

草甘膦残留动态对茶叶安全风险的预警分析

黄鸣, 裴少芬, 邵增琅, 王晓霞, 唐杏燕, 黄叶飞

(南京融点食品科技有限公司, 江苏南京 211300)

摘要: 采用高效液相色谱-串联质谱法建立了茶树不同部位(根、茎、叶)和土壤草甘膦、氨基磷酸的快速检测, 其中茶树经超纯水提取, 土壤经 KOH 溶液提取, 提取液过 C₁₈ 固相萃取柱净化, 然后在硼酸钠缓冲溶液中与 9-芴基甲基三氯甲烷 (Fmoc-Cl) 进行衍生反应, 其衍生产物在 C₁₈ 色谱柱上以 5 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈为流动相(含 0.1% 甲酸)进行梯度洗脱, 采用电喷雾离子源、正离子扫描和多反应监测模式检测, 同位素内标法定量, 系统地研究了提取条件对草甘膦检测影响, 结果表明: 草甘膦和氨基磷酸在 2.5~80 ng/mL 内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 该方法定量限为 0.05 mg/kg。对空白茶树和土壤分别添加 0.05、0.40 和 1.60 mg/kg 3 个浓度水平的草甘膦和氨基磷酸, 平均回收率为 76.95%~112.57%, 相对标准偏差为 2.01%~6.83% (n=4)。该方法快速灵敏稳定, 适用于茶树中不同部位和土壤中草甘膦残留的检测。残留动态试验表明: 在施药剂量为 0.3 g/m² 时, 草甘膦在叶部的富集量是最大的。随着时间延长, 草甘膦在茶树各部位以及土壤中的残留量逐渐降低, 且在土壤中的降解速率最快, 此研究可为后续草甘膦在非目标茶树中的吸收、转运和代谢提供技术支持。

关键词: 草甘膦; 茶树; 土壤; 衍生反应; 残留分析

文章编号: 1673-9078(2020)01-288-295

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.040

Early Warning Analysis of Glyphosate Residues Dynamics on Tea Safety Risk

HUANG Ming, PEI Shao-fen, SHAO Zeng-lang, WANG Xiao-xia, TANG Xing-yan, HUANG Ye-fei

(Nanjing Apogee Food Technology Co. Ltd., Nanjing 211300, China)

Abstract: Rapid detection of glyphosate (GLY) and aminomethyl phosphonic acid (AMPA) in different parts of tea trees (roots, stems, leaves) and soils was established by using high liquid chromatography tandem mass spectrometry. The tea tree was extracted with ultrapure water and the soils was extracted with KOH solution. Then, the extracts were purified by C₁₈ solid phase extraction cartridge, before derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc-Cl) in a sodium borate buffer. The derivatized sample was separated on an Agilent poroshell C₁₈ column using a gradient elution with the mobile phase composed of 5 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile containing 0.1% formic acid. Electrospray ionization in positive ion mode, multiple reaction monitoring, isotopic internal standard method were used to study systematically the effects of extraction conditions on GLY detection. The results showed a good linearity between GLY and aminomethylphosphonic acid in the range of 2.5~80 ng/mL, with the correlation coefficient (r^2) higher than 0.999 and the limit of quantification as 0.50 mg/kg. For the blank tea tree and soil samples at three spiked levels (0.05, 0.40, 1.60 mg/kg), the average recoveries of GLY and AMPA were 76.95%~112.57% with the relative standard deviations (RSD) as 2.01%~6.83% (n=4). The established method was rapid, sensitive and stable, thus suitable for the determination of GLY in different parts of tea trees and soils. The dynamic analysis of residual GLY showed that the amount of the GLY accumulated in tea leaves was the highest when the dosage applied was 0.3 g/m². Over time, the amounts of residual GLY in different parts of tea trees and soils gradually decreased with the degradation rate of GLY in soil being the highest. This research can provide technical support for the subsequent studies on the uptake, translocation and metabolism of GLY in non-target tea trees.

Key words: glyphosate; tea trees; soil; derivative reaction; residue analysis

茶叶作为我国重要的经济作物, 其产量和消费饮用量均位居世界第一, 茶叶饮品被誉为“世界三大饮料

收稿日期: 2019-07-03

基金项目: 江苏省现代农业重点研发计划 (BE2017357-2)

作者简介: 黄鸣 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 邵增琅 (1981-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食品加工

之一”。而近年来, 茶叶食品安全事故频发, 引发国内外各方关注。绿色和平组织于 2012 年和 2016 年发布茶叶农药调查报告^[1], 结果显示国内多家大牌的茶叶样品被检出含有禁用农药以及多种混合农药残留, 因此农药的残留问题已成为制约茶叶食品安全的最主要因素^[2]。

草甘膦 (Glyphosate, GLY), 俗称农达, 分子式为 $C_3H_8NO_5P^{[3]}$, 它作为一种高效、低毒、廉价的无选择类除草剂, 又兼具内吸、传导性和灭生性的特点^[4,5], 因此被广泛应用于茶园、果园、农田、林业等^[6], 是目前世界上产量最大, 应用最广的有机磷除草剂。其除草机理是抑制莽草酸合成酶的活性, 干扰植物中芳香族氨基酸和其它化学成分的形成, 致使植物代谢紊乱^[7,8]。有报道, 草甘膦会在环境和生物体内不断富集, 后通过食品和饮用水进入人体, 从而对人体造成危害^[9,10]。随着草甘膦的使用量不断增加, 特别是在茶园中的运用日益剧增, 其残留问题也越来越受到关注, Tong^[11]等研究了非标靶水培茶树草甘膦的富集和转移情况, 结果表明土壤中游离的草甘膦可被茶树根际吸收和代谢, 再通过根部传输至可食的叶部, 威胁人类健康, 但目前针对喷施草甘膦的茶园中茶树根、茎、叶和环境介质土壤的残留报道较少, 建立一种高效快捷的相关部位草甘膦检测方法显得尤为重要。

草甘膦属强极性化合物, 溶于水, 难挥发, 缺少发色和荧光基团等特性^[12], 因此运用常规检测较为困难, 目前常见的草甘膦检测方法有气相色谱、液相色谱、气质联用仪、液质联用仪和离子色谱法^[13-17]等, 但大部分方法存在操作繁琐、灵敏度不高, 检测效率低、定性困难, 有机试剂污染严重等问题, 而目前普遍采用的检测方法是草甘膦经净化处理后, 在硼酸盐缓冲溶液中加入 9-芴基甲基三氯甲烷 (FMOC-Cl) 作为衍生剂, 其衍生介质与草甘膦的水提取液相容性较好, 形成的衍生产物 GLY-FMOC 在液质联用仪上具有良好的响应^[18], 该方法快速、简便、灵敏。

我国现有的草甘膦检测国标方法和行业标准中, 前处理采用 CAX 小柱净化, 洗脱液中含有的水分较高, 需要旋转蒸发仪进行浓缩, 耗时较长且耗费的试剂较多, 操作较为繁琐, 回收率不稳定, 定量限偏高。目前, 采用柱前衍生-液质联用法检测茶叶中草甘膦残留量的报道很多, 但是研究对象普遍停留在不同茶叶品种和茶粉上, 针对土壤-茶树系统, 研究茶树不同部位 (根、茎、叶) 的草甘膦检测和草甘膦在茶树-土壤系统中的迁移规律的报道很少, 本文对 GLY 色谱和质谱的检测参数进行了优化, 对茶树不同部位和环境介质土壤的前处理的提取方式进行了改进, 采用 C_{18} 固相萃取小柱净化, 柱前 FMOC-Cl 衍生, 并对衍生反应的最佳条件进行了研究, 过程简单, 灵明度高, 回收率和重现性较好, 旨在建立一种高效灵敏的茶树中 GLY 的残留检测, 为草甘膦在非标靶茶树中的吸收、转运和代谢提供技术支持, 为我国草甘膦的科学使用, 加强农药安全管理, 更好地保护环境和人类健康方面

提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈、甲酸 (色谱纯), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙酸铵、甲醇 (色谱纯), 上海安谱科学仪器有限公司; 氢氧化钾、四硼酸钠 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 盐酸 (分析纯), 上海久亿化学试剂有限公司; 氯甲酸-9-芴基甲酯 FMOC-Cl (衍生级, 纯度 $\geq 99.9\%$), 上海安谱科学仪器有限公司; 有机相微孔滤膜 (0.22 μm), 德国 C&B 公司; 草甘膦、氨甲基膦酸标准品 (纯度 $\geq 98.0\%$, 100 $\mu g/mL$), 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司; 草甘膦同位素内标 1,2- $C^{13}N^{15}$ 标准品 (纯度 $\geq 97.0\%$, 100 $\mu g/mL$), 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司; CNWBOND LC- C_{18} SPE 小柱 (3 mL/50 pcs), 上海安谱科学仪器有限公司。

1.2 仪器与设备

明澈 TM-D24UV 超纯水系统, 美国 Merck Millipore 公司; 1260-6420 液质联用仪, 美国 Agilent 公司; KQ-250DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; AL204 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; XW-80A 涡旋混合仪, 金坛希望科研仪器有限公司; RJ-TGL-1650 台式高速离心机, 无锡瑞江分析仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

草甘膦混合标准储备液: 分别移取 100 μL GLY 和 AMPA 标准品于 10 mL 容量瓶中, 用水定容成 1 $\mu g/mL$ 混合标准储备液, 于 4 $^{\circ}C$ 冰箱中冷藏保存, 使用时用水稀释成所需浓度的工作液。

草甘膦混合标准工作曲线配制: 根据需要, 临用时吸取一定量的混合标准中间液和同位素内标标准溶液, 用水稀释配制成 2.5、5、10、20、40、80 ng/mL 的混标溶液, 其中 GLY(IS) 的质量浓度为 10 ng/mL 。

四硼酸钠溶液 50 g/L : 称取 5 g 四硼酸钠, 用超纯水溶解并定容至 100 mL 。

FMOC-Cl 丙酮溶液 20 g/L : 称取 2 g FMOC-Cl, 采用丙酮溶解并定容至 100 mL 。

1.3.2 液相色谱条件

色谱柱: Poroshell 120 EC- C_{18} 色谱柱 (2.7 μm , 3.0 $mm \times 100 mm$); 柱温: 40 $^{\circ}C$; 进样量: 10 μL ; 流速 0.4 mL/min 。流动相: A 为乙腈 (含 0.1% (V/V)

甲酸), B 为 5 mmol/L 的乙酸铵水溶液(含 0.1% (V/V) 甲酸), 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of the gradient elution

Time/min	Flow/(mL/min)	A/%	B/%
0.00	0.4	5.0	95.0
1.00	0.4	30.0	70.0
2.00	0.4	50.0	50.0
10.00	0.4	70.0	30.0
10.10	0.4	100.0	0.0
18.00	0.4	100.0	0.0
18.10	0.4	5.0	95.0
25.00	0.4	5.0	95.0

Note: A: 0.1% formic acid in acetonitrile; B: 5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid aqueous solutions.

1.3.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子模式; 扫描模式: 多反应监测(MRM); 碰撞气为氮气; 气流量为 12 L/min; 毛细管电压为 3500 V; 光电倍增管电压为 400 V; 喷雾器压力为 50 psi; 其它质谱参数见表 2。

1.3.4 样品前处理

样品制备: 取冷冻保存的鲜茶树根、茎、叶及土

壤各 100 g, 依次放入组织捣碎机中切碎, 将粉碎后的样品平铺于托盘, 置于 50 °C 条件下烘干 4 h 备用。

茶树根茎叶前处理: 称取 1 g 待测物(精确至 0.0001 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 μ L 已配好的 10 μ g/mL 同位素内标 GLY-1,2- $C^{13}N^{15}$, 再加入 20.00 mL 超纯水, 涡旋振荡 1 min, 超声提取 30 min, 10000 r/min 离心 5 min, 上清液待净化。取 2 mL 上清液过 C_{18} 固相萃取小柱(提前用 3 mL 甲醇、3 mL 超纯水活化), 弃去流出液, 再重新吸取 2 mL 上清液过 C_{18} 固相萃取小柱, 5 mL 塑料离心管接收流出液, 待衍生; 取 1 mL 的净化液, 加入 400 μ L 50 g/L 的四硼酸钠溶液, 涡旋 30 s, 加入 200 μ L 20 g/L 的 FMOC-Cl 丙酮溶液, 涡旋 30 s, 室温衍生过夜, 15000 r/min 离心 5 min, 吸取 1 mL 上清液过 0.45 μ m 有机相微孔滤膜后供 HPLC-MS 测定。

土壤前处理: 称取 1 g 土壤样品(精确至 0.0001 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 μ L 已配好的 10 μ g/mL 同位素内标 GLY-1,2- $C^{13}N^{15}$, 再加入 20.00 mL 0.6 mol/L 的 KOH 溶液, 涡旋混匀, 超声提取 1 h, 10000 r/min 离心 5 min, 移出上清液, 用一定浓度的盐酸或氢氧化钠调节溶液 pH 为中性备用, 净化和衍生步骤同茶树根茎叶前处理。

表 2 草甘膦和氨甲基磷酸的质谱检测参数

Table 2 Parameters of MS/MS for GLY and AMPA

Compound name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Dwell time/ms	Fragmentor/V	Collision Energy/V	Cell Accelerator voltage/V
GLY-1,2- $C^{13}N^{15}$	395	91	60	90	20	2
GLY	392	214	60	90	5	2
		88*	60	90	20	2
AMPA	334	156	60	80	8	2
		179*	60	80	15	2

注: *为定量离子。

2 结果与分析

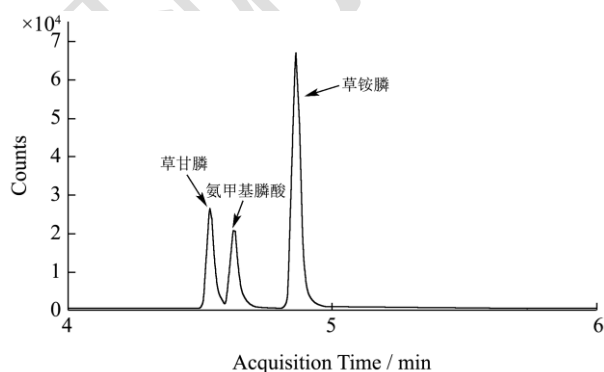


图 1 草甘膦衍生物 GLY-FMOC 的总离子流图

Fig.1 The TIC of glyphosate derivatives (GLY-FMOC)

2.1 质谱条件的优化

配制浓度为 80 μ g/L 的草甘膦和氨甲基磷酸混合衍生物 GLY-FMOC 和 AMPA-FMOC, 通过单针进样注入进样器, 随流动相到质谱仪进行母离子和子离子扫描, 试验发现这种衍生产物在正负离子模式下都可以电离, 但在 ESI+ 模式下响应更高, 离子碎片的特异性更好, 因此选择正离子扫描, 以多反应监测模式 (MRM) 测定这两种衍生产物的一级质谱, 得到的分子信息, 即为母离子, 采集范围为 m/z 300~450, 确定母离子后在对其进行二级质谱扫描。得到的碎片离子信息, 即为子离子, 子离子的采集范围为 m/z 60~400, 选取灵敏度高, 无干扰的离子作为监测离子, 对锥孔

电压、碰撞能量等参数进行优化,以获得稳定性好,信号强度高的离子碎片,优化后的质谱信息见表 2,扫描后的色谱图和质谱图见图 1 和图 2,选取响应较高的 m/z 392>88、 m/z 392>214 和 m/z 334>179、 m/z 334>156 分别作为草甘膦和氨甲基膦酸衍生物的定量、定性离子对。

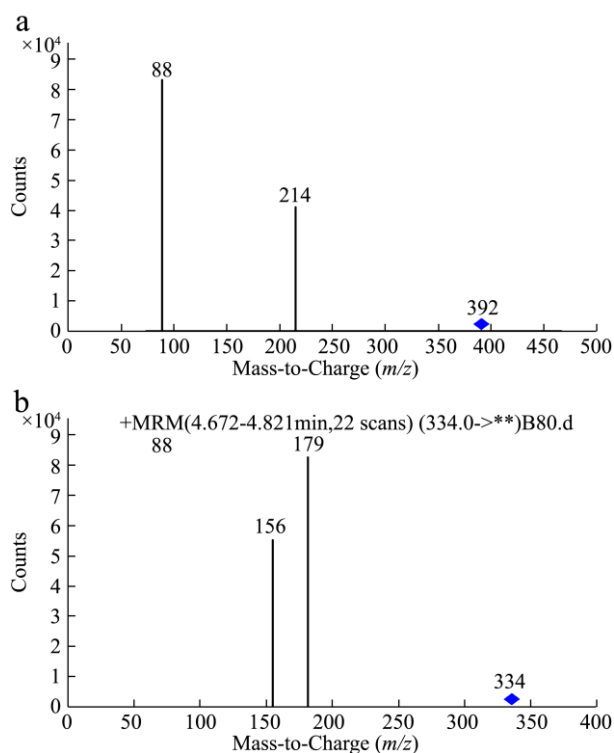


图 2 正离子模式下 GLY-FMOC 和 AMPA-FMOC 的母离子和子离子扫描光谱图

Fig.2 Precursor and product scan spectra of GLY-FMOC and AMPA-FMOC in positive ion mode

2.2 液相色谱条件的优化

为了获取更好地色谱分离效果和仪器响应值,对流动相体系进行了优化,配制以下 3 组流动相: (I) A 为乙腈, B 为水; (II) A 为乙腈, B 为 0.1% (V/V) 甲酸水溶液; (III) A 为乙腈, B 为 5 mmol/L 的乙酸铵溶液+0.1% (V/V) 甲酸水溶液; 选取 80 ug/L 的草甘膦和氨甲基膦酸混合标准溶液衍生液在以上 3 组流动相中的分别进样,考察草甘膦和氨甲基膦酸在各组流动相中进行梯度洗脱后的色谱图,试验结果如图 3,结果显示: (I) 中乙腈+水的流动相组合,目标化合物都未出峰,色谱保留性较差,响应值较低,不采用, (II)、(III) 都具有良好的分离效果,在流动相中添加甲酸,为系统提供质子化的 H⁺,目标化合物的离子化强度得到了明显增强,更易于检出,当流动相中添加一定浓度的乙酸铵溶液,更有助于离子化,目标化合物的响应值同 (II) 相比略有提高,灵敏度得到了

增强,所以综合考虑选择 III,乙腈+5 mmol/L 的乙酸铵水溶液 (含 0.1% (V/V) 甲酸) 为流动相。

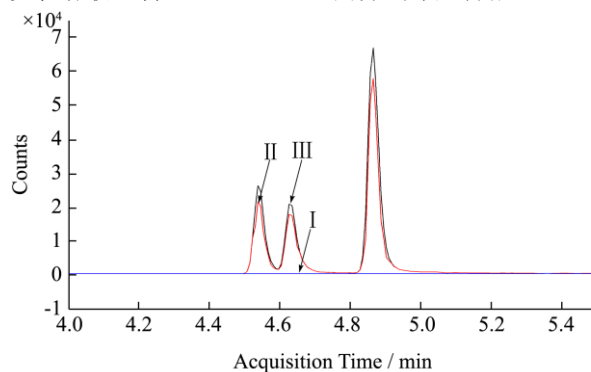


图 3 不同流动相下草甘膦和氨甲基膦酸衍生物的色谱图
Fig.3 Chromatograms of GLY-FMOC and AMPA-FMOC with different mobile phases

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 提取溶剂的选择

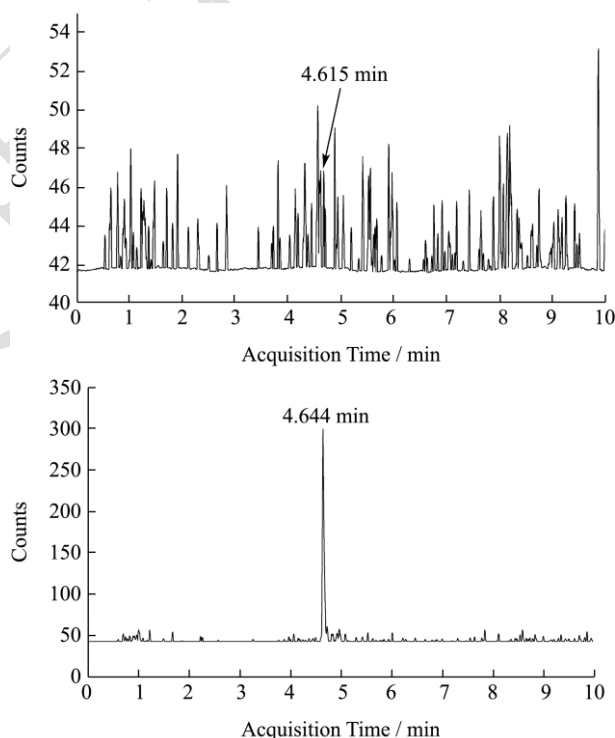


图 4 以 H₂O 和 KOH 溶液为提取剂时的土壤草甘膦 MRM 谱图
Fig.4 MRM spectra of glyphosate in soil with H₂O and KOH as extraction agent

由于 GLY 和 AMPA 的极性较大,且易溶于水,难溶于有机溶剂,所以草甘膦农药一般被制成水剂,有文献报道,一般选用极性溶剂来提取样品中草甘膦及其代谢物氨甲基膦酸^[19],如水、丙酮、KOH、硼酸盐缓冲溶液等,通过试验对比草甘膦和氨甲基膦酸的分离效果和回收率,发现由于茶树中含有大量的色素、多酚、氨基酸、糖和生物碱等物质,丙酮提取出的色

素较多,对后期净化提出了更高的要求,而 KOH 和硼酸盐缓冲液会和茶树的中蛋白质,多酚类物质发生反应,导致离心后的提取液异常浑浊,不容易过固相萃取柱,易引起堵塞,仍然不利于后期的净化和衍生,因此,茶树根、茎、叶提取选择用水作为提取剂,操作简单,试验成本低,且两种目标化合物的回收率也较高,能达到 80% 以上。

本实验针对土壤中的草甘膦提取做了重点分析,试验过程中选择用 KOH 溶液进行提取,由于土壤中的金属离子会和草甘膦络合形成不溶于水的化合物,而且土壤中具有强吸附性的有机质,因此土壤中草甘膦的提取较为困难,资料文献记载有用水、酸、碱等不同溶剂来提取土壤中草甘膦^[20],试验中草甘膦虽为两性化合物,但通常表现为酸性,于是选用 0.6 mol/L 的 KOH 溶液和水为提取剂做对比实验,试验谱图如下,从图 4 可以看出,用水为提取剂使,土壤中的草甘膦衍生物 GLY-FMOC 与杂质峰尚未完全分离,且杂质峰的响应值相对较大,目标物的提取效率较低,当用 KOH 溶液为提取剂时, GLY-FMOC 的响应值近乎扩大为原来的 6 倍,目标物的提取率得到明显增强,回收率较好,后续通过试验发现 KOH 溶液仍适用于土壤中氨基甲酸磷的提取, AMPA-FMOC 的响应值明显增强,土壤中氨基甲酸磷的回收率达到了 81.2%~96.8%,0.6 mol/L 的 KOH 溶液提取法所变现出的较好的回收率以及最佳的稳定性,也说明这两种目标化合物特性的一致性。

2.3.2 衍生条件的选择

样品在衍生过程中选取的四硼酸钠浓度为 50 g/L,实验过程中发现当四硼酸钠的溶液浓度大于 50 g/L 时,标准溶液中草甘膦及其同位素内标的响应值已经达到了阈值,而四硼酸钠浓度太高又会引起质谱污染,因此将四硼酸钠的溶液浓度定为 50 g/L,本文从衍生剂 FMOC-Cl 的浓度和反应时间两方面对 GLY 和 AMPA 的衍生效率进行考察,取 4 份 10 $\mu\text{g/L}$ 的草甘膦标液 1 mL,加入 400 μL 50 g/L 的四硼酸钠溶液,再分别加入 5 g/L、10 g/L、20 g/L 和 40 g/L 的 FMOC-Cl 丙酮衍生液 200 μL ,放于室温下衍生 1 h、2 h、4 h、6 h、12 h 和 18 h,然后进行 LC-MS 测定,试验结果如图,由图 5 可以看出,当 GLY 和 AMPA 与较低浓度(5 g/L)的衍生试剂反应时,产率较低且随时间变化不明显,当 GLY 和 AMPA 与 20 g/L 的 FMOC-Cl 反应时,随着时间的延长,衍生化效率得到了明显的提高,到 12 h 左右达到了最高值,而当 FMOC-Cl 浓度为 40 g/L 时,两者的产率在 4 h 后反而下降,原因可能是衍生试剂 FMOC-Cl 的化学性质较为活泼,当

其用量过大时,剩余部分会快速转变成 FMOC-OH,此物质会对目标化合物的测定产生干扰。综合考虑为了保证反应充分,本实验最终选定的衍生条件为 50 g/L 四硼酸钠溶液,20 g/L 的 FMOC-Cl 丙酮溶液,室温下衍生过夜(12 h)。

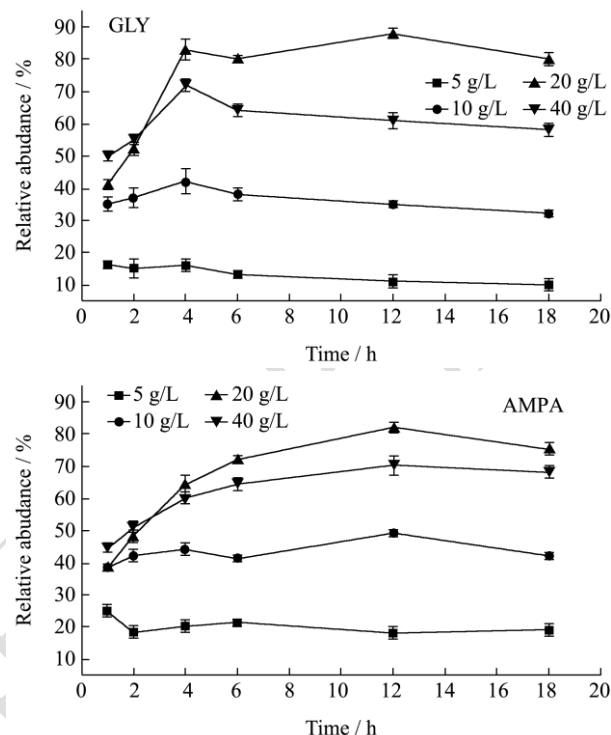


图 5 衍生剂浓度和衍生时间对 GLY 和 AMPA 衍生效率的影响

Fig.5 Influences of FMOC-Cl concentration and reaction time on the derivatization yields of GLY and AMPA

2.4 方法的线性范围、检出限和定量限

在已设置的仪器参数条件下, GLY 和 AMPA 在 2.5~80 $\mu\text{g/L}$ (内标物浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$) 范围内线性良好 ($R^2 > 0.999$),草甘膦标准线性方程为 $y = 1.133554x - 0.005678$,氨基甲酸磷标准线性方程为 $y = 1.253666x - 0.015248$ (其中 x 为质量浓度, y 为分析物与内标物响应的比值),采用向空白样品中逐级降低加标浓度的方法来确定检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ),以信噪比为 3 时的目标物浓度作为检出限,以信噪比为 10 的目标物浓度作为定量限。由表 3 可以看出,草甘膦及其代谢物氨基甲酸磷在茶树不同部位和土壤中的检出限为 0.01~0.03 mg/kg,而定量限都为 0.05 mg/kg。

2.5 方法的回收率和精密度

准确称取 1 g 均质好的空白土壤和茶树各部位样品,放于 50 mL 离心管中,分别添加 0.05、0.40 和 1.60 mg/kg 共 3 个水平的 GLY 和 AMPA 及一定浓度的同位素内标物,进行添加回收试验,每个添加浓度重复

4次,按照1.3.3所述进行前处理后上机测试,加标回收率和精密度结果见表3,结果表明草甘膦及其代谢物氨基磷酸在茶树不同部位以及环境介质土壤中的平均回收率为76.95%~112.57%,相对标准偏差(RSD, n=4)为2.01%~6.83%,实验表明本方法的重现性和精密度均可满足草甘膦的残留分析要求。

2.6 实际样品的测定

利用本文所建立的方法对市面上的5种茶树品种和3种土壤类型进行抽检,共35个样品。其中黄山一品、龙井43、福鼎大白茶、乌牛早和迎霜各4份,黑土、红土和黄土各5份,试验结果显示:土壤中的草甘膦均未检出,有文献指出草甘膦接触土壤后,会很快与土壤中的铁、铝等金属离子结合而失去活性或被土壤微生物分解^[21],而茶树样品中有5份检测出草甘膦,且都位于茶树的叶部,检出的目标物含量范围为0.05~0.5

mg/kg,被检出的这5份阳性样品中氨基磷酸的残留量为ND(未检出),即样品中的草甘膦均未超过国家标准GB 2763-2016中的限量值^[22],但仍有检出,说明草甘膦的施用在茶园仍较为普遍,政府应加强茶叶种植企业的监管,各大茶叶公司应加强对自己供应链的管理,防止草甘膦残留量增加,影响茶叶的饮用安全。

2.7 残留动态分析

在厂区内设置实验基地,面积约为15 m²,试验设高剂量0.30 g/m²和空白对照2个处理,3次重复,在茶树生长期施药一次,多次采样,施药后间隔2 h、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d和28 d后分别采集茶树根、茎、叶和土壤样品,按照1.3.4进行样品前处理,测试各部位的草甘膦和氨基磷酸残留,在28d的试验周期内,发现氨基磷酸的残留水平较低,无明显规律变化,而草甘膦的具体检测结果见表4。

表3 草甘膦和氨基磷酸在茶树不同部位和土壤中的添加回收率和RSD

Table 3 Recoveries and RSDs of GLY and AMPA spiked in different parts of tea trees and soils (n=4)

部位	加标浓度 (mg/kg)	GLY				AMPA			
		回收率/%	RSD /%	检出限 LOD (mg/kg)	定量限 LOQ (mg/kg)	回收率/%	RSD /%	检出限 LOD (mg/kg)	定量限 LOQ (mg/kg)
根	0.05	80.82	2.62			80.53	2.44		
	0.40	95.53	2.01	0.02	0.05	96.64	3.17	0.03	0.05
	1.60	104.31	2.42			98.24	2.86		
茎	0.05	81.42	3.12			80.41	3.33		
	0.40	96.32	4.74	0.02	0.05	98.80	4.47	0.02	0.05
	1.60	107.43	2.01			103.02	5.09		
叶	0.05	86.91	2.82			91.34	6.12		
	0.40	105.91	5.13	0.01	0.05	102.32	5.33	0.02	0.05
	1.60	109.12	2.74			112.57	5.52		
土	0.05	76.95	6.71			81.22	3.61		
	0.40	86.13	3.12	0.03	0.05	84.34	4.42	0.03	0.05
	1.60	95.33	3.02			96.83	6.83		

表4 草甘膦在茶树根、茎、叶和土壤中的残留动态

Table 4 Residual dynamics of GLY in tea roots, stems, leaves and soils

取样 时间	根		茎		叶		土壤	
	残留量 (mg/kg)	降解率/%	残留量 (mg/kg)	降解率/%	残留量 (mg/kg)	降解率/%	残留量 (mg/kg)	降解率/%
2 h	0.24	0	0.36	0	0.55	0	0.19	0
1 d	0.20	16.67	0.28	22.22	0.72	-	0.15	21.05
3 d	0.16	33.33	0.21	41.67	0.63	12.50	0.11	42.11
7 d	0.11	54.17	0.17	52.78	0.53	26.39	0.05	73.68
14 d	0.05	79.17	0.10	72.22	0.32	55.56	-	-
21 d	-	-	0.06	83.33	0.11	84.72	-	-
28 d	-	-	-	-	0.06	91.67	-	-

由表可见茶树各部位及土壤中的草甘膦残留量随时间的延长而降低,最初阶段,茶树叶部的草甘膦富集量最多,可以看出 $C_{叶}>C_{茎}>C_{根}>C_{土}$,在非标靶茶树上,草甘膦的污染可以通过直接接触或土壤释放后,被茶叶根部吸收并转运至可食的叶部,从表4中也可以看出土壤中的草甘膦在7 d后降解率达到了73.68%,表明草甘膦在土壤中的降解速率较快,不易形成持久性残留。

3 结论

本文建立了高效液相色谱-串联质谱法测定茶树不同部位和土壤中的草甘膦和氨基膦酸,系统性的优化了方法中的质谱、色谱和前处理条件,该方法操作简便、灵敏度高、重现性较好,适用于草甘膦的残留检测和分析,并同时达到定性、定量的目的,以本方法为基础可以进一步研究草甘膦在非标靶茶树中的吸收、转运、分布和代谢规律。

参考文献

- [1] 王微,鄢人雨,兰吉玉,等.黔东南州茶叶农药残留与膳食摄入风险评估[J].茶叶科学,2019,39(5):567-575
WANG Wei, YAN Ren-yu, LAN Ji-yu, et al. Dietary intake risk assessment of pesticide residues in tea in Qiandongnan prefecture [J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(5): 567-575
- [2] 施杰,来庆华,郭思聪,等.茶叶农药残留与检测技术[J].食品安全质量检测学报,2019,10(5):1243-1249
SHI Jie, LAI Qing-hua, GUO Si-cong, et al. Pesticide residue and detection technology of tea [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(5): 1243-1249
- [3] 莫佳琳,缪璐,干宁军.超高效液相色谱-串联质谱法检测甘蔗中的草甘膦残留量[J].现代食品科技,2011,27(9):1143-1145
MO Jia-lin, MIAO Lu, GAN Ning-jun. Determination of glyphosate in sugar cane by UPLC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(9): 1143-1145
- [4] 苏少泉,滕春红.草甘膦应用现状与未来发展[J].世界农药,2016,36(3):8-11
SU Shao-quan, TENG Chun-hong. The application status and future development of glyphosate [J]. World Pesticides, 2016, 36(3): 8-11
- [5] Botero A M, Ibanez M, Sancho J V, et al. Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1313(1): 157-165
- [6] 诸力,陈红平,周苏娟,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定不同茶叶中草甘膦、氨基膦酸及草铵膦的残留[J].分析化学,2015, 43(2): 271-276
ZHU Li, CHEN Hong-ping, ZHOU Su-juan, et al. Determination of glyphosate, aminomethyl phosphonic acid and glufosinate in different teas by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(2): 271-276
- [7] Chen R F, Wang H H, Wang C Y. Translocation and metabolism of injected glyphosate in lead tree (*Leucaena leucocephala*) [J]. Weed Science, 2009, 57(3): 229-234
- [8] Gong Y Y, Guo S Q, Shu H M, et al. Advances on resistance mechanism of glyphosate resistant weeds [J]. Weed Science, 2012, 30(3): 9-13
- [9] Williams G M, Kroes R, Munro I C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2000, 31(2): 157-165
- [10] 周垂帆,李莹,张晓勇,等.草甘膦毒性研究进展[J].生态环境学报,2013,22(10):1737-1743
ZHOU Chui-fang, LI Ying, ZHANG Xiao-yong, et al. Research advance in ecotoxicity of glyphosate [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(10): 1737-1743
- [11] Tong M M, Gao W J, Jiao W T, et al. Uptake, translocation, metabolism and distribution of glyphosate in nontarget tea plant [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(35): 7638-7645
- [12] 周爽,徐敦明,林立毅,等.反反相色谱-串联质谱法直接测定植物源性食品中草甘膦及其代谢物残留[J].分析测试学报,2013,32(2):199-204
ZHOU Shuang, XU Dun-ming, LIN Li-yi, et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in plant-derived foodstuff by aqueous normal phase (ANP) chromatography-tandem mass spectrometric method [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(2): 199-204
- [13] 邱慧敏,耿金菊,韩超,等.串联毛细管离子色谱法测定水中亚磷酸根、磷酸根、草甘膦和氨基膦酸[J].分析化学,2013, 41(12):1910-1914
QIU Hui-ming, GENG Jin-ju, HAN Chao, et al. Determination of phosphite, phosphate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid by two-dimensional ion chromatography system coupled with capillary ion chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(12): 1910-1914
- [14] Hogendoorn E A, Ossendrijver F M, Dijkman E, et al. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of precolum derivatisation with 9-fluorenylmethyl

- chloroformate and coupled column liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 833(1): 67-73
- [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产物氨基磷酸残留[J].*色谱*, 2007,25(4):486-490
- LI Bo, DENG Xiao-jun, GUO De-hua, et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 25(4): 486-490
- [16] 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]
- [17] 张丽娟,韦少平,李致宝,等.高效液相色谱法同柱分析草甘膦和双甘膦[J].*农药*,2009,48(6):431-432
- ZHANG Li-juan, WEI Shao-ping, LI Zhi-bao et al. Analysis of glyphosate and N-(Phosphonomethyl) iminodiacetic acid at the same column by HPLC [J]. *Agrochemicals*, 2009, 48(6): 431-432
- [18] 钟茂生,梁剑,朱品玲,等.HPLC-MS-MS 法测定茶叶中的草甘膦和氨基磷酸[J].*广州化工*,2014,42(22):128-130
- ZHONG Mao-sheng, LIANG Jian, ZHU Pin-ling, et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in tea by HPLC-MS/MS [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2014, 42(22):128-130
- [19] 成婧,王美玲,龚强,等.液相色谱-串联质谱法检测植物源食品中的草甘膦及其代谢物的残留量[J].*食品安全质量检测学报*,2016,7(1):138-144
- CHENG Jing, WANG Mei-ling, GONG Qiang, et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in plant-derived foodstuff by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety Quality*, 2016, 7(1): 138-144
- [20] 刘拉平,武瑜,王玉堂,等.柱前衍生高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中草甘膦及其主要代谢物氨基磷酸[J].*农药学报*,2015,17(4):439-446
- LIU La-ping, WU Yu, WANG Yu-tang, et al. Determination of glyphosate and its main metabolites aminomethylphosphonic acid in soil sample by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pre-column derivatization [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2015, 17(4): 439-446
- [21] 孙立思,王娜,孔德洋,等.土壤理化性质对草甘膦残留检测的影响[J].*生态与农村环境学报*,2017,33(9):860-864
- SUN Li-si, WANG Na, KONG De-yang, et al. Influence of soil physical and chemical properties on detection of glyphosate residue [J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(9): 860-864
- [22] GB 2763-2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]
- GB 2763-2014 National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits for Pesticides in Food [S]

(上接第 51 页)

- [25] Gute H, Grosch W. Odorants of extrusion products of oat meal-changes during storage (in German) [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1993, 196(1): 22-28
- [26] 万俊,艾民珉,周佳,等.皮蛋加工过程中油脂氧化及抗氧化特性研究[J].*食品工业*,2018,39(9):126-131
- WAN Jun, AI Ming-min, ZHOU Quan, et al. The Investigation on oxidation and antioxidant properties of preserved egg yolk oil [J]. *The Food Industry*, 2018, 39(9): 126-131
- [27] Rose D J, Pike O A. A simple method to measure lipase activity in wheat and wheat bran as an estimation of storage quality [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, 83(5): 415-419
- [28] 刘辉鸿,胡飞,冯倩倩,等.冻藏期间罗非鱼腥味变化及形成机理[J].*食品与发酵工业*,2013,39(9):52-55
- LIU Hui-hong, HU Fei, FENG Qian-qian, et al. Formation of fishy odor in tilapia muscle and smell change during iced storage [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(9): 52-55
- [29] 周绪霞,梁媛,张焱彦,等.真空包装糙米储藏过程中品质变化分析[J].*浙江工业大学学报*,2019,47(1):118-122
- ZHOU Xu-xia, LIANG Yuan, ZHANG Zheng-yan, et al. Analysis of quality change of vacuum packed japonica brown rice during storage [J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2019, 47(1): 118-122
- [30] 杨忠全,阚建全,陈光静,等.新鲜薏仁米与异味薏仁米挥发性成分对比分析[J].*食品与机械*,2017,33(7):35-39
- YANG Zhong-quan, KAN Jian-quan, CHEN Guang-jing, et al. Contrastive analysis of volatile compounds from fresh adlay seeds and those with off-flavor [J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(7): 35-39

现代食品科技