

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.11.07

高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肉中可的松和氢化可的松残留量的不确定度评价

张婷,程用斌*,王舒婷,吴晓红,凌莉,李嘉,李祯,车彦卓,柏旭

(陕西省农业检验检测中心,西安 710000)

[收稿日期] 2022-01-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 11-0048-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 评定超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肉中可的松和氢化可的松残留量的不确定度。以本单位自建方法 XCZY-051《动物源食品中克仑特罗等 51 种兴奋剂的检测方法液相色谱 - 串联质谱法》为基础,结合 CNAS-GL006《化学分析中的不确定度评估指南》,建立数学模型,以猪肉中检出率最高的内源性兴奋剂可的松和氢化可的松为例分析不确定度来源并计算各不确定度得到的合成标准不确定度。当样品中可的松含量为 $3.386 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,其扩展不确定度为 $0.4374 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$);当氢化可的松含量为 $7.866 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,其扩展不确定度为 $0.9690 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$)。本方法的不确定度来源主要来自样品回收率、重复性、标准溶液配制和曲线拟合。

[关键词] 可的松;氢化可的松;不确定度评定

Uncertainty Evaluation for the Detection of Cortisone and Hydrocortisone Residues in Pork by High Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry

ZHANG Ting, CHENG Yong-bin*, WANG Shu-ting, WU Xiao-hong, LING Li,

LI Jia, LI Zhen, CHE Yan-zhuo, BAI Xu

(Agricultural Inspection and Testing Center of Shaanxi province, Xi'an 710000, China)

Corresponding author: CHENG Yong-bin, E-mail: 121359709@qq.com

Abstract: To evaluate the uncertainty for determination of cortisone and hydrocortisone residues in pork by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry isotope internal standard method. Based on the self-developed method XCZY-051 *Ultra liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the detection of clenbuterol and other 51 stimulants in animal derived foods* and according to CNAS-GL006 *Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis*, a mathematical model was established, then take the endogenous

作者简介:张婷,工学硕士,助理农艺师,从事畜禽产品中兽药残留检测、环境检测工作。

通讯作者:程用斌。E-mail:121359709@qq.com

stimulants cortisone and hydrocortisone with the highest detection rate in pork as examples, the source of uncertainty was analyzed and the synthetic standard uncertainty was calculated. When the cortisone residue in pork was 3.386 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the expanded uncertainty was 0.4374 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$). When the hydrocortisone residue in pork was 7.866 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the expanded uncertainty was 0.9690 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$). The uncertainty of measurement mainly come from sample recovery, repeatability, the preparation of standards and curve fitting.

Key words: Cortisone; hydrocortisone; uncertainty evaluation

可的松和氢化可的松属于糖皮质激素类^[1],是可随动物体应激反应而提升分泌水平的内源性激素,不需要制定最大残留量^[2-4],人工合成的可的松和氢化可的松属于世界反兴奋剂中心禁止运动员使用的药物,规定其在动物组织中的残留限量均不得超过 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]。

为了更合理、更科学地表示测量结果,实验室需根据相关认可的技术规范要求进行不确定度评价^[6],本文基于中心自建方法《动物源性食品中克伦特罗等 51 种兴奋剂的兴奋剂检测方法 液相色谱-串联质谱法》和 CNAS-GLI06《化学分析中不确定度的评估指南》^[7],在实践过程发现 51 种兴奋剂中可的松和氢化可的松的检出率最高,故筛选出这两项具有代表性的食源性兴奋剂进行研究,开展平行测试进行不确定度分析,为检验结果的准确性及可靠性提供技术依据,同时为本实验室自建方法的建立提供数据支撑,为其他实验室采用内标法评定不确定度提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备 TQ-S 高效液相色谱-质谱仪(美国 Waters 仪器公司);PL402-L 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);DU2A12FV 超纯水仪(泽布拉公司);KQ-超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AutoEVA-20Plus 全自动氮吹浓缩仪(睿科仪器公司)。

1.2 试剂与材料 可的松标准物质(不确定度:2%, $k=2$;纯度 98.5%)(北京曼哈格生物科技有限公司);氢化可的松标准物质(不确定度:3%, $k=2$;介质:甲醇;浓度 99.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(北京曼哈格生物科技有限公司);氢化可的松-D₃标准物质(不确定度:5%, $k=2$;介质:乙腈;浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(阿

尔塔科技有限公司);甲醇(质谱纯,美国 Thermo Fisher);乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher);甲酸(美国 Thermo Fisher);无水硫酸钠(分析纯)。

除另有说明,试验中所用试剂均按 GB/T 603 的规定制备。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

1.3 实验条件

1.3.1 前处理方法 称取试样 5.00 g(精确至 ± 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μL 混合同位素内标中间液,涡旋混匀,加入 10 mL1% 甲酸乙腈,涡旋振荡 10 min,加入 3 g 无水硫酸钠,涡旋振荡 2 min,8000 r/min 离心 5 min,取上清液于另一干净的 50 mL 具塞离心管中,剩余部分再用 10 mL1% 甲酸乙腈重复提取一次,合并上清液,精密移取 2 mL 上清液于 10 mL 离心管中,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,准确加入 1 mL 乙腈-水(50+50, v/v)溶液溶解残渣,涡旋振荡 1 min,过 0.22 μm 尼龙滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:Waters BEH C₁₈(2.1 \times 100 mm,1.7 μm);流动相条件:A 相:0.1% 甲酸水,B 相:0.1% 甲酸甲醇;梯度洗脱:0~1 min,维持 95% A;1~2 min,A 相线性变化至 80%;2~6 min,A 相线性变化至 40%;6~8 min,A 相线性变化至 20%;8~8.5 min,A 相线性变化至 10%;8.5~9.7 min,A 相维持 10% A;9.7~9.75 min,A 相线性变化至 0%;9.75~12.75 min,A 相维持 0%;12.75~12.8 min,A 相线性变化至 95%;12.8~15 min,A 相维持 95%。流速:0.35 mL/min,柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.3 质谱条件 离子化模式:电喷雾电离(ESI);正离子模式;电离电压:3200V;离子源温度:150 $^{\circ}\text{C}$;扫描模式:多反应监测(MRM);干燥气

温度:550 ℃;碰撞气:氩气。质谱参数见表 1。

表 1 质谱扫描参数

Tab 1 Scan parameters of mass spectrometry

名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氢化可的松	407.2	331.2	35	17
		282.1	35	38
可的松	405.1	329.2	30	16
氢化可的松-D ₃	410.2	301.2	30	19
		334.2	35	18

1.4 标准溶液配制 称取可的松对照品约 10 mg, 精密称定。用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配成浓度为 1000.8 μg/mL 标准储备液, 然后精密量取 20 μL 可的松标准储备液、400 μL 氢化可的松标准溶液至 10 mL 容量瓶, 用甲醇分别配制成 2.0、4.0 μg/mL 的混合标准中间液。精密量取 1 mL 混合标准中间液至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制成 200 ng/mL 可的松、400 ng/mL 氢化可的松混合标准工作液。同时精密量取 1 mL 氢化可的松-D₃ 内标溶液至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇配制成 1 μg/mL 的内标标准工作液。标准溶液均置于 -20 ℃ 保存。

1.5 标准曲线制作 取 6 份空白样品, 按照 1.3.1 前处理步骤得到空白残余物, 分别加入 10 mL 乙腈-水 (50+50, v/v) 溶解制成空白基质溶液, 分别精密量取 0、100、200、300、400、800、1600 μL 混合标准工作液于 7 个 10 mL 容量瓶中, 各加入 100 μL 的内标标准工作液, 用空白基质溶液定容至刻度, 配成氢化可的松浓度分别为 0、4、8、12、16、32、64 ng/mL; 可的松浓度分别为 0、2、4、6、8、16、32 ng/mL 的混合标准系列溶液, 过 0.22 μm 尼龙滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 不确定度数学模型建立

$$X = \frac{C \times V \times f}{m \times R} = \frac{c \times c_i \times A \times A_{si} \times V \times f}{c_{si} \times A_i \times A_s \times m \times R} \times \frac{1000}{1000} \quad (1)$$

式中: X —试样中各待测物的含量, μg/kg; C —标准

工作溶液待测组分的含量, ng/mL; C_i —测试液中内标物的浓度, ng/mL; A —测试液中待测组分的峰面积; A_{si} —标准工作液中内标物的峰面积; V —定容体积, mL; C_{si} —标准工作溶液中内标物的浓度, ng/mL; A_i —测试液中内标物的峰面积; A_s —标准工作液中待测组分的峰面积; m —样品的称样量, g; f —稀释倍数; R —方法回收率。

2.2 不确定度来源分析 根据检测方法以及已建立的数学模型来分析, 猪肉中可的松、氢化可的松的含量不确定度分量的主要来源为: $U_{rel(1)}$ 样品称量引入的不确定度; $U_{rel(2)}$ 样品定容引入的不确定度; $U_{rel(3)}$ 标准物质引入的不确定度; $U_{rel(4)}$ 回收率引入的不确定度; $U_{rel(5)}$ 方法重复性引入的不确定度。具体来源分析如图 1。

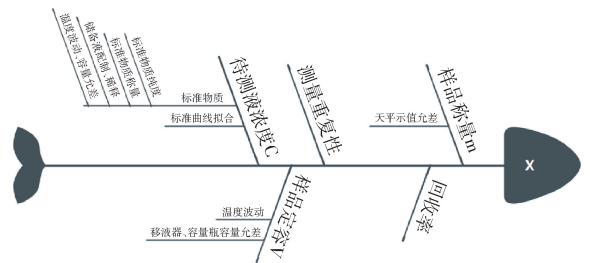


图 1 不确定度来源

Fig 1 Sources of uncertainty

2.3 不确定度分量的评定

2.3.1 样品称量引入的不确定度 实验室电子天平的检定证书提供的允许误差为 ± 0.05 g, 按照矩形分布, $k = \sqrt{3}$, 标准不确定度为 $U_{(1.1)} = 0.05 / \sqrt{3} = 0.0289$ g。样品称量为 5 g, 相对标准不确定度为: $U_{rel(1)} = 0.0289 / 5 = 0.00577$ 。

2.3.2 样品定容引入的不确定度 (1) 移液器引入的不确定度: 依据 JJG646-2006《移液器检定规程》^[8], 10 mL、5 mL、1 mL 移液器的容量允许误差分别为 0.6%、0.5% 和 1.0%, 按矩形分布, $k = \sqrt{3}$, 标准不确定度为: $U_{(2.1)} = 10 \times 0.6\% / \sqrt{3} = 0.0346$ mL, $U_{(2.2)} = 2 \times 0.5\% / \sqrt{3} = 0.00577$ mL, $U_{(2.3)} = 1 \times 1.0\% / \sqrt{3} = 0.00577$ mL。移液器引入

的相对标准不确定度为： $U_{(2.4)} = \sqrt{(0.0346/10)^2 \times 2 + (0.00577/2)^2 + (0.00577/1)^2} = 0.00810$ 。

(2) 温度引入的不确定度：实验室温度范围是 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，水的膨胀系数是 2.1×10^{-4} ，乙腈的膨胀系数是 1.37×10^{-3} ，乙腈：水 (50:50, v/v) 的膨胀系数是 7.9×10^{-4} ，假设温度变化按矩形分布， $k = \sqrt{3}$ ，10 mL、5 mL 和 1 mL 移液器的标准不确定度分别为 $U_{(2.5)} = 10 \times 2 \times 1.37 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.0158 \text{ mL}$ ， $U_{(2.6)} = 1 \times 2 \times 7.9 \times 10^{-4} / \sqrt{3} = 0.000912 \text{ mL}$ ， $U_{(2.7)} = 2 \times 2 \times 1.37 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.00316 \text{ mL}$ ，温度变化引入的相对标准不确定度为： $U_{(2.8)} = \sqrt{(0.0158/10)^2 \times 2 + (0.00316/2)^2 + (0.000912/1)^2} = 0.00288$ 。则样品定容引入的相对标准不确定度为： $U_{\text{rel}(2)} = \sqrt{0.00810^2 + 0.00288^2} = 0.00860$ 。

2.3.3 标准物质引入的不确定度 (1) 标准物质纯度引入的不确定度：根据标准物质证书，按扩展因子， $k = 2$ ，标准物质纯度的相对标准不确定度为： $U_{(3.1)} = u / (p \times 2)$ ，见表 2。

表 2 标准物质纯度引入的不确定度

Tab 2 Uncertainty from the purity of standards

标准物质	p 纯度 (%)	u 不确定度 (%)	$U_{(3.1)}$
可的松	98.5	2	0.0102
氢化可的松	99.8	3	0.0150

(2) 标准品称量引入的相对不确定度

根据称量所使用天平检定证书，可知其最大允许误差为 $\pm 0.1 \text{ mg}$ ，按矩形分布， $k = \sqrt{3}$ ，天平称量过程中引入的标准不确定度为 $U_{(3.2)} = \frac{0.1}{10.16 \times \sqrt{3}} = 0.00568$

(3) 标准溶液配制过程引入的不确定度

标准溶液配制过程中主要有两个不确定度来源：一是确定容量瓶或移液器内部体积时的不确定度，依据 JJG196 - 2006《常用玻璃量器》^[9] 和 JJG646 - 2006《移液器检定规程》要求，按矩形分布 ($k = \sqrt{3}$) 计算；二

是温度在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的实验条件下，溶液温度引入的不确定度，标准溶液定容过程中所使用的溶剂为甲醇， 20°C 时甲醇的膨胀系数为 1.18×10^{-3} ，按矩形分布， $k = \sqrt{3}$ ，标准溶液配制过程中温度引入的不确定度为 $2 \times 1.18 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.00136$ 。

① 标准储备液配制引入的相对标准不确定度

10 mL 级容量瓶允许误差为 $\pm 0.02 \text{ mL}$ ，不确定度为： $U_{(3.3)} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.0115 \text{ mL}$ ，温度引入的不确定度为： $U_{(3.4)} = 10 \times 0.00136 = 0.0136 \text{ mL}$ ，则标准储备液配制引入的相对标准不确定度为： $U_{(3.5)} = \sqrt{(0.0115/10)^2 + (0.0136/10)^2} = 0.00178$ 。

② 标准中间液配制引入的相对标准不确定度

标准中间液配制过程中所用的容量瓶为 A 级 10 mL 的，其允许误差 $\pm 0.02 \text{ mL}$ ，过程中所使用的移液器为 200 μL 和 1000 μL 的，分别移取了 20 μL 和 400 μL ，其允许误差分别为 4.0%、1.0%，容量瓶不确定度为： $U_{(3.6)} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.0115 \text{ mL}$ ，温度引入的不确定度为： $U_{(3.7)} = 10 \times 0.00136 = 0.0136 \text{ mL}$ ，容量瓶引入的相对标准不确定度为： $U_{(3.8)} = \sqrt{(0.0115/10)^2 + (0.0136/10)^2} = 0.00178$ ；移液器引入的相对标准不确定度为： $U_{(3.9)} = \sqrt{(0.02 \times 4\% / \sqrt{3})^2 + (0.4 \times 1\% / \sqrt{3})^2} / (0.02 \times 0.4) = 0.0238$ ，温度引入的不确定度分别为 $U_{(3.10)} = \sqrt{(0.02 \times 0.00136)^2 + (0.4 \times 0.00136)^2} / (0.02 \times 0.4) = 0.00193$ ，则移液器的相对合成标准不确定度为： $U_{(3.11)} = \sqrt{0.0238^2 + 0.00193^2} = 0.0239$ 。标准中间液引入的相对标准不确定度为： $U_{(3.12)} = \sqrt{0.0239^2 + 0.00178^2} = 0.0240$ 。

③ 标准使用液引入的相对标准不确定度

标准使用液的配制过程中所使用的容量瓶为 A 级 10 mL 的，其不确定度为： $U_{(3.13)} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.0115 \text{ mL}$ ；温度引入的不确定度为： $U_{(3.14)} = 10 \times 0.00136 = 0.0136 \text{ mL}$ ，则容量瓶的相对标准不确定度为： $U_{(3.15)} = \sqrt{(0.0115/10)^2 + (0.0136/10)^2} = 0.00178$ ；所使用的移液器是 1 mL 的，其不确定度

为： $U_{(3.16)} = 1 \times 1.0\% / \sqrt{3} = 0.00577$ mL，温度引入的不确定度为 0.00136 mL，则移液器的相对标准不确定度为： $U_{(3.17)} = \sqrt{(0.00577/1)^2 + (0.00136/1)^2} = 0.00593$ ，标准使用液引入的相对标准不确定度为： $U_{(3.18)} = \sqrt{0.00178^2 + 0.00593^2} = 0.00619$ 。

④加入内标引入的不确定度

测定过程中 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标标准工作液加入体积为 100 μL ，所使用的移液器为 200 μL 的，其容量允许误差为 1.5%，则不确定度为： $U_{(3.19)} = 0.1 \times 1.5\% / \sqrt{3} = 0.000866$ mL，温度引入的不确定度

为： $U_{(3.20)} = 0.1 \times 0.00136 = 0.000136$ mL，则内标引入的相对标准不确定度为 $U_{(3.21)} = \sqrt{0.000866^2 + 0.000136^2} / 0.1 = 0.00877$ 。

⑤标准曲线配制引入的不确定度

配制标准工作曲线，吸取标准溶液时，使用 A 级 0.1 mL 分度吸量管 8 次，A 级 0.2 mL 分度吸量管 1 次，A 级 1 mL 分度吸量管 3 次，A 级 2 mL 分度吸量管 1 次，A 级 10 mL 容量瓶 7 次。标准曲线配制中体积引入的相对标准不确定度见表 3。则此部分的合成相对标准不确定度为 $U_{(3.22)} =$

$$\sqrt{0.0329^2 + 0.00877^2 + 0.0155^2 + 0.0116^2 + 0.00593^2 + 0.00454^2 + 0.00389^2} = 0.0400。$$

表 3 标准曲线配制过程引入的不确定度

Tab 3 Uncertainty from the preparation of standard curve

不确定度来源	项目	A 级 0.1 mL 分度吸量管	A 级 0.2 mL 分度吸量管	A 级 1 mL 分度吸量管	A 级 1 mL 分度吸量管	A 级 1 mL 分度吸量管	A 级 2 mL 分度吸量管	A 级 10 ml 容量瓶
	允许误差/mL	± 0.002	± 0.003	± 0.008	± 0.008	± 0.008	± 0.012	± 0.02
刻度误差	移取体积/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.8	1.6	10
	不确定度	0.0327	0.00866	0.0154	0.0115	0.00577	0.00433	0.00306
	温度误差/ $^{\circ}\text{C}$	± 2	± 2	± 2	± 2	± 2	± 2	± 2
温度误差	膨胀系数/ $^{\circ}\text{C}^{-1}$	1.18×10^{-3}	1.18×10^{-3}	1.18×10^{-3}	1.18×10^{-3}	1.18×10^{-3}	1.18×10^{-3}	7.9×10^{-4}
	不确定度	0.00385	0.00136	0.00136	0.00136	0.00136	0.00136	0.00241
	相对标准不确定度	0.0329	0.00877	0.0155	0.0116	0.00593	0.00454	0.00389
	使用次数	8	1	1	1	1	1	7

表 4 标准曲线

Tab 4 Standard curve

浓度 (ng/mL) (可的松/氢化可的松)	峰面积比值 A/A_i					
	可的松			氢化可的松		
0/0	0.0323	0.0317	0.0322	0.123	0.114	0.116
2/4	0.153	0.154	0.151	0.587	0.574	0.569
4/8	0.306	0.319	0.318	1.160	1.137	1.146
6/12	0.493	0.552	0.527	1.934	1.948	1.887
8/16	0.666	0.686	0.737	2.590	2.527	2.494
16/32	1.326	1.384	1.397	5.008	4.870	5.013
32/64	2.640	2.768	2.766	9.767	9.927	10.013
线性方程 $y = ax + b$	$y = 0.0851x + 0.0042$			$y = 0.1544x + 0.0248$		
相关系数 r	0.9997			0.9997		

⑥标准工作曲线拟合引入的不确定度

本实验对可的松和氢化可的松混标制备了 7 个不同浓度点的标准工作液,每个浓度点检测 3 次,工作曲线以外标峰面积/内标峰面积的比值(A/A_i)为纵坐标,标准溶液浓度(C_i)为横坐标,采用最小二乘法拟合,使用权重 $1/x$,得出目标物的回归方程为 $y = ax + b$ (其中 a 为斜率, b 为截距)。可的松的线性方程为 $y = 0.0851x + 0.0042$,氢化可的松线性方程为 $y = 0.1544x + 0.0248$ 。标准曲线测定结果见表 4。

重复测定阳性添加样品 11 次,其测定结果见表 5(测定液平均浓度 C_0 为:可的松 1.693 ng/mL、氢化可的松 3.933 ng/mL),则标准曲线拟合产生的标准不确定度按下式计算:

$$U_{(3.23)} = \frac{s}{a C_0} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}}$$

式中: s 为标准溶液峰面积比值残差的标准差,

计算公式如下: $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a x_i + b)]^2}{n - 2}}$,可

$$U_{rel(3)} = \sqrt{0.0150^2 + 0.0240^2 + 0.00619^2 + 0.00877^2 + 0.040^2 + 0.0303^2} = 0.0586。$$

表 5 猪肉中可的松和氢化可的松测定结果

Tab 5 Determination of cortisone and hydrocortisone in pork

编号	称样量(g)	可的松		氢化可的松	
		浓度 C (ng/mL)	含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	浓度 C (ng/mL)	含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	5.00	1.8172	3.6344	3.9970	7.9939
2	5.00	1.5726	3.1452	3.4642	6.9283
3	5.00	1.7237	3.4474	3.7097	7.4195
4	5.00	1.5700	3.1401	3.9798	7.9595
5	5.00	1.7554	3.5108	4.0392	8.0783
6	5.00	1.9060	3.8119	3.9687	7.9373
7	5.00	1.7649	3.5298	4.0365	8.0730
8	5.00	1.5586	3.1171	3.9662	7.9325
9	5.00	1.6584	3.3167	3.9888	7.9776
10	5.00	1.6575	3.3150	4.0160	8.0319
11	5.00	1.6375	3.2750	4.0973	8.1946
平均值		1.693	3.386	3.933	7.866
标准偏差		0.1114	0.2227	0.1836	0.3673
不确定度		0.0336	0.0672	0.0554	0.1107
相对不确定度		0.0198	0.0198	0.0141	0.0141

的松为 0.0112,氢化可的松为 0.0392; a 为标准工作曲线的斜率,可的松为 0.0851,氢化可的松为 0.1544; p 为对 C_0 测定的次数, $p = 11$; n 为标准溶液测定的次数, $n = 21$; \bar{C} 为标准溶液的平均浓度,可的松为 9.714 ng/mL,氢化可的松为 19.429 ng/mL, $(C_0 - \bar{C})^2$,可的松为 64.342,氢化可的松为 240.113; $\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2$,可的松为 0.00239,氢化可的松为 0.0293。因此,由标准工作曲线拟合所引入的不确定度,可的松为 0.0308,氢化可的松为 0.0303。综上所述,可的松由标准溶液引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel(3)} = \sqrt{\frac{0.0102^2 + 0.00568^2 + 0.00178^2 + 0.0240^2}{+0.00619^2 + 0.00877^2 + 0.0400^2 + 0.0308^2}} = 0.0581。$$

氢化可的松由标准溶液引入的相对标准不确定度为:

空白样品中添加标准品, 可的松和氢化可的松的加标水平分别为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 空白平行加标 6 份, 测得各组分的回收率, 用 t 检验来确定平均回收率是否与 1.0 有显著性差异。检验统计量 t 用下式来计算: $t = \frac{|100\% - \bar{R}|}{U_{rel(4)}}$, 计算得到的值与 95% 置信度, $n-1$ 自由度下的双侧临界值 $t(0.05, 5) = 2.57$

进行比较, 计算得到的 t 值大于或等于查表 t 值, 则平均回收率与 1.0 有显著性差异, 因此平均回收率应包含在结果的计算中。其中 $U_{rel(4)} = \frac{s}{\bar{R} \times \sqrt{6}}$ 。具体结果见表 6。由表 6 可见, 可的松和氢化可的松的计算 t 值 > 2.57 , 所以可的松和氢化可的松平均回收率应该包含在结果的计算中。

表 6 猪肉中可的松和氢化可的松的回收率结果

Tab 6 Recovery results of cortisone and hydrocortisone in pork

组分	回收率						平均回收率 $\bar{R}/\%$	标准偏差 $s/\%$	相对标准不确定度 $U_{rel(4)}$	t 值
	1	2	3	4	5	6				
可的松	82.5	92.5	83.4	87.5	86.3	88.5	86.8	3.66	0.0172	7.56
氢化可的松	96.1	98.7	97.0	95.7	100.6	98.7	97.8	1.85	0.00773	2.59

2.3.5 重复性引入的不确定度 由表 5 的数据可知, 可的松和氢化可的松的含量分别为 3.386、7.866 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的猪肉样品, 平行测定 11 次, 将重复测定的平均值 \bar{X} , 标准偏差 S 结果分别代入公式, $U_{(5.1)} = S/\sqrt{11}$, $U_{rel(5)} = U_{(5.1)}/\bar{X}$ 。计算结果见表 5。

2.3.6 不确定度的合成和结果表示 样品的称样质量、样品定容、标准物质、测量重复性与回收率等的不确定度分量相互独立, 将各不确定度进行合成, 即得相对合成不确定度 U_{rel} , 按下式计算得到可的松: 0.0646, 氢化可的松: 0.0616, 所以可的松的合成标准不确定度为 $0.0646 \times 3.386 = 0.2187$, 氢化可的松为 $0.0616 \times 7.866 = 0.4845$ 。具体结果见表 7。

$$U_{rel} = \sqrt{U_{rel(1)}^2 + U_{rel(2)}^2 + U_{rel(3)}^2 + U_{rel(4)}^2 + U_{rel(5)}^2}$$

2.3.7 扩展不确定度 在置信水平为 95%, 取包含因子 $k=2$, 则可的松和氢化可的松的不确定度分别为 $U_{可的松} = 0.4374$ 、 $U_{氢化可的松} = 0.9690$, 最终结果可表示为可的松含量 $X_{可的松} = (3.386 \pm 0.4374)$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, 氢化可的松含量 $X_{氢化可的松} = (7.866 \pm 0.9690)$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 7 不确定度分量评定表

Tab 7 Evaluation scale of uncertainty components

	描述	不确定度	
		可的松	氢化可的松
$U_{rel(1)}$	样品称量	0.00577	0.00577
$U_{rel(2)}$	样品定容	0.00860	0.00860
$U_{rel(3)}$	标准物质	0.0581	0.0586
$U_{rel(4)}$	回收率	0.0172	0.00773
$U_{rel(5)}$	重复性	0.0198	0.0141
	相对合成不确定度	0.0646	0.0616
	合成标准不确定度	0.2187	0.4845
	扩展不确定度	0.4374	0.9690

3 结论

本文分析过程中可知可的松和氢化可的松不确定度主要来源于样品回收率、重复性、标准物质及其稀释过程中引入的不确定度, 样品回收率涉及到前处理和上机的过程, 可能与仪器稳定性以及提取过程中分取提取液人员操作有关系。因此, 一是加强人员培训, 严格规范操作, 以减少人为因素引入的不确定度; 二是平时加强仪器的维护保养, 检定校准及期间核查, 使仪器的各方面指标都处于合理范围之内, 减少由于仪器稳定性造成的系统误

差;三是在标准工作曲线配制以及前处理过程中,移取溶液时最好使用同一器具及准确度较高的仪器设备,以减小测量的不确定度。

参考文献:

[1] 杨奕,尹杰,杨蕴嘉,等.牛肉、牛奶可的松和氢化可的松含量分析[J].食品科学,2021,42(16):26-266.
Yang Y, Ying J, Yang Y J, *et al.* Analysis of Cortisone and Cortisol in Beef and Milk [J]. Food Science, 2021, 42 (16): 26 - 266.

[2] 国家卫生健康委员会,农业农村部,国家市场监督管理总局. GB 31650-2019 食品中兽药最大残留限量[S].北京:中国农业出版社,2019:39-40.
National Health Commission, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Administration for Market Regulation. GB 31650 - 2019 Maximum residue limits for veterinary drugs in food[S] Beijing: China agriculture press, 2019: 39 - 40.

[3] 段红霞,吴建辉.慢性应激对可的松觉醒反应的影响[C].广州:第十五届全国心理学学术会议论文摘要集,2012,492-493.
Duan H X, Wu J H. Effects of chronic stress on cortisone arousal response[C]. Guangzhou: Abstracts of the 15th National Conference of Psychology, 2012, 492 - 493.

[4] 连慧香,王俊锋,郭峰.应激状态下内分泌变化对家禽营养代谢的影响[J].养禽与禽病防治,2009(10):4-8.
Lian H X, Wang J F, Guo F. Effects of endocrine changes on nutrient metabolism of poultry under stress [J]. Poultry Raising And Disease Control, 2009(10): 4 - 8.

[5] 《关于印发<十四运会和残特奥会食源性兴奋剂检测工作方案>的通知》,全运组办发[2021]38号.
Notice on the issuance of the "Work Plan for Foodborne Stimulant Testing for the 14th Games and the Special Olympics", issued [2021] No. 38 by the National Transport Organization.

[6] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1 - 2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement[S].

[7] CNAS-GL006:2019 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS - GL006: 2019 Guidance on quantifying uncertainty in chemical analysis[S].

[8] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
JJG 646 - 2006 Verification Regulation of Locomotive Pipette [S].

[9] JJG 196-2006 常用玻璃量器[S].
JJG 196 - 2006 Working glass container [S].

(编辑:陈希)