

气相色谱质谱法测定饲料中雌酮的不确定度评定

董艳峰,于静泉,梅艳松

(哈尔滨市兽药饲料监察所,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:为了提高测定结果的准确度,通过建立气相色谱质谱联用法测定饲料中雌酮的测量不确定度分析的数学模型,对测量过程中的不确定度来源进行逐项分析和合成,最终得出气质联用法测定饲料中雌酮的不确定度结果。结果表明:雌酮的扩展不确定度为 $0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。此方法可用于气相色谱质谱联用法测定饲料中雌酮的测量不确定度分析,使测定结果更加可靠。

关键词:测量不确定度;GC/M法;雌酮;评定

中图分类号:O657.6;O657.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)12-0063-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.12.0063

饲料是各种畜禽动物摄入外源性激素的主要途径,这些激素类药物不仅会引起动物自身生理特征的变化,而且在动物生长发育的过程中会残留于动物的身体里,通过食物链进入人体,人类长时间进食这些食品,会产生如性早熟、第二特征异常、各种癌症和肿瘤等疾病,最终将会影响人类身体健康。因此,饲料的质量安全是保障人类食品安全的重要基础。农业部陆续发布了如 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》和 1519 号公告《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》等政府文件明确规定了禁止在食用动物饲养中及饮用水中使用如雌酮、己烯雌酚等激素类药物以促进动物快速生长发育或其它相关用途。因此,对饲料中雌酮的含量测定非常必要,本文通过对气相色谱质谱联用法(GC/MS)测定饲料中雌酮的测量不确定度进行分析探讨,并进行了评定。不确定度的评定是国际检测实验室之间互认和通用准则,是一份完整的检测报告应包括的内容^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料

气相色谱-质谱联用仪(GC-MS 化学工作站和 EI 电离源),7890A/5975A(美国 Agilent 公司);HP-5 MS 石英毛细管柱,25 mm×0.32 mm×0.52 μm , (美国 Agilent 公司);雌酮标准品,Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany 公司提供,证书号:

C13213230,含量:99.8%;精密 pH 计,DEL-TA320(德国梅特勒-托利多仪器有限公司);电子分析天平,AB204-N 型(德国梅特勒-托利多仪器有限公司);电子分析天平(精度 0.000 01 g),AB265-S 型(德国梅特勒-托利多仪器有限公司);HLB 固相萃取柱,500 mg/3 mL(美国 Waters 公司);高速冷冻离心机,VELOCITY 18R(澳大利亚 Jouan 公司);N-EVAP-24 氮吹浓缩装置(美国 Organomation 公司)

1.2 方法

饲料中雌酮的测定采用 GC/MS 法。

1.2.1 样品的制备 准确称取 5 g 动物饲料于 50 mL 离心管中,加入 10 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸铵缓冲溶液,匀质 1 min,加入 10 mL 乙醚,漩涡振荡提取 3 min, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取乙醚层于另一试管中,重复乙醚提取一次,合并的乙醚相用旋转蒸发仪蒸干,加入 5 mL 三氯甲烷溶解残余物,漩涡振荡 1 min,加入 5 mL 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液,漩涡振荡 1 min,于 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上层水相移入另一试管中,重复氢氧化钠溶液提取一次,合并氢氧化钠溶液提取液。加入 1 mL 甲醇,用 HCl 调 pH 为 6.0~6.5。

依次用 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 甲醇和 5 mL 的 pH 为 3 的盐酸溶液活化 HLB 柱固相萃取柱,取全部备用液过柱,控制流速不超过 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,再依次用 5 mL 水-甲醇(体积比为 9:1)和 5 mL 正己烷淋洗小柱,将固相萃取柱抽干,最后用 5 mL 甲醇洗脱,用 50°C 氮气吹干。

于试管中加入 100 μL NO-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺+三甲基氯硅烷(99+1)衍生化试剂,于震荡器上混匀,在 70°C 的烘箱中加热 1 h,

收稿日期:2015-07-03

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2014 AB3BN041)

第一作者简介:董艳峰(1969-),女,黑龙江省巴彦县人,高级工程师,从事兽药畜产品安全检验工作。E-mail:13936257839@163.com。

放置冷却后用氮气吹干,加入 200 μL 异辛烷溶解,上机测定。

空白试验、回收率试验采用相同方法操作,采用保留时间定性,以单点外标法定量。

1.2.2 标准品溶液的制备 准确称取 50.10 mg 标准品,用甲醇溶解,定容于 50 mL 容量瓶中,配制成浓度为 $1.002\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准储备溶液。精密量取 1 mL 标准储备液,置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释,再精密量取 2 mL 置 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释,再精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释,即得 $80.16\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的雌酮标准对照溶液。

1.2.3 GC-MS 条件 气相色谱 7890A 质谱 5975C 液相柱:柱长 30 m,内径 0.25 mm,甲基苯基聚硅氧烷涂层,膜厚 0.25 μm 。色谱柱编号:QZZ-001,载气:氦气,流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。进样量:1 μL 。升温程序:柱初始柱温 150°C ,保持 0 min,然后以 $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,升至 180°C (保持 10 min),再以 $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 230°C ,保持 2 min;再以 $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 300°C (保持 1 min)。进样口温度: 250°C ;接口温度: 280°C 。进样方式及进样量:不分流进样,1 μL 。离子源:EI 源,离子源温度: 250°C ;四极杆温度: 100°C ;溶剂延迟:20 min;选择离子监测(m/z):雌酮(218, 257, 342, 343)。

1.2.4 结果计算 定量数学模型: $X = \frac{AC_s V}{A_s W} f$

其中,X:样品中雌酮的残留量($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$);A:样品中雌酮的峰面积;W:样品重量(g); C_s :标准工作液中雌酮的浓度($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); A_s :标准工作液中雌酮的峰面积;V:样液最终定容体积(mL), f :试样稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 标准溶液浓度 C_s 引起的标准不确定度 $u(C_s)$

标准溶液浓度引入的标准不确定度 $u(C_s)$ 来源于标准品的称量、标准溶液配制过程中的稀释、定容等,需分别对各不确定度分量进行评定后再合成^[2]。

2.1.1 称量标准品引入的标准不确定度 $u(m_s)$

准确称取雌酮标准品 50.10 mg,不确定度分量较小,暂不考虑。 $0\leq m\leq 5\text{ g}$ 天平最大允许误差为 $\pm 0.03\text{ mg}$,按均匀分布考虑 $k = \sqrt{3}$ ^[4],则 $u_1(m_s) = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173\text{ mg}$,重复性误差为

$\pm 0.05\text{ mg}$,则 $u_2(m_s) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289\text{ mg}$,

称量标准品引入的标准不确定度为:
 $\sqrt{[u_1(m_s)]^2 + [u_2(m_s)]^2} = 0.0337\text{ mg}$,相对不确定度: $u_{\text{rel}}(m_s) = \frac{u(m_s)}{m_s} = 0.000670$ 。

2.1.2 标准溶液配制过程引入的标准不确定度 $u(V_s)$

① 人员读数引入的标准不确定度 $u_2(V_s)$ 。按照《化学分析中不确定度评估指南》的要求^[5],人员读数可引起 $0.01 V_s$ 的不确定性,按三角分布考虑 $k = \sqrt{6}$,对人员读数引入的标准不确定度进行计算(见表 1)。② 容量瓶和刻度吸管检定引入的标准不确定度 $u_1(V_s)$ 。标准溶液的配制过程中使用了容量瓶和刻度吸管,在检定规程^[4]中查找到相应的最大允差,按均匀分布考虑 $k = \sqrt{3}$,分别计算标准不确定度(见表 2)。归纳这两项,标准溶液配制过程引入的标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_s)$ (见表 3)。

表 1 人员读数引入的标准不确定度

Table 1 Standard uncertainty introduced by personnel reading

玻璃量具 Glass container	人员读数不准确性 Inaccuracy of personnel reading	标准不确定度 Standard uncertainty
50 mL 容量瓶 A 级(使用 4 次)	0.50 mL	$u_2(V_{S/50}) = 0.204\text{ mL}$
1 mL 刻度吸管 A 级	0.01 mL	$u_2(V_{S/1}) = 0.00408\text{ mL}$
2 mL 刻度吸管 A 级	0.02 mL	$u_2(V_{S/2}) = 0.00816\text{ mL}$
5 mL 刻度吸管 A 级	0.05 mL	$u_2(V_{S/5}) = 0.0204\text{ mL}$

$u_{\text{rel}}(m_s)$ 、 $u_{\text{rel}}(V_{S/50})$ 、 $u_{\text{rel}}(V_{S/1})$ 、 $u_{\text{rel}}(V_{S/2})$ 、 $u_{\text{rel}}(V_{S/5})$ 互相独立不相关,故标准品的浓度 C_s

引起的相对标准不确定度为

$$u_{rel}(C_S) = \frac{u(C_S)}{C_S}$$
$$= \sqrt{[u_{rel}(m_S)]^2 + [u_{rel}(V_{S/50})]^2 \times 4 + [u_{rel}(V_{S/1})]^2 + [u_{rel}(V_{S/2})]^2 + [u_{rel}(V_{S/5})]^2}$$
$$= \sqrt{0.000\ 670^2 + 0.004\ 12^2 \times 4 + 0.006\ 16^2 + 0.005\ 35^2 + 0.010^2} = 0.015\ 3$$

表 2 量器校准引入的标准不确定度

Table 2 Standard uncertainty introduced by glass container calibration

玻璃量具 Glass container	最大允差 Maximum allowing difference	标准不确定度 Standard uncertainty
50 mL 容量瓶 A 级(使用 4 次)	±0.05 mL	$u_1(V_{S/50}) = 0.0289\text{ mL}$
1 mL 刻度吸管 A 级	±0.008 mL	$u_1(V_{S/1}) = 0.00462\text{ mL}$
2 mL 刻度吸管 A 级	±0.012 mL	$u_1(V_{S/2}) = 0.00693\text{ mL}$
5 mL 刻度吸管 A 级	±0.025 mL	$u_1(V_{S/5}) = 0.0144\text{ mL}$

表 3 标准溶液配制过程引入的标准不确定度

Table 3 Standard uncertainty introduced by dilution of standard working solution

玻璃量具 Glass container	标准不确定度 Standard uncertainty	相对标准不确定度 Relatively standard uncertainty
50 mL 容量瓶 A 级(使用 4 次)	$\sqrt{0.0289^2 + 0.204^2} = 0.206\text{ mL}$	$u_{rel}(V_{S/50}) = 0.00412$
1 mL 刻度吸管	$\sqrt{0.00462^2 + 0.00408^2} = 0.00616\text{ mL}$	$u_{rel}(V_{S/1}) = 0.00616$
2 mL 刻度吸管	$\sqrt{0.00693^2 + 0.00816^2} = 0.0107\text{ mL}$	$u_{rel}(V_{S/2}) = 0.00535$
5 mL 刻度吸管	$\sqrt{0.0144^2 + 0.0204^2} = 0.0250\text{ mL}$	$u_{rel}(V_{S/5}) = 0.010$

2.2 供试品的峰面积 A 引起的标准不确定度 u(A)

供试品峰面积标准不确定度 u(A)主要来源于气相色谱-质谱仪的定量重复性。根据气相色谱-质谱仪的检定证书给出的定量重复性为 3.6%,按均匀分布^[3],则相对不确定度为

$$u_{rel}(A) = \frac{3.6\%}{\sqrt{3}} = 0.020\ 8$$

2.3 标准品的峰面积 A_S 引起的标准不确定度 u(A_S)

按 2.2 同法分析,可得其相对不确定度 $u_{rel}(A_S) = 0.020\ 8$

2.4 样品处理过程中体积 V 引起的标准不确定度 u(V)

2.4.1 量器校准引起的标准不确定度 u₁(V)
样品处理过程中使用了一系列玻璃量具,计算中只涉及 0.2 mL 分度吸量管 A 级(吹出式),根据检定规程^[4]的要求,最大允差为±0.003 mL,按均匀分布考虑 $k = \sqrt{3}$,标准不确定度 $u_1(V) = \frac{0.003}{\sqrt{3}} = 0.001\ 73$ 。

2.4.2 人员读数引起的标准不确定度 u₂(V)
根据《化学分析中不确定度评估指南》中有关数据^[5],人员读数允许有 1%的不确定性即 0.01

V_S,按三角分布考虑 $k = \sqrt{6}$,标准不确定度 $u_2(V) = \frac{0.01}{\sqrt{6}} = 0.004\ 08$ 。

则样品提取、净化、洗脱过程中体积 V 引起的标准不确定度 $u(V) = \sqrt{u_1(V)^2 + u_2(V)^2} = \sqrt{0.001\ 73^2 + 0.004\ 08^2} = 0.004\ 43$,故相对标准不确定度 $u_{rel}(V) = \frac{u(V)}{V} = \frac{0.004\ 43}{0.2} = 0.022\ 2$

2.5 供试品的称样量 m 引起的标准不确定度 u(m)

称取供试品 5.00 g,根据电子天平检定证书,天平最大允许误差为 0.001 g。按均匀分布考虑,则 $u_1(m) = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 0.000\ 577\text{ g}$,重复性误差和四角误差为 0.002 g,则 $u_2(m) = \frac{0.002}{\sqrt{3}} = 0.001\ 15\text{ g}$,天平校准的标准不确定度为 $u(m) = \sqrt{[u_1(m)]^2 + [u_2(m)]^2} \times 2 = 0.001\ 73\text{ g}$
 $u_{rel}(m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.001\ 73}{5.00} = 0.000\ 346$

2.6 样品检测回收率 R 引入的不确定度 u(R)
采用在空白样品中添加标准溶液的方法进行回收率测试,标准溶液添加浓度为 3 μg·kg⁻¹,共进行了 6 次检测,测定结果见表 4。

表 4 回收率实验测定结果
Table 4 Results of recovery rate

样品编号 Sample umber	1	2	3	4	5	6	平均值 Mean value
回收率/% Recovery rate	91.86	89.46	86.59	93.46	88.49	89.56	89.90

样品检测回收率 R 引入的不确定度

标准偏差

$s(R)=2.23\%$

标准不确定度

$u(R)=\frac{s(R)}{\sqrt{n}}=0.911\%$

则相对标准不确定度

$$\frac{u(X)}{X}=\sqrt{[u_{rel}(c_s)]^2+[u_{rel}(A)]^2+[u_{rel}(A_s)]^2+[u_{rel}(m)]^2+[u_{rel}(V)]^2+[u_{rel}(R)]^2}$$

 $=0.0412$

表 5 (相对)标准不确定度一览表
Table 5 Schedule of(relatively) standard uncertainty

不确定度来源 Source ofuncertainty	相对标准不确定度 Relatively standard uncertainty
标准工作溶液配制引入的标准不确定度	$u_{rel}(c_s)=0.0153$
样液的峰面积引入的标准不确定度	$u_{rel}(A)=0.0208$
标准品工作液的峰面积引入 的标准不确定度	$u_{rel}(A_s)=0.0208$
样品提取、净化、衍生化过程中体积 V 引起的标准不确定度	$u_{rel}(V)=0.0222$
样品称量引入的不确定度	$u_{rel}(m)=0.000346$
样品处理操作过程的差异回收率 R 引入的不确定度	$u_{rel}(R)=0.0101$

3.2 扩展不确定度

由实验数据计算得样品中雌酮含量为

$u_{rel}(R)=\frac{u(R)}{R}=0.0101$

3 测量结果的表示

3.1 合成标准不确定度

将上述标准不确定度各分量进行汇总(见表 5)。

将表 4 中各相对不确定度合成：

3.22 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，则合成标准不确定度为 $u(X)=3.22\times0.0412=0.133\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ；取包含因子 $k=2$ ，故扩展不确定度为： $U=2u(X)=2\times0.133=0.27\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3.3 测量结果的表示

饲料中雌酮测量结果可表示为 $(3.22\pm0.27)\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $k=2$ 。

参考文献：

[1] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999, 测不确定度评定与表示[S].
[2] 林晓莉, 董艳峰, 于静泉. 高效液相色谱法测定鸡肉中恶唑酸残留量的测量不确定度评定[J]. 食品科学, 2009(2): 32-33.
[3] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1135-2005, 化学分析测量不确定度评定[S].
[4] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 196-2006, 常用玻璃量器[S].
[5] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006: 144.

Evaluation of Measurement Uncertainty in Determination of Estrone in Feed by Gas Chromatography-mass Sepectrometry

DONG Yan-feng, YU Jing-quan, MEI Yan-song

(Institute of Veterinary Drug and Food Control in Harbin, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: In order to improve the accuracy of determination results, the mathematical model to estimate the uncertainty of Gas Chromatography-mass Sepectrometry in measuring of estrone in feed had been constructed. Furthermore, by termwise analyzing and synthesizing the sources, which caused uncertainty in the measuring process, results of the measurement uncertainty of GC/MS in measuring the estrone in feed had been put forward. The results showed that uncertainty for estrone was 0.27 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The established mathematic model was reasonable and relible, it was applicable to the uncertainty analysis of Gas Chromatography-mass Sepectrometry in measuring of estrone in feed.

Keywords: measurement uncertainty; GC/MS; estrone; evaluation