

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.04.017

李彤辉, 袁利杰, 尚伟, 等. UPLC-MS/MS法测定生菜中吗啉胍含量及不确定度评价[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(4): 123-129.

LI T H, YUAN L J, SHANG W, et al. Determination of morpholine residues in lettuces by UPLC-MS/MS and its uncertainty evaluation[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(4): 123-129.

UPLC-MS/MS法测定生菜中吗啉胍含量及不确定度评价

李彤辉^{1,2,3}, 袁利杰^{1,2,3}, 尚伟⁴, 张培毅^{1,2,3}✉

(1. 河南省食品和盐业检验技术研究院, 河南 郑州 450003;

2. 国家市场监督管理总局重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术), 河南 郑州 450003;

3. 河南省特殊食品工程技术研究中心, 河南 郑州 450003;

4. 中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院, 河南 郑州 450042)

摘要: 建立超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定生菜中吗啉胍残留量的分析方法并进行不确定度评价。样品经提取净化后,通过电喷雾离子源正离子扫描、多反应监测模式(MRM)对吗啉胍进行定量分析。通过建立数学模型,分析测量不确定度来源,并量化各不确定度分量,合成不确定度。吗啉胍在0.1~20 mg/L范围内呈良好线性, R^2 为0.999 3,在0.5、5.0和10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 这3个水平的加标回收率为84.08%~98.06% ($n=6$),相对标准偏差为3.58%~5.26% ($n=6$)。样品中吗啉胍含量测定结果为17.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,在95%置信区间下,扩展不确定度为2.84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$)。该方法前处理快速高效、准确度高、重现性好,回收率及精密度均能达到实验要求,不确定度主要由标准溶液、标准曲线的建立及样品加标回收引起。实验结果可为UPLC-MS/MS法测定生菜中吗啉胍残留量及不确定度评价提供参考。

关键词: 超高效液相色谱串联质谱法; 不确定度; 吗啉胍; 生菜

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)04-0123-07

Determination of Morpholine Residues in Lettuces by UPLC-MS/MS and Its Uncertainty Evaluation

LI Tong-hui^{1,2,3}, YUAN Li-jie^{1,2,3}, SHANG Wei⁴, ZHANG Pei-yi^{1,2,3}✉

(1. Food and Salt Inspection Institute Technology of Henan, Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Key Laboratory of Food Safety Quick Testing and Smart Supervision Technology for State Market Regulation, Zhengzhou, Henan 450003, China; 3. Special Food Engineering Technology Center, Zhengzhou, Henan 450003, China; 4. No.988 Hospital of Joint Logistic Support Force, Zhengzhou, Henan 450042, China)

Abstract: To establish a method for the determination of morpholine guanidine residues in lettuce, ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and uncertainty evaluation of the established

收稿日期: 2023-02-20

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20210813)

Supported by: Medical Science and Technology project of Henan Province (No. LHGJ20210813)

作者简介: 李彤辉, 女, 1989年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为食品质量安全检测。E-mail: 942845527@qq.com

通讯作者: 张培毅, 男, 1988年出生, 本科, 助理工程师, 研究方向为食品质量安全检测。E-mail: 374641807@qq.com

method were studied. After samples were extracted and purified, the morpholine guanidine was quantified by scanning with positive ions from an electrospray ionization source in multiple reaction monitoring mode. The uncertainty was synthesized by building a mathematical model to analyze the sources of measurement uncertainty and quantify each uncertainty component. The morpholinoguanidine showed a good line in the range of 0.1~20 mg/L with a correlation coefficient R^2 of 0.999 3. The spiked recoveries at the three levels of 0.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ranged from 84.08% to 98.06% ($n=6$) with the relative standard deviations of 3.58% to 5.26% ($n=6$), and the extended uncertainty was 2.84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$) at 95% confidence interval for the determination of morpholine guanidine in the sample at 17.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method was rapid and efficient, highly accurate and reproducible, and the recovery and precision can meet the test requirements. The uncertainty was mainly caused by the standard solution, the establishment of the standard curve and the recovery of the sample spiking. The experimental results could provide a reference for the determination of morpholine guanidine residues in lettuce by UPLC-MS/MS and the uncertainty evaluation.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem massspectrometry (UPLC-MS/MS); uncertainty evaluation; moroxydine; lettuces

吗啉胍是一种非核苷类广谱抗病毒药, 常被非法用作兽药以防治和治疗动物疾病^[1-2]。吗啉胍作为一种廉价、广谱的农药, 也被广泛应用于黄瓜、烟草、水稻等作物病毒病的预防和治疗中^[3-4]。2005 年, 中华人民共和国农业部公告 560 号文明确规定吗啉(双)胍(病毒灵)为禁用兽药, 但仍有一些兽药生产企业和养殖户为了自身利益在兽药制剂中, 如黄芪多糖注射液中非法添加利巴韦林、吗啉胍等违禁药物^[5-8]。目前文献中报道的吗啉胍残留量测定多以动物源性食品、水稻、蜂蜜、烟叶为主要研究基质^[9-18], 植物源食品中吗啉胍残留量的测定研究较少, 对吗啉胍不确定度分析评价从一定程度上能反映检测方法及测定结果的可靠性与准确性^[19]。

本研究建立超高效液相色谱-质谱/质谱法测定吗啉胍残留量, 并根据 CNAS-GL 06《化学分析中不确定度的评估指南》和 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》对前期建立的方法过程进行不确定度评估分析, 建立不确定度评定方法, 分析实验中的关键点和影响不确定度的主要因素, 为生菜中吗啉胍残留量的测定及正确评价为测定结果提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

盐酸吗啉胍标准品(纯度 99.8%, 1 g): 北京

中科质检生物技术有限公司; 甲醇、乙腈、乙酸铵(质谱纯): 德国 Merck 公司; 乙醇、三氯乙酸、庚烷磺酸钠、氯化钠、乙酸钠、无水硫酸镁(分析纯): 天津市大茂化学试剂厂。

生菜购于市场随机样品。

1.2 仪器与设备

安捷伦液质联用仪 1290-6470, 配有电喷雾离子源(ESI)、固相萃取装置: 美国 Agilent; Multi-tube Vortexer MV-3000 多管振荡器: 成都莱普科技有限公司; 自动氮吹浓缩仪: 美国 Organomation 氮吹仪; 离心机: 德国 SIGMA; 0.22 μm 滤膜(有机系): 天津市领航实验设备股份有限公司; Milli-Q 去离子水发生器: 美国 Milipore 公司; HLB 固相萃取柱 200 mg/6 mL: AgelaCleanert PEP-2 SPE; ME 203 分析天平: 瑞士梅特勒托利多公司; 十八烷基硅烷键合硅胶(C18, 40~60 μm)、N-丙基乙二胺(PSA, 40~60 μm)、石墨化碳黑(GCB, 40~60 μm): 上海博升生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制

吗啉胍标准储备液: 准确称取 0.012 13 g 盐酸吗啉胍标准品, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。

吗啉胍中间标准液: 准确吸取 0.05 mL 标准储备液, 用甲醇定容至 50 mL, 浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

吗啉胍标准使用液：准确吸取 1.0 mL 标准储备液，用初始流动相定容至 10 mL，浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。现配现用。

吗啉胍标准工作液：根据需要吸取适量吗啉胍标准使用液，用空白样品提取液稀释成适当浓度的基质工作溶液，使用前配制。

1.3.2 样品前处理

称取 2.0 g 试样于离心试管中，加入 1.0 g 氯化钠、1.0 g 乙酸钠及 10 mL 乙腈，涡旋振荡 5 min，超声提取 5 min，加入 3.0 g 无水硫酸镁，涡旋振荡 2 min，以 8 000 g 离心 5 min，吸取上清液 2 mL，加入 500 mg 无水硫酸镁，50 mg PSA，50 mg C18，10 mg GCB，涡旋 1 min，10 000 g 离心 5 min，取上清液过滤上机测定。

1.3.3 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH HILIC(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)；流动相：含 0.1%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液(A)-乙腈(B)，流速：0.3 mL/min，进样体积：1 μL ，柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱程序：0~1.0 min，95%B；1.0~4.0 min，95%~40%B；4.0~4.5 min，40%B；4.5~4.6 min，40%~95%B；4.6~6.5 min，95%B。

1.3.4 质谱条件

电离方式：ESI 源正离子扫描；检测方式：多反应离子监测；毛细管电压：4.0 kV；离子源

温度：320 $^{\circ}\text{C}$ ；脱溶剂气温度：400 $^{\circ}\text{C}$ ；脱溶剂气流量：35 Arb；质谱参数见表 1。

表 1 吗啉胍主要质谱参数

组分	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	Collision Energy/V	RF Lens /V
吗啉胍	172.3>113.1*		19.20	39
		172.3>113.1	16.67	39

注：*为定量离子。

Note: *Quantitative ion.

1.4 数学模型的建立

本实验中，水果、蔬菜中吗啉胍含量的测量数学模型：

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

式中：X 表示试样中吗啉胍的含量，单位为微克每千克 ($\mu\text{g/kg}$)；c 表示由标准曲线得出的测定液中吗啉胍的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；V 表示测定液体积，单位为毫升 (mL)；m 表示试样的质量，单位为克 (g)。

1.5 不确定度的来源分析

结合不确定度数学模型和实验过程分析，实验从样品的称量、定容、环境条件、标准溶液及标准曲线配制、标准曲线拟合、重复性测定等方面对水果、蔬菜中吗啉胍含量测定的不确定度进行分析，具体如图 1 所示。

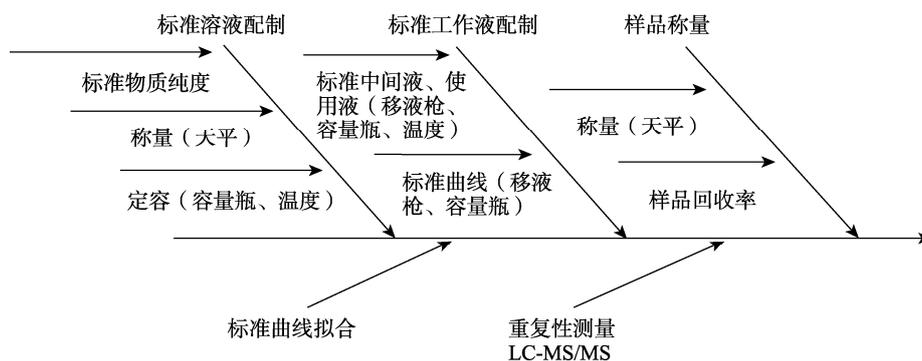


图 1 主要不确定度来源示图

Fig.1 Schematic diagram of the main sources of uncertainties

2 结果与讨论

2.1 生菜中吗啉胍残留量的测定

2.1.1 线性范围与检出限

根据实验前处理过程，用空白基质提取液配

置成 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g/L}$ 的吗啉胍基质标准工作液，上机测定，以质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$) 为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线，回归方程为 $Y=102\ 791x-17\ 457$ ($R^2=0.999\ 3$)，线性关系良好，能对目标化合物

进行准确定量。通过向空白样品中添加逐级降低浓度的标准物质,经前处理后,上机测定,对有信号检出的最低浓度加标样品重复进样 3 次,用 3 次进样响应的信噪比 (S/N) 均大于 3 和 10 确定吗啉胍的检出限为 0.5 μg/kg,定量限为 1.5 μg/kg。

2.1.2 回收率与精密度

在空白样品中添加低、中、高 3 个水平的吗啉胍标准物质 (n=6),进行加标回收实验,结果见表 2。吗啉胍在 0.5、5.0 和 10.0 μg/kg 添加水平的回收率在 84.08%~98.06%,相对标准偏差为 3.58%~5.26%,满足检测要求。

表 2 样品加标回收率及相对标准偏差 (n=6)
Table 2 Recoverandrelative standard deviation of samples (n=6)

化合物	添加水平 / (μg/kg)	样品编号	回收率 / %	RSD / %	平均回收率 / %	平均 RSD / %
吗啉胍	0.5	1	90.28	3.58	88.8	4.94
		2	89.07			
		3	83.12			
		4	87.67			
		5	84.08			
		6	92.34			
	5.0	1	95.94	4.81		
		2	84.89			
		3	84.33			
		4	93.67			
		5	88.80			
		6	86.37			
	10.0	1	85.06	5.26		
		2	89.14			
		3	84.08			
		4	98.06			
		5	93.02			
		6	87.67			

2.1.3 实际样品检测结果

选择大型超市、小超市、农贸市场、路边摊贩、农户棚区等不同区域的具有代表性的样品各 10 批次,共 50 批次样品,按照该方法进行定量检测,发现路边摊贩一批次生菜样品中吗啉胍残留量为 17.5 μg/kg,其余样品中吗啉胍残留量均未检出。

2.2 各不确定分量的评定

2.2.1 标准储备液配制过程引入的不确定度 $u_{rel}(C_{st})$

标准物质的纯度、称量过程、稀释过程及环

境温度引起的体积变化等是标准溶液配制过程中引入不确定度的主要来源。由证书可知,盐酸吗啉胍标准品的纯度为 99.8%,不确定度为 ±1.0% (k=2),则标准物质纯度引入的不确定度为 $u(P)=1.0 \times 0.01/2=0.005$ 0;相对标准不确定度为 $u_{rel}(P)=0.005/0.998=0.005$ 0。使用分度值为 0.000 1 g,最大允许误差为 ±0.000 05 g 的电子天平称量标准物质,按均匀分布考虑,称样量 0.012 13 g 时,标准物质称量引入的不确定度为 $u(m_1)=0.000$ 05/ $\sqrt{3}=0.000$ 029;相对标准不确定度为 $u_{rel}(m_1)=0.000$ 029/0.012 13=0.002 4。参考 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》,10 mL A 级容量瓶的允差为 ±0.02 mL,近似于矩形分布,则标准储备液配制过程中定容容器引入的不确定度为 $u(V_1)=0.02/\sqrt{3}=0.012$ mL;相对标准不确定度为 $u_{rel}(V_1)=0.012/10=0.001$ 2 mL。实验室温度在 (20±5) °C 波动,容量瓶检定环境温度为 20 °C,此时的玻璃膨胀系数为 $2.5 \times 10^{-5}/^{\circ}\text{C}$,甲醇的体积膨胀系数为 $1.18 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ ^[19],则由环境温度引入的不确定度为: $u_{rel}(T_1)=(1.18 \times 10^{-3}-2.5 \times 10^{-5}) \times 10 \times 5/\sqrt{3}=0.033$ 。综上不确定度分量,则标准储备液配制过程引入的相对不确定度为

$$\sqrt{u_{rel}^2(P)+u_{rel}^2(m_1)+u_{rel}^2(V_1)+u_{rel}^2(T_1)}=0.033。$$

2.2.2 标准中间液配制过程引入的不确定度 $u_{rel}(C_s)$

使用 10~100 μL 微量移液器移取 50 μL 标准储备液,根据 JJG 646—2006《移液器检定规程》,容量允差为 ±3%,按均匀分布 $k=\sqrt{3}$,则标准储备液移取体积引入的相对不确定度为 $u_{rel}(V_{st})=0.03/\sqrt{3}=0.017$ 。标准中间液定容至 50 mL A 级容量瓶,允差为 ±0.050 mL,按均匀分布 $k=\sqrt{3}$,则定容容器引入的相对不确定度为 $u(V_s)=0.050/\sqrt{3}=0.029$ mL。相对标准不确定度为 $u_{rel}(V_s)=0.029/10=0.002$ 9 mL。实验室温度在 (20±5) °C 波动,容量瓶检定环境温度为 20 °C,此时的玻璃膨胀系数为 $2.5 \times 10^{-5}/^{\circ}\text{C}$,甲醇的体积膨胀系数为 $1.18 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ ^[20],则由环境温度引入的不确定度为: $u_{rel}(T_s)=(1.18 \times 10^{-3}-2.5 \times 10^{-5}) \times 10 \times 5/\sqrt{3}=0.033$ 。综上不确定度分量,则标准中间液配制引入的相对不确定度为

$$u_{rel}(C_s)=\sqrt{u_{rel}^2(V_{st})+u_{rel}^2(V_s)+u_{rel}^2(T_s)}=0.037。$$

2.2.3 标准使用液配制过程引入的不确定度 $u_{rel}(C_m)$

使用 10~1 000 μL 微量移液器移取 1.0 mL 标准中间液, 其容量允差为 $\pm 1\%$, 按均匀分布, 标准储备液移取体积引入的相对不确定度为 $u_{rel}(V_{ms}) = 0.01/\sqrt{3} = 0.0058$ 。标准使用液定容至 10 mL A 级容量瓶, 其允差为 ± 0.050 mL, 按均匀分布, 定容容器引入的相对不确定度为 $u(V_m) = 0.050/\sqrt{3} = 0.029$ mL。相对标准不确定度为 $u_{rel}(V_m) = 0.029/10 = 0.0029$ mL。实验室温度在 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 波动, 标准使用液用初始流动相定容, 容量瓶检定环境温度为 20°C , 玻璃膨胀系数为 $2.5 \times 10^{-5}/^\circ\text{C}$, 水的体积膨胀系数为 $2.08 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$, 乙腈的体积膨胀系数为 $1.37 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$, 则标准使用液定容环境温度引入的不确定度为 $u_{rel}(T_{ms}) = (1.31 \times 10^{-3} - 2.5 \times 10^{-5}) \times 10 \times 5/\sqrt{3} = 0.037$ 。综上不确定度分量, 标准使用液配制引入的相对不确定度为

$$u_{rel}(C_m) = \sqrt{u_{rel}(V_{ms})^2 + u_{rel}(V_m)^2 + u_{rel}(T_{ms})^2} = 0.038。$$

2.2.4 标准工作曲线配制过程引入的不确定度 $u_{rel}(M)$

参考移液器检定规程, 按照均匀分布, 标准工作曲线配制过程由移液器引入的不确定度见表 3。则由标准曲线配制过程引入的不确定度为

$$u_{rel}(M) = \sqrt{\sum_{i=1}^8 u_{rel}(M_{vi})^2} = 0.043。$$

2.2.5 标准曲线拟合引入的不确定度 $u_{rel}(S)$

由 2.1.1 可知, 吗啉胍在 0.1、0.5、1.0、2.0、

5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的浓度范围时呈良好线性, 回归方程为 $Y = 102\,791x - 17\,457$ ($R^2 = 0.9993$), 斜率 b 和截距 a 分别为 102 791 和 -17 457。对试样测定 6 次, 测得峰面积 y , 由标准工作曲线的线性回归方程计算得出生菜样品中吗啉胍的浓度分别为 3.51、3.49、3.57、3.54、3.46、3.49 $\mu\text{g}/\text{L}$, 平均值为 $x_0 = 3.51$ $\mu\text{g}/\text{L}$ 。根据贝塞尔公式计算标准曲线的残差的标准偏差 S_R , 由贝塞尔方程计算实验的标准曲线引入的不确定度为

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)]^2}{n-2}} = 8\,821.68;$$

其中 $p=6$ (样品重复检测次数), $n=21$ (标曲溶液测定的次数), $\bar{x} = 5.51$ (标准曲线系列质量浓度的算术平均值), x_i 为标准曲线中对应的质量浓度, y_i 为标准曲线中对应的峰面积, 将各值分别代入公式, 得

$$u(S) = \frac{S_R}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{p} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 0.087。$$

则标准曲线拟合引入的相对不确定度为 $u_{rel}(S) = \frac{u(S)}{x_0} = 0.025$ 。

2.2.6 样品称量引入的不确定度 $u_{rel}(Y_m)$

样品称量使用分度值为 0.001 g 的天平, 最大允许误差为 ± 0.005 g, 按照均匀分布, 称取 2 g 时, 样品称量引入的不确定度为 $u_{(Y_m)} = 0.005/\sqrt{3} =$

表 3 标准工作曲线配制过程移液器引起的不确定度

Table 3 Uncertainty introduced by pipette in preparation of standard working curve

标准溶液	20~200 μL 移液器	20~200 μL 移液器	20~200 μL 移液器	20~200 μL 移液器
移取体积/ μL (次数)	20(1)	50(2)	100(3)	200(1)
容量允差/%	± 4.0	± 2.75	± 2.0	± 1.5
计算公式	$\frac{\text{容量允差}}{\sqrt{3}}$			
相对不确定度	$u_{rel}(M_{v1})$ 0.023	$u_{rel}(M_{v2})$ 0.023	$u_{rel}(M_{v3})$ 0.021	$u_{rel}(M_{v4})$ 0.0087
溶剂	10~1 000 μL 移液器	10~1 000 μL 移液器	10~1 000 μL 移液器	10~1 000 μL 移液器
移取体积/ μL (次数)	980(1)	950(2)	900(3)	800(1)
容量允差/%	± 1.0	± 1.0	± 1.0	± 1.0
计算公式	$\frac{\text{容量允差}}{\sqrt{3}}$			
相对不确定度	$u_{rel}(M_{v5})$ 0.0058	$u_{rel}(M_{v6})$ 0.0082	$u_{rel}(M_{v7})$ 0.0100	$u_{rel}(M_{v8})$ 0.0058

0.002 9; 相对标准不确定度为 $u_{rel}(Y_m)=0.002 9/2=0.001 4$ 。

2.2.7 重复性引入的不确定度 $u_{rel}(Y_r)$

实验对实际样品进行测定, 发现一批次生菜样品中吗啉胍残留量检出, 重复测量 6 次, 结果依次为 17.6、17.4、17.8、17.7、17.3、17.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 则样品重复性测定引入的不确定度为: 重复性标

准偏差 $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.20$; 重复性不确定度

$u(Y_r) = \frac{S}{\sqrt{n}} = 0.082$; 重复性相对不确定度 $u_{rel}(Y_r) =$

$\frac{u(Y_r)}{\bar{x}} = 0.004 7$ 。

2.2.8 样品加标回收引入的不确定度 $u_{rel}(Y_R)$

实验以生菜基质为例, 在空白样品中添加 0.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 这 3 个水平的标准品, 每个水平重复测定 6 次, 进行回收率实验得回收率见表 2。样品加标回收引入的不确定度为: 样品加

$$u_{rel}(X) = \sqrt{\frac{u_{rel}^2(C_{st}) + u_{rel}^2(C_s) + u_{rel}^2(C_m) + u_{rel}^2(M) + u_{rel}^2(S) + u_{rel}^2(Y_r) + u_{rel}^2(Y_m) + u_{rel}^2(Y_R)}{u_{rel}^2(C_{st}) + u_{rel}^2(C_s) + u_{rel}^2(C_m) + u_{rel}^2(M) + u_{rel}^2(S) + u_{rel}^2(Y_r) + u_{rel}^2(Y_m) + u_{rel}^2(Y_R)}} = 0.081。$$

实验所得阳性样品中吗啉胍的平均含量为 17.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 则合成标准不确定度为 $u(X)=17.5 \times 0.081=1.42 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

按 95%置信水平计算测量结果的扩展不确定度, 取扩展因子 $k=2$, 则 $U=2u(X)=2 \times 1.42=2.84 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4 测量不确定度的结果报告

根据实验所建的方法测定的生菜样品, 其含量测定结果为 $(17.5 \pm 2.84) \mu\text{g}/\text{kg}$, $k=2$ 。

3 结论

实验建立生菜中吗啉胍残留量 UPLC-MS/MS 检测方法, 结果显示, 吗啉胍在 0.1~20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好线性, 基质标准曲线方程为 $Y=102 791x-17 457 (R^2=0.999 3)$ 。在低、中、高 3 个水平的加标回收率为 84.08%~98.06% ($n=6$), 相对标准偏差为 3.58%~5.26% ($n=6$)。方法灵敏度高, 定性、定量结果可靠, 能够满足实验要求。经随机

标回收标准偏差 $S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.044$; 样品

加标回收不确定度 $u(Y_R) = \frac{S_y}{\sqrt{n}} = 0.010$; 样品加标

回收相对不确定度 $u_{rel}(Y_R) = \frac{u(Y_R)}{\bar{x}} = 0.012$ 。

2.3 合成不确定度及扩展不确定度的计算

测量不确定度分量如表 4 所示。

表 4 测量不确定度分量

Table 4 Uncertainty components of measurement		
符号	来源	相对标准不确定度
$u_{rel}(C_{st})$	标准储备液配制	0.033
$u_{rel}(C_s)$	标准中间溶液配制	0.037
$u_{rel}(C_m)$	标准使用液配制	0.038
$u_{rel}(M)$	标准工作曲线配制	0.043
$u_{rel}(S)$	标准曲线拟合	0.025
$u_{rel}(Y_r)$	重复性测定	0.004 7
$u_{rel}(Y_m)$	样品称量	0.001 4
$u_{rel}(Y_R)$	样品回收率	0.012

合成相对标准不确定度为:

抽取的实际样品检测结果显示, 市面上已存在含有吗啉胍残留的生菜流通, 通过对检测过程及阳性样品结果进行不确定度评价, 结果表明, 取样量 2 g 时, $k=2$ (95%置信度), 生菜中吗啉胍检测结果为 $(17.5 \pm 2.84) \mu\text{g}/\text{kg}$ 。检测过程的不确定度分析表明, 标准曲线配制过程引入的不确定度因移液器的使用频次及不同量程的代入而显示最大。因阳性样品含量的不确定性, 为同时满足检出限及可能检出的样品浓度值, 标准工作液一般会选取较大范围的浓度值, 这直接导致测量值偏离标准曲线中点使标准工作曲线拟合产生较大的不确定度, 实际检测中可通过重复测定及选择合适范围的标准工作曲线来降低此类问题产生的不确定度, 提高检测结果的准确性。实验对生菜中吗啉胍残留量的检测和不确定度评价为国家制订相关标准及打击药物非法添加提供技术支撑, 具有较高的实用价值。

参考文献:

- [1] AN M Y, YI D J, QIU J X, et al. Measurement and correlation for solubility of moroxydine hydrochloride in pure and binary solvents[J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2020, 65: 2611-2618.
- [2] MAGRI A, REILLY R, SCALACCI N, et al. Rethinking the old antiviral drug moroxydine: discovery of novel analogues as anti-hepatitis C virus (HCV) agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25, 5372-5376.
- [3] 白利. 辽宁凌源地区越冬茬黄瓜病毒病防治[J]. *农业工程技术*, 2020, 32(22): 40-41.
 BAI L. Control of cucumber virus disease in overwintering crop in Liaoning Ling Yuan area[J]. *Agricultural Engineering Technology*, 2020, 32(22): 40-41.
- [4] 乔柯. 食品中抗病毒类药物残留检测方法研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2017, 18(86): 112.
 QIAO K. Advances in detection methods for antiviral drug residues in food[J]. *Food Safety Guide*, 2017, 18(86): 112.
- [5] 王丽琼, 吴丽. 高效液相色谱法同时测定感冒清胶囊中对乙酰氨基酚和盐酸吗啡瓜含量[J]. *中国药业*, 2019, 28(21): 38-40.
 WANG L Q, WU L. Simultaneous determination of paracetamol and moroxydine hydrochloride in ganmaoqing capsules by HPLC[J]. *China Pharmaceuticals*, 2019, 28(21): 38-40.
- [6] 张树强. 高效液相色谱法测定盐酸吗啡瓜注射液的含量[J]. *中国药业*, 2011, 20(22): 46-47.
 ZHANG S Q. Determination of morpholine guanidine hydrochloride injection by high performance liquid chromatography[J]. *China Pharmaceuticals*, 2011, 20(22): 46-47.
- [7] 孙海新, 许娜, 张慧, 等. 鸡蛋中金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林和吗啡瓜多残留检测方法的研究[J]. *中国家禽*, 2015, 37(23): 22-26.
 SUN H X, XU N, ZHANG H, et al. Multi-residues determination method of amantadine, rimantadine, ribavirin and moroxydine in eggs[J]. *China Poultry*, 2015, 37(23): 22-26.
- [8] 张艳, 王全胜, 吴银良. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中 7 种抗病毒类药物和利巴韦林代谢物残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(6): 1872-1879.
 ZHANG Y, WANG Q S, WU Y L. Simultaneous determination of 7 kinds of antiviral drugs and ribavirin metabolite residues in eggs by dispersive solid phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(6): 1872-1879.
- [9] LI J, MING M T, HUAI W H, et al. Fast and simple determination of moroxydine residues in pig and chicken samples by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2018, 35(11): 2111-2119.
- [10] 田亚平, 陈洋, 冯若天, 等. UPLC-MS/MS 法测定鸡肉中盐酸吗啡瓜残留量[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(3): 89-91.
 TIAN Y P, CHEN Y, FENG R T, et al. Determination of morpholine guanidine hydrochloride residues in chicken meat by UPLC-MS/MS[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(3): 89-91.
- [11] LIU Z C, YANG F, YAO M N, et al. Simultaneous determination of antiviral drugs in chicken tissues by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38(10): 1784-1793.
- [12] ZHANG Q Y, XIAO C G, WANG W, et al. Chromatography column comparison and rapid pretreatment for the simultaneous analysis of amantadine, rimantadine, acyclovir, ribavirin, and moroxydine in chicken muscle by ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(20): 3998-4010.
- [13] MU P Q, XU N N, CHAI T T, et al. Simultaneous determination of 14 antiviral drugs and relevant metabolites in chicken muscle by UPLC-MS/MS after QuEChERS preparation[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1023-1024+17-23.
- [14] 杨旭, 刘正才, 杨方, 等. 固相萃取 UPLC-MS/MS 法同时检测鸡肉中 8 种抗病毒药物的残留量[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(3): 513-521.
 YANG X, LIU Z C, YANG F, et al. Simultaneous determination of eight antiviral drugs residues in chicken by solid-phase extraction combined with UPLC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36(3): 513-521.
- [15] WANG Z D, WANG X R, WANG Y H, et al. Simultaneous determination of five antiviral drug residues and stability studies in honey using a two-step fraction capture coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1638, 1-9.
- [16] 郑苹果, 赵珊, 李曦, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中 4 种抗病毒类药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 4110-4117.
 ZHENG X G, ZHAO S, LI X, et al. Simultaneous determination of 4 kinds of antiviral drug residues in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(10): 4110-4117.
- [17] 王柯, 陈燕, 李晓雯, 等. 液相色谱-四极杆飞行时间质谱法同时测定动物源性食品中的 5 种抗病毒类药物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(7): 2720-2726.
 WANG K, CHEN Y, LI X W, et al. Simultaneous determination of 5 kinds of antiviral drug residues in animal-derived food by high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7(7): 2720-2726.
- [18] 周健, 龚道新, 吴亮, 等. HPLC 法测定烟叶和烟田土壤中盐酸吗啡瓜残留[J]. *环境监测管理与技术*, 2015, 27(2): 39-42.
 ZHOU J, GONG D X, WU L, et al. Detection of moroxydine hydrochloride residues by HPLC in tobacco leaves and soil[J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2015, 27(2): 39-42.
- [19] 王赛楠. 高效液相色谱法测定水果罐头中阿斯巴甜的不确定度评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(3): 734-739.
 WANG S N. Uncertainty evaluation for determination of aspartame in canned fruits by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(3): 734-739.
- [20] 郭立净, 王赛楠. 液相色谱-高分辨质谱法测定豆芽中 4-氯苯氧乙酸的评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(15): 5203-5208.
 GUO L J, WANG S N. Uncertainty evaluation for determination of 4-chlorophenoxyacetic acid in bean sprouts by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(15): 5203-5208. 完