

烯唑醇分子印迹固相萃取介质的制备与应用

王媛媛, 苏立强*, 张慧洁, 韩 爽, 翟明翥

(齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要:以烯唑醇为模板分子, 采用可逆加成断裂链转移沉淀聚合法制备了分子印迹聚合物, 对该聚合物的吸附性能进行了研究, 结果表明, 该印迹聚合物的最大吸附量为 39.3 mg/g, 非印迹聚合物的最大吸附量为 14.5 mg/g; 并通过电镜分析对印迹聚合物的形貌进行表征, 结果表明, 印迹聚合物微球粒径均一, 分散性好。将其作为固相萃取填料, 结合高效液相色谱方法, 对苹果中残留烯唑醇进行分析。在优化的条件下, 烯唑醇检出限为 1.64×10^{-3} mg/kg; 回收率为 93.2%~100.3%; 该柱与常用的 C18 柱相比, 富集与净化效果更好。

关键词:分子印迹; 烯唑醇; 固相萃取; 高效液相色谱

引言

烯唑醇^[1~3]属三唑类杀菌剂, 具有高效、低毒等特点, 主要用于防治梨的黑星病、葡萄的锈病、苹果的白粉病和玉米的黑穗病等。同时, 烯唑醇对于调节植物生长也具有很好的效果。近年来, 随着三唑类农药的大量使用, 其残留问题不容忽视, 三唑类杀菌剂的残留会引起人体免疫力下降、内分泌紊乱等问题, 危害人体健康。

目前检测烯唑醇的方法^[4,5]有高效液相色谱法、气相色谱法、色谱-质谱联用技术等。其样品前处理通常采用固相萃取法, 而传统的固相萃取填料缺乏选择性, 容易出现杂质共萃取等现象, 影响后续分析。采用分子印迹技术^[6~8]制备的印迹聚合物(MIP), 能够选择性地分离富集复杂样品中的目标物, 有效地去除杂质干扰, 更有利于分析。

制备烯唑醇分子印迹材料已有报道, 高林等^[2]以腈菌唑、联苯三唑醇、烯唑醇为混合模板分子, 采用本体聚合法制备分子印迹聚合物, 并以该聚合物作为填料制备固相萃取柱, 结合高效液相色谱法检测粮谷中腈菌唑、联苯三唑醇、烯唑醇残留。高文惠^[9]等以烯唑醇为模板分子, 采用原位聚合法制备烯唑醇分子印迹固相萃取膜, 结合高效液相色谱法对粮谷中烯唑醇进行检测。

可逆加成断裂链转移(RAFT^[10])自由基聚合, 是通过引入链转移试剂(RAFT)来控制自由基浓度, 实现体系反应可控, 使制备的聚合物分子量分布较窄, 吸附量更佳。当与沉淀聚合^[11]结合时, 制备出粒径更加均一的分子印迹聚合物微球。

本研究以烯唑醇为模板分子, 丙烯酰胺为功能单体, 采用 RAFT-沉淀聚合法制备分子印迹聚合物。将其作为固相萃取填料, 结合 HPLC 分析, 对苹果样品中烯唑醇进行富集、分离与检测, 结果令人满意。为复杂样品中的烯唑醇的分离分析提供了一种可行的方法。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2019.5.009

收稿: 2018-11-07; 修回: 2019-03-09;

基金项目: 黑龙江省教育厅项目资助(135109201, 135209224), 研究生创新项目(YJSCX2017-020X) 黑龙江省青年自然科学基金(QC2018073);

作者简介: 王媛媛, 女, 硕士研究生, 研究方向为分子印迹和色谱分离技术。E-mail: 2265994889@qq.com;

* 通讯联系人: 苏立强, 女, 教授, 从事色谱分析理论与应用研究。Tel: 0452-2738214, E-mail: slq202@163.com.

1 实验部分

1.1 实验仪器及药品

3000 型高效液相色谱仪(美国,戴安公司);TU-1901 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);S-4300 型扫描电子显微镜(HITACHI 公司);60~150 索氏提取器(河南巩义市英峪予华仪器有限公司);DK-98-1 电热恒温水浴锅(北京泰克仪器有限公司);二甲基乙二醇丙烯酸酯(EDGMA,东京化成工业株式会社);偶氮二异丁腈(AIBN,北京化工厂);丙烯酰胺(AM)、甲基丙烯酸(MAA)、2-乙烯基吡啶(2-VP)均购自国药集团化学试剂有限公司;烯唑醇、戊唑醇、己唑醇均购自湖北长远生物科技有限公司;乙腈、甲醇、冰醋酸均购自天津市科密欧化学试剂开发中心;以上试剂均为分析纯。实验用水为蒸馏水、超纯水。

1.2 分子印迹聚合物的制备

称取 0.0815 g(0.25 mmol)模板分子烯唑醇溶于 60 mL 乙腈中,超声使其完全溶解,加入功能单体 AM 0.0711 g(1 mmol),室温下放置 6~8 h。依次加入交联剂 EDGMA 0.57 mL(3 mmol)、RAFT 链转移试剂 DBTTC 0.1000 g 和引发剂 AIBN 0.0200 g,超声溶解,充氮排氧,置于 60 °C 水浴锅中聚合 24 h,抽滤,洗涤。将得到的产物放入索氏提取器中,用甲醇:乙酸(9:1,V/V)为洗脱液进行索氏提取,得到分子印迹聚合物(R-MIP)。按上述步骤,在不加模板分子的情况下制备非印迹聚合物(R-NIP),再按上述步骤不加 RAFT 试剂,制备传统印迹聚合物(T-MIP)。

1.3 动态吸附实验

分别称取 10 mg 的 R-MIP 和 R-NIP 各 10 份,置于 20 个吸附瓶中,再移取 10 mL 烯唑醇溶液(0.16 mg/mL)于瓶中,充分摇匀,置于振荡器中室温振荡,每隔 20 min,采用紫外光谱法测定上层清液中烯唑醇的浓度。

1.4 MISPE 和 NISPE 的制备及固相萃取条件优化

称取 0.1000 g R-MIP 粉末均匀填入 3 mL 聚丙烯固相萃取空柱中,底部和聚合物上方各放入聚乙烯筛板,轻轻敲打至紧实,得到 MISPE 柱。再按上述步骤称取 0.1000 g R-NIP,得到 NISPE。依次用 3 mL 去离子水和 3 mL 甲醇进行活化,考察上样溶剂、淋洗溶剂、洗脱条件下 MISPE 柱对烯唑醇的保留能力。洗脱液用 N₂ 吹干后用流动相溶解经 HPLC 上机分析。

1.5 样品预处理

称取 3.0000 g 苹果于锥形瓶中,加入 20 mL 乙腈,常温超声提取 20 min,离心 10 min,收集上清液,重复上述步骤一次,合并两次提取液,将提取液旋蒸浓缩,取浓缩液待过固相萃取柱,调节流速。C18 柱方法同上。

1.6 HPLC 色谱条件

UltiMate3000 C18 色谱柱(4.6 mm × 200 mm),流动相为乙腈-水(80+20)溶液,流量为 1.0 mL/min,柱温为室温,检测波长为 252 nm,进样量为 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 动态吸附

考察不同吸附时间下,聚合物的吸附量,绘制动态吸附曲线,如图 1 所示。动态吸附实验可以直观得出聚合物达到吸附平衡时间以及平衡吸附量。由图 1 可知,在吸附初期,吸附量随时间的增加而快速增加,在 150 min 左右达到平衡,这是由于在聚合物中,有表面孔穴和深层孔穴两种。初期主要是表面孔穴上的作用位点吸附,因而吸附速率较快。随着时间的延长,表面孔穴逐渐达到饱和,目标物以传质扩散的形式进入深层孔穴中,这时传质阻力增大,导致吸附速率降低逐渐平衡。从图 1 还可以看出,R-MIP 平衡

吸附量(39.3mg/g)远远大于 R-NIP 的平衡吸附量(14.5mg/g),为其 2.7 倍。这是由于 R-MIP 内部具有与烯唑醇结构匹配的三维印迹孔穴,且孔穴内规则排列着与其结构相应的结合位点,能够发生化学吸附,吸附量较大;而 R-NIP 内部不具有这样的规则孔穴,以物理吸附为主,吸附量较小。

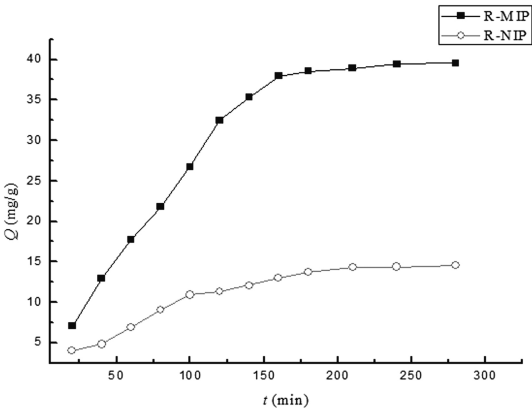


图 1 动态吸附曲线
Figure 1 Dynamic adsorption curve

2.2 印迹柱的性能评价

为考察 MISPE 对烯唑醇选择性吸附能力,选择与烯唑醇结构相似且同为三唑类杀菌剂的戊唑醇、己唑醇为对照物,考察三种杀菌剂在 MISPE、NISPE 和 C18 柱上的吸附量,结果见图 2,MISPE 对烯唑醇、己唑醇、戊唑醇的吸附量分别为 39.3 mg/g、19.3mg/g、18.6mg/g,MISPE 对烯唑醇的吸附量明显高于其它两种结构类似物,这是因为填料中存在与烯唑醇结构相符的印迹孔穴,使得 MISPE 柱对烯唑醇具有较高的吸附量;而另外两种杀菌剂虽然与烯唑醇结构相似,但有差别,不能与孔穴很好匹配,因此吸附量较低。NISPE 对烯唑醇、己唑醇、戊唑醇的吸附量分别为 14.4mg/g、14.6mg/g、14.4mg/g,C18 柱对烯唑醇、己唑醇、戊唑醇的吸附量分别为 15.2mg/g、15.0mg/g、15.1mg/g,吸附量均较小且无明显差别,这是由于 NISPE 填料 R-NIP 和 C18 柱填料均不存在这样的印迹孔穴,属于非特异性吸附作用。

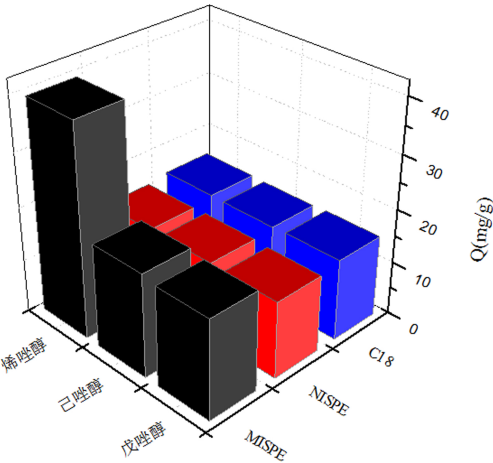


图 2 MISPE 与 C18 柱对其结构类似物的吸附量
Figure 2 Adsorption capacity of vanillin and its analogues after MISPE and C18

2.3 T-MIP 与 R-MIP 的比较

通过扫描电镜对 T-MIP(a)和 R-MIP(b)进行形貌表征,如图 3 所示,传统方法制备的聚合物(T-MIP)微球粒径较小,不均一,分散性也不好,而由 RAFT-沉淀法制备的聚合物(R-MIP)微球粒径明

显增大,约 $4\text{ }\mu\text{m}$ 左右,更加均一,且分散性良好,更适合作为固相萃取填料。这是由于 RAFT 链转移试剂在聚合反应过程中起到了调控作用。

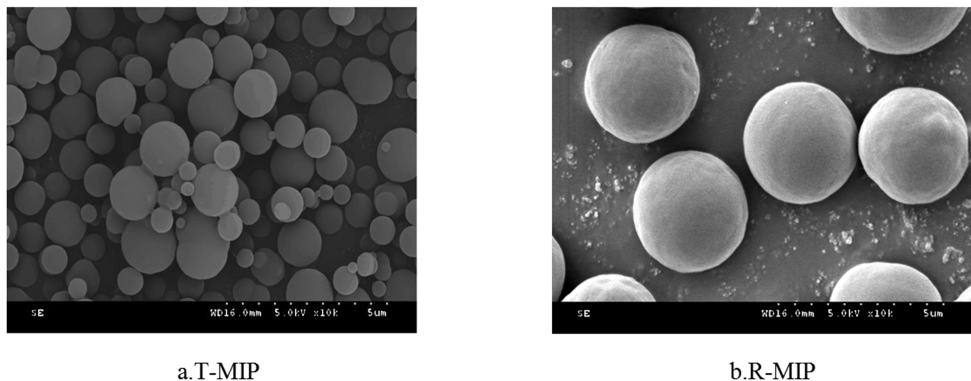


图 3 聚合物扫描电镜图

Figure 3 SEM images of T-MIP and R-MIP

2.4 固相萃取条件优化

固相萃取技术是一种从溶剂中萃取和分离目标物的技术,因具有高效、操作简单、易于实现自动化等优点而备受关注。步骤主要分为:活化、上样、淋洗、洗脱四部分。以制备的 R-MIP 为固相萃取介质,制备分子印迹固相萃取柱(MISPE 柱),用 3mL 去离子水和 3mL 甲醇进行活化,分别对上样溶剂、淋洗溶剂、洗脱液进行条件优化。

2.4.1 上样溶剂的选择

选择上样溶剂要遵从两条原则:一是上样溶剂对目标物要有良好溶解性,二是在不破坏物质形态的前提下使目标物在 MISPE 柱上有较高的结合率。本实验以甲醇、水、乙腈溶液为上样溶剂,考察 MISPE 对烯唑醇的结合性能。结果表明,当甲醇和水作为上样溶剂时,烯唑醇在 MISPE 柱上的洗脱率分别为 63.2% 和 60.1%,均较低。这是由于甲醇和水均是极性较强的质子化溶剂,与烯唑醇之间能产生比较强的氢键作用,从而阻碍了烯唑醇与聚合物之间的结合。当选择乙腈为上样溶剂时,洗脱率为 97.6%。因此,选择乙腈为上样溶剂。

2.4.2 淋洗溶剂条件优化

选择淋洗溶剂应满足两个条件:(1)最大程度地保留固相萃取柱中的目标物,(2)有效地去除聚合物结合的杂质。实验分别以甲醇、氯仿、二氯甲烷、乙腈溶液作为淋洗溶剂,考察对烯唑醇洗脱率的影响。甲醇、氯仿、二氯甲烷为淋洗液时,洗脱率分别为 70.9%、76.6% 和 67.4%,均小于 80%,说明这些溶剂在除去杂质干扰的同时,也损失了大量的目标物,不适合作为淋洗溶剂。而乙腈为淋洗溶剂时,洗脱率为 93.1%,可能是因为乙腈在有效洗去杂质的同时,对目标物与聚合物间氢键破坏程度最小,因此可以选择乙腈为淋洗溶剂。

2.4.3 洗脱液条件优化

洗脱液通过破坏目标物与聚合物的作用力,将吸附在 MISPE 柱上的目标物洗脱下来,达到检测的目的。分别选用甲醇/水(9:1,V/V)、水/乙酸(9:1,V/V)、甲醇/乙酸(9:1,V/V)作为洗脱液,考察洗脱液及洗脱液体积对洗脱率的影响。结果见图 4,当甲醇/乙酸为洗脱液时,洗脱率最高为 96.7%,这是由于烯唑醇在甲醇中有很好的溶解性。此外,乙酸能与目标物竞争聚合物的结合位点,破坏两者间的相互作用力,减少烯唑醇的残留。当洗脱液体积为 3 mL 时,洗脱率已达到最大,所以确定洗脱液体积为 3 mL。

2.5 线性方程及检出限

在优化的条件下,以 R-MIP 为固相萃取填料制备 MISPE,将 MISPE 与 HPLC 相结合建立分析方法,并以检出限、定量限对方法进行评价,在 $0.002\sim 2.000\text{mg/mL}$ 浓度范围内线性良好,方程为 $Y =$

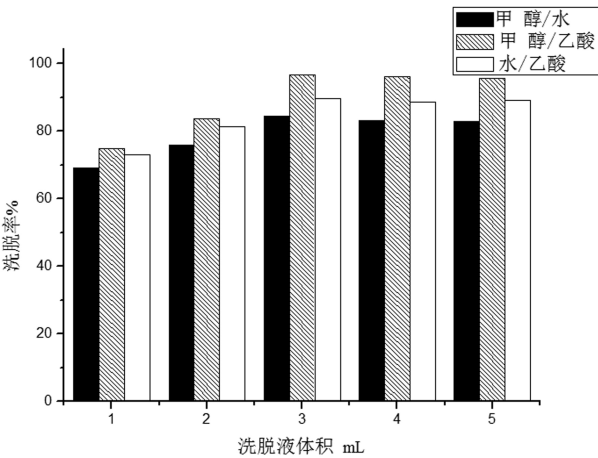


图 4 洗脱液条件优化
Figure 4 Optimization of eluent condition

$7045x+618.2, r^2=0.9998$ 。检出限 ($S/N=3$) 为 $1.64\times10^{-3}\text{ mg/kg}$, 定量限 ($S/N=10$) 为 $5.47\times10^{-3}\text{ mg/kg}$, 满足定量分析要求。

经 MISPE 柱处理, 对苹果样品进行加标回收实验。三水平加标回收率为 93.2~100.3%, 相对标准偏差 $RSD\leq 5.1\%$ 。

2.6 实际样品的色谱行为

分别以 MISPE 柱和目前广泛采用的 C18 柱对苹果样品中的烯唑醇进行分离富集, 结合 HPLC 法进行分析, 其色谱分析图如图 5 所示, 经 MISPE 柱和 C18 柱处理后, 烯唑醇均得到较好的富集, 两者相比, MISPE 柱去除基质的效果更好, 对烯唑醇的富集倍数更高, 这是由分子印迹聚合物的选择性吸附特点所决定的。经 HPLC 分析, 苹果中烯唑醇的含量为 0.106 mg/kg , 未超国家标准^[12]。

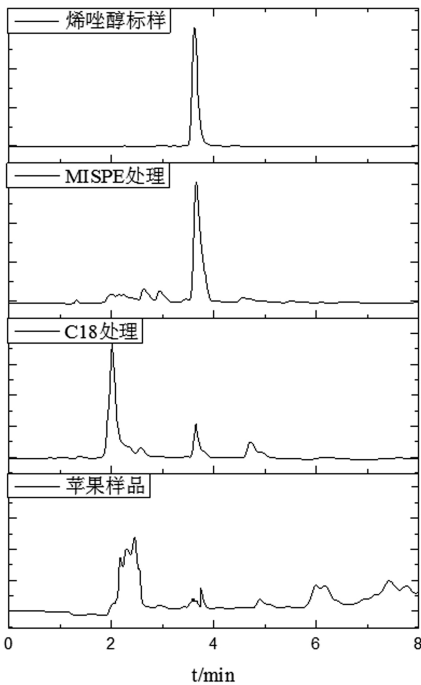


图 5 苹果样品色谱图
Figure 5 Apple sample chromatogram

3 结 论

以烯唑醇为模板分子,丙烯酰胺为功能单体,采用可逆加成断裂链转移沉淀聚合法制备 MIP,聚合物对烯唑醇具有良好的选择性、较高的吸附量。将其作为固相萃取填料,用于分离富集苹果中痕量的烯唑醇,结合 HPLC 对其进行检测,能有效地去除复杂样品中的基质效应,表现出对烯唑醇优异的净化效果和富集能力,为复杂样品中烯唑醇的分离与富集提供了新材料。

参 考 文 献:

- [1] 高文惠,庞军.现代食品科技,2015,31(1):96~100.
- [2] 高林,李亚丽,刘博.中国粮油学报,2016,31(10):131~136.
- [3] 高文惠,赵春娟.现代食品科技,2015,31(11):163~170.
- [4] 金雅慧,王鸣华.色谱,2012,30(1):67~70.
- [5] 刘博,尹航,高文惠.河北科技大学学报,2013,34(5):417~421.
- [6] Pan G Q, Zu B Y, Guo X Z, Zhang Y, Li C X, Zhang H Q. Polymer, 2009, 50: 2819~2825.
- [7] 张会旗,李晨溪.高分子通报,2013,1:13~25.
- [8] 黄原飞,娄晓祎,周哲.分析化学,2018,46(3):454~461.
- [9] 赵春娟,庞军,高文惠.中国食品学报,2015,15(3):175~180.
- [10] 苏立强,王丽博,张慧洁.分析试验室,2017,8:938~942.
- [11] Zhang H Q. Eur Polym J, 2013, 49: 579~600.
- [12] 国家食品药品监督管理总局.GB2763-2016,2016.

Preparation and Application of Diniconazole Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction

WANG Yuan-yuan, SU Li-qiang*, ZHANG Hui-jie, HAN Shuang, ZHAI Ming-hui

(College of Chemistry and Chemical Engineering of Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Molecularly imprinted polymer was prepared by reversible addition fragmentation chain transfer polymerization with diniconol as template molecule. The results showed that the maximum adsorption capacity of the imprinted polymer was 39.3mg/g, the maximum adsorption capacity of non-imprinted polymers is 14.5mg/g. The adsorption performance was studied and its morphology was characterized by electron microscopy. The results showed that Imprinted Polymer uniform particle size and good dispersibility. It was used as a solid phase extraction filler and combined with high performance liquid chromatography to analyze the residual diniconazole in apples. Under optimized conditions, the detection limit of diniconazole was 1.64×10^{-3} mg/kg; the recovery was 93.2~100.3%. The column could enrich and purify the diniconazole with better effect than the common C18 column.

Key words: Molecular imprinting; Diniconazole; Solid phase extraction; High performance liquid chromatography