

# 气相色谱串联质谱法检测黄芪中二嗪磷残留量的 不确定度评定

易大为<sup>1\*</sup>, 邹宇<sup>1</sup>, 刘杨<sup>1</sup>, 高敬红<sup>2</sup>

(1. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036; 2. 沈阳志鹰药业有限公司, 沈阳 110015)

**摘要:** **目的** 对气相质谱法测定黄芪中二嗪磷残留量的不确定度进行评价。**方法** 建立标准工作曲线和样品定量测定的数学模型, 对实验过程中各影响因素进行评价。**结果** 主要从标准曲线的变动性、测定结果的重复性、二嗪磷的浸出率以及内标物取样量 4 个方面进行量化, 并计算出合成不确定度为 0.016 mg/kg, 取  $k=2$  的扩展不确定度为 0.032 mg/kg, 黄芪中二嗪磷残留量为  $(0.091 \pm 0.032)$  mg/kg。**结论** 标准曲线的变动性是影响结果不确定度的主要因素, 使用更高响应的检测方法, 可有效提高标准曲线的线性, 减少此类测量的不确定度。

**关键词:** 气相质谱法; 黄芪; 二嗪磷; 不确定度

## Evaluation of uncertainty for diazinon residues in *Astragal* radix by gas chromatography-mass spectrometry method

YI Da-Wei<sup>1\*</sup>, ZOU Yu<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, GAO Jing-hong<sup>2</sup>

(1. Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China;  
2. Shenyang Zhiying Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110015, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty for diazinon residues in *Astragal* radix by gas chromatography-mass spectrometry. **Methods** The models for evaluation of the uncertainty about both standard work curve and sample quantitative testing were established, and the factors that influenced the measurement were investigated. **Results** The four main factors were quantized including mobility of standard curve, repetitiveness of testing results extract efficiency of diazinon in *Astragal* radix, and the volume of internal standard solution. The combined standard uncertainty was obtained as 0.016 mg/kg, the expanded uncertainty was 0.032 mg/kg when  $k=2$ , then diazinon residues in *Astragal* radix was determined as  $(0.091 \pm 0.032)$  mg/kg. **Conclusion** Mobility of standard curve was the primary factor for the measurement of uncertainty. The uncertainty may be reduced and the linearity of standard curve may be increased by using the higher responsive detector.

**KEY WORDS:** gas chromatography-mass spectrometry; *Astragal* radix; diazinon; uncertainty

## 1 引言

随着生活水平不断提高, 人们的保健意识不断

增强, 一些食药同源的中药材倍受青睐。然而目前市售中药材多为人工栽培, 为抵抗病虫害侵袭, 在中草药的生产期会喷洒大量杀虫剂, 这就使农药残留成

\*通讯作者: 易大为, 副主任药师, 主要研究方向为检验与标准化研究。E-mail: detin@163.com

\*Corresponding author: YI Da-Wei, Associate Chief Pharmacist, Liaoning Institute for Drug Control, No. 46, Guihe Street in Tiexi District of Shenyang, E-mail: detin@163.com

为制约中药安全使用的首要问题,对中草药农药残留量检测技术的研究显得尤为重要。二嗪磷又名二嗪农,是广谱性有机磷杀虫杀螨剂,有触杀、胃毒和熏蒸作用,主要用于防治食叶害虫、刺吸式口器害虫和地下害虫<sup>[1]</sup>。二嗪磷具有一定的接触毒性和遗传毒性,GB 2763-2014规定蔬菜中二嗪磷最大残留限量为0.5 mg/kg<sup>[2]</sup>,而药品标准中尚未收载中药材的有机磷农药的残留限量和检测方法。本文通过对气相质谱联用法测定黄芪中二嗪磷残留量的不确定度进行分析和评价,初步探讨该方法运用过程中应注意的问题,旨在为建立中成药中有机磷农药残留的检测方法提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

QP2010 气相色谱-质谱联用仪(AOC 5000 顶空进样器, GCMSREALTIME 软件, EI 离子源, 日本岛津公司); RE-3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); ZK100 中药打粉机(永康市永康机械有限公司); BT423S 电子天平(赛多利斯公司)。乙腈(色谱级, Tedia Co. ING.), 丙酮(农残级, Fisher Scientific Co. Ltd.), 活性炭(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 邻苯二甲酸二甲酯(分析纯, 98%, 国药集团化学试剂有限公司), 二嗪磷标准溶液(1 mg/mL,  $U_{rel}=0.5\%$ , 中国标准技术开发部), 黄芪药材(饮片)购于河北安国。

### 2.2 色谱、质谱条件

气相色谱条件: rtx-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm); 初始柱温 95 °C, 维持 1.5 min, 以 25 °C/min 升至 200 °C, 再以 5 °C/min 升至 240 °C, 再以 20 °C/min 升至 280 °C, 保持 10 min; 进样口温度 250 °C; 进样量 3 μL, 无分流; 载气: 高纯氦气, 1.67 mL/min。

质谱条件: 溶剂延迟 5 min; EI 离子源能量 70 eV; 离子源温度 230 °C; 接口温度 280 °C; 四级杆温度 150 °C; 扫描范围: 40~400 Da; 内标法定量。

### 2.3 内标物储备溶液

取邻苯二甲酸二甲酯(DMP)约 10 mg, 精密称定, 加丙酮溶解并稀释制成约 5 μg/mL 的溶液, 作为内标物储备溶液。

### 2.4 标准工作曲线

精密量取二嗪磷标准溶液 80 μL, 加丙酮稀释制成 0.8 μg/mL 的溶液, 作为标准品储备溶液; 量取该液各 0.25、0.5、1、2、5、7 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加入内标物储备溶液 1 mL, 加丙酮稀释至刻度, 作为系列标准品溶液。按选定的色谱、质谱条件进行实验。

### 2.5 样品溶液的制备

将黄芪药材粉碎并研磨成细粉, 精密称取约 5 g, 置 250 mL 锥形瓶中, 加入内标物储备溶液 1 mL, 乙腈 50 mL, 冰浴中超声 5 min, 过滤, 滤渣用乙腈洗涤 3 次合并至滤液中, 在旋转蒸发器上蒸发近干, 10 mL 丙酮溶解后, 0.1 g 活性炭吸附, 滤过, 不溶物及活性炭用丙酮洗涤 3 次合并至丙酮液中, 挥干, 加丙酮定容至 10 mL, 滤过。量取滤液 3 μL, 按选定的色谱、质谱条件进行实验。

### 2.6 建立数学模型

为便于量化不确定度的各分量, 将二嗪磷残留量的计算公式分解成两个数学模型, 模型 1 用于评定标准曲线的变动对二嗪磷测定值的影响, 模型 2 用于评定称量、稀释以及提取过程对二嗪磷测定值的影响。

$$c_p = \frac{A_p/A_D + a}{b} \times \frac{V}{m_A} \quad (\text{计算公式}) \quad \longrightarrow$$

$$X_p = f_{rsd} \times x_p = f_{rsd} \times \frac{A_p/A_D + a}{b} \quad (\text{模型1});$$

$$c_p = X_p \times \frac{V}{m_A} \times \frac{1}{Rec} \times f_{rep} \times 1\text{mL} \times \frac{1}{1\text{mL}} \quad (\text{模型2})$$

$c_p$  黄芪中二嗪磷的残留量(mg/kg);  $m_A$  黄芪称样量(g);  $V$  样品稀释体积(mL);  $X_p$  由标准曲线计算得到的二嗪磷浓度(μg/mL);  $Rec$  二嗪磷的加样回收率;  $f_{rep}$  二嗪磷残留量测定的重复性;  $f_{rsd}$  同一供试液多次测量的精密度;  $A_p/A_D$  二嗪磷与内标物响应值之比;  $a$  标准曲线的截距;  $b$  标准曲线的斜率; 1 mL 为内标溶液的取样量。

## 3 结果与分析

### 3.1 二嗪磷的检测

#### 3.1.1 标准曲线的建立

按照 2.4 方法, 以二嗪磷浓度( $X$ )为横坐标, 以二嗪磷与内标物峰面积的比值( $Y$ )为纵坐标绘制标准工

作曲线。标准品浓度与峰面积对应关系见表 1, 线性方程:  $Y=1.164X-0.0165$ ,  $r=0.9990$ 。

3.1.2 药材饮片中二嗪磷的测定结果

按照 2.5 方法, 制备 5 份供试品溶液测定, 试验数据见表 2, 该黄芪药材饮片中二嗪磷的残留量为 0.082 mg/kg。

3.2 不确定度来源与分析

3.2.1 量化不确定度的来源

本研究主要涉及的测量过程: (1)气相色谱-质谱联用技术; (2)标准曲线内标法; (3)有机溶剂的浸渍与提取。由于内标物的浓度不参与计算过程, 本研究的不确定度来源可以归纳为四方面: (1)标准曲线的变动性, 主要与仪器响应值及测量方法的准确度相关; (2)测定结果的重复性, 主要与药品的称量、稀释、定容及结果的精密度相关; (3)样品中二嗪磷的浸出率, 主要与二嗪磷的加样回收率相关。(4)内标溶液的取样量, 1 mL。

3.3 量化各不确定度分量

3.3.1 标准曲线的变动对二嗪磷测定值不确定度的贡献

通常(拟合)标准曲线是通过系列浓度的标准溶液与对应的响应值按最小二程法的回归得到, 标准曲线用于预测被分析物量的前提条件是横坐标的量的不确定度远小于纵坐标的量的不确定度, 因此通常  $X_p$  的不确定度计算程序仅仅与相应值的不确定度

有关, 与标准溶液的不确定度无关, 也不与从同一溶液中逐次稀释产生必然的相关性<sup>[3]</sup>。这种来源的不确定度评估可通过校准数据获得, 见公式 1。

$$u(x_p) = \frac{s}{b} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x}_p - \bar{x})^2}{s_{xx}}} \quad \text{公式 1}$$

其中  $m$ :  $x_p$  的测试次数,  $m=5$ ;  $n$ : 标准溶液的测试次数,  $n=6$ ;  $b$ : 标准曲线的斜率,  $b=1.164$ ;  $\bar{x}$ : 不同标准溶液的平均值,  $\bar{x}=0.21 \mu\text{g/mL}$ ;  $\bar{x}_p$ : 经  $m$  次测试  $x_p$  的平均值,  $\bar{x}_p=0.043 \mu\text{g/mL}$ ;  $s_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = 0.243$ ;  $s$ :

$$\text{残差标准差, } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_f)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (bx_i + a)]^2}{n-2}} = 0.013。 \text{故, } u(x_p) = 0.008 \mu\text{g/mL}。$$

气相质谱响应的重复性, 通常使用 10 ng/mL 的六氯苯溶液, 多次进样, 提取特征离子的峰面积计算 RSD<sup>[4]</sup>, 本研究则用同一份供试液, 进样 5 次, 提取二嗪农分子离子峰( $m/z$  304)和内标物分子离子峰( $m/z$  194)的峰面积, 二者比值的 RSD 为 2.5%。则

$$u_{rel}(X_p) = \sqrt{\left(\frac{\text{RSD}}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_p)}{x_p}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{2.5\%}{\sqrt{5}}\right)^2 + \left(\frac{0.008}{0.0434}\right)^2} \approx \frac{0.008}{0.0434} = 0.18$$

3.3.2 称样量引入的不确定度

本次测量使用感量为 1 mg 的天平, 称量的法定

表 1 标准溶液各浓度与响应值的对应关系

Table 1 Relationship between concentration of the standard solution and response values

序号	1	2	3	4	5	6
二嗪磷浓度 $\mu\text{g/mL}$	0.02	0.04	0.08	0.16	0.4	0.56
二嗪磷峰面积	30721	61740	122494	255081	620482	978063
内标物峰面积	1698412	1765863	1624308	1660410	1413614	1512513
峰面积比	0.0181	0.0350	0.0754	0.1536	0.4389	0.6466

表 2 饮片中二嗪磷残留量的测定结果( $n=5$ )

Table 2 The results of residues of diazinon in this herbal medicine ( $n=5$ )

序号	1	2	3	4	5	平均值	RSD
样品称样量 g	5.515	5.345	5.277	5.067	5.234	5.288	
峰面积比	0.0349	0.0338	0.0348	0.0343	0.0323	0.0340	
二嗪磷浓度 $\mu\text{g/mL}$	0.0442	0.0432	0.0441	0.0436	0.0419	0.0434	
二嗪磷含量 $\text{mg/kg}$	0.080	0.081	0.084	0.086	0.080	0.082	2.9%

允差为 $\pm 2$  mg, 假设按均匀分布, 换算成标准不确定度为:  $2/\sqrt{3}$ ; 由于称量过程采用减重法, 上述分量被

引入 2 次, 则  $u(m_A) = \sqrt{2 \times (\frac{2}{\sqrt{3}})^2} = 1.6$  mg。

### 3.3.3 样品稀释定容引入的不确定度

A 级 10 mL 量瓶的容量允差为 $\pm 0.02$  mL, 假设按均匀分布, 则  $u(V_{\text{校准}}) = 0.02/\sqrt{3}$  mL; 假定实验室温度在 $\pm 2$  °C 间波动, 有机溶剂的体积膨胀系数为  $1 \times 10^{-3}$  °C<sup>-1</sup>, 则实验过程中体积随温度的变化值为  $\pm 2 \times 10 \times 1 \times 10^{-3} = \pm 0.02$  mL<sup>[3]</sup>, 假设按均匀分布,  $u(V_{\text{温度}}) = 0.02/\sqrt{3}$  mL,  $u(V) = \sqrt{2 \times (\frac{0.02}{\sqrt{3}})^2} = 0.016$  mL。

### 3.3.4 重复性引入的不确定度

重复性试验的 5 次测量值的相对平均偏差为 2.8%, 则  $u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}}) = \frac{\text{RSD}}{\sqrt{n}} = \frac{3.2\%}{\sqrt{5}} = 1.4\%$ 。

### 3.3.5 二嗪磷浸出率(二嗪磷加样回收率)引入的不确定度

由于样品中二嗪磷的浸出率无经验值和文献值参考, 故采用加样回收率的方法考察, 本方法二嗪磷的提取效率与二嗪磷的回收率显著相关。量取二嗪磷储备溶液 250  $\mu\text{L}$  及黄芪细粉约 5 g 置 250 mL 锥形瓶中, 照 2.5 方法试验, 结果 9 组试验数据的平均加样回收率为 92%, 相对标准偏差为 12%, 则  $u_{\text{rel}}(\text{Rec}) = \frac{\text{RSD}}{\sqrt{n}} = \frac{12\%}{\sqrt{9}} = 4\%$ 。

### 3.3.6 内标溶液取样量引入的不确定度

虽然内标物的浓度不参与计算过程, 但在标准溶液和样品溶液制备过程中, 均量取等体积的内标溶液, 依数学模型内标溶液取样量的不确定度被 2 次引入。

A 级 1 mL 移液管的容量允差为 $\pm 0.005$  mL, 假设按均匀分布, 则  $u(V_{\text{内标}}) = 0.005/\sqrt{3}$  mL。

## 3.4 合成标准不确定度

按模型 2 所列各分量合成二嗪磷测定值的标准不确定度, 见公式 2:

$$\frac{u(c_p)}{c_p} = \sqrt{\frac{u(X_p)^2}{X_p^2} + \frac{u(V)^2}{V^2} + \frac{u(m_A)^2}{m_A^2} + u_{\text{rel}}(\text{Rec})^2 + u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}})^2 + 2 \times u_{\text{rel}}(V_{\text{内标}})^2}$$

公式 2

$$u(c_p) = 0.082 \times \sqrt{\frac{0.008^2}{0.0434^2} + \frac{0.016^2}{10^2} + \frac{1.6^2}{5288^2} + 1.4\%^2 + 4\%^2 + 2 \times 0.3\%^2} = 0.016 \text{ mg/kg}$$

## 3.5 扩展不确定度

通常情况下包含因子  $k \approx 2$  (置信水平约为 95%)<sup>[5]</sup>,  $U = 2 \times u(c_p) = 0.032$  mg/kg。本次黄芪中二嗪磷残留量的测定结果表示为  $(0.091 \pm 0.032)$  mg/kg<sup>[6]</sup>。

## 4 讨论

粮食、蔬菜以及中草药上的残留农药虽不能短时间内引起人体明显中毒症状, 但农残可经过食物链富集, 并被人类所摄入, 对神经系统、生殖系统、肝肾等器官造成慢性损害, 甚至致癌<sup>[7,8]</sup>。因此对食物及食物链各环节的农残检测和评估十分必要。

气相色谱-质谱联用可同时检测多种农药残留, 同步完成对痕量成分的定性定量<sup>[9,10]</sup>, 但与一些传统检测器相比, 在定量准确性上仍存在差距。由本次评定可以看出, 二嗪磷标准曲线的变动性是影响测量不确定度的主要因素, 其主要原因在于被分析物的响应值呈显著的随机变化, 导致依最小二乘法计算的标准曲线的变动。减少此类不确定度的方法有两种: (1) 通过改变检测方式改善待测物的响应灵敏度和重复性, 如火焰光度检测器(FPD)<sup>[11,12]</sup>, (2) 更换更适合的内标物, 使待测物和内标物的响应因子更趋接近, 提高标准曲线的线性。

国际食品法典委员会(CAC)颁布的指南文件给出了农残检测不确定度的经验计算公式<sup>[13]</sup>, 在一定程度上简化了分析实验室的质量保证工作, 但不确定度评估的实践活动还是应该密切注意所有产生不确定度的可能来源, 并努力找到引起不确定度的主要来源<sup>[14,15]</sup>。对不确定度来源的分析有助于提升测量过程的认知度, 有助于测量方法的确认和改进。

## 参考文献

- [1] 袁秋文. 二嗪农[J]. 新农业, 1984, 12: 22.  
Yuan QW. Diazinon [J]. New Agric, 1984, 12: 22.
- [2] GB 2763-2014. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].  
GB 2763-2014. National food safety standard maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [3] 魏昊, 乔东. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2002.  
Wei H, Qiao D. Guidelines to evaluation of uncertainty in chemical analysis [M]. Beijing: China Metrology Press, 2002.
- [4] JJF 1164-2006. 台式气相色谱-质谱联用仪校准规范[S].

- JJF 1164-2006. Calibration specification for bench top gas chromatography – mass spectrometers [S].
- [5] 钱绍圣. 不确定度实验数据的处理与表示[M].北京: 清华大学出版社, 2002.
- Qian SS. Process and express of uncertainty for experimental data[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2002.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. 测量不确定度评估和报告通用要求[M]. 北京:中国计量出版社, 2006.
- CNAS. General requirements for evaluating and reporting measurement uncertainty [M]. Beijing: China Metrology Press, 2006.
- [7] 王赛妮, 李蕴成. 我国农药使用现状、影响及对策[J]. 现代预防医学, 2007, 20: 3853–3855 .
- Wang SN, Li YC. Current situation, influence and policy of agricultural chemical in China [J]. Mod Prev Med, 2007, 20: 3853–3855 .
- [8] 伍一军. 有机磷农药对人类健康的危害[C]. 农业与环境安全国际学术研讨会, 2003: 79–82.
- Wu YJ. Organophosphorus pesticides endanger the health of mankind [C]. International Symposium on Agricultural and Environmental Safety, 2003: 79–82.
- [9] 潘兴富, 杜会芳, 闫慧芳. 气相色谱-质谱法检测血液中 15 种农药残留[J]. 卫生研究, 2013, 3 (42): 514–519.
- Pan XF, Du HF, Yan HF. Determination of 15 kinds of pesticides in blood by GC-MS [J]. J Hyg Res, 2013, 3(42): 514–519.
- [10] 万益群, 李申杰, 付贵琴. 中草药中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留量的 GC-MS 测定[J]. 分析实验室, 2007, 6(26): 81–84.
- Wan YQ, Li SJ, Fu GQ. Determination of organophosphorous and carbamates pesticide residues in Chinese herbal medicine [J]. Chin J Anal Lab, 2007, 6(26): 81–84.
- [11] GB/T 5009.107-2003. 植物性食品中二嗪磷残留量的测定[S].
- GB/T 5009.107-2003. Determination of diazinon residues in vegetable foods [S].
- [12] NY/T 761-2008 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[S].
- NY/T 761-2008 Pesticide multiresidue screen methods for determination of organophosphorus pesticides, organochlorine pesticides, pyrethroid pesticides and carbamate pesticides in vegetable and fruits [S].
- [13] CAC/GL 59-2006 Guidelines on estimation of uncertainty of results [S].
- [14] 易大为, 高敬红, 邹宇. 加权平均法表述菌落总数测定的数学模型与测量不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(9): 2888–2892.
- Yi DW, Gao JH, Zou Yu. Establishment of mathematical model and evaluation of measurement uncertainty for Aerobic Plate Count by weighted average [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(9): 2888–2892.
- [15] 易大为, 刘漫江, 潘强. 旋光度法测定葡萄糖注射液含量测量不确定度的评定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 157–159.
- Yi DW, Liu MJ, Pan Q. Evaluation of measurement uncertainty for determination of dextrose injection by optical rotation [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(1): 157–159.

(责任编辑: 李振飞)

## 作者简介



易大为, 副主任药师, 主要研究方向为检验与标准研究。  
E-mail: detin@163.com