

◆ 残留与环境 ◆

# 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术的土壤中除草剂成分差异分析

尹 硕<sup>1</sup>, 罗雪婷<sup>1</sup>, 师迎春<sup>1</sup>, 田 争<sup>2</sup>, 孙新圆<sup>2</sup>, 李秋梅<sup>1</sup>, 潘洪吉<sup>1</sup>, 吴 迪<sup>1\*</sup>

(1. 北京市植物保护站, 北京 100029 2. 北京市顺义区植保植检站, 北京 101300)

**摘要:**采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱对2组土壤样品进行化合物分析,利用多变量统计分析方法筛选特征化合物,通过谱库检索匹配获得成分差异筛查响应值最高的土壤除草剂成分。并通过在空白土壤样品添加莠去津、苯噻酰草胺等7种除草剂,验证土壤样品中除草剂成分差异筛查方法的可行性。结果表明:根据空白和添加土壤样品中各自化合物出现的频率、响应值、可变性、特征性等进行过滤分析,成功筛查出添加的除草剂成分。利用该方法对2组实际土壤样品进行比对分析,可高效预测其关键除草剂成分差异。该方法为土壤间除草剂成分差异的非靶向筛查提供了一种思路。

**关键词:**超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱;多变量统计分析;除草剂;土壤;差异分析

中图分类号:TQ 450.2<sup>+</sup>63 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2025.06.012

## Differential analysis of herbicide components in soil based on UPLC-QTOF/MS

YIN Shuo<sup>1</sup>, LUO Xueting<sup>1</sup>, SHI YingChun<sup>1</sup>, TIAN Zheng<sup>2</sup>, SUN Xinyuan<sup>2</sup>, LI Qiumei<sup>1</sup>, PAN Hongji<sup>1</sup>, WU Di<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China; 2. Plant Protection and Plant Quarantine Station of Shunyi District, Beijing City, Beijing 101300, China)

**Abstract:** The components of two groups of soil samples were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS), and the differences in ingredients were screened using mass profiler professional (MPP) software. The herbicide with the highest response value identified through component difference screening was obtained through PCDL mass spectral database retrieval and matching. And by adding herbicides such as atrazine, mefenacet, etc., to the blank soil samples, the feasibility of the screening method for detecting differences in herbicide components in soil samples was verified. The results showed that the added herbicide compounds were successfully screened out through filtration analysis on the basis of the frequency, response value, variability and characteristics of the compounds in the blank and added soil samples, respectively. The MPP software filtered and analyzed the frequency, response values, variability, and characteristics of the compounds present in the blank and added soil samples, and successfully screened for the added herbicides. Using this method to compare and analyze two sets of the actual soil samples, it was possible to efficiently predict the differences in key herbicide components. This method provided an approach for non-targeted screening of differences in herbicide composition between soils.

**Key words:** UPLC-QTOF/MS; multivariate statistical analysis; herbicide; soil; differential analysis

除草剂作为保障农业生产的重要投入品,广泛应用于农业、果园,以及非耕地(河道、道路、自然保护区等)杂草和有害植物的防控。为了减少杂草生

长、提升农业产量,我国每年在农林牧业生产中广泛使用除草剂<sup>[1-3]</sup>。部分除草剂具有良好的水溶性和稳定性,大量、频繁使用会使其残留在农田土壤中,

收稿日期:2025-07-05

作者简介:尹硕(1986—),女,北京人,高级农艺师,硕士,主要从事农药检验检测相关工作。E-mail: yinshuo220@163.com

通信作者:吴迪(1983—),女,正高级农艺师,硕士,主要从事农药检验检测相关工作。E-mail: wudii098@163.com

造成土壤药害、残留污染、杂草抗药性等问题<sup>[4-6]</sup>。因此,开发复杂土壤样品中除草剂残留的快速检测技术成为当前研究重点。

目前,国内外已有众多文献报道应用高分辨质谱技术开展土壤中潜在有机污染物的非靶标筛查研究<sup>[7-11]</sup>。Martinez-Piernas等<sup>[12]</sup>基于液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC-QTOF/MS)技术,从再生水浇灌的农田土壤中鉴定出1300种未知污染物。许惠等<sup>[13]</sup>采用超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q Orbitrap HRMS)对涪陵地区土壤和沉积物样品中的有机污染物开展非靶向筛查,共发现137种有机污染物,主要污染物包括PPCPs(中药品和个人护理产品)、农药、塑料添加剂等。朱超飞等<sup>[14]</sup>利用气相色谱-四极杆飞行时间质谱(GC-QTOF/MS)对某化学工业园区内的土壤进行有机污染物的非靶标筛查,共识别出96种污染物,主要为农药类、多环芳烃及其衍生物。该技术可应用于土壤中残留除草剂种类的非靶标筛查,但未通过对照土壤和污染土壤的差异化因素分析来明确关键残留物。

近年来,四极杆飞行时间质谱(QTOF/MS)与主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(principal least square-discriminant analysis, PLS-DA)等多种化学计量统计分析方法相结合,逐步被应用在复杂体系的定性和定量分析中<sup>[15-16]</sup>。多变量统计分析方法处理大量的质谱数据信息,通过差异分析确定2个或多个样品组变量之间的关系,广泛应用于植物产地鉴别<sup>[17-19]</sup>及代谢组学研究中<sup>[20-21]</sup>。本文基于超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)采集数据,通过多变量统计分析比较空白土壤和除草剂污染土壤间的化学成分差异,可快速筛查出土壤样本间的差异性除草剂,为其合理使用及风险管控提供技术支撑。

## 1 试验部分

### 1.1 主要仪器

超高效液相色谱(Agilent 1290 Infinity 型)串联飞行时间质谱仪(Agilent 6545型),美国安捷伦公司;Autogizer 701型全自动多通道样品匀质器,美国Tomtec公司;TG16型台式高速离心机,长沙英泰仪器有限公司;KQ-50B型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;ASE-350型加速溶剂萃取仪,美国赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 主要材料与试剂

乙腈(农残级)、乙酸乙酯(色谱纯)、正己烷(色谱纯),北京迪马科技有限公司;甲醇(质谱纯),美国赛默飞世尔科技公司;QuEChERS净化包(含C<sub>18</sub>和PSA),美国Agilent公司;氯化钠(分析纯),北京市化学试剂公司。

土壤样品:对照土壤样品、使用过除草剂的土壤样品(以下简称“用药土壤样品”),采自北京市顺义区。

### 1.3 样品预处理

在北京市顺义区采集对照土壤样品及用药土壤样品,667 m<sup>2</sup>范围内取不少于8个点的土壤作为1份样品,对照土壤样品及用药土壤样品各随机取样5份,共计10份样品。采集0~15 cm的表层土壤1~2 kg,除去土壤中的碎石、杂草和植物根茎等杂物,混匀后采用四分法留样,装入样本容器,贴好标签,于-20℃冰柜中保存。每个样品称取3个平行样,分别开展检测。

#### 1.3.1 加速溶剂萃取

称取4 g粉碎均匀的土壤样品,加入2 g硅藻土研磨拌匀,装入34 mL萃取池中进行萃取。以乙腈进行第1次萃取,萃取温度80℃,加热时间5 min,静态萃取时间3 min,溶剂冲洗体积为萃取池体积的40%,冲洗后排气100 s;以乙酸乙酯+正己烷(体积比1:2)进行第2次萃取,萃取过程、条件等同第1次。收集全部萃取液,并将萃取液转入旋转蒸发仪中,于40℃水浴中减压浓缩至1 mL。过0.22 μm滤膜后,进行分析。

#### 1.3.2 甲醇+水超声提取

称取土壤样品5 g,置于50 mL离心管中,加入去离子水1 mL、甲醇10 mL,水浴15℃超声提取30 min。取上清液过0.22 μm微孔滤膜,待测定。

#### 1.3.3 QuEChERS法

称取土壤样品10 g,置于50 mL离心管中,加入20 mL乙腈、7 g氯化钠,摇床振荡15 min,静置30 min。取5 mL上层提取液至装有净化包的离心管中,摇匀,并在涡旋振荡器上振荡2 min。振荡后放入离心机,于10 000 r/min离心11 min。取净化后溶液,过0.22 μm滤膜,待测定。

### 1.4 试验条件

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱:Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm,2.7 μm);柱温:40℃;流动相:A相为水(含0.1%甲酸、2 mmol/L乙酸铵),B相为甲

醇 流速 :0.4 mL/min ;进样体积 :1 μL。梯度洗脱程序见表1。

表 1 流动相洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
2.0	98.0	2.0
30.0	65.0	35.0
32.0	2.0	98.0
36.0	2.0	98.0
36.1	98.0	2.0

1.4.2 质谱条件

喷射流技术离子源(Dual AJS) ;正离子全扫描模式 ;毛细管电压 3.5 kV ;干燥气温度 250℃ ;干燥气流量 :7 L/min ;雾化器压力 2.41 × 10<sup>5</sup> Pa ;鞘气温度 325℃ ;鞘气流量 :12 L/min ;喷嘴电压 0 V。

1.5 数据分析

采用安捷伦MassHunter软件套装中的分子特征提取器进行数据处理 ,通过Profinder软件对对照和用药土壤样品组进行峰提取、数据对齐等处理。处理后的数据导入mass profiler professional(MPP)软件进行多变量统计分析。采用主成分分析和偏小二乘法辨别分析法比对分析对照土壤和污染土壤样本 ,根据*P*值、差异倍数(FC)筛选出差异性成分。通过数据库比对 ,对差异性组分进行鉴别。

2 结果与讨论

2.1 土壤中添加除草剂样品的筛查验证

在空白土壤中添加二甲戊灵、莠去津、苯噻酰草胺、西玛津、异丙甲草胺、乙草胺和唑啞草酯7种除草剂标准品 ,采用1.3.3中QuEChERS法前处理后进行筛查验证。

2.1.1 总离子流图和提取离子图

前处理后的空白和添加7种除草剂的土壤样品溶液 ,在1.4中色谱、质谱条件下进行检测。测得的空白和添加样品的总离子流图(TIC)和提取离子图分别见图1、图2。

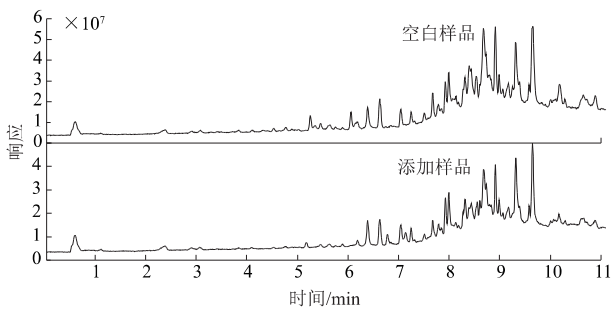


图 1 空白样品和添加样品的总离子流图(TIC)

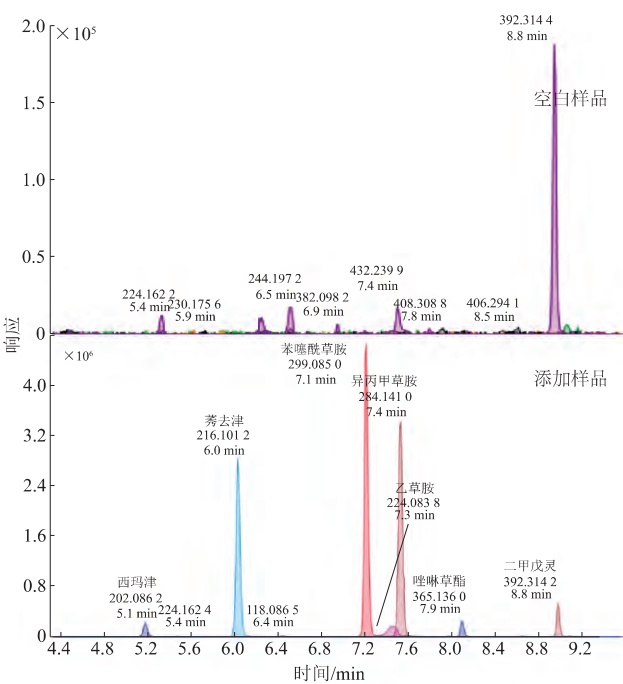


图 2 空白样品和添加样品的提取离子图

2.1.2 非靶向分子特质提取参数设置

土壤空白和添加样品在经过高分辨质谱的数据采集后 ,利用Profinder软件对所有数据进行非靶向分子特质提取(MFE)。采用递归特征提取工作流程 ,提取参数选择峰高不低于500 ,选择可能存在的加合离子H<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup> ,最大电荷数设为2 ,选择2个及以上离子条件作为高级化合物离子计数阈值。MFE提取后通过设置绝对峰高限值和分子特质得分的方式进行过滤选择 ,绝对峰高≥5 000 ,得分(MFE)≥70 ,此时化合物绝对峰高或者得分必须大于阈值 ,才会被保留在结果中。通过以上方法 ,在空白和添加样品中提取出27 295个化合物 ,并将结果生成含有质荷比、保留时间、精确分子质量等化合物信息的数据文件。

2.1.3 差异化合物的筛选

使用MPP软件进行数据统计分析。对提取得到的27 295个化合物以倍性变化(fold change ,FC)2为差异阈值 ,*P*≤0.05 ,出现频率(frequency)为100%进行过滤筛选 ,去冗余后得到1 654个特征化合物 ,见图3(火山图)。

2组样品显著性分析采用*t*检验 ,经过*P*值与倍数变化过滤后 ,去除2组样品中相同的组分 ,得到差异化合物列表 ,利用ID browser identification对化合物进行定性分析。设置参数进行谱库(PCDL)检索匹配 ,结果如图4所示。结果表明 ,通过分子特质提取结合多变量统计方法进行差异性分析 ,匹配数据库



检索,空白土壤中添加的二甲戊灵、莠去津、苯噻酰草胺、西玛津、异丙甲草胺、乙草胺和唑啞草酯等7种除草剂均被定性检出。MPP软件根据化合物的质荷比、同位素丰度、同位素峰间距以及保留时间进行评分,得分越高则该化合物的定性准确度越高。本试验中莠去津、苯噻酰草胺、西玛津、异丙甲草胺、乙草胺和唑啞草酯的得分均大于84,二甲戊灵得分最低,为56.58。这是由于空白样品中也含有二甲戊灵成分,造成2组样品成分差异化相对较小。

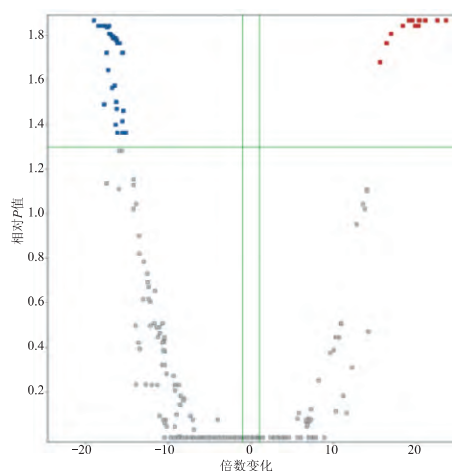


图3 火山图

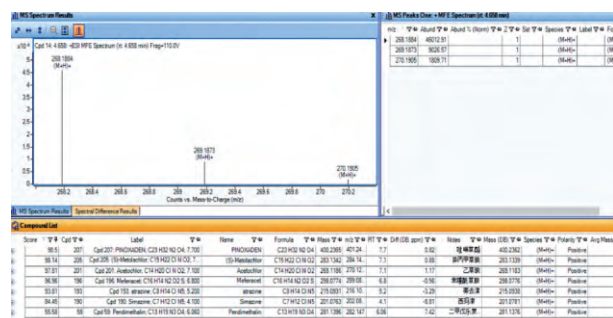


图4 空白与添加样品除草剂成分筛查结果

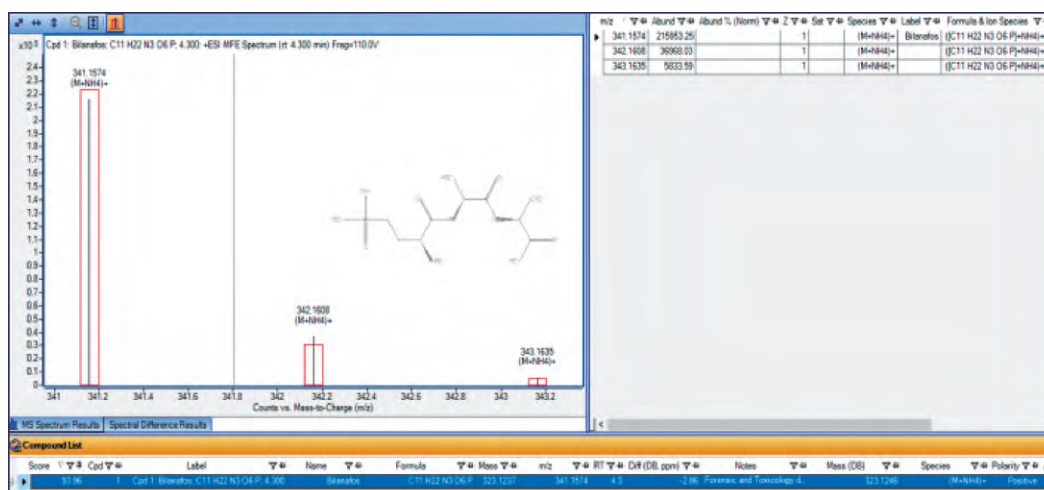


图5 加速溶剂萃取法筛查结果

结合加标基质溶液中除草剂信噪比进行测算,将提取离子模式下目标离子峰的10倍信噪比视为方法的检出限。推测QuEChERS法处理的7种农药的检出限分别为:二甲戊灵7.4 ng/kg、莠去津0.75 ng/kg、苯噻酰草胺0.009 3 ng/kg、西玛津4.3 ng/kg、异丙甲草胺0.22 ng/kg、乙草胺5.0 ng/kg和唑啞草酯3.0 ng/kg。该结果验证了土壤样品间除草剂成分差异筛查方法的可行性,且具有较低的检出限。

## 2.2 实际土壤样品中未知除草剂成分差异筛查

采用2.1中验证的筛查方法对对照土壤和用药土壤样品中的未知除草剂进行检测分析,并考察不同土壤前处理方式对筛查结果的影响。

### 2.2.1 加速溶剂萃取方式筛查结果

将对照土壤样品与用药土壤样品按照1.3.1中加速溶剂萃取方法进行前处理,采用UPLC-QTOF/MS采集质谱数据,通过MPP软件对土壤中除草剂差异成分进行分析。结果表明,质荷比为341.157 4的化合物得分最高,为93.96,谱库(PCDL)检索匹配确认最有可能的除草剂化合物为双丙氨膦(钠),如图5所示。双丙氨膦是从链霉菌发酵液中分离提纯的一种三肽类天然化合物,其本身无除草活性,在植物体内代谢为具有除草活性的草铵膦<sup>[22-23]</sup>。自德国赫斯特公司化学合成草铵膦取得成功,双丙氨膦逐渐退出市场,鲜有使用。双丙氨膦由1个分子草铵膦和2个分子丙氨酸以酰胺键相连接形成<sup>[24]</sup>。故推测在加速溶剂萃取前处理的加温、加压条件下,土壤样品中草铵膦很可能与提取液中的氨基酸发生键合,形成双丙氨膦。实际土壤样品中含有的除草剂可能为草铵膦。

### 2.2.2 甲醇+水超声提取方式筛查结果

按照1.3.2中的甲醇+水超声提取方法对对照土壤样品与用药土壤样品进行前处理, UPLC-QTOF/MS采集质谱数据,经MPP软件对土壤中除草剂差异成分进行分析。结果表明,质荷比为365.091 7

的化合物得分最高,为98.64,检索匹配后确认最有可能的除草剂为甲嘧磺隆(见图6)。甲嘧磺隆为磺酰脲类长效灭生性除草剂,该除草剂水溶性较强,前处理过程中加水进行提取,有利于提升提取效果,提高了甲嘧磺隆的回收率。

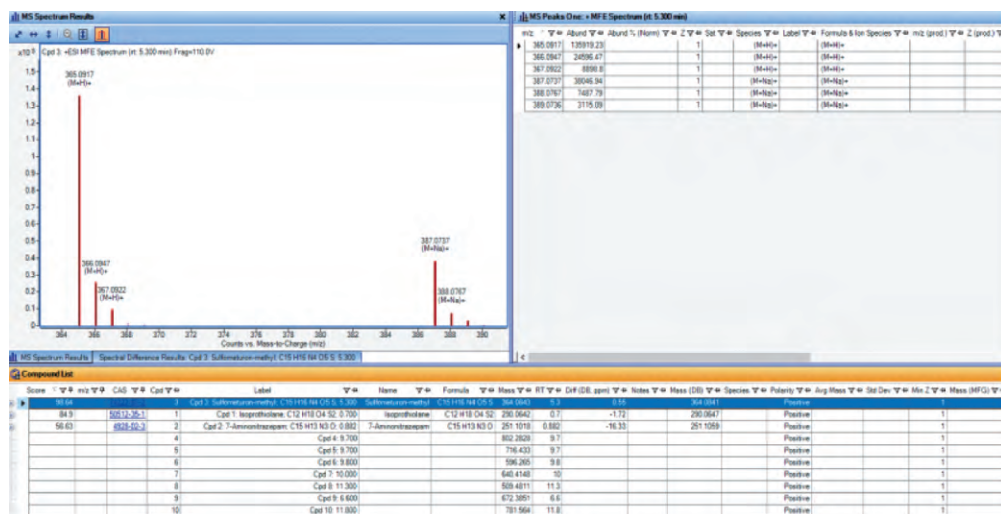


图6 甲醇+水(体积比 10:1)超声提取法筛查结果

### 2.2.3 QuEChERS法筛查结果

采用1.3.3中的QuEChERS法对对照样品与用药土壤样品进行前处理,利用UPLC-QTOF/MS采集质谱数据,经MPP软件对土壤中除草剂差异成分

进行分析。结果显示,得分最高化合物的质荷比为216.196 1,检索匹配后确认该化合物可能为布酰胺(见图7)。布酰胺不属于农药,采用该前处理方法未筛查出除草剂成分。

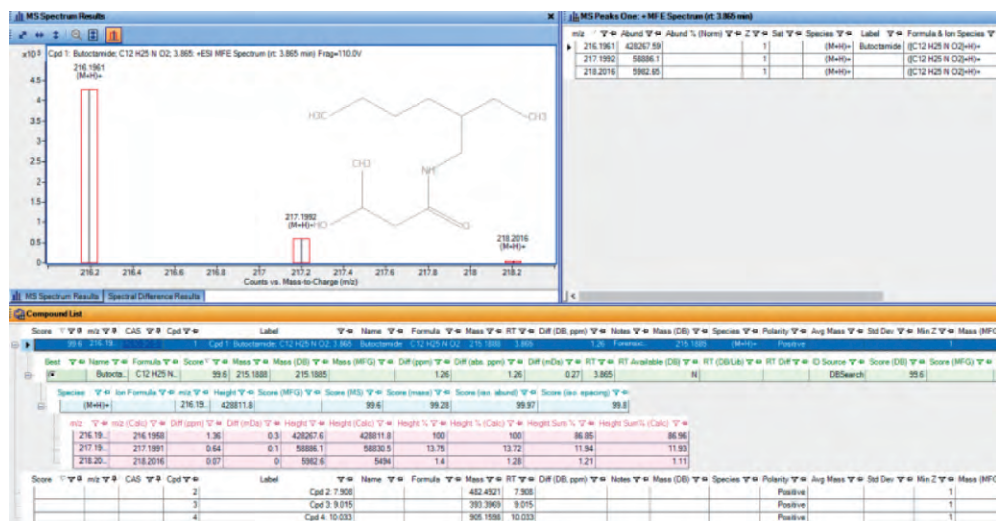


图7 QuEChERS 法筛查结果

由上述结果可知,采用超高效液相色谱串联飞行时间质谱检测2组土壤样品,利用多变量统计分析方法筛选比较后,得出2组土壤样品中的草铵膦和甲嘧磺隆存在显著成分差异。

对不同前处理方式获得的样品进行统计学成分差异分析,结果截然不同,这可能与不同除草剂

的理化性质相关。比较3种前处理方法,加速溶剂萃取法经升温 and 加压辅助、多次循环提取,提取较为充分,对于土壤中长残留且性质较为稳定化合物的提取效果较优。甲醇+水超声提取方式对水溶性较强,且超声条件下较为稳定的目标物效果较好。QuEChERS法是目前农药残留检测中广泛使用的方

法,添加回收测定效果较好,且相较前2种方法增加了净化步骤,但本试验中对实际土壤样品的检测结果并不令人满意。因此,选择合适的前处理方法,充分提取到更完整的目标组分,成为土壤样品中除草剂非靶向筛查的关键。

此外,基于统计学理论上的差异分析方法,将传统的关注被测样品本身的干扰物去除和目标成分测定,转向了与对照物的比较分析。获得除目标成分之外足够相似的对照样品,以及满足统计分析的样本数量,成为了检测分析结果准确的重要影响因素。

### 3 结论

LC-QTOF/MS质谱数据结合统计差异分析处理方法是筛查土壤中残留除草剂成分的有效手段。本试验通过超高效液相色谱相串联飞行时间质谱采集数据,利用统计差异分析软件比较分析空白和实际土壤样本,经谱库检索匹配,最终得到成分差异筛查响应值最高的除草剂,为土壤中除草剂的非靶向筛查提供了一种思路。基于土壤基质的复杂性和目标化合物的理化特性,本文选择了3种前处理方法与仪器分析和数据统计相结合,初步推断得到不同类型农药所适用的筛查方法。基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术的土壤中除草剂成分差异分析,建议尽可能选择更加充分提取目标化合物的前处理方法,可适当减少甚至不采用净化过程,尽量获得与样品差异性足够小的对照样品,提供具备统计学意义的足够数量的样本。然而,适用于不同类型除草剂及其他农药的前处理方法尚需进一步研究验证。

#### 参考文献

- [1] 李国琛,董雯昕,王世成,等.东北黑土区部分地域除草剂在不同作物类型土壤中残留及分布特征[J].农业环境科学学报,2024,43(8):1743-1752.
- [2] 姚杰,陈海宁,王雪景,等.胶东地区3种土地利用类型土壤中农药残留监测与分析[J].农药学报,2023,25(6):1370-1380.
- [3] 苏趋,刘彬,洪军,等.加速溶剂萃取-高效液相色谱法测定土壤中11种三嗪类除草剂[J].环境化学,2017,36(3):628-634.
- [4] 刘永秀.气相色谱质谱法同时检测土壤中5种除草剂的残留[J].化学工程师,2023,37(2):34-36.
- [5] 王丽,付伟,王莎莎.东北地区春玉米田除草剂使用现状、存在问题与建议[J].世界农药,2022,44(8):26-33.
- [6] 李睿,吴秋梅,赵红梅,等.我国黑土地农田土壤除草剂残留特征研究及展望[J].环境科学,2023,44(4):2395-2408.
- [7] 范轶欧,迟英欣,杨路平,等.高分辨质谱技术在环境和食品风险物质非靶向筛查检测中应用的研究进展[J].预防医学论坛,2023,29(12):955-960.
- [8] 何红梅,徐玲英,张昌朋,等.液相色谱-串联质谱法测定土壤、沉积物和水中的3种新型除草剂残留[J].色谱,2024,42(3):256-263.
- [9] 赵亚静,邹立,牛增元,等.液相色谱-高分辨质谱技术在沉积物和颗粒物中有机污染物分析的研究进展[J].分析测试学报,2021,40(9):1396-1408.
- [10] 瞿德业,王彩虹,陈静,等.溶剂诱导萃取/UPLC-MS/MS法检测农田土壤中20种除草剂[J].分析测试学报,2023,42(12):1631-1638.
- [11] 武姿辰,朱超飞,李晓秀,等.基于GC-QTOF/MS的大气中有机污染物的非靶向筛查及半定量分析[J].环境化学,2021,40(12):3698-3705.
- [12] MARTINEZ-PIERNAS A B, PLAZA-BOLANOS P, GARCIA-GOMEZ E, et al. Determination of organic microcontaminants in agricultural soils irrigated with reclaimed wastewater: target and suspect approaches[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1030: 115-124.
- [13] 许惠,汪贞,古文,等.超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术非靶向筛查涪陵地区有机污染物[J].生态与农村环境学报,2020,36(3):406-412.
- [14] 朱超飞,武姿辰,杨文龙,等.土壤中有机污染物的气相色谱-四级杆飞行时间质谱非靶向筛查[J].环境化学,2021,40(2):662-664.
- [15] MEREL S, SNYDER S. 利用LC/Q-TOF和Mass Profiler Professional软件筛查水中新兴化学污染物[J].环境化学,2016,35(3):597-600.
- [16] 谢浙裕,吕林锋,邓俊杰,等.基于Q-TOF-MS技术的姜半夏及其掺伪品姜虎掌的成分鉴定与差异分析[J].中南药学,2022,20(11):2587-2592.
- [17] 黄小贝,易姿,杨丽霞,等.基于UHPLC-QTOF-MS鉴别刺葡萄酒和赤霞珠葡萄酒研究初探[J].广州化工,2023,51(13):109-112;117.
- [18] 李凯旋,黄罗旭,吴曼曼,等.基于便携GC-MS和HS/SPME-GC×GC-TOF MS分析化州橘红与广西橘红成分差异[J].质谱学报,2024,45(5):631-639.
- [19] 冯雪,柳艳霞,贺泽英,等.稻米代谢组学分析方法的建立及在产地溯源中的应用[J].分析测试学报,2016,35(5):514-519.
- [20] 兰天,段国珍,祁有朝,等.红果枸杞和黄果枸杞广泛靶向代谢组学分析[J].食品工业科技,2024,45(24):9-20.
- [21] 陶美奇,潘永飞,山溪,等.基于非靶向代谢组学对青花菜花球表面蜡粉代谢物的差异分析[J].中国蔬菜,2024(5):51-58.
- [22] 李斌,赵昌明.草铵膦的应用、生物合成与降解[J].中国抗生素杂志,2023,48(4):392-402.
- [23] 陈钊民.浅析草铵膦的前景和剂型发展[J].广东化工,2016,43(11):153;151.
- [24] 李斌.双丙氨膦生物合成途径中磷—甲基化酶BcpD的活性探究[D].武汉:武汉大学,2022.

(编辑:顾林玲)