

固相萃取-GC-MS/MS 法测定海水中莠去津及其代谢物残留研究

薛颖^{1,2}, 李雨琦¹, 张蓉蓉¹, 孙爱丽^{1*}, 张泽明¹, 史西志¹

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832)

摘要: 采用固相萃取结合气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS), 建立了海水中痕量莠去津(ATR)及其主要代谢产物脱乙基莠去津(DEA)、脱异丙基莠去津(DIA)和脱乙基脱异丙基莠去津(DDA)的精确定量分析方法. 海水样品在萃取前调节 pH 至 3.0, 然后经 HLB 固相萃取柱富集、净化, 在 GC-MS/MS 多反应监测模式(MRM)下进行定性、定量分析, 并对该方法的线性、检出限、准确度和精密度进行验证分析. 结果表明: ATR、DEA、DIA 和 DDA 在质量浓度为 0.5~100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内具有良好的线性相关性, R^2 均大于 0.999 0, 方法检出限依次为 0.120、0.060、0.060、0.024 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 回收率为 92.3%~104.7%, 相对标准偏差(RSD)小于 6.6%. 本文方法具有较好的线性、灵敏度、准确度和精密度, 并已成功应用于象山港海水实际样品的检测分析.

关键词: GC-MS/MS; 莠去津; 代谢产物; 固相萃取; 海水

中图分类号: X834

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2020) 04-0012-05

莠去津(Atrazine, ATR), 又名阿特拉津, 是一种典型的选择性内吸扩散型除草剂^[1], 因其高效性被广泛应用于防治一年生禾本科杂草、阔叶杂草以及清除水草和有害藻类等^[2]. 有研究表明^[3], ATR 已在全球 70 多个国家注册使用, 每年消耗量高达 7~9 万 t, 是全球使用量较多的除草剂之一. 然而, ATR 在带来经济效益的同时, 也带来了环境污染、生态失衡以及食品安全等一系列问题. 现有研究表明^[4], ATR 虽然是低毒型除草剂, 但是由于其具有类雌激素作用, 会作为内分泌干扰物影响生物体的内分泌系统、中枢神经系统以及免疫系统. 因此, 2002 年美国环境保护署将 ATR 列入优先控制的环境污染物名单^[5]. 此外, 残留在环境中的 ATR 在化学、光及微生物等作用下可以被降解, 其主要降解产物为脱乙基莠去津(DEA)、脱异丙基莠去津(DIA)和脱乙基脱异丙基莠去津(DDA)^[6]. 进一步研究表明^[7], DEA、DIA 和 DDA 与 ATR 具有相同的毒性模式, 且有更强的极性和流动性, 使其更易

迁移至河流、湖泊及海洋, 危害生态环境. 近年来, ATR 及其降解产物在水体、土壤以及食品中被频繁检出, 对生态环境和人类健康造成了严重威胁^[8-9].

目前, 检测水体中 ATR 残留含量的方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱法(LC-MS)以及气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等^[10]. 其中, GC-MS/MS 具有灵敏度高、分离效果好等优点, 可实现对多组分痕量污染物的精确定性、定量测定. 然而, ATR 及其降解产物在海水中通常残留浓度较低. 此外, 与母体及其他降解产物相比, DDA 具有很高的极性, 对 ATR 及其降解产物很难同时进行提取和纯化, 因此有效、灵敏的前处理是实现精确分析的前提. 目前对于除草剂的检测研究主要集中在母体组分的测定, 对于海水中 ATR 及其降解产物同时检测的方法尚未见报道.

本文利用萃取效率高、重现性和回收率好的固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE)技术, 通过优

收稿日期: 2019-12-07.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31772856); 浙江省自然科学基金(LR16C190001).

第一作者: 薛颖(1995-), 女, 安徽滁州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品安全. E-mail: 2712548672@qq.com

*通信作者: 孙爱丽(1978-), 女, 山东潍坊人, 博士/高级实验师, 主要研究方向: 环境与水产品安全. E-mail: sunaili@nbu.edu.cn

化海水样品 pH、固相萃取柱和洗脱溶剂类型,提高样品前处理效率;结合 GC-MS/MS 方法,建立了适用于海水样品中 ATR 及其降解产物的精确定量检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Agilent 7890B-7000D 型气相色谱-三重四级杆串联质谱仪(美国安捷伦科技有限公司); DB-5MS 型毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 固相萃取仪(美国 Supelco 公司); N-EVAP-24 型氮吹仪(美国 Organomation 公司); Milli-RO plus 型纯水仪(美国密理博科技有限公司); Vortex-5 型涡旋混合器(德国 IKA 公司)。

ATR(99.0%)、ATR-d₅(内标 99.0%)、DEA(98.5%)、DIA(99.5%)和 DDA(99.0%)标准品均购自 Sigma-Aldrich 公司。色谱纯乙酸乙酯、丙酮、甲醇购自 Tedia 公司。丙酮、甲醇、氨水及盐酸等试剂为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。C₁₈ 固相萃取柱(500 mg/6 mL)、MCX 混合型阳离子固相萃取柱(500 mg/6 mL)、HLB 亲水亲脂型固相萃取柱(500 mg/6 mL)购自上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 10.0 mg 标准物质(ATR、DEA、DIA、DDA),配制成质量浓度为 100.0 mg·L⁻¹ 的标准储备液,储存于 -20 °C 冰箱中备用,标准工作溶液用丙酮稀释成需要的浓度。精确吸取 100 μL 质量浓度为 100.0 mg·L⁻¹ 的 ATR、DEA、DIA、DDA 标准溶液至 10 mL 容量瓶中,加入丙酮稀释至刻度线,混合标准溶液质量浓度为 1 μg·mL⁻¹。分别吸取适量混合标准溶液,用丙酮逐级稀释成质量浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μg·L⁻¹ 的梯度混合标准系列,并加入适量内标物,放置于 4 °C 储存备用。

1.3 样品采集与保存

在象山港海域收集表层 0.5 m 海水样品,将样品沿瓶口缓缓倒入 500 mL 棕色玻璃瓶中使其充满,并加盖密封(瓶内不能存在空气或气泡)。现场采集的水样避光储存在 4 °C 冰箱中,并于 7 d 内完成。

1.4 样品前处理

准确量取 500.0 mL 海水样品,用 0.45 μm 醋酸

纤维滤膜减压过滤,加盐酸调节 pH 为 3。将 HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水进行活化;然后将海水样品以 5 mL·min⁻¹ 流速过柱,进一步用 5 mL 5% 甲醇-水溶液淋洗,低真空状态保持 30 min 以抽干萃取柱中残余水分;最后用 10 mL 0.2% 氨水丙酮溶液洗脱,收集洗脱液。洗脱液于 40 °C 水浴中以氮气吹至近干,用 200 μL 丙酮复溶,采用 GC-MS/MS 测定。

1.5 仪器条件

气相色谱条件: DB-5MS 型色谱柱;进样口温度 280 °C,进样体积 1 μL,采用不分流进样模式,高纯 He 为载气,流速 2.25 mL·min⁻¹。程序升温:初始温度 70 °C 保持 1 min,以 10 °C·min⁻¹ 升至 180 °C,保持 6 min,再以 40 °C·min⁻¹ 升至 310 °C,保持 1 min。

质谱条件:离子源温度和传输线接口温度均为 280 °C,四级杆质量分析器温度为 150 °C,溶剂延迟时间为 5.8 min;电子轰击电子源(EI) 70 eV;以高纯 N₂ 作为碰撞气,流速为 1.5 mL·min⁻¹。采集方式为多反应监测扫描模式(MRM),扫描范围 50~500 amu。MRM 模式下 ATR 及其代谢物的保留时间、离子对以及碰撞能见表 1。在上述仪器条件下,ATR、DEA、DIA 和 DDA 的分离效果以及总离子流色谱图如图 1 所示。

表 1 4 种目标化合物的质谱条件

化合物	保留时间/min	定量离子对	碰撞能 1/V	定性离子对	碰撞能 2/V
ATR	16.486	215.1>200.1	5	215.1>173.0	5
DEA	14.494	187.0>172.1	5	187.0>145.0	5
DIA	14.279	173.0>145.0	5	173.0>158.0	5
DDA	12.672	145.0>110.1	10	145.0>68.0	30

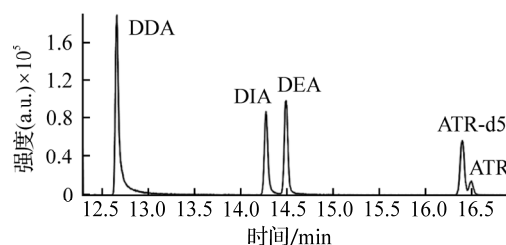


图 1 总离子流色谱图

2 结果与讨论

2.1 固相萃取柱的选择

对于海水中痕量除草剂的检测, SPE 柱的选择

对目标物质的富集与净化作用尤为重要. 选取 C_{18} 、MCX、HLB 共 3 种 SPE 柱对海水中 ATR 及其代谢物的回收率进行比较. 准确量取 100.0 mL 海水样品, 加入适量混合标准溶液, 在保证萃取柱为唯一变量的前提下, 每种 SPE 柱设 3 组平行实验, 取平均回收率, 结果如图 2 所示.

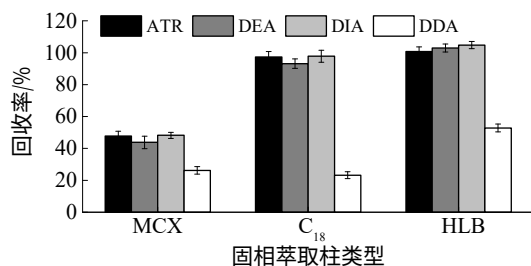


图2 不同SPE柱的萃取效果比较

从图2可知, 3种萃取柱中MCX柱的萃取效果最差, 4种化合物的回收率均在50%以下. C_{18} 柱对ATR、DEA和DIA的萃取效果较好, 3种物质的回收率均大于95%, 但对DDA的回收率仅有23%. 相比较而言, HLB柱的效果最好, DDA的回收率达50%以上, 这主要是因为HLB柱的固定相是由亲水的N-乙烯基吡咯烷酮和亲脂型的二乙烯基苯2种单体聚合而成的一种大孔聚合物, 而ATR及其降解产物的极性差别较大. 以上结果表明, HLB柱具有最好萃取效果, 故选用HLB柱进行优化实验.

2.2 pH 选取

由于ATR及其降解产物的极性差别较大, 且均为弱碱性化合物, 适宜的酸性pH条件可促进极性化合物DDA的离子化, 从而提高其回收率^[11]. 3种pH条件下, ATR、DEA、DIA和DDA的萃取效果如图3所示.

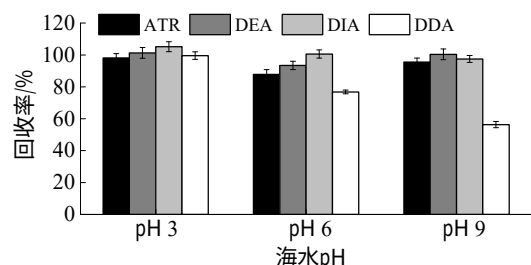


图3 不同pH条件下回收率比较

从图3可知, pH为3时DDA具有最高的回收率(99.3%), 随着pH的升高, DDA的回收率逐渐降低, 而ATR、DEA和DIA的回收率受pH影响不明显, 故最终选用pH为3.

2.3 固相萃取洗脱溶剂的优化

海水酸化后, 一般采用含氨水的试剂进行洗脱. 图4为甲醇、2%氨水甲醇溶液及0.2%氨水丙酮溶液对加标水样中4种化合物的洗脱效果. 从图4可知, 甲醇作为洗脱剂时洗脱效果最差, DDA的回收率为50.3%; 2%氨水甲醇溶液作为洗脱剂时洗脱效果较好, 4种化合物的回收率在86.7%~97.8%之间; 0.2%氨水丙酮溶液作为洗脱剂时效果最好, 4种化合物的回收率在99.5%~105.2%之间, 且丙酮毒性较小, 故将其选为洗脱溶剂.

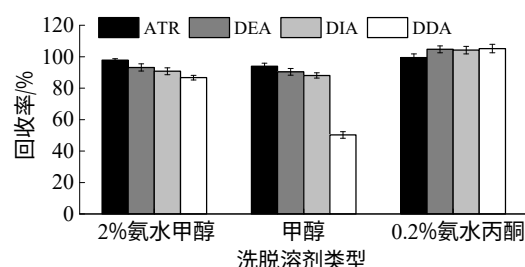


图4 洗脱效果比较

2.4 方法学验证

2.4.1 方法的线性和灵敏度

按照上述参数, 在基线平稳后, 对不同浓度梯度的混合标准溶液进行检测. 以4种化合物与内标物的浓度比值为横坐标, 以化合物与内标物的响应值之比为纵坐标绘制标准曲线, 4种物质的线性范围、相关系数和检出限见表2.

表2 不同化合物线性范围、方程、相关系数和检出限

化合物	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数	检出限/ ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
ATR	0.5~100.0	$y=376.788x-1695.091$	0.999 0	0.120
DEA	0.5~100.0	$y=545.708x-2303.872$	0.999 3	0.060
DIA	0.5~100.0	$y=253.272x-610.504$	0.999 6	0.060
DDA	0.5~100.0	$y=1285.225x+1924.233$	0.999 2	0.024

从表2可知, ATR、DEA、DIA和DDA在0.5~100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性较好, 相关系数 $R^2 \geq 0.999 0$. 将ATR、DEA、DIA和DDA分别加入样品中, 经样品前处理和GC-MS/MS分析后, 以信号与噪音比值为3时所对应的浓度作为检出限, 4种化合物的检出限为0.024~0.120 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明所建立的方法具有较好的线性和灵敏度.

2.4.2 方法的准确度和精密度

准确量取 500.0 mL 空白海水样品, 分别添加

表 3 海水中 4 种化合物检测结果						%
化合物	加标质量浓度 1.0 μg·L ⁻¹		加标质量浓度 10.0 μg·L ⁻¹		加标质量浓度 100.0 μg·L ⁻¹	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
ATR	92.3	6.6	98.3	5.3	104.3	5.4
DEA	94.8	5.8	104.7	5.5	100.8	2.9
DIA	92.7	6.1	102.1	5.8	99.8	5.2
DDA	98.6	5.2	103.4	4.7	102.4	3.6

表 4 不同方法性能对比						
方法	样品	分析物	线性范围	回收率/%	检出限	RSD/% 文献
SPE-GC-MS/MS	海水	ATR、DEA、DIA、DDA	0.5~100.0 μg·L ⁻¹	92.3~104.7	0.024~0.120 ng·L ⁻¹	2.9~6.6 本文
液液萃取-GC-MS	地表水	ATR	1.0~20.0 mg·L ⁻¹	77.5~90.3	0.11 mg·L ⁻¹	6.1~11.7 [12]
SPE-HPLC	地下水	ATR、DEA、DDA	0.25~6.00 mg·L ⁻¹	68.0~106.0	0.02 μg·L ⁻¹	5.0~12.0 [13]
SPE-GC-MS(衍生化)	稻田水	ATR、DEA、DIA、DDA	2.0~100.0 μg·L ⁻¹	61.0~90.0	0.5~2.0 μg·L ⁻¹	6.7~8.9 [14]
SPE-GC/MS	自来水	ATR、DEA、DIA、DDA	25.0~500.0 ng·L ⁻¹	12.7~99.5	4.3~115.0 ng·L ⁻¹	2.8~15.1 [15]
SPE-HPLC-MS/MS	饮用水	ATR、DEA、DIA、DDA	0.4~100.0 μg·L ⁻¹	70.5~116.7	0.01 μg·L ⁻¹	1.0~12.0 [11]

1.0、10.0、100.0 μg·L⁻¹ 3 个标准曲线中低、中、高质量浓度的混合标准溶液, 每组实验设 3 个平行, 按照 1.4 节样品前处理方法处理后, 经 GC-MS/MS 检测, 根据峰面积计算回收率(表 3)。从表 3 可知, ATR 及其降解产物的平均添加回收率在 92.3%~104.7%之间, RSD 值均在 7%以下。将本文方法与其他文献方法对比, 结果见表 4。由表 4 可知, 本文方法具有较好的准确度和精密度, 符合海水中 ATR 及其降解产物的检测要求。

2.5 实际样品的测定

应用本文建立的检测方法对象山港 5 个站点的表层海水进行分析, 结果见表 5。

表 5 象山港海水中 ATR 及其降解产物的检测结果 ng·L⁻¹

站点	检出质量浓度			
	ATR	DEA	DIA	DDA
1	28.77	1.59	未检出	2.61
2	25.42	1.99	未检出	2.04
3	39.42	2.43	未检出	2.96
4	40.67	2.57	未检出	2.51
5	48.15	2.79	未检出	3.76

从表 5 可知, 5 个站点海水样品中 DIA 均未检出, ATR、DEA 和 DDA 检出的质量浓度分别为 25.42~48.15 ng·L⁻¹、1.59~2.79 ng·L⁻¹ 和 2.04~3.76 ng·L⁻¹。表明海水样品中 ATR 的主要代谢物为 DEA 和 DDA。DIA 未检出的原因可能是由于环境中乙基侧链比异丙基侧链更容易从 ATR 上脱除, 因此

由 ATR 降解为 DIA 的速度较慢, 但由 DIA 进一步降解产生 DDA 的速度较快, 导致 DIA 未被检出。

3 结论

本文通过对固相萃取柱类型、pH、洗脱溶剂的优化, 建立了基于 HLB 固相萃取柱对海水样品中 ATR 及其降解产物的富集和净化方法, 进一步结合 GC-MS/MS 方法, 建立对海水中 ATR、DEA、DIA 和 DDA 残留的检测方法。该方法具有较好的线性、准确度和精密度, 重现性良好, 可满足海水中 ATR 及其降解产物的检测, 并成功应用于象山港海域中的实际海水样品分析。

参考文献:

[1] Kumar V, Jha P. Influence of herbicides applied postharvest in wheat stubble on control, fecundity, and progeny fitness of *Kochia scoparia* in the US Great Plains[J]. Crop Protection, 2015, 71:144-149.

[2] Cleary J A, Tillitt D E, vom Saal F S, et al. Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Environmental Pollution, 2019, 251: 639-650.

[3] Lin Z, Zhen Z, Liang Y Q, et al. Changes in atrazine speciation and the degradation pathway in red soil during the vermiremediation process[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 364:710-719.

[4] Sánchez V, López-Bellido F J, Cañizares P, et al. Assessing the phytoremediation potential of crop and

- grass plants for atrazine-spiked soils[J]. *Chemosphere*, 2017, 185:119-126.
- [5] Kolekar P D, Patil S M, Suryavanshi M V, et al. Microcosm study of atrazine bioremediation by indigenous microorganisms and cytotoxicity of biodegraded metabolites[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 374:66-73.
- [6] 任晋, 蒋可, 徐晓白. 土壤中莠去津及其降解产物的提取及高效液相色谱-质谱分析[J]. *色谱*, 2004, 22(2): 147-150.
- [7] Jiang H, Adams C D, Koffsky W. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1064(2):219-226.
- [8] 任晋, 蒋可. 官厅水库水中莠去津及其降解产物残留的分析[J]. *分析试验室*, 2004, 23(12):17-20.
- [9] Yue L, Ge C J, Feng D, et al. Adsorption-desorption behavior of atrazine on agricultural soils in China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 57:180-189.
- [10] Dagnac T, Bristeau S, Jeannot R, et al. Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurised liquid extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067(1/2):225-233.
- [11] 石冬冬, 常碧影, 石波, 等. 固相萃取-高效液相色谱/质谱串联法分析奶牛饮用水中莠去津及其6种代谢物的残留[J]. *中国农业科技导报*, 2012, 14(6):145-152.
- [12] 李永青. 气相色谱质谱法同时测定地表水中松节油和阿特拉津的方法[J]. *山西科技*, 2018, 33(6):146-148.
- [13] Carabias M R, Rodriguez G E, Herrero H E, et al. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters [J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 950:157-166.
- [14] 张婷, 王国强, 张炳谦, 等. 稻田水中莠去津及其代谢物的硅烷基衍生化-气质联用分析法[J]. *刑事技术*, 2011(6):34-37.
- [15] Nevado J J B, Cabanillas C G, Llerena M J V, et al. Sensitive SPE GC-MS-SIM screening of endocrine-disrupting herbicides and related degradation products in natural surface waters and robustness study[J]. *Microchemical Journal*, 2007, 87(1):62-71.

Determination of atrazine and its metabolites in seawater by solid phase extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

XUE Ying^{1,2}, LI Yuqi¹, ZHANG Rongrong¹, SUN Aili^{1*}, ZHANG Zeming¹, SHI Xizhi¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: An accurate analytical method was developed for the determination of trace level of atrazine (ATR) and its major metabolites (deethylatrazine, DEA; deisopropylatrazine, DIA; didealkylatrazine, DDA) in seawater by coupling solid-phase extraction with gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The HLB solid-phase extraction (SPE) column was used to enrich and purify the target analytes in seawater. Furthermore, the parameters affecting the SPE extraction efficiency were optimized. The pH of the seawater sample was adjusted to 3 before the SPE extraction. Subsequently, the samples were analyzed by GC-MS/MS with multi-reaction monitoring mode (MRM), and the limit of detection (LOD), sensitivity, accuracy and precision were verified. Finally, the results indicated that the good linear relationship in the range of 0.5 - 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with R^2 above 0.999 0 was obtained. The LODs of ATR, DEA, DIA and DDA were 0.12, 0.06, 0.06 and 0.024 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The excellent recoveries of ATR, DEA, DIA and DDA were in the range of 92.3%-104.7% with RSD below 6.6%. The results demonstrated that the present method has optimal linearity, sensitivity, accuracy and precision. It could be successfully applied to the analysis of four analytes in the seawater samples from Xiangshan Bay.

Key words: GC-MS/MS; atrazine; metabolites; solid phase extraction; seawater

(责任编辑 史小丽)