

利用UPLC-MS/MS分析水中的草甘膦、AMPA和草铵膦

Marijn Van Hulle, Simon Hird

Aqualab Zuid, Waters Corporation

摘要

多项探究草甘膦和/或AMPA向水环境迁移的实验室和现场研究结果表明，这些物质可能会迁移至地表水体，这一点已得到一定认识和关注。

在水样中检测这些痕量化合物的难点在于它们在水中的高溶解性、离子特性以及与金属离子的螯合作用。这三种化合物都可以通过衍生化得到极性较低的化合物，从而改善固相萃取(SPE)和反相液相色谱(LC)保留和分离效果。芴甲氧羰基(FMOC)氯化物是这类分析中最常用的柱前衍生化试剂，它可以与LC-MS/MS结合使用，在水质监测计划中使用一种方法即可成功测定所有三种化合物。

本应用纪要介绍了一种在水样中检测草甘膦、AMPA和草铵膦的方法，使用ACQUITY UPLC I-Class系统，结合Xevo TQ-XS质谱，采用创新的UniSpray电离技术，在FMOC衍生化后无需SPE即可通过LC-MS/MS进行测定。

回收率和基质效应

所有萃取技术的目标都在于使所有相关分析物获得高效、可重现的回收率。与此前的研究工作一样，对传统MCX技术的清洗方案进行了改进，以适应苯二氮卓类药物的分析²。图4显示了来自六批不同尿样的整组化合物的平均萃取回收率。除甲丙氨酯和去甲丙氧芬以外，所有化合物（MDMA和EDDP除外）的回收率均高于70%。萃取效率

也具有一致性。所有定量化合物的变异系数(%CV)均小于10%。各批次的回收率数据符合相同的模式。分析不同批次基质获得的高效回收率证明了萃取技术的稳定性，并且对于定量分析不同来源样品中的这些化合物非常重要。

优势

- 用于测定水样中草甘膦、AMPA和草铵膦的特异性靶向方法，适用于监测饮用水和地下水/地表水是否符合欧洲法规限值。

简介

农药在农业和其他行业的广泛使用，导致地表水和地下水资源中出现了农药残留。草甘膦是全球应用最广泛的广谱除草剂之一。氨基磷酸（通常称为AMPA）是草甘膦在环境中的主要代谢物。在全球许多国家/地区，草铵膦是用于控制杂草的另一种高效除草剂，它具有相似的化学结构。这类除草剂的多样化和密集使用，意味着其残留物通过喷雾漂移、径流和排水等间接途径，以及点源污染，全年都有可能进入地表水。多项探究草甘膦和/或AMPA向水环境迁移的实验室和现场研究结果表明，这些物质可能会迁移至地表水体，这一点已得到一定认识和关注。同时，仅在深层地下水系统中零星检测到低浓度草甘膦和AMPA，表明这些化合物浸出到地下水的可行性通常较低，甚至可以忽略不计¹。

在水样中检测这些痕量化合物的难点在于它们在水中的高溶解性、离子特性以及与金属离子的螯合作用。这三种化合物都可以通过衍生化得到极性较低的化合物，从而改善固相萃取(SPE)和反相液相-色谱(LC)保留和分离效果。芴甲氧羰基(FMOC)氯化物是这类分析中最常用的柱前衍生化试剂，它可以与LC-MS/MS^{2,3,4}结合使用，在水质监测计划中使用一种方法即可成功测定所有三种化合物。

公共自来水供应商根据当地的水供应情况，从不同水源提取原水。在一些国家，饮用水几乎完全来自地下水，而在其他国家，地表水（河流、云河、湖泊或水库）是主要的饮用水来源。水中存在的农药有不同的指令进行管理。欧盟各成员国有责任定期监测水质，检查提供给消费者的水是否符合饮用水指令的要求⁵。指令中表明，样品中存在的单一农药残留上限为0.1 µg/L（总农药上限为0.5 µg/L）。一般来说，饮用水质量标准均以世界卫生组织(WHO)的饮用水指南和欧盟委员会科学咨询委员会的意见作为科学依据。《水框架指令》(WFD)⁶旨在改善整个欧洲的水质，涵盖地表水、沿海水域和地下水，并力求为整个欧洲的水提供良好的化学状态。欧盟各成员国必须确定流域特定污染物，并针对这些物质制定各自国家的环境质量标准(EQS)特定污染物是指可能对生物质量产生有害影响，并且在成员国内被认定为大量排放到水环境中的物质。在欧洲各地，这些EQS的值各不相同；例如，在英国，草甘膦的长期平均EQS为196 µg/L⁷，而在法国和德国为28 µg/L⁸。因此，需要可靠的分析方法来监测饮用水

、地表水和地下水中的这些极性除草剂。

本应用纪要介绍了一种在水样中检测草甘膦、AMPA和草铵膦的方法，使用Waters ACQUITY UPLC I-Class系统，结合Xevo TQ-XS质谱，采用创新的UniSpray电离技术，在FMOC衍生化后无需SPE即可通过LC-MS/MS进行测定。

实验

样品前处理

在环境水分析中，草甘膦与各种阳离子络合后导致回收率降低的问题已被充分认识到³。所有水样(12 mL)均经过过滤（0.22 μm纤维素膜式过滤器）；通过离子交换色谱柱（Dionex OnGuard II Na离子交换注射器小柱）去除盐和金属，将水样储存在聚丙烯(PP)容器中。每个过滤后的水样中取出的部分测试样品都进行了图1所示的衍生化处理程序。用饮用水样品制备标准溶液，并加入内标，然后使用相同的步骤对溶液进行衍生化。

方法的准确度是通过分析加标有不同浓度目标化合物的水样来评估的。使用饮用水制备浓度为0.02~2.0 μg/L的标准溶液，测定回收率加标样品中的分析物浓度并评估响应的线性。

高效液相色谱条件

UPLC系统：	配备FTN样品管理器的ACQUITY UPLC I-Class，带50 μL扩充定量环和250 μL样品注射器
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH苯基柱，1.7 μm, 2.1 × 100 mm
流动相A：	5 mM乙酸铵水溶液，pH 9（使用25%~28% NH ₄ OH溶液）
流动相B：	甲醇

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 50 μ L

柱温: 50 $^{\circ}$ C

样品温度: 10 $^{\circ}$ C

运行时间: 16 min

梯度

时间(min)	%A	%B	曲线
0	90	10	-
5	54	46	6
7	54	46	6
8	0	100	6
9.5	0	100	6
11	90	10	1

质谱条件

质谱系统: Xevo TQ-XS

离子源: UniSpray

电离模式:	US
毛细管电压:	3.0 kV
脱溶剂气温度:	550 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
离子源温度:	150 °C
锥孔气流速:	150 L/h
锥孔电压:	14 V
碰撞气体流速:	0.14 mL/min
喷雾器气压:	7 Bar

数据采集和处理

使用MassLynx MS软件(v4.2)采集数据，并用TargetLynx XS应用管理软件进行处理。单独进样所有分析物溶液，然后使用IntelliStart软件评估所得数据，据此选出MRM通道并优化关键参数，从而自动生成采集和处理方法。表1汇总了所有MRM通道的条件（包括保留时间）。利用Autodwell功能自动设置最佳驻留时间。本研究使用稳定同位素标记的AMPA作为草铵膦测定的内标。*

*目前，已有多家供应商可提供草铵膦-D₃。

化合物	保留时间 (min)	MRM	CE (eV)	驻留时间 (s)
FMOC-草甘膦	3.0	392>179	26	0.080
		392>88	16	0.080
		392>214	8	0.080
FMOC-草铵膦	4.3	404>136	22	0.043
		404>179	28	0.043
		404>119	35	0.043
FMOC-AMPA	4.7	334>156	8	0.043
		334>179	22	0.043
		334>112	10	0.043
FMOC-草甘膦- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	3.0	394>179	26	0.080
AMPA- ¹³ C, ¹⁵ N, D ₂	4.7	338>160	8	0.043

表1.草甘膦、草铵膦、AMPA及其稳定同位素类似物的MRM参数（粗体为定量通道）。

结果与讨论

UniSpray是一款创新的专有电离源，可提供更高的电离效率⁹。UniSpray离子源独特的几何结构能够利用几种不同的机制生成更小的液滴，从而改善去溶剂化的效果。与电喷雾等传统电离模式相比，采用相同的样品量，这些机制相结合可生成更多的自由离子，通常能提升各种化合物的响应。

分析加标浓度为0.02 µg/L（该浓度远低于饮用水、地表水和地下水的规定限值）的饮用水时检出的每种分析物的响应（见图2），证明了方法优异的灵敏度和选择性。实验室需要提供的检测方法，其定量下限(LLOQ)至少要达到EQS的三分之一。研究中观察到的灵敏度表明，该方法应能够在更低的浓度下对所有三种化合物进行检测和定量。

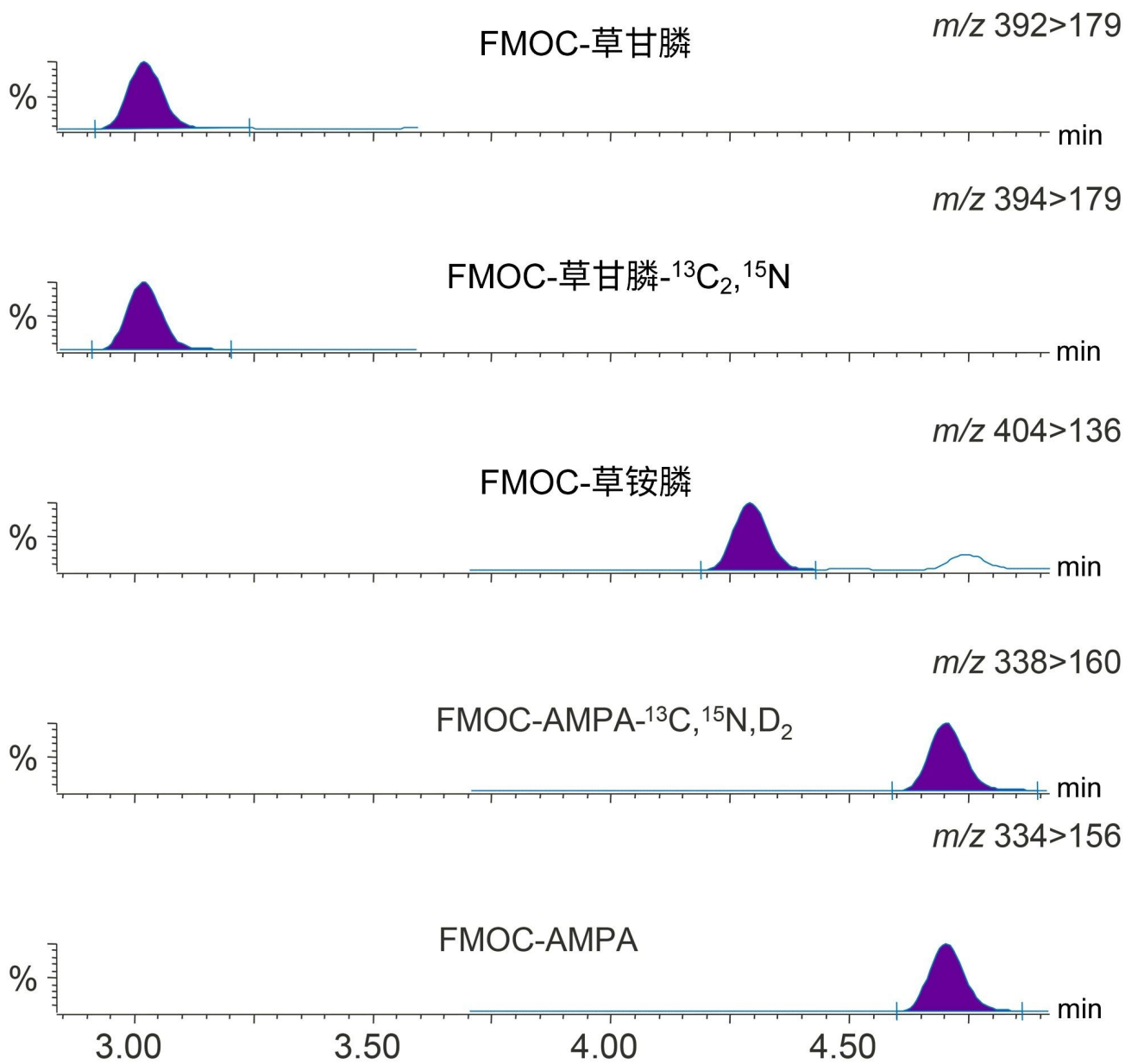
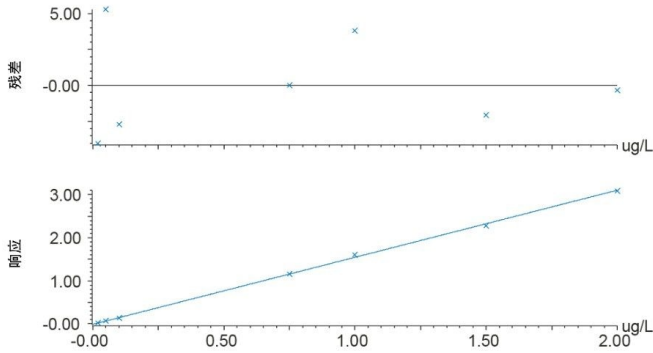


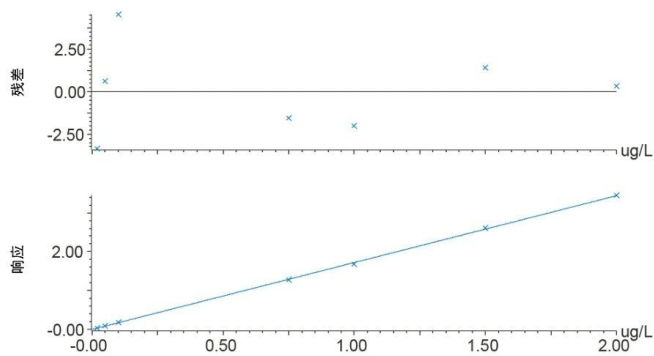
图2. 饮用水中加标浓度为0.02 $\mu\text{g/L}$ 的草甘膦、草铵膦和AMPA的色谱图。

使用饮用水配制七种浓度（0.02、0.05、0.10、0.50、1.0、1.5和2.0 $\mu\text{g/L}$ ）的标准溶液，用于标准曲线。所有三种化合物的响应均为线性，且三种化合物的相关系数(r^2)均大于0.999，残差小于6%（参见图3）。

化合物名称: 草甘膦
 相关系数: $r = 0.999759$, $r^2 = 0.999517$
 标准曲线: $1.5586 * x + -0.0128857$
 响应类型: 内标 (参比3), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 加权: 1/x, 轴转: 无



化合物名称: AMPA
 相关系数: $r = 0.999883$, $r^2 = 0.999766$
 标准曲线: $1.72443 * x + -0.0071747$
 响应类型: 内标 (参比4), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 加权: 1/x, 轴转: 无



化合物名称: 草铵膦
 相关系数: $r = 0.999852$, $r^2 = 0.999704$
 标准曲线: $3.5792 * x + 0.021902$
 响应类型: 内标 (参比5), 峰面积* (内标浓度/内标峰面积)
 曲线类型: 线性, 原点: 排除, 加权: 1/x, 轴转: 无

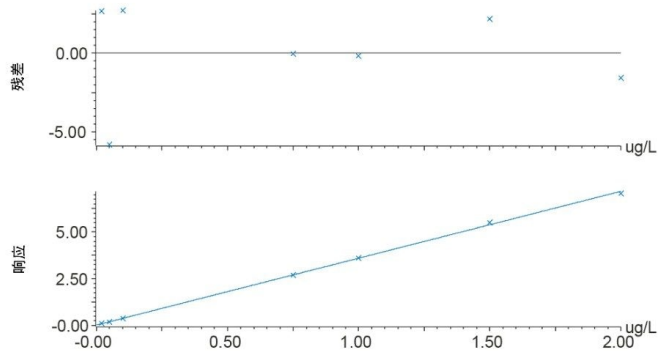


图3.一组以饮用水制备的草甘膦、AMPA和草铵膦样品的标准曲线。

通过分析加标水样确定该方法的准确度。将加标实测值与预期值进行比较，结果在85%~110%的范围内（表2）。测量的重复性也很好；例如，四种不同的地下水样品（加标浓度为0.1 µg/L）重复进样两次(n=8)，所得RSD小于6%。鉴定标准、离子丰度比和保留时间均在可接受偏差范围内¹⁰。

样品	实测浓度(µg/L)和正确度(%)		
	草甘膦	AMPA	草铵膦
饮用水(0.02 µg/L)	0.021 (105)	0.020 (100)	0.022 (110)
饮用水(0.2 µg/L)	0.196 (98)	0.196 (98)	0.213 (107)
饮用水(0.75 µg/L)	0.821 (109)	0.734 (98)	0.721 (96)
地下水样品1 (0.10 µg/L)	0.101 (101)	0.100 (100)	0.085 (85)
地下水样品2 (0.10 µg/L)	0.100 (100)	0.099 (99)	0.087 (87)
地下水样品3 (0.10 µg/L)	0.103 (103)	0.100 (100)	0.092 (92)
地下水样品4 (0.10 µg/L)	0.104 (104)	0.098 (98)	0.093 (93)
地下水样品1 (0.75 µg/L)	0.812 (108)	0.717 (96)	0.735 (99)
地下水样品2 (0.75 µg/L)	0.821 (109)	0.740 (99)	0.807(108)
地下水样品3 (0.75 µg/L)	0.793 (106)	0.764 (102)	0.782 (104)

表2.加标水样测定得到的正确度。

在分析四个水样得到的色谱图中检测到草甘膦和AMPA（图4），但除一例外，其他所有测得的浓度均低于LLOQ；在一个地下水样中检测到草甘膦(0.021 µg/L)。

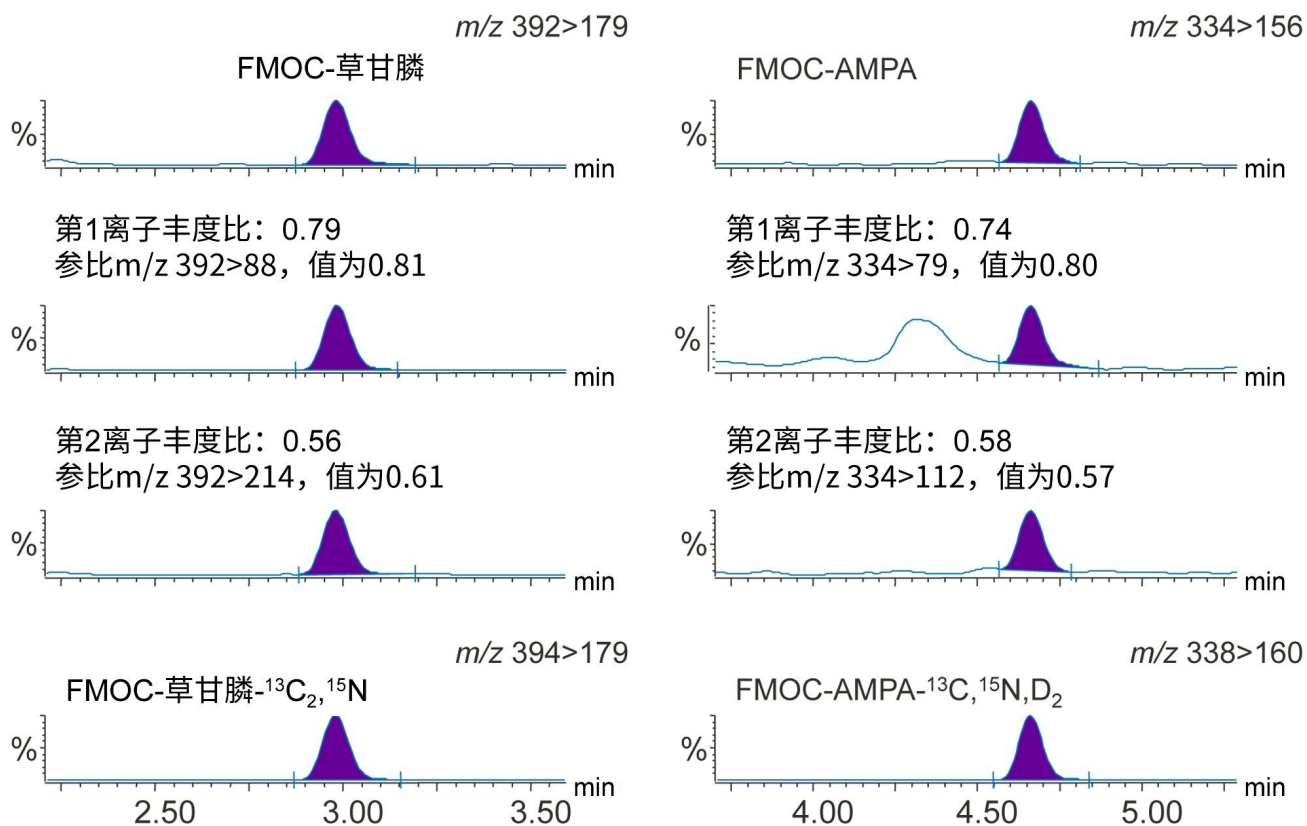


图4.地下水样中检出的草甘膦(0.021 $\mu\text{g/L}$)和AMPA (<0.02 $\mu\text{g/L}$)的色谱图。

结论

本应用纪要展示了ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-XS系统联用，在FMOc衍生化后，通过UPLC-MS/MS测定草甘膦、AMPA和草铵膦的方法性能。该方法简便、省时、经济，可对各种水样中的草甘膦、AMPA和草铵膦进行快速可靠的定量分析。结果表明，该方法适用于草甘膦、AMPA和草铵膦的检测。在所研究的浓度范围内，该方法的校准特性、线性和残差结果都十分优异。该方法的准确度良好，可应用于实际水样的分析。科学家必须在其实验室中对该方法进行验证，证明方法性能适合其用途，并且满足相关分析控制保证体系的要求。

致谢

作者衷心感谢Brabant Water、Evides和Waterleiding Maatschappij Limburg提供水样。

参考资料

1. Silva V. et al.(2017).Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union.*Sci Total Environ.*621:1352–1359.
2. Ibanez M. et al.(2005).Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry.*J Chromatogr A.*1081:145-155.
3. Ibanez M. et al.(2006).Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry.*J Chromatogr A.*1134:51-55.
4. Hanke I. et al.(2008).Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection.*Anal Bioanal Chem.*391:2265-2276.
5. European Commission (1998).Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.*Off.J. Eur.Communities.*1998.
6. European Commission (2000).Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy.*Off.J. Eur.Communities.*No L 327, 22.12.2000, p1, as last amended by Commission Directive 2014/101/EU (OJ No L 311, 31.10.2014, p32).
7. Statutory Instrument (2015).No.1623 The Water Environment (Water Framework Directive) (England and Wales) (Amendment) Regulations 2015.
8. Kos Durjava M. et al.(2013): Water Framework Directive and specific pollutants in surface waters in Slovenia.*Acta Hydrotechnica* 26(45):61–69.
9. Lubin A. et al.(2016).Atmospheric pressure ionization using a high voltage target compared to electrospray ionization.*J Am Soc Mass Spectrom.*28:286-293.
10. European Union (2017).Document No.SANTE/11813/2017.Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

UniSpray离子源 <<https://www.waters.com/134891755>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx定量应用软件 <<https://www.waters.com/513791>>

可在线购买

ACQUITY UPLC BEH苯基色谱柱, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002885>>

720006246ZH, 2018年4月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号