

提高百草枯和敌草快的分离度：使用CORTECS UPLC HILIC色谱柱进行饮用水分析

Jeremy C. Shia、Masayo Yabu、Kim Van Tran和Michael S. Young
 沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 与现有HILIC方法相比，大大改善了百草枯和敌草快的保留性能和分离度。
- CORTECS™ UPLC® HILIC色谱柱可以在百草枯和敌草快之间实现基线分离，允许MS和UV检测使用相同的色谱参数。

简介

敌草快和百草枯是带双电荷的季胺盐类除草剂(图1)。它们在世界范围内被广泛用于控制农作物和水生杂草。美国环保署(EPA)规定的饮用水中最高污染物水平(MCL)为20 µg/L (20 ppb)。百草枯被EPA列为限用农药。为了保证饮用水质量，欧盟(EU)委员会规定单一除草剂的下限为0.1 µg/L (100 ppt)¹。2007年继瑞典当局裁定一项法案之后，欧盟也禁止再继续使用百草枯。敌草快和百草枯的极性都很强，难以在C₁₈色谱柱上使用反相液相色谱法保留。大多数已发表的方法，包括美国EPA方法549.2，都需要往流动相中添加己烷磺酸钠盐等离子对试剂，才能在这两种季胺盐分析物中实现所需的保留时间和分离度。为了满足欧盟等国家和机构规定的极低的定量要求，质谱(MS)成为了必要的检测手段，然而离子对试剂的使用会对MS检测产生显著的离子抑制作用。作为一种替代技术，亲水性相互作用色谱(HILIC)与离子对色谱相比具有一定优势。由于无需添加离子对试剂，MS离子化效率得到提高。其次，提取液中有有机溶剂含量通常很高，可以不经含有离子对试剂的水相流动相稀释直接进入色谱柱中。本应用纪要中演示了使用CORTECS UPLC HILIC色谱柱进行UPLC分离能够显著改善两种分析物的保留时间和分离度，使得仅用UV一种检测方法就能实现最低500ppt的检测。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class 系统

ACQUITY® TQD 质谱仪

CORTECS UPLC HILIC 色谱柱

Oasis® WCX 小柱

关键词

敌草快，百草枯，UPLC/MS/MS，
 UPLC/UV，SPE，饮用水，HILIC，
 CORTECS

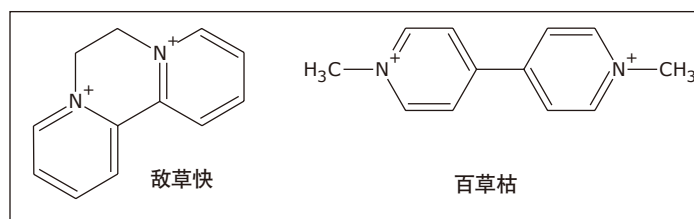


图1. 敌草快和百草枯的结构式。

实验

样品描述

首先，将自来水用硫代硫酸钠进行脱氯处理。加入磷酸铵，将所有样品的pH值调整至7左右。然后，将样品加载到Oasis WCX小柱上。通过蒸发和浓缩减小SPE洗脱液的体积，实现样品富集。详细的SPE步骤如图2所示。

UPLC条件

- 系统：

配有光电二极管阵列(PDA)检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统
- 色谱柱：

CORTECS UPLC HILIC 1.6 μm, 2.1 x 100 mm
([部件号186007106](#))
- 流动相(等度)：

50:50 A/B
- 流动相A：

200 mM甲酸铵缓冲液，pH 3.7
- 流动相B：

乙腈
- 进样体积：

20 μL
- 柱温：

30 °C
- Wash溶剂：

乙腈/水(50:50)
- Purge溶剂：

乙腈/水(50:50)
- 流速：

0.5 mL/min
- PDA 检测条件：

敌草快为UV 308 nm，百草枯为UV 257 nm
- 样品瓶：

聚丙烯自动进样器样品瓶
([部件号186002642](#))

表1总结了本次研究中使用的MRM通道和LC/MS参数。

化合物	MRM	锥孔电压	CID (eV)
敌草快	183.1 > 157.1	50	25
	183.1 > 130.1	50	30
百草枯	185.1 > 170.1	38	22
	171.1 > 77.0	45	40

表1. UPLC/MS/MS分析敌草快和百草枯所用的MRM通道。

试剂

1. pH调节浓缓冲液(400mM磷酸盐缓冲液，pH 7)
准确称量23 g磷酸二氢铵，加入500 mL容量瓶中。加入水(Milli-Q或同等试剂)使之完全溶解，然后稀释至约400 mL。加入氢氧化铵溶液调节pH值至7.2。用水稀释至标线。
2. SPE活化和清洗溶液(10 mM pH 7磷酸盐缓冲液)
取10 mL上述400 mM pH 7浓缩缓冲液，用水稀释至400 mL。
3. SPE 洗脱液(10:90甲酸/乙腈)
将50 mL甲酸加入450 mL乙腈中并充分混合。

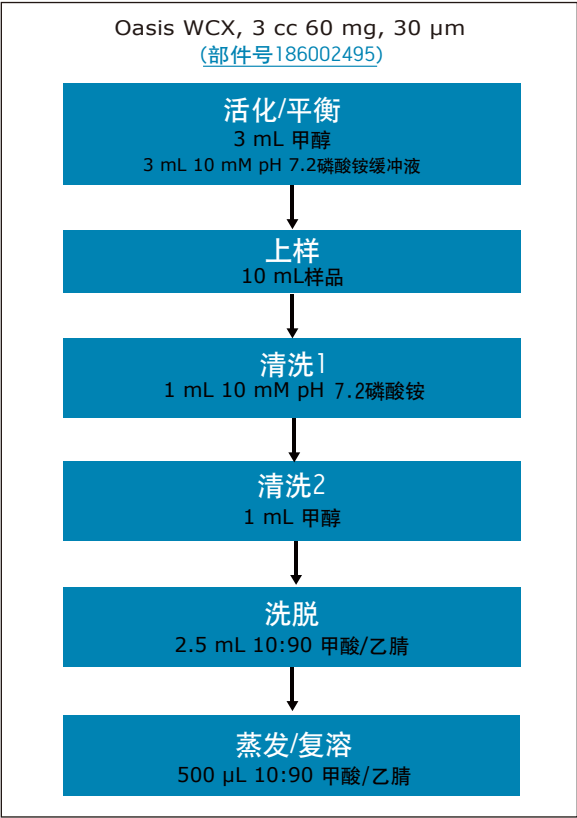


图2. 用于分析敌草快/百草枯的Oasis WCX小柱流程。

MS条件

质谱仪:	ACQUITY TQD
电离模式:	电喷雾正离子
源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	350 °C
脱溶剂气流速:	800 L/h
锥孔气流速:	30 L/h
碰撞气流速:	0.20 mL/min
数据管理:	MassLynx®软件

样品制备

注: 样品收集和所有样品制备步骤均应使用聚丙烯容器。建议使用聚丙烯自动进样器样品瓶(部件号186002642)进行UPLC分析。

1. 样品预处理

将10 mL样品移至适当的聚丙烯容器中(本实验中使用的是15 mL离心管)。如果样品已经氯化, 加入20 mg/mL硫代硫酸钠50 µL并充分混合。向所有样品加入400 mM pH 7磷酸盐缓冲液25 µL以调整pH值。

2. SPE富集和净化

用Oasis WCX小柱进行SPE富集和净化(有关SPE详情, 请参见图2)。在每个小柱上连接一个30 cc聚丙烯储液瓶(部件号WAT011390)用来加载10 mL样品。

结果与讨论

在此前的一篇出版物中²，使用ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱对饮用水中的敌草快和百草枯进行了分析。该方法使用MS检测，灵敏度很高，LOQ值为40 ng/L。然而使用UV做检测器时敌草快和百草枯无法达到基线分离(图3A)。当CORTECS UPLC HILIC色谱柱使用相同的仪器参数时，两种化合物的保留性能和分离度均有提高(图3B)。因此，使用CORTECS UPLC HILIC色谱柱不仅可以使使用MS检测，也可以使用UV检测。为了优化峰形和分析时间，将流动相A中甲酸铵缓冲液的最终浓度从150 mM提高至200 mM，并将流动相组成由40:60 A/B调整为50:50 A/B。

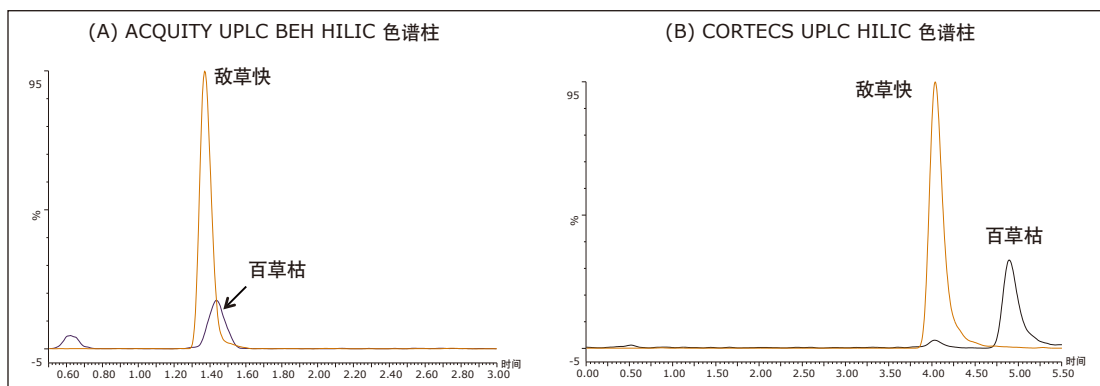


图3. UPLC/MS/MS (TQD) 叠加色谱图: (A) ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm色谱柱, (B) CORTECS UPLC HILIC 1.6 μm , 2.1 \times 100 mm色谱柱。色谱条件相同: 40:60 A/B等度, A: 150 mM甲酸铵缓冲液(pH 3.7), B: 乙腈, 流速0.5 mL/min, 柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

图4所示为自来水样品加标500 ng/L敌草快和百草枯的典型UPLC/UV色谱图。UPLC结合串联MS技术的灵敏度远高于UV检测，因此可以检测的浓度达到50 ng/L。图5显示了自来水样品加标50 ng/L敌草快和百草枯的典型UPLC/MS/MS色谱图。表2和3分别显示了加标500 ng/L和50 ng/L的水样重复分析的回收率数据。MS检测和UV检测的典型基质匹配校准曲线均为线性。MS检测校准标准为25到2000 ng/L，UV检测则为100到5000 ng/L。校准曲线如图6(UV)和图7(MS/MS)所示。

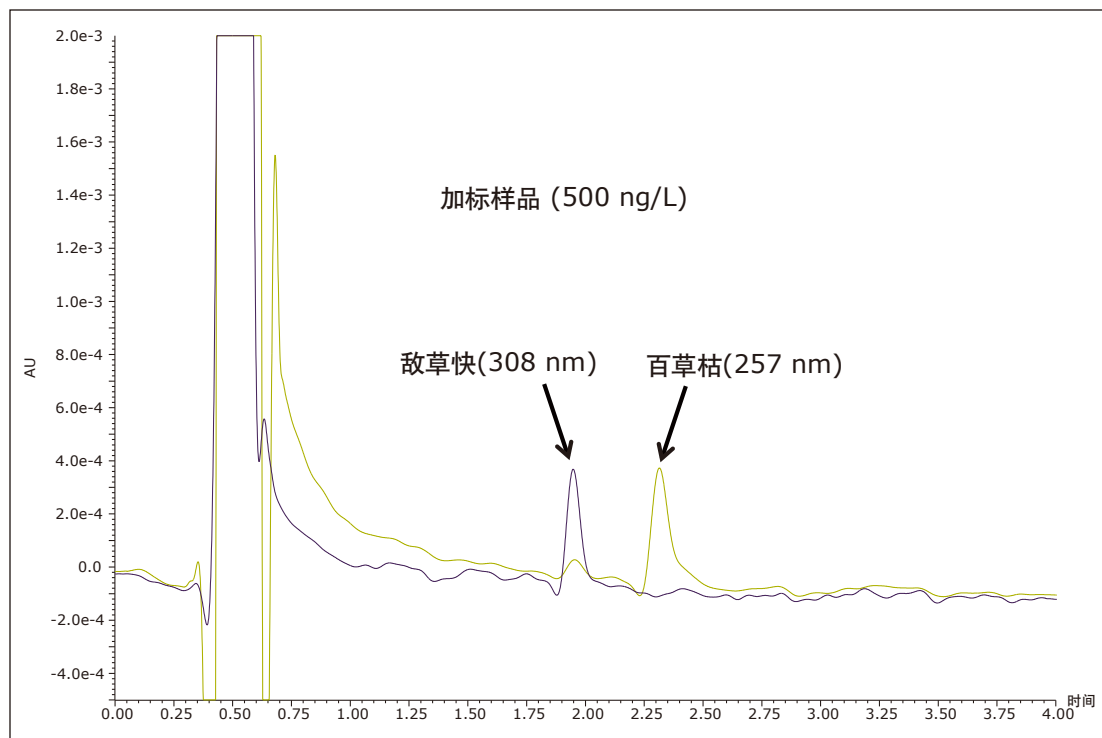


图4. 自来水样品加标500 ng/L敌草快和百草枯的典型UPLC/UV色谱图。

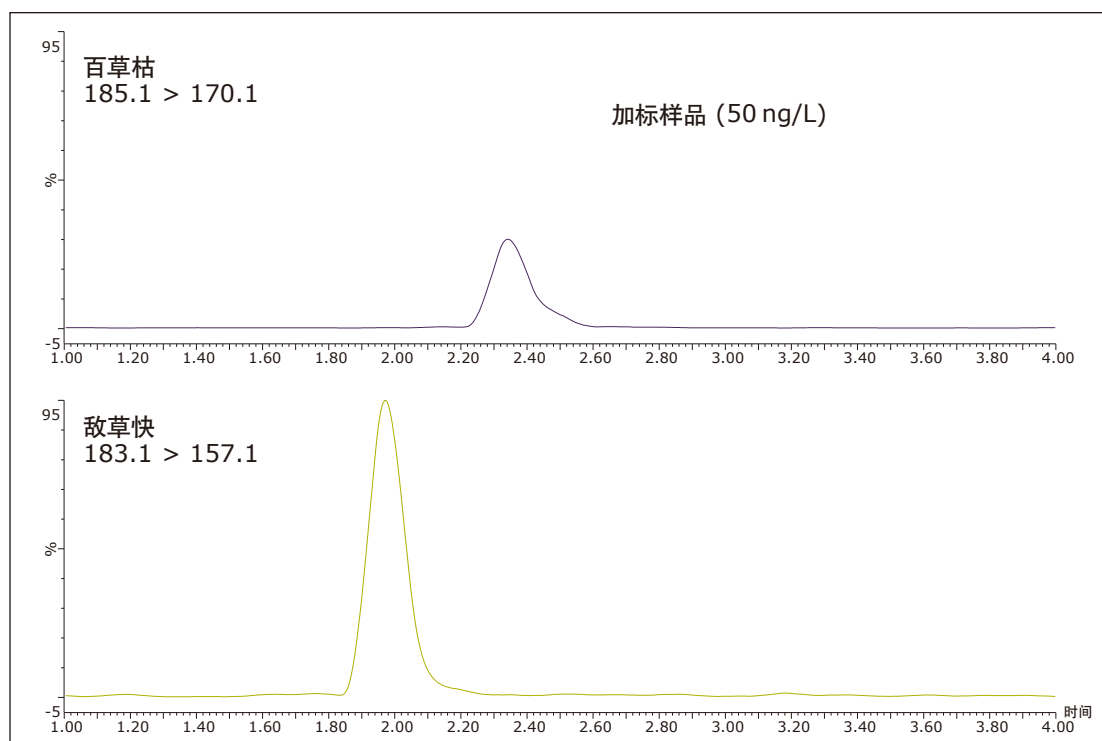


图5. 自来水样品加标50 ng/L敌草快和百草枯的典型UPLC/MS/MS色谱图。

检测条件	敌草快回收率 (%RSD)	百草枯回收率 (%RSD)
UV	74 (5)	90 (9)
MS	76 (2)	100 (3)

表2. 自来水加标500 ng/L敌草快/百草枯回收率数据(n=7)。

检测条件	敌草快回收率 (%RSD)	百草枯回收率 (%RSD)
MS	77 (6)	109 (7)

表3. 自来水加标50 ng/L敌草快/百草枯回收率数据(n=7)。

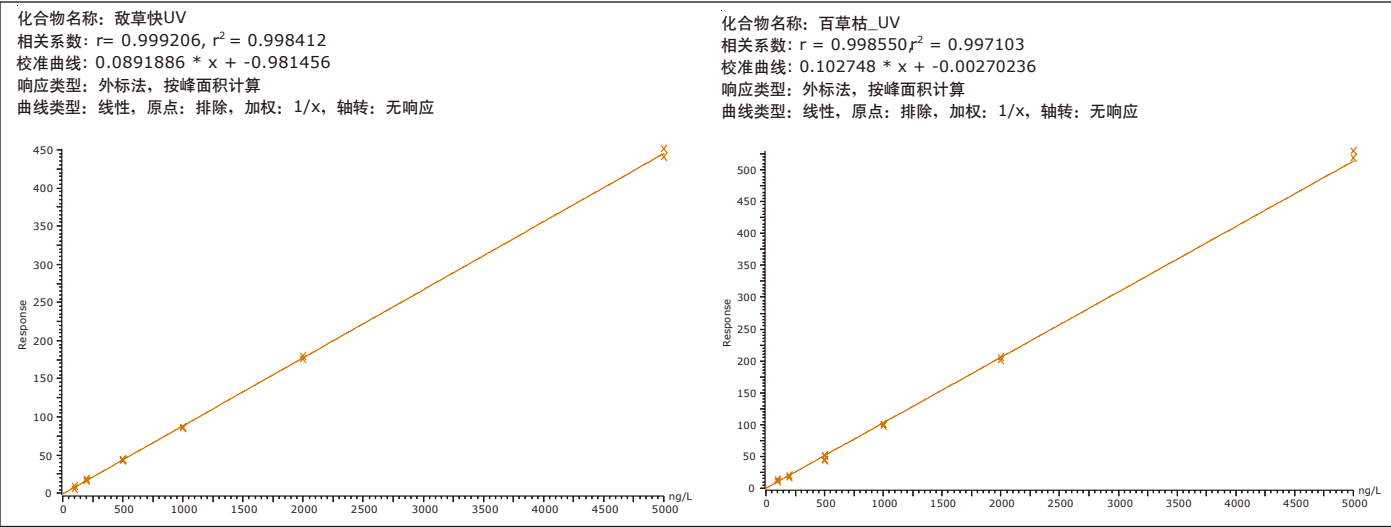


图6. 敌草快(左)和百草枯(右)的典型UPLC/UV校准曲线。

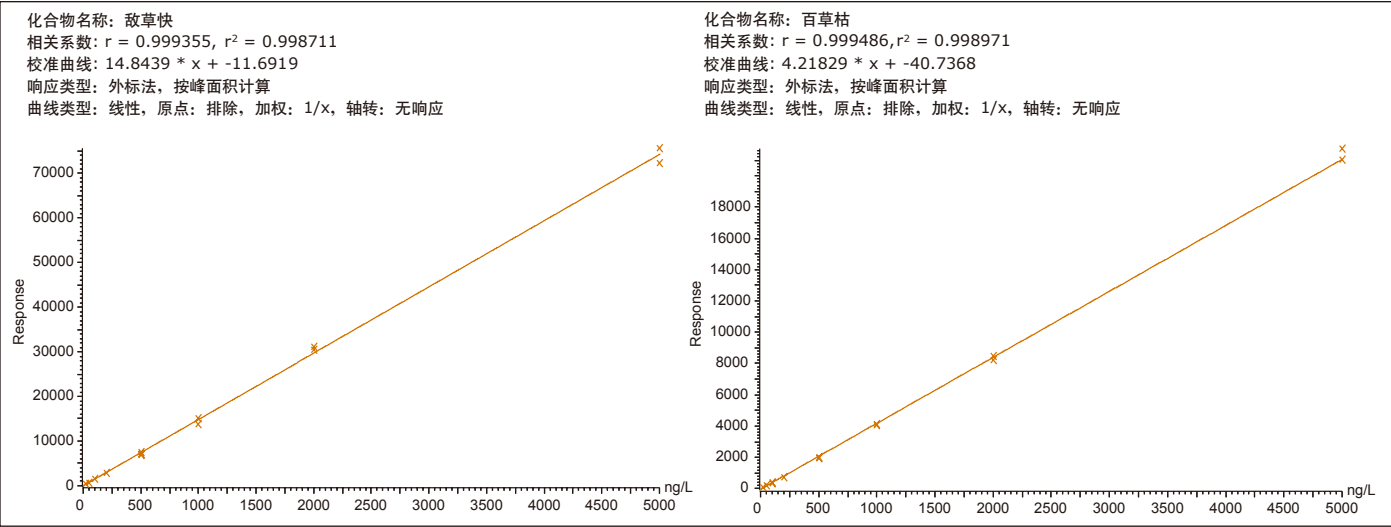


图7. 敌草快(左)和百草枯(右)的典型UPLC/MS/MS校准曲线。

UV检测方法的性能

按照US EPA 方法549.2中定义的方法检测限 (MDL)，利用以下公式评估方法性能：

$$MDL = S \cdot t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$$

其中：

$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ = 置信度为99%且自由度为n-1时的t检验值

n = 重复次数 (7)

S = 重复分析的标准偏差

表4汇总了自来水样品加标500 ng/L的UV分析回收率数据计算得到的MDL结果。

该方法性能等于或优于EPA方法549.2。

化合物	重复次数 (n)	浓度标准偏差 (ng/L)	t 值 (自由度为6)	MDL (µg/L)	方法549.2 中的MDL
敌草快	7	19.4	3.143	0.06	0.72
百草枯	7	40.4	3.143	0.13	0.68

表4. 自来水加标500 ng/L的MDL结果汇总。

结论

借助CORTECS UPLC HILIC色谱柱优异的保留性能和分离能力，敌草快和百草枯的色谱峰实现了基线分离。这使得串联MS或UV可以使用相同的色谱参数进行检测。通过UPLC与串联MS的结合，使方法的灵敏度足以满足当两种化合物浓度仅为0.1 µg/L时的严格灵敏度需求。仅使用UV检测器的方法所表现出的性能优于EPA方法549.2。

参考文献

1. Official Journal of the European Communities: Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption (November 1998).
2. Van Tran K, Shia JC, Young MS. Fast and Sensitive UPLC/MS(MS) Determination of Diquat and Paraquat in Drinking Water. Waters Application Note 720004220en. 2012 January.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®



Waters、ACQUITY UPLC、Oasis、ACQUITY、UPLC、MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。CORTECS是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

© 2013 年沃特世公司。印制于中国
2013 年 6 月 720004732ZH AG-PDF

沃特世科技(上海)有限公司
北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 6555
成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com