

# 使用 Agilent Bond Elut PPL 对水中的有机磷农药进行固相萃取

## 应用简报

环境

### 作者

Marica Beggio 和 Michele Pozzebon  
dtoLABS, via Fratta 25 31023,  
Resana (TV), Italy

Joan Stevens 和 Francesco Spadola  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简报介绍了用于液相色谱/串联质谱农药分析的水样 SPE 处理方法。研究中分析了 16 种极性不同的有机磷农药。对比使用 Agilent Bond Elut PPL 与液液萃取 (LLE) 进行样品前处理。固相萃取 (SPE) 是一种有用的样品前处理技术，它能得到非常纯净的萃取物，并有内置的浓缩步骤。使用 SPE 可以避免许多与 LLE 相关的问题，如相分离不完全、回收率达不到定量要求、需要使用昂贵且易破碎的专用玻璃器皿，以及需要处理大量有机溶剂。SPE 比 LLE 更为高效，不但能轻松实现定量萃取，而且还可实现快速的自动运行，从而减少了溶剂用量，缩短了实验耗时。

采用动态多反应监测 (dMRM) 模式下的 LC/MS/MS 进行分析。所有农药的定量限 (LOQ) 均低于 5 µg/L。5 µg/L 下的回收率为 70%-135%。在所有情况下，回收率的相对标准偏差均小于 10%。



**Agilent Technologies**

## 前言

随着许多有机氯农药在 20 世纪 70 年代的禁用，农药行业将目光转向了更容易降解的有机磷农药 (OP)。除了用于世界各地的家庭和工厂，有机磷农药还广泛用于农业和兽药领域。虽然这些农药在环境中存在的时间很短，但对人类和其他哺乳动物有很强的毒性。这些农药集中在脂肪组织中，且代谢速度很快，因此很难在食物链中对其进行分析 [1]。这些农药的广泛使用和急性毒性会造成一定的环境危害，还会使饮用水、地表水、地下水、水果、蔬菜及其他食品受到有机磷农药的污染，从而引起越来越多的社会关注 [2,3]。美国国家环保局 (EPA) 等多家机构均监测到环境中存在有机磷农药。

测定水中的有机磷农药前通常需要进行样品前处理，对农药进行萃取和浓缩，以供 GC/MS 或 LC/MS 分析。液液萃取 (LLE) 是一种常用的样品前处理方法，但其步骤较为繁琐，且需要用到大量危险且昂贵的溶剂。固相萃取 (SPE) 极大地减少了溶剂消耗。其内置的浓缩步骤对大体积样品显现出明显优势，工作量更少，还可以自动运行。

Agilent Bond Elut PPL 可高效萃取有机磷农药。这款产品的颗粒较大，可有效处理颗粒含量高的样品。苯乙烯-二乙烯基苯 (SDVB) 颗粒专有独特的极性官能团，能够为非极性分析物、有机磷农药和其他极性分析物（主要是水溶性化合物）提供非极性和静电/极性/ $\pi$ - $\pi$  保留机会。

本研究旨在开发一种快速有效分析多种水源中有机磷农药的方法。LC/MS/MS 可在动态多反应监测模式 (dMRM) 下实现高灵敏度的定量分析。LC/MS/MS 的运行时间为 15 分钟。使用聚合 BE-PPL 作为 SPE 吸附剂对 16 种有机磷农药进行富集，萃取效率得到了提高。

## 实验部分

所有试剂和化学药品均为 LC/MS 级。乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH)、乙醇 (EtOH)、异丙醇、冰乙酸和甲酸铵购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。盐酸 (37% w/v) 购自 Fluka (Sleinheim, Germany)。pH 为 4.01、7.00 和 10.01 的缓冲液来自安捷伦科技公司（安捷伦科技有限公司，Wilmington, DE, USA）。Milli-Q 超纯水购自 Sartorius (Sartorius AG, Goettingen, Germany)。甲酸 (FA) 购自 Millipore (EDM Millipore Corporation, MA, USA)。定制农药混标溶液购自 Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA)。

### 溶液与标准品

将 50 mL 乙醇和 50 mL 乙腈混合，配制 1:1 的乙醇/乙腈活化溶液。将 0.157 g 甲酸铵和 50  $\mu$ L 甲酸溶于 500 mL Milli-Q 水中，配制成流动相 A（5 mM 甲酸铵的 0.01% 甲酸溶液）。将 0.157 g 甲酸铵和 50  $\mu$ L 甲酸溶于 500 mL 甲醇中，配制成流动相 B（5 mM 甲酸铵的 0.01% 甲酸溶液）。

将农药混标储备液（100  $\mu$ g/mL，16 种农药的甲醇溶液）储存在 4  $^{\circ}$ C 的环境下。1000  $\mu$ g/L 农药溶液的日常配制方法是将 10  $\mu$ L 农药混标储备液稀释到 1000  $\mu$ L 乙腈中。

将 1、2、5、10、20、50、100  $\mu$ L 的 1000  $\mu$ g/L 农药溶液分别稀释到 1000  $\mu$ L 乙腈中，配制用于绘制校准曲线的溶液。每个校准点对应的最终浓度分别是 1、2、5、10、20、50 和 100  $\mu$ g/L。将 1000  $\mu$ g/L 农药溶液稀释到乙腈中，配制浓度为 5  $\mu$ g/L 的三个 QC（质量控制）样品。

进行回收测试前，在 500 mL 的 Milli-Q 水中加入 20  $\mu$ L 的 1000  $\mu$ g/L 农药溶液，并在进行 SPE 流程前加入盐酸将溶液酸化至 pH 2。

进行实际样品的回收测试前，在 500 mL 地下水加入 20  $\mu$ L 的 1000  $\mu$ g/L 农药溶液，并在进行 SPE 前加入盐酸将溶液酸化至 pH 2。

## 仪器

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
- 配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统
- Agilent 3200P pH 测量仪
- Agilent Vac Elut 真空歧管, 最大压力 30 bar (部件号 12234103)
- Agilent Bond Elut 接头 (部件号 12131001)
- Agilent Bond Elut PPL SPE 柱 200 mg, 3 mL (部件号 12105005)
- Sartorius Arium Pro Milli-Q 制水装置
- 安捷伦自动进样器 2 mL 玻璃样品瓶和瓶盖 (部件号 5190-2279)

## 条件

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 色谱柱:   | Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 柱<br>2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 1200 bar (部件号 959758-902) |    |
| 流动相:   | A) 5 mM 甲酸铵水溶液, 0.01% 甲酸;<br>B) 5 mM 甲酸铵甲醇溶液, 0.01% 甲酸                                    |    |
| 流速:    | 0.3 mL/min  |    |
| 柱温:    | 45 °C   |    |
| 进样量:   | 2 μL  |    |
| 进样针清洗: | 80:15:5 异丙醇:水:冰乙酸, 30 s   |    |
| 梯度:    | 时间  | %B |
|        | 0.0   | 5  |
|        | 0.8   | 40 |
|        | 3.5   | 40 |
|        | 5.0   | 60 |
|        | 6.0   | 60 |
|        | 12.0  | 65 |
|        | 17.0  | 95 |
| 后运行:   | 3.0 min   |    |
| 总运行时间: | 20.0 min  |    |

### 质谱条件

| 参数     | 值 (+)    | 值 (-)    |
|--------|----------|----------|
| 干燥气温度: | 325 °C   | 325 °C   |
| 干燥气流速: | 9 L/min  | 9 L/min  |
| 雾化器压力: | 40 psi   | 40 psi   |
| 鞘气温度:  | 400 °C   | 400 °C   |
| 鞘气流速:  | 11 L/min | 11 L/min |
| 毛细管电压: | 3500 V   | 3500 V   |
| 喷嘴电压:  | 400      | 0        |

表 1 列出了用于有机磷农药分析的仪器采集数据。

表 1. 用于 16 种有机磷农药 LC/MS/MS 分析的仪器采集数据

| 有机磷农药 | MRM 离子对<br>(m/z) | 碎裂电压<br>(V) | CE (V) | 保留时间<br>(min) |
|-------|------------------|-------------|--------|---------------|
| 乙基谷硫磷 | 346.0 → 137.1    | 80          | 20     | 10.60         |
|       | 346.0 → 97.0     |             | 32     |               |
|       | 346.0 → 77.1     |             | 45     |               |
|       | 346.0 → 160.0    |             | 10     |               |
|       | 346.0 → 132.0    |             | 10     |               |
| 谷硫磷   | 318.1 → 261.0    | 80          | 14     | 7.71          |
|       | 318.1 → 132.0    |             | 8      |               |
| 毒虫畏   | 359.1 → 155.1    | 120         | 10     | 14.35         |
|       | 359.1 → 99.0     |             | 10     |               |
| 蝇毒磷   | 363.0 → 306.9    | 120         | 15     | 13.82         |
|       | 363.0 → 227.0    |             | 20     |               |
| 甲基内吸磷 | 231.0 → 89.0     | 80          | 10     | 4.60          |
|       | 231.0 → 61.0     |             | 35     |               |
| 敌敌畏   | 223.0 → 109.0    | 120         | 10     | 4.50          |
|       | 221.0 → 145.0    |             | 15     |               |
|       | 221.0 → 127.0    |             | 20     |               |
|       | 221.0 → 109.0    |             | 15     |               |
| 乐果    | 230.0 → 199.0    | 80          | 8      | 3.17          |
|       | 230.0 → 125.0    |             | 20     |               |
| 杀螟硫磷  | 278.0 → 125.0    | 121         | 16     | 9.63          |
|       | 278.0 → 109.0    |             | 12     |               |
| 倍硫磷   | 279.1 → 246.8    | 115         | 4      | 13.01         |
|       | 279.1 → 168.9    |             | 12     |               |
|       | 279.0 → 109.1    |             | 24     |               |
|       | 279.0 → 105.1    |             | 20     |               |
| 马拉硫磷  | 331.0 → 285.0    | 80          | 5      | 9.41          |
|       | 331.0 → 127.0    |             | 5      |               |
| 速灭磷   | 225.1 → 193.0    | 100         | 15     | 3.55          |
|       | 225.1 → 127.0    |             | 15     |               |
| 氧化乐果  | 214.0 → 183.0    | 80          | 5      | 1.95          |
|       | 214.0 → 125.0    |             | 20     |               |
| 对硫磷   | 292.0 → 264.0    | 100         | 5      | 12.21         |
|       | 292.0 → 236.0    |             | 10     |               |
|       | 292.0 → 97.0     |             | 32     |               |
|       | 292.0 → 94.1     |             | 45     |               |
| 甲基对硫磷 | 264.0 → 125.0    | 120         | 20     | 8.19          |
|       | 264.0 → 79.0     |             | 40     |               |
| 三唑磷   | 314.1 → 162.1    | 120         | 20     | 10.13         |
|       | 314.1 → 119.0    |             | 20     |               |
| 敌百虫   | 256.9 → 221.0    | 120         | 5      | 3.24          |
|       | 256.9 → 109.0    |             | 15     |               |

## 样品前处理

用量筒量取 500 mL 水样，倒入 800 mL 玻璃瓶中。在经过校准的 pH 计辅助下，用 37% 盐酸将溶液 pH 调节到 2。将一根外径 1/8 英寸的 PTFE 管置于样品瓶瓶底，使其靠向一边。将 PTFE 管的另一端与固定在 Bond Elut PPL SPE 柱顶部的接头塞相连，并将 SPE 柱安装在 Agilent Vac Elut 真空歧管的快速释放阀上。从样品容器中直接抽出样品，并通过真空上样至预活化 SPE 柱中（图 1）。

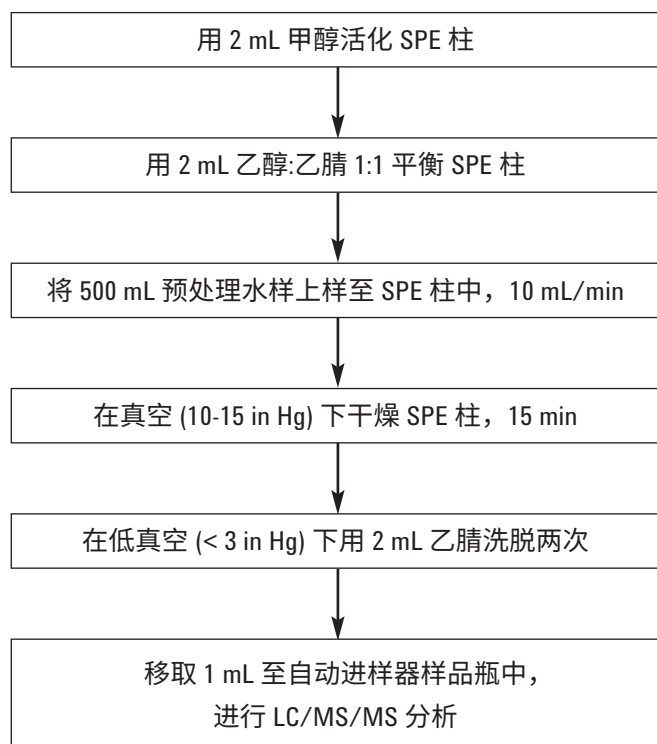


图 1. 水中有机磷农药的固相萃取流程

## 结果与讨论

### 色谱分离

采用优化后的 LC/MS/MS 条件对 16 种有机磷农药进行分离。图 2 显示了典型的色谱图。根据标准溶液的保留时间和质谱图离子对确定有机磷农药的峰归属。

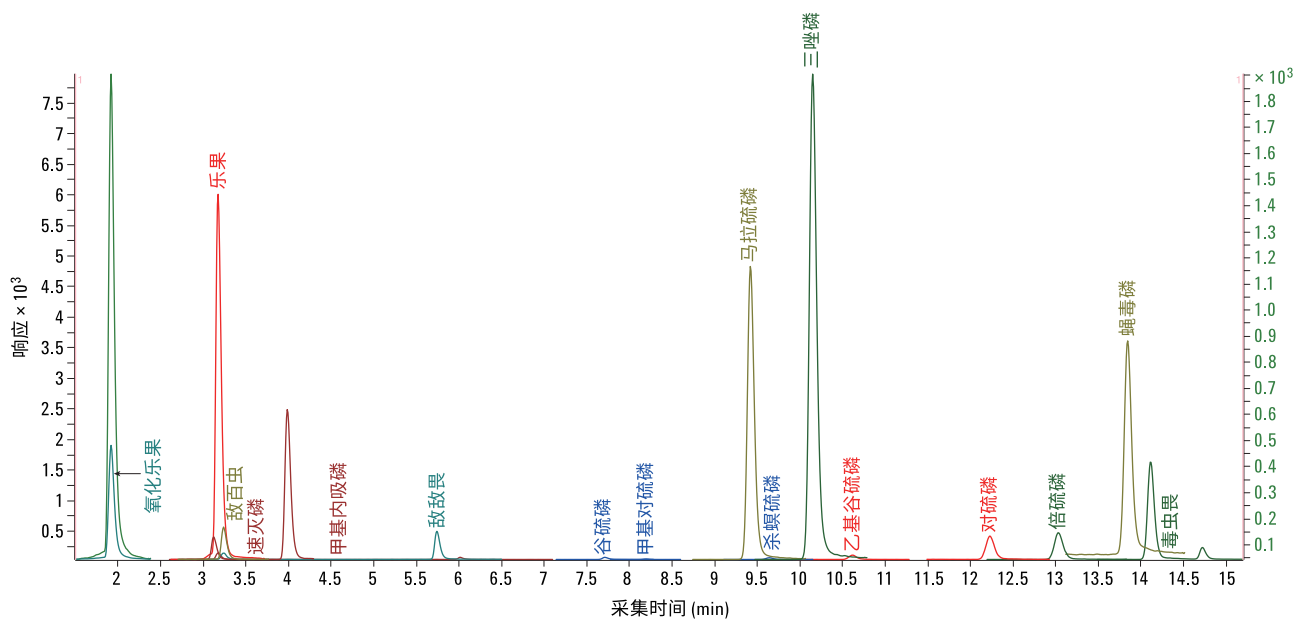


图 2. 5  $\mu\text{g/L}$  萃取水样中 16 种有机磷农药的色谱图

## 回收率与重现性

用 MilliQ 水和地下水样品测试回收率和重现性。经过测试和测定得知，地下水中不含农药。在 MilliQ 和地下水加入 20  $\mu\text{L}$  的 1000  $\mu\text{g/L}$  农药混标乙腈溶液，用 37% 盐酸将溶液酸化至 pH 2，然后用 SPE 柱进行处理，使最终浓度达到预期的 5  $\mu\text{g/L}$ 。

分别用三个样品和三根 SPE 柱平行进行三次 MilliQ 水的回收率测试。分别用五个样品和五根 SPE 柱平行进行五次地下水的回收率测试。根据峰面积得到所有的定量分析结果。每种萃取物进样三次。

表 2 列出了 5  $\mu\text{g/L}$  有机磷农药加标 MilliQ 水样品和 5  $\mu\text{g/L}$  有机磷农药加标地下水样品的回收率，以及添加 16 种有机磷农药的地下水样品的相对标准偏差。所有化合物在 1-100  $\mu\text{g/L}$  的范围内均得到了线性校准曲线。

用乙腈稀释 1000  $\mu\text{g/L}$  农药混合溶液，配制出的样品用于绘制校准曲线。计算 N 次重复分析样品浓度标准偏差的 10 倍作为 LOQ 结果，符合官方认可的指导原则 [4] 中的规定。使用 Agilent MassHunter 定量软件以 5  $\mu\text{g/L}$  的浓度进行 5 次重复计算（表 2）。

表 2. 16 种有机磷农药的 5  $\mu\text{g/L}$  水空白和地下水样品得到的回收率

| 农药    | 5 $\mu\text{g/L}$<br>水空白的<br>回收率 | 5 $\mu\text{g/L}$<br>地下水样品的<br>回收率 | %RSD<br>(地下水) | LOQ<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 线性<br>( $R^2$ ) |
|-------|----------------------------------|------------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------|
| 氧化乐果  | 73.0                             | 84.5                               | 7.3           | 3.04                        | 0.9996          |
| 乐果    | 108.8                            | 117.5                              | 4.9           | 2.96                        | 0.9999          |
| 敌百虫   | 135.0                            | 142.4                              | 4.3           | 3.65                        | 0.9874          |
| 速灭磷   | 109.9                            | 110.3                              | 4.0           | 2.47                        | 0.9996          |
| 甲基内吸磷 | 98.6                             | 99.2                               | 6.0           | 1.55                        | 0.9997          |
| 敌敌畏   | 96.1                             | 92.4                               | 3.7           | 1.02                        | 0.9986          |
| 谷硫磷   | 108.3                            | 111.9                              | 4.6           | 2.01                        | 0.9998          |
| 甲基对硫磷 | 109.3                            | 110.2                              | 6.7           | 4.83                        | 0.9993          |
| 马拉硫磷  | 108.3                            | 106.7                              | 3.4           | 2.12                        | 0.9995          |
| 杀螟硫磷  | 108.6                            | 105.0                              | 5.0           | 3.38                        | 0.9995          |
| 三唑磷   | 107.9                            | 105.8                              | 3.2           | 1.88                        | 0.9998          |
| 乙基谷硫磷 | 108.4                            | 105.8                              | 4.5           | 2.24                        | 0.9998          |
| 对硫磷   | 108.4                            | 105.0                              | 3.7           | 2.08                        | 0.9997          |
| 倍硫磷   | 86.1                             | 75.5                               | 8.1           | 3.59                        | 0.9998          |
| 蝇毒磷   | 107.4                            | 102.5                              | 3.4           | 2.14                        | 0.9992          |
| 毒虫畏   | 109.2                            | 106.9                              | 3.2           | 1.84                        | 0.9998          |

## 结论

使用 Bond Elut PPL 的这一简单 SPE 流程是一项高效的技术，可对水样中浓度相当于或接近于地下水中监测 MRL 水平的 16 种有机磷农药进行预浓缩。这项技术便捷且经济，具有出色的回收率和重现性。工作流程解决方案包括通过 SPE 对痕量分析物的必要浓缩、在液相色谱系统上的有效分离，以及 LC/MS/MS 出色的灵敏度和选择性。

## 参考文献

1. Du Bois, K. P. The Toxicity of Organophosphorus Compounds in Mammals. *Bull. World Health Organization*, **1971**, *44*, 233-240
2. Sun, Q.; Zhu, L.; Dong, M. Risk Assessment of Organic Pesticides Pollution in Surface Water of Hangzhou. *Environ. Monit. Assess.* **2006**, *117*, 377-385
3. Ma, J.; et al. Determination of Organophosphorus Pesticides in Underground Water by SPE-GC-MS0. *J. Chromatographic Science*, **2009**, *47*, 110-115
4. Ripp, J. *Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits*. Wisconsin Department of Natural Resources Laboratory Certification Program PUBL-TS-056-96, April **1996**

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014

2014 年 11 月 7 日，中国出版

5991-5304CHCN



**Agilent Technologies**