

全自动固相萃取

——超高效液相色谱-串联质谱法测定地表水中头孢匹罗的不确定度评定

何媛媛 李双双 杨紫薇 王晨希

江苏省镇江环境监测中心

DOI:10.12238/eep.v6i6.1883

[摘要] 目的: 评定分析全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry,UPLC-MS/MS)测定地表水中头孢匹罗残留量的不确定度。方法: 使用全自动固相萃取仪对地表水水样进行HLB固相小柱萃取富集,用甲醇水溶液洗脱固相萃取小柱,氮吹浓缩至净干,加水定容,经液相色谱分离,质谱检测。结果: 分析方法回收率引入的不确定度分量是对该方法贡献最大的主要分量,当地表水中头孢匹罗含量为 $0.15 \mu\text{g/mL}$ 时,其扩展不确定度 $U=0.048 \mu\text{g/mL}(k=2)$ 。结论: 地表水中头孢匹罗不确定度中分析方法回收率是最主要来源,标准曲线拟合是次要来源,其他分量的影响较小。

[关键词] 全自动固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法; 头孢匹罗; 不确定度; 地表水

中图分类号: P426.1+2 文献标识码: A

Automated Solid Phase Extraction

——Evaluation of uncertainty in the determination of cephalosporin in surface water by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Yuanyuan He Shuangshuang Li Ziwei Yang Chenxi Wang

Jiangsu Zhenjiang Environmental Monitoring Center

[Abstract] Objective To evaluate the uncertainty in the determination of cefpiric residue in surface water by automatic solid phase extraction (SPE) -ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Methods The surface water samples were extracted by HLB solid phase column with automatic solid phase extraction instrument. The column was eluted with methanol aqueous solution, nitrogen was blown and concentrated to dry, water was added, and the samples were separated by liquid chromatography and detected by mass spectrometry. The uncertainty component introduced into the recovery rate of the analysis method is the main component that contributes the most to the method. When the content of cefpirome in surface water is $0.15 \mu\text{g/mL}$, the extended uncertainty $U=0.048 (k=2)$. Conclusion The uncertainty component introduced into the recovery rate of the analysis method is the main component, followed by standard curve fitting, and other factors have little influence.

[Key words] automatic solid phase extraction; Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Cefpirome; uncertainty; Surface water

引言

头孢匹罗作为第四代抗生素,比第三代抗生素具有更广的抗菌谱,对绝大部分革兰阴性和革兰阳性细菌具有活性^[1],水体是抗生素在环境中重要的汇聚地,由于污水处理厂对许多抗生素的处理效果不够,导致抗生素进入水环境造成环境污染^[2]。

测量不确定度意味着对测量结果的有效性、可信性的怀疑程度,或肯定程度,是定量说明测量结果的一个参数^[3-4]。实验室中由于测量误差的存在,每个测量值之间具有分散性,测量不确定度

就是说明测量值之间的分散程度,故为提高测量结果的准确度,需对测量结果进行不确定度评价^[5-6]。本研究采用全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 检测地表水中头孢匹罗的含量,依据JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》和JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》评定检测地表水中头孢匹罗残留量的不确定度,确保检测数据准确可靠^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

地表水采集于镇江长江流域, 作为空白样品基质。阳性样品为空白样品加标, 含量为0.20 μg/mL。

仪器: AB Sciex4000三重四极杆串联质谱仪(配有电喷雾离子源)(美国SCIEX公司); Acquity Ultra超高效液相色谱(Waters公司)串联API4000; 全自动固相萃取仪(GLSciences)。

试剂: 蒸馏水(屈臣氏); 乙腈(色谱纯, 德国默克); 甲醇(色谱纯, 德国默克); 丙酮(色谱纯, 国药试剂); 乙酸铵(色谱纯, CNW安谱科技); 甲酸(色谱纯, 德国默克)。

耗材: 0.22 μm孔径聚四氟乙烯(PTFE)针式过滤头(CNW安谱科技); HLB固相萃取小柱(200mg/6mL, 广州盛康)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理。量取1000mL地表水, 使用全自动固相萃取仪对地表水水样进行HLB固相小柱萃取富集, 用甲醇水溶液洗脱固相萃取小柱, 氮吹浓缩至净干, 加水定容至1mL, 经液相色谱分离, 质谱检测, 以标准物质质谱图、保留时间、子离子质荷比及其丰度定性, 外标法定量。

1.2.2 液相色谱方法。色谱柱: BEH Shield RP18(1.7 μm, 2.1 × 100mm); 柱温30°C; 进样量: 5.0 μL。流动相: A: 10mmol/L乙酸铵水溶液, B: 乙腈溶液; 梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相A/%	流动相B/%
0	0.3	96	4
2.5	0.3	96	4
3	0.3	89	11
6	0.3	89	11
10	0.3	12	88
10.5	0.3	94	6
13	0.3	94	6

1.2.3 质谱方法。电喷雾正离子扫描(ESI+): 碰撞气(CAD)为6.00psi, 气帘气(CUR)为25.0psi, 雾化气(GS1)和辅助加热气(GS2)均为50.0psi, 喷雾电压(IS)为5500V, 离子源温度(TEM)为450°C。采用多反应监测(MRM)模式扫描, 参数详见下表2。

表2 头孢匹罗的MRM质谱参数

化合物	Q1(Da)	Q3(Da)	DP(V)	CE(V)
头孢匹罗	515.2	396.0*	70	16
		324.3		21

注: *为定量离子

1.2.4 标准使用液配制。标准溶液由坛墨提供, 为纯品。用十万分之一天平称量标准品10g于10mL容量瓶中, 用甲醇: 水(V:V=1:1)稀释并定容至刻度, 配制成1000 mg/L质量浓度的标准溶液; 采用1mL移液管吸取1.0mL溶液于10mL容量瓶中, 用甲

醇: 水(V:V=1:1)稀释并定容至刻度, 配制成100mg/L质量浓度的标准溶液中间液; 采用1mL移液管吸取100mg/L标准溶液中间液1mL于10mL容量瓶中, 用甲醇: 水(V:V=1:1)稀释并定容至刻度, 配制成10mg/L质量浓度的标准使用液。

1.2.5 标准曲线绘制。将1.2.4配制的10mg/L的标准溶液用1mL移液管分别移取1.0mL、0.5mL于10mL容量瓶中, 用水稀释并定容至刻度, 再逐级稀释, 将头孢匹罗配制成浓度分别为0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 μg/mL的标准曲线。

2 数学模型

地表水中头孢匹罗的质量浓度按下式进行计算:

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V_i \times 1000}{V}$$

式中: ω_i —样品中头孢匹罗的质量浓度, ng/L;

ρ_i —由标准曲线所得试样中头孢匹罗的质量浓度, μg/mL;

V_i —试样定容体积, mL;

V —分析时所用提取液体积, mL。

根据数学模型和检测方法分析, 各个不确定度分量之间互不相关, 按照不确定度传播率, 其相对合成不确定度为:

$$u_{Crel}(C) = \sqrt{u_{rel}^2(m_s) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(R) + u_{rel}^2(c_x) + u_{rel}^2(\bar{R}_B) + u_{rel}(E)}$$

式中: $u_{rel}(m_s)$ —由配制标准物质引入的不确定度

$u_{rel}(V)$ —由配制系列标准溶液引入的体积不确定度

$u_{rel}(R)$ —由样品测量重复性引入的不确定度

$u_{rel}(c_x)$ —由采用最小二乘法拟合标准工作曲线求得样品浓度过程中引入的不确定度

$u_{rel}(\bar{R}_B)$ —由分析方法中回收率引入的不确定度

$u_{rel}(E)$ —由仪器校准引入的不确定度[8]

3 不确定度分量的来源分析

由数学模型和检测方法分析, 不确定度来源主要有以下几个方面:

(1) 由标准物质配制引入的不确定度; (2) 由配制系列标准溶液引入的体积不确定度; (3) 由样品测量重复性引入的不确定度; (4) 由采用最小二乘法拟合标准工作曲线求得样品浓度过程中引入的不确定度; (5) 由分析方法中回收率引入的不确定度; (6) 由仪器校准引入的不确定度。

4 不确定度分量的评定(计算过程以头孢匹罗为例)

4.1 由标准物质配制引入的不确定度 $u_{rel}(m_s)$

4.1.1 天平称量引入的不确定度 $u_{rel}(m_s)$ 。天平引入的不确定度, 根据天平校准证书得知天平的扩展不确定度 $U=0.0001g(k=2)$ 。因此, 称样量 $m=11.70mg$ 头孢匹罗标准物质带来的相对不确定度 $u_{rel}(m_s)=\frac{U}{k}=\frac{0.0001}{2}=4.27\times 10^{-3}$

4.1.2 10mL容量瓶引入的体积不确定度 $u_{rel}(V)$ 。10mL容量瓶容量允差为 $\pm 0.020\text{mL}$, 10mL容量瓶容量带来的不确定度按

$$\text{照矩形分布处理为 } (V) u(V) = \frac{0.020\text{mL}}{\sqrt{3}} = 0.0115\text{mL}, \text{ 即 } 10\text{mL容}$$

$$\text{量瓶带来相对不确定度 } u_{rel}(V) = \frac{0.0115\text{mL}}{10\text{mL}} = 0.00115$$

4.1.3 标准物质浓度引入的不确定度 $u_{rel}(P)$ 。查头孢匹罗标准物质证书, 头孢匹罗的纯度为83%(g/g), 相对扩展不确定度 $U=1.0\%(\text{g/g})$, $k=2$, 因此标准物质纯度带来的相对不确定度

$$u_{rel}(P) = \frac{U}{k} = \frac{0.001}{2} = 5 \times 10^{-4}$$

因此配制标准物质带来的不确定度

$$u_{rel}(m_s) = \sqrt{u_{rel}(m_{s1})^2 + u_{rel}(V)^2 + u_{rel}(P)^2} = 4.45 \times 10^{-3}$$

4.2 由配制系列标准溶液引入的体积不确定度 $u_{rel}(V)$

4.2.1 1mL移液管引入的体积不确定度。1mL移液管容量允差为 $\pm 0.007\text{mL}$, 按矩形分布处理, 1mL移液管引入的不确定度为

$$u(V_1) = \frac{0.007\text{mL}}{\sqrt{3}} = 0.00404\text{mL}, 0.10\text{mL}、0.50\text{mL} \text{ 分别使用 } 2$$

次, 1.0mL使用1次, 即引入的相对不确定度

$$u_{rel}(V_1) = \sqrt{\left(\frac{0.00404}{0.5}\right)^2 \times 1 + \left(\frac{0.00404}{1}\right)^2 \times 4} = 0.0114$$

4.2.2 10mL容量瓶引入的体积不确定度。10mL容量瓶容量允差为 $\pm 0.020\text{mL}$, 10mL容量瓶容量引入的不确定度按矩形分布

$$\text{处理为 } u(V_2) = \frac{0.020\text{mL}}{\sqrt{3}} = 0.0115\text{mL}, \text{ 即 } 10\text{mL容量瓶带来的相}$$

$$\text{对不确定度 } u_{rel}(V_2) = \frac{0.0115\text{mL}}{10\text{mL}} = 0.00115$$

4.2.3 由实验室温度变化和系列标准溶液的配制带来的体积不确定度。量取时实验室温度范围为 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 水的热膨胀系数为 $1.80 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$, 因此温度引起的体积变化为 $2 \times 1.80 \times 10^{-3} \times 10 = 0.036\text{mL}$ 。假设为均匀分布, 因此温度带来的体积不确定度

$$u(V_3) = \frac{0.036}{\sqrt{3}} = 0.0208\text{mL}。即配制10mL水溶液的相对不确$$

$$\text{定度为 } u_{rel}(V_3) = \frac{0.0208}{10} = 0.00208$$

则配制系列标准溶液引入的体积不确定度:

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{rel}(V_1)^2 + u_{rel}(V_2)^2 + u_{rel}(V_3)^2} = 0.0116$$

4.3 由样品测量重复性引入的不确定度 $u_{rel}(R)$

表3 头孢匹罗重复性浓度

测定次数	1	2	3	4	5	6	平均值 /μg/mL
质量浓度 /μg/mL	0.149	0.152	0.153	0.148	0.158	0.145	0.151

在相同条件下, 对地表水加标 0.20 μg/mL 连续测定6次, 以头孢匹罗为例, 所得浓度如表3所示:

根据贝塞尔公式计算测量重复性的标准差, 得到标准不确定度:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2} = 0.00453\text{ μg/mL}$$

在实际样品测量时, 采用2次测量次数用于计算^[9], 用表3前两次质量浓度数据作为实际样品的测试数据。样品的平均值为

$$c = \bar{c} = \frac{c_1 + c_2}{2} = \frac{0.149 + 0.152}{2} = 0.150\text{ μg/mL}$$

则样品测量平均值重复性的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(R) = \frac{s}{c\sqrt{n}} = \frac{0.00453}{0.150 \times \sqrt{2}} = 0.0213$$

4.4 由采用最小二乘法拟合标准工作曲线求得样品浓度过程中引入的不确定度 $u_{rel}(c_x)$

地表水中头孢匹罗的含量使用液相色谱串联质谱法进行测定, 标准曲线的质量浓度分别为 $0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00\text{ μg/mL}$, 标准曲线为 $Y=39525x-202$, 相关系数 $r=0.9999$,

表4 头孢匹罗标曲峰面积

曲线点	1	2	3	4	5
目标物峰面积	215.3	1723	3660	19210	39800
C _i	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0

根据公式 $S^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - (a + bc_i))^2 / n - 2$, 故计算标

$$\text{曲的残差 } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bc_i))^2}{(n-2)}} = 347.2\text{ μg/mL}。$$

式中: b-斜率, a-截距, -校准溶液的浓度, n-校准溶液的个数, y_i -校准溶液的响应。

根据下面公式, 计算标准曲线拟合带来的头孢匹罗不确定度

$$u(x) = \frac{S}{b} \sqrt{\left(\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}\right)} = 0.00962\text{ μg/mL}$$

式中: c-测试浓度值, n-校准数据点个数, \bar{c} -校准溶液浓度的均值, p-平行样个数。则标准曲线拟合得到头孢匹罗的相对不确定度 $u_{rel}(c_x) = \frac{u(x)}{c} = 0.0639$

4.5 分析方法中回收率引入的不确定度 $u_{rel}(\bar{R}_B)$

在地表水中加标, 使头孢匹罗质量浓度为 1.0 μg/mL , 测定6个平行样, 结果见下表:

表5 头孢匹罗回收率

测定次数(n)	1	2	3	4	5	6	平均值
质量浓度 /μg/mL	0.149	0.152	0.153	0.148	0.158	0.145	0.151
回收率 R/%	74.5	76.0	76.5	74.0	79.0	72.5	75.5

根据贝塞尔公式计算测量重复性的标准差,即标准不确定度:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2} = 0.00454 \mu\text{g/mL}$$

头孢匹罗的质量浓度为971.1 μg/mL,由4.1.3得出配制溶液带来的相对不确定为 4.45×10^{-3} ,将数据带入回收率不确定度计算公式:

$$u_{rel}(\bar{R}_A) = \sqrt{\frac{S^2}{n\bar{c}^2} + \left[\frac{u(c_s)}{c_s} \right]^2} = \sqrt{\frac{0.00454^2}{6 \times 0.15^2} + (4.45 \times 10^{-3})^2} = 0.0131$$

$$u(\bar{R}_A) = u_{rel}(\bar{R}_A) \times \bar{R} = 0.0131 \times 0.755 = 0.00987$$

在加标回收实验后,对于平均回收率和理论回收率(100%)是否存在显著性差异,需要采用t检验法进行检验。统计量t为:

$$t = \frac{|1-\bar{R}| - |1-0.755|}{u(\bar{R}_A) / 0.00987} = 24.8$$

本实验测定次数n=6,因此自由度为n-1=5,t分布表(双侧)t(0.05, 5)=2.015,由于t=24.8>2.015,因此可以得出平均回收率与理论回收率是存在显著性差异的。

因为在环境监测中,使用回收率修正测量结果并不作要求。因此,在实验所得平均回收率与理论回收率(100%)存在显著性差异的情况下,方法回收率的不确定度为^[10]:

$$u_{rel}(\bar{R}_B) = \sqrt{\left(\frac{1-\bar{R}}{k} \right)^2 + u(\bar{R}_A)^2} = \sqrt{\left(\frac{1-0.755}{\sqrt{3}} \right)^2 + 0.00987^2} = 0.142$$

4.6 由仪器校准引入的不确定度 $u_{rel}(E)$

查得液质联用仪校准证书, $u_{rel} = 2\%$, k=2,则有仪器校准引入的相对不确定度

$$u_{rel}(E) = \frac{2\%}{2} = 0.01$$

表6 头孢匹罗不确定度分量

不确定度分量	不确定度来源	相对标准不确定度
$u_{rel}(m_s)$	由标准物质配制引入的不确定度	4.45×10^{-3}
$u_{rel}(V)$	由配制系列标准溶液引入的体积不确定度	0.0116
$u_{rel}(R)$	由样品测量重复性引入的不确定度	0.0213
$u_{rel}(c_x)$	由采用最小二乘法拟合标准工作曲线求得 样品浓度过程中引入的不确定度	0.0639
$u_{rel}(\bar{R}_B)$	由分析方法中回收率引入的不确定度	0.142
$u_{rel}(E)$	由仪器校准引入的不确定度	0.01

5 合成不确定度

不确定度分量一览表如表6所示:

由于各个分量之间相互独立,因此头孢匹罗的相对合成不确定度为:

$$u_{Crel}(C) = \sqrt{u_{rel}^2(m_s) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(R) + u_{rel}^2(c_x) + u_{rel}^2(\bar{R}_B) + u_{rel}^2(E)}$$

$$= 0.158$$

$$u_C(C) = Cu_{Crel}(C) = 0.15 \mu\text{g/mL} \times 0.158 = 0.024 \mu\text{g/mL}$$

6 扩展不确定度

本次实验中头孢匹罗不确定度分量较多,假设其为正态分布,在95%置信水平下k=2

$$U = u \times k = 0.024 \times 2 \mu\text{g/mL} = 0.048 \mu\text{g/mL}$$

头孢匹罗结果表示为: $(0.15 \pm 0.048) \mu\text{g/mL}$, k=2

7 结果与结论

本文建立了全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定地表水中头孢匹罗的不确定度评定方法,通过对不确定度分量进行分析,结果表明,地表水中头孢匹罗不确定度中分析方法回收率是最主要来源,标准曲线拟合是次要来源,其他分量的影响较小。因此,在实验过程中,可以增加实验平行次数,定期校准标准曲线,来保证实验结果的准确性,可靠性,降低实验风险。

【基金项目】

江苏省生态环境监测科研基金项目(NO.2102)。

【参考文献】

[1] 时国朝,邓伟吾.第四代头孢菌素-头孢匹罗[J].中国新药与临床杂志,1999,18(2):106-108.

[2] Al-Rifai JH,Khabbaz H. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in a water recycling process using reverse osmosis systems[J]. Sep Purif Technol, 2011, 77:60-67.

[3] 华蕾.环境监测测量不确定度评定[M].北京:中国计量出版社,2009.

[4] 李倩.浅谈测量不确定度的意义及其在实验室质量管理中的应用[J].科技创新与应用,2015,(14):176-177.

[5] 刘正富.超高效液相色谱-串联质谱法测定淡水鱼中地西泮含量的不确定度评定[J].轻工标准与质量,2022,(3):70-73.

[6] 李文杰,陈涛.超高效液相色谱-串联质谱同位素内标法测定水产品中氟苯尼考及其代谢物残留量的不确定度评定[J].食品安全质量检测学报,2020,(11):7927-67934.

[7] 黄坤,刘迪.同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中3种喹诺酮类兽药残留的不确定度评定[J].食品安全质量检测学报,2021,(12):101-107.

[8] 陈峰,唐访良.吹扫捕集-气相色谱-质谱法测定水中环氧丙烷的不确定度评定[J].北方环境,2011,23(9):202-204.

[9] 杭培红,徐巍.GC/MS测定水中三氯乙醛的不确定度评定[J].广州化工,2012,40(20):106-108.

[10] 孙红梅,朱国军.气相色谱-质谱法测定水中挥发性有机物的测量不确定度评定[J].环境工程学报,2011,5(11):2587-2592.

作者简介:

何媛媛(1989--),女,汉族,江苏镇江人,江苏省镇江环境监测中心分析测试科科员,研究方向:环境中的痕量有机污染物分析。