

液相色谱 - 串联质谱法测定动物尿液中 11 种 β - 受体激动剂残留量的不确定度评估

周 炜, 应永飞, 韦敏珏, 陆春波, 林仙军, 罗成江, 张志健, 朱聪英*

(浙江省兽药监察所, 杭州 310020)

[收稿日期] 2013 - 01 - 05 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2013) 06 - 0044 - 06 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 采用液相色谱 - 串联质谱法测定动物尿液中 11 种 β - 受体激动剂残留量, 对标准溶液、体积、质谱峰面积、浓缩过程及回收率等测定不确定度因素进行了分析, 通过评定各不确定度分量及标准不确定度, 得出 11 种 β - 受体激动剂的扩展不确定度在 0.7 ~ 1.1 ng/mL 范围内。由各因素对合成不确定度的贡献比分析可知, 影响较大的因素为试验回收率及标准溶液浓度。

[关键词] 不确定度; β - 受体激动剂; 液相色谱 - 串联质谱; 评估

Evaluation on Uncertainty of Measurement in the Determination of β - Receptor Agonists in Animal Urine by Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry

ZHOU Wei, YING Yong - fei, WEI Min - jue, LU Chun - bo, LIN Xian - jun,

LUO Cheng - jiang, ZHANG Zhi - jian, ZHU Cong - ying*

(Zhejiang Provincial Supervisory Institute of Veterinary Drug, Hangzhou 310020, China)

Abstract: Evaluation on uncertainty of measurement in the determination of 11 kinds of β - receptor agonists in animal urine by liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC - MS/MS) was practiced. The main factors, including standard solution, volume, mass chromatographic peak area, enrichment process and recovery were analyzed. The combined uncertainty was finally obtained by synthesizing the uncertainties of various components. The expanded uncertainty of 11 kinds of β - receptor agonists was in the range of 0.7 ~ 1.1 ng/mL. According to the contribution of all components, the key ones that affected the combined uncertainty were the concentrations of standards and the recoveries.

Key words: uncertainty; β - receptor agonists; LC - MS/MS; evaluation

β - 受体激动剂可促进动物肌肉生长并促进脂肪组织的分解代谢, 因而统称“瘦肉精”。从 20 世纪末供港活猪引发的瘦肉精中毒事件到双汇收购“健美猪”事件, 瘦肉精引发的公共事件层出不穷, 且有愈演愈烈的趋势。为配合农业行政主管部门有效、有力地打击动物养殖环节非法使用瘦肉精的

行为, 检测机构对饲料、动物可食性组织及动物尿液中 β - 受体激动剂残留检验的准确性和精确度的要求也日趋增高。

在检测过程中, 受人员、仪器、材料、方法及环境等诸多因素的影响, 测量结果可能出现较大波动, 因而对测定结果的评定需要统一的度量尺度,

作者简介: 周 炜, 博士, 从事兽药及畜产品质量安全检测工作。

通讯作者: 朱聪英。E - mail: zjxm_zcy@163.com

目前国际上推荐使用不确定度来评估分析测试结果的质量。不确定度越小,分析测试结果越可靠,因此,测量不确定度是测量结果质量的定量表征^[1]。本文依据农业部 1063 号公告-3-2008《动物尿液中 11 种 β -受体激动剂的检测液相色谱-串联质谱法》^[2]测定动物尿液中 11 种 β -受体激动剂,分析检测过程中不确定度的来源,依据 ISO/IEC17025^[3]及中国实验室国家认可委员会发布的《化学分析中不确定度的评估指南》^[4]的要求,计算各个过程中所产生的不确定度,分析各因素对合成不确定度的贡献比,为完善实验操作提供理论依据以及正确使用检测数据提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪串联质谱仪(Agilent 1290-AB 5500 Q-Trap,配 ESI 离子源);Waters MCX 固相萃取小柱(60 mg, 3 mL);离心机;氮吹仪;pH 计。

1.2 试剂 叔丁基甲醚、叔丁醇、氢氧化钠、氨水均为分析纯;甲醇、甲酸均为色谱纯。标准品:盐酸克伦特罗(中国计量科学研究院,99.1%)、沙丁胺醇(Dr. Ehrenstorfer,95.0%)、盐酸莱克多巴胺(中国计量科学研究院,95.8%)、齐帕特罗(T. R. C. MC,90.0%)、氯丙那林(Witega,99.7%)、硫酸特布他林(Dr. Ehrenstorfer,99.0%)、西马特罗(中国计量科学研究院,99.9%)、西布特罗(Witega,99.6%)、马布特罗(Dr. Ehrenstorfer,99.0%)、盐酸溴布特罗(Dr. Ehrenstorfer,98.5%)、班布特罗(Dr. Ehrenstorfer,98.0%)、D₉-克伦特罗(Dr. Ehrenstorfer,98.4%)、D₃-沙丁胺醇(Dr. Ehrenstorfer,98.0%)、D₃-盐酸莱克多巴胺(PowerCDN,97.1%)。

1.3 对照溶液及内标溶液配制

1.3.1 对照溶液的配制 分别精密称取 11 种 β -受体激动剂类药物对照品 10 mg 至 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,作为 1 mg/mL 标准储备液。分别吸取 11 种 β -受体激动剂标准储备液 10 μ L,置同一 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,作为 1 μ g/mL 标准工作液。

1.3.2 内标溶液的配制 分别精密称取 D₉-克伦特罗、D₃-沙丁胺醇、D₃-盐酸莱克多巴胺对照品 10 mg 至 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,作为 1 mg/mL 内标储备液。分别吸取上述三种内

标储备液 10 μ L,置同一 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,作为 1 μ g/mL 内标工作液。

1.3.3 混标上机液的配制 分别精密量取浓度均为 1 μ g/mL 的标准工作液和内标工作液 100 μ L,置同一 10 mL 玻璃管中,收集阴性样本洗脱液 5 mL 后,同试样操作,作为 100 ng/mL 混标上机液。

1.4 测定方法 精密量取 5.00 mL 动物尿液样本,置于 50 mL 离心管中,加入 100 ng/mL 内标工作液 100 μ L,涡漩混匀,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 9~10。加入叔丁醇-叔丁基甲醚(60:40,V:V)10 mL,充分振荡,10000 r/min 离心 3 min,将上清液转入另一 50 mL 离心管中,重复提取一次,合并上清液,60 $^{\circ}$ C 氮吹至干。加入 0.2% 甲酸水溶液 3 mL,超声使溶解后,涡漩混匀备用。

MCX 固相萃取小柱依次用甲醇、水 3 mL 活化。取提取液过柱,并依次用 0.2% 甲酸水溶液、甲醇 3 mL 淋洗,挤干。用 5% 氨水甲醇溶液 5 mL 洗脱,收集洗脱液,60 $^{\circ}$ C 氮吹至干。精密加入 0.2% 甲酸水溶液 1 mL,超声使溶解后,涡漩混匀,经 0.22 μ m 水系微孔滤膜滤过,进样测定。

1.5 检测条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Waters Atlantis dC18 柱(3.0 mm $\times$ 150 mm,粒径 3 μ m);流动相及流速见表 1;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 5 μ L。

表 1 流动相组成和流速

时间/min	流速/ (μ L $\cdot$ min ⁻¹)	A/% 0.2% 甲酸	B/% 甲醇
0	300	90	10
5	300	40	60
6	300	10	90
8.5	300	10	90
8.6	300	90	10
14	300	90	10

1.5.2 质谱条件 电喷雾离子源;正离子扫描;多反应监测;离子源电压 5500 V;辅助加热气温度 500 $^{\circ}$ C;气帘气流速:40 L/h;脱溶剂流速:中等;离子源气流速:雾化气和辅助气均为 45 L/h;驻留时间 20 ms;11 种 β -受体激动剂及 3 种内标化合物的定性、定量离子对及锥孔电压等质谱参数见表 2。

表 2 11 种 β-受体激动剂及 3 种内标化合物的定性、定量离子对及锥孔电压等质谱参数

	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压/V	碰撞室入口 电压/V	碰撞电压/V	碰撞室出口 电压/V
莱克多巴胺	302. 2	164. 1 *	57	6	23	14
		121. 0	57	6	31	19
克伦特罗	276. 7	203. 0 *	55	3	21	12
		259. 1	55	3	14	15
沙丁胺醇	240. 2	148. 0 *	55	3	26	18
		222. 2	55	3	15	18
特布他林	226. 2	152. 1 *	46	5	22	17
		170. 1	46	5	16	12
西马特罗	220. 2	202. 2 *	35	5	13	17
		160. 1	35	5	23	18
马布特罗	311. 0	237. 1 *	69	6	27	15
		217. 1	69	6	35	11
氯丙那林	213. 7	154. 1 *	53	3	23	13
		196. 2	53	3	16	13
齐帕特罗	262. 2	244. 1 *	41	11	19	23
		185. 1	41	11	33	16
西布特罗	233. 8	160. 2 *	63	3	20	10
		216. 2	63	3	13	13
班布特罗	367. 7	294. 2 *	53	3	26	20
		72. 0	53	3	67	10
溴布特罗	367. 0	292. 9 *	60	3	26	14
		349. 0	60	3	17	13
D ₃ -莱克多巴胺	307. 1	167. 2	55	4	22	8
D ₃ -沙丁胺醇	242. 7	151. 2	55	4	26	7
D ₉ -克伦特罗	285. 7	204. 1	55	7	23	15

注: * :定量离子。

2 结果与讨论

2.1 测量不确定度的数学模型 按公式(1)计算试样中 11 种 β-受体激动剂药物残留量:

$$C_x = \frac{C_s \times C_i \times A_x \times A_{si} \times V \times v_s}{C_{si} \times A_i \times A_s \times R \times v_x} \tag{1}$$

$$V = \frac{V_{\text{定容}}}{V_x} \tag{2}$$

上述两个公式中: C_x 为试样中被测物残留量(μg/L); C_s 为混标上机液中被测物的浓度

(μg/L); C_i 为试样中相应内标物的浓度(μg/L); A_x 为试样中被测物的峰面积; A_{si} 为混标上机液中相应内标物的峰面积; V 为体积浓缩系数; v_s 为混标上机液进样量(μL); C_{si} 为混标上机液中相应内标物的浓度(μg/L); A_i 为试样中相应内标物的峰面积; A_s 为混标上机液中被测物的峰面积; R 为回收率; v_x 为试样进样量(μL); $V_{\text{定容}}$ 为试样最终定容体积(mL); V_x 为试样取样体积(mL)。

2.2 测量不确定度的来源及合成

$u_{rel} = \sqrt{u_{rel}^2(C_s) + u_{rel}^2(C_i) + u_{rel}^2(A_x) + u_{rel}^2(A_{si}) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(v_s) + u_{rel}^2(C_{si}) + u_{rel}^2(A_i) + u_{rel}^2(A_s) + u_{rel}^2(R) + u_{rel}^2(v_x)}$

(1)混标上机液中被测物浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_s)$; (2)试样中相应内标物浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_i)$; (3)试样中被测物峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_x)$; (4)混标上机液中相应内标物峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_{si})$; (5)浓缩过程的相对标准不确定度 $u_{rel}(V)$; (6)混标上机液进样体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(v_s)$; (7)混标上机液中相应内标物浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_{si})$; (8)试样中相应内标物峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_i)$; (9)混标上机液中被测物的峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_s)$; (10)回收率的相对标准不确定度 $u_{rel}(R)$; (11)试样进样体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(v_x)$ 。

2.3 各项不确定度的计算

2.3.1 混标上机液中被测物及相应内标物浓度的不确定度 $u_{rel}(C_s)$ 、 $u_{rel}(C_i)$ 及 $u_{rel}(C_{si})$ (B 类不确定度)

2.3.1.1 标准品纯度引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{A})$

由供应商(或证书)提供的11种 β -受体激动剂类药物标准品及3种内标物标准品纯度及其引起的相对标准不确定度分别为:盐酸莱克多巴胺:0.02;盐酸克伦特罗:0.008;沙丁胺醇:0.02;硫酸特布他林:0.005;西马特罗:0.02;马布特罗:0.005;氯丙那林:0.001;齐帕特罗:0.005;西布特罗:0.0005;班布特罗:0.005;盐酸溴布特罗:0.01; D_9 -克伦特罗:0.005; D_3 -盐酸莱克多巴胺:0.005; D_3 -沙丁胺醇:0.005。

2.3.1.2 标准品称量引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{B})$

(1)天平称量变动性:标准偏差0.02 mg;

(2)天平最大允许误差: ± 0.1 mg, $p = 95\%$;故 $u = 0.1/1.96 = 0.0510$ mg;

此分量的合成标准不确定度: $\sqrt{0.02^2 + 0.051^2} = 0.0548$ mg;相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(\text{B}) = 0.0548$ mg/10 mg = 0.0055。

2.3.1.3 配制标准储备液引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{C})$

(1)容量瓶体积:10 mL A级容量瓶检定证书给定为 ± 0.01 mL,均匀分布, $u = 0.01/\sqrt{3} = 0.0058$ mL;

(2)定容至刻度的变动性:重复定容10次的标准偏差为0.015 mL;

(3)温度:一般假设温度变化为 ± 3 °C,溶剂以水为代表,在20 °C时膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \cdot \text{°C}^{-1}$,

则 $p = 95\%$ 时体积变化区间为 $\pm 10 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} = 0.0063$ mL,标准偏差为 $0.0063/1.96 = 0.0032$ mL。

此分量的合成标准不确定度:

$\sqrt{0.0058^2 + 0.015^2 + 0.0032^2} = 0.0164$ mL;相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(\text{C}) = 0.0164$ mL/10 mL = 0.0016。

2.3.1.4 配制混标上机液引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{D})$

10 mL 容量瓶 $u(V_{10 \text{ mL}})$ 检定证书给出误差为: ± 101.3 μL ,均匀分布, $u(V_{10 \text{ mL}}) = 0.1013/\sqrt{3} = 0.0585$ mL;重复定容10次的标准偏差为0.0907 mL; $p = 95\%$ 时体积变化区间为 $\pm 10 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} = 0.0063$ mL,标准偏差为 $0.0063/1.96 = 0.0032$ mL;分量的合成标准不确定度: $\sqrt{0.0585^2 + 0.0907^2 + 0.0032^2} = 0.1080$ mL;相对标准不确定度: 0.1080 mL/10 mL = 0.0108。

由1 mg/mL 稀释至100 ng/mL,稀释因子为 $f_{100-0.1}$ 和 $f_{1-0.1}$;10 ~ 100 μL 移液器 $u(V_{100 \mu\text{L}})$ 检定证书给出误差为: ± 1.00 μL ,100 ~ 1000 μL 移液器 $u(V_{1 \text{ mL}})$ 检定证书给出误差为: ± 1.18 μL ;均采用均匀分布,因此: $u(V_{100 \mu\text{L}}) = 0.001/\sqrt{3} = 0.0006$ mL; $u_{\text{rel}}(V_{100 \mu\text{L}}) = 0.0006/0.1 = 0.0060$; $u_{\text{rel}}(V_{1 \text{ mL}}) = 0.0007/1 = 0.0007$; $u(V_{1 \text{ mL}}) = 0.0012/\sqrt{3} = 0.0007$ mL;

$$u(f_{100-0.1}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_{100 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{100 \text{ mL}})^2} = \sqrt{0.0060^2 + 0.0108^2} = 0.0124;$$

$$u(f_{1-0.1}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_{100 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{100 \mu\text{L}})^2 + u_{\text{rel}}(V_{1 \text{ mL}})^2} = \sqrt{0.0060^2 + 0.0060^2 + 0.0007^2} = 0.0085;$$

合成相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(\text{D}) = \sqrt{0.0124^2 + 0.0085^2} = 0.0150$;标准不确定度 = 100 ng/mL $\times 0.0150 = 1.500$ ng/mL。

综合上述 A、B、C、D 四项,可由 $\sqrt{u_{\text{rel}}(\text{A})^2 + u_{\text{rel}}(\text{B})^2 + u_{\text{rel}}(\text{C})^2 + u_{\text{rel}}(\text{D})^2}$ 计算出混标上机液中被测物及相应内标物浓度所引起的不确定度,结果如下: $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{莱克多巴胺}}) = 0.0256$;
 $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{克伦特罗}}) = 0.0179$; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{沙丁胺醇}}) = 0.0256$;
 $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{特布他林}}) = 0.0168$; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{西马特罗}}) = 0.0256$;
 $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{马布特罗}}) = 0.0168$; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{氯丙那林}}) = 0.0161$;
 $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{齐帕特罗}}) = 0.0168$; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{西布特罗}}) = 0.0161$;
 $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{班布特罗}}) = 0.0168$; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{溴布特罗}}) = 0.0189$;
 $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{D9-克伦特罗}}) = 0.0168$; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{D3-莱克多巴胺}}) =$

0.0168; $u_{\text{rel}}(\text{C}_{\text{D3-沙丁胺醇}}) = 0.0168$ 。

2.3.2 峰面积引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(A_x)$ 、 $u_{\text{rel}}(A_{si})$ 、 $u_{\text{rel}}(A_i)$ 及 $u_{\text{rel}}(A_s)$ (B类不确定度) 试样中被测物峰面积(A_x)、混标上机液中相应内标物的峰面积(A_{si})、试样中相应内标物的峰面积(A_i)和混标上机液中被测物的峰面积(A_s)引起的不确定度均可归为峰面积引起的不确定度。利用10 ng/mL 混标上机液,5次重复进样,得到14种对照品峰面积,根据贝塞尔(Bessel)公式计算,得到:

莱克多巴胺 $S_{\text{标}}(\bar{X}) = 0.389\%$;克伦特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X}) = 0.570\%$;沙丁胺醇 $S_{\text{标}}(\bar{X}) = 0.814\%$;特布他林 $S_{\text{标}}(\bar{X}) = 0.458\%$;西马特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X}) = 0.131\%$;马布特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X}) = 0.345\%$;氯丙那林

$S_{\text{标}}(\bar{X})=0.823\%$;齐帕特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.992\%$;西布特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.270\%$;班布特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.538\%$;溴布特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.666\%$;D₉-克伦特罗 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.375\%$;D₃-莱克多巴胺 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.614\%$;D₃-沙丁胺醇 $S_{\text{标}}(\bar{X})=0.733\%$ 。

2.3.3 进样体积引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(v)$ (B类不确定度) 混标上机液进样体积引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(v_{\text{s}})$ 及试样进样体积引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(v_{\text{x}})$ 均由定量环引起,可视为同一值。定量环体积误差为: $\pm 0.1\text{ }\mu\text{L}$,按均匀分布,则其标准不确定度为: $u(v)=0.1/\sqrt{3}=0.0577\text{ }\mu\text{L}$,相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(v)/v=0.0577/5=0.0115$ 。

2.3.4 浓缩过程引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$ (B类不确定度) 吸取供试样品 5.00 mL 及加入 1.00 mL 0.2% 甲酸水溶液溶解氮吹至干后的净化物均引入

不确定度。1~5 mL 和 100~1000 μL 移液器检定证书给出误差分别为 $\pm 0.02\text{ mL}$ 和 $\pm 1.18\text{ }\mu\text{L}$,按均匀分布,则: $u(V_5)=0.02/\sqrt{3}=0.0115\text{ mL}$, $u_{\text{rel}}(V_5)=0.0115/5=0.0023$; $u(V_1)=0.0012/\sqrt{3}=0.0007\text{ mL}$, $u_{\text{rel}}(V_1)=0.0007/1=0.0007$; $u_{\text{rel}}(V)=\sqrt{0.0023^2+0.0007^2}=0.0024$ 。

2.3.5 试样中添加回收率 R (平均回收率)的不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$ (A类不确定度) 5次样品添加回收率,相应结果见表3。本研究所用方法对11种 β -受体激动剂的添加回收率在 77.8%~112% 之间,相对均为稳定;但方法回收率对合成不确定度的贡献率达到 10%~28% (表5)。因而回收率是引起本方法测定时不确定度的重要因素。

表 3 试样添加回收率 R 的不确定度

	回收率/%					平均回收率/%	标准偏差/%	不确定度	相对标准不确定度
	1	2	3	4	5				
莱克多巴胺	91.4	103	103	98.6	101	99.4	4.85	0.0217	0.0218
克伦特罗	97.8	99.0	99.0	83.0	101	96.0	7.64	0.0342	0.0356
沙丁胺醇	87.2	83.2	79.3	77.8	87.1	82.9	5.23	0.0234	0.0282
特布他林	107	92.3	92.3	88.8	102	96.5	7.95	0.0355	0.0368
西马特罗	100	102	93.0	92.4	86.6	94.8	6.57	0.0294	0.0310
马布特罗	102	104	112	95.0	101	103	5.97	0.0267	0.0259
氯丙那林	97.0	95.3	86.1	85.7	102	93.2	7.64	0.0342	0.0367
齐帕特罗	100	84.1	90.0	106	94.1	94.8	8.99	0.0402	0.0424
西布特罗	101	101	102	98.1	105	101	2.44	0.0109	0.0108
班布特罗	97.8	107	107	104	91.3	101	6.70	0.0299	0.0296
溴布特罗	109	97.0	97.0	92.0	88.9	96.8	7.91	0.0354	0.0366

2.4 相对标准不确定度、合成标准不确定度 各因子引起的相对标准不确定度及合成标准不确定度见表4,各因子对合成标准不确定的贡献率见表

5。如表5所示:在各影响不确定度的因素中,试验加标回收率及混标上机液引起相对标准不确定度对合成标准不确定度影响较大。

表 4 相对标准不确定度及合成标准不确定度一览表

因子	莱克多巴胺	克伦特罗	沙丁胺醇	特布他林	西马特罗	马布特罗	氯丙那林	齐帕特罗	西布特罗	班布特罗	溴布特罗
$u_{\text{rel}}(C_{\text{s}})$	0.0256	0.0179	0.0256	0.0168	0.0256	0.0168	0.0161	0.0168	0.0161	0.0168	0.0189
$u_{\text{rel}}(C_{\text{i}})$	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168
$u_{\text{rel}}(A_{\text{s}})$	0.0039	0.0057	0.0081	0.0046	0.0013	0.0034	0.0082	0.0099	0.0027	0.0054	0.0067
$u_{\text{rel}}(A_{\text{si}})$	0.0061	0.0038	0.0073	0.0073	0.0073	0.0038	0.0038	0.0073	0.0073	0.0038	0.0038
$u_{\text{rel}}(V)$						0.0024					
$u_{\text{rel}}(v_{\text{s}})$						0.0115					
$u_{\text{rel}}(C_{\text{si}})$	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168	0.0168
$u_{\text{rel}}(A_{\text{i}})$	0.0061	0.0038	0.0073	0.0073	0.0073	0.0038	0.0038	0.0073	0.0073	0.0038	0.0038
$u_{\text{rel}}(A_{\text{s}})$	0.0039	0.0057	0.0081	0.0046	0.0013	0.0034	0.0082	0.0099	0.0027	0.0054	0.0067
$u_{\text{rel}}(R)$	0.0218	0.0356	0.0282	0.0368	0.0310	0.0259	0.0367	0.0424	0.0108	0.0296	0.0366
$u_{\text{rel}}(v_{\text{x}})$						0.0115					
合成标准不确定度	0.045	0.050	0.050	0.051	0.051	0.043	0.051	0.057	0.036	0.046	0.051

表 5 各因素对合成不确定的贡献百分比

%

因子	莱克多巴胺	克伦特罗	沙丁胺醇	特布他林	西马特罗	马布特罗	氯丙那林	齐帕特罗	西布特罗	班布特罗	溴布特罗
$u(C_s)$	20	14	18	12	19	14	12	11	15	14	14
$u(C_i)$	13	13	12	12	13	14	12	11	16	14	12
$u(A_x)$	3.1	4.3	5.6	3.4	1.0	2.9	6.0	6.5	2.5	4.4	4.9
$u(A_{si})$	4.8	2.9	5.1	5.4	5.5	3.3	2.8	4.8	6.9	3.1	2.8
$u(V)$	1.9	1.8	1.7	1.8	1.8	2.1	1.8	1.6	2.3	1.9	1.8
$u(v_s)$	9.1	8.7	8.0	8.4	8.7	9.9	8.5	7.5	11	9.3	8.5
$u(C_{si})$	13	13	12	12	13	14	12	11	16	14	12
$u(A_i)$	4.8	2.9	5.1	5.4	5.5	3.3	2.8	4.8	6.9	3.1	2.8
$u(A_s)$	3.1	4.3	5.6	3.4	1.0	2.9	6.0	6.5	2.5	4.4	4.9
$u(R)$	17	27	20	27	23	22	27	28	10	24	27
$u(v_x)$	9.1	8.7	8.0	8.4	8.7	9.9	8.5	7.5	11	9.3	8.5

2.5 扩展不确定度 u 95% 置信区间,取包含因子 $k=2$,得到扩展不确定度。莱克多巴胺 $U_{95}=2\times 0.045=9.0\%$;克伦特罗 $U_{95}=2\times 0.050=10.0\%$;沙丁胺醇 $U_{95}=2\times 0.050=10.0\%$;特布他林 $U_{95}=2\times 0.051=10.2\%$;西马特罗 $U_{95}=2\times 0.051=10.2\%$;马布特罗 $U_{95}=2\times 0.043=8.6\%$;氯丙那林 $U_{95}=2\times 0.051=10.2\%$;齐帕特罗 $U_{95}=2\times 0.057=11.4\%$;西布特罗 $U_{95}=2\times 0.036=7.2\%$;

班布特罗 $U_{95}=2\times 0.046=9.2\%$;溴布特罗 $U_{95}=2\times 0.051=10.2\%$ 。

2.6 不确定度报告 依据农业部 1063 号公告-3-2008《动物尿液中 11 种 β -受体激动剂多残留 LC-MS/MS 检测》,取包含因子 $k=2$ 时,对动物尿液中 11 种 β -受体激动剂类药物残留检测结果见表 6。

表 6 动物尿液中 11 种 β -受体激动剂类药物残留检测结果

名称	添加浓度 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1})$	实测浓度 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率折算后浓度 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1})$	扩展不确定度	残留浓度 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1})$
莱克多巴胺	10	10.3	10.4	0.9	10.4 ± 0.9
克伦特罗	10	9.90	10.4	1.0	10.4 ± 1.0
沙丁胺醇	10	8.32	10.0	1.0	10.0 ± 1.0
特布他林	10	9.23	9.56	1.0	9.6 ± 1.0
西马特罗	10	10.2	10.8	1.1	10.8 ± 1.1
马布特罗	10	10.4	10.1	0.9	10.1 ± 0.9
氯丙那林	10	9.53	10.2	1.0	10.2 ± 1.0
齐帕特罗	10	8.41	8.87	1.0	8.9 ± 1.0
西布特罗	10	10.1	10.0	0.7	10.0 ± 0.7
班布特罗	10	10.7	10.6	1.0	10.6 ± 1.0
溴布特罗	10	9.70	10.0	1.0	10.0 ± 1.0

3 小 结

本研究对动物尿液中 11 种 β -受体激动剂类药物残留检测的测量结果不确定度进行评定,找出了其中影响测量结果的重要因素,但在样品处理过程中大多操作步骤都会引入不确定度,对每个因素一一确认是十分困难的,因此采用回收率对测试过程引入的不确定度进行评定,再进行合成。由此也得出在测量过程中,应严格按照操作规程进行操作,尽量减少误差,以保证测量结果的准确性和可靠性。

参考文献:

[1] 王 蓓,张 鑫,顾 欣,等.液相色谱法测定猪鸡可食性组织中四环素类残留量的不确定评估[J].中国兽药杂志,2010,44(11):8-11.

[2] 农业部 1063 号公告-3-2008.动物尿液中 11 种 β -受体激动剂的检测液相色谱-串联质谱法[S].

[3] ISO/IEC 导则 25.校准和检测实验室能力的通用要求[Z].

[4] 中国实验室国家认可委员会.化学分析中不确定度的评估指南[M].北京:中国计量出版社,2002:12.

(责任编辑:侯向辉)