

分类号 : O657.7+2
密级 : 秘密

学校代码 : 10426
学号 : 2010052023

青岛科技大学

硕士学位论文

论文题目: 磷酸(盐)类农药离子对
探针筛选与分析方法开发

姓名 : 张 晖
指导教师 : 范志先
学科专业 : 分析化学
专业代码 : 070302
研究方向 : 色谱分析

二〇一三年六月六日

磷酸（盐）类农药离子对探针筛选与分析方法开发

学位论文完成日期： 2013-06-06

指导教师签字： _____

答辩委员会成员签字： _____

前言

现代色谱分析技术已日臻完善，但是对于一些重要的非共轭体系离子型化合物的直接分析，无论从经济性，还是技术上都有一定难度，譬如典型的磷酸（盐）类农药品种，草甘膦、三乙磷酸铝、乙烯利等。这类化合物虽然都已经建立了标准化的或非标准化的定量分析方法，但是随着科学技术的进步，还应当适时创立新的分析理论，采用新技术，开发出用于分析此类化合物的新分析方法。

上世纪 90 年代，本实验室的研究人员开始了磷酸（盐）类代表性农药品种三乙磷酸铝的 HS-GC-FID 定量分析工作，在《色谱》上发表的方法被同行用于烟草中残留量的测定。近些年来，又发表了离子交换色谱法、离子对反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法。这些方法虽然较好的解决了一些问题，但是仍然觉得对过去报道的分析方法并不十分满意，期待着用当今最成熟的高效液相色谱紫外检测器分析技术解决磷酸（盐）类农药有效成分和杂质分离、分析的问题。历经二十多年不懈地努力，通过痛苦甚至绝望的离子对探针的筛选艰辛历程，功夫不负有心人，似是偶遇二苯胍，将其作为离子对探针试剂，同时也得益于液相色谱柱技术的进步，这个梦想今天终于变成实现。磷酸（盐）类农药离子对探针分析方法之所以研究开发成功，主要是得益于 RP 液相色谱柱的商品化，对固定相“三层”作用机理的正确阐释，以及饱和一元羧酸所起作用的新认识。

早期的 IPC 方法存在着许多不足，主要是受到色谱柱填料的影响，基于双电层，定量重现性差。本文开发的用于磷酸（盐）类化合物分析的全新 IPC_{na} 方法，目前已应用到某化工厂用于监测、检测阻燃剂单体磷酸盐类化合物的合成。筛选出的磷酸（盐）类化合物离子对探针紫外试剂二苯胍与间接光度色谱法的开发，使用高效液相色谱仪配以紫外检测器开展检测工作，技术成熟，对设备要求不高；流动相选用的介质（一般 100 % 纯水）普通易得，安全环保，可行性高；操作过程较为简单方便，适用性好；分析准确快速、工效高，对产品质量评价科学可靠。

基于纳克有机合成的柱上亲核加成间接光度色谱法，将会给非共轭阴离子型化合物检测翻开崭新的一页。对于阳离子型化合物相同机理的检测方法开发本文也具有重要的借鉴意义。本文以新型反相色谱柱为反应器，前瞻性、引导性的研究工作社会效益将十分显著，另外需要指出的是将纳克有机合成与分析技术融为一体的科学研究思路，以 RP 制备柱获得微克级，乃至克级新化合物，意义重大，用途广泛，价值难以估量。

磷酸（盐）类农药离子对筛选与分析方法开发

摘要

随着 RP 液相色谱柱颗粒技术的进步，基于纳克有机合成与分析同步一体化技术，用于非共轭有机阴离子型化合物分析的间接光度色谱法具有了广阔的应用前景。传统反相间接光度色谱理论已无法揭示以色谱柱为反应器的物理和化学共同作用的过程，需要提出并证实新的作用机理模式。本文依据新的作用机理和试验数据建立了磷酸（盐）类农药代表性品种草甘膦、三乙磷酸铝的亲核加成间接光度色谱定量分析方法。通过在样品中添加阴离子评价其对样品测定结果的影响。

在 IEC-CD 和 IP-RP-HPLC-ELSD 研究工作的基础上，试验通过 DAD、ELSD 检测器双通道同步监测，筛选出高效、易得、廉价、低毒、安全的离子对探针试剂二苯胍，优化出 RP 8 分析柱、乙酸、丙酸改性剂的浓度，开发出亲核加成间接光度反相高效液相色谱法，同时获得方法学数据及定性（LC-Q/TOF）、定量的（IEC-CD 等）确证。草甘膦、三乙磷酸铝离子对化合物理论值分别为 m/z 380.124 4 u、 m/z 321.123 7 u，测量值分别为 m/z 380.131 6 u、 m/z 321.130 7 u。二组试验数据和延迟 10 s 的 ELSD 信号证实了色谱柱上亲核加成反应的发生及共价离子对化合物的生成。

根据试验结果，依据生成含共轭体系的共价键化合物，提出并证实三电层为主的亲核加成反应混合作用机理模式。固定相表面单分子层，高密度的酰胺极性基团（第一电层）静电吸附流动相中的饱和一元羧酸阴离子（第二电层）。受一元羧酸共振杂化体的影响，二苯胍阳离子（第三电层）靠静电力也会吸附其上形成自身静态的三电层。实测固定相上二苯胍分布密度高于平衡后的流动相，大约 14 倍。创造液液分离界面形成非匀相体系是纳克有机合成的关键，也是亲核加成间接光度色谱法得以应用的前提。

建立了以二苯胍为离子对探针试剂的反相高效液相色谱分析草甘膦含量的方法。采用 RP8 色谱分析柱，流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸水溶液，流速为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，232 nm 3D 采样检测。在上述分析条件下，草甘膦与 H_2PO_4^- 、 NO_2^- 、亚硝基草甘膦、 Br^- 、 SO_4^{2-} 可以获得分离。本方法的 LOD 10 ng。在草甘膦浓度 $5 \sim 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，进样质量与峰面积呈良好的线性关系，回归方程 $Y = -1.20076 \times 10^5 + 1.5464 \times 10^6 X$ ， $r = 0.9996$ 。20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个质量浓度添加水平的平均回收率为 100.09% ~ 100.86%。8 次平行

样品测定 *RSD* 为 0.41 %。本方法适用于草甘膦的原药、异丙胺盐水剂的测定。由于草甘膦铵盐水剂中 Cl^- 含量较高，二者离子对化合物未获得基线分离。

同样以二苯胍为离子对探针试剂，开发了三乙磷酸铝的反相高效液相间接光度色谱定量分析方法。采用 RP8 色谱分析柱，流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液，流速为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，3D 采样，紫外检测器 232 nm 测定。在上述分析条件下，三乙磷酸铝可与 H_2PO_3^- 、 SO_4^{2-} 杂质离子对化合物获得分离。本方法的 LOD 10 ng。在三乙磷酸铝浓度 $5 \sim 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内进样分析，线性回归方程为 $Y = -5.91067 \times 10^5 + 3.2255 \times 10^3 X$ ， $r = 0.9945$ ，线性关系良好。 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个质量浓度添加水平的平均回收率分别为 99.85 % ~ 99.97 %。8 次平行样品测定 *RSD* 为 0.77 %。本方法适用于三乙磷酸铝原药、可湿性粉剂的测定。

由于样品中的杂质无机阴离子也会与离子对探针反应生成离子对化合物，因此对其影响进行了分析测定，明确了样品中不同浓度的无机阴离子对草甘膦、三乙磷酸铝间接光度色谱法测定结果的影响。试验结果表明当在草甘膦样品中添加 $\text{Br}^- \leq 4.98\%$ 、 $\text{NO}_2^- \leq 4.31\%$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^- \leq 4.98\%$ 、 $\text{SO}_4^{2-} \leq 13.04\%$ 、 $\text{Cl}^- \leq 0.30\%$ 时，草甘膦定量结果将不会受到影响。实测草甘膦原药、制剂样品时，各种阴离子含量分别为 $\text{Cl}^- 0.14 \sim 0.84\%$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^- 0.16 \sim 0.22\%$ 、 $\text{SO}_4^{2-} 0.03 \sim 0.16\%$ 、 $\text{NO}_2^- 0.05 \sim 0.08\%$ 、 $\text{Br}^- 0.63\%$ 。当三乙磷酸铝样品中含有的 H_2PO_3^- 、 $\text{SO}_4^{2-} \leq 31.03\%$ 时对三乙磷酸铝定量结果没有影响。实测三乙磷酸铝原药和可湿性粉剂中的 H_2PO_3^- 、 SO_4^{2-} 含量分别为 $5.88 \sim 8.49\%$ 、 $4.74 \sim 11.22\%$ ，所以这两种离子对测定结果的影响可忽略。

本文开发的磷酸（盐）类农药的亲核加成间接光度色谱法操作简便、快速、分析成本低、环境相容性好，对同类型化合物分析具有实用性与指导意义。本研究涉及的纳克有机合成对于常规有机合成，制备克级新的有机化合物具有潜在应用价值和指导意义。

关键词：草甘膦 三乙磷酸铝 离子对探针 三电层 亲核加成 间接光度色谱法

SCREENING OF ION-PAIRING PROBES AND DEVELOPMENT OF ANALYSIS METHOD FOR PHOSPHONIC ACID AND PHOSPHONATE PESTICIDES

ABSTRACT

With the advancement of RP Columns particles technology, based on the Ng organic synthesis and the analysis of synchronous integration technology, the indirect photometric chromatography which is applied in non-conjugated organic anionic compounds analysis possesses the broad application prospects. Traditional inverting indirect photometric chromatography theory is unable to reveal the physical and chemical interaction on the column reactor process. Therefore, the new mechanism of action model needs to be proved. This article provides the nucleophilic addition indirect photometric chromatography quantitative analysis method of phosphonic acid (salt) pesticides, the representative varieties of glyphosate and fosetyl-aluminium which is according to the new mechanism and the experimental data. The method is through adding the anion into the sample in order to assess the influence on the sample measurement results.

On the basic research of IEC-CD and IP-RP-HPLC-ELSD, selected ion-pairing probes reagents diphenylguanidine of effective, easy, cheap, low toxicity and safety by DAD and ELSD dual-channel synchronous monitoring. As well as optimising the RP column, type and concentration of saturated monocarboxylic acid. In time, a new method of IPC_{na}-RP-HPLC-DAD was developed, obtained data of methodology and confirmed qualitative (LC-Q/TOF) and quantitative (IEC-CD). The ion-pairing compounds' theoretical values of glyphosate and fosetyl-aluminium are m/z 380.124 4 u and m/z 321.123 7 u respectively. The measured values are m/z 380.131 6 u and m/z 321.130 7 u. The nucleophilic addition on column and covalent ionic reaction of compounds was confirmed by two detectors and the delay of 10 s ELSD signal.

According to the a lot of data, the covalent bond compound which contains conjugated system, the mechanism mode of three-layer-based nucleophilic addition reactions is proposed and proved. The stationary phase surface monolayer, the high density of the amide polar group (the first layer) electrostatic attracts the mobile phase a saturated monocarboxylic acid anion (the second layer). Due to the influence of the monocarboxylic acids resonance hybrid body, the diphenylguanidine cations (third

layer) against static electricity will adsorb thereon to form a static layer. The measured A_u of diphenylguanidine of stationary phase is about 14 times higher than the concentration of mobile phase after balanced. The key of the Ng organic synthesis is the creation of liquid-liquid separation interface to form a non-homogeneous system. This is also the precondition of the application of nucleophilic addition indirect photometric chromatography.

The diphenylguanidine as the ion probe reagent, the method of reversed-phase high performance liquid chromatography for analysis of glyphosate content is established in this experiment. Under the condition of RP 8 chromatography analysis column, the mobile phase was $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine/ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ propionic acid aqueous solution, the flow rate was $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 232 nm 3D sampling detection, the glyphosate and H_2PO_4^- , NO_2^- , nitroso glyphosate, Br^- , SO_4^{2-} can be separated. The LOD was 10 ng. Among the range of 5 - 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ glyphosate has clearly linear relationship between the injection mass and the peak area. The linear regression equation is $Y = -1.20076 \times 10^5 + 1.5464 \times 10^6 X$, $r = 0.9996$. The level of average recovery for $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ is 100.09 % - 100.86 %. The *RSD* is 0.41 % through measuring the 8 parallel samples. This method can be applied for the measurement of glyphosate technical and the isopropylamine salt agent. Due to the high concentration of Cl^- in the glyphosate agent, the baseline separation of the both ion compounds was not obtained.

Fosetyl-aluminium reversed-phase high performance liquid quantitative analysis method of indirect photometric chromatography is developed through using diphenylguanidine as the ion probe reagent. The conditions of the experiment were: RP8 chromatography analysis column, the mobile phase was $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine / $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetic acid aqueous solution, a flow rate of $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 232 nm 3D sampling detection. Fosetyl-aluminium impurity ions and H_2PO_3^- , SO_4^{2-} can be separated. The LOD 10 ng with the range of 5 - 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ fosetyl-aluminium, the linear regression equation is $Y = -5.91067 \times 10^5 + 3.2255 \times 10^3 X$, $r = 0.9945$. The level of average recovery for $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ is 99.85 % - 99.97 %. The *RSD* is 0.77 % through measuring the 8 parallel samples. This method can be used for the measurement of fosetyl-aluminium technical and WP.

Due to the reaction between impurity inorganic anions in the sample and miscellaneous ion probe, the effect should be measured in order to identify the influence of the various concentrations of the inorganic anions on the glyphosate fosetyl-aluminium indirect photometric chromatography results. The experiment results show that when adding $\text{Br}^- \leq 4.98 \%$, $\text{NO}_2^- \leq 4.31 \%$, $\text{H}_2\text{PO}_4^- \leq 4.98 \%$, $\text{SO}_4^{2-} \leq 13.04 \%$, $\text{Cl}^- \leq 0.30\%$ into the glyphosate samples, the glyphosate quantitative results can not be affected.

The concentration are Cl^- 0.14 - 0.84 %, H_2PO_4^- 0.16 - 0.22 %, SO_4^{2-} 0.03 - 0.16 %, NO_2^- 0.05 - 0.08 %, Br^- 0.63 % in the glyphosate sample. When the amount of anions is high in the sample, the impurity should be considered primarily. There is no influence on the results when the fosetyl-aluminium samples containing H_2PO_3^- , SO_4^{2-} ≤ 31.03 %. The measured concentrations of H_2PO_3^- , SO_4^{2-} in the fosetyl-aluminium original drug and WP are 5.88 - 8.49 %, 4.74 - 11.22 % respectively. Therefore, the influence of these two ions can be ignored.

The phosphonic acid (salt) pesticides nucleophilic addition indirect photometric chromatography is simple, rapid, low-cost analysis and environmental compatibility, which also possesses the practical significances on the same type of compound analysis. The Ng organic synthesis is significant and of great value to the conventional organic synthesis and the preparation of new organic compounds.

KEY WORDS: glyphosate fosetyl-aluminium Ion pairing probes Electric three-layer Nucleophilic additions Indirect photometric chromatography (IPC)

目 录

前 言	I
摘 要	III
ABSTRACT.....	V
第一章 绪 论	1
1.1 磷酸（盐）类代表性农药品种概况.....	1
1.1.1 草甘膦.....	1
1.1.2 三乙磷酸铝.....	2
1.2 离子对探针概况	3
1.2.1 新离子对探针二苯胍基本信息	4
1.2.2 二苯胍的理化性质	5
1.2.3 二苯胍的表征	5
1.2.3.1 紫外吸收光谱.....	5
1.2.3.2 红外吸收光谱.....	5
1.2.3.3 ¹³ C-NMR 核磁共振波谱图	6
1.2.3.4 质谱图.....	7
1.3 磷酸（盐）类农药常量分析方法研究进展.....	7
1.4 间接光度色谱分析方法研究进展.....	8
1.5 基于纳克有机合成的磷酸（盐）类农药间接光度色谱法的提出.....	10
第二章 以反相色谱柱为反应器的离子对探针作用机理研究.....	11
2.1 材料与方法	11
2.1.1 仪器与设备.....	11
2.1.1.1 高效液相色谱仪.....	11
2.1.1.2 液相色谱-高分辨质谱联用仪.....	11
2.1.2 试剂和溶液.....	11
2.1.3 分析条件.....	12
2.1.3.1 高效液相色谱仪.....	12
2.1.3.2 液相色谱-高分辨质谱联用仪.....	12
2.1.4 三电层假说.....	13
2.1.5 非匀相体系的确证.....	13
2.1.6 ELSD 通道同步监测离子对化合物信号	13
2.1.7 共价键离子对化合物精确相对分子质量的测定	13
2.1.8 色谱柱温度对间接光度色谱法的影响	13
2.2 结果与讨论	14
2.2.1 三电层的构建及工作过程.....	14

2.2.1.1 三电层的构建	14
2.2.1.2 工作过程	18
2.2.2 亲核加成反应的前提—色谱柱中非匀相体系建立.....	18
2.2.3 磷酸(盐)类化合物亲核加成反应机理与新化合物.....	20
2.2.4 ELSD 离子对化合物同步信号监测.....	21
2.2.5 离子对化合物精确相对分子质量的在线测定.....	23
2.2.6 色谱柱温度对间接光度色谱法的影响结果.....	24
2.3 小结	25

第三章 基于纳克有机合成间接光度色谱法的建立及优化.....27

3.1 材料与方法	27
3.1.1 仪器与设备	27
3.1.2 试剂和溶液	27
3.1.2.1 草甘膦	27
3.1.2.2 三乙磷酸铝	27
3.1.2.3 改性剂	27
3.1.3 分析条件	28
3.1.3.1 草甘膦	28
3.1.3.2 三乙磷酸铝	28
3.1.4 离子对探针试剂的筛选.....	28
3.1.4.1 原则	28
3.1.4.2 供筛选的离子对探针试剂.....	28
3.1.5 分析条件的优化	28
3.1.5.1 草甘膦	28
3.1.5.2 三乙磷酸铝	29
3.2 结果与讨论	30
3.2.1 离子对探针试剂筛选结果	30
3.2.2 草甘膦分析条件	30
3.2.2.1 色谱柱	30
3.2.2.2 离子对试剂浓度	31
3.2.2.3 改性剂种类	31
3.2.2.4 改性剂浓度	33
3.2.2.5 有机溶剂	34
3.2.3 三乙磷酸铝分析条件	34
3.2.3.1 色谱柱	34
3.2.3.2 离子对试剂浓度	35
3.2.3.3 改性剂	37
3.2.3.4 改性剂浓度	38
3.2.3.5 有机溶剂	39

3.3 小结	40
第四章 草甘膦的离子对探针法测定	41
4.1 材料与方法	41
4.1.1 仪器与设备	41
4.1.2 试剂与样品	41
4.1.3 分析条件	41
4.1.4 纯品的制备与定值	41
4.1.5 溶液的配制	41
4.1.5.1 标准溶液	41
4.1.5.2 样品溶液	41
4.1.6 方法学	41
4.1.6.1 检出限的测定	41
4.1.6.2 标准曲线的绘制	42
4.1.6.3 准确度	42
4.1.6.4 精密度	42
4.1.7 草甘膦样品含量的测定	42
4.2 结果与讨论	42
4.2.1 纯品的制备与定值结果	42
4.2.2 方法学数据	42
4.2.2.1 检出限	42
4.2.2.2 标准曲线	43
4.2.2.3 准确度的试验结果	43
4.2.2.4 精密度的测定结果	44
4.2.3 草甘膦样品中含量测定结果	44
4.2.4 草甘膦样品中杂质离子干扰	45
4.3 小结	47
第五章 三乙磷酸铝的间接光度色谱法测定	49
5.1 材料与方法	49
5.1.1 仪器与设备	49
5.1.2 试剂与样品	49
5.1.3 分析条件	49
5.1.4 三乙磷酸铝纯品的制备与定值	49
5.1.5 溶液的配制	49
5.1.5.1 标准溶液	49
5.1.5.2 样品溶液	49
5.1.6 方法学	50
5.1.6.1 检出限	50

5.1.6.2 标准曲线的绘制	50
5.1.6.3 准确度试验	50
5.1.6.4 精密度试验	50
5.1.7 三乙磷酸铝样品含量的测定.....	50
5.2 结果与讨论	50
5.2.1 纯品的制备与定值结果.....	50
5.2.2 方法学数据	52
5.2.2.1 检出限	52
5.2.2.2 标准曲线的绘制	52
5.2.2.3 准确度的试验结果	52
5.2.2.4 精密度的测定结果	52
5.2.3 三乙磷酸铝样品含量的测定结果.....	54
5.3 小结	55
第六章 样品中无机阴离子含量对间接光度色谱法的影响.....	57
6.1 材料与方法	57
6.1.1 仪器与设备	57
6.1.2 试剂与样品	57
6.1.2.1 草甘膦	57
6.1.2.2 三乙磷酸铝	57
6.1.2.3 七种阴离子标准溶液.....	57
6.1.3 分析条件	57
6.1.3.1 离子色谱仪	57
6.1.3.2 高效液相色谱仪	58
6.1.4 样品背景中阴离子的测定.....	58
6.1.4.1 草甘膦原药及其制剂.....	58
6.1.4.2 三乙磷酸铝原药及其制剂.....	58
6.1.5 溶液的配制	58
6.1.5.1 七种阴离子混合标准溶液的配制.....	58
6.1.5.2 在草甘膦样品溶液中添加阴离子试验.....	58
6.1.5.3 在三乙磷酸铝样品溶液中添加阴离子试验.....	58
6.2 结果与讨论	59
6.2.1 草甘膦原药及其制剂中阴离子含量.....	59
6.2.2 三乙磷酸铝原药及其制剂中阴离子含量.....	60
6.2.3 添加阴离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响.....	61
6.2.4 添加阴离子对三乙磷酸铝间接光度色谱法测定结果的影响.....	66
6.3 小结	68
结 论	71

参考文献	73
附录一 略缩词表	79
致谢	81
攻读学位期间发表的学术论文	83
声明	85

第一章 绪论

磷酸（盐）类化合物是一类非常重要的化工产品，广泛用于农业、卫生、化工、水处理、印染、冶金、建筑等行业，可作为农药、医药、阻垢缓蚀剂、阻燃剂、螯合分散剂、漂白稳定剂、催化剂、鞣剂和浮选剂使用。涵盖有机、无机多种化合物。据不完全统计，目前仅山东省磷酸（盐）产品生产厂家过百。磷酸（盐）类农药既有杀虫剂、杀菌剂、除草剂，还有植物生长调节剂，代表品种主要有三乙磷酸铝、草甘膦、乙烯利，敌百虫等。从中国农药信息网获知，目前草甘膦、三乙磷酸铝和敌百虫制剂生产厂家均过百^[1]（表 1 - 1）。

表 1 - 1 磷酸(盐)类农药主要品种登记状况

Tab. 1 - 1 Registration status of main varieties for phosphonic acid (salt) pesticide

品种 The varieties	原药生产产家 Manufacturers for TC	制剂生产产家（包括混剂） Manufacturers for Formula- tions (including mixtures)	主要生产厂家 Major manufacturers
三乙磷酸铝 fosetyl-aluminium	13	166	浙江嘉华化工有限公司等
草甘膦及盐的衍生品 glyphosate and the salts	123	382	新安集团等
乙烯利 ethephon	14	76	江苏安邦电化有限公司等
敌百虫 trichlorfon	14	106	山东大成农药股份有限公司等

1.1 磷酸（盐）类代表性农药品种概况

1.1.1 草甘膦

中文通用名称：草甘膦；

英文通用名称：glyphosate；

中文别名：镇草宁；农达；甘氨膦；

英文商品名称：Folusen；Forsat；Glialka；Glialka 36；Gliz；Gliz 480CS；GlyGran；Glyphos；Glyphodin A；Glyphomax；Glyphosate CT；HM 2028；Herbatop；Hockey；Kickdown；Klinik；Lancer；MON 2139；MON 3539；MON 6000；Phorsat；Rebel Garden；Roundup Max；Silglif；Total；

化学名称：*N*-(膦羧甲基)-甘氨酸；

化学结构式：见图 1 - 1；

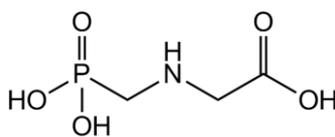


图 1-1 草甘膦化学结构式

Fig. 1 - 1 Chemical structure of glyphosate

分子式： $C_3H_8NO_5P$;

相对精确分子质量：169.014 01;

CAS 登录号：1071-83-6。

草甘膦为磷酸衍生物灭生性除草剂。1971年由 D. D. Baird 等首次报道了其除草活性。1974年孟山都公司推出了草甘膦异丙胺盐、铵盐、钠盐。草甘膦为全球第一大农药品种，其销售额也位居世界第一。经查询中国农药信息网数据库，目前其原药、制剂、混剂共计有 635 条生产厂家注册信息^[1]，为我国大宗生产、应用和出口的除草剂品种之一。

纯品为非挥发性白色固体，熔点：189.5 °C 并伴随分解，蒸汽压： $<1.31 \times 10^{-2}$ mPa(25 °C)，亨利常数： $<2.7 \times 10^{-7}$ Pa m³ mol⁻¹(约 20 °C)， $Kow \log P = -3.2$ (20 °C)，pKa 5.73。25 °C 时在水中的溶解度为 1.05 %，不溶于一般有机溶剂，如丙酮、乙醇等，其异丙胺盐完全溶解于水。不可燃、不爆炸，常温贮存稳定。对中碳钢、镀锌铁皮有腐蚀作用。

1.1.2 三乙磷酸铝

中文通用名称：三乙磷酸铝；

英文通用名称：fosetyl-aluminium；

中文别名：乙磷铝；疫霉灵；疫霜灵；霉菌灵；克霉灵；霉疫净；乙磷铝；疫霉灵；藻菌磷；

英文商品名称：Alette；Chipco Alette Signature；EXP 1659；Efal；Efal 50；Efosite Al；Ephal；Fosethyl Al；Fosetyl Al；Fosetyl aluminum；LS 74-783；Phosethyl Al；Yilinlu；

化学名称：三（乙基磷酸）铝；

化学结构式：见图 1-2；

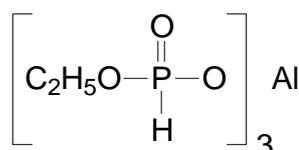


图 1-2 三乙磷酸铝化学结构式

Fig. 1 - 2 Chemical structure of fosetyl-Al

分子式: $C_6H_{18}AlO_9P_3$;

相对精确分子质量: 353.997 91;

CAS 登录号: 39148-24-8。

纯品为白色粉末, 熔点: $215\text{ }^\circ\text{C}$, 蒸汽压: $<10^{-4}\text{ mPa}$ ($25\text{ }^\circ\text{C}$), 亨利常数: $<3.24\times 10^{-5}\text{ Pa m}^3\text{ mol}^{-1}$ (约 $20\text{ }^\circ\text{C}$), $Kow\ logP=-2.1\sim 2.7$ ($23\text{ }^\circ\text{C}$), $pK_a\ 4.7$ ($20\text{ }^\circ\text{C}$), 其他有关信息见参考文献^[2]。三乙膦酸铝为具有保护和治疗作用的内吸性杀菌剂。作用机理是抑制氨基葡萄糖的聚合, 使组成细胞壁壳质无法形成, 阻止菌丝生长和孢子产生。值得提及, 三乙膦酸铝化学分子结构设计非常巧妙, 分解后会释放出乙醇、亚磷酸, 二者均有抑菌作用并低毒。

1.2 离子对探针概况

反相间接光度色谱法将具有紫外吸收的离子对试剂加入到流动相中, 以此测定非紫外吸收的样品, 这种带有紫外吸收的离子对试剂叫做离子对探针试剂。反相离子对色谱法常用洗脱剂的溶剂组成与反相色谱相同, 离子对试剂的种类和浓度对分离效果都有很大的影响, 所以选择合适的离子对探针试剂是进行离子对色谱分离的首要条件。离子对试剂种类的选择依赖于被分离样品的性质。一般地说, 所选用的离子对试剂的电荷应与被分离的样品电荷相反且具有紫外吸收。对酸性或是带有负电荷的溶质而言, 多选用带有正电荷的季铵盐作为离子对试剂; 而对于碱性或带有正电荷的溶质, 则选用带有负电荷的烷基磺酸盐做离子对试剂^[3]。对于溶质结构性质相差较大的混合样品, 离子对试剂种类的选择并没有特殊的要求。离子对试剂疏水性的差别可以通过调节离子对试剂的浓度和有机溶剂的浓度获得满意的分离效果。表 1-2 给出了离子对试剂选择的一般参考原则, 同时列出了一些被分离样品的种类以及所选择的离子对试剂种类匹配的参考方案。

选择离子对试剂的目的是为了在合适浓度获得色谱柱对试剂的较强吸附, 同时还要兼顾离子对试剂的理化性质、分子结构、相对分子质量大小等诸多因素。因为间接光度色谱法是通过具有紫外吸收的离子对试剂间接的测定无紫外吸收的物质, 所以离子对试剂要具有较强的紫外吸收, 例如具有共轭体系的苯环。其次, 离子对试剂的分子构型也是很重要的, 因为分子构型过于复杂的离子对试剂空间位阻比较大, 不易于目标化合物成对且在固定相内不易流出。第三, 相对分子质量较小的离子对试剂比相对分子质量较大的离子对试剂分离效果要好^[4]。因为柱子的有效容量主要由离子对试剂决定, 当离子对试剂的浓度增加时, 被分离化合物的保留也相应增加。

表 1-2 常用的离子对试剂

Tab. 1-2 Favorite ion pair reagents

测定阴离子 Determination of anions	测定阳离子 Determination of cations	疏水性 Hydrophobicity
脂肪胺系列:	羧酸系列:	
乙胺	五氟丙酸	
丙胺	七氟丁酸	增
丁胺	九氟戊酸	加 ↓
戊胺	十五氟辛酸	
己胺	十三氟庚酸	
季胺系列:	磺酸系列:	
四甲基氢氧化铵	丁烷磺酸	
四乙基氢氧化铵	戊烷磺酸	增
四丙基氢氧化铵	己烷磺酸	加 ↓
四丁基氢氧化铵	庚烷磺酸	

1.2.1 新离子对探针二苯胍基本信息

中文名称: 二苯胍;

英文名称: diphenylguanidine;

中文别名: 橡胶促进剂 D; 促进剂 DPG; 对二苯胍; *N,N*-二苯胍; 橡胶硫化促进剂 DPG;

英文商品名称: Accelerator D; Denax; DFG; DPG; Melaniline; Vulcafor DPG; Vulkacit D; Vulkacite D; Vulkazit; USAF EK-1270; 1,3-Diphenylguanid; DPG accelerator; Dwufenyloguanidyna; NCI-C60924; USAF B-19; Vulcaacid D; Vulkacit D/C; Akrochem DPG; D.P.G; Nocceler D; Perkacit DPG; Sanceler D; Soxinol D; Vulcaid DPG; Denax DPG; NSC 3272 Aliette; Efosite-Al; Epal; LS-74783; Mikal; Phosethyl Al; 32545-RP;

化学名称: 1,3-二苯胍;

化学结构式: 见图 1-3;

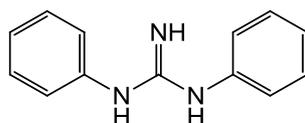


图 1-3 二苯胍化学结构式

Fig. 1-3 Chemical structure of diphenylguanidine

分子式: $C_{13}H_{13}N_3$;

分子量: 211.11095;

CAS 登录号: 102-06-7。

二苯胍为常用橡胶硫化促进剂, 石油分离萃取剂, 标定酸的基准物^[5-6]。目前还未见将二苯胍作为离子对探针试剂用途的报道。

1.2.2 二苯胍的理化性质

纯品为白褐色粉末或颗粒, 微有气味, 味苦, 具强碱性。熔点: 146 ~ 151 °C, 加热至 170 °C 时分解。易溶于稀无机酸, 溶于乙醇、氯仿、热苯和甲苯, 水中溶解度 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (25 °C) 对玻璃表面有一定的腐蚀性。LD₅₀ (大鼠, 经口) $323 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。对眼睛有刺激性。

1.2.3 二苯胍的表征

1.2.3.1 紫外吸收光谱

在本文三乙磷酸铝的分析条件下, 二苯胍的紫外吸收光谱见图 1-4, 其紫外吸收最大波长位于 232 nm。它与草甘膦、三乙磷酸铝生成的离子对化合物紫外最大吸收波长也没有太大的变化。

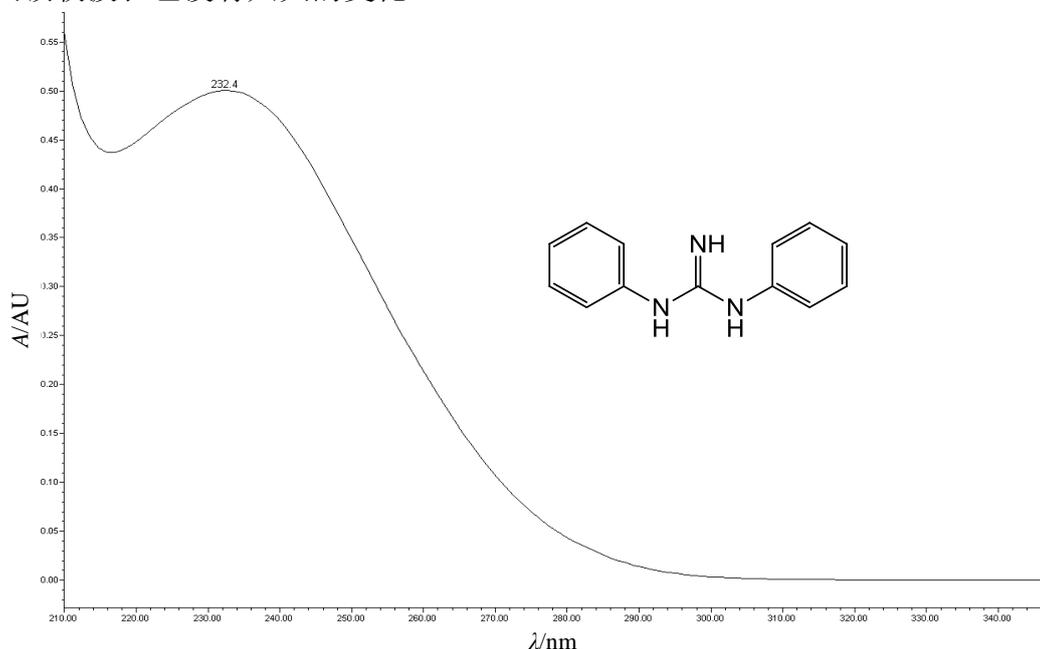


图 1-4 二苯胍的紫外吸收光谱图

Fig. 1 - 4 The UV spectrum of diphenylguanidine

1.2.3.2 红外吸收光谱

二苯胍红外吸收光谱图可知 (图 1-5): 胍基特征吸收为 3381 cm^{-1} 左右的吸收带为分子结构中伯胺非对称伸缩振动吸收带。波数 1528 cm^{-1} 、 1547 cm^{-1} 、 1639

cm^{-1} 、 $1\ 686\ \text{cm}^{-1}$ 的强吸收峰为苯环的特征吸收。 $1\ 170\ \text{cm}^{-1}$ 为 C-N 伸缩振动。

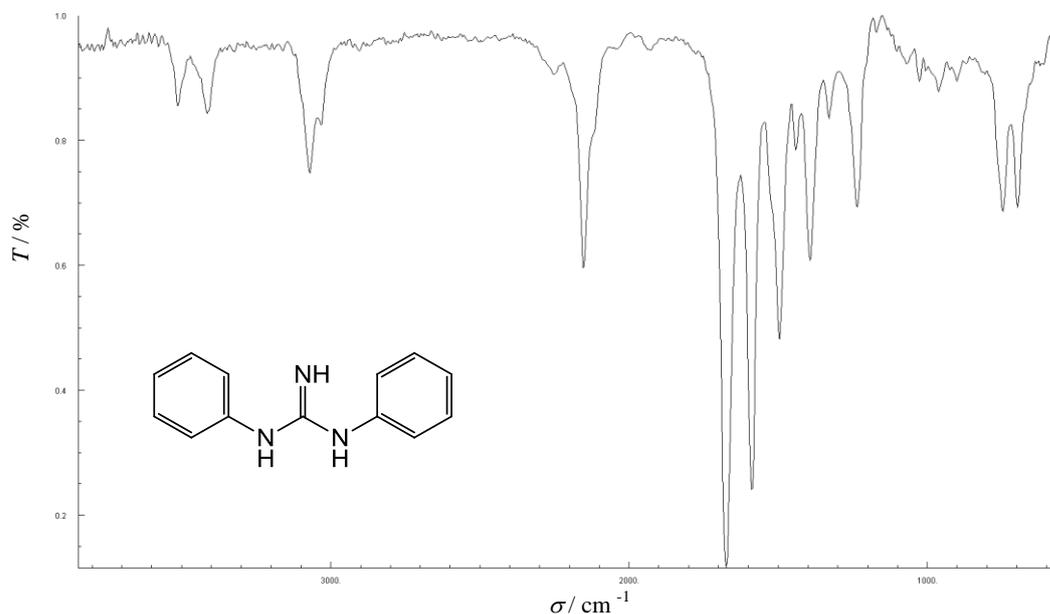


图 1-5 二苯胍的红外吸收光谱图

Fig. 1 - 5 The IR spectrum of diphenylguanidine

1. 2. 3. 3 ^{13}C -NMR 核磁共振波谱图

二苯胍含有十三个碳，化学环境不同有 5 个碳， ^{13}C -NMR 的特征峰为(图 1 - 6): 胍基碳 (1) 的化学位移为 $\delta_{\text{C}} 149.96$, 与胍基氮连接的碳 (2) 为 $\delta_{\text{C}} 144.07$, 苯环上的碳 (3, 4, 5) 分别为 $\delta_{\text{C}} 129.32$, 强度最大; $\delta_{\text{C}} 123.03$; $\delta_{\text{C}} 129.93$ 。

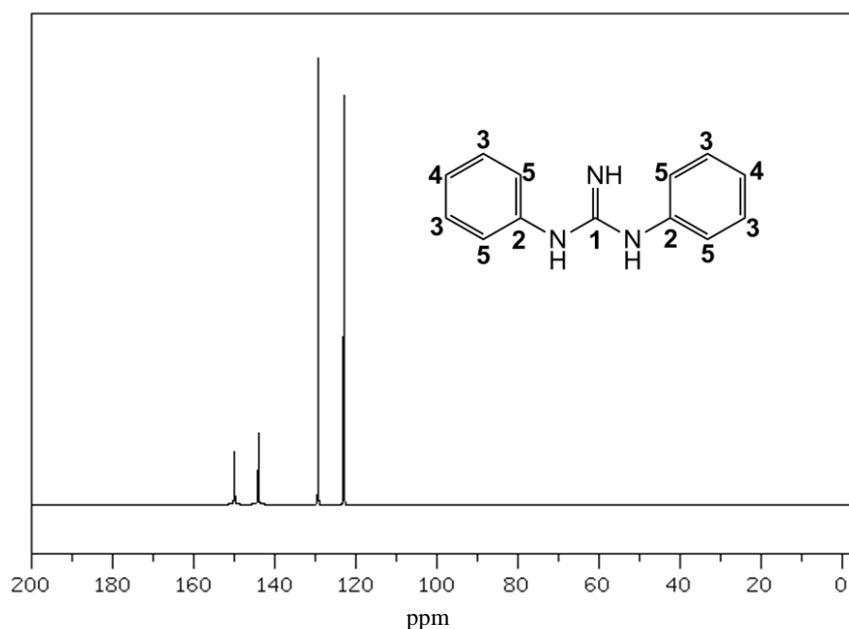


图 1-6 二苯胍的 ^{13}C -NMR 波谱图

Fig. 1 - 6 ^{13}C -NMR spectrum of diphenylguanidine

1.2.3.4 质谱图

二苯胍质谱图见图 1-7，其质谱裂解碎片显示： m/z 211 为分子离子峰，奇数，符合氮律。胍基碳氮键易于断裂并发生氢重排生成基峰 m/z 93，丢失中性碎片苯胺，此为优势反应。同时伴随生成碎片 $C_7H_7N_2^+$ m/z 119。 m/z 77、 m/z 55 碎片证明分子结构中苯环的存在。

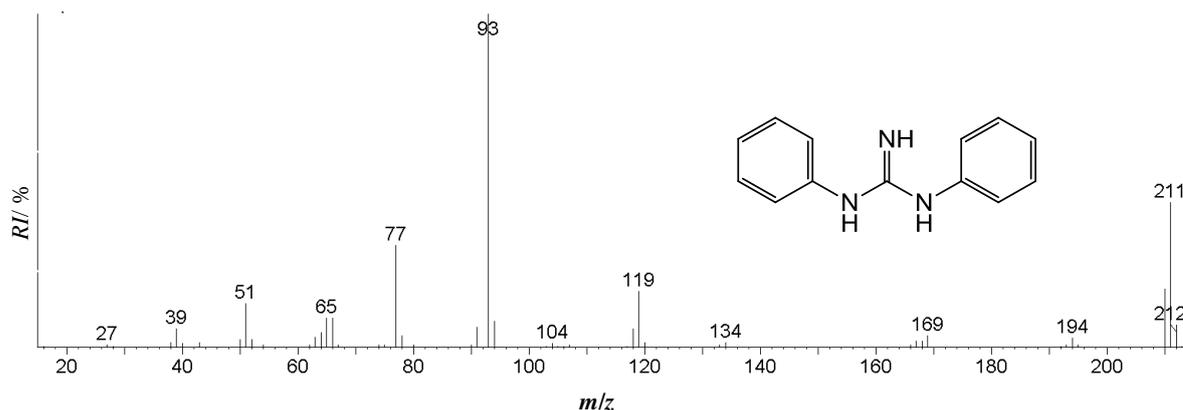


图 1-7 二苯胍的质谱图

Fig. 1 - 7 The mass spectrum of diphenylguanidine (EI)

1.3 磷酸（盐）类农药常量分析方法研究进展

磷酸（盐）类化合物产品国内、外标准分析方法主要是采用化学容量法(如碘量法、银量法等)^[6-12]，其优点是分析成本相对较低，不足是检测工序复杂，工效低，环境污染，不能彻底排除杂质干扰，制约了产品质量的提高和正确评价。现行有效的标准中即使采用了高效液相色谱法，也都是使用了离子交换分离技术或者利用化合物的末端吸收定量，表现出了技术缺陷和不足。各种分析方法特点比较见表 1-3。

目前，磷酸（盐）类农药代表品种草甘膦、三乙磷酸铝原药及制剂的测定，已见多篇离子对色谱法的公开报道^[13,14]。蒸发光散射检测器是近年来进入实验室的一种新型检测器，可以用于没有紫外吸收的化合物的测定，目前仍是检测磷酸(盐)化合物的一种选择。缺点是售价高，灵敏度低，重现性差，虽然其在技术上取得了一定的进步，还需要进一步的丰富和完善。

对于检测无紫外吸收的磷酸(盐)类农药，除采用 ELSD^[15-17]外，还有衍生的方法^[18-21]，但衍生的方法主要适用于痕量即残留分析^[22-25]。在线式柱前或柱后衍生装置目前售价昂贵，即使成功研究出其分析检测方法，在原药、制剂分析工作中几乎没有实用的可能。主要的原因是购买一台在线式衍生装置价格不菲，比一台

高效液相色谱仪装置还贵。单泵单反约 10 万元人民币，双泵双反则更贵。目前国内生产此类衍生装置的厂家有限。

有关磷酸(盐)化合物常量分析方法还有 IEC-CD^[26-30]、LC/MS/MS^[31-39]的报道，但所需仪器设备造价昂贵或检测成本太高，难以普及应用，如离子色谱法通常需要一台专门的离子色谱仪，即使是不使用离子色谱仪，仅利用离子交换法分离，但其高质量的离子色谱柱售价比 C₁₈ 柱贵，且与常见的干扰离子难以获得有效分离。生产高纯度磷酸(盐)类产品是当前生产企业的重要目标，但是在化合物生产和最终产品质量评价过程中迫切需要更新的有效成分分析方法的技术支撑。

表 1-3 磷酸(盐)类化合物分析方法特点比较

Tab. 1-3 Comparison of analysis method for phosphonic acid (salt) compounds

	IPC _{na} -RP-HPLC-DAD (本文方法)	IP-RP-HPLC-ELSD	IC-AS	Iodimetry
有效成分与杂质的分离能力 Separation of impurities	有	有	有，但易受干扰	无，需要采取其他步骤或措施
测定结果误差 Error (%)	1 ~ 2	3 ~ 4	1 ~ 2	0.1 ~ 2
易用性 Ease-of-use	优	中	良	—
仪器设备投资 Instruments investment	—	大，专属性强	大，专属性强	—
工效 Work efficiency	高	高	中	低
分析成本 The cost	中	中	低	中
仪器普及程度 Instrument penetration	高	低	低	—

1.4 间接光度色谱分析方法研究进展

间接光度色谱法(IPC)是针对检测无紫外光吸收能力的常见阴、阳离子，遵循离子对色谱法的原理，只是离子对试剂必须有紫外吸收^[40]。它是将一种(或多种)

与溶质分子电荷相反的离子(称为对离子或反离子)加到流动相或固定相中,使其与溶质离子结合形成疏水型离子对化合物,从而控制溶质离子的保留行为,达到分离目的的技术方法^[41,42]。其原理可用式1表示:



式中: X^{-} = 样品中亲水性极强的阴离子;

Y^{+} = 流动相中离子对试剂提供的疏水性较强的阳离子;

$X \cdot Y$ = 一定疏水性的离子对化合物。

色谱作为一种分离技术与方法,自上世纪初发表第一篇论文算起已有 100 多年的历史,多年来其发展势头迅猛,从理论到技术,到各种分离模式,以及在各个科学领域中的应用。色谱法已在国民经济生活中扮演着重要的角色,间接光度检测法在上世纪 70 年代就用于液-液色谱法中^[43-46]。上世纪 80 年代后国内、外对于间接光度色谱法研究有一段活跃期, Pettersson 等利用正相色谱间接检测法对无检测响应的离子型化合物进行了分离分析^[47]。此后, Hackzell 等认为,借助间接检测技术,反相高效液相色谱法不仅能分离检测上述离子型化合物,而且能用于无检测响应的非离子型化合物的定性、定量分析^[48]。由于当时色谱柱技术的限制,柱寿命短、应用面窄、实用性差、难于掌握、重现性差、加之作用机理不清楚、缺少系统性研究等不足没有发挥太大的作用。上世纪 70-80 年代的间接光度色谱法主要是用来分析一些无机的阴、阳离子,且主要是在离子交换柱上实现分离的目的^[49-52]。现在,把反相色谱柱与此法有效的结合,使检测对象从单纯的无机阴、阳离子扩展到阴、阳离子型有机化合物,使该技术的应用范围进一步的扩大,纳克有机合成和检测分析一体化技术将在相关领域应用前景无限。色谱柱作为液相色谱的核心部件越来越多的受到人们的关注,柱内填料由最初的薄壳无孔填料到今天的超纯硅胶或硅碳键杂化硅胶颗粒技术。色谱柱技术的革新和进步催生了新的分析分离技术,使其更为成熟、实用化。

液相色谱柱作为液相色谱的核心部件备受人们的关注,但是大家普遍认为色谱的分离原理仅仅是被分析物在两相中的物理分配过程所致。研究发现,加入改性剂、离子对试剂的某些色谱的分配行为是以化学反应为主导的,物理过程为次要行为或者作为辅助使得分析组分得以良好的分离。

由于间接光度检测色谱法的体系和检测机理类型较多,目前还没有建立普遍公认的理论模型。根据文献报道,基本可以分为三个基本机理:离子对或加合物的形成、离子交换、离子或分子相互作用“平衡扰动”^[45]。当然,色谱过程中的吸附和分配作用对分离和检测响应也具有一定的影响。Bidlingmeyer 提出离子对色谱的离子相互作用机理,并用于解释间接光度反相离子对色谱分离过程和检测

信号的形成^[53]。基本假设是离子相互作用试剂和带相反电荷的其它离子在固定相的疏水表面形成一个双电层。样品的保留产生于样品同这种双电层的静电作用力和与疏水性固定相表面的吸附力^[54-57]。反相间接光度色谱定量分析方法准确可靠、简便、实用、易于普及推广，适用领域范围宽，克服了传统的、以往的分析方法弊端，解决了存在的问题^[58-61]。特色是实现了可以对无紫外吸收或末端紫外吸收的化合物采用紫外检测器来进行分析测定。本法是利用分离色谱柱作为反应器，与柱前、柱后衍生技术相比，具有分析成本低、操作简便、重现性好、灵敏度高和线性范围宽的特点。实验室分析检测时，本法操作如同普通的高效液相色谱分析无异，但是，在方法开发的过程中，筛选离子对紫外探针试剂、优化分析条件将花费大量的时间，耗费大量的人力、物力和财力。

1.5 基于纳克有机合成的磷酸（盐）类农药间接光度色谱法的提出

磷酸（盐）类农药及其相关化合物产品质量的提高，其技术瓶颈之一就是有效成分分析方法的落后（有些产品还采用重量法）。虽然原有的检测技术标准能够基本解决磷酸（盐）类产品的质量问题的，但是在有些方面或多或少存在不足。检测技术不断发展进步的今天，同样也需要推出采用新原理、新技术的分析方法来满足社会和企业的要求。

将现行的色谱技术与间接光度色谱法有效地融合在一起，以反相色谱柱为反应器揭示新的离子对探针与目标化合物的作用机理。到目前为止，还未发现国内、外有采用二苯胍作为探针试剂的离子型化合物间接光度色谱法的研究和报道。该方法的优越性值得深入开展研究，为社会公共领域提供优质分析技术服务。致力于开发出一种以液相色谱柱为反应器的适用于分析阴离子型有机物的全新高效液相色谱法。采用最普遍、最通用的仪器方法解决多年来困扰磷酸（盐）类农药如三乙磷酸铝等采用紫外检测器分析的难题。

第二章 以反相色谱柱为反应器的离子对探针作用机理研究

大多数情况下,分析对象在高效液相色谱柱是依据分配系数的不同在柱上实现分离,整个过程认为是一个物理行为^[62]。随着离子对色谱法的出现,到达检测器产生信号的物质通常被认为是离子缔合物^[63]。本文以反相色谱柱为间歇式微量化学反应器,离子对探针试剂与被分析磷酸(盐)阴离子在非匀相态的液液分离界面发生化学反应,生成具有紫外活性的共价键化合物供高效液相色谱紫外检测器测定。本章采用柱上衍生技术,以二苯胍作为离子对探针,对亲核加成间接光度色谱法作用机理展开研究,揭示反相色谱柱为反应器的间接光度色谱法全新的三层作用机理模式和保留机制。采用 LC-Q/TOF 对生成的离子对化合物进行精确质量确证。

2.1 材料与方法

2.1.1 仪器与设备

2.1.1.1 高效液相色谱仪

高效液相色谱仪: Waters 600 高压泵,配 Waters 2996 紫外可见光二极管阵列检测器(DAD), Waters 2420 型蒸发光散射检测器(ELSD), Rheodyne 7725i 六通阀进样器, Empower Pro 中文版色谱工作站; Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6mm \times 150 mm) 色谱柱。

2.1.1.2 液相色谱-高分辨质谱联用仪

美国戴安公司 Ultimate 3000 液相色谱仪,配以 LPG-3400SD 四元分析泵, WPS-3000SL 自动进样器, VWD-3100 紫外检测器, Chromeleon 英文版色谱工作站; Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm) 色谱柱; 布鲁克 maXis UHR-TOF 超高分辨四极杆-飞行时间质谱仪。

2.1.2 试剂和溶液

草甘膦纯品: 99.9%, 自制, IEC 面积归一法定值;

三乙磷酸铝纯品: 99.6%, 自制, IEC 面积归一法定值;

二苯胍、丙酸 AR; 乙酸, GR 均为国药集团化学试剂有限公司;

本文试验用水均为分析实验室一级水(自制);

草甘膦 1 000 mg \cdot L⁻¹ 标准品储备水溶液配制: 称取 0.1 g (精确至 0.000 2 g) 草甘膦纯品于 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度即为标准储备溶液, 冷藏室放置时间不超过 14 d, 用前恢复至室温后, 稀释 5 倍进样。

三乙磷酸铝 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品储备水溶液配制：称取 $0.1\ \text{g}$ (精确至 $0.000\ 2\ \text{g}$) 三乙磷酸铝纯品于 $100\ \text{mL}$ 容量瓶中，加入 $90\ \text{mL}$ 水，超声波振荡 $30\ \text{min}$ ，冷却到室温定容至刻度即为标准储备溶液，冷藏室放置时间不超过 $7\ \text{d}$ ，用前恢复至室温后，稀释 5 倍进样。

二苯胍 $100\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备水溶液配制 (约 $0.48\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)：称取 $0.25\ \text{g}$ (精确至 $0.000\ 2\ \text{g}$) 二苯胍于 $2\ 500\ \text{mL}$ 细口瓶中，加水，超声波振荡 $30\ \text{min}$ ，冷却过夜即为二苯胍储备水溶液，冷藏室放置时间不超过 $60\ \text{d}$ ，用前恢复至室温后，稀释 4 倍。

2.1.3 分析条件

2.1.3.1 高效液相色谱仪

2.1.3.1.1 草甘膦分析条件

流动相： $0.12\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸水溶液；
 流动相流速： $1.2\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；氦气鼓泡脱气 $30\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；
 进样量： $10\ \mu\text{L}$ ；
 保留时间：草甘膦约 $5\ \text{min}$ ；
 检测波长范围： $195\ \text{nm} \sim 400\ \text{nm}$ ；
 定量波长： $232\ \text{nm}$ ；
 采样速率： 1.0 ；
 分辨率： $1.2\ \text{nm}$ ；
 仪器控制：自动曝光；
 3 D 数据采集；
 2 D 谱图比较。

2.1.3.1.2 三乙磷酸铝分析条件

流动相： $0.12\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $30\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液；
 保留时间：三乙磷酸铝约 $8\ \text{min}$ ；
 余同 2.1.3.1.1。

2.1.3.2 液相色谱-高分辨质谱联用仪

2.1.3.2.1 草甘膦分析条件

液相分析条件：
 流动相流速： $0.4\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；
 分析时间： $30\ \text{min}$ ；
 余同 2.1.3.1.1。

质谱分析条件:

离子化方式: 电喷雾离子化负离子模式 (ESI⁻);

毛细管电压: 2800 V;

雾化气压力: 0.2 MPa;

干燥温度: 180 °C;

干燥流量: 7 L · min⁻¹;

扫描范围: m/z 250 – 1000。

2.1.3.2.2 三乙磷酸铝分析条件

液相分析条件:

流动相流速: 0.4 mL · min⁻¹;

分析时间: 70 min;

余同 2.1.3.1.2。

质谱分析条件: 同 2.1.3.2.1。

2.1.4 三电层假说

根据亲核试剂的色谱保留行为和试验数据, 推测固定相表面微观景象, 提出三电层假说。磷酸盐类化合物阴离子为亲核试剂, 二苯胍作为反应底物。

2.1.5 非匀相体系的确证

色谱柱为一个间歇式纳克水平的化学反应器。采用将不同浓度组合的改性剂、反应底物加入到容量瓶中, 验证匀相体系下是否可以生成离子对化合物。根据流动相中二苯胍在柱上的平衡时间与死体积时间, 分别计算出固定相上富集的离子对试剂质量和柱内流动相所含的质量, 明确二者倍数, 证实色谱柱内在工作的状态下为一个非匀相体系的状态。

2.1.6 ELSD 通道同步监测离子对化合物信号

将 ELSD 串接在 DAD 出口用以同步监测流出组分的蒸发光散射信号。

2.1.7 共价键离子对化合物精确相对分子质量的测定

采用高分辨率 LC-Q/TOF 测定离子对化合物的精确相对分子质量, 进而证明以色谱柱为反应器内确实发生了亲核加成反应, 用于分析的产物是生成的共价键化合物。采用 $(m/z_{\text{测量值}} - m/z_{\text{理论值}}) / m/z_{\text{理论值}}$ 评定测定误差。

2.1.8 色谱柱温度对间接光度色谱法的影响

在同一分析条件下分别设置色谱柱温度为 20 °C、30 °C、40 °C, 通过离子对化合物保留时间和峰面积的变化来考察温度对间接光度色谱法的影响。

2.2 结果与讨论

2.2.1 三电层的构建及工作过程

2.2.1.1 三电层的构建

液相色谱柱填料技术的革新和进步催生了新的分析分离技术，这些技术需要应用新的色谱分离分析理论来阐述被分析组分的色谱行为。将现行的色谱柱技术与间接光度色谱法有效地融合在一起，以反相色谱柱作为化学反应器将纳克有机合成（由于每次进样量为纳克水平，故称为纳克有机合成）与生成的共价键化合物的分离分析完美的结合为一体，创造性的打破了传统的色谱分离、分析理念。色谱柱上不仅仅是传统的依据分配系数的不同对组分分离的简单的物理作用场所，而是组分首先在非匀相的柱头发生化学反应，生成供紫外分析的离子对化合物，然后该离子对化合物在柱上物理分离。本研究认为反相亲核加成间接光度色谱法在柱上是化学反应与物理作用的共同作用过程，大量的试验结果对分配色谱的保留机理有了新的理解和认识。

传统的“双电层”理论^[45]已经无法揭示间接光度色谱法色谱柱中的物理和化学反应共同作用的过程，需要提出并证实新的作用机理模式。本文通过大量的试验数据和结果，依据生成的有紫外吸收效应的共价键化合物，提出以三电层的亲核加成反应为主的混合作用机理模式。也就是说在色谱柱内同时存在着双电层和三电层，但是以三电层为主，双电层在整个色谱柱内只是占据了极少的位点。

双电层作用机理模式：反相色谱柱的柱内填料主要是以硅胶为主，现在广泛采用的是人工合成的超纯小颗粒全多孔硅胶和杂化颗粒硅胶材料。硅胶的化学结构见图 2 - 1，硅胶上面键合的硅氧烷键，氢键和游离羟基像触手一样裸漏在外面。由于柱内 $\text{pH} > 3$ ，游离羟基就在丙酸的作用下电离为 H^+ 和 SiO^- ，这些固定相表面上带有负电的硅醇基就是双电层的第一电层；质子化后的二苯胍阳离子因静电作用吸附在上面为第二电层。

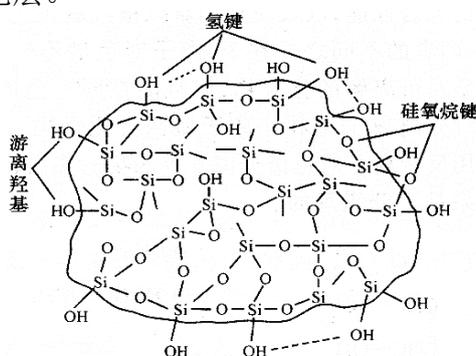


图 2 - 1 硅胶结构示意图

Fig.2 - 1 The structure of silica gel

三电层作用机理模式：**RP8** 色谱柱固定相键合相酰胺基团在流动相改性剂丙酸的作用下质子化，带有正电荷的酰胺基团作为第一电层，单分子排列在固定相表面；流动相改性剂丙酸在水中部分解离为丙酸根阴离子和水合离子，丙酸根阴离子由于共振作用上下两个氧原子各带有 1/2 的负电，下面的氧原子因为静电作用的吸引吸附在酰胺基团上面为第二电层（图 2-2、图 2-3）；流动相中大量存在的离子对试剂二苯胍在丙酸提供的酸性环境下质子化，那么质子化以后的带有正电荷的二苯胍离子由于共振的丙酸根阴离子的吸引吸附在最上面为第三电层。该三电层有些类似于“三明治”。

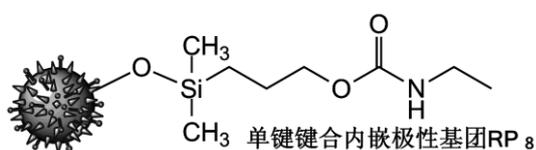


图 2-2 RP8 柱固定相键合相示意图

Fig.2 - 2 The stationary phases of RP8 column

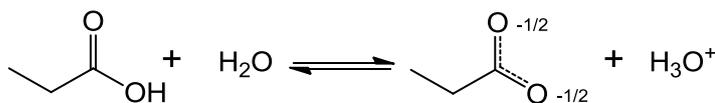


图 2-3 丙酸水解示意图

Fig.2 - 3 The hydrolysis of propionic acid

三电层与双电层混合作用机理模式：色谱柱上双电层与三电层是同时存在的，因为游离羟基在硅胶上只是占据了极少量的位点，所以在混合电层中主要为三电层，双电层极少嵌入其中，固定相三电层示意图见图 2-4。以草甘膦为例的反相亲核加成间接光度色谱法的混合作用机理模式见图 2-5。

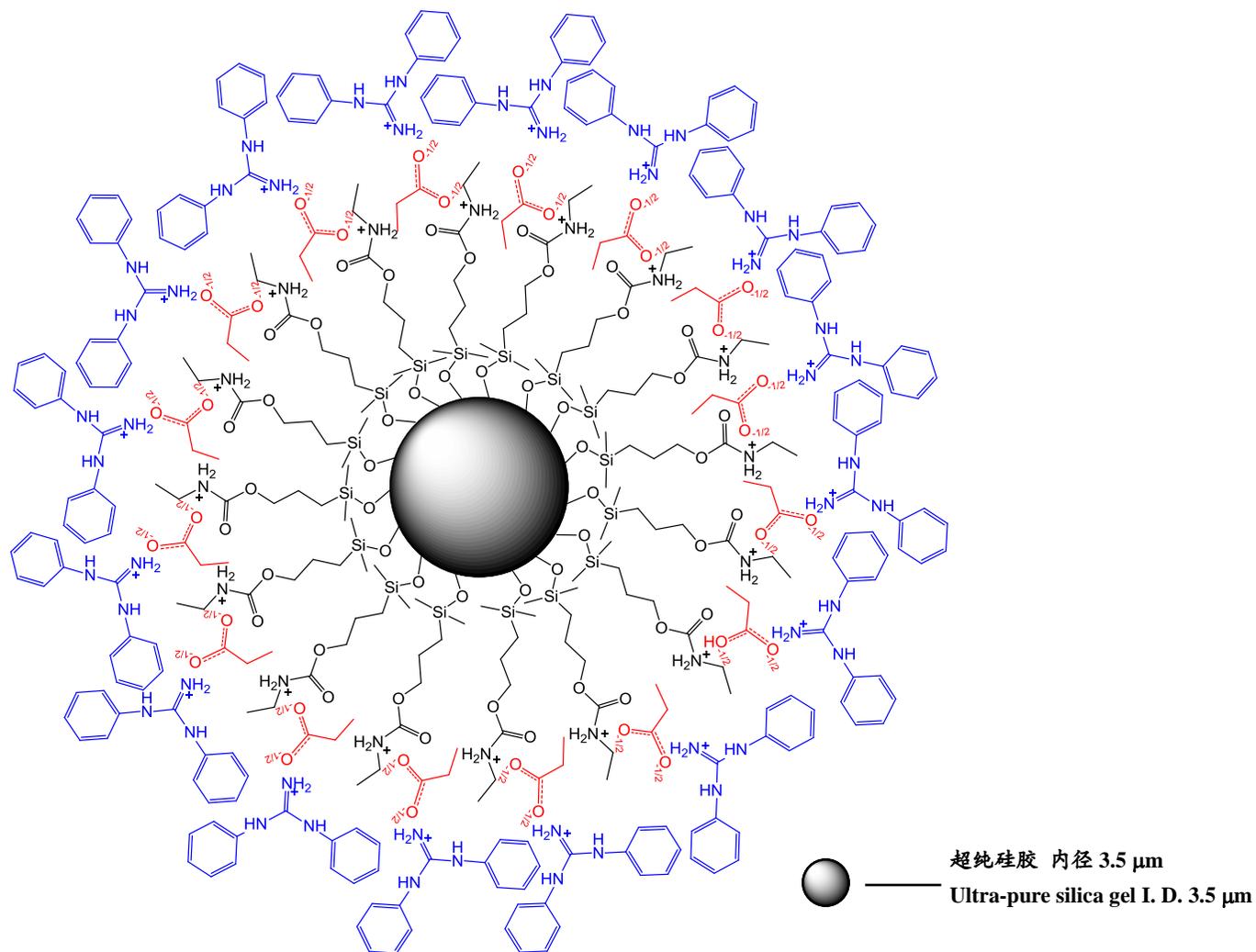


图 2-4 固定相三层示意图

Fig.2 - 4 Illustration of Electric Three-Layer on stationary phase

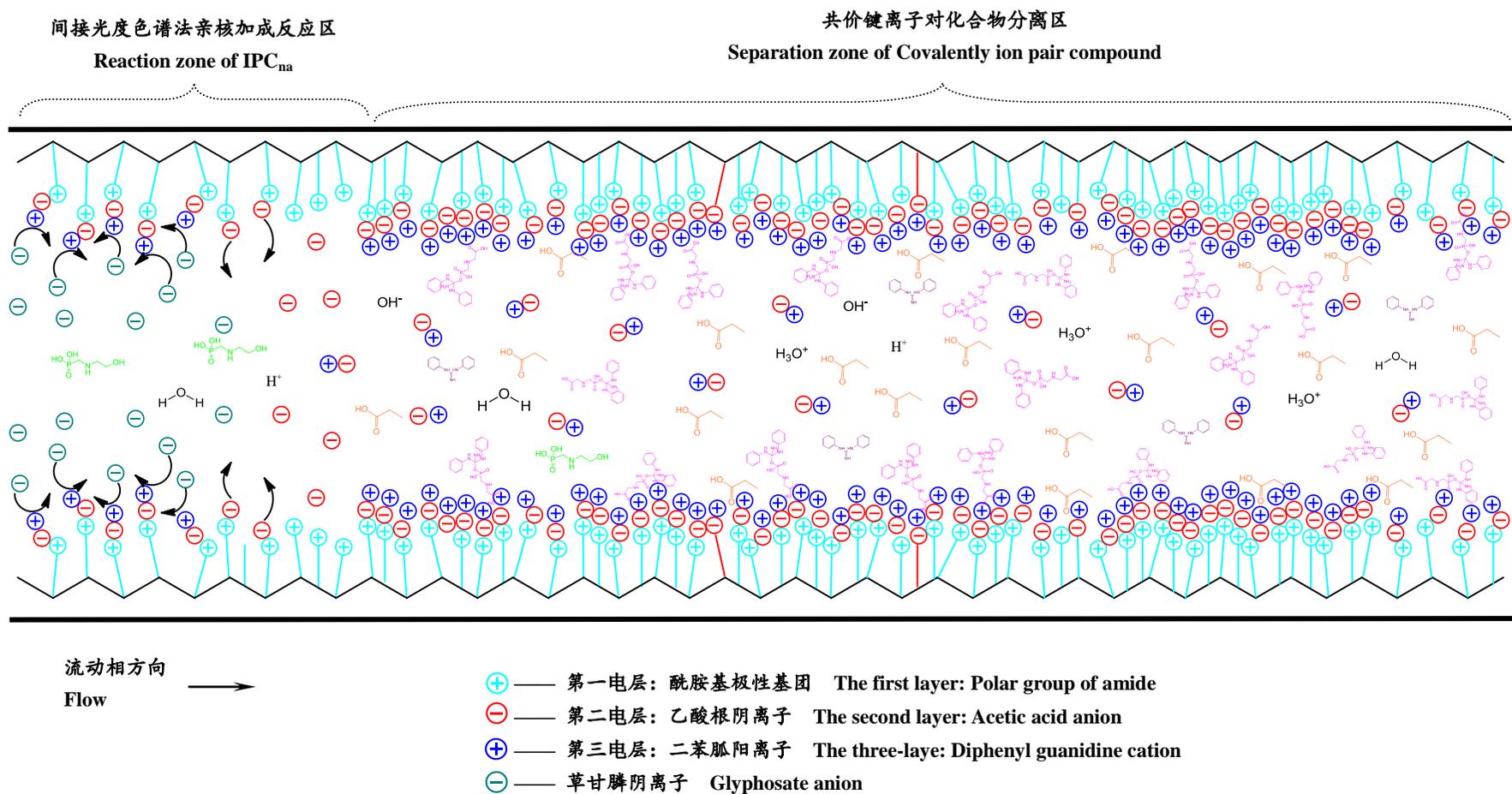


图 2-5 固定相三电层工作过程示意图

Fig.2 - 5 Stationary phase work process diagram of Electric Three-Layer

2.2.1.2 工作过程

三电层工作过程以草甘膦为例，草甘膦进入色谱柱后部分电离为草甘膦阴离子，草甘膦阴离子在流动相携带下，在色谱柱柱头横截面与固定相富集吸附的二苯胍阳离子瞬间反应生成离子对化合物。二者的结合使得该区域内流动相中的二苯胍阳离子浓度迅速下降，同时等比例的释放出改性剂分子，该化合物在柱上被物理分离，即形成保留的紫外透明的负的改性剂系统峰。柱头固定相电层被破坏后，流动相携带的离子对探针会迅速重新建立平衡。随着草甘膦进样浓度的增加，固定相电层平衡破坏越严重就需要流动相提供越多的离子对探针试剂，释放出来的水就会越多，所以该负峰就是水系统峰，它的吸光度值与样品进样浓度呈正相关。

在图 2-5 中可以看出，混合电层中三电层不仅占据了大量的位点同时起到了关键性的作用。绝大部分电离后的草甘膦阴离子由于静电力的作用游离到三电层表面，将最外层的二苯胍阳离子从三电层中抢夺下来，发生亲核加成反应生成新的共价键离子对化合物，该离子对化合物由于疏水性作用在固定相内选择性的保留。草甘膦阴离子在抢夺二苯胍阳离子的同时使得第二电层的丙酸根阴离子也游离了出来，游离出来的丙酸根阴离子与 H_3O^+ 重新结合生成丙酸和水释放到流动相中。丙酸和水分子的涌入使得流动相的浓度降低，就会形成紫外透明的负的改性剂系统峰。与此同时流动相中源源不断的丙酸根阴离子和二苯胍阳离子就会补充上来重新吸附在固定相上。当丙酸根阴离子和二苯胍阳离子再一次铺满固定相形成混合电层的时候也就是整个色谱柱固定相达到静态平衡。

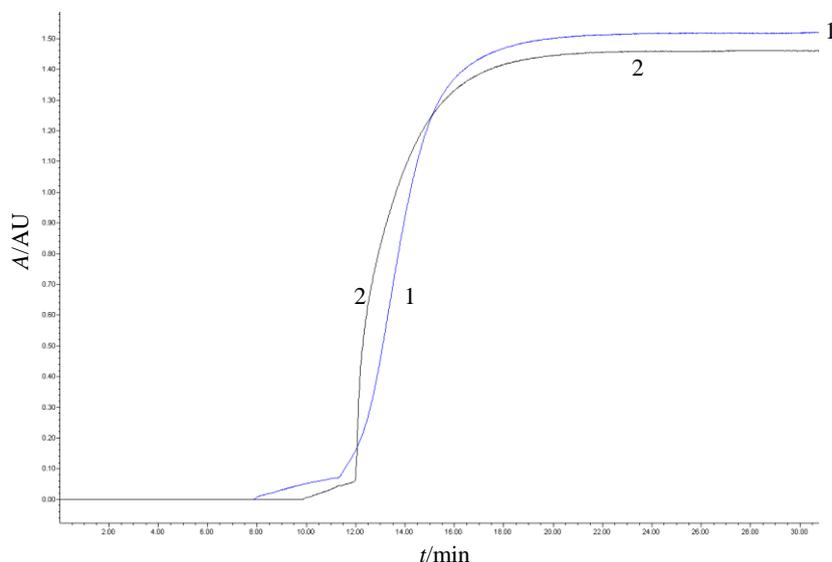
二苯胍在流动相中的水解反应是一个可逆的过程，所以流动相中始终存在着一定数量的分子态的二苯胍，它们不会随着进样浓度的增加而增加，而是与改性剂种类有关，碳链越短的饱和一元酸使得其峰越明显。这些二苯胍分子的存在产生了一个很小的正峰，且该正峰的峰面积与进样浓度无关，称之为离子对探针系统峰。

2.2.2 亲核加成反应的前提—色谱柱中非匀相体系建立

对于以色谱柱为反应器，基于纳克有机合成的亲核加成间接光度色谱技术来讲，色谱系统中存在两个平衡，即整个系统的动态平衡和固定相电层的静态平衡。试验证明，无论是草甘膦还是三乙磷酸铝，该类型亲核加成反应无法在匀相的体系中发生，创造非匀相体系是亲核加成间接光度色谱法的必要条件。

图 2 - 6 分别为色谱柱在草甘膦、三乙磷酸铝分析条件下水起到流动相的平衡过程，从平衡开始到第二个拐点为离子对试剂二苯胍在固定相上的富集时间，需要 11.4 min。流动相速度为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，所以固定相上富集二苯胍的总体积

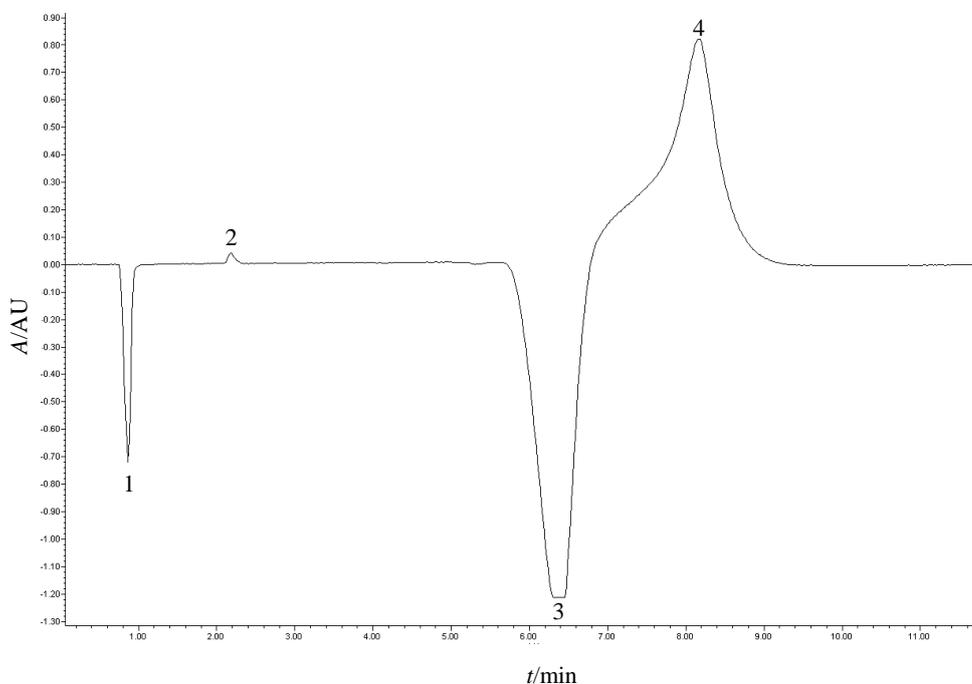
为 13.68 mL。图 2-7 为进样 $1\ 600\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙膦酸铝的色谱分离图，死体积为 0.8 min，通过死体积计算整个柱子容量为 0.96 mL。因流动相浓度相同，可计算出固定相上二苯胍浓度约为流动相上的 14 倍，由此证明色谱柱内三电层的存在创造了一个有利于亲核加成反应的非匀相体系。



1 乙酸 Acetic acid; 2 丙酸 Propanoic acid

图 2-6 三电层构建平衡时间曲线

Fig.2 - 6 Electric three-layer build equilibrium curves



1 水系统峰 system peak of water; 2 离子对探针系统峰 1,3-diphenylguanidine; 3 改性剂系统峰 system peak of modifier, SPM; 4 共价键离子对化合物紫外吸收峰 Covalently ion pair compound (DAD)

图 2-7 进样 $1\ 600\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙膦酸铝的亲核加成间接光度色谱分离图

Fig.2 - 7 The chromatogram of injected $1\ 600\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ fosetyl-aluminium (IPC_{na}-RP-HPLC-DAD)

2.2.3 磷酸(盐)类化合物亲核加成反应机理与新化合物

RP8 柱是指采用内嵌极性酰胺基团的键合相技术,可以在 100 % 水相条件下对极性化合物有极高保留的 C₈ 色谱柱。它适用于分离高极性化合物或进行离子对分析。用 100 % 水做流动相时可保持稳定,保证填料寿命长,不塌陷。极性嵌入基团能够和流动相中的水形成氢键,使填料表面形成一层“水膜”,从而减弱了硅胶表面残留的硅醇基和离子对化合物的相互作用,从而极大地改善了峰形。在 IEC-CD 和离子对 RP-HPLC-ELSD 的研究基础上,通过 DAD、ELSD 双通道同步监测,筛选出一种高效、易得、廉价、低毒、安全的芳香胍类离子对探针试剂二苯胍,用来分析无紫外吸收的磷酸(盐)类农药。以草甘膦的反相间接光度高效液相色谱法为例,介绍以反相色谱柱为化学反应器的纳克有机合成过程(图 2-8)。二苯胍作为离子对探针试剂被添加到流动相中,在流动相改性剂丙酸的作用下质子化。质子化后的二苯胍带有一定的正电荷充满了整个色谱柱,当分析目标化合物草甘膦进入到色谱柱以后,在 100 % 水相的流动相中部分电离为草甘膦阴离子。草甘膦阴离子中的氧负离子进攻二苯胍的中心原子碳发生亲核加成反应并生成新的共价键离子对化合物,与此同时新生成的离子对化合物在流动相改性剂丙酸的调节下选择性的保留。三乙磷酸铝与二苯胍的反应机理同草甘膦,柱上化学反应式见图 2-9。对生成的两个新离子对化合物,采用其分子式、结构式查询,在 SciFinder、ChemSpider 数据库中检索均未发现其著录^[64-65]。

磷酸(盐)类农药阴离子即为亲核试剂,二苯胍作为反应底物二者在色谱柱上创造的非匀相体系下,与其横截面瞬间完成亲核加成化学反应,生成新的离子对化合物。该离子对化合物不同于以往的阴、阳离子在静电力的作用下相互吸引形成的缔合物。缔合物在离开流动相这个特定的环境下又会解离成原来的阴、阳离子,而共价键离子对化合物则稳定。把反相色谱柱当作一个痕量间歇固定床反应器,在该反应器内发生的化学反应生成了稳定易保留的具有紫外吸收的新物质。也就是说组分在色谱柱内不再是简单的物理分配行为,而是集化学反应和物理分配于一身的共同综合作用的复杂过程。更为重要的是该反应物料用量仅为纳克级水平,这项研究成果为未来痕量有机合成提供借鉴。

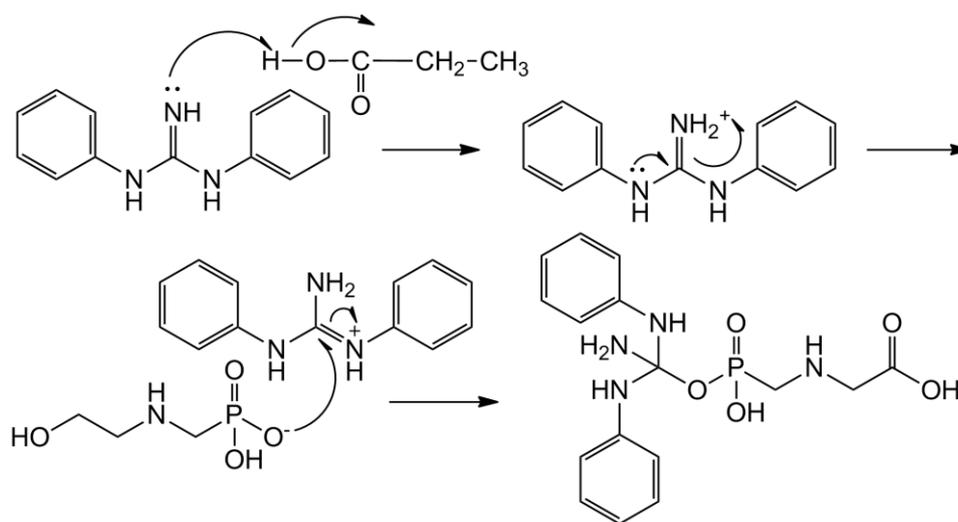


图 2-8 草甘膦与二苯胍反应机理图

Fig.2 - 8 The reaction mechanism of glyphosate with 1,3-diphenylguanidine

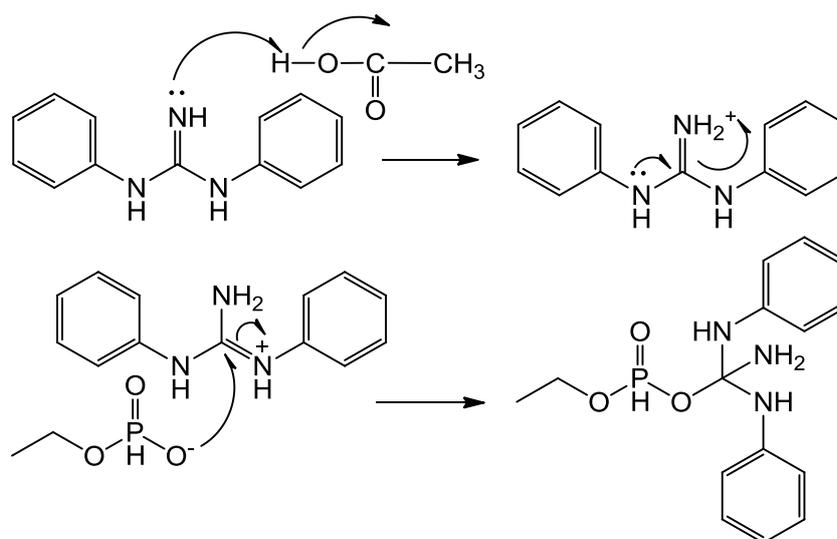


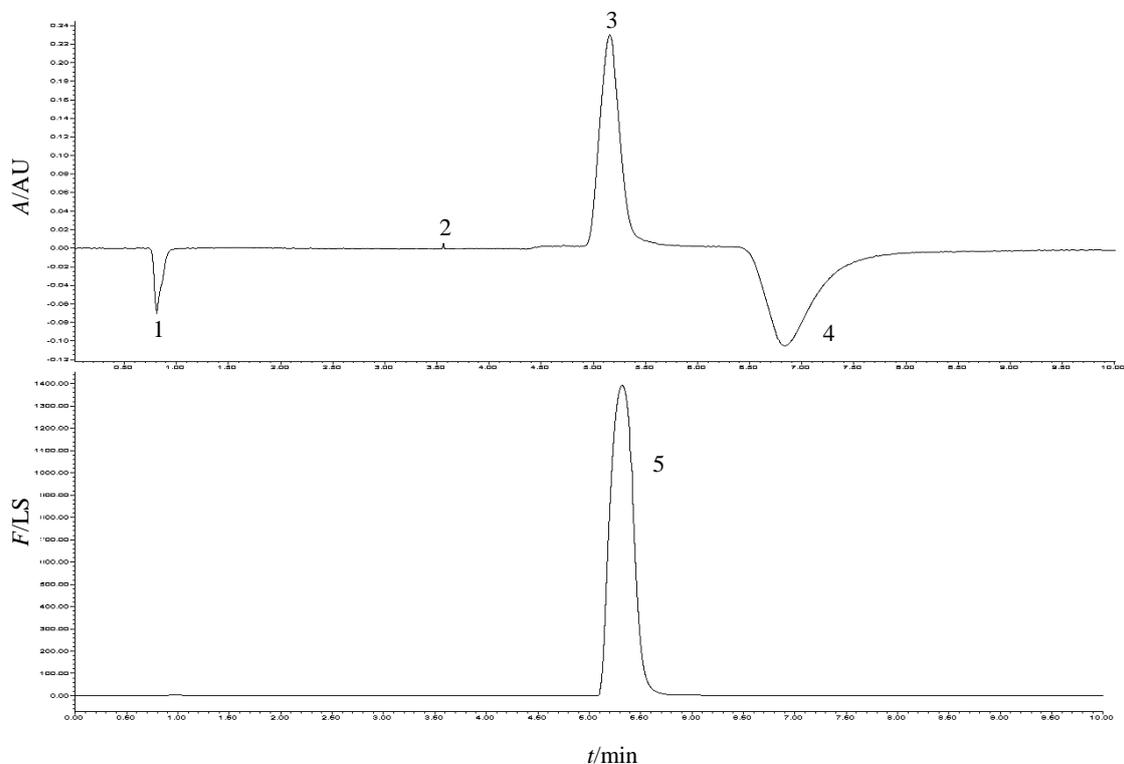
图 2-9 三乙磷酸铝与二苯胍反应机理图

Fig.2 - 9 The reaction mechanism of fosetyl-aluminium with 1,3-diphenylguanidine

2.2.4 ELSD 离子对化合物同步信号监测

磷酸（盐）类农药亲核加成间接光度色谱法之所以开发成功，得益于 ELSD。它在方法优化、离子对化合物生成的判定上发挥了重要作用。当待测阴离子未同离子对探针结合时，几乎无保留迅速流出，在 ELSD 通道可观测到信号，而紫外通道则无信号显示；如果生成了离子对化合物，在 DAD、ELSD 两个通道会产生相差约十秒的同步信号，证实了亲核加成反应的发生（图 2 - 10、图 2 - 11）。当

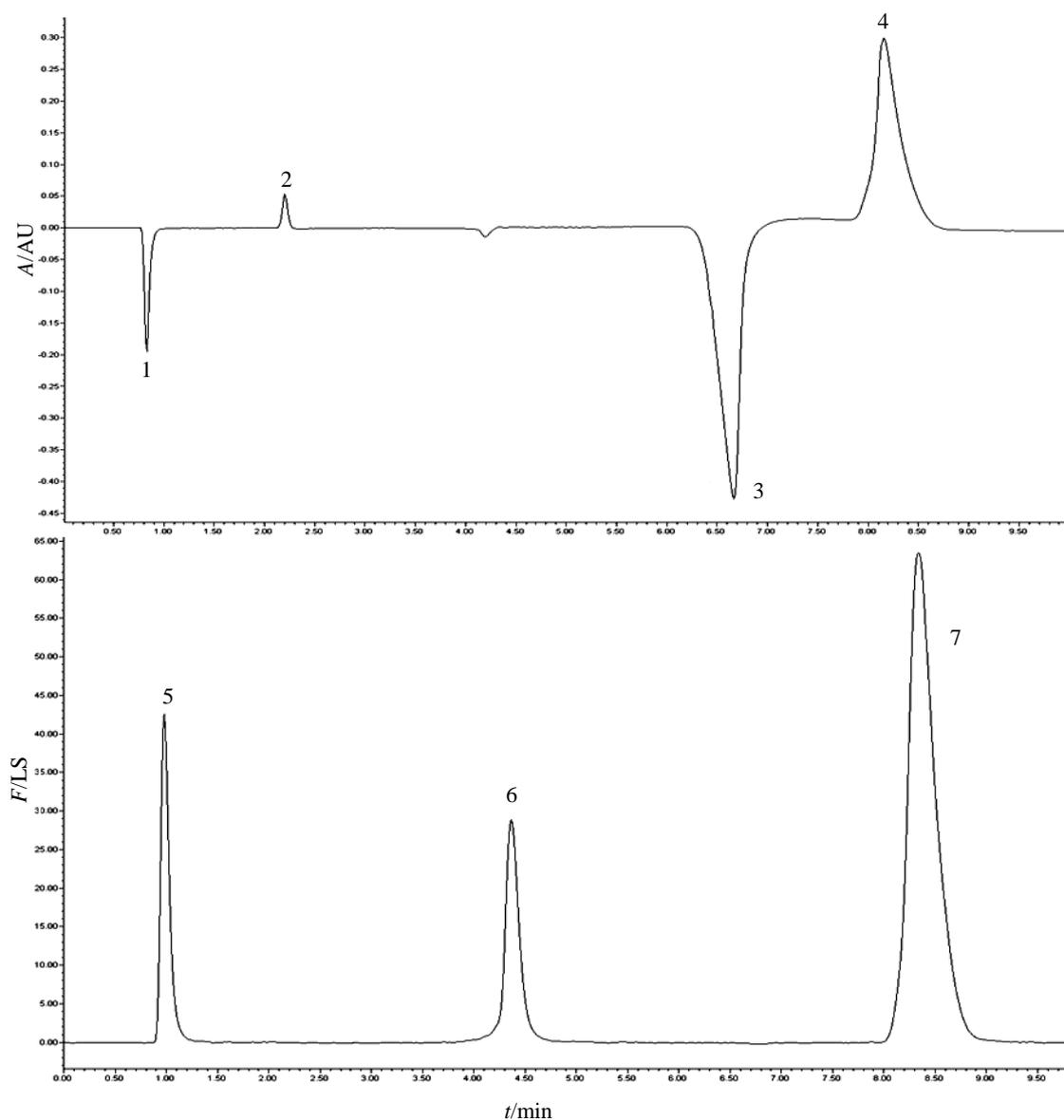
流动相中二苯胍的浓度为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，不影响 ELSD 通道信号的监测； $\geq 0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时会形成干扰无法观测到产生的信号。



- 1 水系统峰 system peak of water; 2 离子对探针系统峰 1,3-diphenylguanidine;
 3 共价键离子对化合物紫外吸收峰 Covalently ion pair compound (DAD); 4 改性剂系统峰 SPM; 5 共价键离子对化合物蒸发光散射色谱峰 Covalently ion pair compound (ELSD)

图 2 - 10 DAD、ELSD 双通道同时监测草甘膦亲核加成间接光度色谱分离图

Fig.2 – 10 Chromatogram of glyphosate's ion pair compound simultaneously using DAD, ELSD by IPC_{na}



1 水系统峰 system peak of water; 2 离子对探针系统峰 1,3-diphenylguanidine; 3 改性剂系统峰 SPM; 4 共价键离子对化合物紫外吸收峰 Covalently ion pair compound (DAD); 5 未知物 Unknown peak; 6 亚磷酸根 H_2PO_3^- ; 7 共价键离子对化合物蒸发光散射色谱峰 Covalently ion pair compound (ELSD)

图 2 - 11 DAD、ELSD 双通道同时监测三乙磷酸铝亲核加成间接光度色谱分离图

Fig.2 - 11 Chromatogram of fosetyl-Al's ion pair compound simultaneously using DAD, ELSD by IPC_{na}

2. 2. 5 离子对化合物精确相对分子质量的在线测定

通过 LC-Q/TOF 的测定磷酸（盐）类农药代表性品种草甘膦、三乙磷酸铝与离子对试剂反应生成的离子对化合物精确相对分子质量，证实了柱上确实发生了亲核加成反应。经测定，草甘膦与离子对探针试剂二苯胍反应生成的离子对化合物准分子离子峰 m/z 379.1238 u，因质谱测定模式为 $\text{M}-\text{H}$ (1.0078 u)，所以反应

生成的离子对化合物相对分子质量测量值为 m/z 380.1316 u, 而草甘膦离子对化合物理论值为 m/z 380.1244 u, 误差为 18.99 ppm, 其质谱图见图 2 - 12。同理, 三乙磷酸铝离子对化合物测量值为 m/z 321.1307 u, 理论值为 321.1237 u, 误差为 21.95 ppm, 其质谱图见图 2 - 13。采用 $(m/z_{\text{测量值}} - m/z_{\text{理论值}}) / m/z_{\text{理论值}}$ 计算测定误差一般应为 ± 5 ppm, 本试验误差稍大的原因与在线测量有关, 特别是离子对探针试剂的影响, 但总体来看测量值与理论值基本吻合。

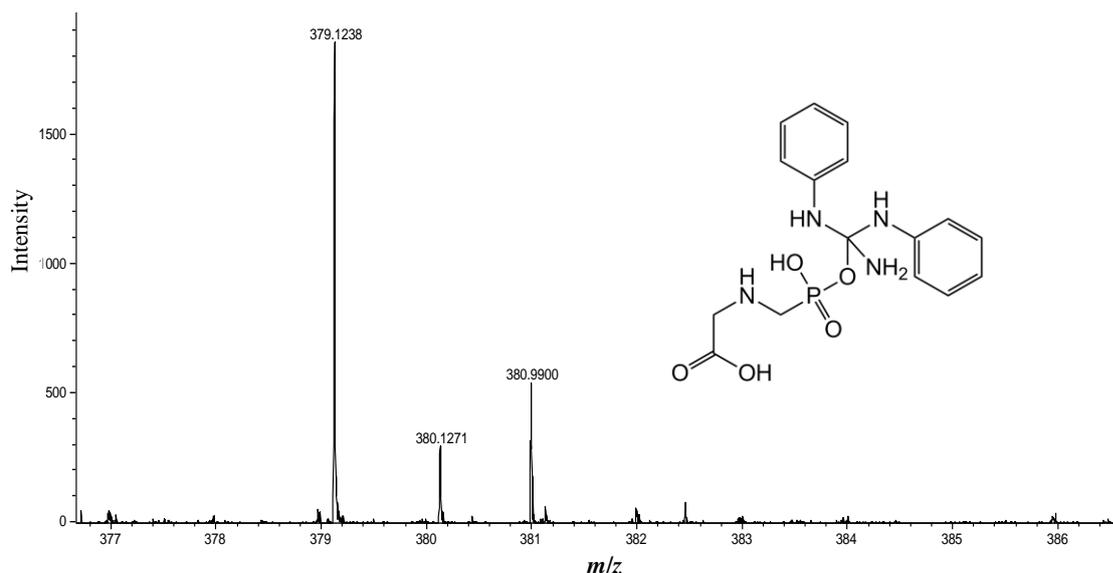


图 2 - 12 草甘膦离子对化合物的质谱图

Fig.2 - 12 Mass spectrum of glyphosate ion pairs compound (ESI⁻)

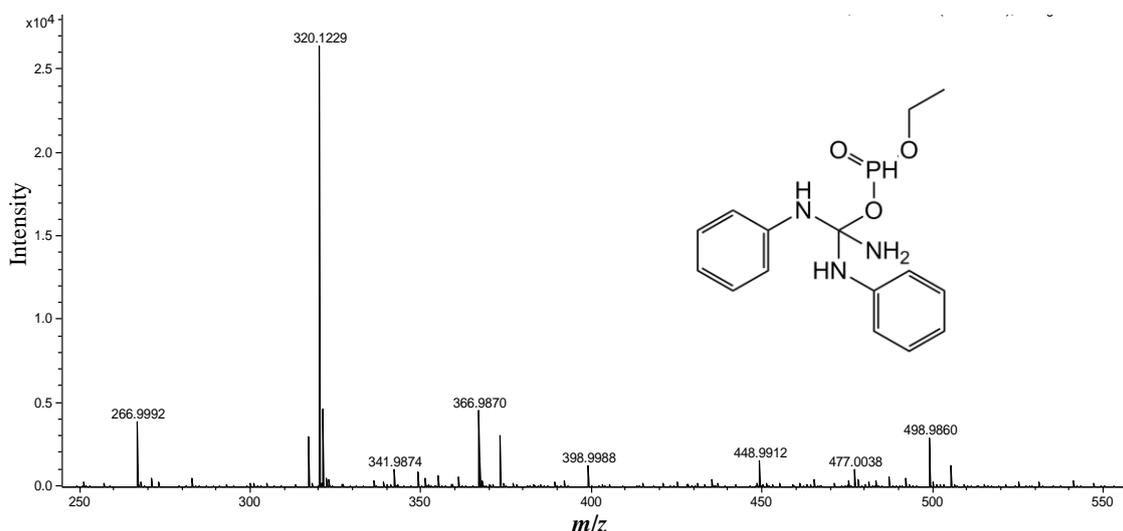


图 2 - 13 三乙磷酸铝离子对化合物的质谱图

Fig.2 - 13 Mass spectrum of fosetyl-aluminium ion pairs compound (ESI⁻)

2.2.6 色谱柱温度对间接光度色谱法的影响结果

随着色谱柱温度的逐渐增加, 离子对化合物保留时间呈减小趋势, 且离子对

化合物峰面积大幅度下降。柱温每升高 10℃，离子对化合物峰面积减小 1/3。由此可以看出，过高的温度不利于亲核加成反应的进行和离子对化合物的生成。

2.3 小结

有机磷酸（盐）类化合物的间接光度色谱法，在色谱柱技术不断进步的前提下，特别是纯水流动相RP色谱柱的应用使之进入实用化阶段，进而带动相关领域类似化合物的合成与检测。突破传统的色谱柱仅是物理分离的观念，实现了纳克有机合成与分离、分析检测快速同步一体化巧妙结合。离子对探针试剂二苯胍为有机离子，被分析物也为有机离子，因此与无机离子间接光度色谱法，IEC分离机理不同，生成物也不同，不是传统的离子缔合物。磷酸（盐）类阴离子为亲核试剂，二苯胍为反应底物，在非匀相体系中能发生亲核加成反应生成新的共价键化合物（如草甘膦、三乙磷酸铝柱上衍生物）用于反相高效液相色谱分离紫外检测。以反相色谱柱作为痕量间歇固定床反应器，进一步揭示了离子对探针的作用机理，首次提出并证实三电层为主的亲核加成柱上反应作用机理模式，揭示了亲核加成间接光度色谱法成败的关键所在，丰富了对间接光度离子对色谱法的认识。生成的离子对化合物精确相对分子质量已被测定，但分子立体结构尚需要NMR确证。

第三章 基于纳克有机合成间接光度色谱法的建立及优化

在已筛选出的离子对探针紫外试剂二苯胍的基础上，建立以草甘膦、三乙磷酸铝为代表的磷酸（盐）类农药的亲核加成间接光度色谱分析法，采用目前最为成熟的反相高效液相色谱紫外检测器进行测定。建立的分析方法，需要经过反复比对选择和优化，确定最佳的色谱分离柱和最优的色谱分析条件。明确不同化合物所需的离子对探针试剂浓度，改性剂的种类及浓度对保留值和响应值的影响。通过深入研究，本文方法将会为社会公共检测领域提供优质的技术服务，并对离子型化合物的同类分析方法建立起到引导作用。

3.1 材料与方法

3.1.1 仪器与设备

色谱柱：Waters Symmetry Shield RP18, 5 μm (4.6 mm \times 250 mm)、Waters Symmetry Shield RP18, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm)、Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm)、Waters XBridge Shield RP18, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm)、Waters XSELECT CSH C₁₈, 2.5 μm (4.6 mm \times 75 mm)、Waters XTerra RP18, 5 μm (3.9 mm \times 150 mm)、Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈, 5 μm (4.6 mm \times 250 mm)、SinoChrom ODS-BP C₁₈, 5 μm (4.6 mm \times 250 mm)、Venusil MP C₁₈, 5 μm (4.6 mm \times 250 mm), 余同2.1.1.1。

3.1.2 试剂和溶液

3.1.2.1 草甘膦

草甘膦原药：95%，安徽中山化工有限公司；

草甘膦铵盐水剂：33%，南通江山农药化工有限公司；

草甘膦异丙胺盐水剂：41%，美国孟山都公司。

3.1.2.2 三乙磷酸铝

三乙磷酸铝可湿性粉剂：80%，山东大成农药股份有限公司。

3.1.2.3 改性剂

甲酸、丁酸、戊酸、己酸均为AR，国药集团化学试剂有限公司；

甲醇、乙腈，HPLC级，天津四友精细化学品有限公司。

余见2.1.2。

3.1.3 分析条件

3.1.3.1 草甘膦

见 2.1.3.1.1。

3.1.3.2 三乙磷酸铝

见 2.1.3.1.2。

3.1.4 离子对探针试剂的筛选

3.1.4.1 原则

建立磷酸（盐）类农药代表性品种草甘膦、三乙磷酸铝的反相间接光度色谱分析方法，离子对探针试剂的筛选至关重要。根据目标化合物的相关性质，优先筛选文献中已经报道的可能离子对探针试剂。因目标化合物草甘膦和三乙磷酸铝显弱酸性，所以离子对探针试剂应为强碱型化合物。直链胺碱性最强但是无紫外吸收，通过文献检索确定芳香胺类化合物为最优离子对探针试剂。

3.1.4.2 供筛选的离子对探针试剂

盐酸吡啶、苄基三甲基溴化铵、苄基三乙基溴化铵、苄基三丁基溴化铵、苄基三乙基氯化铵、盐酸酪胺、灿烂绿、磺胺胍、二苯胍、二邻联甲苯基胍、对胍基苯甲酸盐酸盐、对茴香胺、盐酸邻联甲苯胺、盐酸苯肼。

3.1.5 分析条件的优化

3.1.5.1 草甘膦

3.1.5.1.1 色谱柱的选择

选定流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸水溶液，流速为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，分别选用3.1.1色谱柱对草甘膦进行测定，选择最佳的色谱柱。

3.1.5.1.2 离子对试剂浓度的选择

采用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，分别选用浓度为 $0.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.06 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸水溶液作为流动相对草甘膦进行测定，依据离子对化合物响应值，确定离子对试剂浓度。

3.1.5.1.3 改性剂的选择

流动相改性剂是影响离子对化合物保留和峰形的关键因素。使用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，选定流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液，分别选用甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸作为流动相改性剂对草甘膦进行测定，

依据离子对化合物响应值及保留值，选择最佳的流动相改性剂。

3.1.5.1.4 改性剂浓度的选择

使用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，选定流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液，分别选用浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙酸作为流动相改性剂对草甘膦进行测试，选择最佳流动相改性剂浓度。

3.1.5.1.5 有机溶剂的选择

采用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，分别用甲醇： $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸 = 4 : 96 (V/V)、乙腈： $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸 = 8 : 92 (V/V) 作为流动相对草甘膦进行测定，尝试选择合适的有机溶剂。

3.1.5.2 三乙磷酸铝

3.1.5.2.1 色谱柱的选择

选定流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液，分别选用 3.1.1 色谱柱对三乙磷酸铝进行测定，选择最佳的色谱柱。

3.1.5.2.2 离子对试剂浓度的选择

使用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，分别选用浓度为 $0.06 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液作为流动相对三乙磷酸铝进行测定，选择最佳的离子对试剂浓度。

3.1.5.2.3 改性剂的选择

使用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，固定流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液，分别选用甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、甲酸/乙酸、甲酸/丙酸、乙酸/丙酸、磷酸、三氟乙酸作为流动相改性剂对三乙磷酸铝进行测定，选择最佳的流动相改性剂。

3.1.5.2.4 改性剂浓度的选择

使用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，固定流动相为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液，分别选用浓度为 $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $34 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $38 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸作为流动相改性剂对三乙磷酸铝进行测试，选择最佳流动相改性剂浓度。

3.1.5.2.5 流动相的选择

使用 Waters Symmetry Shield RP8 色谱柱，分别用甲醇： $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸 = 4 : 96 (V/V)、乙腈： $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸 = 8 : 92 (V/V) 作为流动相对三乙磷酸铝进行测定，选择合适的流动相。

3.2 结果与讨论

3.2.1 离子对探针试剂筛选结果

分别采用 3.1.4.2 中提供的离子对探针试剂对磷酸(盐)类代表品种草甘膦、三乙磷酸铝进行了测定。经过多次反复试验,苄基三甲基溴化铵、苄基三乙基溴化铵、苄基三丁基溴化铵、苄基三乙基氯化铵、盐酸酪胺、灿烂绿、磺胺胍、对茴香胺不能与草甘膦和三乙磷酸铝形成离子对化合物。盐酸苯胍、对胍基苯甲酸盐酸盐可与目标化合物成对,但是离子对化合物在柱内没有保留且响应值低。盐酸吡啶、二邻联甲苯基胍、盐酸邻联甲苯胺与目标化合物成对效率较好,但是离子对化合物不易流出,离子对峰拖尾严重,分析周期过长。

胍是一种强碱,二苯胍由于连接了两个苯环,在 232 nm 表现出较强的紫外吸收^[66]。另外在苯环供电子效应的影响下使得二苯胍的碱性大大增强,然后在流动相改性剂一元羧酸的作用下形成胍鎓正离子并与目标化合物反应形成稳定的共价键化合物^[67,68]。经过大量的比对试验工作确定二苯胍为磷酸(盐)类农药分析的合适离子对探针试剂。它是一种高效、易得、廉价、低毒、安全的离子对探针紫外试剂。不会有一种理想的离子对探针试剂,应根据需要待测组分的分子结构特点来自主设计出最佳的离子对探针分子。深入研究的工作是依据三电层作用机理模式,认识规律,设计出适用于不同磷酸(盐)类化合物分子结构的系列芳香胍类离子对探针试剂,满足分离、保留值、峰形和灵敏度的综合要求。

3.2.2 草甘膦分析条件

间接光度色谱法通常不适于用流动相作为样品的稀释剂,因为流动相中含有大量的改性剂酸根阴离子(浓度通常高于样品阴离子一个数量级)会显著地破坏固定相上离子对探针电层的平衡,从而导致分析的复杂化。

3.2.2.1 色谱柱

使用杂化一代、二代颗粒技术等生产的色谱柱(HPT、BHC、CSH)并不太适合于短碳链的磷酸(盐)类化合物间接光度色谱法,分析其主要原因是固定相引进了 Si-C 键、Si-C-C-Si 键导致柱极性下降。长碳链的磷酸(盐)类化合物可以用一、二代杂化颗粒柱并已在企业生产实践中得到应用。超纯硅胶柱更适合极性较大、碳链较短的磷酸(盐)类化合物。通过对比 3.1.1 色谱柱的分离情况,选用 Waters Symmetry Shield RP8, 5 μm (4.6 mm \times 150 mm) 色谱柱作为分离柱。几种典型色谱柱的流出曲线见图 3-1。三电层平衡所需要的时间大致 0.5 h。

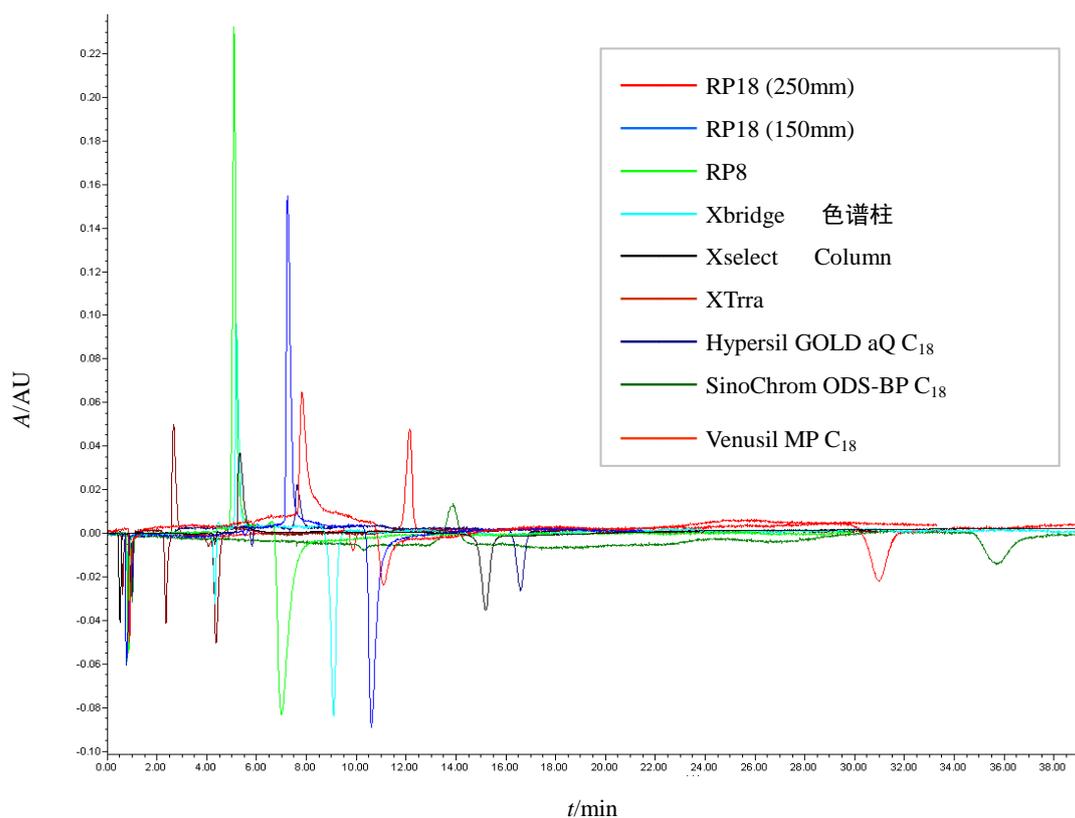


图 3 - 1 几种典型色谱柱的草甘膦间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 1 The chromatogram of glyphosate using several typical column by IPC_{na}

流动相: $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine / $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ propionate aqueous solution;
 流速: Xselect, $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; SinoChrom ODS-BP C₁₈、RP18 (250mm), $1.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 余为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 提取波长: 232 nm。

3. 2. 2. 2 离子对试剂浓度

在 3. 1. 5. 1. 2 中选择了不同浓度的二苯胍对草甘膦进行测定, 如图 3 - 2 所示。随着二苯胍浓度的增加, 草甘膦的响应值呈现出增加的趋势, 且色谱峰的信噪比也逐渐变大。当二苯胍浓度大于 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 草甘膦响应值增加的趋势趋于平缓, 兼顾合适的保留时间和良好的分离及信噪比, 选择 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍作为离子对试剂最佳浓度。

3. 2. 2. 3 改性剂种类

选择 6 种饱和一元羧酸作为流动相改性剂对草甘膦进行测定, 结果表明乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸均可成对。图 3 - 3 中, 甲酸与草甘膦不能成对, 乙酸虽然成对响应值较高, 但是离子对化合物无法同 SPM 获得良好分离。除甲酸外, 其他改性剂对离子对化合物与 SPM 分离影响均为展开式, 即二者在时间坐标相距随着碳链增加而增加。甲酸与上述现象相反, 在分析三乙膦酸铝时表现为聚

拢式。通过分析认识到这是改性剂极性降低及导致色谱柱固定相极性升高双重作用的缘故。综合考虑选用丙酸为分析草甘膦时的改性剂,其离子对化合物保留时间适中,峰型较对称,没有拖尾现象,不但可以获得较好的分离而且分析周期短,所以确定其为合适的改性剂。

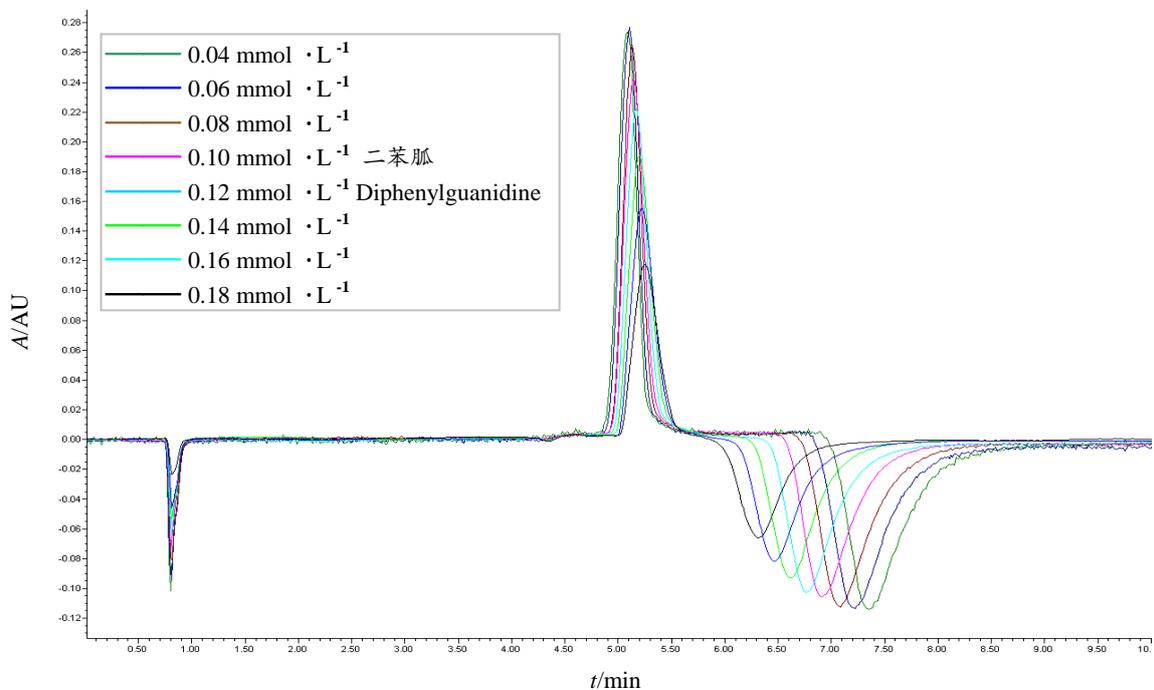


图 3-2 不同浓度离子对试剂草甘膦间接光度色谱分离图

Fig.3 - 2 The chromatogram of different concentration ion pair reagent for glyphosate by IPC_{na}

色谱柱: Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6 mm×150 mm);
 流动相: 不同浓度的二苯胍 / 2 mmol · L⁻¹ propionate aqueous solution;
 流速: 1.2 mL · min⁻¹;
 提取波长: 232 nm。

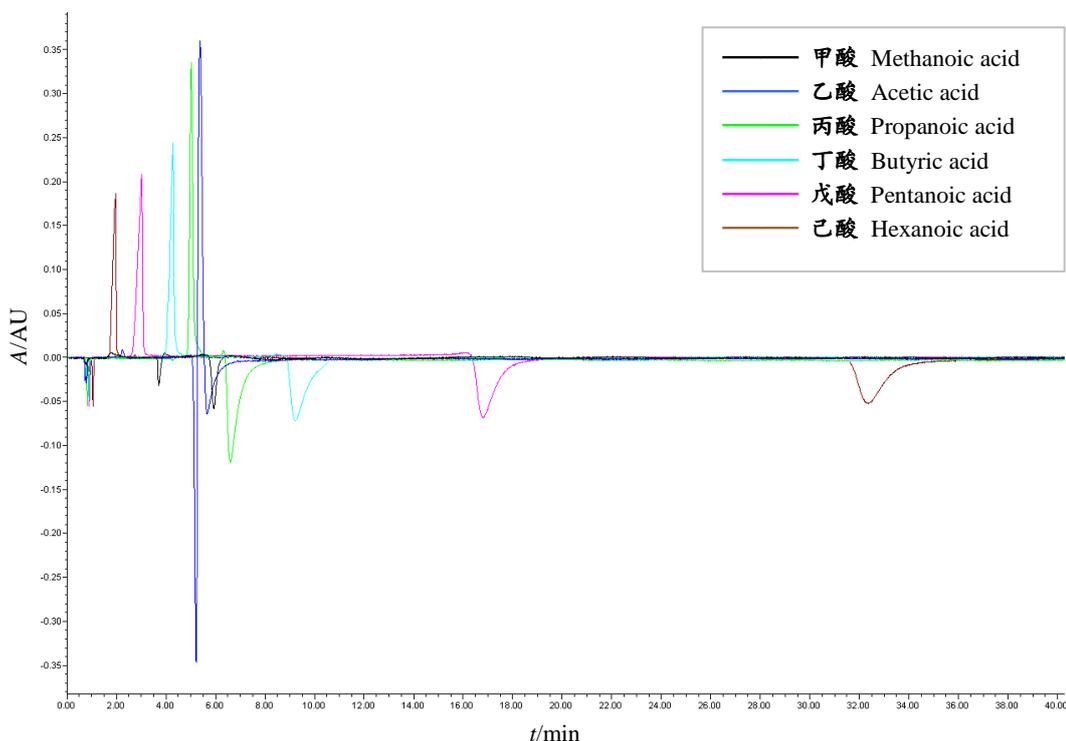


图 3-3 不同种类改性剂的草甘膦间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 3 The chromatogram of different modifier for glyphosate by IPC_{na}

色谱柱: Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm);
 流动相: 0.12 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine / 0.015 % 不同种类的酸水溶液;
 流速: 1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 提取波长: 232 nm。

3. 2. 2. 4 改性剂浓度

图 3 - 4 表明了改性剂浓度在 1.0 ~ 4.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 对草甘膦响应值和保留行为的影响。随着丙酸浓度的不断增加, 草甘膦响应值先增加后降低, 丙酸浓度为 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时草甘膦响应值最大。但是此时草甘膦与其杂质亚硝基草甘膦不能完全分离。兼顾草甘膦与杂质的分离, 改性剂选定 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸水溶液。丙酸浓度过高会抑制草甘膦的解离。通过改性剂种类和浓度的优化, 表明改性剂的碳链越长、使用浓度越低色谱柱三电层平衡建立的就越慢。

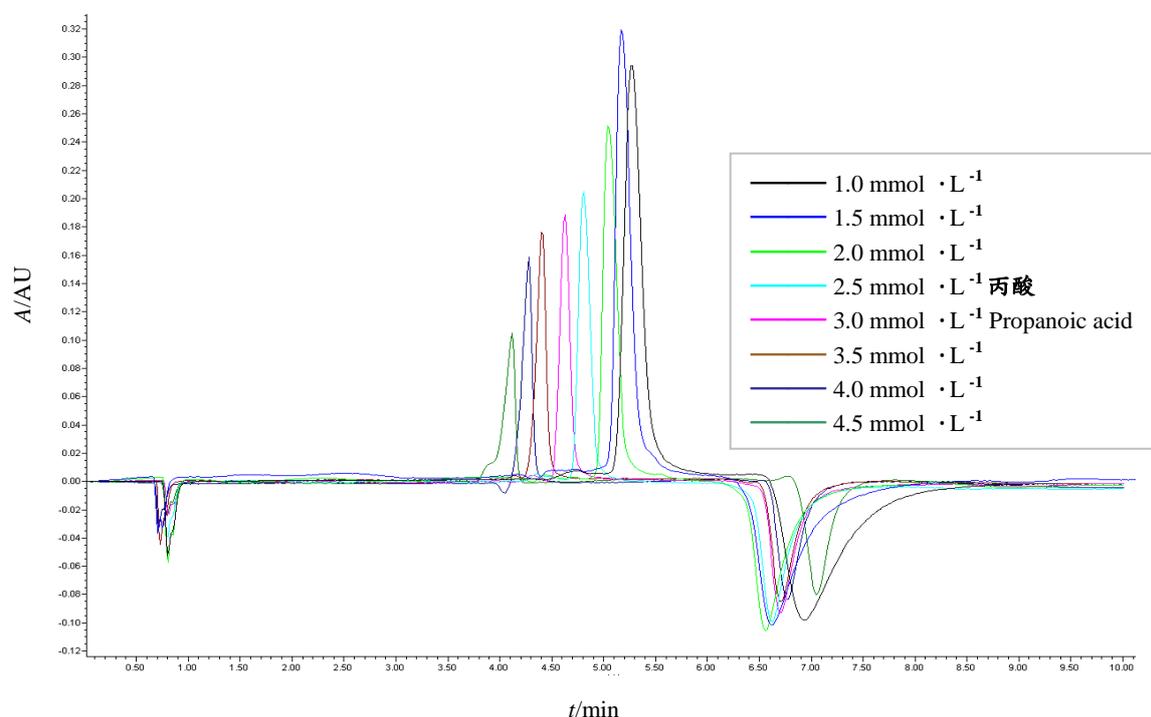


图 3-4 不同浓度改性剂的草甘膦间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 4 The chromatogram of different concentration modifier for glyphosate by IPC_{na}

色谱柱: Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm);
 流动相: 0.12 mmol \cdot L⁻¹ diphenylguanidine / 不同浓度的丙酸水溶液;
 流速: 1.2 mL \cdot min⁻¹;
 提取波长: 232 nm。

3. 2. 2. 5 有机溶剂

由于草甘膦离子对化合物极性较强, 保留值位于改性剂系统峰之前, 有机溶剂的加入大大减小了离子对化合物的保留值, 所以该试验选择不加入有机溶剂进行优化。

3. 2. 3 三乙磷酸铝分析条件

3. 2. 3. 1 色谱柱

通过对比 3. 1. 1 色谱柱的分离情况, 最终也同样选用 Waters Symmetry Shield RP8, 5 μm (4.6 mm \times 150 mm) 色谱柱作为三乙磷酸铝的分离色谱柱。详细情况见图 3-5。

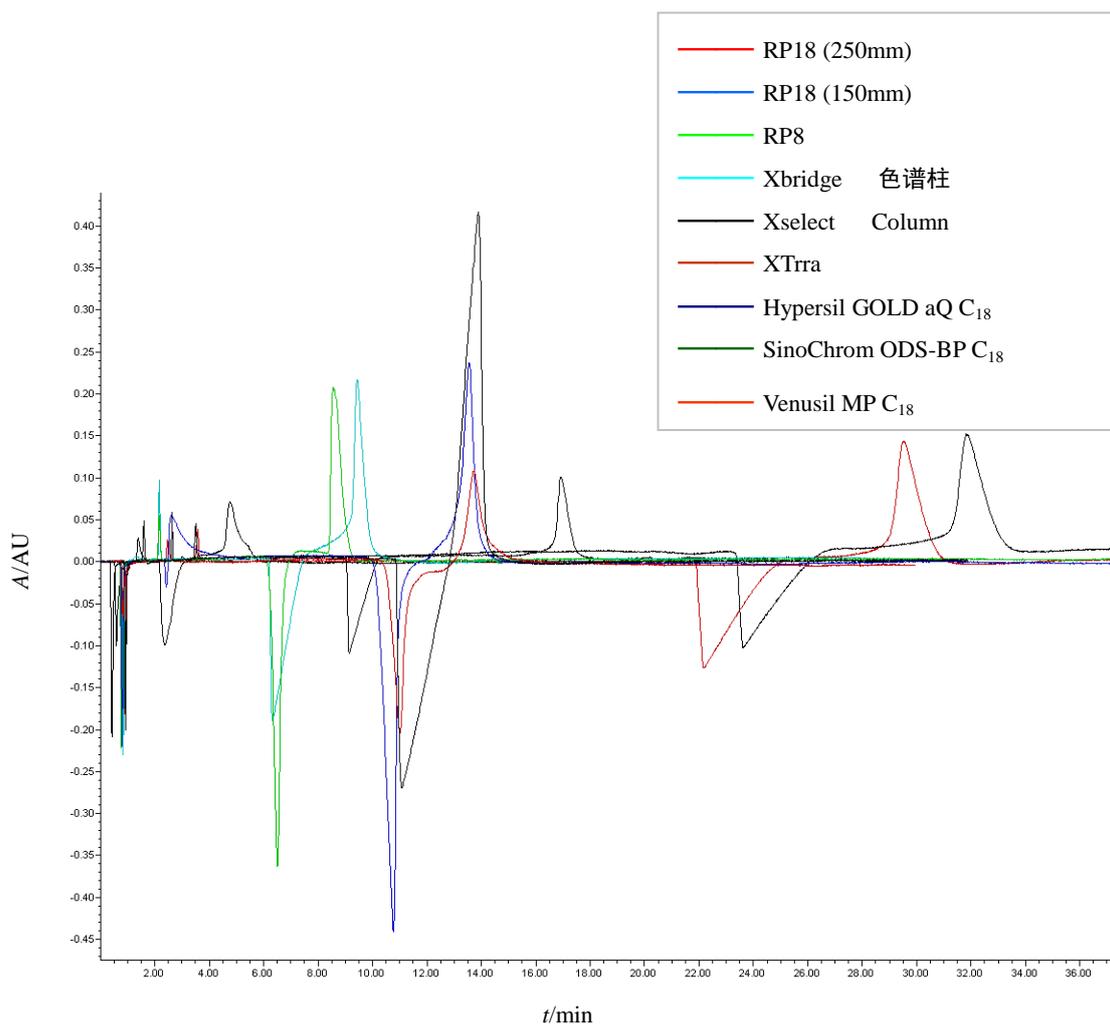


图 3-5 几种典型色谱柱的三乙磷酸铝间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 5 The chromatogram of foseetyl-aluminium using several typical column by IPC_{na}

流动相: $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine / $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetic aqueous solution

流速: Xselect, $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; SinoChrom ODS-BP C₁₈、RP18 (250mm), $1.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
余为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;

提取波长: 232 nm。

3. 2. 3. 2 离子对试剂浓度

在 3. 1. 5. 2. 2 中选择了不同浓度的二苯胍对三乙磷酸铝进行测定, 如图 3-6、3-7。所示三乙磷酸铝响应值随着二苯胍浓度的增加不断增加, 当二苯胍浓度大于 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其响应值趋于平稳。二苯胍作为离子对试剂添加在流动相中, 因其本身具有紫外吸收, 如果浓度过大基线噪声也会相应增加, 严重影响测定结果。最终选定 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为二苯胍的最佳浓度。

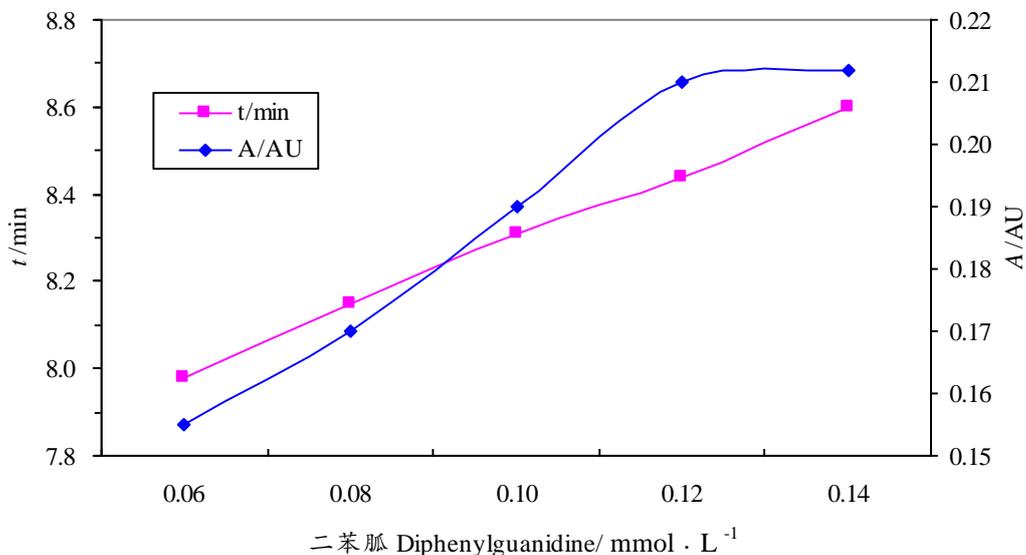


图 3-6 不同浓度离子对试剂对三乙磷酸铝保留时间、响应值的影响

Fig.3 - 6 Effect on retention time, response of fosetyl-aluminium with different concentration modifier by IPC_{na}

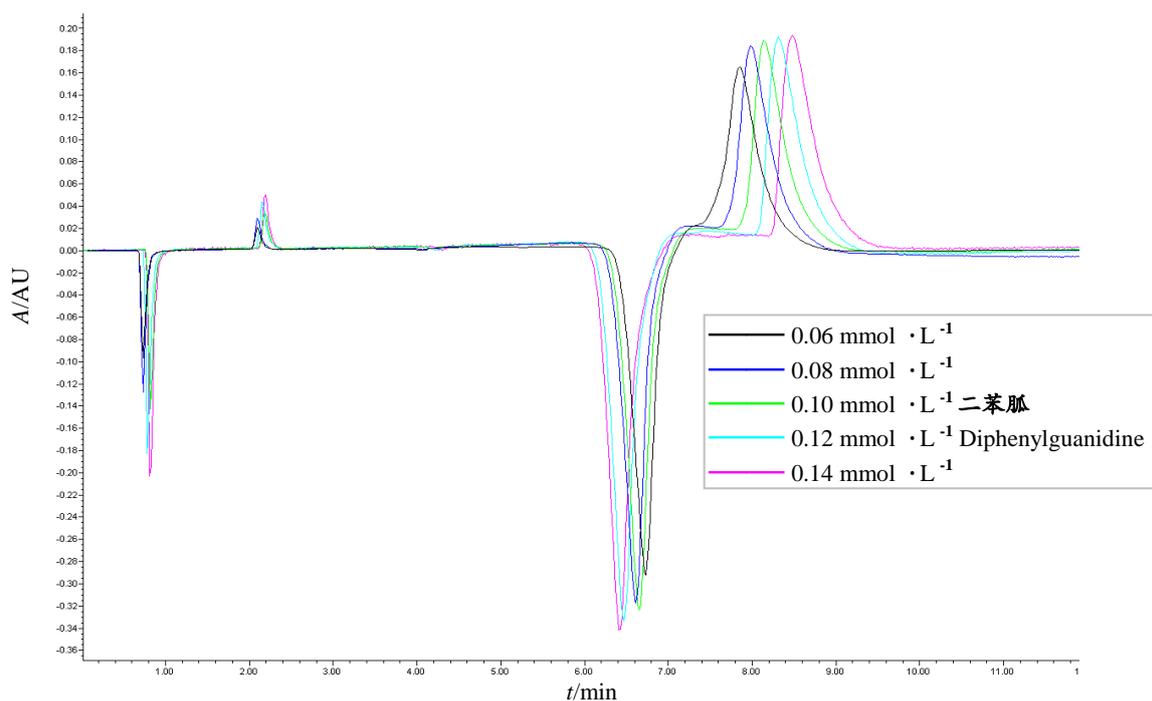


图 3-7 不同浓度离子对试剂的三乙磷酸铝间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 7 The chromatogram of different concentration ion pair reagent for fosetyl-aluminium by IPC_{na}

色谱柱: Waters Symmetry Shield RP8, $3.5 \mu\text{m}$ ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$);
 流动相: 不同浓度的二苯胍 / $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetic aqueous solution;
 流速: $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 提取波长: 232 nm 。

3.2.3.3 改性剂

在间接光度色谱法中，流动相改性剂酸的选择直接决定了离子对是否成对。试验考察了磷酸、三氟乙酸、6种饱和一元羧酸的单酸及混酸，对三乙膦酸铝间接光度色谱法的影响。确定了磷酸和三氟乙酸作为改性剂时二苯胍与三乙膦酸铝不能成对。甲酸成对效率较低，丙酸、丁酸、戊酸、己酸均可成对，但是离子对峰形较差。使用乙酸、丙酸、(甲酸/乙酸)、(乙酸/丙酸)、(甲酸/丙酸)混酸作为改性剂时成对均较好，考虑到溶剂的常用、易得、气味、配置方法等因素，确定乙酸为最优改性剂(图3-8)。

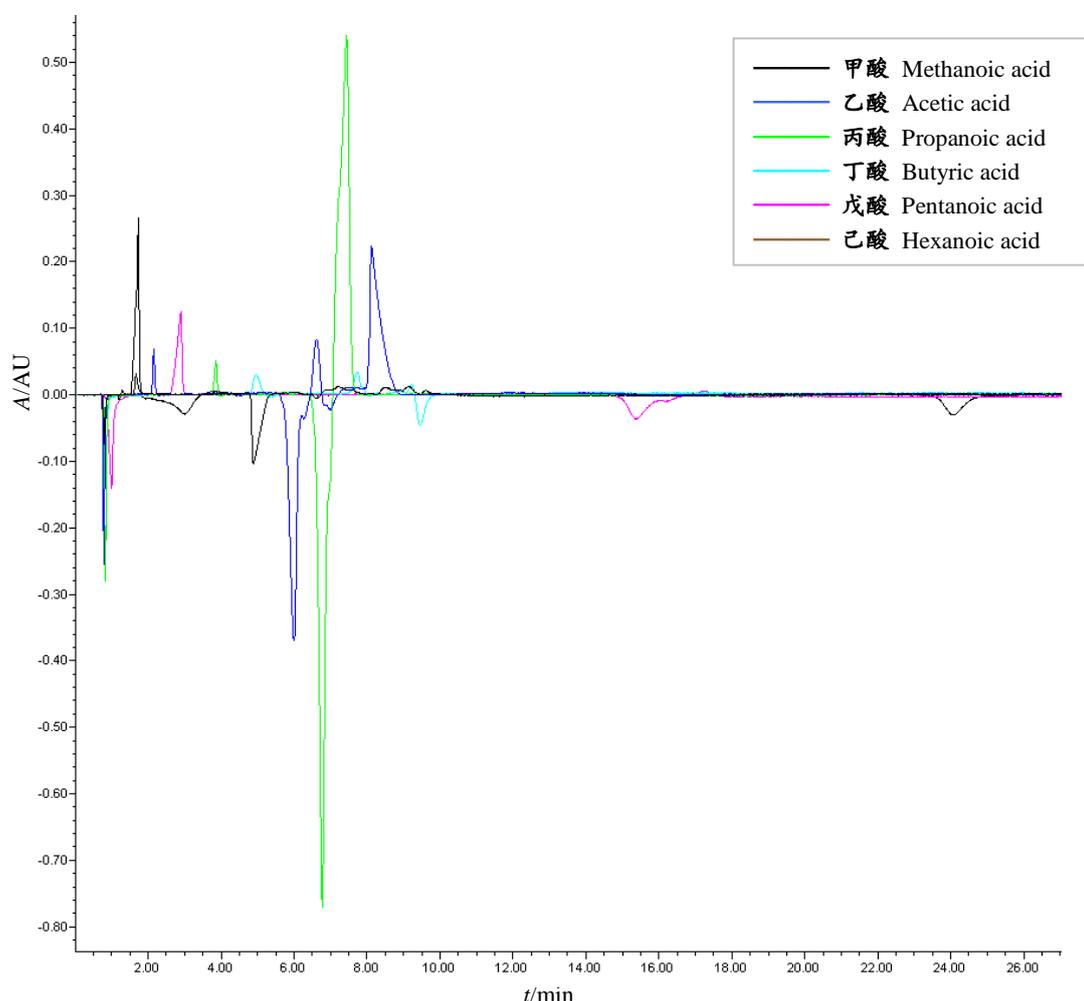


图3-8 不同种类改性剂的三乙膦酸铝间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 8 The chromatogram of different modifier for fosetyl-aluminium by IPC_{na}

色谱柱: Waters Symmetry Shield RP8, 3.5 μm (4.6 mm \times 150 mm);
 流动相: 0.12 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine / 0.015 % 不同种类的酸水溶液;
 流速: 1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 提取波长: 232 nm。

3.2.3.4 改性剂浓度

图 3-9、3-10 表明乙酸浓度在 $14 \sim 42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 作为流动相改性剂对三乙磷酸铝响应值和保留值的影响。随着乙酸浓度的增加, 离子对化合物响应值不断增加。当乙酸浓度大于 $38 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时响应值呈现出下降的趋势。乙酸作为流动相改性剂使得流动相极性减小, 洗脱能力增强, 离子对化合物保留值不断减弱。但是当乙酸浓度大于 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时离子对峰出现拖尾现象。兼顾合适的保留值、保留时间和良好的峰形, 最终选定 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为乙酸的最优浓度。

大量的试验结果证明三乙磷酸铝不论是在浓酸或是稀酸的情况下都可以成对, 但是草甘膦只有在稀酸的情况下才可以成对。这是因为三乙磷酸铝是盐, 在水中可以完全电离成乙基磷酸根和铝离子。但是草甘膦是个有机酸, 流动相中酸的浓度对其电离有很大的影响, 如果 pH 太小就会抑制草甘膦的电离, 也就无法形成离子对化合物。所以在建立方法的时候要根据目标化合物分子结构及理化性质的不同来选择离子对试剂和流动相改性剂。流动相改性剂的酸性大小是离子对成败的关键技术之一, 生成的离子对化合物在色谱柱内的保留遵循反相分配色谱

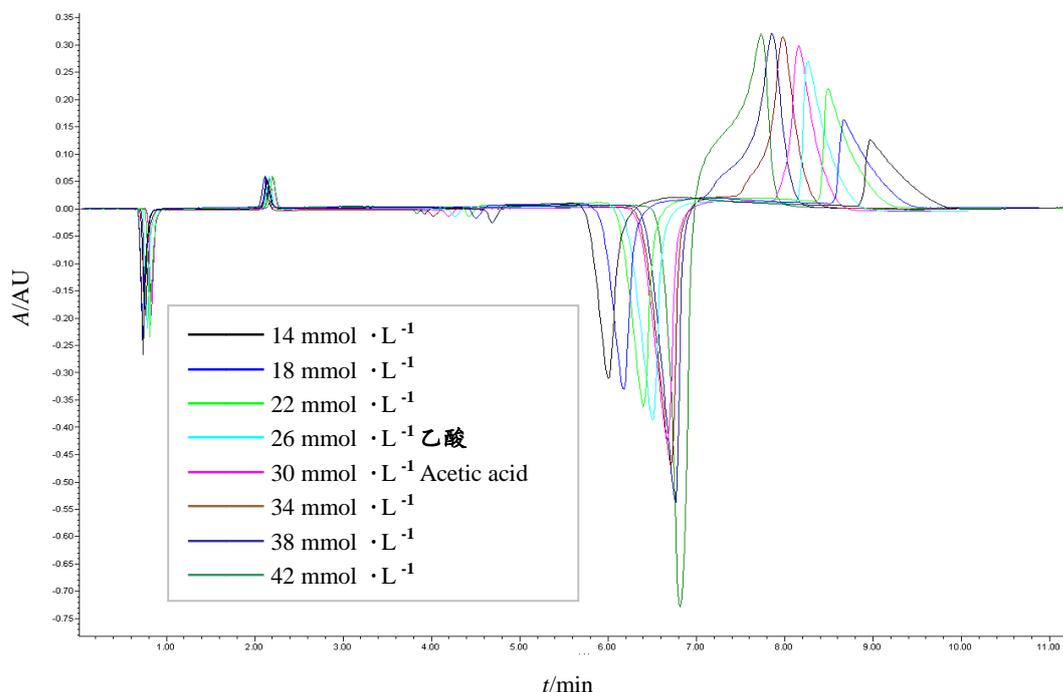


图 3-9 不同浓度改性剂的三乙磷酸铝间接光度色谱法分离图

Fig.3 - 9 The chromatogram of different concentration modifier for fosetyl-aluminium by IPC_{na}

色谱柱: Waters Symmetry Shield RP8, $3.5 \mu\text{m}$ ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$);
 流动相: $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine / 不同浓度的乙酸水溶液;
 流速: $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 提取波长: 232 nm 。

的原理，也就是说当离子对化合物的极性大于固定相极性时，其保留时间就短。反之，其保留时间就长。

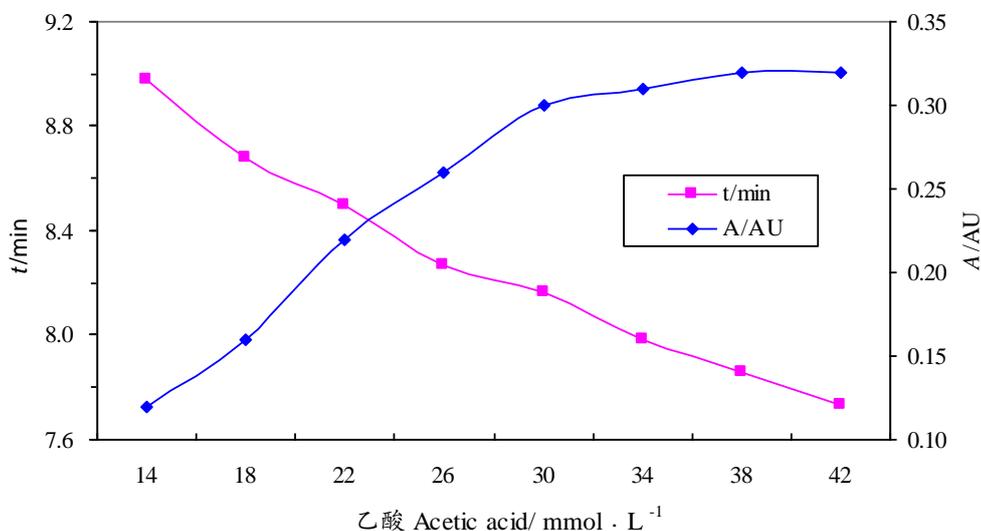


图 3-10 不同浓度改性剂对三乙膦酸铝间接光度色谱法的影响

Fig.3 - 10 Effect on retention time, response of fosetyl-aluminium with different concentration modifier by IPC_{na}

3. 2. 3. 5 有机溶剂

在 3. 1. 5. 2. 5 中，分别选择了甲醇和乙腈两种有机溶剂作为流动相组份分离三乙膦酸铝离子对化合物（图 3 - 11、图 3 - 12）。甲醇作为流动相时破坏了流动相中离子对试剂的平衡，基线不稳，且二苯胍与三乙膦酸铝几乎不能成对。采用乙腈作为流动相时二苯胍可以与三乙膦酸铝成对，但是离子对化合物响应值太低且峰拖尾，可见有机溶剂不适宜作为流动相组成部分。当膦酸（盐）类化合物分子中有较多、较长烷基取代时应考虑流动相中采用一定比例的有机溶剂，但应注意用前预混，降低基线噪声。

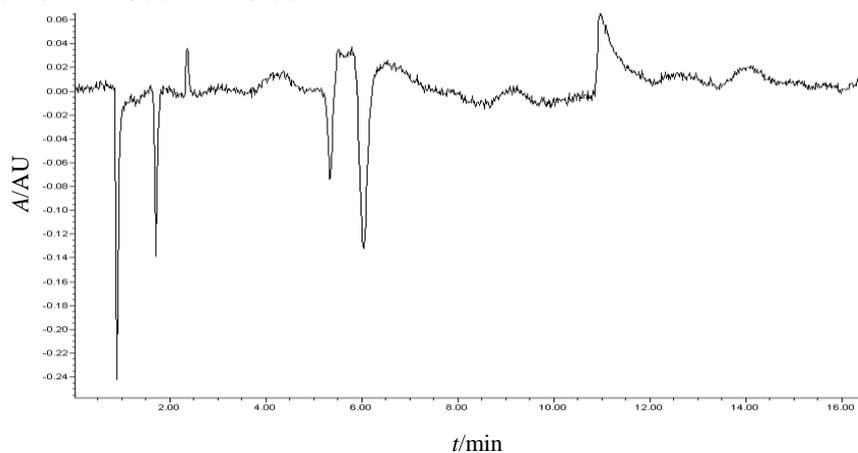


图 3-11 流动相中含有 4% 甲醇时三乙膦酸铝的间接光度色谱分离图

Fig.3 - 11 Chromatogram of fosetyl-aluminium with 4 % methanol in the mobile phase by IPC_{na}

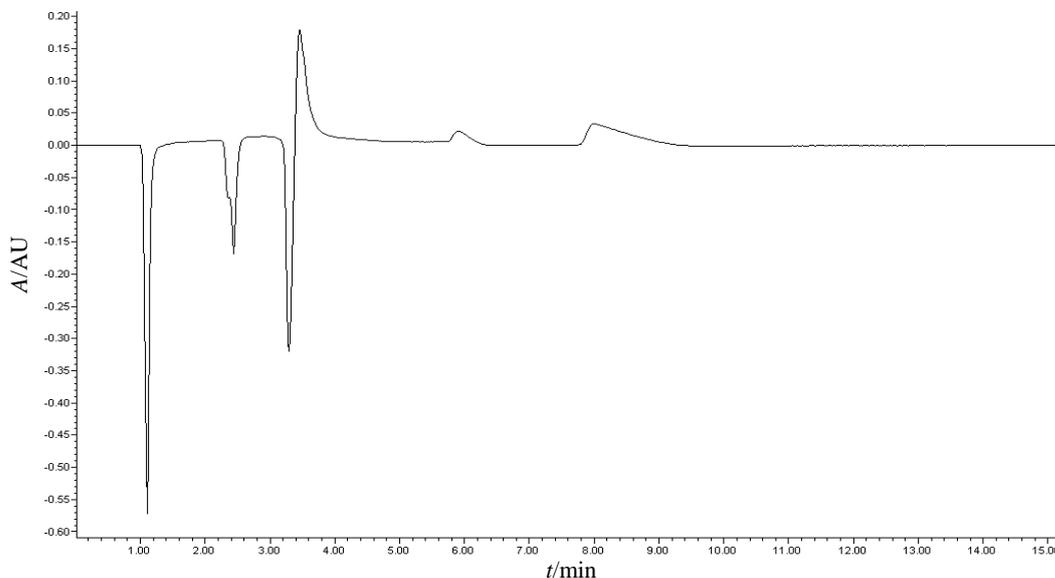


图 3 - 12 流动相中含有 8 %乙腈时三乙磷酸铝的间接光度色谱分离图

Fig.3 - 12 Chromatogram of fosetyl-aluminium with 8 % acetonitrile in the mobile phase by IPC_{na}

3.3 小结

本章建立了以二苯胍作为离子对探针试剂，PR 色谱柱柱上纳克有机合成，适于紫外检测器检测的，以草甘膦、三乙磷酸铝为代表的磷酸（盐）类农药的反相间接光度色谱定量分析方法。对色谱柱种类、离子对试剂浓度、流动相改性剂的种类和浓度进行了细致的优化，确定了最佳的分析条件。实现了可以对无紫外吸收或末端紫外吸收的磷酸（盐）类农药草甘膦、三乙磷酸铝采用紫外检测器来进行分析测定的目标。此法易于普及推广，适用领域范围宽，克服了传统的、以往的分析方法弊端，解决了存在的问题。对设备要求不高；流动相选用的主要介质水、二苯胍，普遍易得，安全环保，可行性高；操作过程较为简单方便，适用性好；分析准确快速、工效高，对产品质量评价科学可靠。同时本文开发建立的分析方法对各领域的磷酸（盐）类产品的质量检测具有重要的借鉴和指导意义。

第四章 草甘膦的离子对探针法测定

草甘膦为甘氨酸的衍生物，分子结构中无生色团，因此现行有效的标准中分析方法即使采用了高效液相色谱法，也都是采用离子交换分离技术或者利用其紫外末端吸收定量^[69-75]。本文利用新型离子对探针紫外试剂二苯胍与草甘膦阴离子在液相色谱柱上发生亲核加成反应生成的具有紫外吸收的离子对共价键化合物进行测定，通过多重优化获得了良好的方法学数据和测定结果，为草甘膦的原药、制剂提供了一种全新的定量分析技术手段。

4.1 材料与方法

4.1.1 仪器与设备

见 2.1.1.1。

4.1.2 试剂与样品

草甘膦纯品：99.9%，余见 3.1.2.1。

二苯胍、丙酸 AR，国药集团化学试剂有限公司。

4.1.3 分析条件

见 2.1.3.1.1。

4.1.4 纯品的制备与定值

见参考文献^[76]。

4.1.5 溶液的配制

4.1.5.1 标准溶液

见 2.1.2。

4.1.5.2 样品溶液

分别称取约含 0.1 g（精确至 0.000 2 g）草甘膦原药、铵盐、异丙胺盐样品于 100 mL 容量瓶中，余见 2.1.2。

4.1.6 方法学

4.1.6.1 检出限的测定

取 4.1.5.1 所配制的标准溶液，逐级用水分别稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草甘膦标准溶液，在 4.1.3 条件下进样分析，以 $S/N=3$

计确定草甘膦的检出限。

4.1.6.2 标准曲线的绘制

将 4.1.5.1 所配制的草甘膦标准溶液稀释成不同水平的标准工作溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)，在 4.1.3 条件下进样分析，以进样量 m 对峰面积 A 绘制草甘膦常量分析的标准曲线。

4.1.6.3 准确度

采用倍量法在草甘膦样品中添加草甘膦标样进行添加回收试验，添加浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个水平。每个添加水平 5 次重复测定，计算其添加回收率。

4.1.6.4 精密度

分别称取 8 份约含草甘膦 0.1 g (精确至 0.0002 g) 的样品于 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。然后用水稀释 5 倍，在 4.1.3 条件下上机测定，计算其相对标准偏差。

4.1.7 草甘膦样品含量的测定

在 4.1.3 条件下，将 4.1.5.2 所配制的样品溶液依次进样分析。外标法定量，分别计算其含量并与离子色谱法定量结果对比分析。

4.2 结果与讨论

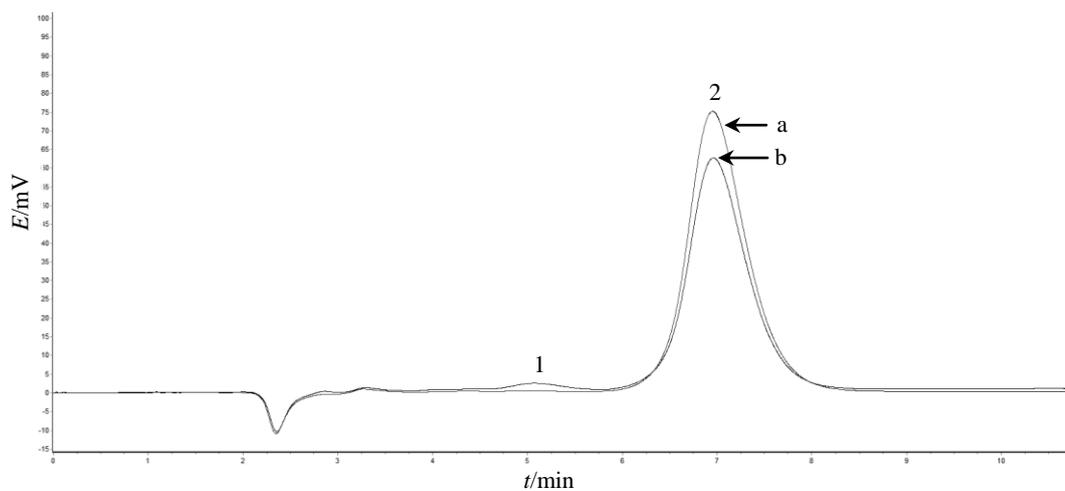
4.2.1 纯品的制备与定值结果

草甘膦用水洗纯化达不到制备纯品的目的。参照文献^[76]纯化的要点是尽可能少加入氢氧化钠，溶液澄清即可。丙酮尽可能多一次加入，弃掉黄颜色下层溶液。过滤后，缓慢加入浓盐酸，充分水洗盐至少 3 次以上。纯化后的 IEC 效果图 4-1。IEC、HPLC 面积归一，定值 99.9 %。

4.2.2 方法学数据

4.2.2.1 检出限

在 4.1.3 的分析条件下，以 $S/N=3$ 计，实测草甘膦 LOD 10 ng 。



a 纯化后 After purification; b 纯化前 Before purification
1 杂质 impurities; 2 草甘膦 glyphosate

图 4 - 1 草甘膦原药纯化前后的离子色谱分离叠加图

Fig.4 - 1 Superimposed ion chromatogram of glyphosate technical before and after purification

4. 2. 2. 2 标准曲线

以进样质量 m 与对应的峰面积 A 绘制草甘膦常量分析标准曲线 (图 4 - 2), 线性回归方程 $Y = -1.200\ 76 \times 10^5 + 1.546\ 4 \times 10^6 X$, 相关系数 $r = 0.999\ 6$ 。草甘膦在 $5 \sim 600\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围线性关系良好。

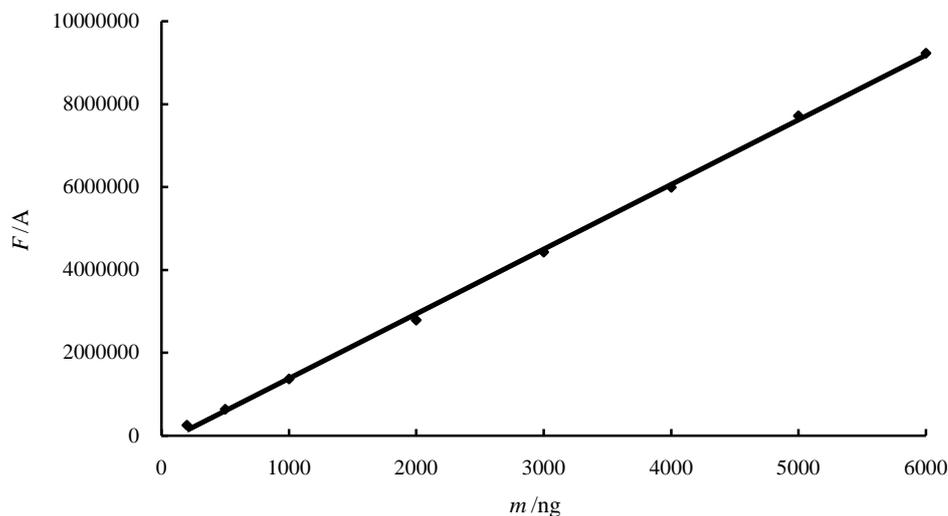


图 4 - 2 草甘膦的标准曲线

Fig.4 - 2 The standard curve of glyphosate

4. 2. 2. 3 准确度的试验结果

准确度用添加回收率表示。在选定的分析条件下测得 $20\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 低浓度添加回收率为 $99.79\% \sim 100.83\%$, 平均回收率为 100.09% 。 $200\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 高浓度添加

回收率为 99.87 % ~ 101.78 %，平均回收率为 100.86 %。添加回收试验结果表明其准确度满足常量分析的要求。草甘膦 2 个水平的添加回收试验结果见表 4 - 1。

表 4 - 1 草甘膦的添加回收试验结果

Tab.4 - 1 Recovery of glyphosate

低水平添加(20 mg · L ⁻¹)				高水平添加(200 mg · L ⁻¹)			
添加量 Fortification/ g	回收率 Recovery/ %	平均回收率 Average/ %	RSD/ %	添加量 Fortification/ g	回收率 Recovery/ %	平均回收率 Average/ %	RSD/ %
0.010 8	100.00			0.098 9	101.43		
0.011 6	99.87			0.102 4	100.96		
0.010 4	99.95	100.09	0.42	0.101 3	101.78	100.86	0.79
0.011 4	100.83			0.104 4	99.87		
0.010 3	99.79			0.100 0	100.25		

4. 2. 2. 4 精密度的测定结果

按照方法学要求，八平行样测得草甘膦精密度结果见表 4 - 2，计算 RSD 0.41 %，可见本方法精密度良好。

表 4 - 2 草甘膦精密度测定结果

Tab.4 - 2 Precision date of glyphosate

序号 No.	称样量 Sample/ g	测定值 Measured value/ %	平均值 Average/ %	S _x	RSD/ %
1 [#]	0.100 4	93.71			
2 [#]	0.099 9	93.47			
3 [#]	0.110 5	92.63			
4 [#]	0.108 2	93.62			
5 [#]	0.102 3	93.26	93.35	0.381 9	0.41
6 [#]	0.104 3	93.41			
7 [#]	0.101 9	92.97			
8 [#]	0.113 6	93.71			

4. 2. 3 草甘膦样品中含量测定结果

草甘膦原药色谱分离见图 2 - 10。由于草甘膦离子对化合物极性较大，保留值位于改性剂系统峰之前，不利于其与杂质离子生成的化合物分离。草甘膦异丙胺盐的色谱分离图见图 4 - 3，杂质离子的含量较低，对有效成分的测定没有造成影响。分析结果见表 4 - 3。亲核加成间接光度反相色谱法对样品测定结果准确可靠，RSD 比离子交换色谱法稍大，符合真实情况。误差表明能够满足常量定量分析的要求。

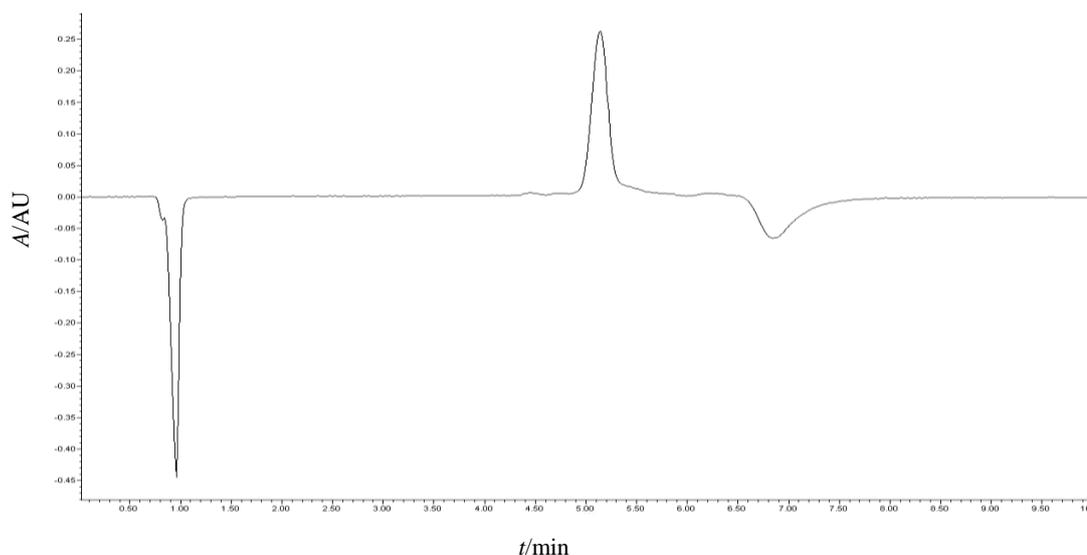


图 4 - 3 草甘膦异丙胺盐水剂色谱分离图

Fig 4 - 3 Chromatography of glyphosate isopropylamine salt by IPC_{na}

表 4 - 3 草甘膦原药、草甘膦异丙胺盐的测定数据

Tab.4 - 3 The data of glyphosate technical and glyphosate isopropylamine salt

样品 Samples	草甘膦含量/ % content of glyphosate		草甘膦平均含量/ % Average content of glyphosate		RSD/ %	
	IPC _{na}	IEC	IPC _{na}	IEC	IPC _{na}	IEC
	草甘膦原药 glyphosate technical	93.71 93.00 94.13	93.15 93.20 92.89	93.61	93.08	0.61
草甘膦异丙胺盐 glyphosate isopropylamine salt	42.42 42.19 42.38	41.11 41.02 39.87	42.33	40.67	0.29	1.70

4. 2. 4 草甘膦样品中杂质离子干扰

草甘膦各种样品中含有多种杂质无机阴离子，包括 Cl^- 、 H_2PO_4^- 、 NO_2^- 、 Br^- 、 SO_4^{2-} ，它们也会与二苯胍探针试剂发生反应，含量过高会对分析构成干扰，影响定量结果。硫酸根含量过高虽然不会对测定结果产生影响，但是要考虑延长分析时间（图 4 - 4）。

草甘膦铵盐水剂见图 4 - 5。草甘膦铵盐采用 IEC 测定含量平均为 30.37 %，与标称值接近。采用亲核加成间接光度色谱法，由于氯离子含量较高导致氯离子的离子对化合物与草甘膦离子对化合物不能有效分离，测定结果与标称值相去较远，平均值为 42.63 %。对于高含量氯离子样品的测定还有待于深入研究其有效

的分离方法或除杂。

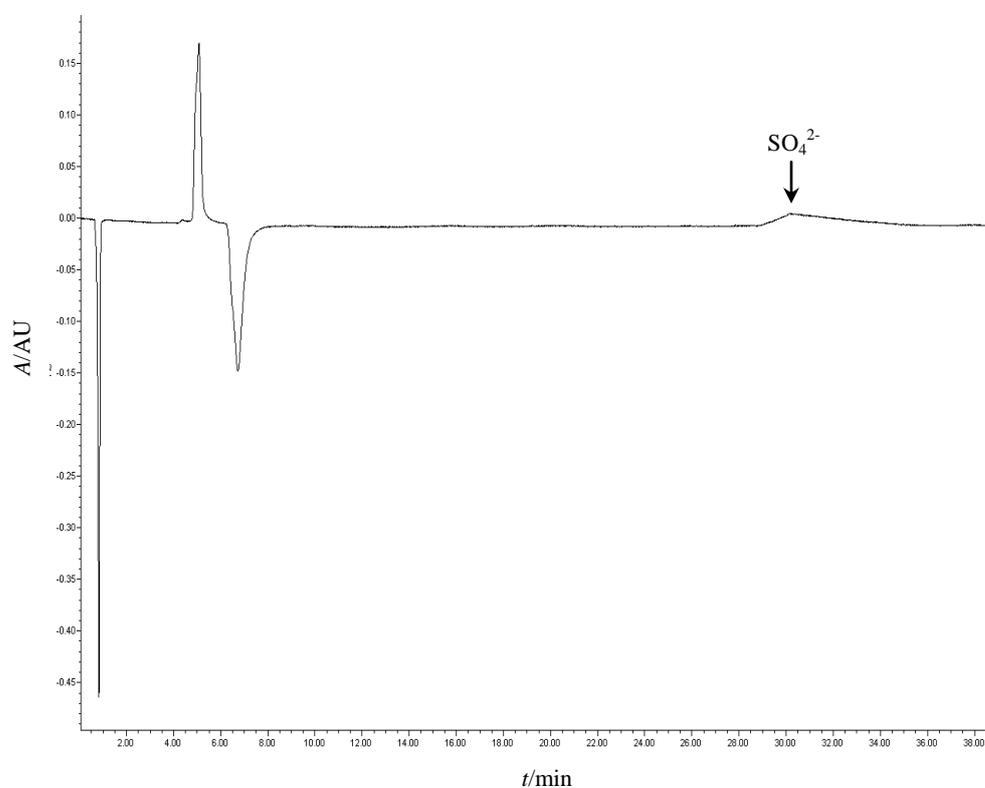


图 4 - 4 草甘膦纯品中添加硫酸根的离子对色谱分离图
Fig 4 - 4 Chromatography of pure glyphosate with sulfate ion by IPC_{na}

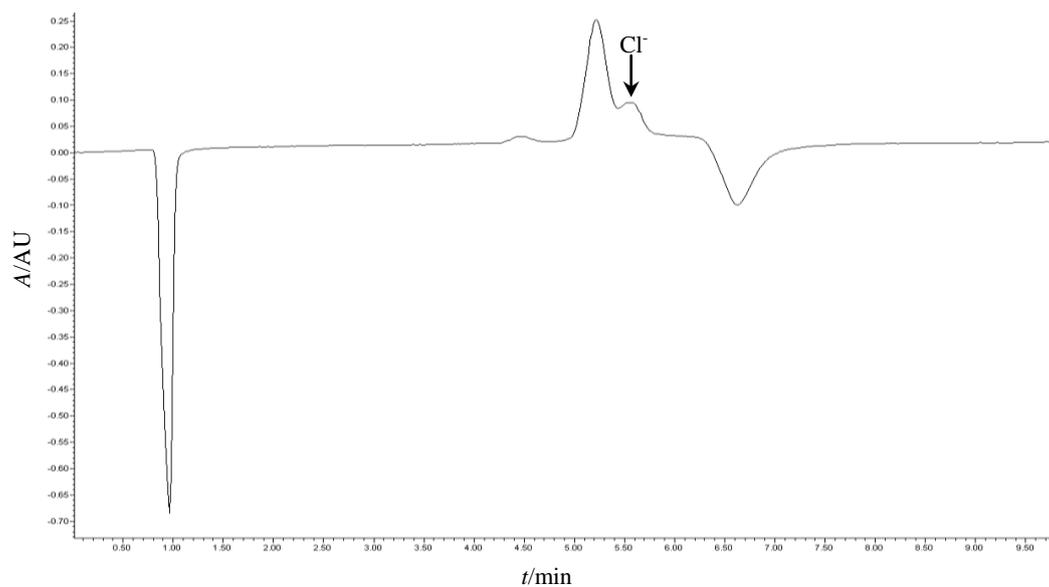


图 4 - 5 草甘膦铵盐亲核加成间接光度色谱分离图
Fig 4 - 5 Chromatography of ammonium glyphosate Chromatography by IPC_{na}

4.3 小结

以二苯胍作为离子对探针试剂, 采用反相间接光度高效液相色谱法, 对草甘膦原药、草甘膦铵盐水剂、草甘膦异丙胺盐水剂进行了定量分析。方法的草甘膦检出限 10 ng, $Y = -1.20076 \times 10^5 + 1.5464 \times 10^6 X$, $r = 0.9996$ 。20 mg · L⁻¹、200 mg · L⁻¹ 两种质量浓度添加水平的平均回收率分别为 100.09 %、100.86 %。八平行样品测定 *RSD* 0.41 %。该方法的精密度和准确度符合常量分析的要求, 方法操作简便, 分析速度快, 分析成本低, 数据准确可靠, 易于普及应用。该方法适用于草甘膦原药、异丙胺盐水剂的有效成分定量分析。草甘膦铵盐水剂样品中氯离子含量较高, 定量结果误差大。如样品中硫酸根离子含量较高时, 可考虑延长分析时间, 避免硫酸根离子对化合物影响定量结果的准确性。

第五章 三乙磷酸铝的间接光度色谱法测定

纵观全球农药市场，非共轭磷酸（盐）类化合物三乙磷酸铝属大宗生产并在经济作物上广泛使用的有机磷内吸性杀菌剂品种，仅中国每年生产应用有千吨以上，包括原药、各种制剂和混剂。三乙磷酸铝目前国内行业标准分析方法采用碘量法^[6-8]，其优点是分析成本相对较低，不足是检测工序复杂，工效低，污染环境，不能彻底排除杂质干扰，制约了产品质量的提高和科学评价。尽管到目前为止已有对三乙磷酸铝多种分析方法的报道^[77-80]，但严格讲还没有比较令人满意的仪器分析定量方法。本章针对三乙磷酸铝难于汽化和无紫外生色团化学结构的特点，采用亲核加成间接光度色谱全新的分析手段对三乙磷酸铝原药及可湿性粉剂进行测定。

5.1 材料与方法

5.1.1 仪器与设备

见 2.1.1.1。

5.1.2 试剂与样品

三乙磷酸铝纯品：99.6%，自制，IEC 面积归一法定值；

80% 三乙磷酸铝可湿性粉剂 1，2007 年生产；80% 三乙磷酸铝可湿性粉剂 2：，2012 年生产；

90% 原药 1，2007 年生产；95% 原药 2，2012 年生产；96% 原药 3、95% 原药 4，2007 年生产。

5.1.3 分析条件

见 2.1.3.1.2。

5.1.4 三乙磷酸铝纯品的制备与定值

见参考文献^[2]。

5.1.5 溶液的配制

5.1.5.1 标准溶液

见 2.1.2。

5.1.5.2 样品溶液

分别称取约含 0.1 g(精确至 0.000 2 g)不同厂家不同年份的三乙磷酸铝原药、

可湿性粉剂于 100 mL 容量瓶中，余见 2.1.2。

5.1.6 方法学

5.1.6.1 检出限

取 5.1.5.1 所配制的标准溶液，用水分别稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三乙磷酸铝标准溶液，在 5.1.3 条件下进样分析，以 $S/N=3$ 计确定三乙磷酸铝的检出限。

5.1.6.2 标准曲线的绘制

将 5.1.5.1 所配制的三乙磷酸铝标准溶液稀释成各种标准工作溶液（ $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）的溶液，在 5.1.3 条件下进样分析，然后以进样量 m 对峰面积 A 绘制三乙磷酸铝常量分析的标准曲线。

5.1.6.3 准确度试验

采用倍量法在三乙磷酸铝样品中添加三乙磷酸铝标样进行添加回收试验，添加浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个水平。每个添加水平 5 次重复测定，计算其添加回收率。

5.1.6.4 精密度试验

分别称取 8 份约含三乙磷酸铝 0.1 g（精确至 0.000 2 g）的样品于 100 mL 容量瓶中，加入 90 mL 水，超声波振荡 30 min，冷却到室温定容至刻度。稀释 5 倍在 5.1.3 的分析条件下上机测定，然后计算其相对标准偏差。

5.1.7 三乙磷酸铝样品含量的测定

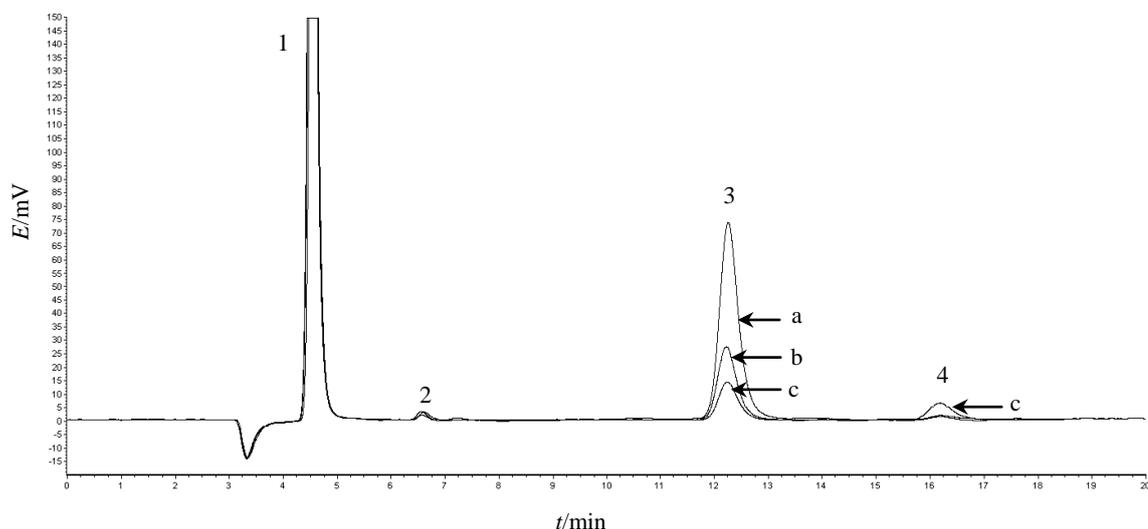
在 5.1.3 的分析条件下，将 5.1.5.2 所配制的样品溶液依次进样分析。采用外标法定量，分别计算其含量并与离子色谱法定量结果对比分析。

5.2 结果与讨论

5.2.1 纯品的制备与定值结果

三乙磷酸铝在自然条件下贮藏，会分解成亚磷酸和乙醇。即使将纯品置于室温干燥器中贮藏，年平均分解也达到 2.4 % 以上（图 5-1）。为建立三乙磷酸铝仪器分析方法，首先需要解决的问题是制备其纯品。参照文献^[2]，称取三乙磷酸铝原药 100 g 于烧杯中，加 100 mL 水于室温下磁力搅拌 20 min，G3 玻璃砂芯漏斗减压抽滤近干，再重复 2 次后，将白色过滤物置于烧杯中，最后用 100 mL 乙醇

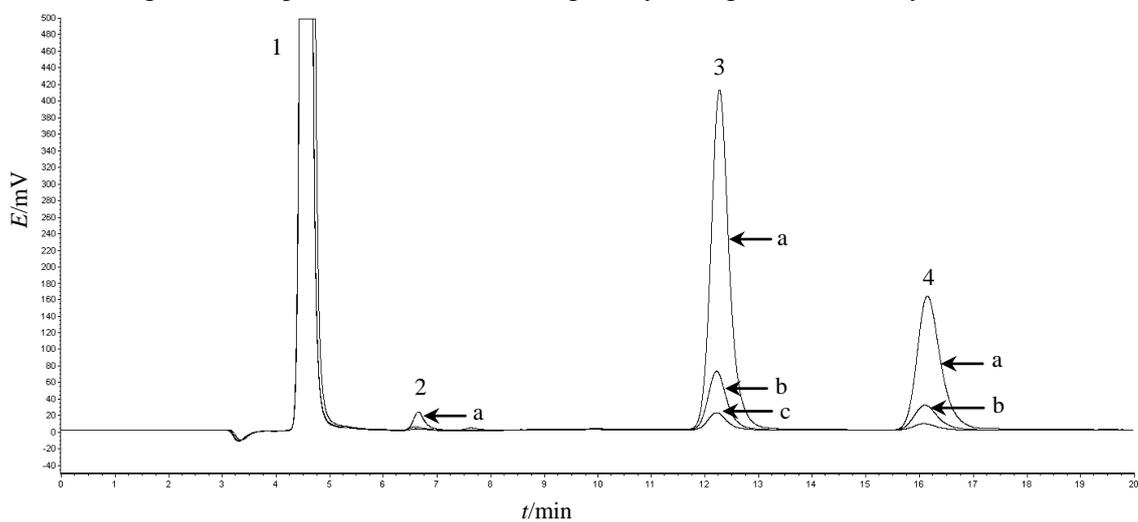
磁力搅拌匀浆 15 min 后, 用 G4 玻璃砂芯漏斗抽滤近干, 取出过滤物置于红外灯下烘干近恒重研磨成粉末, 于 40 °C 真空干燥器中再干燥 4 h 至恒重, 即得。纯化的效果见图 5 - 2。采用碘量法、离子色谱法对纯化后的三乙磷酸铝纯品定值为 99.6 %。纯化后采用离子色谱法分离的谱图见图 5 - 3。



a 贮藏 5 年的标准品 Standard sample storage 5 years; b 干燥器中贮藏 5 年的标准品 Standard sample storage 5 years in desiccator; c 贮藏 1 年的原药 The technical storage 1 year
 1 $C_2H_6PO_3^-$; 2 Cl^- ; 3 $H_2PO_3^-$; 4 SO_4^{2-}

图 5 - 1 三乙磷酸铝降解比较图

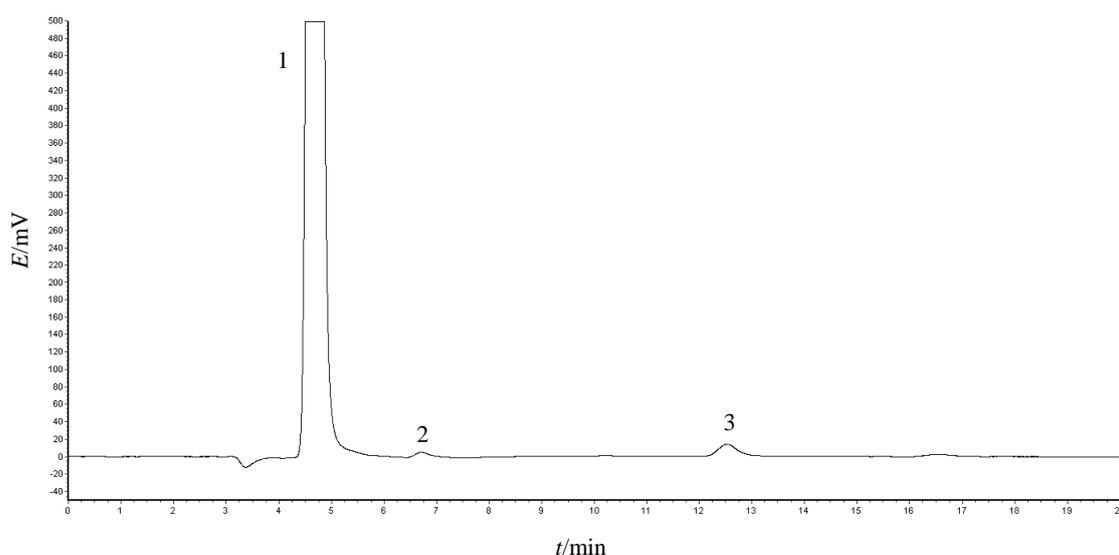
Fig.5 - 1 A comparison of anion chromatogram by the degradation of fosetyl-Al



A 一次滤液 Once filtrate; b 二次滤液 Secondary filtrate; c 三次滤液 Third filtrate
 1 $C_2H_6PO_3^-$; 2 Cl^- ; 3 $H_2PO_3^-$; 4 SO_4^{2-}

图 5 - 2 纯化三乙磷酸铝的滤液中阴离子色谱分离叠加图

Fig.5 - 2 Superimposed anion chromatogram of fosetyl-Al and the impurities in filtrates after purification



1 $C_2H_6PO_3^-$; 2 Cl^- ; 3 $H_2PO_3^-$

图 5-3 三乙磷酸铝纯品阴离子色谱分离图

Fig.5 - 3 The anion chromatogram of fosetyl-Al pure sample

5.2.2 方法学数据

5.2.2.1 检出限

在 5.1.3 的分析条件下,以 $S/N=3$ 计,实测三乙磷酸铝的 LOD 10 ng。

5.2.2.2 标准曲线的绘制

以质量 m 与相应的峰面积 A 绘制三乙磷酸铝常量分析的标准曲线。得到三乙磷酸铝的线性回归方程 $Y = -5.91067 \times 10^5 + 3.2255 \times 10^3 X$, 相关系数 $r = 0.9945$, 三乙磷酸铝在 $5 \sim 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围线性关系良好。其标准曲线见图 5-4。

5.2.2.3 准确度的试验结果

用添加回收率表示准确度。在最终确定的分析条件下测得 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 低浓度添加回收率为 99.21% ~ 101.13%, 平均回收率为 99.97%。 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 高浓度添加回收率为 99.09% ~ 100.85%, 平均回收率为 99.85%。添加回收的试验结果表明其准确度满足常量分析的要求。三乙磷酸铝 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个水平的添加回收试验结果见表 5-1。

5.2.2.4 精密度的测定结果

按照方法学要求,八平行样品测得三乙磷酸铝精密度结果见表 5-2, 计算 RSD 为 0.77%, 可见本方法精密度良好。

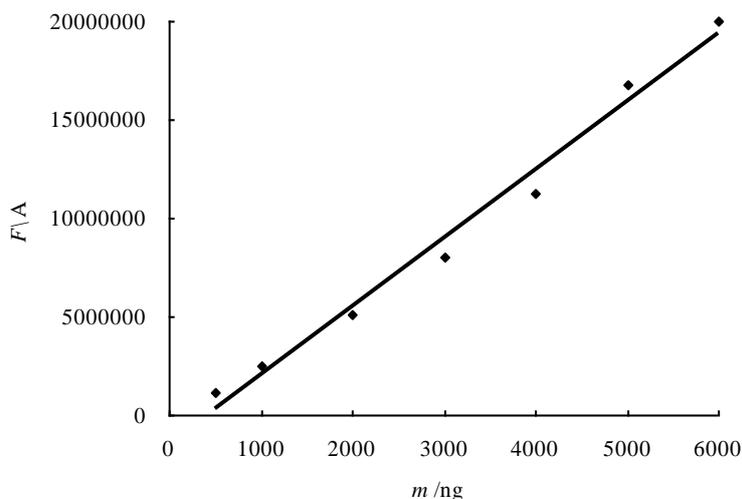


图 5 - 4 三乙膦酸铝的标准曲线
Fig.5 - 4 The standard curve of fosetyl-aluminium

表 5 - 1 三乙膦酸铝的添加回收试验结果

Tab.5 - 1 Recovery of fosetyl-aluminium

低水平添加(20 mg · L ⁻¹)				高水平添加(200 mg · L ⁻¹)			
添加量 Fortification/ g	回收率 Recovery/ %	平均回收率 Average/ %	RSD/ %	添加量 Fortification/ g	回收率 Recovery/ %	平均回收率 Average/ %	RSD/ %
0.010 0	99.49			0.107 2	99.76		
0.009 6	99.89			0.102 2	99.09		
0.009 9	99.21	99.97	0.74	0.101 7	100.85	99.85	0.64
0.010 1	101.13			0.097 9	99.87		
0.010 5	100.11			0.102 0	99.70		

表 5 - 2 三乙膦酸铝精密度测定结果

Tab.5 - 2 Precision date of fosetyl-aluminium

序号 No.	称样量 Sample/ g	测定值 Measured value/ %	平均值 Average/ %	S _x	RSD/ %
1 [#]	0.100 4	89.63			
2 [#]	0.099 9	88.16			
3 [#]	0.110 5	89.33			
4 [#]	0.108 2	89.57			
5 [#]	0.102 3	89.24	89.01	0.689 4	0.77
6 [#]	0.104 3	88.31			
7 [#]	0.101 9	88.14			
8 [#]	0.113 6	89.71			

5.2.3 三乙磷酸铝样品含量的测定结果

不同生产厂家、不同生产年份三乙磷酸铝原药及可湿性粉剂的测定数据及其分析结果见表5-3。三乙磷酸铝可湿性粉剂亲核加成间接光度色谱法分离图5-5。各种离子对化合物保留时间， H_2PO_3^- 为 6.348 min； $\text{C}_2\text{H}_6\text{PO}_3^-$ 为 8.236 min； SO_4^{2-} 为 21.340 min。三乙磷酸铝与两个主要杂质均能获得有效分离，但是对亚磷酸的定量还尚待进一步研究。

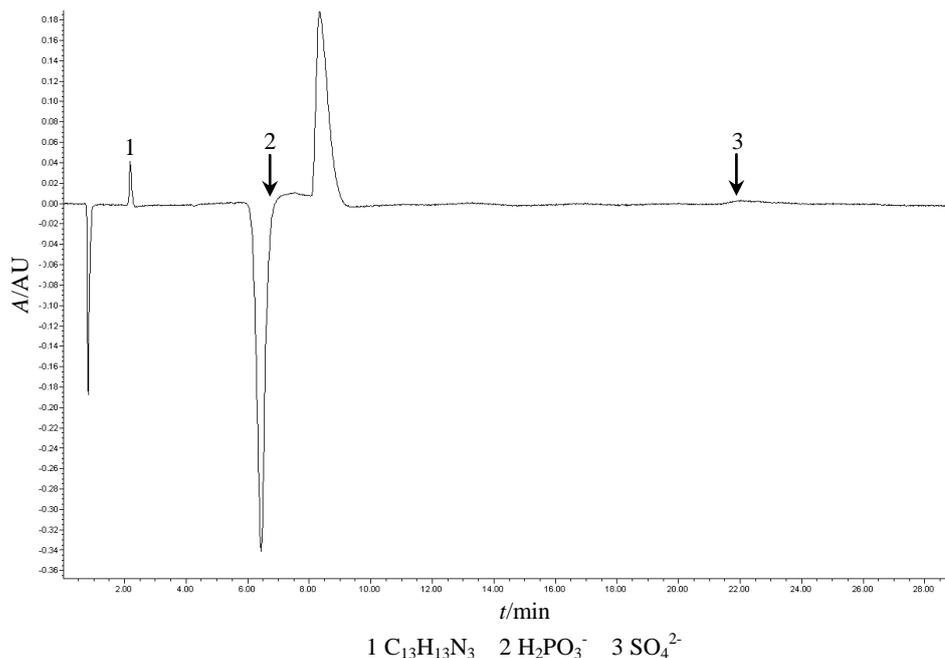


图 5 - 5 三乙磷酸铝 80 %可湿性粉剂间接光度色谱分离图

Fig.5 – 5 The chromatogram of fosetyl-aluminium 80 % WP by IPC_{na}

表 5-3 三乙磷酸铝原药、可湿性粉剂的测定数据

Tab.5-3 The data of fosetyl-Al technical and WP

样品 Samples	三乙磷酸铝含量/ % Content of fosetyl-Al		三乙磷酸铝平均含量 / % Average content of fosetyl-Al		RSD/ %	
	IPC _{na}	IEC	IPC _{na}	IEC	IPC _{na}	IEC
80 % 可湿性粉剂 1 (2007) fosetyl-Al WP 1	64.78	64.30				
	64.85	64.74	64.96	64.53	0.38	0.33
	65.24	64.55				
80 % 可湿性粉剂 2 (2012) fosetyl-Al WP 2	76.36	78.12				
	77.15	77.96	76.86	78.21	0.57	0.38
	77.08	78.54				
90 % 原药 1 (2007) fosetyl-Al technical 1	81.99	83.67				
	81.73	83.77	82.00	83.78	0.34	0.14
	82.29	83.90				
95 % 原药 2 (2012) fosetyl-Al technical 2	89.28	91.38				
	89.20	91.80	89.24	91.35	0.04	0.50
	89.24	90.88				
96 % 原药 3 (2007) fosetyl-Al technical 3	87.13	88.50				
	87.78	86.69	87.37	87.60	0.41	1.03
	87.21	87.61				
95 % 原药 4 (2007) fosetyl-Al technical 4	58.31	56.88				
	58.23	56.86	58.03	57.01	0.72	0.42
	57.55	57.28				

5.3 小结

以二苯胍作为离子对探针试剂，采用反相间接光度高效液相色谱法，对原药和制剂中的三乙磷酸铝进行了准确的定性、定量分析。三乙磷酸铝检出限为 10 ng，标准曲线方程为 $Y = -5.91067 \times 10^5 + 3.2255 \times 10^3 X$ ， $r = 0.9945$ 。20 mg · L⁻¹、200 mg · L⁻¹ 两种质量浓度添加水平的平均回收率分别为 99.97 %、99.85 %。八平行样品测得 RSD 0.77 %。这些结果表明方法的精密度和准确度符合分析的要求，三乙磷酸铝各种样品测定结果准确、可靠。本方法适用于原药、可湿性粉剂中有效成分的定量分析。方法样品用量少，操作简便、快速，分离完全。为磷酸（盐）类化合物的分析工作奠定了良好的基础，提供了科学数据。

第六章 样品中无机阴离子含量对间接光度色谱法的影响

由于磷酸（盐）类农药样品中的杂质无机阴离子也会与离子对探针反应生成离子对化合物，因此对其影响要进行分析测定。以草甘膦、三乙磷酸铝为代表性品种，在测定样品中阴离子含量的基础上，明确添加不同浓度的无机阴离子对亲核加成间接光度色谱法测定结果的影响。

6.1 材料与方法

6.1.1 仪器与设备

离子色谱仪：戴安公司 DX-120 离子色谱仪，具有 ASRS-ULTRA 自身再生抑制器和电导检测器；工作站：N-2000 色谱工作站；

IonPac AS9-HC (4 mm×250 mm)阴离子色谱分析柱，IonPac AG9-HC (4 mm×50 mm)阴离子保护柱；

进样器：1 mL；

余同 2.1.1.1。

6.1.2 试剂与样品

6.1.2.1 草甘膦

见 4.1.2。

6.1.2.2 三乙磷酸铝

见 5.1.2。

6.1.2.3 七种阴离子标准溶液

见参考文献^[2]。

6.1.3 分析条件

6.1.3.1 离子色谱仪

色谱柱：戴安公司 AS-9 HC 阴离子分析柱；

淋洗液：9 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃；

柱温：25 °C（温度变化应不大于 2 °C）；

淋洗液流速：0.5 mL · min⁻¹；

进样量：25 μL。

6.1.3.2 高效液相色谱仪

6.1.3.2.1 草甘膦分析条件

同 2.1.3.1.1。

6.1.3.2.2 三乙磷酸铝分析条件

同 2.1.3.1.2。

6.1.4 样品背景中阴离子的测定

6.1.4.1 草甘膦原药及其制剂

在 6.1.3.1 条件下，以 6.1.2.3 中配制的七种阴离子标准溶液为标对草甘膦原药、草甘膦铵盐、草甘膦异丙胺盐中的无机阴离子进行定性、定量分析。称取两个平行样品进样分析测定。

6.1.4.2 三乙磷酸铝原药及其制剂

在 6.1.3.1 条件下，用七种阴离子标准溶液对三乙磷酸铝原药及其制剂中的无机阴离子进行定性、定量分析。称取两个平行样品进样测定。

6.1.5 溶液的配制

6.1.5.1 七种阴离子混合标准溶液的配制

见参考文献^[2]。

6.1.5.2 在草甘膦样品溶液中添加阴离子试验

分别移取 2.1.2 中配制的草甘膦标准品储备水溶液，在此基础上单独添加不同浓度的 Br^- 、 NO_2^- 、 H_2PO_4^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 标准溶液，配制成杂质阴离子与草甘膦的混合溶液。添加的 Br^- 、 NO_2^- 、 H_2PO_4^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 的量分别相当于在草甘膦样品中的含量为 0.50 %、0.99 %、1.48 %、1.96 %、2.44 %、2.91 %、3.38 %、3.85 %、4.31 %、4.98 %、9.09 %、13.04 %、16.67 %、20.00 %、23.08 %、25.93 %、28.57 %、31.03 %、33.33 %。通过对比草甘膦含量的变化来考察这几种离子对间接光度色谱法测定结果的影响。

6.1.5.3 在三乙磷酸铝样品溶液中添加阴离子试验

分别移取 2.1.2 中配制的三乙磷酸铝标准品储备水溶液，单独添加不同浓度的 H_2PO_3^- 、 SO_4^{2-} 标准溶液，配制成杂质阴离子与三乙磷酸铝的混合溶液。添加的 H_2PO_3^- 、 SO_4^{2-} 的量分别相当于在三乙磷酸铝样品中的含量为 0.50 %、0.99 %、1.48 %、1.96 %、2.44 %、2.91 %、3.38 %、3.85 %、4.31 %、4.98 %、9.09 %、13.04 %、16.67 %、20.00 %、23.08 %、25.93 %、28.57 %、31.03 %、33.33 %。

通过对比三乙磷酸铝含量的变化考察这两种离子对间接光度色谱法测定的影响。

6.2 结果与讨论

6.2.1 草甘膦原药及其制剂中阴离子含量

采用离子色谱法对草甘膦原药、草甘膦铵盐和草甘膦异丙胺盐中的阴离子进行了测定。草甘膦原药中主要杂质无机阴离子为 Cl^- 、 H_2PO_4^- 和 SO_4^{2-} ，草甘膦铵盐中阴离子为 Cl^- 、 NO_2^- 、 Br^- 、 SO_4^{2-} ，而草甘膦异丙胺盐中主要杂质为 Cl^- 、 NO_2^- 、 H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} ，测定结果见表 6-1 ~ 表 6-3。

表 6-1 草甘膦原药中阴离子测定数据

Tab. 6 - 1 The data of anion ion in glyphosate technical

样品 Samples	草甘膦原药 1 [#] Glyphosate technical 1 [#]	草甘膦原药 2 [#] Glyphosate technical 2 [#]	杂质离子平均含量 / % Average
$\text{Cl}^- / \%$	0.139 1	0.139 4	0.14
	0.138 6	0.138 6	
	0.139 5	0.139 0	
$\text{H}_2\text{PO}_4^- / \%$	0.159 0	0.158 4	0.16
	0.158 2	0.157 9	
	0.158 5	0.158 8	
$\text{SO}_4^{2-} / \%$	0.163 6	0.164 5	0.16
	0.164 2	0.164 4	
	0.163 9	0.163 9	

表 6-2 草甘膦铵盐中阴离子测定数据

Tab. 6 - 2 The data of anion ion in ammonium glyphosate

样品 Samples	草甘膦铵盐 1 [#] Ammonium glyphosate 1 [#]	草甘膦铵盐 2 [#] Ammonium glyphosate 2 [#]	杂质离子平均含量 / % Average
$\text{Cl}^- / \%$	0.834 1	0.834 9	0.84
	0.835 6	0.835 2	
	0.834 7	0.835 9	
$\text{NO}_2^- / \%$	0.084 4	0.084 0	0.08
	0.083 2	0.083 1	
	0.084 7	0.083 9	
$\text{Br}^- / \%$	0.625 3	0.625 7	0.63
	0.626 0	0.626 3	
	0.626 5	0.627 0	
$\text{SO}_4^{2-} / \%$	0.030 5	0.029 9	0.03
	0.029 7	0.029 9	
	0.031 0	0.030 4	

表 6 - 3 草甘膦异丙胺盐中阴离子测定数据

Tab. 6 - 3 The data of anion ion in *N*-(phosphonomethyl) glycine

样品 Samples	草甘膦异丙胺盐 1 [#] <i>N</i> -(phosphono- methyl) glycine 1 [#]	草甘膦异丙胺盐 2 [#] <i>N</i> -(phosphono- methyl) glycine 2 [#]	杂质离子平均含量 / % Average
Cl ⁻ / %	0.294 9	0.294 2	0.29
	0.295 7	0.295 0	
	0.295 3	0.294 1	
NO ₂ ⁻ / %	0.050 8	0.050 8	0.05
	0.051 2	0.051 1	
	0.050 3	0.051 0	
H ₂ PO ₄ ⁻ / %	0.220 9	0.220 7	0.22
	0.221 3	0.220 7	
	0.221 9	0.221 1	
SO ₄ ²⁻ / %	0.057 4	0.057 7	0.06
	0.056 9	0.056 5	
	0.056 8	0.057 3	

可以看出草甘膦原药中的 Cl⁻、H₂PO₄⁻和 SO₄²⁻的含量均小于 0.20 %；草甘膦铵盐中 Cl⁻、Br⁻含量较高，分别为 0.84 %、0.63 %，NO₂⁻和 SO₄²⁻离子含量均低于 0.10 %；草甘膦异丙胺盐中 Cl⁻、H₂PO₄⁻含量分别为 0.29 %、0.22 %，NO₂⁻和 SO₄²⁻含量均低于 0.10 %。

6. 2. 2 三乙磷酸铝原药及其制剂中阴离子含量

三乙磷酸铝原药中阴离子杂质有 H₂PO₃⁻和 SO₄²⁻。H₂PO₃⁻是三乙磷酸铝降解的主要阴离子。三乙磷酸铝原药中 H₂PO₃⁻含量为 5.88 %，SO₄²⁻含量为 4.74 %。而三乙磷酸铝可湿性粉剂中 H₂PO₃⁻和 SO₄²⁻含量相对较高，H₂PO₃⁻含量为 8.48 %，SO₄²⁻含量为 11.22 %。具体数据见表 6 - 4 ~ 表 6 - 5。

表 6 - 4 三乙磷酸铝原药中阴离子测定数据

Tab. 6 - 4 The data of anion ion in fosetyl-Al technical

样品 Samples	原药 1 [#] Fosetyl-Al technical 1 [#]	原药 2 [#] Fosetyl-Al technical 2 [#]	杂质离子平均含量 / % Average
H ₂ PO ₃ ⁻ / %	5.88	5.94	5.88
	5.99	5.82	
	5.89	5.89	
SO ₄ ²⁻ / %	4.66	4.72	4.74
	4.77	4.75	
	4.70	4.74	

表 6 - 5 三乙磷酸铝可湿性粉剂中阴离子测定数据

Tab. 6 - 5 The data of anion ion in fosetyl-Al WP

样品 Samples	三乙磷酸铝可湿性粉剂 1 [#] Fosetyl-Al WP 1 [#]	三乙磷酸铝可湿性粉剂 2 [#] Fosetyl-Al WP 2 [#]	杂质离子平均含量 / % Average
H ₂ PO ₃ ⁻ /%	8.43	8.50	8.48
	8.49	8.55	
	8.45	8.47	
SO ₄ ²⁻ /%	11.23	11.20	11.22
	11.19	11.24	
	11.20	11.24	

6. 2. 3 添加阴离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响

根据 6.2.1 中的测定结果分别考察了 Br⁻、NO₂⁻、H₂PO₄⁻、Cl⁻、SO₄²⁻ 几种阴离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响。由表 6 - 6 可以看出，在进样量为 2000 ng 草甘膦纯品的基础上添加不同含量的 Br⁻，最终通过计算样品中草甘膦的含量来考察 Br⁻ 对该方法定量结果的影响。

由表中数据可知，当样品中添加的 Br⁻ ≥ 9.09 % 时，草甘膦的定量结果将受到影响。随着样品中 Br⁻ 含量的不断增加草甘膦含量逐渐下降。当 Br⁻ ≥ 33.33 %，草甘膦含量由最初的 99.90 % 下降到 35.29 %。并且草甘膦的保留时间与添加 Br⁻ 的含量呈负相关性。也就是说 Br⁻ 的引入不仅破坏了离子对成对的效率，同时也缩短了草甘膦离子对化合物在柱子上的保留时间。

表 6 - 7 为 NO₂⁻ 对该方法定量结果的影响，添加的 NO₂⁻ ≤ 4.31 % 时对样品中草甘膦的测定结果没有影响。而当 NO₂⁻ ≥ 4.98 % 时，样品中草甘膦的测定结果逐渐减小，且保留时间也开始缩短。NO₂⁻ 添加量为 33.33 % 时，草甘膦含量测定值下降至 49.67 %，对测定结果影响极大。若采用此法测定草甘膦样品，如 NO₂⁻ ≥ 4.98 % 必须首先考虑除杂。

表 6 - 8 为添加的 SO₄²⁻ 对草甘膦定量结果的影响，SO₄²⁻ ≥ 16.67 % 时草甘膦的测定结果由开始的 99.90 % 下降到 96.45 %。继续增加 SO₄²⁻ 的含量测定结果下降到 95 % 以后趋于平稳。草甘膦离子对化合物的保留时间也随着 SO₄²⁻ 含量的增加有逐渐减小。

表 6 - 9 中数据表明了 H₂PO₄⁻ 的存在给草甘膦间接光度色谱法测定结果带来的影响，当 H₂PO₄⁻ 的添加量在 0.00~4.98 % 的范围内对定量结果几乎没有影响。当 H₂PO₄⁻ 的添加量超过 9.09 % 时，测定结果开始小幅度的下降至 95 % 后趋于平稳。

表 6 - 10 中数据表明了 Cl⁻的存在, 会对草甘膦间接光度色谱法测定结果带来影响, 当 Cl⁻的添加量在 0.00~0.30 % 的范围内对定量结果几乎没有影响。当 Cl⁻的添加量超过 0.35 % 时, 测定结果开始逐渐下降。草甘膦离子对化合物与氯离子对化合物的两个色谱峰分离度, 氯离子占样品质量比 0.05 % 时可达 1.38, 可以满足定量要求; 质量比 1.48 % 时分离度仅有 0.58, 无法满足准确要求。经过实验证实, RP18、XSELECT CSH C₁₈、XBridge Shield RP18、Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈ 色谱柱对其离子对化合物都不能进行有效的分离, 都不如 RP8 柱。

表 6 - 6 溴离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响

Tab. 6 - 6 The effect on the determination of glyphosate by IPC_{na} from bromide ion

草甘膦进 样量/ ng glyphosate injection	Br ⁻ 进样量/ ng Br ⁻ injection	A	t _R	Br ⁻ 占样品的 质量百分比 / % Br ⁻ in the sample	草甘膦含量/ % Content of glyphosate
2 000	—	2 855 920	5.144	—	99.90
	10	2 855 933	5.143	0.50	99.90
	20	2 856 492	5.142	0.99	99.92
	30	2 859 922	5.143	1.48	100.04
	40	2 854 912	5.141	1.96	99.86
	50	2 822 376	5.140	2.44	98.73
	60	2 821 615	5.141	2.91	98.70
	70	2 822 186	5.140	3.38	98.72
	80	2 820 471	5.140	3.85	98.66
	90	2 817 041	5.139	4.31	98.54
	100	2 808 846	5.139	4.98	98.25
	200	2 693 789	5.131	9.09	94.23
	300	2 398 549	5.119	13.04	83.90
	400	2 150 959	5.112	16.67	75.24
	500	1 992 890	5.107	20.00	69.71
	600	1 741 134	5.077	23.08	60.90
	700	1 606 659	5.043	25.93	56.20
	800	1 219 885	5.041	28.57	42.67
	900	1 081 846	5.039	31.03	37.84
	1 000	1 008 767	5.027	33.33	35.29

表 6-7 亚硝酸根离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响

Tab. 6 - 7 The effect on the determination of glyphosate by IPC_{na} from nitrite ion

草甘膦进 样量/ ng glyphosate injection	NO ₂ ⁻ 进样量/ ng NO ₂ ⁻ injec- tion	A	t _R	NO ₂ ⁻ 占样品 的质量百分 比/ % NO ₂ ⁻ in the sample	草甘膦含量 / % Content of glyphosate
2 000	—	2 840 672	5.143	—	99.90
	10	2 840 952	5.142	0.50	99.91
	20	2 832 995	5.135	0.99	99.63
	30	2 812 237	5.133	1.48	98.90
	40	2 840 388	5.132	1.96	99.89
	50	2 811 384	5.132	2.44	98.87
	60	2 818 493	5.133	2.91	99.12
	70	2 817 071	5.131	3.38	99.07
	80	2 840 103	5.130	3.85	98.88
	90	2 809 109	5.130	4.31	98.79
	100	2 611 698	5.128	4.98	91.85
	200	2 584 214	5.116	9.09	90.88
	300	2 547 685	5.108	13.04	89.60
	400	2 455 328	5.087	16.67	86.35
	500	2 112 915	5.069	20.00	74.31
	600	1 972 387	5.058	23.08	69.36
	700	1 841 745	5.042	25.93	64.77
	800	1 740 235	5.036	28.57	61.20
	900	1 551 032	5.027	31.03	54.55
	1 000	1 412 345	4.925	33.33	49.67

表 6 - 8 硫酸根离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响

Tab. 6 - 8 The effect on the determination of glyphosate by IPC_{na} from sulfate ion

草甘膦进 样量/ ng glyphosate injection	SO ₄ ²⁻ 进样量/ ng SO ₄ ²⁻ injec- tion	A	t _R	SO ₄ ²⁻ 占样品 的质量百分 比/ % SO ₄ ²⁻ in the sample	草甘膦含量 / % Content of glyphosate
2 000	—	2 943 191	5.247	—	99.90
	10	2 946 726	5.242	0.50	100.02
	20	2 943 486	5.227	0.99	99.91
	30	2 945 548	5.219	1.48	99.98
	40	2 909 605	5.206	1.96	98.76
	50	2 943 780	5.191	2.44	99.92
	60	2 933 469	5.200	2.91	99.57
	70	2 941 129	5.189	3.38	99.83
	80	2 939 361	5.176	3.85	99.77
	90	2 934 353	5.163	4.31	99.60
	100	2 913 730	5.154	4.98	98.90
	200	2 919 917	5.120	9.09	99.11
	300	2 907 223	5.105	13.04	98.68
	400	2 841 497	5.102	16.67	96.45
	500	2 823 578	5.097	20.00	95.84
	600	2 822 694	5.076	23.08	95.81
	700	2 821 516	5.064	25.93	95.77
	800	2 819 453	5.046	28.57	95.70
	900	2 803 839	5.021	31.03	95.17
	1 000	2 802 660	5.010	33.33	95.13

表 6 - 9 磷酸二氢根离子对草甘磷间接光度色谱法测定结果的影响

Tab.6-9 The effect on the determination of glyphosate by IPC_{na} from dihydrogenphosphate ion

草甘磷进样 量/ ng glyphosate injection	H ₂ PO ₄ ⁻ 进样 量/ ng H ₂ PO ₄ ⁻ in- jection	A	t _R	H ₂ PO ₄ ⁻ 占样 品的质量百 分比/ % H ₂ PO ₄ ⁻ in the sample	草甘磷含量 / % Content of glyphosate
2 000	—	2 943 191	5.247	—	99.90
	10	2 946 726	5.245	0.50	100.00
	20	2 943 486	5.237	0.99	99.89
	30	2 945 548	5.218	1.48	99.91
	40	2 909 605	5.205	1.96	98.86
	50	2 943 780	5.192	2.44	99.98
	60	2 933 469	5.187	2.91	99.75
	70	2 941 129	5.178	3.38	99.38
	80	2 939 361	5.162	3.85	99.87
	90	2 934 353	5.153	4.31	99.60
	100	2 913 730	5.144	4.98	98.76
	200	2 919 917	5.120	9.09	97.13
	300	2 907 223	5.115	13.04	96.88
	400	2 841 497	5.112	16.67	96.15
	500	2 823 578	5.087	20.00	95.94
	600	2 822 694	5.066	23.08	95.82
	700	2 821 516	5.054	25.93	95.57
	800	2 819 453	5.036	28.57	95.30
	900	2 803 839	5.011	31.03	95.21
	1 000	2 802 660	5.000	33.33	95.03

表 6 - 10 氯离子对草甘膦间接光度色谱法测定结果的影响

Tab. 6 - 10 The effect on the determination of glyphosate by IPC_{in} from chloride ion

草甘膦进样量/ ng glyphosate injection	Cl ⁻ 进样量/ ng Cl ⁻ injection	A	t _R	Cl ⁻ 占样品的质量百分比/ % Cl ⁻ in the sample	草甘膦含量 / % Content of glyphosate
2 000	—	2 263 196	5.051	—	99.90
	1	2 248 244	5.051	0.05	99.24
	2	2 270 672	5.051	0.10	100.23
	3	2 262 743	5.050	0.15	99.88
	4	2 265 688	5.049	0.20	100.01
	5	2 252 775	5.051	0.25	99.44
	6	2 264 782	5.052	0.30	99.97
	7	2 217 660	5.050	0.35	97.89
	8	2 188 436	5.049	0.40	96.60
	9	2 174 163	5.048	0.45	95.97
	10	2 143 580	5.045	0.50	94.62
	20	2 107 332	5.044	0.99	93.02
	30	2 072 671	5.045	1.48	91.49
	40	2 001 082	5.043	1.96	88.33
	50	1 941 727	5.041	2.44	85.71
	60	1 939 688	5.037	2.91	85.62
	70	1 934 251	5.038	3.38	85.38
	80	1 918 846	5.037	3.85	84.70
	90	1 909 557	5.033	4.31	84.29
	100	1 881 239	5.031	4.98	83.04
	200	1 535 238	5.030	9.09	82.89
	300	1 515 122	5.031	13.04	76.47
	400	1 492 737	5.029	16.67	73.49
	500	1 490 370	5.025	20.00	64.21
600	1 407 144	5.022	23.08	63.25	
700	1 391 317	5.019	25.93	59.55	
800	1 404 943	5.017	28.57	58.94	
900	1 367 809	5.016	31.03	58.31	
1 000	1 288 821	5.014	33.33	56.89	

6. 2. 4 添加阴离子对三乙磷酸铝间接光度色谱法测定结果的影响

由 6. 2. 2 中测定结果可知三乙磷酸铝原药及其制剂中的阴离子为 SO₄²⁻和

H₂PO₃⁻。表 6 - 11 中数据可以看出, 当添加的 H₂PO₃⁻ ≤ 31.03 % 时对三乙磷酸铝的定量结果几乎没有影响, H₂PO₃⁻ 的含量超过 33.33 % 时, 样品中三乙磷酸铝的含量从开始的 99.6 % 下降到 94.71 %。但是从实际情况来看, 样品中 H₂PO₃⁻ 含量达到 33.33 % 几乎是不可能的。在表 6 - 12 中, 添加的 SO₄²⁻ 在 0.00~33.33 % 的范围内对三乙磷酸铝的定量结果均没有影响。所以在测定三乙磷酸铝样品时可以忽略 SO₄²⁻ 对定量结果的影响。

表 6 - 11 亚磷酸根离子对三乙磷酸铝间接光度色谱法测定结果的影响

Tab. 6 - 11 The effect on the determination of fosetyl-Al by IPC_{na} from phosphite ion

三乙磷酸铝 进样量/ ng fosetyl-Al injection	H ₂ PO ₃ ⁻ 进样 量/ ng H ₂ PO ₃ ⁻ injec- tion	A	t _R	H ₂ PO ₃ ⁻ 占样 品的质量百 分比/ % H ₂ PO ₃ ⁻ in the sample	三乙磷酸铝 / % Content of fosetyl-Al
2 000	—	2 458 887	8.326	—	99.60
	10	2 459 875	8.346	0.50	99.64
	20	2 458 640	8.358	0.99	99.59
	30	2 443 828	8.321	1.48	98.99
	40	2 460 368	8.365	1.96	99.66
	50	2 459 134	8.365	2.44	99.61
	60	2 457 656	8.341	2.91	99.85
	70	2 454 949	8.321	3.38	99.74
	80	2 451 503	8.374	3.85	99.60
	90	2 452 734	8.369	4.31	99.65
	100	2 458 393	8.322	4.98	99.58
	200	2 438 149	8.324	9.09	98.76
	300	2 434 199	8.356	13.04	98.60
	400	2 452 962	8.361	16.67	99.36
	500	2 434 446	8.354	20.00	98.61
	600	2 461 356	8.337	23.08	99.70
	700	2 430 249	8.326	25.93	98.44
	800	2 437 903	8.354	28.57	98.75
	900	2 427 287	8.328	31.03	98.32
	1 000	2 338 165	8.324	33.33	94.71

表 6 - 12 硫酸根离子对三乙磷酸铝间接光度色谱法测定结果的影响
 Tab. 6 - 12 The effect on the determination of fosetyl-Al by IPC_{na} from sulfate ion

三乙磷酸铝 进样量/ ng fosetyl-Al injection	SO ₄ ²⁻ 进样量/ ng SO ₄ ²⁻ injection	A	t _R	SO ₄ ²⁻ 占样品 的质量百分 比/ % SO ₄ ²⁻ in the sample	三乙磷酸铝 / % Content of fosetyl-Al
2 000	—	2 377 877	8.343	—	99.60
	10	2 379 310	8.326	0.50	99.66
	20	2 388 620	8.315	0.99	100.05
	30	2 381 458	8.354	1.48	99.75
	40	2 392 440	8.332	1.96	100.21
	50	2 348 750	8.315	2.44	98.38
	60	2 368 566	8.317	2.91	99.21
	70	2 376 445	8.326	3.38	99.54
	80	2 360 449	8.325	3.85	98.87
	90	2 371 670	8.331	4.31	99.34
	100	2 365 224	8.326	4.98	99.07
	200	2 380 026	8.327	9.09	99.69
	300	2 376 683	8.319	13.04	99.55
	400	2 378 593	8.330	16.67	99.63
	500	2 353 764	8.326	20.00	98.59
	600	2 354 003	8.327	23.08	98.60
	700	2 367 372	8.325	25.93	99.16
800	2 365 701	8.331	28.57	99.09	
900	2 358 061	8.325	31.03	98.77	
1 000	2 376 922	8.342	33.33	99.56	

6.3 小结

6.3.1 采用离子色谱法分别对草甘膦、三乙磷酸铝原药及其制剂中的阴离子进行了定性、定量分析。确定了草甘膦原药中阴离子含量分别为 Cl⁻: 0.14 %、H₂PO₄⁻: 0.16 %、SO₄²⁻: 0.16 %; 草甘膦铵盐 Cl⁻: 0.84 %、NO₂⁻: 0.08 %、Br⁻: 0.63 %、SO₄²⁻: 0.03 %; 草甘膦异丙胺盐: Cl⁻: 0.29 %、NO₂⁻: 0.05 %、H₂PO₄⁻: 0.22 %、SO₄²⁻: 0.06 %。三乙磷酸铝原药中阴离子含量分别为: H₂PO₃⁻: 5.88 %、SO₄²⁻: 4.74 %; 三乙磷酸铝可湿性粉剂: H₂PO₃⁻: 8.49 %、SO₄²⁻: 11.22 %。

6.3.2 通过添加阴离子的方式分别考察了 Br⁻、NO₂⁻、H₂PO₄⁻、SO₄²⁻和 Cl⁻对草甘膦间接光度色谱法定量结果的影响, 结果表明当草甘膦样品中 Br⁻

$\leq 4.98\%$ 、 $\text{NO}_2^- \leq 4.31\%$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^- \leq 4.98\%$ 、 $\text{SO}_4^{2-} \leq 13.04\%$ 、 $\text{Cl}^- \leq 0.30\%$ 时草甘膦测定结果将不会受到影响。所以在分析草甘膦样品时，当其中的阴离子含量较高时首先考虑除杂。

6.3.3 根据 6.2.4 中的测定结果可知，三乙磷酸铝样品中 H_2PO_3^- 、 $\text{SO}_4^{2-} \leq 31.03\%$ 时对定量结果没有影响。测定三乙磷酸铝原药和可湿性粉剂中的 H_2PO_3^- 和 SO_4^{2-} 含量均不在影响范围内，所以可以忽略这两种离子对测定结果的影响。

结 论

- 1 以纯水相 RP 高效液相色谱柱为反应器，实现了亲核加成纳克有机合成并同步将生成的具有紫外吸收的离子对化合物用于磷酸（盐）类化合物的定量分析。
- 2 发现了 1,3-二苯胍的新用途，可作为磷酸（盐）类化合物离子对探针使用。二者在柱上发生亲核加成反应，LC-Q/TOF 定性确证生成了 2 个新共价键化合物。
- 3 首次提出并证实了三电层离子对探针作用机理模式。固定相表面单分子层，高密度的酰胺极性基团（第一电层）静电吸引流动相中的饱和一元羧酸阴离子（第二电层）。由于一元羧酸存在共轭体系，二苯胍阳离子（第三电层）靠静电力也会吸附其上形成静态的三电层。实测固定相上二苯胍分布密度高于平衡后流动相中的约 14 倍，创造液液分离界面形成非匀相体系是纳克有机合成的关键，也是亲核加成间接光度色谱法得以应用的前提。
- 4 本文建立了草甘膦、三乙磷酸铝原药、制剂的间接光度色谱定量分析方法，确认了杂质的分离。磷酸（盐）类代表性农药品种草甘膦的分析方法：RP8 色谱柱， $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸水溶液为流动相，流速为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，232 nm 检测；分析三乙磷酸铝时采用 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液。主要控制指标杂质离子草甘膦中亚硝基草甘膦、三乙磷酸铝中亚磷酸能够获得较好分离。该方法的准确度和精密度满足了常量分析的要求，样品测定结果准确可靠。其特点是操作简便、快速、分析成本低、环境保护相容性好。本文创立的方法具有很强的实用性与指导性。
- 5 明确了常见无机阴离子，对磷酸（盐）类化合物间接光度色谱法测定结果的影响。Cl⁻ 离子含量较高时（>0.35 %）对草甘膦测定结果会造成干扰。样品中 H₂PO₄⁻、SO₄²⁻、NO₂⁻ 的含量影响可忽略不计。三乙磷酸铝原药、可湿性粉剂样品中所含杂质阴离子 H₂PO₃⁻、SO₄²⁻ 对测定结果没有干扰。
- 6 亲核加成间接光度色谱法已被企业应用于分析监测、检测阻燃剂单体磷酸盐类化合物的合成。

参考文献

- [1] 中国农药信息网, 通过有效成分查询产品 [DB]. [2013-03-12]. <http://www.icama.org.cn/service.aspx/B3.aspx>.
- [2] 丁宁. 三乙磷酸铝的离子色谱分析及原药全分析 [D]. 青岛: 青岛科技大学化工学院, 2008.
- [3] 张玉奎, 张维冰, 邹汉法. 分析化学手册(第二版)第六分册 液相色谱分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000, 49.
- [4] 牟世芬, 刘克纳. 离子色谱方法及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000, 149.
- [5] Koll A, Rospenk M, Bureiko S F, *et al*. Molecular structure and association of diphenylguanidine in solution [J]. *J Phys Org Chem*, 1996, 9: 487 - 497.
- [6] HG/T 2342-92 硫化促进剂 DPG (二苯胍) [S]. 北京: 中华人民共和国化学工业部, 1992.
- [7] 全国农药标准化技术委员会. 中华人民共和国化工行业标准 HG 3297-2001 三乙磷酸铝可湿性粉剂 [S]. 北京: 国家经济贸易委员会, 2001.
- [8] 全国农药标准化技术委员会. 中华人民共和国化工行业标准 HG 3296-2001 三乙磷酸铝原药 [S]. 北京: 国家经济贸易委员会, 2001.
- [9] 全国农药标准化技术委员会. GB 12686-2004, 草甘膦原药 [S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局/中国国家标准化管理委员会, 2005.
- [10] 巩莹, 古耘, 刘吉华, 等. 络合滴定测定三乙 锰中三乙磷酸铝含量 [J]. *河南化工*, 1998, (4): 25 - 26.
- [11] 何凯, 李国芳, 吴柱东, 等. 草甘膦分析方法的研究进展 [J]. *理化检测-化学分册*, 2011, 47: 991 - 995.
- [12] 范淑霞. 亚硝化滴定法分析草甘膦 [J]. *农药*, 1988, 27 (3): 31.
- [13] 胡宝祥, 莫卫民, 孙楠. ELSD-HPLC 联用测定制剂中草甘膦的含量 [J]. *农药*, 2005, 44 (8): 365 - 367.
- [14] 范志先, 贾淑敏, 丁宁, 等. 离子对反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定三乙磷酸铝的含量 [J]. *色谱*, 2009, 27 (6): 849 - 851.
- [15] 谢赞, 蒋晔, 田书霞. 反相离子对色谱-蒸发光散射法测定帕米磷酸钠及其有关物质 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26 (12): 1729 - 1732.
- [16] 蒋晔, 张晓青, 徐智儒, 等. 反相离子对色谱/蒸发光散射检测器分离唑来膦酸及其有关物质 [J]. *分析化学*, 2005, 33 (10): 1455 - 1458.
- [17] 王巧娥, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术研究进展 [J]. *分析测试学报*, 2006, 25 (6): 126 - 132.
- [18] 屠春燕, 赵珺, 葛佳璐, 等. 新型衍生试剂柱前衍生氨基酸的高效液相色谱分析 [J]. *分析测试学报*, 2008, 28 (7): 681 - 685.
- [19] 梁冬生, 常碧影. 柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸 [J]. *色谱*, 1993, 11 (3): 140 - 143.
- [20] 孙燕桥, 陈茂华, 张东, 等. 新型衍生试剂芳基重氮甲烷快速衍生有机磷酸 [J]. *防化学报*, 1996, 7 (54): 23 - 27.

- [21] 方芳, 徐会, 魏荣卿, 等. 草甘膦的邻硝基苯磺酰氯柱前衍生高效液相色谱分析 [J]. 分析测试学报, 2011, 30 (6): 683 - 686.
- [22] 孙立荣, 迟志娟, 刘贤金, 等. 气相色谱法测定苹果中三乙磷酸铝残留 [J]. 农药, 2009, 48 (10): 747 - 748.
- [23] 潘熙萍, 楼佳俊, 张高精, 等. 草甘膦残留检测技术的研究进展 [J]. 杭州师范大学学报, 2011, 10 (6): 506 - 509.
- [24] 赖丰英, 周微. 农药混剂中三乙磷酸铝含量测定方法的探讨 [J]. 化工技术与开发, 2007, 36 (1): 39 - 41.
- [25] Pelegri R, Gamon M, Coscolla R, *et al.* The metabolism of fosetyl-aluminium and the evolution of residue levels in oranges and tangerines [J]. Pestic Sci, 1993, 39: 319 - 323.
- [26] 林琳, 鲁斌礼, 张军, 等. 离子色谱法测定草甘膦原药中的杂质成分 [J]. 农药, 2009, 48 (10): 734 - 735.
- [27] 戚荣平, 邱晓枫, 孟琪, 等. 离子色谱法测定水中草甘膦含量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21 (4): 820 - 821.
- [28] 吴燕琴, 郭梁钻, 谢丽章. 饮用水中草甘膦的离子色谱法测定 [J]. 广东化工, 2012, 39 (6): 224 - 225.
- [29] 王雪, 朱岩, 张嘉捷. 离子色谱法同时测定三(乙基磷酸)铝原药纯度及各杂质离子的含量 [J]. 浙江大学学报, 2009, 36 (2): 180 - 182.
- [30] 丁宁, 范志先, 葛海英, 等. 三乙磷酸铝的纯化与离子色谱分析 [J]. 青岛科技大学学报, 2008, 29 (3): 200 - 203.
- [31] 杨舰. 高效液相色谱/质谱联用仪在农药全分析中的应用 [J]. 环境化学, 2001, 20 (4): 407 - 408.
- [32] 雷荣, 马丽娟, 怀其勇, 等. 高效液相色谱-串联质谱法鉴定伊维菌素的成分 [J]. 分析化学, 2002, 30 (1): 26 - 30.
- [33] Félix Hernández, Juan V Sancho, Óscar J Pozo. Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun. Mass Spectrom, 2002, 16: 1766 - 1773.
- [34] Robin M. Black, Robert W. Read. Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 794: 233 - 234.
- [35] Poustka J, Hajslova J, Holadova K, *et al.* Potential of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry for determination of fosetyl-aluminium residues in dried hops [J]. Czech J Food Sci, 2004, 22(1): 24 - 28.
- [36] Félix Hernández, Juan V Sancho, Óscar J Pozo, *et al.* Rapid determination of fosetyl-aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. Journal of AOAC international, 2003, 86 (4): 832 - 838.
- [37] Jan Pousika, Jana Hajšlová, Katerina Holadová *et al.* Potential of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry for determination of fosetyl-aluminium residues in dried hops [J]. Czech J Food Sci, 2004, 22 (1): 24 - 28.
- [38] ZROSTLÍKOVÁ J, HAJŠLOVÁ J, POUŠIKA J, *et al.* Alternative calibration approaches to

- compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant matrices [J]. *Chromatogr A*, 2002, 973: 13 - 26.
- [39] ZROSTL ĀOVÁ J, HAJŠLOVÁ J, KOVALCUZUK I, *et al.* Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of AOAC international*, 2003, 86: 612 - 622.
- [40] Small H, Miller T E. Indirect photometric chromatography [J]. *Anal Chem*, 1982, 54(3): 462 - 469.
- [41] Jenke D R. Standardization of transparent analyte response in indirect photometric chromatography [J]. *Anal Chem*, 1984, 56(13): 2468 - 2470.
- [42] Jenke D R. Modeling of analyte behavior in indirect photometric chromatography [J]. *Anal Chem*, 1984, 56(14): 2674 - 2681.
- [43] Cmmen J. Fraetionation and characterization of acidic ologosaccharides and glycopeptides from normal and pathological urines [J]. *Chromatogr*, 1977.142: 283.
- [44] 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. 反相离子对色谱法及其应用 [J]. *色谱*, 1992, 10 (6): 329 - 333.
- [45] 达世禄. 间接光度高效液相色谱 [J]. *分析化学*, 1989, 17 (4): 372 - 381.
- [46] 余嘎尔, 徐和德. 间接光度色谱法简介 [J]. *色谱*, 1987, 5 (2): 94 - 97.
- [47] Pettersson CY, Sehill G. Chiral separation of aminoalcohols by ion-pair chromatography [J]. *Chromatographia*, 1982, 16: 192.
- [48] Hackzell L, Schill G. Detection by ion-pairing probes in reversed-phase liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 1982, 15(7): 437 - 444.
- [49] Sherman J H, Danielson N D, Hazey J W. Simultaneous determination of sodium, potassium, magnesium, and calcium ions in milk products by indirect photometric high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 1988, 36(5): 966 - 969.
- [50] Boiani J A. Spectator ion indirect photometric detection of aliphatic anionic surfactants separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1987, 59(21): 2583 - 2586.
- [51] Larson J R, Pffelffer C D. Determination of alkyl quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with indirect photometric detection [J]. *Anal Chem*, 1983, 55(2): 393 - 396.
- [52] Iskandarani Z, Miller T E. Simultaneous independent analysis of anions and cations using indirect photometric chromatography [J]. *Anal Chem*, 1985, 57(8): 1591 - 1594.
- [53] Bidlingmeyer B A, Warren F V. Effect of ionic strength on retention and detector response in reversed-phase ion-pair liquid chromatography with ultraviolet-absorbing ion interaction reagents [J]. *Anal Chem*, 1982, 54(13): 2351 - 2356.
- [54] 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. 反相离子对色谱保留值变化规律式的推导 [J]. *色谱*, 1991, 9 (3): 157 - 162.
- [55] 邹汉法, 张玉奎, 洪名放, 等. 反相离子对色谱中有机溶剂浓度和离子对试剂浓度对保留值的影响 [J]. *化学学报*, 1994, 52: 1106 - 1111.
- [56] 洪名放, 邹汉法, 张玉奎, 等. 反相离子对色谱中离子对试剂浓度对保留值的影响 [J]. *化学学报*, 1993, 51: 178 - 183.
- [57] Brown D, Payton R, Jenke D. Elimination of matrix related interferences in indirect photomet-

- ric chromatography [J]. *Anal Chem*, 1985, 57(12): 2264 - 2267.
- [58] 周炜, 刘文英. 高效液相色谱间接光度检测法及其应用 [J]. *国法医学药学分册*, 1991, 18 (5): 269 - 273.
- [59] 邵容姿, 刘屏. 高效液相色谱间接光度检测法及其应用现状 [J]. *实用医药杂志*, 2005, 22 (4): 356 - 359.
- [60] 樊小辉. 高效液相色谱间接紫外光度法的研究 [J]. *化工技术与开发*, 2002, 31 (3): 34 - 35.
- [61] 邹汉法, 张玉奎, 洪名放, 等. 反相离子对色谱保留机理研究的进展 [J]. *自然科学进展-国家重点实验室通讯*, 1994, 4 (4): 403 - 409.
- [62] 苏立强, 郑永杰, 杨铁金, 等. 色谱分析法 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2009.17.
- [63] Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W. 现代液相色谱技术导论 第3版 [M]. 陈小明, 唐雅妍, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2012, 156 - 162.
- [64] Royal Society of Chemistry, Structure search [DB]. [2013-04-05]. <http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>.
- [65] SciFinder, Chemical Structure exact [DB]. [2013-05-07]. <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.
- [66] Xing H, Zhang Y, Lai Y S, *et al.* Synthesis of symmetrical and unsymmetrical *N,N'*-diaryl guanidines via copper/*N*-methylglycine-catalyzed arylation of guanidine nitrate [J]. *J Org Chem*, 2012, 77: 5449 - 5453.
- [67] Preti C, Tosi G. Conductometric titrations in 2-methoxyethanol with *N,N'*-diphenylguanidine as standard Lewis base [J]. *Anal Chem*, 1981, 53(1): 48 - 51.
- [68] Gushchin P V, Kuznetsov M L, Haukka M, *et al.* A novel reactivity mode for metal-activated dialkylcyanamide species: addition of *N,N'*-diphenylguanidine to a *cis*-(R₂NCN)₂Pt^{II} center giving an eight-membered chelated platinoguanidine [J]. *Inorganic Chemistry*, 2009, 48(6): 2583 - 2592.
- [69] 叶纪明, 刘绍仁, 姜淑秀, 等. 草甘膦水剂分析方法研究 [J]. *农药科学与管理*, 1993, 4: 22 - 25.
- [70] 张丽娟, 韦少平, 李致宝, 等. 高效液相色谱法同柱分析草甘膦和双甘膦 [J]. *农药*, 2009, 48 (6): 431 - 432.
- [71] 戴郁菁, 姚杰, 冯玉英. 红外光谱法测定草甘膦铵盐的含量 [J]. *农药*, 2011, 50 (10): 732 - 736.
- [72] 李广, 韦志明, 廖艳芳, 等. 双甘膦和草甘膦的高效液相色谱分析法 [J]. *世界农药*, 2008, 30 (6): 45 - 46.
- [73] 高双飞, 王远, 尹荃, 等. 双甘膦和草甘膦及副产物的高效液相色谱分析 [J]. *农药*, 2010, 49 (9): 664 - 665.
- [74] 董文庚, 陈学诚, 郎志敏, 等. 褪色分光光度法间接测定草甘膦 [J]. *分析化学*, 1997, 25 (10): 1210 - 1212.
- [75] 吴晓红, 杨文远. 用反相高效液相色谱法测定农药草甘膦含量的研究 [J]. *宁夏大学学报*, 2006, 27 (4): 351 - 353.
- [76] 沈清, 程浩, 谭炜. 草甘膦标准样品的制备研究[J]. *安徽化工*, 2009, 35 (4): 74 - 76.

- [77] 范志先, 宋述尧, 马凡如, 等. 三乙膦酸铝及其与代森锰锌混剂的顶空气相色谱分析方法 [J]. 色谱, 1993, 11 (5): 285 - 287.
- [78] 范志先, 李娇, 丁宁, 等. 三乙膦酸铝原药全分析 [J]. 现代农药, 2010, 9 (6): 28 - 31
王仪, 郑斐能. 代森锰锌或福双美与三乙膦酸铝混合可湿性粉剂中三乙膦酸铝的测定 [J]. 农药, 1991, 30 (6): 22.
- [79] Giordano R, Ciaralli L, Ciprotti M, *et al.* Applicability of high-performance ion chromatography (HPIC) to the determination of fosetyl-aluminum in commercial formulations [J]. Microchemical J, 1995, 52: 68 - 76.
- [80] Hernandez F, Sancho J V, Pozo O J, *et al.* Rapid determination of fosetyl-aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. J AOAC International, 2003, 86(4): 832 - 838.

附录一 略缩词表

略缩词	英文全称	中文名称
A	area	峰面积
BEH	Ethylene Bridged Hybrid	亚乙基桥杂化颗粒
CSH	Charged Surface Hybrid	表面带电杂化颗粒
d	Day	天
DAD	Diode array detector	二极管阵列检测器
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	蒸发光散射检测器
h	Hour	小时
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
HPT	hybrid particle technology	杂化颗粒技术
IC	Ion Chromatography	离子色谱图或离子色谱法或离子色谱仪
IEC	Ion exchange chromatography	离子交换色谱法
IPC	Ion Pair Chromatography	离子对色谱
IPC	Indirect photometric chromatography	间接光度色谱法
IPC _{na}	Indirect photometric chromatography by Nucleophilic additions	亲核加成间接光度色谱法
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrograph	液相色谱-质谱联用法/仪
LC-MS-MS	Liquid Chromatography-Tandem -Mass Spectrograph	液相色谱-串联质谱法/仪
LC-Q/TOF	Liquid Chromatography-Quadrupole/Time of Flight- Mass Spectrograph	液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用仪
LD ₅₀	Median lethal dose	致死中量
LOD	Limit of detection	检出限
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	核磁共振波谱法/仪
RSD	Relative standard deviation	相对标准偏差
S/N	Signal-to-noise ratio	信噪比
SPM	System Peak of Modifier	改性剂系统峰
t _R	Retention time	保留时间

致 谢

春去夏至，寒暑易节。在这繁花似锦的时光里，即将完成我攻读硕士学位的学习，从一个新的起点，继续人生的旅程。这是一年中最馥郁的季节，也是人生中最美好的年月。值此论文完成之际，我谨向所有曾给予我关心和帮助的人们致以最诚挚的谢意！

本硕士学位论文是在我的导师范志先教授的悉心指导下完成的，从论文的选题、设计、实验的开展以及论文的撰写，范老师都给予了我亲切的关心和指导，保证了论文的顺利完成。范老师渊博的知识，敏锐的学术思维，严谨的治学态度以及忘我的工作精神，是我工作和学习的榜样，并且时时刻刻感动和鼓舞着我，将使我受益终生；日常学习生活中范老师创造了紧张而自由的学术氛围，传授给我们丰富的专业知识和科研创新能力，以及在为人处事方面潜移默化地教会我很多做人的道理，都将使我终生受用不尽！再次感谢范老师对我的辛勤培养，春风化雨，永铭于心！

感谢唐林生教授、冯柏成教授对柱上反应机理分析所给予的热情指导。

同时要特别感谢王树娟和李娇师姐在我刚进入实验室后对我在仪器使用和实验设计方面的热忱指点。感谢赵文英师姐在实验方面给予的热心帮助。感谢李文祺、张凯、徐波昌、冯猛、王铁健、丁晓东、张栋、张青、程媛、许庆云等师弟、师妹陪同我一起完成部分的实验内容。

感谢同寝的姐妹们，谢谢你们陪我度过三年精彩的研究生时光，和你们在一起共同学习、共同生活、共同奋斗，使我获得了深厚的友谊和难忘的欢乐，也使我的生活充满朝气和活力！

还要特别感谢我的家人一直以来为我默默的付出，你们在我工作、学习、生活以及精神上给予的极大支持和理解是我坚持不懈、持之以恒的动力，谢谢你们为我所奉献的一切。

值此，特别感谢评阅我论文的专家和答辩委员会的全体老师们，感谢您们在百忙之中参加我的硕士论文答辩，给予真诚的指教！

张 晖

二〇一三年六月六日于青岛

攻读学位期间发表的学术论文

- [1] 王树娟, 李 娇, 张 晖, 田 霞, 范志先. 气相色谱法检测毒死蜱在桃上的残留 [J]. 青岛科技大学学报 (自然科学版), 2011, 32(4): 365 - 368.
- [2] 范志先, 张 晖, 李 娇. 高效液相色谱法测定酰嘧磺隆、乙氧磺隆、烟嘧磺隆原药的含量 [J]. 现代农药, 2011, 10(5): 34-37.
- [3] 范志先, 李 娇, 张 晖, 薄振海, 李 毅, 何 涛. 27 种市售瓶装饮用水中阴阳离子的离子色谱分析[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(增刊): 11-14.
- [4] 张 晖, 范志先. 阻燃剂五溴苄基溴的高效液相色谱分析[J]. 分析试验室, 2011, 30(增刊): 360-362.
- [5] 张 晖, 范志先. 阻燃剂丙烯酸五溴苄酯的气相色谱分析[J]. 盐业与化工, 2012, 41(1): 12-14.

声 明

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

本人签名： 张 晖 日期： 2013 年 6 月 6 日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解青岛科技大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青岛科技大学。(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

本学位论文属于：

保密 ，在 1 年解密后适用于本声明。

不保密 。

(请在以上方框内打“√”)

本人签名： 张 晖 日期： 2013 年 6 月 6 日

导师签名： 范志先 日期： 2013 年 6 月 6 日