

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY××××-××××

植物中农药代谢试验准则

Guideline for the testing of pesticide metabolism in crops

（征求意见稿）

2016-××-××发布

2016-××-××实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位:农业部农药检定所

本标准主要起草人:

植物中农药代谢试验准则

1 范围

本标准规定了植物中农药代谢试验的基本要求，包括农药的同位素标记合成、示踪试验的设计和实施、样品采集及贮藏、代谢产物定性定量分析、试验记录及报告要求等。

本标准适用于为农药登记提供数据而进行的农药代谢试验。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB11930 操作开放型放射性物质的辐射防护规定

GB14500 放射性废物管理规定

GB12711 低、中放射性固体废物包装安全标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 农药代谢 pesticide metabolism

农药直接或间接施于作物后，活性成分在作物中的吸收、分布、转化，鉴定其在作物中的代谢和（或）降解产物，并明确代谢和（或）降解途径。

3.2 农药的同位素标记合成 synthesis of isotopic labeling pesticides

利用放射性和（或）稳定性同位素对农药分子（稳定骨架）进行同位素标记合成，从而获得 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 和 ^{35}S 等标记农药化合物的过程。一般首选 ^{14}C 同位素，当分子中不含碳原子或仅有不稳定的含碳侧链时，可考虑使用 ^{35}S 或其

他放射性同位素。稳定性同位素（如 ^{13}C 和 ^{15}N ）与放射性同位素同时使用，有助于代谢物的结构鉴定。

3.3 同位素标记农药 isotopic labeling pesticides

用放射性或稳定性同位素标记的农药。

3.4 放射化学纯度 radiochemical purity

放射性标记化合物中以某种特定的化学形态存在的放射性核素的活度占总放射性核素活度的百分比。

3.5 总放射性残留量 total radioactive residue (TRR)

残留中源于标记农药的母体及其代谢和（或）降解物的总放射性量，包括可提态残留量和结合残留量。

3.6 同位素示踪规范试验 laboratory practice of isotopic tracing

在具有国家或省级以上“辐射安全许可证”资质（丙级以上非密封性放射性同位素实验许可资质）实验室中，以同位素标记化合物为示踪剂，按照放射性实验规范（GB11930）操作试验，获取推荐使用的农药在作物中的代谢和（或）降解产物信息及途径，以及推荐农药母体及其代谢和（或）降解产物在作物中的消减动态规律。

3.7 可提态残留 extractable residue (ER)

能够用常规提取方法得到的农药残留，即通常意义上的农药残留，包括母体及其衍生物。

3.8 结合态残留 bound residue (BR)

在不显著改变残留物化学性质条件下，不能用常规提取方法提取的包括母体及其衍生物农药残留，即不可提取态残留。

3.9 推荐剂量 recommendation dosage

一种农药产品经田间药效试验后，提出的防治某种作物病、虫、草害的施药量或浓度。

3.10 实验室样品 laboratory sample

实验室中按照缩分原则缩小以后、用于冷冻贮藏、分析取样和复检的样品。

3.11 分析样品 analytical sample

按照分析方法要求直接用于分析的样品。

4 基本要求

4.1 农药代谢试验单位实验室应具备以下条件：

- 4.1.1 具有丙级以上非密封性放射性实验室资质；
- 4.1.2 按照同位素示踪实验操作规程进行代谢试验，保证分析质量；
- 4.1.3 具有满足代谢产物分析鉴定技术要求的仪器、设备和环境设施。

4.2 农药代谢试验人员

从事标记农药代谢试验骨干人员要求具有放射性工作人员许可证，个人剂量季度监测报告，职业病检测报告，以及具备进行农药代谢试验的专业知识和经验，掌握农药代谢试验的相关规定和技能。

4.3 代谢试验的背景资料

背景资料包括：拟登记的农药有效成分及其剂型的理化性质、制备方法、登记应用的作物、防治对象、使用剂量、使用适期和次数、推荐的安全间隔期，以及已有的毒理、残留和环境评价资料等。并记录农药产品标签中农药通用名称（中、英文）、注意事项以及生产厂家（公司）、产品批号等。

4.4 代谢试验的设计原则

- 4.4.1 根据农药产品推荐的使用方法，明确规范用药条件下，直接或间接施于作物后活性成分在作物体内的残留分布、主要代谢物和（或）降解物组成，指明活性成分的代谢和（或）降解途径。
- 4.4.2 防治对象存在与否并不影响代谢试验方案的实施。

5 试验方法

5.1 农药的同位素标记

根据农药化合物的元素组成和分子结构，选择射线类型、能量和半衰期合适的核素和稳定的标记位置以及适宜的比活度。对于一些结构复杂的农药化合物，应选择多位置标记和（或）双（多）核素标记。农药标记化合物的化学纯度和放

射化学纯度要求达到 95% 以上。

5.2 供试作物

将作物分为 5 类：根茎类作物、叶类作物、果实类作物、种子与油料类作物、谷类作物（见附录 A）。为了推断一种农药在所有作物种群中的代谢，需在上述 5 类作物中选 3 类，每类应至少选 1 种代表性作物进行代谢研究。在使用剂量和方法近似的情况下，每类中 1 种作物上的代谢数据可适用于同类其他作物。对那些不属于该 5 类作物中的作物，试验人员应参考附录 A 中“其他种类”作为指导。

5.3 供试土壤

根据作物生长特性，选择具有代表性且未施用目标农药的土壤。采 0~15 cm 耕作层，土壤 pH 范围为 4.5-8.5，有机质含量范围为 0.5~2.5%。

5.4 施药方式

5.4.1 施药剂量 在代谢试验设计中，应该考虑到施药方法和所用的农药活性成分的施用剂量，一般采用田间最大推荐施用剂量。对于某些施药量特别低的农药，可以适当增大施药剂量，以便鉴定出各种代谢产物。在该种情况下，代谢产物及规律需要进行田间最大推荐施用剂量下的验证试验。

5.4.2 示踪剂从作物地上部（叶片）引入的方法 作物地上部引入示踪剂是一种常用的引入方法。该引入途径需将农药标记化合物配制成浓度适当的溶液。可以适当增加溶液中示踪剂的比活度或丰度，以满足试验需要。引入方式主要有：

5.4.2.1 涂抹法：配制好示踪剂溶液，蘸取一定量在叶面或叶背反复涂抹，并通过测定实际引入作物的总放射性活度确定引入量。处理叶的叶龄要求基本一致。涂抹时防止叶面损伤和交叉污染。

5.4.2.2 喷雾法：用微型喷雾器将示踪剂溶液均匀地喷洒在叶片表面，并通过测定实际引入作物的总放射性活度确定引入量。喷洒需在气密性装置中进行，以保证实验人员安全和防止交叉污染。

5.4.2.3 点滴法：用移液枪定量吸取示踪剂溶液，均匀涂抹在叶面上，并通过测定实际引入作物的总放射性活度确定引入量。处理叶的叶龄要求基本一致。涂抹时防止叶面损伤和交叉污染。

5.4.3 示踪剂由栽培基质引入的方法

5.4.3.1 毒土法试验时，示踪剂可在播种前或播种后按试验设计均匀施入培养土壤中。示踪剂的用量和施加方法可根据试验目的而定。

5.4.3.2 砂培和水培试验时，按需要的浓度及比活度，把示踪在预定的时间（或作物生育期）加入培养液中。

5.5 作物培养

用于代谢研究的作物可以种植在辐射防护设施完备的户外试验小区、温室或者人工气候室内。实验时根据不同作物的生理生长特性，按照常规栽培方法对其进行培养，培养期间记录环境条件（如温度、湿度、光照等）和栽培措施。

5.6 采样间隔和次数

施药后定期采样，采样次数不少于 6 次。作物首次采样应于施药后药液基本风干时进行，以确定标记农药的原始沉积量。毒土法试验时应同时采集作物与土壤样品。

6 样品的采集、运输及贮藏

6.1 样品采集

6.1.1 作物样本的采集 作物样本的采集时间和采集方式由其农艺和经济食用方式确定。对那些在未成熟期就被食用的作物，应采集相关的植株样本进行分析。采集后植株通常根据作物生理性状分为根、茎、叶、果实（果肉和果皮）、种子。

6.1.2 土壤样品的采集 土壤样品的采集时间由作物样本的采集时间确定，采集样品量可通过测定土壤中总放射性残留量（TRR）来确定，采样量应足够用于土壤中降解产物分析。

6.1.3 样品采集过程中应避免交叉污染。在采集叶片施药作物样品时，可用滤纸或套袋将施药叶片与其他非施药叶片隔离；在采集根部施药作物样品时，可采用滤纸将地上部与施药的土壤或营养液等介质隔离，防止污染地上部。

6.2 样品处理的注意事项

6.2.1 在样品采集、包装和制备过程中，必须采取措施以杜绝放射性物质向对照组、土壤、水等环境中的迁移。

6.2.2 在样品的采集、包装和制备过程中避免样品表面残留农药的损失。

6.3 样品的运输及贮藏

6.3.1 采集的每一个样品应做好标识，并赋予唯一编号，且于 24 h 以内送达实验室，同时记录样品相关资料（如样品名称、采样时间、地点及注意事项等）。

6.3.2 样品需用不含分析干扰物质和不易破损的容器包装，并尽快保存在冷冻或冷藏冰箱中。

6.3.3 新鲜样品应在 3℃~5℃下贮存并尽快检测，如需贮存较长时间或是冷冻样品，则样品必须先液氮冷冻或冷冻干燥，然后于-18℃条件下贮存，解冻后应立即测定。有些农药在贮存时可能会发生降解，需要在相同条件下作添加回收率试验进行验证。对于果皮和果肉分别检测的样品，应该在冷冻前将其分离，分别包装。一般不得将样品匀浆后冷冻，除非证明这样不可能造成农药残留的损失。

7 可提态残留分析

7.1 提取

根据待测农药的性质、植物样品类型和实验室条件选择适当的提取方法。常用的提取方法主要有振荡法、匀浆法、浸渍漂洗法、索氏抽提法、超临界流体萃取（SFE）、微波萃取、加速溶剂萃取（ASE）等方法。在提取的过程中，要求测量每一提取步骤的放射性，计算提取效率，确定最佳提取方案。

7.2 样品的预处理

7.2.1 样品的浓缩 常用的样品浓缩方法有旋转蒸发法和氮气吹扫法等。

7.2.2 样品的净化 根据样品与干扰物物理化学性质的不同，采用液-液分配法、吸附柱层析法、柱色谱法、吹扫共馏法和冷冻干燥法等方法进行样品净化。在净化过程中，根据萃取各相或流出液的放射性检测来取舍目标物和杂质，避免放射性目标物丢失，确保放射性物质的回收率。

7.3 代谢物和（或）降解物的分离与鉴定

7.3.1 代谢物和（或）降解物的分离 通常采用高效液相色谱-液体闪烁测量仪（HPLC-LSC）或流动液体闪烁仪（HPLC-FSA）联机技术分离净化样品中各组分，并根据流出组分的放射性特征峰来取舍目标代谢产物和杂质。色谱分离条件

应以能将放射性目标物与杂质间达到有效分离为宜。

7.3.2 代谢和（或）降解物的鉴定 将分离得到的放射性目标物进行色谱-质谱联用分析，质谱选用二级或多级质谱分析，建议采用高分辨质谱。鉴定目标物时，对比质谱总离子流（TIC）和液相色谱峰各目标物的保留时间，并根据目标物的二级质谱断裂行为（Fragment Pattern）推断放射性目标物的分子结构。在做结构鉴定时，还需特别注意同位素质谱特征信息。

7.4 放射性代谢物和（或）降解物的确证

采用共色谱法对鉴定结果进行确证实验。确证结构的典型方法：一是通过在不同色谱体系下，主要代谢物和（或）降解物与已知标样进行共色谱法对比，要对比色谱图中目标物的保留时间、峰型和响应值与标准品是否一致。二是使用如质谱（MS）或串联质谱（MS/MS）等可以确定其结构的技术，将代谢物和（或）降解物的二级质谱特征和碎裂行为与已知标样的进行比对，旨在进一步确证代谢物和（或）降解物的结构。

7.5 当代代谢物绝对浓度低于 0.05 mg/kg 或在残留物总量中占的比例低于 TRR 的 10% 时，用该物质与合成的标准物质进行共色谱法分析，来确定其结构。

7.6 通常不需要进行代谢物的立体化学结构鉴定。如果已确定有手性中心的代谢物包含在残留物中，且存在毒理学问题，那么光学异构体的比例应该在试验中加以说明。

7.7 在相当于 1 倍田间最大推荐施用剂量用药条件下，采用同位素标记法进行农药在植物中的残留代谢研究总体措施参见表 1。

表 1 植物研究中可提态残留物性质与代谢产物结构鉴定研究措施

相对含量 (%)	浓度 (mg/kg)	要求的措施
<10	<0.01	没有毒理学问题, 不采取进一步研究
<10	0.01-0.05	确定性质。只有容易确定结构的时候才尝试确定结构, 例如有参考物或以前的研究已确定了化合物的结构。
<10	>0.05	每个化合物逐个考虑, 根据已确定结构的化合物数量, 决定对化合物进行结构、性质确定。
>10	<0.01	确定性质。只有容易确定结构的时候才尝试确定结构, 例如有参考物或以前的研究已确定了化合物的结构。
>10	0.01-0.05	尽量确定结构和代谢途径
>10	>0.05	用所有可能的方法确定结构和代谢途径
>10	>0.05 结合态残留物	进行结合态放射性残留物性质分析

7.8 结果的计算和表述

根据采用的检测方法进行结果计算和数据统计。代谢物残留量可根据放射性活度和比活度换算成 mg/kg 表示。当检测值低于最低检测浓度时, 应写 “<最低检测浓度值”。应真实记载实际检测结果, 分别列出各样品重复检测值和平均值, 而不能用回收率校正。

结果一般以两位有效数字表达, 在残留量浓度低于 0.01 mg/kg 时采用一位有效数字表达。回收率采用整数位的百分数表达。土壤样品以干重计算, 作物样品以鲜重计算。

8 结合态残留分析

采用放射性同位素示踪定量方法进行结合残留定量。在利用生物氧化燃烧仪转化释放结合残留物时, 其放射性物质回收率应保证在 90% 以上。

9 放射性废物处置

按照《操作开放型放射性物质的辐射防护规定》(GB11930)、《放射性废物管理规定》(GB14500)、《低、中放射性固体废物包装安全标准》(GB12711)以及《放射性物品运输安全管理条例》(国务院第 562 号令)等国家相关法律、法规进行放射性废物分类、处理、处置、运输和存放。

10 实验报告的撰写

见附录 B，农药代谢试验报告格式。

附件 A

用于代谢试验作物分类

作物代谢研究需要相关的作物；需要对建议使用的每个作物进行代谢研究。如果在某三类作物上能获得一致的代谢过程，则最多选择三类作物即可。如果在选择的作物种类中发现不同的代谢途径，那么就需要进行进一步的研究。

代码	种类	作物
F	果实类作物	柑橘类水果 坚果 仁果类水果 核果 浆果 小果类 葡萄 果菜类蔬菜 香蕉 柿子
R	根茎类作物	根类或块茎类蔬菜 鳞茎类蔬菜
L	叶类作物	十字花科蔬菜 叶菜 茎菜 啤酒花 烟草
C/G	谷类、饲料作物	谷类 牧草及饲料作物
P/O	种子与油料类作物	豆类蔬菜 豆类

		含油种子 花生 饲用豆科作物 可可豆 咖啡豆
-	其它种类	总的来说，以上没有列出的作物种类被认为是各类混杂的作物，一般不被选在三类作物之中。然而，如果考虑到该类作物在一些国家、地区中的重要性，建议使用某种这类作物来代替三类作物中的一种，如有这种情况一般建议试验人员向监管部门咨询。

附件 B 农药代谢试验报告编写格式

报告编号：_____

农药（通用名称）在作物名称上的代谢试验报告

试验药剂：农药产品名称（剂型、含量等）

试验单位：

委 托 方：

试验地点：

试验起始时间：

试验完成时间：

试验负责人：

参加试验人员：

报告完成时间：

农药名称 含量 剂型 在植物上代谢试验报告

中文通用名：

英文通用名：

化学名称：

化学结构式：

化学分子式：

分子量：

农药基本情况：（包括试验委托方、农药生产企业、农药的理化特性、毒性、生物活性和防治对象、作用机制、推荐 MRL 和 ADI(含数据来源)等。）

放射性标记农药信息：（包括化学纯度、放射化学纯度、比活度、放射特性以及它的来源；需对标记位点进行阐述，通常选择农药分子中的稳定结构进行同位素标记；如果没有选择 ^{14}C 进行同位素标记，须说明理由）。

一、实验室（室内）试验

1.试验时间：

2.试验地点：

3.试验农药：

4.试验土壤和植物：

5.施药和处理方法

5.1 室内试验设计：（包括试验单位及人员、重复次数、施药方法、施药量、施药次数及间隔、采样时间及间隔、采样方法、样品制备、包装、运输及储藏、放射性废物处置等。）

5.2 室内条件、土壤类型：

5.3 消解动态试验：（包括重复次数、施药方法、施药量、采样时间、采样方法、样品制备、样品处理及分析等。）

5.4 最终代谢试验：（包括样品预处理、代谢物的分离与鉴定、代谢物的验证、结合态残留分析等。）

二、检测方法

方法原理简述

1.仪器设备：

- 2.试剂:
- 3.分析步骤
 - 3.1 提取方法:
 - 3.2 净化方法:
 - 3.3 分析测定
 - 3.3.1 仪器（HPLC、HPLC-FSA、HPLC-LSC、LC-MS/MS 等）条件:
 - 3.3.2 最小检出量:
 - 3.3.3 最低检测浓度:
 - 3.3.4 相对保留时间:
 - 3.3.5 添加回收率与相对标准偏差：文字及表格说明
 - 3.3.6 放射性物质（LSC 谱）：文字及表格说明
 - 3.3.7 代谢物分析与鉴定:
- 4.试验结果
 - 4.1（农药通用名称）在植物、土壤的消解动态结果（有文字说明，且有表格附后；用 $C=C_0e^{-kt}$ 计算半衰期、相关系数）
 - 4.2（农药通用名称）在植物、土壤中代谢物和（或）降解物鉴定（有文字说明，且有表格及相关鉴定谱图附后）
 - 4.3 确证试验结果（如果有的话）
- 5.结论及合理使用建议
 - 5.1 待测农药在植物或土壤中的消解速率评价
 - 5.2 各种施药因子与代谢物相关性分析
 - 5.3 非正常检测结果分析
 - 5.4 根据试验结果提出合理使用建议
- 6. 图表:
 - 6.1 表格包括室内试验表、放射性物质添加回收率表、消解动态表、农药代谢物鉴定结果表。
 - 6.2 谱图包括液相色谱图（HPLC）、高效液相色谱-液体闪烁测量仪（HPLC-LSC）或流动液体闪烁仪（HPLC-FSA）图谱、代谢产物结构鉴定质谱（MS）图等。

6.3 农药母体代谢动态曲线图: 包括农药母体在植物中的代谢动态曲线, 图中显示回归方程及相关系数。

6.4 代谢产物的动态曲线图: 农药代谢产物在植物中的动态变化曲线。

6.5 代谢途径: 农药在植物中的代谢途径。