

气相色谱质谱法测定饲料中雌二醇的测量 不确定度分析

张 巍

(哈尔滨市兽药饲料监察所,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:通过建立测量不确定度的数学模型,对气相色谱质谱联用(GC/MS)法测量饲料中雌二醇的测量不确定度进行计算和分析,找出其主要的影响因素。结果表明:饲料中雌二醇含量测量不确定度为($k=2, p=95\%$ 时)(1.53 ± 0.112) $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

关键词:不确定度;气相色谱质谱联用(GC/MS)法;饲料;雌二醇

中图分类号:S816.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)10-0079-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.10.0079

17 β -雌二醇(E2),是一种常见的人工合成雌激素,被认为是最具潜在影响、作用最强烈的雌激素之一,具有污染范围广、危害大等特点,即使在极低的浓度下($1.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)也会对生物体产生明显的影响^[1]。如果孕妇在妊娠期间使用雌二醇,将可能导致胎儿畸形,并且出生后的女婴会生殖道异常,甚至在其成年后会导致阴道癌或宫颈癌的发生率极高。雌二醇还能够通过乳汁排出,因此哺乳期的妇女也是禁用的。如果雌二醇在人体内含量过高,则会造成女性性早熟、妊娠(尤其双胎或多胎)、雌激素分泌瘤、卵巢肿瘤、无排卵性子宫功能出血和肝硬化等;而男性则会引发性腺功能紊乱导致其女性化特征,男性乳房发育并第二性征消失,性器官萎缩等。饲料是动物性食品的源头,而激素类药物的摄入不但会引发动物的自身生理疾病,并且还会残留在动物体内,通过食物链被人体摄入,人类如果长时间摄入含有激素类的食品,就会引发生殖系统疾病并致癌。所以,饲料的质量安全对于人类的食品安全是至关重要的。农业部在2002年发布第235号公告——《动物性食品中兽药最高残留限量》中明确指出,雌二醇在动物性食品的可食用部分中要求不得检出^[2]。

通过建立气相色谱质谱联用(GC/MS)法测定饲料中雌二醇不确定度的数学模型,对影响测量结果的各不确定度分量进行计算、评定与分

析^[3],找出影响测量结果的主要因素,并且对其进行持续的改进,进而使得实验室质量控制流程可以更加完善。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器 气相色谱-质谱联用仪(型号为7890A/5975C),由美国Agilent公司生产;电子天平(型号为AR2140),由德国梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;电子天平(型号为AB265-S,精度 0.01 mg),由德国梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;高速冷冻离心机(型号为CT15RT),由上海天美生化仪器设备工程有限公司生产;氮吹浓缩装置(型号为N-EVAP-24),由美国Organomation公司生产;HLB固相萃取柱,(规格为 $500 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}^{-1}$),由美国Waters公司生产。

1.1.2 试剂 雌二醇对照品(证书号为C13213100,含量为98.4%),由Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany生产。N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺+三甲基氯硅烷(BSTFA:TMCS=99:1, BSTFA+1%)衍生化试剂,由上海安普实验科技股份有限公司提供。甲醇(色谱级),由德国默克股份两合公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 检测方法 采用气相色谱质谱联用(GC/MS)法测定饲料中雌二醇。

(1)提取:称取粉碎过的饲料5.0 g置50 mL离心管中,加入10 mL的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵缓冲溶液,匀质1 min,加入10 mL无水乙醚,振荡提取3 min, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,移取乙醚,

收稿日期:2016-08-09

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2014AB3BN041)

作者简介:张巍(1973-),女,辽宁省新民县人,学士,高级兽医师,从事饲料及兽药检测工作。E-mail:13100881825@163.com。

再次加入 10 mL 无水乙醚重新提取一次,合并乙醚并且旋蒸,残余物用 5 mL 三氯甲烷进行溶解,振荡 1 min,加入 5 mL 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液,振荡 1 min, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上层水相移入到新的离心管中,加入 5 mL 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液重新提取一次,合并提取液,加入 1 mL 甲醇,用 pH 为 6.0~6.5 的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸进行调节,备用。(2) 净化:依次加入 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 甲醇、5 mL pH=3 的盐酸溶液活化 HLB 小柱,取备用液过柱,控制流速不得超过 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,再依次用 5 mL 水-甲醇(水-甲醇=9:1)和 5 mL 正己烷淋洗 HLB 小柱,抽干后用 5 mL 甲醇洗脱,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沙浴氮气吹干。

(3) 衍生化:在反应试管中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 衍生化试剂,混合 30 s, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温干燥箱中衍生 1 h,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沙浴氮气吹干,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 异辛烷溶解振荡,混匀 10 s 后待测。

同法同时操作空白实验、回收率实验,并且用外标法定量。

1.2.2 标准溶液的配制 准确称取 50.01 mg 雌二醇标准品(纯度为 98.4 %),用甲醇定容至 50 mL 容量瓶中,该溶液为 $1.000\,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液。精密量取 1.0 mL 该标准储备液,用甲醇定容至 50 mL,配制成浓度为 $0.020\,004 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液;再量取此标准溶液 2.0 mL 用甲醇定容至 50 mL,配制成浓度为 $0.800\,16 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液;量取此溶液 5.0 mL 用甲醇定容至 50 mL,逐步稀释即得 $80.02 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的雌二醇标准对照溶液。

1.2.3 色谱条件 气相色谱-质谱联用仪(型号为 7890 A/5975 C),离子源为 EI 源,离子源温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;四极杆温度为 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样口温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;接口温度: $280\text{ }^{\circ}\text{C}$;溶剂延迟时间为 20 min;载气为氦气(纯度 99.999%),流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,不分流模式,进样量为 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。色谱柱编号:QZZ-001,液相柱 30 m 柱长, 0.25 mm 内径,甲基苯基聚硅氧烷涂层,膜厚 $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 。选择离子监测(质子数/电荷数):雌二醇为(232, 285, 416, 417)。

1.2.4 定量数学模型 $X = \frac{AC_s V}{A_s W} f$ 其中 X:样品中雌二醇的残留量($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$); A:样品中雌二醇的峰面积($\mu\text{V} \times \text{sec}$); W:样品重量(g); C_s :标

准工作液中雌二醇的浓度($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); A_s :标准工作液中雌二醇的峰面积($\mu\text{V} \times \text{sec}$); V:样液最终定容体积(mL), f:试样稀释倍数。

1.2.5 不确定度的主要来源分析 气相色谱质谱联用(GC/MS)法检测饲料中雌二醇含量过程中不确定度的主要来源包括:样品称量、样品定容、标准溶液配制、样品峰面积、对照品峰面积、样品测量重复性等 6 个方面^[4]。

2 结果与分析

2.1 不确定度分量的评定

2.1.1 样品称量引入的标准不确定度 $u(m)$ 分量 用 AR 2140 型电子天平称量 5.00 g 样品,取均匀分布, $k = \sqrt{3}$ 。根据电子天平的检定证书:天平偏载误差为 0.1 mg,则: $u_1(m) = 0.000\,058 \text{ g}$;天平重复性为 0.1 mg,则: $u_2(m) = 0.000\,058 \text{ g}$; $0 \leq m \leq 50 \text{ g}$ 天平示值误差为 0.1 mg,则: $u_3(m) = 0.000\,058 \text{ g}$;该校准天平的三者合成标准不确定度为: $u(m) = \sqrt{[u_1(m)]^2 + [u_2(m)]^2 + [u_3(m)]^2} = 0.000\,10 \text{ g}$,该天平样品称量的相对标准不确定度为: $u_{rel}(m) = \frac{u(m)}{m} = 0.000\,02$ 。

2.1.2 样品定容体积引入的标准不确定度 $u(V)$ 分量 (1)量器校准引入的标准不确定度 $u_1(V)$ 分量依据 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[5]中的相关规定:0.2 mL A 级分度吸量管的最大允差为 $\pm 0.003 \text{ mL}$,取均匀分布, $k = \sqrt{3}$ 。则标准不确定度为 $u_1(V) = 0.001\,73$ 。(2)人员读数引入的标准不确定度 $u_2(V)$ 分量根据 CNAS-GL06《化学分析中不确定度评估指南》中有关数据^[6],人员读数允许有 1 % 的不确定性,取三角分布, $k = \sqrt{6}$ ^[7],则标准不确定度 $u_2(V) = 0.004\,08$ 。则样品在定容体积过程中两者合成的标准不确定度为: $u(V) = \sqrt{u_1(V)^2 + u_2(V)^2} = 0.004\,43$,该样品在定容体积中引入的相对标准不确定度为: $u_{rel}(V) = \frac{u(V)}{V} = 0.002\,22$ 。

2.1.3 标准溶液配制引入的标准不确定度 $u(C_s)$ 分量 对照品的纯度、称量、定容等都可以对其浓度的标准不确定度 $u(C_s)$ 分量产生影响,需要分别分析各分量然后再合成。

(1) 标准物质纯度引入的标准不确定度 $u_{rel}(C)$ 分量:根据厂家提供的标准物质证书,得知

雌二醇的纯度为 98.4%, 不确定度为 $U=1.6\%$, 按照正态分布, 包含因子 $k=2$, 则标准不确定度为 $u(C)=\frac{U}{k}=0.8\%$, 标准物质纯度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C)=0.008\ 13$ 。

(2) 标准物质称量引入的标准不确定度 $u(m_s)$ 分量: 用 AB265 -S 型电子天平准确称取 50.01 mg 雌二醇对照品。根据电子天平的检定证书: 天平偏载误差为 0.02 mg, 取均匀分布, $k=\sqrt{3}$, 则 $u_1(m_s)=0.000\ 012\ \text{g}$; 天平重复性误差为 0.02 mg, 则 $u_2(m_s)=0.000\ 012\ \text{g}$; 当称样量 $0\leq m\leq 5\ \text{g}$ 时, 天平示值误差为 0.02 mg, 则 $u_3(m_s)=0.000\ 012\ \text{g}$; 标准物质称量合成的标准不确定度为: $u(m_s)=\sqrt{[u_1(m_s)]^2+[u_2(m_s)]^2+[u_3(m_s)]^2}=0.000\ 02\ \text{g}$, 其校准天平标准物质称量引入的相对不确定度为: $u_{\text{rel}}(m_s)=\frac{u(m_s)}{m_s}=0.000\ 40$ 。

(3) 标准溶液定容引入的标准不确定度

表 1 标准溶液定容体积引入的标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_S)$

Table 1 Standard uncertainty of volume introduction of standard solution $u_{\text{rel}}(V_S)$

量器校准引起的标准不确定度 Standard uncertainty due to calibrator calibration			人员读数引起的标准不确定度 Standard uncertainty due to personnel readings			定容稀释引起的标准不确定度 Standard uncertainty due to constant volume dilution	
玻璃器具 Glassware	最大允差/m LMaximum tolerance	标准不确 定度/mL Standard Uncertainty 取 $k=\sqrt{3}$	人员读数不 准确性/mL Standard uncertainty due to personnel readings	标准不确 定度/mL Standard Uncertainty 取 $k=\sqrt{6}$		合成标准不 确定度/mL Synthetic standard uncertainty	相对标准不 确定度 Relative standard uncertainty
A 级单标线 50 mL 容量瓶 A-level single-standard line 50 mL volumetric flask	±0.05	$u_1(V_{S/50})=0.028\ 87$	0.5	$u_2(V_{S/50})=0.204\ 12$	$\sqrt{0.02887^2+0.20412^2}=0.206\ 02$	$u_{\text{rel}}(V_{S/50})=0.004\ 12$	
1.0 mL A 级分度吸量管 1.0 mL A level indexing pipette	±0.008	$u_1(V_{S/1})=0.004\ 62$	0.01	$u_2(V_{S/1})=0.004\ 08$	$\sqrt{0.00462^2+0.00408^2}=0.006\ 16$	$u_{\text{rel}}(V_{S/1})=0.006\ 16$	
2.0 mL A 级分度吸量管 2.0 mL A level indexing pipette	±0.012	$u_1(V_{S/2})=0.006\ 93$	0.02	$u_2(V_{S/2})=0.008\ 16$	$\sqrt{0.00693^2+0.00816^2}=0.010\ 71$	$u_{\text{rel}}(V_{S/2})=0.005\ 36$	
5.0 mL A 级分度吸量管 5.0 mL A level indexing pipette	±0.025	$u_1(V_{S/5})=0.014\ 43$	0.05	$u_2(V_{S/5})=0.020\ 41$	$\sqrt{0.01443^2+0.02041^2}=0.025\ 00$	$u_{\text{rel}}(V_{S/5})=0.005\ 00$	

因此标准溶液配制引入的相对标准不确定度为:

$u(V_S)$ 分量:

①雌二醇对照品在标准溶液配制过程中使用经过校准的 50 mL 容量瓶引入的标准不确定度为 $u_1(V_S)$ 。依据 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[5] 中的相关规定: A 级单标线 50 mL 容量瓶的最大允差为 $\pm 0.05\ \text{mL}$, 取均匀分布, $k=\sqrt{3}$ 。标准溶液配制步骤详见 1.2.2。本试验中逐步稀释溶液时使用了 4 次 A 级单标线 50 mL 容量瓶, 1.0、2.0、5.0 mL A 级分度吸量管各一次, 彼此之间是互相独立不相关的操作。

②对照品溶液配制过程中人员读数引入的标准不确定度 $u_2(V_S)$ 。根据 CNAS-GL06《化学分析中不确定度评估指南》^[7] 中有关数据^[7], 人员读数允许有 1% 的不确定性, 取三角分布, 取 $k=\sqrt{6}$ ^[7]。

③标准溶液定容体积引入的标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_S)$ (见表 1)。

$$\sqrt{[u_{\text{rel}}(C)]^2+[u_{\text{rel}}(m_s)]^2+[u_{\text{rel}}(V_{S/30})]^2\times 4+[u_{\text{rel}}(V_{S/1})]^2+[u_{\text{rel}}(V_{S/2})]^2+[u_{\text{rel}}(V_{S/5})]^2}$$

=0.015 03。

2.1.4 样品的峰面积 A 引入的标准不确定度分量 $u(A)$ 分量 峰面积引入的标准不确定度主要由测定仪器—气相色谱-质谱联用仪产生,来源主要是:测量重复性;信噪比校准。

其标准不确定度分量的评定由仪器检定证书提供:测量重复性为 3.01%,取均匀分布, $k = \sqrt{3}$, 则相对不确定度为: $u_{rel}(A_1) = 0.01738$ 。

信噪比测量结果不确定度为 5.0%, $k = 2$, 信噪比测量结果的标准不确定度 $u(A_2) = 0.025$, 取均匀分布, $k = \sqrt{3}$, 则 $u_{rel}(A_2) = 0.01443$ 。合成不确定度 $u_{rel}(A) = \sqrt{u_{rel}(A_1)^2 + u_{rel}(A_2)^2} = 0.02259$ 。

2.1.5 雌二醇对照品的峰面积 A_s 引入的标准不确定度 $u(A_s)$ 分量 其引入标准不确定度分量同 3.4:测量重复性为 3.01%,相对不确定度为: $u_{rel}(A_s) = 0.01738$ 。

信噪比测量结果不确定度为 5.0%,标准不确定度 $u_{rel}(A_s) = 0.01443$ 。合成不确定度 $u_{rel}(A_s) = \sqrt{u_{rel}(A_s)^2 + u_{rel}(A_s)^2} = 0.02259$ 。

2.1.6 样品测量重复性引入的标准不确定度 $u(R)$ 分量 称取 6 份不含雌二醇的空白饲料样品,添加浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的标准样品,在相同的条件下做加标回收实验,测定浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 分别为: 1.817、1.798、1.774、1.801、1.786、1.783;回收率 (%) 分别为: 90.85、89.90、88.70、90.05、89.30、89.15;平均值 $\bar{x} = 89.66\%$,其重复

性标准偏差为 $s(R) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.766$

43,相对标准偏差就是标准不确定度则 $u(R) =$

$\frac{s(R)}{\bar{x}} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \times 100\% = 0.85\%$,其相

对标准不确定度为: $u_{rel}(R) = \frac{u(R)}{\bar{R}} = 0.00948$ 。

回收率为 88.70%~90.85%,表明此方法的准确性较高。

2.2 合成和扩展不确定度

2.2.1 合成标准不确定度 通过合成得到的相对合成标准不确定度:

$$\frac{u(X)}{X} = \sqrt{[u_{rel}(m)]^2 + [u_{rel}(V)]^2 + [u_{rel}(C_s)]^2 + [u_{rel}(A)]^2 + [u_{rel}(A_s)]^2 + [u_{rel}(R)]^2} = 0.0366$$

2.2.2 扩展不确定度分量的分析 样品中雌二醇含量为 $1.53 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,在一般情况下,取包含因子 $k = 2$,置信水平 95% 时,则测量结果的合成标准不确定度为 $u(X) = 0.056 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;其测量结果的扩展不确定度为: $U = ku(X) = 0.112 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.3 不确定度结果

饲料中雌二醇含量测量不确定度为: ($k = 2$, $p = 95\%$ 时) $(1.53 \pm 0.112) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 张静,郭少华. 环境雌激素对鱼类免疫系统的影响[J]. 科技信息, 2012(5): 266.
- [2] 董艳峰,于静泉,梅艳松. 气相色谱质谱法测定饲料中雌酮的不确定度评定[J]. 黑龙江农业科学, 2015(12): 63-65.
- [3] 王宇,孔祥瑞,李成久. 气相色谱-质谱法测定水产品中已烯雌酚的不确定度分析评定[J]. 水产科学, 2016(3): 284-288.
- [4] 林小莉,张巍,董艳峰. 高效液相色谱法测定青霉素钠含量的测量不确定度评定[J]. 中国兽药杂志, 2009(4): 25-28.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. JJG196-2006. 常用玻璃量器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007: 7-8.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL06 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.
- [7] 林小莉,于静泉,董艳峰. HPLC 法测定鸡肉中氟甲唑残留量的测量不确定度评定[J]. 湖北农业科学, 2009(4): 965-968.

Analysis of Measurement Uncertainty in Determination of Estradiol in Feed by Gas Chromatography-mass Spectrometry

ZHANG Wei

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

Abstract: Through establishing the mathematical model of uncertainty measurement, the uncertainty of Gas Chromatography-mass Spectrometry in measuring of Estrone in feed was constructed and estimated. Furthermore, the sources were analyzed and synthesized by termwise, the influencing factors were found out caused uncertainty in the measuring process. The results showed that the measurement uncertainty of GC/MS in measuring the Estrone in feed was put forward by $k = 2$, $P = 95\%$, $(1.53 \pm 0.112) \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

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