

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00244

流动相离子色谱法同时测定植物中残留的矮壮素和缩节胺

周 旭^{1,2}, 许锦钢², 陈智栋¹, 朱 岩^{2*}

(1. 常州大学石油化工学院, 江苏 常州 213164; 2. 浙江大学化学系, 浙江 杭州 310028)

摘要: 以离子对试剂作流动相, 采用离子对抑制电导检测法同时测定植物中残留的矮壮素和缩节胺。简单处理后的样品经过 Dionex IonPac NG1 保护柱和 NS1 分离柱, 在流速为 1.00 mL/min、淋洗液为 1.00 mmol/L 九氟戊酸(作为离子对试剂) 7% (体积分数, 下同) 乙腈时等度洗脱分离, 能够快速稳定出峰, 且被测物与其他干扰离子充分分离。矮壮素和缩节胺的检出限分别为 0.154 6 和 0.171 4 mg/L, 在 1 ~ 100 mg/L 范围内具有良好的线性关系和重现性。对实际样品进行测定, 矮壮素和缩节胺的回收率范围分别为 96.06% ~ 104.6% 和 98.53% ~ 103.7%, 相对标准偏差小于 3%。该方法分析结果令人满意, 可以满足矮壮素和缩节胺常规的定性、定量分析需求。

关键词: 流动相离子色谱; 抑制电导检测; 矮壮素; 缩节胺; 植物

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2011)03-0244-05

Simultaneous determination of chlormequat chloride and mepiquat chloride in plants by mobile phase ion chromatography

ZHOU Xu^{1,2}, XU Jingang², CHEN Zhidong¹, ZHU Yan^{2*}

(1. School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;

2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

Abstract: Ion-pair reagent was used as mobile phase for the simultaneous separation of chlormequat chloride and mepiquat chloride in plants. The rapid separation was performed on a Dionex IonPac NG1 guard column and a Dionex IonPac NS1 analytical column using 1.0 mL/min of the eluent mixture of 1.00 mmol/L nonafluoropentanoic acid (as ion-pair reagent) and 7% acetonitrile, and the detection was achieved by a suppressed conductivity detector. The method provided good resolution of the analyte peaks without any interference. The detection limits of chlormequat chloride and mepiquat chloride were 0.154 6 mg/L and 0.171 4 mg/L, respectively. The linear calibration curves were obtained in the range of 1 ~ 100 mg/L. The mean recoveries in the ranges of 96.06% ~ 104.6% for chlormequat chloride and 98.53% ~ 103.7% for mepiquat chloride were obtained in real samples. The method requires only simple sample preparation and the technique is suitable for routine quality control analysis.

Key words: mobile phase ion chromatography (MPIC); suppressed conductivity detection; chlormequat chloride; mepiquat chloride; plants

矮壮素 (chlormequat chloride) 和缩节胺 (mepiquat chloride) 均是广谱、高效、低毒的植物生长调节剂, 在蔬菜幼苗期和发生徒长时喷施, 当浓度、喷施次数适宜时, 可增强秧苗的抗寒、抗旱、抗病能力, 培育矮健壮苗^[1]。这两种植物生长调节剂虽然低毒, 但过量使用会给人体和鱼类带来一定的毒性, 曾有报道口服矮壮素死亡的案例。矮壮素和缩

节胺均为季铵盐类化合物, 极性和水溶性强, 在土壤中具有强吸附性, 容易污染地下水, 会给环境造成一定的污染。

早期分析矮壮素和缩节胺的方法包括薄层色谱法、比色分析法和气相色谱法等^[2-3]。气相色谱法的测定需要对样品进行衍生, 但衍生化过程会造成回收率低、干扰物质增加、检测结果易产生假阳性等

* 通讯联系人: 朱 岩, 教授, 主要研究方向为离子色谱。E-mail: zhuyan@zju.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金 (Nos. 20775070, J0830413) 和浙江省自然科学基金 (Nos. R4080124, Y4100190) 项目。

收稿日期: 2010-12-06

问题^[2,3]。矮壮素和缩节胺的弱挥发性和强极性决定了其适合采用液相色谱法进行检测,但因其分子结构简单,不含有发色基团,也需要衍生化后才能进行紫外检测^[4]。采用质谱检测则可以解决这一问题,因此目前常采用液相色谱-质谱联用法进行分析^[5-9],但质谱仪高昂的成本提高了矮壮素和缩节胺常规检测的成本。傅里叶变换拉曼光谱法^[10]虽然相对地降低了检测成本,但由于仪器不够普及,所以不适合常规检测。采用离子色谱法测定矮壮素和缩节胺^[11,12],虽然灵敏度没有气相色谱-质谱或液相色谱-质谱高,但该方法具有操作简单、快速、实用等特点,能满足矮壮素和缩节胺的常规检测,且离子色谱仪及其操作的成本较质谱低,实际推广性更强。

流动相离子色谱(MPIC)以疏水性树脂作固定相,亲水性的离子对试剂作流动相,这种方式具有反相离子对色谱的高分离效率和选择性。一般而言,MPIC是离子对色谱与抑制电导检测结合的技术^[13],适合用于带有电荷的大分子化合物的分析。矮壮素和缩节胺是季铵盐类化合物,在离子交换树脂上保留较强。Peeters等^[11]用阳离子交换抑制电导检测法测定梨中的矮壮素,其在色谱分离过程中用很高浓度的 H_2SO_4 作为淋洗液时,仍存在峰形较宽等问题。用MPIC的分离检测方式从理论上可以很好地解决这一问题。Fegert等^[12]以己烷磺酸作为离子对试剂的流动相离子色谱柱切换技术对缩节胺进行检测。目前,直接用流动相离子色谱同时测定矮壮素和缩节胺的方法未见报道。本文以离子对试剂九氟戊酸作为流动相,采用离子对抑制电导检测法直接对矮壮素和缩节胺同时进行检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Dionex ICS900 离子色谱仪、Abel Industries NG6000 柱温箱、Dionex CSRS300-4 mm 抑制器、Dionex Reagent-Free™ Controller 抑制器外接电源、Dionex IonPac® NG1 (50 mm × 4 mm, P/N 039567) 保护柱、Dionex IonPac® NS1 (250 mm × 4 mm, P/N 035321) 分离柱、Dionex Chromeleon 6.8 色谱工作站(Dionex 公司); UC-3281 高压输液泵(北京优联光电技术有限公司)。

九氟戊酸(纯度为97.0%,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(ACN,纯度>99.9%),矮壮素(纯度>95.0%,阿拉丁试剂有限公司),缩节胺(纯度>95.0%,阿拉丁试剂有限公司);其他所用试剂均为分析纯或色谱纯。所需溶液都采用二次去离子水

(18.2 MΩ·cm)配制而成。

1.2 实验条件

淋洗液为1.00 mmol/L 九氟戊酸-7% 乙腈混合液,流速为1.00 mL/min,进样量为25 μL。分离柱柱温为35℃,检测器温度为35℃,抑制器电流为30 mA,抑制器外接水流速为1.10 mL/min。

1.3 样品来源及前处理

市售矮壮素和缩节胺农药制剂:称取0.01 g样品,用水定容至100 mL容量瓶中,然后稀释10倍,经0.22 μm的微孔滤膜过滤,滤液供分析。

植物中残留的矮壮素和缩节胺:自种黄瓜幼苗和西红柿苗,在其茎叶上喷洒一定量的矮壮素和缩节胺农药,5 d后测其残留。将要检测的植物部分绞碎、混匀。称取一定量的样品用水定容至40~50 mL,超声提取30 min后离心过滤,取上清液,稀释5倍,经0.22 μm的滤膜过滤,再经过Dionex OnGuard RP柱净化,净化液供分析。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的优化

离子对分离的选择性主要是由流动相决定的^[14],水相中的两种主要组分是离子对试剂和有机溶剂,通过这两种组分类型和浓度的变化来完成设定的分离。本文主要对离子对试剂的种类和浓度以及有机溶剂的浓度进行优化选择。

2.1.1 离子对试剂的选择

离子对试剂的选择决定于被测物的性质,通常选用与被测物电荷相反的离子对试剂。离子对试剂往往含有一个亲脂区域与固定相相吸,而且有一个电荷区域与被测物作用。离子对试剂分子中的亚甲基数增加,则阳离子的保留时间亦增加。根据矮壮素和缩节胺的分子结构,本实验首先选择用甲基磺酸作为离子对试剂,实验结果发现,矮壮素和缩节胺在5 min之前出峰,二者的色谱峰不能分开,峰形较宽且峰响应值较低。再以相对分子质量较为适中的九氟戊酸作为离子对试剂,其与矮壮素和缩节胺形成的离子对的保留时间可以相对地延长,从而提高这两种被测物的分离度。若选用相对分子质量比九氟戊酸更大的离子对试剂,虽然有可能实现矮壮素和缩节胺更好的分离效果,但其与被测物形成的离子对的保留强度增加,需要在淋洗液中增加更多的乙腈来改善峰形和减少保留时间;但随着有机溶剂的增加,对阳离子抑制器的损害增加,影响阳离子抑制器的使用寿命。综合考虑,本文选择以九氟戊酸作为离子对试剂。

2.1.2 乙腈含量的优化

淋洗液中九氟戊酸浓度为 1.00 mmol/L 时,乙腈含量对矮壮素、缩节胺的保留时间及分离度的影响见表 1。

表 1 淋洗液中乙腈含量对矮壮素、缩节胺的保留时间及分离度的影响

Table 1 Effect of concentration of ACN in eluent on retention times and resolutions of chlormequat chloride and mepiquat chloride

$\varphi(\text{ACN}) / \%$	t_R / min		Resolution
	Chlormequat chloride	Mepiquat chloride	
5	21.03	29.11	2.67
6	16.63	21.43	2.58
7	12.93	15.63	2.33
8	12.34	14.67	2.07
9	10.41	11.84	1.57

Eluent mixture: 1.00 mmol/L nonafluoropentanoic acid (as ion-pair reagent) and different concentrations of ACN. Mass concentrations of chlormequat chloride and mepiquat chloride mixed standard solution: 10 mg/L.

从实验结果可知,随着淋洗液中乙腈含量的增加,矮壮素、缩节胺的保留时间越来越短,但分离度

越来越差,反之则相反。乙腈含量为 7% 时,被测物的峰形及分离度均较好,且保留时间较适中,能与其他杂质峰完全分离,故确定淋洗液中乙腈的体积分数为 7%。

2.1.3 九氟戊酸浓度的优化

淋洗液中乙腈含量为 7% 时,九氟戊酸的浓度对矮壮素、缩节胺的保留时间、分离度和噪声的影响见表 2。

由实验结果知,淋洗液中九氟戊酸浓度为 0 时,矮壮素和缩节胺在色谱柱中保留很弱。这是因为淋洗液中没有离子对试剂,不能形成离子对。离子对试剂的浓度是影响矮壮素和缩节胺保留的主要因素。增加离子对试剂的浓度可以增强矮壮素和缩节胺在柱中的保留作用,但随着九氟戊酸浓度的增加,虽然分离度越来越好,但是矮壮素和缩节胺的保留时间越来越长、色谱峰(对称性变化不大)越来越宽,且噪声也越来越大,从而增加最低检出限;反之则相反。综合考虑,确定淋洗液中九氟戊酸的浓度为 1.00 mmol/L。

表 2 淋洗液中九氟戊酸的浓度对矮壮素和缩节胺的保留时间、分离度和噪声的影响
Table 2 Effect of concentration of nonafluoropentanoic acid in eluent on retention times, resolutions and noises of chlormequat chloride and mepiquat chloride

$c(\text{Nonafluoropentanoic acid}) / (\text{mmol/L})$	t_R / min		Resolution	Noise/ μS
	Chlormequat chloride	Mepiquat chloride		
0	1.943	1.943	0	0.0004
0.25	12.06	14.23	1.59	0.001
1.00	12.93	15.63	2.33	0.001
2.00	15.77	19.43	2.41	0.003
3.00	19.87	26.28	2.58	0.01

Eluent: different concentrations of nonafluoropentanoic acid (as ion-pair reagent) and 7% ACN. Mass concentrations of chlormequat chloride and mepiquat chloride in mixed standard solution: 10 mg/L.

在 1.2 节条件下,质量浓度为 5.00 mg/L 的矮壮素和缩节胺混合标准溶液的色谱图见图 1。从图 1 可看出,在综合考虑了上述色谱条件下,矮壮素和缩节胺的分离度和峰宽仍不是非常理想,这与被测物本身的结构及色谱柱柱填料的性质有关。被测物的结构相似导致色谱峰的保留时间相近,而被测物与离子对试剂形成的离子对的强保留性是导致峰形较宽的原因之一。此外,由于所用的 NG1 和 NS1 色谱柱粒径为 10 μm ,其柱效与 5 μm 及更小粒径的高效液相色谱柱相比,有其局限性。而且 NG1 和 NS1 色谱柱的大孔的聚合物填料相对于硅胶基质填料,色谱柱柱效较低。但 NG1 和 NS1 色谱柱所产生的柱压可以在离子色谱的操作环境的承受范围内,同时其所承受的 pH 值(0 ~ 14)能满足该实验酸性淋

洗液环境的需要。从整体上看,所选择的色谱条件能较好地满足被测物的分析要求。

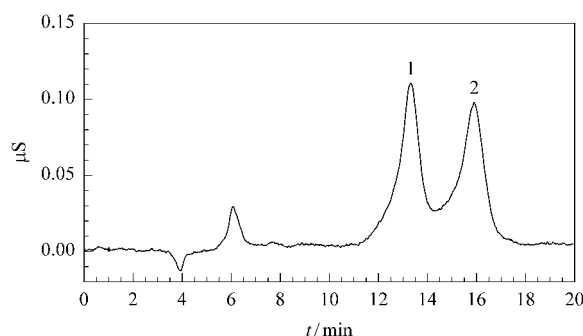


图 1 矮壮素和缩节胺混合标准溶液的离子色谱图
Fig. 1 Ion chromatogram of mixed standard solution of chlormequat chloride and mepiquat chloride
Eluent: 1.00 mmol/L nonafluoropentanoic acid-7% ACN.
1. chlormequat chloride; 2. mepiquat chloride.

2.2 工作曲线、检出限与重现性

在 1.2 节条件下,分别测定质量浓度为 1、2、5、10、20、60、100 mg/L 矮壮素和缩节胺混合标准溶液,分别以峰面积(Y_1)和峰高(Y_2)对被测物的质量浓度(X)进行线性回归,结果见表 3。以 3 倍信噪比($S/N=3$)对应的质量浓度为检出限。对质量浓度为 5.00 mg/L 的矮壮素和缩节胺混合标准溶液连续进样测定 10 次,矮壮素和缩节胺峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 2.9% 和 2.7%,表明重现性较好。

表 3 矮壮素和缩节胺的线性关系与检出限($S/N=3$)
Table 3 Linear relationships and detection limits ($S/N=3$) of chlormequat chloride and mepiquat chloride

Analyte	Linear equation	Correlation coefficient	Detection limit/(mg/L)
Chlormequat chloride	$Y_1=0.0175X-0.0056$	0.9998	0.1546
	$Y_2=0.0196X-0.0096$	0.9997	
Mepiquat chloride	$Y_1=0.0171X-0.0079$	0.9998	0.1714
	$Y_2=0.0176X-0.0104$	0.9994	

Y_1 : peak area ($\mu S \cdot min$); Y_2 : peak height (μS); X : mass concentration (mg/L).

表 4 实际样品中矮壮素和缩节胺的回收率($n=3$)

Table 4 Recoveries of chlormequat chloride and mepiquat chloride in real samples ($n=3$)

Sample	Analyte	Background/(mg/L)	Added/(mg/L)	Recovery/%
Cucumber seedlings	chlormequat chloride	14.07 ± 0.1888	14	96.06 ± 1.424
	mepiquat chloride	4.017 ± 0.2470	4.0	98.53 ± 0.8885
Tomato seedlings	chlormequat chloride	9.518 ± 0.2089	9.0	104.6 ± 1.998
	mepiquat chloride	2.427 ± 0.1003	2.5	103.7 ± 1.053

表 5 4 种不同样品中矮壮素和缩节胺的含量
Table 5 Contents of chlormequat chloride and mepiquat chloride in four different samples g/kg

Sample	Chlormequat chloride	Mepiquat chloride
Commercial pesticide formulation of chlormequat chloride	654.0	ND
Commercial pesticide formulation of chlormequat chloride	ND	89.50
Cucumber seedlings	1.594	0.4551
Tomato seedlings	0.9572	0.2441

ND: not detected.

3 结论

采用 1.00 mmol/L 九氟戊酸和 7% 乙腈的混合液作为流动相、抑制电导检测的流动相离子色谱方法可以快速、准确地测定实际样品中的矮壮素和缩节胺,两种被测物间的分离度大于 1.5,满足分析要求。该方法样品前处理方法简单,分离检测方法上

2.3 回收率及样品测定

分别测定市售的矮壮素、缩节胺农药制剂以及植物中残留的矮壮素和缩节胺,图 2 为种植期黄瓜苗样品的离子色谱图。在黄瓜苗和西红柿苗样品中按 1:1 的比例添加标准溶液,得到矮壮素和缩节胺的回收率良好,达到分析要求(见表 4)。用 RP 柱处理净化样品可去除叶绿素之类的有机大分子,这些物质会对色谱柱造成损害,对小分子分析物无吸附。表 5 为各样品中矮壮素和缩节胺的含量。

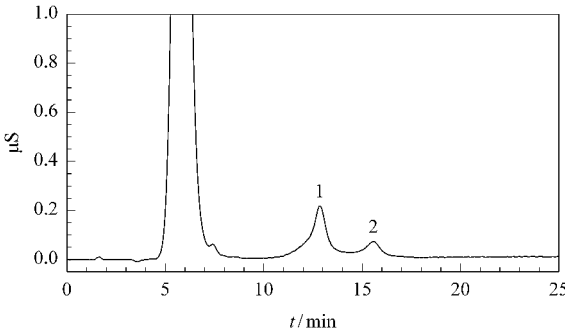


图 2 种植期黄瓜苗样品的离子色谱图
Fig. 2 Ion chromatogram of cucumber seedlings
1. chlormequat chloride; 2. mepiquat chloride.

省去了 Fegert 等^[12]提出的柱切换技术,操作更简单,检测成本更低,重现性良好,可以满足含矮壮素和缩节胺的实际样品的常规的定性、定量分析要求。

参考文献:

[1] Wang Q M, Guo D P. Plant Hormone and Vegetable Growing Development. Beijing: Agricultural Press of China (汪俏梅,郭得平. 植物激素与蔬菜的生长发育. 北京: 中国农业出版社), 2001: 97

[2] Tafuri F, Businelli M, Giusquiani P L. Analyst, 1970, 95: 675

[3] Zhao Y X, Song G L, Zhang J, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (赵永信,宋国良,张晶,等. 中国卫生检验杂志), 2008, 18(6): 1064

[4] Karasali H, Ioannou S. Bull Environ Contam Toicol, 2009, 83: 636

[5] Riediker S, Obrist H, Varga N, et al. J Chromatogr A, 2002, 966(1): 15

[6] Wang J H, Lu X Y, Huang M, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王金花,卢晓宇,黄梅,等. 分析化学), 2007, 35(10): 1509

[7] Esparza X, Moyano E, Galceran M T. J Chromatogr A, 2009,

- 1216: 4402
- [8] Henriksen T, Juhler R K, Brandt G, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 2504
- [9] Zhou Y M, Han Y, Tian H Z, et al. Journal of Instrumental Analysis (周艳明, 韩瑜, 田宏哲, 等. 分析测试学报), 2009, 28 (10): 1206
- [10] Quintas G, Garrigues S, Pastor A, et al. Vibrational Spectroscopy, 2004, 36: 41
- [11] Peeters M C, Defloor I, Coosemans J, et al. J Chromatogr A, 2001, 920: 255
- [12] Fegert A, Schepers U, Schwarz B. Fresenius J Anal Chem, 1991, 339: 441
- [13] Zhu Y. Theory and Application of Ion Chromatography. Hangzhou: Zhejiang University Press (朱岩. 离子色谱原理及其应用. 杭州: 浙江大学出版社), 2002: 10
- [14] Huang C Q, Wang L L, Chen Y J, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (黄超群, 王丽丽, 陈永菁, 等. 分析化学), 2006, 34: 1641