

# 气相色谱-串联质谱法测定不同原产国抗草甘膦转基因大豆中草甘膦及其代谢物的残留量

何龙凉, 陈延伟, 陈智鹏\*, 李小琴, 陈永欣, 杨怀军  
(防城港出入境检验检疫局, 防城港 538001)

**摘要:** **目的** 利用气相色谱-串联质谱(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)法对防城港口岸进境的不同原产国抗草甘膦转基因大豆中的草甘膦及其代谢物-氨基膦酸的残留量进行检测, 对比分析其差异。 **方法** 采集原产自美国、巴西、阿根廷和乌拉圭的抗草甘膦转基因大豆各3批, 样品磨碎后过筛, 用水提取, 再用盐酸沉淀蛋白, 用二氯甲烷萃取脂肪, 上层清液经阳离子交换柱(CAX柱)净化后, 再与七氟丁醇和三氟乙酸酐进行衍生化反应, 用柠檬醛-乙酸乙酯溶液定容, GC-MS/MS分析。 **结果** 草甘膦和氨基膦酸在2.5~100 ng/mL浓度范围内的质量浓度与峰面积间的线性相关性较好( $r>0.999$ ), 检出限均为0.05 mg/kg。样品的加标浓度为0.05、0.5和2.0 mg/kg时的平均回收率为77.1%~96.5%, 相对标准偏差小于8.8%( $n=6$ )。 **结论** 本方法的准确度高、精密度良好, 能满足检测工作的实际需求。

**关键词:** 转基因大豆; 草甘膦; 氨基膦酸; 气相色谱-串联质谱

## Determination of residues of glyphosate and its metabolite in roundup ready soybean imported from different original countries by gas chromatography-tandem mass spectrometry

HE Long-Liang, CHEN Yan-Wei, CHEN Zhi-Peng\*, LI Xiao-Qin, CHEN Yong-Xin, YANG Huai-Jun  
(Fangchenggang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fangchenggang 538001, China)

**ABSTRACT: Objective** To detect the residues of glyphosate (PMG) and its metabolite-aminomethyl phosphonic acid (AMPA) in roundup ready soybean imported from different original countries in Fangchenggang port by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), and analyze the differences. **Methods** Three batch samples of each country were collected from the roundup ready soybeans imported from the United States, Brazil, Argentina and Uruguay. The procedures of sample were as follows: sifted after being pulverized, extracted by water, then the protein in sample was precipitated with hydrochloric acid and the fat was extracted with dichloromethane. After purification by cation exchange column (CAX), the supernatant extract obtained from the above steps was reacted derivatively with heptafluorobutanol and trifluoroacetic anhydride. The product was diluted with citral-ethyl acetate solution and then analyzed by GC-MS/MS. **Results** The calibration curves between mass concentration and peak area of PMG and AMPA showed good linearities ( $r>0.999$ ) in the range of 2.5~100 ng/mL, and the detection

基金项目: 广西出入境检验检疫局科技计划项目(2015k011)

**Fund:** Supported by Science and Technology Project of Guangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (2015k011)

\*通讯作者: 陈智鹏, 博士, 工程师, 主要研究方向为化学分析。E-mail: 345624687@qq.com

\*Corresponding author: CHEN Zhi-Peng, Ph.D, Engineer, Fangchenggang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fangchenggang 538001, China. E-mail: 345624687@qq.com

limits were both 0.05 mg/kg. The average recoveries of spiked samples were between 77.1% and 96.5% when the added concentrations were 0.05, 0.5 and 2.0 mg/kg, respectively, and the relative standard deviations (RSDs) were less than 8.8% ( $n=6$ ). **Conclusion** This method is accurate and precise, which can meet the requirements of detection.

**KEY WORDS:** genetically modified soybean; glyphosate; aminomethylphosphonic acid; gas chromatography-tandem mass spectrometry

## 1 引言

草甘膦(glyphosate, PMG)是内吸传导性强的广谱灭生性除草剂,其主要代谢物为氨基甲膦酸(aminomethyl phosphonic acid, AMPA),它们均为弱酸性、极性高、水溶性强且不易溶于有机溶剂。抗除草剂转基因大豆是美国孟山都公司培育的第1代转基因大豆,1988年世界第一例转基因大豆植株诞生<sup>[1]</sup>,1996年孟山都公司推出抗草甘膦转基因大豆<sup>[2,3]</sup>,抗草甘膦转基因大豆将来源于土壤农杆菌CP4菌株的EPSPS合酶编码基因转入到大豆中并使之正确表达,从而使其获得了比野生型大豆品种对农药草甘膦更高的抗性。相较于常规大豆品种而言,对草甘膦具有高抗性的转基因抗草甘膦大豆在实际的农业生产种植中更易于管理,也减小了生产成本。由于抗除草剂转基因大豆具有耐除草剂、含油量高、产量高且少耕作的特点,使其便于大面积机械化生产,因此迅速得到推广应用。到2014年,全球抗除草剂转基因大豆的种植面积已达9000万公顷,占全球大豆栽培面积的82%<sup>[4]</sup>。

目前,商业化种植的抗除草剂转基因大豆主要有抗草丁膦(glufosinate)和抗草甘膦(glyphosate)两类,前者是安万特药品(Aventis)公司的产品,后者是孟山都(Monsanto)公司的产品,它们在美国、巴西和阿根廷等国家广泛种植<sup>[5-7]</sup>。在大豆国际贸易中,抗除草剂转基因大豆已占主导地位<sup>[8]</sup>。近年来,通过防城港口岸进境的大豆均为抗草甘膦转基因大豆,原产国为美国、巴西、阿根廷和乌拉圭。抗草甘膦转基因大豆在种植过程中会不可避免地使用大量草甘膦除草剂,而过量的草甘膦会在大豆种子内积累,并通过食物链传递到人体内,从而危害人体健康<sup>[9-14]</sup>。据麻省理工学院的科学家Stephanie Seneff和美国里特管理咨询公司的退休科学顾问Anthony Samsel于2013年9月在科技期刊《Entropy》上发表的研究报告指出<sup>[15]</sup>,目前世界上应用最广泛的一种除草剂-Roundup(美国孟山都公司生产的旗舰产品,是全球知名的草甘膦除草剂)可能与帕金森综合症、不孕症和癌症等疾病的发生有关。研究称,在糖、玉米、大豆和小麦等西方主要食品中发现存在草甘膦残留,这会增加环境中食物源化学物质及毒素的伤害性,可能破坏人体的正常功能并导致疾病,并且这些有害影响会随着时间的推移逐渐明显。

世界多个国家和地区对草甘膦及其代谢物的残留限量做出了明确规定<sup>[16,17]</sup>,其中美国、欧盟和加拿大等主要农产品贸易国家和地区转基因大豆中草甘膦的残留限量标准为20 mg/kg,澳大利亚、韩国和日本分别为10、6和0.2 mg/kg。而我国目前由于没有推广和种植抗草甘膦转基因大豆,因此尚未制定草甘膦在转基因大豆中的残留限量标准。

防城港于2014年获批为国家进境粮食指定口岸,年进口粮食达500多万吨,粮食进口量位居全国前列,辖区内5大粮油加工、仓储企业的规模化生产使转基因大豆的进口量居高不下。2015年,防城港进口转基因大豆403.6万吨,略高于2014年的403.4万吨。为确保进口转基因大豆的安全性,检验检疫部门肩负重大责任。本研究通过检测不同原产国抗草甘膦转基因大豆中草甘膦及其代谢物的残留量,对比其残留量的差异,试图为检验检疫日常工作提供有价值的参考资料。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器

7890A-5795C 气相色谱-质谱联用仪(配备电子轰击离子源并具有选择离子功能,美国Agilent公司);3-18K 高速离心机(德国赛多利斯公司);RV-10 旋转蒸发器(德国IKA公司);XMTD-204 电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司);DCY-12G 氮吹仪(青岛海科仪器有限公司);QL-861 漩涡振荡器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

### 2.2 试剂

草甘膦标准品(纯度>98.0%)和氨基甲膦酸标准品(纯度>98.0%)均购自德国DR公司;三氟乙酸酐(纯度为99%,美国Regis公司);七氟丁醇(纯度为98%)和柠檬醛(纯度为99%)均购自上海安谱CNW公司;乙酸乙酯和甲醇(色谱纯,德国Merck公司);二氯甲烷(色谱纯,美国Fisher公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品处理

##### (1)样品制备

分别采集原产自美国、巴西、阿根廷和乌拉圭4个国家的抗草甘膦转基因大豆(外源基因均为CP4-EPSPS)各3批,共12个样品,将每个样品按四分法缩分出1 kg,全部

磨碎并过 20 目筛, 装入洁净的容器中, 标明标记(美国: 1-285、1-493 和 1-3745; 巴西: 1-635、1-1408 和 1-2050; 阿根廷: 1-1562、1-2853 和 1-3678; 乌拉圭: 1-3240、1-3502 和 1-3950)。

(2)样品处理

样品处理分为提取、净化和衍生化, 具体操作步骤如下:

**提取:** 准确称取 25.00 g 粉末试样于 150 mL 聚乙烯塑料离心瓶中, 加水 120 mL, 混匀后浸泡 0.5 h; 高速均质 5 min, 于 9000 r/min 离心 10 min, 取上清液 20 mL 置于 50 mL 聚乙烯离心管中, 加入 100 μL 盐酸, 漩涡震荡 1 min; 取上清液 15 mL 置于 50 mL 聚乙烯离心管中, 再加入 15 mL 二氯甲烷, 漩涡震荡 2 min, 于 9000 r/min 离心 5 min; 取上清液 4.5 mL 置于 15 mL 聚乙烯塑料具塞刻度试管中, 加入 0.5 mL 酸度调节剂(16 g 磷酸二氢钾+160 mL 水+13.4 mL 盐酸+40 mL 甲醇), 混匀。

**净化:** CAX 小柱经 10 mL 水活化后, 加入 1.0 mL 提取液, 用 0.7 mL CAX 洗脱液(160 mL 水+2.7 mL 盐酸+40 mL 甲醇)淋洗两次, 再用 13 mL CAX 洗脱液洗脱并收集, 收集到的溶液于 40 °C 旋转浓缩至约 1 mL 后用 CAX 洗脱液定容至 2.0 mL。

**衍生化:** 取 1.6 mL 衍生试剂(七氟丁醇:三氟乙酸酐=1:2, V:V)于 4 mL 衍生瓶中, 加盖后放入-40 °C 的冰箱中冷冻 0.5 h 后取出, 用移液枪在衍生剂液面以下缓慢加入 50 μL 净化提取液(混合标液进行同步同体积衍生), 加盖小心混匀后于 90 °C 水浴衍生 1 h(每 15 min 小心振摇一次)。取出冷却至室温, 用氮气吹干, 并继续氮吹 0.5 h。加 1.0 mL 0.2% 的柠檬醛-乙酸乙酯溶液溶解残渣, 混匀后供上机分析。

2.3.2 气相色谱-质谱联用条件

(1)气相色谱条件

色谱柱: DB-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 载气为高纯氮气, 流速 1.0 mL/min; 进样口温度为 200 °C; 升温程序: 80 °C 保持 1.5 min, 以 30 °C/min 升至 260 °C, 保持 1 min, 再以 30 °C/min 升至 290 °C。无分流进样, 0.75 min 后开阀。

(2)质谱条件

电子轰击离子源(electron impact ion source, EI): 接口温度 270 °C, 离子源温度 230 °C, 电子能量 70 eV, 倍增器电压 1.4 kV, 溶剂延迟 3.5 min, 选择离子监测(selected ion monitoring, SIM)方式采集数据。

2.3.3 标准曲线的制作

用 CAX 洗脱液定容, 配制 2.5、5、25、50 及 100 ng/mL 的草甘膦、氨甲基膦酸混合标准工作溶液, 存放于聚乙烯塑料管中, 0~4 °C 保存。按照“2.3.2”中所述仪器条件, 对混合标准溶液进行测定, 分别得到草甘膦和氨甲基膦酸在不同浓度下的峰面积。分别以草甘膦和氨甲基膦酸的质量浓度为横坐标, 各自的峰面积为纵坐标, 绘制草甘膦和氨甲基膦酸的标准曲线。

2.3.4 加标回收实验

称取不同原产国的转基因大豆样品, 分别添加当量为 0.05、0.5 及 2.0 mg/kg 的混合标准溶液, 每个浓度水平重复测定 6 次, 采用外标法定量, 计算回收率和精密度。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的制作

草甘膦和氨甲基膦酸标准品衍生物的保留时间、定量离子荷质比和监测离子荷质比见表 1, 二者的选择离子色谱图如图 1 所示, 选择监测离子质谱图分别如图 2 和图 3 所示。

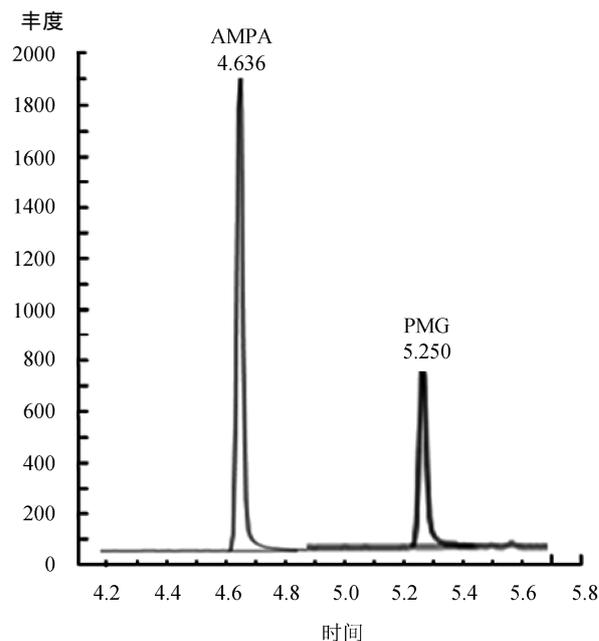


图 1 草甘膦和氨甲基膦酸标准品衍生物的选择离子色谱图  
Fig.1 Selective ion chromatogram of derivatives of PMG and AMPA standard

表 1 草甘膦和氨甲基膦酸标准品衍生物的保留时间、定量离子荷质比和监测离子荷质比

Table 1 The retention time, charge-mass ratios of quantitative ion and monitoring ion derivatives of PMG and AMPA standard

化合物名称	分子式	保留时间(t/min)	定量离子荷质比(m/z)	监测离子荷质比(m/z)
草甘膦(PMG)	CH <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> P	4.64	446	502, 372
氨甲基膦酸(AMPA)	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub> P	5.25	612	611, 584, 460

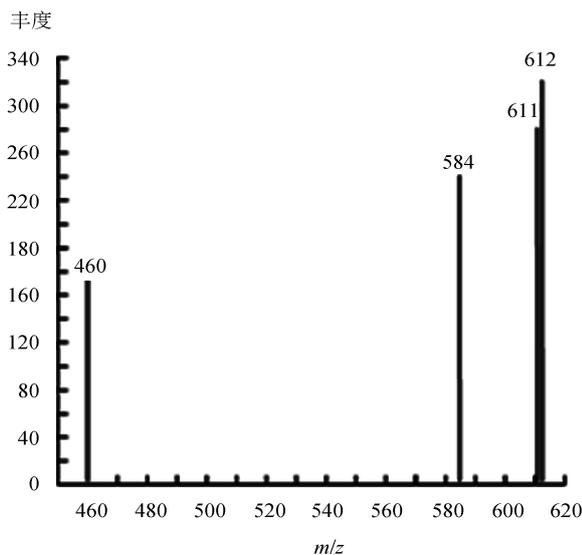


图2 草甘膦标准品衍生物的选择监测离子质谱图

Fig. 2 Selective ion mass spectrogram of derivative of PMG standard

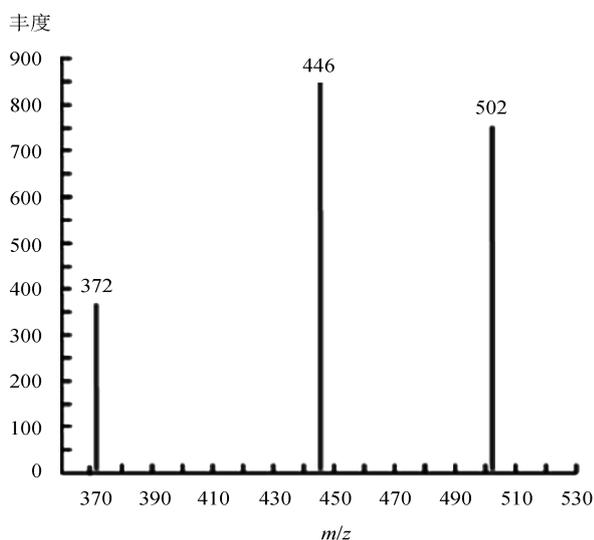


图3 氨基甲酸标准品衍生物的选择监测离子质谱图

Fig. 3 Selective ion mass spectrogram of derivative of AMPA standard

草甘膦和氨基甲酸标准品的线性回归方程见表2,从表中可以看出,PMG和AMPA在2.5~100 ng/mL浓度范围内的质量浓度与峰面积呈正比,且线性相关性较好( $r>0.999$ ),检出限均为0.05 mg/kg。

### 3.2 方法的回收率和精密度

对样品分别进行不同浓度水平的添加回收实验,其回收率和精密度的结果见表3。由表3可知,在3个添加水平下,PMG的回收率在77.1%~92.0%之间,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在2.1%~8.0%之间;AMPA的回收率在82.5%~96.5%之间,RSD在3.9%~8.8%之间,表明方法的准确度高和精密度好,能满足检测工作的实际需求。

### 3.3 样品测定

用本研究确定的方法进行实际样品的检测,结果见表4。从表中可以看出,不同原产国转基因大豆中草甘膦及氨基甲酸的残留量存在较大差别,二者的残留总量从高到低为:乌拉圭(5.04 mg/kg)>阿根廷(4.78 mg/kg)>美国(4.53 mg/kg)>巴西(3.30 mg/kg)。此次检测的抗草甘膦转基因大豆样品中草甘膦及其衍生物-氨基甲酸的残留量远高于日本设定的限量值(0.2 mg/kg),而离美国及欧盟等国家的限量值(20 mg/kg)还有很大差距。

## 4 结论

本研究建立了气相色谱-质谱联用法测定抗草甘膦转基因大豆中草甘膦及其代谢物-氨基甲酸的分析方法,二者在2.5~100 ng/mL浓度范围内的质量浓度与峰面积间的线性相关性较好( $r>0.999$ ),检出限均为0.05 mg/kg。方法的准确度高、精密度良好,能满足检测工作的实际需求。样品的检测结果能够为检验检疫部门加强对进口转基因大豆的监管提供可靠的依据,同时为我国制定转基因大豆中草甘膦及其衍生物的限量标准提供有价值的参考资料,也为进一步分析评估转基因大豆的食用安全性提供可利用的原始数据。

表2 PMG和AMPA的回归方程、相关系数和检出限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients and detection limits of PMG and AMPA

名称	浓度范围(ng/mL)	回归方程	相关系数 $r$	检出限(mg/kg)
PMG	2.5~100	$Y=41.99X-97.09$	0.9992	0.05
AMPA	2.5~100	$Y=120.3X-208.5$	0.9995	0.05

表3 样品的回收率和相对标准偏差( $n=6$ )Table 3 The recovery rates and RSDs of samples( $n=6$ )

添加浓度 c(mg/kg)	平均回收率 R/%		RSD /%	
	PMG	AMPA	PMG	AMPA
0.05	77.1	82.5	8.0	8.8
0.5	83.2	88.8	4.1	4.8
2.0	92.0	96.5	2.1	3.9

表 4 样品的检测结果  
Table 4 Test results of samples

国别	样品编号	PMG 残留量(mg/kg)	平均值(mg/kg)	AMPA 残留量(mg/kg)	平均值(mg/kg)	总量(mg/kg)
美国	1-285	1.79		2.76		
	1-493	1.72	1.75	2.79	2.78	4.53
	1-3745	1.69		2.80		
巴西	1-635	1.32		1.92		
	1-1408	1.36	1.37	1.98	1.93	3.30
	1-2050	1.42		1.88		
阿根廷	1-1562	1.90		2.90		
	1-2853	1.79	1.84	3.00	2.94	4.78
	1-3678	1.82		2.92		
乌拉圭	1-3240	1.98		3.02		
	1-3502	2.06	2.06	2.94	2.98	5.04
	1-3950	2.15		2.99		

参考文献

[1] Hinchey MAW, ConnorWard DV, Nevell CA, *et al.* Production of transgenic soybean plants using agrobacterium-mediated DNA transfer [J]. *Nat Biotechnol*, 1988, 6(8): 915-922.

[2] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010 [R]. Ithaca: ISAAA, 2010: 42.

[3] 苏少泉. 转基因抗除草剂大豆的种植与问题[J]. *世界农业*, 2006, (2): 41-42.  
Su SQ. Planting and problem of transgenic soybean tolerant to herbicide [J]. *World Agric*, 2006, (2): 41-42.

[4] 崔宁波, 宋秀娟. 国外转基因大豆种植与育种研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(08): 103-108.  
Cui NB, Song XJ. Research progress on development and planting of foreign genetically modified soybean [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2015, 46(08): 103-108.

[5] 罗阿东, 焦彦朝, 曹云恒, 等. 转基因大豆检测技术研究进展[J]. *南方农业学报*, 2012, 43(3): 290-293.  
Luo AD, Jiao YC, Cao YH. Progresses in detection technologies for transgenic soybean [J]. *J Southern Agric*, 2012, 43(3): 290-293.

[6] 赵波, 张鹏飞. 抗除草剂转基因大豆的生态安全评价进展[J]. *山地农业生物学报*, 2012, 31(1): 70-76.  
Zhao B, Zhang PF. Ecological assessment of transgenic soybean tolerant to herbicide [J]. *J Mount Agric Biol*, 2012, 31(1): 70-76.

[7] 赵贵兴. 内、外源基因在豆制品加工过程中变化规律的研究概况[J]. *大豆科技*, 2015(1): 28-33.  
Zhao GX. Degradation of endogenous and exogenous genes of transgenic soybean in soybean products during processing [J]. *Soybean Sci Technol*, 2015(1): 28-33.

[8] 陈新, 王长永, 朱成松. 转基因抗草甘膦大豆安全性评价及对环境影响的检测[J]. *江苏农业科学*, 2003(6): 126-127.  
Chen X, Wang CY, Zhu CS. Evaluation of safety of transgenic glyphosate-resistant soybean and its influence on environment [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2003(6): 126-127.

[9] 王华, 王志良, 夏明芳. 污染场地土壤及地下水调查实证分析[J]. *扬州大学学报: 自然科学版*, 2006, 9(4): 78-82.  
Wang H, Wang ZL, Xia MF. Case assessment on investigation on soil and groundwater of contaminated land [J]. *J Yangzhou Univ: Nat Sci Ed*, 2006, 9(4): 78-82.

[10] 路超, 袁建琴, 马艳琴, 等. 转基因大豆的食用安全性研究进展[J]. *农业学报*, 2015, 5(12): 82-85.  
Lu C, Yuan JQ, Ma YQ, *et al.* Research progress on food safety of genetically modified soybeans [J]. *J Agric*, 2015, 5(12): 82-85.

[11] 朱元招. 抗草甘膦大豆转基因 PCR 检测及其饲用安全研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.  
Zhu YZ. Study on transgenic detection with PCR and feeding safety of glyphosate-tolerant soybeans [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.

[12] 叶增民, 潘婕. 转基因大豆及其制品的安全性研究现状[J]. *生物技术通报*, 2009(2): 26-28.  
Ye ZM, Pan J. Current situation in safety of transgenic soybean and its products [J]. *Biotechnol Bull*, 2009(2): 26-28.

[13] 芦春斌, 蔡娟, 戚青林. 抗草甘膦转基因大豆对雄鼠睾丸的影响[J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2014, 35(3): 245-249.  
Lu CB, Cai J, Qi QL. Effects of glyphosate-resistant transgenic soybean on male mice testis [J]. *J Jinan Univ (Nat Sci Med Ed)*, 2014, 35(3): 245-249.

[14] 曹华明. 转基因作物的食品安全与生态风险[J]. *天津农业科学*, 2013, 19(11): 56-58.

Cao HM. Food safety and ecological risk of transgenic crops [J]. Tianjin Agric Sci, 2013, 19(11): 56–58.

[15] 周洲. 美国: 孟山都公司除草剂疑对人体健康有影响[J]. 中国果业信息, 2013, 30(9): 44.

Zhou Z. The United States: Monsanto herbicide suspected of impact to human health [J]. China Fruit News, 2013, 30(9): 44.

[16] 辛绪红, 王晓光. 国内外大豆农药残留限量标准分析[J]. 农业质量标准, 2007(1): 21–23.

Xin XH, Wang XG. Analysis of pesticide residue limits of soybean at home and abroad [J]. Agric Qual Stand, 2007(1): 21–23.

(责任编辑: 刘 丹)

## 作者简介



何龙凉, 本科, 农艺师, 主要研究方向为食品及农产品中农药残留检测。

E-mail: helongliang@163.com



陈智鹏, 博士, 工程师, 主要研究方向为化学分析。

E-mail: 345624687@qq.com