

• 监测技术 •

## 饮用水中苯基脲除草剂的分子印迹固相萃取方法研究

熊力<sup>1</sup>, 王金成<sup>2\*</sup>

(1. 大连工业大学, 辽宁 大连 116034; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**以 *N*-(4-异丙基苯基)-*N'*-亚丁基脲分子印迹聚合物为吸附剂,建立了饮用水中苯基脲除草剂的分子印迹固相萃取方法。上样后固相萃取柱依次用 2.5 mL 0.1 mol/L 盐酸和 2.5 mL 去离子水淋洗,然后氮气吹干,再用 1 mL 含 8% 乙腈的甲苯溶液淋洗,最后用 2 mL 甲醇洗脱。将建立的方法用于自来水中异丙隆、非草隆、甲氧隆、绿麦隆、枯莠隆、灭草隆、伏草隆、草不隆等 8 种苯基脲类除草剂的测定,除伏草隆和草不隆的回收率较低外,其余 6 种除草剂的回收率均 >60%。

**关键词:** 苯基脲除草剂; 分子印迹固相萃取; 饮用水

中图分类号: O652.6

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2012)05-0044-05

## Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction for Phenylurea Herbicides Determination in Drinking Water

XIONG Li<sup>1</sup>, WANG Jin-cheng<sup>2\*</sup>

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

**Abstract:** Molecular imprinting solid-phase extraction (MISPE) was developed for phenylurea herbicides in drinking water by using *N*-(4-isopropylphenyl)-*N'*-butyleneurea molecularly imprinted polymer as sorbent. Loaded the tap water, the MISPE cartridge was orderly washed by 2.5 mL 0.1 mol/L HCl and 2.5 mL deionized water. The MISPE cartridge was dried by nitrogen, and then washed by 1 mL 8% acetonitrile in toluene, and finally eluted by 2 mL methanol. The method was used to determinate isoproturon, fenuron, metoxuron, chlortoluron, difenoxuron, monuron, fluometuron and neburon in tap water. Test results of recoveries for those herbicides were more than 60% except for the fluometuron and neburon.

**Key words:** Phenylurea herbicides; Molecularly imprinted solid-phase extraction; Drinking water

分子印迹(Molecular imprinting)是近年来发展起来的对目标化合物具有特定识别能力的一种聚合物制备技术。分子印迹聚合物(MIP)具有性质稳定、制备简单、成本低等优点,在色谱分离<sup>[1-3]</sup>、传感器<sup>[4-5]</sup>、模拟酶催化<sup>[6]</sup>、膜分离<sup>[7]</sup>、免疫分析<sup>[8]</sup>等众多领域得到了广泛应用。固相萃取(SPE)是上个世纪70年代发展起来的样品前处理技术,具有省时、省力及有机溶剂用量少等优点,目前已经广泛用于环境水样的前处理<sup>[9-10]</sup>。1994年, Sellergren<sup>[11]</sup>首次将MIP用于SPE后,分子印迹固相萃取(MISPE)成为了研究热点。通常以目标化合物自身为模板制备MIP,但残留在聚合物中的

模板在MISPE过程中会泄漏出来,从而影响结果的准确度。而用目标化合物的结构类似物为模板制备MIP则可解决这一问题,因为在随后的色谱分析中可将泄漏的模板分子与目标化合物分离<sup>[12-13]</sup>。

苯基脲类除草剂是一类结构相似、在农业中广泛使用的芽前和芽后除草剂,由于降解速度较慢,因而常存在于地表水和地下水中。研究结果表明,此

收稿日期: 2011-07-04; 修订日期: 2012-08-03

作者简介: 熊力(1963—)女,湖南零陵人,副教授,本科,主要从事分离材料的制备及应用研究。

\* 通讯作者: 王金成 E-mail: wangjincheng@dicp.ac.cn

类除草剂对人类有不同程度的毒性<sup>[14]</sup>,有的甚至有致癌作用<sup>[15]</sup>。欧盟对饮用水中的农药残留明确规定,单一化合物不得高于0.1 μg/L,化合物总量不得高于0.5 μg/L<sup>[16]</sup>。因此,检测饮用水中的苯脲类除草剂具有重要意义。由于仪器灵敏度的限制,水样分析前通常需要前处理。目前用于水中苯脲类除草剂残留测定的前处理方法有液液萃取<sup>[17]</sup>、SPE<sup>[16,18-19]</sup>、免疫亲和萃取<sup>[20-21]</sup>等。液液萃取不仅费时费力,而且消耗大量有机溶剂,污染环境;SPE虽然具有环境友好、操作简便、易于自动化等优点,但传统的SPE填料选择性较差,富集目标化合物的同时也会萃取干扰成分,对定量分析造成干扰;免疫亲和吸附材料虽然选择性好,但制备复杂,成本高,而且抗恶劣环境能力差,容易失活。作者曾以苯脲类除草剂的结构类似物 *N*-(4-异丙基苯基)-*N'*-亚丁基脲为模板,甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,制备了对苯基脲除草剂具有类选择性的MIP<sup>[22-23]</sup>。今以制备的MIP为富集分离材料,建立了一种适用于饮用水中8种苯基脲除草剂残留分析的固相萃取方法。

## 1 试验

### 1.1 主要仪器与试剂

Waters 2695型(Alliance系统,996PDA)高效液相色谱仪,美国Waters公司。

异丙隆(IP)、非草隆(FN)、甲氧隆(MX)、绿麦隆(CT)、枯莠隆(DF)、灭草隆(MN)、草不隆(NB)、伏草隆(FU)(纯度>98%),百灵威化学试剂有限公司;200 mg/L 8种苯基脲除草剂标准储备液,用乙腈配制,于4℃条件下储存备用;甲基丙烯酸、乙二醇二甲基丙烯酸酯(分析纯),使用前减压蒸馏以除去阻聚剂,ACROS公司;偶氮二异丁腈(分析纯),沈阳东陵精细化工有限公司;*N*-(4-异丙基苯基)-*N'*-亚丁基脲为自合成<sup>[22]</sup>;乙腈、甲醇、二氯甲烷(色谱纯),甲苯(分析纯),天津科密欧化学试剂开发中心。

### 1.2 色谱条件

Hypersil ODS2分析柱(250 mm×4.6 mm×5 μm);流动相为乙腈-水,梯度条件为:20%乙腈(15 min)→50%乙腈(45 min)→80%乙腈(5 min)→20%乙腈;流量1 mL/min;检测波长240 nm。

### 1.3 MIP的制备

准确称取1 mmol *N*-(4-异丙基苯基)-*N'*-亚丁基脲于15 mL试管中,依次加入5.6 mL甲苯、8 mmol甲基丙烯酸、20 mmol乙二醇二甲基丙烯酸酯和40 mg偶氮二异丁腈,超声15 min,使模板和偶氮二异丁腈溶解,在冰水浴中通氮气10 min,塞上胶塞,于60℃水浴聚合24 h。将得到的棒状聚合物固体研磨、过筛,收集38 μm~65 μm的微粒,用丙酮沉降3次,每次30 min。弃去上清液,沉淀放置于空气中至半干状态,然后于60℃真空干燥过夜。将得到的干燥的聚合物颗粒干法装入100 mm×5 mm HPLC柱中(约0.7 g),依次用300 mL乙酸-甲醇(体积比1:9)、300 mL甲醇在线冲洗(流量0.4 mL/min),然后取出干燥,用于SPE。非印迹聚合物(NIP)在无模板存在下用同样的方法制备。

### 1.4 SPE方法

将200 mg按1.3方法制备并处理过的干燥的MIP和NIP粒子装于SPE小柱(内径0.5 cm、长7 cm)中,柱的中底部和上部塞上玻璃筛板。萃取在自制的SPE装置上进行,上样前萃取柱依次用5 mL甲醇、5 mL水活化,上样量为1 mL 0.2 mg/L异丙隆水溶液,上样后萃取柱用空气吹扫30 min,然后淋洗、洗脱。淋洗液和洗脱液氮气吹干后用20%乙腈水溶液定容至1 mL,在1.2色谱条件下测定。

### 1.5 实际水样回收率的测定

用自来水(经0.45 μm滤膜过滤)配制含8种苯基脲除草剂(0.100 μg/L)的模拟样品500 mL,以5 mL/min的流量上样。上样后萃取柱依次用2.5 mL 0.1 mol/L盐酸、2.5 mL去离子水淋洗,之后用空气吹扫30 min,然后分别用1 mL含8%乙腈的甲苯溶液和2 mL甲醇淋洗和洗脱。洗脱液氮气吹干后用20%乙腈水溶液定容至1 mL,在1.2色谱条件下测定。

### 1.6 标准曲线绘制

吸取不同体积8种苯基脲除草剂标准储备液于100 mL容量瓶中,用乙腈-水(体积比20:80)配制成0.010 mg/L、0.040 mg/L、0.100 mg/L、0.400 mg/L、2.00 mg/L、8.00 mg/L标准溶液系列,在1.2色谱条件下测定,以峰面积对应质量浓度绘制标准曲线,回归方程和相关系数见表1。

表1 8种苯基脲除草剂的标准曲线

Table 1 Standard curves of 8 phenylurea herbicides

除草剂	回归方程	相关系数 $R^2$
灭草隆	$A = 1.00 \times 10^6 \rho - 4.93 \times 10^3$	0.999 9
异丙隆	$A = 1.00 \times 10^6 \rho - 4.89 \times 10^3$	0.999 8
绿麦隆	$A = 9.53 \times 10^5 \rho - 409$	0.999 9
枯莠隆	$A = 8.40 \times 10^5 \rho - 3.59 \times 10^3$	0.999 9
伏草隆	$A = 9.24 \times 10^5 \rho - 3.42 \times 10^3$	1
草不隆	$A = 6.45 \times 10^5 \rho - 5.40 \times 10^3$	0.999 9
甲氧隆	$A = 8.61 \times 10^5 \rho - 4.45 \times 10^3$	0.999 9
非草隆	$A = 1.14 \times 10^5 \rho - 12.5$	0.999 9

## 2 结果与讨论

### 2.1 淋洗与洗脱溶剂的优化

MIP 对目标化合物的保留是多种吸附综合作用的结果。在非共价分子印迹方法中,为了形成稳定的单体-模板复合物,常常需加入过量的功能单体,其结果是除了在 MIP 的识别位点有功能单体的功能基团外,功能基还随意地分布在聚合物的其他部位,使 MIP 的非特异性吸附作用增大。也就是说,目标化合物的保留既有印迹空穴对目标化合物的特异性相互作用(印迹空穴对目标化合物的识别作用)的贡献,也有聚合物中随意分布的功能基团与目标化合物产生的非特异性相互作用的贡献。为了尽可能地消除干扰成分,使目标化合物得到选择性的富集分离,以便最后得到分离良好的色谱图,在进行 MISPE 时,选择的淋洗溶剂应尽可能地消除非特异性相互作用,而最大限度地保留特异性相互作用。

为选择合适的淋洗溶剂,分别考察了异丙隆上样后,用 1 mL 甲苯、二氯甲烷、乙腈和甲醇淋洗后的回收率,结果见图 1。由图 1 可见,用甲苯淋洗时,无论是印迹柱还是非印迹柱,异丙隆都不能被洗脱,说明甲苯无法消除非特异性吸附;用甲醇淋洗时,由于其极性很强,可以除去 90% 以上的非特异性相互作用,但同时印迹柱也失去了识别作用,导致 90% 以上的异丙隆被洗脱;用二氯甲烷和乙腈淋洗时,印迹柱表现出微弱的识别作用。

为了最大限度地保留印迹柱的特异性识别作用,同时尽可能地减弱其非特异性吸附作用,用 1 mL 甲苯-乙腈混合流动相进行了淋洗研究,结果见图 2。由图 2 可见,随着乙腈体积分数增加,异丙隆在非印迹柱上的保留明显减弱;当乙腈体积分数为 8% 时,75% 的异丙隆被洗脱,而印迹柱中的异丙隆仅损失 5%,说明 1 mL 含 8% 乙腈的甲苯

溶液是理想的淋洗溶剂。

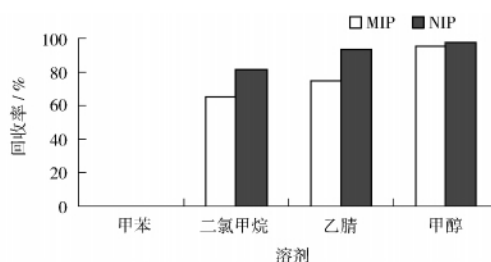


图1 不同淋洗溶剂对异丙隆回收率的影响

Fig. 1 Effect of different wash solvents on recoveries of isoproturon

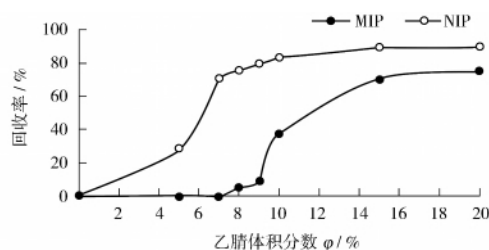


图2 甲苯-乙腈混合淋洗溶剂对异丙隆回收率的影响

Fig. 2 Effect of acetonitrile amounts in toluene on recoveries of isoproturon

在 MISPE 过程中,当目标化合物被选择性地保留后,需用少量极性溶剂将其洗脱下来。由图 1 可见,1 mL 甲醇可以洗脱 90% 以上的异丙隆,说明甲醇是理想的洗脱溶剂。

根据以上研究结果,该试验分别选择 1 mL 含 8% 乙腈的甲苯溶液和 2 mL 甲醇为淋洗和洗脱溶剂。

### 2.2 上样体积对回收率的影响

在上述优化的淋洗和洗脱条件下,考察了不同体积含 0.2 μg 异丙隆的水样上样对回收率的影响,结果见图 3。由图 3 可见,随着上样体积增大,异丙隆的回收率有所下降,但在上样 500 mL 时回收率仍达 80%。

### 2.3 基质干扰及消除

该试验优化过程均采用去离子水为基质,然而实际水样的成分要复杂得多,常常会对 MISPE 的回收率产生影响。纯水上样和自来水上样后异丙隆回收率的比较见图 4。由图 4 可见,自来水上样后回收率显著下降,这是因为自来水中存在大量  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  等,这些离子与印迹聚合物中识别位点

的功能基团羧基进行离子交换后,使羧基形成氢键的能力减弱,从而导致印迹柱对目标化合物的选择性富集能力下降,回收率降低<sup>[24]</sup>。

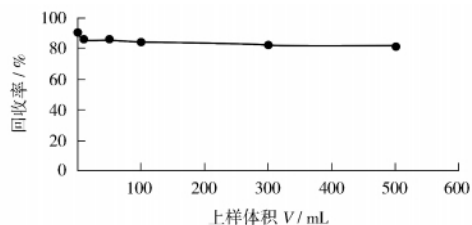


图3 上样体积对异丙隆回收率的影响

Fig. 3 Effect of sampling volume on recoveries of isoproturon

为了消除基质带来的干扰,印迹柱自来水上样后依次用 2.5 mL 0.1 mol/L 盐酸和 2.5 mL 去离子水淋洗,结果见图 4。由图 4 可见,异丙隆的回收率显著提高,也验证了基质干扰主要由  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等造成。

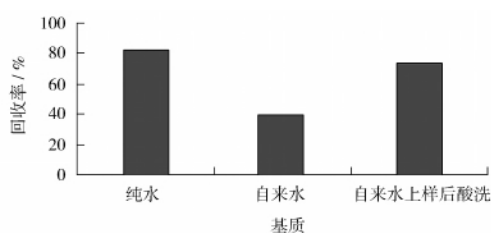


图4 基质对异丙隆回收率的影响

Fig. 4 Effect of matrix on recoveries of isoproturon

#### 2.4 自来水样品回收率的测定

用上述优化的 MISPE 方法对添加了 8 种苯基脲除草剂的自来水样进行测定,结果见表 2。由表 2 可见,除伏草隆和草不隆的回收率较低外,其余 6 种苯基脲除草剂的回收率都 >60%。该结论与印迹聚合物的色谱评价结果<sup>[22]</sup>相一致,伏草隆和草不隆因分子中含较大基团,与模板分子相差较大,减弱了其印迹聚合物中特异性识别位点的匹配性,使印迹聚合物对其亲和性和选择性减弱,从而导致回收率较低。

表 2 自来水样品回收率的测定结果( $n=3$ )

Table 2 Test results of recoveries for tap water samples ( $n=3$ )

除草剂	加标量 $\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 / %	RSD / %	除草剂	加标量 $\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 / %	RSD / %
非草隆	0.050	104	4.5	枯莠隆	0.050	102	2.4
	0.500	104	4.0		0.500	99.6	1.9
	5.00	100	3.3		5.00	100	2.3
甲氧隆	0.050	99.0	4.5	绿麦隆	0.050	65.0	4.3
	0.500	93.0	4.9		0.500	62.5	3.3
	5.00	98.5	2.6		5.00	60.2	4.5
灭草隆	0.050	104	3.4	伏草隆	0.050	<40	
	0.500	101	2.5		0.500	<40	
	5.00	98.3	2.2		5.00	<40	
异丙隆	0.050	98.6	2.6	草不隆	0.050	<20	
	0.500	94.3	1.3		0.500	<20	
	5.00	98.0	1.8		5.00	<20	

### 3 结语

以  $N-(4-异丙基苯基)-N'-亚丁基脲$  分子印迹聚合物为吸附剂,建立了饮用水中苯基脲除草剂的分子印迹固相萃取方法。优化结果表明,含 8% 乙腈的甲苯溶液可以消除 75% 的非特异性吸附,是理想的淋洗溶剂,甲醇是理想的洗脱溶剂。自来水中的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等会削弱印迹聚合物的特异性吸附作用,上样后依次用 2.5 mL 0.1 mol/L 盐酸和 2.5 mL 去离子水淋洗,可消除基质干扰。

将建立的方法用于自来水中异丙隆、非草隆、甲氧隆、绿麦隆、枯莠隆、灭草隆、伏草隆、草不隆等 8 种苯基脲类除草剂(单一质量浓度为 0.100  $\mu\text{g}/\text{L}$ )的测定,除伏草隆和草不隆的回收率较低外,其余 6 种除草剂的回收率均 >60%,可以满足欧盟对饮用水中农药残留的检测要求。该试验均在同一分子印迹固相萃取柱中完成,前后共经历 50 余次使用,所制备的萃取柱对目标化合物的亲和性和选择性没有发生变化。

## [参考文献]

- [1] KEMPE M, MOSBACH K. Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases [J]. *J. Chromatogr A*, 1995(691): 317–323.
- [2] KEMPE M. Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC [J]. *Anal Chem*, 1996, 68: 1948–1953.
- [3] LAI J P, LU X Y, LU C Y, et al. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymeric microspheres by aqueous suspension polymerization for use as a high-performance liquid chromatography stationary phase [J]. *Anal Chim Acta*, 2001(442): 105–111.
- [4] SERGEYEVA T A, PILETSKY S A, BROVKO A A, et al. Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection [J]. *Anal Chim Acta*, 1999(392): 105–111.
- [5] KRIZ D, RAMSTROM O, SVENSSON A, et al. A biomimetic sensor based on a molecularly imprinted polymer as a recognition element combined with fiber-optic detection [J]. *Anal Chem*, 1995, 67: 2142–2144.
- [6] OHKUBO K, SAWAKUMA K, SAGAWA T. Influence of cross-linking monomer and hydrophobic styrene comonomer on stereoselective esterase activities of polymer catalyst imprinted with a transition-state analogue for hydrolysis of amino acid esters [J]. *Polymer*, 2001, 42: 2263–2266.
- [7] 卢春阳, 马向霞, 何锡文, 等. 药物氟哌酸分子印迹聚合物膜的制备及其渗透性质研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2005, 26(7): 1356–1359.
- [8] LAVIGNAC N, ALLENDER C J, BRAIN K R. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays [J]. *Anal Chim Acta*, 2004(510): 139–145.
- [9] 张丽, 李楠, 万延延. 固相萃取-高效液相色谱法测定饮用水中酚类化合物 [J]. *环境监测管理与技术*, 2010, 22(1): 49–51.
- [10] 叶凤娇, 孔德洋, 单正军, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中12种磺酰脲类除草剂 [J]. *环境监测管理与技术*, 2011, 23(2): 36–40.
- [11] SELLERGRÉN B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer [J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 1578–1582.
- [12] JODLBAUER J, MAIER N M, LINDNER W. Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction [J]. *J. Chromatogr A*, 2002(945): 45–63.
- [13] MATSUI J, FUJIWARA K, UGATA S, et al. Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent [J]. *J. Chromatogr A*, 2000(889): 25–31.
- [14] LEWIS R J. Sax's dangerous properties of industrial materials [M]. 8th ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.
- [15] RAGSDALE N N, MENZER R E. Carcinogenicity and pesticides: principles, issues and relationships [M]. Washington DC: American Chemical Society, 1989.
- [16] GERECKE A C, TIXIER C, BARTELS T, et al. Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1 ng/L using solid-phase extraction, derivatization and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr A*, 2001(930): 9–19.
- [17] MOLINA C, DURAND G, BARCEL D. Trace determination of herbicides in estuarine waters by liquid chromatography-high-flow pneumatically assisted electrospray mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr A*, 1995(712): 113–122.
- [18] BASSETT M V, WENDELKEN S C, DATTILIO T A, et al. The application of tris buffer and copper sulfate for the preservation of phenylurea pesticides analyzed using U. S. EPA Method 532 in the UCMR Survey [J]. *Environ. Sci. Technol*, 2002, 36: 1809–1814.
- [19] ASPERGER A, EFER J, KOAL T, et al. Determination of nitrotriacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in environmental samples as their methyl ester derivatives by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr A*, 2002(960): 109–119.
- [20] LAWRENCE J F, MENARD C, HENNION M-C, et al. Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant material [J]. *J. Chromatogr A*, 1996(732): 277–281.
- [21] FERRER I, HENNION M-C, BARCELO D. Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry for the part per trillion level determination of pesticides in sediments and natural waters using low preconcentration volumes [J]. *Anal Chem*, 1997, 69: 4508–4514.
- [22] WANG J C, GUO R B, CHEN J P, et al. Phenylurea herbicide-selective polymer prepared by molecular imprinting using *N*-(4-isopropylphenyl)-*N'*-butyleneurea as dummy template [J]. *Anal Chim Acta*, 2005(540): 307–315.
- [23] 王金成, 徐青, 薛兴亚, 等. 苯基脲类除草剂分子印迹聚合物的合成和识别性能研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27(7): 1227–1231.
- [24] CHAPUIS F, PICHON V, LANZA F, et al. Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism [J]. *J. Chromatogr A*, 2003(999): 23–33.