

# 一次检测10皮克的86种农药残留的气质联用方法

袁猛 珀金. 埃尔默公司, 710 Bridgeport Avenue, Shelton, 康乃狄克州, 美国  
Email: Meng.Yuan@perkinelmer.com

肖辉, 孙梦寅, 赵雅松 北京市食品安全监控中心, 北京, 100043

## 1. 前言

为加强北京市食品安全、商品质量控制及奥运会食品安全监督工作, 2004年初, 北京市工商行政管理局、北京市人民政府食品安全监督协调办公室设立了北京市食品安全监控中心, 构建了食品安全信息监测及研究, 突发食品安全事件处理, 食品安全风险评估及预警, 奥运食品安全监测以及食品安全技术应用及转化的技术平台, 为首都的食品安全, 商品质量控制工作和领导决策提供了有力的技术支持。

食品中的农药危害健康, 为了保证食品的安全, 有必要准确的测量农药残留。多数检测农残的标准方法建议用气相色谱和选择性元素检测器, 比如FPD和ECD。<sup>(1)</sup> 但这些检测器不能提供足够多的信息来证明农药是否确实存在, 所以很难消除假阳性的检测结果。质谱仪提供了额外的信息, 自动去卷积的软件AMDIS能够消除假阳性。<sup>(2)</sup>

气质联用是适合检测农残的方法, 它提供了足够的选择性, 同时也比液质联用和气相色谱串联质谱联用更便宜。必须小心选择衬管和毛细管色谱柱, 我们建议使用去活化衬管(P/N N6502002)和 DB17 MS 色谱柱, 惰性的衬管和色谱柱能保证检出限到 10 皮克。

这篇应用文献描述了用气质联用仪检测10皮克农药残留的方法, 珀金. 埃尔默公司的 Clarus600气质联用仪可以一针准确测试10皮克的86种农药。图1是北京工商局测试农残的仪器。



图1 北京工商局的Clarus600气质联用仪

## 2. 实验

北京工商局的工程师配置了 1mg/mL 的 86 种农药混合标准溶液作为储备液， 农药混标中包括菊酯， 有机氯， 有机磷， 氨基甲酸酯四类农药。

表 1 仪器参数

气相色谱	PerkinElmer Clarus 600 GC
烘箱起始温度	50 °C
保持时间 1	1 min
升温速度 1	25 °C/min 到 150 °C
保持时间 2	0 min
升温速度 2	3 °C/min 到 200 °C
保持时间 3	0 min
升温速度 3	8 °C/min 到 300 °C
保持时间 4	5.83 min
平衡时间	0.2 min
色谱柱	DB 17 MS – 30 m x 250 µm x 0.25 µm
进样口	PSSI
进样模式	不分流脉冲进样
进样体积	1 µL
进样口温度	280 °C

衬管	表面去活化衬管 (P/N N6502002)
载气	氮
载气流速	1 mL/min
<b>质谱</b>	<b>PerkinElmer Clarus 600 MS</b>
质量范围	45-500u
溶剂延迟	4 min
扫描时间	0.20 sec
扫描间隔时间	0.02 sec
传输线温度	280 °C
源温	230 °C
光电倍增管电压	500V
通道间隔时间	0.01 sec
<b>SIM 模式</b>	<b>31 SIM 组</b>
<b>SIR 停留时间</b>	<b>0.04 sec</b>
工作站	TurboMass 5.4.2

系统配置：

- Clarus 600 气质联用仪；
- 去活化衬管 (P/N N6502002)；
- DB17 MS 色谱柱；
- TurboMass 5.4.2 工作站；
- NIST 谱库，其中包括 AMDIS 质谱去卷积软件。

#### 选择离子扫描模式 SIM

为提高灵敏度，我们使用选择离子扫描方法，以下是划分离子组的步骤：

- 每一种农药选择一个定量离子和两个定性离子。
- 每一个离子的停留时间是 0.04 秒。
- 每一个通道包括一到三种农药，三到九个离子。
- 离子组之间的保留时间相隔为 0.2 分钟。
- 中国农业部规定检测的农药，比如甲胺磷、甲基对硫磷、对硫磷等单独占用一个通道；这些离子的停留时间是 0.08 秒。

图 2 是质谱方法

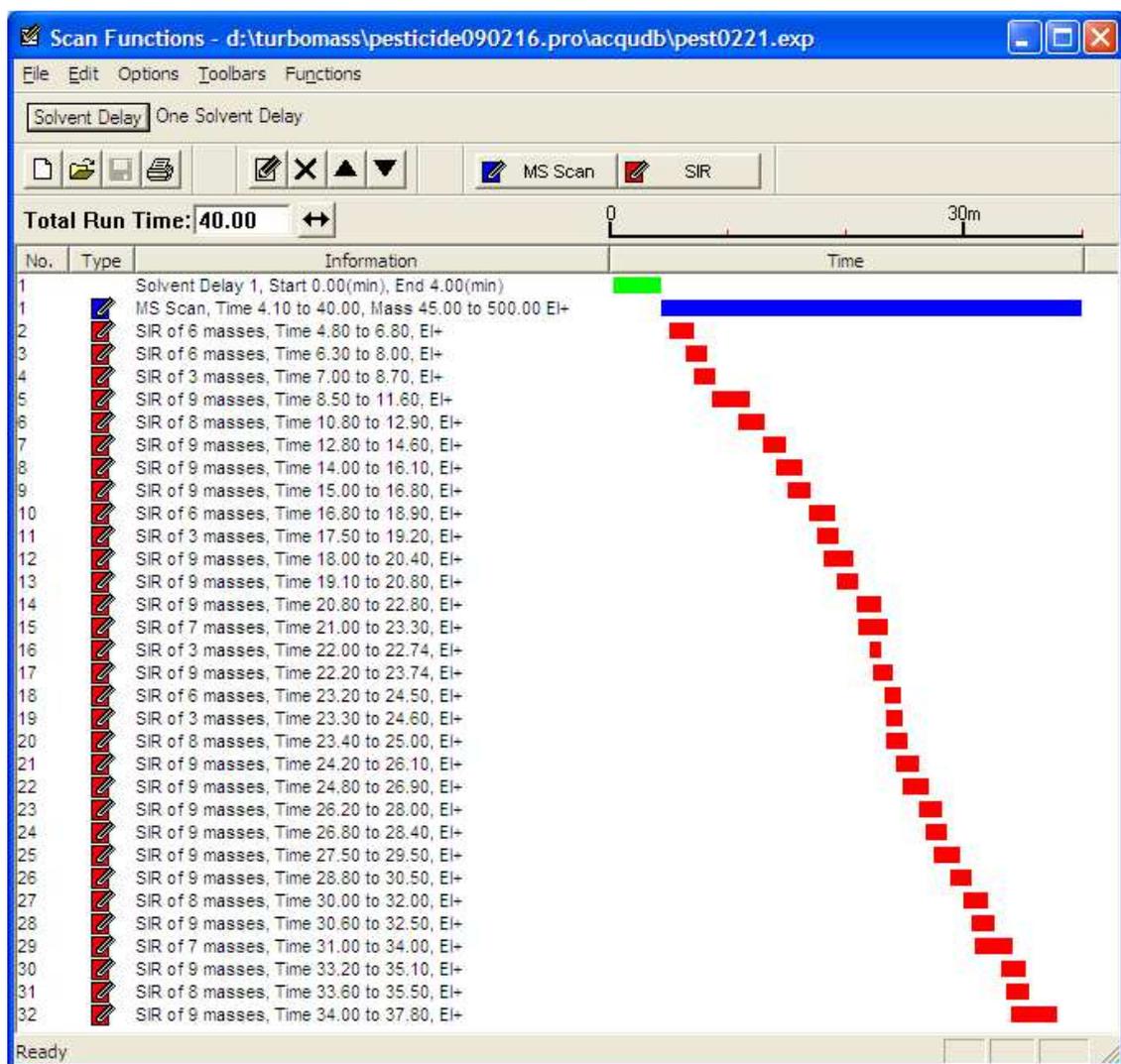


图 2 质谱方法

### 配置标准溶液

配置 10 $\mu$ g/mL 标准储备溶液:

用乙腈/甲苯 (3:1) 混合溶液把100 $\mu$ L 的1000 $\mu$ g/mL农药混标稀释到10mL, 需冰箱冷冻保存。

配置 0.100 $\mu$ g/mL 工作标准溶液:

用乙腈/甲苯 (3:1) 混合溶液把100 $\mu$ L 的10 $\mu$ g/mL农药混标稀释到10mL。

表 2 是具体稀释方法。

表 2 配置工作曲线农药标准溶液的方法

数据点	浓度	0.1 µg/mL 标准 溶液体积	10 µg/mL 标准 溶液体积	乙腈/甲苯 (3:1)体积
1	10 µg/L	100 µL	0	0.90 mL
2	20 µg/L	200 µL	0	0.80 mL
3	50 µg/L	500 µL	0	0.50 mL
4	100 µg/L	100 µL	0	0 mL
5	200 µg/L	0	20 µL	0.98 mL
6	500 µg/L	0	50 µL	0.95 mL
7	1000 µg/L	0	100 µL	0.90 mL

### 样品制备

QUICK, EASY, CHEAP, EFFECTIVE, RUGGED, AND SAFE (QuEChERS) 方法<sup>(3)</sup>

- 把食物样品切成碎块。
- 50mL 塑料离心管中加入 2.00g 到 10.00g 切碎后的食物样品， 加入 10mL 乙腈，加入 4g 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>， 0.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>； 涡旋振荡 2 分钟，高速离心 2 分钟。
- 移取 1.00mL 上清液到 2mL 塑料离心管中，加入 200mg 无水 MgSO<sub>4</sub> 和 50mg 伯偻胺 Primary Secondary Amine (PSA)； 涡旋振荡 2 分钟，高速离心 2 分钟。

QuEChERS 方法可以把样品振荡混匀以后萃取各种农药进入上层的乙腈相，而 PSA 不会吸附农药， 但可以有效去除食物基体提取液中的很多极性干扰化合物， 比如脂肪酸和糖。

日本肯定列表制度方法<sup>(4)</sup>

- 50mL 塑料离心管中加入 2.00g 到 10.00g 切碎后的食物样品， 加入 10mL 乙腈， 加入 4g 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>， 0.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>； 涡旋振荡 2 分钟，高速离心 2 分钟。
- 移取 1.00mL 到 5.00mL 上清液到 ProElut Carb/NH<sub>2</sub> 固相萃取小柱(Dikma Technologies)， 用 5mL 乙腈/甲苯 (3:1) 混合溶液清洗小柱。
- 收集所有的流出液，用氮气吹干，然后加入 1.0mL 丙酮/正己烷 (1:1) 混合溶液溶解。

由于经处理后的食物样品总是比较脏， 我们不建议使用大体积进样方法， 以避免需要经常维护质谱仪离子源。

### 3. 结果

工作曲线包括7个浓度点， 86种农药中的每一种都要求相对标准偏差少于15%； 如果相对标准偏差大于15%， 就需要重新做工作曲线。 表3中包括600pg的86种农药的相对标准偏差， 全部小于15%。 图3是100pg和500pg的农药的总离子色谱图， 条件为不分流进样、进样体积1微升； 这些农药的全扫描定量检出限大约是100pg。

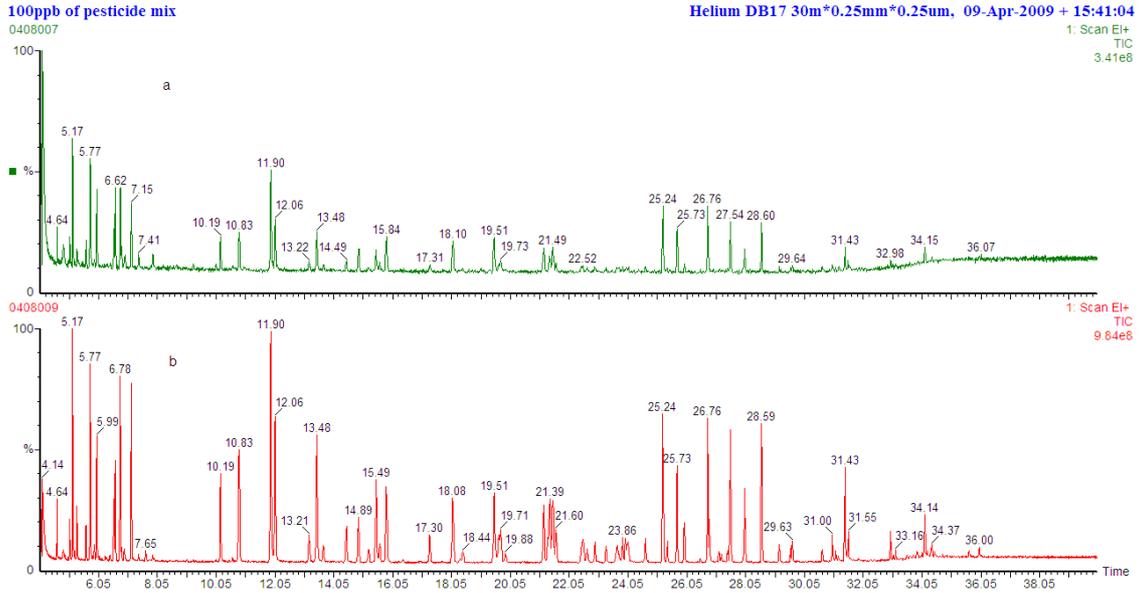


图3 100pg (图a) 和500pg (图b) 农药的总离子色谱图.

计算方法检出限 (MDL) 可以说明方法的检出能力, 定量检出限通常需要方法检出限10倍的浓度。通过公式1来计算方法检出限, 先测定空白来决定基线, 然后测试8次 20 ng/mL 的标准样品来计算方法检出限, 每个化合物的方法检出限是通过99% t分布乘以标准偏差计算的, 即等于3倍标准偏差。表3给出了每个化合物的方法检出限。

公式1: 方法检出限MDL的计算

$$MDL = t_{(n-1, \alpha = .99)} \times S$$

表 3. 86 种农药的校准表

CAS #	名称	保留时间	定量离子	定性离子 1	定性离子 2	%RSD	相关系数	MDL (pg)
16752-77-5	灭多威	5.323	58	105	88	4.49	0.9998	12.9
2631-40-5	异丙威	5.99	121	136	77	7.49	0.9991	7.5
62-73-7	敌敌畏	6.779	109	185	79	5.53	0.9997	11.5
1563-38-8	克百威	7.159	164	149	131	4.69	0.9993	13.9
10265-92-6	甲胺磷	7.664	94	141	95	5.93	0.9999	6.3
1918-11-2	芽根灵	9.05	205	220	57	10.93	0.9916	55.0
16655-82-6	3-羟基克白威	10.197	137	180	147	9.01	0.9998	8.7
1129-41-5	速灭威	10.84	108	107	79	8.12	0.9999	6.7
30560-19-1	乙酰甲胺磷	11.261	136	95	94	7.71	0.9999	6.1
63-25-2	甲萘威	11.905	144	116	115	3.53	0.9994	10.4
2631-40-5	异丙威	12.062	121	136	91	7.28	0.9999	7.6
23560-59-0	蚜螨磷	13.213	124	109	89	6.03	0.9999	7.0

3766-81-2	仲丁威	13.472	121	150	91	6.83	0.9999	7.3
13194-48-4	灭线磷	13.697	158	126	97	8.35	0.9998	4.3
114-26-1	残杀威	14.479	110	152	111	8.70	0.9998	7.3
118-74-1	六氯苯	14.88	284	286	282	4.46	0.9999	4.6
298-02-2	甲拌磷	15.252	75	121	97	6.07	0.9999	9.8
12407-86-2	混灭威	15.486	136	121	91	7.06	0.9993	6.9
319-84-6	1-666	15.844	181	219	183	4.05	0.9999	3.7
1113-02-6	氧化乐果	15.901	110	156	79	6.94	0.9999	4.5
82-68-8	五氯硝基苯	17.305	237	249	214	6.00	0.9998	5.0
319-85-7	2-666	18.101	181	219	183	4.28	0.9999	4.2
6923-22-4	久效磷	18.355	127	97	67	8.10	0.9998	1.5
298-04-4	乙拌磷	18.445	88	97	89	6.17	0.9999	8.5
	3-666	19.519	181	219	183	3.98	0.9993	3.4
60-51-5	乐果	19.576	87	125	93	5.19	0.9999	5.3
97-17-6	除线磷	19.659	279	223	97	8.01	0.9996	3.6
76-44-8	七氯	19.734	272	274	100	6.38	0.9998	2.9
101-76-8	p, p'-DDM	19.904	201	236	165	9.30	0.9998	4.0
	4-666	21.207	181	219	183	4.17	0.9998	3.8
1897-45-6	百菌清	21.378	266	268	264	8.23	0.9999	2.2
23103-98-2	抗蚜威	21.396	166	238	72	7.81	0.9999	3.8
309-00-2	艾试剂	21.504	263	265	66	4.32	0.9998	3.9
5598-13-0	甲基毒死蜱	21.607	286	288	125	6.89	0.9998	5.3
57018-04-9	甲基立枯磷	22.459	265	267	125	6.10	0.9992	6.5
298-00-0	甲基对硫磷	22.522	263	125	209	5.29	0.9999	5.9
29232-93-7	甲基嘧啶磷	22.675	290	305	276	9.27	0.9995	3.5
327-98-0	壤毒磷	22.943	109	297	271	4.53	0.9999	5.0
2921-88-2	毒死蜱	23.321	197	314	199	6.71	0.9998	6.8
121-75-5	马拉硫磷	23.683	173	127	125	7.06	0.9998	5.8
231937-89-6	烯丙菊酯	23.738	123	136	79	5.11	0.9997	4.1
56-38-2	对硫磷	23.876	291	109	97	5.37	0.9994	0.1
23505-41-1	乙基嘧啶磷	23.962	333	318	168	9.50	0.9997	5.4
63-25-2	甲萘威	24.023	144	116	115	11.79	0.9999	5.2
2032-65-7	速灭威	24.063	168	153	109	14.94	0.9999	4.5
55-38-9	倍硫磷	24.646	278	125	109	5.82	0.9998	3.8
5103-74-2	反式-氯丹	25.249	373	377	375	4.33	0.9999	4.0
24353-61-5	水胺硫磷	25.286	136	121	110	9.65	0.9999	5.5
4824-78-6	乙基溴硫磷	25.388	359	303	301	7.31	0.9993	2.9
5103-71-9	顺式-氯丹	25.727	373	377	375	4.49	0.9999	4.0
13593-03-8	啶硫磷	25.972	146	157	156	4.15	0.9992	9.4
72-55-9	p, p'-DDE	26.777	246	318	316	4.19	0.9999	5.3
22350-76-1	杀虫威	26.815	329	331	109	3.33	0.9997	2.5
41198-08-7	丙溴磷	27.158	208	206	139	5.87	0.9995	3.7
22224-92-6	克线磷	27.241	303	217	154	9.71	0.9995	53.0

950-37-8	杀扑磷	27.448	145	93	85	5.09	0.9999	5.2
53-19-0	o, p'-DDD	27.531	235	237	165	2.68	0.9999	5.4
72-20-8	异狄试剂	28.023	263	265	81	12.72	0.9992	6.6
72-54-8	p, p'-DDD	28.591	235	237	165	3.87	0.9999	5.1
563-12-2	乙硫磷	28.625	231	153	97	5.52	0.9999	4.7
35400-43-2	硫丙磷	29.189	322	156	140	5.49	0.9994	4.3
10453-86-8	苜呋菊酯	29.58	123	171	128	4.55	0.9997	2.9
83322-02-5	氟氯菊酯	29.636	181	166	165	4.44	0.9998	3.0
64257-84-7	甲氰菊酯	30.658	97	181	125	5.14	0.9997	2.7
35575-96-3	甲基吡恶磷	30.748	109	215	125	8.78	0.9997	55.0
26002-80-2	苯醚菊酯	30.999	123	183	81	4.35	0.9997	2.9
7696-12-0	胺菊酯	31.126	164	123	79	6.10	0.9998	1.9
91465-08-6	氯氟氰菊酯	31.221	181	208	197	5.82	0.9997	3.3
72490-01-8	苯醚威	31.435	116	186	88	4.90	0.9996	3.1
65907-30-4	氟线威	31.56	163	194	135	10.09	0.9995	3.3
54774-45-7	氯菊酯(除虫精) I	32.981	183	165	163	4.04	0.9995	3.0
52645-53-1	氯菊酯(除虫精) II	33.164	183	165	163	4.24	0.9997	2.2
67747-09-5	丙氯磷	33.546	180	163	70	9.60	0.9995	56.0
	氟氯氰菊酯 I	33.652	163	206	165	4.24	0.9993	13.2
68359-37-5	氟氯氰菊酯 II	33.771	163	206	165	4.87	0.9994	8.3
2642-71-9	乙基谷硫磷	33.89	132	160	77	5.22	0.9999	8.6
56-72-4	蝇毒磷	34.052	362	226	79	8.98	0.9993	11.5
105024-66-6	氟硅菊酯	34.161	179	286	258	5.52	0.9999	3.2
70124-77-5	氟氰菊酯	34.237	199	181	157	7.74	0.9999	2.8
52315-07-8	氯氰菊酯	34.364	163	181	165	8.72	0.9993	4.7
70124-77-5	氟氰菊酯	34.499	199	181	157	7.87	0.9994	5.7
102851-06-9	氟胺氰菊酯-I	34.753	250	252	181	8.07	0.9993	3.1
69409-94-5	氟胺氰菊酯-II	34.88	250	252	181	8.41	0.9995	3.0
66230-04-4	氰戊菊酯-I	35.654	125	181	167	6.59	0.9993	3.8
51630-58-1	氰戊菊酯-II	36.013	125	181	167	6.01	0.9993	2.9
52918-63-5	溴氰菊酯	37.407	181	253	251	3.85	0.9994	21.3

购买质谱标准库时，国家科学和技术研究所(NIST) 会随标准附送AMDIS软件。AMDIS用于解析重叠的色谱峰，把重叠的质谱图进行去卷积算法，从重叠的色谱峰当中取出目标化合物的干净质谱图，甚至当干扰峰的强度远超过目标化合物的时候，AMDIS也能成功地从色谱柱流失、其他分析物以及共流出的干扰当中分离目标化合物的质谱图。

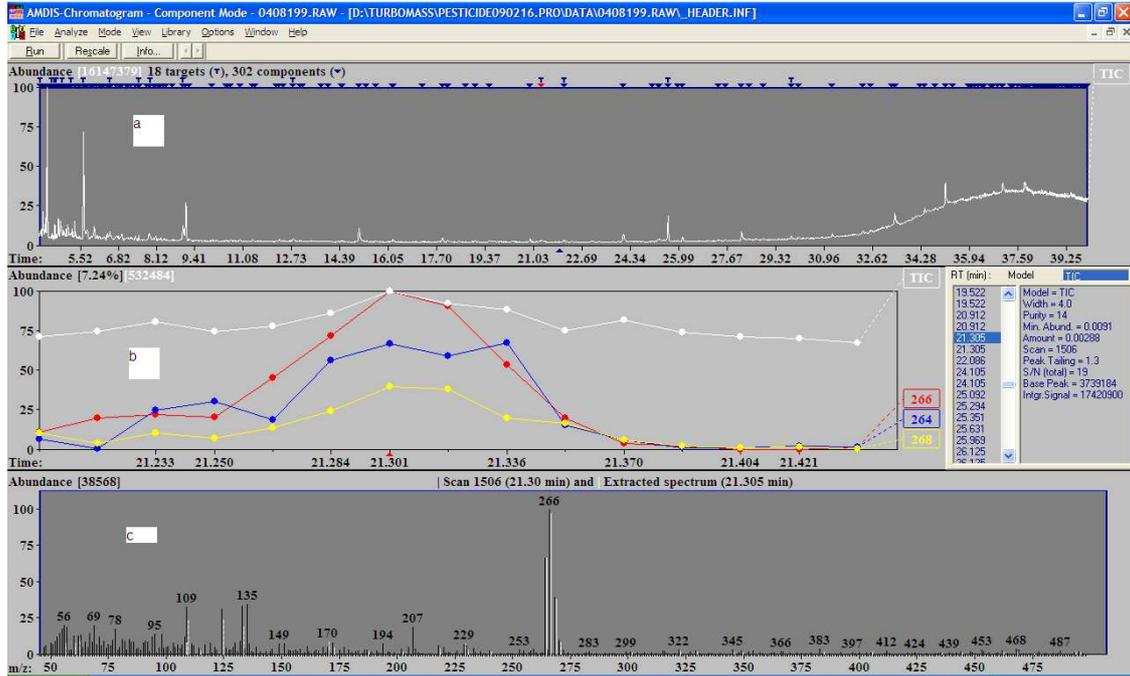


图4为AMDIS的截屏图片：图a为西红柿的总离子色谱图，图b为保留时间21.31分钟时的266，264，268三个离子碎片的色谱图，图c中黑色的质谱图为21.31分钟的样品峰，而白色的质谱图为NIST谱库中百菌清的标准质谱图，黑色样品质谱图和白色标准质谱图匹配相当好，这就说明西红柿中存在百菌清。

使用QuEChERS和日本肯定列表的方法处理小油菜、西红柿、茶叶和速溶咖啡样品，之后用气质联用仪检测农药残留。图5说明添加800ng/g的农药后，它们的添加回收率和重复的添加回收率。

使用QuEChERS方法处理白菜、梨、大米、玉米粉和面粉样品，之后用气质联用检测农药残留。图5说明添加300ng/g的农药后，它们的添加回收率和重复的添加回收率；用AMDIS来确证这些食品中检出的农药，避免假阳性检测结果。

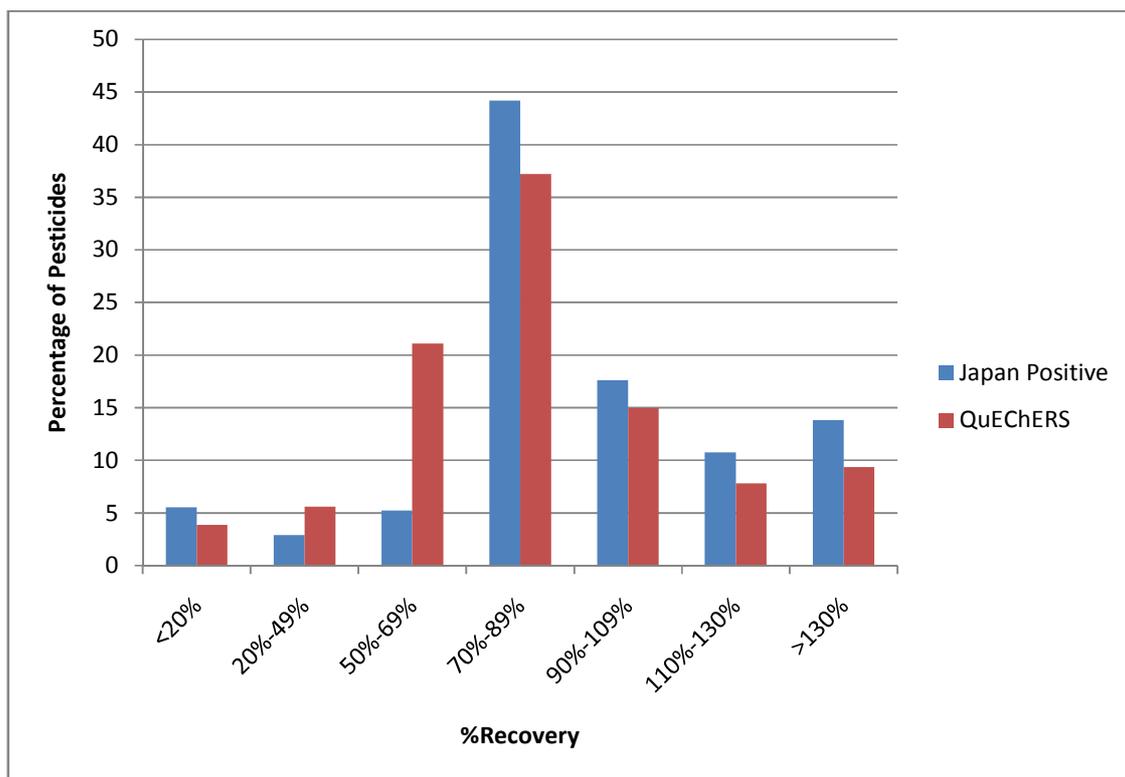


图5. 86种农药的添加回收率和重复的添加回收率。日本肯定列表的方法处理了小油菜、西红柿、茶叶和速溶咖啡，共688个数据点；QuEChERS方法处理了小油菜、西红柿、茶叶、速溶咖啡、白菜、梨、大米、玉米粉和面粉，共1548个数据点。

大部分农药的添加回收率在70%至130%之间，符合欧盟和美国加州食品农业部的要求。

#### 4. 讨论

本方法突出的特点是灵敏度高。甲胺磷是中国农业部规定检测的农药，通常用气质联用检测甲胺磷难度大；不同的实验室之间用检测甲胺磷来比较他们分析农药残留的方法之好坏。图6是10pg甲胺磷的选择离子扫描的色谱图，定量离子的信噪比是19，所以本方法适合检测甲胺磷。本方法全扫描的灵敏度也高；图4说明用全扫描检出了西红柿样品中的百菌清，含量是80pg，并且用AMDIS进行了确证。

0.01ppm pesticide mix

0221002

Helium DB17

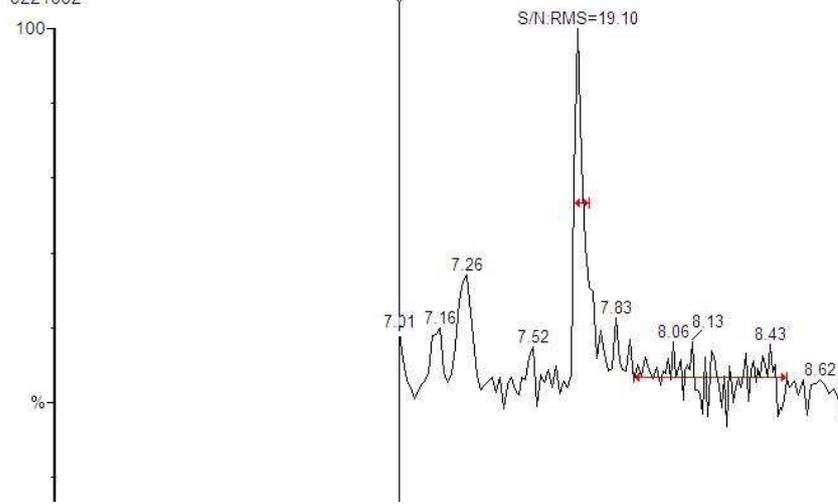


图6. 10pg甲胺磷的选择离子扫描色谱图， 定量离子的信噪比是19。

图7是10pg到1000pg的甲胺磷工作曲线， 由于是2次曲线， 工作曲线至少需要7个点。

0.01ppm pesticide mix

Compound 5 name: Methamidophos

Coefficient of Determination: 0.999929

Calibration curve:  $50124.8 * x^2 + 69665.9 * x - 455.903$

Response type: External Std, Area

Curve type: 2nd Order, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

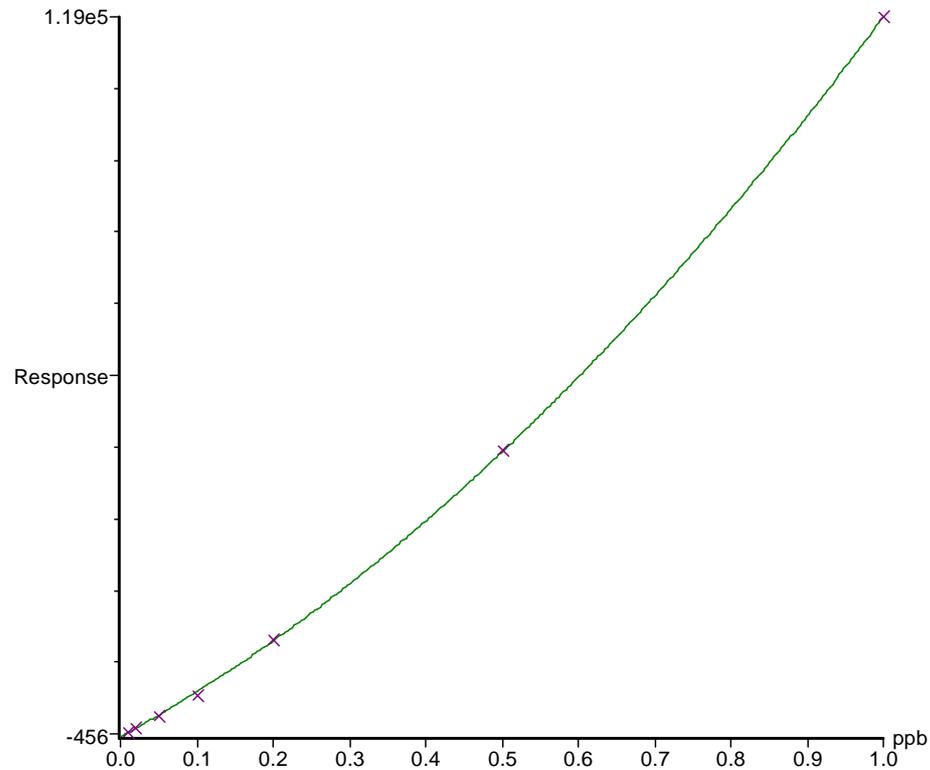


图7. 10pg到1000pg 甲胺磷的工作曲线

推荐用AMDIS来确认复杂基体中的目标化合物， 这样出检测报告的时候会减少假阳性和假阴性， AMDIS能给出更准确的结果。

做样品处理的时候，北京工商局的工程师更喜欢QuEChERS. 因为他们每天要检测上百个样品，而QuEChERS方法处理样品速度快，又容易操作。

本方法改进了一些QuEChERS步骤： 第一步加入4g 无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ，而不是无水 $\text{MgSO}_4$ 。因为无水 $\text{MgSO}_4$ 遇水会放热，热会分解一些不稳定的农药，比如甲胺磷；同时加入0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和0.5g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  来控制食物样品的pH值。

QuEChERS方法适合处理相对干净的食物样品，比如白菜、梨、大米、玉米粉和面粉。图8是用QuEChERS处理的白菜、梨、大米、玉米粉和面粉的总离子色谱图，基线是平的。日本肯定列表的方法更适合处理比较脏的样品，比如速溶咖啡。用日本肯定列表方法处理样品，被萃取的食品基体少，所以基线更好(图9)；但缺点是速度慢很多，而且浪费溶剂。本文的方法能够测量多种食品基体当中很低浓度的多种样品。

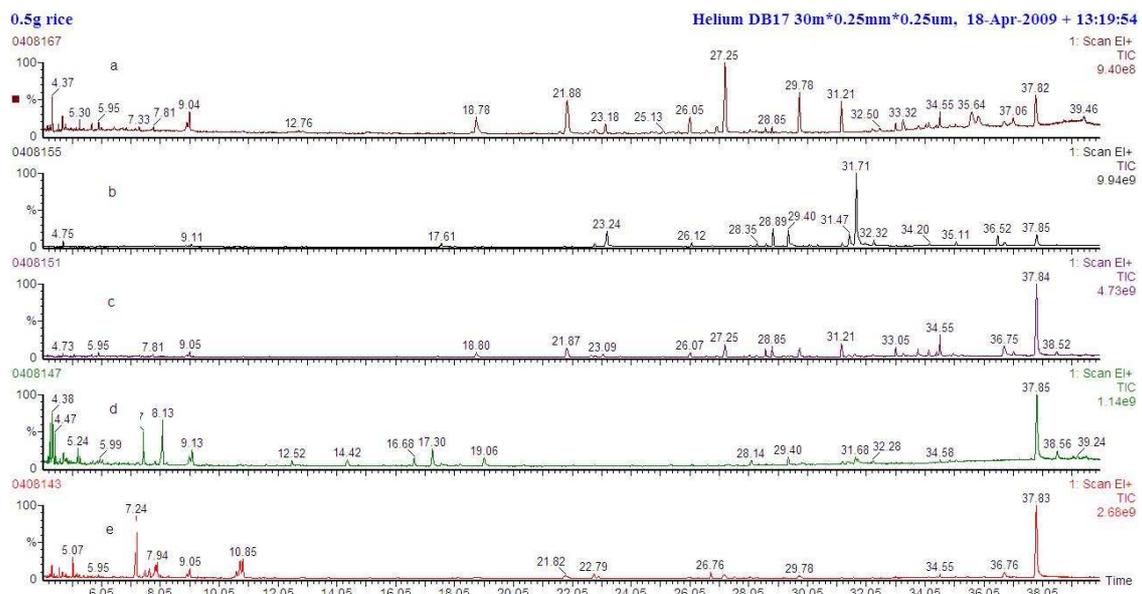


图8 QuEChERS处理的大米(图a)、面粉(图b)、玉米(图c)、梨(图d)和白菜(图e)的总离子色谱图。

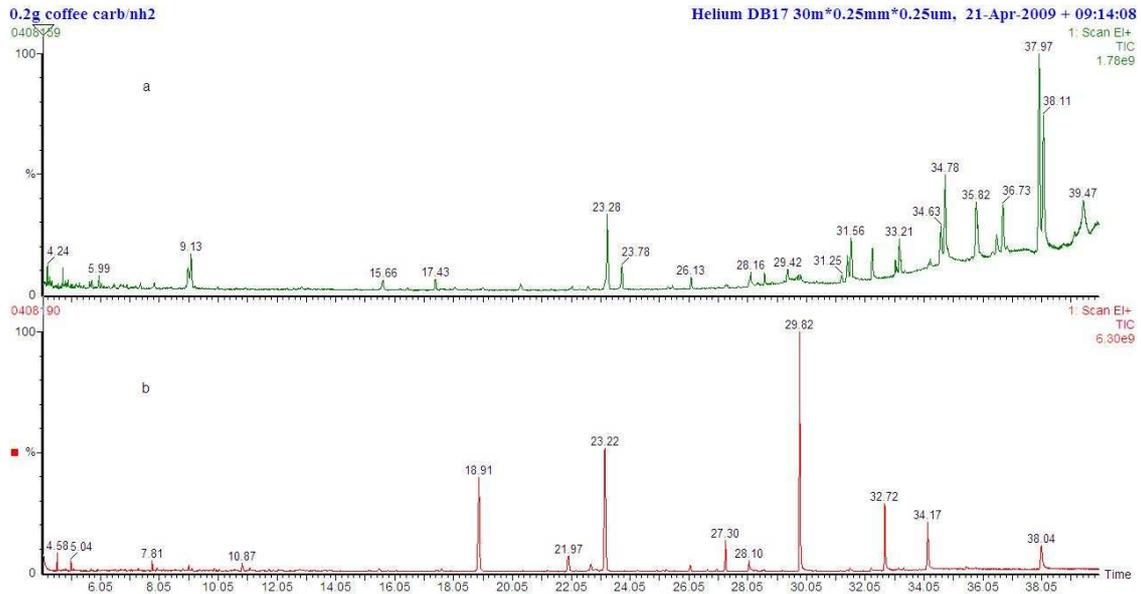


图9. QuEChERS (图a)和日本肯定列表(图b)处理的速溶咖啡的总离子色谱图。日本肯定列表的方法萃取更少的食品基体，所以处理比较脏样品的时候基线更好。

如果加入石墨化炭黑可以吸收食品中的色素，不过，石墨化炭黑也会吸附部分农药。北京工商局的工程师打算进一步改进QuEChERS方法：加入50mg PSA时，打算再加入50mg的石墨化炭黑来去除比较脏的样品里面的色素；当时实验室里面没有石墨化炭黑，将来会做实验验证石墨化炭黑的效果。

## 5. 结论

本应用文献说明珀金. 埃尔默公司的Clarus600气质联用仪完全满足检测农药残留的要求，能可靠地一针检测10皮克的86种农药；同时灵敏度高和精度好，所有农药的相对标准偏差小于15%。表3当中工作曲线的相关系数说明了每一种化合物的工作曲线误差小。

北京市食品安全监控中心的工程师按照QuEChERS和日本肯定列表的方法处理各种食品样品，QuEChERS适合处理相对干净的食物样品；日本肯定列表的方法更适合处理比较脏的样品。本方法能够测量多种食品基体当中很低浓度的多种样品。

### 5.1 方法总结

1. 设置顶空进样器和气质联用仪。
2. 按照表1描述设置实验方法。
3. 测试一个空白样品，检查系统是否污染。
4. 测试7点校准，工作曲线是从10 到1000 ng/mL。

5. 计算600 ng/mL的标准农药的相对标准偏差，如果相对标准偏差超过15%需要重新制作工作曲线。
6. 测试样品。
7. 每20个样品就需要测试一次实验室控制样品。
8. 每天都要做仪器校准，计算出的校准化合物浓度的误差应该在添加的标准物质浓度的20%以内。

方法的质量控制：

- 检查方法检出限。
- 计算相对标准偏差，检查方法的精密度。

QuEChERS 方法

- 把食物样品切成碎块。
- 50mL 塑料离心管中加入 2g 到 10g 切碎后的食物样品，加入 10mL 乙腈. 加入 4g 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ，0.5g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和 0.5g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。涡旋振荡 2 分钟，高速离心 2 分钟。
- 移取 1.00mL 上清液到 2mL 塑料离心管中，加入加入 200mg 无水  $\text{MgSO}_4$  和 50mg 伯仲胺 Primary Secondary Amine (PSA)。涡旋振荡 2 分钟，高速离心 2 分钟。

日本肯定列表炭黑/氨基方法

- 50mL 塑料离心管中加入 2g 到 10g 切碎后的食物样品，加入 10mL 乙腈，加入 4g 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ，0.5g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和 0.5g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。涡旋振荡 2 分钟，高速离心 2 分钟。
- 移取 1.00mL 到 5.00mL 上清液到 ProElut Carb/NH2 固相萃取小柱(Dikma Technologies)，用 5mL 乙腈/甲苯 (3:1)溶液淋洗小柱。
- 收集所有的流出液，氮气吹干，然后加入 1.0mL 丙酮/正己烷(1:1)溶液溶解。

参考文献

1. “蔬菜 and 水果中有机磷，有机氯，拟除法虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定”，中国农业部，NY761-2008.
2. “Measuring Volatile Organic Compounds by Headspace Trap GC-MS in the Beijing Food Laboratory”, Meng Yuan, et al, American Laboratory, On-Line Edition, April 2009.
3. “QuEChERS a Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products”, <http://www.quechers.com/>
4. “Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection” Fillion, J. et al, J. AOAC Int, 83: 698-713 (2000)