任颖俊, 彭君, 赵锦华, 等. 全自动在线固相萃取-液相色谱串联质谱法快速测定地表水中痕量甲基对硫磷[J]. 环境化学, 2024, 43(7): 2504-2507.

REN Yingjun, PENG Jun, ZHAO Jinhua, et al. Fully automated on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid determination of trace methyl parathion in surface water[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (7): 2504-2507.

全自动在线固相萃取-液相色谱串联质谱法快速测定 地表水中痕量甲基对硫磷*

任颖俊 彭君** 赵锦华 刘立平 李超群 梁锋

(湖南省地质实验测试中心, 长沙, 410007)

摘要 建立了全自动化在线固相萃取-液相色谱串联质谱法快速、准确测定地表水中痕量甲基对硫磷的方法. 水样经在线富集、色谱柱分离后, 梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正离子多反应监测模式, 内标法定量. 通过对离子源参数、水相洗脱溶剂、有机相洗脱溶剂、洗脱溶剂初始比例进行优化试验, 甲基对硫磷的灵敏度显著提升, 峰型更好. 该方法在质量浓度 5—1000 ng·L⁻¹ 范围内线性关系良好 (相关系数 $R^2 \geq 0.998$). 添加回收试验结果表明, 方法检出限为 4 ng·L⁻¹, 方法定量限为 16 ng·L⁻¹, 在 40、100、500 ng·L⁻¹ 的 3 个添加水平下, 平均回收率为 90.1%—97.8%, 相对标准偏差为 1.7%—3.5%. 应用于实际地表水样品测定, 结果均未检出. 该方法便捷、高效, 可实现高通量测定地表水中痕量甲基对硫磷.

关键词 全自动在线固相萃取, 液相色谱, 串联质谱, 甲基对硫磷.

中图分类号 X-1; O6 **文献标识码** A

Fully automated on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid determination of trace methyl parathion in surface water

REN Yingjun PENG Jun** ZHAO Jinhua LIU Liping LI Chaoqun LIANG Feng

(Hunan Geological Experiment and Testing Center, Changsha, 410007, China)

Abstract A method for rapid and accurate determination of trace methyl parathion in surface water by Fully automated on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry was established. The water samples were enriched online, separated on a chromatographic column with gradient elution, and quantified by internal standard method using electrospray ionization source in positive ions multiple reaction monitoring mode. By optimizing the ion source parameters, changing aqueous phase eluent, organic phase eluent, and initial ratio of eluent, the sensitivity of methyl parathion was significantly improved, and the peak shape got better. The method showed good linearity in the mass concentration range of 5—1000 ng·L⁻¹ (Correlation coefficient (R^2) ≥ 0.998). Through standard addition experiments, The results showed that the limit of detection of the method was 4 ng·L⁻¹ and the limit of quantification was 16 ng·L⁻¹. The average recovery at 3 addition concentrations of 40, 100, and 500 ng·L⁻¹ was 90.1%—97.8%, with a relative standard deviation (RSD) of 1.7%—3.5%. The method was applied to the determination of actual surface water samples, and no trace of methyl parathion was detected. The method is convenient and

* 湖南省自然资源厅科技项目 (2022B03) 和湖南省地质院科研基金 (HNGSTP202214) 资助.

** 通信联系人 Corresponding author, E-mail: pengjun6539@126.com

efficient, and can achieve high-throughput determination of trace methyl parathion in surface water.

Keywords Fully automated on-line solid phase extraction, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, methyl parathion.

甲基对硫磷是一种高效、广谱的有机磷农药,能有效抑制害虫神经系统中胆碱酯酶活力,但是由于其毒性高,长期大量使用不仅会造成农作物及土壤的农药残留,农作物附近的地表水也极易受到污染^[1-2],进而污染环境和饮用水源,对人体健康构成潜在威胁,因此建立准确快速测定地表水中甲基对硫磷残留量的测定方法具有非常重要的意义。

目前,甲基对硫磷的测定方法主要有气相色谱法^[3]、气相色谱-质谱法^[4]、液相色谱法^[5]和液相色谱-质谱法^[6]。水体中甲基对硫磷的残留量极低,常规检测中主要采用液液萃取^[7]、固相萃取^[8]等方法离线富集分析水样中的甲基对硫磷,但都存在操作复杂,人为误差大、耗时长、通量低及样品消耗量大等问题。张毅华等^[9]采用分散液液微萃取技术对地表水进行富集预处理,选取四氯乙烯为萃取溶剂,萃取剂体积为 30 μL ,并通过气相色谱质谱仪,进行有机磷农药的测定;张泾凯等^[10]用二氯甲烷对水样液液萃取 3 次,经无水硫酸钠除水后,用甲醇定容上气相色谱-串联质谱仪,测得最低检出限为 0.04 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;胡红美等^[11]采用 C18 固相膜萃取技术萃取水样,经丙酮和二氯甲烷洗脱,用气相色谱氮磷检测器测定养殖用水中甲基对硫磷的含量;田葆萍等^[12]将 100 mL 水样通过 HLB 固相萃取柱进行富集,再用甲醇洗脱,氮吹浓缩后,定容 1 mL,再用 HPLC-MS 检测,检出限为 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

全自动在线固相萃取^[13]通过结合大体积进样和在线固相萃取技术,自动化程度更高,无需进行液液萃取、浓缩等步骤,简化了样品前处理步骤,样品消耗量小,通量大,缩短了样品前处理时间,同时对环境污染小,更适合日常大批量水样分析。本方法采用二元高压液相色谱-质谱联用系统及在线固相萃取大体积进样系统,对样品进行富集后再用 LC-MS/MS 检测。利用阀程序的切换,液相色谱及质谱条件的优化,建立了全自动在线固相萃取超高效液相色谱-串联质谱快速测定地表水中痕量甲基对硫磷的分析方法,相对于传统的离线固相萃取方式,灵敏度更高,检出限更低,同时实现了样品的自动化在线前处理和测定。

1 实验部分

1.1 仪器、材料及试剂

LCMS-8050 液相色谱串联三重四极杆质谱仪(岛津企业管理(中国)有限公司),配置有电喷雾离子源(ESI), DGU-20A5R 真空脱气机, LC-20ADXR 二元高压梯度分析型色谱泵 A、泵 B 及 LC-20AD 全自动在线固相萃取大体积上样泵 C, CBM-20A 系统控制器, CTO-20AC 柱温箱(内有十通阀), SIL-16P 自动进样器(内有 5 mL 定量环,一次可最多进样 5 mL), LabSolutions 色谱管理软件。分析柱为 Shim-pack GIST C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 2.0 μm , 岛津企业管理(中国)有限公司);固相萃取柱为 HLB 柱(2.1 mm $\times$ 30 mm $\times$ 20 μm , 美国沃特世公司);0.22 μm 水系滤膜(天津市领航实验设备股份有限公司);玻璃针筒。

甲醇、乙腈均为(LC-MS, HPLC)级(霍尼韦尔贸易(上海)有限公司);甲酸为 UPLC-L-1C-MS 级(CNW Technologies); 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基对硫磷标准储备液(上海安谱实验科技股份有限公司);95% 甲基对硫磷-D6 标准品(上海化工研究院);15 mL 玻璃进样瓶(岛津企业管理(中国)有限公司);所有用水均为超纯水。

1.2 色谱-质谱分析条件

色谱条件:上样泵流动相 A 为超纯水,流动相 B 为乙腈,分析泵流动相 A 为 0.1% 甲酸水,流动相 B 为甲醇。上样泵流速为 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分析泵流速为 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 3.0 mL。梯度程序及阀切换时间见表 1。0—2 min,分析泵维持初始流动相,用于平衡分析柱,上样泵进行大体积进样,固相萃取柱对目标物完成富集吸附;2 min 时,十通阀开始切换,在线 SPE 小柱切换到分析流路;2—9 min,分析泵洗脱富集在 SPE 小柱上的甲基对硫磷,经分析柱分离,进入质谱检测器检测,上样泵流路则接至废液中;9 min 时,十通阀切换至初始状态;9—15 min,分析泵继续分析,上样泵在 9 min 从流动相 A 切换至流动相 B,9—11 min,用强极性乙腈溶液再生 SPE 小柱,11 min 时,上样泵切回流动相 A,11—15 min 时,回到初始状态,用超纯水进一步冲洗平衡 SPE 小柱,等待下一次进样(表 1)。

表 1 全自动在线固相萃取梯度洗脱程序及阀切换时间

Table 1 Gradient elution procedure for fully automatic online solid-phase extraction and time of valve switching

上样泵			分析泵		切换阀	
时间/min	流动相切换阀	流速/($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	时间/min	流动相/(B/%)	时间/min	位置
0.00	A	3	0.00	80	0.00	1-2
2.00	A	3	2.00	80	2.00	6-1
2.01	A	0	9.00	100	9.00	1-2
9.00	B	0	10.00	100		
9.01	B	3	10.10	80		
11.00	A	3	15.00	80		
15.00	A	3				

质谱条件: ESI 正离子(+)扫描, 多反应监测 (MRM) 模式, 碰撞气为氩气, 雾化气流量 $3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 加热气流量 $15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 接口温度 $400 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂温度 $650 \text{ }^\circ\text{C}$, DL 温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$, 加热块温度 $400 \text{ }^\circ\text{C}$, 干燥气流量 $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 甲基对硫磷的保留时间为 4.053 min , 具体 MRM 参数见表 2.

表 2 甲基对硫磷的 MRM 参数

Table 2 MRM parameters for methyl parathion analysis

前体离子 (m/z)	产物离子(m/z)	驻留时间/s	Q1pre偏差/V	CE/eV	Q3pre偏差/V
264.15	231.90	100	-10	-17	-24
264.15	124.95	100	-10	-21	-24

1.3 标准溶液的配制

标准使用液的配制: 将 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基对硫磷标准储备液逐级稀释, 用甲醇配成 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准使用液.

内标使用液的配制: 将 10 mg 甲基对硫磷-D6 标准品用丙酮溶解并定容至 100 mL , 得到内标储备液, 再用甲醇稀释成 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标使用液.

标准曲线的绘制: 采用内标法定量. 取不同体积的目标化合物标准使用液和 $10 \mu\text{L}$ 内标使用液, 用甲醇分别配制成 1 、 2 、 5 、 10 、 20 、 100 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准混合工作溶液(内标浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 然后将上述标准混合工作溶液用超纯水再稀释, 定容至 10.0 mL , 配制成 5 、 10 、 25 、 50 、 100 、 500 、 $1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准系列(内标浓度为 $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$), 分别装入 15 mL 玻璃进样瓶中, 按照 1.2 节方法, 由低浓度到高浓度依次进样分析. 以目标化合物质量浓度与内标化合物质量浓度的比值为横坐标; 以目标化合物与内标定量离子对响应值的比值为纵坐标, 绘制校准曲线.

1.4 样品前处理方法

将水样通过 $0.22 \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤后, 加入适量内标, 按照 1.2 色谱-质谱分析条件直接上机测定.

2 结果与讨论

2.1 质谱、色谱参数的优化

2.1.1 离子源参数的优化

在确立的 MRM 参数基础上, 对比了不同雾化气流量、加热气流量、干燥气流量、接口温度及 DL 温度对甲基对硫磷灵敏度的影响. 雾化气流量从 $1.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 起, 以 $0.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度升到 $3.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 甲基对硫磷的灵敏度呈逐渐增大的趋势. 在 $3.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 灵敏度达到最大, 故选择其雾化气流量为 $3.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

接口温度从 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 起始, 以 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 为一个步幅升到 $400 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 灵敏度呈逐渐增大的趋势. 在 $400 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 灵敏度最佳, 故选择其接口温度 $400 \text{ }^\circ\text{C}$.

分别选用加热气和干燥气流量比例($\text{L}\cdot\text{min}^{-1} : \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)为 $5:15$ 、 $10:10$ 和 $15:5$, 甲基对硫磷在比例为 $15:5$ 时灵敏度最佳, 故选择 $15:5(\text{L}\cdot\text{min}^{-1} : \text{L}\cdot\text{min}^{-1})$ 为合适的加热气和干燥气流量比.

当 DL 温度从 $160 \text{ }^\circ\text{C}$ 起始, 以 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 为一个步幅升到 $280 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 甲基对硫磷的响应值逐渐增加, 并在 $280 \text{ }^\circ\text{C}$ 达到最大值, 故选择 $280 \text{ }^\circ\text{C}$ 作为合适的 DL 温度.

2.1.2 水相洗脱溶剂的优化

甲基对硫磷在弱酸性和中性环境下较为稳定, 本文选用质量浓度为 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基对硫磷溶液, 对比了 0.05% 、 0.1% 、 0.2% 、 0.5% 的 4 种浓度甲酸水溶液作为水相洗脱溶剂, 考察对其灵敏度的影响. 结果表明, 当甲醇水溶液浓度为 0.5% 和 0.2% 时都比较低下, 当甲酸水溶液浓度降低为 0.1% , 其响应值明显增加, 灵敏度达到最高. 当甲酸水溶液浓度继续降至 0.05% 时, 其响应值又呈降低趋势, 故本文选用 0.1% 甲酸水溶液作为合适的水相洗脱溶剂.

2.1.3 有机相洗脱溶剂的优化

选用质量浓度为 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基对硫磷溶液, 当水相流动相为 0.1% 甲酸水溶液时, 对比研究了纯乙腈、甲醇-乙腈=1:2、甲醇-乙腈=1:1、甲醇-乙腈=2:1、甲醇-乙腈=4:1、甲醇-乙腈=8:1、纯甲醇等 7 种不同比例的甲醇-乙腈有机相洗脱溶剂其灵敏度的影响. 结果表明, 当有机相为纯乙腈时, 甲基对硫磷灵敏度特别低、随着有机相中甲醇比例的增加, 甲基对硫磷的灵敏度呈现不断升高的趋势. 当有机相为纯甲醇时, 目标物相应值大为提升, 灵敏度达到最高, 峰型也较好, 故本文选用有机相为纯甲醇作为合适的有机相洗脱溶剂.

2.1.4 洗脱液初始比例的优化

经上述分析条件优化后, 甲基对硫磷的响应值得到明显提高, 但是峰型拖尾严重, 本研究选取了洗脱液初始流动相百分比分别为 $20:80$ 、 $40:60$ 、 $60:40$ 及 $80:20$ 的 0.1% 甲酸水-甲醇混合洗脱液对其峰型和出峰时间进一步进行优化. 结果表明, 随着初始流动相中甲醇比例的增加, 甲基对硫磷的峰型拖尾程度逐渐减小, 当初始流动相比例中甲醇比例达到 60% 时, 上部峰型明显变窄, 但仍有拖尾; 当初始流动相比例中甲醇比例达到 80% 时, 其峰型继续变窄, 拖尾消失. 故本文选用 0.1% 甲酸水-甲醇混合溶液 ($20:80, V:V$) 作为合适的洗脱液初始流动相比例.

2.2 方法验证

2.2.1 线性范围

按照优化后的 UPLC-MS/MS 条件下测定, 并绘制标准曲线, 甲基对硫磷的标准工作曲线为 $Y=4.6419X+0.0445$ ($R^2=0.9983$). 在质量浓度为 5 — $1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性良好, 线性相关系数 $R^2>0.995$, 达到了极显著水平. 甲基对硫

磷及甲基对硫磷-D6标准溶液的 $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MRM标准色谱图显示,内标物质甲基对硫磷-D6与待测物质甲基对硫磷的监测离子对出峰时间基本一致.经多离子反应监测(MRM)条件优化后,甲基对硫磷的定量离子对(m/z)和定性离子对(m/z)分别为 $264.15\rightarrow 124.95^*$ 和 $264.15\rightarrow 231.90$,甲基对硫磷-D6的定量离子对(m/z)和定性离子对(m/z)分别为 $269.85\rightarrow 252.90^*$ 和 $269.85\rightarrow 149.20$,其中各物质定量离子对(m/z)的确定是由于该监测离子对能表现出更高的信号强度且两对离子对出峰时间一致.

2.2.2 方法检出限、定量限

本文按照HJ 168-2020进行方法验证,对空白地表水样品进行甲基对硫磷加标浓度为 $20\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的7次平行加标测定,按公式(1)计算方法检出限,以4倍检出限作为方法定量限.

$$\text{MDL} = t_{(n-1,0.99)} \times S \quad (1)$$

式中:MDL—方法检出限; n —样品平行测定次数测定; t —自由度为 $n-1$,置信度为99%的t分布(单测); S — n 次平行测定的标准偏差.

添加回收试验结果表明,甲基对硫磷在地表水中的方法检出限为 $4\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限为 $16\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=7$,自由度为6,置信度为99%时的t分布, $t=3.143$,符合痕量分析的要求.

2.2.3 方法精密度、准确度

取地表水样品,按照1.4步骤制备样品和加标样品,分别做低($40\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)、中($100\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)、高($500\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)的3个质量浓度水平的加标回收试验,各加标样品平行测定6次,计算方法准确度和精密度.添加回收试验结果表明(表3);在40、100、500 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 等3个添加水平下,甲基对硫磷的平均回收率为90.1%—97.8%,相对标准偏差为1.7%—3.5%,说明该方法精密度和准确度良好,符合痕量分析的要求.

表3 精密度、准确度测试数据表

Table 3 Method precision and accuracy test

化合物	平均样品浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$	样品加标浓度($40\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)		样品加标浓度($100\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)		样品加标浓度($500\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	
		平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
甲基对硫磷	N.D.	90.1%	3.5%	95.9%	2.1%	97.8%	1.7%

注:N.D.代表样品未检出.

2.3 实际样品测定

平行采集3份100mL长沙市某集中式生活饮用水源地地表水样品,按1.4步骤进行样品处理后,上机测定,3份水样中甲基对硫磷均未检出.

3 结论

本研究利用阀程序的切换,通过液相色谱及质谱条件优化试验,添加回收率试验和实际样品测定,建立了全自动在线固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法对地表水中痕量甲基对硫磷的快速测定方法,样品经在线富集、色谱柱分离后,梯度洗脱,采用电喷雾离子源正离子多反应监测模式,内标法定量.该方法在质量浓度为5—1000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好(相关系数 $R^2\geq 0.998$),方法检出限为 $4\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限为 $16\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,在3个添加水平下的回收率在90.1%—97.8%之间,相对标准偏差在1.7%—3.5%之间.该方法相比传统的离线固相萃取方式,灵敏度更高,检出限更低,简化了分析步骤,对环境较友好,操作快速,简便,具有较高的准确度和精密度,适用于对地表水中痕量甲基对硫磷的分析测定.

参考文献 (References)

- [1] 陈彦彤,李杰,李欢,等.茶叶中甲基对硫磷、对硫磷农药残留分析及安全性评价[J].食品与机械,2023,39(8):55-59,159.
- [2] 国家环境保护总局,国家质量监督检验检疫总局.地表水环境质量标准:GB 3838—2002[S].北京:中国环境科学出版社,2002.
- [3] 邵先涛,沈鹏,徐晓晖,等.气相色谱法测定水中甲基对硫磷的不确定度研究[J].能源与环境,2021(6):97-98,107.
- [4] 陈绍华,郑清林.全自动固相萃取-气相色谱-三重四极杆串联质谱法测定地下水中甲基对硫磷[J].分析仪器,2023(3):40-44.
- [5] 鲍玲,江悠,黄艳,等.液相色谱法测定自来水中甲基对硫磷[J].城镇供水,2014(6):42-43.
- [6] 杨敏娜,高翔云,汤志云.UPLC-串联质谱法快速测定地表水中多种农药残留[J].环境监测管理与技术,2019,31(1):54-57.
- [7] 王路杰,褚惠炎,陈达,等.液液萃取-气相色谱质谱法同时测定地下水中6种有机污染物[J].化学工程师,2023,37(9):44-47.
- [8] 成树森.气相色谱法检测地表水中有机磷农药[J].品牌与标准化,2023(4):82-84.
- [9] 张毅华,黄帝媛.气相色谱质谱法测定地表水中4种有机磷农药[J].化学工程师,2023,37(9):41-43,108.
- [10] 张泾凯,顾青青,许小燕,等.液液萃取/气相色谱/串联质谱法测定水中有机磷[J].中国给水排水,2016,32(17):145-147.
- [11] 胡红美,郭远明,金衍健,等.固相膜萃取-气相色谱法测定养殖用水中痕量有机磷农药[J].理化检验-化学分册,2015,51(6):770-774.
- [12] 田葆萍,彭清涛,王育兵,等.SPE-HPLC-MS法测定饮用水中甲基对硫磷[J].解放军预防医学杂志,2015,33(6):640-641.
- [13] 徐潇颖,刘柱,毛思浩,等.全自动在线固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定螺旋藻中8种微囊藻毒素[J].食品科技,2023,48(4):305-311.