

毛静春, 罗发美, 周琴, 等. 固相萃取结合液相色谱串联质谱法测定生咖啡中草甘膦和氨基膦酸残留[J]. 山西农业科学, 2025, 53(1): 151-159.

MAO J C, LUO F M, ZHOU Q, et al. Determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid residues in green coffee by solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(1): 151-159.

doi:10.3969/j.issn.1002-2481.2025.01.17

固相萃取结合液相色谱串联质谱法测定 生咖啡中草甘膦和氨基膦酸残留

毛静春¹, 罗发美¹, 周琴¹, 祁正有², 曾侶斌², 朱臆霖¹, 王丽芳¹, 程龙³

(1. 普洱市质量技术监督综合检测中心, 云南 普洱 665000; 2. 思茅海关综合技术服务中心, 云南 普洱 665000;

3. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司, 上海 200335)

摘要: 为了给咖啡种植过程中草甘膦农药使用提供指导, 需建立一种分析生咖啡中草甘膦和氨基膦酸残留的检测方法。生咖啡粉末样品室温下经水超声提取, 二氯甲烷萃取部分脂溶性组分, 上清液用PCX固相萃取小柱净化, 净化液与氯甲酸-9-芴基甲酯发生衍生化反应, 液相色谱-串联质谱仪在正离子模式下扫描分析草甘膦和氨基膦酸衍生产物, 内标法定量。采用固相萃取结合液相色谱串联质谱法检测生咖啡中草甘膦和氨基膦酸残留, 结果表明, 草甘膦和氨基膦酸在2~100 ng/mL呈良好线性关系, 在0.05、0.10、0.20 mg/kg的加标水平下, 平均回收率为81.8%~97.5%, 相对标准偏差均小于9.1%, 草甘膦和氨基膦酸的定量限均为0.04 mg/kg。采用此方法参加FAPAS(19377)能力验证, Z值为-0.4, 结果满意。综上, 该方法具有良好的线性关系, 准确度和精密度均满足定量分析的要求, 适用于生咖啡中草甘膦和氨基膦酸残留的定量分析。

关键词: 生咖啡; 固相萃取; 草甘膦; 氨基膦酸; 液相色谱串联质谱

中图分类号: S571.2; S481+.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2025)01-0151-09

Determination of Glyphosate and Aminomethyl Phosphonic Acid Residues in Green Coffee by Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

MAO Jingchun¹, LUO Famei¹, ZHOU Qin¹, QI Zhengyou², ZENG Lübin²,
ZHU Yilin¹, WANG Lifang¹, CHENG Long³

(1. Pu'er Comprehensive Technical Testing Center, Pu'er 665000, China; 2. Simao Customs Comprehensive Technology Service Center, Pu'er 665000, China; 3. SCIEX Analytical Instrument Trading Co., Ltd, Shanghai 200335, China)

Abstract: In order to provide guidance for the use of glyphosate pesticides in coffee cultivation, it is necessary to establish a detection method for analyzing glyphosate and aminomethyl phosphonic acid residues in green coffee. The green coffee powder was extracted by ultrasonic with water at room temperature, lipid-soluble components in the extracts were extracted with dichloromethane, and the supernatant were purified by PCX solid phase extraction. Derivatization reaction was happened between purified solution and 9-fluorenylmethyl chloroformate. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used for analyzing derivative products of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid at positive ion mode, and quantified by internal standard. The results of determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid residues in green coffee by solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry showed that a good linear relationship was observed between glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in the range of 2~100 ng/mL, and the average recoveries ranged from 81.8%

收稿日期: 2024-03-20

基金项目: 云南省市场监督管理局科技计划(2022YSJK14, 2023YSJK09); 普洱市“茶城英才支持计划”质量基础高层次创新团队

作者简介: 毛静春, 工程师, 硕士, 主要从事植物源性食品中农药残留检测工作, E-mail: 1028526736@qq.com

通信作者: 罗发美, 高级工程师, 硕士, 主要从事食品质量与安全研究工作, E-mail: 332551921@qq.com

to 97.5% at the spiked levels of 0.05, 0.10 and 0.20 mg/kg with the relative standard deviations of less than 9.1%, and the limits of quantification(LOQ) of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid were 0.04 mg/kg. The method was applied to FAPAS(19377) proficiency testing with satisfactory results which Z score was-0.4. This method had good linear relations, accuracy and precision met the requirement of quantitative analysis, it was suitable for quantitative analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid residues in green coffee.

Keywords: green coffee; solid phase extraction; glyphosate; aminomethyl phosphonic acid; liquid chromatography tandem mass spectrometry

草甘膦(Glyphosate)又名草干灵、芽草膦、草克灵、春多多和甘氨膦,是一种内吸传导性广谱除草剂^[1-2]。草甘膦除草的机制是:将其喷洒在植物叶面后传导至根部,通过抑制 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸盐合成酶的活性,干扰芳香族氨基酸的合成,进而影响植物代谢,导致其根部腐烂枯死^[3-4]。草甘膦 1971 年由美国孟山都公司研制成功,于 1974 年引入市场,因其广谱、高效、低毒等特点,被广泛应用于农业、林业、草地和非农业区域除草^[5-6],其在国际除草剂市场上的销量呈逐年增长趋势^[7],成为全球使用量最大的除草剂品种。随着草甘膦的广泛持续应用,国内外相关研究数据表明,草甘膦及其主要代谢产物氨甲基膦酸在土壤、食物和水生态环境中存在一定的残留^[8-10],残留的除草剂通过食物链进入动物和人体,当生物体内草甘膦和氨甲基膦酸蓄积到一定量后,可能会导致肝脏系统^[11-12]、生殖系统^[13-14]和神经系统^[15]等器官病变,威胁生命健康。尽管多个研究表明,草甘膦不具有致癌性,但因长期大量使用导致草甘膦及其主要代谢产物氨甲基膦酸在生物体内的蓄积,对机体仍然存在一定的安全风险。各国对草甘膦在食品及环境中的残留要求也日趋严格。草甘膦及其代谢物氨甲基膦酸在食品和环境中的蓄积水平是其健康风险评价的基础,因此,如何准确检测草甘膦及其代谢物氨甲基膦酸残留量具有重要意义。

咖啡作为一种热带经济作物,因其独特的风味备受消费者青睐,其消费需求被不断释放。据统计,2023 年全国咖啡种植面积 7.8 万 hm^2 ,总产量 14.8 万 t,占全球总产量的 1.4%,居全球咖啡生产国第 13 位。其中,云南种植总面积高达 7.64 万 hm^2 ,占全国的 98.0%;总产量 14.6 万 t,占全国的 98.7%,咖啡成为云南省重要的经济作物。咖啡种植过程离不开除草剂,草甘膦作为低毒、高效、广谱的除草剂成为咖啡种植的首选,咖啡豆中草甘膦及其主要代谢物氨甲基膦酸残留也成了消费者重点关注的指标之一。我国食品安全国家标准《GB 2763—

2021 食品中农药最大残留限量》中对咖啡豆中草甘膦的残留没有限量要求,但欧盟和日本均对咖啡豆中草甘膦的残留限量有明确的规定,最大残留限量分别为 0.1 mg/kg^[16]和 1.0 mg/kg^[17],严格的残留限量也成为咖啡出口的绿色贸易壁垒,对于咖啡出口贸易产生重大影响。目前,对食品和环境中的草甘膦和氨甲基膦酸残留的检测方法主要有分光光度法^[18]、液相色谱法^[19]、气相色谱串联质谱法^[20]、液相色谱串联质谱法^[21]和离子色谱质谱法^[22]等,根据分析检测仪器的差异分为衍生化法和非衍生化法,同时根据分析基质的复杂程度,选择不同的前处理及分析仪器进行检测。《GB/T 23750—2009 植物性产品中草甘膦残留量的测定 气相色谱-质谱法》、《NY/T 1096—2006 食品中草甘膦残留量测定》、《SN/T 4655—2016 出口食品中草甘膦及其代谢物残留量的测定方法 液相色谱-质谱/质谱法》和《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》标准对水果、蔬菜、谷物等食品中草甘膦和氨甲基膦酸的残留检测提供了方法依据,但未提供对咖啡豆中草甘膦及氨甲基膦酸的检测方法,国内外相关文献也鲜有报道。

本研究建立固相萃取结合液相色谱串联质谱法,测定生咖啡中草甘膦和氨甲基膦酸的残留,以期对咖啡种植过程中草甘膦农药使用指导和咖啡质量安全保障提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

空白基质生咖啡粉末为有机咖啡豆经粉碎研磨后备用。FAPAS(19377)草甘膦能力验证生咖啡粉末来自英国 FAPAS 分析实验室;25 个待测样品为随机从普洱市市场上购买,均为阿拉比卡生咖啡豆。

1.2 试剂与仪器设备

草甘膦标准品(CAS 号:1071-83-6,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、

氨甲基膦酸标准品(CAS号:1066-51-9,浓度100 $\mu\text{g/mL}$)、草甘膦-13C₂,15N(CAS号:1185107-63-4,100 $\mu\text{g/mL}$),标准品均购自天津阿尔塔科技有限公司;乙腈、甲醇均为色谱纯,购自美国J.T. Baker公司;甲酸(纯度88%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;二氯甲烷(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;十水合四硼酸钠(分析纯)购自西陇化工股份有限公司;氯甲酸-9-苄基甲酯(色谱纯)购自美国Sigma-Aldrich公司;乙酸铵(色谱纯)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱(500 mg/12 mL)购自日本岛津公司;Cleanert PCX 固相萃取柱(500 mg/6 mL)购自天津博纳艾杰尔科技有限公司;Oasis HLB 固相萃取小柱(500 mg/6 mL)购自美国沃特世 Waters 公司;Cleanert PEP 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱(500 mg/6 mL)购自天津博纳艾杰尔科技有限公司;C18 固相萃取柱(1 g/6 mL)购自天津博纳艾杰尔科技有限公司;0.22 μm 聚醚砜(FES)膜针头过滤器购自天津腾实验设备有限公司;聚丙烯样品瓶(2 mL)购自美国安捷伦科技有限公司。

AB SCIEX Triple Quad 3500 三重四级杆液质联用仪(AB SCIEX 公司);AL204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);3K15 台式高速冷冻离心机(美国 Sigma-Aldrich 公司);AS-3120B 超声波清洗仪(天津兴特赛恩斯仪器有限公司);PV-1 涡旋混合器(英国 Grant 公司);MILLI-Q Advantage A10 超纯水仪(美国 Milli-Q[®]实验室)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液配制

1.3.1.1 标准储备液配制 分别准确移取 1 mL 100 $\mu\text{g/mL}$ 的草甘膦、氨甲基膦酸和草甘膦-13C₂,15N 至 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,分别配制成质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的单标储备液。

1.3.1.2 混合标准中间液的配制 分别准确移取 1 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的草甘膦和氨甲基膦酸至 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的草甘膦、氨甲基膦酸混合标准中间液。

1.3.1.3 标准工作曲线的配制 分别移取 2、5、10、20、50 和 100 μL 混合标准中间液至 2 mL 聚丙烯离心管中,各离心管中均加入 20 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的

草甘膦-13C₂,15N,各管再分别加入 978、975、970、960、930、880 μL 超纯水混匀,得到质量浓度为 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准工作曲线系列溶液。标准工作曲线中加入 200 μL 5% 十水合四硼酸钠缓冲溶液,充分混匀,再分别加入 300 μL 1 g/L 的氯甲酸-9-苄基甲酯乙腈溶液,混匀。室温下与待测样同时进行衍生化反应,衍生化反应结束后,将衍生化后的溶液过 0.22 μm 聚醚砜(FES)膜针头过滤器于聚乙烯样品瓶中,待液相色谱串联质谱仪测定。

1.3.2 样品前处理 准确称取 1 g 生咖啡粉末(精确至 0.000 1 g)置于 50 mL 塑料离心管中,加入 200 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 草甘膦-13C₂,15N 溶液,准确加入 10 mL 超纯水,于混匀器上涡旋混匀 1 min;再加入 10 mL 二氯甲烷,涡旋混匀 1 min,将离心管置于超声波清洗仪中在常温下超声 30 min;于 4 000 r/min 离心 2 min,取 2 mL 上清液至固相萃取小柱(固相萃取小柱使用前需活化,依次采用 5 mL 甲醇和 5 mL 水流经小柱活化)中,弃去流出液,待小柱中液面干涸,再移取 2 mL 提取上清液至固相萃取小柱中,收集流出的净化液于 15 mL 聚乙烯离心管中(可加压促进净化液流出,流速不超过 1 mL/min)。混匀收集的净化液,准确移取 1 mL 净化液至 2 mL 离心管中,加入 200 μL 5% 十水合四硼酸钠缓冲溶液,充分混匀,再加入 300 μL 1 g/L 的氯甲酸-9-苄基甲酯乙腈溶液,混匀。室温下与标准曲线同时进行衍生化反应,衍生化反应结束后,将衍生化后的溶液过 0.22 μm 聚醚砜(FES)膜针头过滤器于聚乙烯样品瓶中,待液相色谱串联质谱仪分析。

1.3.3 色谱-质谱条件 色谱柱:Shim-pack GISS-HP C18(Metal free column)(100 mm $\times$ 2.1 mm,3.0 μm);流动相:5 mmol/L 乙酸铵水溶液(A相)-乙腈(B相)溶液;流速 0.3 mL/min;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。梯度洗脱程序:0~6 min,8%~35%B;6.00~7.01 min,35%~95%B;7.01~9.00 min,95%B;9.00~9.01 min,95%~8%B;9.01~15 min,8%B。质谱条件:质谱离子源电喷雾离子源(ESI),扫描方式为正离子扫描,检测模式为多反应监测,雾化气压力 60 psi,加热气压力 70 psi,气帘气压力 25 psi,离子源温度 600 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压 5 500 V。定量方式采用内标法。草甘膦和氨甲基膦酸质谱分析参数见表 1。

表 1 LC-MS/MS 分析参数

Tab.1 The analysis parameters of LC-MS/MS

化合物 Compound	保留时间/min Retention time	定量离子(m/z) Quantitative ion	定性离子(m/z) Qualitative ion	碰撞电压/eV Collision voltage	去簇电压/V Declustering voltage
草甘膦 Glyphosate	7.20	391.9>88.0	391.9>179.2	22,22	69
氨甲基膦酸 Aminomethyl phosphonic acid	7.90	334.0>179.0	334.0>112.0	28,30	60
草甘膦-13C2,15N Glyphosate-13C2,15N	7.20	395.0>91.0		32	70

1.3.4 试剂空白条件下净化小柱对目标分析物吸附能力考查试验 于 50 mL 塑料离心管中加入 0.5 mL 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准中间液和 0.2 mL 的 10 $\mu\text{g/mL}$ 内标标准溶液,以此为试剂空白样品,分别以 SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱、Cleanert PCX 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取小柱、Cleanert PEP 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱和 C18 固相萃取柱为净化小柱,按 1.3.2 步骤处理试剂空白样品并测定,外标法定量,计算草甘膦氨甲基膦酸和草甘膦-13C2,15N 的回收率,考察净化方法在纯试剂背景条件下目标分析物及内标物在处理全过程的损失。

1.3.5 衍生温度对衍生化反应的影响 采用 1.3.2 步骤对草甘膦空白基质样进行净化,于净化液中分别加入 0.05 mL 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准中间液和 0.02 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 草甘膦-13C2,15N 标准溶液,混匀后依次加入 0.2 mL 硼砂缓冲溶液和 0.3 mL 氯甲酸-9-芴基甲酯乙腈溶液,分别在 10、20、30、40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下衍生 1 h,衍生化反应结束后测定草甘膦、氨甲基膦酸和草甘膦同位素内标的峰面积,考察衍生温度对该衍生反应的影响。

1.3.6 衍生时间对衍生化反应的影响 在衍生温度优选的基础上,采用 1.3.2 步骤对草甘膦空白基质样进行净化,于净化液中分别加入 0.05 mL 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准中间液和 0.02 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 草甘膦-13C2,15N 标准溶液,混匀后依次加入 0.2 mL 硼砂缓冲溶液和 0.3 mL 氯甲酸-9-芴基甲酯乙腈溶液,在已优化的衍生温度条件下衍生时间分别设置为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、12.0 h,衍生化反应结束后测定草甘膦氨甲基膦酸和草甘膦-13C2,15N 的峰面积,考察衍生时间对该衍生化反应的影响。

1.3.7 不同固相萃取小柱净化效果比对试验 于空白基质样品中加入 0.5 mL 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准中

间液和 0.2 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 内标标准溶液,采用 1.3.2 步骤对加标样进行净化,分别以 SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱、Cleanert PCX 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取小柱、Cleanert PEP 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱和 C18 固相萃取柱为净化小柱,测定其峰面积,与相同浓度的纯标品对比,同时考察 5 种净化小柱对实际样品的净化效果及基质效应,基质效应以基质因子量化。

基质因子=基质标品衍生峰面积/溶剂纯标品衍生峰面积 (1)

1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次,数据为 3 次试验结果的平均值。使用 Origin Pro 2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 试剂空白条件下净化小柱对目标分析物吸附能力考查

以 SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱、Cleanert PCX 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取小柱、Cleanert PEP 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱和 C18 固相萃取柱为净化小柱,考查各净化小柱对目标分析物的吸附能力,同时评估净化方法在纯试剂背景条件下目标分析物及内标物在处理全过程的损失,回收率及相对标准偏差数据见表 2。

由表 2 可知,草甘膦、氨甲基膦酸和草甘膦同位素内标回收率在 84.2%~106.6%,平行测定相对标准偏差均小于 8.5%,表明在空白试剂背景条件下,无同位素内标校正回收率,草甘膦、氨甲基膦酸和草甘膦同位素内标 3 种物质在净化过程中的损失满足定量分析的要求,SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱、Cleanert PCX 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取小柱、Cleanert PEP 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱和 C18 固相萃取柱 5 种净化小柱在净化过程中对目标分析物的吸附

均较弱,均可作为草甘膦和氨甲基膦酸分析净化和氨甲基膦酸前处理方法。
小柱备选,可用于进一步优化咖啡基质中草甘膦

表2 试剂空白条件下回收率和精度数据

Tab.2 The date of recovery and precision in the reagent blank

固相萃取小柱 Solid phase extraction(SPE)	草甘膦 Glyphosate		氨甲基膦酸 Aminomethyl phosphonic acid		草甘膦-13C2,15N Glyphosate-13C2,15N	
	平均回 收率/%	相对标准 偏差	平均回收率/%	相对标准 偏差	平均回 收率/%	相对标准 偏差
	Mean recovery	RSD	Mean recovery	RSD	Mean recovery	RSD
SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱 SHIMSEN Styra MCX SPE	105.0	4.6	98.4	3.7	102.1	8.2
Oasis HLB 固相萃取柱 Oasis HLB SPE	84.2	6.8	96.6	5.1	82.3	5.8
Cleanert PEP 固相萃取柱 Cleanert PEP SPE	97.2	2.7	106.6	8.5	95.5	2.5
C18 固相萃取柱 C18 SPE	86.4	5.7	90.8	7.3	84.7	7.3
Cleanert PCX 固相萃取柱 Cleanert PCX SPE	104.8	3.8	98.6	2.8	104.1	2.9

2.2 样品空白基质条件下方法优化试验

2.2.1 衍生温度试验 从图1可以看出,衍生温度在10~20℃随着衍生温度的升高,氨甲基膦酸和草甘膦-13C2,15N衍生产物含量增加,草甘膦衍生产物含量变化不大;衍生化反应在0~20℃,随着温度的变化氨甲基膦酸、草甘膦和草甘膦-13C2,15N衍生产物量变化不大;衍生温度超过40℃后,3种衍生产物量均随着衍生温度的升高而缓慢降低;当衍生温度超过70℃时,衍生温度升高,衍生产物急剧降低,数据表明该反应受温度的影响较明显。该衍生化反应为氯甲酸-9-苄基甲酯与二级胺的酰化反应,反应为放热可逆反应,在20℃内衍生温度的升高有利于分子的热运动,促进衍生化反应的进行,因此,在10~20℃随着温度的升高衍生产物含量增加;当温度超过40℃时,升高温度不利于放热反应的进行,致使温度的升高衍生产物含量降低。因此,为确保衍生产物的彻底进行,提供一定的温度,促进反应物分子热运动接触,加速反应进行,减少衍生化时间。故选择40℃为衍生化反应温度。

2.2.2 衍生时间试验 从图2可以看出,在40℃的衍生条件下,衍生化反应发生1h后,随着衍生时间的延长氨甲基膦酸、草甘膦和草甘膦-13C2,15N衍生产物峰面积趋于稳定,分析其原因可能是由于酰化反应具有较快的反应速率,在较短的时间内就能达到可逆反应的动态平衡,衍生产物含量不再增加,峰面积趋于稳定,因此,试验确定衍生化反应时间为1h。

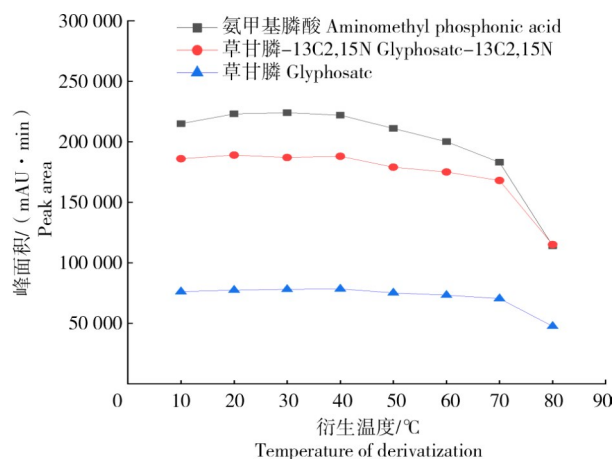


图1 衍生温度对衍生化反应的影响

Fig.1 Effect of temperature of derivatization on the derivatization reaction

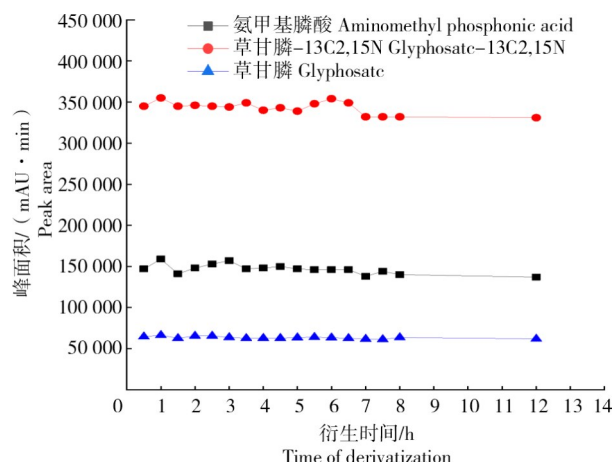


图2 衍生时间对衍生化反应的影响

Fig.2 Effect of time of derivatization on the derivatization reaction

2.2.3 固相萃取小柱对比试验 采用 SHIMSEN Styra MCX 固相萃取柱、Cleanert PCX 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取小柱、Cleanert PEP 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱和 C18 固相萃取柱 5 种净化小柱对加标样进行净化(图 3、4、5)。

由图 3 可知,PCX 净化待测液呈清亮透明状,MCX 净化待测液呈水黄色,HLB 和 PEP 净化待测液呈奶绿色,C18 净化待测液呈果绿色。因此,从视觉上判断,Cleanert PCX 固相萃取柱对咖啡中水溶性色素的净化效果最佳。

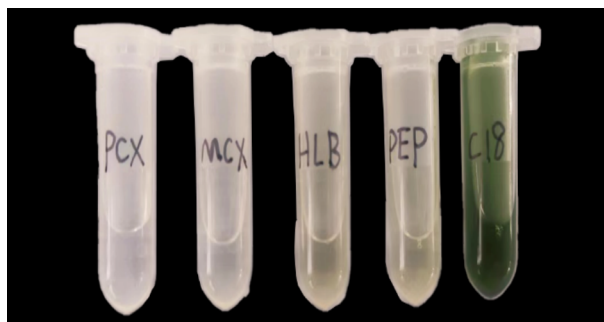


图 3 不同固相萃取小柱净化效果

Fig.3 The diagram of purification effect with different solid phase extraction

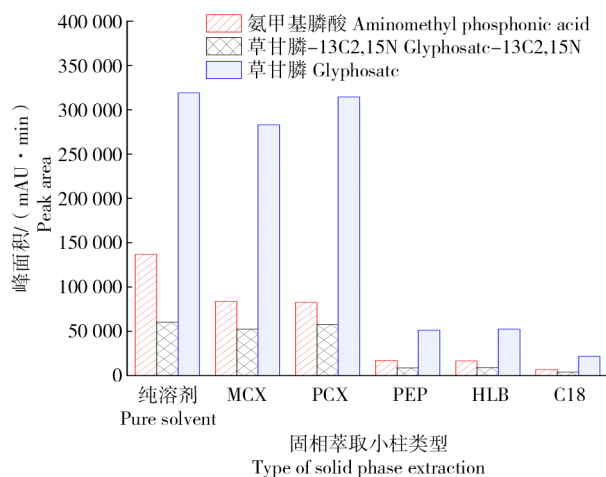


图 4 不同固相萃取小柱净化峰面积对比

Fig.4 The comparison of peak areas with different solid phase extraction

由图 4 可知,与纯溶剂衍生产物峰面积相比,采用 5 种净化小柱净化,氨甲基膦酸、草甘膦和草甘膦-13C2,15N 衍生产物变化呈现相同的趋势,峰面积由大到小依次为纯溶剂>PCX>MCX>HLB≈PEP>C18,其中,PCX 和 MCX 净化液峰面积较纯溶剂峰面积变化较小,而 HLB、PEP 和

C18 净化待测液峰面积较纯溶剂峰面积变化差异较大。在 2.1 中通过设计试剂空白试验考查 5 种固相萃取净化小柱对氨甲基膦酸、草甘膦和草甘膦-13C2,15N 的吸附,表明 5 种小柱对 3 种分析物的吸附较弱,回收率满足定量分析的要求,但在样品基质背景下 HLB、PEP 和 C18 净化待测液峰面积大幅降低,推测其原因为部分干扰杂质净化不彻底,在测定过程中对目标分析物产生较强的基质削弱效应,进而导致峰面积响应较弱。

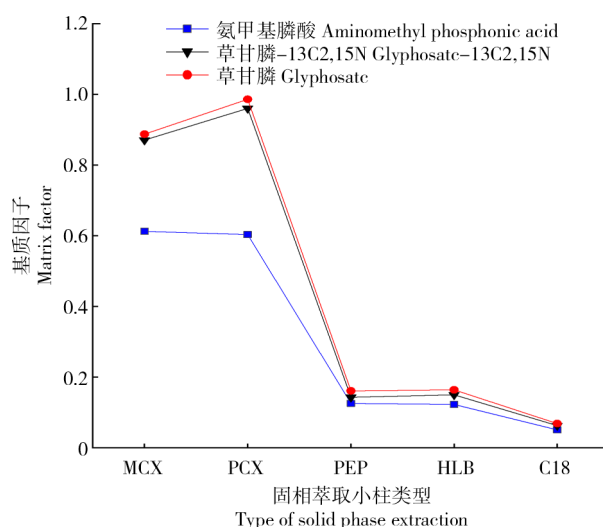


图 5 不同固相萃取小柱净化基质效应

Fig.5 The matrix effete with different solid phase extraction

基质因子如图 5 所示,氨甲基膦酸、草甘膦和草甘膦-13C2,15N 在咖啡基质分析中基质因子均小于 1,呈基质削弱效应,基质因子由大到小依次为 PCX>MCX>HLB≈PEP>C18,其中 HLB、PEP 和 C18 净化测试液基质因子低于 0.2,表现为较强的基质削弱作用;在 MCX 和 PCX 净化测试液中,草甘膦和草甘膦-13C2,15N 基质因子介于 0.8~1.0,呈弱基质削弱效应,氨甲基膦酸基质因子分别为 0.6(PCX)和 0.61(MCX),PCX 小柱净化基质效应值与 MCX 小柱净化基质效应相当,但 PCX 小柱净化液较 MCX 溶液清凉透明,综合考虑净化待测液颜色、基质效应等因素,为避免待测物中干扰杂质对设备的污染,有效降低设备维护成本,保证分析结果的准确性,试验选 PCX 小柱作为方法的净化小柱。

基于 2.2.1、2.2.2、2.2.3 已优化的条件,制作图 6 基质标准品总离子流图。

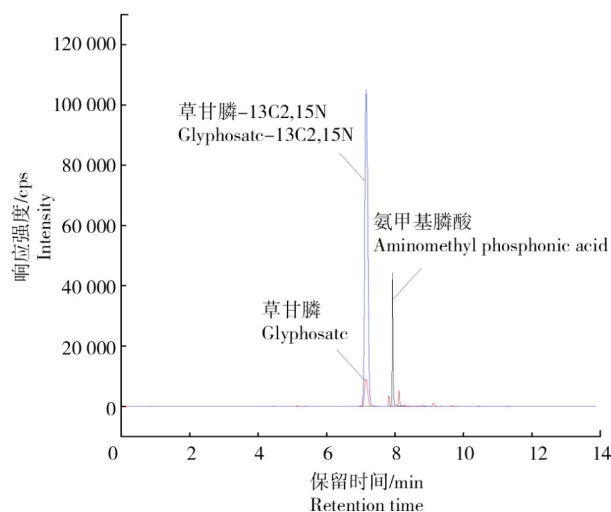


图6 基质匹配标准品总离子流

Fig.6 The total ion chromatogram of matrix-matched standards

2.3 方法验证

2.3.1 方法线性、检出限及定量限 采用《HJ 168—2020 环境监测分析方法标准制订技术导则》附录A中第1部分和第2部分,采用标准偏差法来评估该方法的检出限和定量限,选择空白样品基质,添加草甘膦和氨甲基膦酸质量分数均为0.05 mg/kg的样品处理,重复试验7次,按3.143倍标准偏差计算方法检出限,4倍检出限计算方法定量限。表3为方法的相关系数、线性范围检出限和定量限。

从表3可以看出,氨甲基膦酸在2~100 ng/L的范围内,线性关系良好,相关系数均大于0.995,草甘膦的检出限和定量限分别为0.01、0.04 mg/kg,方法满足欧盟(最大残留限量0.1 mg/kg)和日本(最大残留限量1.0 mg/kg)对咖啡中草甘膦残留量的质量监督要求。

表3 方法的相关系数、线性范围检出限和定量限

Tab.3 Correlation coefficient, linear range, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the method

化合物 Compound	相关系数 Correlation coefficient	线性范围/(ng/mL) Linear range	检出限/(mg/kg) LOD	定量限/(mg/kg) LOQ
草甘膦 Glyphosate	0.999 6	2~100	0.01	0.04
氨甲基膦酸 Aminomethyl phosphonic acid	0.999 0	2~100	0.01	0.04

2.3.2 方法精密度及回收率考察 称取空白生咖啡样品,分别在空白基质中添加0.05、0.10、0.20 mg/kg混合标准溶液,采用新建的方法对空白加标样进行处理并测定,每个加标水平进行6次重复试验。

由表4可知,生咖啡中3个添加水平的平均回

收率在81.8%~97.5%,相对标准偏差均小于9.1%,回收率和相对标准偏差满足中华人民共和国农业部2386公告《农药残留检测方法国家标准编制指南》附录A植物源性食品中农药残留检测方法编制技术正确度和精密度要求,表明该方法适用于生咖啡豆中草甘膦和氨甲基膦酸残留定量分析。

表4 生咖啡中3个添标水平的回收率和精密度

Tab.4 Recovery and precision of green coffee at three spiked levels

序号 No.	化合物 Compound	加标水平1 Spiked level 1			加标水平2 Spiked level 2			加标水平3 Spiked level 3		
		加标量/ (mg/kg) Addition level	平均回 收率/% Mean re- covery	相对标 准偏 差/% RSD	加标量/ (mg/kg) Addition level	平均回 收率/% Mean recov- ery	相对标准 偏差/% RSD	加标量/ (mg/kg) Addition level	平均回 收率/% Mean re- covery	相对标准 偏差/% RSD
1	草甘膦 Glyphosate	0.05	92.6	7.9	0.10	95.1	3.3	0.20	97.5	2.6
2	氨甲基膦酸 Aminomethyl phosphonic acid	0.05	81.8	9.1	0.10	84.2	6.3	0.20	85.6	7.0

2.3.3 外部实验室方法比对 为有效验证方法的有效性和准确性,实验室报名参加2023年英国FAPAS组织的咖啡中草甘膦能力验证(19377),实验室编码为10。实验室采用本研究建立的方法

对能力验证样品进行测定,各实验室结果反馈Z值分布见图7。从图7可以看出,本实验室草甘膦测定值为496 μg/kg,Z值为-0.4,测定结果满意,表明本实验室所建立的方法对生咖啡中草甘膦的定

量分析具有较强的准确性。

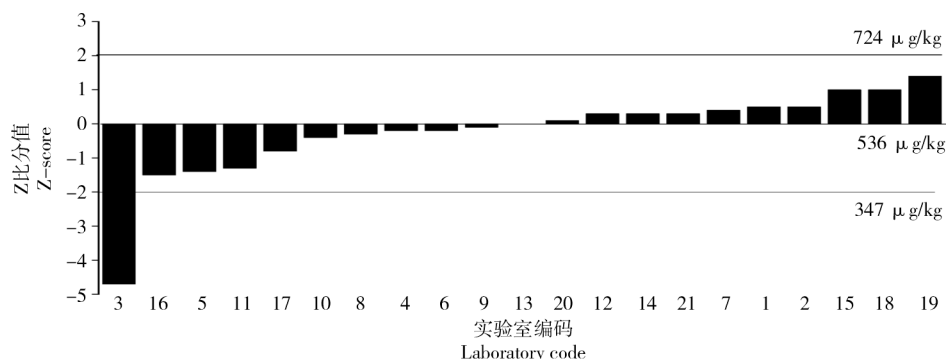


图7 FAPAS能力验证Z值分布

Fig.7 FAPAS capability verification Z-value distribution

2.4 实际样品测定

采用本试验建立的方法测定市场上随机购买的25个生咖啡样品中草甘膦和氨甲基膦酸的残留量,其中氨甲基膦酸均未检出,25个样本中草甘膦检出19个,检出率为76%,其含量在0.025~0.098 mg/kg,均未超过欧盟(最大残留限量0.1 mg/kg)和日本(最大残留限量1.0 mg/kg)对咖啡中草甘膦残留量的质量监控要求。实际样品检测结果表明,草甘膦在咖啡种植过程中的使用在咖啡豆中有一定程度的富集,该方法的建立对咖啡质量安全监督、促进咖啡产业发展具有重要意义。

3 结论与讨论

本研究采用固相萃取小柱净化法对生咖啡样品进行前处理,以草甘膦-13C₂,15N为内标分析物,基于LC-MS/MS对生咖啡中草甘膦和氨甲基膦酸残留量进行定量分析。通过优化衍生时间、衍生温度和固相萃取小柱,所建立的分析方法在2~100 ng/mL范围内线性关系良好,相关系数均大于0.995,在0.05、0.1、0.2 mg/kg添加水平下,回收率在81.8%~97.5%,相对标准偏差均小于9.1%,草甘膦和氨甲基膦酸方法的定量限均为0.04 mg/kg,满足日本和欧盟对咖啡中草甘膦农药残留限量监控的要求。本研究所建立的方法与SN/T 1923—2007和SN/T 3983—2014方法相比,填补了标准中缺乏咖啡基质前处理方法的空白,方法具有操作简便快捷、成本低、净化效果好、灵敏度和准确率高等优点,适用于生咖啡中草甘膦和氨甲基膦酸残留的准确定量分析,为咖啡产业安全和质量

控制提供一定技术支持。但研究仅对生咖啡基质进行方法学验证,对于生咖啡中草甘膦和氨甲基膦酸的残留分析具有较好的适用性,而对于焙炒咖啡、速溶咖啡等生咖啡精深加工产品基质未进行验证,适用基质有限、不利于咖啡精深加工产品中草甘膦和氨甲基膦酸的质量监控。因此,对于咖啡中草甘膦和氨甲基膦酸残留测定的不同产品基质方法有待进一步完善。

参考文献:

- [1] Qusel化学物质特征数据库[DB]. [2022-09-14]. <https://www.quselchem.com/hxhy/home/homePage.html>.
- [2] 王淑楠,任浦慧,解静芳. 除草剂草甘膦和氯磺隆对植物毒性效应的研究进展[J]. 山西农业科学, 2020, 48(10): 1693-1700.
- [3] DILL G M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future[J]. Pest Management Science, 2005, 61(3): 219-224.
- [4] SAMMONS R D, GAINES T A. Glyphosate resistance: state of knowledge[J]. Pest Management Science, 2014, 70(9): 1367-1377.
- [5] 李敏华,董永义,郭园,等. 不同除草剂对浅埋滴灌栽培模式下玉米田杂草防效研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2020, 35(3): 245-251.
- [6] RICHMOND M E. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species[J]. Journal of Environmental Studies and Sciences, 2018, 8(4): 416-434.

- [7] MAGGI F, TANG F H M, LA CECILIA D, et al. PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025[J]. Scientific Data, 2019, 6(1):170.
- [8] XU J W, SMITH S, SMITH G, et al. Glyphosate contamination in grains and foods: an overview[J]. Food Control, 2019, 106:106710.
- [9] 党亚敏. 环境与食品中除草剂草甘膦的污染现状[J]. 环境与健康杂志, 2021, 38(3):279-282.
- DANG Y M. Pollution status of herbicide glyphosate in environment and food[J]. Journal of Environment and Health, 2021, 38(3):279-282.
- [10] MYERS J P, ANTONIOU M N, BLUMBERG B, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement[J]. Environmental Health, 2016, 15:19.
- [11] 王非. 农达(41% 草甘膦)对人L-02肝细胞损伤的研究[D]. 长沙:中南大学, 2008.
- WANG F. Study on cellular damage of human L-02 hepatocyte induced by Roundup (41% glyphosate) [D]. Changsha: Central South University, 2008.
- [12] SÉRALINI G E, CLAIRE E, MESNAGE R, et al. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(11):4221-4231.
- [13] PAGANELLI A, GNAZZO V, ACOSTA H, et al. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling[J]. Chemical Research in Toxicology, 2010, 23(10):1586-1595.
- [14] 吴玉琼, 许祯毅, 尚亚明, 等. 草甘膦暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应及机制[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(4):429-438.
- WU Y Q, XU Z Y, SHANG Y M, et al. Developmental impact of glyphosate exposure on zebrafish embryos and mechanism involved[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(4):429-438.
- [15] PLANCHE V, VERGNET S, AUZOU N, et al. Acute toxic limbic encephalopathy following glyphosate intoxication[J]. Neurology, 2019, 92(11):534-536.
- [16] European Commission[DB]. [2024-02-28]. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en.html.
- [17] The Japan Food Chemical Research Foundation[DB]. [2024-02-28]. <http://db.ffcr.or.jp/front/>.html.
- [18] 常亚青, 张富彬, 任彤彤, 等. 比色法测定草甘膦含量的试验研究[J]. 长春工程学院学报(自然科学版), 2023, 24(2):125-128.
- CHANG Y Q, ZHANG F B, REN T T, et al. Experimental research on determination of glyphosate content by colorimetric[J]. Journal of Changchun Institute of Technology (Natural Sciences Edition), 2023, 24(2):125-128.
- [19] 吴文静, 林燕. NBD-Cl柱前衍生-高效液相色谱法测定土壤中草甘膦残留[J]. 农药学报, 2020, 22(6):1027-1032.
- WU W J, LIN Y. Determination of glyphosate in soils by HPLC with pre-column derivatization using 4-chloro-7-nitro-1, 2, 3-benzoxadiazole[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(6):1027-1032.
- [20] KOCADAL K, ALKAS F B, BATTAL D, et al. A review on advances and perspectives of glyphosate determination: challenges and opportunities[J]. Archives of Environmental Protection, 2022, 48(3):89-98.
- [21] 易华娟, 朱洁灵, 周瑞铮, 等. 全自动固相萃取结合 UPLC-MS/MS 测定茶叶中的草甘膦及其代谢物[J]. 茶叶科学, 2023, 43(6):857-869.
- YI H J, ZHU J L, ZHOU R Z, et al. Determination of glyphosate and its metabolites in tea by automatic solid phase extraction combined with UPLC-MS/MS[J]. Journal of Tea Science, 2023, 43(6):857-869.
- [22] 王禹衡. IC-MS 技术筛选生物检材中草甘膦等八种强极性毒物的研究[D]. 北京:中国人民公安大学, 2023.
- WANG Y H. The study on the determination of eight highly polar poisons (including glyphosate) in biological matrices by IC-MS[D]. Beijing: Chinese People's Public Security University, 2023.