

## 柱前衍生化液相色谱-串联质谱法测定茶叶中草铵膦的残留量

林永辉\*, 刘正才, 杨 方, 邱元进, 刘素珍,  
苏芝娇, 张 琼, 薛芝敏, 方 宇

(福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350001)

摘要: 建立了茶叶中草铵膦残留检测的液相色谱-串联质谱分析方法。样品经水超声提取, C<sub>18</sub> 固相萃取小柱净化, 9-芴基氯甲酸酯 (FMOCl) 溶液在硼酸盐缓冲溶液下衍生 2 h 后, 用 Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 以乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 (含 0.2% (v/v) 甲酸) 作为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾负离子模式电离 (ESI<sup>-</sup>), 多反应监测 (MRM) 模式检测, 外标法定量。方法的线性范围为 2.5 ~ 50.0 μg/L, 相关系数  $r^2$  大于 0.999; 定量限为 0.10 mg/kg。在不同基质中, 草铵膦在 0.10、0.50、1.00 mg/kg 添加水平下的平均回收率为 61.6% ~ 81.4%, 相对标准偏差为 3.2% ~ 8.4%。该方法具有快速简便、灵敏度高、准确性强等特点, 适用于茶叶中草铵膦残留量的检测。

关键词: 柱前衍生; 液相色谱-串联质谱; 草铵膦; 茶叶

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)12-1260-05

## Determination of glufosinate residue in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with precolumn derivatization

LIN Yonghui\*, LIU Zhengcai, YANG Fang, QIU Yuanjin, LIU Suzhen,  
SU Zhijiao, ZHANG Qiong, XUE Zhimin, FANG Yu

(Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was established for the determination of glufosinate (GLUF) residue in tea. The GLUF was extracted with water for 30 min under ultrasonication, and cleaned-up using a C<sub>18</sub> solid phase extraction cartridge, then derived using fluorenylmethylchloroformate (FMOCl) in borate buffer for 2 h. The separation was performed on a Kinetex C<sub>18</sub> column with the mobile phases of acetonitrile and 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (containing 0.2% (v/v) formic acid) in a gradient elution mode. The identification and quantification of the GLUF were carried out by MS/MS in negative electrospray ionization (ESI<sup>-</sup>) and multiple reaction monitoring (MRM) mode, the quantification analysis was performed by external standard method. The calibration curve showed good linearity in the range of 2.5 - 50.0 μg/L with the correlation coefficient  $r^2 > 0.999$ . The limit of quantification (LOQ) was 0.10 mg/kg. The average recoveries of GLUF spiked at 0.10, 0.50 and 1.00 mg/kg levels in tea were between 61.6% and 81.4%, and the relative standard deviations (RSDs) were between 3.2% and 8.4%. The method is simple, rapid, sensitive, accurate and suitable for the confirmation and quantification of GLUF in tea.

Key words: precolumn derivatization; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); glufosinate; tea

草铵膦 (glufosinate, GLUF) 是赫斯特公司 (Hearst Corporation) 于上世纪 80 年代开发的新型灭生性除草剂, 是目前用量仅次于草甘膦的世界第二

大转基因作物耐受除草剂。草铵膦为广谱、触杀型、灭杀性除草剂, 采用杂草茎叶定向喷雾处理, 几乎可以用于各种宽行种植的果树、中耕作物、蔬菜和非耕

\* 通讯联系人: 林永辉, 硕士, 工程师. Tel: (0591) 87065541, E-mail: xmulyh@163.com.

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目 (2009IK143) 和福建检验检疫局科技计划项目 (FK2011-35)。

收稿日期: 2012-07-17

地<sup>[1,2]</sup>。尽管草铵膦属于非持久性农药,但其大量和任意的使用仍有可能在农作物上残留,从而对人、畜构成威胁<sup>[3,4]</sup>。我国食品安全国家标准 GB 28260-2011《食品中阿维菌素等 85 种农药最大残留限量》中规定茶叶中草铵膦的最大残留限量为 0.5 mg/kg<sup>[5]</sup>,但目前并无具体的检测标准。建立茶叶中草铵膦的检测方法将为检测茶叶品质及食品安全起到关键作用。

草铵膦的结构与草甘膦类似,含有膦酸基、羟基、氨基,为极强的两性化合物,难挥发,紫外光区无吸收,直接测定原药的灵敏度较差,需要采用衍生技术分析草铵膦残留<sup>[6]</sup>。气相色谱和气相色谱-质谱法虽然具有较高的灵敏度,但需要将草铵膦转化为可气化的物质,引入的试剂过多,过程相对繁琐<sup>[6-9]</sup>。采用液相色谱-质谱法(LC-MS)测定时常采用 9-芴基氯甲酸酯(FMOC-Cl)为衍生剂,其衍生介质与草铵膦的水提取溶液相容性较好,过程简单,具有良好的响应结果。目前应用 LC-MS 的检测对象主要为环境样品(水或土壤)和食品<sup>[6,10-13]</sup>。部分食品样品中草甘膦的检测方法采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),方法简单实用<sup>[14,15]</sup>。茶叶基体复杂,含有大量的色素、茶多酚和咖啡碱等,对衍生反应和雾化电离的抑制较为严重,国内外均无茶叶中草铵膦的检测方法。本文采用 C<sub>18</sub>固相萃取柱净化,柱前 FMOC-Cl 衍生,采用 LC-MS/MS 测定。该方法试剂用量少,过程简便,方法快速、灵敏。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与设备

API4000Q 三重四极杆质谱,配电喷雾离子源(ESI,美国 Applied Biosystems 公司),LC-20AT 液相色谱仪(日本岛津公司)。

### 1.2 试剂与材料

乙腈、甲醇、丙酮(色谱纯,德国 Merck 公司);硼酸钠(Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O,分析纯,汕头市光华化学厂);乙酸铵、FMOC-Cl(色谱纯,美国 Fluka 公司);实验室用水为 Milli-Q 去离子水;C<sub>18</sub>固相萃取小柱(500 mg,3 mL;美国安捷伦公司);草铵膦标准品(纯度≥97.5%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

### 1.3 溶液的配制

标准溶液:称取 1 mg(精确至 0.001 mg)草铵膦标准品,用水溶解并定容至 100 mL,配制 10.0 mg/L 的标准储备液,于 4 °C 下保存;使用时用水逐级稀释成所需要浓度的工作液。

硼酸钠溶液:称取适量的 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O,用

水溶解并定容至 100 mL,配制 30 g/L 的硼酸钠溶液。

FMOC-Cl 丙酮溶液:称取 1.00 g FMOC-Cl,用丙酮溶解并定容至 100 mL,配制 10.0 g/L FMOC-Cl 丙酮溶液。

### 1.4 样品提取和净化

称取约 200 g 茶叶,放入粉碎机均质,充分混匀。称取均质好的试样 1 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 具塞聚乙烯离心管中,加入 20.00 mL 水,充分振荡 1 min,超声提取 30 min,以 4 500 r/min 速率离心 5 min,上清液待净化。

取 5 mL 上清液以约 2~3 mL/min 的流速过 C<sub>18</sub>固相萃取小柱(事先用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化),弃去前 2 mL 流出液,收集后 3 mL 流出液,待衍生。

### 1.5 样品衍生

取 1.00 mL 待衍生液,加入 1.00 mL 30 g/L 硼酸钠溶液、1.00 mL FMOC-Cl 丙酮溶液,涡旋振荡 1 min,室温下衍生 2 h,于 4 500 r/min 速率离心 5 min,将上清液过 0.45 μm 有机相滤膜,滤液供 LC-MS/MS 检测。

### 1.6 LC-MS/MS 条件

#### 1.6.1 LC 条件

色谱柱:Kinetex C<sub>18</sub>柱(50 mm×2.1 mm,2.6 μm;Phenomenex 公司);流动相:A 为乙腈,B 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.2%(v/v)甲酸)。梯度洗脱程序:0~2 min 80% B;2~3 min 80% B~20% B;3~7 min 20% B;7~8 min 20% B~80% B;8~10 min 80% B。进样量:5 μL;柱温:30 °C;流速:0.4 mL/min。

#### 1.6.2 MS/MS 参数

电喷雾离子源,负离子模式扫描;喷雾电压(IS):5 500 V;离子源温度(TEM):500 °C;气帘气(curtain gas)压力:0.172 MPa;雾化气(gas 1)压力:344.5 kPa(50.00 psi);辅助气(gas 2)压力:344.5 kPa(50.00 psi);监测模式:多反应监测(MRM);特征离子对(对应的去簇电压、碰撞能):m/z 402>180(50 V,17 eV)、402>206(50 V,21 eV),其中 m/z 402>206 为定量离子对。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LC-MS/MS 条件的优化

取 1.00 mL 10.0 mg/L 的 GLUF 标准储备液,按 1.5 节方法衍生。蠕动泵流动注射方式进样进行母离子扫描,确定目标母离子。再对母离子施加一定的碰撞能量,使其产生特定的子离子。选取丰度

强且干扰较少的 2 对子离子,以 MRM 模式优化各质谱参数。

实验发现 GLUF 衍生物在正、负离子模式下均有响应,但负离子模式下的信号更强,且在茶叶样品中背景干扰更小。因此本方法选择负离子模式扫描。

GLUF 衍生后带上较大的芳香基团,其在 C<sub>18</sub> 色谱柱上有较好的保留行为,因此本实验选择 C<sub>18</sub> 反相色谱柱作为分离柱。本实验对比 Accucore C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm; Thermo 公司)、XDB C<sub>18</sub> 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm; Agilent 公司)、Luna C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 2.0 mm, 3 μm; Phenomenex 公司)和 Kinetex C<sub>18</sub> 柱(50 mm × 2.1 mm, 2.6 μm; Phenomenex 公司)发现,采用 Kinetex C<sub>18</sub> 柱分离的峰形尖锐、对称,分离度显著优于其他色谱柱,能将 GLUF 衍生物同干扰物质完全分离,适合茶叶基体中草铵膦残留的检测。图 1 和图 2 分别为 GLUF 标准溶液和加标样品的 MRM 色谱图。

实验选择水、5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.2% (v/v) 甲酸)和 0.5% 甲酸水溶液作流动相 B 进行色谱条件优化。结果表明,以水作流动相 B 时的质谱

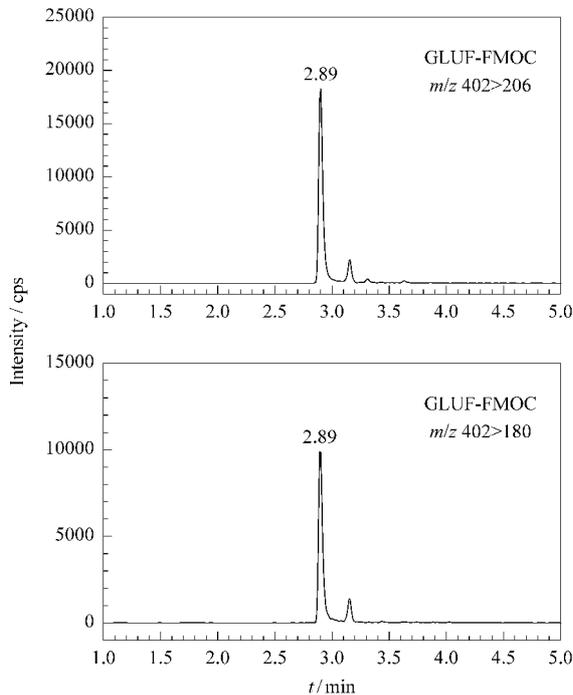


图 1 GLUF 标准溶液(2.5 μg/L)在 MRM 模式下的 LC-MS/MS 谱图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of GLUF standard solution (2.5 μg/L) in MRM mode

LC conditions: mobile phases, acetonitrile (A) and 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (containing 0.2% (v/v) formic acid) (B). Gradient elution: 0–2 min, 80% B; 2–3 min, 80% B–20% B; 3–7 min, 20% B; 7–8 min, 20% B–80% B; 8–10 min, 80% B.

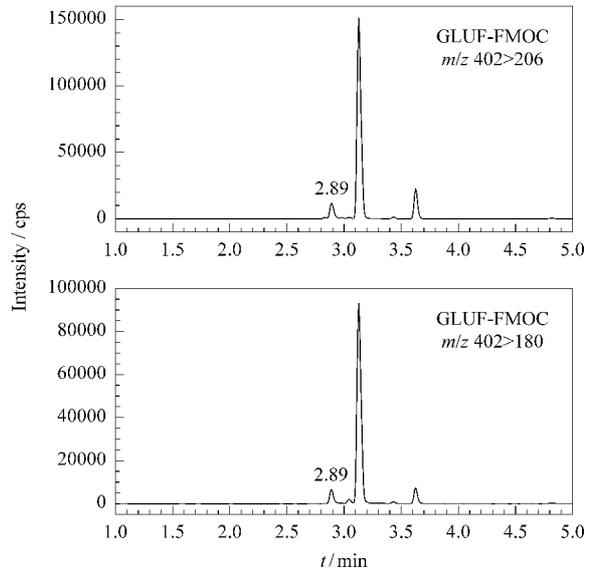


图 2 添加 GLUF 的空白红茶样品(0.50 mg/kg)在 MRM 模式下的 LC-MS/MS 谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of negative black tea spiked with GLUF at 0.50 mg/kg in MRM mode. LC conditions are the same as in Fig. 1.

信号较强,但色谱出峰过快,峰形略有拖尾;以 0.5% 甲酸水溶液作流动相 B 时的质谱信号较弱;以 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.2% (v/v) 甲酸)作流动相 B 时峰形对称,响应值较高(见图 1)。因此本文选用 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.2% (v/v) 甲酸)作为流动相 B。

### 2.2 提取、净化方式的选择

草铵膦具有较强的水溶性,因此常用极性溶剂提取,如用水、水-二氯甲烷、NaOH 溶液直接提取。试验发现,用 NaOH 溶液提取时有过多的杂质一同提取出来,影响后续的衍生效率;而在水中添加二氯甲烷溶液对提取效率没有帮助。本文通过试验对比回收率和净化效果,最终选择以水作为提取溶剂进行提取,方法简单易行,同时具有较好的回收率。

茶叶中含有大量的色素,由于草铵膦在 C<sub>18</sub> 柱上不保留,而 C<sub>18</sub> 柱对色素类物质有较强的吸附作用,因此本文采用 C<sub>18</sub> 柱除去色素类杂质。

### 2.3 衍生剂用量对衍生化效率的影响

考虑茶叶基体可能会对衍生过程带来影响,我们考察了标准溶液和添加草铵膦标准品的茶叶基质溶液中 FMOCl 浓度对衍生效率的影响。将草铵膦标准溶液分别用水和阴性茶叶待衍生液(阴性茶叶样品按 1.4 节方法处理后得到的待衍生液)稀释成 25 ng/L 的标准溶液和 25 ng/L(相当于样品 0.5 mg/kg)的基质标准溶液,再分别加入 1.00 mL 30 g/L 硼酸钠缓冲盐、1.00 mL 1.0 ~ 10.0 g/L 的

FMOCl-Cl 丙酮溶液, 室温下衍生 2 h, 然后进行 LC-MS/MS 测定, 结果见图 3。由图 3 可知, 当衍生剂的质量浓度大于 1.0 g/L 时, 标准溶液由于不含干扰物质, 其中的草铵膦衍生反应充分; 但衍生剂的质量浓度小于 5.0 g/L 时, 基体标准溶液中的草铵膦衍生并不充分。这是由于茶叶提取液中可能还含有其他胺类物质, 它们可能同 FMOCl-Cl 发生反应, 产生衍生化竞争, 从而抑制草铵膦的衍生化反应。因此分析茶叶时需要更高浓度的衍生剂。为了确保衍生剂量充足, 将衍生剂的质量浓度定为 10.0 g/L。

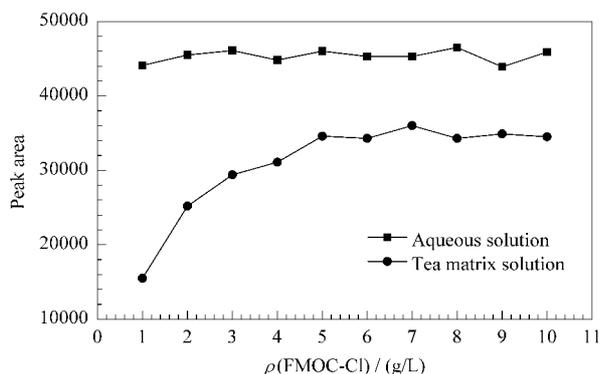


图 3 FMOCl-Cl 的浓度对 GLUF 衍生效率的影响  
Fig. 3 Influence of FMOCl-Cl concentration on the derivatization efficiency of GLUF

#### 2.4 硼酸钠缓冲液浓度对 GLUF 衍生效率的影响

取 10 份 25 ng/L 的标准溶液和基质溶液, 分别加入 1.00 mL 质量浓度在 10 ~ 100 g/L 范围的硼酸钠缓冲溶液, 再加入 1.00 mL 10.0 g/L 的 FMOCl-Cl 丙酮溶液, 室温下衍生 2 h, 然后进行 LC-MS/MS 测定, 结果见图 4。由图 4 可看出, 当硼酸钠缓冲液浓度高于 20 g/L 时, 其浓度对衍生过程均不产生影响。而过高浓度的盐溶液容易污染质谱离子源, 因此我们选择 30 g/L 硼酸钠缓冲溶液。

#### 2.5 衍生化反应时间对 GLUF 衍生效率的影响

分别取 25 ng/L 的标准溶液和基质溶液 1 mL,

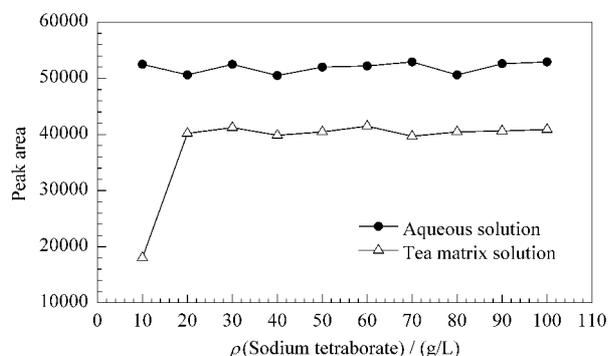


图 4 硼酸钠缓冲液浓度对 GLUF 衍生效率的影响  
Fig. 4 Influence of sodium tetraborate concentration on the derivatization efficiency of GLUF

加入 1.00 mL 30 g/L 硼酸钠溶液和 1.00 mL 10 g/L FMOCl-Cl 溶液, 衍生 30 min 后开始在不同时间点取样进行 LC-MS/MS 测定。由图 5 可见, 衍生 30 ~ 60 min 时, 草铵膦的衍生效率逐渐升高, 在 60 min 后衍生化反应趋于平衡。为了保证反应充分, 选择在室温下衍生反应时间为 2 h。

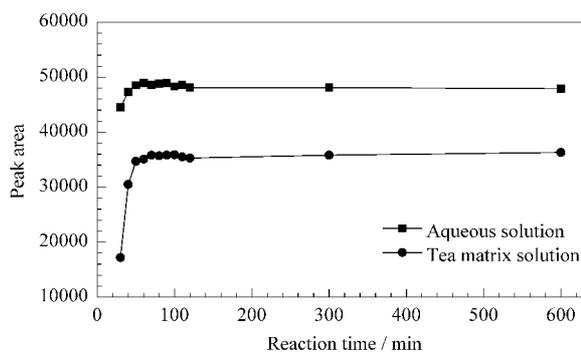


图 5 衍生化反应时间对 GLUF 衍生效率的影响  
Fig. 5 Influence of reaction time on the derivatization efficiency of GLUF

#### 2.6 基质效应

实验过程中发现, 无论怎样优化提取和衍生化条件, 基体都存在一定的干扰。在一般的质谱分析中, 基质抑制作用主要是基质在电离源雾化电离过程中对目标物的雾化电离产生抑制。但本方法中的茶叶基质是在衍生过程对目标物有衍生抑制作用。

将草铵膦标准溶液用水稀释至 0、2.5、5.00、10.0、20.0 和 50.0  $\mu\text{g/L}$ , 每一水平取 1.00 mL 溶液 3 份 (A、B、C), 分别按以下步骤衍生: A 中加入 1.00 mL 水、1.00 mL 硼酸钠溶液、1.00 mL FMOCl-Cl 溶液, 衍生 2 h; B 中加入 1.00 mL 硼酸钠溶液、1.00 mL FMOCl-Cl 溶液, 衍生 2 h 后加入 1.00 mL 阴性茶叶待衍生液; C 中加入 1.00 mL 阴性茶叶待衍生液, 混匀, 加入 1.00 mL 硼酸钠溶液、1.00 mL FMOCl-Cl 溶液, 衍生 2 h。对上述溶液进行 LC-MS/MS 测定, 分别得到 GLUF 标准曲线 A、基质曲线 B 和基质曲线 C (见表 1)。3 种曲线的线性相关系数均大于 0.999。由于基质曲线 B 中茶叶未参与 GLUF 的衍生过程, 因此对衍生过程不产生影响, 其基质抑制主要为电离源中的雾化电离抑制; 基质曲线 C 则包括衍生抑制和雾化电离抑制。基质效应 (matrix effect, ME) [16,17] 可以用  $ME = B/A \times 100\%$  计算, 式中 B 为基质曲线斜率, A 为标准曲线斜率。茶叶中草铵膦测定的基质效应如表 1 所示。

表 1 草铵膦标准溶液和基质标准溶液的线性方程、相关系数和基质效应 (ME)  
Table 1 Linear equations, correlation coefficients ( $r^2$ ) and matrix effects (ME) of GLUF standard solution and matrix-matched standard solutions

Sample	Linear equation	Linear range/( $\mu\text{g/L}$ )	$r^2$	ME/%
Standard solution (A)	$y = 21.15742 + 539.89881x$	2.5 - 50.0	0.99991	
Matrix-matched standard solution (B)	$y = 5.88957 + 501.00613x$	2.5 - 50.0	0.99997	92.79
Matrix-matched standard solution (C)	$y = -255.09202 + 462.17178x$	2.5 - 50.0	0.99966	85.60

$y$ : peak area;  $x$ : mass concentration,  $\mu\text{g/L}$ .

一般认为, 基质曲线响应值与其标准曲线响应值之比在 85% ~ 115% 之间不存在明显的基质效应, 据此判断本方法, 无论是衍生抑制还是电喷雾电离抑制均未对 GLUF-FMOC 产生显著的影响。

### 2.7 检出限、定量限、回收率和相对标准偏差

以信噪比 ( $S/N$ ) = 3 作检出限 (LOD), 茶叶中草铵膦的 LOD 为 0.03 mg/kg; 以  $S/N$  = 10 作定量限 (LOQ), 茶叶中草铵膦的 LOQ 为 0.10 mg/kg。

按照 1.4 节和 1.5 节的提取、净化、衍生步骤, 在阴性红茶、绿茶、乌龙茶、花茶中添加相当于 0.10、0.50、1.00 mg/kg 水平的草铵膦标准溶液进行添加回收试验, 每个水平的样品测定 8 次, 其平均回收率及相对标准偏差 (RSD) 见表 2。结果显示, 在 0.10, 0.50, 1.0 mg/kg 3 个添加水平下, 方法的平均回收率稳定在 61.6% ~ 81.4% 之间, RSD 为 3.2% ~ 8.4%, 说明方法准确度高, 稳定性好。

表 2 茶叶中草铵膦的平均添加回收率和相对标准偏差 ( $n=8$ )  
Table 2 Average recoveries and relative standard deviations (RSD) of GLUF spiked in tea ( $n=8$ )

Spiked concentration/ (mg/kg)	Black tea		Green tea		Oolong tea		Scented tea	
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
0.10	61.6	5.1	64.6	4.9	61.6	6.6	70.6	8.4
0.50	71.7	3.2	63.8	3.5	63.2	4.0	73.4	6.6
1.00	69.8	3.8	63.6	5.3	81.0	3.2	81.4	4.8

### 2.8 实际样品检测

用所建立的方法对实际样品进行检测, 测定红茶 54 份、绿茶 100 份、乌龙茶 222 份、普洱茶 4 份、白茶 24 份、花茶 119 份, 均未检出草铵膦残留。其原因可能是同类除草剂中, 草铵膦的价格较草甘膦高出数倍, 因此在国内茶叶种植中并未大量使用草铵膦。

### 3 结语

建立了柱前衍生液相色谱-串联质谱测定茶叶中草铵膦残留量的方法。结果表明, 本方法净化过程简单, 选择性好, 抗干扰能力强, 可作为茶叶中草铵膦残留的分析确证方法。

### 参考文献:

[1] Ahren W H. Herbicide Handbook. 7th ed. Champaign, IL: Weed Science Society of America, 1994  
 [2] Ni H W, Zhang H J, Yang F Y. Journal of Beijing Agricultural College (倪汉文, 张宏军, 杨逢玉. 北京农业学院学报), 2002, 17(4): 100  
 [3] Niu L Z, Gui W J, Zhu G N. Acta Agriculturae Zhejiangensis (牛立志, 桂文军, 朱国念. 浙江农业学报), 2010, 22(4): 485

[4] Schweinsberg F, Abke W, Rieth K, et al. Toxicol Lett, 1999, 107: 201  
 [5] GB 28260-2011  
 [6] Stalikas C D, Konidari C N. J Chromatogr A, 2001, 907: 1  
 [7] Tseng S H, Lo Y W, Chang P C, et al. J Agric Food Chem, 2004, 52: 4057  
 [8] Alain R, Sylvie B, Heinz S, et al. J Agric Food Chem, 2000, 48: 5184  
 [9] Royer A, Beguin S, Tabet J C, et al. Anal Chem, 2000, 72: 3826  
 [10] Coline D, Olivier D, Annette D V, et al. Anal Bioanal Chem, 2011, 399: 1725  
 [11] Qian K, He S, Tang T, et al. Food Chem, 2011, 127: 722  
 [12] Guo Z X, Cai Q T, Yang Z G. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 1606  
 [13] Liu Z Z, Li L, Wang J, et al. Environmental Monitoring in China (刘铮铮, 李立, 王静, 等. 中国环境检测), 2009, 25(5): 35  
 [14] Jiang Y, Cao Z Y, Jia R L, et al. Chinese Journal of Chromatography (江燕, 曹赵云, 贾瑞琳, 等. 色谱), 2012, 30(1): 39  
 [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] Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. Anal Chem, 2003, 75: 3019  
 [17] Qi M L. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (齐美玲. 药物分析杂志), 2005, 25(4): 476