柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光法测定蔬菜中草甘膦

杭学宇, 汪 怡, 王 芹, 王 露, 宋 鑫, 冯晓青*

(淮安市疾病预防控制中心, 淮安 223001)

摘 要: 目的 建立快速、准确的蔬菜中草甘膦的柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光测定方法。**方法** 蔬菜提取液样经衍生后经固相萃取, 过 C_{18} 色谱柱, 以甲醇-水(70:30, *V*:*V*) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温为 35 ℃, 荧光检测激发波长为 265 nm, 发射波长为 315 nm。**结果** 草甘膦的加标回收率在 89.2%~99.2%范围, 其相对标准偏差均<5.0%, 在 0.5~20.0 ng/mL 范围呈现良好的线性, 其回归系数>0.999, 最低定量检出限(LOQ)为 0.02 mg/kg。**结论** 本方法回收率高, 净化效果好, 杂质干扰少, 可满足蔬菜中痕量草甘膦的残留检测要求。

关键词: 柱前衍生; 高效液相色谱法; 草甘膦; 蔬菜

Determination of glyphosate in vegetables by high performance liquid chromatography- fluorescence detection with pre-column derivatization and solid phase extraction

HANG Xue-Yu, WANG Yi, WANG Qin, WANG Lu, SONG Xin, FENG Xiao-Qing*

(*Huai'an Center for Disease Control and Prevention*, *Huai'an* 223001, *China*)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the determination of glyphosate in vegetables by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization and solid phase extraction. **Methods** The glyphosate was derived from water samples and cleaned up with solid phase extraction, and then the separation was performed on a C_{18} column by the mobile phase consisting of methanol-water (70:30, *V*:*V*) at the flow rate of 1.0 mL/min and the column temperature of 35 ℃. The fluorescence excitation and emission wave lengths were set at 265 nm and 315 nm, respectively. **Results** The recoveries of glyphosate were 89.4%~98.9%, and the RSDs were less than 5.0%. Calibration curve of glyphosate was linear within the range of 0.5~20.0 ng/mL with the regression coefficient greater than 0.999. The limit of quantification (LOQ) was 0.02 mg/kg. **Conclusion** This method has high recovery rates, good purification results and less impurity interference, and is suitable for the detection of trace glyphosate residue in vegetables.

KEY WORDS: pre-column derivatization; high performance liquid chromatography; glyphosate; vegetables

1 引 言

草甘膦自 1971 年研制成功以来[1], 是产量最高的除草剂[2], 在全世界范围内的使用量逐年提高, 是目前国内外使用最广泛、无选择性和除草活性最强的有机磷除草剂。虽然草甘膦毒性较低, 但长期使用不仅影响土

*通讯作者: 冯晓青, 技师, 主要研究方向为理化检验。E-mail: fengxiaoqing-20@163.com

***Corresponding author:** FENG Xiao-Qing, Technician, Huai'an Center for Disease Control and Prevention, No.118, Huaihai Road, Huai'an 223001, China. E-mail: fengxiaoqing-20@163.com

壤正常微生物繁殖[3], 还会对环境造成一系列影响。草甘膦在环境和生物体内不断富集, 通过食品和饮用水进入人体, 对人体造成危害[4,5]。

目前, 文献报道食品和水中草甘膦测定的检测方法较多, 化学分析法[6-8]、化学发光分析法[9,10]、分光光度法[11]、酶联免疫分析法[12,13]、气相色谱-质谱联用法[14-17]、柱后衍生液相色谱法[18-21]、柱前衍生液相色谱法[22]和液相色谱-质谱联用法[23-29]。化学法及酶联免疫法等方法操作繁琐、稳定性和精密度较差, 难以满足大批量样品检测。柱后衍生需要配制相关的柱后衍生仪器, 许多柱前衍生液相色谱法操作繁琐, 回收率较低。质谱仪器虽然已在卫生检测中大量应用, 但由于质谱仪器价格昂贵, 柱后衍生法需专门的衍生化设备, 普通实验室难以普及。本研究采用常规仪器对蔬菜基质样本中的草甘膦进行检测研究, 利用 9-芴基甲基三氯甲烷(FMOC-Cl)为衍生剂, 用固相萃取法去除衍生化反应 FMOC-Cl 水解产物对荧光测定的干扰, 高效液相色谱荧光检测器进行检测。

2　材料与方法

2.1　仪器与试剂

HPLC-1260 液相色谱仪(美国安捷伦公司); 固相萃取仪(美国 Supelco 公司); 固相萃取柱(美国安捷伦公司); 高速离心机(中国湘仪离心机有限公司); 涡旋混匀器(美国 Scientific Industries 公司); 食品粉碎机(中国欧科电器公司)。

草甘膦标准溶液: 100 μg/mL, 购自于农业部环境保护科研监测所。

甲醇(色谱纯, Merck 公司); 0.25μm 水系滤膜(天津东康科技有限公司); 实验室用水为 Millipore 超纯水。

2.2　试验方法

2.2.1　溶液配制

草甘膦标准溶液配制: 准确移取 100 μL 的草甘膦农药标准品, 用纯水做溶剂, 配制成 10 μg/mL 储备液, -20 ℃保存。使用时根据草甘膦对应响应值, 吸取适量储备液, 用甲醇配制成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 的系列标准溶液, 供高效液相色谱测定。

FMOC-Cl 丙酮溶液(1.0 g/L): 称取 100 mg FMOC-Cl 用丙酮溶解并定容至 100 mL, 临用现配。

5%硼酸盐缓冲溶液(pH=9): 称取 5 g 硼酸钠, 用水溶解并定容至 100 mL, 于 4 ℃下保存。

2.2.2　样品处理

①试样制备

取有代表性的 10 种蔬菜样品, 取可食部分, 经缩分后, 切碎, 充分混匀后放入食品粉碎机粉碎, 制成待测样品。分装后置于–20 ℃下保存, 待提取。

②提取

称取 25 g(精确到 0.01 g)捣碎的蔬菜样品, 加入 50 mL 纯水, 高速匀浆 2 min。试样转移至具塞离心管中, 在 5000 r/min 转速下离心 10 min, 收集上清液, 待衍生。

③衍生化

取蔬菜提取液 1 mL 于进样瓶中, 加入 200 μL 硼酸钠溶液, 混匀, 加入 200 μL FMOC-Cl 衍生液, 混匀, 室温放置 2 h。将 C_{18} 固相萃取小柱分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化。将样液过活化后的 C_{18} 固相萃取小柱, 常压下收集初滤液, 用 1 mL 甲醇-水(70:30, *V*:*V*) 溶液洗脱, 洗脱液与初滤液合并, 过 0.25 μm 滤膜, 待分析。标准系列处理方法同上。

2.2.3　色谱参考条件

色谱柱: 分析柱: C_{18}(4.6 mm×25 cm, 5 μm); 预柱: C_{18} 预柱(4.6 mm×4.5 cm)。柱温: 35 ℃。荧光检测器, 激发波长 265 nm; 发射波长 315 nm。流动相: 甲醇-水(70:30, *V*:*V*)。

3.1　色谱条件优化

3.1.1　流动相的选择

本实验以甲醇-水为流动相, 以甲醇与水混合溶液的体积比为条件进行测试, 甲醇比例较低时, 保留时间延长, 灵敏度降低, 结果表明甲醇-水体积比为 70:30 时, 样品的出峰时间、峰形、灵敏度较适宜, 与文献报道一致。另外, 实验中采用乙酸铵-甲醇作为流动相进行测试, 结果发现乙酸铵-甲醇流动相分离效果不如相同比例的甲醇-水。

3.1.2　柱温的选择

研究中固定其他色谱条件, 将色谱柱温度从 20 ℃升至 40 ℃, 结果显示草甘膦保留时间逐渐提前, 为有效确证柱效及色谱柱使用寿命, 方法采取柱温 35 ℃。

3.1.3　检测波长选择

取草甘膦标准使用液在 2.2.3 条件下进样, 分别采取多发射和多激发模式在波长 200~900 nm 范围内对草甘膦进行扫描, 结果发现草甘膦分别在激发波长 265 nm 和发射波长为 315 nm 处最强(图 1)。故方法选定 320 nm 为发射波长, 285 nm 为激发波长。

3.2　基质类型选择实验

实验中分别选取市售常见蔬菜种类如瓜果类、根茎类、叶类等, 另外针对蔬菜的基体类型分别选取新鲜、冷冻、干燥、辛辣以及腌制蔬菜分别进行加标回收试验, 结果显示各类蔬菜提取液经衍生净化后草甘膦经色谱分离良好。

3.3　衍生条件的优化

实验中分别配制质量浓度为 1、5、10、15、20、25 g/L 的 FMOC-Cl 丙酮溶液和质量浓度为 10、20、30、40、50 g/L 的硼酸钠缓冲溶液, 对二者对草甘膦的衍生效果影响进行试验。结果表明当 FMOC-Cl 丙酮溶液质量浓度为 20 g/L 和硼酸钠缓冲溶液质量浓度为 50 g/L 时衍生效果最好。在 20

g/L FMOC-Cl 丙酮溶液和 50 g/L 硼酸钠缓冲溶液浓度下，对草甘膦分别进行 1. 0、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0、15.0 h 衍生试验，结果发现在衍生时间为 2 h 时，衍生反应达到平衡。

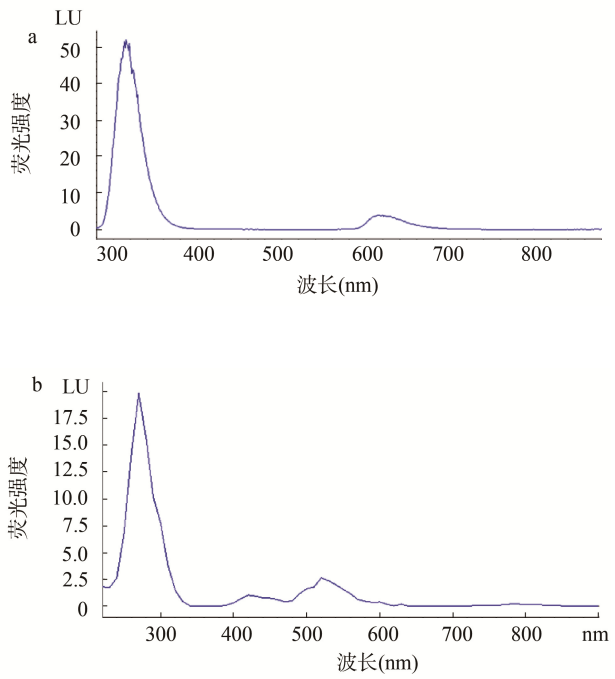

图 1 a: 草甘膦多发射扫描光谱图; b: 草甘膦多激发扫描光谱图

Fig. 1 a: Multiple transmit scanning spectrogram of glyphosate; b: Multiple excitation scanning spectrogram of glyphosate

3.4 固相萃取条件优化

实验根据文献方法采用 C_{18} 固相萃取柱[22]，对影响萃取的条件主要是洗脱条件进行研究。分别采用甲醇-水(90:10，*V*:*V*)、甲醇-水(70:30，*V*:*V*)和甲醇-水(50:50，*V*:*V*)进行洗脱，结果证明采用甲醇-水(70:30，*V*:*V*)可以较好地洗脱目标化合物，同时避免衍生副产物干扰。固相萃取过程中发现初滤液含有较多目标化合物，故实验中需收集初滤液。经固相萃取后两者色谱峰实现较好的分离，避免未萃取时两峰重叠现象。

3.5 线性范围及检出限

草甘膦储备液用水稀释配制成 1.0 μg/mL 的标准溶液，配制草甘膦标准工作液系列，按方法的实验条件进样，在上述色谱条件下测定，以峰面积(Y)对待测物浓度(X, ng/mL) 进行线性回归。结果表明在 0.5~20.0 ng/mL 的标准溶液浓度范围内，草甘膦浓度与响应值有良好的线性关系(图 2)，其回归方程为：Y=1.005X−0.0328；相关系数：r=0.9997。根据色谱响应值 S/N≥3 标准计算，草甘膦最低检出浓度为 0.02 mg/kg。

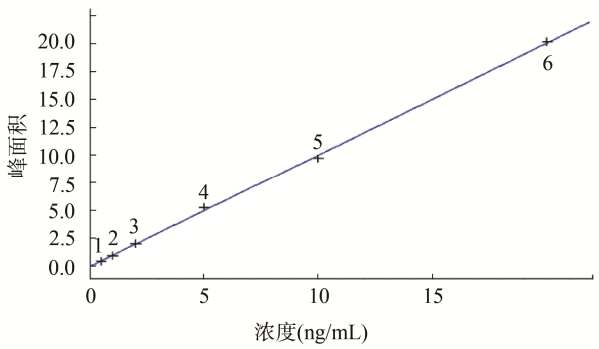

图 2 草甘膦标准工作曲线图

Fig. 2 The standard working curve of glyphosate

3.6 方法的回收率与精密度

精密称取阴性蔬菜样品进行低浓度的加标回收实验，结果见表 1。该阴性样品中加标 1.00、2.00、5.00 μg/kg，回收率在 89.2%~99.2%之间，RSD 在 4.26%~13.63%之间。

表 1 空白样品中草甘膦的添加回收率、精密度(n=3)

表 1 Recoveries and the relative standard deviations (RSDs) of glyphosate in blank sample(n=3)

本底(μg/kg)	添加水平(μg/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
	1.00	89.4	13.63
0	2.00	90.9	9.69
	5.00	98.9	4.26

以草甘膦标准溶液 10.0 μg/mL，连续进样 6 次，每次 10 μL，测得草甘膦平均峰面积为 10.26, RSD 为 0.108%。

3.7 蔬菜监测应用

用本方法对采自本市菜场及超市等不同地方的共 12 份样本进行了检测，结果显示全部样品草甘膦含量均低于检出限。

4 讨论与结论

本研究建立了柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱法测定蔬菜中草甘膦。通过一系列的衍生条件优化得知：本方法操作流程简便，相对于同种衍生剂试验方法衍生反应时间短，固相萃取步骤少而且回收率相对较高，另外本方法通过对不同类型基质蔬菜样品进行方法验证均呈现良好的效果，实验成本较低，适用于基层单位开展草甘膦的监测分析。

参考文献

[1] 苏少泉. 草甘膦述评[J]. 农药, 2005, 44(4): 145–149.
Su SQ. Glyphosate review [J]. Agrochemicals, 2005, 44(4): 145–49.
[2] 华乃震, 冷阳. 论除草剂草甘膦和助剂[J]. 农药, 1997, 36(3): 29–31.

Hua NZ, Leng Y. Glyphosate and additives for herbicides [J]. Agrochemicals, 1997, 36(3): 29–31

[3] Hernandez A, Garda- plazaola JI, Becenril J. Glyphosate effects onhenolic metabolism of nodulated soybean(Glycine max L Merr) [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(7): 2920–925.

[4] McDuffie HH, Pahwa P, McLaughlin JR, *et al*. Non-Hodgkin slymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health [J]. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 2001, 10(11): 1155–1163.

[5] Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, *et al*. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase [J]. Environ Health Perspect, 2005, 113: 716–720.

[6] 李本盈. 草甘膦工业分析[J]. 农药工业, 1978, (5): 20–22.
Li BY. Glyphosate industry analysis [J]. Agrochem Ind, 1978, (5): 20–22.

[7] 周洁薇. 电位滴定法测定草甘膦[J]. 农药, 1981, (3): 24–25.
Zhou JW. Determination of glyphosate by potentiometric titration [J]. Agrochemicals, 1981, (3): 24–25.

[8] 周洁薇. 快速法测定草甘膦的新改进[J]. 农药, 1982, (3): 25, 35.
Zhou JW. Rapid determination of glyphosate by new improvements [J]. Agrochemicals, 1982, (3): 25, 35.

[9] 范顺利, 吕超, 高建磊. 反相流动注射化学发光法测定草甘膦[J]. 理化检验(化学分册), 2001, 37(7): 289–291.
Fan SL, Lv C, Gao JL. Reverse flow injection chemiluminescence determination of glyphosate [J]. Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal, 2001, 37(7): 289–291.

[10] Adcock JL, Barnett NW, Gerardi RD, *et al*. Determination of glyphosate mono-isopropylamine salt in process samples using flow injection analysis with tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection [J]. Talanta, 2004, 64(2): 534–537.

[11] 李国鹏, 周彩荣, 石晓华, 等. 分光光度法测定草甘膦生产废水中草甘膦和甘氨酸的含量[J]. 郑州大学学报(理学版), 2012, 44(2): 81–84.
Li GP, Zhou CR, Shi XH, *et al*. Determination of the amount of glyphosateand glycine in the waste water of glyphosate produced by spectrophotometry [J]. J Zhengzhou Univ (Nat Sci Ed), 2012, 44(2):81–84.

[12] Byer Jonathan D, Struger J, Klawunn P, *et al*. Low cost monitoring ofglyphosate in surface waters using the ELISA method: an evaluation [J]. Environ Sci Technol, 2008, 42(16): 6052–6057.

[13] Selvi AA, Sreenivasa MA, Manonmani HK. Enzyme-linked immunoassay for the detection of glyphosate in food samples using avian antibodies [J].Food Agric Immun, 2011, 22(3): 217–228.

[14] GB/T 23750-2009 植物性产品中草甘膦残留量气相色谱-质谱法[S].
GB/T 23750-2009 Determination of glyphosate residues in plant products GC-MS [S].

[15] Elisabet B, Lennart T. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil [J]. J Chromatogr A, 2000, 886(1/2): 207–216.

[16] Tsunoda N. Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1993, 637(2): 167–173.

[17] 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.
Cheng XM, Zhou M. Determination of glyphosate and its metabolite residues in banana and irrigation water by GC-MS [J]. Chin J Chromatogr, 2004, 22(3): 288.

[18] 王聪, 刘颖超, 庞民好, 等. 高效液相色谱柱后衍生法测定农田沟渠水中草甘膦残留[J]. 植物保护, 2012, 38(5): 96–99.
Wang C, Liu YC, Pang MH, *et al*. Determination of glyphosate in the water of farmland ditch and by high performance liquid chromatography post column derivatization [J]. Plant Protect, 2012, 38(5): 96–99.

[19] 汪琳, 曾锦明, 韩燕飞, 等. 直接进样高效液相色谱-柱后衍生法检测水中草甘膦和氨甲基膦酸[J]. 现代科学仪器, 2010, (6): 99–100, 104.
Wang L, Zeng JM, Han YF, *et al*. Determination of glyphosate and phosphonic acid in drinking water by direct injection HPLC-post column derivation [J]. Mod Sci Inst, 2010, (6): 99–100, 104.

[20] 陈际, 袁晓静, 胡家琦, 等. 柱后衍生-高效液相色谱法测水中草甘膦[J]. 化工管理, 2014, 27: 44–45.
Chen J, Yuan XJ, Hu JQ, *et al*. Determination of glyphosate in water by HPLC-post column derivation [J]. Chem Enter Manag, 2014, 27:44–45.

[21] 支建梁, 牟仁祥, 陈铭学, 等. 柱后衍生液相色谱法测定粮食中草甘膦和氨甲基磷酸残留量[J]. 分析试验室, 2008, S2: 170–172.
Zhi JL, Mou RX, Chen MX, *et al*. Determination of glyphosate and ammonia methyl phosphate residues in grain by liquid chromatography with column derivatization [J]. Chin J Anal Lab, 2008, S2: 170–172.

[22] 马建明, 龚文杰, 邬晨阳, 等. 水中草甘膦的柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光法测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(18): 2599–2601.
Ma JM, Gong WJ, Wu CY, *et al*. Determination of glyphosate in the water by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization and solid-phase extraction [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(18): 2599–2601.

[23] 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膦酸残留[J]. 色谱, 2010, 28(8): 743–748.
Cao ZY, Mou RX, Chen MX. Determination of glyphosate and ammoniummethyl acid in rice using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(8): 743–748

[24] 诸力, 陈红平, 周苏娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定不同茶叶中草甘膦、氨甲基膦酸及草铵膦的残留[J]. 分析化学, 2015, 43(2):271–276.
Zhu L, Chen HP, Zhou SJ, *et al*. Determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in different teas by ultrahigh performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(2): 271–276.

[25] 莫佳琳, 缪璐, 干宁军. 超高效液相色谱-串联质谱法检测甘蔗中的草甘膦残留量[J]. 现代食品科技, 2011, 27(9): 1143, 1145–1156.
Mo JL, Miao L, Gan NJ. Determination of glyphosate in sugar cane by UPLC-MS/MS [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(9): 1143, 1145–1156.

[26] 李波, 邓晓军, 郭德华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测食品中的草甘膦及其主要代谢物氨甲基膦酸残留[J]. 色谱, 2007, 25(4):486–490.
Li B, Deng XJ, Guo DH, *et al*. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2007, 25(4): 486–490.

[27] 衷兴旺. 高效液相色谱串联质谱测定武夷岩茶中草甘膦残留量的方法探讨[J]. 山东化工, 2014, 43(7): 70–72.
Zhong XW. Glyphosate residues in Wuyi rock tea using HPLC tandem mass spectrometry methods [J]. Shandong Chem Ind, 2014, 43(7): 70–72.

[28] 朱伟. 高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中草甘膦残留量的不确定度评价[J]. 包装与食品机械, 2013, 31(6): 58–60, 68.
Zhu W. Uncertainty analysis of glyphosate in tea by HPLC-MS/MS method [J]. Pack Food Mach, 2013, 31(6): 58–60, 68.

[29] 周爽, 徐敦明, 林立毅, 等. 反反相色谱-串联质谱法直接测定植物源性食品中草甘膦及其代谢物残留[J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 199–204.
Zhou S, Xu DM, Li LY, *et al*. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in plant-derived foodstuff by aqueous-normalphase(APN) chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(2): 199–204.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介

杭学宇, 副主任技师, 主要研究方向为理化检验。
E-mail: 664686545@qq.com

冯晓青, 技师, 主要研究方向为食品理化检验。
E-mail: fengxiaoqing-20@163.com

“食品加工中的安全控制”专题征稿函

食品安全问题一直是公众最关心的话题之一。而且随着发展已经出现了很多食品安全事件, 自 2015 年 10 月 1 日起实施的新《食品安全法》也从“加大处罚力度、特殊食品特殊对待、监管网络食品交易”等方面对食品安全实行了更加严格的管控, 食品在加工中的安全控制是食品安全的重要环节。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品加工中的安全控制”专题, 由**西北农林科技大学岳田利教授**担任主编, 岳教授现任西北农林科技大学食品科学与工程学院院长, 兼任现任国务院学位委员会食品科学与工程学科评议组成员, 国家杨凌农业综合试验工程技术研究中心主任, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(杨凌)主任, 农业部食品质量监督检验测试中心(杨凌)常务副主任, 农业部植物 DUS 测试中心(杨凌)常务副主任。农业部农产品质量安全专家组成员, 国家食品药品监督管理总局餐饮食品安全专家组成员等职。专题主要围绕**食品加工全链条中安全危害因子的来源识别与过程节点的存在状态解析(微生物污染, 毒素污染, 植物源农药残留, 动物源兽药残留, 植物激素, 过量添加剂等)、加工全链条中有毒有害物质的控制方法、加工全链条的安全控制体系及系统解决方案**等或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在 2016 年 7 月出版。

本刊编辑部和**岳田利**教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部