

# UPLC-MS/MS 法同时检测土壤中毒甘磷、草铵磷及代谢物

邢银英 项林敏<sup>通讯作者</sup> 练瓯滨 杨聪聪

温州市质量技术检测科学研究院, 浙江温州, 325000;

**摘要:** 土壤中草甘磷、N-乙酰草甘磷、氨甲基膦酸、N-甲基草甘磷、N-乙酰氨甲基膦酸、草铵磷、草铵磷-N-乙酰、3-甲基磷酸亚基丙酸等 8 种极性农药通过非衍生化法建立 HPLC-MS/MS 的检测方法<sup>[1]</sup>。用该法对温州某山区的 5 个镇 31 个土壤样本进行检测。准确称取 5 g 土壤样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 氨水溶液 (0.2 mol/L), 混匀涡旋, 超声 30 min 置于 40 °C 水浴锅中, 在 8 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液过水相滤膜 (0.2 μm)。以 Agilent HILIC Plus 色谱柱 (3.5 μm, 4.6 × 100 mm), 以乙腈-0.05 % 氨水溶液 (含 2 mmol 乙酸铵) 为流动相体系进行梯度洗脱; 洗脱后的被测物经负离子模式进行电离<sup>[1]</sup>, MRM 模式进行检测, 经外标法定量。结果表明: 8 种化合物标准曲线范围 5-200 ng/mL 下线性相关系数均 > 0.999, 定量限为 10 μg/kg; 称取 18 个空白土壤样品分别在 1 倍、2 倍、5 倍的定量限三个水平 18 个样品进行加标回收率试验, 回收率在 78.2%~102.6%, 测定相对偏差为 0.62%~7.6%。

**关键词:** 草铵磷; 草甘磷; 代谢物; UPLC-MS/MS; 土壤; 非衍生化

**DOI:** 10.69979/3041-0673.25.09.053

随着社会的发展, 农民种植方式发生了许多变化, 从传统的手工操作被机械化代替, 除草方式也从原来的物理除草, 改用施用除草剂, 从效率上看, 确实高效便捷, 但是除草剂也带来一定的危害。为了更加全面的了解农村施用除草剂的情况, 了解土壤在施用除草剂后的残留情况, 需要对土壤进行采样分析。而草甘磷和草铵磷作为灭生性除草剂, 都非常广泛的使用, 且随着草甘磷、草铵磷的使用量在不断增多, 在环境水样、土壤和植物中经常会检测到草甘磷、草铵磷及其代谢物, 如此长期以来慢慢累积会导致环境污染, 对人类健康构成一定的威胁。目前, 草铵磷、草甘磷及其代谢物的测定方法以质谱法为多。由于这 8 种均为强极性化合物, 不溶于大部分有机溶剂、难挥发且在常规色谱柱上不保留, 不能直接通过液相色谱进行分离, 也无法直接通过常规检测器进行测定。目前大部分方法都是通过衍生反应来检测, 但是, 这种方法的衍生化法的前处理步骤复杂, 花费时间长。在非衍生化这块的研究上, 近年来, 孙文闪等采用水-二氯甲烷常规的提取方式测定土壤中草甘磷及其代谢物氨甲基膦酸和草铵磷 3 种化合物, 周芹等]采用磷酸钠和柠檬酸三钠混合容一人作为提取溶剂, 测定土壤中草甘磷及其代谢物氨甲基膦酸 2 种化合物, 但是这两种方法均需要过固相萃取小柱净化, 步骤繁琐, 回收率不稳定, 且成本较高。姬乐园等方法虽然覆盖了草甘磷、草铵磷及其代谢物 8 种化合物, 但前处理采用

纯水提取, 60 mL 提取液全部过 (MCX 串联 MAX) 小柱, 此法操作复杂, 成本高, 且未考虑到土壤本身基质的复杂性, 在实际测试中, 加标样品未测出。目前还没有关于非衍生化同时测定土壤中草甘磷及其代谢物等 8 种物质含量且前处理方法不过固相小柱的报道, 更没有对区域土壤中草甘磷及其代谢物现状进行调查研究。

本研究结合非衍生化方法建立了一套土壤中草甘磷、草铵磷及代谢物等 8 种组分的高效液相色谱质谱的检测方法。非衍生化方法较衍生化方法, 大大提高效率, 降低基质效应, 提高回收率; 并应用液质联用技术, 快速、高灵敏度多覆盖的土壤中多种草甘磷、草铵磷及代谢物组分筛查、定性和定量检测方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

三重四级杆液相色谱-串联质谱仪配电喷雾离子源/负离子 (美国 SCIEX 公司, 型号 5500+); Agilent HILIC Plus 色谱柱 (3.5 μm, 4.6 × 100 mm); 3k15 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); 水浴恒温超声振荡器; 0.2 μm 微孔过滤膜; 纯水机

氨水 (色谱纯); N-丙基乙二胺 (PSA); HLB、MAX、GLY 固相萃取柱, 乙腈 (HPLC 级); 草甘磷、N-乙酰草甘磷、氨甲基膦酸、N-甲基草甘磷、N-乙酰氨甲基膦酸、草铵磷、N-乙酰草铵磷、3-甲基磷酸亚基丙酸

(天津阿尔塔科技有限公司)。

## 1.2 标准溶液的配制

准确称取适量草甘膦、草铵膦及代谢物等 8 种标准物质，用水配制成浓度为 1.0 μg/mL 的标准储备液，冷藏，使用时按照一定比例配制成标准工作液。用去离子水对一定体积的标准工作液进行稀释定容，配制成 8 种混合标准工作溶液。

## 1.3 样品前处理

取温州某山区不同地区的土壤，准确称取不同样品 5 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 氨水溶液 (0.2 mol/L)，混匀涡旋，超声 30 min 置于 40 °C 水浴锅中，在 8 000 r/min 下离心 10 min，取上清液过水相滤膜 (0.2 μm)。按仪器工作条件测定滤液中的草甘膦、草铵膦及代谢物等 8 种目标物。

## 1.4 仪器条件

### 1.4.1 色谱条件

色谱柱: Agilent HILIC Plus 色谱柱 (4.6 × 100 mm, 3.5 μm); 柱温 40 °C; 进样体积 5 μL; 流动相 A 为乙腈, B 为 0.05 % 氨水溶液 (含 2 mmol 乙酸铵); 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱程序 0–0.5 min, 90 % B; 0.5–1 min, 90 %–60 % B; 1–4 min, 60 %–20 % B; 4–6 min, 20%–5 % B, 6–7 min, 5 % B; 7–7.1 min, 5 %–90 % B; 7.1–8 min 90 % B。

### 1.4.2 质谱条件

电离模式: 电喷雾离子源模式 (ESI); 扫描模式: 负离子模式; 检测方式: 多反应监测 (MRM) 扫描; 电喷雾电压: -4 500 V; 离子源温度 600 °C。8 种化合物的质谱参数见表 1。

表 1 8 种化合物的质谱参数

Analyte	CAS	Parent ion(m/z)	Product ion(m/z)	DP/V	CE/V
草甘膦	1 071-83-6	168.0	63.0*/79	-30	-33/-53
氨甲基磷酸	1 066-51-9	110.0	63.0*/79	-49	-23/-37
N-乙酰氨甲基磷酸	57 637-97-5	152.0	110.0*/63	-35	-20/-40
N-乙酰草甘膦	129 660-96-4	210.0	63.0*/150	-35	-40/-17
N-甲基草甘膦	24 569-83-3	182.0	79.0*/63	-35	-33/-35
草铵膦	77 182-82-2	180.0	63.0*/85	-45	-59/-26
3-甲基磷酸亚基丙酸	15 090-23-0	151.0	63.0*/133	-35	-47/-17
N-乙酰草铵膦	73 634-73-8	222.0	136.0*/63	-35	-61/-29

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱-质谱条件的优化

为了获得满意的质谱条件，采用针泵式进样，对 8 种草甘膦类的质谱参数进行优化，并选择出最优的母离子及子离子，具体参数见表 1。

本实验分别考察了 Athena C18 HPLC column (3 μm, 2.1 × 100 mm)、Luna Omega 1.6 μm Polar C 18 100A (2.1 × 100 mm) 和 Agilent HILIC Plus (3.5 μm, 4.6 × 100mm) 对 8 种被测化合物的色谱峰形响应值的影响。直接进样标进行比对后发现，草甘膦和草铵膦及其代谢物在 Agilent HILIC Plus 色谱柱上峰形最好，响应值最高，见图 1。因此最终选择了 Agilent HILIC Plus 色谱柱。

在最佳质谱条件下，使用 Agilent HILIC Plus 色

谱柱分别对流动相、流速、梯度洗脱条件及柱温进行了考察。作为最重要的影响因素，流动相的考察尤为重要，考虑到被测物质的特性，选取了乙酸铵、甲酸铵、氨水、甲醇、乙腈等流动相来考察这些物质对目标化合物的峰形和响应值的影响。最后表明，乙腈的峰型比甲醇更尖更好看，而氨水跟乙酸铵的搭配比甲酸铵效果更好，出峰更明显。

在流动相比比例上考察了 (0.01 % 氨水 1 mmol 乙酸铵溶液、0.02 % 氨水 1 mmol 乙酸铵溶液、0.02 % 氨水 2 mmol 乙酸铵、溶液 0.05 % 氨水 2 mmol 乙酸铵溶液、0.05 % 氨水 5 mmol 乙酸铵溶液、0.1 % 氨水 2 mmol 乙酸铵溶液) 6 种比例，结果表明流动相条件为乙腈-0.05 % 氨水溶液 (含 2 mmol 乙酸铵) 最优。图 1 为 8 种化合物在 MRM 模式下的色谱图。

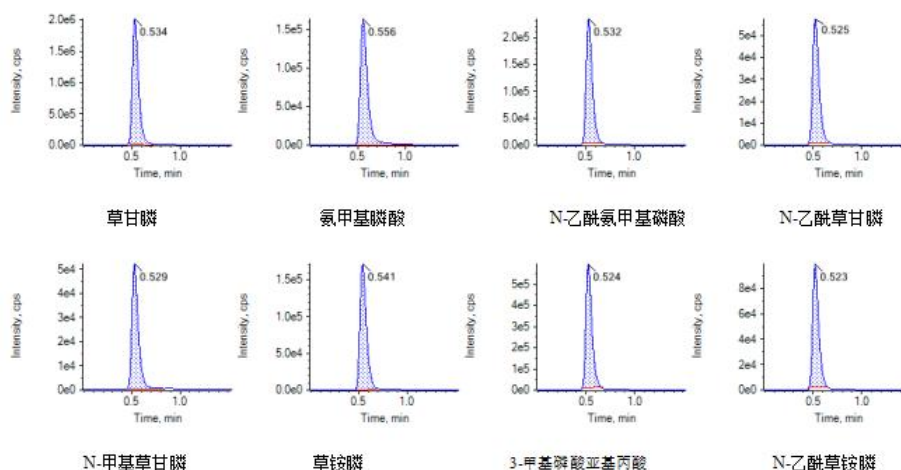


图 1 各化合物在 MRM 模式下的色谱图

## 2.2 前处理条件的优化

### 2.2.1 提取试剂的优化

草甘膦跟草铵膦代谢物本都极易溶于水。但由于土壤基质复杂，富含各种有机质和矿物质成分，草甘膦和草铵膦及其代谢物很容易被这些成分吸附或者产生络合作用，土壤中有机质含量对草甘膦和草铵膦及其代谢物回收率起到主要影响作用，土壤中有机质含量越高，对草甘膦和草铵膦及其代谢物的吸附越强，那么回收率就会越低，并且土壤中 pH 值的大小对草甘膦的回收率也有较大影响。在土壤 pH 值小于 7 的环境下，草甘膦和草铵膦及其代谢物主要以分子形态存在；而在土壤 pH 值大于 7 环境下，草甘膦和草铵膦及其代谢物主要以

阴离子形态存在，这样会与土壤颗粒相排斥，减少了草甘膦和草铵膦及其代谢物对土壤的吸附量，由此使回收率提高。故本实验选取纯水、磷酸钠和柠檬酸钠溶液、氨水作为溶剂作为验证，结果表明，水的提取效率极低，而磷酸钠和柠檬酸钠溶液、氨水提取效率差不多，但是考虑到柠檬酸钠为不挥发性盐易对仪器造成影响，而且氨水可以直接进质谱，流动相选的也是氨水，因此氨水作为提取溶剂是最为合适。与此同时考察了不同浓度氨水溶液（0.1、0.2、0.5、1 mol/L）对土壤的提取效果，结果表明除了 0.1 mol/L，其余浓度回收率接近，见图 3 考虑到对仪器的伤害，选取 0.2 mol/L 氨水溶液作为提取溶剂。

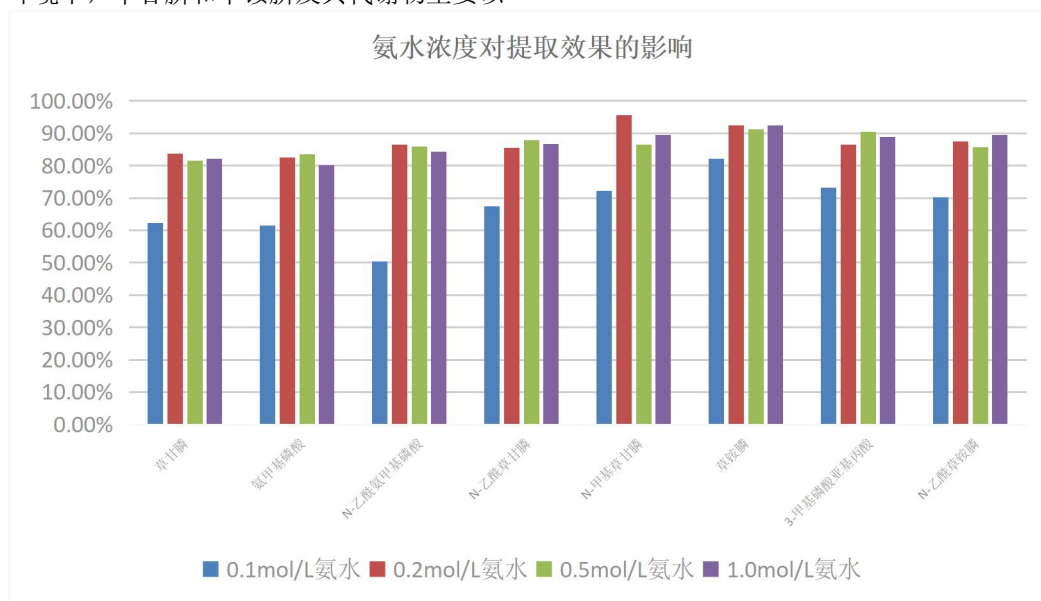


图 3 氨水浓度对提取物质回收率的影响

### 2.2.2 净化方法的优化

本实验根据物质特性选取了 HLB、MAX、GLY 固相萃

取柱作为比较，结果显示 3 种柱子回收率都不是很理想，且净化效果不明显。同时直接在水中加标测试过这三种

小柱计算回收率,部分被测物质回收率依然较低,实验表明这三种小柱对被测物质产生了吸附,不易洗脱,并不适用 8 种被测物质的净化。对于直接提取方案,无论是水中加标和土壤加标,回收率高且稳定。首先,采用各种固相萃取柱净化的成本很高,效率还低,回收率亦不满足实验需求,其次,使用小柱操作复杂,耗时久,对于检测大批量样品来说性价比太低,且稳定性不够,与此同时,由于土壤基质的复杂性及不同土壤之间的差异性,固相小柱满足不了各种土壤的需要。因此通过不过柱与过柱的比较,得出不仅为了节省成本,更为了保证实验结果的准确率,同时满足快速检测大批量样品的需求,最终选择不使用固相萃取柱来进行净化,采用溶剂直接提取土壤中被测物质。

### 2.2.3 其余提取条件的优化

本实验同时考察了超声提取的时间、温度和次数来对提取效率的影响,通过对 10 min, 20 min, 30 min, 40 min; 20 °C, 40 °C, 60 °C; 提取 1 次, 2 次等三项数据的比对,最终选取 40 °C 超声 30 min, 提取一次。

## 2.3 分析方法评价

### 2.3.1 基质效应

基质效应问题在 UPLC-MS/MS 分析中比较突出。研究基质效应的强弱及对定量影响。基质效应计算公式如下:  $ME(\%) = (\text{基质标曲斜率} / \text{溶剂标曲斜率} - 1) \times 100$ ;  $ME$  0-20 %: 弱基质效应;  $ME$  20-50 %: 中等基质效应;  $ME > 50$  %: 强基质效应。标曲斜率/溶剂标曲斜率  $> 1$  为基质增强,标曲斜率/溶剂标曲斜率  $< 1$  为基质减弱。本实验采用空白土壤基质来 8 种混合标准曲线与溶剂配制的标准曲线进行比对,得出草甘膦、氨甲基膦酸、3-甲基膦酸亚基丙酸、N-乙酰氨甲基膦酸为基质增强-中等基质效应,其余 4 种三类基质基本都是基质增强-弱基质效应。因基质效应各有差异,本实验方法采用基质配标来进行定量检测。

### 2.3.2 线性范围与检出限

用水配制草甘膦等 8 种混合标准工作溶液(曲线点为 5、20、50、100、200  $\mu\text{g/L}$ ),在最佳仪器条件下进行测定,以质量浓度为横坐标,峰面积来纵坐标绘制曲线,结果表明 8 种物质线性良好均大于 0.999,完全满足定量分析需求。本方法 8 种物质均以检出限 1  $\mu\text{g/kg}$  为检出限,3  $\mu\text{g/kg}$  为定量限。

### 2.3.3 准确度与精密度

以空白土壤为基质进行加标回收实验。分别在空白样品中加入标样在 1 倍、2 倍、5 倍的定量限三个水平各 6 份,按照最佳前处理方法进行前处理,将提取液过滤后进样分析,来计算回收率和相对标准偏差。结果表明,回收率在 78.2 %~102.6 %,测定相对偏差为 0.62%~7.6 %。

## 2.4 实际样品检测

从温州某县五个镇采集了 31 个土壤样品。采用本方法进行检测。结果显示,草甘膦的检出率为 45.2 %,检出量为 4.4~65.2  $\mu\text{g/kg}$ 、氨甲基膦酸的检出率为 87.1 %,检出量为 36.0~4 426.5  $\mu\text{g/kg}$ 、N-甲基草甘膦有的检出率为 16.1 %,检出量为 102.8~269.4  $\mu\text{g/kg}$ ,其余 5 种未检出。草甘膦及其代谢物有检出,而草铵膦及其代谢物未检出,说明该地区使用草甘膦及其代谢物,而未使用草铵膦及其代谢物。同时氨甲基膦酸的检出率均高于草甘膦,这是由于氨甲基膦酸是草甘膦的主要代谢物,检出草甘膦的样品都同时都检出氨甲基膦酸。从以上数据可以看出该地区草甘膦的使用情况较为普遍,要引起关注。

## 3 结论

本文建立了土壤中草甘膦、N-乙酰草甘膦、氨甲基膦酸、N-甲基草甘膦、N-乙酰氨甲基膦酸、草铵膦、草铵膦-N-乙酰、3-甲基膦酸亚基丙酸<sup>[1]</sup>等 8 种极性农药的 UPLC-MS/MS 法,对仪器条件和前处理都进行了优化,该方法简易,方便,适用于批量检测,可为市场监测提供有效思路。

## 参考文献

- [1] 王禹衡. IC-MS 技术筛选生物检材中草甘膦等八种强极性毒物的研究[D]. 中国人民公安大学, 2023. DOI: 10.27634/d.cnki.gzrgu.2023.000115.
- [2] 平华, 赵芳, 李成, 等. 高效液相色谱-串联质谱法快速同时测定土壤中草甘膦、草铵膦及其代谢物[J]. 色谱, 2022, 40(03): 273-280.
- [3] 孙文闪, 诸骏杰, 钟寒辉, 等. 固相萃取净化-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定土壤中草铵膦、草甘膦及其代谢物氨甲基膦酸[J]. 理化检验(化学分册), 2021, 57(04): 322-326.