

在线净化/固相萃取-高效液相色谱法测定饮用水和 环境水体中的百草枯和敌草快

陈 静¹, 刘召金², 安保超¹, 卢 燕¹, 许 群^{1*}

(1. 赛默飞世尔科技中国, 上海 201203; 2. 山东省邹城市食品质量检验中心, 山东 邹城 273500)

摘要: 建立了在线净化/固相萃取(SPE)-高效液相色谱(HPLC)快速、准确测定饮用水和环境水体中的两种痕量除草剂百草枯和敌草快的方法。样品用大体积自动进样器注入在线净化小柱并流经固相萃取小柱,通过双梯度高效液相色谱系统中的上样泵实现净化和富集后,通过阀切换将固相萃取小柱切换至分析流路中;用分析泵将待测物从富集柱冲洗至分析柱进行测定。上样泵流速和分析泵流速分别为 0.7 和 0.6 mL/min,采用等度洗脱方式完成两种除草剂的分离和检测。检测波长分别为 260 nm (百草枯)和 311 nm (敌草快),进样体积为 2.5 mL,整个分析时间为 16 min。该方法在 1.0 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,两种除草剂的线性相关系数均大于 0.998 0,检出限分别为 0.10 和 0.12 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$)。该方法前处理简单,快速,可用于饮用水和环境水体中痕量除草剂的测定。

关键词: 在线固相萃取; 在线净化; 双梯度高效液相色谱系统; 除草剂; 百草枯; 敌草快; 水

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)10-1068-06

Determination of paraquat and diquat in drinking water and environmental water by high performance liquid chromatography coupled with on-line clean-up and solid phase extraction

CHEN Jing¹, LIU Zhaojin², AN Baochao¹, LU Yan¹, XU Qun^{1*}

(1. ThermoFisher Scientific (China), Shanghai 201203, China;

2. Zoucheng Food Quality Inspection Center of Shandong Province, Zoucheng 273500, China)

Abstract: An on-line solid phase extraction (SPE) system was used to eliminate the interferences sufficiently and fulfill the simple and sensitive determination of diquat and paraquat in tap and pond water. This on-line SPE system used two SPE cartridges. One was an Acclaim Mixed-Mode WAX-I cartridge for the elimination of anionic interferences; the other one was an Acclaim Mixed-Mode WCX-I cartridge for the enrichment of diquat and paraquat and the elimination of co-enriched cationic interferences. The baseline separation of diquat and paraquat was achieved on an Acclaim Trinity P1 column. A dual-gradient high performance liquid chromatographic (HPLC) system provided an efficient platform to fulfill the on-line SPE and separation, and the system operated under automatic control of chromatography data system software. The complete analysis only required 16 min, and the detection limits of the method were 0.12 $\mu\text{g/L}$ for diquat and 0.10 $\mu\text{g/L}$ for paraquat. The method is simple, rapid and sensitive, and can be applied to the determination of diquat and paraquat in drinking water and environmental water.

Key words: on-line solid phase extraction (SPE); on-line clean-up; dual-gradient high performance liquid chromatographic (HPLC) system; herbicides; paraquat; diquat; water

作为广谱性除草剂,季铵盐类化合物百草枯
(paraquat) 和敌草快(diquat) 已经广泛应用于农业

生产。它们都具有高毒性,长期摄入对人的眼睛、心
脏、肝、肾等器官有严重伤害。美国环保署(EPA) 规

* 通讯联系人: 许 群,博士,主要从事高效液相色谱在环境、食品等领域应用方法的开发研究。E-mail: qun.xu@thermofisher.com.

收稿日期: 2012-06-14

定饮用水中允许的敌草快的最大污染质量浓度为 $20 \mu\text{g/L}$ ^[1]; 而欧盟的饮用水农药残留通则(98/83/EC) 则更为严格, 单个农药组分的最大允许质量浓度为 $0.1 \mu\text{g/L}$, 残留总量不得超过 $0.5 \mu\text{g/L}$ ^[2]。因此, 有必要建立一个前处理过程简单、检测灵敏度高的方法来测定水体中痕量的百草枯和敌草快。虽然高效液相色谱法(HPLC) 被广泛应用于百草枯和敌草快的测定, 但是由于它们的强离子特性, 使得它们在传统反相 C18 或 C8 色谱柱上的保留很弱, 难以得到良好分离, 而且色谱峰拖尾严重。因此, 多采用在流动相中加入离子对试剂来增加保留和改善分离与峰形^[3,4]; 例如, EPA 549.2 方法将 1-己基磺酸作为离子对试剂用于在 C18 色谱柱上分离这两种除草剂^[5]。但离子对试剂的使用会降低色谱柱的适用性, 因此, 有文献尝试使用亲水相互作用模式色谱柱(HILIC), 仅以甲酸铵和甲醇为流动相而不添加离子对试剂, 实现了分离度(R_s) ≥ 3 的分离^[6]。

由于环境水体中这两种除草剂的含量很低, 因此需要对水体样品进行富集后才能使用常规的 HPLC 方法进行测定。目前多采用离线固相萃取(off-line SPE) 方法完成水体样品富集, 但步骤较繁琐, 单个样品通常耗时 2~3 h, 成为快速分析的瓶颈^[6,11]。与离线固相萃取相比, 在线固相萃取(on-line SPE) 具有自动化程度高、减低有机溶剂对操作人员的健康影响、节约时间和方法重现性好等优点^[12-14], 已有相关报道采用在线固相萃取测定水体中的百草枯和敌草快^[15,16]。本研究利用双梯度高效液相色谱系统(dual gradient HPLC), 采用在线净化/固相萃取方式完成饮用水和环境水体中百草枯和敌草快的快速测定, 实现了样品的净化、富集和分析自动化, 方法的技术指标满足国内外相关法规的要求。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 配置六通道在线脱气机、双三元梯度泵、自动进样器(带大体积进样组件)、柱温箱(带一个 2p-6p 切换阀, 即 2 位六通阀)、二极管阵列检测器(DAD), 变色龙色谱管理软件 Chromeleon[®] 6.8 SR9(美国赛默飞世尔公司); Orion 420A + pH 计(美国赛默飞世尔公司), IKA 旋涡振荡器(德国 IKA 公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher 公司), 去离子水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), 乙酸、乙酸铵、硫酸铵和二甲基二氯硅烷(均为分析纯, 中国国药集团化学试剂有限

公司)。百草枯和敌草快液态混合标准溶液(均为 1.0 g/L) 购于 AccuStandard 公司。

1.2 标准储备溶液和标准工作溶液配制

标准储备溶液: 精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 混合标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 摇匀, 得到百草枯和敌草快质量浓度均为 1 mg/L 的标准储备溶液。标准工作溶液: 分别量取适量的标准储备溶液于容量瓶中, 用 25 mmol/L 乙酸铵水溶液(乙酸调节 pH 至 5.2) 稀释定容成 $0.5 \sim 60 \mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。所有容量瓶和样品瓶在使用前均采用乙腈和二甲基二氯硅烷试剂(9:1, v/v) 混合溶液浸泡 8 h 以上, 以消除玻璃内壁残余的硅醇基对百草枯和敌草快的吸附。

1.3 色谱条件

色谱柱: 净化柱和富集柱分别为 Acclaim WAX-1 和 WCX-1 (均为 $10 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 美国赛默飞世尔公司) 柱芯, 使用时放入保护卡套中; 分析柱为 Acclaim Trinity P1 ($50 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, 美国赛默飞世尔公司)。流动相: 上样泵的流动相 A 为 250 mmol/L 乙酸铵水溶液(乙酸调节 pH 至 5.2), B 为甲醇, C 为纯水; 分析泵的流动相 A 为 500 mmol/L 硫酸铵水溶液(不需酸度调节), B 为甲醇, C 为纯水。流动相梯度及阀切换时间见表 1。柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: 2.5 mL (大体积进样组件一次完成); 检测波长: 260 nm (百草枯) 和 311 nm (敌草快)。

1.4 在线净化/固相萃取-HPLC 流程

本研究中的在线净化/固相萃取-HPLC 流程如图 1 所示。与传统的在线固相萃取-HPLC 流程相比, 其区别仅在于在自动进样器后加装了一根 Acclaim WAX-1 小柱, 以用于在线水体样品的净化。如表 1 所描述, $0 \sim 6 \text{ min}$ (六通阀的 1-2 位通), 分析泵在平衡色谱柱, 上样泵则通过自动进样器完成进样。Acclaim WAX-1 小柱可将样品中的阴离子和部分非极性物质吸附(样品净化); 而阳离子化合物(包括百草枯和敌草快) 则在 Acclaim WCX-1 柱上富集。 $6 \sim 6.8 \text{ min}$, 六通阀切换到 6-1 位(即 6-1 位通), 已经富集了被分析物的 WCX-1 柱被引入分析流路, 分析泵将富集柱上的被分析物冲至分析柱上进行分离检测; 此时, 上样泵则提高有机相和缓冲液的流动相比比例对 WAX-1 柱进行再生。 6.8 min , 六通阀切回至初始状态(1-2 位通); $6.8 \sim 16 \text{ min}$, 分析泵继续分析, WAX-1 和 WCX-1 柱在上样泵的作用下完成再生和平衡过程, 为下一个样品分析做准备。

表 1 在线净化/固相萃取梯度洗脱程序及阀切换时间表
Table 1 Gradient program and valve-switching time of on-line clean-up and solid phase extraction (SPE)

Time/min	Loading pump			Analytical pump			Valve position
	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%	Mobile phase C/%	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%	Mobile phase C/%	
0.00	10	5	85	60	15	25	1-2
6.00	10	5	85				6-1
6.10	55	45	0				-
6.80	-	-	-				1-2
9.50	55	45	0				-
9.60	10	5	85				-
16.00	10	5	85				-

For loading pump, mobile phase A: 250 mmol/L ammonium acetate buffer, pH 5.2; mobile phase B: methanol; mobile phase C: water; flow rate: 0.7 mL/min. For analytical pump, mobile phase A: 500 mmol/L ammonium sulfate buffer; mobile phase B: methanol; mobile phase C: water; flow rate: 0.6 mL/min. -: remain unchanged.

1.5 样品制备

样品: 准确称取 0.77 g 乙酸铵置于 1 L 水体样品中,用乙酸调节 pH 至 5.2,混匀后过 0.45 μm 滤膜,装瓶待测。**加标样品:** 准确称取 0.077 g 乙酸铵置于 100 mL 水体样品中,加入适量的 1 mg/L 标准储备溶液,用乙酸调节 pH 至 5.2,混匀后过 0.45 μm 滤膜,装瓶待测。

2 结果与讨论

2.1 在线固相萃取柱和分析柱的选择

本研究重点比较了 Acclaim HILIC 和 Acclaim Trinity P1 色谱柱(混合基质液相色谱柱,具有阴离子交换、阳离子交换以及反相吸附 3 种机理,可以通

过流动相的调整使得其中一种机理起主要作用) 的分离效果。至于在线固相萃取柱的选择,为保证两种除草剂的富集效果,考察了 Trinity P1 和 WCX-1 两种具有阳离子交换功能的固相萃取柱。

图 2 和图 3 为在传统在线固相萃取-HPLC 模式下,分别以 HILIC 和 Trinity P1 色谱柱作为分析柱、WCX-1 和 Trinity P1 作为在线固相萃取柱所得到的色谱图。尽管 WCX-1 和 Trinity P1 均能较好地富集两种除草剂,但由于前者共富集的干扰组分更少,易于萃取柱的再生和其寿命的延长。因此,本研究选用 WCX-1 作为在线固相萃取柱。

在分析柱的选择上,使用 HILIC 色谱柱时(见图 2),尽管两种除草剂分离情况良好,但由于出峰

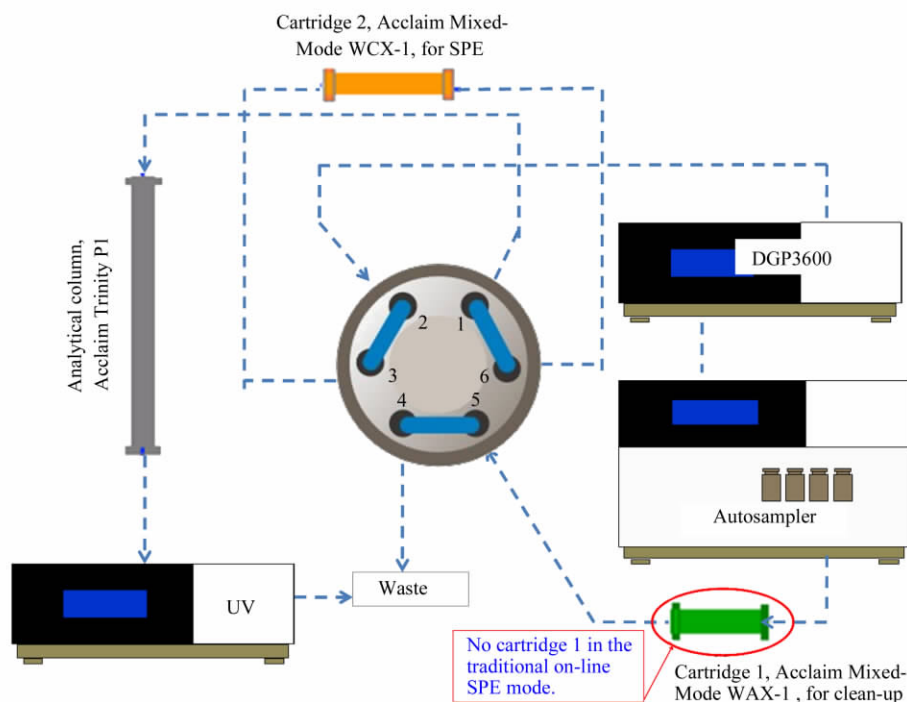


图 1 在线净化/固相萃取模式流程图

Fig. 1 Flow schematic of on-line clean-up and solid phase extraction (SPE)

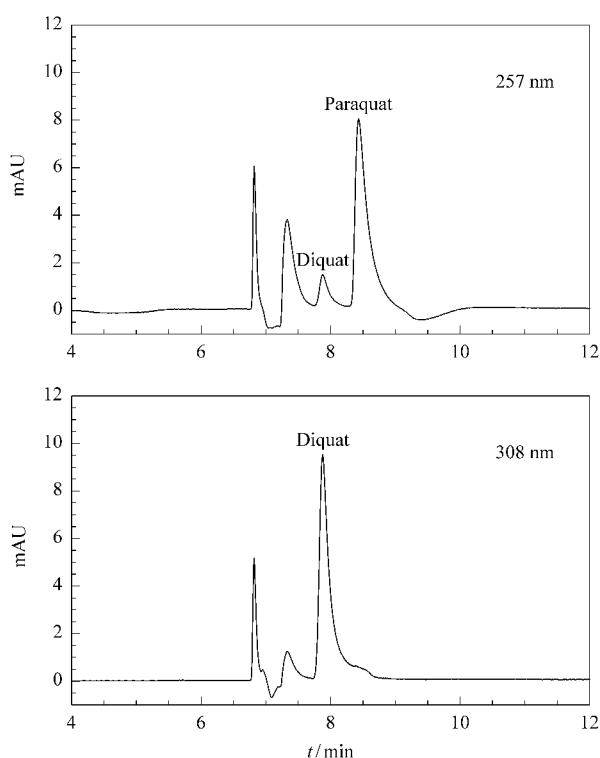


图 2 混合标准溶液(5 µg/L) 在使用未加净化柱的在线固相萃取模式下的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of a mixture of diquat and paraquat standards (5 µg/L) using the on-line SPE mode without clean-up cartridge

SPE cartridge, Acclaim Mixed-Mode WCX-4 (10 mm × 4.6 mm); analytical column, Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 (150 mm × 3.0 mm, 3 µm); column temperature, 25 °C; mobile phase for on-line SPE, 250 mmol/L ammonium acetate (pH 5.2, adjusted with acetic acid) - methanol-water (2.5:13:84.5, v/v/v); mobile phase for separation, 500 mmol/L ammonium sulfate-methanol-water (72:13:15, v/v/v); flow rate: 0.45 mL/min for on-line SPE, and 1.0 mL/min for chromatographic separation; injection volume: 2.5 mL on the on-line SPE cartridge (cartridge 2).

较快,容易受强极性干扰物的干扰,甚至在分析标准品时也存在干扰;而使用 Trinity P1 柱则不仅能使两种除草剂有更好的保留,而且能提供良好的分离度和色谱峰对称性(图 3a)。因此,在本研究中使用 Trinity P1 作为分析柱

如图 3 中的加标池塘水和自来水样品色谱图(b 和 c)所示,未加净化柱的在线固相萃取模式不能有效地消除水体样品中大量极性物质对测定的干扰。因此,如图 1 所示,本研究在自动进样器后增加了一根 WAX-1 小柱(具有阴离子交换和反相吸附两种功能),用于捕集样品中阴离子和非极性干扰物。如图 4 所示,标准加标样品中目标物的光谱图和标准品光谱图完全一致,显示了另加一根净化柱的在线净化/固相萃取模式的净化效果令人满意。

2.2 方法的线性关系、检出限及仪器精密度

在如 1.3 节所述的色谱条件下,百草枯和敌草

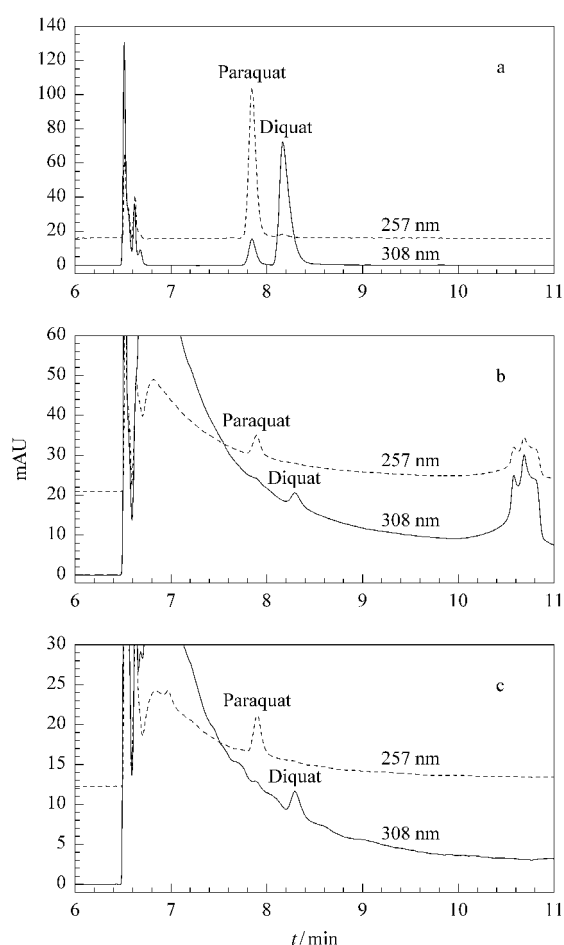


图 3 (a) 百草枯和敌草快混合标准溶液(20 µg/L)、(b) 池塘水加标样品(20 µg/L)和(c) 自来水加标样品(5 µg/L) 在使用未加净化柱的在线固相萃取模式下的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) a mixture of diquat and paraquat standards (20 µg/L each), (b) a pond water sample spiked with standards at 20 µg/L each, and (c) a tap water sample spiked with standards at 5 µg/L each using the on-line SPE mode without clean-up cartridge

SPE cartridge: Acclaim Trinity P1 (10 mm × 4.6 mm, 5 µm); analytical column: Acclaim Trinity P1 (50 mm × 3.0 mm, 3 µm); column temperature, 25 °C; mobile phase for on-line SPE, 250 mmol/L ammonium acetate (pH 5.2, adjusted with acetic acid) - methanol-water (55:10:35, v/v/v); mobile phase for separation, 500 mmol/L ammonium sulfate-methanol (60:40, v/v); flow rate, for on-line SPE and separation, both 0.6 mL/min; injection volume, 2.5 mL on the SPE cartridge (cartridge 2).

快在 1.0 ~ 20 µg/L 范围内线性关系良好,线性相关系数(r^2)均 ≥ 0.9989 。百草枯的线性回归方程为 $A = 0.3582C - 0.0195$; 敌草快的线性回归方程为 $A = 0.4755C - 0.2741$, 其中, A 为峰面积 (mAU · min), C 为样品质量浓度 (µg/L)。百草枯和敌草快的检出限(以信噪比(S/N)为 3 计)分别为 0.10 和 0.12 µg/L。以池塘水加标样品(2.5 µg/L)连续 9 针进样,各组分的峰面积相对标准偏差(RSD)小

于 3.7%, 保留时间的 RSD 小于 0.024%。

2.3 加标回收率及实际样品测定

取自来水和池塘水样品按在线净化/固相萃取模式下的色谱条件进行测定, 结果表明样品均为阴

性, 样品加标回收率为 94%~98% (结果见表 2), 表明该方法可准确用于水体样品中百草枯和敌草快的测定, 自来水和池塘水测定样品的色谱图见图 4。

表 2 百草枯和敌草快在水样中的加标回收率

Table 2 Recoveries of paraquat and diquat spiked in water samples

Pesticide	Tap water				Pond water			
	Detected/ ($\mu\text{g/L}$)	Added/ ($\mu\text{g/L}$)	Found/ ($\mu\text{g/L}$)	Recovery/ %	Detected/ ($\mu\text{g/L}$)	Added/ ($\mu\text{g/L}$)	Found/ ($\mu\text{g/L}$)	Recovery/ %
Paraquat	ND	2.5	2.45	98	ND	2.5	2.40	96
Diquat	ND	2.5	2.40	96	ND	2.5	2.36	94

ND: Not detected.

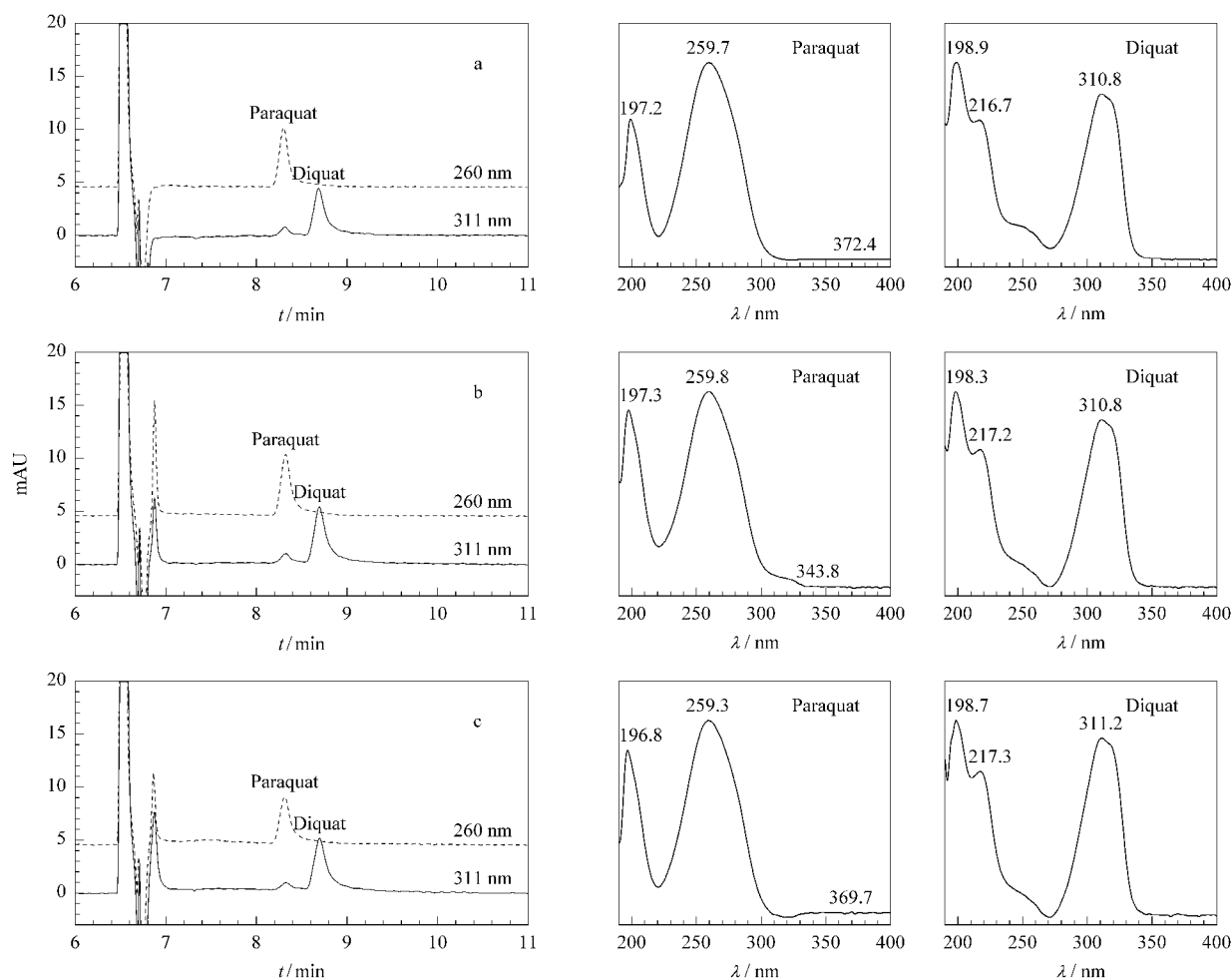


图 4 (a) 百草枯和敌草快混合标准溶液 (2 $\mu\text{g/L}$)、(b) 自来水加标样品 (2.5 $\mu\text{g/L}$) 和 (c) 池塘水加标样品 (2.5 $\mu\text{g/L}$) 在使用在线净化/固相萃取模式下的色谱图 (右侧为各自对应的光谱图)

Fig. 4 Chromatograms of (a) a mixture of diquat and paraquat standards (2 $\mu\text{g/L}$ each), (b) a tap water sample spiked with standards at 2.5 $\mu\text{g/L}$ each and (c) a pond water sample spiked with standards at 2.5 $\mu\text{g/L}$ each using the on-line clean-up and SPE mode (UV spectra of diquat and paraquat are shown on the right side)

Cartridge 1 (for clean-up), Acclaim Mixed-Mode WAX-I (10 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); cartridge 2 (for SPE), Acclaim Mixed-Mode WCX-I (10 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); analytical column, Acclaim Trinity PI (50 mm $\times$ 3.0 mm, 3 μm); mobile phase for on-line SPE, A: 250 mmol/L ammonium acetate (pH 5.2); B: methanol; C: water; in gradient, 0.0–6.0 min, 10% A, 5% B; 6.1–9.5 min, 55% A, 45% B; 9.6–16 min, 10% A, 5% B; mobile phase for separation, 500 mmol/L ammonium sulfate-methanol-water (60:15:25, v/v/v); column temperature, 25 $^{\circ}\text{C}$; flow rate, 0.7 mL/min for on-line SPE, and 0.6 mL/min for separation; injection volume, 2.5 mL on the on-line SPE cartridge.

2.4 与 EPA 549.2 离线固相萃取方法比较

对于水样中痕量物质的检测, 需要较高的富集倍数才能达到满意的检出限。EPA 549.2 方法^[9]采

用离线固相萃取方法富集水体中的百草枯和敌草快, 取 250 mL 水样过 C8 固相萃取柱, 经淋洗、洗脱后加入离子对试剂, 重新定容至 5 mL 后待测, 此时

富集倍数为 50。然而进样时,只取 200 μL ,这样,两种除草剂的含量只相当于 2 mL 原始样品中的含量。采用在线固相萃取模式,虽然进样量只有 2.5 mL,但是由于无样品损耗,其中的待测物全部进入分析系统测定,使得被测物的灵敏度与离线方法相比更高。相比繁琐的离线处理过程,在线固相萃取技术更为简单、方便。

3 结语

本文采用在线净化/固相萃取-液相色谱法测定水体中的敌草快和百草枯,在 16 min 内即可完成一次实际样品测定。样品无须经过繁琐的人工前处理过程,过滤后即可进样,样品的净化、萃取和浓缩完全由液相色谱系统自动完成。与传统的离线固相萃取相比,在线固相萃取技术不仅样品需求量小,试剂消耗量少,并且操作简单,样品分析成本低廉,回收率高。在线净化/固相萃取-快速液相色谱联用技术测定水样中痕量污染物将会有很好的应用前景。

致谢: 本文的完成得到了李浪和罗继两位同仁的倾力协助,作者在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] US Environmental Protection Agency (EPA). Basic Information about Regulated Drinking Water Contaminants, 1997. [2012-08-30]. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/diquat.cfm>
- [2] The Council of the European Union. Quality of Water Intended for Human Consumption (L330/42). Official Journal of the European Communities, L330/34. Council Directive 98/83/EC (En), 1998
- [3] US Environmental Protection Agency (EPA). Determination of Diquat and Paraquat in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. EPA Method 549.2, Revision 1.0, 1997
- [4] Hara S, Sasaki N, Takasa D, et al. Anal Sci, 2007, 23: 523
- [5] Thermo Scientific (formerly Dionex). Application Brief 114, LPN 2577, 2010. [2012-08-30]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/87647-AB114-4C-DiquatParaquat-03Sep10-LPN2577-01.pdf>
- [6] Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Perez-Lamela C, et al. J Chromatogr Sci, 2006, 44: 539
- [7] Tuzimski T. J AOAC Int, 2008, 91: 1203
- [8] Taguchi V Y, Jenkins S W, Crozier P W, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 1998, 9: 830
- [9] Zhu G Y, Qin D M, Gong Y. Pesticide Science and Administration (朱光艳, 秦冬梅, 龚勇. 农药科学与管理), 2008, 29 (7): 11
- [10] Li H M, Sun S W, Shi X F. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李红梅, 孙守威, 史谢飞. 分析化学), 2007, 35 (10): 1499
- [11] Bo H B. Chinese Journal of Chromatography (薄海波. 色谱), 2011, 29(2): 180
- [12] Thermo Scientific (formerly Dionex). Application Note 287, LPN 2919, 2011. [2012-08-30]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/111142-AN287-HPLC-Sudan-Dyes-Chili-Oil-21Sept2011-LPN2919.pdf>
- [13] Thermo Scientific (formerly Dionex). Application Note 292, LPN 2969, 2011. [2012-08-30]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/111209-AN292-HPLC-AnilineNitroanilines-Waters-18Oct2011-LPN2969.pdf>
- [14] Thermo Scientific (formerly Dionex). Application Update186, LPN 3045, 2012. [2012-08-30]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/111719-AU186-HPLC-Carbofuran-Carbaryl-Water-SPE-05Mar2012-LPN3045.pdf>
- [15] Castro R, Moyano E, Galceran M T. J Chromatogr A, 2000, 869: 441
- [16] Zougagh M, Bouabdallah M, Salghi R, et al. J Chromatogr A, 2008, 1204: 56