

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.06.09

鸡蛋中多西环素残留测定不确定度评定

张雪芹,张崇威,韩立,李华岑,吴志明,刘占通*

(河南省农畜水产品检验技术研究院,郑州 450008)

[收稿日期] 2023-03-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2023)06-0057-09 [中图分类号] S859.79

[摘要] 评定了高效液相色谱串联质谱法测定鸡蛋中多西环素残留量的不确定度,通过建立数学模型,对高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中多西环素残留量进行不确定度评定,分析不确定度来源,评价其对测定结果不确定度的相对贡献,并计算合成不确定度,最终得到鸡蛋中多西环素残留量的扩展不确定度。结果显示,鸡蛋中多西环素残留量为 $9.18 \mu\text{g}/\text{kg}$,在 95% 的置信区间下,合成不确定度 0.0603,扩展不确定度为 0.1206($k=2$),最终结果应表示为 $9.18 \pm 1.11 \mu\text{g}/\text{kg}$,实验过程中不确定度主要来源于工作曲线的配制过程,测量重复性和回收率。本研究可为以后的检测工作提供可行性建议。

[关键词] 高效液相色谱-串联质谱法;鸡蛋;多西环素;不确定度

作者简介: 张雪芹,本科,从事食品质量安全检测。

通讯作者: 刘占通, E-mail: hnsysls@163.com

未对该处方进行薄层色谱鉴别。方中以陈皮芳香化湿,有理气健脾和胃之效,为臣药。桑白皮肃降肺气,通调水道,泻肺行水;为佐药。生姜皮辛散,通行全身而散水气,为使药,其中君药茯苓皮进行含量测定控制,桑白皮、陈皮、姜皮均为方中要药,为了更好的控制本品质量,故增加了桑白皮、陈皮、姜皮的薄层鉴别方法。

研究通过薄层色谱法对桑白皮、陈皮、姜皮三味药材进行了定性鉴别,结果表明,所拟定的 TLC 色谱条件,分离效果佳,稳定性和耐用性良好,专属性强,阴性无干扰,可用于产品的质量控制。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典(2020年版二部). 中国农业出版社,2020[S].
Veterinary Pharmacopoeia of the people's Republic of China (2020 Edition II). China Agricultural Press, 2015[S].
- [2] 中国药典 2020 年版“开胃山楂丸”中桑白皮薄层鉴别方法[S].
TLC identification method of mulberry bark in appetizer Hawthorn pills in Chinese Pharmacopoeia 2015[S].

- [3] 贺云杰,赵晨. 参附强心丸中人参、大黄、桑白皮的薄层色谱鉴别及乌头碱限度检查[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2009(3):468-471.
Yunjie He, Chen Zhao. TLC Identification of Active Ingredients in Shenfu Qiangxin Pill and Associated Limited Examination of Aconitine[J], World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2009(3): 468-471; 468-471
- [4] 项海芝,桑育黎. 小儿肺咳颗粒中陈皮的薄层鉴别方法改进研究[J]. 中华中医药学刊,2007,3(25):462.
Haizhi Xiang, Yuli Sang. Improved TLC identification of Tangerine peel in Xiaer Feike Granules [J]. CHINESE ARCHIVES OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE 2007, 3(25): 462.
- [5] 中国药典 2015 年版“气痛丸”中枳实薄层鉴别方法[S].
TLC identification of Fructus Aurantii in Qitong pills, 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia[S].
- [6] 中成药中的药材薄层色谱鉴别中干姜药材(P40)薄层鉴别[S].
TLC identification of dried ginger (P40) in “TLC identification of proprietary Chinese medicines”[S].

(编辑:陈希)

Uncertainty Evaluation for The Determination of Doxycycline Residues in Eggs

ZHANG Xue - qin, ZHANG Chong - wei, HAN Li, LI Hua - cen, WU Zhi - ming, LIU Zhan - tong*

(Henan Institute of Agricultural Animal and Aquatic Products Inspection Technology, Zhengzhou 450008 China)

Corresponding author: LIU Zhan - tong, E - mail: hnsysls@163. com

Abstract: To evaluate the uncertainty of the determination of doxycycline residues in eggs by high performance liquid chromatography tandem mass spectrum (HPLC - MS/MS), we established a mathematical model, the uncertainty assessment of the testing of the doxycycline residues in eggs by HPLC - MS/MS was carried out. The cause of uncertainty was analyzed, and its relative contribution to the uncertainty in the testing process was evaluated, combined uncertainty was calculated, and the expanded uncertainty for doxycycline residues in eggs was got finally. The result shows that doxycycline residue in eggs was $9.18 \mu\text{g}/\text{kg}$. Under the 95% confidence interval, the combined uncertainty was 0.0603, and the expanded uncertainty was 0.1206 ($k = 2$), the final result should be expressed as $9.18 \pm 1.11 \mu\text{g}/\text{kg}$, The uncertainty in the testing process is mainly comes from the preparation process of the working curve, measurement repeatability and recovery rate. This study can provide practical suggestions for future testing work.

Key words: HPLC - MS/MS; eggs; doxycycline; uncertainty

多西环素属半合成四环素类抗生素^[1], 又称脱氧土霉素、强力霉素, 对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌以及一些立克次氏体、衣原体、支原体、螺旋体和某些原虫均有抑制作用, 具有高效、广谱及长效的特点^[2-3]。体内外抗菌活性均优于土霉素和四环素^[4], 作为饲料添加剂或药品^[5-6], 被广泛应用于畜牧、水产等养殖过程中, 以达到促生长和治疗疾病的作用^[7]。多西环素不仅有抑菌作用, 而且可能通过抑制炎症因子、信号通路及基质金属蛋白酶等机制, 在组织再生、修复, 延缓组织退变等方面具有重要作用^[8], 近年来亦可用于治疗水生动物疾病, 如鱼的弧菌病、爱德华菌病和气单胞菌病等^[9-10], 但多年来由于四环素类的广泛应用但超剂量、超范围及不遵守休药期等不合理使用, 造成了畜禽产品中残留超标的现象, 药物残留问题引起社会广泛关注。同时, 由于多西环素水溶性好, 环境中不易降解, 且体内代谢后主要为原型药物^[11], 通过食物链富集, 对人体肝脏、牙齿和骨骼等造成损害, 并导致耐菌药株的出现, 给人类的健康造成潜在危害。因此, 我国农业农村部发布的 GB31650 - 2019 食品中兽药残留最大限量对多西环素有严格的规定, 猪、

鸡和牛等靶动物组织中皮 + 脂肪为 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、肌肉为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、肾为 $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝为 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$, 且在最新标准 GB31650.1 - 2022 中对禽蛋中多西环素残留限量给出了明确规定, 即为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[12]。

目前, 多西环素的检测方法主要有液相色谱法^[13-15], 液相色谱 - 串联质谱法^[16-24]、分光光度法^[25]、薄层色谱法^[26]、微生物法^[27]。禽蛋中较低的残留限量, 对方法灵敏度和仪器灵敏度均有很高的要求, 因此, 具有高灵敏度和精密度的液相色谱 - 串联质谱法逐渐成为残留检测主要手段。较低的残留限量对残留检测结果的准确度和精密度也有了更高的要求, 方法不确定度的评定也越来越被重视。目前, 梁飞燕等已经报道了液质联用法测定多西环素残留量不确定度的评定, 以及液相色谱法测定四环素类残留量的不确定度评价, 计算并合成了扩展不确定度, 但评价基质主要为猪肉^[28]、鸡肉^[29]、水产^[30]、牛奶^[31]或饲料^[32]等, 对评价液质联用法测定鸡蛋中多西环素残留量的不确定度的文献较少, 基于以上研究, 本研究对高效液相色谱 - 串联质谱法测定鸡蛋中多西环素残留量不确定度进行评定, 结合数学模型, 分析并量化不确定

来源的因素,讨论各不确定度分量的相对贡献,确认实验过程重点关注环节,以提高对检测结果的判定提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Waters Acquity UPLC - xevo TQ - S 高效液相色谱 - 串联质谱仪(配电喷雾离子源,美国 Waters 公司), ES3200 型天平(感量 0.01 g, METTLER 公司); S470 - K 型酸度计(梅特勒 - 托利多仪器(上海)有限公司); TARGIN TECH VX - 03 多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司); 3K - 30 型台式高速冷冻离心机(德国 sigma 公司); TTL - DC II 型 24 位水浴氮吹仪; Milli - Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); IKA MS3 Basic 圆周振荡器(广州仪科实验室技术有限公司)。KQ 5800 B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 多西环素(含量:98%); 甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,德国 Fluck 公司); 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(优级纯), 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)(分析纯); 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)(分析纯); McIlvaine - Na_2EDTA 缓冲盐:将 12.9 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、27.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1000 mL 水中,溶解混匀,即得;有机滤膜(0.22 μm , 天津津腾公司); HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL, 天津市天兴达科技有限公司); 水为一级水。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 提取:取试料 2 g(精确至 ± 0.02 g), 于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 McIlvaine - Na_2EDTA 缓冲液 8 mL, 振荡 10 min, 低温(5 $^{\circ}\text{C}$) 14000 r/min 离心 10 min, 吸取上层液体于另一 50 mL 离心管中。重复用 McIlvaine - Na_2EDTA 缓冲液提取 2 次, 每次 8 mL, 合并提取液, 低温(5 $^{\circ}\text{C}$) 14000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

净化:固相萃取柱使用前加入少许脱脂棉,并依次用甲醇、水各 3 mL 活化,备用液过柱,用水 3 mL, 5% 甲醇 3 mL 淋洗,抽干,甲醇 3 mL 洗脱,抽干,收集洗脱液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加 30% 甲醇 1.00 mL 定容,涡旋混匀过微孔滤膜,供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

谱 - 串联质谱仪测定。

1.2.2 工作曲线的配制 精密称取 11.08 mg 盐酸多西环素于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容混匀。然后取 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中,加乙腈稀释并定容为中间液 I, 取中间液 I 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中,加乙腈稀释并定容为中间液 II, 取中间液 II 1.00 mL 于 10 mL 量瓶中,加乙腈稀释并定容为中间液 III, 分别取中间液 III 0.05、0.10、0.2 mL 及中间液 II 0.05、0.10、0.2 mL 于空白洗脱液中,氮气吹干,1.0 mL 复溶液溶解混匀得浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 的工作曲线。

1.2.3 仪器条件 色谱条件:色谱柱:Waters AcquityBEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量:10 μL ; 流动相:A:0.1% 甲酸乙腈溶液, B:0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Procedure of gradient elution

| 时间/min | 流速/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) | A/% | B/% |
|--------|--|-----|-----|
| 0 | 0.30 | 10 | 90 |
| 4.0 | 0.30 | 40 | 60 |
| 5.0 | 0.30 | 10 | 90 |

质谱条件:电喷雾(ESI)离子源,正离子,多反应离子监测(MRM),电离电压:3.2 kV,锥孔电压:24 V,源温:150 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度:450 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气流速:150 L/h,脱溶剂气流速:1000 L/h,定性、定量离子对、离子源、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 定性、定量离子及对应的锥孔电压和碰撞能量

Tab 2 Qualitative and quantitative ion pair, the corresponding cone volt and collision energy

| 化合物名称 | 定性离子对(m/z) | 锥孔电压/V | 碰撞能量/eV |
|-------|-----------------|--------|---------|
| 多西环素 | 445.18 > 153.99 | 34.0 | 28.0 |
| | 445.18 > 321.04 | 34.0 | 28.0 |

1.2.4 不确定度数学模型的建立

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000}$$

其中: X: 供试品中待测组分的残留量, $\mu\text{g}/\text{kg}$; C: 由曲

线校准所得试样溶液中待测组分的浓度,ng/mL;V:试样定容体积,mL;m:试样质量,g;1000:转换系数。

1.2.5 不确定度来源分析 由检测方法和数学模型可知,鸡蛋中检测多西环素残留量的不确定度分量主要来源为:标准物质引入的不确定度;样品称量引入的不确定度;样品定容引入的不确定度;测量重复性不确定度;回收率不确定度。

2 结果与分析

2.1 标准品纯度引入的不确定度 $u_{rel(标纯)}$ 由标准品证书显示,标准品纯度为 98.0%,则不确定度半宽为 $a = 2.0\%$,服从均匀分布,标准不确定度为 $u_{标物} = 2.0\% / \sqrt{3} = 0.01155$,相对标准不确定度为 $u_{rel(标纯)} = \frac{0.01155}{98.0\%} = 0.01179$ 。

2.2 标准品称量引入的不确定度 $u_{rel(标称)}$ 使用十万分之一的电子天平称量盐酸多西环素 11.08 mg,由检定证书得知,实际标尺分度值 $d = 0.01$ mg,检定标尺分度值 $e = 10 d = 0.1$ mg,天平称量最大允许误差绝对值为 $MPEV = 1.5e = 0.15$ mg,按照均匀分布计算,称量标物时引入的标准不确定度和相对不确定度分别为: $u_{标物} = 0.15 \text{ mg} / \sqrt{3} = 0.0866 \text{ mg}$, $u_{rel(标称)} = \frac{0.0866 \text{ mg}}{11.08 \text{ mg}} = 0.007816$ 。

2.3 标准贮备溶液配制引入的不确定度 $u_{rel(标配)}$ 由贮备液配制过程中引入的不确定度主要来自 10 mL 容量瓶校准不确定度 $u_{容}$ 及甲醇受室温变化引入的不确定度 $u_{甲}$ 。依据玻璃量器检定规程^[33],10 mL 量瓶容量允差为 ± 0.020 mL,室温为 20 ± 5 °C,甲醇膨胀系数为 0.00119,按照均匀分布,则标准不

确定度 $u_{容} = 0.020 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.01155 \text{ mL}$,标准不确定度 $u_{甲} = 5 \text{ mL} \times 10 \times 0.001191 / \sqrt{3} = 0.03438 \text{ mL}$,合成标准不确定度 $u_{标配} = \sqrt{u_{容}^2 + u_{甲}^2} = \sqrt{0.01155^2 + 0.03438^2} = 0.03627 \text{ mL}$,相对标准不确定度 $u_{rel(标配)} = \frac{u_{标配}}{10 \text{ mL}} = 0.003627$ 。

2.4 标准工作溶液稀释引入的不确定度 $u_{rel(标稀)}$ 由 1.2.2 项标准工作曲线配制过程可知,用到量具及频次为:10 mL 容量瓶 3 次、1000 μL 移液枪取 1000 μL 体积 1 次、200 μL 移液枪取 200 μL 体积 2 次、100 μL 移液枪取 100 μL 体积 4 次、100 μL 移液枪取 50 μL 体积 2 次,引入的不确定度主要来源于所使用容量瓶最大容量允差和移液枪吸取体积允差^[34],以及稀释溶剂受室温变化所产生的体积膨胀,服从均匀分布, $k = \sqrt{3}$,标准溶液稀释溶剂均为乙腈,乙腈膨胀系数为 0.00137,室温为 20 ± 5 °C,则标准不确定度分别为:

$$u_{容量瓶} = \frac{\text{最大容量允差}}{k}, u_{移液枪} = \frac{\text{吸取体积允差}}{k},$$

$$u_{溶剂} = \frac{\text{溶剂体积} \times \text{温差} \times \text{膨胀系数}}{k},$$

$$u_{合成} = \sqrt{u_{容量瓶}^2 \text{ 或 } u_{移液枪}^2 + u_{溶剂}^2}, u_{rel(合成)} =$$

$$\frac{u_{合成}}{\text{容量瓶体积或移液枪吸取体积}},$$

$$u_{rel(标稀)} =$$

$\sqrt{3 \times u_{rel(合成1)}^2 + 3 \times u_{rel(合成2)}^2 + 4 \times u_{rel(合成4)}^2 + 2 \times u_{rel(合成5)}^2}$ 。
标准工作溶液配制过程引入的相对标准不确定度如表 3 所示。

表 3 标准曲线配制过程引入的不确定度

Tab 3 Uncertainty introduced by the standard cure formulation process

| 合成不确定度名称 | 器皿名称 | 器皿(移取)体积/mL | 允差/mL | $U_{容量瓶}$ ($U_{移液枪}$) | $U_{溶剂}$ | $U_{合成}$ | $U_{rel(合成)}$ | 使用次数 | $U_{rel(标稀)}$ |
|----------------|------------------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------|-----------|---------------|------|---------------|
| $u_{rel(合成1)}$ | 10 mL 容量瓶 | 10 | ± 0.020 | 0.01155 | 0.03955 | 0.04120 | 0.004120 | 3 | |
| $u_{rel(合成2)}$ | 1000 μL 移液枪 | 1.0 | ± 0.010 | 0.005774 | 0.003955 | 0.006999 | 0.006999 | 1 | |
| $u_{rel(合成3)}$ | 200 μL 移液枪 | 0.2 | ± 0.003 | 0.001732 | 0.0007910 | 0.001904 | 0.009520 | 2 | 0.03884 |
| $u_{rel(合成4)}$ | 100 μL 移液枪 | 0.1 | ± 0.002 | 0.001155 | 0.0003955 | 0.001221 | 0.01221 | 4 | |
| $u_{rel(合成5)}$ | 100 μL 移液枪 | 0.05 | ± 0.0015 | 0.0008660 | 0.0001977 | 0.0008883 | 0.01777 | 2 | |

由表 3 可知,由标准工作溶液稀释引入的不确定度 $u_{rel(标稀)}$ 为 0.03884。

2.5 标准曲线拟合引入的不确定度 $u_{rel(拟合)}$ 采用最小二乘法对标准溶液浓度及相应仪器响应值进行拟合,由此引入的标准曲线拟合不确定度计算公式如下:

$$u_{曲线} = \frac{S_R}{B} = \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(C_x - C_{0j})^2}{\sum_{j=1}^n (C_{0j} - \bar{C}_{0j})^2}}, S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_{0j} - (B_0 + B \times C_{0j})]^2}{n - 2}}, u_{rel(曲线)} = \frac{u_{曲线}}{c_x}。$$

式中, S_R 为标准曲线的残差的标准偏差; B 为标准曲线斜率; P 为样品溶液测量次数; n 为标准曲线溶液测量次数; \bar{C}_x 为样品溶液浓度均值, ng/mL; 为各标准曲线点浓度平均值, ng/mL; 为标准曲线各点浓度, ng/mL; A_{0j} 为标准曲线各浓度点响应面积; B_0 为标准曲线截距。标准不确定度计算结果如表 4 所示。

表 4 标准曲线拟合引入的不确定度

Tab 4 Uncertainty introduced by the standard cure fitting

| 参数 | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | STD6 |
|---|-------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 标准溶液浓度 $C_{0j}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 0.5019 | 1.0038 | 2.0077 | 5.0192 | 10.0385 | 20.0770 |
| 标准曲线各浓度峰面积 A_{0j} | 10258 | 21698 | 44618 | 120595 | 228695 | 469521 |
| 标准溶液测量次数 n | 6 | | | | | |
| 曲线线性方程 | $Y = 23394.4425X - 1460.9589$ | | | | | |
| 相关系数 r | 0.9998 | | | | | |
| 斜率 B | 23394.4425 | | | | | |
| 截距 B_0 | -1460.9589 | | | | | |
| 标准浓度平均值 $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 6.4414 | | | | | |
| 标曲残差标准偏差 S_R | 3392.4163 | | | | | |
| 样品测量次数 P | 6 | | | | | |
| 样品浓度均值 $\bar{C}_x / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 18.5 | | | | | |
| 标准不确定度 $u_{曲线} / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 0.1331 | | | | | |
| 相对标准不确定度 $u_{rel(拟合)}$ | 0.007196 | | | | | |

2.8 试样测量重复性引入的不确定度 $u_{rel(重复)}$ 对样品溶液进行连续 6 次测量,其标准偏差 $s =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}, \text{标准不确定度 } u_{重复} = \frac{s}{\sqrt{n}}, \text{相对标准}$$

2.6 定容体积引入的不确定度 $U_{rel(定容)}$ 试样经提取、净化、氮吹后用 1.00 mL 移液枪加复溶液混匀。1.00 mL 移液枪移取 1.00 mL 液体时允差为 ± 0.010 mL,按照均匀分布考虑,其引入标准不确定

$$U_{定容} = \frac{0.010 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.005774 \text{ mL}, \text{相对标准偏差为}$$

$$U_{rel(定容)} = \frac{u_{定容}}{1.0 \text{ mL}} = 0.005774。$$

2.7 试样称量引入的不确定度 $U_{rel(称样)}$ 称取试样 2 份,分别为 2.01、2.02 g,均值为 2.015 g,由检定证书结果可知,实际标尺分度值 $d = 0.01$ g,检定标尺分度值 $e = 10d = 0.1$ g,称量范围内,示值最大允许误差 MPEV 为 $\pm 0.5e$,服从均匀分布,则不确定

$$u_{称样} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}} = \frac{0.05 \text{ g}}{\sqrt{3}} = 0.02887 \text{ g}, \text{相对标准不}$$

$$\text{确定度 } U_{rel(称样)} = \frac{u_{称样}}{2.015 \text{ g}} = 0.01433。$$

准不确定度 $u_{rel(重复)} = \frac{u_{重复}}{x}$, X_i 为第 i 次测量得试样

多西环素残留量,为样品残留量均值, n 为测量次数,符合正态分布,则在置信区间为 95% 时,由测量重复性引入的不确定度见表 5。

表 5 样品测量重复性引入的不确定度

Tab 5 Uncertainty introduced by sample measurement repeatability

| | 序号 | | | | | |
|---|---------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 残留量 $X_i / (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ | 8.36 | 9.70 | 8.91 | 8.76 | 9.50 | 9.85 |
| 残留量均值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 9.18 | | | | | |
| 标准偏差 $s /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 0.5905 | | | | | |
| 标准不确定度/ $u_{\text{重复}} (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ | 0.2411 | | | | | |
| 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{重复})$ | 0.02626 | | | | | |

表 6 回收率引入的不确定度

Tab 6 Uncertainty introduced by collection rates

| | 序号 | | | | | |
|--|---------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 回收率/% | 78.5 | 88.3 | 82.9 | 89.9 | 93.5 | 82.6 |
| 回收率均值/% | 85.6 | | | | | |
| 标准偏差 $s / \%$ | 5.5526 | | | | | |
| 标准不确定度 $u_{\text{回收率}} / \%$ | 2.2668 | | | | | |
| 相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{回收率})$ | 0.02637 | | | | | |

2.9 回收率引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{回收率})$ 前处理过程包含了提取、净化、浓缩等过程,操作较为复杂,采用回收率不确定度进行统一评价,利用空白样品添加标物法,做 6 平行,其标准偏差 $s =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}{n-1}}, \text{标准不确定度 } u_{\text{重复}} = \frac{s}{\sqrt{n}}, \text{相对标准}$$

不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{重复}) = \frac{u_{\text{重复}}}{R}$, R_i 为第 i 次测得回收率,为平均回收率, n 为测量次数。回收率及不确定度如表 6 所示。

$$u_{\text{rel}} = \sqrt{u_{\text{纯}}^2 + u_{\text{rel纯}}^2 + u_{\text{rel标}}^2 + u_{\text{rel标稀}}^2 + u_{\text{rel拟合}}^2 + u_{\text{rel定溶}}^2 + u_{\text{rel称样}}^2 + u_{\text{rel重复}}^2 + u_{\text{rel回收率}}^2 + u_{\text{rel面积}}^2} = \sqrt{0.01179^2 + 0.007816^2 + 0.003627^2 + 0.03884^2 + 0.007196^2 + 0.005774^2 + 0.01433^2 + 0.02626^2 + 0.02637^2 + 0.01559^2} = 0.0603。$$

实验测得鸡蛋中多西环素残留量为:9.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$,根据 CNAS - GL006 - 2008《化学分析中不确定度的评估指南》,该方法属于正态分布,在 95% 置信水平下,取包含因子 $k = 2$,则相对扩展不确定度 $u_k = u_{\text{rel}} \times 2 = 0.1206$,扩展不确定度为 $u = 9.18 \mu\text{g}/\text{kg} \times u_k = 1.11 \mu\text{g}/\text{kg}$,最终结果应表示为:在置信水平为 95% 时,取 $k = 2$, $X = 9.18 \pm 1.11 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.12 不确定度各分量柱状图 如图 1 所示,利用该方法测定多西环素残留量时,对检测结果影响较大的为工作溶液的配制,其次为重复测量和

对结果进行显著性检验,并根据显著性检验结果来判定回收率是否与 1.0 有显著性差异。设置信区间为 95%,自由度为 $n - 1 = 5$ 时,查表可知, $t_{0.95}(5) = 2.571$,检测统计数据 T 值按下式计算: $T = \frac{|1 - \bar{R}|}{u_{\text{回收率}}} = 6.35 > t_{0.95}(5)$,平均回收率存在显著差异,应考虑回收率引入的不确定度。

2.10 峰面积测定引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{面积})$ 利用液相色谱 - 串联质谱测定鸡蛋中多西环素残留量,根据仪器校准证书,其峰面积重复性的相对标准偏差(RSD)为 2.7%,采用 B 类评定,按照均匀分布, $k = \sqrt{3}$,则由峰面积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{面积}) = \text{RSD}/k = 2.7\% / \sqrt{3} = 0.01559$ 。

2.11 合成相对标准不确定度 u_{rel} 及结果表示 通过对鸡蛋中多西环素残留量测定的不确定度来源分析和计算,获得各不确定度分量值,合成相对标准不确定度。

回收率的影响,对结果影响最小的为贮备液的配制。

本文评定了高效液相色谱串联质谱测定鸡蛋中多西环素残留量不确定度,该方法中,标准品纯度和称量、贮备液配制、曲线拟合以及样品定容对检测结果影响较小,对总不确定度贡献均低于 10%,由重复测量及回收率引入的不确定度基本一致,为 18.5%,但工作溶液配制过程引入的不确定度最大,为 27.3%,因此,在前处理过程中,一定要规范操作严格配制标准溶液,对容量瓶及移液枪要

定期检定并在使用前再次确认,选用精度较高的量具,同时控制实验室温差或在温差较小的空间操

作,以降低溶剂膨胀引入的不确定度,提高测量结果的准确性。

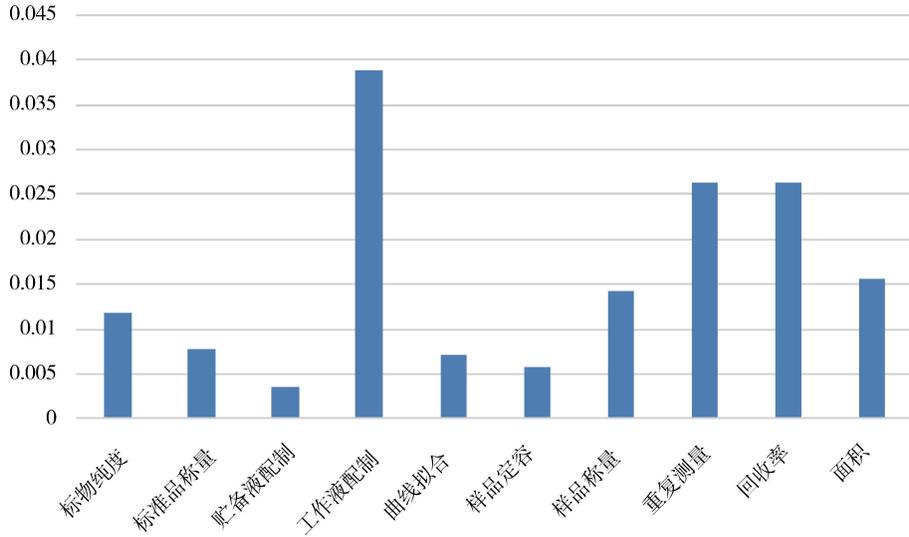


图 1 鸡蛋中多西环素残留检测不确定度各分量柱状图

Fig 1 Histogram of doxycycline residue detection uncertainty by component in eggs

参考文献:

- [1] 刘欣,魏丽娟,瞿红颖,等. 盐酸多西环素颗粒在猪体内残留消除的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 539(23): 201-203.
- Liu X, Wei L J, Qu H Y, *et al.* Study on the elimination of doxycycline hydrochloride granules in pig [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, 539(23): 201-203.
- [2] 张青,李慧素,吴宁鹏,等. 鸡组织中多西环素残留量测定的高效液相色谱法建立[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(10): 1-9.
- Zhang Q, Li H S, Wu N P, *et al.* Determination of doxycycline residues in chicken tissues by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(10): 1-9.
- [3] 耿智,贾兴,刘静,等. 盐酸多西环素颗粒对自然感染猪传染性胸膜肺炎的疗效研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, (11): 189-192.
- Geng Z, Jia X, Liu J. *et al.* Efficacy of doxycycline hydrochloride granules on infectious pleuropneumonia in naturally infected pigs [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary

Medicine, 2018, (11): 189-192.

- [4] 孔伶俐,林翠萍,陆毅兴,等. 牛奶中多西环素残留消除及最大残留限量[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(04): 750-755.
- Kong L L, Lin C P, Lu Y X, *et al.* Residue depletion and maximum residue limit assessment for doxycycline in milk [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(4): 750-755.
- [5] 夏伶俐,区敏霞. 高效液相色谱法测定鸡肉中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素残留量的方法优化探讨[J]. 现代食品, 2018, 12: 108-111.
- Xia J Z, Ou M X. HPLC determination of oxytetracycline, Tetracycline, chlortetracycline, doxycycline in chicken residues method optimization [J]. Modern Food, 2018, 12:108-111.
- [6] 苏银池,高娜,岳婷婷,等. 生鲜乳中四环素类药物残留的超高效液相色谱-串联质谱检测方法研究[J]. 农产品质量与安全, 2021, 5: 54-59.
- Su Y C, Gao N, Yue T T, *et al.* Determination of tetracycline residues in raw milk by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2021, 5:54-59.
- [7] 高云慨,陈小妹,陈春泉,等. HPLC-MS/MS法测定罗非鱼中4种四环素类抗生素残留量及不确定度评定[J]. 食品安

- 全导刊, 2022(32): 97 - 101 + 105.
- Gao Y K, Chen X M, Chen C Q, *et al.* Uncertainty evaluation of determination of 4 kinds of tetracyclines antibiotics in tilapia by HPLC - MS/MS[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(32): 97 - 101 + 105.
- [8] 于召龙, 田纪伟. 多西环素抑制基质金属蛋白酶作用机制的研究进展[J]. *中国当代医药*, 2019, 26(30): 28 - 30 + 34.
- Yu S L, Tian J W. Research advance on the mechanism of inhibition effects of doxycycline on matrix metalloproteinases[J]. *China Modern Medicine*, 2019, 26(30): 28 - 30 + 34.
- [9] Rivierej E, Papich M G. *Veterinary pharmacology and therapeutics* [M]. 10thed. Hoboken, NJ: John Wiley&SonsInc. 2018.
- [10] Xu N, Fu Y, Cheng B, *et al.* The pharmacokinetics of doxycycline in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following intravenous and oral administrations[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 577234.
- [11] 史艳伟, 孟丽华, 刘方, 等. 高效液相色谱法测定渔业水质中多西环素、四环素、土霉素、金霉素残留量[J]. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(06): 43 - 47.
- Shi Y W, Meng L H, Liu F, *et al.* Determination of doxycycline, tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline residual amount in fishery water by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2015, 5(06): 43 - 47.
- [12] GB 31650.1 - 2022 食品安全国家标准 食品中 41 中兽药最大残留限量[S].
- GB31650 - 2022 National food safety standard - Maximum residue limits for 41 veterinary drugs in foods[S]
- [13] He Z, Guo Y, Chen L, *et al.* Development of a UPLC - FLD method for quantitative analysis of three tetracyclines and two fluoroquinolones in chicken muscle [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 109: 104471 - 104479.
- [14] Armstrong N, Richez M, Raoult D, *et al.* Simultaneous UHPLC - UV analysis of hydroxychloroquine minocycline and doxycycline from serum samples for the therapeutic drug monitoring of Q fever and whipple's disease [J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2017, 1060: 166 - 172.
- [15] 余佩瑶, 陈传胜, 刘寒冰, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定鸡粪中四环素、喹诺酮类和磺胺类抗生素[J]. *色谱*, 2019, 37(5): 518 - 524.
- Yu P Y, Chen C S, Liu B H, *et al.* Simultaneous determination of tetracyclines, fluoroquinolones, an sulfonamides in chicken manure using solid - phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(5): 518 - 524.
- [16] Bortolotte A R, Daniel D, Braga P A D. A simple and high - throughput method for multiresidue and multiclass quantitation of antimicrobials in pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) fillet by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1124: 17 - 25.
- [17] Da Silveira V G, Oliveira M S, De Almeida C A A, *et al.* Liquid chromatography - tandem mass spectrometry determination and depletion profile of chlortetracycline, doxycycline, and oxytetracycline in broiler chicken muscle after oral administration [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 8: 2181 - 2194.
- [18] Patyra E, Kwiatek K. Development and validation of multi - residue analysis for tetracycline antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2017, 34(9): 1553 - 1561.
- [19] Anna G, Andrzej P, Grzegorz T. LC - MS/MS analysis of doxycycline residues in chicken tissues after oral administration [J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2014, 58(4): 573 - 579.
- [20] Gajda A, Posniak A, Tomczyk G. LC - MS/MS analysis of doxycycline residues in chicken tissues after oral administration [J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2014, 58(4): 573 - 579.
- [21] 石春红, 曹向英, 曹美萍. 超高效液相色谱 - 串联质谱法分析动物源性食品中 4 种四环素类药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(10): 3126 - 3131.
- Shi C H, Cao X Y, Cao M P. Determination of 4 kinds of tetracycline drugs residues in food of animal origin by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(10): 3126 - 3131.
- [22] 刘善普, 陆桂萍, 刘雨昕. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肝中 4 种四环素类药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(11): 4379 - 4387.
- Liu S Q, Lu G P, Liu Y X. Determination of 4 kinds of tetracyclines residues in swine liver by ultraperformance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(11): 4379 - 4387.
- [23] 皮瑞渔, 吴迪, 周临, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定鸭蛋中 7 种四环素类药物残留[J]. *分析试验室*, 2020, 39(9): 1062 - 1065.

- Pi J Y, Wu D, Zhou L, *et al.* Determination of 7 tetracyclines residues in duck eggs by ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2020, 39(9): 1062 – 1065.
- [24] 王飞, 宓捷波, 李淑静, 等. 改良的 QuEChERS 样本前处理/高效液相色谱 – 串联质谱法检测猪肉中四环素类兽药的残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(2): 272 – 275.
- Wang F, Mi J B, Li S J, *et al.* Determination of tetracyclines residues in pork by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with modified QuEChERS sample Pretreatment[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(2): 272 – 275.
- [25] Abdulsattar J O, Hadi H, Richardson S, *et al.* Detection of doxycycline hyclate and oxymetazoline hydrochloride in pharmaceutical preparations via spectrophotometry and microfluidic paper – based analytical device (mu PADs) [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 113(6): 196 – 204.
- [26] Das S, Faysal M N A, Ferdous J, *et al.* Detection of oxytetracyclin and doxycycline residue in different growth stages of commercial broiler [J]. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 2019, 17(1): 7 – 14.
- [27] Le T, Yu H, Guo Y C, *et al.* Development of an indirect competitive ELISA for the detection of doxycycline residue in animal edible tissue [J]. Food & Agricultural Immunology, 2009, 20(2): 111 – 124.
- [28] 武焯, 李小桥, 邹锐. 液相色谱 – 串联质谱法测定猪肉中四环素类药物残留量的不确定度评定[J]. 中国兽药杂志, 2022, 56(4): 53 – 60.
- Wu X, Li X Q, Zhou R. Uncertainty Evaluation for the determination of tetracyclines residues in pig muscle by liquid chromatography – tandem mass spectrometry method[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2022, 56(4): 53 – 60.
- [29] 梁飞燕, 吕敏, 林小莹, 等. 鸡肉中强力霉素残留测定不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3294 – 3300.
- Liang F Y, Lv M, Lin X Y, *et al.* Uncertainty evaluation for the determination of doxycycline residue in chicken[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(10): 3294 – 3300.
- [30] 何咏欣, 陈嘉欣, 龚海锟, 等. 液相色谱 – 串联质谱法测定虾类中四环素类物质的不确定度评定[J]. 现代食品, 2022, 28(21): 159 – 165169.
- He Y X, Chen J X, Gong H K, *et al.* Uncertainty evaluation based on determination of tetracyclines in shrimp by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Modern Food, 2022, 28(21): 159 – 165169.
- [31] 陈梦, 范蕾, 蒋凯亚, 等. 高效液相色谱法测定牛奶中四环素类兽药残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5088 – 5093.
- Chen M, Fan L, Jiang K Y, *et al.* Uncertainty evaluation for the determination of tetracycline drug residues in milk by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(15): 5088 – 5093.
- [32] 娄迎霞, 姚婷, 朱晓静, 等. 高效液相色谱法测定饲料中金霉素的 不确定度评价[J]. 饲料研究, 2021, 44(17): 89 – 92.
- Lou Y X, Yao T, Zhu X J, *et al.* Uncertainty evaluation for determination chlortetracycline in feed by high performance liquid chromatography[J]. Feed Research, 2021, 44(17): 89 – 92.
- [33] JJG 196 – 2006 常用玻璃量器检定规程[S]. JJG 196 – 2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [34] JJG 646 – 2006 移液器检定规程[S]. JJG 646 – 2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].

(编辑:侯向辉)