应用简报

食品检测与农业

使用柱前在线自动衍生-反相色谱法测定精草铵膦原药中 L-草铵膦的质量分数和比例

作者

杨新磊
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

利用自动进样器的可编程功能，先将精草铵膦原药与衍生试剂在自动进样针内完成衍生，再进入反相色谱柱进行分离检测。D-草铵膦和 L-草铵膦在 2.5–250 µg/mL 范围内线性良好，2.5 µg/mL 下 D-草铵膦和 L-草铵膦的信噪比分别为 65 和 60。自动化程序保证了方法的稳定性和便捷性，同时可以大幅提高样品检测通量。

前言

草铵膦作为一种广谱除草剂，其市场规模相比于草甘膦要小很多。然而，随着抗草甘膦杂草的增加以及百草枯的禁用，草铵膦将获得巨大的应用前景和发展空间[1]。目前市售草铵膦多为外消旋体，含有 L 型和 D 型两种构型，其中 L 型为真正具有除草活性的构型。因此，在草铵膦的生产和施用过程中，会因 D 型的存在而导致产能消耗和环境污染。近年来，国内多家农药企业相继宣称突破了精草铵膦生产的技术壁垒，可实现万吨级生产规模，由此必将极大推动精草铵膦市场的发展。

精草铵膦原药和制剂的质量控制指标一般包含精草铵膦的质量分数、L-草铵膦比例、pH 值范围和水不溶物等。其中精草铵膦的质量分数主要通过阴离子交换-高效液相色谱法测定，而 L-草铵膦比例的测定方法则比较多，包括手性色谱柱直接测定法[2-4]、柱前离线衍生-反相色谱法等[5-6]。其中，采用冠醚手性色谱柱的直接测定法比较简单，但色谱柱成本相对较高且流动相需要用到高氯酸；柱前衍生法，在衍生后采用常规反相柱即可，但手动衍生操作不利于样品的连续分析，样品通量有限。

本方法参考氨基酸自动衍生方案[7-8]，利用自动进样器使草铵膦外消旋体与邻苯二甲醛 (OPA) 和 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 反应生成一对非对映异构体（L-草铵膦衍生物和 D-草铵膦衍生物），然后利用反相 C18 色谱完成分离。衍生化机理如图 1 所示。

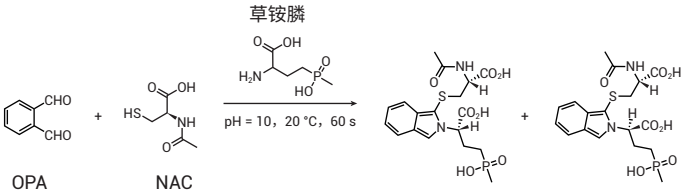


图 1. 草铵膦衍生反应机理

实验部分

试剂和样品

甲醇、乙腈和无水乙醇为色谱纯，购自默克；去离子水为 MilliQ 纯水机新制；5 mol/L 醋酸铵溶液购自 Sigma-Aldrich；醋酸、磷酸和三乙胺为色谱纯，购自迪马公司；邻苯二甲醛 (OPA) 和 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 购自 TCI。草铵膦标样和精草铵膦原药由客户提供。0.4 mol/L 硼酸缓冲液来自安捷伦（部件号 5061-3339）。

仪器和设备

实验使用 Agilent 1260 Infinity II 二元液相色谱系统，该系统包含以下组件：1260 二元泵（部件号 G7112B）、1260 自动进样器（部件号 G7129A）、1260 柱温箱（部件号 G7116A）和 1260 紫外检测器（部件号 G7114A）。所用色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm（部件号：695975-902），软件为 Agilent Openlab CDS 2.4。

衍生化试剂、标准品溶液和样品溶液准备

分别称取 10 mg OPA 和 12 mg NAC 用 1 mL 无水乙醇溶解后，再加入 4 mL 0.4 mol/L 硼酸缓冲盐，摇匀后作为衍生试剂溶液，保存于 4 °C 的冰箱中，使用周期为 7 天。取 1 mL 磷酸用水稀释到 100 mL 作为衍生反应终止和稀释液，保存于 4 °C 的冰箱中待用。

准确称取 100.0 mg 草铵膦标样用水溶解并定容至 100 mL，将此溶液作为 L-草铵膦 (500 µg/mL) 和 D-草铵膦 (500 µg/mL) 混合储备液，保存于 4 °C 的冰箱，待用。将此混合储备液用水依次稀释成 250、100、50、10、2.5 µg/mL 标准工作溶液，用于绘制 L-草铵膦和 D-草铵膦的标准曲线。准确称取 25.0 mg 精草铵膦原药用水溶解并定容至 100 mL，得到 250 µg/mL 精草铵膦样品溶液，待用。

自动进样器方法

自动进样器在线衍生程序见表 1。其中，位置 P2-F2 为衍生试剂溶液，位置 P2-F3 为 0.1% 磷酸溶液。

表 1. 自动进样器衍生程序

功能/动作	参数
吸取	吸取 2 µL 衍生试剂溶液 (P2-F2)，默认速度
清洗	清洗口，3 秒
吸取	吸取样品，默认体积，默认速度
清洗	清洗口，3 秒
吸取	吸取 1 µL 衍生试剂溶液 (P2-F2)，默认速度
混合	在空气中混合 3 µL，10 次，默认速度
等待	1 分钟
吸取	吸取 4 µL 稀释剂 (P2-F3)，默认速度
混合	在空气中混合 10 µL，8 次，默认速度
清洗	清洗口，3 秒
进样	进样

液相色谱方法

色谱柱：Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm

柱温：35 °C

流动相 A：50 mmol/L 醋酸铵溶液（含 0.1% 三乙胺），用醋酸将 pH 调节至 5.5

流动相 B：甲醇

流速：1 mL /min

梯度程序：

时间 (min)	B (%)
0	8
6	15
6.5	90
10	90
10.1	8
12	8

进样量：1 µL

检测波长：338 nm，10 Hz

结果与讨论

流动相的选择

流动相（尤其是水相）的选择对于可离子化的化合物分离和保留至关重要。本实验需要分离的是一组非对映异构体，分离难度较大，因此考察了不同流动相 pH 以及缓冲盐种类对分离的影响。考察了 4 种不同流动相，分别是：50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 2.5)、50 mmol/L醋酸铵 (pH 4.5)、50 mmol/L 醋酸铵 (pH 5.5) 和 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 6.5)。结果如图 2 所示。从中可以看出，随着 pH 的增加，草铵膦衍生产物的保留越来越弱；异构体的分离也发生较大变化，pH 2.5 时异构体没有分离迹象，pH 5.5 时分离度最高，pH 6.5 时分离度又开始下降。为进一步改善衍生产物的拖尾问题，最终选择的流动相为 50 mmol/L 醋酸铵溶液，并添加 0.1% 三乙胺后再用醋酸将 pH 调节至 5.5。

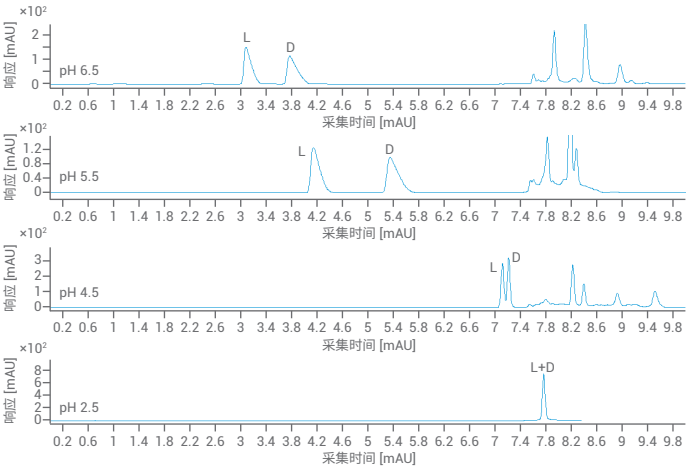


图 2. 不同 pH 下草铵膦衍生产物的分离

衍生时间的选择

衍生试剂 (OPA/NAC) 与草铵膦反应的充分程度不仅影响色谱分析的重现性，而且影响衍生产物的检测限。为保证衍生反应完全，考察了不同衍生时间对峰面积的影响。如表 1 所示，可以通过等待 (Wait) 时间来改变衍生时间。本研究分别考察了 1、3、5、7 和 10 分钟的等待时间。结果得到的草铵膦衍生产物的峰面积变化波动小于 1%，据此认为在 1 分钟的等待时间内，草铵膦已经完成与衍生试剂的反应。因此，本方法最终选择的等待时间为 1 分钟。

典型色谱图

通过上述优化后的方法，检测草铵膦标准溶液（L-草铵膦和 D-草铵膦标准混合液），得到草铵膦典型色谱图如图 3 所示，可以看出 L-草铵膦和 D-草铵膦得到了完全分离。

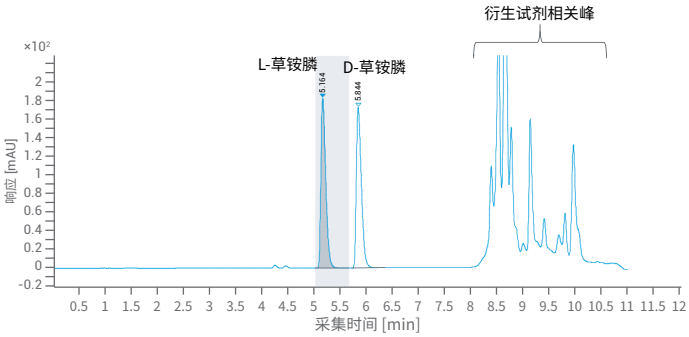


图 3. 草铵膦典型色谱图

分离度、重现性、线性范围、检测限和定量限

按实验部分所述的液相色谱方法，取 50 μg/mL 标准工作溶液连续分析 6 次。结果如表 2 显示，方法重现性良好，L-草铵膦和 D-草铵膦的保留时间相对标准偏差均小于 0.1%，峰面积相对标准偏差均小于 1.37%。以 L-草铵膦与 D-草铵膦的峰面积比例计算，则相对标准偏差为 0.34% (n = 6)。本实验L-草铵膦和 D-草铵膦分离度可达 3.9，与文献报道[3] 的手性柱分离度（Rs：4）相当。

表 2. 50 μg/mL 标准工作溶液连续分析 6 次结果

进样次数	L-草铵膦		D-草铵膦		L/D 峰面积比
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	
1	5.232	85.981	5.917	82.002	1.05
2	5.233	87.981	5.918	83.698	1.05
3	5.238	85.520	5.923	80.830	1.06
4	5.241	88.123	5.926	83.844	1.05
5	5.237	86.973	5.922	82.957	1.05
6	5.246	86.575	5.932	82.422	1.05
RSD%	0.10	1.21	0.09	1.37	0.34

按浓度由低至高的顺序，进样分析标准工作溶液，且每个浓度点进样分析 2 次。得到 L-草铵膦在 2.5–500 μg/mL 范围内的线性回归方程为 Y = 1.6966X + 1.2405，相关系数为 R^2 = 0.9999；D-草铵膦在 2.5–500 μg/mL 范围内的线性回归方程为 Y = 1.6541X + 0.2883，相关系数为 R^2 = 0.9999（见图 4）。在 2.5 μg/mL 时，L-草铵膦的信噪比为 66，按信噪比 S/N = 3 计算出检测限为 0.125 μg/mL；按信噪比 S/N = 10 计算出定量限为 0.42 μg/mL。与手性直接测定法相比，本实验开发方法检测限和定量限低了约 50 倍。

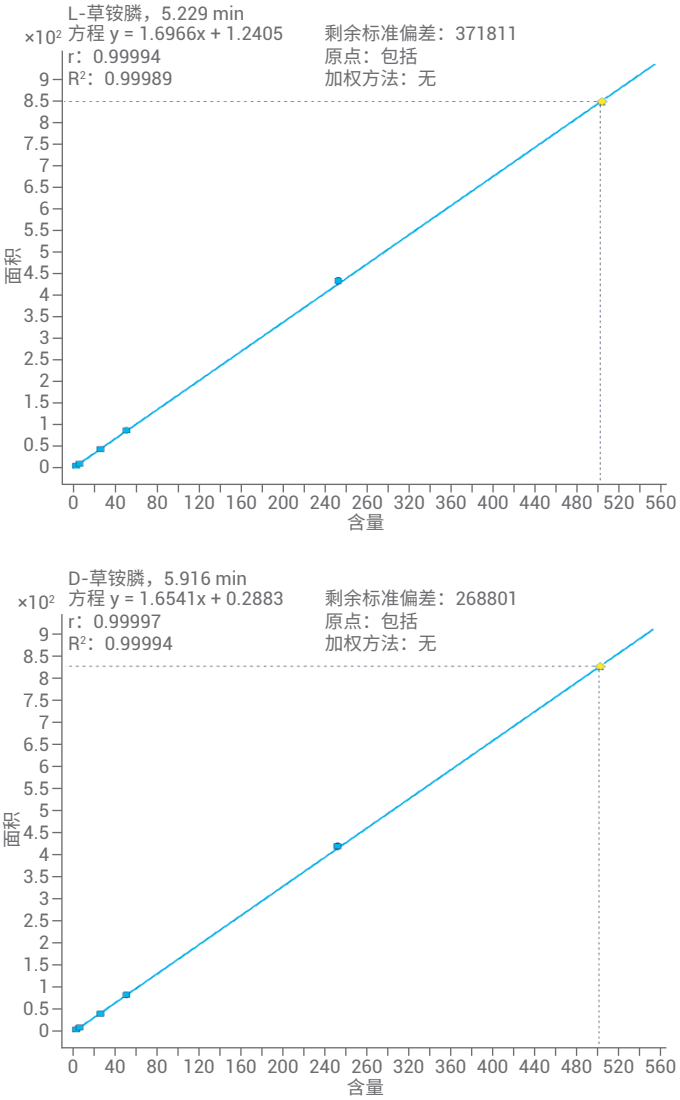


图 4. L-草铵膦和 D-草铵膦的线性拟合曲线

样品分析

按样品溶液配制方法，分别称取 6 份精草铵膦原药样品进行测定，根据 L-草铵膦线性回归方程计算精草铵膦的质量分数，并以 L-草铵膦和 D-草铵膦峰面积计算 L-草铵膦占整个草铵膦对映体的百分含量，结果如表 3 所示。

表 3. 精草铵膦原药中 L-草铵膦的质量分数及百分含量

进样	质量分数 (%)	L 型比例 (%)
1	90.1	91.8
2	90.3	92.0
3	90.8	92.3
4	91.1	91.9
5	90.4	92.0
6	91.3	91.9
平均值	90.7	92.0
RSD (%)	0.5	0.2

结论

本研究利用自动进样器将草铵膦衍生后进样分析，完成对精草铵膦原药中 L-草铵膦的质量分数以及 L-草铵膦占整个草铵膦对映体的百分含量的测定。相比于手动衍生方法，自动进样器自动衍生方式可以准确地控制吸样量、混合速度和次数，衍生反应时间等参数，从而保证方法的稳定性以及高通量分析的可行性。从标样和样品的分析结果看，可以保证本文衍生方法峰面积重现性低于 1.5% (n = 6)，保留时间重现性低于 0.1% (n = 6)。另一方面，衍生后的草铵膦具有很强的紫外吸收官能团，因此与手性分析直接测定相比，可以达到更低的检测限和定量限。同时，草铵膦衍生产物的极性减小，可以利用常规反相 C18 色谱柱进行保留和分离，使用成本也较手性柱有所降低。

参考文献

1. 董文凯，柴洪伟，解银萍等. 化学法合成精草铵膦的研究进展. 现代农药, 2016, 15(5): 26-29

2. 张寒，肖鸣，徐永等. 精草铵膦原药高效液相色谱分析方法研究. 现代农药, 2017, 16(2): 32-33

3. 王贤书，张钰萍. 手性冠醚柱固定相直接拆分草铵膦对映异构体. 农药, 2015, 54(9): 638-641

4. Guifei Jia, Jin Xu, Xiaofang Long, et al. Enantioselective Degradation and Chiral Stability of Glufosinate in Soil and Water Samples and Formation of 3-Methylphosphinicopropionic Acid and N-Acetyl-glufosinate Metabolites. J. Arg. Food Chem, 2019, 67(41): 11312-11321

5. 徐建妙，徐永鑫，郑裕国等. 柱前手性衍生花-RP-HPLC 法拆分 D, L-草铵膦. 农药, 2013, 52(3): 195-201

6. Yasushi Hori, Manami Fujisawa, Kenji Shimad. Enantioselective analysis of glufosinate using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. J Chroma B, 776(2): 191-198

7. Hiroki Kumagai. Automated Precolumn Derivatization for the Enantioseparation of Amino Acids Using the Agilent 1290 Infinity II LC（使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统对氨基酸进行自动化柱前衍生以实现对映体分离）. 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-8329EN, 2017

8. 陆予菲. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱分析在线衍生氨基酸. 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-6572ZHCN, 2017

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

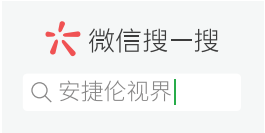
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021

2021 年 1 月 7 日，中国出版
5994-2959ZHCN

Agilent
Trusted Answers