

# C O D E X   A L I M E N T A R I U S

国际食品标准



联合国粮食  
及农业组织



世界卫生组织

E-mail: [codex@fao.org](mailto:codex@fao.org) - [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org)

---

## 国际食品法典

质谱在农药残留定性、确认和定量分析中的应用指南

**CAC/GL 56-2005**

## 确认试验

在监督监测分析时，在样品中检测出与商品非正常相关的农药残留，或者检测出的残留量超过其最大残留限量，在出具报告前，获取确证数据非常重要，因为样品中可能会含有被误认为是农药的干扰物质。比如在气相色谱分析中，电子捕获检测器对邻苯二甲酸酯的响应和磷选择性检测器对包含硫、氮元素化合物的响应。

农药多残留分析方法通常包括两个阶段，即筛选（screening）和确认（confirmation）。图 1 为其过程示意图。第一阶段是通过分析原始数据来确定可能存在的农药残留，尽可能的避免假阴性。第二阶段是针对第一阶段发现的农药进行确认。根据第一阶段的结果报告决定在确认过程中的投入。在验证过程中，技术的选择依赖于其有效性，以及所花费的时间和成本。根据化合物的理化性质，利用色谱或质谱数据进一步分析，或者是通过不同分离技术和检测方法的结合运用进行验证分析。表 1 列出了一些可供选择的确认方法。

无论是农药残留的筛查还是确认，色谱保留时间窗口上的适当设置是非常重要的。应该注意的是，在分析开始前，仪器需要被适当的调整；而且每一批分析前都需要进行系统适用性检验<sup>1</sup>。保留时间数据库也需要在当前的设置条件进行调适<sup>2</sup>。在保留时间较短的区域，根据峰形毛细管气相色谱的容差区间为绝对保留时间的 1.5%~3%。而对保留时间较长的区域，绝对容差区间随着保留时间的增大而增加。保留时间少于 500 秒的，相应的容差区间应小于 1 秒；保留时间在 500~5000 秒之间的，推荐的区间是相对保留时间的 0.2%。对于更高的保留时间，6 秒是一个合适的容差区间。

验证试验可以进行定量和/或定性，但是在大多数情况下，两种信息都需要。但当在检测限浓度进行残留物确认时，会产生一些特殊的问题，即在这个水平对于残留物的定量非常困难，但提供充分的定量和定性信息是必要的。

验证试验的必要性依赖于样品的类型或农药的已知应用历史。在一些农作物和商品中，某些残留物经常被检测到。对于同类的一系列样品，可能含有相同的农药残留，因此我们可以通过随机抽取小部分的样品来确认残留物的类型。类似地，当一个众所周知的特定农药被应用于样品材料中时，则几乎没必要再进行验证试验，尽管可能会有一些随机选取的样品结果需要进行验证。如果有空白样品，那么这些空白可用于检测是否存在干扰物质。

对于分析人员而言，进行阳性鉴定是个容易出现判断问题的步骤，尤其要注意方法的选择，从而尽可能的减小干扰物质的作用。技术的选择依赖于适当仪器的可用性和实验室的专业技术。

### 气相色谱/质谱分析（GC/MS）

质谱数据可以给出残留物验证最明确的证明，因此如果有适当的质谱仪器，那么将选择质谱作为确认技术。这种技术也通常用于残留物的筛选（阶段 1）。残留物的质谱测定常常和色谱的分离技术结合运用，从而可以同时提供离子质核比的保留时间及其丰度数据。不稳定分析物在色谱系统的定量传输存在着与其他检测器类似的问题。在定量方面，应该选择信噪比好，干扰少的离子，即分析物的所有碎片离子中最特征的离子作为监测离子。

在选择离子监测（SIM）模式下，以接近于临界水平浓度的农药标准溶液注入系统，从而建立在该浓度下的离子比和保留时间的容差区间。离子比的容差间隔应该在绝对离子丰度比的±30%以内。当选择的离子比中有 2（或 3）个出现在所建立的容差区间内时，则该残留物可以被确认<sup>3</sup>。而对于少部分农药，质谱只能出现一个特征离子。这种情况下，需要寻找替代的验证技术。

当检测到的离子仍然表明可能存在某种残留物时，那么报告会被暂时的生成。然而，当报告结果导致监管行为产生，或者该结果被用于其他的目的（例如饮食摄入评估）时，分析物需要进行进一步的确认。这一过程可以通过向同一个 GC-MS 中注入疑似分析物的基质匹配标准品而获得，从而补偿基质对离子比的影响。在这种情况下，我们接下来要进行基质匹配标准品和疑似分析物的进样。标准品中分析物和样品中的疑似目标物的相对保留时间的偏差应小于 0.1%。同时样品中的两个离子比应处于基质匹配标准品离子比的容差区间内。如果残留物的分析符合上述的一般规则，那么就可以确定该残留物质。但是如果离子比不处于容差范围内，那么就需要通过利用其他的分析方法进行再次的确认。表 1 列出了一些例子。

通过获得完整的电子轰击质谱（实际上，一般质荷比从 50 开始，到超过分子离子量）可以进行进一步的质谱确认。在确定残留物成分时减少干扰离子的存在是一个重要考虑。残留物的进一步确认可以通过以下几种方式获得：（1）另一个色谱柱的使用；（2）另一种电离技术的使用（如，化学电离）；（3）通过串联质谱检测选择离子的进一步反应产物；（4）在高分辨质谱下监测选择离子。

<sup>1</sup> Soboleva E. Ambrus A., Application of system suitability test for quality assurance and performance optimization of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis, *J. Chromatogr. A*. 1027. 2004. 55-65.

<sup>2</sup> Lantos J., Kadenczki L., Zakar F., Ambrus A. Validation of gas chromatographic Databases for qualitative identification of active ingredients of pesticide residues in Fajgelj A. Ambrus A. (eds) Principles of Method Validation, *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 2000, pp 128-137.

<sup>3</sup> Soboleva E. Ahad K. Ambrus A. Applicability of some MS criteria for the confirmation of pesticide residues, *Analyst*, 129, 1123-1129, 2004.

质谱检测应该满足分析质量控制标准，类似于其他的应用系统。

### 高效液相色谱(HPLC)和高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)

相比于气相色谱，HPLC 进行分离后，残留物的确认过程存在更多的问题。如果通过紫外吸收检测，那么一个完整的光谱可以提供充分的识别证据。然而，一些农药的紫外光谱很难确认，因为具有相同官能团的或结构的许多其他化合物产生相似的紫外吸收，另外干扰物质的共流出也会产生一些其他问题。在多波长条件下产生的紫外吸收数据可以用于支持或反对残留物的鉴定。但是，一般来说，仅仅这些数据不足以用来定性分析。荧光数据可以作为紫外吸收数据的补充支持。LC-MS 可以提供好的支持证据，但是因为获得的谱图非常简单，有很少的特征碎片，所以由 LC-MS 得到的结果不能进行确定。LC-MS/MS 是一种更强大的技术，同时具有选择性和特异性，并且可以提供关于定性的可靠证据。LC-MS 技术易受基质影响，特别是抑制效应，因此 LC-MS 需要用标准添加法或同位素标记的标准品进行定量确认。衍生化也被用于 HPLC 的残留物确认（表 1）。

### 薄层色谱法 (TLC)

在某些情况下，通过 TLC 对气相色谱的结果进行确认会更方便。TLC 鉴定基于两个标准进行，即 Rf 值和可视化反应。由于生物测定（例如，酶-，真菌生长，叶绿体抑制）只针对某一类化合物具有特异性和敏感性，一般不会受到共提取物的影响，所以以生物测定为基础的检测方法特别适合于定性分析<sup>4</sup>。科学文献中有大量关于该技术的参考文献报道<sup>5</sup>。然而，薄层色谱法的定量效果却非常有限。但该技术可以通过进一步的扩展延伸来满足定量的要求，如通过先移除我们所感兴趣的化合物，及其 Rf 值所对应的区域，接着对所移除的薄层材料进行洗脱，然后再进行进一步的物理或化学验证分析。农药标准溶液也应该和样品提取物一同在板上进行点样，从而排除 Rf 不可重复的问题。加大提取液和标准品的点样量也可以提供有用的信息。薄层色谱法的优点是速度快，花费低，适用于热敏感性物质；缺点是相对于仪器色谱技术，灵敏度低，分离能力差，在用化学变色反应进行检测时需要更有效地净化。

### 衍生化

当以衍生化为基础进行选择离子的 GC-MS 验证时，所选的离子必须是残留物的特征结构碎片，而不能是衍生化试剂的碎片。虽然说衍生化可能是残留物身份确认的一种有效方式，但我们应该考虑的是在此同时，衍生化也会对定量确认分析增加额外的不确定性。

这方面的确认可以分为以下三个方面。

#### (a) 化学反应

现在经常使用的是小规模化学反应。化学反应可以导致农药产生降解、加和或者缩合产物，这些产物又可以通过色谱技术进行重新检测。相对母体化合物而言，反应所生成的产物具有不同的保留时间或检测器响应。农药标准品样品需要和疑似残留物进行相同的处理，以至于每个样品中的残留物可以直接进行比较。同样，添加回收试验也需要进行，证明在样品基质存在下，衍生化反应可以发生。在衍生化过程中，衍生产物通过衍生试剂的特性进行检测，所以可能会有干扰发生。一篇关于用化学反应进行确认试验的综述在 1981 年被 Cochrane, W.P 出版（化学衍生在农药分析中的应用，Plenum Press, NY (1981)。化学反应具有快速，便于操作的优点，但需要购买或纯化特异性的衍生化试剂。

#### (b) 物理方法

光化学转化是一种有用的物理技术，可以将农药残留转化为具有再生色谱模式的一个或多个产物。农药标准品样品和提取物样品需要用同样的方式进行处理。当样品含有不止一种农药残留物时，结果的分析上会有些困难。因此，这样的情况下，样品需要在开始反应前用 TLC，HPLC 或者柱分级进行特定残留的预分离。

#### (c) 其他方法

许多农药易受到酶的降解或转化作用。相比于常规的化学反应，这些反应具有特异性，如氧化、水解或脱烷基化作用。相对于母体农药，得到的转化产物具有不同的色谱特征，而且如果将农药标准品和反应产物进行对比，可以获得确认信息。

4 Ambrus1\* Á., Füzesi2 I.; Susán2 M.; Dobi3 D., Lantos4 J., Zakar5 F., Korsós4 I., Oláh3 J., Beke3 B.B., and L. Katavics5 A cost effective screening methods for pesticide residue analysis in fruits, vegetables and cereal grains, *J. Environ Sci. Health* B40, 297-339, 2005.

5 Ambrus Á.; Füzesi I.; Lantos J.; Korsos I.; Hatfaludi T. Repeatability and Reproducibility of Rf and MDQ Values with Different TLC Elution and Detection Systems. *J. Environ Sci. Health* B39 2004 accepted for publication.

6 IUPAC Report on Pesticides (13) (Bátora, V., Vitorovic, S.Y., Thier, H.-P. and Klisenko, M.A.; *Pure & Appl. Chem.*, 53, 1981, 1039-1049

表 1. 适用于残留物筛选(阶段 1)和确认(阶段 2)的检测方法

		阶段 1: 筛选							
		气相 - 毛细管色谱柱 -ECD, NPD, FPD, PFPD	GC-MS	LC-MS	LC-DAD 或紫外扫描	LC-UV/VIS(单波长)	LC- 荧光检测	气相 - 填充色谱柱 -ECD,NPD,FPD,PF PD	薄层色谱法-酶、真菌生长或叶绿体抑制
阶段 2: 确认	气相-毛细管色谱柱 - ECD, NPD, FPD, PFPD	x <sup>1</sup>	x <sup>1</sup>	x	x	x	x	x	x
	GC-MS	x	X <sup>12</sup>	x	x	x	x	x	x
	LC-MS	x	x		x	x	x	x	x
	全扫描技术	x	x	x	x	x	x	x	x
	串联质谱, 高分辨质谱, 其他离子化技术	x	x	x	x	x	x	x	x
	LC-DAD 或紫外扫描	x	x	x		x	x	x	x
	LC-UV/VIS(单波长)	x	x				x	x	x
	LC-荧光检测	x	x		x	x		x	x
	薄层色谱法 - 酶、真菌生长或叶绿体抑制	x	x	x	x	x	x	x	X <sup>23</sup>
	衍生化	x	x	x	x	x	x	x	x
特定的同分异构体	x	x	x	x	x	x	x		

1. 柱子的极性不同, 可能导致残留物洗脱顺序的不同以及污染物在出峰位置的干扰, 所以可以选用不同极性的柱子, 或选用另外一种检测器
2. 如果监测不同的离子, 或者容差区间以基质标准品为基础建立, 那么同一个气质也可以用于验证。
3. 利用不同极性的流动相或固定相。

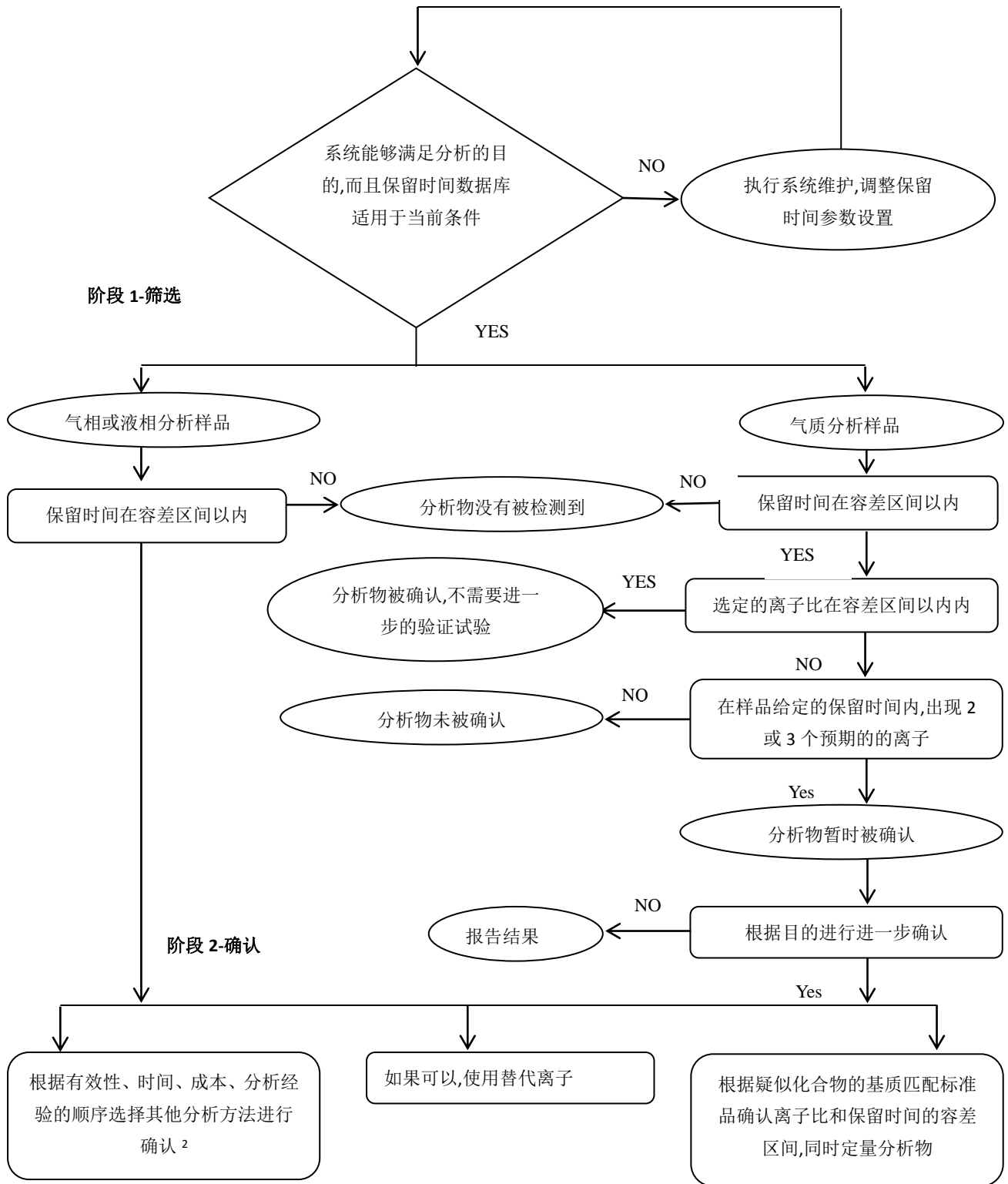


图 1. 农药残留的筛选和确认过程（阶段 1 和 2）示意图

1. 不正常值，包括禁用物质，超过最大残留限量值或者研究需要，如暴露评估。
2. 参考表 1 中的其他验证方法。
3. 对于小部分农药，质谱中只有一个特定离子。这种情况下，需要寻找替代的验证方法。