虚拟模板分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测食品中联苯三唑醇与烯唑醇

高文惠，刘博，庞军，李兴峰，贾英民

（河北科技大学生物科学与工程学院，河北省发酵工程技术研究中心，河北石家庄 050000）

摘要：利用虚拟模板分子印迹固相萃取技术对食品中的联苯三唑醇与烯唑醇进行分离富集，并建立高效液相色谱检测方法。以腈菌唑为模板分子，丙烯酰胺（AM）为功能单体，EDMA 为交联剂，乙腈为致孔剂，采用本体聚合法制备得到了腈菌唑分子印迹聚合物（MMIP），以此聚合物为固相萃取剂，制备固相萃取柱，对食品中联苯三唑醇和烯唑醇进行分离富集，并采用高效液相色谱法测定其在食品中的残留。采用 C_{18} 色谱柱分离，以甲醇-水（体积比为 90:10）溶液为流动相，紫外检测波长为 210 nm，外标法定量。结果表明，联苯三唑醇和烯唑醇的平均回收率分别为 89.40~90.88%和 81.37~83.26%，RSD 分别为 1.08~2.04%和 1.29~2.52%，检测限均为 0.20 μg/g。此聚合物对两种杀菌剂具有良好的吸附能力，拟模板分子印迹固相萃取技术可以用于这两种杀菌剂的分离检测。

关键词：联苯三唑醇；烯唑醇；虚拟模板技术；固相萃取；高效液相色谱法

文章篇号：1673-9078(2013)10-2504-2508

Determination of Bitertanol and Diniconazole in Food by Virtual-template Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction-HPLC

GAO Wen-hui, LIU Bo, PANG Jun, LI Xing-feng, JIA Ying-min

(College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, R&D Center for Fermentation Engineering of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Myclobutanil molecularly imprinted polymer (MMIP) was prepared by bulk polymerization using myclobutanil as template molecule, methacrylate acid (MAA) as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as crosslinker and acetonitrile as pore-foaming agent. The solid phase extraction (SPE) column was produced with MMIP as SPE agent. Fungicides of Bitertanol and diniconazole in food could be separated and enriched by SPE column, and then residuals were determined by HPLC. The sample was separated by the C_{18} column with a mobile phase of methanol and water (90:10, *V/V*) at the rate of 1mL/min and the wavelength was 210 nm. Their contents were quantified by external standard method. The average recoveries of bitertanol and diniconazole were 89.40~90.88% and 81.37~83.26%, respectively. The detection limits were all 0.20 μg/g. RSDs were 1.08~2.04% for bitertanol and 1.29~2.52% for diniconazole. In conclusion, the polymer had a good adsorption capacity for the two fungicides and the virtual template molecularly imprinted solid phase extraction technology could be used for the separation and detection of the two fungicides.

Key words: bitertanol; diniconazole; virtual template technology; solid phase extraction; high performance liquid chromatography

分子印迹技术起源于 20 世纪 40 年代，发展至今已有 70 多年了，现在被广泛应用于食品、化学等领域，近几年主要研究内容有新模板物质开发、功能单体选择、应用领域拓展等。近些年分子印迹固相萃取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。其广泛应用于固相萃取、化学仿生传感器、模拟酶催化、膜分离技术等领域[1~6]。

联苯三唑醇和烯唑醇属于三唑类杀菌剂。这类杀菌剂具有高效、广谱、内吸性特点，防治机理主要是抑制菌体细胞膜上麦角甾醇的去甲基化，使得病菌无法形成细胞膜，从而杀死病菌。它们用来防治植物病害，对病原微生物有杀死作用或抑制生长作用，但又不防碍植物正常生长，而且能够起到一定的治疗作用，被广泛的应用到农作物、蔬菜、水果的种植过程中，

收稿日期：2013-06-21

基金项目：国家科技支撑计划项目（2013BAD10B03），国家自然科学基金项目（31101358），河北省科技支撑计划项目（10276902D）

作者简介：高文惠（1963-），女，博士，教授，主要研究方向：食品安全与分离科学

通讯作者：贾英民(1961-)，男，教授，博士生导师，研究方向为食品生物技术与安全

大量使用杀菌剂会造成食品及饲料中农药残留超标。最近此类杀菌剂超标事件有 315 报道的芹菜杀菌剂超标，还有中国产毛豆在日本被检出杀菌剂超标，频发的超标事件也让我们更加关注此类杀菌剂的检测。杀菌剂的残留超标对人体、动物和环境的危害已被相关研究证实。这些物质主要导致：（1）损害神经系统；（2）机体的生殖机能下降或异常现象；（3）降低生物体的免疫能力并诱发肿瘤[7~9]。

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可有效地降低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有高的吸附效果[1]。

本文采用本体聚合法自制了腈菌唑分子印迹聚合物（MMIP），以此聚合物为固相萃取剂，制备固相萃取柱，对食品中联苯三唑醇和烯唑醇进行分离富集，并采用高效液相色谱法测定其在食品中的残留。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

腈菌唑（纯度为 97.7%，北京金宝在线科技有限公司）；联苯三唑醇（纯度为 99%，上海酶联生物科技有限公司）；烯唑醇（纯度为 98%，北京金宝在线科技有限公司）；乙腈、四氢呋喃和乙酸乙酯（分析纯，天津市永大化学试剂有限公司）；甲醇（色谱纯，天津市光复精细化工研究所）；丙烯酰胺（AM，分析纯，天津金汇太亚化学试剂有限公司）；乙二醇二甲基丙烯酸酯（EDMA，分析纯，抚顺安信化学有限公司）；偶氮二异丁腈（AIBN，化学纯，天津市大茂化学试剂厂）。

LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；TU-1810 紫外可见分光光度计（北京普析通用有限责任公司）；SHZ-82A 型恒温水浴振荡器（江苏省太仓医疗器械厂）；ASE-12 固相萃取仪（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）；KH5200 型超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司）。

1.2 腈菌唑分子印迹聚合物致孔剂的选择

取 1 mmol/L 腈菌唑乙腈溶液 100 μL 于 10 mL 比色管中，分别加入 2 mmol/L 功能单体乙腈溶液，使腈菌唑与功能单体浓度比分别为 1:0、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10，乙腈定容，超声 10 min 后，在 2 ℃环境下静置 14 h，以不含模板物质腈菌唑的功能单体乙腈溶液为参比溶液，在波长 190~300 nm 之间进行紫外光谱扫描。以乙酸乙酯、四氢呋喃为致孔剂操作方法同上。

1.3 腈菌唑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 腈菌唑和 0.4 mmol 的丙烯酰胺 AM 放入 50 mL 的安瓿瓶中，加 15 mL 乙腈使其反应，超声 1 h 后，再加交联剂 EDMA 1.5 mL 和引发剂 AIBN 0.02 g。超声 30 min 后，通入 N_2 脱氧 15 min，抽真空 1 min 后密封，在恒温水浴振荡器中振荡 24 h，得乳白色块状固体 MIP。将得到的 MIP 固体置于 45 ℃干燥箱内烘干 6 h，经研磨、粉碎，过 200 目筛，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-乙酸溶液（体积比 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 ℃）干燥 6 h，得到腈菌唑模板聚合物 MIP。

1.4 固相萃取柱制备

将 1.3 制备的聚合物装填入内径 1.5 cm、长 15 cm 具砂芯层析管中，层析管中聚合物填充高度 2 cm，在上端加适量脱脂棉，轻轻挤压使柱子填充紧实。

1.5 色谱条件

色谱柱：安捷伦 C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm），检测波长 210 nm，流动相为甲醇-水（体积比为 90:10），流速 1 mL/min，柱温箱温度为 25 ℃。

1.6 样品前处理

分别称取 5.00 g 果蔬样品，捣碎，加 6 g 无水硫酸钠，用 10 mL 乙腈溶解，混匀，超声 15 min，提取两次，将两次提取液混匀，于 4000 r/min 离心 10 min，并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，收集洗脱液待检。

2 结果与讨论

2.1 腈菌唑分子印迹聚合物合成过程

腈菌唑分子印迹聚合物的合成过程（见图 1）中模板物质腈菌唑与功能单体 AM 通过氢键相互作用，然后用 EDMA 交联剂固定，再用洗脱剂将模板物质腈菌唑洗去就得到了具有特异性吸附能力的 MIP。

2.2 腈菌唑和 AM 在不同致孔剂中相互作用

紫外光谱分析

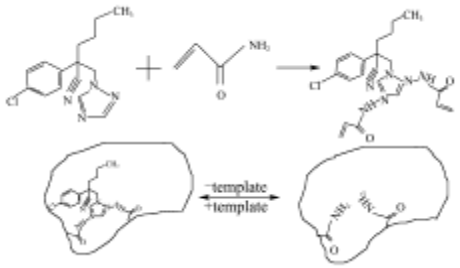


图 1 腈菌唑分子印迹聚合成过程

Fig.1 The synthetic process of bitertanol molecular imprinted polymer

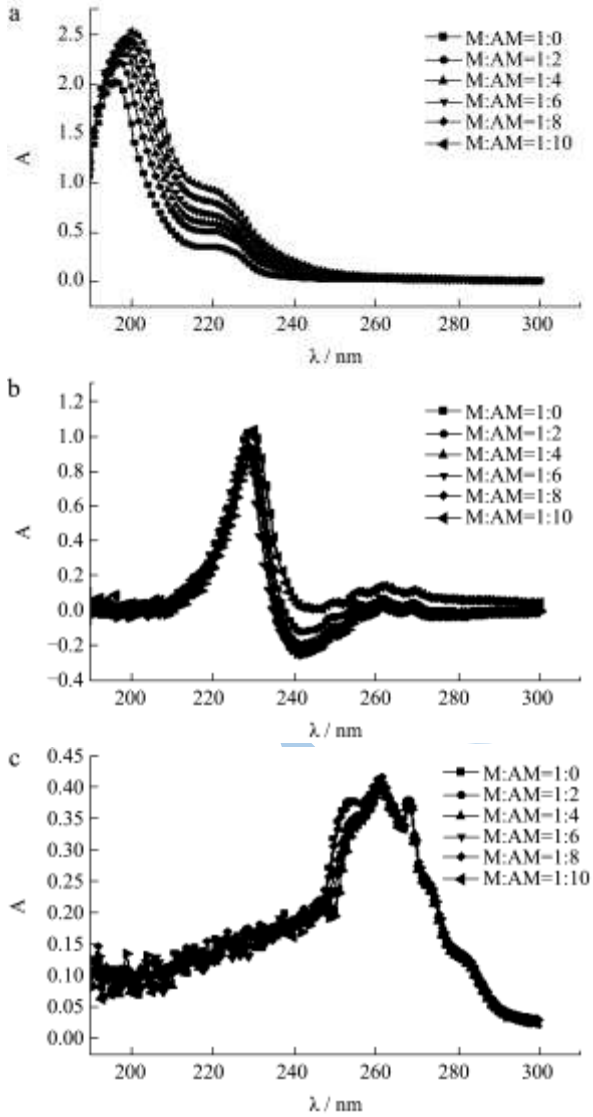


图 2 不同致孔剂对体系紫外光谱的影响

Fig.2 Effect of different pore-foaming agents on ultraviolet spectrum of system

注：a、b 和 c 图为腈菌唑与 AM 不同浓度比下分别在乙腈、四氢呋喃和乙酸乙酯三种致孔剂中紫外光谱扫描图。

腈菌唑在三种极性不同的溶剂中，紫外吸收光谱有很大的不同，当功能单体 AM 加入量逐步增加后，由图 2 中 a 图可知，腈菌唑-AM 乙腈溶液在 196 nm 处最大吸收峰发生了红移，从 196 nm 红移到 200 nm，红移了 4 nm。由 b 图可知，腈菌唑-AM 四氢呋喃溶液在 261 nm 处最大吸收峰也发生了红移，从 261 nm 到 262 nm，仅红移了 1 nm。由 c 图可知，腈菌唑-AM 乙酸乙酯溶液在 262 nm 处最大吸收峰未发生红移。这些结果表明，模板分子腈菌唑与功能单体 AM 之间在乙酸乙酯中没有产生氢键作用力，在四氢呋喃中产生的作用力很微弱，而乙腈作为致孔剂效果最好，因为模板物质与功能单体相互作用力最强。

由图 2a 光谱移动情况看出，随着 AM 加入比例的增加，其紫外吸收光谱的最大吸收波长发生红移，这是由于腈菌唑分子中存在着带有孤对电子的 N 原子，其电负性较大能和氨基中的 H 原子形成氢键，由此可知模板分子与功能单体 AM 的作用形式。烯唑醇和联苯三唑醇都属于三唑类杀菌剂，其结构式如图 3 所示。它们在结构上都有三唑环，有带孤对电子的 N 原子，化学结构与腈菌唑类似，所以腈菌唑分子印迹聚合物能够对烯唑醇和联苯三唑醇产生吸附作用，形成非共价键结合。所以利用乙腈为致孔剂按 1.3 方法制得分子印迹固相萃取剂用于样品净化。

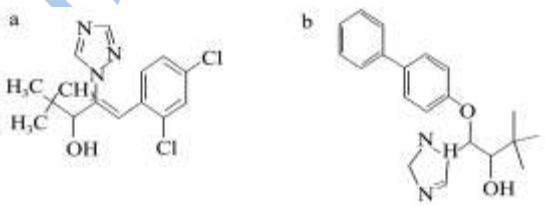


图 3 烯唑醇和联苯三唑醇的化学结构式

Fig.3 Chemical structural formula of bitertanol and diniconazole

注：a. 烯唑醇分子结构，b. 联苯三唑醇分子结构。

2.3 淋洗液的选择

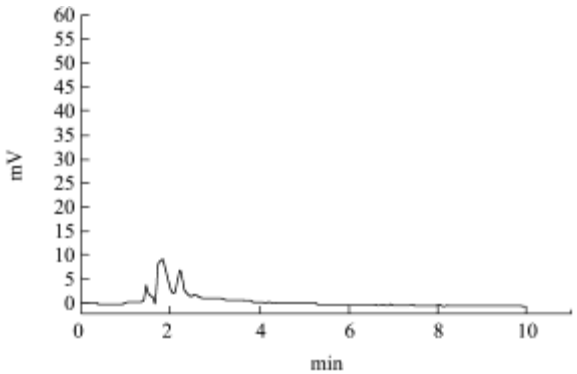


图 4 水为淋洗液的色谱图

Fig.4 Chromatogram of water as eluent

淋洗液的选择原则之一是所选择的淋洗液不能

将目标物质淋洗下来。实验考察了水和甲醇作为淋洗液的淋洗效果。图 4 和图 5 为将 200 μg/mL 混合标液上样，分别经水和甲醇淋洗后淋洗液色谱图。

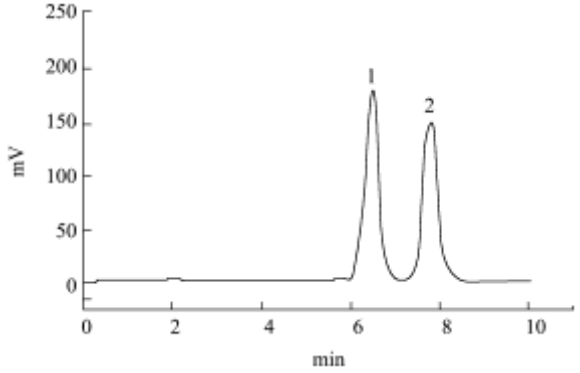


图 5 甲醇为淋洗液的色谱图

Fig.5 Chromatogram of methyl alcohol as eluent

注：1：联苯三唑醇，2：烯唑醇。

从图 4 和图 5 可以看出，水为淋洗液时没有将目标物淋洗下来，而甲醇为淋洗液时将目标物大量洗脱下来。故选择水为淋洗液。

2.4 样品提取剂的选择

样品提取剂的选择原则是对待测组分溶解度大，但对干扰杂质溶解度小，与样品基质相容性差，且沸点适中，粘度小，毒性低，廉价等。但是对于分子印迹固相萃取提取剂的选择还需要考虑印迹聚合物的溶胀现象。

从数据上看，以甲醇为提取剂，样品回收率仅为乙腈作提取剂时的 92.8%。出现这种现象的主要原因是制作 MMIP 的致孔剂是乙腈，当甲醇作为提取剂时 MMIP 发生了溶胀。溶胀导致内部空穴变小，吸附能力下降，故其洗脱能力降低。

2.5 线性关系与检测限

表 1 烯唑醇和联苯三唑醇的线性关系及检出限

Table 1 Linear equation and detection limit of bitertanol and diniconazole

药品	线性方程	线性相关系数	线性范围/(μg/mL)	检测限/(μg/g)
烯唑醇	$y=2.0813\times10^4x+6.1414\times10^4$	0.9991	0.50~200	0.20
联苯三唑醇	y=54751x+18233	0.9998	0.50~200	0.20

将烯唑醇和联苯三唑醇分别配制成质量浓度为 0.10、0.50、1、2、5、10、20、50、100、150、200 μg/mL 的一系列标准溶液，在 1.5 色谱条件下绘制烯唑醇和联苯三唑醇的线性关系曲线。其线性关系和检测限见表 1。烯唑醇和联苯三唑醇线性相关系数分别为 0.9991 和 0.9998，检测限均为 0.20 μg/g。

2.6 分子印迹固相萃取柱对样品净化和检测效果

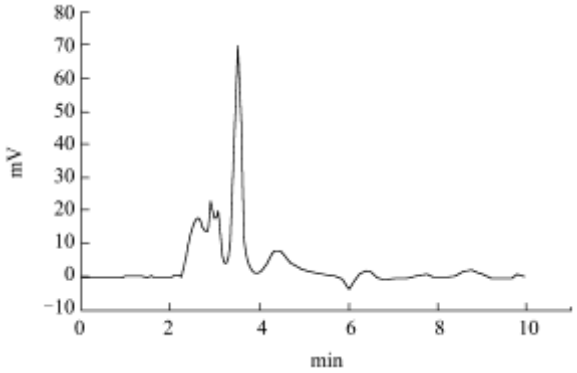


图 6 黄豆原液色谱图

Fig.6 chromatogram of soya bean solution

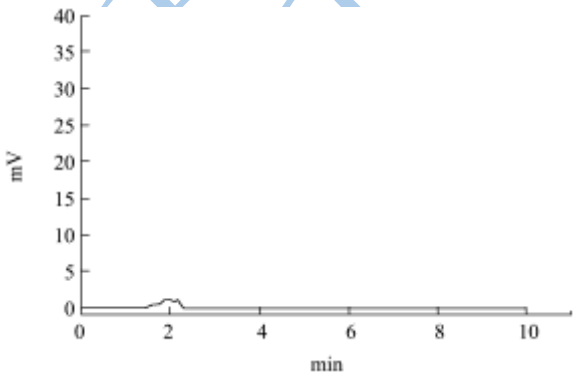


图 7 黄豆样品过柱后色谱图

Fig.7 Chromatogram of effluent after sample passing SPE column

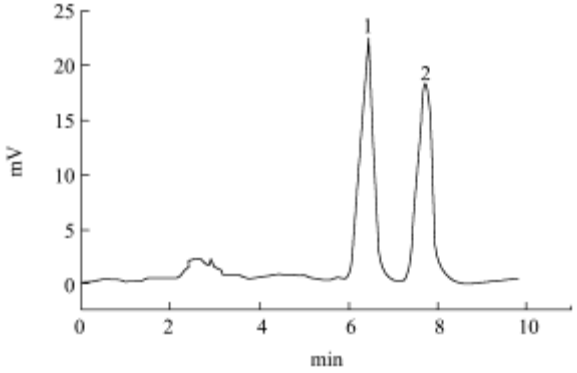


图 8 黄豆样品加标过 SPE 柱后色谱图

Fig.8 Chromatogram of sample solution of added standard after passing SPE column

注：1：联苯三唑醇；2：烯唑醇。

分子印迹固相萃取柱是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。从图 6 和图 7 对比可知分子印迹固相萃取柱对样品净化效果明显，只对模板物质及结构类

似物有吸附作用。从图 8 可知，其对结构类似物具有选择性的吸附作用，从而表现出它从复杂基质条件下分离富集目标物的优越性能。

2.7 回收率和精密度实验

采用本方法对样品在 1 μg/g 和 100 μg/g 的烯唑醇和联苯三唑醇的 2 个添加水平下进行加标回收率实验，分析结果如表 2 所示，烯唑醇平均回收率在 81.37~83.26%之间，相对标准偏差（RSD）在 1.29~2.52%之间（n=5）。联苯三唑醇平均回收率在 89.40~90.88%之间，相对标准偏差（RSD）在 1.08~2.04%之间（n=5）。说明方法的回收率和精密度良好。

表 2 回收率和精密度实验（%）（n=5）

Table 2 Recovery rate and precision

测定次数	不同添加水平/(μg/g)							
	苹果				白菜			
	烯唑醇		联苯三唑醇		烯唑醇		联苯三唑醇	
	1	100	1	100	1	100	1	100
1	83.41	80.00	91.16	87.81	79.75	85.31	88.05	87.38
2	80.23	82.82	89.37	90.11	81.03	80.64	92.34	89.27
3	84.85	82.91	90.65	90.98	82.44	86.26	93.22	90.15
4	81.62	80.72	92.06	89.85	82.93	83.18	90.94	88.97
5	84.98	85.35	91.86	88.03	80.74	80.95	89.85	91.24
平均回收率	83.02	82.36	91.02	89.35	81.37	83.26	90.88	89.40
相对标准偏差	2.07	2.10	1.08	1.38	1.29	2.52	2.04	1.43

3 结论

3.1 乙腈为致孔剂制得的 MMIP 不仅对模板物质具有较强的吸附能力，同样对腈菌唑的结构类似物联苯三唑醇和烯唑醇也具有很强的吸附能力。

3.2 采用本体聚合法自制了腈菌唑分子印迹聚合物，以此聚合物为固相萃取剂，制备固相萃取柱，此柱对样品净化能力非常好，能在复杂基质环境中对目标物具有良好的的分离富集能力。

3.3 乙腈作为样品提取剂，避免了聚合物的溶胀现象，大大提高了柱性能。水作为淋洗剂，能将杂质冲洗干净，同时不会将目标物洗脱下来，所以能够保证在样品前处理过程中不损失目标物。

3.4 利用此印迹聚合物对样品进行前处理回收率高，对样品净化效果好。烯唑醇和联苯三唑醇线性范围为 0.50 μg/mL~200 μg/mL，线性相关系数分别为 0.9991 和 0.9998，样品平均回收率分别为 81.37~83.26%和 89.40~90.88%，相对标准偏差（RSD）≦ 2.5%（n=5），检测限均为 0.20 μg/g。

参考文献

[1] 郑平,姚剑,徐业平.分子印迹固相萃取技术及其在食品安全分析中的应用[M].合肥工业大学出版社,2011
Zheng Ping, Yao Jian, Xu Ye-ping. Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction Technology And Its Application In Food Safety Analysis [M]. Hefei Industrial University Press, 2011

[2] Yang L Q, Zhao X M, Crescenzi C, et al. Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79: 3099-3104

[3] 郑红,胡力玫.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 Li-mei. Preparation Of Omethoate Imprinted Polymer And Its Application [J]. Chemical Reagents, 2012, 34(2): 162-164

[4] Delaney T, Mirsky V M, Ujbricht M, et al. Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers [J]. Analytica Chemistry Acta, 2001,435:157-162

[5] Yu Y, Edward P C Lai. An investigation of porous structure in molecularly imprinted polymer for sensor development: Non-linear fluorescence quenching of 17 β-estradiol bound inside MIP submicron particles by sodium nitrite and methacrylamide [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2010, 213: 123-128

[6] Kira K, Munawar H, Ghulam M, et al. MIP sensors on the way to biotech applications: Targeting selectivity [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013

[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] Yun S K, Ki D K. Evidence of a potential adaptation of Magnaporthe oryzae for increased phosphorothiolate-fungcide resistance on rice [J]. Crop Protection, 2009, 28: 940-946

[9] Giuseppe L, Raffaello C, Filippo D C, et al. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 60: 164-172

现代食品科技