

· 监测技术 ·

水中草甘膦和氨甲基膦酸的柱前衍生 - 液相色谱方法研究

张蓓蓓¹, 张立志², 章勇¹

(1. 国家环境保护地表水环境有机污染物监测分析重点实验室, 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

摘要:建立柱前衍生 - 液相色谱 - 荧光检测法同时测定水中草甘膦和氨甲基膦酸的方法。水样经茚甲氧羰酰氯衍生化后取上清液进样, 采用 ODS C₁₈ 柱, 以水 (5 mmol/L 乙酸铵) - 乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 采用荧光检测器进行检测。实验通过加入柠檬酸钠, 解决了实际水样中金属阳离子的干扰问题。草甘膦和氨甲基膦酸在一定范围内线性良好 ($r = 0.9973 \sim 0.9990$), 回收率为 92.2% ~ 102%, 相对标准偏差为 4.3% ~ 8.5%, 方法检出限为 1.29 μg/L 和 1.84 μg/L。

关键词:草甘膦; 氨甲基膦酸; 茚甲氧羰酰氯柱前衍生; 柱前衍生 - 液相色谱法; 地表水

中图分类号: O657.7⁺²

文献标识码: B

文章编号: 1674 - 6732(2015)02 - 0013 - 04

Coupling Pre-column Derivatization with High Performance Liquid Chromatography for Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Water

ZHANG Bei-bei¹, ZHANG Li-zhi², ZHANG Yong¹

(1. State Environmental Protection Key Laboratory of Monitoring and Analysis for Organic Pollutants in Surface water, Environmental Monitoring Center of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210036, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water was developed by pre-column derivatization followed with high performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence detection. 9-Fluorenylmethyl chloroformate was selected as the derivatization reagent. After derivatization and extraction, the upper aqueous phase was analyzed. HPLC was achieved on an ODS C18 column by linear gradient elution using 5 mmol ammonium acetate-acetonitrile as the mobile phase, and fluorescence detector was used for detection. By adding trisodium citrate, the interference from metal cations was effectively eliminated. The results showed that good linear relationships ($r = 0.9973 \sim 0.9990$) were exhibited in the range 10.0 ~ 500 μg/L for both compounds. The recoveries ranged from 92.2% to 102%, with the relative standard deviations of 4.3% ~ 8.5%. The detection limits were 1.29 μg/L and 1.84 μg/L for glyphosate and aminomethylphosphonic acid, respectively. This method was simple, rapid, sensitive and accurate. It was suitable for simultaneous determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface water.

Key words: Glyphosate; Aminomethylphosphonic acid; 9-Fluorenylmethyl chloroformate; Pre-column derivatization; Surface water

草甘膦 (Glyphosate, PMG), 化学名为 N - 膦羧基甲基甘氨酸, 是一种广谱、非选择性、内吸传导性强的除草剂。随着转基因抗草甘膦农作物的增多, 草甘膦已成为世界上应用最广、产量最大的农药品种。草甘膦具有强极性、低挥发性的特点, 导致其难以气化, 且在常规反相柱上没有保留, 难以利用气相色谱 (GC) 和高效液相色谱 (HPLC) 进行分离测定。此外, 由于缺少生色基团, 难以直接利用

紫外和荧光检测器进行检测。草甘膦的代谢物为氨甲基膦酸 (Aminomethyl phosphonic acid, AMPA), 其极性与水溶性不利于对它进行提取。

目前, 《生活饮用水标准检验方法》(GB/T

收稿日期: 2014 - 10 - 08; 修订日期: 2014 - 10 - 11

基金项目: 江苏省环境监测科研基金资助项目 (1301)

作者简介: 张蓓蓓 (1982—), 女, 高级工程师, 硕士, 主要从事环境监测科研工作。

5750-2006)以及EPA 547方法测定环境水体中草甘膦和氨甲基磷酸均采用柱后衍生离子交换色谱法,操作繁琐且不易掌握。国内外文献报道的检测方法主要包括离子色谱法^[1-3]、柱前或柱后衍生-液相色谱法^[4-5]、柱前衍生-气相色谱法^[6-7]或气质谱联用法^[8]和液相色谱质谱法^[9-13]等。但采用质谱检测,仪器设备昂贵,不易推广,因此,建立了较易推广的柱前衍生-液相色谱-荧光检测法。草甘膦结构中存在较多的活性位点,易与多价金属阳离子发生络合反应^[14-17]。在大量饮用水源地实际样品测定中也发现,部分实际样品加标后回收率很低,因此在方法研究中着重考察了水中多价阳离子对草甘膦及氨甲基磷酸测定的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

仪器:高效液相色谱/荧光检测器(Waters 2695/2475);Empower 3.0工作站;水浴机(LAUDA公司);Milli-Q超纯水器(美国millipore公司);涡旋混合器(日本LMS公司)。

试剂:草甘膦(PMG,纯度97.0%);氨甲基磷酸(AMPA,纯度98.3%),购于Dr. Ehrenstorfer公司;甲醇;乙腈(色谱纯,Merck公司);乙酸铵(色谱纯);纯化水(Millipore);柠檬酸三钠(分析纯);磷酸(分析纯);四硼酸钠(分析纯);茚甲氧羰酰氯(FMOC,色谱纯)。

1.2 色谱分析条件

ODS C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm);流动相为水-5 mmol/L乙酸铵(A相)和乙腈(B相),采用梯度洗脱模式,0 min, A:B = 90:10(V/V),保持2 min;到8 min时,梯度比例变为A:B = 50:50(V/V);到10 min时,梯度比例变为A:B = 0:100(V/V),保持2 min;到14 min时,梯度比例变回初始比例A:B = 90:10(V/V),保持1 min。流速1.0 mL/min,进样量20 μL,色谱柱温为25℃。荧光检测器激发波长254 nm,发射波长315 nm。

1.3 样品制备

在10 mL玻璃具塞试管中,取1.0 mL水样,加入100 μL 5%柠檬酸三钠水溶液(m/V)并混匀;加入0.5 mL的0.05 mol/L四硼酸钠水溶液和0.5 mL的0.1% FMOC乙腈溶液(m/V),塞上试管盖,充分振荡,放入40℃恒温水浴中反应15 min;取出试管,加入0.5 mL的2%磷酸水溶液(V/V)以

中止反应;加5 mL二氯甲烷涡旋萃取2 min,取水相层;上机前过0.45 μm针头过滤器。

2 结果与讨论

2.1 不同极性萃取溶液比较

配制相同浓度的水样,经过衍生化反应后,比较不加萃取溶剂直接过滤进样、加入乙酸乙酯萃取后过滤进样、加入正己烷萃取后过滤进样和加入二氯甲烷萃取后过滤进样四种不同极性萃取溶液对衍生化副产物的去除效果。结果表明,不加萃取溶剂直接过滤进样,样品中干扰物质较多,衍生化反应副产物响应很高。而采用正己烷、乙酸乙酯和二氯甲烷分别萃取,副产物去除能力依次增强,对目标物亦无损失。同时针对实际水样,采用二氯甲烷作为萃取剂可以较大范围的去除一些不必要的有机干扰物,从而选择二氯甲烷作为萃取剂。

2.2 多价阳离子对目标物的影响考察

对实际水样草甘膦检测分析,结果表明,有些实际水样经加标后回收率非常低,而同时采用纯水加标回收率均正常。查阅文献可知,草甘膦具有与多价阳离子配位络合的活性点,实际样品加标回收率低可能与样品中含有一定浓度的多价阳离子有关。因此,着重考察了水样中Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Cu²⁺对PMG和AMPA检测分析的影响。

根据自然环境水体中金属离子浓度水平,配制了含有不同浓度、不同种类的多价金属阳离子的水样以及纯水样品,分别加入一定浓度PMG和AMPA,避光过夜放置24 h后,进行检测分析,以考察多价金属阳离子对目标化合物是否有影响。具体实验过程:取1.0 mL水样于10 mL玻璃具塞试管中,加入0.5 mL的0.05 mol/L四硼酸钠和0.5 mL的0.1% FMOC,塞上试管盖,充分振荡,放入40℃恒温水浴中反应30 min;取出试管,加入0.5 mL的2%磷酸溶液以中止反应;加5 mL二氯甲烷涡旋萃取2 min,取水相层;上机前过0.45 μm针头过滤器,结果见表1。由表1可见,ρ(Cu²⁺)达到0.05 mg/L以上时,对PMG有明显络合能力,影响水体中PMG的测定,但对AMPA无显著影响;而其他阳离子在设定浓度水平下对两个目标物的测定均没有明显影响。

2.4 金属螯合剂的选择

实验发现,水体中存在Cu时会和PMG发生络合,并显著影响PMG的测定。因此,采用金属螯合

表1 水体中多价阳离子对目标物测定的影响考察 (n=6)

ρ (多价阳离子)/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	PMG 回收率					AMPA 回收率				
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Fe^{3+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Fe^{3+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}
0	92	96	101	92	98	94	102	97	95	96
0.005			95	102	101			104	88	87
0.01			103	89	103			96	92	92
0.02			89	94	95			89	106	88
0.05			92	92	89			97	96	105
0.1			105	96	58			102	105	100
0.2			96	102	36			96	93	92
0.4			92	92	37			88	96	89
0.6			95	95	35			85	88	93
0.8			103	96	38			92	86	88
1			92	99	35			104	96	101
2			84	92	31			97	94	95
3			80	94	28			86	94	89
4			81	88	28			92	92	92
40	95	92				92	93			
80	91	97				96	85			
120	94	88				88	98			
160	96	95				92	91			

剂来竞争水体中的 Cu^{2+} 及其他金属阳离子,以释放 PMG 从而实现准确定量。

实验研究了在衍生化之前,加入 EDTA、酒石酸钾钠及柠檬酸三钠的影响。结果表明,加入 EDTA 和酒石酸钾钠,虽然对 Cu^{2+} 有较好络合能力,但对目标物 PMG 会产生较大的副产物干扰峰,而柠檬酸三钠既可以很好的竞争络合 Cu^{2+} ,又对两个目标物没有干扰。因此采用柠檬酸三钠作为实验的金属螯合剂。同时,按照柠檬酸三钠与金属阳离子最弱络合比例(摩尔比 1:1)来计算,1 mL 水体中加入 5% 柠檬酸三钠 100 μL ,已完全过量,可以满足对自然水体中金属阳离子的充分络合。

2.5 衍生化反应温度和时间优化

根据 1.3 节中样品制备过程,分析了不同反应温度(常温、40 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$)和时间(0、5、15、30、60和 120 min)对衍生化效率的影响,见图 1(a)(b)。由图 1 可见,在水浴温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,反应时间为 5~30 min,PMG 和 AMPA 具有较高的衍生化效率,因此选择 40 $^{\circ}\text{C}$ 衍生化温度,15 min 反应时间。

2.6 工作曲线与检出限

配制质量浓度依次为 10.0、20.0、50.0、100、200 和 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 PMG 和 AMPA 水样(此为参考浓度序列),按照 1.3 节样品制备过程处理后进行检测分析,结果见表 2。由表 2 可见,在该浓度范围内 2 种组分的相关系数均 > 0.995。2 种目标物经衍生后的标准色谱图见图 2。

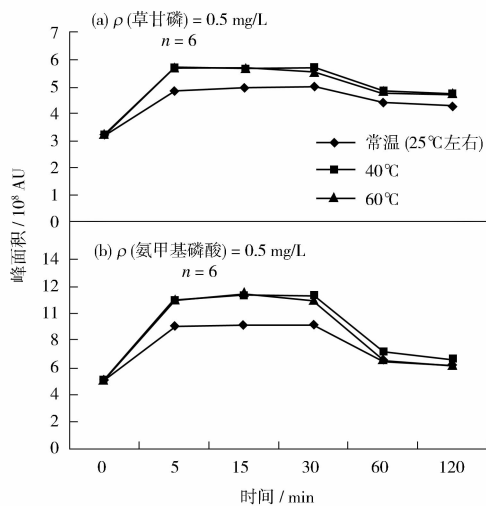


图1 衍生化效率考察

表2 PMG 和 AMPA 的线性方程

化合物	线性方程	相关系数
PMG	$Y = 2.23 \times 10^5 X - 2.0 \times 10^5$	$r = 0.999 0$
AMPA	$Y = 3.21 \times 10^5 X + 1.49 \times 10^5$	$r = 0.997 3$

2.7 方法检出限

根据《环境监测 分析方法标准制修订 技术导则》(HJ/T 168 - 2010)空白实验中未检出目标物质的检出限测定方法,以 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的水样浓度作为检出限测定的浓度,配制 7 份平行水样。经全过程分析,计算其浓度的标准偏差 S。以 3.143S

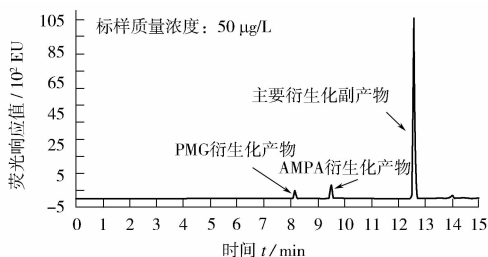


图2 2种目标物经衍生后的标准色谱图

表3 方法检出限计算结果 (n = 7)

化合物	测得值							平均值	标准偏差	检出限	定量限
	1	2	3	4	5	6	7				
PMG	5.64	5.06	5.35	4.96	4.95	5.81	4.67	5.21	0.41	1.29	5.14
AMPA	5.97	6.07	5.27	5.06	4.60	5.70	4.73	5.34	0.58	1.84	7.35

为 20.0、200.0 µg/L, 每个添加水平平行配制 6 份样, 其加标回收率及精密度分析结果见表 4。由表 4 可见, 2 种目标物的回收率在 92.2% ~ 102% 之间, 测定结果的相对标准偏差在 4.3% ~ 8.5% 之间, 方法的准确度和精密度均符合痕量分析的要求。

表4 2种目标化合物的回收率、精密度 (n = 6)

化合物	加标水平 / (µg · L ⁻¹)	RSD / %	回收率 / %
PMG	20.0	8.5	102
	200.0	4.3	92.7
AMPA	20.0	7.2	92.2
	200.0	4.8	96.5

3 结语

建立了柱前衍生-高效液相色谱-荧光检测法分析水中草甘膦和氨甲基磷酸的方法, 该法操作简便、灵敏度高、准确性好的特点, 且很好地排除了地表水中金属阳离子的干扰, 在定性和定量上更加精确可靠, 适合大批量地表水样品的快速分析。

[参考文献]

[1] GUO ZX, CAI QT, YANG ZG. Ion chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, fosamine and ethephon at nanogram levels in water[J]. Rapid Commun. Mass Spectrom, 2007, 21(10): 1606-1612.

[2] 李祥平, 齐剑英, 陈永亨, 等. 离子色谱法测定环境水体中的卤乙酸和草甘膦[J]. 应用化学, 2009, 26(4): 447-450.

[3] 张培志, 吴军, 张培敏, 等. 土壤中草甘膦的离子色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 89-90.

[4] MONTRA P, JAYANTA S, MITRA S, et al. Micro-scale mem-

为检出限 (LOD), 4 倍检出限为定量下限 (LOQ), 结果见表 3。由表 3 可见, 2 种目标物的检出限为 1.29、1.84 µg/L, 该方法检出限远远低于国家控制标准限值。

2.8 方法的精密度及回收率

选择具有典型性的地表水样 (含有 Cu²⁺ 0.114, Fe³⁺ 0.008, Zn²⁺ 0.032, Ca²⁺ 138 mg/L) 进行加标回收率测定, 加标后两个质量浓度水平分别

brane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1189(1-2): 483-492.

[5] QIAN K, TANG T, SHI TY, et al. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 635(2): 222-226.

[6] 胡继业, 赵殿英, 宁君, 等. 气相色谱-氮磷检测器测定草甘膦在土壤和苹果中的残留量[J]. 农药学报, 2007, 9(3): 285-29.

[7] 马为民, 牛森, 李东运, 等. 气相色谱法测定几种蔬菜水果中草甘膦残留[J]. 农药, 2006, 45(4): 261-262.

[8] 程雪梅, 周敏. 气相色谱-质谱法测定香蕉和灌溉水中的草甘膦及其代谢物的残留量[J]. 色谱, 2004, 22(3): 288.

[9] HAO CY, MORSE D, MORRA F, et al. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(33): 5638-5643.

[10] SANCHIS J, KANTIANI L, LLORCA M, et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(7): 2335-2345.

[11] HANKE I, SINGER H, HOLLENDER J, et al. 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[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(6): 2265-2276.

(下转第 19 页)

的检出率更好。综上所述,本次实验采用的改良沉淀集卵法稳定性要较漂浮集卵法高,尤其对于低浓度样品的检测,具有一定的优势。

3 结语

通过实验可以发现,改良的沉淀集卵法对低、中、高3种浓度加标样品中蛔虫卵的分离效果依次为高浓度>中浓度>低浓度,其中最高回收率达到30.4%,且不同浓度间回收率波动较小。该结果与现有文献记载的各种固体蛔虫卵检测方法的回收率比较,具有一定优势,而随着蛔虫卵数量的增多,漏检率会进一步下降,回收率有可能进一步上升,有待后续论证。改良后的沉淀集卵法不仅精简了原EPA分离方法的实验步骤,缩短了实验时间,而且选择了更加通用的实验器材和设备,降低了实验成本,使该方法更便于在国内推广。就实验结果来看,改良后的沉淀集卵法回收效果并没有下降,且方法的稳定性较高,尤其在低浓度样品的检测中表现较漂浮集卵法更为出色。

[参考文献]

[1] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(增刊): 332-334.

[2] 詹希美编. 人体寄生虫学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

[3] 孔繁瑶编. 家畜寄生虫学[M]. 2版. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.

[4] 许隆祺, 蒋则孝, 余森海, 等. 人体常见三种土源性线虫感染与土壤污染调查[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(3): 171-173.

[5] 国家环境保护总局. GB 7959-1987 粪便无害化卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.

[6] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB 18466-2005 医疗机构水污染物排放标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.

出版社, 2005.

[7] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB 18596-2001 畜禽养殖业污染物排放标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.

[8] 国家环境保护总局. GB 8172-1987 城镇垃圾农用控制标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.

[9] 俞梁敏, 徐燕, 王婷. 典型外向型经济地区农村固体废弃物污染处置状况与管理对策[J]. 环境监控与预警, 2014, 6(2): 55-58.

[10] 杜敏敏, 黄卫. 以污染源普查结果谈环境问题与对策建议[J]. 环境监控与预警, 2010, 2(3): 52-56.

[11] 朱俊勇, 张明华, 郭枫. 寄生虫卵饱和盐溶液浮聚法的比较研究[J]. 数理医药学杂志, 2002, 15(2): 173.

[12] GEENEN P L, BRESCIANI J, BOES J, et al. The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg[J]. Parasitol, 1996, 85(4): 616-622.

[13] 李鹏. 出口泡菜中人畜共患寄生虫卵的检测与处理[J]. 卫生检验, 2007(1): 33.

[14] MAYA C, JIMENEZ B, SCHWARTZBROD J. Comparison of Techniques for the Detection of Helminth Ova in Drinking Water and Wastewater[J]. Water Environment Research, 2006, 78(2): 118-124.

[15] EPA. EPA/625/R-92/013 Environmental Regulations and Technology, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge[S]. 2003.

[16] 陈佩惠编. 人体寄生虫学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1988.

[17] 白功懋. 寄生虫与寄生虫检验学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1989.

[18] 张皓, 张小琼, 张翔, 等. 改良的沉淀集卵法分离四种不同固体介质中蛔虫卵效果的比较研究[C]//中国环境科学学会学术年会论文集, 2013.

[19] 崔晓明, 周宪民. 大量土壤样本中蛔虫卵的检测方法初探[J]. 江西医学院学报, 1994, 34(3): 20.

[20] 钱颖骏, 诸廷俊, 王聚君, 等. 4种漂浮法分离土壤中蛔虫卵的效果比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4): 305-306.

[21] AJALA M. The separation results of *Ascaris* eggs with Floating in the soil salt[J]. Helminthol, 1995, 69(1): 1-6.

(上接第16页)

[12] 郑和辉, 张静, 李洁, 等. 超高效液相色谱串联质谱法直接进样测定水中的草甘膦和咪唑丹[J]. 分析试验室, 2008, 27(12): 68-70.

[13] 支建梁, 牟仁祥, 陈铭学, 等. 柱后衍生液相色谱法测定粮食中草甘膦和氨基磷酸残留量[J]. 分析试验室, 2008, 27(增刊): 170-172.

[14] 张伟, 王进军, 高立明, 等. 草甘膦在水-土壤系统中的环境

行为及研究进展[J]. 农药, 2006, 45(10): 649-654.

[15] 卢信, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 除草剂草甘膦的性质及环境行为综述[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 785-790.

[16] 王玉军, 周东美, 孙瑞娟, 等. 除草剂草甘膦在几种土壤和矿物上的吸附研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(5): 780-785.

[17] 杨宏伟, 郭博书, 嘎尔迪. 除草剂草甘膦在土壤中的吸附行为[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 158-162.