

## 高效液相色谱法测定渔业水域中百草枯和敌草快

覃东立, 吴松, 郑敏, 陈中祥, 赵吉伟, 牟振波\*  
(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

**摘要:** 利用固相萃取和液相色谱紫外检测建立了渔业水体中百草枯和敌草快的分析方法。水样经弱阳离子交换小柱 WCX 固相萃取, 采用具有亲水相互作用机理(HILIC)的色谱柱进行液相分离, 流动相中缓冲体系为甲酸-甲酸铵-三乙胺, 紫外检测波长: 百草枯 257 nm, 敌草快 308 nm。水中百草枯和敌草快在 0.1~50  $\mu\text{g/L}$  范围内具有良好线性, 百草枯和敌草快的检出限均为 0.05  $\mu\text{g/L}$ , 定量限均为 0.10  $\mu\text{g/L}$ 。在水样中分别添加 0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{g/L}$  三个水平, 百草枯和敌草快的加标回收率分别为 90.3%~97.6% 和 92.7%~103%, 相对标准偏差分别为 4.3%~8.5% 和 3.1%~11%。

**关键词:** 百草枯; 敌草快; 液相色谱; 渔业水域

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2013)02-054-04

百草枯(paraquat)和敌草快(diquat)属季胺盐类化合物,是目前使用较多的除草剂之一,在世界范围内使用量都较大。这两种化合物都属于高毒类,当其施用于农田后,经雨水冲刷进入水体,会对鱼类、藻类和其它水生生物造成毒害<sup>[1]</sup>。因此,有必要建立渔业水体中百草枯和敌草快的监测分析方法。

百草枯和敌草快均为碱性的阳离子有机化合物,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使用较多的分析方法<sup>[2~4]</sup>,孙红梅等<sup>[5]</sup>探索使用 KPF<sub>6</sub> 作为“离液试剂”,配合一根耐水性 >95% 水的反相柱,实验结果两组分离效果较好。朱震海等<sup>[6]</sup>利用该方法建立了水中百草枯和敌草快的检测方法。Waters 公司的 Yong 等<sup>[7]</sup>研制了一种具有亲水相互作用机理(HILIC)的色谱柱,专门用于离子化合物的分离,在未使用离子对试剂的情况下,加入甲酸铵,并用液相色谱-质谱法(LC/MS)分析了水样中的百草枯和敌草快溶液,效果较好,方法的定量下限低于 0.2  $\mu\text{g/L}$ ,且加标样品检测结果准确。王静等<sup>[8]</sup>在这一方法的基础上,采用液相色谱/紫

外法测定地表水中百草枯和敌草快,方法的基线分离度好,定量限达到 0.2  $\mu\text{g/L}$ 。本试验通过优化流动相组合和选择合适的色谱柱等措施,使检测方法的灵敏度明显提高。

## 1 试验部分

### 1.1 仪器设备

Waters Alliance 2695 分离单元,带柱温箱和自动进样系统; Waters 2487 双波长紫外检测器; 固相萃取装置(美国 Supelco 公司); 纯水仪(美国 Millipore 公司); N-EVAP<sup>TM</sup> 111 氮吹仪(美国 organomation 公司); PHS-3C 酸度计(上海雷磁仪器厂)。

### 1.2 材料和试剂

百草枯(paraquat)和敌草快(diquat)标准溶液(含量均为 100  $\mu\text{g/mL}$ ,农业部环境保护科研监测所); 弱阳离子交换小柱 WCX(60 mg, 3 mL); 乙腈、甲醇(色谱纯,美国 MERCK 公司); 甲酸铵(优级纯); 甲酸(色谱纯); 三乙胺(分析纯); 水:高纯水。

水样:用失活处理的玻璃瓶采集于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验基地,样品用

收稿日期:2012-09-06

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(201014)资助

E-mail: qdl978@163.com

4 °C 冰箱保存。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Waters HILIC (4.6 mm × 150 mm, 3 μm); 流动相: 乙腈 - 水相 [40:60 (V:V)]; 水相中含有 250 mmol/L 甲酸铵和 20 mmol/L 三乙胺, 用甲酸调节 pH = 3.8; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 百草枯 257 nm, 敌草快 308 nm; 进样量: 50 μL; 定量方法: 外标法(峰面积)。

### 1.4 样品处理

从采样瓶中移取水样 100 mL, 逐滴加入 1 mol/L pH 7 的磷酸铵缓冲液, 调节 pH 7。分别使用 2 mL 甲醇和 2 mL 水活化和平衡 WCX 固相萃取小柱。将 100 mL 经过处理的水样上至 WCX 固相萃取小柱。分别用 1 mL 水和 1 mL 甲醇淋洗小柱。用 4 mL 2% 甲酸的乙腈洗脱目标组分。45 °C 下氮吹浓缩至近 0.1 mL 左右, 加流动相定容至 0.5 mL, 过滤待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 的确定

参考文献 Raquel 等<sup>[9]</sup>所用的 pH 最低(pH = 2), Dionex 公司<sup>[10]</sup>实验的 pH 最高(pH = 5.2)。本文在这两个 pH 之间进行试验, 结果在 pH ≤ 4.0 时, 无论是保留时间的控制还是色谱峰的对称性均

达到理想状态。过低的 pH 不利于色谱柱的保护, 实验建议 pH 应选择 3.0 至 4.0 之间, 本文用 pH 3.8。

### 2.2 流动相中缓冲体系的确定

分析百草枯和敌草快常用的有甲酸、乙酸和磷酸缓冲体系, 这 3 种酸的 PKa 分别为 3.75、4.74 和 2.12。本实验拟控制 pH = 3.8, 能起作用的应为甲酸缓冲体系, 因此选用甲酸铵缓冲液, 使用甲酸调节溶液 pH。在使用甲酸 - 甲酸铵体系时, 两种组分的色谱峰均有一定程度的拖尾(图 1a)。本试验尝试在缓冲体系中添加三乙胺, 色谱峰的对称性明显改善, 基本消除了拖尾, 由于组分的峰展收窄, 相同浓度溶液的组分的响应值(峰高)也明显增强(图 1b)。百草枯和敌草快的阳离子易与残余硅羟基产生次级相互作用, 加入三乙胺可以起到屏蔽硅羟基的作用。实验比较了不同三乙胺浓度的影响, 其浓度从 10、20 增至 40 mmol/L, 结果在 20 mmol/L 时即达到理想效果。

使用三乙胺可以减少拖尾, 提高分析的灵敏度, 但三乙胺会与色谱柱发生反应, 从而降低色谱柱的柱效, 因此, 建议实验结束后用 10 倍柱体积的 0.1% HAc 溶液冲洗, 再用 20 倍柱体积的甲醇复生<sup>[11]</sup>。

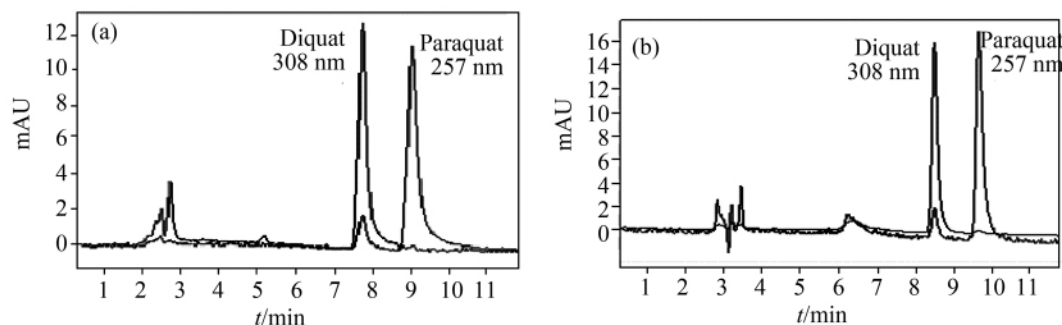


图 1 不同缓冲体系对百草枯和敌草快分离效果的影响

Fig. 1 Effect of buffer salts in mobile phase on HPLC separation of paraquat and diquat.

条件: Waters HILIC 柱 4.6 mm × 150 mm 3 μm 流动相: CH<sub>3</sub>CN / 水相 = 40/60(水相: 图 1a: 250 mmol/L HCOONH<sub>4</sub>, 图 1b: 250 mmol/L HCOONH<sub>4</sub> + 20 mmol/L (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N; pH = 3.8) 流量: 0.8 mL/min 检测波长: 百草枯 257 nm, 敌草快 308 nm 柱温: 30 °C 进样量: 50 μL (sample 5 μg/L)。

### 2.3 流动相中有机相组分的确定

用液相分离百草枯和敌草快时, 流动相中有机相比例的不同对两个组分的分离效果影响较大。

HILIC 色谱柱使用要求流动相中有机相比例

不得低于 40%。试验考察了流动相中含 40%、45% 和 50% 的有机相时组分的分离效果, 结果含 40% 有机相的流动相对组分的分离效果最好。试验还考察了含 40% 乙腈、10% 甲醇 + 30% 乙腈、20% 甲醇 + 20% 乙腈、30% 甲醇 + 10% 乙腈和

40% 甲醇的流动相对两组分的分离效果,结果含 40% 乙腈的分离效果较好。

#### 2.4 色谱柱的选择

在传统“离子对”模式下,通常选用的色谱柱为 C<sub>8</sub> 柱<sup>[2]</sup>和 C<sub>18</sub> 柱<sup>[4]</sup>。采用“离液试剂”分离模式,需要使用耐水性较高的色谱柱,如 Waters 的 XTERRA RP 柱<sup>[5]</sup>,Hamilton PRP 分析柱<sup>[6]</sup>等。近年来,以硅胶为基础的色谱柱在分离百草枯和敌草快时显示效果理想,如 Atlantis HILIC Silica 柱<sup>[7,8]</sup>,Phenomenex Spherclone 3 μm silica 柱<sup>[9]</sup>,Acclaim Trinity P1 柱<sup>[10]</sup>等。鉴于百草枯和敌草快这两种组分难以分离,在采用 HILIC Silica 色谱柱时,建议使用粒径较小的色谱柱以提高柱效,文献<sup>[8]</sup>报道在流动相中含有 40% 的乙腈时无法分离目标物,是因为选用了粒径较大的色谱柱(5 μm)。本文采

用 3 μm 的 HILIC 柱,在流动相中有机相的比例达 40% 时,分离效果良好(图 1)。

#### 2.5 方法的线性范围和检出限

在空白水样中添加 0.1、0.5、1.5、10、50 μg/L 的百草枯和敌草快,按 1.4 方法处理,1.3 条件检测,得到标准溶液浓度 ρ 与峰面积 A 之间的工作曲线。最低检出限以 3 倍信噪比计算,最低定量限以 10 倍信噪比计算。百草枯和敌草快的回归方程、相关系数、最低检出限和定量限见表 1。

#### 2.6 水样加标回收试验

取 3 份水样各 1000 mL,分别加入 0.1、1.0 和 5.0 μg 混合标准溶液,相当于加标浓度分为 0.1、1.0 和 5.0 μg/L。按 1.4 方法处理,1.3 条件检测,每份样品平行测定 6 次,计算加标回收率和精密度,结果见表 2。

表 1 标准曲线的回归方程和检出限

Tab. 1 Linear relationships and detection limits of 2 herbicides

	回归方程	相关系数(r)	检出限 ρ/(μg/L)	定量限 ρ/(μg/L)
百草枯/PQ	$A = 46199\rho - 1693.0$	0.998	0.05	0.10
敌草快/DQ	$A = 40608\rho - 1698.2$	0.999	0.05	0.10

表 2 百草枯、敌草快回收率及精密度测定(n=6)

Tab. 2 Recoveries and relative standard deviations of 2 herbicides (n=6)

	本底 ρ/(μg/L)	加标浓度 ρ/(μg/L)	测定值 ρ/(μg/L)	回收率 /%	精密度 /%
百草枯	ND	0.1	0.09	90.3	8.5
	ND	1.0	0.95	94.9	7.1
	ND	5.0	4.88	97.6	4.3
敌草快	ND	0.1	0.10	103.0	11
	ND	1.0	0.93	92.7	6.6
	ND	5.0	4.74	94.8	3.1

#### 参考文献

- [1] Vince Y Taguchi, Steve W D, Jenkins Patrick W, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 1998, 9(8): 830
- [2] Determination of Diquat and Paraquat in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection; U. S. EPA Method 549.2, Revision 1.0; U. S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, 1997
- [3] 王端花, 苏少明, 秦光明, 等. 法医学杂志, 2005, 21(2): 121
- [4] Ito M, Hori Y, Fujisawa M, et al. Biol Pharm Bull, 2005, 28, 725
- [5] 李红梅, 孙守威, 史谢飞. 分析化学, 2007, 35(10): 1499
- [6] 朱震海, 宣栋梁. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(9): 2154
- [7] Michael S, Young, Kevin M. Jenklms. 环境化学, 2004, 23(6): 722
- [8] 王静, 刘铮铮. 中国环境监测, 2011, 27(4): 50
- [9] Raquel R O, Beatriz C G, Concepcion P L, et al. J Chromatogr Sci, 2006, 44, 539
- [10] Dionex Corporation. Sensitive On-Line SPE - HPLC

Determination of Paraquat and Diquat in Drinking and  
Environmental Waters. Application Note 274 , LPN

2726 , 2011 , Sunnyvale , CA

[11] 苏 坦. 中国中医药资讯 , 2010 , 2( 1 ) : 109

### **Determination of paraquat and diquat in fishery waters by high-performance liquid chromatography**

*QIN Dong-li , WU Song , ZHENG Min , CHEN Zhong-xiang , ZHAO Ji-wei and MOU Zhen-bo* \* ( Heilongjiang River Fishery Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences , Harbin 150070 ) , Fenxi Shiyanshi , 2013 32( 02 ) : 54 ~ 57

**Abstract:** An analysis method for simultaneous determination of paraquat and diquat in fishery waters has been developed based on solid-phase extraction ( on weak cation exchange cartridges ) and high-performance liquid chromatography ( HPLC ) in combination with an UV detector. In this study , the hydrophilic interaction liquid chromatographic ( HILIC ) column was used for the separation in absence of an ion-pairing reagent. The results showed that paraquat and diquat had good linear relationship with the concentration ranging from 0. 1 to 50  $\mu\text{g/L}$  , the recoveries percentage of paraquat and diquat from environmental water ( 100 mL in all cases ) , spiked at levels between 0. 1 , 1. 0 , and 5. 0  $\mu\text{g/L}$  , ranged from 90. 3% to 103% . Relative standard deviation were between 3. 1% and 11. 2% . The quantitation and detection limits were 100 and 50 ng/L for paraquat and diquat , respectively. This method is considered to be a promising approach for quality control laboratories in environmental monitoring station.

**Keywords:** Paraquat; Diquat; High-performance liquid chromatography; Fishery waters