

特丁津分子印迹整体萃取棒的研制及其萃取性能

胡玉玲* 朱飞 李家威 李攻科

(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

摘要 以特丁津为模板分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯为交联剂, 甲苯为致孔剂, 在 75 °C 下封管聚合反应 24 h 后, 以 HF 溶液腐蚀除去玻璃毛细管, 制备得到分子印迹整体萃取棒, 优化了聚合配方和合成条件。采用扫描电镜表征了萃取棒表面形貌, 结果表明: 萃取棒表面呈疏松、多孔的结构。研究了特丁津分子印迹整体萃取棒作为三嗪类除草剂样品前处理分离介质的萃取条件和萃取性能。采用甲苯为萃取剂, 萃取 60 min 后以 150 μ L 甲醇解吸。与不加模板分子的整体萃取棒相比, 分子印迹整体萃取棒对模板分子特丁津及其结构类似物西玛津、西草净、莠去津、莠灭净、扑灭津及特丁净表现出选择性识别能力, 富集率分别提高到 1.5 ~ 8.1 倍, 对氯三嗪的萃取选择性优于硫三嗪。

关键词 分子印迹, 特丁津, 整体萃取棒, 三嗪类除草剂

1 引言

三嗪类除草剂在世界范围内广泛使用, 由于其“致癌、致畸、致突变”的性质, 世界各主要农业大国对粮食中三嗪除草剂残留制定了严格的限量标准^[1]。三嗪类除草剂在样品中含量极低、基体复杂, 因此可靠的分析结果直接依赖于高效和高选择性的样品前处理技术。常规样品前处理方法操作繁杂、处理时间长、试剂消耗量大、选择性低^[2]。有必要发展具有特异性识别能力的分离富集材料, 以提高农残分析的准确性和速度。

分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIPs) 是一种人工合成的通过模板分子、功能单体和交联剂相互作用的具有三维空间结构的受体, 对模板分子有“预定”的识别能力, 具有从复杂样品中选择性吸附目标分子或结构类似化合物的能力, 将 MIP 作为萃取介质分离富集复杂样品中的痕量被分析物, 可克服生物、环境及食品样品体系复杂、预处理繁琐等不利因素, 达到分离富集的目的^[3]。MIP 在三嗪类除草剂分析中的应用近年来得到了快速的发展^[4~8]。Turiet 等^[8]采用玻璃毛细管封管聚合的方法制备了固相微萃取纤维用于土壤和蔬菜样品中三嗪化合物的分离富集。

搅拌棒吸附萃取 (stir bar sorptive extraction, SBSE) 是 1999 年提出的一种样品前处理技术, 由于其高效、快速、操作方便等特点受到关注, 高选择性涂层的研制成为 SBSE 发展的关键^[9]。Zhu 等^[10]制备了分子印迹搅拌棒涂层, 提高了萃取选择性。但 SBSE 技术在搅拌过程中完成萃取, 容易造成涂层磨损, 导致萃取重现性下降。本研究以特丁津为模板分子, 采用封管聚合方法制备得到分子印迹整体萃取棒, 并研究了其作为三嗪类除草剂样品前处理分离介质的萃取性能。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); HGC-12 氮吹仪 (天津恒奥科技发展有限公司); HN1006 型超声清洗仪 (广州华南超声设备厂); 电磁搅拌/加热平台 (美国 Supelco 分析仪器公司); XL-30 扫描电子显微镜 (荷兰飞利浦电子光学有限公司); Mars-X 微波萃取仪 (美国 CEM 公司)。

特丁津、莠去津、西玛津、西草净、莠灭净、扑灭津及特丁净 (96.0%, 山东滨州农药厂); 甲醇 (HPLC

2008-08-09 收稿; 2008-12-01 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20775095, 20705042) 和广东省自然科学基金 (No. 06023094) 资助项目

* E-mail: ceshyl@mail.sysu.edu.cn

纯, Sigma-Aldrich 公司), 乙腈 (HPLC 纯, Merck 公司); 甲基丙烯酸 (MAA)、偶氮二异丁腈 (AIBN) (分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯 (TRIM) (95.0%, 美国罗姆公司)。

2.2 分子印迹整体萃取棒的制备

将模板分子 (特丁津)、功能单体 (MAA)、溶剂 (甲苯) 振荡混匀, 静置 12 h 使模板分子与功能单体进行自组装, 然后加入交联剂 (TRIM) 和引发剂 (AIBN), 通入 N_2 , 将聚合液注满内径分别为 0.3、0.5 和 1.0 mm, 长度为 10 cm 的玻璃毛细管, 两端胶塞密封, 75 °C 下反应 24 h。聚合完成后放入 $V(HF):V(H_2O) = 1:3$ 混合溶液中浸泡 12 h, 腐蚀除去玻璃毛细管, 图 1 为除去玻璃毛细管模具前后对比图。由图 1 可见, 除去玻璃毛细管模具后所得整体萃取棒具有较好的韧性和机械强度, 不易折断。采用 $V(CH_3OH):V(HAc) = 1:1$ 混合溶液超声清洗除去模板分子至解吸液中检测不到特丁津, 120 °C 下老化 3 h。将所得的 MIP 整体材料分割成 1.9 mm 的整体萃取棒备用。

非分子印迹聚合物 (NIP) 整体萃取棒的合成不加模板分子特丁津, 其余过程同 MIP 整体萃取棒。

2.3 萃取实验条件

在一定浓度 10 mL 待测液中, 加入搅拌磁子, 转速为 250 r/min, 放入分子印迹整体萃取棒进行萃取, 萃取过程中萃取棒浸没于样品溶液中随搅拌转动。萃取一定时间后, 取出萃取棒, 吹干表面吸附的溶剂, 放入 150 μ L 样品瓶内的插管中, 加入 150 μ L 甲醇, 超声解吸一定时间后取 20 μ L 解吸液进样分析。

2.4 色谱分析条件

Dikma C_{18} 钻石柱 (250 mm \times 4.6 mm I. D., 5 μ m), 柱温 40 °C; 流动相为 $V(CH_3CN):V(H_2O) = 1:1$ 混合溶液, 流速为 1.0 mL/min; 采用 SPD-M20A 二极管阵列检测器, 检测波长为 223 nm。

2.5 样品前处理条件

取一定量生菜样品, 剪碎, 在 60 °C 下烘干恒重并过筛 (粒径 0.771 mm)。然后准确称取 1 g 至微波萃取罐, 加入 30 mL 乙腈, 在 60 °C 下微波提取 20 min。过滤, 滤液在 40 ~ 60 °C 下旋转蒸干, 用 5 mL 甲苯重新溶解, 加入分子印迹整体萃取棒萃取。

3 结果与讨论

3.1 制备条件研究

研究中采用热引发自由基聚合反应原理、封管聚合的方式制备分子印迹整体萃取棒。反应过程如图 2 所示: (1) 在甲苯溶剂中, 功能单体甲基丙烯酸与模板分子特丁津通过分子间的氢键作用进行分子自组装, 形成预聚体; (2) 在完成自组装的溶液中加入交联剂和引发剂, 使预聚体与交联剂在 75 °C 下发生热引发聚合反应, 形成刚性聚合物。甲苯在此过程中还充当致孔剂的角色; (3) 采用 $V(CH_3OH):V(HAc) = 1:1$ 混合溶液作为洗脱液, 超声辅助洗脱, 使分子印迹聚合物中产生与模板分子大小、形状相匹配的立体空穴 (即识别位点)。利用分子印迹聚合物固定相进行吸附萃取时, 即利用识别位点对三嗪类化合物分子的官能团、分子大小互补识别, 形成分子间氢键作用, 实现高选择性吸附萃取。

为获得识别位点多、选择性高且具有高机械强度的分子印迹整体萃取棒, 需严格控制反应物组成、聚合反应时间和温度等条件。

实验中采用易与特丁津目标物形成氢键作用的甲基丙烯酸作为功能单体, 三元交联剂 TRIM 作为交联剂, 与二元交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDGMA) 相比用量更少而达到相同的交联度, 从而提高单位质量 MIP 中可结合的位点数目。研究结果表明, 采用甲苯作为聚合溶剂模板分子特丁津具有良好的溶解性能, 还可避免由于氢键作用对模板分子与功能单体的自组装产生的不利影响。采用模板分子、

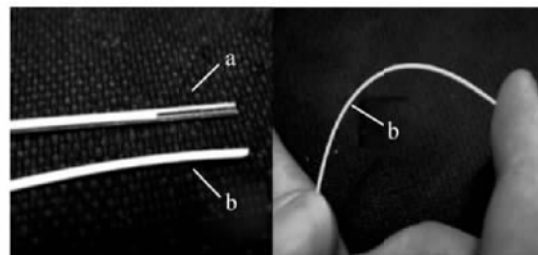


图1 玻璃毛细管除去前后图片

Fig. 1 Monolithic bar before and after removing silica capillary walls

a. 除去前 (before removing silica capillary walls); b. 除去后 (after removing silica capillary walls)。

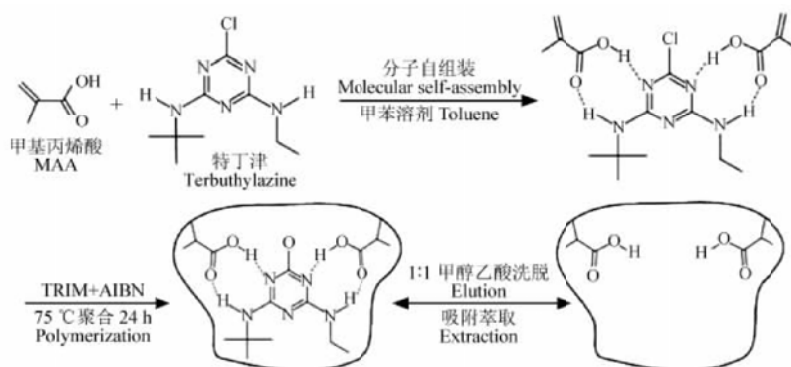


图 2 特丁津分子印迹整体吸附萃取棒聚合反应过程

Fig. 2 Polymerization of terbutylazine molecularly imprinted monolithic bar

功能单体与交联剂的不同摩尔比 (1:4:4、1:4:8、1:4:12、1:4:14、1:4:16、1:4:18)，所得整体萃取棒之间的机械强度存在较大差别，当交联剂 TRIM 用量增大到配比为 1:4:18 时，所得整体萃取棒已具有较好的刚性，不易发软变形。反应温度过低或反应时间不足会造成固定相发生局部聚合和聚合度下降，无法制备刚性萃取棒；而反应温度过高和反应时间过长则会造成所得整体萃取棒发生断裂。在 75 °C 下反应 24 h，所得整体萃取棒聚合充分，不发生断裂。

图 3 为自制特丁津分子印迹整体萃取棒的表面形貌扫描电镜图。从图 3 可看出，萃取棒表面呈疏松、多孔的结构，有利于增加萃取容量和加速待分析物在萃取棒内部的传质。

3.2 萃取和解吸条件的选择

图 4 显示了在不同萃取剂中 MIP 整体萃取棒对模板分子特丁津的萃取效果。由图 4 可见，以水、甲醇、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯和四氢呋喃为萃取剂，MIP 整体萃取棒的萃取效果较差，而以氯仿和甲苯为萃取剂，萃取率明显提高。这是因为水、甲醇、乙醇、正丁醇、乙酸乙酯能占据 MIP 中的氢键结合位点，从而破坏模板分子特丁津与 MIP 的氢键作用。氯仿和甲苯不参与氢键形成，保证了 MIP 结合位点对特丁津的有效识别。文献 [5] 报道：当萃取剂与聚合剂一致时可以获得更好的萃取效果。本实验结果也表明，采用甲苯作为萃取剂时特丁津的萃取率最高。

以甲苯为萃取剂，考察了 20、30、40、50、60、70 和 90 min 不同萃取时间对特丁津萃取率的影响。结果显示，当萃取时间为 60 min 时萃取率最高。

表 1 萃取剂对特丁津萃取效果的影响

Table 1 Effect of extraction solvents on extraction efficiency of terbutylazine

试剂 Reagent	H ₂ O	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	正丁醇 <i>n</i> -Butyl	乙酸乙酯 Ethylacetate	四氢呋喃 Tetrahydrofuran	氯仿 Chloroform	甲苯 Toluene
峰面积 Peak area (10 ⁴)	0.15	0.46	0.13	0.12	0.38	0.03	1.7	5.5

10 μg/L 特丁津标准溶液 (terbutylazine standard solution); 萃取时间 (extraction time): 1 h; 150 μL 甲醇 (methanol); 超声解吸 (desorption with ultrasonic): 15 min; 进样 (injection): 20 μL。

样品在色谱分析前，需将萃取棒富集的待分析物用少量溶剂有效解吸，解吸是已萃取的待测物在萃取棒与解吸溶剂间的再分配过程。比较了甲醇、乙腈、10% 和 50% 乙酸的甲醇溶液 (体积比) 对特丁津解吸效果的影响，结果显示：甲醇作为解吸剂时解吸效果最好。这是由于甲醇可通过与 MIP 识别位点形成氢键作用，使特丁津再分配于解吸液；加入乙酸后基线噪音变大，使检测灵敏度降低。

以甲醇为解吸剂，分别选取 10、12、15、18 和 20 min 解吸时间进行了研究，结果显示：解吸时间为 15 min 时解吸率最高。将解吸后的萃取棒于甲醇中再次超声解吸，未检测到残留的待分析物，表明已完

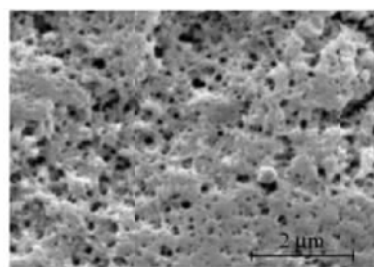


图 3 特丁津分子印迹整体吸附萃取棒表面形貌扫描电镜图

Fig. 3 Scanning electron micrographs of terbutylazine-imprinted molecularly imprinted monolithic bar

全解吸。

采用封管聚合的方法制备分子印迹整体萃取棒具有较大的灵活性,可以通过调整玻璃毛细管的内径来控制萃取棒的固定相体积。实验中分别制备了直径为0.3、0.5和1.0 mm的萃取棒,比较其萃取率。由实验结果可知,3种不同直径萃取棒的富集能力为:1.0 mm > 0.5 mm > 0.3 mm。在实际分析工作中,可以根据分析需要灵活制备合适体积的分子印迹整体萃取棒。但是,随着固定相体积的增大也会带来模板分子难以洗脱干净和解吸过程残留的问题,使分析时间延长,因此需要综合考虑萃取性能和分析效率。

3.3 萃取性能研究

图4是MIP与NIP在相同萃取解吸条件下,萃取7种三嗪类化合物的色谱图。从图4可知:MIP萃取棒对7种三嗪的萃取能力明显优于NIP萃取棒。对于氯三嗪类除草剂,如扑灭津、西玛津、莠去津、特丁津,MIP的富集率分别是NIP的8.1、7.3、6.9、5.4倍;对于硫三嗪类除草剂,如莠灭净、西草净和特丁净,MIP的富集率分别是NIP的5.3、4.5、1.5倍;表明MIP萃取棒对氯三嗪类除草剂的选择性明显优于硫三嗪类除草剂。MIP中形成的形状相匹配的立体空穴提高了MIP的萃取选择性,从而使MIP整体萃取棒对模板分子特丁津及其结构类似物三嗪类除草剂具有特异性的分子识别能力。但整体萃取棒没有显示出对模板分子具有最高的选择性。这可能是由于7种三嗪类除草剂结构相似度较大,而模板分子特丁津由于存在较大的特丁基基团在进入分子识别空腔时造成一定的空间位阻。考察了自制分子印迹整体萃取棒在复杂基质样品中痕量三嗪类化合物的分离富集能力。图5比较了在生菜样品中加入10 μg/L三嗪混合标准溶液时微波提取液和经NIP萃取棒和MIP萃取棒分离富集后的色谱图。由图5可知,生菜样品基体较为复杂,微波提取液直接进样无法检测到三嗪类化合物;NIP萃取后可检测到,但富集率低,选择性差;MIP萃取棒对生菜中痕量三嗪类化合物有明显的选择性富集能力,表明自制分子印迹整体萃取棒在复杂基质样品前处理中具有实际应用前景。

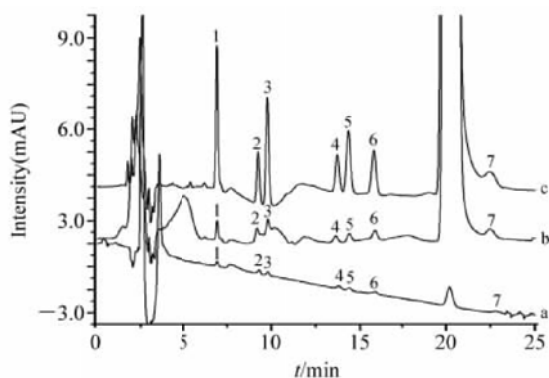


图4 MIP萃取棒与NIP萃取棒萃取色谱图

Fig.4 Chromatogram of triazines extracted by molecularly imprinted polymer (MIP) and non-imprinted polymer (NIP) monolithic bar

a. 10 μg/L 7种三嗪混标直接进样 (injection of 7 triazines standard solution); b. NIP萃取后进样 (extracted by NIP); c. MIP萃取后进样 (extracted by MIP)。1. 西玛津 (simazine); 2. 西草净 (simetryn); 3. 莠去津 (atrazine); 4. 莠灭净 (ametryn); 5. 扑灭津 (propazine); 6. 特丁津 (terbuthylazine); 7. 特丁净 (terbutryn) 萃取棒直径 (diameter of extraction bar) 1.0 mm, 萃取时间 (extraction time) 1 h, 150 μL 甲醇超声解吸 (desorption with ultrasonic in methanol) 15 min, 进样 (injection) 20 μL。

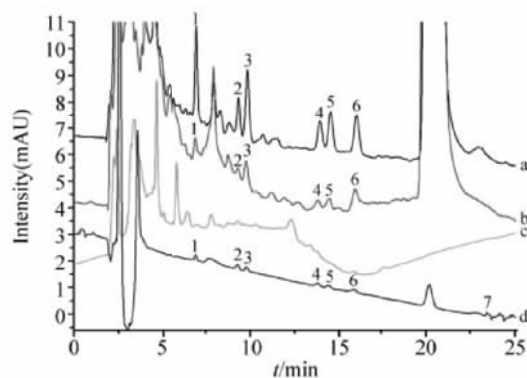


图5 生菜中三嗪加标萃取色谱图

Fig.5 Chromatogram of triazines in spiked lettuce sample a. MIP萃取10 μg/L加标液 (spiked sample with 10 μg/L triazines by MIP); b. NIP萃取10 μg/L加标液 (spiked sample with 10 μg/L triazines by NIP); c. 生菜微波提取液直接进样 (triazines spiked microwave assisted extraction solution of lettuce); d. 10 μg/L三嗪类除草剂混合标准直接进样 (direct injection of triazines standard solution)。峰1~7同图4 (peak 1-7 are the same as in Fig.4)。

References

- 1 Barceló D. *J. Chromatogr.*, **1993**, 643: 117 ~ 143
- 2 Schachterle S, Feigl C. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 754 (1-2): 411 ~ 422
- 3 Hu Xiao-Gang (胡小刚), Li Gong-Ke (李攻科). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2006**, 34 (7): 1035 ~ 1041
- 4 Sambe H, Hoshina K, Haginaka J. *J. Chromatogr A*, **2007**, 1152: 130 ~ 137
- 5 Ferrer I, Lanza F, Tolokan A, Horvath V, Sellergren B, Horvai G, Barcelo D. *Anal. Chem.*, **2000**, 72: 3934 ~ 3941
- 6 Koeber R, Fleischer C, Lanza F, Boos K S, Sellergren B, Barcelo D. *Anal. Chem.*, **2001**, 73: 2437 ~ 2444
- 7 Hu X G, Hu Y L, Li G K. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1147: 1 ~ 9
- 8 Turiel E, Tadeo J L, Martin-Esteban A. *Anal. Chem.*, **2007**, 79: 3099 ~ 3104
- 9 Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C. *J. Microcol. Sep.*, **1999**, 11: 737 ~ 747
- 10 Zhu X, Cai J, Yang J, Su Q, Gao Y. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1131 (1-2): 37 ~ 44

Preparation of Terbutylazine Molecularly Imprinted Monolithic Bar and its Extraction Property

HU Yu-Ling*, ZHU Fei, LI Jia-Wei, Li Gong-Ke

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

Abstract The molecularly imprinted monolithic bar was prepared by blocking-tube polymerization at 75 °C for 24 h using terbutylazine as template, methacrylic acid (MAA) as monomer and trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) as cross-linker respectively. Preparing material and conditions were researched. The surface structure of the monolithic bar was investigated by scanning electron micrograph and it showed a porous structure. The extraction conditions and properties of the molecularly imprinted monolithic bar for enrichment of triazines was investigated. Extraction was performed in toluene for 60 min and the analytes were then desorbed by 150 μ L methanol. Results indicated special selectivity towards terbutylazine and its analogs such as simazine, simetryn, atrazine, ametryn, propazine and terbutryn was obtained for the molecularly imprinted monolithic bar compared to the non-imprinted monolithic bar. The enrichment efficiency of the molecularly imprinted monolithic bar for triazines was 1.5 to 8.1 times as that of the non-imprinted monolithic bar. Better selectivity was obtained for chlorotriazines than that of thiotriazines. The molecularly imprinted monolithic bar was effective and selective for the enrichment of spiked lettuce. It showed potential application to the analysis of trace triazines in complex matrix.

Keywords Molecularly imprinted polymer, terbutylazine, monolithic bar, triazines

(Received 9 August 2008; accepted 1 December 2008)

《色谱定性与定量》(第二版)

该书主要介绍了色谱分析中常用的定性和定量方法。在定性分析中除了介绍经典的保留值定性的各种方法外,对近年来在色谱定性分析中使用的质谱和红外光谱的谱图解析作了较详细的介绍。定量分析中除了介绍各种定量分析方法外,对数据处理中的误差分析、定量结果的评价和表达方法作了详细介绍。该书还对色谱定性定量分析常用的积分仪和色谱工作站作了介绍,并对保证色谱定性和定量结果准确的优良实验室规范及实验室认可制度作了介绍。与第一版相比,该书的第二版增加了色谱峰纯度检验、色谱指纹图谱分析、实验室能力验证等新内容。

该书是《色谱技术丛书》之分册,在第一版基础上作了修改和充实,补充了新近发展的仪器、技术与应用实例。

该书可供从事色谱分析的人员及大专院校分析化学相关专业师生学习参考。该书由汪正范编著,化学工业出版社出版,定价 39.00 元。