

## 第五章 农药制剂分析方法与农药残留实验室质量控制

### 一、CIPAC 农药制剂分析方法准则

#### (一) CIPAC 简介

国际农药分析协作委员会的英文简称是 CIPAC，它是 Collaborative International Pesticides Analytical Council 的缩写，其官方网址是：  
<http://www.cipac.org>

#### 1. CIPAC 的历史

CIPAC 的前身是 CPAC，即欧洲农药分析协作委员会(1957)。1970 年，更名为 CIPAC，成为世界性组织并出版 CIPAC 手册第一版；1971 在英国正式登记，是一个非盈利性组织。

#### 2. CIPAC 的目标与任务

CIPAC 的目标与任务是促进农药产品分析方法以及制剂的物理化学试验方法取得国际间一致、促进实验室内部规范操作程序、资助旨在促进上述领域工作的会议、颁布标准化分析方法、加强与其它组织间合作。

#### 3. CIPAC 会员组成

CIPAC 的正式会员一般为每个国家一个。此外吸收企业和科研单位通讯员、观察员。会员组成特点：保持与政府部门相对独立；企业界专家参与协作或研究、讨论。

#### 4. CIPAC 方法的提出与验证程序

CIPAC 方法的提出与验证程序一般包括以下几个步骤，即：

(1) 组织者提出建立有关分析方法的任务，CIPAC 将任务指派给某区域的 PAC。

(2) 组织者将详细分析方法和资料交 PAC，确定试验方案。

(3) 少数实验室进行小规模试验，由组织者评估其作为进一步协作研究的可能问题。

(4) 交 CIPAC 讨论是否作为国际间协作，必要时对数据进行更细致查看。

(5) CIPAC 秘书处确定协作实验室和分发样品、资料。

(6) 国际协作结果交 PAC 讨论，通过后交 CIPAC。

(7) 方法连同实验数据公布；方法通过或修订。

## 5. CIPAC 手册颁布的分析方法

CIPAC 手册颁布的分析方法有以下几种类型：**CIPAC 方法 (F)**：为获得全体成员国可以接受结果的方法；**CIPAC 暂定方法 (P)**：候选的 CIPAC 方法，预期经过阶段性试验可以成为 CIPAC 方法，或者是具有最小缺陷的然而却是目前所能获得的最好方法。**CIPAC 暂行方法 (T)**：由于技术上或其它原因尚不能在整个国际范围内进行协作研究然而却满足了某些特殊需要的方法。此外，CIPAC 手册中涉及的一些非正式出版发布的方法或者方法的某个部分可以通过 CIPAC 秘书处索取。

**6. CIPAC 发展展望**：CIPAC 鼓励组织者在通用的体系上建立标准、CIPAC 方法反映分析技术的进展、CIPAC 鼓励建立仪器分析方法，对物理化学性质作更客观测试。

## (二) CIPAC 关于农药原药与制剂分析方法的准则与指南

进行产品的化学分析选取分析方法必须遵守三个基本原则，即：采用标准分析方法；可以自行开发并验证用于质量控制的分析方法、使用实验室熟练掌握的且经常使用的分析方法。

### 1. 有关定义

- (1) 误差：本准则中确认的误差类型有：

①偶然误差：此类误差通常微小，由偶然误差导致的结果，多数接近于平均值范围，换句话说，由它们决定方法的重复性或再现性。

②系统误差：此类误差使所得结果偏离，其平均值高于或低于实际值（如方法中某些误差可导致不正确结果）。

(2) 精密度的基度：精密度的基度是偶然误差的基度，可用重复性和再现性表示，此类术语在 ISO5725 中均有说明。

①重复性指采用相同方法，在同一实验室用同一试验物质，同一操作者使用同一设备，在短时间间隔内，在相互独立试验中所获得结果的一致性。

②再现性指采用相同方法，在不同实验室用同一试验物质，由不同操作者使用不同设备所得试验结果的一致性。

(3) 准确度：方法的准确度指所得结果与分析样品中真值的符合程度。

(4) 线性范围：试验方法的线性范围指在一定范围内所得试验结果与分析样品浓度（剂量）成比例的性能。

(5) 特异性：方法特异性定义为对所分析的特定样品产生的特定信号。

2. 单个实验室内部的误差来源：主要包括以下因素，即每个分析测试员之间的差异，仪器之间的差异，实验试剂与消耗品之间的差异，一定时间内以上因素引起的差异。

### 3. 方法确证（method validation）的内容

方法确证应该包括以下基本内容：

- (1) 在方法中被分析物质（和内标物，如适宜）响应的线性。
- (2) 分析方法精密度的评价。
- (3) 分析方法准确度的证明。
- (4) 赋形剂中无干扰物的证明。
- (5) 被测定物质种类的确定的。

#### 线性范围的考察：

分析物质响应的线性范围，至少应大于分析物标明浓度的± 20%。至少测

定 3 个浓度，每个浓度测定两次，应附上此线性图、斜率、截距和相关系数等数据。

测得的斜率可证明响应与分析物浓度之间有明显的相关性。在标明值±20%范围内，其结果不应与线性有显著偏离，即相关系数（y）应>0.99，否则提交方法必须同时提供如何保持本方法有效性的说明，如故意使用不成线性响应的方法，也必须提出解释。

#### 精密度考察：

- ①化学分析：在此类准则中要求对重复性简单评价即可。至少作 5 次重复样品的测定，同时简单评价其结果，包括相对标准偏差 RSD%。

如认为合适，对测定中偏离数据可用 Dixons 或 Crubbs 试验检验，但要舍去某些结果时，必须明确指出，并应设法解释为何产生偏离的数据。

- 

数据结果的合格性应以修改的 Horwitz 公式为依据：

- 

$$RSDy < 2^{(1-0.5 \log C)} \times 0.67$$

- 

式中 C 为样品中分析物浓度，以小数计。

Horwitz 公司的推导和使用实例列于（附件 1）中。

②物理化学性能测定：当进行物理或物理化学性能测定时，使用官方方法（如 CIPAC 或 OECD）即不需要再予确认。本原则亦适用于对此类方法略有改动的情况，如使用其他方法时，必须测定其重复性，但无须遵守 Horwitz 公式。

#### 方法的准确度评价：

评价方法的准确度，至少需要 4 个已知含量的实验室样本进行测定，其结果可用 students t 统计或附件 II 中其他适用方法检验。

### **非分析物质的干扰证明：**

在评价准确度时，通常包含非分析物质的干扰，因赋形剂中的任何干扰物均会导致分析方法出现系统误差。然而分析时应同时测定不带赋形剂的空白样品，或证明其无干扰，如有干扰时可测定数量，样品色谱图和其他结果均应附上。

当原药有效成份中有特定杂质时，必须证明在相同分析条件下此类杂质的响应值不应大于被分析物或内标总峰高的 0.3%。如有此类偏离，必须在提交报告中说明其数据是否已经校正。

### **方法的特异性：**

方法特异性应以被分析物质的特点来确定，通常对此类化合物进行质谱测定，如使用 GC / MS, LC / MS 的二极管阵列检测器或峰收集后使用质谱测定。

在使用色谱法测定时，通常以此作为鉴别有效成份或确认分析标准品的方法。当制剂分析是根据其中一种方法时，不需要重复此项工作。

对创新的色谱法，必须确定其特异性，如使用质谱法，则可由质谱图来推断。

实际测定时被测定物质的种类应在提交登记资料时阐明，否则必须解释其理由。

### **对多种制剂适用性的确认：**

对多种制剂适用性的确认数据：确认数据一般为针对某一特定的制剂，但制造商可能生产许多类似的制剂，并可能使用同一分析方法，其交互使用规则为：

①制剂中应含有相同（或很类似）助剂，改变助剂性质时，应检验可能的干扰。

②制剂在物理化学性能上不应有显著区别（如 P<sup>''</sup>值）。

③在测定溶液中，有效成份浓度必须保持在标明的线性范围内。

④有关助剂浓度的任何变化，不应产生明显干扰。

提交进行交互使用的方法，应考虑以上几点。

(5) 提出确认的任何方法，只能使用经过认证过的参比物质（或来源于参比物质）作为标准品，本要求不适用于内标物。

#### 4. 重复性可行性的 Horwitz 公式

•

适用于本文的下述实例浓度范围是 0.25%~100%。

•

$$\bullet \quad \%RSDR = 2^{(1-0.51\log C)}$$

•

• 式中% RSDR 是实验室间的变异系数 (CV), C 是样品中被分析物的浓度, 以小数计。

•

• 因此 100% 的纯样品, 则  $C=1$ ,  $\log C=0$ ,

•

$$\text{故 } \%RSDR = 2^{(1-(0.5 \times 0))} = 2;$$

•

50% 的样品(如 500 克 / 千克可湿性粉剂), 则  $C=0.5$ ,  $\log C=-0.3010$ ,

$$\text{故 } \%RSDR = 2^{(1-0.5 \times (-0.3010))} = 2.22;$$

•

其它数值为:

对 20% 的样品,  $\%RSDR=2.55$ ;

• 10%,  $\%RSDR=2.83$ ;

• 5%,  $\%RSDR=3.14$ ;

• 2%,  $\%RSDR=3.60$ ;

• 1%,  $\%RSDR=4.00$ ;

• 0.25%,  $\%RSDR=4.93$ 。

• Horwitz 注意到 RSD (重复性变异系数) 通常为 RSDR 的 1/2 和 2/3 之间, 为此重复性的变异系数即 Horwitz 的值为  $RSDR \times 0.67$ 。

根据以上数值, 可得出如下结果:

•

被分析物%	Horwitz RSDR	建议的 RSDY
100	2	1.34
50	2.22	1.49
20	2.55	1.71
10	2.83	1.9
5	3.14	2.1
2	3.6	2.41
1	4	2.68
0.25	4.93	3.3

• 未经修改的 Horwitz 上式是 CIPAC 协作研究试验方法可行性的依据。

• 1.3.4 下列阐明评价方法准确度的各种途径:

(1) 一种方法的准确度, 可以从测定已知分析物含量的大量“样品”的结果获得。这些样品由实验室制备, 加入已知量的分析物(其数量根据方法要求)并带有助剂的混合物。加入的被分析物必须是已知有效成份含量的原药。在分析样品过程中应消除取样误差, 并严格按照提出的方法, 至少测定 4 个回收率, 测得的数据可用下列办法处理:

- ①计算回收率平均值和回收率的相对标准偏差。
- ②对这些结果和评价重复性的结果进行 F 检验, 以确定回收率结果的 RSD 与评价精密度结果之间无显著差异。
- ③如能达到②项对回收率结果可用 Student t 检验, 其目的是为证明获得回收率(平均值)与加入浓度之间差异仅仅是由于偶然误差(无明显的系统误差)。

$$|T| = |(\bar{x} - \mu) \sqrt{n} / S|$$

X=样品平均值,  $\mu$  =真值, n=样品数量, S=标准偏差。t 在不同自由度(n-1)的临界值在一般的统计表中列出。如果算得的 t 值未超过临界值。证明在给定的置信区间(95%即可)没有显著系统误差。

(2) 上述表达式可再整理为平均数的置信区间, 可定为一个范围,

样品的真值是在此范围内（在给定的置信度）

$$\mu = \bar{X} \pm t (s/\sqrt{n})$$

自配的制剂平均回收率的计算如下：

$$\text{平均回收率 (\%)} = \text{测定含量的平均值} \% \times 100 / \text{理论含量} \%$$

平均回收率应在以下的范围内：

有效成份标明值%	平均回收率%
>10	98.0~102.0
1~10	97.0~103.0
<1	95.0~105.0

•

(3) 对上述两种情况，本消除取样误差必须分析一种完全自配制剂。相同步骤也可用于已知成份混合物的子样品分析，但必须注意，在取样时如制剂样品不均匀，则将使平均数的置信区间数值人为增大。

• (4) 当分析样品很难获得重复结果的制剂（如颗粒或块状饵料），可通过添加标准品的方法来计算准确度。在这种情况下，必须提交如何添加标准品的细节报告。

#### 1.4 方法验证的程序

**方法验证可以分为 4 个阶段：** 验证前期预备（Pre-validation）、验证各指标（Validation）、研究其性能（Performance Check）、统计分析（Statistical Analysis）。但方法验证不是一个简单的过程，它可以是一个持续的、通过验证分析方法不断提高分析的可靠性的手段；因此一个阶段性的分析方法验证的完成可意味着一个改善的新的验证过程的开始。

**方法验证的重要性：** 确定方法的应用范围与局限性、由质量控制样本确定



结果的可接受范围、验证分析测定是否真实可靠。

#### 农药分析方法验证的基本内容包括：

- 准确性 Accuracy: 与真值的偏离程度
- 线性范围 Linearity: 分析的可靠范围（定量分析的基础）
- 精确性 Precision: 结果之间的接近程度
- 灵敏度 Sensitivity: 不同浓度样本的响应大小
- 特异性 Specificity: 分析物定性的考察
- 添加回收率 Recovery: 测定样本中分析物全部的能力
- 重现性 Reproducibility
- 稳定性 Stability 分析方法各步骤中分析物稳定性
- 抗干扰能力 Robustness
- 分析范围 Analytical Range

#### 农药分析方法验证的基本手段：

- 不同分析人员在不同天对同一样本或方法进行至少 4 次测定
- 添加可能干扰样本分离的类似物以确立色谱分离方法并保证分析的特异性
- 通过添加标准品确定回收率水平
- 添加稳定性分析物测试分析流程重样本制备与储存的稳定性
- 标准校正曲线最好 3—5 浓度水平(level)，每个点 7 个重复（6 个自由度），需要考察相关系数 ( $>0.997$ )、以及斜率 Slope 的可置信范围、截距 Intercept 的可置信范围、相对残差的标准偏差 (Standard deviation of relative residual,  $SS < 0.01$  or  $0.02$ )

#### (三)、验证实例：甲霜灵 CIPAC 方法的适应 (Adoption) 与验证 (Validation)

## 1. 实例背景与研究目的:

CIPAC 方法中有许多种农药的分析方法,它们是保证农药质量的有力武器.本节选取一种 GC 柱和一种 HPLC 柱,拟对多个农药进行测定(MP 程序),以达到利用同一仪器和色谱柱完成多个农药的定量测定,因此对 CIPAC 或 AOAC 方法进行验证是非常必要的。

现有 CIPAC 方法: 采取填充柱、内标物与样本保留时间相差较大, 若采用粗口径毛细管柱, 保留时间相差较大。

预计优化措施: 采取 0.53\*15M 粗口径毛细管色谱、分流进样、较低浓度 200—800ppm 的样品进样和与 CIPAC 方法不同的内标。

## 2 色谱分析条件的初步建立

2.1 两根色谱柱 A: CPSIL 8 CB; B: CPSIL 19CB, 0.53 or 0.32mm. GC-FID, 采用恒温条件, 可根据 MP-GC 初步确定, 也可参照 CIPAC: (如甲霜灵柱温 205 度, 进样口 225 度, 检测器 240 度; 内标物: 待选。 分别进标样、可能的内标物、样本提取溶液, 以确定初步的色谱条件。要求: 分析物和内标物均在 4—8min 出峰; 峰形对称;

在两根柱子上有不同的相对保留值(两根柱子可以用不同的温度); 不能有杂峰干扰。

## 3. 系统稳定性测试 (System Suitability Test, SST)

进样重复性的测试:

- 系统稳定后, 进行系统测试 SST.
- 取标样和内标的混合物, 重复进样 5 次, 计算 SD 和 CV.
- 要求: (对于不分流进样), (标样/内标) 比值  $CV \leq 1\%$  (较难的化合物最差  $\leq 2\%$ )。单个峰  $CV \leq 5\%$  (最差  $\leq 10\%$ ), 保留时间  $CV \leq 0.5\%$

一些农药和一些内标物在典型测试条件下不稳定, 较难获得稳定结果。下表的

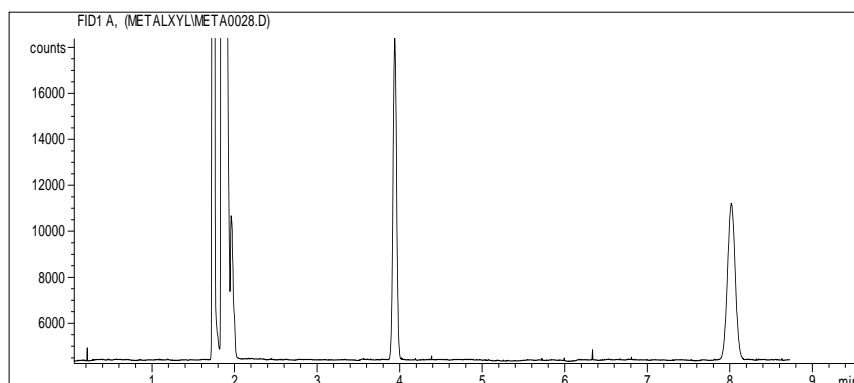
数据可以作为重要的参考。如三唑酮、甲氰菊酯的 GC 分析较难获得稳定结果。

表 一些农药的分析条件的稳定性测试结果

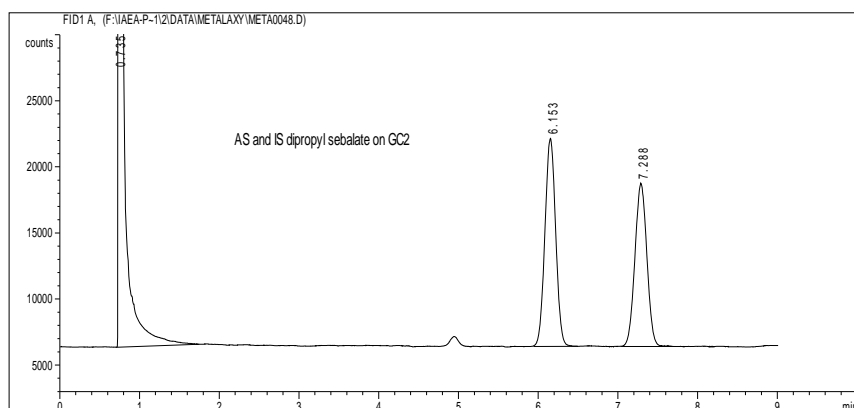
农药	内标	有效成分		内标		有效成分/内标
		Signal CV (%)	tR CV (%)	Signal CV (%)	tR CV (%)	CV (%)
乐果	邻苯二甲酸二丁酯	15.28	0.8	14.89	0.57	0.85
甲氰菊酯	邻苯二甲酸二丁酯	4.24	0.13	5.03	0.35	0.79
克菌丹	邻苯二甲酸二丁酯	22.77	0.47	23.68	0.46	1.24
brompropilate	邻苯二甲酸二丁酯	9.62	0.1	8.98	0.15	0.83
百菌清	邻苯二甲酸二丁酯	17.59	0.21	18.77	0.2	1.42
dichlobutanil	邻苯二甲酸二苯酯	33.1	0.31	36.04	0.17	2.48
戊唑醇	邻苯二甲酸二丁酯	33.97	0.27	27.74		1.81
三唑酮		28.07	0.45			8.1
fozalone	邻苯二甲酸二丁酯	20.15	0.36	18.63	0.76	2.21
甲氰菊酯	邻苯二甲酸二丁酯	29.86	0.47	23.63	0.77	6.98
丙环唑	邻苯二甲酸二丁酯	15.36	0.08	14.03	0.04	1.51
除草通	邻苯二甲酸二丁酯	12.64	0.45	13.21	0.45	0.66

本课题选取 CP-8 和 CP-19 两根不同极性的 GC 色谱柱对多个农药制剂进行分析，不同极性柱可以考察在某一根柱子上是否有共流出物或者干扰物质，

从而确定一种实验室常用的色谱分析方法分析多种农药制剂。以甲霜灵为例，最后选取邻苯二甲酸二乙酯或者丙二酸二丙酯为内标，先考察它们的色谱行为和进样重复性。选取内标时考虑到出峰时间在 3.5-8.5min 之间，且内标和主峰互不干扰。



GC1: CP-8 column, 224 degree column temp (邻苯二甲酸二乙酯 + 甲霜灵)



GC2: CP-19 column, 220 degree column temp (丙二酸二丙酯 和 甲霜灵)

系统测试的结果表明，甲霜灵和内标物在 GC1 上的重复性良好，

## Repeatability of 6 injections of 甲霜灵 and IS on GC1

	内标 Area	内标 Height	内标 RT(min)	样本 Area	样本 Height	样本 Rt (min)	样本/内标 比值 (ratio)
	41212	6254.8	7.761	42206	7252.6	7.334	1.0241
	41315	6363.5	7.76	42583	7408.9	7.332	1.0307
	42858	6422.4	7.759	43793	7316.7	7.333	1.0218
	41854	6556.4	7.761	42670	7552.7	7.334	1.0195
	41433	6398.6	7.761	42889	7389.5	7.334	1.0351
	40552	6218.4	7.745	41619	7187.7	7.317	1.0263
Average	41537	6369	7.7578	42626	7351.4	7.3307	1.0263
SD	772.37	122.15	0.0063	724.72	128.87	0.0067	0.0058
CV (%)	<b>1.859</b>	<b>1.918</b>	<b>0.082</b>	<b>1.7</b>	<b>1.753</b>	<b>0.092</b>	<b>0.566</b>

### 4 样本测试

提取：严格采用 CIPAC 方法进行样本的提取和制备。称取（精确至 0.1mg）样品，使之含有效成分 380—420mg，置于 100ml 容量瓶中，加 50ml 丙酮，超声波震荡 10min，使之溶解。将惰性物质沉淀或离心，用上清液进样测定。（必要时需稀释，最好用重量法稀释）

### 5 是否存在干扰物的测定：

- 制剂空白（blank formulation）的处理，以确证色谱条件的可靠性
- 用同样的方法提取制剂空白（但不加内标），并进样；
- 将制剂空白的提取液浓缩一倍（如 4ml→2ml），增加检测灵敏度使之达到有效成分信号的 0.01 倍，然后将浓缩液进样。
- 判断在目标物与内标物附近是否有杂峰干扰，记录其保留值。

- 若有，需改变温度条件或变换内标物，以消除干扰。

#### 6 校正曲线的制作：

- 标样浓度设为制剂有效成分浓度的 0.8、1、1.2 倍，分别单独配制，直接用内标溶液配制，使所有溶液中内标物浓度一致。进行三点校正。
- 首先配制足够的内标溶液，足以配制所有的样本和标样，空白除外。
- 标样称样量不能过小，需保证标样溶液的  $CV \leq 0.25\%$ 。
  - 用三点法校正，每一浓度进样两次。3×2 injection
- 计算线性回归方程、相关系数、斜率、截距及 relative residues 的置信区间、SD。
  - 要求：回归相关系数  $\geq 0.997$ ，relative residues 的  $SD \leq 0.01$ （最差 0.02），截距不能与 0 有显著性差异

#### 7 样本分析：

- 在 A 柱上分析样本
- 各重复两次。结果标记为 METWPA11-METWPA52。检查重复进样是否在重复性范围之内：
- $A_{max} - A_{min} \leq 3.64 * CV * X_{mean}$ ，  
其中  $CV_{gc}$  已知， $X_{mean}$  为两针重复进样的平均值。
  - 用三点校正法计算有效成分含量。
  - 比较不同批次的色谱图，是否有多余的峰出现。
- 计算其相对于有效成分和内标物的保留值。

#### 8 分析同一样本的重复性考察：

- 对同一样本三个部位分析结果应符合：
- $C_{max} - C_{min} < 3.31 * r / 2.8$

（其中，r 为 CIPAC 方法手册中规定列出的重复性限）

表 分析同一样本三个部位的考察：

RATIO of AS/IS	Content	Average	SD	CV
1.126	39.36	39.28	0.104	0.266
1.122	39.21			
1.104	38.4	38.31	0.12	0.314
1.099	38.23			
1.113	38.76	38.6	0.225	0.584
1.104	38.44			
		Cmax-Cmin:	0.972	
		3.31*r/2.8:	1.773	
		r=1.5 (r=15g/kg, 查 CIPAC 手册中方法的重复性限 r, 可计算 Sr)		

从以上表格实测数据看，Cmax-Cmin 等于 0.972，小于 3.31\*r/2.8 的阈值，因此样本是均匀的。（如果样本可以确保均匀，如使用液体制剂，则说明实验测试人员的技术是可靠的，在统计控制范围以内。）

9 在 A、B 两根色谱柱上进行分析（两种方法）的比较研究：

- 建立和优化在 B 柱上的色谱条件
- 保证在目标化合物和内标峰附近无杂峰干扰
- B 柱上的校正曲线和样本分析
- 重复进样本，标记为 METWPB11---METWPB52。
- 两种方法的结果比较
- 用 paired t-test 检验，如无显著性差异，两种方法均得到确认；可用于今后的常规分析中，得到更多的数据。

方法 A			方法 B or reference method			
Replicate 1	Replicate 2	Average	Replicate 1	Replicate 2	Average	Difference
0.532	0.545	0.539	0.518	0.524	0.521	0.018
0.52	0.53	0.525	0.538	0.523	0.531	-0.006
0.535	0.531	0.533	0.527	0.519	0.523	0.01
0.517	0.526	0.522	0.513	0.531	0.522	-5E-04
0.529	0.523	0.526	0.521	0.528	0.525	0.002
SAra	0.007				Average	0.005
					SDdif	0.009
					tcalc=	1.127
					tcrit=	2.776

上表中的实测数据表明，在 GC1 和 GC2 上的两组结果是等同的，说明 GC1 和 GC2 中均没有干扰物质。若存在证据，如空白制剂的浓缩进样表明不可能存在干扰，则说明两种分析方法是可靠的、可以互相验证。

•



## 二、农药分析实验室 GLP 指南

GLP (Good Laboratory Practice) 是包括试验、设计、实施、查验、记录、归档保存和报告等组织过程的一种质量体系, 适用对象包括农药、兽药、工业化学品、食品 / 饲料添加剂等。在中国, 与化学品 GLP 相关的政府管理部门主要有四个。其中, 农业部负责农药、兽药和饲料的登记管理, 农业部农药检定所和中国兽药监察所共同承担 GLP 监督实施的具体工作; 国家环保总局负责新 (工业) 化学品的登记管理, 由有毒化学品登记中心承担 GLP 监督实施的具体工作。

中国农药 GLP 工作起步较晚, 但近几年在 GLP 体系建立尤其是 GLP 国际互认方面开展的工作很有成效。2002~2003 年农药检定所和沈阳化工研究院共同承担了'十五' 国家重大科技攻关项目' 新农药创制研究及产业化关键技术开发' 的子项目' 农药安全性评价 GLP / SOP 体系的建立和完善'。通过项目实施, 农业部制定和颁布了《农药毒理学安全性评价良好实验室规范》, 使国内农药有了第一个 GLP 专门标准。

GLP 可以定义为: 对从事实验的规划、执行、监督、记录和报告的实验室组织、工作方法和有关条件提出的法规或准则, 其目的是提高和保证数据的质量和有效性。

在国际贸易中要达到公平性原则, 这很大程度上依赖于分析结果的可靠性。在农药残留分析中, 分析结果的可靠性不仅取决于可靠的分析方法, 而且需要分析工作者的经验以及在农药分析中遵守良好实验室规范 (GLP)。以下准则和指南根据 CAC 法典第 2A 卷 Part1 “GUIDELINES ON GOOD LABORATORY PRACTICE IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS” 有关部分整理。

下面从三个互相关联的部分 (即**分析工作者**、**实验室资源**和**测试本身**) 来说明农药残留分析的良好实验室规范。

### 1. 分析工作者

农药残留分析包括取样、制备样本、提取、净化、仪器分析、定性定量分析、结果报告等一系列的操作过程, 分析人员要掌握这些单元操作要具备分析化学的基本素质并且要经过一定的培训。因为待测物的浓度通常在 mg/kg 至 tg/kg

之间，要求每一步操作都特别仔细。

实验人员应该有一定的专业知识结构和实验经验，要经过专门的培训课程使之掌握良好的实验技能并能熟练而正确地使用操作分析仪器。他们必须懂得农药残留分析的基本原则和分析质量保证系统的要求，必须了解分析方法的每一步骤的目的和按照规定的方法操作的重要性，同时注意任何对实验结果产生偏离的因素。此外在数据处理和结果表述方面要进行专门训练。所有成员的工作经历和培训情况都必须存档备案。

当建立一个新的残留分析实验室时，骨干人员应该到权威实验室参加培训实习。如果涉及的分析范围较广，到多个已认证的权威实验室培训是必要的。

## 2. 实验室资源

实验室和它的设备必须设置在规定好的地方，保证安全并且样品被污染的可能性最小，实验室应该用对该实验室中所使用的化学品有抵抗力的材料来建筑。在这种情况下用来接收储存、制备、提取和用仪器测定样品的房间最好相对独立，用于提取和纯化样品的地方必须满足溶剂实验室的条件，并且通风设备良好。如果需要，接收、储存样品的制备可以在一个房间中进行。**农药残留分析的最低要求是维持样品的稳定和提供足够的人身安全保证。**

2.1 实验室安全必须根据可取的条件和必要性加以考虑，在一些地方的残留实验室中规定的严格工作环境在其它地方可能就变得无法执行。在工作区应该禁止吸烟、吃东西和喝水。个人、家庭、工业上准备的用来扫除和装饰等设备应该减少到最低程度。因为它们会导致污染及其它一些问题。工作区只能存放一小部分溶剂，并且装溶剂的瓶子应该分开放，远离主要工作区。应该尽可能减少高毒或慢性毒性的溶剂和试剂。所有的废溶剂应该安全地储存起来，并且应该安全又环保地进行处理。

在主要工作区应该可以使用多数分析用溶剂而不置于对分析产生干扰。所有的设备如灯、浸泡软化机、冰箱应该是“无火花”或“防爆的”。提取纯化和浓缩步骤应该在一个通风良好的地方，最好在通风厨中。

当玻璃器皿在真空或压力下使用时应该用安全屏，实验室中应该有足够的安安全眼镜、手套和其它保护衣服、紧急清洗设施和处理泄漏设备。实验室中应该又

足够的消防设施。工作人员必须明白许多农药有急性和慢性毒性。因此在使用标准参考物质时有必要特别小心。

## 2.2. 设备和辅助设施

2.2.1 实验室需要充足的可靠的供水、供电和供应保证质量的各种气体。气体么从管道中输送，或者来自气体储存钢瓶。充足的试剂、溶剂、玻璃器皿，色谱材料等的供应是重要的。

色谱、天平、光谱等必须检定，并且它们的使用情况必须定期检查，所有的使用和维修的记录必须备案。对仪器测量来说，校正是很重要的。

用来进行绝对量测量的仪器必须定期校正，并且所有的校正记录应该备案。

2.2.2. 虽然仪器可能需要周期性的更新，仪器的性能只要满足工作的需要就足够了。

2.2.3. 所有的实验室需要足够范围的高纯度的含量已知的标准参考物质。标准参考物质的种类范围应该覆盖所有的实验室经常监测的目标化合物和一些代谢物标品。

2.2.4. 所有的分析标准、储备的溶液和试剂必须有干净的标有有效日期和正确储存条件的标签，应该注意保证标准参考物质的稳定性，同样也应该注意农药的标准溶液在储存期间或在蒸发溶剂，浓缩期间不被光和热分解。

•

## 3. 测试

### • 3.1. 避免污染

• 3.1.1 农药残留分析和常量分析的一个主要的明显的不同是污染问题，痕量污染物在最终用于测定的进样样品溶液中可能对测试产生干扰。例如结果的正偏差或者灵敏度降低，使得残留物不能被检出。污染物可能产生于建筑材料、试剂、实验室环境、分析过程或上述情况的加合，所有的玻璃器皿、试剂、有机溶剂和水在使用以前应该用空白实验来检验可能产生干扰的污染物。

• 3.1.2. 刷子、肥皂中含有杀菌剂、杀虫剂等，这些可能引起干扰问题，并且当用电子扑获检测器时特别明显，除了禁止它们在实验室中使用外，

没有任何其它办法来解决这些问题。

- 3.1.3. 润滑剂、密封胶、塑料、天然和合成橡胶，保护手套，来自空气压缩机的油和工业上制造的粗劣的套管、滤纸和棉花都能在最后测定中引起污染。
- 3.1.4. 化学试剂、吸收剂和普通实验室溶剂可能含有吸收化合物，这些都能在分析中产生干扰，所以纯化试剂、吸收剂是必要的并且有必要用重蒸溶剂。去离子水经常是值得怀疑的，最好用重蒸水，虽然在很多时候自来水和井水可能是令人满意的。
- 3.1.5. 玻璃器皿、注射器、气相色谱柱的污染来自与以前的样品或提取物的接触，所有的玻璃器皿必须用重蒸水或其它干净水彻底的清洗。然后用将药使用的溶剂润滑，用作残留分析的玻璃器皿应该分开保存。
- 3.1.6. 农药标准参考物质，应该在隔离于主要残留实验室的房间里，在适当的温度下储存。
- 3.1.7. 含有塑料的仪器应谨慎使用。如果它是一种污染源，那么它将被禁止进入残留实验室，其它含有可塑剂的材料也应该被看作是可疑的，但是PTFE通常是可接受的并且其它材料在一定条件下也可能是可接受的。
- 分析仪器应该放置在一个隔离的房间中，污染的本质和重要性是根据所用的测定技术的种类和需要测定的农药残留的水平而变化的。例如在基于气相色谱法和高效液相色谱法时是重要的污染问题，可能在用光谱测定是就不是很重要，反之亦然。对于相对高的残留水平来自溶剂和其它物质的背景干扰相对于低残留水平来说是不重要的。许多问题能够通过使用特殊的检测器来解决，而且如果污染物不干扰想测定的结果，它的存在是可以接受的。
- 3.1.8. 残留分析和制剂分析必须完全分析，并且由分开的实验人员来做每一项工作。样品的制备应该在一个与主残留实验室分开的地方，为了排除交叉污染。

## 3.2. 接收和储存样品

- 3.2.1. 实验室接收的每一个样品应该带有分析要求方面的信息以前和要求的储存条件，以及处理这些样品时的潜在的危險的信息。

- 3.2.2. 收样品时必须立即给样品一个唯一的样品代码，这个代码将跟随样品进行所有的分析过程直到报告结果，样品一个提交到一个适当的复检系统，并且保存其结果。
- 3.2.3. 样品的处理和再取样应该用已经证实了的对残留量的富集没有影响的过程。
- 3.2.4. 在理想情况下，样品应该远离阳光直射，并且在几天内分析完，然而在很多情况下，样品在分析前可能需要储存超过一年的时间，储存样品的温度应该在-20度左右。在这种温度下，残留的农药被酶分解的量时常低的。如果有任何可疑结果应该用同样的条件下，储存同样时间的样品来检验。
- 3.2.5. 如果样品将被冷冻，我们建议分析用的样品应该在冷冻前进行提取，为了让在储存期间水以冰的形式分离出来，我们必须注意保证所有的取样部分都被用于分析。
- 3.2.6. 不管是储存用的容器还是它们的盖子、塞子都不应该把装在容器里的化学物质带出来。容器必须是不漏的。所有的样品应该用永久标签清楚的标出来。所有的记录必须被保存下来，提取液和最终测定液不应该暴露在阳光直射下。

### 3.3. 标准操作规程 (SOP)

- 3.3.1. 所有的例行操作都应该有一个标准操作规程，一个标准操作规程应该包括所有的实验细节，应用信息、工作情况、可获得的测定限和计算结果的方法。它还应该包括关于任何来自方法、标准物质和试剂的危险。
- 3.3.2. 任何偏离标准操作规程的操作必须记录，并且经分析主管人授权。

### 3.4. 方法的验证

- 3.4.1. 进行方法验证所做的要求将依不同的方法而异，在一个根据最大残留限量和国家标准来监测的常规实验室在很多情况下将使用标准方法。必要时可对方法的各项参数进行验证，并且经常进行周期性的检查。
- 3.4.2. 无论何时一个实验室发展和修改了方法，影响其分析的因素应该被确立。例如用一个严格实验、严格的条件控制必须附到记录这种方法的各方面

的文献中，它们包括样品的大小、分流体积、样品净化系统的性能的变化，试剂或衍生物的稳定性。在分析物提取过程中溶剂效应、进样器、分离柱、流动相的性质（组成和流速）、温度、检测系统和干扰物，定性和定量在信号的测定和分析要求方面的关系被确立下来是很重要的。

- 3.4.3. 分析方法在它的开发使用中的情况，应该按照以下的标准进行检验。
- 这种方法所有的平均回收率（通过在空白中加入样品来测定）应该在70—120%内，对于一些特殊农药，或者混合基质可能难以达到满意的回收率。
- 方法的重现性和重复性必须通过对空白样本进行适合的平均添加回收，或者可靠的基准物质，或者已知残留量的样本来确定，相对标准偏差应该小于20%。但是在低残留情况下，相对标准偏差将高一些。它常用来作为评价分析过程效率的一种方法。但是添加回收率并不能真实反映提取效率，方法的评估如果有可能，应该包括提供标准的化合物的提取。

### 3.5. 总体分析质量的控制

- 3.5.1. 方法的使用情况应该按照本章所描述的来评估，空白和样本在可接受水平和最低决定限时都要分析。
- 3.5.2. 对已知的无农药残留的基质的定期分析时必要的，为了满足没有发生污染。
- 3.5.3. 在所有的实验室中，必须对试剂或者溶剂等的来源进行定期的检查。
- 3.5.4. 在储存和浓缩过程中，必须小心使农药的标准溶液不被光和热分解，对保证标准参考物质的稳定性也要同样小心。定期的进标准液，在色谱分析中稳定性很重要的。
- 3.5.5. 许多国内和国际的组织正在组织在特殊的方法和测定样品上进行合作。后者提供了一个对实验室情况评估的理想的方法。如果有可能的话，对样品进行复查应该用于常规样品。

### 3.6. 确证实验

- 3.6.1. 当为常规目的的分析工作完成后，在报告样品中含有本来不应该含有的农药残留时，和这种农药残留超过了MRL时进行确证实验时特别重要的。第

一步分析工作应该用同样的方法重复一次，如果在开始时只有一定样品被检查，样品中可能含有非农药化学物质，这些物质在一些色谱方法中被误检为农药。

- 3.6.2. 确证实验可分为两种类型，当测定量超过MRL时进行定量实验是必要的，并且在这种情况下定性的确证实验也是必要的。定性实验包括化学反应或者可能发生一定损失残留物的分离。当MRL和检出限相近时，虽然在这种水平下很难定量，但是对化合物的定性确证是必要的。
- 3.6.3. 进行确证实验的必要性决定于样品和对其了解的历史，在许多基质中某些残留物经常被发现，对于一系列来源相似的样品，它们含有同一种农药残留确定一个随机样品中含有这种残留物是必要的。同理，当我们知道一种具体的农药已添加于样本中时，对它进行确证实验是没有必要的。虽然一部分的随机样品应该被确证。当有控制样本时，我们应该用控制样本来检查有无干扰物的存在。
- 3.6.4. 在定量确证实验中至少有另一种处理的方法，并且独立报告结果。在定性确证实验中至少应该使用一种可代替的技术，这种技术使用不同的物理化学性质和用光谱数据。
- 3.6.5. 对正确的判定来说，必要的一步是分析工作者的判断，分析工作者应该注意判断哪一种方法的干扰影响最少。被选择的方法将依据仪器的可得性和实验室的专业性，作为分析工作者的指导，一些可选择得用来做确证实验得方法如下。
- 3.6.6. 最终得定性定量结果应该通过使用不同极性得固定相来确定，定量的结果应该在最初结果的 20%之内。如果结果超出20%，那么进一步的确认是必要的，除非当MRL等于或接近于检出限，这时大于100%的差异可能存在。
- 在选择另一根柱子材料的时候，应该考虑分离任何一个农药或已知干扰物，在最初的柱子上与被分析的残留物有相同的保留时间，另一根柱子因为它的高分离能力可以是填充柱或毛细管柱。当用另一根气相色谱柱不能正确地确证时，我们经常否定初次的检出结果。在这种情况下，需要对残留物进行进一步鉴定。

### 3.6.7. 对气相色谱使用选择性检测器。

- 当农药含有几种化学元素时，对这些元素有较好地响应地检测器，可能用于确证实验，检测器像火焰光度（磷、硫、锡）碱金属火焰离子化（磷、氮）原子发射、富立叶变换、红外和电量、电导（氮、硫、卤素）能对残留物提供有价值地附加信息。如用火焰光度检测器获得的硫磷响应比可以用于定性分析。

### • 3.6.8. 高效液相色谱

- 高效液相色谱经常用来做确证实验，需要确证的最初结果是通过其它技术和某种首先被使用的定量技术所得到的。柱前和柱后的衍生化和使用不同的检测器，或不同获得光谱的方法是分析家可以选择的选项。特别是热敏性或低挥发性使化合物，它们不利于用气相色谱分析。

### 3.6.9. 薄层色谱

在某些情况下，用薄层色谱对气相色谱的结果进行确认是最方便的。定性是根据二个标准： $R_f$ 值和显色反应，然而在定量方面薄层色谱的应用是有限的。这种技术的进一步的延伸，包括根据我们所感兴趣的化合物的 $R_f$ 值，将我们要的那一部分刮下来，然后通过分离进行进一步化学或物理分析。标准农药的溶液应该点在被提取样品的旁边，避免 $R_f$ 的重复性问题，有时在提取物的上面点上标准农药也能得到有用的信息。薄层色谱的优点是快速、低费用、可用于热敏性物质。缺点是与色谱仪器检测技术相比，检测特异性较差，并且经常需要有效的净化。在一些国家高温或高湿使TLC方法重复性较差。

### • 3.6.10. 柱分离鉴定

### • 3.6.11. 衍生化

- 这个方面的确证要考虑以下几点：

- 化学反应

- 小规模化学反应导致分解、富集并浓缩产物，进一步用色谱再检查产物，反应产物与原始化合物相比，有不同的保留时间和不同的检测器响应特征。

注意：当衍生物通过衍生化试剂的性质来检测时可能产生干扰。化学反应



一般可快速、简单进行，但特殊的试剂需要提纯和购买。

- 其它反应：例如可利用农药残留物的光化学转换来得到一个和多个产物的可重复性的色谱图。农药的标准品和被确认的提取物用相似的方法来处理。但含有多个农药残留的样品在结果的解释方面可能存在问题。在这些情况下，可以用TLL或IFPLL分离柱进行残留物的预分离。
- 其它方法：许多农药可能在酶存在下进行降解和转化。与正常的化学反应相比，这些过程是非常特别的并且经常包括氧化、水解、脱烷基化。产物与原来的物质相比有不同的色谱性质。该性质可以用来确认某些特定的农药。

### 3.6.12. 质谱

质谱获得的残留物的数据可提供最有力的证据，可用于进行确证目的。这种技术还能用来进行未知残留物分析或者监测。质谱分析残留物经常与色谱技术进行联用，同时提供保留时间、分子的质荷比和离子丰度。某一农药品种是否适合某一种色谱—质谱检测有很强的经验性，并不是一种检测条件就能适用于所有化合物。质谱分析时要注意化合物稳定性、柱流出干扰、基质效应等问题。

- 对残留物的确定最有用的是获得一张完整的电子轰击、电离质谱图（通常从 $m/z$  70到大于分子离子的质荷比）在质谱图中离子的相对丰度和无干扰离子对于定性是很重要的。这种分析方式是选择性最低的，在提取和储存过程中来说，应该避免污染物的干扰。质谱仪的数据处理系统允许进行背景扣除。虽然背景扣除非常有用，但是在某些情况下它也能产生错误的结果。
- 增加选择性可以通过限制质量扫描的范围，或选择特定的离子来实现。但是被检测的分子数量越小（特别是当它们的质量比较低时），所得数据的定性能力越小。确证可以通过（1）不同的色谱柱来获得；（2）用不同的电离技术；（3）检测进一步反应产物的选择性离子（多级质谱）；（4）检测高质量的选择性离子。
- 对定量来说，被检测的离子应该是那些对分析物来说最特征的离子，是产生最小干扰和提供最好信噪比的离子。质谱的定性定量应该满足适用于其它方法的质量控制系统。

### 3.6.13. 光谱方法

- 目前我们很少使用红外光谱、拉曼光谱/核磁共振来进行农药残留分析。更多地使用微探针、激光、富立叶变换等仪器技术。

### 3.6.14. 生物分析技术

生物分析技术包括酶反应抑制,用真菌孢子做生测或免疫技术来进行最初的筛选,在样品进行更复杂的仪器分析前确定残留物是否存在。免疫分析也能用于定量分析作为色谱分析的补充。

### 3.7. Lower Practical Levels for the determination of Residues of Pesticides (LPL)

- 3.7.1. 随着色谱系统的持续改善和分析方法改进,更灵敏更有选择性的检测器能使农药残留分析测量越来越达到较低的水平,能否测定非常低水平的残留物在一些情况下是很重要的。

• 残留分析工作者经常需要测量样品中的残留量来建立或检测国际贸易中商品的污染物残留水平。在这种情况下,残留分析方法应该有足够的灵敏度,一般需要低于最大残留限量(MRL),以便可测定可能存在于样品中的痕量残留物。但是方法不必有能够检测低于MRL两个或更多个数量级的残留物,因为用来测定很低水平残留物的方法通常很难运用且花费时间和精力、物质投入。因此,对于任何样品我们可以规定一个LPL水平。这样有利于减小获得数据的技术困难并降低测试成本。

- 3.7.2. 对于已登记的符合MRLs的活性物质,它的LPL可以定义为MRL的一部分。LPL的设定可根据残留物浓度而改变。

MRL (mg/kg)	LPL (mg/kg)
5或大于5	0.5
0.5到 5	0.1到0.5
0.05到0.5	0.02到0.1
小于0.05	0.5×MRL

- 当MRL在分析方法的定量限附近时，LPL也可设定在同等水平。

### 3.8. 结果表述

对于一般常规目的的分析而言，残留检出时必须进行结果的验证。“0”残留量应该报告为小于分析的测定限，而不是小于根据外推法计算出来的值。在复检过程中不得更改以前的测试结果。当通过测定几个样品或几次重复测定得到测试数值时，应该对结果进行科学评价并予以报告。

当结果有相等的可信度时，应该报告数值的算术平均值。通常对于常规目的的分析来说，小于 1mg/kg 的结果，应该近似为一位有效数字。从 1 到 10mg/kg 的结果应该近似为两位有效数字。超过 10mg/kg 的结果应该近似为最接近的整数。