

地表水和饮用水中未衍生草甘膦和其他极性农药的测定

使用反相色谱和串联质谱的联用系统

作者

Jean-Francois Roy,
Jarod N. Grossman,
Tarun Anumol
安捷伦科技有限公司

摘要

事实证明，鉴于草甘膦和其他强极性农药的极性，难以对地表水和饮用水中纳克/升 (ng/L) 级别的这些化合物进行准确定量。本文介绍了一种简单、高效的方法，采用液相色谱与串联质谱联用系统 (LC/TQ)。该方法包括无需衍生化的快速、高效的样品前处理，稳定的反相色谱，以及用于常规分析的极其灵敏的质谱检测。

主要优势

- 饮用水的方法检测限 (MDL)：草甘膦为 10 ng/L (ppt)
- 无需进行样品稀释；该方法可处理大体积进样的水样
- 常用的酸性 LC/MS 流动相；无需专用的 LC/TQ 系统

前言

草甘膦是一种合成的广谱除草剂，在农业和居住区中应用广泛。草铵膦由植物天然产生，但也可以在工业中大规模合成。两者被植物、土壤和水中的细菌分别降解为氨甲基磷酸 (AMPA) 和 3-(甲基磷酸亚基)丙酸 (MPPA)。事实证明，难以对地表水和饮用水中亚 $\mu\text{g/L}$ 级别的这些化合物和其他极性农药 (2-羟基乙基磷酸 (HEPA)、草铵膦-N-乙酰 (NAG)、乙烯利和乙磷铝) 进行准确定量，因为需要克服两个主要的挑战。

第一个挑战来自于这些农药的极性 (图 1)，这一性质使样品前处理及其在传统反相色谱柱上的保留性能变得复杂。多年来，行业中已经对此提出并开发了多种方法，将准确定量的两个关键步骤——样品前处理和色谱分析结合起来^[1]。然而，大多数现有方法都耗时且通量较低，需要大量的样品前处理或由专家级的分析人员来执行，才能应用于常规环境。

另一个挑战来自于强极性农药对 HPLC 流路中痕量金属的亲合力，这会导致峰拖尾^[2]。痕量金属可在流路中的多种组件 (流动相、玻璃容器和不锈钢 (SST) 管等) 中找到，且难以彻底清除。同样，使用了多种方法来涵盖 HPLC 系统中的痕量金属 (钝化、螯合、使用具有更高 pH 值的流动相等)，并取得了不同程度的成功。

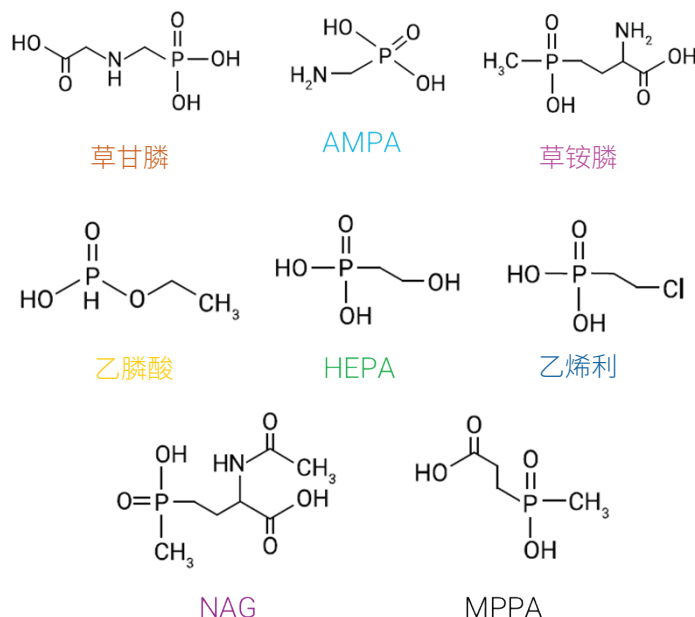


图 1. 分析物结构

本研究提出了一种克服了这两个挑战的简单、高效的方法，其中包括快速的样品前处理、稳定的反相色谱以及用于常规分析的高灵敏度质谱检测。

实验部分

化学品与试剂

- **草甘膦**: Sigma-Aldrich (部件号 45521-250MG)
- **AMPA**: Sigma-Aldrich (部件号 324817-250MG)
- **草铵膦**: Sigma-Aldrich (部件号 45520-100MG)
- **乙磷铝**: Toronto Research Chemicals Inc (部件号 F727450)
- **HEPA**: Toronto Research Chemicals Inc (部件号 H939650)
- **乙烯利**: Toronto Research Chemicals Inc (部件号 C366175)

- **NAG**: Toronto Research Chemicals Inc (部件号 A178235)
- **MPPA**: Sigma-Aldrich (部件号 31264-100MG)
- **甲酸**: 安捷伦科技公司 (部件号 G2453-85060)
- **甲醇**: 安捷伦科技公司 (部件号 5191-4497)
- **Agilent InfinityLab 去活剂添加剂**: 安捷伦科技公司 (部件号 5191-4506)

样品前处理

- 将地表水样品收集于 15 mL 聚丙烯 (PP) 管中。随后将试管以 5000 rpm 的转速离心 5 分钟。然后将 1.5 mL 左右的各上清液载入装有安捷伦 0.2 μm 聚醚砜 (PES) 滤膜 (部件号 5190-5096) 的塑料注射器中，并过滤到 1.5 mL PP 管中
- 将饮用水样品直接收集于装有安捷伦 0.2 μm PES 滤膜 (部件号 5190-5096) 的塑料注射器中，并过滤到 1.5 mL PP 管中

接下来，移取 999 µL 每种滤液至 2 mL HPLC 样品瓶中，用 1 µL 浓甲酸酸化，使甲酸的最终浓度为 0.1%。将样品瓶盖紧并短暂涡旋混合。

标样配制

在 15 mL 聚丙烯管中，通过在 10 mL 超纯（I 类）水中稀释 10 mg 的每种标准品，制备 AMPA、草甘膦、草铵膦、MPPA、HEPA、NAG、乙膦酸和乙烯利的单标储备液。

表 1. 按照连续稀释法制备基质匹配校准标样

校准标样	农药浓度 (µg/L)
13	10
12	5
11	2.5
10	1
9	0.75
8	0.5
7	0.25
6	0.1
5	0.075
4	0.05
3	0.025
2	0.01
1	0.005

用酸化（0.1% 甲酸）地表水或酸化饮用水对校准曲线进行基质匹配。如样品前处理部分所述，制备得到足够体积的空白基质。然后，在 1.5 mL PP 管中分别将八种农药的 1 µL 单标储备液与 992 µL 空白基质混合，制备得到常用农药储备液（1000 µg/L）。随后，在相同的空白基质中制备得到 100 µg/L 的额外常用储备液，然后按照连续稀释法制备得到 0.005–10 µg/L 的 13 个校准标样。实验室可以根据各自的 QA/QC 要求减少校准点。

仪器条件

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 G7120A
- 配备样品盘冷却选件的 Agilent 1290 Infinity II Multisampler G7167B
- Agilent 1290 Infinity II 集成式柱温箱 G7116B

表 2. UHPLC 条件

UHPLC 方法参数			
运行时间	8 min		
再平衡时间	12 min		
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 693775-942)		
流动相 A	0.1% 甲酸 + 5 µmol/L 的 Agilent InfinityLab 去活剂添加剂的超纯水溶液		
流动相 B	0.1% 甲酸的甲醇溶液		
进样量	25 µL		
进样针清洗	用 0.1% 甲酸的甲醇溶液冲洗进样口 3 秒		
Multisampler 温度	4 °C		
柱温	40 °C		
流速	0.35 mL/min		
梯度	时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
	0	99.9	0.1
	1.5	99.9	0.1
	2	80	20
	4	60	40
	4.1	0	100
	8	0	100

表 3. 质谱参数

Agilent 6470A 三重四极杆液质联用系统				
采集模式	动态 MRM (dMRM)			
离子源	安捷伦喷射流 ESI			
极性	正 (+) 或负 (-)			
毛细管电压	3000 V (+), 3500 V (-)			
干燥气流速	11 L/min			
干燥气温度	220 °C			
雾化器压力	30 psi			
鞘气温度	300 °C			
鞘气流速	11 L/min			
喷嘴电压	1500 V (+), 800 V (-)			
Q1 和 Q2 分辨率	单位 (0.7 amu), 调谐优化			
Delta EMV	0 V			
MRM 离子对	化合物	定量离子	定性离子 1	定性离子 2
	AMPA	112 → 30 (+)	110 → 79 (-)	110 → 63 (-)
	草铵膦	182 → 56 (+)	182 → 136 (+)	
	草甘膦	170 → 88 (+)	170 → 60 (+)	170 → 42 (+)
	HEPA	125 → 79 (-)	127 → 81 (+)	127 → 109 (+)
	MPPA	153 → 79 (+)	153 → 135 (+)	
	NAG	224 → 56 (+)	224 → 164 (+)	224 → 136 (+)
	乙烯利	145 → 63 (+)	145 → 91 (+)	143 → 107 (-)
	乙膦酸	109 → 81 (-)	111 → 83 (+)	111 → 65 (+)

结果与讨论

分析化学家需要实现样品前处理、色谱和质谱三大技术的最佳整合，以达到极低的检测限。对于草甘膦等极性农药而言，要实现这样的整合始终是一项挑战。多年来，行业中提出了多种方法，但本应用简报中介绍的方法实现了三大技术之间的完美整合。

第一，使用这种方法，无需对水性原料进行稀释或仅需极低程度的稀释，从而降低了检测限。避免长时间处理大量原料，有助于减少人工和消耗品成本，并提高通量。同时无需衍生化处理，从而减少使用对环境有害的溶剂，节省了时间，并提升了实施的便利性。

第二，水性基质非常适用于使用化学键合相开发的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱。制备此键合相时首先使二氧化硅表面带正电荷，然后用 C18

键合相对颗粒进行官能化，从而提供对强极性、可电离分子的保留能力。使得该色谱柱与水性流动相条件和样品完全兼容。此外，这种兼容性使用户能够在不影响峰形的情况下对水性样品进行大体积进样。使用一种最常用的 LC/MS 条件（0.1% 甲酸）还可实现在同一 LC/MS 系统上从一种应用轻松过渡到另一种应用，而无需使用专用系统或进行长时间的冲洗和平衡。重要的是，这些条件还允许多数农药使用正离子模式离子对，从而提高了灵敏度。

第三，UHPLC 流路中可能存在痕量金属，会对含磷酸的化合物峰形产生不利影响，本方法通过两种方式解决了这一问题：

- 在流动相系统中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ InfinityLab 去活剂添加剂（图 3）可提供恒定的痕量金属整合，不会对正离子或负离子模式电离产生不利影响，也不会质谱仪的离子通道中积聚

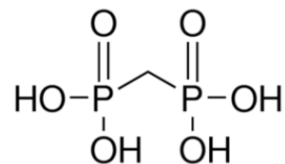


图 3. Agilent InfinityLab 去活剂添加剂中主要成分的结构

- 除去从样品入口到质谱仪的流路中的大部分不锈钢。使用带 PEEK 内衬的管线（部件号 G5667-81005）取代了 Multisampler 进样阀和色谱柱进样口之间的标准不锈钢管线。该管线与进样阀和配备 Agilent Quick Turn 接头（部件号 5067-5966）的色谱柱连接，该接头使用聚合物密封垫圈

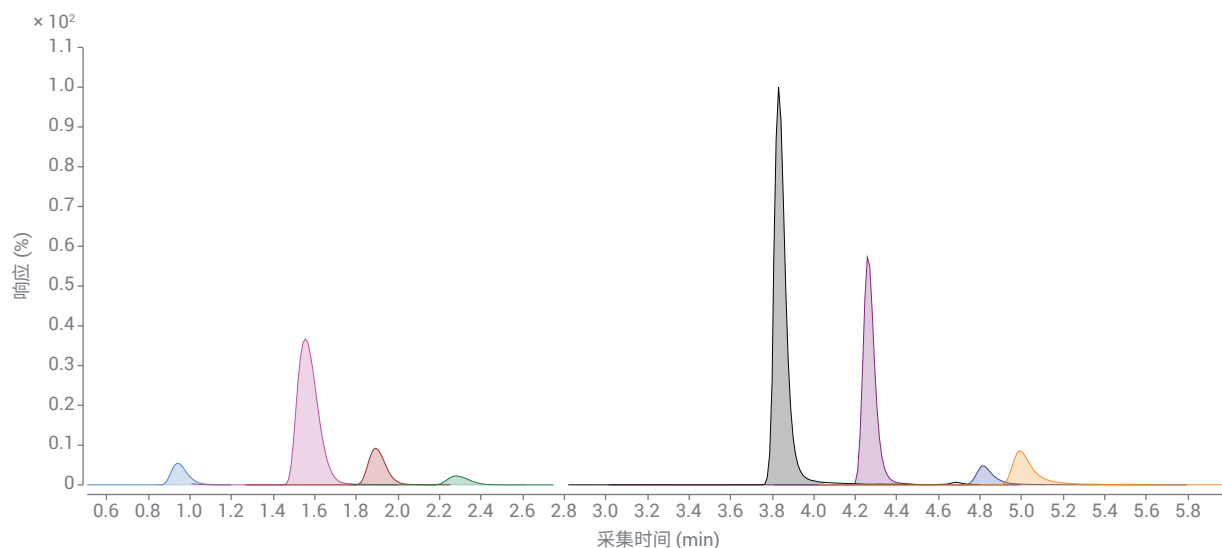


图 2. 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 的八种农药的典型色谱图。保留时间如下：AMPA = 0.95 分钟，草铵膦 = 1.6 分钟，草甘膦 = 1.9 分钟，HEPA = 2.3 分钟，MPPA = 3.8 分钟，NAG = 4.3 分钟，乙烯利 = 4.8 分钟，乙膦酸 = 5.0 分钟

最后，6470 三重四极杆液质联用系统可在同一动态 MRM 窗口中采集相同化合物的正极性和负极性信号。根据基质的不同，给定化合物可能在正极性或负极性模式下表现出更高的灵敏度（更强的信号或更低的噪音），从而使其成为一种通用的定量方法。从草甘膦的方法检测限 (MDL) 计算结果可以看出，高灵敏度 6470 即使在低 ng/L (ppt) 范围也可提供高度可重现的峰面积。

表 4. 校准结果（每个校准标样平行分析三次）

化合物	曲线类型	饮用水			河水		
		线性范围 (ng/L)	校准点数量	R ²	线性范围 (ng/L)	校准点数量	R ²
AMPA	线性	100–10000	8	0.9993	100–10000	8	0.9993
草铵膦	二次拟合	25–10000	11	0.9998	25–10000	11	0.9998
草甘膦	线性	25–10000	11	0.9995	25–10000	11	0.9997
HEPA	线性	50–10000	10	0.9995	50–10000	10	0.9994
MPPA	线性	50–10000	10	0.9991	50–10000	10	0.9986
NAG	线性	10–10000	12	0.9986	10–10000	12	0.9984
乙烯利	线性	25–10000	11	0.9990	25–10000	10	0.9989
乙磷酸	线性	10–10000	12	0.9996	10–10000	11	0.9996

校准曲线和线性范围

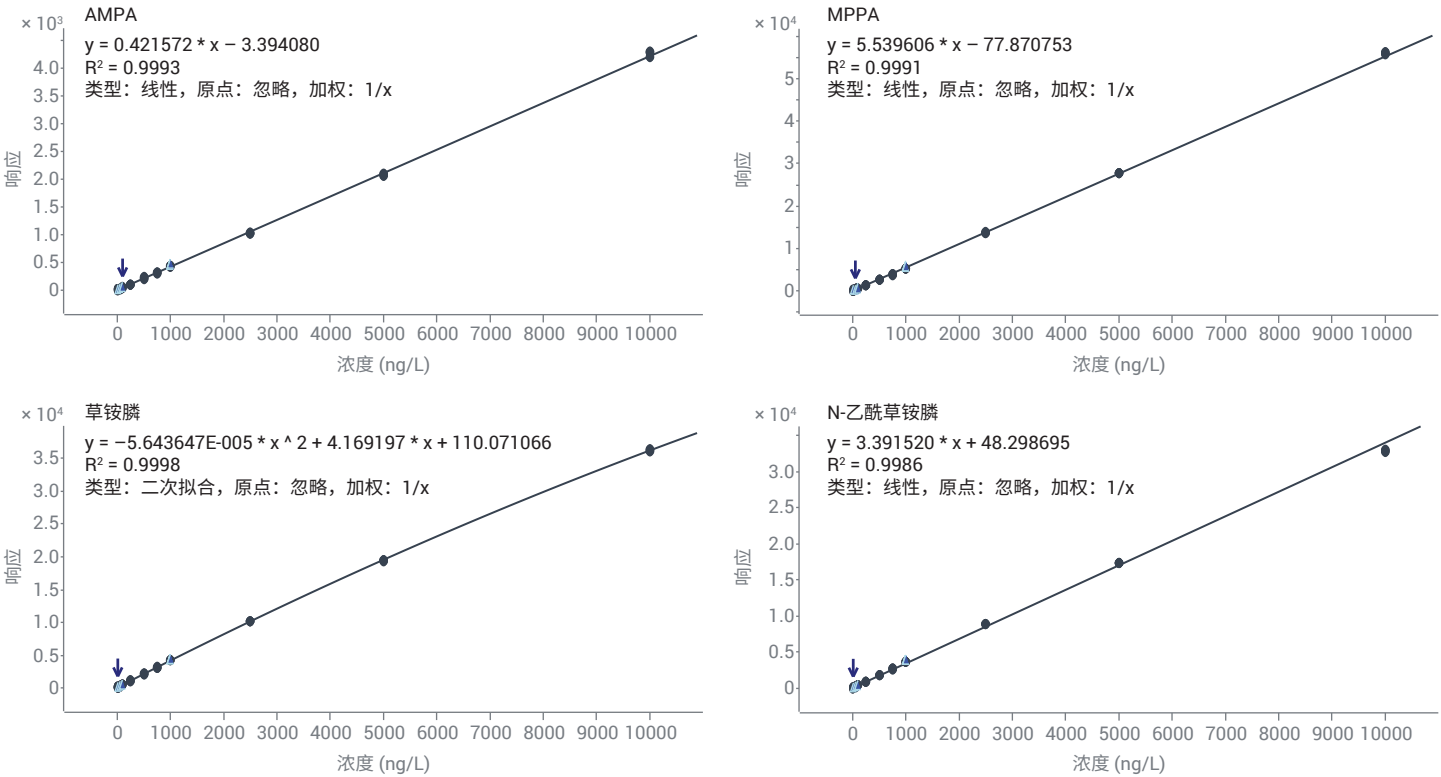


图 4. 每种农药的典型校准曲线（下页续）

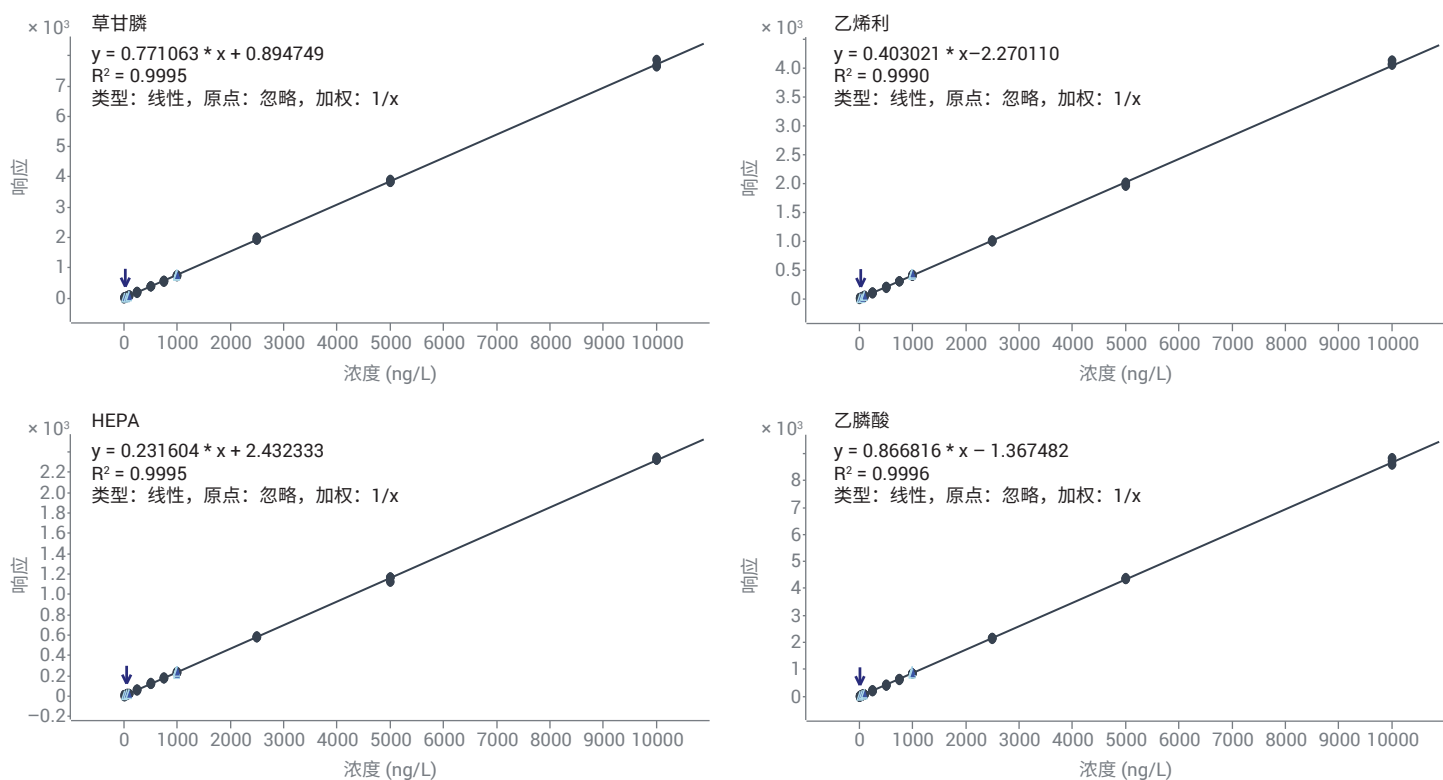


图 4. 每种农药的典型校准曲线（承上页）

定量限准确度和色谱图

表 5. 校准结果（每个校准标样平行分析三次）

	饮用水		河水	
化合物	LOQ (ng/L)	LOQ 准确度 (三次重复测定的平均值)	LOQ (ng/L)	LOQ 准确度 (三次重复测定的平均值)
AMPA	100	102.9%	100	87.6%
草铵膦	25	107.2%	25	85.6%
草甘膦	25	96.8%	25	108.6%
HEPA	50	110.9%	50	105.8%
MPPA	50	120.3%	50	118.9%
NAG	10	82.6%	10	93.4%
乙烯利	25	92.5%	50	121.7%
乙磷酸	10	108.9%	25	96.6%

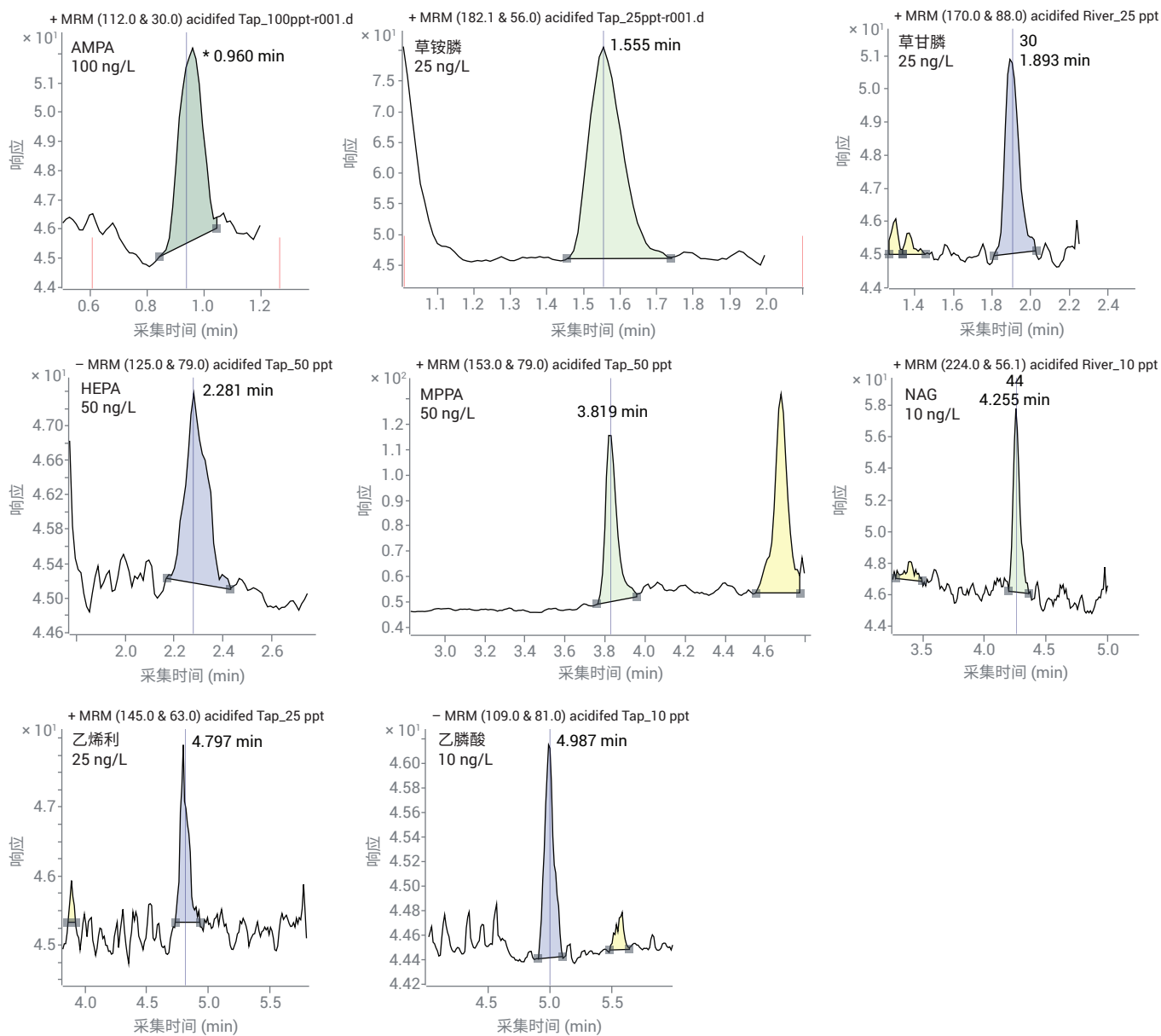


图 5. 浓度分别为各自 LOQ 的每种农药的典型色谱图

草甘膦 MDL

按照 EPA 指南，MDL 的计算基于一系列重复进样得到的重现性统计数据，用于确定柱上进样浓度，其中置信度为 99% 的样品明确且可重现地区别于基线噪音^[3]。在四天内分别使用四个不同的 10 ng/L 校准标样以及来自四个不同批次的四根不同色谱柱，通过以下公式计算草甘膦 MDL：

MDL = (柱上进样浓度) × (%RSD/100) × (t-统计值)

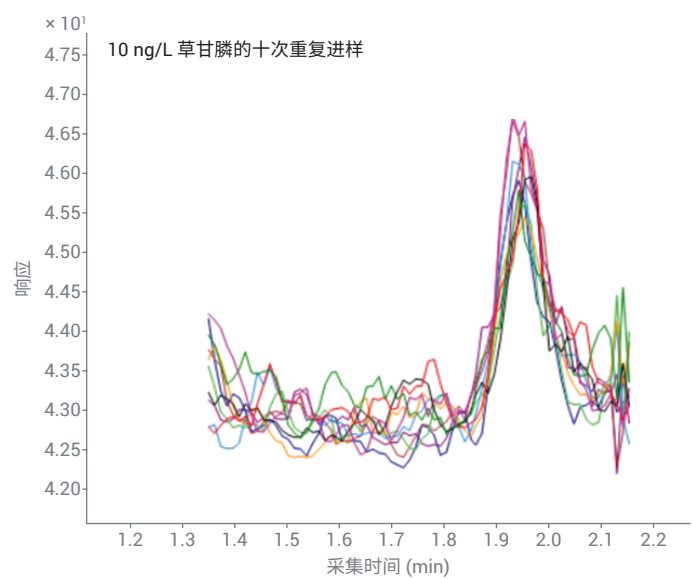


图 6. 对 10 ng/L 草甘膦校准标样进行十次重复进样获得的叠加色谱图

表 6. 草甘膦的 MDL 计算

		用户输入进样单位	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
			用户输入样品量（浓度或柱上进样量）			
		ng/L（柱上）	10	10	10	10
		重复进样编号	用户输入响应（无手动积分）			
最小值	参考值	重复进样 1	13	15	20	11
		重复进样 2	19	30	15	12
		重复进样 3	15	26	25	10
		重复进样 4	17	14	16	15
		重复进样 5	16	20	18	11
		重复进样 6	16	13	11	15
		重复进样 7	29	25	10	12
		重复进样 8	23	15	10	11
		重复进样 9	14	22	14	7
		重复进样 10	21	17	16	9
计算的参数						
%RSD (CV)		26.7%	29.7%	30.5%	21.7%	
关键 t-值 (t)		2.821	2.821	2.821	2.821	
MDL (ng/L)		7.5	8.4	8.6	6.1	

结论

本应用简报中介绍的工作流程提供了一种完美整合样品前处理、色谱和质谱分析的安捷伦解决方案，用于分析地表水和饮用水中的未衍生草甘膦和其他七种极性农药。

通过在流动相中添加 Agilent InfinityLab 去活剂添加剂，以及在 Multisampler 和色谱柱之间使用带 PEEK 内衬的管线，可最大程度减少流路中可能存在的导致极性化合物峰拖尾的痕量金属。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱采用新型反相填料；它可耐受水提取物的大体积进样，且在酸性条件下可以很好地保留这些极性化合物，而不会影响峰形。

Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统具有出色的灵敏度、重现性和线性，这些特性均适用于定量分析地表水和饮用水中具有挑战性的分析物类型。

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE44208.613275463

本文中的信息、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，2021

2021 年 1 月 13 日，中国出版

5994-2986ZHCN

致谢

衷心感谢安捷伦同事 Theresa Sosienski、Dorothy Yang、Jordy Hsiao 和 Anne Mack 对本研究的重要贡献。

参考文献

1. Zweigenbaum, J.; Lucas, D.; Cali, A. Direct Analysis of Glyphosate, AMPA, and Other Polar Pesticides in Food (直接分析草甘膦、AMPA 和食品中的其他极性农药)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-0796EN，**2019**
2. Hsiao, J. J. et al. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Analytical Chemistry* **2018**, 90(15), 9457–9464
3. US EPA, Procedures for Detection and Quantitation – Documents. <https://www.epa.gov/cwa-methods/procedures-detection-and-quantitation-documents>