

超高效液相色谱串联质谱法测定咖啡豆中草甘膦、 氨基磷酸和草铵膦残留量

谭建林¹, 白祥¹, 彭珍华¹, 宾婕², 赵秀琳¹, 牛之瑞¹, 王吉祥¹,
胡赠彬¹, 冯雷^{1*}

(1. 云南省产品质量监督检验研究院, 国家热带农副产品监督检验中心, 昆明 650223;

2. 红河卫生职业学院, 红河 661100)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)定量测定咖啡豆中草甘膦、氨基磷酸和草铵膦残留量。**方法** 通过水提取样品, C₁₈固相萃取小柱进行净化, FMO-CI溶液衍生, 后采用超高效液相色谱串联质谱测定。**结果** 草甘膦、氨基磷酸和草铵膦在 2~100 ng/mL 范围内线性良好($r^2 \geq 0.999$), 方法的定量限为 0.05 mg/kg。在添加水平为 0.05 mg/kg 和 0.5 mg/kg 时, 回收率为 99.6%~107.6%, 相对标准偏差低于 4.52%。**结论** 该方法准确、稳定、灵敏, 能够满足咖啡豆中草甘膦、氨基磷酸和草铵膦检测与确证的需要。

关键词: 超高效液相色谱串联质谱法; 草甘膦; 氨基磷酸; 草铵膦; 咖啡豆

Determination of glyphosate, aminomethyl phosphoric acid and glufosinate residue in coffee bean by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

TAN Jian-Lin¹, BAI Xiang¹, PENG Zhen-Hua¹, BIN Jie², ZHAO Xiu-Lin¹, NIU Zhi-Rui¹,
WANG Ji-Xiang¹, HU Zeng-Bin¹, FENG Lei^{1*}

(1. Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, National Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, Kunming 650223, China; 2. Honghe Health Vocational College, Kunming 661100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a quantitative method for the determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate residues in coffee beans by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted by water, purified by C₁₈ solid phase extraction column, derivatized by FMO-CI solution, and then determined by UPLC-MS/MS. **Results** Glyphosate, aminomethyl phosphonic acid and glufosinate had good linearity in the range of 2–100 ng/mL ($r^2 \geq 0.999$), and the quantitative limit of the method was 0.05 mg/kg. The recoveries were 99.6%–107.6% and the relative standard deviation was less than 4.52% at 0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg. **Conclusion** This method is accurate, stable and sensitive, and can meet the needs of the detection and confirmation of glyphosate, aminomethyl phosphoric acid and glyphosate in coffee beans.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; glyphosate; aminomethyl

*通讯作者: 冯雷, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全和理化检测。E-mail: kmfenglei@126.com

*Corresponding author: FENG Lei, Senior Engineer, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Kunming 650223, China. E-mail: kmfenglei@126.com

phosphoric acid; glufosinate; coffee bean

1 引言

草甘膦是全球最大吨位的除草剂品种, 具有高效、低毒、廉价等特性, 被广泛应用于全球各个农业和非农业领域, 年销售值与使用面积均居农药首位^[1]。草甘膦通过抑制植株合成芳香性氨基酸, 最终导致植物叶片枯黄脱落, 死亡^[2]。草甘膦在环境中会通过微生物降解, 氨甲基膦酸(aminomethyl phosphonic acid, AMPA)是草甘膦的主要代谢物, 草甘膦 C-N 键通过酶促反应断裂生成低毒的氨甲基膦酸^[3]。草铵膦是一种有机磷类非传导性灭生除草剂, 通过抑制谷氨酰胺合成酶, 导致植物体内氮代谢紊乱, 铵的过量积累后叶绿体解体, 从而光合作用受抑制, 最终导致植物死亡^[4]。草铵膦的发展, 得益于草甘膦, 近年来市场发展迅速。从结构上讲, 草铵膦与草甘膦一样, 同为含磷的氨基酸类除草剂^[5]。

我国 GB 2763-2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[6]规定食品中草甘膦和草铵膦的最大残留限量分别为 0.05~7.00 mg/kg 和 0.05~5.00 mg/kg, 但是对咖啡豆没有限量要求, 检测标准分别为 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》^[7](草甘膦以草甘膦和氨甲基膦酸之和计)和 GB 23200.108-2018《食品安全国家标准 植物源性食品中草铵膦残留量的测定液相色谱-质谱联用法》^[8]。目前国内外检测食品中草甘膦、草铵膦和氨甲基膦酸的方法主要有分光光度法^[9]、毛细管电泳法^[10]、气相色谱法^[11]、气质联用法^[12]、离子色谱法^[13]、液相色谱法^[14]和液质联用法^[15]。草甘膦和草铵膦的结构相似, 具有强极性、易溶于水难溶于有机溶剂的特点, 这使其残留量进行准确定量分析难度较大, 相关的检测标准和传统的检测方法前处理成本高、耗时长, 步骤繁琐、回收率不高, 且不是同时检测。本研究采用 C₁₈ 固相萃取柱对提取液进行净化, 采用超高效液相色谱-串联质谱法检测, 建立了同时测定咖啡豆中的草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦残留量的快速分析方法, 以期满足咖啡豆中的草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦残留量的检测, 为相关检测机构提供参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

LC-30A 超高效液相色谱仪、LC-MS 8050 串联质谱仪(日本岛津公司); 0.1 mg 和 0.01 mg 分析天平(瑞士梅特勒公司); TGL-20B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); Milli-Q 超纯水仪(德国默克集团); KQ-800DE 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); VORTEX2 涡旋振荡器(德国 IKA 集

团); 水相针式过滤器 0.22 μm(上海安谱科学仪器有限公司); Research® plus 20~200 μL、10~1000 μL 移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

乙腈(色谱纯, 德国默克集团); 硼酸钠(Na₂B₄O₇·10H₂O, 分析纯, 四川西陇化工有限公司); 9-芴基甲基三氯甲烷(FMOC-Cl, 99.0%, 国药集团化学试剂有限公司); C₁₈ 固相萃取柱(上海安谱科学仪器有限公司); 草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦(草甘膦≥99.0%, 氨甲基膦酸纯度≥99.0%, 草铵膦纯度≥98.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 草甘膦-13C₂, 15N(99.0%, 加拿大 TRC 公司); 咖啡豆(本地市场采购)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦和草甘膦-13C₂, 15N 标准储备溶液(0.1 mg/mL): 分别精确称取草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦和草甘膦-13C₂, 15N 标准品各 1.0 mg 于 10 mL 容量瓶, 用水溶解后定容 10 mL。放置于 0~4 °C 冰箱, 有效期 6 个月。

草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦混合标准中间工作溶液(1.0 μg/mL): 分别吸取 0.1 mL 草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至 10 mL。放置于 0~4 °C 冰箱, 有效期 1 个月。

草甘膦-13C₂, 15N 工作溶液(1.0 μg/mL): 分别吸取 0.1 mL 草甘膦-13C₂, 15N 标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至 10 mL。放置于 0~4 °C 冰箱, 有效期 1 个月。

草甘膦、氨甲基膦酸、草铵膦混合标准工作溶液: 吸取适合体积的混合标准中间工作溶液和 0.1 mL 草甘膦-13C₂, 15N 工作溶液, 采用梯度稀释的方式配制成混合标准工作溶液, 浓度为: 2、5、10、20、50、100 ng/mL, 现用现配。

2.2.2 样品处理

(1) 样品制备

将咖啡豆放入粉碎机中粉碎, 样品全部过网筛后密封并标记, 于 0~4 °C 保存。

(2) 样品提取

称样 2.0 g 于 50 mL 离心管中, 加入 0.1 mL 草甘膦-13C₂, 15N 工作溶液, 涡旋 1 min 后静置 30 min, 加入 20 mL 去离子水, 涡旋 1 min, 于超声波振荡器上提取 30 min, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液 3 mL 于 10 mL 比色管中, 加入 1 mL 乙腈, 涡旋 1 min 后全部过 C₁₈ 小柱(使用前先后用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化, 然后加压抽干 5 min 后使用), 收集全部流出液, 涡旋 1 min。取 0.8 mL 流出液, 加入 0.2 mL 5% 硼酸钠溶液和 0.2 mL FMOC-Cl 衍生

溶液, 立即漩涡 1 min, 室温衍生 6 h, 过滤上机测定。

2.3 仪器条件

2.3.1 色谱条件

采用 Shiseido CAPCELL PAK AMDE 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm); 柱温 40 °C; 样品温度 8 °C; 流动相 A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液, 流动相 B: 乙腈; 流速 0.4 mL/min; 进样量 2μL。梯度洗脱程序: 0 min, 流动相 B: 8%; 0~4.6 min, 流动相 B: 8%~95%; 4.6~5.6 min, 流动相 B: 95%~95%; 5.6~5.7 min, 流动相 B: 95%~8%; 5.7~8 min, 流动相 B: 8%~8%。

2.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI): 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 脱溶剂温度 350 °C, 脱溶剂气氮气流速 800 L/h, 离子源温度 250 °C, 锥孔气流量 55 L/h, 毛细管电压 3.5 kV, 碰撞气为氩气。其他质谱参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 色谱柱的选择

分别采用 Penomenex Kinetex 1.7 μ XB-C₁₈、SHIMADZU ODS III C₁₈、Shiseido CAPCELL PAK AMDE 进行分析, 发现 Penomenex Kinetex 1.7 μ XB-C₁₈ 不适合草甘膦、氨甲基

膦酸和草铵膦的分析, 存在严重拖尾; 采用 SHIMADZU ODS III C₁₈ 分析时, 目标峰分离较好, 但氨甲基膦酸和咖啡豆样品杂质峰无法完全分离, 因此也不适用于咖啡豆中草甘膦、氨甲基膦酸和草铵膦的分析; 而采用 Shiseido CAPCELL PAK AMDE 分析时, 目标峰与杂峰完全分离, 峰形较好, 无拖尾现象, 因而选择 Shiseido CAPCELL PAK AMDE 进行分析。

3.2 衍生条件优化

3.2.1 衍生溶剂优化

空白样品经 2.2.2 节方法提取, 采用空白提取液加标(0.1 μg/mL)的方式进行, 分别加入甲醇、乙腈和丙酮配制的 FMOC-Cl 衍生溶剂进行衍生(衍生 6 h), 比较不同衍生液溶剂对衍生效果的影响, 结果如图 1 所示, 由丙酮配制的 FMOC-Cl 衍生液效果最好。

3.2.2 衍生液浓度优化

空白样品经 2.2.2 节方法提取, 采用空白提取液加标(0.1 μg/mL)的方式进行, 加入浓度 1~6 mg/mL FMOC-Cl 衍生试剂(衍生 6 h), 比较不同浓度的 FMOC-Cl 对衍生效果的影响, 结果如图 2 所示, 衍生试剂浓度为 5 mg/mL 时, 衍生效果最好, 到 6 mg/mL 时, 4 个目标化合物的峰面积没有明显的增加, 因此选择衍生液浓度为 5 mg/mL。

表 1 质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	碰撞能量/V	扫描方式	保留时间/min
草甘膦	392.1/88.0*	-23	正离子	2.664
	392.1/179.0	-28		
草铵膦	402.0/180*	14	负离子	2.786
	402.0/206.0	12		
氨甲基膦酸	334.1/111.9*	-14	正离子	3.110
	334.1/179.0	-22		
草甘膦- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	395.1/91.0*	-19	正离子	2.664
	395.1/179.0	-26		

注: *为定量离子对。

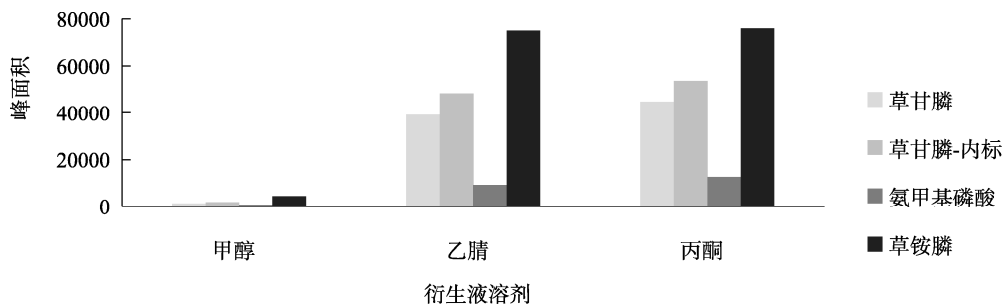
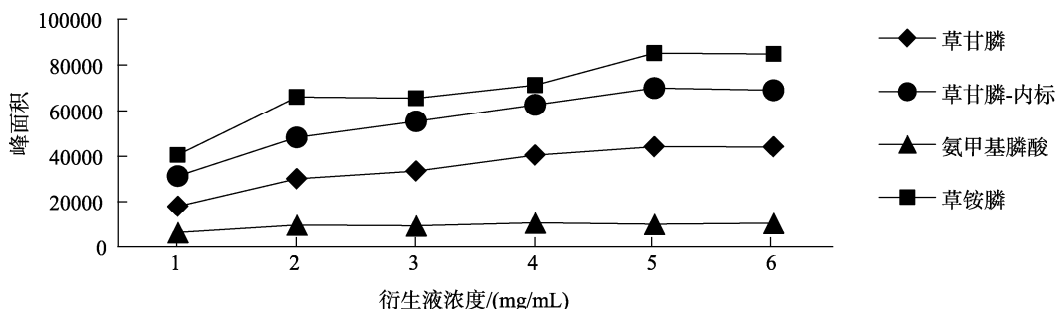


图 1 衍生溶剂优化(*n*=6, RSD<10%)

Fig.1 Optimization of derived solvent(*n*=6, RSD<10%)

图 2 衍生液浓度优化($n=6$, $RSD<10\%$)Fig.2 Optimization of derivative concentration($n=6$, $RSD<10\%$)

3.2.3 衍生时间优化

空白样品经 2.2.2 节方法提取, 采用空白提取液加标 (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 的方式进行, 加入浓度 5 mg/mL FMOC-Cl 衍生试剂, 比较不同的衍生时间对衍生效果的影响, 结果如图 3 所示, 衍生时间为 6 h 时, 衍生效果最好, 到 8 h 时, 4 个目标化合物的峰面积没有明显的增加, 因此选择衍生时间为 6 h。

3.3 方法评价

对 2~100 ng/mL 的草甘膦、氨基膦酸和草铵膦标准溶液进行测定, 内标法定量, 采用 2.3 仪器条件进行测定, 以标准溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。由表 2 可见, 各标准曲线相关系数 (r^2) 均大于 0.999, 相关性良好。

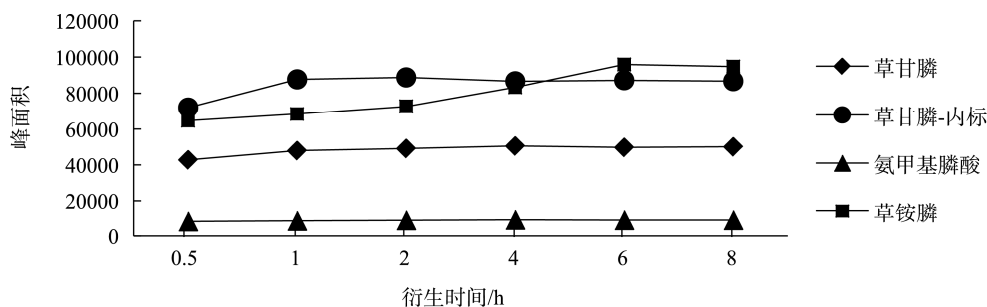
方法检出限是依据 2.2.2 节操作步骤进行添加回收,

根据 3 倍信噪比确定该方法的检出限 0.04 mg/kg , 10 倍信噪比确定该方法的定量限 0.1 mg/kg 。

选取阴性的典型样品, 向试样中添加草甘膦、氨基膦酸和草铵膦的标准溶液, 分别进行 0.05 mg/kg 和 0.5 mg/kg 的加标回收实验, 每份样品检测 6 次, 空白加标样品色谱见图 4。实验结果表明本方法的回收率为 99.6%~107.6%, 相对标准偏差小于 4.52%。空白试样的添加浓度和回收率的实验数据见表 2。

3.4 样品测定结果

采用本检验方法对市场采购 25 批咖啡豆进行草甘膦、氨基膦酸和草铵膦残留检测, 以保留时间、离子对丰度比进行定性分析, 以定量离子对进行定量分析。其中 5 批样品有检出草甘膦含量为 0.0453~0.172 mg/kg , 其余样品均未检出草甘膦、氨基膦酸和草铵膦。

图 3 衍生时间优化($n=6$, $RSD<10\%$)Fig.3 Optimization of derivative time($n=6$, $RSD<10\%$)表 2 化合物的线性方程、相关系数、加标回收率、相对标准偏差、检出限和定量限($n=6$)Table 2 Linear equation, correlation coefficient, recovery rate, relative standard deviation, detection limit and quantitative limit of compounds ($n=6$)

名称	线性方程	相关系数 r^2	添加量/(mg/kg)	回收率/%	精密性/%	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
草甘膦	$Y=3.11e^8X-2.50e^4$	0.9997	0.05	100.7	1.48	0.02	0.05
			0.5	99.9	1.05		
氨基膦酸	$Y=1.71e^8X+1.52e^4$	0.9995	0.05	100.1	3.37	0.02	0.05
			0.5	99.6	2.33		
草铵膦	$Y=6.25e^8X-5.28e^4$	0.9991	0.05	107.6	4.52	0.02	0.05
			0.5	107.0	3.80		

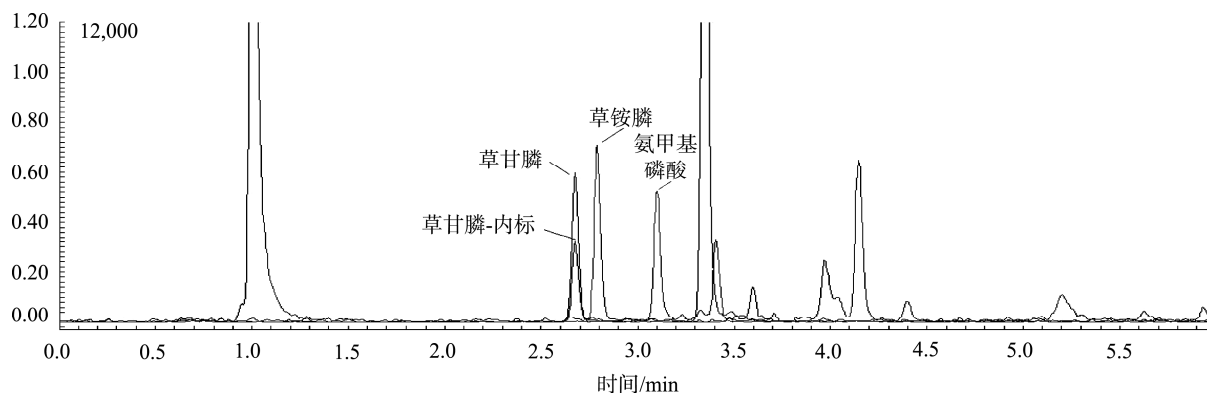


图 4 空白加标样品色谱图

Fig.4 Chromatogram of blank recovery experiment sample

4 结 论

本方法用水进行提取, 采用 C_{18} 固相萃取小柱进行净化, 优化了色谱条件和样品前处理条件, 建立了咖啡豆中草甘膦、氨基磷酸和草铵膦残留的液相色谱-串联质谱检测方法, 该方法前处理过程快速简单, 方法的检出限、精密度和线性关系均满足草甘膦、氨基磷酸和草铵膦残留的分析检测要求。

参考文献

- [1] 苏少泉. 草甘膦与抗草甘膦作物[J]. 农药, 2008, 47(9): 631-636.
Su SQ. The glyphosate and roundup ready crops [J]. Agrochemicals, 2008, 47(9): 631-636.
- [2] 向文胜, 张文吉, 王相晶, 等. EPSP 合成酶的特性及新抑制剂的研究进展[J]. 农药学报, 2000, 2(2): 1-8.
Xiang WS, Zhang WJ, Wang XJ, *et al.* Characteristics of EPSP synthetase and research progress of new inhibitors [J]. Chin J Pestic Sci, 2000, 2(2): 1-8.
- [3] Sviridov AV, Shushkova TV, Zelenkova NF, *et al.* Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. [J] Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(2): 787-796.
- [4] 张宏军, 刘学, 张佳等. 草铵膦的作用机理及其应用[J]. 农药科学与管理, 2004, 25(4): 23-27.
Zhang HJ, Liu X, Zhang J, *et al.* Mechanism and utilization of glufosinate-ammonium [J]. Pestic Sci Admin, 2004, 25(4): 23-27.
- [5] 张一宾. 近年来全球草铵膦的市场及发展趋势[J]. 农药, 2016, 55(5): 313-315.
Zhang YB. The global market and development trend of glufosinate in recent years [J]. Agrochemicals, 2016, 55(5): 313-315.
- [6] GB 2763-2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763-2019 National food safety standard—Maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [7] 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[S].
SN/T 1923-2007 Determination of glyphosate residues in food for import and export—HPLC-MS/MS method [S].
- [8] GB 23200. 108-2018 食品安全国家标准 植物源性食品中草铵膦残留量的测定 液相色谱-质谱联用法[S].
GB 23200. 108-2018 National food safety standard—Determination of glufosinate-ammonium residue in foods of plant origin—Liquid chromatography tandem mass spectrometry [S].
- [9] 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 glyphosate and glycine in waste water from glyphosate production of spectrophotometric [J]. J Zhengzhou Univ (Nat Sci Ed), 2012, 44(2): 81-84.
- [10] Hsu CC, Whang CW. Microscale solid phase extraction of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water and guava fruit extract using alumina-coated iron oxide nanoparticles followed by capillary electrophoresis and electrochemiluminescence detection [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(49): 8575-8580.
- [11] 马为民, 牛森, 李东运, 等. 气相色谱法测定几种蔬菜水果中草甘膦残留[J]. 农药, 2006, 45(4): 261-262.
Ma WM, Niu S, Li DY, *et al.* Determining glyphosate residues in vegetables and fruits by gas chromatography [J]. Agrochemicals, 2006, 45(4): 261-262.
- [12] 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): 288-291.
Chen XM, Zhou M. Determination of glyphosate and its metabolites in banana and irrigation water by GC-MS [J]. Chin J Chromatogr, 2004, 22(3): 288-291.
- [13] 朱惠扬, 李晓晶, 甘平胜, 等. 离子色谱法同时测定水源水和饮用水中草甘膦和氨基磷酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(10): 1396-1398.
Zhu HY, Li XJ, Gang PS, *et al.* Simultaneous detection of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in drinking water and source water by ion chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(10): 1396-1398.
- [14] 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.

Fang F, Xu H, Wei RQ, *et al.* Determination of glyphosate by high performance liquid chromatography with o-nitrobenzenesulfonyl chloride as derivatization reagent [J]. J Instrum Anal, 2011, 30(6): 683-686.

[15] 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基磷酸残留 [J]. 色谱, 2007, 25(4): 486-490.

Li B, Deng XI, Guo DH, *et al.* Determination of glyphosate and amino methyl phosphoric acid residues in foods using high performance Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2007, 25(4): 486-490.

(责任编辑: 王 欣)

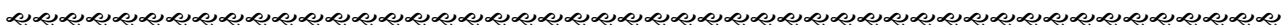
作者简介



谭建林, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品污染物检测。
E-mail: ynzjtg@126.com



冯 雷, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全和理化检测。
E-mail: kmfenglei@126.com



“功能食品与营养活性物质”专题征稿函

功能性食品由于其特殊的营养和保健功能, 越来越得到国内外广泛关注。

鉴于此, 本刊特别策划了“功能食品与营养活性物质”专题, 围绕功能性食品的营养研究、开发应用、安全质量控制及活性物质等问题展开讨论, 计划在 2020 年 11~12 月出版。之前也组织过类似的专题, 由南昌大学食品科学与技术国家重点实验室副主任邓泽元教授担任专题主编, 成效很不错, 很多研究人员积极参与进来。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2020 年 09 月 15 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**功能食品与营养活性物质**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 功能食品与营养活性物质”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **功能食品与营养活性物质**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部