

ICS 67.040
B 04

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1096—2006

食品中草甘膦残留量测定

Determination of glyphosate residues in food

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：农业部食品质量监督检验测试中心(湛江)。

本标准主要起草人：陈鹰、程雪梅、黄和、周敏、叶英。

食品中草甘膦残留量测定

1 范围

本标准规定了食品中草甘膦及其代谢物残留量的测定方法。

本标准适用于蔬菜、水果和粮食类产品中草甘膦及其代谢物残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 8855 新鲜水果和蔬菜的取样方法

3 原理

试样中草甘膦及其代谢物氨基磷酸(AMPA)以水提取,粗提液经二氯甲烷液分配和离子交换柱(CAX)净化后用三氟乙酸酐和七氟丁醇的混合液衍生。氨基基团被衍生成相应的三氟乙酰衍生物,羧基和磷酸基团被衍生形成相应的七氟丁酯。衍生物用气相色谱-质谱联用仪器定性,采用离子选择模式外标法定量,测定结果以草甘膦和AMPA的浓度之和计。

4 试剂

除注明外,使用试剂均为分析纯,用水符合GB 6682中二级水要求。

4.1 乙酸乙酯

重蒸馏。

4.2 甲醇

重蒸馏。

4.3 二氯甲烷

重蒸馏。

4.4 七氟丁醇

纯度 $\geq 99\%$ 。

4.5 三氟乙酸酐

纯度 $\geq 99\%$ 。

4.6 柠檬醛

纯度95%。

4.7 盐酸(市售)

4.8 磷酸二氢钾

4.9 CAX 洗脱液

160 mL 水 + 2.7 mL 盐酸 + 40 mL 甲醇。

4.10 酸调节液

16 g 磷酸二氢钾 + 160 mL 水 + 40 mL 甲醇 + 13.4 mL 盐酸。

4.11 0.2% 柠檬醛乙酸乙酯溶液

200 μ L 柠檬醛 + 100 mL 乙酸乙酯, 储于 <5 $^{\circ}$ C 冰箱保存 1 个月。

4.12 草甘膦(glyphosate)标准品: 纯度 \geq 99%。

4.13 草甘膦标准溶液

准确称取 50.0 mg 草甘膦标准品(4.12)于塑料烧杯中, 加适量的水和 2 滴~3 滴盐酸溶解, 转移到 50 mL 聚四氟乙烯或聚丙烯容量瓶, 定容配制成质量浓度为 1.0 g/L 的标准储备液, 并储于 <5 $^{\circ}$ C, 保存 6 个月。

4.14 AMPA(aminomethyphosphonic acid)标准品

纯度 \geq 99%。

4.15 AMPA 标准溶液

准确称取 50.0 mg AMPA 标准品(4.14)于塑料烧杯中, 加适量的水和 2 滴~3 滴盐酸溶解, 转移到 50 mL 聚四氟乙烯或聚丙烯容量瓶, 定容配制成质量浓度为 1.0 g/L 的标准储备液, 并储于 <5 $^{\circ}$ C, 保存 6 个月。

4.16 草甘膦及 AMPA 标准混合工作液

取适量草甘膦和 AMPA 标准储备液, 用 CAX 洗脱液(4.9)配制成适当浓度的标准工作液, 当日配制。

4.17 阳离子交换(CAX)柱

LC-WCX(500 mg, 3 mL)或等效柱, 使用前用 10 mL 水预处理, 保持柱体湿润。

4.18 衍生试剂

在聚丙烯塑料瓶(5.5)中加入七氟丁醇(4.4)和三氟乙酸酐(4.5)(1+2), 轻轻混匀, 得到混合衍生试剂, 现用现配。

5 仪器设备

5.1 气相色谱-质谱联用仪

带四级杆质量分离器、电子轰击源(EI)。

5.2 色谱柱

弹性石英毛细管柱, DB-5MS(30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm i.d), 或与 DB-5MS 极性相当的色谱柱。

5.3 衍生用玻璃瓶

4 mL, 具螺纹口空心塞, 配聚四氟乙烯垫。

5.4 组织捣碎机

5.5 聚丙烯塑料瓶

5.6 高速均质机

10 000 r/min。

5.7 具塞聚丙烯离心管

50 mL。

5.8 具塞刻度试管

10 mL。

5.9 高速冷冻离心机

2 000 r/min。

5.10 旋转蒸发器

5.11 恒温水浴锅

5.12 移液器

10 μL ~100 μL , 200 μL ~1 000 μL 。

6 取样和制样

6.1 取样

粮食样品按照 GB 5491 取样;水果、蔬菜样品按照 GB/T 8855 取样。

6.2 试样制备

粮食样品经粉碎机粉碎,过 20 目筛制成试样备用,水果、蔬菜样品擦净,晾干表面水分,取可食部分经组织捣碎机(5.4)捣碎,制成试样备用。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 蔬菜、水果类样品

称取 25 g 均匀试样,精确到 0.01 g,置于塑料瓶(5.5)中,加入 105 mL 的水,在均质机(5.6)上高速浸提 3 min,转移约 50 mL 匀浆到 50 mL 离心管(5.7)离心 10 min,取上清液 20.00 mL 到另一 50 mL 聚丙烯离心管(5.7)。加入 15.00 mL 二氯甲烷,振摇 2 min~3 min,离心 10 min,取上清液 4.50 mL 于 10 mL 具塞试管(5.8)中,加入 0.50 mL 酸调节液(4.10),轻轻振摇,离心 10 min,上清液供净化用。

7.1.2 粮食类样品

称取 12.5 g 均匀试样,精确到 0.01 g,置于塑料瓶(5.5)中,加入 125 mL 水,以下按 7.1.1 中的“在均质机上高速浸提 3 min”之后的步骤操作。

7.1.3 豆类等蛋白质含量高的样品

称取 12.5 g 均匀试样,精确到 0.01 g,置于塑料瓶(5.5)中,加入 125 mL 水,在均质机(5.6)上高速浸提 3 min,转移约 50 mL 匀浆到 50 mL 离心管(5.7)离心 10 min,取上清液 20.00 mL 到另一 50 mL 聚丙烯离心管(5.7),加入 100 μL HCl,盖上盖,离心 10 min,取 15.0 mL 上清液于另一离心管(5.7),以下按 7.1.1 中“加入 15.0 mL 二氯甲烷”之后的步骤操作。

7.1.4 坚果等含油量高的样品

称取 12.5 g 均匀试样,精确到 0.01 g,置于塑料瓶(5.5)中,加入 125 mL 水,在均质机(5.6)上高速浸提 3 min,转移约 50 mL 匀浆到 50 mL 离心管(5.7)离心 10 min,取上清液 20.00 mL 到另一 50 mL 聚丙烯离心管(5.7),加入 15 mL 二氯甲烷,振摇 2 min~3 min,离心 10 min,弃去离心液中的有机层,再加入 15.0 mL 二氯甲烷,以下按 7.1.1 中“振摇 2 min~3 min”之后的步骤操作。

7.2 净化

移取 1.00 mL 样品提取液过固相萃取柱(4.17),自然垂滴,待上清液完全流出后,用 15 mL CAX 洗脱液(4.9)淋洗,淋洗液收集于 50 mL 圆底烧瓶,在 $\leq 40^\circ\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至近干,用 2.00 mL CAX 洗脱液(4.9)充分溶解残渣,待衍生。经 CAX 柱净化后的收集液和 2.0 mL 溶解定容液均可在 $< 5^\circ\text{C}$ 保存 7 d。

7.3 衍生化

移取 1.6 mL 衍生试剂到衍生玻璃瓶(5.3)中,盖上盖,放置于干冰浴中冷却到 -40°C ~ -60°C 。用移液器取 50.0 μL 样品净化液,将移液头伸入衍生瓶中液面以下缓慢释放样液,盖上盖,将衍生瓶再放入干冰浴中冷却,3 min 后取出,放至室温,在 85°C ~ 90°C 水浴反应 1 h,每隔 15 min 振摇一次。反应结束后取出衍生瓶,放至室温,在 40°C ~ 50°C 水浴中氮气吹干,继续通氮气 30 min 后盖上盖。用注射器移取 250.0 μL 柠檬醛乙酸乙酯溶液(4.11)注射到衍生瓶内溶解残渣,此液供气质联用仪测定。

7.4 测定

7.4.1 气相色谱—质谱参考条件

色谱柱温度: 90℃ 保持 1.5 min, 20℃/min 程序升温到 300℃, 保持 4 min;

进样口温度: 200℃;

接口温度: 250℃;

载气: 氦气, 纯度不低于 99.999%, 流速 0.9 mL/min;

进样方式: 分流进样, 分流比为 1 + 1;

电离模式: 电子电离(EI);

电离电压: 70 eV;

质谱调谐: 做标准调谐后, 在 m/z 350~650 范围进行手动调谐;

检测用草甘膦衍生物和 AMPA 衍生物的特征质谱峰分别为: m/z 611.5、584、460(m/z 611.5 为基峰离子)和 m/z 372、446、502(m/z 446 为基峰离子);

溶剂延迟时间: 3.5 min。

7.4.2 定性和定量

取合适浓度的草甘膦及 AMPA 混合标准工作液 50.0 μ L, 按 7.3 进行衍生反应。待仪器稳定后进行测定。取衍生后的标准液在 m/z 350~650 范围内做全扫描(scan)得到总离子流色谱图, 分别取 1.0 μ L 衍生后的混合标准液和样品液交替进样, 选择离子模式(SIM)采集数据, 以相对保留时间、特征离子的丰度比作为定性依据; 用外标单点或多点校正法、峰面积或峰高定量。单点校正时选择的标准溶液响应值应在样品溶液响应值 50%~200% 范围内。同时做空白试验。

上述色谱—质谱条件下 AMPA 衍生物和草甘膦衍生物的相对保留时间分别为 4.61 min 和 5.49 min。

8 结果计算

样品中草甘膦残留量以质量分数 w 计, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按公式(1)计算。

$$w = \frac{(\rho_1 + \rho_2) \times V}{m} \times K \dots\dots\dots (1)$$

式中:

w ——样品中草甘膦残留量, 单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_1 ——样液中草甘膦质量浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

ρ_2 ——样液中 AMPA 质量浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

V ——样液最后定容体积, 单位为毫升(mL);

m ——试样的质量, 单位为克(g);

K ——稀释倍数。

结果以两次测定的算术平均值表示, 测定值保留两位有效数字。

9 允许差

相对相差 $\leq 15\%$ 。

10 方法检出限和回收率

最小检出量为 0.2 μ g, 在称样量为 25 g 时, 方法检出限为 0.02 mg/kg。

方法回收率: 添加浓度 0.05 mg/kg~1.0 mg/kg 时, 蔬菜回收率范围为 86.7%~104.7%; 水果回收率范围为 84.2%~96.3%; 粮食回收率范围为 88.9%~101.8%。

11 色谱图

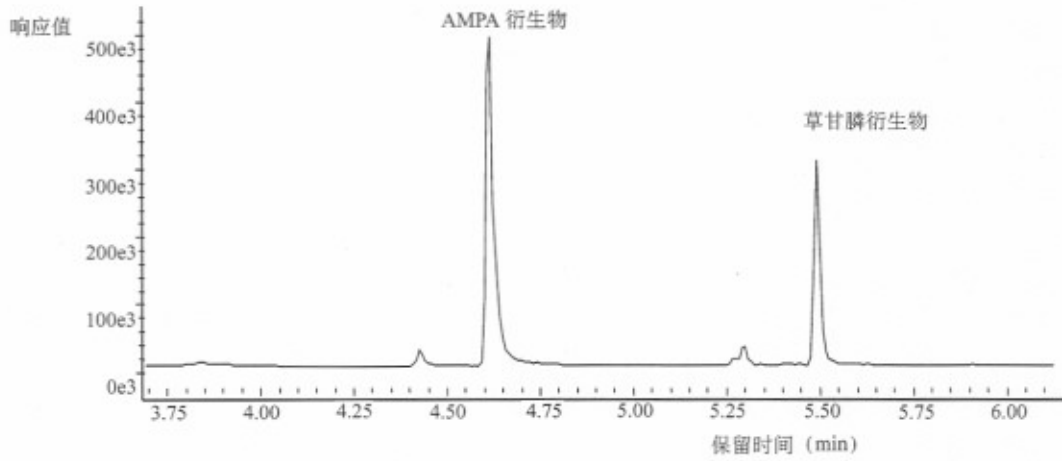


图 1 草甘膦衍生物和 AMPA 衍生物标准溶液总离子流色谱图

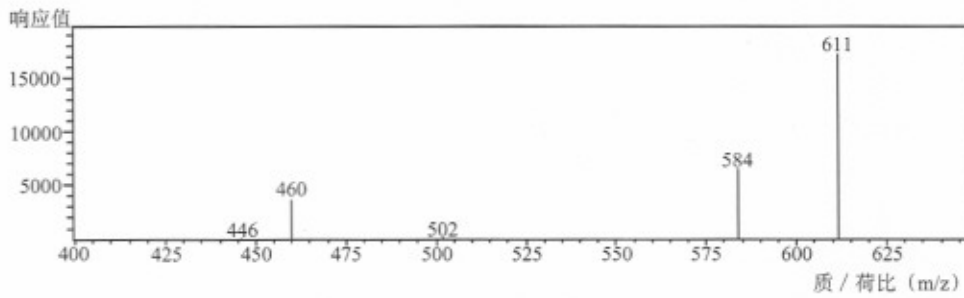


图 2 草甘膦衍生物质谱图

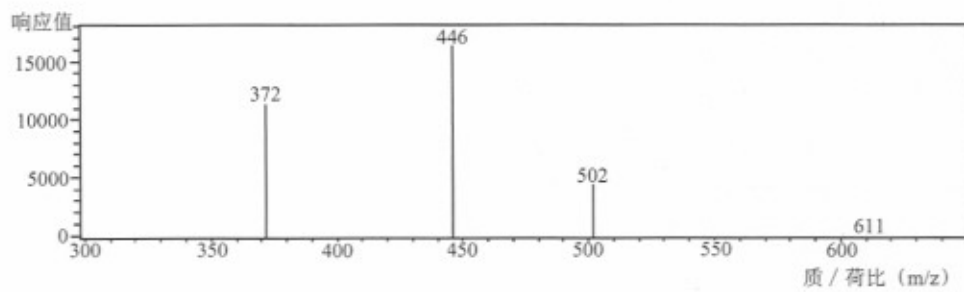


图 3 AMPA 衍生物质谱图