

采用日本肯定列表方法筛查食品中的农药： 使用具有解卷积报告软件和保留时间锁定的 质谱数据库的 GC/MS 的优点

应用

食品

作者

Philip L. Wylie
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

2006年，日本卫生、劳动与福利部出台了一个新的方案来控制农药、饲料添加剂和兽药。这个肯定列表方案规定，只有许可列表上的化合物才能用于食品生产，并提供了这些化合物的规范框架。这个新规范提高了检测这些物质在不同食品中残留量分析方法的要求。农药是主要的监测对象，常用 GC/MS 和 LC/MS 来分析。为快速全面分析日本市场上的食品，安捷伦推出了一个新的日本肯定列表农药数据库及其解卷积报告软件 (DRS)。分析人员可以采用这个数据库和软件来筛查日本政府规定的 430 种可用 GC 分析的农药的 GC/MS 数据文件。分析过程可完全自动化，每个样品只需 2 分钟。

引言

2005年11月29号，日本卫生、劳动与福利部 (MHLW) 出台了一个“肯定列表”方案来规范农药、饲料添加剂

和兽药 [1,2]。该方案规定了758种化学品的最高残留限量及65种规范外的物质。有15种对人体有高风险性的成分必须低于检测限 [3-5]。“肯定列表”方案暗示只有列表上的化学品才能用于农用产品的生产，并且残留量必须低于日本政府规定的最高残留限量。其它没有给出最高残留限量的农用化学品有一个统一的最高残留限量0.01 ppm。这项新方案已于2006年5月29日开始实施。

自该方案出台后，日本本国及进口到日本的所有农用产品都必须遵守肯定列表的要求。这就需要对农用产品中的农药、饲料添加剂和兽药进行筛查。

本文介绍了一种快速方法，用于筛查食品提取物中可用GC分析的肯定列表上列出的农药及日本检疫站监测的农药。总之，该方法能够筛查430种不同农药的残留。这个方法采用Agilent 7890A/5975C GC/MS，其中GC采用MHLW气相色谱方法，质谱采用全扫描模式。针对这一方法，我们建立的一个新的保留时间锁定的质谱数据库。该数据库结合安捷伦的DRS，可以筛查430种农药的GC/MS数据结果，每个样品只需2分钟。



Agilent Technologies

实验

MHLW公布了基于食品的植物类和动物类食品的提取和分析方法 [6]。根据目标化合物，选择GC/MS或LC/MS来分析提取物。GC/MS方法要确定色谱柱固定相和尺寸、程序升温条件、进样口温度、载气、电离模式和电离能，以及在SIM分析中每个化合物被检测的离子。

除了通常要在全扫描模式下进行分析以检测每个化合物的所有离子外，此处使用的方法参数都是相同的。

此时使用安捷伦的DRS会更容易，比其他方法具有更多优点。

仪器、软件和仪器参数列于表1。

实例：

使用Lehotay等开发的QuEChERS方法来提取本方法分析的样品 [7, 8]。

表1. 根据日本肯定列表系统分析农药的仪器和参数

气相色谱	Agilent 7890A
色谱柱	Agilent J&W 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm DB-5MS (部件号 122-5532)
保留间隙柱 (可选)	5 m × 0.25mm Siltek脱活熔融石英管[Restek (Bellefonte, PA USA) 部件号 10026]
载气	氦气，无保留间隙柱时流速为1.0 ml/min。 用5 m × 0.25 mm保留间隙柱与GC柱头连接时流速为1.1 ml/min。 用5 m × 0.25 mm保留间隙柱与GC柱头连接，并装有QuickSwap时流速为1.7 ml/min，并设定压力为5.2 psi。
保留时间锁定	甲基毒死蜱锁定于13.443 min
程序升温条件	50 °C (1 min), 25 °C/min到125 °C (0 min), 10 °C/min到300 °C (10 min)
进样口	分流/不分流
进样口温度	250 °C
进样口衬管	螺旋双细径锥，去活 (部件号 5188-5398)
自动进样器	Agilent 7683B 系列进样器和样品盘
进样量	2 μl
质谱	Agilent 5975C MSD
数据采集模式	全扫描
扫描范围	45-550 u
阈值	0 (或根据噪音水平来设定)
电离能	70 eV
采样速率	n = 2
传输线温度	280 °C
溶剂延迟	3.5 min
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
调谐文件	Atune.u
微量离子检测	开
软件	
GC/MS 仪器控制	Agilent GC/MS化学工作站 (部件号 G1701EA, E.01.00版或更高)
解卷积报告软件	安捷伦解卷积报告软件 (部件号 G1716AA, A.03.00版或更高)
谱库检索软件	NIST MS 检索 (2.0d版或更高) (与NIST05质谱库-Agilent 部件号 G1033A 一起提供)
解卷积软件	自动质谱解卷积和鉴定软件 (AMDIS_32 2.64版 ; 与NIST05质谱库 - 安捷伦部件号 G1033A 一起提供)
质谱库	NIST05质谱库 (安捷伦部件号 G1033A) 安捷伦和NIST格式安捷伦日本肯定列表农药库 (部件号 G1675 AA)

结果与讨论

安捷伦在几年前就为GC和GC/MS提供了保留时间锁定功能。使用该软件，只要是采用相同的方法和色谱柱，不论在哪个实验室的仪器上都能得到重复的保留时间，这就使得可以建立一个含有锁定保留时间的质谱数据库。采用与数据库对应的分析方法，用户就可以鉴别库中所有物质的GC/MS结果。只有与数据库中的化合物具有相同的保留时间和谱图才能认定是同一物质，这就消除了假阳性结果，鉴定结果更确信。

最近，安捷伦推出了兼有质谱解卷积和数据库检索及定量功能的解卷积报告软件（DRS）。该软件源于以下三个软件包：1）安捷伦GC/MS化学工作站，2）国家标准与技术研究院(NIST)质谱检索程序及NIST05质谱数据库，3）、NIST的自动质谱解卷积与鉴定系统软件（AMDIS）。

DRS为所有校正过的化合物进行统一的定量分析，然后将数据文件发送到AMDIS，该软件对总离子流色谱图中的所有谱图进行解卷积（后附解卷积原理讨论）。依据每个峰的解卷积谱图在目标化合物库中进行检索。安捷伦的日本肯定列表农药库含有430种化合物。通过谱图匹配程度和比较锁定的保留时间来验

证每个命中峰。锁定保留时间的偏差允许与库值相差 ± 10 秒。通过将命中峰的解卷积谱图与NIST05质谱数据库比较，方能给出鉴定结果。鉴定结果以一个简单的报告形式给出。

解卷积

本文不对解卷积进行详细讨论，图1是其基本原理图。

黑线表示的色谱峰看似高斯峰，实际上代表至少三个部分分离的化合物。色谱峰顶点的质谱图包含三个化合物的离子，有一些离子是重叠分析中两种或三种化合物都有的。AMDIS对色谱图解卷积，从重叠峰中提取出纯物质的谱图。绝大部分情况下，该软件能够成功地将目标化合物的谱图与干扰物分离，即使干扰物丰度远远高于目标化合物。

AMDIS根据解卷积得到的全谱，在安捷伦的日本肯定列表农药库中检索与命中峰匹配的谱图，只有匹配度达到用户设定的阈值，才能报告为阳性结果。由于还需要正确的保留时间，因此有效排除了假阳性结果。同时，即使是被基质严重干扰的微量农药残留，AMDIS也能够提供可供谱库检索的谱图，从而大大减少了假阴性结果。

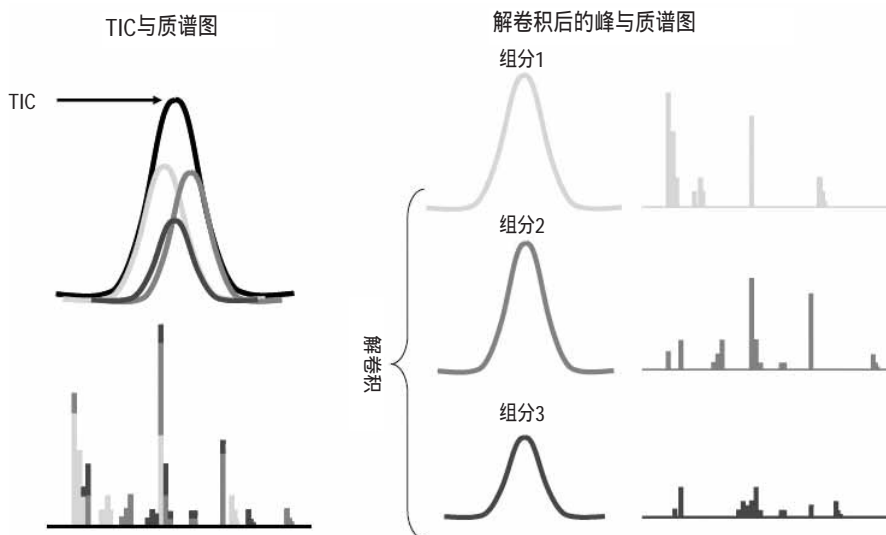


图1. 质谱解卷积示意图

在确认步骤中，需要在NIST质谱库里检索所有AMDIS得到的阳性结果的解卷积谱图。此时不需要保留时间的信息。以前的参考资料详细介绍了有关DRS的内容[11-17]。各个实验室的经验表明，DRS是快速、全面、准确筛查农药的最佳选择。

日本肯定列表农药数据库中包括的农药

日本肯定列表农药数据库中包括的农药有三个来源。第一是目前MHLW规定的用GC/MS分析所列出的农药。其次是最近神户和横滨检疫处的分析人员所写的文章中发表的几种农药[18]。第三个是来自于日本食品安全办公室的“为了2006财年的进口食品检控计划”。该计划要求进口食品和农产品必须“遵守进度表6”，该表含有447种农药[19]。在这447种农药中，一些可以用GC进行较好的分析，其他一些可以用LC。另一些两种方法均可分析，但是文件没有明确指出使用哪种方法。安捷伦日本肯定列表农药数据库包括该列表中的所有化合物，这些化合物都可以用GC/MS分析。

在两个列表中都列出实际的最高残留限量 - 一个含有最终确定的最高残留限量[4]，另一个含有临时最高残留限量[5]。在2007年2月5日，日本MHLW发表了两个最高残留限量列表的修订版本，加入了67种滥用药和农药。

在原始的日本肯定列表中的农药中，265个用GC/MS进行分析。59个新加入的农药中有些可用GC/MS分析。生成的日本肯定列表农药数据库包含430个农药和一个内标（菲-d₁₀）的质谱图和锁定的保留时间。

样品分析

图2为一个草莓提取物的色谱图，该提取物中加入了8种杀虫剂（每个为500 ng/g），并用日本肯定列表方法分析。色谱图的前18分钟非常“脏”，许多大峰来自于随同农药一起提取出来的内源性化合物。

对该样品运行DRS，但没有对目标化合物校准GC/MS，数据库中的所有农药均采用平均响应因子。图3为DRS在约90秒时生成的报告。

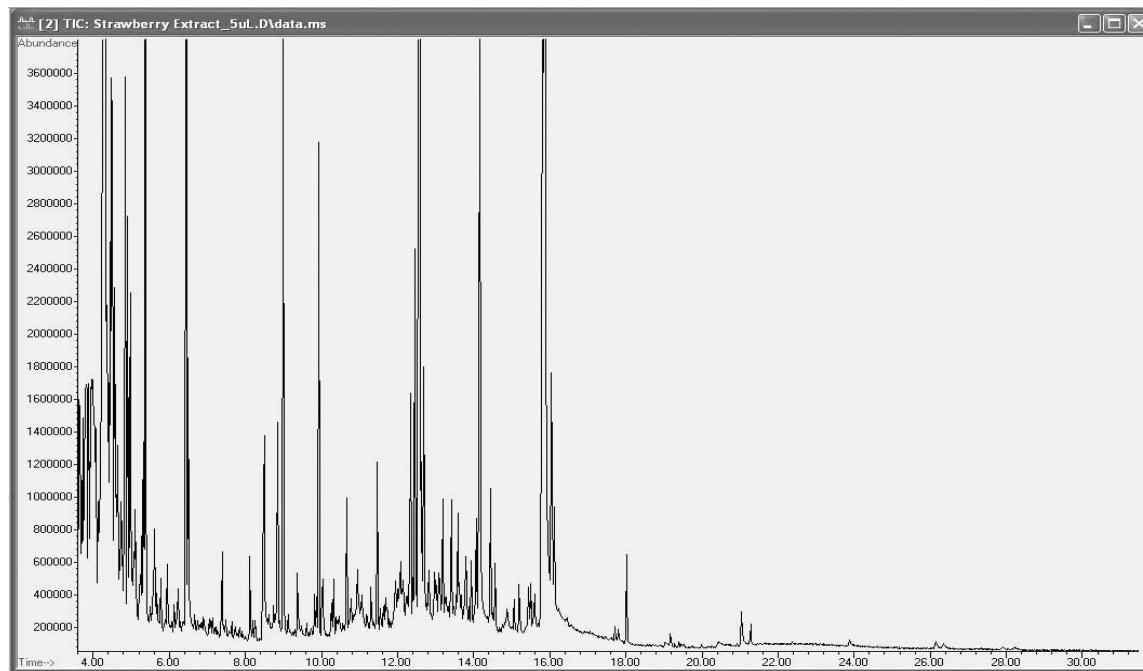


图2. 加入了8个杀虫剂（每个为500 ng/g）的草莓提取物的色谱图。8个农药中的7个存在于日本肯定列表数据库且用DRS很容易鉴定

双硫磷被加入到样品中，但是却没有被DRS发现，原因是该化合物在该数据库中不存在。用安捷伦化学工作站鉴别的哒螨灵却不能被AMDIS确认。化学工作站使用了四个离子来鉴别，而AMDIS使用整个解卷积谱来鉴别。很少有AMDIS不能发现的目标化合物而用化学工作站可以鉴别。此数据表明在样品中不存在哒螨灵。同样对于灭虫威，用AMDIS可以发现该化合物而化学工作站却没有报告是非常普遍的。该实例表明DRS如何有助于排除假阳性和假阴性结果。

对于7个命中峰中的每一个，DRS都提供了保留时间，CAS号和农药的名称。第四列表明了用化学工作站软件测得的每个命中峰的量。安捷伦提供了可以与用于不同仪器配置的日本肯定列表农药数据库一起使用的四个方法。这些方法中的每一个都配有一个用于430个目标农药的定量数据库。这些方法提供的响应因子来自于约25个典型农药的平均响应因子。这些响应因子不是准确的，但是分析人员可以据此估计目标化合物的浓度。此估计值通常与实际浓度在一个数量级内。

为了精确定量分析，实验室必须自己做校正。因为实验室不可能对430个农药进行校正，他们可以使用这些没有校正过的化合物平均值。当使用DRS对一个新化合物进行鉴定时，可以加入校正溶液。

第五列表明解卷积谱与目标农药库谱的匹配度（100=完全匹配）。同样AMDIS标题下是谱库和观察值（第6列）之间保留时间的差异。因为保留时间锁定用于谱库的建立和草莓分析，因此观察值与谱库值非常接近。值得注意的是只有一个化合物，即苯线磷，偏离其谱库的保留时间超过1秒。

DRS分析的最后一步是将每个命中峰的解卷积谱与NIST05质谱库进行对比，如果发现农药在前100个谱库命中峰中，就在最后两列打印其匹配度和Hit number。这个步骤对化合物提供了进一步的鉴定。

图4 给出了未添加标样的混合水果提取物的色谱图。DRS发现了两种杀真菌剂（二苯胺和噻苯咪唑）和一种有机磷农药（甲基谷硫磷，图5）。在初始分析中，

MSD解卷积报告

样品名: 草莓提取物
 数据文件: C:\msdchem\1\DATA\Strawberry_TID_2uL.D
 日期/时间: 04:44 PM Thursday, Sep 6 2007
 NIST谱库检索AMDIS目标谱库找到的成份

保留时间	Cas 号	化合物名称	安捷伦化学 工作站含量 (ng/μL)	AMDIS		NIST	
				Match	R.T. Diff sec.	Reverse match	Hit number
11.4914	298022	甲拌磷	0.99	95	-0.4	90	1
12.3647	13071799	特丁磷	1.4	97	-0.5	89	1
12.4698	333415	二嗪磷	1.09	95	-0.3	80	1
12.5726	1517222	菲-d ₁₀		98	-0.6	84	1
12.7135	298044	乙拌磷	0.91	87	-0.3	84	1
14.0851	2032657	灭虫威		85	0.5	81	1
14.4553	55389	倍硫磷	2.57	99	-0.3	90	1
16.0453	22224926	苯线磷	3.32	96	2.4	88	1
20.630	96489713	哒螨灵	0.04				
12.575		菲-d ₁₀	5				

图3. 草莓样品的DRS报告，其色谱图见图2。第4列的含量仅为近似值，得自平均响应因子而不是每个单独农药的校准值

尽管二苯胺与AMDIS和NIST05的结果很匹配，但它不在化学工作站给出的结果里。在这种情况下，利用化学工作站Q-edit功能对二苯胺的峰进行手动积分，DRS重新处理已定量的结果。图6给出了详细结果。由于采用平均响应因子定量，报告的结果是估计值。尽管甲基谷硫磷被共流出物掩盖，它还是从混合水果提取物中被鉴定出来。图7是一个通过AMDIS进行筛

查的例子，充分显示了解卷积的优势。图7a的箭头标出了甲基谷硫磷在总离子流图中的位置，图7b是对应位置的质谱图，图7c是解卷积谱图（白）与谱库结果（黑）的重叠图。没有解卷积的结果，几乎不可能通过谱库检索鉴定甲基谷硫磷。尽管已知甲基谷硫磷存在，但无法通过标准背景扣除技术生成谱库可检索的谱图。解卷积后的谱图与谱库结果能够合理匹配。

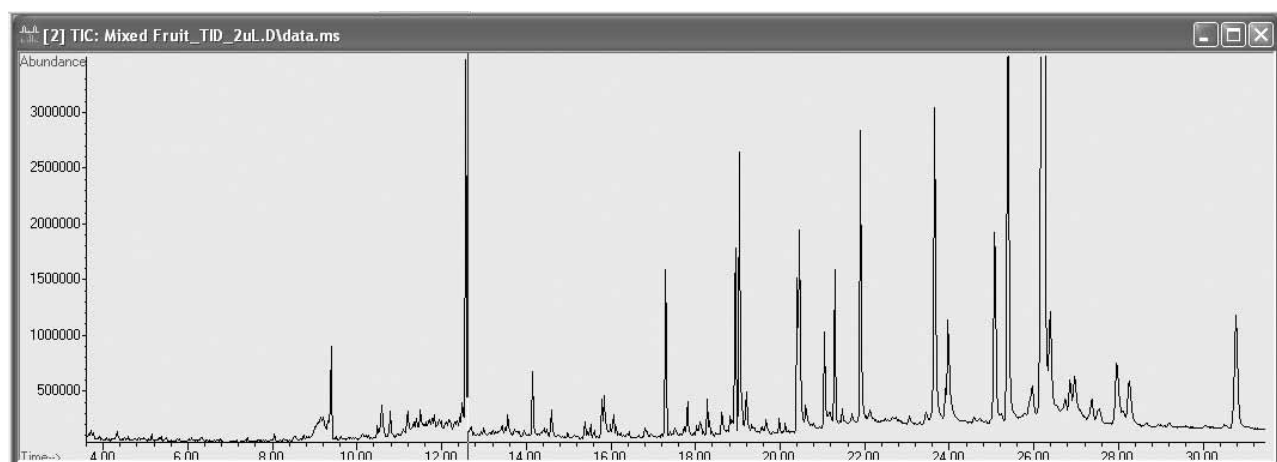


图4. 未添加标样的混合水果萃取物色谱图

质谱解卷积报告

样品名称： 水果混合物

数据文件： C:\MSData\Sept 04_07 Lehotay samples using TID & Japanese method\Mixed Fruit_TID_2uL.D

时间： 04:01 PM Monday, Sep 10 2007

NIST库搜索结果

保留时间	Cas 号	化合物名称	安捷伦化学 工作站含量 (ng/ μ L)	AMDIS		NIST	
				Match	R.T. Diff sec.	Reverse match	Hit number
10.7853	122394	二苯胺		97	-0.1	91	1
12.5733	1517222	菲-d ₁₀		99	-0.6	84	2
15.3882	148798	噻苯咪唑	0.66	99	-2.6	92	1
19.4523	86500	甲基谷硫磷	0.02	63	-0.6	76	2
12.575		菲-d ₁₀	5				

图5. 混合蔬菜样品的初始解卷积报告，色谱图见图4。

质谱解卷积报告

样品名称： 水果混合物

数据文件： C:\MSData\Sept 04_07 Lehotay samples using TID & Japanese method\Mixed Fruit_TID_2uL.D

时间： 04:11 PM Monday, Sep 10 2007

NIST库搜索结果

保留时间	Cas 号	化合物名称	安捷伦化学 工作站含量 (ng/μL)	AMDIS Match	AMDIS R.T. Diff sec.	NIST Reverse match	NIST Hit number
10.783	122394	二苯胺	0.92	97	-0.1	91	1
12.5733	1517222	菲-d ₁₀		99	-0.6	84	2
15.3882	148798	噻苯咪唑	0.66	99	-2.6	92	1
19.4523	86500	甲基谷硫磷	0.02	63	-0.6	76	2
12.575		菲-d ₁₀	5				

图6. 对二苯胺采用Q-Edit积分后的解卷积报告结果

几项研究表明，DRS能够鉴定常规农药分析方法不能发现的农药[14,15]。大部分GC和GC/MS方法只适用特定的一些农药，并且通常不鉴定化合物，除非这些化合物在目标列表中。另外，采用这些方法分析鉴定

每个样品的时间一般在30分钟甚至更长。而采用安捷伦的DRS，每个样品只需2分钟，就能筛查由GC分离的所有日本政府限定的农药。

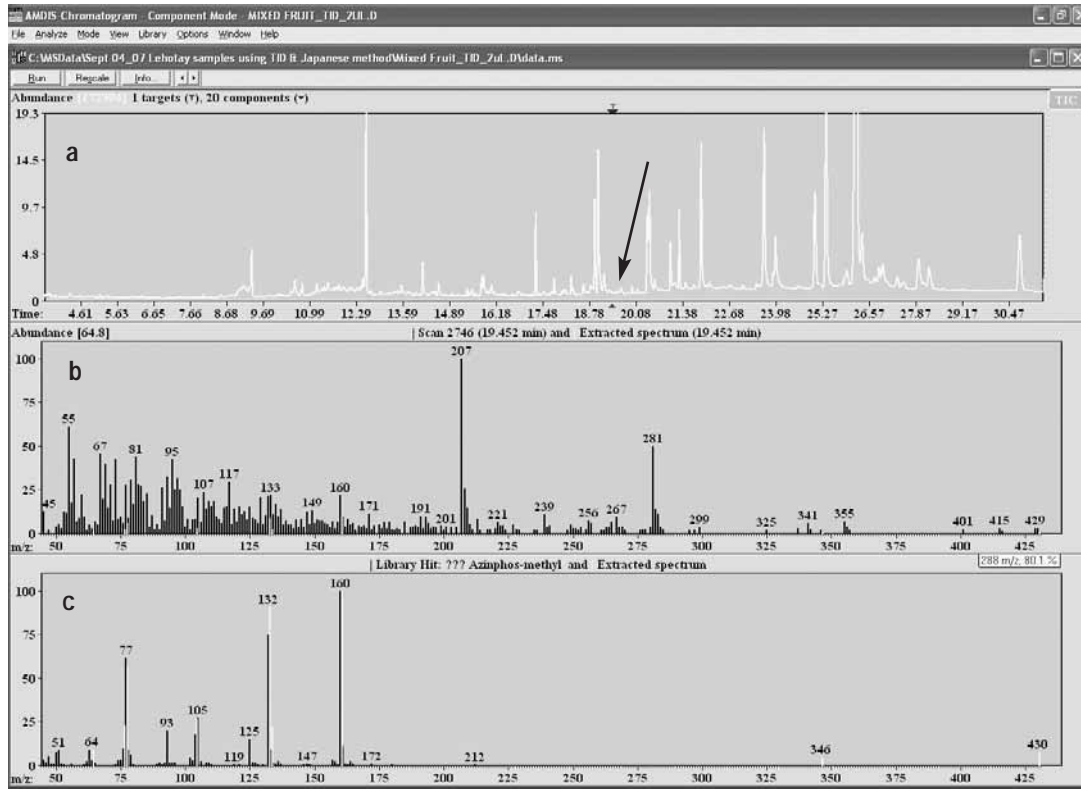


图7. AMDIS筛查实例：a) 混合水果萃取物总离子流色谱图，b) 甲基谷硫磷在总离子流图中对应位置的质谱图，c) 解卷积谱图（白）与谱库结果（黑）的重叠图

结论

安捷伦科技有限公司推出了一个新的保留时间锁定质谱数据库，它能够满足必须符合日本肯定列表要求的实验室的需求。数据库包含430种农药的安捷伦、NIST和AMDIS格式的质谱图和锁定的保留时间。农药列表来自最新的日本卫生、劳动福利部及其机构的出版物。用MHLW推荐的GC/MS条件得到锁定保留时间。加上安捷伦的DRS，分析人员可以在大约2分钟的时间内为每个样品筛查所有430种农药的数据文件。方法快速、全面、精确，并且可自动化，因此较少依赖于分析人员的技能。

参考文献

1. "Introduction of the Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods," Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare, June 2006
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food-safety/positivelist060228/introduction.html>
2. "Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods," Ministry of Health, Labour and Welfare
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food-safety/positivelist060228/index.html>
3. "Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods," The Japan Food Chemical Research Foundation
<http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>
4. Table in item 6 (1), Section A General Compositional Standards for Food, Part I Food: The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food-safety/positivelist060228/dl/index-1a.pdf>
5. Table in item 7 (1), Section A General Compositional Standards for Food, Part I Food: The maximum residue limits of substances used as ingredients of agricultural chemicals in foods (Provisional MRLs List)
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food-safety/positivelist060228/dl/index-1b.pdf>
6. "Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural Chemicals, Feed Additives, and Veterinary Drugs in Food", Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare,
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food-safety/positivelist060228/dl/060526-1a.pdf>
7. S. J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, and P. van Bodegraven (2005) *J. AOAC Int.* **88**, 595-614
8. M. Anastassiades, S. Lehotay, D. Štajnbaher, and F. J. Schenck (2003) *J. AOAC Int.*, **86**, 412-431
9. V. Giarocco, B. Quimby, and M. Klee, "Retention Time Locking: Concepts and Applications," Agilent Technologies, publication 5966-2469E, www.agilent.com/chem
10. H. Prest, P. Wylie, K. Weiner, and D. Agnew, "Efficient Screening for Pesticides and Endocrine Disruptors Using the 6890/5973 GC/MSD System," Agilent Technologies, publication 5968-4884E, www.agilent.com/chem
11. Philip L. Wylie, "Screening for 926 Pesticides and Endocrine Disruptors by GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a New Pesticide Library," Agilent Technologies, publication 5989-5076EN, www.agilent.com/chem
12. Bruce Quimby, "Screening for Hazardous Chemicals in Homeland Security and Environmental Samples Using a GC/MS/ECD/FPD with a 731 Compound DRS Database," Agilent Technologies, publication 5989-4834EN, www.agilent.com/chem
13. Mike Szelewski and Bruce Quimby, "New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples," Agilent Technologies, publication 5989-1716EN, www.agilent.com/chem
14. Chris Sandy, "A Blind Study of Pesticide Residues in Spiked and Unspiked Fruit Extracts Using Deconvolution Reporting Software," Agilent Technologies, publication 5989-1654EN, www.agilent.com/chem
15. Philip Wylie, Michael Szelewski, Chin-Kai Meng, Christopher Sandy, "Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD Using Deconvolution Reporting Software," Agilent Technologies, publication 5989-1157EN, www.agilent.com/chem

16. Xiaofei Ping, Chin-Kai Meng, Michael Szelewski, "Building Agilent GC/MSD Deconvolution Reporting Libraries for Any Application," Agilent Technologies, publication 5989-2249EN, www.agilent.com/chem
17. C. Lesueur and M. Gartner, "Routine Identification and Quantification of Pesticide Multiresidues in Fruit and Vegetable Samples with Full Scan, SIM, and Deconvolution Reporting Software," *Ernahrung/Nutrition* **29** (11), 466-471 (2005)
18. Y. Hirahara, et Al., "Validation of Multiresidue Screening Methods for the Determination of 186 Pesticides in 11 Agricultural Products Using Gas Chromatography (GC)," *J. Health Science* **51** (5) 617-627 (2005)
19. "Imported Foods Monitoring Plan for 2006" Notices Nos. 0331006 and 0525001, Office of Imported Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare, May 26 2006
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/dl/4.pdf>

致谢

作者感谢美国农业部的Steven Lehotay和Katerina Mastovska提供的加标和未加标的提取物。

如需详细信息

有关我们的产品和服务的更多信息，欢迎访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本文存在的纰漏以及与本文有关的设备、操作或使用的材料造成的损害不承担任何责任。

本文中相关的信息、说明或规格若有变动，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2007

中国印刷
2007年9月21日
5989-7436CHCN