

水中嘉磷塞及其代謝物檢測方法—液相層析串聯式質譜儀法

中華民國 110 年 3 月 5 日環署授檢字第 1101000937 號

自中華民國 110 年 6 月 15 日生效

NIEA W548.50B

一、方法概要

樣品流經固相萃取管匣後，續以溶劑清洗及抽乾固相萃取管匣，再以 0.2 M 鹽酸水溶液沖提待測物，沖提液收集過濾後，以液相層析串聯式質譜儀(LC/MS/MS)檢測樣品中嘉磷塞(Glyphosate)、氨基磷酸(Aminomethylphosphonic acid)及 N-乙醯氨基甲基磷酸(N-Acetylaminomethylphosphonic acid)。

二、適用範圍

本方法適用於飲用水水質、飲用水水源、地面水體、地下水體、廢(污)水、放流水中待測物如表一所示。

三、干擾

- (一) 本方法的干擾可能來自於溶劑、試劑、塑膠器皿及樣品處理過程中所使用的硬體設備之污染，干擾物質會導致層析圖基線之漂移，須執行空白樣品的測試，以證明無干擾情形。
- (二) 嘉磷塞易與玻璃表面進行交互作用(註1)，所有使用之實驗器皿、定量瓶、附螺旋瓶蓋之離心管、樣品瓶之材料建議採用聚丙烯(Polypropylene, PP)或聚乙烯(Polyethylene, PE)，若無合適體積塑膠定量瓶可供使用時，可以使用玻璃定量瓶，惟溶劑應為試劑水，且定量後立即移液至附螺旋瓶蓋之塑膠離心管儲存。

四、設備與材料

- (一) 採樣瓶：採用 PP 或 PE 樣品瓶，並附螺旋瓶蓋。使用前需先用試劑水及甲醇清洗並乾燥之。
- (二) 聚丙烯定量瓶：25 mL 或其他適當體積。
- (三) 硼矽玻璃定量瓶：5 mL、1000 mL 或其他適當體積。
- (四) 聚丙烯刻度離心管：15 mL、50 mL。
- (五) 分析天平：可精稱至 0.1 mg。
- (六) 液相層析串聯式質譜儀。
 1. 液相層析儀。
 2. 串聯式質譜儀。

3.數據處理系統：能顯示待測物的滯留時間及尖峰面積之定性及定量系統。

4.層析管柱：Acclaim Trinity Q1 管柱（註 2）， $3.0\ \mu\text{m}$ （粒徑）， $2.1\ \text{mm}$ （內徑） $\times 100\ \text{mm}$ （長度）或同級品。

（七）萃取裝置

1.固相萃取管匣：Oasis® MAX Cartridges 150 mg 或同級品。

2.固相萃取裝置：20 孔萃取裝置或同級品。

3.真空幫浦：可調整真空度，可達真空壓力 10 mmHg 以下。

4.吹氮裝置：可調整加熱溫度和氮氣吹出量（視濃縮操作需要）。

5.針頭式過濾膜： $0.22\ \mu\text{m}$ 或以下孔徑，Nylon 材質。

6.塑膠針筒及針頭：5 mL 或其他適當體積。

（八）pH 測定儀：可測量 pH 值範圍 1 至 14。

（九）上機樣品瓶：瓶身、瓶蓋為 PP 或 PE 材質，0.5 mL 以上。

（十）離心機：可容納 15 mL 離心管、離心力可達 900 g 以上（g 為離心力，註 3），具冷卻系統。

（十一）冷藏設施：儲放樣品，溫度可達 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

（十二）冷凍設施：儲放標準品，溫度可達 -20°C 。

五、試劑

（一）試劑水：不含待測物之去離子水，或市售蒸餾水。

（二）甲醇(Methanol)、乙醇(Ethanol)、乙腈(Acetonitrile)、甲酸(Formic acid)：LC 級或 LC/MS 級。

（三）甲酸銨 (Ammonium formate)：LC 級或 LC/MS 級。

（四）濃鹽酸 (Hydrochloric acid)：濃度約 35%，試藥級。

（五）濃氨水 (Ammonium hydroxide)：濃度約 28%，試藥級。

（六）鹽酸溶液，0.2 M：以濃鹽酸與試劑水配製。

（七）氨水，0.6 %：使用前配製。

（八）抗壞血酸(Ascorbic acid)：試藥級。

（九）移動相 A：取約 2.84 g 甲酸銨溶於試劑水中，續添加試劑水至 1000 mL，混合均勻經濾膜過濾後，再添加甲酸直至 pH 值範圍於 2.8 至 2.9 之間。

(十) 標準溶液：可用高純度標準品配製或市售可追溯濃度證明文件之溶液。

1. 儲備標準溶液：稱取約 10 mg（精稱至 0.1 mg）各待測物標準品，並分別以適當量的試劑水定容至 25 mL（PP 定量瓶），配製完成保存於 PP 樣品瓶中 -20 °C 以下儲存。
2. 中間標準溶液配製：將儲備標準溶液以 0.2 M 鹽酸溶液稀釋配製成中間標準溶液（建議配製濃度為 10 mg/L），配製完成保存於 PP 樣品瓶中 -20 °C 以下儲存，以此溶液使用於檢量線標準溶液之配製。

(十一) 內標準品溶液：可用高純度標準品配製或市售可追溯濃度證明文件之溶液，建議之內標準品如表三。

1. 儲備內標準品溶液：稱取約 1.0 mg（精稱至 0.1 mg）內標準品，並分別以適當量的試劑水定容至 5 mL，配製完成保存於 PP 樣品瓶中 -20 °C 以下儲存。
2. 中間內標準品溶液配製：將儲備標準溶液以 0.2 M 鹽酸水溶液稀釋配製成中間標準溶液（建議配製濃度為 2 mg/L），保存於 PP 樣品瓶中，於 -20 °C 以下保存。以此溶液使用於檢量線標準溶液之配製。

六、採樣與保存

(一) 採樣方法可參考本署公告之「飲用水水質採樣方法(NIEA W101.5)」、「監測井地下水採樣方法(NIEA W103.5)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣方法(NIEA W104.5)」、「事業放流水採樣方法(NIEA W109.5)」等相關水質樣品採樣方法（註4）。

(二) 以 PE、PP 材質樣品瓶採集水樣，含餘氯水樣每公升需加入 100 mg 抗壞血酸，保存於 4 °C ± 2 °C 冰箱，採樣後 14 天內完成分析。若前處理完成當日無法上機分析其萃取液需於 -20 °C 冰箱中保存。

七、步驟

(一) 本方法係為效能基準(Performance-based)分析方法，分析人員可依使用的固相萃取管匣、前處理程序、液相層析儀、層析管柱及串聯式質譜儀廠牌的不同，適當修改本方法之檢測程序，惟修改後之方法其執行檢測所有步驟及程序，應符合本方法品質管制規範。

(二) 液相層析串聯式質譜儀參考條件如下（註5）：

1. 層析管柱：Acclaim Trinity Q1 管柱（註2），3.0 μm（粒

徑)，2.1 mm (內徑)× 100 mm(長度)或同級品。

2.初始移動相：A:B = 100 % : 0 %

A：甲酸銨水溶液 (pH 2.8 至 2.9)

B：乙腈

3.移動相梯度：

時間(min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	100	0
5	100	0
7	10	90
12	10	90
13	100	0
18	100	0

4.流率：0.4 mL/min。

5.樣品注入量：20 μ L。

6.管柱溫度：34 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C。

7.負電荷模式串聯式質譜儀條件 (電噴灑法)：

(1) 離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：-4.5 kV。

(2) 氣簾氣體(Curtain gas)：25 psi。

(3) 碰撞氣體(Collision gas)：medium。

(4) 霧化氣體(Ion source gas 1)：55 psi。

(5) 加熱氣體(Ion source gas 2)：60 psi。

(6) 加熱溫度(Temperature)：580 $^{\circ}$ C。

8.質譜參數如表二。

(三) 檢量線製備

1.檢量線製備：添加至少 5 種不同濃度之待測物標準品於 0.2 M 鹽酸溶液中，最低一點濃度應與方法定量極限之濃度相當，建

議濃度範圍為 1.0 $\mu\text{g/L}$ 至 50 $\mu\text{g/L}$ ，內標準品濃度建議為 10 $\mu\text{g/L}$ (IS_{cal})，可依個別待測物感度適當調整之，其中各待測物建議對應之內標準品如表三。檢量線的製備係採用線性迴歸法 (Linear regression) 製作檢量線，為避免低濃度之偏差，可使用 $1/x$ 加權進行校正，以提高低濃度數值之準確性，其線性相關係數 (Correlation coefficient, r)，必須大於或等於 0.99。

2. 檢量線確認：檢量線製備完成後，應即以第二來源標準品（若無第二來源標準品且無不同批號標準品時，至少應使用另一獨立配製之標準品）配製接近檢量線中點濃度，進行檢量線確認，所測得濃度之相對誤差值不得超過 $\pm 25\%$ 。
3. 檢量線查核：檢量線應至少每 12 小時執行檢量線查核，所測得濃度之相對誤差值不應超過 $\pm 25\%$ 。

(四) 樣品前處理

1. 樣品中如果含有微粒或懸浮物時，可將樣品倒入 PP 瓶離心管中，以 900 g 離心（離心溫度控制 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）約 15 分鐘後，取澄清液進行固相萃取。
2. 從前述步驟之樣品澄清液取適量體積（建議取 10 mL），另配製查核樣品與添加樣品（建議加入 10 mg/L 標準溶液 10 μL ）。每個樣品建議添加 2 mg/L 中間內標準品溶液 25 μL ，配製之樣品內標準品濃度 (IS_s) 為 5 $\mu\text{g/L}$ ，以氨水調整 pH 值至 10.0 至 10.5。
3. 固相萃取：
 - (1) 固相萃取管匣以 6 mL 甲醇沖提一次後，再以 6 mL 0.6% 氨水沖提一次待用。
 - (2) 樣品以約每秒 1 滴之流率流經固相萃取管匣。
 - (3) 續以 6 mL 0.6% 氨水清洗固相萃取管匣，控制流率約每秒 1 滴，完成後抽乾固相萃取管匣約 3 分鐘。完成後續以 6 mL 乙醇清洗固相萃取管匣，控制流率約每秒 1 滴，完成後抽乾固相萃取管匣約 3 分鐘。
 - (4) 固相萃取管匣加入 4.5 mL 0.2 M 鹽酸溶液於管匣，以約每秒 1 滴流率沖提管匣，使用 PP 離心管收集沖提液。若沖提液不易流出，可以針筒之活塞略施壓力壓出，惟壓出後流率維持約每秒 1 滴，沖提液最後以 0.2 M 鹽酸溶液定容至 5.0 mL。
 - (5) 沖提液經由針頭式過濾膜過濾，將沖提液移入上機樣品瓶

待上機。

(五) 定性與定量

1. 使用液相層析串聯質譜系統之多重反應監測模式 (Multiple reaction monitoring mode, MRM)，前驅/產物離子對如表二所示。對每一種待測物監測其前驅/產物離子對兩對，以其中訊號強度較高的前驅/產物離子對作為定量依據，另一前驅/產物離子對作為定性的依據。多重反應監測模式下前驅/產物離子對層析圖如圖一所示。
2. 待測物之滯留時間須落在當天檢量線確認標準品、檢量線查核標準品或添加樣品待測物之滯留時間 $\pm 2.5\%$ 範圍之內。
3. 待測物之兩監測前驅/產物離子對 (積分面積或高度) 的離子比率 (Ion Ratio) 須落在可接受的離子比率範圍之內 (如表四所示)，其離子比率須以檢量線查核分析或品管樣品的前驅/產物離子對的比率為基準計算之。
4. 當樣品待測物濃度超過檢量線時，應取較少樣品量，重新前處理後上機分析。

八、結果處理

水樣濃度

$$C_w = (C \times IS_s) / (IS_{cal} \times 1000)$$

其中

C_w ：水樣濃度 (mg/L)

C ：由檢量線求得之待測物檢出濃度 ($\mu\text{g/L}$)

IS_s ：樣品內標準品濃度 ($\mu\text{g/L}$)

IS_{cal} ：檢量線標準品內標濃度 ($\mu\text{g/L}$)

九、品質管制

- (一) 空白樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行空白樣品分析，空白樣品分析值應小於 2 倍方法偵測極限。
- (二) 重複樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行重複樣品分析，其相對差異百分比應在 30% 以內。
- (三) 查核樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行查核樣品分析，其回收率範圍 50% 至 150%。
- (四) 添加樣品分析：每批次或每 10 個樣品，應執行添加樣品分析，其回收率範圍 40% 至 160%。

十、精密度與準確度

單一實驗室查核及添加樣品分析之精密度與準確度的結果如表五。

十一、參考資料

(一) Anastassiades, M. ; Kolberg, D.I. ; Eichhorn, E. ; Wachtler, A-K. ; Benkenstein, A. ; Zechmann, S. ; Mack, D. ; Wildgrube, C. ; Barth, A. ; Sigalov, I. ; Gorlich, S. ; Dork, D. ; Cerchia, G. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement (QuPPE-Po-Method) - Version 10.1 EU Reference Laboratory for Residues of Pesticides Single Residue Methods (EURL-SRM), 2019.

(二) 衛生福利部食品藥物管理署，食品中殘留農藥檢驗方法—極性農藥及其代謝物多重殘留分析方法，TFDAP0006.00，中華民國 106 年。

註1：嘉磷塞與玻璃表面的這種相互作用通常於非質子溶劑情況較明顯，例如：乙腈。若溶劑增加水含量或酸度通常會減少這種相互作用。

註2：Acclaim Trinity Q1 管柱禁止與醇類溶劑接觸。

註3：離心力g與離心機轉速之關係，如下列公式。

$$\text{離心力}(g) = 1.118 \times (\text{rpm})^2 \times R \times 10^{-5}$$

式中rpm為離心機每分鐘轉速、R為離心機半徑以公分(cm)表示。

註4：本文引用之公告方法之名稱及編碼，以環保署最新公告者為準。

註5：在LC/MS-MS中如管柱材質種類、管柱的長度、內徑、層析的流速、移動相及添加劑的選擇，都可能影響分析效果及儀器感度。而電噴灑法游離效率又和待測物、溶劑及流速的關係密切，所以需考量移動相本身的電導率及介電常數，以減少離子抑制的情況，以達到MS-MS分析效率的最佳化。

註6：嘉磷塞及其代謝物和對應內標準品的CAS No.:Glyphosate(1071-83-6)、Aminomethylphosphonic acid(1066-51-9)、N-Acetylaminomethyl-phosphonic acid(57637-97-5)、Glyphosate-¹³C₂ ¹⁵N(1185107-63-4)、Aminomethylphosphonic acid-¹³C ¹⁵N(-)

表一 嘉磷塞及其代謝物中英文名稱及簡稱 (註6)

中文名稱	英文名稱	簡寫
嘉磷塞	Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine) ⁻	
氨基磷酸	Aminomethylphosphonic acid	AMPA
N-乙醯氨基甲基磷酸	N-Acetyl-aminomethyl phosphonic acid	N-Acetyl-AMPA

表二 前驅/產物離子對質譜參數

待測物名稱	前驅離子 (m/z)	產物離子(m/ z)	去簇電壓 DP (V)	碰撞能量 CE (V)
Glyphosate	168	63	-65	-31
	168	150	-65	-12
AMPA	110	63	-140	-24
	110	79	-140	-35
N-Acetyl-AMPA	152	110	-50	-18
	152	63	-50	-39
Glyphosate- ¹³ C ₂ ¹⁵ N	171	63	-60	-29
Aminomethylphosphonic acid- ¹³ C ¹⁵ N	112	63	-80	-24

註：質譜參數DP：Declustering Potential及 CE：Collision Energy，可依實際需要適當調整之。本方法使用儀器：液相層析儀 (Agilent 1290 Infinity II)；串聯式質譜儀 (SCIEX QTrap 5500)。

表三 建議對應之內標準品表 (註6)

待測物名稱	內標準品
Glyphosate	Glyphosate- ¹³ C ₂ ¹⁵ N
AMPA	Aminomethylphosphonic acid- ¹³ C ¹⁵ N
N-Acetyl-AMPA	Aminomethylphosphonic acid- ¹³ C ¹⁵ N

表四 LC/MS/MS 前驅/產物離子對之離子強度比率(Ion ratio)規範

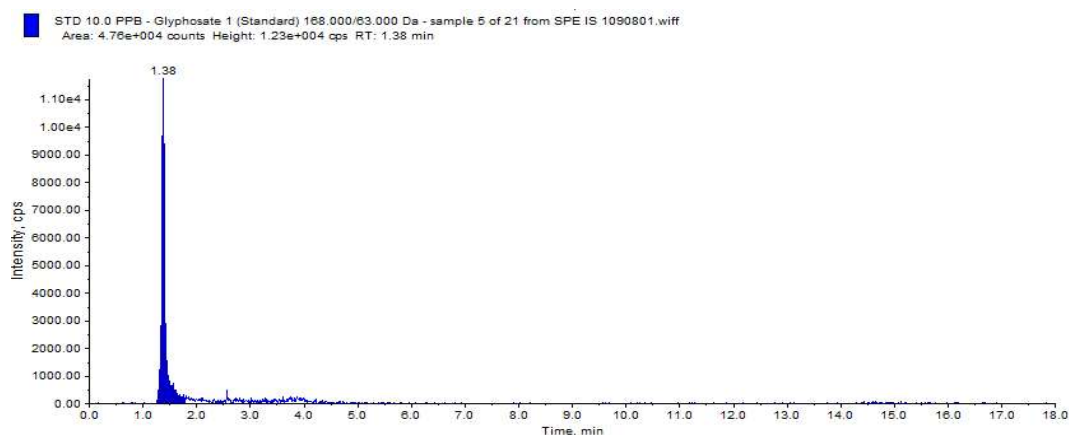
相對強度 (% of Base Peak)	兩離子對比率的最大允許誤差(%)
>50	± 20
>20 to 50	± 25
>10 to 20	± 30
≤10	± 50

表五 查核及河川水添加樣品分析精密度與準確度

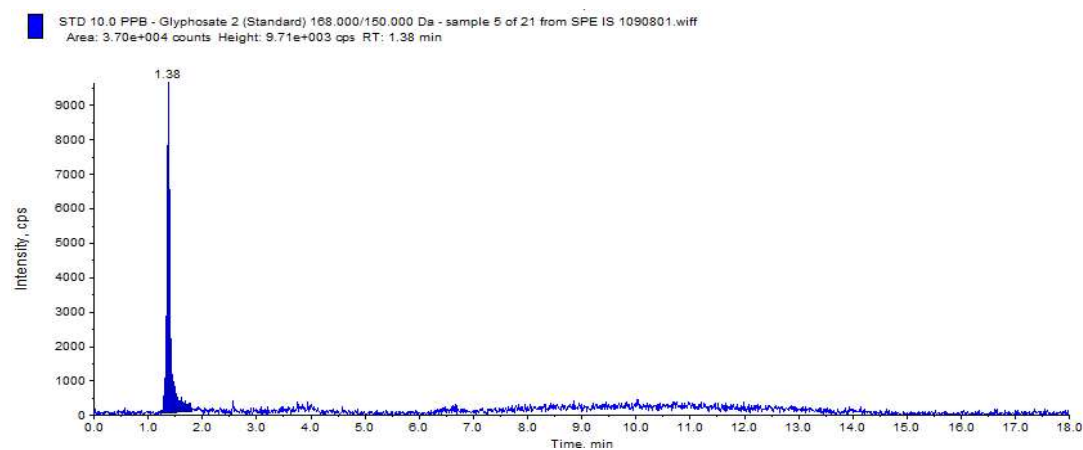
待測物名稱	查核樣品回收率 (n=5)		添加樣品回收率 (n=5)	
	平均 (%)	標準偏差 (%)	平均 (%)	標準偏差 (%)
Glyphosate	94.7	2.8	91.5	3.4
AMPA	106.2	5.3	86.9	2.9
N-Acetyl-AMPA	142.8	10.5	74.7	8.4

註：配製查核樣品與添加樣品濃度為 10.0 µg/L，內標準品濃度 5.0 µg/L。

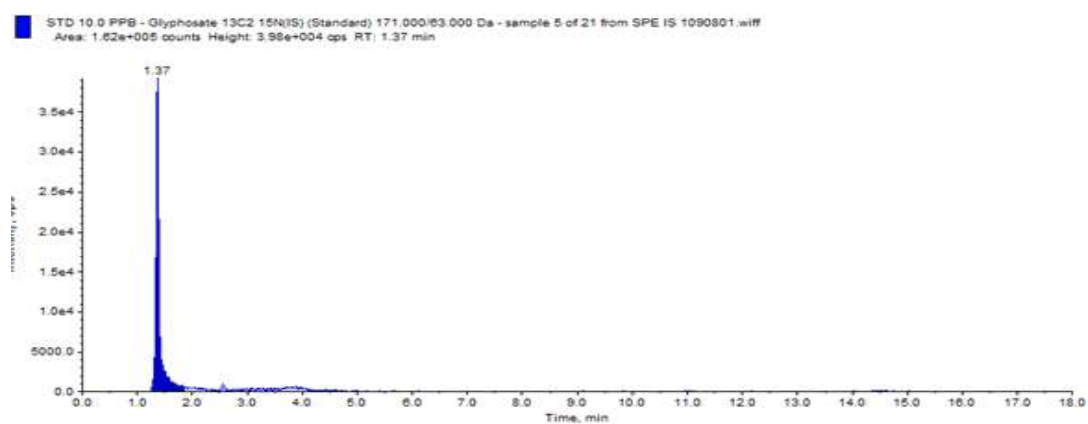
Glyphosate 定量 MRM : 168>63



Glyphosate 定性 MRM : 168>150

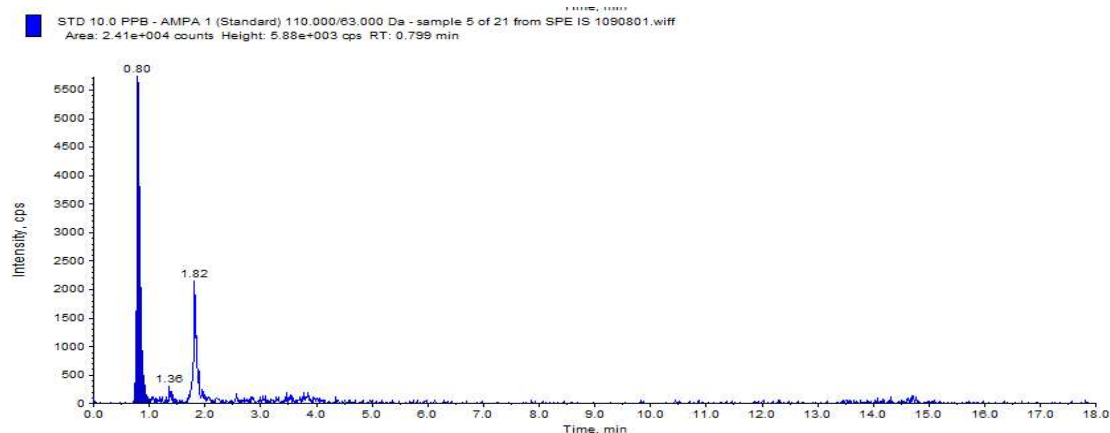


Glyphosate-¹³C₂ ¹⁵N MRM : 171>63

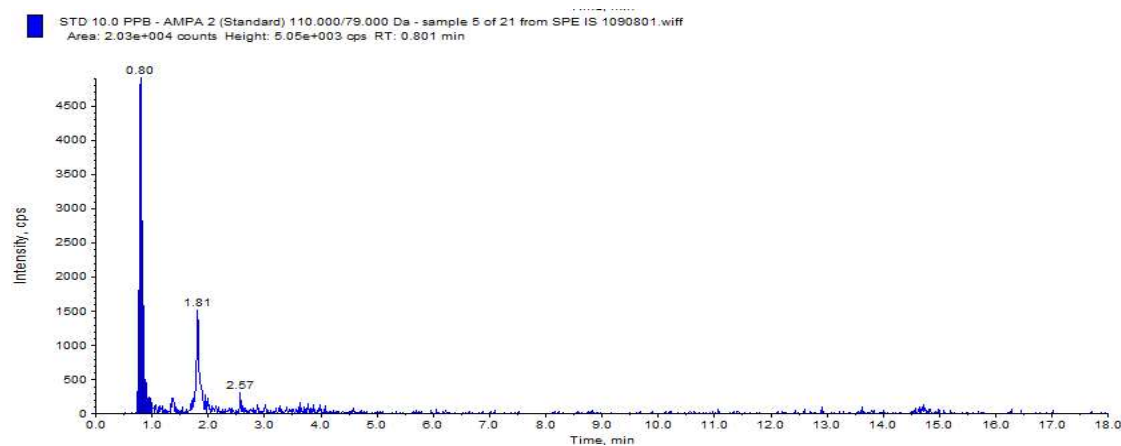


圖一 Glyphosate 及內標準品多重反應監測模式(MRM) 前驅/產物離子對之層析圖

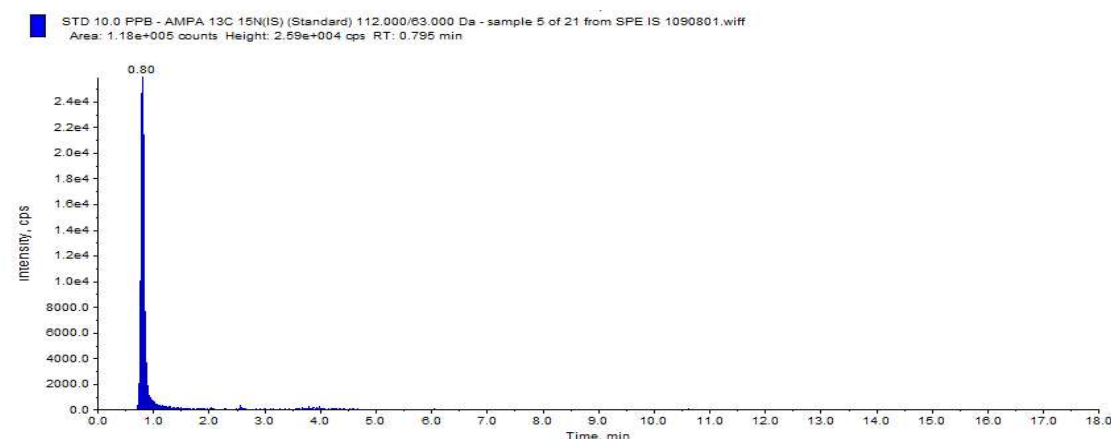
AMPA 定量 MRM : 110>63



AMPA 定性 MRM : 110>79

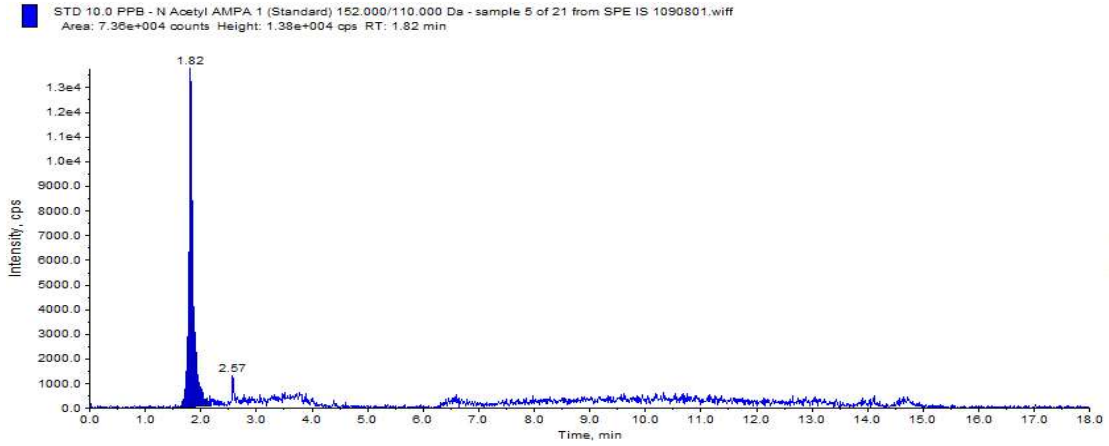


AMPA-¹³C¹⁵N MRM : 112>63

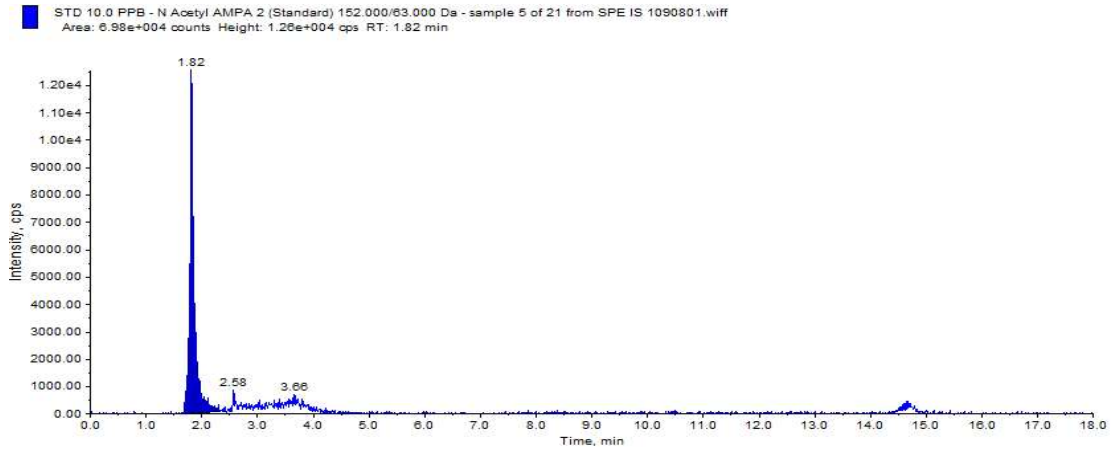


圖二 AMAP 及內標準品多重反應監測模式(MRM) 前驅/產物離子對之層析圖

N-Acetyl-AMPA 定量 MRM : 152>110



N-Acetyl-AMPA 定性 MRM : 152>63



圖三 N-Acetyl-AMAP 多重反應監測模式(MRM) 前驅/產物離子對之層析圖