

液相色谱法测定辣椒中克百威农药残留量的不确定度评定

魏维杰, 王丽芳 (浙江省杭州市余杭区食品药品监测中心, 浙江杭州 311112)

摘要 [目的]了解测定蔬菜中氨基甲酸酯类农药多残留量不确定度的主要来源,通过一些方法对不确定度贡献度大的进行改善修正,从而进一步提升检测结果的可靠性。[方法]对辣椒中克百威农药残留的不确定度进行评定和分析,找出影响不确定度的因素,对各个不确定度分量进行评估并比较各分量对总不确定度的贡献,从而给出测定结果的置信区间。[结果]分析得出影响结果的主要不确定度分量是色谱仪峰面积的测定和总重复性。[结论]在检测过程中,需在检测前做好仪器平衡和调试,确保仪器处于良好的工作状态,并在重复检测时尽可能排除其他干扰。

关键词 液相色谱法;克百威;不确定度

中图分类号 S481+.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)08-089-03

Evaluation of Measurement Uncertainty in Determination of Carbofuran Residue in Chilli by Liquid Chromatography

WEI Wei-jie, WANG Li-fang (Yuhang District Supervising & Testing Center for Food and Drug of Hangzhou City, Hangzhou, Zhejiang 311112)

Abstract [Objective] To find out the main sources of measurement uncertainty in the data about determination carbamate pesticides in vegetables, through some methods to improve and correct the larger contribution of the uncertainty, thus further improve the reliability of detection results. [Method] Find out the influencing factors of uncertainty by evaluation of measurement uncertainty in determination of carbofuran residue in chilli, then evaluate each component of uncertainty and compare each of the components on contribution of the total uncertainty, thus obtain the determination results of the confidence interval. [Result] It was found that the results of the main components of the uncertainty is the chromatograph peak area determination and total repeatability. [Conclusion] It's necessary that balance and debug the instrument before the detection, ensure the instrument is ready, and as much as to exclude other interference in duplicate detection.

Key words LC; Carbofuran; Uncertainty

近年来,食品安全问题日益凸显,蔬菜农药残留已经成为人们最关心话题之一,因此农药残留检测数据的准确性至关重要。为了提供更公正、更准确的检测数据,测量不确定度作为判定测量结果准确度的一个重要依据,是实验室质量体系建立的重要部分,实验室认证时也对其有明确要求,因此受到了各检测实验室的重视,各实验室对其进行了广泛的研究与讨论^[1-6]。克百威属高毒杀虫剂,被农业部禁止在蔬菜上使用,但偷用、滥用现象屡有发生,辣椒在南方需求量非常大,但病虫害多,农药检出率较高,为此,笔者选择对辣椒中克百威农药残留量进行了测量不确定度评定,旨在为农药残留检测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品。鲜辣椒为市售。

1.1.2 试剂。乙腈,甲醇,二氯甲烷,氯化钠,超纯水(哇哈哈纯净水经纯水器过滤所得)。

1.1.3 主要仪器。岛津 LC-20A 液相色谱仪(氨基甲酸酯分析系统);检测器为荧光检测器(λ_{ex} 330 nm, λ_{em} 465 nm);柱子为 C_8 (4.0 mm × 250.0 mm), 5 μ m。

1.2 分析条件 柱温及衍生温度:50 $^{\circ}$ C;柱后衍生:0.05 mol/L 氢氧化钠溶液,流速 0.3 ml/min;OPA 试剂,流速 0.3 ml/min;反应器温度:100 $^{\circ}$ C。保留时间定性,外标单标法峰面积定量。检测时,室温(25 ± 3) $^{\circ}$ C。

1.3 方法 依据 NY/T761-2008《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定》第 3 部

分:蔬菜和水果中氨基甲酸酯类农药多残留的测定》改动的非标方法测定。将鲜辣椒用打样机打碎混匀,称取 10.00 g 样品放入 50 ml 离心管中,加入 5.00 g 氯化钠,再加入 25.00 ml 乙腈,充分混匀,用低速离心机 4 500 r/min 离心 4 min,使乙腈相和水相充分分层,室温下静置 5 min。从离心管中吸取 5.00 ml 乙腈溶液,放入 10 ml 试管 1 中,将试管放在氮吹仪上氮吹,设置水浴温度 70 $^{\circ}$ C,缓缓通入氮气,将乙腈氮吹蒸发至近干,加入 2.00 ml 甲醇 + 二氯甲烷(1+99)溶解残渣,待净化。将氨基柱用 4.0 ml 甲醇 + 二氯甲烷(1+99)预洗条件化,当溶液液面到达柱吸附层表面时,立即加入上述待净化溶液,用 10 ml 试管 2 收集洗脱液,用 2 ml 甲醇 + 二氯甲烷(1+99)洗试管 1 后过柱,并重复 1 次。将试管 2 置于氮吹仪上,水浴温度 50 $^{\circ}$ C,氮吹蒸发至近干,用 2.00 ml 10% 甲醇溶解残渣。样品在混匀器上混匀后,经 0.2 μ m 有机针式过滤器过滤,吸取 10.0 μ l 净化后的样品溶液注入液相色谱仪中待分析。

1.4 计算公式

$$\omega = C_{\text{标}} \times A_{\text{样}} \times V_1 \times V_3 \times 1\ 000 / (A_{\text{标}} \times m \times V_2 \times R \times 1\ 000)$$

式中, ω ——样品中农药的含量,mg/kg; $C_{\text{标}}$ ——标准溶液中克百威浓度, μ g/ml; $A_{\text{标}}$ ——标准溶液中克百威峰面积,mV * s; $A_{\text{样}}$ ——样品中克百威峰面积,mV * s; m ——样品的质量,g; V_1 ——提取溶液总体积,ml; V_2 ——提取溶液分取的体积,ml; V_3 ——样品溶液定容体积,ml; R ——样品加标回收率,%。

2 结果与分析

2.1 识别不确定度的来源 液相色谱法检测辣椒中克百威的标准不确定度 $u_{rel}(\omega)$ 主要来源:①检测方法总重复性导致的相对不确定度 $u_{rel}(rep)$;②标准溶液浓度引入的标准不确定度 $u_{rel}(C_{\text{标}})$;③样品称量引入的标准不确定度 $u_{rel}(m)$;

基金项目 浙江省杭州市科技局社会发展科研专项(20140533B61)。

作者简介 魏维杰(1986-),男,浙江杭州人,助理工程师,从事食品及农产品检测工作。

收稿日期 2015-01-30

④ 样品前处理溶液体积引入的标准不确定度 $u_{rel}(V)$; ⑤ 标准溶液峰面积测定引入的标准不确定度 $u_{rel}(A_{\text{标}})$; ⑥ 样品峰面积测定引入的标准不确定度 $u_{rel}(A_{\text{样}})$; ⑦ 样品加标回收率

引入的不确定度 $u_{rel}(R)$ 。

从测定方法看,各影响参数相对独立,合成标准不确定度可用相对标准不确定度合成:

$$u_{rel}(\omega) = \sqrt{u_{rel}^2(rep) + u_{rel}^2(C_{\text{标}}) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(A_{\text{标}}) + u_{rel}^2(A_{\text{样}}) + u_{rel}^2(R)}$$

2.2 量化不确定度分量

2.2.1 检测方法总重复性导致的相对不确定度 $u_{rel}(rep)$ 。按照该方法对样品加标中的克百威含量分别进行测定,检测结果为 0.170、0.173、0.169、0.167、0.165、0.168、0.171、0.169、0.167 和 0.170 mg/kg。

$$\bar{w} = 0.1689(\text{mg/kg}) \quad s(w) = 0.002283(\text{mg/kg})$$

实际测量时,一般对样品测定 2 次作为测量结果,则:

$$u(w) = s(\bar{w}) = \frac{s(w)}{\sqrt{2}} = 0.001614(\text{mg/kg})$$

其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(rep) = \frac{u(w)}{\bar{w}} = 0.00956(\text{mg/kg})$$

2.2.2 克百威标准溶液引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_{\text{标}})$ 。

2.2.2.1 标准溶液纯度引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(C'_{\text{标}})$ 。

克百威标准溶液母液由农业部环境保护科研监测所(天津)制备,浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 ml/瓶,其定值扩展不确定度为 $\pm 0.08 \mu\text{g/ml}$, $k=2$ 。属于 B 类评定,计算标准物质纯度引入的相对标准不确定度:

$$u(C'_{\text{标}}) = \frac{a}{k} = 0.04(\mu\text{g/ml})$$

$$u_{rel}(C'_{\text{标}}) = \frac{u(C'_{\text{标}})}{C} = 0.00040$$

2.2.2.2 标准溶液稀释配制过程中引入的相对标准不确定度评定。将 1 ml 安瓿瓶中的克百威标准母液移至 10 ml 容量瓶(A 级)中,用 1 ml 甲醇冲洗安瓿瓶移至容量瓶中,重复 5 次,然后用甲醇定容,配成 10 $\mu\text{g/ml}$ 克百威标准储备液。用移液枪吸取 10 $\mu\text{g/ml}$ 克百威标准储备液 500 μl 移至 25 ml 容量瓶(A 级)中,用甲醇定容,配成 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 克百威标准工作液。

因克百威标准母液未能完全转移至容量瓶中而产生的不确定度由于 5 次清洗已经可以忽略不计。

移液枪为 Eppendorf(20~200 μl),根据检定证书提供的信息其 200 μl 时的测量重复性为 1.0%,按矩形分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(D_{E_1}) = 0.00577$$

移液枪为 Eppendorf(100~1000 μl),根据检定证书提供的信息其 500 μl 时的测量重复性为 0.5%,按矩形分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(D_{E_2}) = 0.00289$$

根据 GB12806-1991《实验室玻璃仪器单标线容量瓶》规定:单标线 10 ml 容量瓶的容量允许差为 $\pm 0.02 \text{ ml}$ 。按三角分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(D_{F_1}) = 0.00082$$

根据 GB12806-1991《实验室玻璃仪器单标线容量瓶》规定:单标线 25 ml 容量瓶的容量允许差为 $\pm 0.03 \text{ ml}$ 。按三角分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(D_{F_2}) = 0.00049$$

标准溶液稀释过程引入的相对标准不确定度:

$$u_{rel}(D) = \sqrt{u_{rel}^2(D_{E_1}) + u_{rel}^2(D_{E_2}) + u_{rel}^2(D_{F_1}) + u_{rel}^2(D_{F_2})} = 0.00652$$

2.2.2.3 克百威标准溶液引入的合成相对不确定度评定。

$$u_{rel}(C_{\text{标}}) = \sqrt{u_{rel}^2(C'_{\text{标}}) + u_{rel}^2(D)} = 0.00653$$

2.2.3 样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(m)$ 评定。样品称量所用天平最小分度值为 0.01 g 电子天平,准确称量样品 10.00 g,由于天平精度不是很高,数显非常稳定,故称量重复性引入的不确定度忽略不计。该准确级的天平在(0~50 g)称量范围的最大允许误差为 $\pm 0.01 \text{ g}$,由称量误差导致的不确定度按矩形分布计算(B 类评定):

$$u_{rel}^2(m) = 0.00058$$

2.2.4 样品前处理过程溶液体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V)$ 评定。

2.2.4.1 提取溶液总体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_1)$ 。用 A 级 25 ml 单标线胖肚移液管移取 25.00 ml(V_1)乙腈,根据 GB12808-1991《实验室玻璃仪器单标线吸量管》规定:A 级 25 ml 单标线胖肚移液管的容量允许差为 $\pm 0.03 \text{ ml}$ 。按三角分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(V_1)_{\text{移液管}} = 0.00049$$

实验室温度在 $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间变化,乙腈的膨胀系数为 0.00137 $^\circ\text{C}^{-1}$,视温度变化为矩形分布 $K=\sqrt{3}$,属于 B 类评定:

$$u_{rel}(V_1)_{\text{乙腈}} = 0.00237$$

样品定容体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_1)$ 合成为:

$$u_{rel}(V_1) = \sqrt{u_{rel}^2(V_1)_{\text{移液管}} + u_{rel}^2(V_1)_{\text{乙腈}}} = 0.00242$$

2.2.4.2 提取溶液分取体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_2)$ 。用 A 级 5 ml 单标线胖肚移液管分取提 5.00 ml(V_2)取液,根据 GB12808-1991《实验室玻璃仪器单标线吸量管》规定:A 级 5 ml 单标线胖肚移液管的容量允许差为 $\pm 0.015 \text{ ml}$ 。按三角分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(V_2)_{\text{移液管}} = 0.00122$$

实验室温度在 $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间变化,乙腈的膨胀系数为 0.0137 $^\circ\text{C}^{-1}$,视温度变化为矩形分布 $K=\sqrt{3}$,属于 B 类评定:

$$u_{rel}(V_2)_{\text{乙腈}} = 0.00237$$

样品定容体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_2)$ 合成为:

$$u_{rel}(V_2) = \sqrt{u_{rel}^2(V_2)_{移液管} + u_{rel}^2(V_2)_{乙腈}} = 0.00267$$

2.2.4.3 样品定容体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_3)$ 评定。测定液浓缩后最后用移液枪定容至 2.0 ml, 移液枪为 Eppendorf(100 ~ 1 000 μ l), 根据检定证书提供的信息其 1 000 μ l 时的测量重复性为 0.5%, 按矩形分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(V_3)_{移液枪} = 0.00289$$

实验室温度在 ± 3 $^{\circ}$ C 之间变化, 甲醇的膨胀系数为 0.001 10 $^{\circ}$ C, 视温度变化为均匀分布 $K = \sqrt{3}$, 属于 B 类评定:

$$u_{rel}(V_2)_{甲醇} = 0.00191$$

样品定容体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_3)$ 合成为:

$$u_{rel}(V_3) = \sqrt{u_{rel}^2(V_3)_{移液枪 \times 2} + u_{rel}^2(V_3)_{甲醇 \times 2}} = 0.00490$$

2.2.4.4 样品前处理过程溶液体积引入的相对标准不确定度合成。

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{rel}^2(V_1) + u_{rel}^2(V_2) + u_{rel}^2(V_3)} = 0.00608$$

2.2.5 色谱仪峰面积测定引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(A)$ 评定[包含 $u_{rel}(A_{标})$ 和 $u_{rel}(A_{样})$]。

2.2.5.1 由标准品添加引入的相对不确定度 $u_{rel}(V_A)$ 。以峰面积外标法定量, 需用移液枪 Eppendorf(20 ~ 200 μ l) 取 10 μ g/ml 的标准液 200 μ l, 根据检定证书提供的信息其 200 μ l 时的测量重复性为 1.0%, 按矩形分布处理(属于 B 类评定):

$$u_{rel}(V_A) = 0.00577$$

2.2.5.2 仪器引入的相对不确定度 $u_{rel}(LC)$ 。根据仪器检定证书提供信息, 定量重复性误差 (RSD_6) 为 2.7%, 属于 B 类评定, 仪器引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(LC) = \frac{RSD_n}{\sqrt{n}} = 0.01102$$

2.2.5.3 色谱仪峰面积相对标准不确定度合成。

$$u_{rel}(A) = \sqrt{u_{rel}^2(LC) + u_{rel}^2(V_A)} = 0.01244$$

2.2.6 样品加标回收率引入的不确定度 $u_{rel}(R)$ 。按照该方法对 6 个样品加标中的克百威含量进行测定, 其回收率分别为 84.5%、86.5%、84.0%、85.5%、82.5% 和 83.5%。

$$\bar{w} = 0.8442 \text{ (mg/kg)} \quad s(w) = 0.014289 \text{ (mg/kg)}$$

$$u(w) = s(\bar{w}) = \frac{s(w)}{\sqrt{6}} = 0.005833 \text{ (mg/kg)}$$

$$u_{rel}(rep) = \frac{u(w)}{\bar{w}} = 0.00691 \text{ (mg/kg)}$$

2.3 相对标准不确定度的合成和相对扩展不确定的计算

$$u_{rel}(\omega) = \sqrt{u_{rel}^2(rep) + u_{rel}^2(C_{标}) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(A) + u_{rel}^2(R)} = 0.01933$$

取包含因子 $k = 2$ (95% 置信度), 则测得辣椒中克百威测定的相对扩展不确定度为:

$$U_{(\omega)} = u_{rel}(\omega) \times k = 0.03866$$

2.4 测定结果

$$\omega = \frac{C_{标} \times A_{样} \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_{标} \times m \times V_2 \times 1000} = 0.1688 \text{ (mg/kg)}$$

由试验数据平均值计算辣椒中克百威的最佳估计值:

$$\omega = 0.1688 \text{ (mg/kg)}$$

其扩展不确定度为:

$$U = U_{(\omega)} \times \omega = 0.00650$$

故该试验采用液相色谱法测定辣椒中克百威含量为 (0.1688 \pm 0.0065) mg/kg, $k = 2$ 。

3 讨论

总重复性 (rep)、标准液 ($C_{标}$)、样品量 (m)、前处理体积 (V)、峰面积 (A)、回收率 (R) 6 项参数的相对标准不确定度分量值分别为 0.00956、0.00653、0.00058、0.00608、0.01244、0.00691。

由各个相对标准不确定度分量值可知, 影响结果的主要不确定度分量是色谱仪峰面积的测定; 其次是总重复性、回收率、标准溶液浓度、前处理体积; 样品量可以忽略不计。因此, 在标准进样和样品检测过程中应严格按照仪器操作规程进行测定, 在测定前做好仪器平衡和调试准备工作, 尽量排除仪器的不确定因素, 同时在样品检测过程中应严格控制样品前处理的各个步骤, 减少因定容、取液等引入的不确定度, 从而减小测定结果的不确定度。

参考文献

- [1] 罗小玲, 刘长勇, 任雪燕. 气相色谱法测定蔬菜中氧化乐果农药残留量的测量不确定度评定[J]. 中国测试技术, 2006, 32(3): 126-127, 131.
- [2] 吕立涛, 郝晓莉. 液相色谱法测定大白菜中克百威残留量的不确定度分析[J]. 吉林蔬菜, 2008(3): 77-78.
- [3] 周锦萍, 胡佩玉. 测定丁硫克百威含量的不确定度分析[J]. 精细化工中间体, 2009, 39(1): 68-70.
- [4] 鲜青龙, 王琴, 武洪丽. 石墨炉原子吸收光谱法测定茶叶中铅的不确定度评定[J]. 计量与测试技术, 2013, 40(7): 57-59.
- [5] 上官苗苗, 曹晓. 液相色谱法测定豇豆中灭多威农药残留量的测量不确定度评定[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(1): 108-112.
- [6] 卢欢, 王雯. 食醋中总酸含量测定的不确定度评定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 1523-1525, 1544.

(上接第 66 页)

- [37] PENG X H, YE L L, WANG G H, et al. Temperature-and-duration-dependent rice straw-derived biochar; characteristics and its effects on soil properties of an ultisol in southern China[J]. Soil & Tillage Research, 2011, 112(2): 159-166.
- [38] 高海英, 何绪生, 耿增超. 生物炭及炭基氮肥对土壤持水性能影响研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 207-213.
- [39] 刘玮晶. 生物炭质对土壤中氮素养分滞留效应的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 11-12.
- [40] 张忠河, 林振衡, 付娅琦, 等. 生物炭在农业上的应用[J]. 安徽农业科

- 学, 2010, 38(22): 11880-11882.
- [41] VAN ZWIETEN L, KIMBER S, MORRIS S, et al. Effects of biochar from slow pyrolysis of paper mill waste on agronomic performance and soil fertility[J]. Plant and Soil, 2010, 327: 235-246.
- [42] LEHMANN J, DA SILVA J P JR, STEINER C, et al. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer manure and charcoal amendments[J]. Plant and Soil, 2003, 249: 343-357.
- [43] 武玉, 徐刚, 吕迎春, 等. 生物炭对土壤理化性质影响的研究进展[J]. 地球科学进展, 2014, 29(1): 68-79.