

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.09

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

武 焯^{1,2}, 李小桥², 邹 锐^{2*}

(1. 农业农村部畜禽产品质量安全监督检验测试中心(重庆), 重庆 401120;

2. 重庆市动物疫病预防控制中心, 重庆 401120)

[收稿日期] 2021-09-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 04-0053-08 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 为了评定液相色谱 – 串联质谱法 (LC – MS/MS) 测定猪肉中四环素类药物残留量的不确定度, 依据 GB/T 21317 – 2007 《动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱 – 质谱/质谱法与高效液相色谱法》, 建立相关数学模型, 对实验过程中的不确定度来源进行分析与评定。当采用 LC – MS/MS 法测定猪肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的残留量分别为 50.05、42.81、42.45、41.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 扩展不确定度分别为 5.44、6.72、2.86、4.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$)。检测结果的不确定度主要受回收率、标准物质、工作曲线拟合的影响。

[关键词] 四环素; 不确定度; LC – MS/MS

Uncertainty Evaluation for The Determination of Tetracyclines Residues in Pig Muscle by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Method

WU Xuan^{1,2}, LI Xiao-qiao², ZOU Rui^{2*}

(1. Quality Control and Inspection Center for Domestic Animal Product, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Chongqing),

Chongqing 401120, China; 2. Chongqing Center for Animal Disease Control and Prevention, Chongqing 401120, China)

Corresponding author: ZOU Rui, E-mail: 601540388@qq.com

Abstract: To evaluate the uncertainty of the determination of tetracyclines residues in pig muscle by Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry (LC – MS/MS). According to GB/T 21317 – 2007 *Determination of tetracycline residues in food of animal origin by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method and high performance liquid chromatography method*, relevant mathematical models were established to analyze and evaluate the sources of uncertainty in the LC – MS/MS experiment. When the content of oxytetracycline, tetracycline, aureomycin, doxytetracycline in pig muscle was 50.05、42.81、42.45、41.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by LC – MS/MS, its extended relative uncertainty was 5.44, 6.72, 2.86, and 4.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$), respectively. The

基金项目: 中央高校基本科研业务费(自然科学)(XDJK2020B062)

作者简介: 武 焯, 高级兽医师, 从事食品检测与食品安全研究。

通讯作者: 邹 锐。E-mail: 601540388@qq.com

uncertainty of detection results is mainly affected by recovery rate, standard substance and working curve fitting.

Key words: Tetracycline drug; Uncertainty; LC – MS/MS

测定不确定度是表征合理地赋予被测量值的分散性,是测量结果质量的指标。不确定度越小,所得到的测量结果与被测量的真值越接近。实验室在出具检测报告和认可考核中都会涉及检测结果不确定度的评定,ISO17025 – 2017《校准和检测实验室能力的通用性要求》明确要求“当不确定度与检测结果有效性或应用有关,或客户的指令中有要求,或不确定度影响到限度的符合性时,检测报告中需包括有关不确定度的信息”^[1]。

四环素类药物主要包括土霉素、四环素、金霉素和强力霉素等^[2],是目前全球范围内使用广泛的一类抗生素^[3-5]。现在主要采用高效液相色谱法^[6-7]和液相色谱 – 串联质谱法^[8-9]对其残留量进行检测,对其不确定度的研究也多见报道^[10-15],但目前尚未见采用液相色谱 – 串联质谱法(LC – MS/MS)对猪肉中四环素类药物进行不确定度评定的报道。

采用 GB/T 21317 – 2007 的检测方法,依据 CNAS – GL 006 – 2019《化学分析中不确定度的评估指南》^[16]和 JJF 1059.1 – 2012《测量不确定度评定与表示》^[17]要求,采用 LC – MS/MS 对猪肉中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素残留量的不确定度进行分析与评定,旨在提高检验结果的可靠性,为实验室的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 液相色谱 – 串联质谱仪 AB 5500Q(美国 ABI SCIEX 公司);电子分析天平 XP205(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

对照品购买自德国 Dr. Ehenrnstorfer 公司,盐

酸土霉素,含量:96.02%,不确定度:0.19%;盐酸四环素,含量:97.15%,不确定度:0.18%;盐酸金霉素,含量:92.5%,不确定度:5.0%;盐酸强力霉素,含量:99.3%,不确定度:2.0%。

Oasis HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL,美国 Waters 公司),甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);其它试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 准确称取猪肉试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 0.1 mol/L EDTA – McIlvaine 缓冲液 20 mL,振荡 10 min,10000 rpm 离心,取上清液,重复提取一次。合并两次提取液,用 0.1 mol/L EDTA – McIlvaine 定容于 50.00 mL 容量瓶中。过滤,吸取 10.0 mL 提取液转移至 HLB 固相萃取柱中(使用前依次用 5 mL 甲醇,5 mL 水进行活化),提取液流干后分别用 5 mL 水和 5 mL 5% 甲醇水进行淋洗,抽干后用 10 mL 甲醇 – 乙酸乙酯(1 + 9)(V/V)洗脱,洗脱液用氮吹至干,用 1.0 mL 10% 甲醇溶液溶解残渣,用 0.22 μm 有机相滤膜过滤,供 LC – MS/MS 测定。

1.2.2 标准溶液的配制 准确称取盐酸土霉素 27.65 mg,盐酸四环素 27.93 mg,盐酸金霉素 28.62 mg,盐酸强力霉素 26.19 mg 于 4 个 25 mL 容量瓶中,甲醇溶解后定容,作为四环素标准贮备液。精确吸取各标准储备液 1.0 mL 于同一 100 mL 容量瓶中,用 70% 甲醇定容,得到标准工作液。再用 10% 甲醇稀释,得到各组分浓度分别约为 10、20、50、100、200 ng/mL 的对照溶液,供测试用。

表 1 标准溶液的配制

Tab 1 Preparation of Standard Solution

对照品名称	纯度	单体量	称样量/(mg)	贮备液浓度/(mg · mL ⁻¹)	工作液浓度/(μg · mL ⁻¹)	对照液浓度/ x_i /(ng · mL ⁻¹)
盐酸土霉素	96.2%	92.7%	28.70	1.022	10.22	10.22, 20.44, 51.10, 102.2, 204.4
盐酸四环素	96.2%	92.4%	28.20	1.003	10.03	10.03, 20.06, 50.15, 100.3, 200.6
盐酸金霉素	92.9%	92.9%	29.04	1.002	10.02	10.22, 20.44, 51.10, 102.2, 204.4
盐酸强力霉素	99.3%	92.9%	27.19	1.003	10.03	10.03, 20.06, 50.15, 100.3, 200.6

1.2.3 仪器条件 色谱柱:Agilent C18 色谱柱(4.6 mm×100 mm,1.7 μm);流速为 0.25 mL/min;柱温为 30 ℃;进样量:5 μL;流动相梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure		
时间/Time	0.1% 甲酸水溶液/%	0.1% 甲酸甲醇溶液/%
0.0	90	10
1.0	90	90
8.0	10	90
8.5	90	90
10.0	90	10

表 3 多反应监测条件

Tab 3 MRM Mass condition					
组 分	定性离子	定量离子	DP	EP	CE
土霉素	461.1>426.1	461.1>426.1	55.0	10.0	25.0
	461.1>443.0			10.0	18.0
四环素	445.1>427.0	445.1>427.0	80.0	10.0	24.0
	445.1>410.0		80.0	10.0	27.0
金霉素	479.1>443.9	479.1>443.9	80.0	10.0	28.0
	479.1>461.9		80.0	10.0	23.0
强力霉素	445.1>428.0	445.1>428.0	70.0	10.0	24.0
	445.1>154.0		55.0	10.0	37.0

1.2.4 回收率的计算 采用加标回收的方式,称取 5 份质量均为 5.00 g 的猪肉空白样品,添加四环素类药物工作液 0.025 mL,制备成加标水平约为 50 μg/kg 的阳性添加样品。按 1.2.1 的过程进行前处理后,按 1.2.3 的仪器条件进行检测,计算回收率。

2 数学模型的建立

猪肉中四环素类药物残留量计算公式:

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{m \times A_s \times V_2}$$

式中:X:供试品中待测组分的含量,μg/kg;

m:供试品称样量,g;

A:供试品相应目标化合物的峰面积;

A_s:标准溶液中相应目标化合物的峰面积;

C_s:标准溶液中相应目标化合物的浓度,

ng/mL;

V₁:提取液总体积,mL;

V₂:过 HLB 固相萃取柱的提取液体积,mL;

V₃:最终定容体积,mL。

3 不确定度来源分析

根据检测方法以及数学模型,猪肉中四环素类药物残留量不确定度分量主要来源有:

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)}:测试过程中随机效应引入的不确定度。

4 不确定度分量的评定

4.1 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最大允许误差为 ±0.5 g,按矩形分布 $k = \sqrt{3}$,标准不确定度为: $U_{(1.1)} = 0.5/\sqrt{3} = 0.2887$ 。样品称样量为 5 g,相对标准不确定度为: $U_{rel(1)} = 0.2887/5 = 5.774 \times 10^{-2}$ 。

4.2 样品定容引入的不确定度

4.2.1 容量瓶和移液管刻度引入的不确定度 依据 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[18],A 级 50 mL 容量瓶、10 mL 移液管、1 mL 刻度移液管的最大允许误差分别为 ±0.05、±0.020、±0.008 mL,按矩形分布,k=3,则 50 mL 容量瓶、10 mL 移液管、1 mL 刻度移液管分别引入的标准不确定度为:

$$U_{(2.1)} = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times 50} = 5.774 \times 10^{-4} \text{ mL},$$

$$U_{(2.2)} = \frac{0.020}{\sqrt{3} \times 10} = 1.155 \times 10^{-3} \text{ mL},$$

$$U_{(2.3)} = \frac{0.008}{\sqrt{3} \times 1} = 4.62 \times 10^{-3} \text{ mL},$$

容量瓶和移液管引入的相对标准不确定度为:

$$U_{(2.4)} = \sqrt{0.0005774^2 + 0.001155^2 + 0.004619^2} = 4.656 \times 10^{-3}$$

4.2.2 温度引入的不确定度 玻璃仪器的校准温度为 20 ℃,实验室的实际温度范围为 20 ℃ ±3 ℃,

水在此温度下的膨胀系数为 1.80×10^{-3} ,假设温度变化按矩形分布, $k = 3$,50 mL 容量瓶、10 mL 移液管和 1 mL 刻度移液管的标准不确定度分别为:

$$U_{(2.5)} = 50 \times 2 \times 1.80 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.1039,$$
$$U_{(2.6)} = 10 \times 2 \times 1.80 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.02079,$$
$$U_{(2.7)} = 1.0 \times 2 \times 1.80 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 0.002079,$$
温度变化引入的相对标准不确定度为:
$$U_{(2.8)} = \sqrt{(0.1039/50)^2 + (0.02079/10)^2 + (0.002079/1.0)^2} = 3.60 \times 10^{-3}$$
样品定容引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel(2)} = \sqrt{(4.656 \times 10^{-3})^2 + (3.60 \times 10^{-3})^2} = 5.885 \times 10^{-3}$$
4.3 标准物质引入的不确定度4.3.1 标准物质纯度引入的不确定度 根据标准物质证书,按矩形分布, $k = \sqrt{3}$ 标准物质纯度的相对标准不确定度为: $U_{(3.1)} = u/(p \times \sqrt{3})$,见表 4。4.3.2 标准物质称量引入的不确定度 电子天平的检定证书提供的允许误差为 ± 0.01 mg,按矩形分布, $k = \sqrt{3}$,标准物质称量引入的相对标准不确定度为: $U_{(3.2)} = \frac{0.01}{m \times \sqrt{3}}$,见表 4。

表 4 标准物质纯度的相对标准不确定度
Tab 4 Standard uncertainty of purity

组 分	p 纯度/%	u 不确定度/%	$U_{(3.1)}$	称样量 m/mg	定容体积 V/mL	$U_{(3.2)}$
土霉素	96.2	0.19	0.00114	28.70	25.00	2.01×10^{-4}
四环素	96.2	0.18	0.00108	28.20	25.00	2.05×10^{-4}
金霉素	92.9	5.0	0.00311	29.04	25.00	2.00×10^{-4}
强力霉素	99.3	2.0	0.00116	27.19	25.00	2.12×10^{-4}

4.3.3 标准贮备液定容产生的不确定度 25 mL A 级容量瓶允许误差为 ± 0.03 mL,按矩形分布, $k = \sqrt{3}$,标准不确定度为 $U_{(3.3)} = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173$ mL,实验室的温度变化范围是 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,甲醇的膨胀系数为 1.24×10^{-3} ,标准不确定度为: $U_{(3.4)} = \frac{25 \times 2 \times 1.24 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 3.58 \times 10^{-2}$ mL,则标准储备液定容产生的相对标准不确定度为 $U_{(3.5)} = \frac{\sqrt{0.0173^2 + 0.0358^2}}{25} = 1.59 \times 10^{-3}$

4.3.4 标准工作液引入的不确定度 1 mL A 级单标线移液管的允许误差为 ± 0.007 mL,移液管的标准不确定度为: $U_{(3.6)} = \frac{0.007}{\sqrt{3}} = 0.00404$ mL;溶剂受温度影响的标准不确定度为:

$$U_{(3.7)} = \frac{1 \times 2 \times 1.24 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.00143 \text{ mL},$$

则移液管的相对合成标准不确定度为:

$$U_{(3.8)} = \frac{\sqrt{0.00404^2 + 0.00143^2}}{1} = 0.00484。$$

100 mL 容量瓶的允许误差为 ± 0.10 mL,标准不确定度为: $U_{(3.9)} = \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.0577$ mL,甲醇的膨胀系数为 1.24×10^{-3} ,温度影响的标准不确定度为: $U_{(3.10)} = \frac{100 \times 2 \times 1.24 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.1432$ mL,则容量瓶的相对合成标准不确定度为: $U_{(3.11)} = \frac{\sqrt{0.0577^2 + 0.1432^2}}{100} = 0.00154$ 。标准中间液产生的相对合成标准不确定度为: $U_{(3.12)} = \sqrt{0.00484^2 + 0.00154^2} = 5.08 \times 10^{-3}。$

4.3.5 标准工作曲线配制引入的不确定度 分别移取 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL 标准中间液到 100 mL 容量瓶中,用 10% 甲醇溶液定容,得到标准工作液曲线。标准工作液曲线的相对合成标准不确定度见表 5。

表 5 配制标准工作曲线溶液引入的不确定度

Tab 5 Uncertainty introduced by standard solution preparation

不确定 度来源	项 目	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 1 mL 分度 吸量管	A 级 2 mL 单标 线吸量管	A 级 100 mL 单 标线容量瓶
刻度误差	允许误差/mL	±0.008	±0.008	±0.008	±0.008	±0.010	±0.10
	移取体积/mL	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	100.0
	不确定度	0.00462	0.00462	0.00462	0.00462	0.00577	0.00577
温度误差	温度误差/℃	±2	±2	±2	±2	±2	±2
	膨胀系数/℃ ⁻¹	2.1 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻⁴
	不确定度	2.42 × 10 ⁻⁵	4.84 × 10 ⁻⁵	1.21 × 10 ⁻⁴	2.42 × 10 ⁻⁴	4.84 × 10 ⁻⁴	2.42 × 10 ⁻²
	相对不确定度	0.0462	0.0231	0.00924	0.00462	0.00290	2.49 × 10 ⁻⁴
	使用次数	1	1	1	1	1	5

$$U_{(3.13)} = \sqrt{0.0462^2 + 0.0231^2 + 0.00924^2 + 0.00462^2 + 0.00290^2 + 5 \times 0.000249^2} = 0.0528$$

4.3.6 标准曲线拟合引入的不确定度 对标准工作溶液的 5 个点分别测定 1 次,得到相应的色谱峰面积,采用最小二乘法进行拟合,得到土霉素、四环素、金霉素、强力环素的回归曲线方程。得到各组分的线性回归方程及回归系数分别为:土霉素: $y = 0.8434x + 3.4863$, $R^2 = 0.9996$; 四环素: $y = 1.0153x + 0.2832$, $R^2 = 0.9993$; 金霉素: $y = 1.0142x + 0.5395$, $R^2 = 0.9991$; 强力霉素: $y = 1.013x - 0.1466$, $R^2 = 0.9997$ 。计算标准曲线的残

差标准差(见表 6):
$$s = \sqrt{\frac{\sum_1^5 [y_i - (\hat{y})]^2}{n - 2}}$$
其中: n :标准曲线浓度点数, $n = 5$;
 y_i :浓度为 x_i 所对应的实测峰面积;
 $\hat{y}$:浓度为 x_i 代入标准曲线方程所计算得到的各浓度点的理论峰面积
计算标准工作曲线拟合引入的不确定度(表 6):

表 6 标准曲线的不确定度

Tab 6 The standard uncertaintyof the standard curve

组分	y_i	$\hat{y}$	s	$\bar{c}$	$\bar{x}$	$U_{(3.14)}$
土霉素	10.11, 21.21, 48.15, 90.25, 175.25	12.11, 20.73, 46.58, 89.68, 175.88	1.57	52.05	77.67	0.641
四环素	9.52, 21.83, 48.95, 105.17, 202.92	10.47, 20.56, 50.20, 102.12, 203.95	2.18	42.81	76.23	0.668
金霉素	9.55, 22.47, 48.74, 105.38, 202.73	10.70, 20.86, 51.35, 102.16, 203.78	2.72	42.45	76.15	0.668
强力霉素	9.86, 21.27, 48.73, 102.67, 202.84	10.01, 20.17, 50.66, 101.46, 203.06	1.47	40.16	76.23	0.670

$$U_{(3.14)} = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(\bar{c} - \bar{x})^2}{\sum_1^5 (x_i - \bar{x})^2}}$$

其中: s :标准曲线的残差标准差;
 b :标准曲线的截距;
 n :参与校准曲线拟合的浓度点的个数, $n = 5$;

p :阳性添加样品测定次数, $p=5$;
 $\bar{x}$:校准曲线所有浓度点的平均值, ng/mL;
 $\bar{c}$:阳性添加样品上机测定溶液的浓度平均值, ng/mL;

x_i :校准曲线各点的浓度, ng/mL;
对上述标准物质的各分量不确定度进行合成, 得到相对合成标准不确定度(表 7)。

表 7 标准物质的相对合成标准不确定度

Tab 7 The related combined standard uncertainty of standard substance

名称	纯度 $U_{(3.1)}$	称量 $U_{(3.)}$	贮备液定容 $U_{(3.5)}$	工作液制备 $U_{(3.12)}$	标准工作曲线 $U_{(3.13)}$	标准曲线拟合 $U_{(3.14)}$	相对合成标准不 确定度 $U_{rel(3)}$
土霉素	0.00114	2.01×10^{-4}	0.00159	0.00508	0.0528	0.641	0.643
四环素	0.00108	2.05×10^{-4}	0.00159	0.00508	0.0528	0.668	0.670
金霉素	0.00311	2.00×10^{-4}	0.00159	0.00508	0.0528	0.668	0.670
强力霉素	0.00116	2.12×10^{-4}	0.00159	0.00508	0.0528	0.670	0.672

$$U_{rel(3)} = \sqrt{U_{(3.1)}^2 + U_{(3.2)}^2 + U_{(3.5)}^2 + U_{(3.12)}^2 + U_{(3.13)}^2 + U_{(3.14)}^2}$$

4.4 回收率引入的不确定度评价 样品前处理方法较为复杂,包括提取、净化、洗脱、浓缩等过程,本实验的回收率采用 1.2.4 的方法制备 5 份阳性添

加平行样品,测得各组分的回收率。考虑平均回收率引入的不确定度(表 8)。

表 8 回收率引入的不确定度

Tab 8 The uncertainty evaluation introduced by recovery rate

名称	阳性添加量理论值(μg/kg)	阳性样品添加量测定值 $X(\mu\text{g/kg})$					添加量测定均值 $\bar{X}(\mu\text{g/kg})$	添加量标准偏差 $S(\mu\text{g/kg})$	回收率平均值 $\bar{r}(\%)$	回收率标准偏差 $S_r/\%$	t	相对标准不确定度 $U_{rel(4)}$	相对标准不确定度 $U_{rel(5)}$
		1	2	3	4	5							
土霉素	51.10	55.08	55.68	49.23	49.72	50.55	52.05	3.08	101.86	6.03	0.007	2.64	0.059
四环素	50.15	40.30	47.74	39.46	42.74	40.83	42.81	3.15	83.70	6.16	0.050	3.29	0.073
金霉素	51.10	41.22	41.52	43.99	42.14	43.38	42.45	1.19	83.07	2.34	0.134	1.26	0.028
强力霉素	50.15	39.98	45.21	41.75	40.89	40.16	41.60	2.14	81.32	4.18	0.081	2.30	0.051

$$U_{rel(4)} = \frac{S_r}{\bar{r} \times \sqrt{5}}$$

S_r :回收率标准偏差
 $\bar{r}$:回收率平均值

对回收率采用 t 检验进行显著性分析,以确定检测结果是否需要回收率校正(表 8)。当自由度 $f=4$ 时,查 t 临界分布表, $t(0.05,4)=2.776$ 。据表 8 可知,各组份 t 检验结果分别为:土霉素 $t=0.007 < 2.776$,四环素 $t=0.050 < 2.776$,金霉素 $t=0.134 < 2.776$,强力霉素 $t=0.081 < 2.776$,故回收率无显著性差异,不必用回收率校正结果。

$$t = \frac{|100\% - \bar{r}|}{U_{rel(4)}}$$

4.5 随机效应引入的不确定度 对加标样品重复性测定 5 次,计算随机效应引入的相对不确定度(表 8)。

$$U_{rel(5)} = \frac{S_c}{\bar{C}}$$

S :阳性添加样品添加量测定值标准偏差

$\bar{X}$:阳性添加样品添加量测定均值

兽药残留量的相对标准不确定度;取包含因子 $K = 2$,计算扩展不确定度(置信概率为 95% 时包含因子)(表 9):

5 合成标准不确定度评定

由上述各相对不确定度合成猪肉中四环素类

表 9 相对标准不确定度
Tab 9 Relative standard uncertainty

名称	相对不确定度					相对标准不确定度	扩展不确定度
	$U_{rel(1)}$	$U_{rel(2)}$	$U_{rel(3)}$	$U_{rel(4)}$	$U_{rel(5)}$	U_{rel}	$U / (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
土霉素	0.005774	0.0005885	0.643	2.64	0.059	2.72	5.44
四环素	0.005774	0.0005885	0.670	3.29	0.073	3.36	6.72
金霉素	0.005774	0.0005885	0.670	1.26	0.028	1.43	2.86
强力霉素	0.005774	0.0005885	0.672	2.30	0.051	2.40	4.80

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

液相色谱 – 串联质谱仪测定猪肉中四环素类兽药残留结果表示为:土霉素 (50.05 ± 5.44) μg/kg、四环素 (42.81 ± 6.72) μg/kg、金霉素 (42.45 ± 2.86) μg/kg、强力霉素 (41.60 ± 4.80) μg/kg。

6 结 论

液相色谱 – 串联质谱法测定猪肉中 4 种四环素类兽药残留的不确定度主要来源按影响大小主要来源于回收率、标准物质和随机效应。因此,在实际检测工作中可以通过制定实验室 SOP 来规范不同检测人员的操作过程,选择精度更高的玻璃仪器进行标准溶液的配制,减少随机误差来提高检测结果的准确性。

参考文献:

[1] ISO/IEC 17025:2017, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, the International Organization for Standardization, Geneva, 2017[S].

[2] 伍玉琪, 吴安华. 新型四环素类抗生素 Omadacycline 的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(11): 1087 – 1092. Wu Yu Qi, Wu An Hua. Research progress in omadacycline, a novel tetracycline antibiotic [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2019, 18(11): 1087 – 1092.

[3] 黄希汇, 刘少颖, 金 铨, 等. 杭州城区动物性食品中四环素类抗生素残留调查[J]. 预防医学, 2019, 3(17): 735 – 736, 739. Huang Xi Hui, Liu Shao Yin, Jin Quang, et al. Research of tet-

racycline residues in food of animal origin in the city zone of Hangzhou[J]. Preventive Medicine, 2019, 3(17): 735 – 736, 739.

[4] 张婷婷, 苗娇娇, 强裕俊, 等. 四环素类耐药基因在不同国家人体、动物和环境微生态中的多样性[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(9): 797 – 802. Zhang Ting Ting, Miao Jiao Jiao, Qiang Yu Jun, et al. Diversity of tetracycline resistance genes in human, animal and environmental micro – ecology in different countries [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2019, 18(9): 797 – 802.

[5] 涂 棋, 徐 艳, 李二虎, 等. 典型养鸡场及其周围土壤中抗生素的污染特征和风险评估[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(1): 97 – 107. Tu Qi, Xu Yan, Li Er Hu, et al. Occurrence and risk assessment of antibiotics in typical chicken farms and surrounding soils [J]. Journal of Agro – Environment Science, 2020, 39(1): 97 – 107.

[6] 农业部 958 号公告 – 2 – 2007 猪鸡可食性组织中四环素类残留检测方法 高效液相色谱法[S]. High performance liquid chromatographic method for the determination of tetracyclines residues in pig and chicken edible tissues [S].

[7] GB/T 20764 – 2006 可食动物肌肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱 – 紫外检测法[S]. GB/T 20764 – 2006 Method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, and doxycycline residues in edible animal muscles LC – UV detection method[S].

[8] GB/T 21317 – 2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱 – 质谱/质谱法与高效液相色谱法[S]. GB/T 21317 – 2007 Determination fo tetracyclines residues in food of animal origin LC – MS/MS method and HPLC method [S].

[9] 农业部 1025 号公告 – 12 – 2008 鸡肉、猪肉中四环素类药物

- 残留检测 液相色谱 - 串联质谱法[S].
- Determination of tetracyclines residues in mussle of chicken and swine by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[S].
- [10] 庞明利, 孔繁迪, 张萌萌, 等. 液相色谱 - 串联质谱法测定蜂蜜中四环素残留量的不确定度评定[J]. 福建分析测试, 2020, 29(2): 16 - 20.
- Pang Min Li, Kong Fan Di, Zhang Meng Meng, *et al.* Determination of tetracycline residues in honey by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Fujian Analysis & Testing*, 2020, 29(2): 16 - 20.
- [11] 文红, 李涛, 朱宽正. 鱼肉中四环素、土霉素、金霉素兽药残留量及不确定度评估研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008 (4): 735 - 738.
- Wen Hong, Li Tao, Zhu Kuang Zheng. The Study of uncertainty evaluation and residues of tetracycline, oxytetracycline and chlorotetracycline in fish muscle[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008(4): 735 - 738.
- [12] 陈琨, 周劭桓, 廖艳华. 液相色谱 - 串联质谱法测定鸭肉基质中四环素类的不确定度评定[J]. 应用预防医学, 2016, 22 (5): 463 - 466.
- Chen Kun, Zhou Shao Heng, Liao Yan Hua. Uncertainty evaluation for the determination of tetracycline drug residues in dark muscle by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Applied Preventive Medicine*, 2016, 22 (5): 463 - 466.
- [13] 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审[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 15(8): 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]. *Food Safety and Quality Detection Technology Food Safe Qual Detec Technol*, 2020, 15(8): 5088 - 5093.
- [14] 卢光菊, 周德刚, 赵莹, 等. 高效液相色谱法测定牛奶中四环素残留量的不确定度评定[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47 (7): 55 - 57.
- Lu Guang - ju, Zhou De - gang, Zhao Ying, *et al.* Evaluation on the Uncertainty of Measurement for the Determination of Tetracycline Residue in Milk by High Performance Liquid Chromatography[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2013, 47(7): 55 - 57.
- [15] 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度评估[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(11): 8 - 11.
- Wang Bei, Zhang Xin, Gu Xin, *et al.* Evaluation on Uncertainty of Measurement in the Determination of Four Kinds of Tetracyclines in Meat by HPLC[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2010, 44(11): 8 - 11.
- [16] CNAS - GL 006 - 2019 化学分析中不确定度的评估指南[S]. CNAS - GL 006 - 2019 Guidance on Quantifying Uncertainty in Chemical Analysis[S].
- [17] 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].
- [18] JJG 196 - 2006 常用玻璃量器检定规程[S]. JJG 196 - 2006 Verification Regulation of Working Glass Container[S].

(编辑:陈希)