

茶叶中草甘膦和氨甲基膦酸残留量的测定 (Copure® 草甘膦专用柱)

草甘膦 (GLY) 是一种高效、低毒、廉价的内吸传导型广谱灭生性除草剂, 被广泛施用于茶园等农业生产中。随着草甘膦的广泛使用, 其在茶叶、水果等植物源食品中残留量的检测越来越受到关注。草甘膦及其代谢物氨甲基膦酸具有极性、易溶于、难溶于各种有机溶剂, 这给常规检测带来了极大的困难和挑战。

逗点生物在 2021 年推出过检测茶叶中 Copure® 草甘膦的专用柱 (货号: COGLY3000) 及其应用方案。然而, 客户在方法开发时依然遇到了很多问题, 如方法很难重现, 峰形不好, 质谱找不到母离子等, 鉴于此我司对该法进行了完善, 详细考察了其前处理条件, 并用优化后的方法对红茶、绿茶、青茶进行了样品处理, 都能够获得满意的实验结果。本文把完善后的方案及优化过程一并呈现给大家, 供大家参考。

一、样品提取

准确称取经粉碎的茶叶 1.0 g 于 50 mL 离心管中, 加入浓度为 10 µg/mL 草甘膦内标 100 µL, 再加入 10 mL 水, 涡旋混匀 15 min, 超声提取 15 min, 以 10000 r/min 离心 5 min, 待净化。

二、样品净化 (Copure® 草甘膦专用柱)

移取 5 mL 上清液至 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 二氯甲烷, 涡旋混匀 5 min, 以 10000 r/min 离心 5 min, 取 2.5 mL 上清液过固相萃取柱 (使用前用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化), 弃掉前端几滴液体, 再收集后续流出液, 待衍生。

三、衍生

取 1.0 mL 上述的净化液, 加入 0.2 mL 50 g/L 硼酸钠缓冲液, 涡旋混匀, 再加入 0.2 mL 10 g/L FMOC-Cl 丙酮衍生液, 涡旋混匀后置于 45 °C 下衍生 2 h, 以 10000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 µm 滤膜, 上机测试。

四、标曲配制

吸取一定量的混合标准溶液和同位素内标溶液, 用水稀释定容至 1.0 mL, 使每毫升混合标准工作液含有同位素内标 100 ng/mL。加入 50 g/L 硼酸钠缓冲液 0.2 mL, 混匀, 再加入 10 g/L FMOC-Cl 溶液 0.2 mL, 涡旋混匀后同样品置于 45 °C 下衍生 2 h, 配制上机浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL。

五、仪器条件 (Thermo Fisher TSQ Endura)

液相部分:

色谱柱: Commaill® BEH T-C18(2.1 mm×100 mm, 3 µm)

流动相: A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液

B: 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 30°C

进样量: 5 µL

洗脱程序: 梯度洗脱表 1

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.0	95	5
4.0	70	30
6.0	70	30
6.1	5	95
6.6	5	95
7.1	95	5
7.4	95	5

质谱条件:

离子源: HESI

电喷雾电压: 3500 V

鞘气压力: 40 arb

辅气压力: 10 arb

离子传输管: 260 °C

辅气温度: 350 °C

表 2 组分名称、保留时间及特征离子一览表 (* 为定量离子)

名称	母离子	子离子
草甘膦-FMOC-Cl	392	213.9, 179.0*
氨甲基膦酸-FMOC-Cl	334	156.0, 179.1*
1,2-C13N15 草甘膦-FMOC-Cl	395	91.2

六、实验结果

5.1 测试数据

表 3 加标回收率结果

名称	0.10 mg/kg				0.50 mg/kg				1.0 mg/kg			
	草甘膦		氨甲基膦酸		草甘膦		氨甲基膦酸		草甘膦		氨甲基膦酸	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
龙井茶	78.6	8.1	74.5	7.2	80.3	5.3	78.6	5.7	89.7	4.9	87.6	4.6
铁观音	87.1	5.2	82.5	5.6	94.2	4.0	97.6	4.2	92.2	2.1	91.1	2.8
金骏眉	82.7	6.3	80.9	5.9	95.6	4.4	90.4	4.8	100.3	3.2	95.7	3.5
翠竹	76.4	7.1	75.1	7.5	81.2	5.1	79.8	5.6	88.2	5.0	85.6	4.7

5.2 测试色谱图

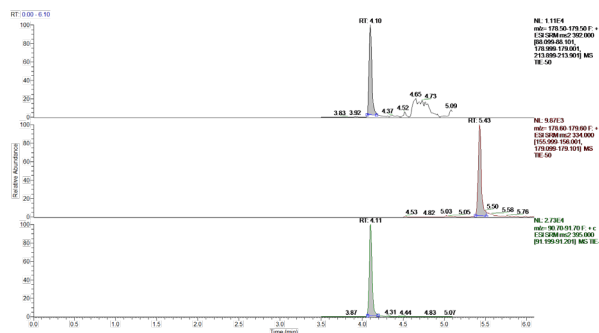


图 1 添加水平为 0.50 mg/kg 的铁观音总离子流图

七、实验过程分析

6.1 衍生剂浓度

如图 2 所示, 考察衍生剂浓度分别为 1g/L、5g/L、6g/L、8g/L、10g/L 和 20g/L, 添加量为 0.2 mL 时标液中目标物

的峰面积变化,从图中可以看出衍生剂加入量 $\geq 6\text{g/L}$ 时,目标物峰面积无明显变化。考虑到样本中的基质会消耗一定量的衍生剂,建议适当增大衍生剂的浓度,方案中衍生剂的浓度为 10g/L 。

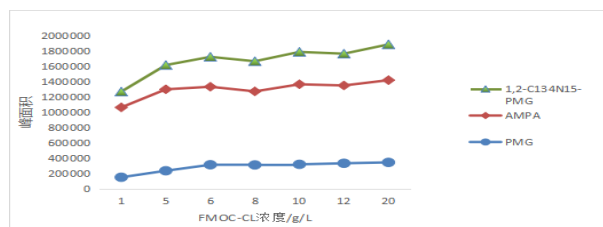


图2 衍生剂浓度对目标物的影响

6.2 衍生时间

考察不同衍生时间,0.5~4小时(衍生温度 40°C)及12小时(室温过夜 20°C)。结果如图3所示,草甘膦和氨甲基磷酸在衍生时间 ≥ 2 小时,目标物峰面积无明显变化,室温过夜有利于衍生完成。综合考虑时效性,方案中衍生时长为2小时。

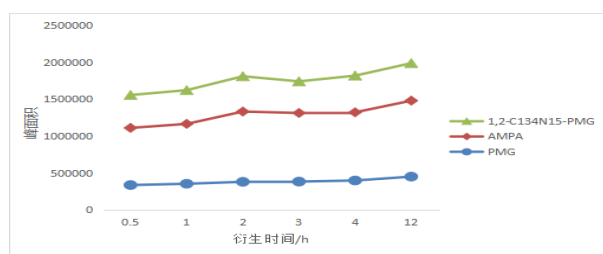


图3 衍生时间对目标物的影响

6.3 衍生温度

考察不同温度对衍生的影响,衍生温度大于 35°C 时,草甘膦和氨甲基磷酸以及内标的峰面积无太大差异,方案中选择 45°C 为衍生温度。

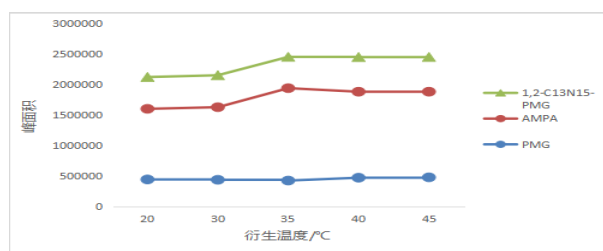


图4 衍生温度对目标物的影响

6.4 硼酸钠浓度

如图5,不同浓度硼酸钠缓冲溶液对草甘膦和氨甲基磷酸以及内标的衍生影响较小, 50g/L 硼酸钠缓冲溶液已经能获得较为理想的衍生效果,而浓度高的硼酸钠溶液会污染质谱,方案采用 50g/L 的硼酸钠。

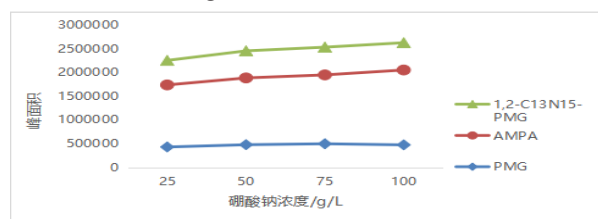


图5 硼酸钠浓度对目标物的影响

6.5 衍生剂存储时间

考察不同存储时间的FMOC-Cl对目标物的影响,实验结果如图6所示。FMOC-Cl存储时间对于草甘膦及其内标影响较小,但对氨甲基磷酸有显著影响,储存时间越长峰面积越小。

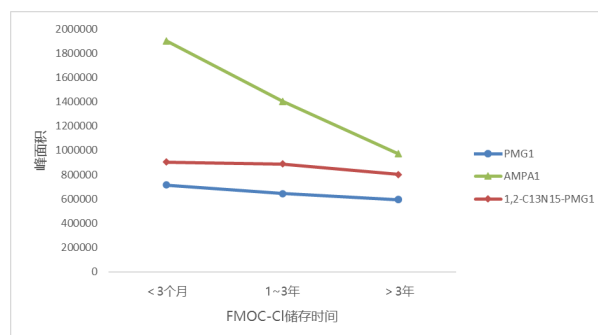


图6 衍生剂存储时间对目标物的影响

说明:

- 不同类型的茶叶所含干扰基质不一样,实际处理时可对方法进行适当调整,如对颜色深的提取液可多次加入二氯甲烷净化,且在衍生时提高衍生剂的浓度。
- 前处理中可加入微量饱和醋酸铅溶液(如 $20\mu\text{L}$),用于沉淀酚类干扰物,此时可获得较为澄清的上机溶液。值得注意的是,醋酸铅的加入会导致氨甲基磷酸响应变低,但不会影响草甘膦的响应,可综合考虑选择性使用。
- 仪器条件优化,草甘膦和氨甲基磷酸受基质抑制影响严重,灵敏度低的仪器在优化时很难找到相应的母离子,此时,可直接参考文献或者标准输入同类型仪器的参数。

订购信息

货号	描述	包装
COGLY3000	Copure® 草甘膦专用柱	50支/盒
SDC-3000-D	biocomma® 多管涡旋混匀仪	1台/箱
SF130-22-PES	水系针式过滤器,直径13mm,孔径 $0.22\mu\text{m}$,有机系	100个/盒
SC2-1	2mL蓝色聚丙烯盖,白色PTFE/红色硅胶垫,9-425	100个/盒
V2-AL	2mL螺纹棕色样品瓶,带书写处 $11.6^{\circ}32\text{mm}$,9-425	100个/盒