

分子印迹固相萃取膜-高效液相色谱法检测粮谷中的三唑类杀菌剂

高文惠, 王姣姣

(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: 本文建立了同时分离检测粮谷样品中4种三唑类杀菌剂的分子印迹固相萃取膜-高效液相色谱法。采用自制的联苯三唑醇分子印迹固相萃取膜对粮谷中的联苯三唑醇、三唑酮、烯唑醇和戊唑醇残留进行分离富集, 并采用高效液相色谱法测定其在粮谷样品中的残留。试验对淋洗剂、洗脱剂的种类和用量以及检测条件进行了优化。以5 mL水为淋洗剂, 3 mL甲醇为洗脱剂, 使用C₁₈色谱柱, 以甲醇-水(体积比为82:18)溶液为流动相, 紫外检测波长为210 nm, 外标法定量。结果表明, 4种杀菌剂平均回收率在84.2%~98.1%之间, 相对标准偏差(RSDs)在1.2%~2.7%之间(n=5)。该分子印迹固相萃取膜不仅对样品净化效果好, 而且对4种杀菌剂特异吸附能力强。该方法能高效、快速、灵敏检测粮谷样品中三唑类杀菌剂。

关键词: 粮谷; 联苯三唑醇; 三唑类杀菌剂; 分子印迹固相萃取膜; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2014)12-225-229

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.038

Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction Membrane-high Performance Liquid Chromatography for the Determination of Triazole Fungicide Content in Grains

GAO Wen-hui, WANG Jiao-jiao

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

Abstract: A molecularly imprinted solid-phase extraction membrane (MISPEM) coupled with high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of four triazole fungicides in grain samples was developed. Residues of bitertanol, triadimefon, diniconazole, and tebuconazole in grains were separated and enriched using the self-prepared MISPEM. These enriched residues were subsequently analyzed by HPLC. Process characteristics such as washing agents, the type and amount of eluents, and the detecting conditions were optimized. For this process, using 5 mL water and 3 mL methanol as the washing agent and eluent, respectively; the samples were separated with a C₁₈ column, using a mobile phase of methanol and water (82:18, V/V). The separation was quantified using an external standard method, by detection at a wavelength of 210 nm. The average recovery rates of the four fungicides were discovered to be between 84.2% and 98.1%; the relative standard deviations (RSDs) ranged from 1.2% to 2.7% (n = 5). The MISPEM showed a good cleansing effect on the samples, as well as strong adsorption capacities for the four fungicides. These results suggest that this method can be used in the efficient, sensitive, and rapid determination of triazole fungicides in grain samples.

Key words: grain; bitertanol; triazole fungicide; molecularly imprinted solid phase extraction membrane; high performance liquid chromatography

分子印迹膜(molecularly imprinted membrane, MIM)是指包含或由分子印迹聚合物组成的一类膜^[1], 它结合了新兴分子印迹技术的预定性、选择性和专一

收稿日期: 2014-05-31

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(14227504D, 14236602D-13)

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

性与传统膜技术的稳定性、连续性和节能性的优点, 近年来已经成为分离、催化和传感等领域研究的热点之一, 具有良好的科学和应用前景。MIM通过聚合物对模板分子的记忆识别性能达到分子识别的目的, 其分子空间识别能力强, 可实现高选择性分离。通常根据制备方法的不同, 分子印迹膜可分为三类^[2]: 分子印迹填充膜、分子印迹整体膜和分子印迹复合膜。前

两种方法容易破坏分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIPs) 的结构, 而复合膜可利用机械性能好, 多孔的基质作为载体, 在表面附聚 MIM 而改善膜的性能^[3]。

三唑类杀菌剂是一种杀真菌剂, 能渗透叶面的角质层而进入植株组织, 具有保护和治疗作用, 还对植物具有调节生理效能, 被广泛用于多种农作物的种植过程。由于农药的潜在危害, 世界卫生组织以及联合国粮食和农业组织规定了三唑类杀菌剂的最大残留限量。

一般情况下, 三唑类杀菌剂的检测是通过色谱法, 如液相色谱法^[4]、液质联用技术^[5-6]、气相色谱法^[7]、毛细管电泳法^[8]。但气相色谱仅适用于易气化且气化后不发生分解的农药。尤其是上述方法在检测前均须经过繁琐且要求较高的预处理步骤。与此相比, MIM 制备方便, 在样品农残检测的前处理方面具有突出优势。

本试验采取原位聚合法制备分子印迹复合膜, 并利用此分子印迹膜作为固相萃取材料对粮谷中联苯三唑醇及其结构类似物进行分离富集, 采用高效液相色谱技术对其进行检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; KH5200 型超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; HH-4 型恒温水浴锅, 江苏省金坛市宏华仪器厂。

联苯三唑醇 (bitertanol, 纯度 99%), 上海酶联生物科技有限公司; 三唑酮 (纯度为 97%), 郑州绿康化工有限公司; 烯唑醇 (98%), 北京金宝在线科技有限公司; 戊唑醇 (98%), 北京金宝在线科技有限公司; α -甲基丙烯酸酯 (MAA, 分析纯), 天津市化学试剂一厂; 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; 甲醇、乙腈 (色谱纯), 天津市光复精细化工研究所; 有机膜 (尼龙 66, 45 μm)。

1.2 联苯三唑醇分子印迹固相萃取膜的制备

将 0.2 mmol 联苯三唑醇和 0.8 mmol α -甲基丙烯酸酯 (MAA) 放入 50 mL 的圆底烧瓶中, 加致孔剂乙腈 15 mL 使其反应, 超声 1 h, 再加交联剂 EDMA 1.5 mL 和引发剂 AIBN 0.02 g, 将有机膜浸入液体中, 超声 30 min, 把膜取出置于两片载玻片中间并固定两个载玻片位置, 将载玻片放入自制真空瓶内, 通入 N_2

脱氧 15 min 后, 抽真空 1 min 后密封, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中静置 24 h, 得到分子印迹固相萃取膜。将得到的分子印迹固相萃取膜用甲醇:乙酸 (体积比 95:5) 洗脱至无模板分子, 再用甲醇浸泡 1 h 除去残留的乙酸, 洗脱后的分子印迹固相萃取膜干燥 6 h, 得到联苯三唑醇分子印迹固相萃取膜。

1.3 色谱条件

色谱柱: Promosil C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μm), 检测波长 210 nm, 流动相为甲醇-水 (体积比为 82:18), 流速 1 mL/min, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL 。

1.4 样品的提取

称取 5.000 g 样品, 捣碎, 用 20 mL 乙腈提取 (提取两次, 每次 10 mL), 超声 15 min, 于 4000 r/min 离心 10 min, 合并 2 次上清液, 定容至 20 mL, 混匀, 取 1 mL 过分子印迹固相萃取膜, 用 5 mL 水淋洗, 待排净淋洗液后, 用 3 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液待测^[9]。

2 结果与讨论

2.1 淋洗剂及其用量的选择

试验在其他条件相同且非饱和上样的情况下进行淋洗, 考察了氯仿、乙腈和水三种淋洗剂效果, 按照 1.3 色谱条件测定, 结果表明, 乙腈和氯仿两种有机溶液均能将模板物质淋洗下来, 所以可以作为洗脱剂的备选溶剂, 不适合作为淋洗剂。而水作为淋洗剂不仅可将杂质洗去, 而且不会将模板物质淋洗下来。故本试验选择水作为淋洗剂。

试验考察了不同用量的淋洗剂对样品中杂质的淋洗效果。将 1 mL 样品提取液加入分子印迹固相萃取膜装置, 分别用 1 mL、2 mL、5 mL 和 10 mL 的去离子水进行淋洗, 收集各淋洗液, 用高效液相色谱仪检测。结果为淋洗液用量是 5 mL 时, 即可将样品中杂质淋洗干净。

2.2 洗脱剂及其用量的选择

试验在其他条件相同且非饱和上样的情况下进行洗脱, 考察了甲醇、乙腈和氯仿三种洗脱剂, 按照 1.3 色谱条件测定。结果显示, 甲醇的洗脱能力强于乙腈和氯仿的洗脱能力。结合淋洗剂选择的结果, 并兼顾溶剂毒性和价格因素, 本试验选择甲醇为洗脱剂。

试验考察了不同用量的洗脱剂对样品中目标物质的萃取效果的影响。将 1 mL 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液加入分子印迹固相萃取膜装置, 分别用 1

mL、2 mL、3 mL、5 mL 和 10 mL 的甲醇进行洗脱，收集各洗脱液用高效液相色谱仪进行检测。结果表明，当洗脱液用量大于 3 mL 时，已经不能检测到目标物，亦即说明 3 mL 洗脱液可以完全将目标物质洗脱下来，并且不会造成洗脱剂的浪费，故本试验最佳洗脱剂用量为 3 mL。

2.3 检测波长的选择

对联苯三唑醇、三唑酮、烯唑醇和戊唑醇进行紫外光谱扫描，以确定液相色谱的检测波长。由图 3 可以看出联苯三唑醇、三唑酮、烯唑醇和戊唑醇的最大吸收波长分别为 214 nm、196 nm、194 nm 和 200 nm，但甲醇在 190~208 nm 之间有吸收。综合考虑以上情况，本试验选择 210 nm 为最佳检测波长。

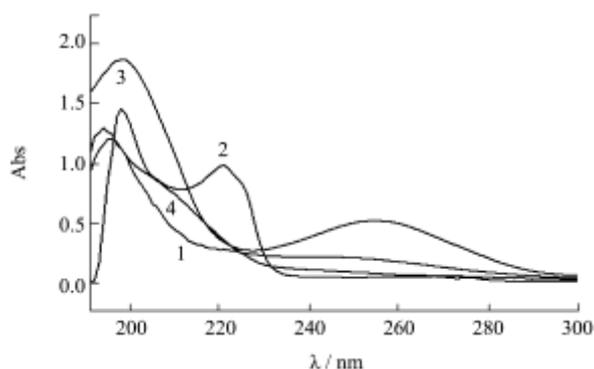


图1 三唑酮、戊唑醇、联苯三唑醇和烯唑醇的紫外光谱图

Fig.1 Ultraviolet spectra of triadimefon, tebuconazole, bitertanol and diniconazole

注：1三唑酮；2戊唑醇；3联苯三唑醇；4烯唑醇。

表 1 三唑酮、戊唑醇、联苯三唑醇和烯唑醇的线性关系及检出限

Table 1 Linear relationship and detection limits of triadimefon, tebuconazole, bitertanol and diniconazole

目标物	线性方程	线性相关系数	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	检出限/($\mu\text{g/mL}$)
三唑酮	$y=38445.75x+56780.95$	0.9996	0.3~100	0.1
戊唑醇	$y=29973.26x+14232.02$	0.9984	0.3~100	0.1
联苯三唑醇	$y=76146.18x-162592.53$	1.0000	0.6~100	0.2
烯唑醇	$y=66197.91x+27248.20$	0.9998	0.3~100	0.1

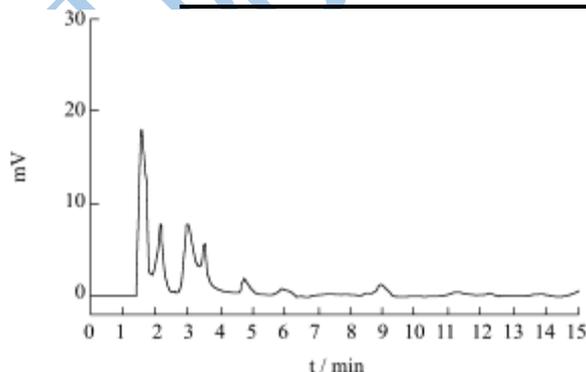


图3 小麦样品提取液色谱图

Fig.3 Chromatogram representing wheat extraction liquid

2.4 流动相的选择

本试验采用甲醇-水混合溶液作为流动相，试验考察了甲醇-水体积比分别为 100:0、90:10、80:20 和 82:18 时各三唑类杀菌剂的保留情况。试验结果表明，当流动相比例为 82:18 时，各目标物分离效果好，分析时间较短，如图 3 所示。因此本试验选择体积比为 82:18 的甲醇-水作为流动相。

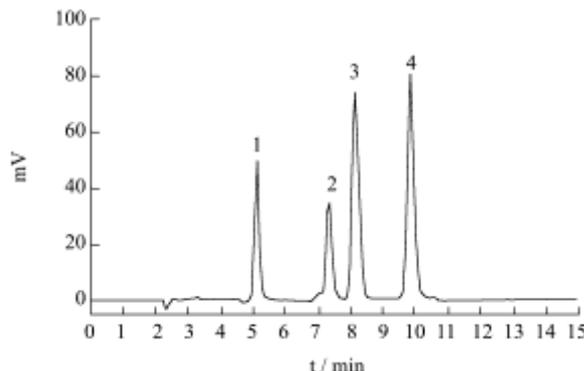


图2 混合标准溶液的分离色谱图

Fig.2 Chromatogram of the mixed standard solution

注：1三唑酮；2戊唑醇；3联苯三唑醇；4烯唑醇。

2.5 线性关系与检出限

将三唑酮、戊唑醇、联苯三唑醇和烯唑醇分别配制成质量浓度为 0.1、0.3、0.6、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列标准溶液，在 1.3 色谱条件下上机测定，绘制联苯三唑醇、三唑酮、烯唑醇和戊唑醇的线性关系曲线。其线性关系和检出限见表 1。

由表 1 可知，三唑酮、戊唑醇和烯唑醇的线性范围在 0.3~100 $\mu\text{g/mL}$ 之间，检出限（由 $S/N=3$ 确定）为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ；联苯三唑醇的线性范围在 0.6~100 $\mu\text{g/mL}$ 之间，检出限为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ；四种目标物的线性相关系数在 0.9984~1.0000 之间。

2.6 分子印迹固相萃取膜对样品净化吸附能力

分子印迹固相萃取膜采用原位聚合方式制作，对目标物具有特异性吸附，通过淋洗剂水将杂质去除，

再利用洗脱剂甲醇将目标物洗脱下来, 在 1.3 色谱条件下上机测定。

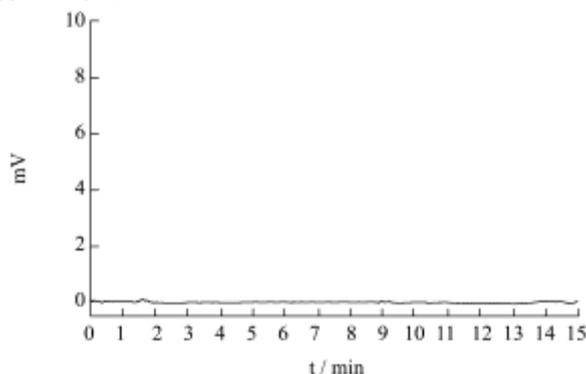


图 4 小麦样品提取液过膜后洗脱液色谱图

Fig.4 Chromatogram of elution liquid after passing of wheat extraction liquid through the MIM

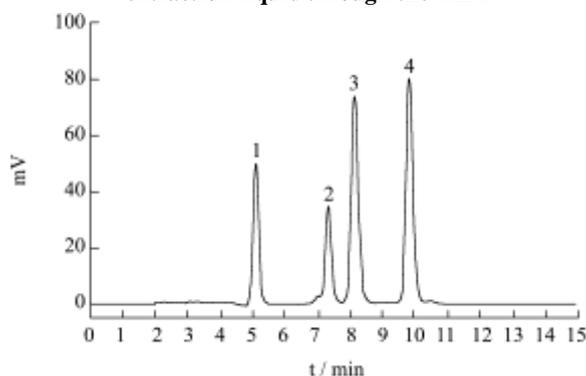


图 5 小麦样品加标提取液过膜后洗脱液色谱图

Fig.5 Chromatogram of the elution liquid after adding of standard solution

注: 1三唑酮; 2戊唑醇; 3联苯三唑醇; 4烯唑醇。

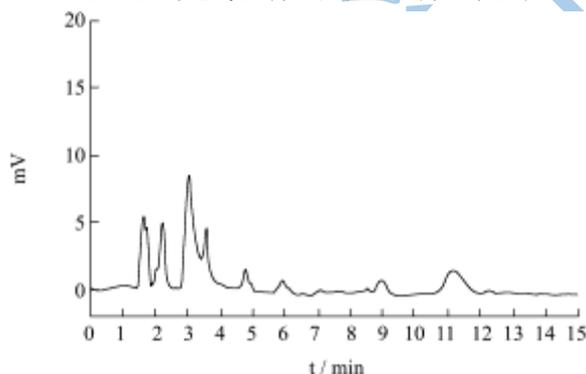


图 6 黑米样品提取液色谱图

Fig.6 Chromatogram of black rice extraction liquid

从图 3 与图 4 以及图 6 与图 7 对比可知, 联苯三唑醇分子印迹固相萃取膜对小麦和黑米样品净化效果好, 对杂质不具有吸附能力。从图 5 和图 9 可知, 分子印迹固相萃取膜只对模板物质及其结构类似物有吸附作用, 显示出该膜的高选择性。

以上结果表明, 联苯三唑醇分子印迹固相萃取膜不仅对样品净化效果好, 而且对模板物质及其结构类

似物特异吸附能力强, 能够将复杂的样品纯化。另外, 分子印迹固相萃取膜处理样品速度快、操作简便, 尤其选择性高, 因此应用前景广阔。

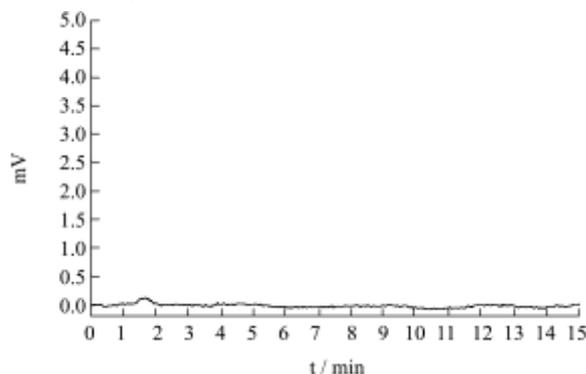


图 7 黑米样品提取液过膜后洗脱液色谱图

Fig.7 Chromatogram representing the elution liquid after passage of black rice extraction liquid through the MIM

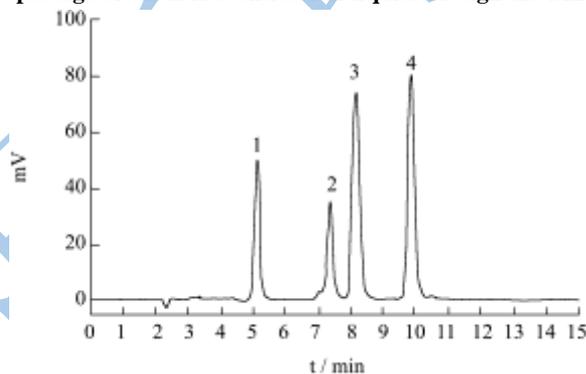


图 8 黑米样品加标提取液过膜后洗脱液色谱图

Fig.8 Chromatogram representing the elution liquid after passage of black rice with added standard solution through the MIM

注: 1三唑酮; 2戊唑醇; 3联苯三唑醇; 4烯唑醇。

2.7 加样回收率和精密度试验

采用本方法对小麦、黑米和黄豆在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2 个添加水平下, 进行加标回收率试验, 分析结果如下表所示, 四种杀菌剂在样品中的平均回收率 (AR) 在 84.2%~98.1%之间, 相对标准偏差 (RSDs) $\leq 2.7\%$ (n=5)。说明方法的回收率和精密度好。

3 结论

试验以自制的联苯三唑醇分子印迹膜为固相萃取材料, 对粮谷样品进行前处理, 并利用高效液相色谱法测定粮谷中联苯三唑醇、三唑酮、戊唑醇和烯唑醇四种杀菌剂的残留。结果表明, 利用此印迹膜对样品进行前处理, 不仅样品净化效果好, 且对目标物特异吸附能力强。三唑酮、戊唑醇和烯唑醇的线性范围在 0.3~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间, 检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 联苯三唑

醇的线性范围在 0.6~100 μg/mL 之间, 检出限为 0.2 μg/mL; 四种目标物的线性相关系数在 0.9984~1.0000 之间。对粮谷样品进行分析, 平均回收率在 84.2%~98.1% 之间, 相对标准偏差 (RSDs) 在

1.2%~2.7% 之间 (n=5)。该方法具有选择性好、简便快速、精密度高等特点, 是检测食品中三唑类杀菌剂的有效方法。

表 2 粮谷样品中四种杀菌剂回收率和精密度 (n=5)

Table 2 Fungicide recovery rates and precision in grain samples (n = 5)

样品	添加水平/(μg/mL)											
	小麦				黑米				黄豆			
	1		10		1		10		1		10	
	AR/%	RSD/%	AR/%	RSD/%	AR/%	RSD/%	AR/%	RSD/%	AR/%	RSD/%	AR/%	RSD/%
三唑酮	87.1	1.6	96.7	1.8	87.1	1.2	88.5	1.4	84.3	2.3	91.4	2.7
戊唑醇	88.1	1.7	89.0	1.8	86.8	1.4	94.5	1.6	89.3	2.3	93.7	2.0
联苯三唑醇	86.3	1.2	98.1	2.4	87.8	1.6	87.3	1.4	86.5	1.8	94.3	2.2
烯唑醇	85.3	2.6	85.3	1.9	84.2	1.8	93.4	1.8	85.5	2.1	92.3	2.1

参考文献

[1] Ulbricht M. Membrane separations using molecularly imprinted polymers [J]. Journal of chromatography B, 2004, 804(1): 113-125

[2] Liu Y W, Chang X J, Wang S, et al. Solid-phase extraction and preconcentration of cadmium(II) in aqueous solution with Cd(II)-imprinted resin (poly-Cd(II)-DAAB-VP) packed columns [J]. Analytica Chimica Acta. 2004, 519(2): 173-179

[3] 郑平,姚剑,徐业平.分子印迹固相萃取技术及其在粮谷安全分析中的应用[M].合肥:合肥工业大学出版社,2011

ZHENG Ping, YAO Jian, XU Ye-ping. Molecularly imprinted solid phase extraction technology and its application in food safety analysis [M]. Hefei: Hefei Industrial University Press, 2011

[4] Zhang M, Moore G A, Barclay M L, et al. A simple high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of three triazole antifungals in human plasma [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(1): 484-489

[5] Beste K Y, Burkhardt O, Kaever V. Rapid HPLC-MSMS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma [J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413(1): 240-245

[6] Raina R, Smith E. Determination of azole fungicides in atmospheric samples collected in the canadian prairies by LCMSMS [J]. Journal of AOAC International, 2012, 95(5): 1350-1356

[7] Farajzadeh M A, Djozan D, Mogaddam M R, et al. Extraction and preconcentration technique for triazole pesticides from cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-FID and GC-MS determinations [J]. Journal of separation science, 2011, 34(11): 1309-1316

[8] Ana J G, Yolanda P, Guillermina F. Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1073: 229-236

[9] 刘博,尹航,刘文红,等.分子印迹固相萃取—高效液相色谱法检测饲料中联苯三唑醇[J].中国饲料,2013,(15):33-34,43

LIU Bo, YIN Hang, LIU Wen-hong, et al. Determination of bitertanol in feed by molecularly imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. China Feeds, 2013, (15): 33-34, 43