

国家药品对照品有机氯农药混合对照品溶液的研制与不确定度评定^{*}乔菲, 金红宇^{**}, 孙磊, 马双成^{**}

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 制备适用于中国药典 2015 年版农药残留量测定法的农药标准物质。方法: 以药典通则 2341 中规定的 22 种农药为研究对象, 以农药标准物质为原料, 用容量法制备, 采用气相色谱-电子捕获检测法 (GC-ECD 法) 进行均匀性和稳定性检验, 协作标定进行定值, 并对量值的不确定度进行评估。结果: 22 种农药的质量浓度范围为 9.9~10.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对扩展不确定度为 2.8%~8.4%。结论: 有机氯农药混合对照品溶液符合国家药品对照品的技术要求, 可为药品检验、科学研究等方面的测量和研究工作提供技术支撑和量值溯源保障。
关键词: 有机氯农药; 混合对照品; 农药残留量; 均匀性测定; 稳定性; 协作标定; 不确定度

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2018) 02-0347-07
doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.24

Preparation and uncertainty evaluation on national drug reference substance of organochlorine pesticide mixed reference solution^{*}QIAO Fei, JIN Hong-yu^{**}, SUN Lei, MA Shuang-cheng^{**}

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To prepare pesticide reference substance for the determination of pesticide residues following Chinese Pharmacopoeia (ChP) of 2015 edition. **Method:** 22 kinds of pesticides described in the general rules 2341 of ChP were selected as the research objects. With the reference materials as raw material, mixed reference solution of organochlorine pesticide was prepared by volumetric method. After the homogeneity and stability tested by the gas chromatograph with configuring electron capture detector (GC-ECD), collaborative calibration was used to set the value and the uncertainty of the fixed value was evaluated. **Results:** The mass concentration of 22 pesticides ranged from 9.9 to 10.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the relative expanded uncertainty was 2.8%~8.4%. **Conclusion:** Mixed reference solution of organochlorine pesticide met the technical requirements of the national reference substance, and provided technical support for the measurement and research work in the field of drug control and scientific research.
Keywords: organochlorine pesticide; mixed reference; pesticide residues; uniformity determination; stability test; collaborative calibration; uncertainty

^{*} 国家十二五“重大新药创制”专项课题: 中药质量安全检测和风险控制技术平台, 课题编号: 014ZX09304-307, 子课题 3: 标准物质研制及痕量分析质量保证体系

^{**} 通信作者 马双成 Tel: (010) 67095272; E-mail: Masc@nifdc.org.cn

金红宇 Tel: (010) 67095424; E-mail: jhyu@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 67095424; E-mail: qiaofei@nifdc.org.cn

常见农药根据化学结构分为有机氯类、有机磷类和拟除虫菊酯类。有机氯类农药因其杀虫谱广、效率高而曾在 20 世纪 50 年代被广泛使用,其化学性质稳定、半衰期长、降解速度慢,可长时间残留在土壤中,且易通过食物链在生物体内蓄积,进而危害人体健康。虽然早已禁止使用,但由于该类农药残留时间长,以及药农的违规乱用,而致中药材尤其是根茎类药材往往会检出有机氯农残超标。中国药典 2015 年版(以下简称药典)通则 2341 收载了 22 种有机氯农药残留量测定法,测定目标物包括 α -六六六、 β -六六六、 γ -六六六、 δ -六六六、 p,p' -滴滴伊、 p,p' -滴滴涕、 p,p' -滴滴涕、 o,p' -滴滴涕、六氯苯、七氯、艾氏剂、狄氏剂、异狄氏剂、顺式氯丹、反式氯丹、五氯硝基苯、氧化氯丹、顺式环氧七氯、反式环氧七氯、 α -硫丹、 β -硫丹、硫丹硫酸盐^[1]。目前国内还没有该 22 种有机氯农药混合对照品溶液,国外标准物质价格昂贵,且由于涉及剧毒化学品,购买程序烦琐,周期长。本文针对药典通则有机氯农药残留量测定法 2 研制了 22 种有机氯混合对照品溶液(仅供中国药典有机氯农残测定法用),以固体农药标准物质为原料,采用重量-容量法制备,采用气相色谱-电子捕获检测法(GC-ECD 法)进行均匀性和稳定性检验,多家实验室协作标定进行定值,并对其特性量值进行了不确定度评估。

1 仪器与试剂

气相色谱仪(Agilent 7890A)配 ECD 检测器,电子天平(METTLER TOLEDO),手动移液器(Eppendorf);异辛烷(美国 TEDIA, Fisher Scientific, 农残级),甲苯(分析纯),50 mL 量瓶,5 L 量瓶中(北京计量院校准)。弹性石英毛细管柱(固定相:14% 氰丙基苯-86% 甲基硅氧烷;30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m;OPTIMA-1701;德国 MN 公司)。

量值溯源用对照品:异辛烷/甲苯中 15 种有机氯农药混合溶液(7+8), (六氯苯 210 ng $\cdot$ mL⁻¹(2.4%, 扩展不确定度 $k=2$ 以下同)、七氯 208 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.6%)、艾氏剂 209 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.4%)、狄氏剂 208 ng $\cdot$ mL⁻¹(2.6%)、异狄氏剂 208 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.4%)、 p,p' -滴滴伊 210 ng $\cdot$ mL⁻¹(2.4%)、 p,p' -滴滴涕 209 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.2%)、 p,p' -滴滴涕 208 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.2%)、 o,p' -滴滴涕 210 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.2%)、 α -六六六 208 ng $\cdot$ mL⁻¹(2.4%)、 β -六六六 211 ng $\cdot$ mL⁻¹(4.2%)、 γ -六六六 210 ng $\cdot$ mL⁻¹(2.4%)、 δ -六六六 209

ng $\cdot$ mL⁻¹(2.4%),中国计量科学研究院,批号 12001);顺式氯丹(99.0%,0.5%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 31125);反式氯丹(98.0%,0.5%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 11216);五氯硝基苯(100 ng $\cdot$ mL⁻¹,1.5%,中国计量科学研究院 14001);氧化氯丹(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹,2.0%,CHEM SERVICE 3485400);顺式环氧七氯(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹,2.0%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 30108CY);反式环氧七氯(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹,2.0%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 31122CY); α -硫丹(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹,2.0%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 41111CY); β -硫丹(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹,2.0%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 40121CY);硫丹硫酸盐(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹,2.0%,LGC-Dr.Ehrenstorfer 41007CY)。扩展不确定度, $k=2$ 。

2 方法与结果

2.1 制备

2.1.1 单标储备液(0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹) 分别精密称取 22 种对照品各 50 mg $\pm$ 0.5 mg,加异辛烷溶解并定容至 100 mL,对于难溶物质可加入适量甲苯。

2.1.2 候选标准物质溶液(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹) 将 22 种单标储备液完全转移至同一 5 L 量瓶中,用异辛烷充分洗涤各容量瓶,合并入 5 L 量瓶中,用异辛烷稀释至刻度,摇匀,避光、密闭、冷藏保存。

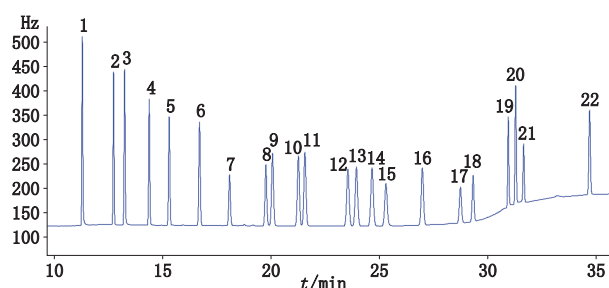
2.1.3 灌封 用有机型瓶口分液器分装至 1 mL 安瓿中,装量 1.2 mL。封口过程中弃去前后各 30 支,分装,按顺序编号。

2.2 均匀性检验

2.2.1 色谱条件 弹性石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m)MN-1701。进样口温度 220 $^{\circ}$ C,检测器温度 300 $^{\circ}$ C,分流比:50:1,流速为恒压模式(初始流速为 1.5 mL $\cdot$ min⁻¹)。升温程序:初始 60 $^{\circ}$ C,保持 0.3 min,以 60 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹升至 170 $^{\circ}$ C,以 10 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹升至 220 $^{\circ}$ C,保持 10 min,以 1 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹升至 240 $^{\circ}$ C,以 15 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹升至 280 $^{\circ}$ C,保持 5 min。

2.2.2 取样 按照相关规定^[2-3],对于均匀性好的样品,当总体单元数大于 500 时,抽取单元数不少于 15 个。分别在分装的初始、中间和终结阶段随机抽取 5 瓶,每瓶独立,重复测定 3 次,共计得到 45 个峰面积数据。

2.2.3 统计方法 采用单因素方差分析(ANOVA)方法,使用 JMP12.0 软件对结果进行评估,当 $P > 0.05$ 时,表明样品均匀。以六氯苯为检测指标,将六氯苯的全部 45 个峰面积检验数据输入后, F 检验结果如表 1 所示, $P=0.1204$,即 $P > 0.05$,表明瓶间和



1. 六氯苯 (hexachlorobenzene) 2. α -六六六 (α -BHC) 3. 五氯硝基苯 (quintozene) 4. γ -六六六 (γ -BHC) 5. 七氯 (heptachlor) 6. 艾氏剂 (aldrin) 7. β -六六六 (β -BHC) 8. δ -六六六 (δ -BHC) 9. 氧化氯丹 (oxy-chlordane) 10. 顺式环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide) 11. 反式环氧七氯 (heptachlor-endo-epoxide) 12. α -硫丹 (α -endosulfan) 13. 反式氯丹 (trans-chlordane) 14. 顺式氯丹 (cis-chlordane) 15. p, p' -滴滴伊 (p, p' -DDE) 16. 狄氏剂 (dieldrin) 17. 异狄氏剂 (endrin) 18. o, p' -滴滴涕 (o, p' -DDT) 19. p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDD) 20. β -硫丹 (β -endosulfan) 21. p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDT) 22. 硫丹硫酸盐 (endosulfan sulfate)

图1 有机氯农药混合对照品溶液气相色谱图

Fig. 1 Typical gas chromatograms of mixed reference solution of organochlorine pesticide

瓶内无显著性差异,样品均匀。同理,其他待测目标物的均匀性检验结果均得到了样品均匀的结论。

表1 有机氯农药混合对照品溶液的
均匀性检验的方差分析结果

Tab. 1 Analysis of variance (ANOVA) results of homogeneity test for mixed reference solution of organochlorine pesticide

	离均差平方和 (sum of square)	自由度 (df)	均方 (mean square)	F	P
组间 (between groups)	15286368	14	1091883	1.665 7	0.120 4
组内 (within groups)	19783486	30	659450		
总和 (total)	35069854	44			

2.3 短期稳定性检验

2.3.1 测定方法 同均匀性检验的测定方法。

2.3.2 取样 短期稳定性评估通常在不同温度条件下进行,以考察温度对于候选标准物质待特性值的影响^[2,12]。随机抽取 18 瓶样品,采用同步稳定性评估,对不同温度、不同时间点抽取的样品进行测定。

2.3.3 统计方法 采用趋势分析进行统计评估,稳定性评估基本模型公式为:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X$; 式中: β_0, β_1 是回归系数; X 是时间; Y 是候选标准物质的特性值。

$$\text{斜率 } \beta_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

$$\beta_1 \text{ 的标准偏差 } s(\beta_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \beta_0 - \beta_1 X)^2}{n-2}$$

用 t 检验进行判断: 若 $|\beta_1| < t_{0.95,2} \cdot s(\beta_1)$, 则表明斜率不显著,没有观察到不稳定性。以六氯苯 (20 °C) 为例,由表 2 结果可知, $\beta_1 = 0.005\ 95$, $t_{0.95,2} \cdot s(\beta_1) = 4.30 \times 0.005\ 233 = 0.022\ 5$, 满足 $|\beta_1| < t_{0.95,2} \cdot s(\beta_1)$, 说明样品在 20 °C 避光条件下贮存 30 d 未发现不稳定性。同理,可认为本批有机氯混合对照品溶液在不超过 40 °C 避光条件下短期放置稳定。由此确定有机氯混合对照品溶液的运输条件: 温度不超过 40 °C; 时间不超过 30 d。

表2 有机氯农药混合对照品溶液的短期稳定性结果

Tab. 2 Short-term stability for mixed reference solution of organochlorine pesticide

时间 (time) / d	六氯苯 (hexachlorobenzene) / (mg · kg ⁻¹)	
	20 °C	40 °C
0	10.706	10.706
5	10.440	10.496
15	10.499	10.335
30	10.443	10.479
β_1	0.005 95	0.006
β_0	10.596	10.583
s^2	0.014 37	0.024 50
$s(\beta_1)$	0.005 233	0.007
$t(0.95, 2)$	4.30	4.30

2.4 协作定值

2.4.1 正态性检验 采用多家实验室合作定值。每家实验室 6 瓶待测对照品, 5 家实验室共计 30 组数据。采用夏皮洛-威尔克 (Shapiro-Wilk) 法对原始数据进行正态性检验, 结果表明 22 个特性值的数据均为正态分布。见表 3。

表 3 正态分布检验

Tab. 3 Normal distribution test

农药名称 (pesticide name)	W	W (30, 0.95)
六氯苯 (hexachlorobenzen)	1.539	0.927
α -六六六 (α -BHC)	1.834	0.927
五氯硝基苯 (quintozene)	2.032	0.927
γ -六六六 (γ -BHC)	1.682	0.927
七氯 (heptachlor)	1.747	0.927
艾氏剂 (aldrin)	1.880	0.927
β -六六六 (β -BHC)	2.191	0.927
δ -六六六 (δ -BHC)	2.511	0.927
氧化氯丹 (oxy-chlordane)	1.693	0.927
顺氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	2.440	0.927
反氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	2.306	0.927
α -硫丹 (α -endosulfan)	2.552	0.927
反氏氯丹 (trans-chlordane)	1.918	0.927
顺氏氯丹 (cis-chlordane)	1.800	0.927
p, p' -滴滴伊 (p, p' -DDE)	1.866	0.927
狄氏剂 (dieldrin)	1.466	0.927
异狄氏剂 (endrin)	1.940	0.926
o, p' -滴滴涕 (o, p' -DDT)	1.534	0.927
p, p' -滴滴滴 (p, p' -DDD)	1.634	0.927
β -硫丹 (β -endosulfan)	2.384	0.927
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDT)	1.843	0.927
硫丹硫酸盐 (endosulfan sulfate)	2.585	0.927

2.4.2 可疑值检验和等精度检验 先用格拉布斯法及狄克逊法进行组内可疑值检验,舍去异常值,然后用科克伦法检验各组数据平均值间是否等精度,结果表明各组数据等精度(表4)。然后按组内可疑值检验方法检验各组数据平均值有无显著性差异。经检验:六氯苯、 α -六六六和 p, p' -滴滴滴的平均值有显著性差异,舍去异常值,其余各组数据平均值无显著性差异。

2.4.3 标准值的确定 除六氯苯、 α -六六六和 p, p' -滴滴滴之外的其余各组数据平均值无显著性差异的,求出总平均值,即为标准值;六氯苯、 α -

表 4 组间数据等精度检验(科克伦法)

Tab. 4 Equal precision test between groups (Cochran)

农药名称 (pesticide name)	C	C (0.05, 5, 6)
六氯苯 (hexachlorobenzen)	0.432 7	0.478 3
α -六六六 (α -BHC)	0.301 8	0.478 3
五氯硝基苯 (quintozene)	0.338 3	0.478 3
γ -六六六 (γ -BHC)	0.271 4	0.478 3
七氯 (heptachlor)	0.234 5	0.478 3
艾氏剂 (aldrin)	0.317 1	0.478 3
β -六六六 (β -BHC)	0.194 5	0.478 3
δ -六六六 (δ -BHC)	0.203 5	0.478 3
氧化氯丹 (oxy-chlordane)	0.236 2	0.478 3
顺氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	0.230 0	0.478 3
反氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	0.271 5	0.478 3
α -硫丹 (α -endosulfan)	0.254 3	0.478 3
反氏氯丹 (trans-chlordane)	0.225 0	0.478 3
顺氏氯丹 (cis-chlordane)	0.222 5	0.478 3
p, p' -滴滴伊 (p, p' -DDE)	0.147 8	0.478 3
狄氏剂 (dieldrin)	0.119 1	0.478 3
异狄氏剂 (endrin)	0.076 1	0.478 3
o, p' -滴滴涕 (o, p' -DDT)	0.099 7	0.478 3
p, p' -滴滴滴 (p, p' -DDD)	0.175 7	0.478 3
β -硫丹 (β -endosulfan)	0.257 7	0.478 3
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDT)	0.106 6	0.478 3
硫丹硫酸盐 (endosulfan sulfate)	0.286 0	0.478 3

六六六和 p, p' -滴滴滴的平均值存在显著性差异,在经技术审查确定剔除平均值存在差异的可疑数据组之后合并数据,求出总平均值,即为标准值^[3]。见表5。

2.5 标准物质特性量值的不确定度的来源和分析^[10-14]

标准物质的特性量值的不确定度主要由不均匀性引起的不确定度、不稳定性引起的不确定度以及定值过程带来的不确定度三部分组成。将三部分不确定度分量按照平方和开方的方法进行合成,即得标准物质的合成标准不确定度 u_{CRM} 。乘以包含因子 k 得到扩展不确定度或称总不确定度 U 。包含因子 k 取 2,对应置信概率 95%。

表 5 协作定值测定结果

Tab. 5 Results of the collaborative calibration

农药名称 (pesticide name)	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	$\bar{x}$
六氯苯 (hexachlorobenzene)	10.46	10.317	/	10.414	10.318	10.4
α -六六六 (α -BHC)	10.437	10.326	/	10.353	10.311	10.4
五氯硝基苯 (quintozene)	10.577	10.181	11.781	10.94	9.639	10.3
γ -六六六 (γ -BHC)	10.512	10.489	10.017	10.459	10.363	10.4
七氯 (heptachlor)	10.54	10.795	9.701	10.132	10.366	10.4
艾氏剂 (aldrin)	10.082	9.932	9.76	10.083	10.032	10
β -六六六 (β -BHC)	10.467	10.391	10.033	10.317	10.243	10.3
δ -六六六 (δ -BHC)	10.208	10.405	10.131	10.974	10.22	10.4
氧化氯丹 (oxy-chlordane)	10.614	9.555	11.597	11.181	9.638	10.5
顺氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	10.036	10.44	9.997	11.202	9.717	10.3
反氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	9.842	10.477	10.07	10.906	9.808	10.2
α -硫丹 (α -endosulfan)	9.817	10.364	10.014	11.117	9.763	10.2
反氏氯丹 (trans-chlordane)	9.893	10.221	10.156	10.603	9.676	10.1
顺氏氯丹 (cis-chlordane)	10.093	10.461	10.313	10.708	9.908	10.3
p, p' -滴滴伊 (p, p' -DDE)	10.64	10.343	9.982	10.514	10.555	10.4
狄氏剂 (dieldrin)	10.167	9.784	9.633	10.12	10.068	10
异狄氏剂 (endrin)	10.206	9.334	9.973	10.28	9.638	9.9
o, p' -滴滴涕 (o, p' -DDT)	11.12	10.895	9.781	10.478	10.97	10.6
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDD)	10.211	10.37	/	10.284	10.334	10.3
β -硫丹 (β -endosulfan)	9.986	10.37	9.927	10.718	10.053	10.2
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDT)	10.628	10.298	9.452	9.888	10.641	10.2
硫丹硫酸盐 (endosulfan sulfate)	9.736	10.306	10.005	10.955	10.043	10.2

不均匀性引起的不确定度 u_{bb} 和不稳定性引起的不确定度 u_s 通过均匀性检验的方差分析结果和稳定性考察的变化趋势线可以计算得到。从短期稳定性结果未观察到明显不稳定性,参考已上市同类型农药对照品溶液的稳定性均为 3~8 年,由不稳定性带来的不确定度对标准物质的特性量值的不确定度贡献很小,因此予以忽略。从实验结果来看,有机氯农药混合对照品溶液特性量值的不确定度主要来自标准物质的定值过程带来的不确定度。见表 6。

对于标准物质,其定值过程不确定度评定程序为:建立待定特性量及其输入量之间的函数关系式(数学模型),确定不确定度分量来源,量化不确定度分量。GC-ECD 外标法测定溶液浓度的数学模型为 $C_s = (A_s \times C_r \times D_s) / (A_r \times D_r)$, 式中 A_s 为样品峰面积; C_r 为对照品标示量值; D_s 为样品的稀释倍数; A_r 为对照品峰面积; D_r 为对照品稀释倍数。

定值过程引入的不确定度分为 2 个部分: A 类不确定度和 B 类不确定度。A 类是按统计方法计算

出的不确定度; B 类是通过测量影响因素的分析,以非统计分析的方法评定的不确定度。

2.5.1 定值过程带来的不确定度的 A 类评定 标准物质的特性量值,由多个实验室,每个实验室测定 n 次,每个实验室的测定平均值为 $\bar{x}_i$,当测定数据服从正态分布,且 $\bar{x}_i$ 间等精度时,总平均值的标准不确定度,即不确定度的 A 类分量 u_A 用下式表示:

$$u_A = s_{\bar{x}} = \sqrt{\sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2 / m(m-1)}$$

式中, $s_{\bar{x}}$ 为总平均值的标准偏差; $\bar{x}_i$ 为各实验室的测定平均值; $\bar{\bar{x}}$ 为总平均值; m 为参与定值的实验室数目。

2.5.2 定值过程带来的不确定度的 B 类评定 由测量的数学模型和对测量过程的分析,定值过程带来的 B 类不确定度主要来源于:溯源用对照品溶液标示量值引入的不确定度;溯源用对照品溶液和候选标准物质溶液稀释过程引入的不确定度;溯源用对照品溶液和候选标准物质溶液的色谱峰面积引入的不确定度。以六氯苯为例。

表 6 合成相对不确定度 u_{CRM} 和扩展不确定度 U Tab. 6 Combined relative uncertainty standard u_{CRM} and expanded uncertainty U

农药名称 (pesticide name)	u_{char}	u_{bb}	u_{CRM}	U
六氯苯 (hexachlorobenzene)	0.013 7	0.006 1	0.015	3.0
α -六六六 (α -BHC)	0.013 6	0.006 4	0.015	3.0
五氯硝基苯 (quintozene)	0.030 5	0.005 8	0.031	6.2
γ -六六六 (γ -BHC)	0.016 0	0.006 3	0.017	3.4
七氯 (heptachlor)	0.022 4	0.006 4	0.023	4.7
艾氏剂 (aldrin)	0.014 6	0.005 8	0.016	3.2
β -六六六 (β -BHC)	0.015 1	0.006 1	0.016	3.3
δ -六六六 (δ -BHC)	0.019 9	0.005 8	0.021	4.1
氧化氯丹 (oxy-chlordane)	0.041 8	0.005 6	0.042	8.4
顺氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	0.028 9	0.005 5	0.029	5.9
反氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	0.024 9	0.005 5	0.025	5.1
α -硫丹 (α -endosulfan)	0.028 2	0.004 1	0.028	5.7
反氏氯丹 (trans-chlordane)	0.018 4	0.006 1	0.019	3.9
顺氏氯丹 (cis-chlordane)	0.016 7	0.006 1	0.018	3.6
p, p' -滴滴伊 (p, p' -DDE)	0.017 4	0.006 9	0.019	3.7
狄氏剂 (dieldrin)	0.016 9	0.005 9	0.018	3.6
异狄氏剂 (endrin)	0.022 3	0.003 4	0.023	4.5
o, p' -滴滴涕 (o, p' -DDT)	0.026 3	0.006 7	0.027	5.4
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDD)	0.013 7	0.003 7	0.014	2.8
β -硫丹 (β -endosulfan)	0.020 3	0.005 6	0.021	4.2
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDT)	0.026 1	0.005 3	0.027	5.3
硫丹硫酸盐 (endosulfan sulfate)	0.024 8	0.005 2	0.025	5.1

溯源用对照品溶液中六氯苯标示量值 C_r 的不确定度由标准物质证书上给出的扩展不确定度计算得到。2.4%/2=1.2% ($k=2$)。

由于使用了 1 mL 移液管和 50 mL 量瓶, 候选标准物质溶液稀释过程 D_s 引入的不确定度包括以下三部分: 其一, 制造商提供的容量瓶和移液管体积的不确定度 50 mL 量瓶的容量允差为 ± 0.05 mL, 其标准不确定度 $u=0.05/\sqrt{3}=0.029$ mL; 1 mL 移液管的容量允差为 ± 0.007 mL, 其标准不确定度 $u=0.007/\sqrt{3}=0.004$ mL。其二, 环境温度变化引入的不确定度忽略玻璃膨胀系数, 异辛烷的体积膨胀系数为 1.2×10^{-3} , 假定温度相差 ± 4 °C; 因温度产生的 50 mL 量瓶的体积变化为 $\pm 50 \times 4 \times 1.2 \times 10^{-3} = \pm 0.24$ mL, 按照均匀分布转化, 则标准不确定度为 $0.24/\sqrt{3}=0.14$

mL; 因温度产生的 1 mL 移液管的体积变化为, $\pm 1 \times 4 \times 1.2 \times 10^{-3} = \pm 0.0048$ mL, 按照均匀分布转化, 则标准不确定度为 $0.0048/\sqrt{3}=0.0028$ mL。其三, 充满量瓶至刻度的随机变化, 50 mL 量瓶充满 10 次并反复称量, 由贝塞尔公式得出充满容量瓶至刻度的标准偏差为 0.01 mL。同理, 1 mL 移液管充满至刻度的标准偏差可忽略。

由于溯源用标准物质溶液中六氯苯的浓度与样品接近, 无需稀释, 因此 D_r 引入的不确定度为零。

溯源用对照品溶液和候选标准物质溶液的色谱峰面积引入的不确定度主要来源于积分方式、积分参数和积分的重复性。由于不确定度较小, 可以忽略。

合成上述各 B 类不确定度分量, 六氯苯的相对标准不确定度 (B 类) 为 0.013 3。将 A 类不确定度分量和 B 类不确定度分量进行合成, 得到定值过程引入的相对不确定度 u_{char} (表 7)。

$$u_{\text{char}} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2}$$

表 7 定值过程带来的相对不确定度 u_{char} Tab. 7 The uncertainty from characterization u_{char}

农药名称 (pesticide name)	u_A	u_B	u_{char}
六氯苯 (hexachlorobenzene)	0.003 4	0.013 3	0.013 7
α -六六六 (α -BHC)	0.002 7	0.013 3	0.013 6
五氯硝基苯 (quintozene)	0.027 0	0.014 2	0.030 5
γ -六六六 (γ -BHC)	0.008 8	0.013 3	0.016 0
七氯 (heptachlor)	0.018 1	0.013 3	0.022 4
艾氏剂 (aldrin)	0.006 1	0.013 3	0.014 6
β -六六六 (β -BHC)	0.007 2	0.013 3	0.015 1
δ -六六六 (δ -BHC)	0.014 8	0.013 3	0.019 9
氧化氯丹 (oxy-chlordane)	0.038 7	0.015 7	0.041 8
顺氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	0.025 1	0.014 2	0.028 9
反氏环氧七氯 (heptachlor-exo-epoxide)	0.020 4	0.014 2	0.024 9
α -硫丹 (α -endosulfan)	0.024 4	0.014 2	0.028 2
反氏氯丹 (trans-chlordane)	0.015 5	0.009 8	0.018 4
顺氏氯丹 (cis-chlordane)	0.013 5	0.009 8	0.016 7
p, p' -滴滴伊 (p, p' -DDE)	0.011 2	0.013 3	0.017 4
狄氏剂 (dieldrin)	0.010 5	0.013 3	0.016 9
异狄氏剂 (endrin)	0.018 0	0.013 3	0.022 3
o, p' -滴滴涕 (o, p' -DDT)	0.022 7	0.013 3	0.026 3
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDD)	0.003 3	0.013 3	0.013 7
β -硫丹 (β -endosulfan)	0.014 5	0.014 2	0.020 3
p, p' -滴滴涕 (p, p' -DDT)	0.022 4	0.013 3	0.026 1
硫丹硫酸盐 (endosulfan sulfate)	0.020 3	0.014 2	0.024 8

3 讨论

3.1 浓度的选择

有机氯农残测定通常采用气相色谱-电子捕获

检测器(GC-ECD)和气相色谱质谱联用仪(GC-MS)测定,具有非常高的灵敏度,达到 10^{-9} 甚至 10^{-12} 级。在标准物质的使用时,通常要进行稀释才能使用,而稀释次数越多,给测量结果带来的不确定度越大。因此本文选用了 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度,一次稀释即可达到工作对照浓度,既可满足稳定性要求,实现量值的准确传递,并且也可制备成对照品储备液,降低使用成本^[9]。

3.2 溶剂的选择

与单一组分溶液标准物质相比,含22种农药组分的有机氯混合对照品溶液在选择制备溶剂时,要兼顾各农药组分在该溶剂中的溶解度和稳定性,同时参考国际和国内有机氯农药标准物质常用溶剂,最终选择了稳定、低毒的异辛烷。

3.3 色谱条件的优化

中国药典通则2341项下22种有机氯农药测定法规定分析柱使用50%苯基50%二甲基聚硅氧烷为固定液的弹性石英毛细管柱,实验证明DB-17分离度无法达到要求,不能满足标准物质定量的要求,通过色谱柱筛选,本文选用Optima-1701作为分析柱,并通过优化色谱条件,使分离度和保留时间均满足要求。

3.4 定值方式

标准物质的定值方式有5种^[2],由单一实验室采用基准法定值;由1个实验室采用2种或更多不同原理独立参考方法定值;使用1种或多种已证明准确性的方法,由多个实验室合作定值;利用特定方法进行定值;利用一级标准物质进行比较定值。根据标准物质的类型、最终使用要求、相关实验条件方法的性能指标以及与其特性值相关的不确定度的实际评估能力来适当选择定值方法。本品同时采用了多家实验室合作定值方式,同时参考了重量-容量法的定值结果,2种方法结果差异不大,小于3%,表明以外标法多个实验室合作定值结果准确可靠。

3.5 关于稳定性

由于样品短期内是稳定的,且暂缺乏长期稳定性监测数据,无法将标准物质的不稳定性引入的不确定度合成到总不确定度中,此项需日后补充长期稳定性数据后再行完善。

参考文献

- [1] 中国药典2015年版.四部[S].2015:209
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015:209
- [2] JJF1343-2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[S].2012:5
JJF1343-2012 General and Statistical Principles for Characterization of Reference Materials[S].2012:5
- [3] CNAS-GL29 标准物质/标准样品定值的一般原则和统计方法[S].2010
CNAS-GL29. Reference materials - General and statistical Principles for Certification[S].2010
- [4] JJF 1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S].2005
JJF1135-2005 Evaluation of Uncertainty in Chemical Analysis Measurement[S].2005
- [5] JJG196-2006 常用玻璃量器[S].2006
JJG196-2006 Working Class Container[S].2006
- [6] CNAS-GL06. 化学分析中不确定度的评估指南[S].2006
CNAS-GL06. Guidance on Evaluating the Uncertainty in Chemical Analysis CNAS[S].2006
- [7] 徐华能.多菌灵农药标准物质的研制[J].农药,2012,51(3):190
XU HN. Preparation of reference material of carbendazim[J]. Chin J Pestic, 2012, 51(3): 190
- [8] 王璐,彭伟,罗铭.六氯苯·马拉硫磷和治螟磷标准工作液的研制与不确定度评定[J].安徽农业科学,2014,42(27):9344
WANG L, PENG H, LUO M. Preparation and uncertainty evaluation on standard work-solution of hexachl, orobenzene, malathion and sulfotep[J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(27): 9344
- [9] 邵明武,汤桦,陈大舟.关于多组分痕量有机污染物溶液标准物质研制的体会[J].计量技术,2007,12(3):61
SHAO MW, TANG H, CHEN DZ. The experience about manufacturing standard substance solution of multicomponent trace organic pollutants[J]. Measur Technol, 2007, 12(3): 61
- [10] GONG NB, WANG XY, ZHANG BX, et al. Characterization and uncertainty evaluation of a new certified reference material of baicalein[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 89(2): 106
- [11] 马玲云,陈红岩,肖新月,等.标示量值七叶皂苷对照提取物的研制[J].药物分析杂志,2014,34(7):1278
MA LY, CHEN HY, XIAO XY, et al. Preparation of aescinate extractive reference standard at labeled amounts[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(7): 1278
- [12] 常艳,马双成,胡昌勤.美洛西林标准物质短期稳定性研究[J].药物分析杂志,2013,33(4):684
CHANG Y, MA SC, HU CQ. Short-term stability study of mezlocillin reference material[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(4): 684
- [13] 何凤艳,戴忠,何轶,等.西红花苷对照提取物的定值及不确定度评估研究[J].药物分析杂志,2016,36(6):1113
HE FY, DAI Z, HE Y, et al. Certification and uncertainty evaluation of crocin reference extract[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(6): 1113
- [14] 卢宪波,陈吉平,王淑秋,等.贻贝中有机氯农药和多氯联苯标准物质的研制及同位素稀释高分辨质谱法定值[J].色谱,2012,30(9):915
LU XB, CHEN JP, WANG SQ, et al. Preparation and certification of mussel reference material for organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls using isotope dilution-high resolution mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(9): 915

(本文于2017年3月22日收到)