

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

江 燕, 曹赵云, 贾瑞琳, 齐 慧, 陈铭学*

(中国水稻研究所, 农业部稻米及制品质量监督检验测试中心, 浙江 杭州 310006)

摘要: 采用亲水作用色谱-串联质谱建立了同时测定稻米中草甘膦及其主要代谢物氨甲基磷酸残留量的检测方法。样品经水提取, C18 固相萃取柱和超滤膜净化, 以 1 mmol/L 乙酸铵溶液(用氨水调 pH = 11.0) - 乙腈为流动相, 亲水作用色谱柱分离, 采用电喷雾离子源、负离子扫描模式和多反应监测模式质谱检测, 基质匹配标准溶液外标法定量。草甘膦和氨甲基磷酸分别在 0.001 ~ 0.250 mg/L 和 0.002 5 ~ 0.250 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 检出限(信噪比为 3) 分别为 0.010 mg/kg 和 0.020 mg/kg。通过对空白大米样品进行 0.100、0.500 和 2.500 mg/kg 3 个加标水平的回收试验, 草甘膦和氨甲基磷酸的平均回收率和相对标准偏差分别为 96.3% ~ 107.3% 和 1.3% ~ 9.1% ($n = 3$)。该方法无需衍生, 净化步骤简便快速, 定量准确, 可满足稻米中草甘膦和氨甲基磷酸残留检测要求。

关键词: 亲水作用色谱-串联质谱; 草甘膦; 氨甲基磷酸; 稻米

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)01-0039-06

Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rice using hydrophilic interaction chromatography- tandem mass spectrometry

JIANG Yan, CAO Zhaoyun, JIA Ruilin, QI Hui, CHEN Mingxue*

(Rice Product Quality Inspection and Supervision Center of Ministry of Agriculture,
China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of glyphosate (Gly) and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in rice using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS). The samples were extracted with water, and purified using a C18 solid phase extraction cartridge followed by an ultrafiltration membrane to remove interfering materials. Gly and AMPA were separated on an HILIC column with the mobile phases of 1 mmol/L ammonium acetate (pH 11.0 adjusted with ammonium hydroxide) and acetonitrile, and finally detected with negative electrospray ionization (ESI⁻) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The matrix-matched external standard calibration curves were used for quantitative analysis. The sample pretreatment of Gly and its metabolite was successfully carried out without any derivatization. Under the optimal analytical conditions, the linearities of Gly and AMPA were in the concentration ranges of 0.001 to 0.250 mg/L and 0.002 5 to 0.250 mg/L respectively, with the correlation coefficients of 0.999 5 for the both analytes. The limits of detection ($S/N = 3$) of the method were 0.010 mg/kg for Gly, and 0.020 mg/kg for AMPA. For all the samples, the mean spiked recoveries of Gly and AMPA were in the range from 96.3% to 107.3% at 3 spiked levels (0.100, 0.500 and 2.500 mg/kg), and the relative standard deviations (RSDs, $n = 3$) were in the range of 1.3% ~ 9.1%. The method is easy, fast, sensitive and accurate, and can meet the requirements of the determination of Gly and AMPA pesticide residues in rice.

* 通讯联系人: 陈铭学, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全. Tel: (0571) 63370275, E-mail: cmingxue@163.com.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2009RG006) 和农业行业标准制定资金项目(2004-62)。

收稿日期: 2011-08-25

Key words: hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS); glyphosate; aminomethylphosphonic acid; rice

草甘膦(glyphosate, Gly), 化学名称 *N*-(膦酰基甲基)氨基乙酸, 是目前世界上应用最广、生产量最大的广谱非选择性除草剂, 可有效防除一年生与多年生的禾本科、双子叶杂草及灌木等^[1,2], 2010 年全球总需求量为 70~75 万吨左右, 我国年需求量达 5 万吨左右^[3]。虽然草甘膦属于低毒类的有机磷除草剂, 但其不合理的使用仍会导致其过高地残留于植物体中。草甘膦及其主要代谢物氨甲基磷酸(aminomethylphosphonic acid, AMPA) 具有与有机磷化合物相似的作用毒理, 主要通过抑制胆碱脂酶的活性而导致神经系统机能失调, 由草甘膦引起的水体污染、植被破坏、牲畜中毒等案件也逐年增加^[4,5]。为此, 世界各国, 包括我国及国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC) 均对农产品中 Gly 的最大残留量(MRL) 有着严格的限量规定^[6,7], 如我国对稻米、小麦粉和水果中 Gly 的 MRL 规定分别为 0.1、0.5 和 0.1 mg/kg。

草甘膦和氨甲基磷酸均为强极性两性化合物, 不溶于大部分有机溶剂, 且挥发性差、紫外光区无吸收, 这些特性使得对它们的残留量进行准确分析难度较大^[8,9]。一方面, Gly 和 AMPA 具有强极性、低挥发性的特点, 导致其难以气化, 且在常规反相柱上没有保留, 难以利用气相色谱(GC) 和高效液相色谱(HPLC) 进行分离测定; 另一方面, 由于缺少生色基团, 难以直接利用紫外和荧光检测器进行检测, 因此, 柱前或柱后衍生方法常用于改善 GC 和 HPLC 的色谱行为及提高检测响应值。如早期常采用三氟乙酸酐和三氟乙醇等用于 GC 的柱前衍生^[10,11], 9-苄基甲基氯仿(FMOC-Cl) 等用于 HPLC 柱前衍生^[12-14], 结合氮磷检测器(NPD) 或荧光检测器进行定量分析, 但方法灵敏度低, 不能满足残留分析的要求。采用色谱-质谱联用技术可大大提高方法的灵敏度与选择性, 特别是液相色谱-质谱联用(LC-MS、LC-MS/MS)^[15-18] 已成为当前测定 Gly 和 AMPA 残留量的主要方法, 但方法同样需采用 FMOC-Cl 柱前衍生以增强其在反相色谱柱上的保留。然而柱前或柱后衍生步骤操作复杂、耗时, 操作过程不易控制, 同时衍生副产物干扰测定, 重现性差^[17-19]。近年来, 不经衍生的方法已有报道, 如 Granby 等^[20] 采用离子色谱-质谱法测定了农产品中 Gly 和 AMPA 残留, 但离子色谱所使用的高浓度盐与质谱系统兼容性差, 需要特殊装置进行在线脱盐。

基于 Gly 和 AMPA 的强极性, 本文采用亲水作用色谱-串联质谱(HILIC-MS/MS), 结合超滤膜净化, 建立了一种无需衍生, 净化步骤简单的测定稻米中 Gly 和 AMPA 残留量的方法。研究了不同类型亲水作用色谱柱、流动相组成及质谱条件等对测定灵敏度、精密度的影响, 考察了提取和净化方式对方法回收率的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Survryor 系列液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司), TSQ Quantum Access Max 三重四极杆质谱仪, 配电喷雾离子源(美国 Thermo Fisher 公司), 高速分散机(德国 IKA 公司)。

1.2 试剂与材料

乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 氨水(25%~28%, 杭州长征化学试剂有限公司); 乙酸铵(分析纯, 美国 Fluka 公司); 实验室用水为 Milli-Q 高纯水; Bond Elut C18 固相萃取柱(500 mg/6 mL, 40 μ m; 美国瓦里安公司); Amicon Ultra 超滤膜(4 mL, 3K MWCO, 美国 Millipore 公司); 草甘膦(纯度 98%) 和氨甲基磷酸(纯度 99%) 标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

1.3 标准储备液和工作溶液的配制

Gly 和 AMPA 标准储备液: 分别称取 10 mg(精确至 0.01 mg) 的 Gly 和 AMPA 标准品, 用水溶解并定容至 10 mL, 配制成质量浓度为 1 g/L 的标准储备液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存。

Gly 和 AMPA 混合标准工作溶液: 用水将上述标准储备液逐级稀释, 配成含 Gly 和 AMPA 均为 10 mg/L 的混合标准工作溶液。

Gly 和 AMPA 基质匹配标准使用溶液: 空白样品经提取、净化后获得空白基质溶液, 用等体积的乙腈对其进行稀释, 混匀。使用时用上述混合液将标准工作溶液逐级稀释成所需浓度的工作溶液。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取

将稻米干样粉碎过 20 目筛, 然后称取 5 g(精确到 0.01 g) 置于 250 mL 具塞聚乙烯离心管中, 加入 25 mL 水, 在高速分散机中以 10 000 r/min 高速匀浆 1 min 后, 于 3 500 r/min 下离心 3 min, 收集上清液, 残渣中加入 25 mL 水按上述步骤再提取一

次,合并两次上清液,混匀,待净化。

1.4.2 净化

将 C18 固相萃取小柱分别用 3 mL 乙腈和 3 mL 水预条件化,待液面到达柱吸附层表面时,加入 5 mL 待净化液,弃去前 1 mL 后,用 10 mL 试管收集剩余流出液,涡旋混匀;吸取 2 mL 于超滤膜离心管,在 5 500 r/min 下离心 35 min,取出 0.5 mL 下层滤出液并加入 0.5 mL 乙腈等体积稀释,混匀,供 LC-MS/MS 分析测定。

1.5 LC-MS/MS 条件

色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50 4E 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相 A: 1 mmol/L 乙酸铵水溶液(用氨水调 pH 11.0),流动相 B: 乙腈;二元梯度洗脱程序: 0 ~ 10 min, 70% A ~ 95% A; 10 ~ 15 min, 95% A; 15.1 ~ 35 min, 70% A; 流速为 0.3 mL/min。柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。电喷雾离子源(ESI),负离子模式扫描,多反应监测(MRM);喷雾电压 2 200 V;辅助气(N₂)压力 34.475 kPa;鞘气(N₂)压力为 206.85 kPa;碰撞气(Ar)压力为 0.2 Pa(1.5 mTorr);毛细管温度为 300 °C;其他质谱参数见表 1。

表 1 检测 Gly 和 AMPA 残留的质谱参数
Table 1 MS/MS parameters for the detection of Gly and AMPA residues

Analyte	Molecular formula	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Tube len voltage/V	Collision energy/V
Gly	C ₃ H ₈ NO ₅ P	168	150*	87	13
			81		17
AMPA	CH ₆ NO ₃ P	110	79*	77	28
			63		51

* Quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

Gly 和 AMPA 均为两性化合物,Gly 的 pK_a 为 0.78、2.29、5.96 和 10.98, AMPA 的 pK_a 为 0.9、5.6 和 10.2^[2],实验发现它们在正、负离子模式下均有响应,但负离子模式下的灵敏度远高于正离子,而且随着流动相 pH 的增大,灵敏度明显提高,当 pH > 10.5 时可以获得较满意的灵敏度。分别对 Gly 和 AMPA 的标准溶液进行全扫描和子离子扫描,确定母离子、子离子;分别优化了碰撞电压、碰撞能量等参数,最终为每种物质确定两个特征子离子,其中丰度较高的为定量离子,较低的为定性离子,具体参数见表 1。

2.2 色谱条件的优化

由于 Gly 和 AMPA 不能在常规反相色谱柱上

保留,根据其强极性的特点,本实验拟采用亲水作用色谱柱实现二者的色谱分离。比较了 Obelisc N 色谱柱、SeQuant ZIC-HILIC 色谱柱、硅胶基质的氨基柱及聚合物基质的氨基柱 4 种亲水类型色谱柱。结果表明,Gly 和 AMPA 在 SeQuant ZIC-HILIC 色谱柱上保留很弱;而 Obelisc N 和硅胶基质的氨基柱由于可以承受的 pH 范围较窄,只能在低 pH 下进行分离而导致灵敏度低,不能满足测定要求;聚合物基质的氨基柱 Shodex Asahipak NH2P-50 4E 可以在 pH 2 ~ 13 的范围内使用,在碱性条件下,可以获得较好的分离度和峰形,适用于目标物的色谱分离。

根据目标物的 pK_a 值,试验比较了不同 pH (10.5、11.0 和 11.5) 的氨水溶液对色谱分离和灵敏度的影响。结果表明: Gly 和 AMPA 的检测灵敏度均随 pH 的升高而提高。AMPA 在色谱柱上的保留强弱随 pH 变化不明显。而 Gly 随 pH 升高其保留变弱,当 pH 为 10.5 时,其在柱上难以被洗脱,且色谱峰出现严重拖尾;而当 pH 为 11.5 时,Gly 保留较弱,与 AMPA 不能完全分离,且基质效应更明显;当 pH 为 11.0 时,Gly 得到较好的保留,并与 AMPA 达到基线分离。因此,实验选择 pH 为 11.0。另外,试验考察了不同浓度(0.5、1、3、5 mmol/L,用氨水调 pH 11.0) 乙酸铵对改善 Gly 和 AMPA 色谱峰形的效果,结果表明当乙酸铵浓度为 1 mmol/L 时效果最好。为此,实验选择 1 mmol/L 乙酸铵溶液(pH 11.0) 为水相。

综合以上结果,本实验选用 pH 为 11.0 的 1 mmol/L 乙酸铵-乙腈进行二元梯度洗脱,获得的目标物总离子流图及质谱图见图 1。可以看出 Gly 和 AMPA 均获得良好的保留,保留时间分别为 10.43 min 和 14.22 min,两者基线分离,并具有良好的峰形和灵敏度,Gly 和 AMPA 的仪器检出限分别为 0.000 5 mg/kg 和 0.001 mg/kg。

2.3 提取方式的选择

由于 Gly 和 AMPA 具有强的水溶性,常用水、水/二氯甲烷^[5,14]等溶剂进行提取。试验比较了这两种提取溶剂的效果,结果表明,虽然加入二氯甲烷能够除去部分脂类物质,但 Gly 有一定的损失,损失率约为 20%。试验还发现,样品经一次提取的回收率仅为 70% 左右,残渣中仍留有较高含量的目标物;经过两次提取基本可将被测物全部提取出来。因此,实验采用纯水作提取溶剂,并进行两次提取。

2.4 净化方式的选择

由图 2a 可以看出,样品经提取后直接进行测定会产生极强的离子抑制作用,测定液中 Gly 浓度即

使高达 50 $\mu\text{g/L}$, 其响应也被完全抑制, 而 AMPA 也存在较强的响应抑制, 灵敏度与纯溶剂标样(以水作为溶剂配制而成)相比大幅度下降, 因此必须采取适当的净化。在草甘膦净化方面, 常通过加入氯仿、二氯甲烷等^[12,14]有机试剂进行液-液萃取净化, 然后采用固相萃取净化, 其中最常用的是离子交换固相萃取柱^[10,14,16]。但上述净化方法主要应用于衍生测定时样品的净化, 对于不经衍生测定的净化效果研究尚少。本实验利用 Gly 和 AMPA 在反相 C18 柱上不保留的特性, 将提取液通过 C18 固相萃取小柱, 在一定程度上除去疏水性干扰物; 同时根据稻米中含有大量的淀粉、蛋白质等大分子物质, 利用超滤膜去除这些大分子化合物达到净化的目的, 取得了满意的净化效果, 结果如图 2b 和 c 所示。样品经过 C18 固相萃取小柱净化后, 杂峰数量减少且强度降低; 样品经 C18 固相萃取柱与超滤膜双重净化后,

杂峰基本去除, 离子抑制效应得到明显的改善, Gly 抑制率由图 2a 中的 100% 降低为 20%, AMPA 由 60% 降低为 15%。为了更好地准确定量, 本实验采用基质匹配校正曲线进行定量分析, 使标准溶液和样品溶液具有相同的离子化条件, 从而进一步消除基质效应对测定的影响。

2.5 方法的线性范围与检出限

将空白样品分别按上述方法提取、净化, 获得上机前的空白基质溶液, 经与乙腈 1:1 体积比混合后分别配制成系列浓度的 Gly 和 AMPA 基质匹配标准溶液进行测定, 以定量离子峰面积(y)对质量浓度(x , mg/L)绘制基质匹配标准曲线, 得到的线性方程和相关系数见表 2。结果表明, Gly 和 AMPA 分别在 0.001 ~ 0.250 mg/L 和 0.002 5 ~ 0.250 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 线性相关系数均为 0.999 5。

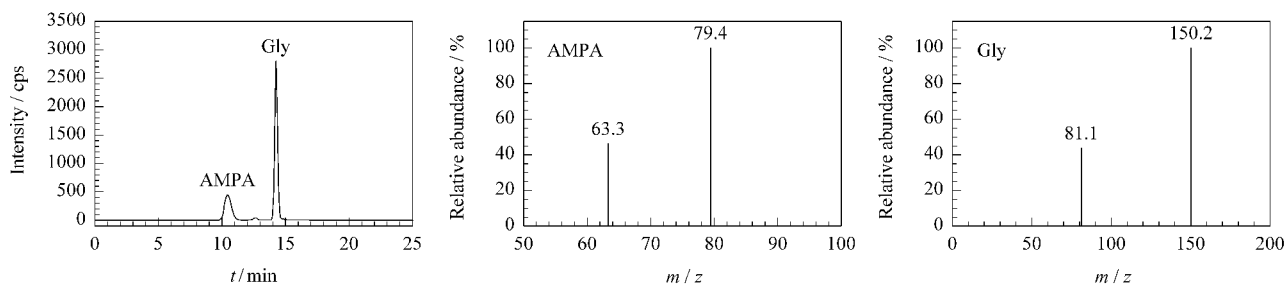


图 1 Gly 和 AMPA (25 $\mu\text{g/L}$) 的总离子流图与质谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram and spectra of Gly and AMPA (25 $\mu\text{g/L}$)

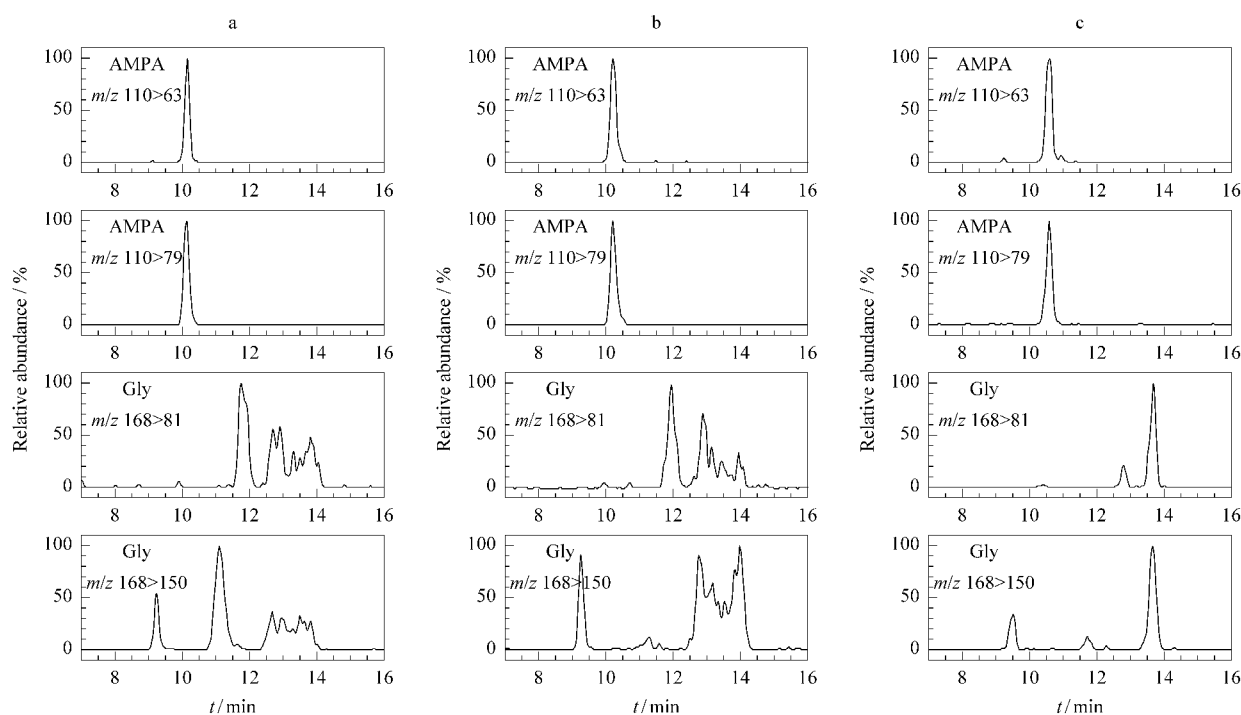


图 2 不同净化方式加标 (0.050 mg/L) 提取液的净化效果

Fig. 2 Effects of different purification methods for blank rice sample extracts spiked at 0.050 mg/L

a. without any cleanup; b. cleanup with C18 extraction column; c. cleanup with C18 extraction column and ultrafiltration membrane.

表 2 Gly 和 AMPA 在稻米样品中的线性关系、检出限 (LOD)、加标回收率和精密度 (RSD) ($n=3$)
Table 2 Linearities and limits of detection (LODs) for Gly and AMPA and their recoveries and relative standard deviations (RSDs) from rice samples at different spiked levels ($n=3$)

Analyte	Linear range/(mg/L)	Linear equation	r	LOD/(mg/kg)	Spiked/(mg/kg)	Recovery /%	RSD /%
Gly	0.001 -0.250	$y = -45.2256 + 1306.59x$	0.9995	0.010	0.100	103.5	6.2
					0.500	98.4	1.3
					2.500	99.8	9.1
AMPA	0.0025 -0.250	$y = -422.718 + 465.7x$	0.9995	0.020	0.100	107.3	2.7
					0.500	96.3	6.1
					2.500	99.8	4.4

y : peak area of quantitative ion; x : mass concentration of the analyte, mg/L.

在空白样品中添加 Gly 和 AMPA,按确定的方法测定,以 3 倍信噪比($S/N=3$) 确定方法的检出限 (LOD) ,结果如表 2 所示,Gly 和 AMPA 的 LOD 分别为 0.010 mg/kg 和 0.020 mg/kg。

2.6 方法的回收率和精密度

在稻米空白样品中分别添加 0.100、0.500 和 2.500 mg/kg 3 个水平的 Gly 和 AMPA,平均回收率和精密度($n=3$) 见表 2。结果表明,在 0.100 ~ 2.500 mg/kg 的加标水平范围内,Gly 的平均回收率为 98.4% ~ 103.5%,相对标准偏差 (RSD) 为 1.3% ~ 9.1%; AMPA 的平均回收率和 RSD 分别为

96.3% ~ 107.3% 和 2.7% ~ 6.1%。

2.7 实际样品测定

利用本文建立的方法对 20 份大米样品(粳米与籼米各 10 份) 进行测定,其中 3 份以添加标准样品的方式(0.100 mg/kg 的加标水平) 用于过程控制。结果表明,所测样品中均未有 Gly 和 AMPA 检出,且质量控制样品的测定结果稳定可靠,RSD 为 4.3% ~ 15.4%。加标样品和空白样品的谱图见图 3。从图 3 可以看出空白样品的背景没有干扰目标待测物的测定,不影响实际样品中 Gly 和 AMPA 的定性和定量分析。

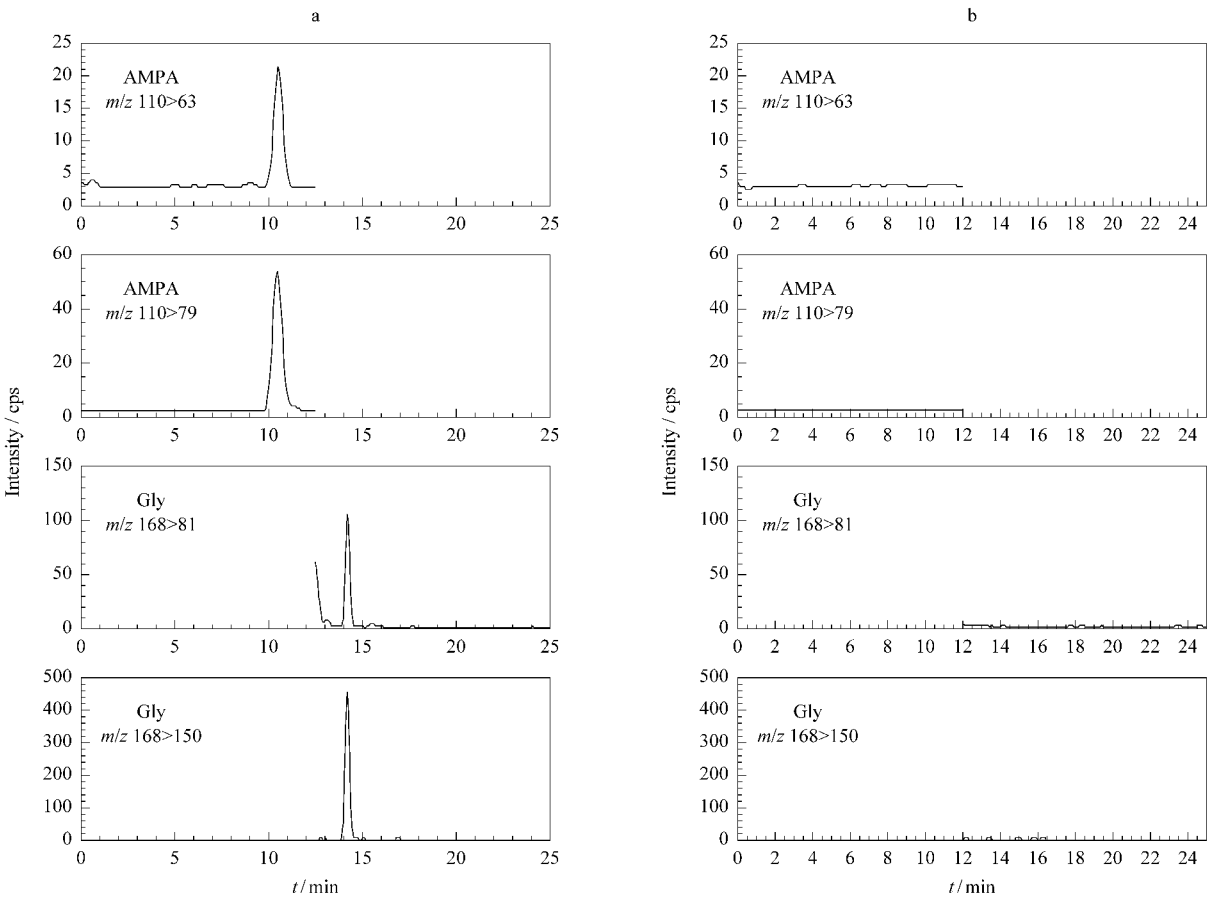


图 3 (a) 加标样品(0.100 mg/kg)和 (b) 空白样品的 LC-MS/MS 选择离子色谱图

Fig. 3 Selected ion chromatograms of (a) a sample spiked at 0.100 mg/kg and (b) a blank sample

3 结论

本文建立了采用亲水作用色谱-串联质谱测定稻米中草甘膦及其主要代谢物氨甲基磷酸残留量的检测方法。方法不经过衍生就可以使强极性的草甘膦和氨甲基磷酸在色谱柱上有较好的保留并获得较高的灵敏度;通过超滤膜去除了样品中可溶性淀粉、蛋白质等大分子化合物,在很大程度上消除了离子抑制作用。结果表明,Gly 和 AMPA 的方法检出限分别为 0.010 mg/kg 和 0.020 mg/kg,加标回收率为 96.3%~107.3%,精密度为 1.3%~9.1%,符合残留检测要求。方法无需衍生,净化步骤简单,适用于谷物等高淀粉、高蛋白质含量基质样品的测定。

参考文献:

- [1] Safarpour H, Asiaie R. Electrophoresis, 2005, 26(7/8): 1562
- [2] Goodwin L, Startin J R, Goodall D M. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(9): 963
- [3] Nonghua Shichang Shirixun (农化市场十日讯), 2011(10): 17
- [4] Gasnier C, Dumont C, Benachour N, et al. Toxicology, 2009, 262(3): 184
- [5] Rubin J L, Gaines C G, Jensen R A. Plant Physiol, 1982, 70(3): 833
- [6] Ge Z R. Limit Standards of Pesticide and Veterinary Drug Residues in Foods of the Main Trade Countries and Regions. Beijing: Chinese Standard Press (葛志荣. 主要贸易国家和地区食品中农兽药残留限量标准: 食品卷. 北京: 中国标准出版社), 2006
- [7] GB 2763-2005
- [8] Coutinho C F B, Coutinho L F M, Mazo L H, et al. Anal Chim Acta, 2007, 592(1): 30
- [9] Martins-Júnior H A, Lebre D T, Wang A Y, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23(7): 1029
- [10] Ma W M, Niu S, Li D Y, et al. Agrochemicals (马为民, 牛森, 李东运, 等. 农药), 2006, 45(4): 261
- [11] Hu J Y, Zhao D Y, Ning J, et al. Chinese Journal of Pesticide Science (胡继业, 赵殿英, 宁君, 等. 农药学报), 2007, 9(3): 285
- [12] Zhou Y M, Li N, Zhao Y B, et al. Food Science (周艳明, 李娜, 赵瑛博, 等. 食品科学), 2008, 29(9): 461
- [13] Corbera M, Hidalgo M, Salvadó V. Microchim Acta, 2006, 153(3/4): 203
- [14] Llasera M P G, Gómez-Almaraz L, Vera-Avila L E, et al. J Chromatogr A, 2005, 1093: 139
- [15] Cao Z Y, Mou R X, Chen M X. Chinese Journal of Chromatography (曹赵云, 牟仁祥, 陈铭学. 色谱), 2010, 28(8): 743
- [16] Li B, Deng X J, Guo D H, et al. Chinese Journal of Chromatography (李波, 邓晓军, 郭德华, 等. 色谱), 2007, 25(4): 486
- [17] Hanke I, Singer H, Hollender J. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(6): 2265
- [18] Jan M R, Shah J, Muhammad M, et al. J Hazard Mater, 2009, 169: 742
- [19] Sun Y J, Wang C Y, Wen Q Y, et al. Chromatographia, 2010, 72(7/8): 679
- [20] Granby K, Johannesen S, Vahl M. Food Addit Contam, 2003, 20(8): 692
- [21] Küsters M, Gerhartz M. J Separ Sci, 2010, 33(8): 1139