

NONGYAO CANLIU JIANCE YU
ZHILIANG KONGZHI SHOUCHE

农药残留检测

质量控制手册

张志恒 主编

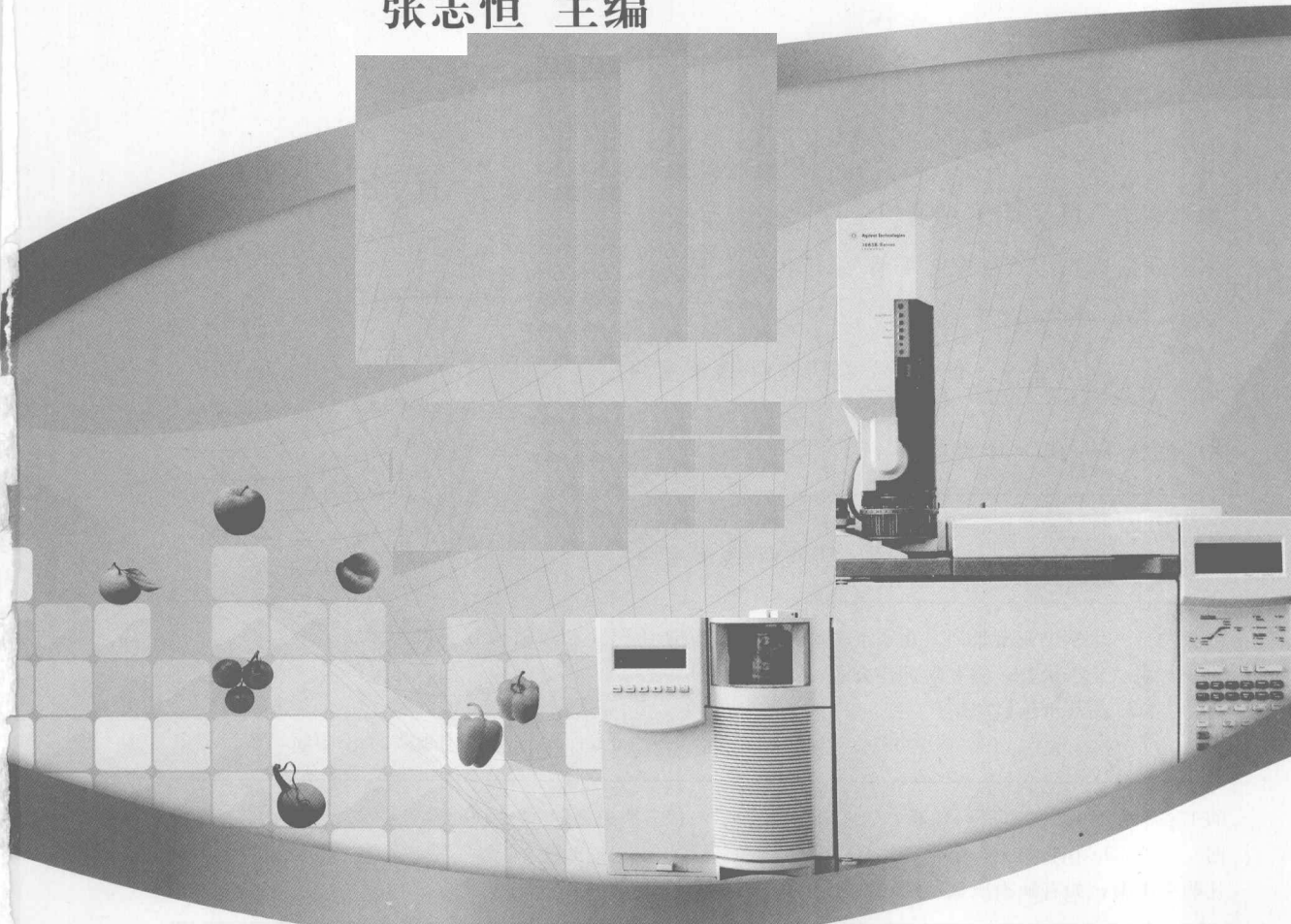


化学工业出版社

NONGYAO CANLIU JIANCE YU
ZHILIANG KONGZHI SHOUCHE

农药残留检测 质量控制手册

张志恒 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书分为农药残留检测方法和检测质量控制两部分内容。系统介绍了当前实用的相关农药残留检测方法、食品农药残留检测标准、农业化学物残留检测方法、我国现行的农药残留检测方法以及2006年制定的8个农药多残留检测方法国家标准的摘编等内容。同时,也详细介绍了农药残留分析良好实验室规范及欧盟农药残留分析的质量控制程序等。

本书可供从事农副产品、食品农药残留检测等相关人员阅读,也可供大专院校农药分析、农产品安全检测等相关专业师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

农药残留检测与质量控制手册/张志恒主编. —北京:
化学工业出版社, 2009.4
ISBN 978-7-122-04785-4

I. 农… II. 张… III. 食品-农药残留-残留量测定-
手册 IV. TS207.5-62

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第018182号

责任编辑:刘军 杨立新

文字编辑:林媛

责任校对:陈静

装帧设计:张辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张19½ 字数484千字 2009年4月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:60.00元

版权所有 违者必究

前 言

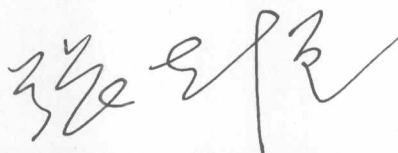
农药是当今世界上富有争议的焦点问题之一。一方面，它在农业有害生物和卫生害虫的防治方面得到了广泛的应用，发挥着非常重要的作用；另一方面，农药的广泛使用已经造成了食物链和环境的普遍污染，对人类健康和生态环境产生严重的不利影响。为控制食物农药残留对人类健康造成的危害，世界各国以及相关国际组织都已经制定了大量农药在各种食品中的最高残留限量（MRL）标准。为使这些农药残留限量标准得到有效的执行，全面、准确、及时地了解 and 掌握食物链各环节的农药残留状况是至关重要的，而高效、准确、经济的检测方法和有效的检测质量控制是实现这一目标的关键。为此，近二三十年以来，世界各国以及相关国际组织都非常重视农药残留检测方法和检测质量控制技术的开发及其标准化。

为便于从事食品农药残留检测和检测质量控制的技术人员和管理人员了解和掌握国内外在食品农药残留检测方法和检测质量控制标准化方面的新成就，我们组织编写了这本《农药残留检测与质量控制手册》。

本书分为检测方法和检测质量控制两大部分。检测方法包括第1章至第5章，第1章概括性地介绍了几类实用化了的农药残留检测方法；第2章提供了国际食品法典中的食品农药残留检测方面的3个标准，分别是“农药 MRL 符合性测定的推荐取样方法”、“农药 MRL 适用和分析取样的产品部位”以及“农药残留分析推荐方法”；第3章给出了日本厚生劳动省为配合“农业化学物残留肯定列表制度”的实施而提供的农业化学物残留检测方法；第4章列出了我国现行有效的农药残留检测方法，包括国家标准和行业标准；第5章分别是我国2006年制定的8个农药多残留检测方法国家标准的摘编。检测质量控制包括第6章和第7章，第6章给出了国际食品法典中的农药残留分析良好实验室规范；第7章介绍了欧盟农药残留分析的质量控制程序。

限于篇幅，本书列出的绝大多数检测方法只能提供名录及非常简要的介绍，只是在第5章中用了较大篇幅摘编8个农药多残留检测方法国家标准的主要内容。读者可通过本书提供的参考文献和书中的其他相关信息找到检测方法的具体资料。

限于编者的学识水平，加上时间仓促，书中疏漏之处在所难免，恳请广大专家和读者批评指正。



2009年1月于杭州

目 录

| | |
|--|-----|
| 第 1 章 农药残留检测方法概述 | 1 |
| 1.1 农药残留分析的样品前处理技术 | 1 |
| 1.2 气相色谱法 | 9 |
| 1.3 高效液相色谱法 | 23 |
| 1.4 酶抑制法 | 33 |
| 1.5 酶联免疫法 | 37 |
| 第 2 章 国际食品法典农药 MRL 符合性测定方法 | 44 |
| 2.1 农药 MRL 符合性测定的推荐取样方法 | 44 |
| 2.2 农药 MRL 适用和分析取样的产品部位 | 54 |
| 2.3 农药残留分析推荐方法 | 58 |
| 第 3 章 日本农业化学物残留检测方法 | 80 |
| 第 4 章 我国现行的农药残留检测标准方法列表 | 106 |
| 4.1 农药残留检测方法国家标准列表 | 106 |
| 4.2 农药残留检测方法商检行业标准列表 | 109 |
| 4.3 农药残留检测方法农业和水产行业标准列表 | 118 |
| 第 5 章 我国农药多残留检测标准方法 | 121 |
| 5.1 水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法 | 121 |
| 5.2 粮谷中 475 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法 | 139 |
| 5.3 动物组织中 478 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法 | 156 |
| 5.4 蜂蜜、果汁和果酒中 497 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法 | 174 |
| 5.5 水果和蔬菜中 405 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法 | 192 |
| 5.6 粮谷中 372 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法 | 212 |
| 5.7 动物肌肉中 380 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法 | 231 |
| 5.8 蜂蜜、果汁和果酒中 420 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱- 串联质谱法 | 250 |
| 第 6 章 国际食品法典农药残留分析良好实验室规范 | 271 |
| 6.1 导言 | 271 |
| 6.2 分析人员 | 271 |
| 6.3 基本装备 | 272 |
| 6.4 分析过程 | 273 |

| | |
|---------------------------|-----|
| 第7章 欧盟农药残留分析的质量控制程序 | 292 |
| 7.1 实验室认可 | 292 |
| 7.2 样品的采集、运送和处理 | 292 |
| 7.3 农药标准品及校准溶液 | 293 |
| 7.4 提取和浓缩 | 294 |
| 7.5 污染和干扰 | 295 |
| 7.6 分析校准 | 295 |
| 7.7 分析方法和分析作业 | 297 |
| 7.8 结果的确证 | 298 |
| 7.9 结果报告 | 299 |
| 参考文献 | 301 |

第1章

农药残留检测方法概述

目前应用的农药残留检测方法主要有：气相色谱法（GC）、高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱-质谱联用法（GC-MS）、液相色谱-质谱联用法（LC-MS），还有用于快速检测的酶联免疫法（ELISA）和酶抑制法等。

1.1 农药残留分析的样品前处理技术

一般来说，农产品和加工食品中农药残留的检测技术分为目标物的提取、分离、净化和检测几个步骤，其中提取、分离和净化属于样品前处理阶段，主要是为了改善提取效果，减少基质和杂质对检测结果的影响（图 1.1）。样品和目标农药的理化性质不同，选择提取试剂、合适的净化方法和浓缩条件也不同，目前经典的提取、净化方法有漂洗、匀浆、索氏提取、超声波提取、液-液分配、柱色谱、薄层色谱等方法。样品处理在农药残留检测中占有重要地位，但占用大量的人力物力、处理时间较长、消耗溶剂较多、后续污染严重。自 20 世纪 90 年代以来，一些样品前处理的新技术不断被引入，如固相萃取（SPE）、固相微萃取（SPME）、超临界流体提取（SFE）和分子印迹合成受体技术（MISR）等，这些新技术的共同特点是：节省时间，减轻劳动强度，节省溶剂，减少样品用量，提高提取或净化效率和提高自动化水平。

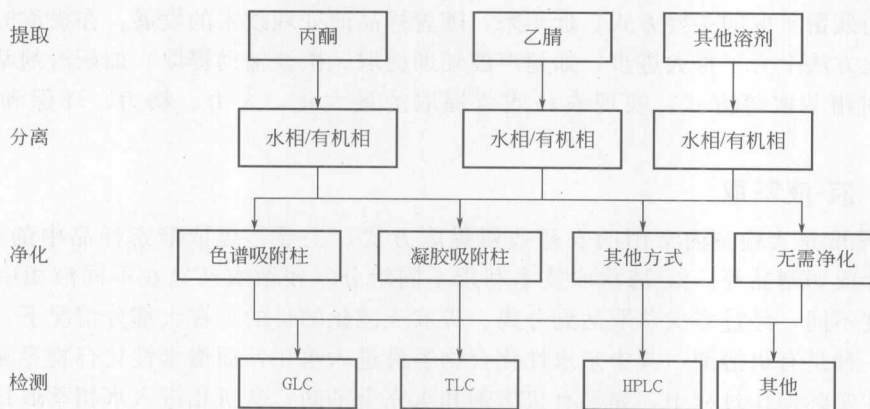


图 1.1 农产品和加工食品中农药残留检测方法的一般流程

1.1.1 农药残留萃取的基本原则

由于农产品和食品的来源和特性以及农药理化性质不同，农药残留提取的方法也不同，应该根据“相似相溶”原则选择合适的提取试剂和方法，提高目标检测物的提取效果，降低非目标物杂质的干扰。

不论样品和溶剂的类别差异有多大，利用溶剂萃取样品中的农药残留，首先要满足溶剂

对样品的渗透性和对农药残留的萃取性,要使溶剂能够尽可能渗透到样品中,并对农药残留获得最大的萃取效果,也就是所说的“相似相溶”,即溶质和溶剂在极性、官能团和化学性质等方面相似时,可以互相溶解;这里说的溶质是指样品中农药残留,溶剂是指提取试剂,但是溶剂一般不能和样本混溶,否则达不到提取和分离的效果。农产品和食品的种类繁多,其农药残留的种类和性质也各不相同,萃取溶剂的选择一般应遵循以下规律。

(1) 农药的极性 对于极性较小的农药(如有机氯农药),一般选择非极性溶剂如正己烷、苯等提取;对于极性强的农药(如有机磷和氨基甲酸酯类农药),可以选择极性较强的溶剂如三氯甲烷(氯仿)、丙酮和乙腈等提取;对于中等极性的拟除虫菊酯类农药,可以选择混合溶剂如丙酮-石油醚等提取。

(2) 样品的含水量 样品含水量较高的蔬菜、水果等一般先粉碎打浆,采用极性较高的溶剂如丙酮、乙腈、甲醇等提取;含水量较低的产品如豆类、谷物等要先粉碎,加水后采用丙酮、乙腈、甲醇和二氯甲烷等提取。

(3) 样品的理化性质 对于脂肪含量较高的样品,一般采用混合溶剂如丙酮-石油醚(3:7)来提取;含糖量较高的样品如浓缩果汁等,可以先加入水后再用热的乙腈或丙酮提取;辛辣味较重的产品如韭菜、大葱、大蒜等,可以先用微波稍微加热灭活酶活性后,再用丙酮、乙腈等溶剂提取。

(4) 提取溶剂的极性 根据提取的“相似相溶”原则,溶剂的极性从强到弱的顺序为:水、乙腈、甲醇、乙酸、异丙醇、丙酮、二氧六环、正丁醇、正戊醇、乙酸乙酯、乙醚、硝基甲烷、二氯甲烷、三氯甲烷、苯、甲苯、二甲苯、四氯化碳、二硫化碳、环己烷、正己烷(石油醚)、正庚烷。

1.1.2 萃取方式

农药残留的溶剂萃取方式主要包括液-液萃取、液-固萃取和液-气萃取,前两者是农产品和食品农药残留萃取的主要方式。近年来,随着样品前处理技术的发展,在提取时间、溶剂用量和提取方法上有了很大进步,如超声波辅助提取、微波辅助提取、加压溶剂萃取、超临界萃取和固相萃取等方式,实现农药残留提取的最大化,人力、物力、环保和时间的最优化。

1.1.2.1 液-液萃取

液-液萃取是实验室内常用的农药残留提取方式,主要是提取液态样品中的农药残留,如水、果汁或奶制品等。液-液萃取技术利用不同组分(残留农药)在不同液相中的分配比例或溶解度不同,经过多次萃取达到分离、提取或纯化的目的。在大部分情况下,一种液相是水,另一种是有机溶剂,其中亲水性化合物容易进入水相,而憎水性化合物容易进入有机溶剂相。在实际操作过程中,如果有机溶剂和水完全不同,有机相进入水相萃取目标物的效果就差,此时可以增加另一种有机相来渗透到水相提取目标物后,再在两种有机相溶剂中液-液萃取,达到提取、分离或纯化的效果。

液-液萃取的基本原理是基于 Nernst 分配定律,即在一定温度下,溶质在一对互不相溶的溶剂间进行质量分配,平衡时溶质在两相中的浓度之比为常数,也称为溶质(农药)的分配系数(K)。一般用分配系数和多次提取的量(E)来表示:

$$K = p/q \quad (1.1)$$

式中, K 为分配系数; p 为有机相中溶质的浓度; q 为水相中溶质的浓度。

$$E=1-\left(\frac{1}{1+KV}\right)^n \quad (1.2)$$

式中, E 为多次提取的量; V 为有机相与水相的体积比; n 为萃取次数。

一般说来, 分配系数越大, 残留农药越容易到有机相中, 萃取效果越好; 但是由于分配系数差异大, 一次难以提取完全, 需要多次进行。如果某一种残留农药的分配系数 $K=5$, 且有机相和水相的体积相同, 则必须进行 3 次萃取才可以达到 99% 的提取效果。

液-液萃取的基本过程是: 一般选用分液漏斗(事先检验活塞是否漏液)作为萃取器皿, 将含待萃取组分的水溶液放入分液漏斗, 然后加入萃取有机溶剂, 加入的量视样品量而定, 溶剂体积一般为样品溶液体积的 30%~35%; 加入盐溶液(NaCl 或 Na_2SO_4) 增加盐析效果, 将残留农药“逼”入有机相; 为增加提取效果, 需要慢慢摇晃多次, 其间不断打开活塞放气, 漏斗下口向上倾斜(勿对准人); 经多次摇晃放气后, 一般放气至气压很小时, 再剧烈摇晃后静置在漏斗架上; 待漏斗中两层液相完全分离后, 打开上口瓶塞, 再小心打开下口缓慢释放下层液体(一般为水相), 从漏斗上口将有机相转移到浓缩瓶(切勿从下口释放, 避免污染); 重复上述步骤多次(一般 3 次), 合并有机相(含有待测残留农药), 浓缩后净化或直接进样检测(视情况而定)。

另外还有连续液-液萃取、逆流萃取、微萃取、小柱萃取、在线萃取和自动液-液萃取等技术, 主要是为了减少萃取劳动强度、次数和时间, 实现萃取自动化、简单化和低溶剂用量。

1.1.2.2 液-固萃取

液-固萃取又称液-固提取, 因为萃取是在不同液态相间进行, 而提取可以从固相中溶解待测物后再经过萃取获得, 是残留农药从固相—液相—液相转移的过程。这里的固相不完全是固态的, 如蔬菜、水果和谷类等农产品都采用液-固提取。如果单纯靠有机溶剂相去提取固相中的残留农药, 很难在短时间内达到效果, 而且平衡不易打破, 提取效果差, 一般采用振荡或索氏提取法加速提取速度, 增加提取效果。

液-固提取的基本原理是基于溶质在固-液相间的扩散原理, 包括固体样品中残留农药经溶剂的渗透溶解过程和待测残留农药组分在溶剂分子间相互扩散的过程。其扩散过程中各因数关系如:

$$G=DF\frac{\Delta c}{\Delta X}t \quad (1.3)$$

式中, G 为已扩散的物质质量; D 为扩散系数; F 为扩散面积; Δc 为两相界浓度差, 为扩散过程的推动力; ΔX 为溶质的扩散距离; t 为扩散时间。

一般说来, Δc 越大, ΔX 越小, 则扩散速度越快; 扩散系数 D 和扩散面积 F 越大, 则扩散量 G 越大。通过加大溶剂与固体的接触面积(样品粉碎等)、减少扩散距离, 增加扩散速度(振荡等), 延长提取时间(如索氏萃取时间较长)来增加提取残留农药的效果。

液-固提取的基本过程是: 蔬菜、果类等样品需要使用万能均化器粉碎、萃取, 或者用打浆机粉碎, 加入溶剂后振荡提取; 土壤或谷物等样品磨细后, 加入一些水分后增加溶剂的渗透性, 一般采用索氏提取来提高提取效果; 经过振荡后的样品一般需要过滤或离心将固体残渣与有机相分离, 然后液-液分配或者加入无水硫酸钠脱水(含水量低时), 收集有机相浓缩、净化后待测。

液-固萃取过程中影响扩散速度和提取效果的主要因素有:

(1) **样品基质的影响** 样品基质中非目标理化性质的差异,影响提取效果。例如含水量高的蔬菜需要尽可能打浆粉碎;谷物粉碎后要加水渗透,以增加扩散面积和减小扩散距离,提高提取效果。

(2) **溶剂的性质与剂量** 根据“相似相溶”原则,选择合适的溶剂,包括溶剂的性质和纯度。例如溶剂的纯度达到气相色谱中电子捕获检测器(ECD)上不含杂峰的效果并避免使用含氯有机溶剂提取,且溶剂不能与待测物发生反应;对于极性强的农药一般选择丙酮、乙腈提取,或者采用丙酮-石油醚混合提取;提取试剂的剂量要根据样品的性质,一般蔬菜样品用量较少,而含水量低的谷物样品需要剂量大,太少提取效果差,太多时杂质干扰大。

(3) **提取温度与时间** 温度升高,增加分子热运动,扩散系数增大,提取效果好,但不能过高,否则容易造成回收率降低和杂质过多;根据扩散公式[式(1.3)],随着时间的延长,提取效果提高,但分子扩散达到平衡后,再延长时间,对提高提取效果就没有意义了。

1.1.2.3 超声波辅助提取 (ultrasonic extraction, UE)

超声波辅助提取是实验室内常用的方法之一,最初由 Johnson 等在 1967 年提出,具有操作简单、节省时间的特点,可以同时提取多个样品。相当于在振荡技术进一步改进,通过空化作用使分子运动加快,将声波能量传递给样品,改变组分结构,加速组分脱附和溶解,减少提取时间。超声波辅助提取的影响因素主要有超声波的强度、频率、样品性质和提取时间。有实验证明,不同的提取样品选择不同的提取参数会出现不同的试验结果,而且溶剂的理化性质与样品的匹配程度也影响提取效果。

1.1.2.4 微波辅助萃取 (microwave assisted extraction, MAE)

微波辅助萃取是 1986 年匈牙利学者 Ganzler 等人提出的样品前处理方法,利用高频电磁波穿透萃取溶剂,造成组织细胞破裂,温度升高,加速待测物组分的提取过程;形成电磁场,加速被萃取组分向有机溶剂中的扩散速率。微波辅助萃取法的提取效果与样品性质、靶标农药、提取温度和溶剂性质有关,与其他方法相比,基质组分的影响较大。可用于植物及肉类食品中农药残留的提取,用此法提取土壤中的有机氯农药时,实验结果表明微波萃取法比索氏提取法完全、省时。微波辅助萃取法在缩短萃取时间和提高萃取效率的同时也使萃取液中干扰物质的浓度增大,在进行不同样品中农药残留萃取时,要有针对性地进行微波参数设置优化。

1.1.2.5 加速溶剂萃取法 (accelerated solvent extraction, ASE)

1995 年 Richter 等提出的一种新型萃取方法,主要是采用常规溶剂,在较高温度(50~200℃)和压力(1000~3000psi^①)下对固体或半固体样品进行农药残留的萃取。加速溶剂萃取法的突出优点是有机溶剂用量少(1g 样品仅需 1.5mL 溶剂)、快速(一般为 15min)和回收率高。1995 年美国环保署(EPA)证明该法是一种有效的提取方法,由于有机溶剂用量少、提取时间快,目前被广泛应用于水果、蔬菜、谷物、饲料和动物制品中多种农药残留检测的提取过程。

1.1.2.6 超临界流体萃取法 (supercritical fluid extraction, SFE)

超临界流体萃取是近年来迅速发展起来的一种新型物质分离技术,与其他在液-固或液-

① 1psi=1bf/in²=6894.76Pa。

液相间进行萃取农药残留物的技术不同,超临界流体是处于临界温度以上的高密度气体,流体介于气体(气相)和液体(液相)之间,既有气体密度小、扩散速度快、渗透力强的特点,又有液体对样品溶解性能好的特点。一般选用 CO₂ 萃取剂,操作简单,并且引入其他杂质的概率大大降低;但二氧化碳的极性较低,对极性较大的物质萃取能力差。对于一些热敏性、低挥发性的化合物是最好的提取方法;但对于某些极性较强的有机物质如杂环化合物或多环芳烃等则不能有效萃取,需要加热溶剂等来增加超临界 CO₂ 的溶解能力,提高萃取效果。研究表明混合使用两种或多种超临界流体可以使农药萃取达到较高的回收率。

1.1.2.7 固相萃取 (solid-phase extraction, SPE)

固相萃取与其他提取技术不同,是利用固体吸附剂将样品中的目标化合物吸附,而与样品的基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱或加热解吸附,达到分离和富集目标化合物的目的。其分离模式有正相 SPE (吸附剂极性大于洗脱液极性)、反相 SPE (吸附剂极性小于洗脱液极性)、离子交换 SPE 和吸附 SPE。SPE 既可用于复杂样品中微量或痕量目标化合物的提取,又可用于目标化合物净化与富集,操作简便、省时,有机溶剂用量少,是目前残留分析中样品前处理的主流技术。

1.1.2.8 基质固相分散技术 (matrix solid-phase dispersion, MSPD)

由于在分析固态样品(如谷物、蔬菜、水果等)时,一般是先粉碎样品,再用溶剂从样品中将农药提取出来,然后经过净化等步骤,而且有些简便方法还需要离心等操作,步骤繁琐,溶剂消耗量大。Barker 等在固相萃取技术的基础上,于 1989 年提出基质固相分散技术,并解释了样品预处理的方法。

基质固相分散的基本原理和方法是:一般是先将样品基质固相化(脱水剂),再加入吸附剂,如 C₁₈、Al₂O₃、Florsil 和硅胶等固相萃取填料(类似于固相萃取中的填料,不同之处是填料和基质同时粉碎均质),经过研磨后样品基质均匀分散于吸附剂固定相颗粒的表面,装玻璃柱后进行洗脱,类似 SPE 的洗涤和洗脱,完成样品的提取和净化过程。吸附剂同时起到支持、分散、吸附和净化的作用,待测物在吸附剂、洗脱液和基质之间进行吸附与分配,最终达到萃取和净化的目的。

1.1.2.9 QuEChERS 法

QuEChERS 法是英文 Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged and Safe (即快速、容易、便宜、有效、稳定和可靠)的缩写。由美国农业部农业研究服务中心的 Anastassiades M 等于 2003 年开发的一种预处理方法来实现高质量的农药多残留分析。基本操作过程如下:一般 10g 样品用 10mL 乙腈,均浆粉碎后用力振荡 1min,加入 4g 无水硫酸镁和 1g 氯化钠再用力振荡 1min,离心后取上清液(有机相)1mL,再加入 150mg 硫酸镁和 25mg PSA (乙二胺-N-丙基硅烷),用力振摇 30s 后离心,取上清液用于 GC-MS 或 LC-MS 分析。该法已在世界各国得到广泛应用,2006 年欧盟委员会制定了相应的 SANCO 操作指南。

1.1.3 样品提取液的净化技术

样品提取液的净化过程对农药残留的检测非常重要,因为提取过程不仅将残留农药提取出来,样品基质中的相关成分如油脂、色素、糖分和蛋白质等成分也会一同提取出来,这些物质被称为“共萃取物”。这些物质将干扰检测结果,甚至污染检测仪器。将残留农药与共萃取物中的干扰物质分离的操作过程称为净化。在净化过程中,残留农药也可能由于净化而

和萃取物一起被分离掉,造成丢失,可以说提取和净化也是一种相互制约、相互统一的过程。

净化程度的要求与农药和样品的性质,以及所用检测仪器的检测器有关,也取决于检测方法和对分析及检测结果准确度的要求。如检测样品中的有机磷农药时,一般采用气相色谱的火焰光度(FPD)和氮磷检测器(NPD),对样品的净化程度要求低;而采用气相色谱的电子捕获检测器(ECD)时,测定有机氯和拟除虫菊酯类农药时净化程度要求高。根据净化的步骤和原理不同,常见的样品净化方法主要有液-液分配、柱色谱法、固相微萃取和基质固相分散等其他方法。

1.1.3.1 液-液分配净化

液-液分配是在通过溶剂提取样品中的残留农药后,基于分配定律原理,利用农药和杂质在不同溶剂间的溶解度不同,通过多次液-液分配,将残留农药转移到目标有机相的过程。一般采用非极性溶剂和极性溶剂组成溶剂对来进行分配,同时加入盐溶液进行盐析,增加残留农药到目标试剂中的程度。常用的溶剂对主要有丙酮-正己烷(石油醚)、乙腈-正己烷(石油醚)、二氯甲烷-石油醚、二甲基甲酰胺-正己烷(石油醚)、二甲基亚砜-正己烷(石油醚)等。

(1) 基本原理 根据分配系数的定义,农药在两种互不相溶的溶剂中,经过混合振摇后达到平衡状态时,分别在上下两层溶剂中的浓度比例称为该农药的分配系数,一般采用 $K = p/q$ 来表示,其中 K 、 p 和 q 分别代表分配系数、在非极性溶剂中的农药浓度和极性溶剂中的农药浓度。在实际操作中,多数采用等体积溶剂平衡时在非极性溶剂中的农药浓度。在液-液分配中, p 值主要用于溶剂对的选择来决定提取液的分配次数(n),主要有等体积一次/多次分配和非等体积一次/多次分配。其中非等体积多次分配的计算公式是:

$$E_{\text{非}} = \left(\frac{ap}{ap - p + 1} \right)^n \quad (1.4)$$

式中, a 为溶剂比值,等于非极性溶剂与极性溶剂的体积比,当 $a=1$, $n=1$ 时, $E_{\text{非}} = p^n$,表示为等体积一次提取;二者不同时为1时,表示多次提取。

(2) 基本步骤 取己烷提取含脂肪等杂质的农药样品25mL,用预先经过己烷过饱和过的二甲基甲酰胺分3次提取分液漏斗中的溶液,每次10mL,合并提取液于另一个分液漏斗;再用己烷反萃取二甲基甲酰胺溶液,以去除少量脂肪,再用二甲基甲酰胺10mL反萃取;合并40mL的二甲基甲酰胺溶液,用200mL2%的硫酸钠溶液和10mL己烷提取,振摇2min,静置20min后去掉二甲基甲酰胺水溶液,此时残留农药转移到己烷相,可以浓缩定容待测。

液-液分配过程比较繁琐,消耗试剂多,时间长,不适合快速检测,现在使用此法较少。

1.1.3.2 柱色谱法

柱色谱法是实验室内进行农药残留检测时样品净化的常用方法,操作简单,而且吸附剂可以自行制备,成本低,净化效果好。

(1) 基本原理 利用吸附剂对残留农药与脂肪、蜡质和色素等杂质的吸附力差异,采用不同极性的溶剂进行洗脱,一般是农药最先洗脱下来,而杂质等被吸附在吸附柱上,从而达到分离、净化的目的。在净化过程中一般采用梯度洗脱,就是配制不同极性的洗脱液,根据相似相溶原则,可以分时段地洗脱不同极性的残留农药,适用于多残留检测。

(2) 常用吸附剂 不同的吸附剂对不同杂质的吸附程度不同,常见的吸附剂有弗罗里硅土、氧化铝和活性炭等。

① 弗罗里硅土 主要成分是硅酸镁,由硫酸镁和硅酸钠作用生成的沉淀物,经过滤和干燥后制得,是多孔性固体,比表面积大($297\text{m}^2/\text{g}$)。实验室购买的弗罗里硅土普通商品一般仅通过 110°C 或 260°C 温度活化,需要再在 650°C 温度下活化 $1\sim 3\text{h}$,以提高对杂质的吸附能力;并经过5%的去离子水灭活(一般情况下),混匀后放入干燥器内 48h 后使用。弗罗里硅土柱一般对有机氯和拟除虫菊酯类农药的前处理净化效果好,现在可以购买成品的SPE柱(如有 $200\text{mg}/3\text{mL}$, $500\text{mg}/3\text{mL}$, $500\text{mg}/6\text{mL}$ 和 $100\text{mg}/6\text{mL}$ 等规格)进行净化处理,操作简便,平行重复效果好。

② 氧化铝 氧化铝也是常用的吸附剂,有酸性、中性和碱性之分,能够吸附脂肪、蜡质。市售的氧化铝(中性或酸性),先在 130°C 左右温度下活化 4h 以上,然后加入相当于5%~10%质量的蒸馏水,混匀后装瓶密封于干燥器内待用。氧化铝对有机磷农药的净化效果好,淋洗时淋洗液用量少。不同极性的农药可以采用不同的淋洗液,如10%的乙醚-正己烷可以淋洗乙硫磷、对硫磷和马拉硫磷等有机磷农药及艾氏剂、滴滴涕和林丹等有机氯农药;而2%丙酮-正己烷可以淋洗极性较强的有机磷农药如敌敌畏、甲胺磷和乐果等。

③ 活性炭 活性炭是一种非常优良的吸附剂,它是利用木炭、竹炭、各种果壳和优质煤等作为原料,通过物理和化学方法对原料进行破碎、过筛、催化剂活化、漂洗、烘干和筛选等一系列工序加工制造而成;它具有物理吸附和化学吸附的双重特性,比表面积大,可以吸附样品中的色素等杂质,一般不单独使用,而是和弗罗里硅土或氧化铝按一定比例使用(比例较小)。将活性炭与4~10倍量的弗罗里硅土或氧化镁及助溶剂Celite545、白土等混合,用乙腈-苯(1:1)等淋洗,可以有效净化样品中的色素。以1%的比例添加到弗罗里硅土玻璃柱中,净化色素较多的茶叶样品中杂质,用于有机磷农药检测的净化。

(3) 柱色谱法的基本步骤 实验室内一般采用自己活化的吸附剂如弗罗里硅土等,在玻璃管柱 $300\text{mm}\times 20\text{mm}$ (内径)依次装 2cm 的无水硫酸钠、 5g 弗罗里硅土和 2cm 的无水硫酸钠,采用湿装法(也可干装法)效果较好;净化前用少许溶剂淋洗,然后将浓缩的提取液转移至色谱柱,先少许淋洗液转移淋洗,多次清洗以后再加入适量淋洗液,防止液面干,待完全淋洗后,浓缩近干定容后待测。淋洗用的溶剂极性和剂量视样品的处理情况而定,一般要几倍于色谱柱的柱容量。

1.1.3.3 凝胶渗透色谱

凝胶渗透色谱是在凝胶渗透柱色谱的基础上发展起来的,是目前大型检测实验室常用的样品净化手段之一,在我国的应用还不普遍。凝胶渗透色谱最初用于蛋白质的分离,随着凝胶类型的增加,开始应用于农产品水果、蔬菜和谷类中农药残留检测时的样品净化,尤其对含有大分子脂肪、色素的样品净化效果好。

(1) 基本原理 凝胶色谱技术是根据溶质(被分离物质)分子量的不同,通过具有分子筛性质的固定相(凝胶),不同分子经过的路径不同,大分子的不易进入凝胶颗粒的微孔,移动速度快,最先洗脱出;小分子的容易进入凝胶相内,速度慢于大分子的,洗脱时间长,分子最小的最后才流出。这与柱色谱的分离原理不同,柱色谱分离时填料、样品基质和淋洗液之间的极性差别影响被分离物质的洗脱时间和分离速度;而凝胶色谱分离主要与被分离物质的分子量大小和凝胶色谱载体的性质(如分子筛孔径的大小等)有关,淋洗溶剂的极性对

分离影响不大。

(2) 常见凝胶种类 常见的凝胶种类主要有以下几种。

① 聚丙烯酰胺凝胶 是一种人工合成凝胶，是以丙烯酰胺为单位，与交联剂亚甲基双丙烯酰胺交联成的颗粒状，根据交联剂的用量可制成不同型号的凝胶。

② 交联葡聚糖凝胶 (Sephadex) 常见交联葡聚糖凝胶的种类有 G-10、G-15、G-25、G-50、G-75、G-100、G-150 和 G-200 等。G 后面的阿拉伯数为凝胶吸水值的 10 倍，如 G-25 为每克凝胶膨胀时吸水 2.5g，G-200 为每克干胶可吸水 20g。因此，“G”的大小可反映凝胶的交联程度和膨胀程度。另外 Sephadex LH-20 是 Sephadex G-25 的羧丙基衍生物，能溶于水及亲脂溶剂，用于分离不溶于水的物质。

③ 琼脂糖凝胶 是依靠糖链之间的次级键如氢键来维持网状结构，网状结构的疏密取决于琼脂糖的浓度。一般情况下，它的结构是稳定的，可以在许多条件下使用（如水，pH4~9 范围内的盐溶液）。琼脂糖凝胶在 40℃ 以上开始熔化，也不能高压消毒，可用化学灭菌处理。

④ 聚苯乙烯凝胶 具有大网孔结构，可用于分离相对分子质量 1600~4000000 的生物大分子，适用于有机多聚物的分子量测定和脂溶性天然物的分级，凝胶机械强度高，洗脱剂可用甲基亚砷。

(3) 基本过程 凝胶渗透色谱的基本组成有六通阀、净化柱和泵等；而全自动型凝胶色谱净化装置由自动采样、自动收集、供液、检测、分离和控制六大系统组成。

半自动的凝胶渗透色谱过程分为 2 步：凝胶色谱柱制备和上样分离。先称取 7g 聚苯乙烯凝胶 SX-3 浸泡在 50mL 环己烷-乙酸乙酯（体积比为 1:1，下同）溶液中至少 5h，吸胀后的凝胶仍保持在液面下；在半自动凝胶色谱仪上，利用 N₂ 的压力将吸胀的凝胶转移到玻璃柱（10mm i. d. × 200mm）内，用环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗剂，在 N₂ 的压力作用下流经凝胶柱，调节流速至 1mL/min，稳定后待用；将样品提取液 1mL 进样到凝胶渗透色谱柱上，开启压力，使流动相流速保持在 1mL/min，收集第 10~18mL 流出物（可以事先用农药标样测定流出时间次序）。在 40℃ 下用旋转蒸发器浓缩淋洗液至近干，再用 N₂ 吹干，用乙酸乙酯定容至 1mL，待测。

1.1.3.4 免疫亲和色谱

复杂样品中痕量农药的前处理一般比较复杂，能够实现快速高效的往往是具有共性的农药，而免疫亲和色谱能够使样品中的特异性农药残留实现快速分离净化。

(1) 基本原理 免疫亲和色谱 (immunoaffinity chromatography, IAC) 就是基于免疫反应的基本原理，利用抗原-抗体结合的高度专一性来分离、富集特定目标物以及色谱分离过程中的迁移差异，实现样品分离的一种分离净化方法；该方法具有选择性强、结合容量大、富集效率高、可重复使用等特点，大大地简化了样品的前处理过程，可提高分析的灵敏度和可靠性。

(2) 免疫亲和柱的建立与应用过程 IAC 的建立包括抗体的制备、固相基质的选择和基质的活化与偶联。小分子农药经过衍生化后与载体蛋白共价偶联构成人工抗原，经过动物机体免疫系统被激活产生相应的抗体；然后将抗体固定在特定的基质上，大部分基质在与抗体偶联之前，均需要进行化学活化，再与间隔分子或抗体上的亲核基团（如—NH、—OH、—COOH 等）共价结合，完成免疫亲和柱的建立。当样本粗提液中目标农药经过免疫亲和色谱柱时，首先与抗体结合，用淋洗液先将非目标分析物洗涤掉；再用适当的淋洗条

件将结合在抗体上的农药洗脱下来,然后浓缩获得分析样本;可直接采用GC、HPLC和ELISA等方法进行检测,这大大简化了样品的前处理过程,减少有机溶剂的用量和提取过程中样品的损失。

1.1.3.5 其他净化方法

(1) 磺化法 利用脂肪、蜡质等杂质与浓硫酸的磺化作用,生成极性很大的水溶性物质,经过有机溶剂分配后而去除,达到净化目的。磺化法适用于对浓硫酸稳定的有机氯农药,可以直接添加浓硫酸进行振荡磺化,重复2~3次;也可以将硅藻土和浓硫酸混合装柱,加入提取液进行有机溶剂淋洗净化。

(2) 凝结剂沉淀法 将氯化铵、磷酸和水按照一定比例配制凝结剂,将浓缩的提取液溶于丙酮,加入凝结剂溶液后使蛋白质、色素等杂质沉淀去除,常用于水溶性高的组分净化。

(3) 低温冷冻法 利用动植物组织中的脂肪和蜡质在低温下的丙酮中容易沉淀析出的特点,而农药则溶解在丙酮中达到分离净化的目的,方法回收率较高。

(4) 吹扫-捕集法 利用惰性气体将液体样品或提取液中容易挥发的有机物驱逐到气相中,收集后用于检测;而样品中高沸点的脂肪、蜡质和色素等杂质留在溶液相。此法主要用于环境样品或高脂肪样品中挥发性物质,如氯甲烷、溴氯甲烷、苯和有机磷农药的净化处理。

1.2 气相色谱法

气相色谱法是在纸色谱、吸附柱色谱等色谱技术基础上发展而来的一种分离、检测技术,是农药残留检测最常用的方法。

1.2.1 基本原理与专业术语

1.2.1.1 基本原理

气相色谱法是采用气体作流动相的色谱法,主要是待测物质在气相中传递速度快,待测组分汽化后与固定相相互作用,气相和固相之间分配系数不一样,经过多次分配后不同组分之间在流动相流出时间有所差异,从而达到分离的目的。固定相的性质对于待测物质的分配起决定性作用,可以选择高选择性的固定相以及高灵敏度的检测器来提高气相色谱法的高选择性、高分离效能和高灵敏度的特点。气相色谱法可以用于气体、液体和固体的痕量分析,只要在-190~500℃温度范围内所分析物质的蒸气压在0.2~10mmHg^①范围内,且具有热稳定性,都可以使用气相色谱法。

在进行色谱分析时常常会考虑两个问题:一是组分要达到完全分离,即色谱峰之间的间距要大;二是流出峰的峰宽小,峰形尖锐。

1.2.1.2 专业术语

(1) 死时间 (t_M)、保留时间 (t_R) 和调整保留时间 (t'_R) 在分离各混合组分时,各组分可视为溶质,色谱柱中的固定液可视为溶剂。在组分进入色谱柱后,经过在固定相和流动相间的不断分配流动,到离开色谱柱反应检测信号的总时间称为分离组分保留时间 (t_R);

① 1mmHg=133.322Pa。

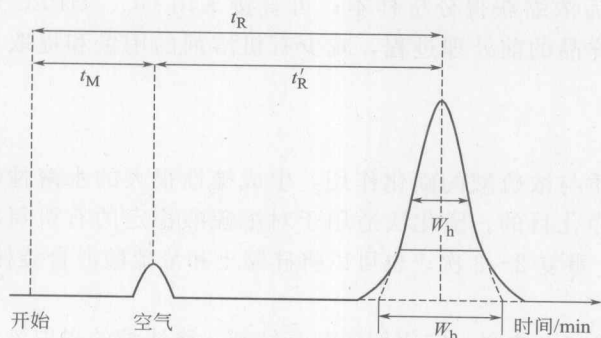


图 1.2 典型的色谱图

其中由于组分溶解于溶剂中所消耗的时间称为调整保留时间 (用 t'_R)；被载气携带通过柱子的时间 (t_M) 称为死时间，包括经过进样器、柱前后连接管和检测器等部位所消耗的时间。在载气流速、柱温、固定液性质及含量 (厚度) 等条件不变时，每一种组分都有一个特定的保留时间，这是进行农药残留分析时定性的基础指标。图 1.2 是典型的色谱图，其中 $t_R = t_M + t'_R$ 。

(2) 柱效率 (H) 与理论塔板数 (n) 柱效率是指溶质通过色谱柱之后其区域宽度增加了多少，与溶质在两相中的扩散及传质情况有关，也就是所谓色谱的动力学过程；荷兰的 Van Deemeter (范第姆特) 等人在 1956 年根据前人的工作基础，推导出柱效率 (H) 和载气线速度之间的关系式：

$$H = A + B/U + CU \quad (1.5)$$

式中， A 为涡流扩散项，与填充柱内的填充物粒度及均匀性有关； B/U 为分子扩散项，与组分在载气流中的分子扩散系数有关，载气的分子量小和流速减慢会增加分子扩散而使峰变宽； C 为传质阻力项，包括气相传质 (C_G) 和液相传质 (C_L) 两方面，前者是指在气相的样品和液液界面进行交换时的传质阻力，后者是指组分从气液界面到液相内部达到平衡后又返回气液界面的传质过程，降低固定液的液膜厚度和黏度有利于增加传质效率； U 为载气平均线速度。

该方程将 H 和 U 之间的关系描绘成一条双曲线，即 $H-U$ 曲线 (图 1.3)，与曲线最低点对应的载气线速度叫做最佳载气平均线速度 (U_{opt})，此点的 H 值最小，柱效最高。从曲线图可以看出，在 U_{opt} 左边，纵向扩散对峰展宽起主要作用；在其右侧则传质阻力起主要作用。

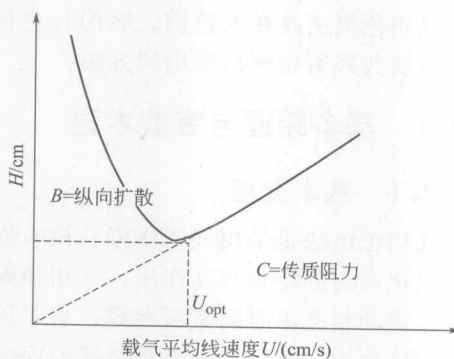


图 1.3 毛细管的范第姆特曲线

H 表示的是理论柱效率，相当于一个理论或有效塔板的柱长，实际应用中一般采用塔板数 (n) 来衡量色谱柱质量的好坏， n 可以通过下式来计算：

$$n = L/H = 5.545 \times (t_R/W_h)^2 = 16 \times (t_R/W_b)^2 \quad (1.6)$$

式中， L 为柱长； H 为柱效率； W_h 为色谱半峰宽； W_b 为色谱基线峰宽。理论塔板数与色谱柱长有关，对于给定的柱子， H 越小 n 越大，色谱峰越窄；增加柱长或缩小塔板高度可以增加理论塔板数，但柱长过长会增加分析时间和造成样品浓度的更大稀释，影响检测灵敏度。所以，在实际工作中尽可能减少 H 值，来增加 n ，实现组分的良好分离。

(3) 色谱峰的分度 (R) 在气相分析时，表示两个组分的分离效果常用分度 (R) 来表示，是指两个组分峰顶之间的距离 (Δt) 除以两个峰基线峰宽之和的 $1/2$ ，如下式：

$$R = \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{\frac{1}{2}(W_{b1} + W_{b2})} = \frac{\Delta t}{W_b} \quad (1.7)$$

式中, Δt 为两个峰保留时间之差, 与溶质和固定液的热力学性质有关, 与柱的类型 and 尺寸无关; 分母部分的半峰宽与色谱过程的动力学因素有关。所以可以认为, 分离度 (R) 是柱效率和选择性的总和, 当分离度为 1.0 时, 可以达到 95% 的分离; 当分离度为 1.5 时, 几乎达到 100% 分离; 而当固定液和柱温一定时, 分离度取决于理论塔板数 (n), n 越大, 分离度越好。另外, 两个相邻色谱峰分离度的测定也可以用图 1.4 表示。

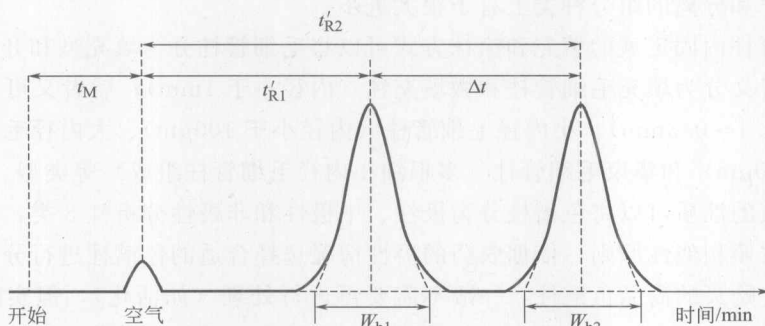
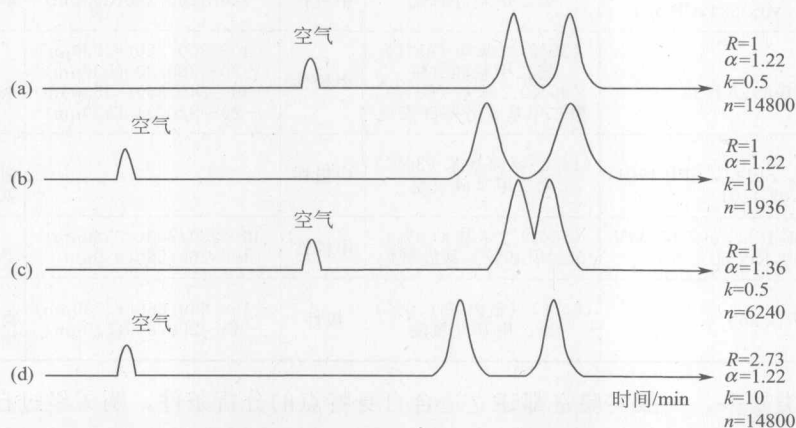


图 1.4 相邻色谱峰分离度的测定示意图

1960 年, 泊纳尔首先推导出 R 与相对保留值 α 、理论塔板数 n 和容量比 k 之间的关系式:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{n} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1 + k} \quad (1.8)$$

式中, $\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1}$, 表示相对保留值, K_1 和 K_2 代表组分 1 和 2 的分配系数; k_1 和 k_2 代表组分 1 和 2 的容量比。式中第一项为效率项, R 与 n 成正比; 第二项为选择因子项, 在组分物质对和固定液确定后只与柱温有关; 第三项为容量因子项, 与柱子类型有关。图 1.5 是 R 与 α 、 n 和 k 之间的关系示意图:

图 1.5 R 与 α 、 k 、 n 的关系示意图