

虚拟模板分子印迹固相萃取-高效液相色谱法 检测果蔬中三唑类杀菌剂

刘 博,尹 航,高文惠

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

摘 要:采用本体聚合法自制了联苯三唑醇分子印迹聚合物(MIP),以此聚合物为固相萃取剂,制备固相萃取柱,对果蔬中烯唑醇、戊唑醇进行分离富集,并采用高效液相色谱法测定其在果蔬中的残留。烯唑醇平均回收率在74.6%~88.6%之间,检测限为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。戊唑醇平均回收率在66.9%~73.3%之间,检测限为0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词:三唑类杀菌剂;虚拟模板分子印迹聚合物;固相萃取;高效液相色谱法

中图分类号:O657.32;O641.3 **文献标志码:**A

Detection of triazole fungicides in fruit and vegetable by virtual-template molecularly imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography

LIU Bo, YIN Hang, GAO Wenhui

(School of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: The solid phase extraction column is prepared by mass polymerization with bitertanol molecularly imprinted polymer (MIP) as solid phase extraction agent. Diniconazole and tebuconazole in fruit and vegetable can be separated and enriched by the column, and their residuals are determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The average recoveries of diniconazole and tebuconazole are 74.6%~88.6% and 66.9%~73.3%, respectively. The detection limits are 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for diniconazole and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for tebuconazole.

Key words: triazole fungicides; virtual-template molecularly imprinted polymer; solid phase extraction; high performance liquid chromatography

杀菌剂的使用在中国农业种植过程中担当了越来越重要的作用,使用量和使用面积逐年增加。烯唑醇和戊唑醇属于三唑类杀菌剂。这类杀菌剂具有高效、广谱、内吸性的特点,其防治病菌的机理主要是它们能抑制菌体细胞膜上麦角甾醇的去甲基化,从而使病菌无法形成细胞膜,进而杀死病菌。这些三唑类杀菌剂对生物体有以下危害:1)损害神经系统;2)使机体的生殖机能下降或产生异常现象;3)降低生物体的免疫能力并诱发肿瘤。

收稿日期:2013-05-02;修回日期:2013-09-08;责任编辑:王海云

基金项目:河北省科技支撑计划(10276902D);石家庄市科技支撑计划(12149472A)

作者简介:刘 博(1987-),男,吉林通化人,硕士研究生,主要从事质量与安全检测方面的研究。

通讯作者:高文惠教授。E-mail:wenhuigao@126.com

分子印迹技术现在越来越多地被用于食品中有害物质的检测中,主要研究内容有新模板物质开发^[1-2]、功能单体选择等。近几年分子印迹技术得到了快速发展,主要因为分子印迹技术具有特异性选择、可反复使用、耐苛刻条件、简化前处理、制作简单等优点^[3]。其广泛应用于化学仿生传感器^[4-6]、模拟酶催化^[7-10]、固相萃取技术^[11-21]等领域。

虚拟模板技术是利用与目标物结构类似的模板物质进行合成,利用所得聚合物对目标物质分离富集。采用虚拟模板技术合成分子印迹聚合物有效地降低了合成过程中的毒性和成本,还能避免模板泄露导致的定量不准确问题,而又能达到对目标物的高吸附效果^[1]。

本文采用本体聚合法自制了联苯三唑醇分子印迹聚合物(MIP),以此聚合物为固相萃取剂,制备固相萃取柱,对果蔬中烯唑醇、戊唑醇进行分离富集,并采用高效液相色谱法测定其在果蔬中的残留。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

联苯三唑醇(纯度为99%,上海酶联生物科技有限公司提供);烯唑醇(纯度为98%,北京金宝在线科技有限公司提供);戊唑醇(纯度为98%,北京金宝在线科技有限公司提供);甲醇、乙腈(色谱纯,天津市光复精细化工研究所提供); α -甲基丙烯酸酯(MAA,分析纯,天津市化学试剂一厂提供,使用前需要重蒸以除去阻聚剂);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA,分析纯,抚顺安信化学有限公司提供);偶氮二异丁腈(AIBN,化学纯,天津市大茂化学试剂厂提供)。

LC-20A 高效液相色谱仪,配紫外检测器(日本岛津公司提供);SHZ-82A 型恒温水浴振荡器(江苏省太仓医疗器械厂提供);ASE-12 固相萃取仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司提供);KH5200 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司提供)。

1.2 分子印迹聚合物制备

实验室自制分子印迹聚合物:将0.2 mmol 联苯三唑醇和0.8 mmol 的 α -甲基丙烯酸酯(MAA)放入50 mL 的安瓿瓶中,加致孔剂使其反应,超声1 h,振荡30 min 后,再加交联剂EDMA 和引发剂AIBN。超声30 min,混匀后通入 N_2 脱氧15 min 后,抽真空1 min 后密封,在恒温水浴振荡器中振荡24 h,得块状固体MIP。经研磨、粉碎,过200目(75 μ m)筛,再用去离子水沉降聚合物3次除去过细粉末。将最终得到的MIP 颗粒用甲醇-乙腈(体积比为95:5)洗脱至无模板分子,最后用甲醇浸泡1 h 除去残留的乙酸,洗脱后的聚合物放入真空干燥器中(45 $^{\circ}$ C)干燥6 h,得到联苯三唑醇模板聚合物MIP。

1.3 固相萃取柱制备

将研磨后过200目(75 μ m)筛的分子印迹聚合物装填入内径为1.5 cm、长为15 cm 的具砂芯层析管,层析管有效分离区域高2 cm,在上端加2 cm 高的脱脂棉,轻轻挤压使柱子填充紧实。

1.4 色谱条件

色谱柱:安捷伦 C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m),检测波长为230 nm,流动相为甲醇-水(体积比为70:30),流速为1 mL/min,柱温箱温度为25 $^{\circ}$ C,进样量为20 μ L。

1.5 样品前处理

分别称取5.00 g 苹果和白菜样品,捣碎,加6 g 无水硫酸钠,用20 mL 乙腈溶解,混匀,超声15 min,于4 000 r/min离心10 min,吸取上清液过分子印迹固相萃取柱,用三蒸水20 mL 淋洗,待排净淋洗液后,用10 mL 甲醇洗脱^[19],收集洗脱液待检。

2 结果与讨论

2.1 分子印迹固相萃取柱对样品净化和检测效果

分子印迹固相萃取柱利用非共价键对目标物吸附,通过淋洗液将杂质去除,最后利用洗脱液将目标物洗脱下来。淋洗液的量对样品净化起到至关重要的作用,若淋洗液量少,会导致洗脱后洗脱液的液相色谱图出峰复杂,干扰分析。分别测试了5~20 mL 4个淋洗液用量,结果发现20 mL 淋洗液可将杂质全部洗去。从图1和图2对比可知联苯三唑醇分子印迹固相萃取柱对样品净化效果明显。从图3可知,其对结构类似物烯唑醇和戊唑醇具有选择性的吸附作用,从而表现了它从复杂基质条件下分离富集目标物

的优越性能。

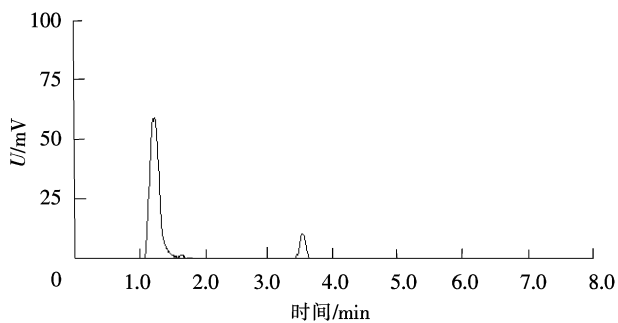


图 1 苹果原液色谱图

Fig. 1 Sample chromatograms of apples stock solution

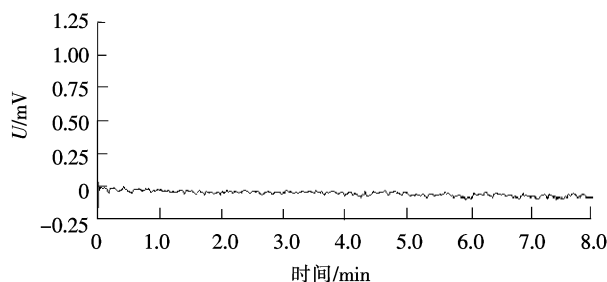
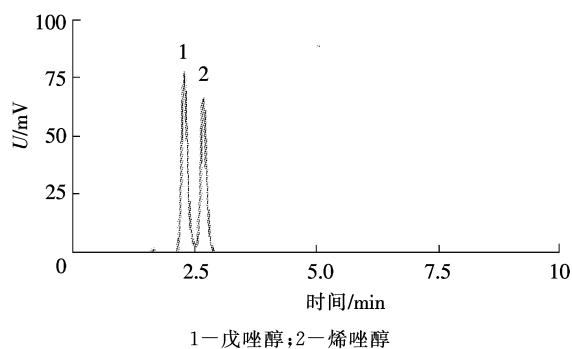


图 2 苹果样品过柱后色谱图

Fig. 2 Chromatograms of effluent aftersample cross SPE column

2.2 分子印迹聚合物对结构类似物的识别作用

由于形成分子印迹聚合物的模板物质联苯三唑醇分子中存在着带有孤对电子的 N 原子,其电负性较大,能和羧基中的 H 原子形成氢键,由此可推测模板分子与功能单体 MAA 的作用形式。烯唑醇和戊唑醇以及联苯三唑醇都属于三唑类杀菌剂,它们在结构上都有三唑环,有带孤对电子的 N 原子,化学结构式类似(见图 4),所以联苯三唑醇分子印迹聚合物能够对烯唑醇和戊唑醇吸附,形成非共价键结合而产生识别作用。



1-戊唑醇;2-烯唑醇

图 3 苹果加戊唑醇和烯唑醇后过柱洗脱液色谱图

Fig. 3 Sample solution added standard after passing SPE column

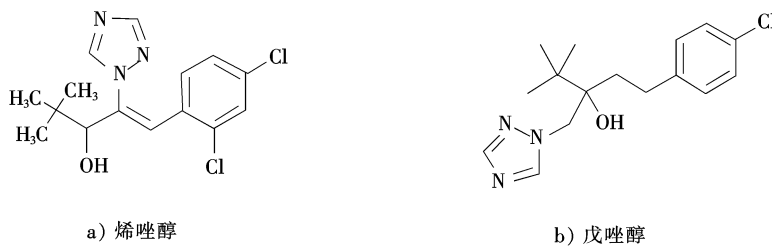


图 4 化学结构式

Fig. 4 Chemical structural formula

2.3 线性范围与检测限

将烯唑醇和戊唑醇分别配制成质量浓度为 0.25,0.5,1,2,5,10,20,50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的一系列标准溶液,在 1.4 色谱条件下绘制烯唑醇和戊唑醇的线性关系曲线,其线性关系和检测限见表 1。

表 1 烯唑醇和戊唑醇的线性关系及检测限

Tab. 1 Linear equation and detection limit of tebuconazole and diniconazole

药品	线性方程	线性相关系数	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
烯唑醇	$y=31\ 982.394\ 3x+35\ 511.879\ 7$	0.999 9	1~200	0.5
戊唑醇	$y=30\ 063.550\ 2x+8\ 292.075\ 3$	0.999 8	0.5~200	0.25

2.4 方法回收率和精密度

采用本方法对果蔬样品在 $10 \mu\text{g/g}$ 和为 $100 \mu\text{g/g}$ 2 个烯唑醇和戊唑醇添加水平下,进行加标回收率实验,分析结果如表 2 所示,烯唑醇平均回收率为 $74.6\% \sim 88.6\%$,相对标准偏差(RSD)为 $2.0\% \sim 3.7\%$ ($n=5$)。戊唑醇平均回收率为 $66.9\% \sim 73.3\%$,相对标准偏差(RSD)为 $1.2\% \sim 3.1\%$ ($n=5$)。说明方法的回收率和精密度良好。

表 2 果蔬的回收率实验($n=5$)

Tab. 2 Recovery of fruit and vegetable($n=5$)

测定次数	苹果				白菜			
	$\omega(\text{烯唑醇})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$		$\omega(\text{戊唑醇})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$		$\omega(\text{烯唑醇})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$		$\omega(\text{戊唑醇})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	
	10	100	10	100	10	100	10	100
1	91.9	84.0	68.4	73.9	72.9	71.4	67.0	68.3
2	85.2	86.97	69.2	70.2	78.2	70.5	70.2	63.1
3	87.1	88.3	67.7	75.0	74.4	74.6	73.2	66.3
4	89.4	89.2	66.3	74.2	77.1	79.2	75.2	70.1
5	89.2	87.8	69.0	73.1	73.1	77.1	71.2	66.7
平均回收率	88.6	87.3	69.0	73.3	75.1	74.6	71.4	66.9
相对标准偏差	2.5	2.0	1.2	1.9	2.4	3.7	3.1	2.6

3 结 论

采用本体聚合法自制了联苯三唑醇分子印迹聚合物(MIP),以此聚合物为固相萃取剂,制备固相萃取柱,对果蔬中烯唑醇和戊唑醇进行分离富集,并采用高效液相色谱法测定其在果蔬中的残留。结果表明,利用此印迹聚合物对样品进行前处理,其净化效果好。烯唑醇线性范围为 $1 \sim 200 \mu\text{g/mL}$,线性相关系数 $r=0.9999$,样品平均回收率为 $74.6\% \sim 88.6\%$,相对标准偏差(RSD)为 $2.0\% \sim 3.7\%$ ($n=5$),检测限为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 。戊唑醇线性范围为 $0.5 \sim 200 \mu\text{g/mL}$,线性相关系数 $r=0.9998$,样品平均回收率为 $66.9\% \sim 73.3\%$,相对标准偏差(RSD)为 $1.2\% \sim 3.1\%$ ($n=5$),检测限为 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 。

参考文献/References:

- [1] KOSTER E H M, CRESCENZI C, de HOEDT W, et al. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(13): 3 140-3 145.
- [2] 郑红, 胡力政. 氧乐果分子印迹聚合物的制备与性能研究[J]. 化学试剂, 2012, 34(2): 162-164.
ZHENG Hong, HU Limei. Preparation of omethoate imprinted polymer and its application[J]. Chemical Reagents, 2012, 34(2): 162-164.
- [3] 郑平, 姚剑, 徐业平. 分子印迹固相萃取技术及其在果蔬安全分析中的应用[M]. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2011.
ZHENG Ping, YAO Jian, XU Yeping. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Technology and Its Application in Food Safety Analysis[M]. Hefei: Hefei Industrial University Press, 2011.
- [4] PANASYUK-DELANEY T, MIRSKY V M, UIBRICH M, et al. Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 435(1): 157-162.
- [5] YANG Y, LAI E P C. An investigation of porous structure in molecularly imprinted polymer for sensor development; Non-linear fluorescence quenching of 17β -estradiol bound inside MIP submicron particles by sodium nitrite and methacrylamide[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2010, 213(2/3): 123-128.
- [6] KOTOVA K, HUSSAIN M, MUSATAFA G, et al. MIP Sensors on the way to biotech applications; Targeting selectivity[J/OL]. Sensors and Actuators B: Chemical, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.040>, 2013-03-04.
- [7] GILLARD C L, RANATUNGA N K, CONNER R L. The control of dry bean anthracnose through seed treatment and the correct application timing of foliar fungicides[J]. Crop Protection, 2012, 37: 81-90.
- [8] SPIVAK D A, SIMON R, CAMPBELL J. Evidence for shape selectivity in non-covalently imprinted polymers[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 504(1): 23-30.
- [9] KOOHPAEI A R, SHAHTAHERI S J, GANJALI M R, et al. Optimization of solid-phase extraction using developed modern sorbent for trace determination of ametryn in environmental matrices[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170(2/3): 1 247-1 255.
- [10] DIAZ-ALVAEREZ M, TURIEL E, MARTIN-ESTEBAN A. Selective sample preparation for the analysis of (fluoro) quinolones in

- baby food; Molecularly imprinted polymers versus anion-exchange resins[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(3): 899-905.
- [11] 孙宝维, 杨敏莉, 李元宗, 等. 模板结构与分子印迹效果间关系的研究[J]. *化学学报*, 2003, 61(6): 878-884.
SUN Baowei, YANG Minli, LI Yuanzong, et al. Relationship between template structure and its imprinting efficiency[J]. *Chimica Sinica*, 2003, 61(6): 878-884.
- [12] 程健琳, 吕昌银, 严成艳, 等. 两类三聚氰胺分子印迹聚合物性能比较研究及应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(1): 44-47.
CHENG Jianlin, LYU Changyin, YAN Chengyan, et al. Performance and application of the two types of molecularly imprinted polymers for melamine[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21(1): 44-47.
- [13] 张红武, 温金莲, 唐睿, 等. 三聚氰胺分子印迹整体柱识别性能的研究[J]. *化学通报*, 2010(6): 545-550.
ZHANG Hongwu, WEN Jinlian, TANG Rui, et al. Characterization of molecularly imprinted monolithic column for recognition of melamine[J]. *Chemistry*, 2010(6): 545-550.
- [14] 贾玉香, 朱若华, 陈惠敏. 安定分子印迹聚合物的制备及应用[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(1): 15-21.
JIA Yuxiang, ZHU Ruohua, CHEN Huimin. Preparation and application of diazepam molecularly imprinted polymers[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(1): 15-21.
- [15] 张圣祖, 袁庭, 段亦龙. 胆固醇分子印迹聚合物的制备及其选择性吸附[J]. *化学通报*, 2011, 74(2): 137-143.
ZHANG Shengzu, YUAN Ting, DUAN Yilong. Preparation methods and selective adsorption capabilities of cholesterol molecularly imprinted polymers[J]. *Chemistry*, 2011, 74(2): 137-143.
- [16] LIU X J, LIU J Z, HUANG Y, et al. Determination of methotrexate in human serum by high-performance liquid chromatography combined with pseudo template molecularly imprinted polymer[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(44): 533-538.
- [17] WULFF G, BEST W, AKELAH A. Enzyme-analogue built polymers, 17 investigations on the racemic resolution of amino acids[J]. *Reactive Polymers Ion Exchangers, Sorbents*, 1984, 2(3): 167-174.
- [18] PASCALE M, de GIROLAMO A, VISCONTI A, et al. Use of itaconic acid-based polymers for solid-phase extraction of deoxynivalenol and application to pasta analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 609(2): 131-138.
- [19] 胡静. 果蔬中三唑类杀菌剂残留分析技术研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2010.
HU Jing. Study on the Technique for Residues Analysis of Conazole Fungicides in Food[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2010.
- [20] 胡静, 吴晓燕, 高文惠. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法分析2种三唑类杀菌剂残留[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(6): 1043-1047.
HU Jing, WU Xiaoyan, GAO Wenhui. HPLC analysis of two triazole fungicide residues by molecularly imprinted solid phase extraction[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(6): 1043-1047.
- [21] 吴文铤, 李志伟, 杨更亮, 等. 三唑醇分子印迹聚合物的吸附特性[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2004, 24(6): 615-618.
WU Wenxian, LI Zhiwei, YANG Gengliang, et al. Adsorption characteristic of triadimenol imprinted polymer[J]. *Journal of Hebei University(Natural Science Edition)*, 2004, 24(6): 615-618.

~~~~~

(上接第 385 页)

- [32] KUO T C, WANG M L. The optimization of maintenance service levels to support the product service system [J]. *International Journal of Production Research*, 2012, 50(23): 6691-6708.
- [33] LI H, JI Y J, GU X J, et al. Module partition process model and method of integrated service product [J]. *Computers in Industry*, 2012, 63(4): 298-308.
- [34] KERR W, RYAN C. Eco-efficiency gains from remanufacturing; A case study of photocopier remanufacturing at Fuji Xerox Australia [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2001, 9(1): 75-81.
- [35] SUNDIN E, LINDAHL M, IJOMAH W. Product design for product/service systems; Design experiences from Swedish industry [J]. *Journal of Manufacturing Technology Management*, 2009, 20(5): 723-753.
- [36] HU A H, LIN R W, HUANG C Y, et al. Carbon reduction assessment of a product service system; A case study of washing machines [A]. *Design for Innovative Value Towards a Sustainable Society*. Springer Netherlands, 2012: 998-1001.
- [37] YADAV P, MILLER D M, SCHMIDT C P, et al. McGriff trading company implements service contracts with share savings [J]. *Interfaces*, 2003, 33(6): 18-29.
- [38] WHITELEGG J, BRITTON E E. Carsharing 2000-A hammer for sustainable development [J]. *Journal of World Transport Policy and Practice*, 1999, 5(3): 129-138.
- [39] BIERMA T J, WATERSTRAAT J F L. *Chemical Management; Reducing Waste and Cost Through Innovative Supply Strategies* [M]. New York: John Wiley and Sons, 2000.
- [40] STOUGHTON M, VOTTA T. Implementing service-based chemical procurement; Lessons and results [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2003, 11(8): 839-849.