

QuEchERS-超高效合相色谱测定土壤中啉虫脒的含量及不确定度分析

孟冰冰, 于洪春*

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 采用超高效合相色谱(UPC²)-二极管阵列检测器(PDA)法快速分析土壤中啉虫脒的含量。**方法** 在检测波长为 254 nm 条件下, 通过对色谱柱, 流动相, 柱温以及 QuEchERS 前处理方式各个参数优化, 最终确定色谱柱选择 ACQUITY UPC² 2-EP 柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温为 70 °C, 背压为 1600 psi, 流动相为甲醇和超临界 CO₂。同时分析实验过程中对样品含量测定的影响, 分析该方法测定中的不确定度因素。**结果** 经过分析, 可以得出在 0.002~2.0 μg/mL 线性范围内回收率良好, 且最小检出限为 0.002 μg/kg, 定量限为 0.006 μg/kg, 线性方程为 $Y=37.5X-16.4$, 相关系数为 0.9999, 回收率在 75%~105% 之间, 相对标准偏差低于 10%。土壤中啉虫脒的实际测定不确定度为 0.00030 mg/kg, $k=2$ 。**结论** 使用超高效合相色谱能够准确、迅速地测定土壤中啉虫脒的含量。当土壤中啉虫脒的含量接近测定方法的最低限量时, 需要参考检测方法的不确定度, 并将其应用到最终结果的确定中, 提高数据的准确性。

关键词: 超高效合相色谱; 啉虫脒; 不确定度评价

Determination of acetamiprid content and analysis of uncertainty in the soil by QuEchERS-ultra performance convergence chromatography

MENG Bing-Bing, YU Hong-Chun*

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid determination of acetamiprid in the soil by ultra performance convergence chromatography- photo-diode array (UPC²-PDA). **Methods** At the wavelength of 254 nm, single factor experiments were carried out to optimize the parameters, including chromatographic column, mobile phase, column temperature, pressure and QuEchERS. Finally, the chromatographic column was ACQUITY UPC² 2-EP (3.0 mm×100 mm, 1.7 μm), the column temperature was 70 °C, the backpressure was 1600 psi, and the mobile phase was identified methanol and supercritical CO₂. At the same time, the influence of the sample content was analyzed, and the uncertainty factors in the determination were analyzed. **Results** Under the optimum conditions, the calibration curve had a linearity in the range of 0.002~2.0 μg/mL with a correlation coefficient of 0.9999, the linear equation was $Y=37.5X-16.4$, the recoveries were in the range of 75%~105%, and the relative standard deviation were less than 10%. The limit of detection and limit of quantification were 0.002 μg/kg and 0.006 μg/kg, respectively. The actual measurement uncertainty of acetamiprid in the soil was 0.00030 mg/kg, $k=2$. **Conclusion**

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201003025)、现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-04)

Fund: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201003025) and Special Funds for the Construction of Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-04)

*通讯作者: 于洪春, 副教授, 主要研究方向为害虫综合治理和害虫生物防治。E-mail: hongcyu@126.com

*Corresponding author: YU Hong-Chun, Associate Professor, College of Agriculture, Northeast Agricultural University, No. 59 Wood Street, Xiangfang District, Harbin 150030, China. E-mail: hongcyu@126.com

The use of UPC² can accurately and rapidly determination of acetamiprid in the soil. It needs to reference the uncertainty of the detection method, and apply it to the final result determination for improving the accuracy of the data, when the content of acetamiprid in the soil was close to the lower limit of the detection method.

KEY WORDS: ultra performance convergence chromatography; acetamiprid; uncertainty evaluation

1 引言

啶虫脒又名金世纪, 吡虫清, 是日本曹达公司开发的高效的杀虫剂, 是在吡虫啉的基础上合成的第三个烟酰亚胺类杀虫剂, 按照我国农药毒性分级标准属于中等毒性, 是新一代的超高活性的杀虫剂, 比吡虫啉杀虫范围更广, 对害虫具有触杀和胃毒的作用, 具有很好的内吸活性。其作用机制是干扰昆虫的内神经的传导机制作用, 通过与突触后膜上的乙酰胆碱受体结合, 抑制乙酰胆碱受体的活性, 使害虫麻痹, 又能干扰害虫使其不能蜕皮而死亡, 对皮肤和眼睛无刺激性, 由于其杀虫广泛, 药效持续时间长, 对环境友好等特点而被广泛使用, 其作用机制与其他的常规杀虫剂不同, 对于有机磷类、菊酯类、氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗药性的害虫有特别的效果, 并且不会和上述农药产生交叉抗药性, 目前啶虫脒的使用量已经达到市场的 30% 左右^[1-5]。

啶虫脒的化学名称为 N-(N-氟基-乙亚胺基)-N-甲基-2-氯吡啶-5-甲胺, 其外观为白色结晶粉末, 熔点在 101 °C 左右, 蒸汽压 $>1.33 \times 10^{-6}$ Pa (25 °C), 微溶于水, 在水中的溶解度为 4.2 g/L, 能溶于乙腈, 甲醇, 四氢呋喃等有机试剂, 在日光下稳定, 其有效的吸收光波长为 254 nm。当 pH 为 9 时, 于水中逐渐水解。

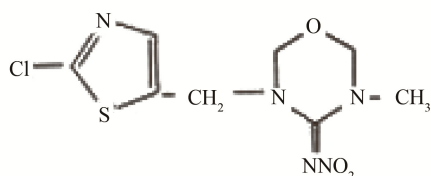


图 1 啶虫脒的结构式

Fig. 1 The structure of acetamiprid

由于啶虫脒含有一个氯原子、易气化, 使用气相色谱仪(含有 ECD 检测器)和气质联用仪可以对其进行测定, 啶虫脒分子结构中的共轭芳环结构使其具有紫外吸收效应, 可以使用液相色谱仪(含有紫外检测器)或者使用液相色谱串联质谱仪对其进行测定, 都能取得较好的测定效果, 也是实验室常用的检测手段。使用气相色谱仪只能进行定量, 不能进行定性分析, 所以不考虑使用气相色谱仪; 液相色谱仪和气质联用仪的检出限较高, 液质联用仪(LC-MS/MS)和超高效合相色谱(UPC²)的采集时间较短、检出限较低、能够满足定性和定量的需求, 但是液质联用仪设备较昂贵,

选用超临界色谱仪能够节省时间成本和金钱成本, 由于使用试剂为二氧化碳和乙腈, 有机试剂用量小, 降低了有机试剂对检测人员的身体危害, 更加环保^[6-11]。

测量不确定度是土壤中啶虫脒含量的定量表征, 是与测量结果密切相关的定量参数。由于具有广泛的应用性, 对于测量结果的不确定度评价变的尤为重要。使用超临界色谱仪测定土壤中的啶虫脒, 并对测定结果进行系统的分析, 通过对不确定度的各个来源的具体分析, 建立数学模型, 计算在实验过程中的各个实验步骤的不确定度, 最终合并得出扩展不确定度。当检测结果接近于检出限时, 需要对测得结果进行不确定度的测量和评定, 为最终的测定结果提供科学的评定依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 仪器与试剂

Waters Acquity UPC², 超高效合相色谱(美国 Waters 公司), 同时配有 PDA 检测器; Empower 3 色谱工作站; KQ-300GVDV 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 漩涡混匀仪(MS3, IKA 公司); 乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 甲醇(色谱纯, 德国默克公司); 超纯水(屈臣氏品牌); 二氧化碳(纯度 $>99.999\%$); PSA、MgSO₄、C₁₈EC 以及陶制子均子均为美国安捷伦公司; 针式滤器(0.22 μm × 25 mm PTFE)为上海安谱; 啶虫脒标准品(德国 Dr., 纯度 98 ± 0.5%)。

2.1.2 实验样品

本实验土壤样品采用哈尔滨郊区农田表层土壤, 取土壤样品约 5000 g, 使用马弗炉连续高温烘烤 12 h, 烘烤温度设为 180 °C。将烘烤后的土壤样品使用高速粉碎机进行粉碎, 并且过 40 孔/英寸筛子将部份颗粒较大的土壤中的杂质及颗粒等物筛去, 将过筛后的样品存放在干燥器中保存及使用。

2.2 色谱条件

色谱柱为: ACQUITY UPC² 2-EP 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); 柱温为 70 °C; 进样体积为 5.0 μL; 检测波长为 254 nm; 背压为 1600 psi; 流动相为乙腈和超临界 CO₂; 流速为 1.5 mL/min; 流动相梯度洗脱程序: 0~0.5 min 为 5% 的乙腈, 95% 超临界 CO₂; 0.5~1.0 min 为 30% 的乙腈, 70% 超临界 CO₂; 1~2.2 min 为 65% 的乙腈, 35% 超临界 CO₂; 2.3~3 min 为 5% 的乙腈, 95% 超临界 CO₂。

2.3 样品前处理

准确称取 5 g 土壤样品, 使用 10 mL 的 1% 乙酸乙腈超声提取 30 min, 3500 r/min 离心 5 min, 将上清液转移到提前装有 50 mg PSA、50 mg C₁₈ EC 以及 150 mg 硫酸镁的离心管中, 同时加入陶制子均子, 漩涡萃取混匀 30 s, 15000 r/min 离心 10 min, 取上清液氮气吹干, 定容 1 mL 上机测定。

3 结果与讨论

3.1 实验结果讨论

3.1.1 超高效合相色谱的选择

由于啶虫脒的广泛使用, 啶虫脒的检测技术已非常完善, 啶虫脒的常用检测手段主要有气相色谱仪、液相色谱仪、气质联用仪以及液相色谱串联质谱仪等, 均能取得非常好的检测结果。使用 Waters Acquity UPC² 配备 PDA 检测器可以达到我们对样品采集的需求, 能够在较短的时间内对土壤中的啶虫脒进行分离及采集, 使用的流动相为压缩二氧化碳(CO₂), 是 UPC₂ 的主流动相, 它比液相色谱仪使用的液体流动相和气相色谱仪使用的载气更具有突出的分离特点, 二氧化碳(CO₂)加入少量的乙腈作为流动相, 具有粘度小、扩散率更高、便于流动相的传质和分离等优点, 并且通过流动相、柱温、背压的调节, 可以对啶虫脒的保留时间进行有效调控。使用二氧化碳(CO₂)为主流动相, 可以将挥发性有机试剂乙腈的使用量降到最低, 极大降低了有机试剂对环境的污染和实验人员的健康损坏, 废液处理成本也降低到最低水平, 在有机试剂的使用上极大地节省了实验成本。

3.1.2 色谱柱、流动相、柱温和背压的选择

根据啶虫脒的物理化学性质易溶于乙腈中, 使用乙腈做为流动相可以使用 UPC² 进行分离及分析, 由于 Waters Acquity UPC² 在分离机制上更倾向于正相色谱, 在色谱柱的选择上最终要求是获得最佳峰型、峰型对称且尖且窄, 这样才能提高样品的信噪比和具有较好的分离效果。在色谱柱的选择上, 选择了 Waters Acquity UPC² BEH, BEH 2-EP, HSS C₁₈ SB 3 种色谱柱, 所有的色谱柱的规格均为 3.0 mm×50 mm, 1.7 μm, 流动相均为乙腈和水, Acquity UPC² BEH 色谱柱是仅含有极性表面集团(硅醇)极性固定相的色谱柱, 而 HSS C₁₈ SB 色谱柱则是含有非极性功能团化 C₁₈ 配体和硅醇混合极性固定相的色谱柱, BEH 2-EP 是(2-乙基吡啶)基为固定相, 硅胶表面键合了 2-乙基吡啶, 可以将具有极性功能团的化合物进行较好的分离。在筛选的过程中, Acquity UPC² BEH 和 HSS C₁₈ SB 得到的色谱峰明显更宽一些, 这将影响低浓度水平样品的检测并降低信噪比。色谱峰的展宽的原因是目标化合物与固定相之间进行梯度洗脱时的相互作用产生的, 选择 BEH 2-EP 色谱柱是进行低浓度水平定量分析的最佳选择。

和 UPLC 相比, UPC² 分析啶虫脒主要使用的流动相为

压缩二氧化碳(CO₂)和乙腈, 二氧化碳(CO₂)被认为是非极性溶剂, 因此对于极性化合物的亲和性比较弱, 为了提高对极性化合物的分析, 需要在二氧化碳(CO₂)中加入一定量的有机试剂提高在色谱柱内对极性化合物的吸附和洗脱, 改善分离效果, 最终选用乙腈为流动相分析啶虫脒, 并且进样体积可以灵活改变, 0.5~10 μL 可以灵活改变, 最大程度地减少样品的损耗。

和常规色谱上柱温对色谱峰的保留时间的影响不同, 在 UPC² 上, 柱温越低, 对于超临界 CO₂ 的密度越低, 黏度也降低, 啶虫脒的洗脱效果减弱, 保留时间推后; 柱温越高越有利于流动相中乙腈在色谱柱固定相中的吸附和解脱, 超临界 CO₂ 的密度越大, 黏度也升高, 啶虫脒的洗脱效果显著, 色谱峰的保留时间提前, 因此柱温设为 70 °C 时的保留时间为最佳出峰时间。

背压对于 UPC² 流动相中的超临界 CO₂ 的黏度和密度也有一定的影响, 背压越大, 超临界 CO₂ 的黏度和密度越大, 溶剂化效应则增强, 导致化合物的保留时间提前; 背压越小, 则反之。但是当压力低于一定值时, CO₂ 会由于黏度减小而转变为气态的状态, 并影响其分析物的分离效果, 因此在超临界色谱仪中背压的最佳值为 1600 psi。

流动相的选择、温度和压力这 3 个可以调节的重要参数对于啶虫脒在色谱柱内的吸附和洗脱起到了关键作用, 加大极性有机溶剂的比例、提高压力、降低温度将加快啶虫脒的吸附洗脱效率, 使保留时间提前; 相反, 减小有机溶剂的比例, 降低压力和提高温度则增强化合物的保留, 使保留时间延后。标准品的色谱图见图 2。

3.1.3 QuEchERS 提取方式的选择

采用 QuEchERS 净化方式能够在较短的时间内完成对样品的净化, 净化效果良好、回收率高、能够准确地测定高浓度的样品含量, 所使用的有机溶剂用量少。整个样品前处理过程具有快速、简便、高效以及安全的特点。在吸附剂的选择上, PSA 主要用于吸附基质中的脂肪酸、有机酸、脂类和少量的色素; C₁₈ EC 则是去除脂肪和脂类等的非极性杂质; MgSO₄ 则是吸附杂质中的水分; 石墨化碳黑是除去样品中的色素, 因此在分析土壤中啶虫脒的前处理净化过程中, 使用 PSA、MgSO₄ 和 C₁₈ EC 三种吸附剂。

3.1.4 检出限、定量限、标准曲线、线性范围以及加标回收量

将啶虫脒标准溶液分别稀释为 0.002、0.02、0.05、0.2、2.0 μg/mL 5 点浓度, 试验中设定了将此 5 点 5 个浓度的水平添加回收试验, 将此 5 个浓度的啶虫脒标准溶液添加进空白土壤(见图 3, 4)中, 每个水平做 6 个平行, 计算平均值。使用外标法进行定量, 可以得出在 0.002~2.0 μg/mL 线性范围内回收率良好, 且最小检出限为 0.002 μg/kg, 定量限为 0.006 μg/kg, 线性方程为 $Y=37.5X-16.4$, 相关系数为 0.9999。回收率在 75%~105% 之间, 相对标准偏差低于 10% (表 1), 能够满足实验分析需求。

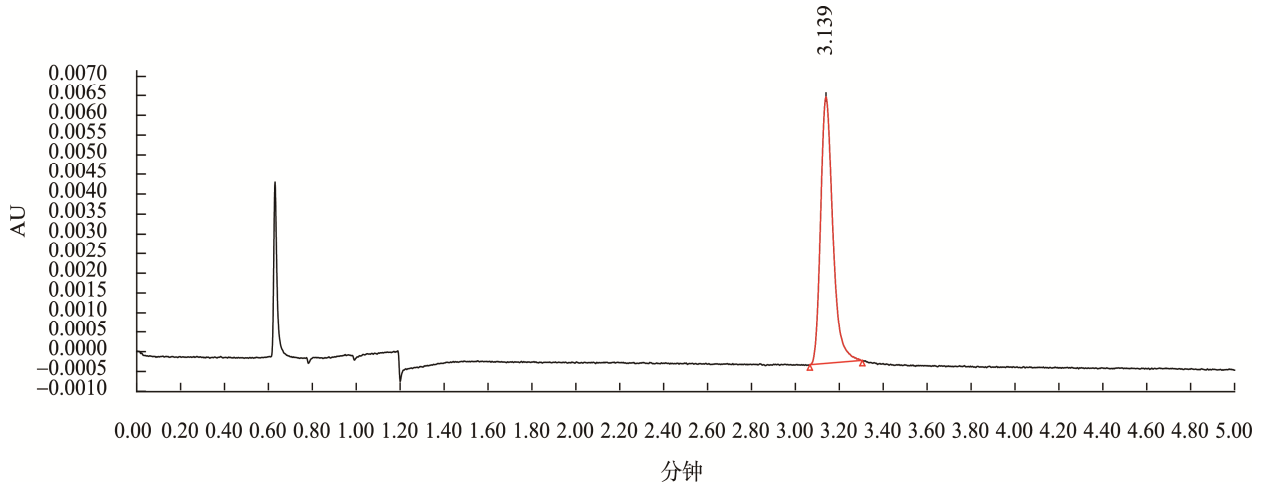


图 2 啉虫脒标准品的色谱图(浓度为 0.05 µg/mL)
Fig. 2 Chromatogram of acetamiprid standard (0.05 µg/mL)

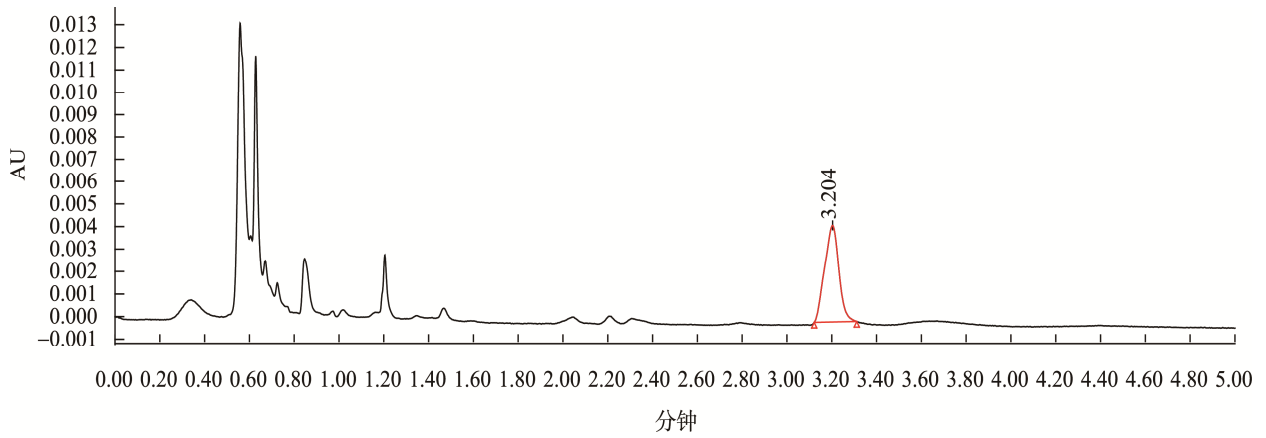


图 3 土壤中添加啉虫脒的色谱图(添加啉虫脒含量为 0.05 mg/kg)
Fig. 3 Chromatogram of acetamiprid standard in the soil(0.05 mg/kg)

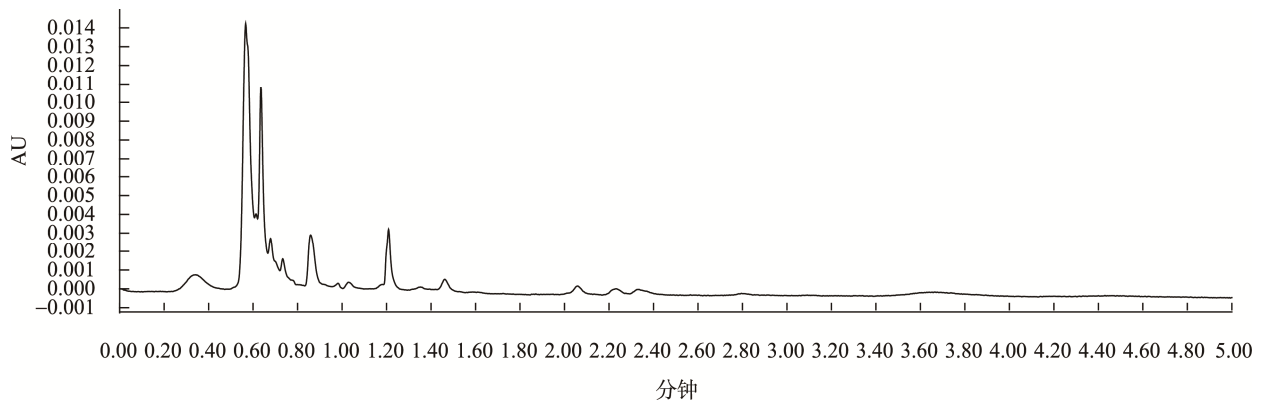


图 4 空白土壤的色谱图
Fig. 4 Chromatogram of blank soil

表 1 啶虫脒的回收率及 RSD ($n=6$)
Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of acetamiprid ($n=6$)

添加量(mg/kg)	实际检测量(mg/kg)	回收率%	平均偏差%	RSD%
0.002	0.0015	75%	6.25	3.1
0.02	0.018	90%	5.5	4.4
0.05	0.049	98%	4.0	4.7
0.20	0.204	102%	5.8	3.3
2.00	2.100	105%	2.6	4.9

3.1.5 土壤样品中啶虫脒的测定

使用超高效合相色谱对土壤中的啶虫脒含量进行测定, 结果为未检出。

3.2 土壤中啶虫脒不确定度计算

测量不确定度是和最终的测量结果相关联的一个参数, 用来表达被测量值的合理性的离散性, 通常用不确定度的方式表达, 也可以用标准偏差 RSD% 等表达^[12,13]。在试验中, 应考虑到各种综合因素对于测量的影响所做出的修正, 尤其是同一样品被多次测量, 测得结果不是同一值, 而是分布在一定区域内的多个值, 计算测量不确定度就是说明被测量值分散下那个的参数, 来证明测得结果是否接近真值。所以一个实验通常同时包含被测得的值和该测得的值的测量不确定度, 才是完整的并且具有意义的。

在试验中, 采用最低点加标回收土壤样品作为合成不确定度的对象。将不确定度分为 A 类和 B 类, A 类不确定度通常为用对观测列进行统计分析的方法来评定不确定度, 其计算方式为通过观测列数据求得标准偏差, 然后算出不确定度, B 类不确定度通常是先估计被评定的量的变化范围, 再按照变量可能分布范围计算出不确定度^[14,15]。根据 JJG 196-2006《常用玻璃量器鉴定规程》规定, 100 mL 和 50 mL 容量瓶及 1 mL 刻度吸管的允差分别为 ± 0.1 mL、 ± 0.1 mL 和 ± 0.007 mL。因此, 在计算测量不确定度过程中, 只需计算 A 类不确定度, 并最终拟合计算出来的不确定度即为最终的测量不确定度。

根据计算公式: $x = \frac{c \times v}{m}$, 其中, c 为啶虫脒的浓度 ($\mu\text{g/mL}$); v 为定容体积(mL); m 为样品的称量质量(g); 在对试样中啶虫脒的不确定度进行分析的时候, 从以下几个方面考虑: (1)标准品的配置引入的不确定度; (2)样品定容引入的不确定度; (3)样品前处理过程中称量引起的不确定度。其中, 标准品的配置引入的不确定度为标准品的纯度、容量瓶定容体积、刻度吸管移取的标准品的体积以及室温的变化最后是标准曲线拟合引起的不确定度。

3.2.1 标准品纯度引起的不确定度

使用的是德国 Dr. 的啶虫脒标准品, 其纯度为 (98 \pm 0.5)%, 为平均分布, $k=3$, 按照 B 类不确定度来进行评定, 所以相对应的不确定度为: $u_1 = \frac{0.005}{0.986 \times \sqrt{3}} = 0.0029$ 。

3.2.2 标准品称量引起的不确定度

标准品的称量质量为 10 mg, 使用电子天平进行称量, 天平的不确定度根据给出的检定证书的称量值得到扩展不确定度为 $U=0.3$ mg; $k=2$, 按照 A 类不确定度来进行评定, 为平均分布, 所以标准品称量引起的不确定度为:

$$u_2 = \frac{0.3}{10 \times 2} = 0.015。$$

3.2.3 标准品定容体积引起的不确定度

100 mL 容量瓶的不确定度来源于容量瓶的校准、重复性、温度的变化、及实验人员操作时的读数。而容量瓶的校准引入的不确定度应当按照 B 类不确定度来进行评定, 引入 JJG 196-2006《常用玻璃量器鉴定规程》, 在 20 ± 5 °C、100 mL 容量瓶的允差为 ± 0.1 mL, 定容为 100 mL 时的不确定度为: $u_{v100} = \frac{0.1}{100 \times \sqrt{3}} = 0.0006$ 。

由于室温温度会产生一定的变化, 根据室温监测结果, 其变化区间在 ± 5 °C 之间变动, 因此温度引起的不确定度应当按照 B 类不确定度来进行评定, 定溶溶剂为甲醇, 在室温 20 ± 5 °C 时, 甲醇的膨胀体积系数为 14.3×10^{-4} °C, 因此, 温度引起的不确定度为: $u_{temp} = \frac{14.3 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.004128$ 。

所以, 标准品定容引起的不确定度应当包括 100 mL 容量瓶引入的不确定度以及在室温 20 ± 5 °C 时, 使用甲醇溶剂定容所产生的不确定度为: $u_3 = \sqrt{u_{v100}^2 + u_{temp}^2} = 0.00085$ 。

3.2.4 标准溶液稀释带来的不确定度

在标准品稀释过程中, 分别使用了 100 mL 和 50 mL 容量瓶及 1 mL 刻度吸管, 根据 JJG 196-2006《常用玻璃量为: ± 0.1 mL, ± 0.1 mL 和 ± 0.007 mL, 所以 100 mL 和 50 mL 容量瓶以及 1 mL 刻度吸管引起的不确定度应当按照 B 类不确定度来进行评定, 所以 100 mL 和 50 mL 容量瓶及 1 mL 刻度吸管的允差分别为: $u_{v100} = \frac{0.1}{100 \times \sqrt{3}} = 0.0006$ 、 $u_{v50} = \frac{0.1}{50 \times \sqrt{3}} = 0.0012$ 和 $u_{移1mL} = \frac{0.007}{1 \times \sqrt{3}} = 0.004$; 同 3.2.3 需要考虑容量瓶的允差和温度引起的体积变化, 以及刻度吸

管的示值允差和温度引起的体积变化。

由于定溶溶剂都是甲醇，甲醇的膨胀体积系数为 $14.3 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$ ，在室温为 $20 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时，由温度引起的不确定度为：
$$u_{temp} = \frac{14.3 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.004128。$$

3.2.4.1 100 mL 容量瓶的不确定度

在室温为 $20 \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时，使用甲醇做为定容溶剂时，100 mL 容量瓶引起的不确定度同前 3.2.3 为 B 类不确定度：

$$u_{容100} = \sqrt{u_{v100}^2 + u_{temp}^2} = 0.00085。$$

3.2.4.2 100 mL 容量瓶的不确定度

在室温为 $20 \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时，使用甲醇做为定容溶剂时，50 mL 容量瓶引起的不确定度为：
$$u_{容50} = \sqrt{u_{v50}^2 + u_{temp}^2} = 0.0043。$$

3.2.4.3 1 mL 刻度吸管的不确定度

在室温为 $20 \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时，使用甲醇做为定容溶剂时，1 mL 刻度吸管引起的不确定度为：
$$u_{移1mL} = \sqrt{u_{移1mL}^2 + u_{temp}^2} = 0.0057。$$

所以，使用 100 mL 和 50 mL 容量瓶以及 1 mL 刻度吸管稀释标准溶液所引起的不确定度为：

$$u_4 = \sqrt{u_{容100}^2 + u_{容50}^2 + u_{移1mL}^2} = 0.0011。$$

3.2.5 标准曲线拟合引起的不确定度

使用 Waters Acquity UPC²，采用 5 点水平浓度的啶虫脒的标准溶液，每一点浓度分别采集 6 次，使用 Empower 3 色谱工作站软件得出每次采集的峰面积，算出每点浓度的峰面积的平均值，用最小二乘法拟合出直线方程为 $Y=16864X+6.2452$ ，相关系数为 1.000，因此标准曲线拟合引起的不确定度同样的应该属于 A 类不确定度的评定，其不确定度计算过程为：

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A - (a + bc_i)]^2}{n-2}} = 0.61$$

$$u_c = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{c} - c_i)^2}{\sum_{i=1}^n (\bar{c}_i - \bar{c}_0)^2}} = 0.058$$

$$U_{rel} = \frac{u_c}{c_0} = \frac{0.058}{4.28} = 0.014$$

其中：S-标准曲线的标准差；A-为各个标准浓度的峰的相应值； $a+bc_i$ -根据标准曲线计算出来的理论值；n-点数；P-样品重复测定次数， $P=6$ ； \bar{c} -待测样品质量浓度的平均值； C_i -标液质量浓度； C_0 -根据标准曲线计算出来的 5 点质量浓度的平均值。

3.2.6 样品前处理带来的不确定度

在前处理过程中，相对会带来扩展不确定度的主要包含样品称量、样品定容以及样品重复性测试引起的的不确

定度。

3.2.6.1 样品称量带来的不确定度

其中样品称量引起的不确定度同 3.2.2，属于 A 类不确定度评定，在称量 5 g 样品时的不确定度为：

$$u_{5gsample} = \frac{0.3}{5 \times 2} = 0.03。$$

3.2.6.2 样品定容带来的不确定度

最后使用 1 mL 刻度吸管定容 1 mL，样品定容带来的不确定度同前 3.2.3，分别由 1 mL 刻度吸管定容时产生的

不确定度为：
$$u_{移1mL} = \frac{0.007}{1 \times \sqrt{3}} = 0.004$$
；由于定溶溶剂都是甲

醇，甲醇的膨胀体积系数为 $14.3 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$ ，在室温为 $20 \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时，由温度引起的不确定度为：
$$u_{temp} = \frac{14.3 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}}$$

$= 0.004128$ ；所以使用 1 mL 刻度吸管定容 1 mL 最终产生的不确定度为：
$$u_{移1mL} = \sqrt{u_{移1mL}^2 + u_{temp}^2} = 0.0057。$$

最终，样品在称量和定容过程中产生的不确定度为

$$u_6 = \sqrt{u_{5gsample}^2 + u_{移1mL}^2} = 0.03。$$

3.2.7 样品处理过程中带来的不确定度

由于前处理过程中涉及到样品的均匀性，实验人员的操作熟练性以及回收率等多种因素，因此采用 A 类不确定度来进行评定，按照 2.3 进行了加标回收试验，对空白土壤样品进行加入啶虫脒标准溶液，同 3.1.4，重复进行 6 次实验并测得值，根据表 2，计算样品处理过程中带来的标准不确定度。

$$u_7 = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [hi - h]^2}{n-1}}}{\sqrt{n}} = 0.199$$

3.2.8 样品重复测定引起的不确定度

在重复性试验中，对样品进行 6 次的独立的测试，测得的土壤中的啶虫脒的含量应当按照 A 类不确定度来进行评定，以添加量为 0.002 mg/kg 为例，根据表二给出的平均

值为 0.0015 mg/kg，则
$$U_8 = \frac{s}{\sqrt{n}} \times \frac{s}{\sqrt{n} \times 0.0015} = 0.0011。$$

3.2.9 不确定度的合成

在本研究中，会产生不确定度的因素包含 U_1 为标准品纯度引起的不确定度； U_2 为样品称量引起的不确定度； U_3 为标准品定容引起的不确定度； U_4 为标准品稀释引起的不确定度； U_5 为标准品拟合引起的不确定度； U_6 为样品前处理引起的不确定度； U_7 为样品处理过程中引起的不确定度； U_8 为样品重复测定引起的不确定度，将以上不确定度进行合成，可以得到样品中不确定度为：

$$U = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2 + u_5^2 + u_6^2 + u_7^2 + u_8^2} = 0.202$$

表 2 0.002~2 $\mu\text{g/L}$ 啶虫脒质量浓度的峰面积
Fig. 2 The peak area of the acetamiprid's mass concentration (0.002~2 $\mu\text{g/L}$)

啶虫脒质量浓度($\mu\text{g/L}$)	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	平均值
2	31309	35446	32518	34416	32831	34811	33555.17
0.2	3284	3396	3393	3201	3464	3375	3352.17
啶虫脒	0.05	884	863	852	810	866	857.00
	0.02	340	361	323	305	317	338.00
	0.002	32	35	33	39	37	36.00

土壤中啶虫脒的实际测定不确定度为 $0.0015 \times 0.202 = 0.00030 \text{ mg/kg}$, $k=2$ 。而土壤中啶虫脒的残留量则应为 $(0.0015 \pm 0.00030) \text{ mg/kg}$ 。

4 结 论

采用超高效合相色谱对土壤中的啶虫脒进行了分析和检测, 同时使用 QuEChERS 法对土壤样品进行前处理净化, 通过对色谱柱、流动相、柱温、背压等因素的优化选择, 使啶虫脒在超高效合相色谱上达到最佳的分离条件, 能够使啶虫脒目标峰与杂质峰较好地分离, 方法简便快速、分离效率高、准确度和灵敏度都能满足本实验的需求, 并且实验成本低、使用试剂量小、对环境和实验人员友好, 适用于实验室中啶虫脒的残留量的分析。

计算不确定度的最终目的则是在于对于测量结果的定量的准确性的表达, 测量结果的正确性以及可用性很大程度上取决于其测量不确定度的大小。尤其当测量值介于临界点时, 测量不确定度值能够更好地帮助我们对于测量数据的分析和判断, 减少由于实验误差产生的数据偏离, 提高实验数值真实性。而在本实验中, 由于前处理试验中会带来不确定度的来源很多, 带来很多不确定性, 对最终的测量结果产生很大的影响, 所以每一步实验会产生的不确定性因素都要计算不确定度, 因此, 一个数据的完整性必须包含这个数据的测量值及相关的确定度才能保证了数据的准确度及可靠性。

参考文献

- [1] 侯如燕, 卞红正, 赵秀霞, 等. 固相萃取-液相色谱测定复杂基质蔬菜中 9 种烟碱类残留[J]. 分析测试学报, 2011, (01): 64-69.
Hou RY, Bian HZ, Zhao XX, *et al.* Determination of 9 kinds of residues in complex matrix vegetables by solid phase extraction and liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2011, (01): 64-69.
- [2] 侯如燕, 蔡荟梅, 张正竹, 等. 水果蔬菜中吡虫啉农药残留的液相色谱检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2009, (10): 133-136.

- Hou RY, Cai HM, Zhang ZZ, *et al.* Imidacloprid pesticide residues in vegetables and fruits by liquid phase chromatographic detection method [J]. Food Ferment Ind, 2009, (10): 133-136.
- [3] 刘文杰, 万英, 庞新安, 等. 高效液相色谱法测定水果和蔬菜中残留的多菌灵、吡虫啉和甲基托布津[J]. 理化检验(化学分册), 2008, (7): 115-116.
Liu WJ, Wan Y, Pang XA, *et al.* effect and so on. The residue determination of fungus spirit, imidacloprid and thiophanate methyl in fruits and vegetables by High performance liquid chromatography [J]. Phy Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2008, (7): 115-116.
- [4] 帕尔哈提. 气相色谱法测定蔬菜中 9 种农药残留[J]. 新疆化工, 2005, (03): 99-103.
Parr Hart. Determination of 9 pesticide residues in vegetables [J]. Xinjiang Chem Ind, 2005, (03): 99-103.
- [5] 张亮, 孙剑宁, 熊先贵, 等. QuEChERS-高效液相色谱检测土壤中的吡虫啉[J]. 分析实验室, 2010, (12): 90-92.
Zhang L, Sun JN, Xiong XG, *et al.* Detection of imidacloprid in soil by QuEChERS- high performance liquid phase chromatographic [J]. Chin J Anal Lab, 2010, (12): 90-92.
- [6] 侯如燕, 蔡荟梅, 张正竹, 等. 水果蔬菜中吡虫啉农药残留的液相色谱检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2010, (01): 133-136.
Hou RY, Cai HM, Zhang ZZ, *et al.* The residue analysis of imidacloprid pesticide in vegetables and fruits by liquid phase chromatographic detection method [J]. Food Ferment Ind, 2010, (01): 133-136.
- [7] 张艳, 王松雪, 孙长坡. 超临界流体萃取技术在粮食农药残留检测中的应用[J]. 食品科学, 2010, (01): 281-284.
Zhang Y, Wang SX, Sun CP. The application of supercritical fluid extraction technology in food pesticide residue detection [J]. Food Sci, 2010, (01): 281-284
- [8] 程群, 林碧芬, 黄萍, 等. LC-MS/MS 测定茶叶中吡虫啉和啶虫脒残留量[J]. 福建轻纺, 2009, (10): 51-53.
Cheng Y, Lin BF, Huang P, *et al.* Determination of imidacloprid and acetamiprid residue analysis by LC-MS/MS in tea acetamiprid [J]. Fujian

- Textile, 2009, (10): 51-53.
- [9] 毕富春. 啮虫脒高效液相色谱法定量分析[J]. 现代农药, 2002, (03): 18-19.
- Bi FC. The quantitative analysis of acetamiprid by HPLC [J]. Mod Agrochem, 2002, (03): 18-19.
- [10] 莫建初, 程家安. 新烟碱类杀虫剂抗性研究进展[J]. 植物保护学报, 2003, (01): 93-98.
- Mo JC, Cheng JA. The research progress of neonicotinoid insecticide resistance [J]. J Plant Prot, 2003, (01): 93-98.
- [11] 游靖, 张冰若. 高效液相色谱法测定葡萄酒中合成色素不确定度分析[J]. 现代仪器与医疗, 2013, (06): 64-67.
- Yu J, Zhang BR. The determination of wine in pigment synthesis and uncertainty analysis by high performance liquid chromatography [J]. Mod Instrum Med Treatment, 2013, (06): 64-67.
- [12] 杨小宁, 郭靛, 但德忠. 关于不确定度评定中两个问题的讨论[J]. 四川环境, 2008, (06): 21-23.
- Yang XN, Guo L, Dan DZ. Discussion of two problems in the evaluation of uncertainty [J]. Sichuan Environ, 2008, (06): 21-23.
- [13] 郑波, 张克荣, 李梦龙. 化学测量不确定度研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, (01): 192-195.
- Zheng B, Zhang KR, Li ML. Research progress of uncertainty in chemical measurement [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, (01): 192-195.
- [14] 但德忠. 环境监测中仪器分析方法不确定度的评估(I) [J]. 四川环境, 2007, (02): 50-56.
- Dan DZ. Evaluation of the uncertainty of instrumental analysis methods in environmental monitoring (I) [J]. Sichuan Environ, 2007, (02): 50-56.
- [15] 曹宏燕. 分析测试中测量不确定度及评定 第五部分 测量不确定度评定中要注意的一些问题[J]. 冶金分析, 2006, (04): 94-99.
- Cao HY. Some problems to be noticed in the measurement uncertainty and evaluation of the fifth part of the measurement uncertainty evaluation in the analysis test [J]. Metall Anal, 2006, (04): 94-99.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



孟冰冰, 研究生, 研究方向为有机化学分析。

E-mail: 23894471@qq.com



于洪春, 教授, 主要研究方向为害虫综合治理和害虫生物防治。

E-mail: hongcyu@126.com