

# 高效安全的敌草快和百草枯液相色谱分离分析技术

李红梅\* 孙守威

史谢飞

(中国计量科学研究院化学研究所, 北京 100013) (中国测试技术研究院, 成都 610005)

**摘要** 研究了  $KCD_4$ 、 $KBF_4$  和  $KPF_6$  “离液试剂”的浓度及流动相组分对敌草快和百草枯分离的影响。优化后的实验条件是: 20 mmol/L 的  $KPF_6$ , 在 pH = 3 的条件下用 100% 的水作为流动相, 配合一根耐水性 >95% 水的反相柱。实验结果无论在保留值的控制、柱效和色谱峰的对称性各方面都优于传统的“离子对”方法。

**关键词** 反相高效色谱, 离液效应, 阳离子化合物, 敌草快, 百草枯

## 1 引言

敌草快 (diquat dibromide, CAS# 85-00-7)、百草枯 (paraquat dichloride, CAS#1910-42-5) 是季胺盐类化合物, 作为广谱性除草剂, 用途很广。美国 1997 年使用量为敌草快 300 万磅/年, 百草枯 20 万磅/年; 我国的产量分别为 3.5 和 2.5 万吨/年。这两种化合物都属高毒类, 摄入后对生物体的还原氧化活性影响很大, 对肺、心、肝、肾等都有害 (USEPA, 1987)。

敌草快和百草枯均为碱性的阳离子有机化合物, 结构如图 1 所示。这类碱性化合物在低 pH 范围下 (pH < 3), 已完全电离, 而成为高度溶剂化、质子化的阳离子, 几乎不能被憎水性的反相柱保留; 由于和残留硅羟基的二级相互作用, 这类高度质子化和溶剂化离子的色谱峰严重拖尾, 所以分析这类化合物是反相高效液相色谱法的一个困难课题。离子对色谱法是目前众多国家所推荐的标准方法, 例如, 水体中的残留分析方法 US EPA National Environmental Methods 549.2 (Revision 1.0, June 1997)、分析车间空气的 NDSH Method 5003、用于农药制剂分析的我国国家标准 GB19307-2003、土豆中的残留方法 AOAC 992.17 等, 这些方法的最终检测手段都是采用离子对色谱法、紫外检测器检测。虽然如此, 该方法分析结果并不令人满意, 主要是无法实现两个峰的基线分离, 所推荐的分离条件和检测波长下相互干扰, 影响最终准确分析定量, 如图 1 所示。

近年来, RP-HPLC 分析百草枯和敌草快的方法有了改进。Waters 公司的 Young 等<sup>[1]</sup> 研制了一种专门用于分析阳离子化合物的 Atlantis HPLC 色谱柱, 在未使用离子对试剂情况下, 加入甲酸胺, 并用 LC/MS 法分析了百草枯和敌草快的标准溶液。该方法中分离的两个峰仍不能实现基线分离, 影响色谱准确定量。但用在 LC/MS 上, 可依靠质荷比的不同进行定性及定量分析, 因此还是适用的。更重要的是, 该法用 MS 代替 VWD, 提高了可靠性和检测灵敏度。

Supelco 公司则开发了  $ZrO_2$  的 Discovery ZR-PS 色谱柱, 以氟化铵、磷酸等作添加剂, 其中的磷酸盐离子与色谱柱上的  $ZrO_2$  生成配键后成为阳离子交换的活性位置, 成功地分离了这一对化合物<sup>[2]</sup>。而

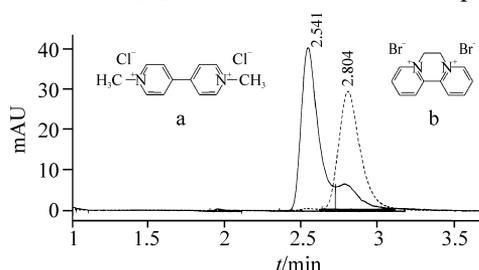


图 1 敌草快 (a) 和百草枯 (b) 的离子对高效液相色谱法典型色谱图

Fig 1 Typical separation of diquat (a) and paraquat (b) by ion-pair HPLC

条件 (conditions): ODS Hypersil 100 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m; 流动相 (mobile phase): 14.2 mmol/L  $(C_2H_5)_2NH$ , 0.12 mol/L  $H_3PO_4$ , 0.05 mol/L  $CH_3(CH_2)_6SO_3Na$ ; 测定波长 (wavelength): 敌草快 (diquat) 307 nm, 百草枯 (paraquat) 257 nm.

2006-12-01 收稿; 2007-05-20 接受

本文系国家科技基础条件平台建设项目“实验材料与标准物质”资助 (No. 2005DKA21500)

\* E-mail: lihm@nim.ac.cn

Vydac公司则开发出了一种二苯基反向柱,仍旧用磺酸盐离子对试剂,但比一般的  $C_{18}$ 柱,对敌草快和百草枯有较好的分离能力。

在低 pH范围,“离液试剂”(chaotropic agents)可以增强有机胺类碱性化合物的保留,并同时改善色谱峰的对称性。这一现象最早是由 LoBritto 等<sup>[3]</sup>在分析吡啶、取代吡啶和芳香胺类化合物时发现。Roberts等<sup>[4]</sup>在分析伯胺、仲胺、苯甲叔胺类及抗忧郁药物时也发现有类似的现象。Jones等<sup>[5]</sup>研究了不同种类“离液试剂”及其浓度对阻滞剂的反相 HPLC分析;LoBritto等<sup>[6]</sup>研究了酸和“离液试剂”的浓度对质子化碱类的 R-PHLC保留时间的影响。Li等<sup>[7]</sup>对“无机流动相添加剂”对质子化碱类在 R-HPLC中的保留值、峰形、分离效率及峰形对称性的影响等作了系统的研究。

本实验使用“离液试剂”分析季胺类化合物,在相关文献中均未见报道。季胺类化合物比伯、仲、叔胺的离子性更强,更难被反相系统保留,因而要很好地分离此类化合物并得到可靠的分析结果难度大。百草枯和敌草快,是季胺盐类化合物的典型代表,研究和开发其可靠的分离及分析方法,尤其改进和完善原来的离子对方法,在农药残留物检测、农药制剂的分析等工作中有着广泛的需求,不失为一种高效、安全且经济的分析方法,在相关应用领域具有较强的推广价值。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

色谱系统为 Agilent 1100 HPLC仪器,配置 VWD检测器和 Chem station 工作站。ZORBAX SB  $C_{18}$ 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, Agilent); XTerra RP18色谱柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, Waters公司)。PHS-25 pH计(上海精密科学仪器公司)。

百草枯和敌草快标准品(国家标准物质研究中心提供),纯度分别为 99.9%和 99.7%;乙腈和甲醇均为 HPLC级(99.9%, Merck公司);六氟磷酸钾(98%, ALDRICH);氟硼酸钾(分析纯, 98.0%, 天津福晨化学试剂厂);高氯酸钾(分析纯, 99.5%, 北京房山益华化工厂)。全部水相均用 0.45  $\mu$ m膜过滤。

### 2.2 色谱条件

色谱分析均为等度洗脱,流速 1 mL/min。百草枯和敌草快的 UV 检测波长选择它们的最大吸收波长( $\lambda_{max}$ ),分别为 257 nm和 307 nm。流动相的有机相为乙腈和甲醇,水相中先加入 20 mmol/L三乙胺,然后用磷酸调 pH=3。选择的“离液试剂”为:高氯酸钾、氟硼酸钾和六氟磷酸钾,实验中 3种离液试剂的浓度分别为 10、20和 40 mmol/L。百草枯和敌草快样品溶于流动相中,浓度为 1 g/L。

## 3 结果与讨论

### 3.1 pH值的确定

pH值是影响酸、碱性化合物保留的一个最主要因素。当 pH值在  $pK_a \pm 2$ 个单位区域时,化合物的保留随 pH变化最敏感。若要求碱性化合物完全电离,必须控制 pH值低于  $pK_a$ 值 2个单位,离子化的比例才能高于 99%。实验未测定百草枯和敌草快的  $pK_a$ ,但结构类似的季胺类化合物的  $pK_a$ 值约 9.5~10.5,所以采用 pH=3应足以保证该两种化合物的完全离子化。在实验中,设置较低 pH值,更侧重于考虑抑制残余硅羟基的电离,以减轻硅羟基与百草枯和敌草快阳离子的次级相互作用。选择三乙胺作为 pH调节试剂,也是出于同一目的。因为三乙胺可以起到屏蔽硅羟基的作用。

### 3.2 离液试剂的品种、浓度对分离的影响

对离液效应本质的认识目前还不一致,存在几种保留模型:(1)离子对模型;(2)加入的反阴离子先被固定相吸附,然后与被分析的阳离子产生动态离子交换的模型;(3)流动相中所添加的这类特殊无机反离子能破坏离子的溶剂化外壳,降低亲水性,从而增强了保留,也减弱了次级相互作用等模式。

在选用的 3种离液试剂中,四氟硼酸钾作用最弱,其浓度从 10 mmol/L、20 mmol/L增至 40 mmol/L,在所选择的两根  $C_{18}$ 柱上均不能分离敌草快和百草枯。高氯酸钾较四氟硼酸钾有效,分离度随浓度增大

而改善。当达到 40 mmol/L,在优化后的流动相组成条件下,百草枯和敌草快被基本分离。最有效的是六氟磷酸钾,只需加入 10 mmol/L,即可达到基线分离,如图 2 所示。实验结果显示,3 种试剂对百草枯和敌草快的“离液效应”强弱次序是:六氟磷酸钾 > 高氯酸钾 > 四氟硼酸钾,且均随浓度增高而增强。

### 3.3 流动相中水/有机相比率的优化

对乙腈-水体系,分离随着水相比率的增加而改进,在 20 mmol/L  $KPF_6$  条件下,85% 水比例达到基线分离,100% 的水分离度最大。但因为 ZORBAX SB 和其它多数品牌的  $C_{18}$  色谱柱不能在全水相下工作,因此选择 90% ~ 95% 的水相,图 3 为不同比例的流动相的色谱图。不过在此条件下(流动相为乙腈/水)百草枯峰的峰顶会分岔,见图 3 中水/乙腈 = 95/5 色谱图的第一个峰。可在流动相中加入少量甲醇,流动相为  $V(\text{乙腈}) : V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 3 : 2 : 95$ ,以改变选择性,消除分岔现象,图 2 即是修饰后的结果。

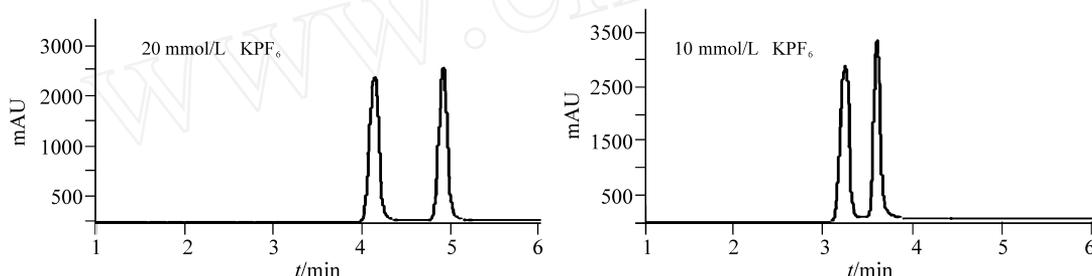


图 2 在高效液相色谱中不同浓度的  $KPF_6$  对敌草快和百草枯分离效果的影响

Fig 2 Effect of concentrations of  $KPF_6$  on the HPLC separation of diquat and paraquat

ZORBAX SB  $C_{18}$ , pH = 3,  $CH_3CN/CH_3OH/H_2O = 3/2/95$ , 流速 (flow rate): 1 mL/min, 测定波长 (wavelength): 敌草快 (diquat) 307nm, 百草枯 (paraquat) 257 nm, 进样量 (injection volume) 5  $\mu$ L (1 g/L)。

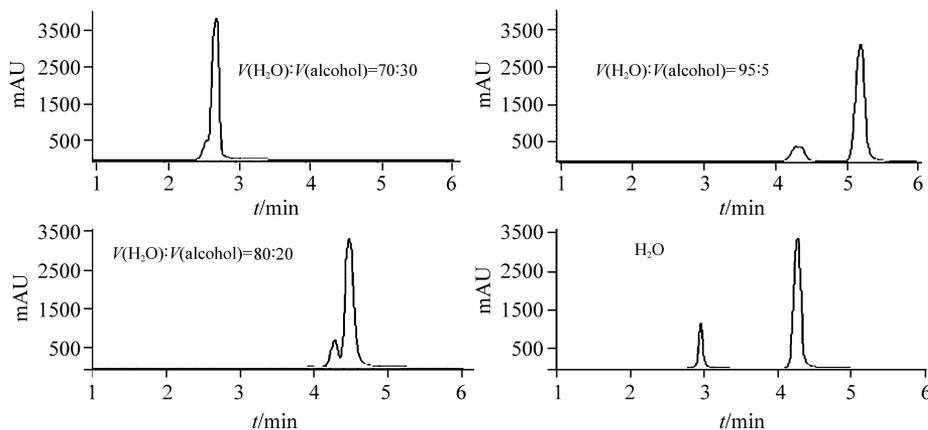


图 3 在高效液相色谱中不同比例的水对敌草快和百草枯分离效果的影响

Fig 3 Effect of water percent in mobile phase on HPLC separation of diquat and paraquat

条件 (conditions): ZORBAX SB  $C_{18}$  柱, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, pH = 3, 流动相 (mobile phase): 20 mmol/L  $KPF_6$  / 水相 (water phase),  $CH_3CN$  / 水, 流量 (flow rate): 1 mL/min, 检测波长 (detected wavelength): 257 nm, 进样体积 (injection volume) 5  $\mu$ L (1 g/L)。

### 3.4 色谱柱的选择

正如前所述, ZORBAX SB 等常用的  $C_{18}$  色谱柱可以用于分离百草枯和敌草快,只要使用六氟磷酸钾作为“离液试剂”。但考虑到色谱柱的适应能力,应注意水相比比例以 95% 以下为宜。

在 100% 水相条件下,有人认为,  $C_{18}$  键合相将发生一定程度的流失,色谱保留行为明显变化,很快降低柱效;有人认为这是因为 100% 的水不能浸润硅胶的微孔所致<sup>[9]</sup>。所以研究可用于 100% 水相的  $C_{18}$  柱是色谱柱表面化学的重要课题。例如 Phenomenex 的 AQUA<sup>TM</sup>, Waters 的 XTerra RP 柱等,均有在 100% 水相下的出色润湿性能。使用 Waters 的 XTerra RP18 柱,在 100% 水相中依图 3 的流动相条件分

离百草枯和敌草快,获得的色谱图的分离情况极好(图略)。

### 3.5 线性范围与检出限

用 XTerra RP18 柱,流动相为含 20 mmol/L  $KPF_6$ , pH = 3 的 100% 水,测定了在该体系下敌草快和百草枯的线性范围。敌草快和百草枯的检测波长各为 257 nm 和 307 nm,浓度范围从  $0.1 \sim 10^4 \mu\text{g/L}$ ,结果如图 4。用百草枯和敌草快的标准溶液 ( $0.05 \text{ mg/L}$ ) 估计了该 HPLC 方法的柱上检出限;以信噪比 3 倍定义,约为 0.3 ng。

美国 EPA 对饮用水中敌草快和百草枯的最大残留量 (MRL) 的规定分别为 0.4 和 0.8  $\mu\text{g/L}$ ;对食品中 MRL 低于  $0.1 \times 10^{-6}$ 。而 US EPA 549.2 检测方法是将 250 mL 水样用  $C_8$  柱分离浓缩,然后取 200  $\mu\text{L}$  浓缩液进样, HPLC 分析;这样进样量约在 10 ~ 20 ng, 本方法的检出限可以满足饮用水中对敌草快和百草枯的残留检测。

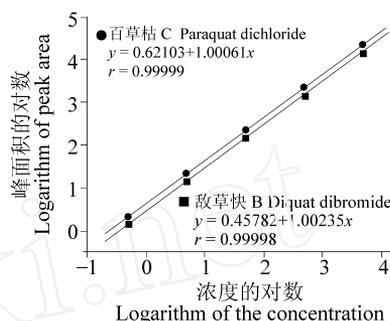


图 4 敌草快和百草枯的校正曲线

Fig 4 Calibration curve of diquat and paraquat

## References

- 1 Young M S, Jenkins KM. *Water Corporation The Application Notebook*, **2004**: 09
- 2 Sigma-aldrich/Supelco, Applications Development Group. *Application Note* 170, **2005**: 1 ~ 2
- 3 LoB ruto R, Jones A, Kazakevich Y V, McNair H M. *J. Chromatogr A*, **2001**, 913: 173 ~ 187
- 4 Roberts J M, Diaz A R, Fortin D T, Friedle J M, Piper S D. *Anal. Chem.*, **2002**, 74: 4927
- 5 Jones A, LoB ruto R, Kazakevich Y V. *J. Chromatogr A*, **2002**, 964: 179 ~ 187
- 6 LoB ruto R, Jones A, Kazakevich Y V. *J. Chromatogr A*, **2001**, 913: 189 ~ 196
- 7 Li P, LoB ruto R, Kazakevich Y V, Thompson R. *J. Chromatogr A*, **2004**, 1049: 63 ~ 73
- 8 Przybyciel M, Majors R E. *LCGC, North America*, **2002**, 6(20): 516, 520, 522 ~ 523

## Analysis of Diquat and Paraquat by High Performance Liquid Chromatography

Li Hong-Mei<sup>1</sup>, Sun Shou-Wei<sup>2</sup>, Shi Xie-Fei<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Institute of Chemistry, National Institute for Metrology, Beijing 100013)

<sup>2</sup> (National Institute for Measurement Technology, Chengdu 610005)

**Abstract** Diquat and Paraquat are ionic compounds, and difficult to retain and resolve on silica-base RP-HPLC columns. Consequently, the determination of diquat and paraquat is usually performed by ion-pairing reagents. In this study, a new RP-HPLC approach was established depending on the chaotropic effect, which is interpreted by the influence of some special inorganic additives to disrupt the analyte's solvation-desolvation equilibrium in the mobile phase. The effects of three chaotropic agents ( $KClO_4$ ,  $KBF_4$ ,  $KPF_6$ ) concentrations on the separation were studied.  $KPF_6$  is the most effective one and was used in the experiment practically. The separation conditions were optimized. In the system, 100% water (pH = 3) was used as mobile phase containing 20 mmol/L  $KPF_6$ ; a reversed phase column which can be used throughout the entire range of aqueous-organic solvent mobile phase was preferable; the detection wavelength was selected 307 nm for diquat and 257 nm for paraquat. By comparing with traditional ion-pairing method, the retention value, separation efficiency, peak symmetry and ruggedness were all improved greatly in this approach.

**Keywords** Reversed phase high performance liquid chromatography, chaotropic effect, cationic compounds, diquat, paraquat

(Received 1 December 2006; accepted 20 May 2007)