

◆ 加工与分析 ◆

# 测定吡虫啉农药制剂中有效成分的3种HPLC 不同定量方法比较

李环亭<sup>1,2</sup>, 刘黎<sup>3</sup>, 乔海清<sup>1,2</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 李建兵<sup>1,2\*</sup>, 王晓滨<sup>1</sup>, 何培迎<sup>4</sup>

(1. 青岛市产品质量监督检验研究院, 山东青岛 266101; 2. 国家海洋精细化工及其生物制品质量监督检验中心, 山东青岛 266101; 3. 青岛市黄岛区检验检测中心, 山东青岛 266555; 4. 江苏蓝丰生物化工股份有限公司, 江苏新沂 221400)

**摘要:**采用高效液相色谱法测定吡虫啉农药制剂产品中有效成分含量,并对单点校正法、标准曲线法和标准加入法3种不同方法进行分析,比较了3种方法的差异性。利用Excel对3种定量方法的标准偏差、基质效应和测定结果进行 $F$ 检验和 $t$ 检验。结果表明,在显著性水平 $\alpha=0.05$ 时,单点校正法与标准曲线法、标准加入法标准偏差有明显差别,标准曲线法和标准加入法之间无显著性差异。对可湿性粉剂产品,基质效应无法忽略,3种方法测定结果间均具有显著性差别;对乳油产品,标准曲线法和标准加入法测定结果无明显差别,但单点校正法与其他2种方法具有显著性差异。建议对可湿性粉剂产品选择标准加入法定量,乳油产品选择标准曲线法定量。

**关键词:**高效液相色谱法;吡虫啉;单点校正法;标准曲线法;标准加入法

中图分类号:O 657.7+2 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2021.01.006

## Comparison of Three Quantitative Methods for Determination of Imidacloprid by HPLC

LI Huanting<sup>1,2</sup>, LIU Li<sup>3</sup>, QIAO Haiqing<sup>1,2</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, LI Jianbing<sup>1,2\*</sup>, WANG Xiaobin<sup>1</sup>, HE Peiying<sup>4</sup>

(1. Qingdao Testing Research Institute of Product Quality, Shandong Qingdao 266101, China; 2. National Quality Supervision and Testing Center of Marine Fine Chemical and Biological Products, Shandong Qingdao 266101, China; 3. Qingdao Huangdao District Inspection and Testing Center, Shandong Qingdao 266555, China; 4. Jiangsu Lanfeng Bio-chemical Co., Ltd., Jiangsu Xinyi 221400, China)

**Abstract:** The content of imidacloprid in pesticide product was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), and quantitatively analysed by single point calibration method, standard curve calibration method and standard addition method. The significant differences of three methods were compared. The standard deviation, matrix effect and measurement results of the three quantitative methods were analyzed by using Excel for  $F$ -test and  $t$ -test statistical analysis. Results showed that the level of significance  $\alpha=0.05$ , the significant differences of standard deviation were between signal point calibration method and other two methods, and there were no significant differences between standard curve calibration method and standard addition method. For wettable powder products, the matrix effect could not be ignored that there were significant differences among the results of the three methods. There was no significant difference in the measurement results of emulsifiable concentrate between the standard curve method and the standard addition method, but the single point correction method was significantly different from the other two methods. It is suggested to determine imidacloprid in wettable powder by standard addition method and in emulsifiable concentrate by standard curve calibration method.

**Key words:** HPLC; imidacloprid; single point calibration method; standard curve calibration method; standard addition method

收稿日期:2020-06-16

基金项目:山东质监局科技项目(2017KY32Z00)

作者简介:李环亭(1966—)男,山东青岛人,硕士,高级工程师,主要从事标准化研究。E-mail: lht1966808@163.com

通信作者:李建兵(1980—)男,山西榆社人,博士,高级工程师,主要从事化学测试及其标准化研究。E-mail: jblee0787@163.com

农药是人类生活中不可或缺的重要物资。近年来,随着人们环保意识的增强和对食品安全与健康的日益重视,农药生产不断发展和进步,农药在人类社会经济活动中发挥着越来越重要的作用<sup>[1]</sup>,农药质量也成为人们关注的焦点。农业农村部2018年农药监督抽查结果表明,有效成分不符合要求是农药质量不合格的主要问题之一,有效成分实际含量高于标签标示值<sup>[2]</sup>。农药有效成分含量的增加不仅会造成农产品中农药残留超标,危害人体健康,也会对生态环境造成一定的威胁,因此农药有效成分含量是监管的重点。

根据农药的物理化学及生物特性,农药产品的检测方法主要有气相色谱法、液相色谱法、色谱质谱联用法、光谱法等<sup>[3]</sup>。目前吡虫啉有效成分含量测定的国家标准方法主要有GB 28126—2011《吡虫啉原药》、GB 28142—2011《吡虫啉可湿性粉剂》、GB 28143—2011《吡虫啉乳油》、GB 28141—2011《吡虫啉可溶液剂》、GB 28132—2011《吡虫啉微乳剂》,均采用单点校正法定量高效液相色谱法测定。单点校正法是通过已知浓度的标准样品与坐标原点做直线,对未知浓度待测组分进行测定,当待测组分的线性方程与坐标原点有较大差别时,单点校正法会出现较大的误差,而且单点校正法对标样称取、溶液配制、标样是否均匀的偶然误差无法分析,因此单点校正法对其给出的结果无法放进行判断<sup>[4]</sup>。标准曲线法通过配制标准工作曲线,定量时可以直接从标准曲线上读出含量,适合于大量样品分析,但如果用纯溶剂配置标准溶液来定量分析目标物,由于基质效应会造成检测结果与实际值之间会有偏差<sup>[5]</sup>,标准曲线法无法消除基质效应影响。标准加入法可以避免基质干扰,但操作比较复杂,对样品需求量较大<sup>[6]</sup>。

本文选取吡虫啉农药产品为研究对象,采用HPLC测定,采用单点校正法、标准曲线法和标准加入法3种方法定量,比较了不同定量方法对测定结果的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:Agilent1200高效液相色谱仪(配紫外检测器),安捷伦科技有限公司;ML204T/02电子天平,瑞士梅特勒-托利多集团。

试剂:甲醇(色谱纯),上海安谱实验科技股份

有限公司。

标准物质 吡虫啉,德国Dr.Ehrenstorfer公司。

### 1.2 液相色谱条件

Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 粒径5 μm),流动相甲醇:水=40:60,流速0.8 mL/min,进样体积10 μL,紫外检测器,检测波长260 nm。

### 1.3 标准溶液配置

#### 1.3.1 单标储备液

称取0.1 g(精确至0.000 1 g)吡虫啉标准物质于100 mL容量瓶中,加入甲醇溶解,并定容至刻度线,配制成1 mg/mL的单标储备液。

#### 1.3.2 标准使用液

准确移取5.0 mL 1.3.1标准储备液于50 mL容量瓶中,加入甲醇定容至刻度线,配制成0.1 mg/mL的标准使用液。

#### 1.3.3 标准曲线法标准工作液

取1.3.1单标储备液和1.3.2标准使用液用甲醇逐级稀释成0.02~0.8 mg/L的标准工作液。

### 1.4 样品前处理

共选取7个不同厂家吡虫啉农药产品,包括10%可湿性粉剂4个,25%可湿性粉剂1个,5%乳油1个,10%乳油1个。

#### 1.4.1 单点校正法前处理

分别称取2.0 g(标准质量分数5%)、1.0 g(标准质量分数10%)和0.4 g(标准质量分数25%)样品于100 mL容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度线,然后准确移取5.0 mL于50 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度线,稀释10倍,过滤待测。取1.3.2标准使用液,按照标样溶液、样品溶液、样品溶液、标样溶液的顺序进行测定。

#### 1.4.2 标准曲线法前处理

分别称取1.0、2.0、3.0 g(标准质量分数5%);0.5、1.0、2.0 g(标准质量分数10%);0.2、0.4、0.6 g(标准质量分数25%)样品于50 mL容量瓶中,然后准确移取5.0 mL于50 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度线,稀释10倍,过滤待测。

#### 1.4.3 标准加入法前处理

分别称取1.0、2.0 g(标准质量分数5%);0.5、1.0 g(标准质量分数10%);0.2、0.4 g(标准质量分数25%)各3组样品于50 mL容量瓶中,加入甲醇溶解定容至刻度线。准确移取5.0 mL于50 mL容量瓶中,第2和3组样品再分别准确加入0.1 mg/mL标准使用

液(1.3.2)2.5、5.0 mL,用甲醇定容至刻度线,过滤待测。

## 2 结果和讨论

### 2.1 方法重复性标准偏差

标准曲线法配制0.02~0.8 mg/L的标准曲线,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归分析,线性回归方程为 $y=46\ 466.76x+296.01$ ,线性相关系数 $R^2$ 大于0.99。结果表明,在所测定浓度范围内,标准曲线线性良好。取10%吡虫啉乳油样品连续测定10次,结果见表1。单点校正法、标准曲线法和标准加入法重复性标准偏差分别为0.092、0.087和0.307,表明3种方法都适用于吡虫啉含量测定。

表 1 单点校正法、标准曲线法和标准加入法重复性标准偏差

测定次数	样品含量/%		
	单点校正法	标准曲线法	标准加入法
1	10.41	11.02	11.12
2	10.45	11.06	11.33
3	10.21	10.86	11.05
4	10.21	10.82	10.61
5	10.23	10.85	10.87
6	10.23	10.84	11.17
7	10.22	10.84	10.85
8	10.22	10.84	10.26
9	10.18	10.80	10.76
10	10.23	10.86	10.82
平均值	10.26	10.88	10.88
重复性标准偏差	0.092	0.087	0.307

对表1中的数据进行单因素方差分析( $F$ 检验), $F$ 值为35.1,显著大于临界值( $F_{(2,27)}=3.35$ ),表明3种定量方法间存在显著差异。采用 $F$ 检验对上述3种方法的检测重复性标准偏差进行两两比较,结果发现标准加入法与单点校正法( $p<0.001$ )和标准曲线法( $p<0.001$ )有显著差异,单点校正法和标准曲线法两者间无显著差异( $p=0.440>0.05$ )。对任意2种不同定量方法测试结果的一致性采用 $t$ 检验方法进行比较。有显著差异的2种定量方法,采用异方差假设的 $t$ 检验方式;无显著差异的定量方法,采用等方差假设的 $t$ 检验方式。检验结果表明,单点校正法与标准曲线法、标准加入法检测结果间存在显著差异(显著性水平 $\alpha=0.05$ )。标准曲线法和标准加入法之间无显著差异(显著性水平 $\alpha=0.05$ )。

### 2.2 基质效应

基质效应是指样品中的其他成分对待测组分的影响。本文通过单点校正法、标准曲线法和标准

加入法标准曲线来考察7种吡虫啉产品的基质效应,并对可湿性粉剂和乳油2种剂型不同的产品进行分析。采用 $t$ 检验分析不同剂型的3种定量方法斜率的一致性,标准加入法、单点校正法与标准曲线法斜率比较的 $t$ 值根据式(1)计算。结果表明,可湿性粉剂标准加入法、单点校正法与标准曲线法斜率统计量 $t$ 值分别为4.36( $>t(25)_{0.05}$ 临界值=2.06)、13.49( $>t(16)_{0.05}$ 临界值=2.12)、乳油标准加入法、单点校正法与标准曲线法斜率统计量 $t$ 值分别为1.01( $<t(17)_{0.05}$ 临界值=2.11)、17.18( $>t(15)_{0.05}$ 临界值=2.13)。标准加入法与单点校正法的斜率利用 $F$ 检验和 $t$ 检验进行分析(表2和表3)。结果表明,可湿性粉剂和乳油的 $p$ 值均小于0.01。

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{\sigma_x}{\sqrt{n-1}}} \quad (1)$$

式中 $t$ 为标准加入法或单点校正法与标准曲线法斜率的统计量; $\bar{X}$ 为标准加入法或单点校正法斜率平均值; $\mu$ 为标准曲线法斜率; $\sigma_x$ 为标准加入法或单点校正法斜率标准差; $n$ 为标准加入法或单点校正法斜率测定次数。

表 2 标准加入法和单点校正法斜率  $F$  检验

剂型及方法	可湿性粉剂		乳油	
	标准加入法	单点校正法	标准加入法	单点校正法
平均	47 016	48 649	47 074	49 101
方差	412 822	444 947	301 262	334 167
观测值	26	17	10	9
df	25	16	9	8
$F$	0.93		0.90	
$P(F \leq f)$ 单尾	0.42		0.44	
$F$ 单尾临界	0.48		0.31	

表 3 标准加入法和单点校正法斜率  $t$  检验

剂型及方法	可湿性粉剂		乳油	
	标准加入法	单点校正法	标准加入法	单点校正法
平均	47 016	48 649	47 074	49 101
方差	412 822	444 947	301 262	334 167
观测值	26	17	10	9
合并方差	425 359		316 747	
假设平均差	0		0	
df	41		17	
$t$ Stat	-8.02		-7.84	
$P(T \leq t)$ 单尾	$3.07 \times 10^{-10}$		$2.40 \times 10^{-7}$	
$t$ 单尾临界	1.68		1.74	
$P(T \leq t)$ 双尾	$6.14 \times 10^{-10}$		$4.80 \times 10^{-7}$	
$t$ 双尾临界	2.02		2.11	

统计发现,对于可湿性粉剂,标准加入法的斜率与标准曲线法、单点校正法的斜率有显著差异(置信水平 $\alpha=0.05$ ),说明可湿性粉剂的基质效应对定量结果的影响不可忽略,标准加入法定量可湿性粉剂的检测结果更可靠;对于乳油,单点校正法与其他两种方法的斜率有显著性差异(置信水平 $\alpha=0.05$ ),这可能是由于单点校正法在测量过程中根据产品标签确定称样量,但样品标称含量与实际含量是有差别的,实际测量过程中待测组分与标准样品的响应值不可能完全一致,采用单点校正法会产生较大误差<sup>[4]</sup>。标准加入法的斜率与标准曲线法的斜率没有显著差异(置信水平 $\alpha=0.05$ ),说明本文检测的乳油基质效应对测定结果的影响不显著,但标准加入法操作过程较为复杂,样品需要量大,在处理大量样品或者对农药产品进行监督抽查时,会影响检测效率,同时需要大量的标准品,可采用标准曲线法定量更快速准确。

### 2.3 3种定量方法测定结果 $t$ 检验

为了研究3种定量分析方法在检测不同产品时的差异,本文对7个不同厂家的产品分别用单点校正法、标准曲线法和标准加入法进行了检测,检测结果采用成对二样本平均值的 $t$ 检验两两进行显著性检验。结果表明,在显著性水平 $\alpha=0.05$ 时,可湿性粉剂产品3种方法定量结果都有显著性差异( $p<0.05$ ) (表4);乳油产品标准曲线法和标准加入法定量结果没有显著差异( $p=0.95>0.05$ ),但单点校正法与另外2种方法测试结果都存在显著差异( $p<0.01$ ) (表5),这可能是单点校正法会受到标样称取、配置等操作引起的偶然误差,部分产品还会受到组成、待测成分等因素导致相应信号与其量的线性关系与标物响应与标物量的线性关系偏离,标准曲线法受环境影响较大,其截距偏离较大时会与单点校正法有显著差异,标准加入法解决了样品组分、基质等因素的影响<sup>[4]</sup>。

表4 吡虫啉可湿性粉剂3种定量方法测定结果 $t$ 检验

方法	标准曲线法	标准加入法	标准曲线法	单点校正法	标准加入法	单点校正法
平均	18.54	18.35	18.54	17.69	18.35	17.69
方差	59.66	57.62	59.66	52.29	57.62	52.29
观测值	16	16	16	16	16	16
泊松相关系数	0.999 3		0.999 8		0.999 1	
假设平均差	0		0		0	
df	15		15		15	
$t$ Stat	2.56		6.64		5.50	
$P(T\leq t)$ 单尾	0.011		$3.91\times 10^{-6}$		$3.08\times 10^{-5}$	
$t$ 单尾临界	1.75		1.75		1.75	
$P(T\leq t)$ 双尾	0.022		$7.82\times 10^{-6}$		$6.16\times 10^{-5}$	
$t$ 双尾临界	2.13		2.13		2.13	

表5 吡虫啉乳油3种定量方法测定结果 $t$ 检验

方法	标准曲线法	标准加入法	标准曲线法	单点校正法	标准加入法	单点校正法
平均	10.05	10.05	10.05	9.51	10.05	9.51
方差	4.59	4.55	4.59	3.96	4.55	3.96
观测值	14	14	14	14	14	14
泊松相关系数	0.994 7		0.999 8		0.994 2	
假设平均差	0		0		0	
df	13		13		13	
$t$ Stat	0.06		12.74		7.62	
$P(T\leq t)$ 单尾	0.47		$5.10\times 10^{-9}$		$1.90\times 10^{-6}$	
$t$ 单尾临界	1.77		1.77		1.77	
$P(T\leq t)$ 双尾	0.95		$1.02\times 10^{-8}$		$3.80\times 10^{-6}$	
$t$ 双尾临界	2.16		2.16		2.16	

### 3 结 论

本文利用HPLC法对不同剂型不同含量的吡虫啉农药产品进行测定,通过单点校正法、标准曲线法和标准加入法进行定量分析,对3种方法的标准偏差、基质效应和测定结果进行了 $F$ 检验和 $t$ 检验。结果表明,对吡虫啉可湿性粉剂产品,标准加入法曲线斜率与单点校正法和标准曲线法具有显著性差异,为消除基质效应对检测结果准确性的影响,建议选择标准加入法进行定量分析;对吡虫啉乳油产品,由于单点校正法与标准曲线法和标准加入法标准偏差具有显著性差异,单点校正法只有在标准曲线截距较小时才可使用,应用受限,且标准加入法操作较为复杂,因此选择标准曲线法进行定量分析,以节省时间,同时满足各类检测要求。不同定量分析方法对农药制剂产品有害成分的检测有影响,相关农药产品的国家、行业标准在制定过程中需要

考虑不同定量分析方法对测定的影响,以确保农药有效成分检测的准确性。

#### 参考文献

- [1] 潘兴鲁,董丰收,刘新刚,等.中国农药七十年发展与应用回顾[J].现代农药,2020,19(1):1-5;23.
- [2] 董记萍,付鑫宇,白孟卿,等.近三年我国农药产品质量分析[J].农药科学与管理,2019,40(7):13-21.
- [3] 李建兵,王建萍,孙娜,等.农药中非法添加成分检测方法的研究进展[J].农药,2018,57(3):157-161.
- [4] 刘绍仁,叶纪明,张百臻.浅谈单点校正法和标准曲线法及其在农药分析中的应用[J].农药科学与管理,1999,20(2):12-15.
- [5] 于建华,朱梅华,吉绍长,等.色谱法测定多种农药残留的基质效应研究进展[J].广东化工,2017,44(3):101-104.
- [6] 廖燕芝,黄辉,杨代明,等.GC-MS测定食品中丙烯酰胺含量的定量方法比较[J].食品与机械,2013,29(5):91-94.

(责任编辑:徐娟)

## 《现代农药》投稿简则

《现代农药》(双月刊)是由国家新闻出版总署批准在国内外公开发行的中国农药行业技术类期刊,并入选“中国科技核心期刊”。本刊主要报道未曾发表过的、具有新颖性的农药研究成果,分综述、研究论文和试验简报三个类型。投稿方式分为邮箱(agrochem@263.net)或投稿系统(<http://xdnyqk.com/>)。现将有关稿件要求禀告如下:

**题名** 文章应主题鲜明,内容新颖,条理清晰,文字简洁,数据可靠。题名应简明、具体、确切,概括文章的要旨。中文题名一般不超过20个汉字,英文题名一般不超过10个实词。

**摘要与关键词** 正文前有100~200字的摘要及3~5个关键词,中英文摘要均采用第三人称书写,应包括目的、方法、结果和结论,突出创新性。简报可省略英文摘要和关键词。

**作者与单位** 按排名先后顺序,用中英文写出全部作者及工作单位全称、所在城市和邮政编码,以\*标明通信作者。第一作者简介包括姓名、出生年份、性别、籍贯(某省某市/县人)、职称或学位、从事专业或研究方向、联系方式。

**字体及格式** 正文用5号宋体,每段首行缩进2字,标题一律左顶格排,层次划分不超过4级。正确使用简化汉字和标点符号。采用国家规定的统一计量单位与符号。

**图表** 文中图表力求精简,内容不应重复。图、表题、注释和图、表中文字均用中文,图题和表题用小5号黑体、居中;图、表中文字用6号宋体。表格采用国际通用的3线表。插图要绘制清晰,色谱图要附原图。表、图内数据须标明计量单位。

**农药名称** 应使用农药通用名称,制剂需注明含量和剂型,可在正文中首次出现时用括号标注英文通用名、商品名(注册商标)及生产厂家。

**参考文献** 参考文献只列作者阅读过、与文章内容密切相关、正式发表的主要文献资料,一般在20篇以内为宜。按正文中引用先后顺序编号,采用6号宋体,并在正文中引用处用方括号作上标加以标注,即……[1],……[2-4],……[3,5]。参考文献作者仅列前3名,3名后加“等”。作者姓名一律姓在前,名在后,外国人名可缩写为首字母(大写),但不加缩写点(.)。

电话 025-86581148 传真 025-86581147 邮编 210046 地址 南京经济技术开发区恒竞路31-1号