

毒死蜱分子印迹聚合物的制备与性能研究*

郑红,张迎雪

(重庆师范大学 化学学院,重庆 401331)

摘要:分子印迹技术是近些年发展起来的一种新技术,因其具有构效预定性、特异识别性和广泛实用性等特点而被广泛应用于环境、生物医药等领域,其在食品安全检测中也有重要的研究潜力。以毒死蜱为模板分子,采用原位逐步聚合法制备了具有良好识别性能的分印迹聚合物(MIPs),考察了毒死蜱、敌敌畏及甲胺磷在毒死蜱分子聚合物上的选择性分离富集特性。用毒死蜱分子聚合物固相萃取了蜂蜜、蔬菜和天然水中的毒死蜱。结果表明,聚合物对模板分子产生了印迹效应,对毒死蜱有明显的选择性,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量为 $20 \mu\text{L}$,加样回收率为 $96\% \sim 102\%$,RSD小于 6.6% 。该方法操作简单,针对性强,不需复杂的样品前处理,可用于食品中毒死蜱残留量的测定。

关键词:分子印迹聚合物;毒死蜱;高效液相色谱

中图分类号:O657

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2011)05-0073-04

毒死蜱是一种高效、速效且广谱的有机磷杀虫剂,具有触杀、胃毒和熏蒸作用。近年来常发生小吃、馒头、火腿中加毒死蜱的事件,食用后对人体造成很大的危害。食品和环境中毒死蜱的常用检测方法有高效液相色谱法、高效液相-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法等。上述方法样品主要采用固相萃取等技术进行前处理,处理过程繁杂,很难满足痕量分析的测定要求,而且这些方法选择性差,耗时,回收率偏低^[1-3]。因此,研制新型的高选择性材料来富集分离有机磷农药,建立有效的检测农副产品中有机磷农药残留量的方法具有重要意义。

本文利用逐步聚合反应,以毒死蜱为模板分子,聚乙二醇作为致孔剂,二乙烯三胺为固化剂与环氧树脂聚合,制备出了一种新型的毒死蜱分子印迹聚合物(MIPs)^[4-6],用其吸附萃取毒死蜱,建立了一种新的固相萃取-高效液相色谱定量检测方法。结果表明,该方法具有测定速度快、精密度好、灵敏度高等优点,为蔬菜和天然水中低含量毒死蜱残留的监测提供了一种可靠的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津公

司),包括 SPD-6AV 紫外-可见检测器,LC-6A 高压溶液输送泵和 HW2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所);FS-1 电动匀浆机(金坛市富华仪器有限公司)。

试剂:毒死蜱、敌敌畏及甲胺磷标准品纯度均大于 98.0% (天津农药质检中心);甲醇(色谱纯,天津市化学试剂批发公司);实验用水为重蒸馏水。

1.2 实验步骤

1.2.1 毒死蜱分子印迹聚合物的制备 在 60°C 下,将 8 g 环氧树脂和 16 g 聚乙二醇充分混合后,加入 0.5 mmol 毒死蜱和 2 g 二乙烯三胺。在强烈搅拌下,待混合体系初期剧烈的放热反应结束,黏度很高的时候,将其转入玻璃空管柱中密封置于 60°C 的恒温箱中,在无搅动模式下继续反应 24 h ,得到管内的白色固体,取出后冷却,用热水反复洗涤除去致孔剂。用乙腈:1%冰醋酸= $80:20$ 充分洗脱毒死蜱模板分子,直到在紫外分光光度计上检测不到毒死蜱为止。再将洗脱好的聚合物放入去离子水中充分浸泡,置换出残留的缓冲液和甲醇。处理好的MIPs放在去离子水中室温下储存待用。

非印迹环氧树脂聚合物(NIPs)的制备,除不加毒死蜱外,其余步骤同上。

1.2.2 毒死蜱分子印迹平衡吸附实验 分别称取

* 收稿日期 2011-04-06 修回日期 2011-05-16 网络出版时间 2011-09-17 13:59:00

资助项目:重庆市教委科技项目(No. KJ100606;No. KJ090806);重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BB0201;No. CSTC2010BB8328);重庆师范大学基金项目(No. 07XWR035)

作者简介:郑红,女,教授,博士,研究方向为环境化学。

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20110917.1359.201105.73_015.html

50.0 mg 的 MIPs 和 NIPs 置于 25 mL 比色管中,加入 5 mL 一系列不同浓度(0 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)毒死蜱的甲醇溶液,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 24 h (200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)。上清液经过 0.45 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱(HPLC)测定。MIPs 和 NIPs 所吸附的毒死蜱的量由最初上样浓度减去上清液中游离态的毒死蜱浓度计算得到。

1.2.3 毒死蜱分子印迹聚合物的选择性 称取 80 mg 的毒死蜱分子印迹聚合物和非印迹聚合物于比色管中,分别加入 3 mL 浓度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的毒死蜱、敌敌畏和甲胺磷。将吸附后的溶液用 HPLC-UV 检测(吸收波长:毒死蜱:290 nm;敌敌畏:270 nm;甲胺磷 254 nm)。计算方法同 1.2.2。

NIPs 按上述相同的步骤操作,测定其吸附量。

1.2.4 实际样品的处理 1) 蜂蜜样品的处理^[7]。准确称取 3 g 蜂蜜于 15 mL 具塞离心管中,加入 3 mL 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,涡旋 1 min,加入丙酮-正乙烷(1:2)3 mL,涡旋 60 min,在室温下离心 3 min 后取出,用移液管将溶剂层完全转移至烧杯中,再用丙酮-正乙烷(1:2)萃取两次,合并萃取液,过滤 3 次。50 mL 处理过的蜂蜜试样以 0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速通过 MIPs,吸附的毒死蜱用 1 mL 乙腈:1% 冰醋酸 = 80:20 淋洗,柱洗脱液在适当的条件下用 HPLC 测定。2) 蔬菜样品的处理^[8]。将蔬菜切碎混匀后,称取 10.00 g 的样品置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 30 mL 二氯甲烷和 8 g 碳酸钠,超声提取 30 min 后过滤于分液漏斗中,用 20 mL 二氯甲烷分 3 次洗涤锥形瓶及漏斗,静置,待溶液清晰分层,收集有机相,水相用 20 mL 二氯甲烷振摇 2 min 静置分层,合并 2 次有机相提取液加适量无水硫酸钠,至溶液透明,表示水分已除掉,过滤,用约 20 mL 二氯甲烷分数次洗涤容器和无水硫酸钠,将滤液在小于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发器浓缩至干,用甲醇超声溶解移入 50 mL 容量瓶中,定容。用 0.45 μm 滤膜过滤。50 mL 处理过的蔬菜试样以 0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速通过 MIPs,吸附的毒死蜱用 1 mL 乙腈:1% 冰醋酸 = 80:20 溶液洗脱,收集洗脱组分,用 HPLC-UV 检测。

1.2.5 高效液相色谱条件 高效液相色谱系统(LC-10AT,C18 柱 4.6 mm \times 150 mm 4.6 μm ,紫外可见检测器 SPD-6 AV)用于毒死蜱定量测定。进样体积 20 μL ,流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相:乙腈:1% 冰

醋酸 = 80:20,柱温:室温,检测波长为 290 nm。

2 结果和讨论

2.1 吸收波长的选择、标准曲线及检出限

照紫外分光光度法以流动相作参比溶剂,在波长 200 ~ 400 nm 范围内扫描,选择毒死蜱在 290 nm 处有最大吸收为测定波长。配制毒死蜱标准溶液的浓度为 0、10、50、100、300 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,HPLC 检测,以峰面积 A 对浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行回归分析。回归方程: $Y = 8.206e + 004X$; 相关系数: $R = 0.9959$ 检出限为 1.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 2$)。

2.2 分子印迹聚合物的平衡吸附性能

衡量吸附剂的优劣,它的饱和吸附量是一个重要的参数。MIPs 和 NIPs 的平衡吸附实验在甲醇溶剂中进行,结果见图 1。初始浓度很低时,毒死蜱的吸附量随初始浓度线性增加,初始浓度较高时,出现平台,说明吸附达到饱和。毒死蜱 MIPs 和 NIPs 的吸附量分别为 26.39、8.16 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,并且 MIPs 的吸附量远大于 NIPs 的吸附量。证明了 MIPs 材料作为固相萃取的吸附剂是很有潜力的。表明在 MIPs 中形成了能够有效识别毒死蜱的特异性结合位点。

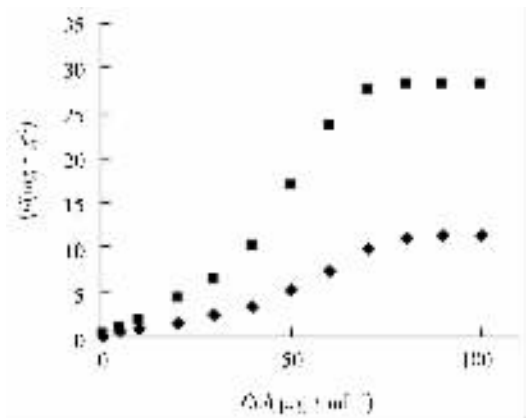


图 1 毒死蜱/甲醇溶液平衡吸附实验

2.3 分子印迹聚合物的选择吸附性

如图 2 所示,毒死蜱、敌敌畏及甲胺磷 3 种化合物用来做 MIPs 和 NIPs 的选择吸附性实验(浓度 5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。毒死蜱在 MIPs 的吸附量明显高于其他两种物质,而 NIPs 对毒死蜱的吸附量也很高,可能是因为聚合物表面本身存在相同的羟基基团,羟基上的氧原子具有孤对电子对与毒死蜱的磷原子结合的缘故;另外,若在 MIPs 上的吸附为

100% 则毒死蜥、敌敌畏及甲胺磷在 MIPs 上的吸附分别为 33.9%、34.8% 和 9.2%。这种高的交叉反应率表明合成的 MIPs 可以用于有效识别毒死蜥及其结构类似物。

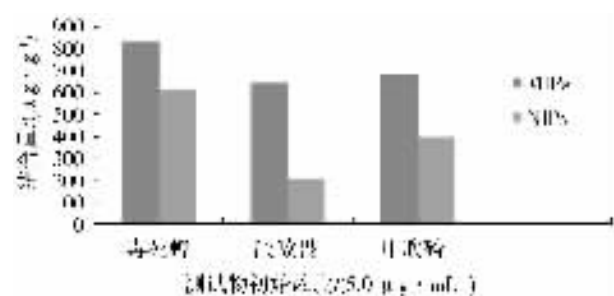


图2 毒死蜥 MIPs 交叉反应示意图

2.4 固相萃取应用

2.4.1 优化洗脱条件 在固相萃取中,为了消除杂质的干扰必须选择合适的洗脱剂。为了优化洗脱条件,用甲醇和乙腈含有 0%、10%、20%、30%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100% 的水溶液分别作为洗脱液进行洗脱时,组分比例对灵敏度和分离度均有一定的影响。实验结果表明乙腈:1% 冰醋酸 = 80:20 时,柱效最高,毒死蜥在 4 min 内达到基线分离,且灵敏度高,杂质峰与毒死蜥峰分开效果最好。所以,流动相选择为乙腈:1% 冰醋酸 = 80:20;流速:1.0 mL · min⁻¹。

2.4.2 实际样品分析 为了验证方法的可靠性,10 mL 长江水样被用来做加标回收实验。结果如表 3 所示,相对标准偏差为 0.06% ~ 6.66%,回收率达到 96% ~ 102%。证明了 MIPs 富集分离水样中毒死蜥的可行性。另外,MIPs 经处理后,重复利用 30 次,而萃取效率并未降低,证明了制备的 MIPs 比较稳定,再生性能好,可以重复使用。蔬菜样品经萃取后,取上清液同样过 MIPs,收集洗脱液 HPLC 检测,结果如表 4。

表3 10 mL 长江水加标回收验证 MIPs 整体柱的精密度和准确度

添加浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	添加量/ μg	测量值	RSD/%	回收率/%
1.0	10	9.56 ± 0.006	0.06	96
5.0	50	49.94 ± 0.126	0.25	100
10	100	98.90 ± 3.190	3.30	99
50	500	508.3 ± 32.12	6.66	102

表4 MIPs 富集检测实际样品中毒死蜥的含量

序号	样品	在 MIP-SPE 富集上的值/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	蜂蜜	未检出
2	蚕豆	7.23
3	西红柿	15.6
4	苦瓜	19.33

3 结论

本文利用逐步聚合反应,以毒死蜥作为模板分子,聚乙二醇作为致孔剂,二乙烯三胺为固化剂与环氧树脂聚合,制备出了一种新型的毒死蜥分子印迹聚合物。该法简便、快速,适合于蜂蜜和蔬菜中毒死蜥的残留分析,为分析检测食品中微量毒死蜥提供可靠的方法。

参考文献:

- [1] 牛古丹,俞志刚,李晓霞,等. 高效液相色谱法测定白菜中农药马拉硫磷残留量[J]. 韶关学院学报:自然科学版,2007,28(3):3-6.
- [2] 刘承兰,钟国华,高燕,等. 测定环境水样中毒死蜥及其降解产物的固相萃取-高效液相色谱法[J]. 西北农林科技大学学报,2008,36(2):215-221.
- [3] 周娟,王祥洪,结晶紫共振瑞利散射法测定七叶皂苷钠[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版,2008,25(2):71-73.
- [4] 杨伟群,王九春. 马来酰肼的分子印迹-化学发光传感检测技术研究[J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2010,34(1):72-77.
- [5] 李振营,段全,黄艳萍,等. 分子印迹液相色谱整体柱[J]. 化学进展,2008,20(5):747-753.
- [6] 李懿睿,张敏如. 分子印迹整体柱在高效液相色谱中的研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2007,38(4):313-317.
- [7] 李亚辉,王悦秋,张朔瑶,等. 孔雀石绿分子印迹的制备及其在固相萃取中的应用[J]. 化学研究与应用,2008,20(9):1163-1165.
- [8] 牛古丹,俞志刚,李晓霞,等. 高效液相色谱法测定白菜中农药马拉硫磷残留量[J]. 韶关学院学报:自然科学版,2007,28(3):3-6.

Research on the Preparation and Performance of Chlorpyrifos' Molecularly Imprinted Polymers

ZHENG Hong , ZHANG Ying-xue

(Dept. of Chemistry , Chongqing Normal University , Chongqing 401331 , China)

Abstract : As a new technique of recent development , molecular imprinting technique (MIT) with predetermination , specific recognition and practicability is widely used in the domain of environment , biological medicines , and so on. It also has important research potential in food security test. In this paper , using chlorpyrifos as template , the molecular imprinted polymers was prepared by in situ step-addition polymerization. The characteristics of selective separation and pre-concentration for chlorpyrifos , dichlorovos and methamidophos were examined on the polymer. The chlorpyrifos from the honey , vegetables and natural water was extracted via using the polymer. The extraction conditions of MISPE column for chlorpyrifos were optimized. The results indicated that different kinds of recognition sites in the MIPs showed specific affinity toward chlorpyrifos. Velocity is $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, the sampling volume of $20 \mu\text{L}$. Average recoveries for chlorpyrifos in a blank sample spiked at 3 levels were between 96.0 % and 102% , with a RSD of less than 6.6%. This method is easily operated , highly selective and has no requirement of complicated sample pretreatment and is applicable for the determination of chlorpyrifos residue in foods.

Key words : molecularly imprinted polymers ; chlorpyrifos ; high-performance liquid chromatography

(责任编辑 欧红叶)