

采用LC-MS/MS直接分析法测定饮用水中的草甘膦、氨甲基膦酸(AMPA)和草铵膦

Stuart Adams, Benjamin Wuyts, Simon Hird

Waters Corporation

摘要

检测、定量和鉴定饮用水中的草甘膦、氨甲基膦酸(AMPA)和草铵膦时，需要采用可靠的分析方法。本应用纪要介绍了一种操作简单的直接分析方法，该方法使用液相色谱/串联质谱(LC-MS/MS)联用系统，无需冗长繁琐的衍生化和固相萃取(SPE)步骤，直接将水样进样至配备阴离子型极性农药分析色谱柱的LC-MS/MS系统（ACQUITY™ Premier UPLC™系统与Xevo™ TQ Absolute串联质谱仪联用）进行分析即可。我们使用三种不同类型的饮用水成功评估了该方法的性能。实验证明Xevo TQ Absolute系统具有相当高的灵敏度，三种分析物都能在低至10 ng/L (0.01 µg/L)的浓度下可靠检出。我们还使用加标水样评估了该方法在实验室内部以及实验室间的性能。这两项研究的结果均表明，该方法的正确度在82%~110%范围内。研究观察到重复性、实验室内重现性以及实验室间重现性非常一致，RSD均小于16%。该方法的灵敏度、专属性、准确度已获认可，适用于测定各种不同类型饮用水中的这些棘手分析物是否符合法规限值要求，还可以为人体暴露的相关研究提供支持。

优势

- 无需衍生化即可直接进样，极大地简化了分析工作流程，缩短了分析时间，有望提高样品通量
- 实验室内研究和实验室间研究证明了该方法的性能，让用户对方法的易实施性充满信心
- 该方法适用于检测饮用水中的这些强极性阴离子型农药是否符合法规限值要求

简介

草甘膦和草铵膦是农业和其他行业广泛用于杂草控制和采收前干燥处理的农药制剂中含有的两种活性物质^{1,2}。草甘膦的大规模使用引发人们开展了多项研究，希望确定草甘膦对生态或人类健康有没有潜在危害。尽管人们通常认为草甘膦不太可能对动物和人类有急性毒性，但它对水环境具有毒性。文献中有关草甘膦致癌性的观点存在分歧。2015年，国际癌症研究机构将草甘膦归为可能的人类致癌物，但欧洲食品安全局、欧洲化学品管理局和美国环境保护局都不支持这一分类³⁻⁶。

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。农药在河流或溪流附近直接喷洒、径流、陆地腐蚀物进入水道，以及喷雾漂移，都可能导致农药进入地表水。农药还会渗透土壤进入地下水中。地表水和地下水中经常检测到低浓度的草甘膦及其主要代谢物氨甲基膦酸(AMPA)^{7,8}。这些农药的残留问题不仅仅存在于集约化农业地区。草铵膦在土壤中似乎极易迁移，因此有可能污染地下水。许多国家/地区的公共饮用水源都是地表水（例如河流、湖泊和溪流）和/或地下水，这些水可能会被这些农药污染，进而导致长期膳食暴露。

世界上大多数国家/地区都对地表水、地下水和饮用水中的农药残留做了规定，但最大值差异巨大。对于饮用水，EU规定农药及任何相关代谢物总量的最大限值为500 ng/L (0.5 µg/L)，每种农药和代谢物各自的最大限值为100 ng/L (0.1 µg/L)⁹。其他地区饮用水中草甘膦的浓度标准要高得多。例如，加拿大、美国和澳大利亚规定的最大可接受浓度分别为280、700和1000 µg/L¹⁰。

人们需要准确可靠的方法来监测水样是否符合法规限值，以及更全面地了解环境和饮用水中是否存在这些化合物。草甘膦、AMPA和草铵膦都是强极性的离子型化合物，这种理化特性大幅提高了检测其残留的难度。典型的分析方法是先用氯甲酸-9-苄基甲酯(FMOC-Cl)进行衍生化处理，然后进行固相萃取(SPE)和液相色谱(LC)测定，液相色谱系统通常还会与MS/MS联用¹¹。FMOC衍生化可降低化合物的极性，以便使用反相吸附剂有效萃取和浓缩化合物，接着在相同的分离模式下进行LC测定。然而，衍生化步骤缓慢且繁琐，在LC分析之前还得去除过量的衍生化试剂、硼酸盐缓冲液和/或反应副产物。无需衍生化的直接分析法步骤更少，操作起来速度也更快。直接进样方法能否成功在很大程度上取决于色谱性能（保留性能、峰形和稳定性）以及水样组分所产生的基质效应对分析物响应的影响。使用稳定同位素类似物作为内标有助于减轻基质效应。

在分析化学领域，验证研究在分析方法的性能特征评估中发挥着重要作用。要证明方法符合预期用途，必须执行实验室内方法验证。而在实验室间研究中，若干个经验丰富的实验室将从同一个均质且稳定的检测样品中分取相同份数的样品，然后遵循严格定义的方案进行测定，以验证方法性能是否一致。

本应用纪要介绍了一项大规模的方法性能评估研究，旨在评估一种分析方法测定多种不同水样中草甘膦、AMPA和草铵膦的性能。这种直接进样的LC-MS/MS方法采用配备阴离子型极性农药分析色谱柱的ACQUITY Premier UPLC与Xevo TQ Absolute串联质谱仪组成的联用系统，并配合使用waters_connect™定量软件平台。

实验

样品前处理

从英国境内多个地点采集三种不同的饮用水样品（硬质饮用水、软质饮用水和矿泉水）。样品在分析之前冷藏保存。取供试水样(15 mL)转移到50 mL塑料离心管中。使用草甘膦、氨甲基膦酸(AMPA)和草铵膦的分析标准品制备工作溶液，用于创建标准曲线样品和加标到不同的水样中。配制浓度在10~200 ng (0.01~0.2 µg/L)范围内的标准曲线样品。使用草甘膦- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ 、AMPA- $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, \text{D}_2$ 和草铵膦- D_3 作为内标。加入EDTA（200 µL，2 g/L），混匀样品内容物，然后取一份等分试样转移到聚丙烯样品瓶中，准备进行LC-MS/MS分析。配制流动相所用的全部添加剂和溶剂均为LCMS级或同等级别试剂。

液相色谱条件

液相色谱系统：	配备BSM和FTN SM的ACQUITY Premier UPLC系统
样品瓶：	聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹口样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积为700 µL (P/N: 186005222)
色谱柱：	阴离子型极性农药分析色谱柱（5 µm, 2.1 x 100 mm）(P/N: 186009287)
柱温：	50 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	50 µL
流动相A：	0.9%甲酸的水溶液
流动相B：	0.9%甲酸的乙腈溶液

切换阀：0~1.5 min导入废液

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ Absolute

电离模式：电喷雾（负离子模式）

毛细管电压：2.3 kV

离子源温度：150 °C

脱溶剂气温度：600 °C

脱溶剂气流速：800 L/h

锥孔气流速：150 L/h

锥孔电压：15 V

数据管理

质谱采集软件：waters_connect定量软件平台

定量软件：waters_connect定量软件平台

方法验证

通过重复分析加标饮用水样品进行单实验室验证。评估的因素包括：选择性、灵敏度、标准曲线特征、正确度、实验室内重复性（合并 RSD_r ）和实验室内重现性（ RSD_R ，也称为中间精密度）。在单实验室验证中，三天内每天

重复分析($n = 11$)用硬质饮用水、软质饮用水和矿泉水这三种水制备的20、60和100 ng/L水样，确定正确度、合并 RSD_r 和 RSD_{WLR} 。多实验室验证则是让9个实验室分析加标的矿泉水样品。对浓度为20 ng/L和60 ng/L的加标样品进行重复分析($n=7$)，确定正确度、合并 RSD_r 和实验室间重现性(RSD_{WLR})。

结果与讨论

色谱分析

该方法分离这些强极性阴离子化合物时展现出优异的色谱保留性能和峰形。该方法的保留性能符合ISO 21253-2:2019标准（适用于多化合物类别的水质检测标准）要求，在整个研究过程中（9天，500次进样）都得到了高斯色谱峰形并展现出良好的保留时间稳定性，且不受分析的饮用水类型影响¹²。

灵敏度

图1显示了分析加标浓度为20 ng/L的约克饮用水时获得的三种强极性阴离子化合物的典型色谱图，这表明该方法通常能够检测饮用水中浓度较低的这些分析物，适合用于检查水样是否符合欧盟饮用水指令(DWD)中设定的100 ng/L参数限值要求。

选择性、鉴定和标曲标准

制备不同类型的水的代表性样品作为空白样。空白样中未检测到可能导致误报样品不合规或可能影响方法灵敏度的信号。每种分析物在两个通道中生成的峰的离子丰度比和保留时间均处于ISO 21253-1:2019标准（第1部分）规定的相较于标准品的偏差范围内¹³。使用稳定同位素类似物作为内标，为矿泉水中的每种分析物绘制6点括号式标准曲线，每天采集数据。采用 $1/x$ 加权进行线性拟合，标准曲线(10~200 ng/L)的所有决定系数(R^2)值都高于0.98，各残差均低于20%，证明该方法能够可靠地定量分析物，检查其浓度是否符合EU DWD设定的参数限值要求。典型标准曲线的几个示例见图2。

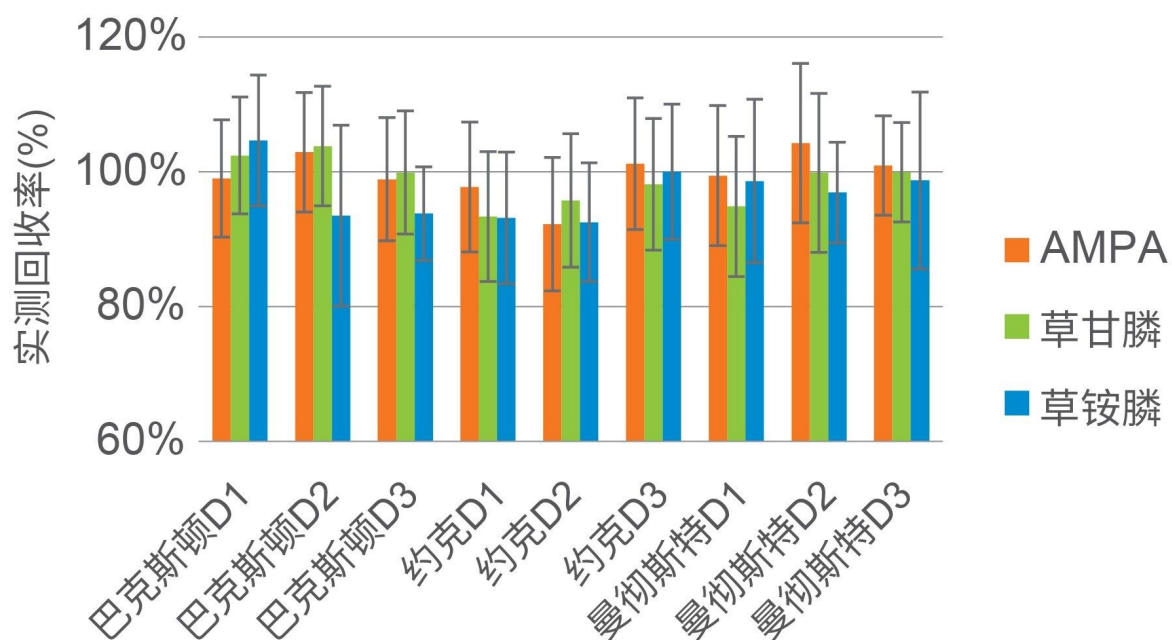


图3.三个加标浓度下每个水样的平均实测回收率值汇总，相关的重复性通过误差棒表示。

单实验室验证

结果表明，该方法定量饮用水中这三种化合物的准确度都很出色（表1）。准确度是使用适当的内标进行调整后，根据这三种饮用水在三个加标浓度下（20、60和100 ng/L）的实测浓度值确定的。合并所有三种水样的结果，正确度（根据实测回收率确定）在96%~102%之间，实验室内重复性（合并 RSD_r ）在7.9%~11%之间，并且三天内的实验室内重现性(RSD_{WLR}) 在7.6%~15%之间。使用内标时得到的这些结果均符合ISO 21253-1:2019标准（第2部分）规定的可接受标准：“收率”（实测回收率）在70%~120%范围内，中间精密性(RSD_r) $\leq 20\%$ ¹³。图3汇总了每种水样品的平均实测回收率值及其重复性。

加标浓度 (ng/L)	AMPA			草甘膦			草铵膦		
	正确度	RSD _r (合并)	RSD _{WLR}	正确度	RSD _r (合并)	RSD _{WLR}	正确度	RSD _r (合并)	RSD _{WLR}
20	99	9.3	10	96	11	15	97	10	13
60	99	8.6	8.2	98	9.2	12	96	10	12
100	101	7.9	7.6	102	8.1	8.4	98	10	11

表1.单实验室验证研究的结果汇总

多实验室验证

采用与单实验室验证研究相同的方案确定方法准确度，区别在于让9个实验室采用该方案分析2个加标水平的矿泉水，每个加标水平设一个样品。进行统计分析之前，未从数据中剔除任何异常值。采用该方法分析单个矿泉水样品得到的结果验证了该方法的准确度（表2）。图4汇总了每个实验室的平均实测回收率值及其相关的实验室内重复性。每个实验室报告的正确度值都在82%~110%之间，重复性(RSD_r) 在2.6%~22%之间。实验室内的总体重复性（合并RSD_r）值和实验室间的重现性(RSD_{BLR})值分别在11%~14%和10%~16%范围内。这些结果都符合上一节提到的ISO 21253-1:2019标准（第2部分）规定的可接受标准。

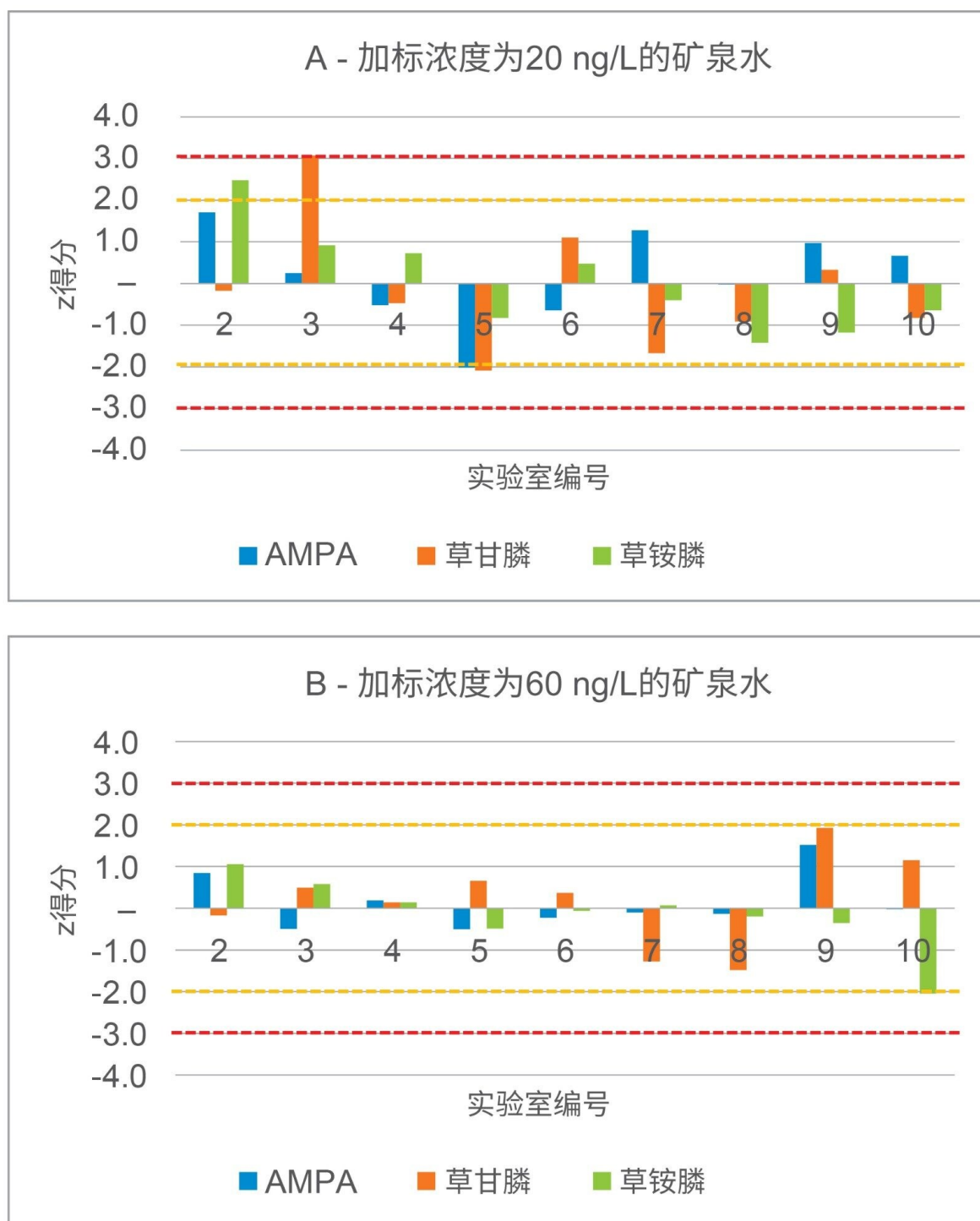


图5.此柱状图显示了每个实验室进行低浓度加标分析（20 ng/L，A图）和高浓度加标分析（60 ng/L，B图）得到

的三种分析物的z得分

为了进一步评估数据，我们为报告的每一个实验室结果计算了z得分。z得分是实验室报告值与认定值之间的差值（针对变异性做了校正）。所得结果如图5中的两张图表所示。几乎所有实验室都报告了可接受的结果，z得分低于2。有3个实验室报告的低浓度加标分析结果有问题，有1个实验室报告的高浓度加标分析结果有问题。只有一个结果不理想：20 ng/L草甘膦的z得分为3.07。

结论

本应用纪要介绍了一项大规模的方法性能评估研究，旨在评估一种简单直接的方法测定饮用水中草甘膦、AMPA和草铵膦的性能。水样直接进样至配备阴离子型极性农药分析色谱柱的ACQUITY Premier LC系统与Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪组成的联用系统进行分析。该方法省去了冗长繁琐的样品前处理步骤，有助于减少衍生化方法可能造成的误差。该方法能够可靠测定远低于DWD参数限值(0.1 µg/L)的浓度。本研究通过测定一系列不同类型的饮用水样品，成功评估了该方法的性能。实验证明该方法适用于监测饮用水中这些含量极低的强极性阴离子型农药残留，因此可用于检查样品是否符合法规限值要求，还能为针对人体暴露的研究提供支持。

参考资料

1. Richmond M. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *J Environ.Stud.Sci.* (2018) 8:416–434.
2. Takano HK and Dayan FE. Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest.Manag.Sci.* (2020) 76:3911–3925.
3. IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 112. Glyphosate. 2016.
4. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* (2015) 13(11):4302–4408.

5. ECHA. Committee for Risk Assessment RAC Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of glyphosate (ISO); N-(phosphonomethyl)glycine EC Number: 213-997-4 CAS Number: 1071-83-6 CLH-O-0000001412-86-149/F. 2017.
6. US EPA. Revised Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential. D444689. 2017.
7. Duke, S. Glyphosate: Environmental fate and impact. *Weed Sci.* (2020) 68(3):201–207.
8. Carretta L *et al.* Review of studies analysing glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) occurrence in groundwater. *Environ. Rev.* (2020) 30(1):88–109.
9. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption. *OJ L* 435, 23.12.2020, p. 1–62.
10. Wen-Tien T. Trends in the Use of Glyphosate Herbicide and Its Relevant Regulations in Taiwan: A Water Contaminant of Increasing Concern. *Toxics* (2019) 7(1):4.
11. Analysis of Glyphosate, AMPA, and Glufosinate in Water Using UPLC-MS/MS. Waters Application Note. [720006246](#). 2018.
12. ISO 21253-2:2019. Water quality. Multi-compound class methods – Part 2: Criteria for the quantitative determination of organic substances using a multi-compound class analytical method. 2019.
13. ISO 21253-2:2019. Water quality. Multi-compound class methods – Part 1: Criteria for the quantitative determination of organic substances using a multi-compound class analytical method. 2019.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720008052ZH, 2023年9月



© 2024 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](#)