

QuEChERS—UPLC/MS/MS 快速测定茶叶中的 草甘膦和氨甲基磷酸

Fast determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid
residues in tea by QuEChERS and UPLC/MS/MS

曹 慧 郑军科 黄丽英 盛华栋

CAO Hui ZHENG Jun-ke HUANG Li-ying SHENG Hua-dong

(浙江省质量检测科学研究院, 浙江 杭州 310018)

(Zhejiang Institute of Quality Inspection Science, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

摘要:采用 QuEChERS—超高效液相色谱—串联质谱技术同时测定茶叶中的草甘膦和氨甲基磷酸农药残留。茶叶样品用纯水提取,经分散固相萃取净化,以乙腈和 0.1% 氨水溶液为流动相进行梯度洗脱,采用 CORTECSTM UPLC® C₁₈₊ 色谱柱分离,电喷雾—负离子多反应模式监测,内标法定量。草甘膦和氨甲基磷酸农药在 5~500 $\mu\text{g/L}$ 内线性关系良好,相关系数均大于 0.999,该方法的检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 30 $\mu\text{g/kg}$ 。分别添加 30,100,500 $\mu\text{g/kg}$ 3 个浓度水平的草甘膦和氨甲基磷酸农药,草甘膦的回收率为 90.5%~93.5%,相对标准偏差为 4.1%~7.2%;氨甲基磷酸的回收率为 99.2%~102.4%,相对标准偏差为 3.4%~8.3%。该方法前处理简便、分析速度快、方法稳定,适用于茶叶中草甘膦和氨甲基磷酸农药残留的同时测定。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱;分散固相萃取;草甘膦;氨甲基磷酸

Abstract: A method was developed for determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid residues in tea by QuEChERS and UPLC/MS/MS. The samples were extracted with water and cleaned up with dispersive-solid phase extraction. The target analytes were separated by CORTECSTM UPLC® C₁₈₊ column with gradient elution using acetonitrile and 0.1% ammonium hydroxide solution as mobile phases. Negative electrospray ionization with multiple reaction monitoring mode was used in the detection. Internal standard method was used to determine the results. The linear ranges were 5 to 500 $\mu\text{g/L}$. The limit of detection (LOD) of this method were 10 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantitation (LOQ) were 30 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid were

90.5%~93.5% and 99.2%~102.4% respectively, with relative the standard deviations of 4.1%~7.2% and 3.4%~8.3% at three spiked concentration levels of 30 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$ and 500 $\mu\text{g/kg}$. The simplicity, sensitivity and good precision of the method made it be well suitable for determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid residues in tea.

Keywords: UPLC/MS/MS; QuEChERS; glyphosate; aminomethyl phosphonic acid

草甘膦是一种广谱灭生性除草剂,具有与有机磷化合物相似的毒性,近年来,被广泛关注。目前报道的检测方法有离子色谱法^[1-3]、气相色谱^[4]和气相色谱—质谱法^[5]、高效液相色谱^[6-9]和高效液相色谱—串联质谱法^[10-13]等。由于草甘膦及其主要代谢物氨甲基磷酸水溶性极强,且为强极性的两性化合物,上述测试方法操作中存在着一定的缺陷。色谱法需要进行前处理衍生化,不但操作繁琐,而且衍生化试剂毒性大,易与水反应生成副产物,定量分析困难。此外,离子色谱法、气相色谱法和液相色谱法存在定性困难、假阳性率高等缺点。色谱—质谱联用技术虽然定性准确、干扰小^[14],但过量的衍生化试剂会污染离子源。胡继业^[4]、程雪梅^[5]、李建平^[6]和莫佳琳^[12]等分别采用了气相色谱、液相色谱和液相色谱—串联质谱联用技术测定草甘膦农药,但前处理都进行了衍生化试验,处理时间长,草甘膦农药容易降解,且过量的衍生化试剂会产生较多的副产物。叶明丽等^[1-3]虽开发了离子色谱测定草甘膦农药的方法,但一般仅针对水样等简单基质,对于复杂基质,该方法定性困难、容易产生假阳性。分散固相萃取(QuEChERS),是一种快速、简单、廉价、高效、可靠并安全的样品前处理技术,不仅广泛应用于农药残留检测^[15],在兽药检测中也普遍使用。QuEChERS利用具有吸附性能的材料均匀分散在萃取液中,达到除去杂质的目的。本实验室已将 QuEChERS 技术成功应用于抗生

基金项目:浙江省质量技术监督系统科研计划项目(编号:20150204)
作者简介:曹慧(1980—),女,浙江省质量检测科学研究院高级工程师,博士。E-mail: ch_zj_cn@163.com

收稿日期:2015-10-03

素^[16]和植物激素^[17]残留的检测。本研究拟采用 QuEChERS—超高效液相色谱/串联质谱技术对茶叶中草甘膦和氨甲基磷酸农药进行直接分析,不仅在前处理中避免使用衍生化试剂,而且操作简单、定量准确。由于前处理时间短,保留了草甘膦原药的性质,可满足日常检测的分析要求。

1 材料与方法

1.1 仪器

超高效液相色谱—串联质谱仪:Acquity™/Xevo™ TQ-S 系列,美国 Waters 公司;

超纯水仪:A10 系列,美国 Millipore 公司;

高速离心机:Thermo Scientific Sorvall Stratos 系列,美国 Thermo 公司;

涡旋混合器:WH-861 系列,太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 试验材料

乙腈:色谱纯,德国 Merck 公司;
氨水:色谱纯,美国 TEDIA 公司;
C₁₈ 吸附剂:上海安谱科学仪器有限公司;
无水硫酸镁:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
试验用水为 Milli-Q 系统纯化水。

1.3 标准品与配制

草甘膦(纯度≥98.0%)、氨甲基磷酸(纯度≥98.0%)、1,2-¹³C¹⁵N 草甘膦内标(100 mg/L):德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;

草甘膦和氨甲基磷酸系列标准溶液的配制:分别准确称取 10 mg 草甘膦及氨甲基磷酸标准品粉末于 10 mL 容量瓶中,用水定容,配制成 1 mg/mL 的草甘膦及氨甲基磷酸标准储备液(−18 ℃保存)。分别准确吸取上述两种标准溶液各 100 μL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成 10 μg/mL 中间浓度的混合标准溶液,用时再用水稀释成系列标准溶液进行测试。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Waters CORTECSTM UPLC® C₁₈₊ 柱 2.1 mm×100 mm,粒径 1.6 μm;柱温:35 ℃;样品温度:25 ℃;进样体积:5 μL;流速:0.3 mL/min;流动相:0.1% 氨水溶液(A),乙腈(B);洗脱程序:0.0~1.5 min,5% B;1.5~2.0 min,5% B~90% B;2.0~2.8 min,90% B;2.8~3.0 min,90% B~5% B;3.0~4.0 min,5% B。本研究分别选择 Waters CORTECSTM UPLC® C₁₈₊ 柱(2.1 mm×100 mm,1.6 μm),Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),Waters ACQUITY UPLC BEH C₈ 柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),Waters ACQUITY UPLC BEH C₈ 柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm)5 种不同型号和规格的色谱柱分析草甘膦和氨甲基磷酸化合物。

1.4.2 质谱条件 离子源和检测方式:电喷雾负离子源(ESI[−])多反应监测模式,离子源温度为 150 ℃;毛细管电压为一2.20 kV,脱溶剂气流量为 800 L/h,脱溶剂气温度为

450 ℃。本研究采用流动注射的方式将草甘膦和氨甲基磷酸化合物直接注入质谱仪,分别在 MS 和 MS/MS 模式下找到化合物的母离子和子离子,通过对锥孔电压和碰撞能量的不断优化,找到最佳质谱参数。

1.5 前处理方法

1.5.1 提取 称取 5 g 茶叶试样于 50 mL 离心管中,加入浓度为 5 μg/mL 的内标溶液 20 μL,放置 1 min 后加入 20 mL 水,超声提取 10 min,高速离心后取上清液待净化。

1.5.2 净化 将 200 mg C₁₈ 净化粉加入上述提取液中,涡旋 3 min,离心后上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后,于 UPLC—MS/MS 仪上分析。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

试验结果表明:草甘膦和氨甲基磷酸在 50 mm 长的色谱柱上出峰太早,因而,Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm)和 Waters ACQUITY UPLC BEH C₈ 柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm)不适合此类化合物的分析。由于草甘膦和氨甲基磷酸是强极性化合物,在 C₈ 和 C₁₈ 色谱柱上色谱峰的拖尾非常严重,而 CORTECSTM UPLC® C₁₈₊ 色谱柱填料表面带电,在低离子强度流动相条件下也可以获得优异的峰形,当分离复杂样品时,在提供最高柱效的同时,能成功优化色谱柱的背压。因此,本研究采用 Waters CORTECSTM UPLC® C₁₈₊ 柱(2.1 mm×100 mm,1.6 μm)色谱柱对样品进行分析。色谱图见图 1。

2.2 质谱条件的优化

草甘膦和氨甲基磷酸农药的质谱分析参数见表 1。

表 1 草甘膦和氨甲基磷酸的质谱分析参数[†]
Table 1 LC—MS/MS parameters for glyphosate and aminomethyl phosphonic acid

化合物	监测离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压/V	碰撞能量/V
草甘膦	168.03/80.99 [*]	38	14
	168.03/62.98	38	18
氨甲基磷酸	109.97/80.89 [*]	40	12
	109.97/62.99	40	14
1,2- ¹³ C ¹⁵ N	171.03/80.93	36	16

[†] * . 定量离子。

2.3 前处理方法的优化

2.3.1 提取条件的优化 分别选择甲醇、乙腈、丙酮、乙醇和超纯水作为提取溶液,由于草甘膦和氨甲基磷酸是极性较强的化合物,极易溶于水,利用超纯水作为提取溶液的提取效率在 95% 以上,因而,本研究采用超纯水进行样品提取。

2.3.2 净化条件的优化 由于茶叶基质较为复杂,本试验分别选用 PSA、C₁₈ 和石墨碳净化粉对茶叶样品进行净化,试验结果表明:PSA 的净化效果不如 C₁₈ 净化粉好,而石墨碳对草甘膦和氨甲基磷酸标准品具有一定的吸附性。因此,本试验采用 C₁₈ 净化粉对茶叶提取液进行净化。

2.4 线性方程、检出限和定量限

取浓度分别为 5,50,100,250,500 μg/L 的一系列标准混

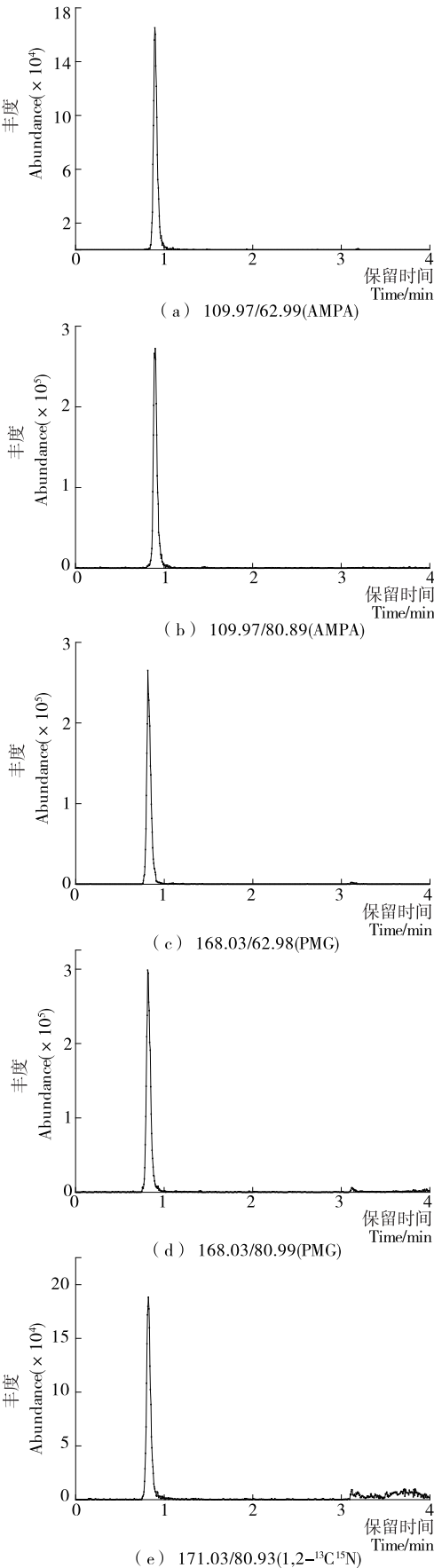


图 1 草甘膦和氨甲基磷酸的色谱图

Figure 1 The chromatogram of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid

合溶液,经超高效液相色谱—串联质谱分析,得到相应的线性回归方程和标准曲线,数据见表 2。结果表明:草甘膦和氨甲基磷酸农药在 5~500 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内线性关系良好,相关系数 r 均在 0.999 以上。分别按 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算得到样品中草甘膦和氨甲基磷酸的检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 30 $\mu\text{g/kg}$ (表 2)。

表 2 草甘膦和氨甲基磷酸的线性方程及相关数据

Table 2 Linear equations and correlated data of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid

化合物	线形方程	相关系数 r	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
草甘膦	$Y=3\,519.02x+1\,533.21$	0.999 9	10	30
氨甲基磷酸	$Y=2\,293.94x-572.431$	0.999 2	10	30

2.5 回收率试验

分别在阴性的茶叶样品基质中添加 30,100,500 $\mu\text{g/kg}$ 3 种浓度水平的草甘膦和氨甲基磷酸农药混合标准溶液,按本试验方法进行前处理,各浓度水平的草甘膦和氨甲基磷酸农药回收率见表 3。结果表明:草甘膦的回收率为 90.5%~93.5%,相对标准偏差为 4.1%~7.2%;氨甲基磷酸的回收率为 99.2%~102.4%,相对标准偏差为 3.4%~8.3%。

表 3 草甘膦和氨甲基磷酸的回收率

Table 3 Results of recoveries of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid ($n=3$)

添加浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	草甘膦		氨甲基磷酸	
	回收率/ %	相对标准 偏差/%	回收率/ %	相对标准 偏差/%
30	90.5	7.2	99.2	6.4
100	93.5	4.1	102.4	3.4
500	92.9	6.1	100.5	8.3

2.6 阳性样品的测试

对阳性茶叶样品进行测试,分别采用中国行业标准 SN/T 1923—2007《进出口食品中草甘膦残留量的检测方法 液相色谱—质谱/质谱法》和本研究的方法对茶叶中的草甘膦和氨甲基磷酸化合物进行测试,结果见表 4。

根据茶叶评价规则,草甘膦项目的检测结果以草甘膦(草甘膦+氨甲基磷酸)计,从表 4 结果看:SN/T 1923—2007 检测草甘膦(草甘膦+氨甲基磷酸)的总含量(0.73 mg/kg)与本研究方法检测出的草甘膦(草甘膦+氨甲基磷酸)的总含

表 4 草甘膦和氨甲基磷酸的测试结果

Table 4 The testing data of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid mg/kg

化合物	SN/T 1923—2007	本研究方法
草甘膦	/	0.65
氨甲基磷酸	0.73	0.10
草甘膦(草甘膦+氨甲基磷酸)	0.73	0.75

量(0.75 mg/kg)较接近。但 SN/T 1923—2007 前处理操作中大量的水旋蒸至近干致使草甘膦完全降解为氨甲基磷酸,且由于较长的前处理时间,导致氨甲基磷酸含量降低,所测得的结果会稍低于本研究方法的测试结果。本研究方法能测试到样品中草甘膦原药,前处理时间短且未使用衍生化试剂,可有效保护质谱仪的离子源,具有明显的检测优势。

3 结论

本试验建立了 QuEChERS—超高效液相色谱/串联质谱同时测定茶叶中的草甘膦和氨甲基磷酸农药残留量的分析方法。该方法前处理简单,由于未使用衍生化试剂,完全避免了衍生化过程中带来的不确定因素,也避免了离子源的污染。由于该方法采用同位素内标进行定量,回收率稳定,适合茶叶中草甘膦和氨甲基磷酸农药残留量的日常检测需要。

参考文献

[1] 叶明立,胡忠阳,潘广文. 毛细管离子色谱法同时测定饮用水中痕量碘离子、硫氰酸根和草甘膦[J]. 分析化学, 2011, 39(11): 1 762-1 765.

[2] 王莹,魏慧珠,马颖. 离子色谱法测定水源水和生活饮用水中的草甘膦[J]. 供水技术, 2012, 6(1): 53-55.

[3] 邱慧敏,耿金菊,韩超,等. 串联毛细管离子色谱法测定水中亚磷酸根、磷酸根、草甘膦和氨甲基磷酸[J]. 分析化学, 2013, 41(12): 1 910-1 914.

[4] 胡继业,赵殿英,宁君,等. 气相色谱—氮磷检测器测定草甘膦在土壤和苹果中的残留量[J]. 农药学学报, 2007, 9(3): 285-290.

[5] 程雪梅,周敏. 气相色谱—质谱法测定香蕉和灌溉水中的草甘膦及其代谢物的残留量[J]. 色谱, 2004, 22(3): 288.

[6] 李建平,渠志华,马永民,等. 饮用水中草甘膦残留量的柱前衍生—高效液相色谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(1): 73-74.

[7] 张丽娟,韦少平,李致宝,等. 高效液相色谱法同时分析草甘膦和双甘膦[J]. 农药, 2009, 48(6): 431-432.

[8] 高双飞,王远,尹荃,等. 双甘膦和草甘膦及副产物的高效液相色谱分析[J]. 农药, 2010, 49(9): 664-665.

[9] 方芳,徐会,魏荣卿,等. 草甘膦的邻硝基苯磺酰氯柱前衍生—高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 2011, 30(6): 683-686.

[10] 郑和辉,李洁,魏建荣,等. 液相色谱串联质谱法直接进样测定水中呋喃丹、草甘膦、灭草松和 2,4-滴[J]. 卫生研究, 2009, 38(3): 302-303.

[11] 江燕,曹赵云,贾瑞琳,等. 亲水作用色谱—串联质谱法测定稻米中的草甘膦和氨甲基磷酸残留量[J]. 色谱, 2012, 30(1): 39-44.

[12] 莫佳琳,缪璐,干宁军. 超高效液相色谱—串联质谱法检测甘蔗种的草甘膦残留量[J]. 现代食品科技, 2011, 27(9): 1 143-1 156.

[13] 曹赵云,牟仁祥,陈铭学. 液相色谱—串联质谱法测定稻米中的草甘膦和氨甲基磷酸残留[J]. 色谱, 2010, 28(8): 743-748.

[14] 陈景春,陈盛,何亚斌,等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定蔬菜水果中亚胺唑残留量[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 75-77.

[15] 张帆,李忠海,黄媛媛,等. 改良 QuEChERS—气相色谱法测定茶油中有机磷类农药残留[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 87-90.

[16] 曹慧,陈小珍,朱岩,等. QuEChERS—超高效液相色谱—串联质谱技术同时测定乳制品中磺胺类和喹诺酮类抗生素残留[J]. 食品科技, 2013, 38(6): 323-329.

[17] 曹慧,陈小珍,祝颖,等. QuEChERS/超高效液相色谱—串联质谱技术同时测定食品中 13 种植物生长调节剂残留[J]. 化学试剂, 2013, 35(11): 1 005-1 009.

信息窗

每天喝咖啡或可降低患肠癌几率 黑咖啡效果更显著

科技日报北京 4 月 5 日电 (记者刘霞)据英国《独立报》近日报道,美国南加州大学的最新研究表明,每天喝少量咖啡,或能大大降低罹患肠癌的风险,比如,一天只需要饮用一到两杯咖啡就能将罹患肠癌的风险降低 26%。而且,如果饮用的是黑咖啡,抗癌效果可能更显著。

研究负责人斯蒂芬妮·施密特说:“尽管每份咖啡提供的有益化合物因咖啡豆、烘焙方法以及冲调方法的不同而有所不同,但我们的最新数据表明,不管咖啡是何种味道,成分是什么,都能降低饮用者罹患肠癌的风险。”

在最新研究中,科学家们对 5 100 多名已被诊断罹患肠癌的病人和 4 000 名没有此种疾病病史的研究对象饮用咖啡的习惯进行了记录。同时,研究人员也详细记录了这些研究对象日常饮用其他饮料的细节和其他影响因素,比

如家族疾病史、饮食习惯、锻炼习惯以及是否抽烟喝酒等,从而得出了最新研究结论。

而且,研究还表明,并非只有咖啡内含的咖啡因给人提供保护,有咖啡因和去咖啡因的咖啡都产生了同样的效果。科学家们认为,抗氧化剂和其他化学物质,有些甚至来自烘焙过程,可能是“幕后功臣”。

尽管该研究报道的第一作者史蒂芬·格鲁伯说,他会“鼓励咖啡爱好者相信,他们的每日饮用能降低得肠癌的风险”,但他并不推荐那些想保护自己免患癌症的人增加咖啡因的摄入。他说:“在支持饮用咖啡因作为一种预防肠癌的手段之前,还需要进一步的研究。”

(来源:www.foodmate.net)