

整体柱高效液相色谱法测定草甘膦原药中甲醛含量

张 微 李文明 黄宝勇 潘灿平 *

(中国农业大学理学院, 北京 100094)

摘 要 建立了衍生化 高效液相色谱法对草甘膦原药中痕量甲醛含量进行测定的方法。样品中残留甲醛经超声波水浴提取, 与 2,4-二硝基苯肼衍生反应, 生成的 2,4-二硝基苯腙用反相整体柱色谱进行快速分离, 在 360 nm 紫外波长下检测, 外标法定量。该分析方法在 20 ~ 200 mg/L 浓度范围呈良好线性, 添加回收率在 88% ~ 105% 之间, 相对标准偏差小于 5%。样品中甲醛的最小检测浓度为 0.5 mg/kg。比较了整体色谱柱和常规 C_{18} 反相柱分离效果, 表明整体色谱柱可在 1.5 min 内实现衍生化产物的快速分离并进行定性定量, 同时发现相对于常规柱, 采用整体柱提高了检测灵敏度约 10 倍。

关键词 甲醛, 草甘膦, 整体柱, 高效液相色谱, 衍生化

1 引 言

痕量甲醛的检测方法主要有分光光度法 (其中主要包括变色酸比色法、乙酰丙酮化学滴定法^[1]、乙酸铅试纸法、盐酸副玫瑰苯胺比色法)、色谱法^[2~4] (主要包括 2,4-二硝基苯肼衍生法和巯基乙胺法) 和示波极谱法等。国家标准方法 (GB12686-2002) 中草甘膦原药中甲醛的测定采用的是乙酰丙酮显色法, 但是这种方法灵敏度较低, 且可能产生一定干扰和假阳性误差, 该方法已不能满足国际贸易中农药产品质量控制的需要 (FAO Specification, Glyphosate, 2000/2001)。文献报道了空气和食品中痕量甲醛测定可采用衍生化 高效液相色谱的方法^[5,6]。尚未有农药原药或制剂中用衍生化色谱法检测甲醛含量的报道。草甘膦原药为酸性和强极性, 只溶解于水和醇等极性溶剂中。因此, 衍生化后的试液无法直接进行气相色谱分析。本研究建立了草甘膦原药中甲醛经超声波提取、与 2,4-二硝基苯肼试剂衍生化后经整体柱反相高效液相色谱快速分离并检测的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

P3000 型液相色谱仪 (UV2000 检测器) (北京创新通恒有限公司)。乙腈为色谱纯; 四氯化碳为分析纯; 磷酸: 85%, 分析纯; 盐酸溶液: 1 mol/L; 甲醛: 37% 水溶液; 草甘膦原药: 纯度 95%; 2,4-二硝基苯肼: 分析纯; 超纯水。

2.2 整体柱色谱操作条件

色谱柱: Merk Ca Monolithic column C_{18} 4.6 mm $\times$ 150 mm; 流动相: $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{水}} = 55 : 45$; 紫外检测器 ($\lambda = 360$ nm); 流速: 3 mL/min; 进样量: 20 μ L; 保留时间: 2,4-二硝基苯肼约 0.9 min; 2,4-二硝基苯腙约 1.2 min。

2.3 常规 C_{18} 4.6 mm $\times$ 150 mm 色谱柱的色谱操作条件

色谱柱: Develsil ODS NOMURA CHEMICAL; 流动相: $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{水}} = 60 : 40$; 紫外检测器 ($\lambda = 360$ nm); 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μ L; 保留时间: 2,4-二硝基苯肼约 6.9 min; 2,4-二硝基苯腙约 10.6 min。

2.4 测定步骤

2.4.1 2,4-二硝基苯肼溶液的制备 称取 20.0 mg 2,4-二硝基苯肼于 10 mL 容量瓶中, 加入乙腈 四氯化碳 磷酸 (85:14:1, V/V) 溶解, 定容至 10 mL。

2.4.2 甲醛标准溶液的制备 称取 21.9 mg 37% 的甲醛水溶液于 50 mL 容量瓶中, 乙腈稀释超声溶

2004-07-14 收稿; 2005-01-23 接受

本文系国家重点基础研究发展规划资助项目 (No. 2002CB410805, No. FAO/IAEA CRP11479)

解,定容至 50 mL,取此溶液 1 mL 用乙腈稀释并定容至 50 mL。

2.4.3 2,4-二硝基苯肼标准溶液的制备 分别移取甲醛标准溶液 1、3、5、7 和 9 mL,加入 1 mL 的 2,4-二硝基苯肼溶液,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 2,超声波振荡 10 min,冷却放置至室温后定容到 10 mL,待测。

2.4.4 2,4-二硝基苯肼标准曲线的建立 在上述操作条件下,待仪器稳定后(相邻两针的相关响应信号之比的相对偏差 < 1.5%),通过定量环定量进样 20 μ L,测量保留时间和峰面积,每个浓度重复测定 3 次,取峰面积均值和甲醛浓度作图,绘制标准曲线。

2.4.5 草甘膦原药中甲醛含量的测定 称取 100 mg 草甘膦原药,乙腈水溶解,加入 1 mL 2,4-二硝基苯肼溶液,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值到 2.0,然后在超声波水浴中反应 10 min,冷却放置至室温,用乙腈定容到 10 mL,反应液经微孔滤膜过滤,通过定量环定量进样 20 mL,根据保留时间定性,外标标准曲线法定量。

3 结果与讨论

3.1 整体柱与普通柱的比较

将常用的 4.6 mm $\times$ 150 mm 的 C_{18} 色谱柱与 C_{18} 整体柱做了比较,发现使用整体柱后,检出限比常规色谱柱降低了 10 倍左右,而且加快了检测速度。使用 C_{18} 整体柱,流速设定为 3.0 mL/min,2,4-二硝基苯肼衍生物的出峰时间为 1.2 min,与反应原料 2,4-二硝基苯肼达到基线分离(见图 1)。常规 C_{18} 柱的色谱柱流速为 0.8 mL/min,2,4-二硝基苯肼衍生物的保留时间为 10.6 min(见图 2)。由于分离时间缩短,色谱峰变得高而尖锐,因而可有效的提高分析的灵敏度。

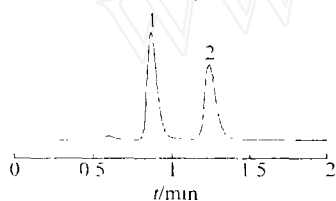


图 1 整体柱分离色谱图(甲醛浓度为 2.7 mg/L)

Fig. 1 Typical high performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV) chromatogram by a monolithic column (at a conc. of 2.7 mg/L formaldehyde)

1. 2,4-二硝基苯肼(1-(2,4-dinitrophenyl) hydrazine); 2. 2,4-二硝基苯肼(2-methylene-1-(2,4-dinitrophenyl) hydrazine)。

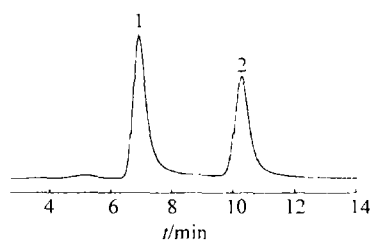


图 2 常规柱分离色谱图(甲醛浓度为 43.2 mg/L)

Fig. 2 Typical HPLC-UV chromatogram by a usual C_{18} column (at a conc. of 43.2 mg/L formaldehyde)

1. 2,4-二硝基苯肼(1-(2,4-dinitrophenyl) hydrazine); 2. 2,4-二硝基苯肼(2-methylene-1-(2,4-dinitrophenyl) hydrazine)。

3.2 方法的检出限、线性范围和测量的精密度

通过配制不同浓度的甲醛溶液反应后,进行检测,按照整体柱色谱条件测定,对草甘膦原药样品中甲醛的最低检出浓度为 0.5 mg/kg。

按照 2.4.3 节配制标准溶液,并进行色谱分析。以峰面积对标液浓度作图,建立标准曲线,线性方程为 $y = 38893x + 14153$,相关系数为 0.9993。结果表明,在 2.7~21.6 mg/L 进样浓度范围内,衍生产物峰面积与甲醛浓度间呈良好线性相关。进一步扩大考察的浓度范围,发现在 2.0~200 mg/L 范围内均呈良好线性关系。高浓度甲醛的测定时可以适当稀释若干倍后进样分析。

在稳定的色谱操作条件下,对某一未知甲醛含量的同一样品多次重复测定,测得甲醛含量平均值为 16.2 mg/kg,其标准偏差为 0.71 mg/kg ($n=5$),相对标准偏差为 4.13%。

3.3 添加回收率的测定

通过 2.7、10.5 和 21.6 mg/L 的 3 个浓度水平的添加回收率实验(平行 3 次),结果表明草甘膦原药中甲醛的回收率在 88%~105% 之间。

3.4 测定草甘膦样品中的甲醛

对某工厂生产的 5 个批次草甘膦原药(甘氨酸路线生产)进行了甲醛含量的测定,结果(见表 1)表

明:各个批次草甘膦原药中甲醛含量在 0.05~0.16 g/kg 之间,符合 FAO 规格要求 (要求不大于 1.3 g/kg)。

表 1 5 个批次草甘膦原药中甲醛含量 (n=3)

Table 1 The contents of formaldehyde in glyphosate technical (five batches) (n=3)					
No	1	2	3	4	5
Content (g/kg)	0.100 ±0.031	0.075 ±0.005	0.102 ±0.039	0.110 ±0.032	0.077 ±0.011

本实验建立了农药原药中痕量甲醛的快速仪器测定方法。样品经离线衍生化和超声波提取,采用反相高效液相色谱法,配备整体色谱柱快速分离甲醛衍生化产物,用紫外检测器进行检测,外标法进行定量。本方法准确可靠,具有较高的灵敏度,方法简单、快速,适用于质检和质量控制分析。

References

1 Zhou Guangyu (周光宇), Hu Minyu (胡敏予), Huang Yiming (黄忆明). *Practical Preventive Medicine* (实用预防医学), **2003**, 10 (2): 256~257

2 Huang Weixiong (黄伟雄). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (中国卫生检验杂志), **1999**, 2: 190~191

3 Huang Fang (黄 芳), Lin Xiaoshan (林晓珊), Wu Huiqin (吴惠勤). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32 (12): 1617~1620

4 Chen Xiaomei (陈笑梅), Shi Xuxia (施旭霞), Zhu Weijian (朱卫建), Zheng Ziqiang (郑自强), Shan Huijun (单慧君). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32 (11): 1489~1491

5 Ge Jianmin (葛健民). *Journal of Hygiene Research* (卫生研究), **1994**, 23 (3): 138~140

6 Zhang Xiuyao (张秀尧), Chen Dong (陈 栋). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (中国卫生检验杂志), **2004**, 14 (1): 75~76

Determination of Formaldehyde in Glyphosate Technical by Monolithic C₁₈ Flash Column Separation and Ultraviolet Detection

Zhang Wei, Li Wenming, Huang Baoyong, Pan Canping*
(College of Science, China Agriculture University, Beijing 100094)

Abstract An analytical method for determination of formaldehyde impurity in glyphosate technical by offline derivatization-high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The sample was resolved in acetonitrile-water and derivatized with 2,4-dinitrophenyl hydrazine at pH 2.0 and then extracted under ultrasonic bath. The derivatized product was separated on a Merk Co. monolithic flash column (4.6 mm ×150 mm) with mobile phase consisting of acetonitrile: water (55:45, V/V), flow rate of 3 mL/min and detected by ultraviolet detection at 360 nm. Formaldehyde was determined by a reversed phase HPLC monolithic flash column, off-line derivatization with hydrazine reagent and ultraviolet (UV) detection at 360 nm. The method was shown to be simple, rapid and practical. The method was validated from 2.0 to 200 mg/L with satisfied linear relationship. The recovery rates were between 88% to 105%, with less than 5% of relative standard deviation. The detection limit is 0.5 mg/L. A comparison was undertaken for regular C₁₈ and monolithic column in separation time and limit of detection (LOD). With the monolithic column, lower LOD can be obtained, and the analytical time reduced to 1.5 minutes.

Keywords Formaldehyde, glyphosate, high performance liquid chromatography, offline derivatization
(Received 14 July 2004; accepted 23 January 2005)