

·诊疗技术·

UPLC-MS/MS 法测定蔬菜中多菌灵含量的不确定度评估

石晓妮, 李 婷, 马宇熙

(乌鲁木齐市疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830026)

摘要:目的 研究超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定蔬菜中多菌灵含量的不确定度。方法 色谱柱为 Waters ACQUITY BEH C18, 1.7 μm , 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μl ; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.05% 甲酸水; 流速: 0.3 ml。梯度洗脱条件: 0~5 min 30% A, 70% B; 5~6 min 95% A, 5% B; 6~7 min 30% A, 70% B, 采用多反应监测模式进行检测, 对不确定来源进行分析, 建立标准曲线模型, 计算各变量的不确定度、合成不确定度、扩展不确定度。结果 超高效液相色谱-质谱联用法测定蔬菜中多菌灵含量的不确定度, 影响最大的是标准溶液配制稀释过程中产生的不确定度。相对不确定度为 0.233, 在置信度为 95% 时, 覆盖因子 $k=2$, 扩展不确定度为 4.66%。结论 UPLC-MS/MS 法测定多菌灵含量对测量不确定贡献最大的是标准溶液的配制和稀释过程中产生的不确定度, 其次是标准曲线拟合时产生的不确定度。因此在实验过程中要严格操作规程, 减少人为误差。

关键词: 多菌灵; 蔬菜; 超高效液相色谱-质谱联用; 不确定度

中图分类号: TQ450.7

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.03.054

文章编号: 1006-1959(2020)03-0162-03

Evaluation of Uncertainty in Determination of Carbendazim in Vegetables by UPLC-MS/MS

SHI Xiao-ni, LI Ting, MA Yu-xi

(Urumqi Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830026, Xinjiang, China)

Abstract: Objective To study the uncertainty of determination of carbendazim in vegetables by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Methods The chromatographic column was Waters ACQUITY BEH C18, 1.7 μm , column temperature: 35 $^{\circ}\text{C}$; injection volume was 5 μl ; mobile phase: A was acetonitrile, B was 0.05% formic acid water; flow rate: 0.3 ml. Gradient elution conditions: 0~5 min 30% A, 70% B; 5~6 min 95% A, 5% B; 6~7 min 30% A, 70% B. Multi-reaction monitoring mode was used for detection. Analyze the sources of uncertainty, establish a standard curve model, and calculate the uncertainty, synthetic uncertainty, and expanded uncertainty of each variable. Results The uncertainty of the determination of carbendazim in vegetables by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with the most significant factor was the uncertainty generated during the preparation and dilution of standard solutions. The relative uncertainty is 0.233. When the confidence is 95%, the coverage factor $k=2$ and the expanded uncertainty is 4.66%. Conclusion The most significant contribution to the measurement uncertainty of the determination of carbendazim by the UPLC-MS/MS method is the uncertainty generated during the preparation and dilution of the standard solution, followed by the uncertainty generated during the fitting of the standard curve. Therefore, it is necessary to strictly operate procedures during the experiment to reduce human error.

Key words: Carbendazim; Vegetables; Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry; Uncertainty

在我国植物杀菌剂已广泛使用于水果蔬菜种植, 其中多菌灵是一种广谱性杀菌剂, 属于内吸性杀菌剂, 通过吸收蔬菜体内产生代谢产物, 从而起到杀菌作用。但多菌灵在人体内蓄积, 可能引起呕吐等症状, 且对生殖系统有很大影响^[1]。多菌灵产生的积累性及生物毒性已经引起国家的重视, 为了保证蔬菜质量安全, 我国对农药残留实施了严格的检测, 并对不同农作物有一定的限值要求^[2,3], 这就对多菌灵检测结果的可信度和准确度提出了很高的要求。多菌灵的检测方法有高效液相色谱法、气相色谱法、气质联用法、高效液相色谱-串联质谱法^[4-6], 但以上方法的适用范围较小, 对于复杂基质的农药残留测定干扰较大。近年来随着检测技术的日益更新, 超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法在测定农药方面得到广泛应用^[7-9], UPLC-MS 与 MS 联用, 可以充分发挥两者的优势, 与传统的高效液相色谱和质谱联用(HPLC-MS)相

比, 显著提高了定量分析的重复性和可靠性以及定性分析的准确性, 较好地适应了现代药物研究对自动化、高通量分析的需求, 已成为药物分析的重要方法之一^[10]。本研究主要探讨超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定蔬菜中多菌灵含量的不确定度, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Xevo-TQ-S Micro 超高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司), AE240 天平(瑞士 Mettler), KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 3-30KS 冷冻离心机(德国 Sigma 公司), AH-20 全自动均质器(睿科仪器有限公司), Milli-Q Integral 10 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 实验试剂 乙腈: 色谱纯, 德国 Sigma 公司; 无水甲酸: 色谱纯, 天津光复精细化工研究所; 无水硫酸镁、氯化钠: 优级纯, 天津市光复科技发展有限公司; PSA CNW; GCB, Agela Technologies; 0.22 μm 微孔过滤膜, 安谱。多菌灵: Dr. Ehrenstorfer GmbH, 纯度 99.6%。

作者简介: 石晓妮(1977.8-), 女, 陕西大荔县人, 硕士, 副主任检验技师, 主要从事食品水质理化检验工作

2 方法

2.1 样品前处理

2.1.1 样品来源 市售绿叶蔬菜韭菜、茼蒿、叶用莴苣、油麦菜、小白菜共 35 份。

2.1.2 样品前处理 称取 5 g 小白菜样品加入 10 ml 乙腈,充分震荡后超声 10 min;加入 1 g NaCl,再次充分震荡 1 min,再加入 4 g 无水 MgSO₄ 迅速涡旋 1 min。以 10000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液 1.0 ml,加入 400 mg PSA,10 mg GCB,涡旋 1 min,10000 r/min 离心 5 min,取上清液,过膜,上机测定。

2.2 仪器条件

2.2.1 质谱条件 离子源:ESI 正离子模式;离子源温度:150℃;去溶剂气流量:1000 L/h;去溶剂气温度:450℃;锥孔气流量:50 L/h;监测方式:MRM 模式,扫描采集参数:母离子:192.1 m/z;定量离子/碰撞能量:132.1/28 V;定性离子/碰撞能量:160/18 V;锥孔电压:33 V;保留时间:0.46 min。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY BEH C18,1.7 μm,柱温:35℃;进样量 5 μl;流动相:A 为乙腈,B 为 0.05%甲酸水;流速:0.3 ml。梯度洗脱条件:0~5 min 30% A,70% B;5~6 min 95% A,5% B;6~7 min 30% A,70% B。

2.3 标准溶液配制 称取 10.04 mg Dr.Ehrenstorfer GmbH 标准品,置于 10.00 ml 容量瓶,使用乙腈定容,配制成 1 mg/ml 多菌灵储备液。取 1.00 ml 储备液于 100 ml 容量瓶,用乙腈稀释配制为浓度为 10 μg/ml 的中间液。取中间液适量,用空白基质配制为测定浓度为 0.5、1.0、5.0、10、20、40、80、100 μg/L 的基质系列标准工作液。

3 结果

3.1 测定结果计算 本文中测定物质为多菌灵,其含量按以下公式计算: $X(\text{mg/kg}) = \frac{C \times V}{M \times 1000}$

注:X:待测物浓度(mg/kg);C:样品中待测物浓度(μg/l)(仪器直读);V:样品提取液体积 10.00 (ml);M:样品质量 5.00(g)。

3.2 不确定度来源分析 影响不确定的因素有以下 3 个方面:①多菌灵标准品引入的不确定度,其中包括多菌灵标准品称量、稀释、定容引入的不确定度;②标准曲线的拟合引入的不确定度;③样品制备和测

定以及回收率引入的不确定度^[11,12]。

3.2.1 多菌灵标准品称量引入的不确定度 $[u_{r(m)}]$ 根据本实验所用天平的检定证书,检定分度值 $e=0.1 \text{ mg}$,最大允许误差为 $0.5e$,即为 0.05 mg 。按均匀分布,包含因子 $k=\sqrt{3}$,标准品称量引起的不确定度为 $u_r = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times M}$,式中 M 为标准品称取量(mg),因此标准

品称量引入的不确定度为 $u_{r(m)}=0.00287$ 。

3.2.2 标准溶液配制引入的不确定度 $[u_{r(c)}]$ ①容量瓶引起的不确定度:配制标准溶液所需的容量瓶为 10 ml 和 100 ml。根据本实验所用玻璃器皿的检定证书,其中 10 ml (V_1)A 级容量瓶和 100 ml(V_2)A 级容量瓶最大允许误差 α 均为 $\pm 0.02 \text{ ml}$,因质谱实验室温度控制恒定,故试剂及标准都在相同的环境下,可以忽略由温度引入的不确定度。按均匀分布,包含因子 $k=\sqrt{3}$ 时容量瓶引入的不确定度为 $u_{r(v)} = \frac{\alpha}{kx}$,x 为容量瓶体积(ml),即 10 ml 容量瓶

$u_{r(v1)} = \frac{0.02}{\sqrt{3} \times 10} = 0.001154$,100 ml 容量瓶引起的不

确定度 $u_{r(v2)} = \frac{0.02}{\sqrt{3} \times 100} = 0.000116$ 。②移液器引起

的不确定度:配制标准溶液所需的移液器量 2~10 μl(p_1),50~200 μl(p_2),200~1000 μl(p_3),根据检定证书移液器的允许误差 α 分别为 $\pm 0.10 \mu\text{l}$, $\pm 1.6 \mu\text{l}$, $\pm 8 \mu\text{l}$,按照均匀分布, $k=\sqrt{3}$,不确定度为分别为 $u_{r(p)} = \frac{\alpha}{kx}$,x 为移液器最大量程(μl)。即 3 种

移液器引入的不确定度分别为 $u_{r(p1)} = \frac{0.10}{\sqrt{3} \times 10} =$

0.005773 , $u_{r(p2)} = \frac{1.6}{\sqrt{3} \times 200} = 0.004618$, $u_{r(p3)} =$

$\frac{8}{\sqrt{3} \times 1000} = 0.004618$ 。

由①②可得:在配制标准溶液时,使用 1 次 10 ml 容量瓶,2 次 100 ml 容量瓶,2~10 μl 移液器使用 2 次(1 次 5 μl,1 次 10 μl),50~200 μl 移液器使用 3 次(1 次 50 μl,1 次 100 μl,1 次 200 μl),200~1000 μl 移液器使用 4 次(1 次 400 μl,1 次 800 μl,2 次 1000 μl),其相对不确定度是:

$$u_{r(c)} = \sqrt{(u_r(V_1))^2 + 2(u_r(V_2))^2 + (0.005^2 + 0.010^2)u_r(p_1) + (0.05^2 + 0.10^2 + 0.20^2)u_r(p_2) + (0.40^2 + 0.80^2 + 2)u_r(p_3)} = 0.215003$$

3.2.3 标准曲线拟合引入的不确定度 $[u_{r(b)}]$ 基质标准曲线共 8 个点($m=8$),每个点测定 3 次,共测定 24 次,结果见表 1。

共拟合 3 条标准曲线方程:a 为标准曲线的斜率,b 为标准曲线的截距平均值。三条曲线分别为 $y_1 = 7282.72x + 76548$; $y_2 = 7466.96x + 68572$; $y_3 =$

$7346.91x + 80467$ 。 $b = 75196$, $\bar{a} = 7358.86$ 。

\bar{x} 为基质标准的理论平均值, $\bar{x} = 32.0625$,j 为每组基质曲线的序号 ($j=1,2,3$),i 为测定基质标准溶液的序数($i=1,2,3,\dots,N$):自相关的方差为 $S_{xx} =$

$$\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 = 31275.37, \text{ 残余标准差为 } S =$$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (ax_i + b)]^2}{N-2}} = 25643.74$$
, 测定一份阳性样品(z)6次, $P=6$, $\bar{z}_1=17.98$, $\bar{a}=7358.86$, 标准曲线拟

合标准不确定度 $u_{(z)} = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{z}_1 - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = \frac{25643.74}{7358.86} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{24} + \frac{(17.98-32.0625)^2}{31275.37}} = 1.614$, 相对不确定度: $u_{r(z)} = \frac{u_{(z)}}{\bar{z}_1} = 0.08976$ 。

表 1 多菌灵拟合曲线中标准点的实际浓度值($\mu\text{g/L}$)

标准曲线理论浓度值	标准曲线计算出的实际浓度		
	标准曲线 1	标准曲线 2	标准曲线 3
0.5	0.521	0.567	0.553
1.0	1.04	1.09	0.992
5.0	5.06	5.01	5.09
10	10.04	10.02	10.04
20	20.06	20.02	19.98
40	41.44	41.20	41.02
80	82.62	83.40	82.29
100	98.82	99.04	99.17

3.3 样品测量重复性和回收率引入的不确定度做一份空白样品的加标实验, 加标量为 0.10 mg/kg , 每份样品测定 6 次, 计算出多菌灵含量(mg/kg)及回收率(%)、相对标准偏差(%), 结果见表 2。

表 2 蔬菜样品中多菌灵回收率相关结果

序号	样本质量 (g)	多菌灵含量 (mg/kg)	回收率 (%)
1	5.0	0.090	90.00
2	5.0	0.089	89.00
3	5.0	0.089	89.00
4	5.0	0.091	91.00
5	5.0	0.088	88.00
6	5.0	0.090	90.00
平均值(mg/kg)	5.0	0.0895	89.50
标准偏差	0	0.00105	0.9574
相对标准偏差(%)	0	0.004367	0.0106

3.3.1 回收率引入的不确定度 $[u_{r(R)}]u_{(R)} = \frac{S_{(R)}}{\sqrt{6}} = 0.390856$, 其中 $S_{(R)}$ 为回收率的标准偏差, 回收率相对不确定度 $u_{r(R)} = \frac{u_{(R)}}{R} = 0.004367$, 其中 R 为回收率的平均值。

3.3.2 样品重复性引入的不确定度 $[u_{r(y)}]u_{r(y)} = \frac{S(x)}{x\sqrt{6}}$

$= 0.004789$, 其中 $S(X)$ 为样品测定的标准偏差, X 为样品测定平均值。

3.4 合成不确定度 多菌灵测定的相对不确定度为:

$$u_{r(x)} = \sqrt{u_r^2(m) + u_r^2(c) + u_r^2(b) + u_r^2(R) + u_r^2(y)} = 0.233095$$

3.5 相对扩展不确定度 置信区间 95%, 对于本实验包含因子选择 $k=2$, 则扩展不确定度 $U = u_{r(x)} \times k = 0.46619$ 。

4 总结

使用 UPLC-MS/MS 测定蔬菜中的多菌灵含量, 结果发现相对不确定度为 0.233, 在置信度为 95% 时, 覆盖因子 $k=2$, 扩展不确定度为 4.66%, 小于 16.8% 的要求值。通过对以上各分量不确定度的研究, 发现本实验中对测量不确定影响的最大分量是标准溶液的配制和稀释过程中产生的不确定度, 其次是标准曲线拟合时产生的不确定度。因此在实验过程中, 应加强对实验所用量器的检定, 严格操作规程, 减少人为误差, 从而达到减小测定结果的不确定度, 保证实验数据准确。

参考文献:

- [1] 于功昌, 王筱芬. 苯并咪唑杀菌剂的雄性生殖毒性作用机制研究进展[J]. 职业与健康, 2014, 30(18): 2661-2663, 2669.
- [2] GB2763-2016 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [3] 董亚蕾, 刘文婧, 曹进, 等. 国内食品农药多残留检测技术的研究进展[J]. 分析试验室, 2017, 36(2): 241-248.
- [4] 蔡红梅, 汪孟丽, 田子玉. 蔬菜中农药残留检测前处理方法概述[J]. 现代农业科技, 2019(3): 93-94.
- [5] 刘洪斌, 姚喜梅, 蔡英华, 等. 应用 QuEChERS 检测鸡蛋中 16 种磺胺类药物残留 UPLC-MS/MS 方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(2): 7-12.
- [6] 刘运明, 刘华良, 古文亮, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定豆芽中 7 种植物生长调节剂的残留量[J]. 2015, 25(12): 1880-1883.
- [7] 刘黎, 邓可. 气相色谱-质谱联用法测定番茄中腐霉利农药残留量的不确定度评定[J]. 农业与技术, 2017, 37(8): 55-58.
- [8] 潘城, 胡朝阳, 吴凌, 等. 高效液相色谱法测定蔬菜中异菌脲残留量的不确定度分析[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 235-240.
- [9] 管阳凡, 杨惠琴, 郭德华. 农药残留检测用联苯三唑醇和丙硫菌唑标准物质的定值与不确定度的评估[J]. 理化检验: 化学分册, 2019, 46(1): 91-96.
- [10] 逢瑜, 于新兰, 李海芳, 等. 农药残留测定结果不确定度评定方法指南介绍[J]. 中国新药, 2018, 27(1): 17-21.
- [11] 国家技术监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示 JJF 1059.1-2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2013.
- [12] 国家质量监督检验检疫总局. 化学分析测量不确定度评定: JJF 1135-2005[S]. 北京: 中国计量出版社, 2005.

收稿日期: 2019-10-29; 修回日期: 2019-11-12

编辑/杜帆