

# 二元小分子醇/盐双水相体系萃取 三唑类杀菌剂

吴格格<sup>1</sup>,高仕谦<sup>1,2</sup>,张占恩<sup>1,2,3\*</sup>

- (1.苏州科技大学环境科学与工程学院,江苏 苏州 215000;  
2.苏州科技大学江苏省环境科学与工程重点实验室,江苏 苏州 215000;  
3.苏州科技大学水处理技术与材料协同创新中心,江苏 苏州 215000)

**摘要:**应用二元小分子醇-盐双水相微萃取(ATPS)技术,建立水体中6种三唑类杀菌剂的高效液相色谱(HPLC)分析方法,观察了二元小分子醇体积比、盐的种类和浓度、萃取时间、样品溶液pH和萃取温度对萃取效率的影响,6种三唑类杀菌剂的相关系数( $R$ )在0.9993~0.9999;检出限为1.67~2.96  $\mu\text{g}/\text{L}$ ( $S/N=3$ )。将该方法应用于苏州地区的河水、自来水和稻田水实际水样的分析,得到加标回收率范围在81.9%~106.9%,相对标准偏差为1.7%~8.1%。本方法具有简单快速的操作和低检出限,可满足环境水样中痕量三唑类杀菌剂残留的分析。

**关键词:**二元小分子醇-盐双水相微萃取;高效液相色谱法;三唑类杀菌剂;环境水样

中图分类号:O657.72;S482.2

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)02-0231-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.02.049

## Extraction of triazole fungicides by binary small molecule alcohol/salt dual-aqueous phase system

WU Ge-ge<sup>1</sup>, GAO Shi-qian<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhan-en<sup>1,2,3\*</sup>

- (1.School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215000, China; 2.Jiangsu Provincial Key Laboratory of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215000, China; 3.Collaborative Innovation Center of Water Treatment Technology and Material, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215000, China)

**Abstract:** Binary small molecule alcohol/salt dual-aqueous phase micro-extraction technique is used to establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis method for six kinds of triazole fungicides in water. Various experimental parameters including volume ratio of binary small molecule alcohols, the types and concentration of salts, extraction time, pH value of the sample solution and extraction temperature are optimized to improve the extraction efficiency. The correlation coefficients ( $r$ ) are in the range of 0.9993~0.9999 and the detection limits are in the range of 1.67~2.96  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $S/N=3$ ) for six triazole fungicides. As the method is applied to the analysis of actual water samples such as river water, tap water and paddy field water in Suzhou region, the spiked recoveries are in the range of 81.9%~106.9%, and the relative standard deviations (RSDs) are in the range of 1.7%~8.1%. Due to its simple and fast operation as well as low detection limit, the method can be used for the analysis of trace triazole fungicide residues in environmental water samples.

**Key words:** binary small molecule alcohol-salt dual-aqueous phase micro-extraction; HPLC; triazole fungicides; environmental water samples

杀菌剂除内源性杀菌活性外,一些杀菌剂还具有调节植物生长的功能<sup>[1]</sup>。由于三唑类杀菌剂具有广谱、高效、低毒、长期残留等特点<sup>[2]</sup>,正逐渐成为新型农药研究开发的热点。目前,三唑类杀菌剂的检测方法有气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[4]</sup>和高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[5]</sup>等。前处理方法有液相微萃取(LPME)<sup>[3]</sup>和固相微萃取(SPME)<sup>[4]</sup>等。但这些方法成本高、使用有毒有机溶剂,影响实验人员健康。

双水相体系(ATPS)是由于萃取剂的浓度高于临界胶束浓度时形成的互不相溶的两相体系,包括聚合物-聚合物<sup>[6]</sup>、聚合物-盐<sup>[7]</sup>、离子液体-盐<sup>[8]</sup>和小分子有机溶剂-盐<sup>[9]</sup>双水相体系,具有操作条件温和、回收率较高等优点,已广泛用于药物、蛋白质和抗生素<sup>[10]</sup>的分离富集。采用正丙醇/异丙醇-( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>二元双水相体系可以降低小分子醇的挥发性,并且通过调节二元体系极性使体系与杀菌剂极性更加相近,使其达到很好的相溶性,更容易分

收稿日期:2019-04-17;修回日期:2019-12-03

作者简介:吴格格(1992-),女,硕士生;张占恩(1963-),男,博士,教授,研究方向为污染物分析与监测,通讯联系人,zhanenzhang@126.com。

离萃取环境水样中的三唑类杀菌剂。

## 1 实验

### 1.1 仪器和试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪, 配有 Shim-pack GIST C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm, 日本 Shimadzu 公司); DC-12 型氮吹仪 (上海安普实验技术有限公司); 800 型离心沉淀器 (上海精科实业有限公司); PHS-3S 台式酸度计 (上海仪电科学仪器有限公司)。

腈菌唑 (Myclobutanil)、氟环唑 (Epoconazole)、戊唑醇 (Tebuconazole)、戊菌唑 (Penconazole)、丙环唑 (Propiconazole)、苯醚甲环唑 (Difenoconazole) 6 种三唑类杀菌剂标准品 (质量分数均在 98% 以上, 上海 Aladdin 公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 氢氧化钠、盐酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无机盐 (分析纯, 北京国药集团有限公司); 正丙醇、异丙醇、无水乙醇 (分析纯, 北京国药集团有限公司)。

### 1.2 样品制备

准确称取适量各标准品于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇 (色谱级) 溶解并定容, 配制成 500 mg/L 的单标储备液, 于 4℃ 冰箱中冷藏, 使用前用甲醇稀释成 20 mg/L 的混合工作标准溶液。

### 1.3 高效液相色谱条件

流动相由乙腈 (A) 和超纯水 (B) 组成。梯度洗脱条件为: 0~5 min, 40%~55% A; 5~15 min, 55%~70% A; 15~20 min, 70%~40% A。流动相流速 1.5 mL/min, 柱温 35℃, 进样量 10 μL, 检测波长 225 nm。

### 1.4 双水相萃取步骤

取 5 mL 含有一定浓度目标物水样于 10 mL 离心管中, 加入 3.20 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 震荡溶解。用移液枪迅速将 100 μL 正丙醇和 200 μL 异丙醇注入样品溶液中, 超声萃取 15 min 后并在 4 000 r/min 的转速下离心 5 min 后, 双水相形成。收集上层有机相 50 μL 于 1.5 mL 离心管中氮吹干, 加 100 μL 40% 的乙腈溶液复溶后经过 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 进入 HPLC 进行测定。

## 2 结果与讨论

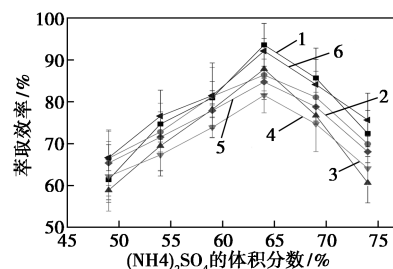
### 2.1 体系物质体积比的选择

研究正丙醇/异丙醇:硫酸铵形成的二元双水相体系, 考察了不同体积比的正丙醇和异丙醇 (正丙

醇:异丙醇分别为 0.04:0.02、0.02:0.04、0.04:0.04、0.04:0.08、0.08:0.04) 对萃取效率的影响。结果显示, 正丙醇和异丙醇的体积比为 0.02:0.04 时, 6 种三唑类杀菌剂在该体系中的萃取率最高。因此选取正丙醇和异丙醇的体积比为 0.02:0.04 进行后续实验。

### 2.2 盐的种类和浓度对萃取效率的影响

小分子醇和盐溶液混合后, 两者互不相溶, 且混合溶液具有较低的黏性, 从而两相可以迅速分开, 并且缩短了分相的时间。因此, 对目标物进行萃取分离时, 还需考虑小分子醇和盐的分相能力以及它们的稳定性。研究了 NaCl、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等分相盐, 当正丙醇和异丙醇以一定的体积比加入时, 各分相盐与正丙醇/异丙醇均能形成稳定的二元双水相体系。结果显示, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为分相盐加入该体系后, 6 种三唑类杀菌剂的萃取效率最高。图 1 考察了不同体积分数的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 对三唑类杀菌剂萃取率的影响, 当 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的体积分数为 64% 时, 目标分析物的回收率达到最大值, 因此选择 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的体积分数为 64%。

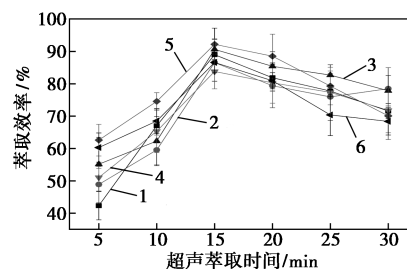


1—腈菌唑; 2—氟环唑; 3—戊唑醇; 4—戊菌唑; 5—丙环唑;  
6—苯醚甲环唑

图 1 硫酸铵的体积分数对萃取效率的影响

### 2.3 超声萃取时间对萃取效率的影响

在水相和有机相间, 目标分析物能够达到一种动态的分配平衡所需要的时间被称为萃取时间。实验考察的萃取时间分别为 5、10、15、20、25、30 min, 结果如图 2 所示, 当萃取时间为 15 min 时, 6 种三唑



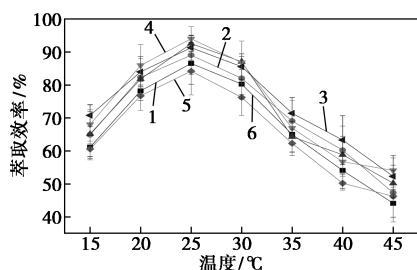
1—腈菌唑; 2—氟环唑; 3—戊唑醇; 4—戊菌唑; 5—丙环唑;  
6—苯醚甲环唑

图 2 超声萃取时间对萃取效率的影响

类杀菌剂的回收率达到最大值,萃取基本平衡,萃取效果最好。因此选择 15 min 为萃取平衡时间。

#### 2.4 样品溶液 pH 对萃取效率的影响

样品溶液的 pH 会影响体系的成相行为,也会影响目标物质分配行为及在样本溶液中的存在状态。对 pH 在 4.0~10.0 范围内的萃取效率进行优化。结果由图 3 可知,当样品溶液 pH 在 6.0~8.0 时,各物质的萃取效率最高。这可能是因为强酸强碱溶液中,三唑类杀菌剂容易水解而导致待测物响应信号降低,而在中性条件下较为稳定<sup>[11]</sup>。本实验所用水样均为中性溶液,无需调整 pH。



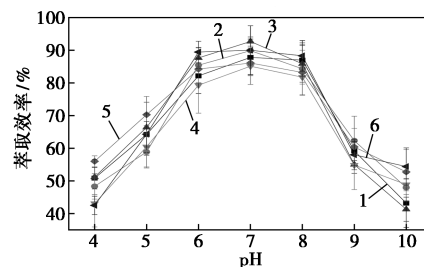
1—腈菌唑;2—氟环唑;3—戊唑醇;4—戊菌唑;5—丙环唑;  
6—苯醚甲环唑

图 3 样品溶液 pH 对萃取效率的影响

#### 2.5 温度对萃取效率的影响

温度不仅影响双水相体系的成相效果,而且影响三唑类杀菌剂的萃取结果。由于小分子醇的沸点较低,温度过高会促使小分子醇蒸发影响双水相体系的稳定性。本实验考察了萃取温度为 15、20、25、

30、35、40、45℃时的萃取效果,由图 4 可知,在 15~25℃,6 种三唑类杀菌剂的萃取率都逐渐增加,在 25℃时,6 种三唑类杀菌剂的萃取率均达到最大值。故选取 25℃作为最佳萃取温度。



1—腈菌唑;2—氟环唑;3—戊唑醇;4—戊菌唑;5—丙环唑;  
6—苯醚甲环唑

图 4 温度对萃取效率的影响

#### 2.6 试验方法工作曲线、线性范围、检出限

在上述最佳萃取条件下,制备了一系列不同浓度的标准溶液,并进行了测定,结果如表 1 所示。腈菌唑和戊菌唑在 20~2 000  $\mu\text{g/L}$  范围内,另外 4 种三唑类杀菌剂在 30~2 000  $\mu\text{g/L}$  范围内,均具有良好的线性关系,相关系数 ( $R$ ) 为 0.999 3~0.999 9,检出限为 1.67~2.96  $\mu\text{g/L}$ ,定量限为 5.58~9.88  $\mu\text{g/L}$ 。通过测定日内和日间相对标准偏差来检验方法的精确度。选取加标浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的加标水样平行测定 5 次,得到的日内  $RSD$  值为 2.8%~6.2%,日间  $RSD$  值为 5.4%~8.9%。实验结果表明,该方法具有较好的准确性和可行性。

表 1 6 种三唑类杀菌剂的线性范围、相关系数、检出限、定量限和相对标准偏差

( $n=5$ )

分析物	线性范围/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	校准方程式	相关系数 ( $R$ )	检出限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	定量限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$RSD/\%$	
						日内	日间
腈菌唑	20~2000	$y=170.64x+4120.4$	0.9996	1.67	5.58	2.8	5.6
氟环唑	30~2000	$y=180.86x+4701.2$	0.9993	2.06	6.88	4.6	6.2
戊唑醇	30~2000	$y=224.62x+967.96$	0.9997	2.35	7.83	3.6	7.7
戊菌唑	20~2000	$y=290.32x+5570.4$	0.9994	1.85	6.18	6.2	5.4
丙环唑	30~2000	$y=74.459x+194.03$	0.9997	2.54	8.45	5.3	8.9
苯醚甲环唑	30~2000	$y=331.49x+7863.6$	0.9999	2.96	9.88	3.4	7.8

#### 2.7 实际水样测定

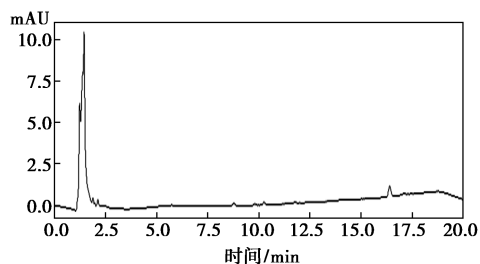
采集苏州地区的湖水、自来水和稻田水 3 个实际环境水样,经 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后,按上述方法在实际水样中添加 50.0、100.0、500.0  $\mu\text{g/L}$  3 个浓度水平的加标回收实验,每个浓度平行测 5 次,各

自的回收率和相对标准偏差见表 2。结果显示,6 种三唑类杀菌剂的回收率为 81.9%~106.9%, $RSD$  为 1.7%~8.1%。该方法具有良好的精密度和重现性,能满足实际水样的测定。图 5 列出了环境水样中空白和加标(5  $\mu\text{g/mL}$ )6 种三唑类杀菌剂的 HPLC 色谱图。

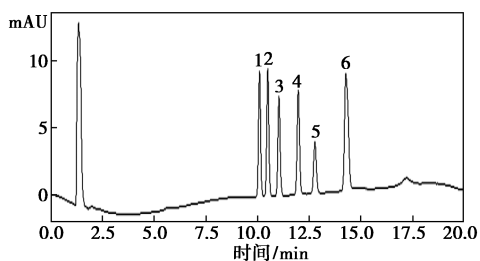
表 2 河水、自来水和稻田水中三唑类杀菌剂的回收率

(n=5)

三唑类 杀菌剂	加标浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	湖水			自来水			稻田水		
		检出值/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收率/ %	RSD/ %	检出值/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收率/ %	RSD/ %	检出值/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收率/ %	RSD/ %
腈菌唑	50	40.95	81.9	6.2	44.60	89.2	2.4	43.60	87.2	4.8
	100	86.50	86.5	4.1	93.30	93.3	5.4	91.10	91.1	6.3
	500	473.00	94.6	5.3	499.50	99.9	6.8	467.50	93.5	2.3
氟环唑	50	46.25	92.5	2.2	46.85	97.3	2.6	47.05	94.1	1.8
	100	88.40	88.4	3.6	90.40	90.4	5.4	92.40	92.4	3.6
	500	478.10	96.2	7.2	449.00	89.8	6.7	467.00	93.4	4.5
戊唑醇	50	47.65	95.3	3.7	50.35	100.7	5.8	46.30	92.6	7.2
	100	94.30	94.3	6.1	99.00	99.0	3.5	97.60	97.6	2.8
	500	454.00	90.8	2.9	473.50	94.7	2.3	522.50	104.5	6.1
戊菌唑	50	44.70	89.4	6.6	45.15	90.3	5.9	44.45	88.9	3.7
	100	93.70	93.7	3.1	84.90	84.9	4.9	82.80	82.8	5.7
	500	477.00	95.4	8.1	474.00	94.8	5.5	454.00	90.8	1.9
丙环唑	50	42.35	84.7	7.3	46.05	92.1	6.8	48.25	96.5	7.8
	100	88.80	88.8	1.7	97.70	97.7	2.7	100.10	100.1	4.1
	500	463.50	92.7	4.6	534.50	106.9	5.8	453.50	90.7	3.8
苯醚甲环唑	50	50.75	101.5	6.2	48.30	96.6	4.5	489.00	97.8	2.1
	100	95.70	95.7	2.6	103.40	103.4	3.6	97.20	97.2	3.3
	500	448.50	89.7	5.5	474.50	94.9	7.2	461.00	92.2	4.2



(a) 空白



1—腈菌唑; 2—氟环唑; 3—戊唑醇; 4—戊菌唑; 5—丙环唑;  
6—苯醚甲环唑

(b) 加标(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

图 5 空白和加标(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 环境水样的色谱图

### 2.8 与其他同类方法的比较

将该方法与文献中测定三唑类杀菌剂含量的方

法在检出限和萃取时间等方面做了比较。从表 3 可以看出,本方法操作简单,萃取时间较短,且检出限低于其他方法。

表 3 本方法与其他前处理技术对三唑类  
杀菌剂萃取的比较

前处理方法	检测方法	样品	检出限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	萃取时间/ min
HF-LPME <sup>①</sup> [3]	GC-MS	水样	0.36~10.8	20
SPME <sup>②</sup> [4]	HPLC-DAD	红酒	4~27	30
CPE <sup>③</sup> [12]	HPLC-UV	水样	0.007~0.035	10
IL-DLLME <sup>④</sup> [13]	HPLC-DAD	水样	2~6	<1
ATPS(本方法)	HPLC-UV	水样	1.67~2.96	15

注:①离子液体分散液-液微萃取;②中空纤维液相微萃取;  
③浊点萃取;④磁性固相萃取。

### 3 结论

通过在小分子醇/盐双水相体系的基础上建立了二元醇/盐双水相体系来分离和富集环境水体中的 6 种三唑类杀菌剂,并结合高效液相色谱法

(HPLC) 进行分析测定。采用正丙醇/异丙醇-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 二元双水相体系萃取环境水样中的三唑类杀菌剂,具有操作简单、成本低、分相快、作用条件温和、萃取效率高等优点。此外,该分析方法线性范围较好、检出限较低、精密度和重现性也较好,可用于实际水样中痕量三唑类杀菌剂残留的检测分析。

### 参考文献

- [1] 葛娜,刘晓茂,李学民,等.气相色谱-质谱法测定蔬菜与水果中 11 种三唑类农药残留[J].分析测试学报,2011,30(12):1351-1355.
- [2] 庄乾坤,郑和辉,卞战强,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定饮用水中 6 种三唑类杀菌剂[J].中国卫生检验杂志,2016,(2):153-155.
- [3] Sarafrazayadi A, Assadi H, Wan A W I. Determination of triazole fungicides using hollow fiber liquid phase microextraction prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2012, 51(7):3101-3107.
- [4] Millán S, Sampedro M C, Unceta N, et al. Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. Journal of Chromatography A, 2003, 995(1/2):135-142.
- [5] Liu C X, Wang B, Xu P, et al. Enantioselective determination of triazole fungicide epoxiconazole bioaccumulation in tubifex based on HPLC-MS/MS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 62(2):360-367.
- [6] Madeira P P, Reis C A, Rodrigues A E, et al. Solvent properties governing protein partitioning in polymer/polymer aqueous two-phase systems [J]. Chromatogr A, 2011, 1018(10):1379-1384.
- [7] Amid M, Manap Y, Zohdi N K. A novel aqueous two phase system composed of a thermo-separating polymer and an organic solvent for purification of thermo-acidic amylase enzyme from red pitaya (Hylocereus polyrhizus) peel [J]. Molecules, 2014, 19(5):6635-6650.
- [8] Antep H M, Mumcu T, Bostanci K, et al. Ultrasound-assisted surfactant/ionic liquid aqueous two-phase system extraction prior to high performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in milk and honey samples [J]. Turk J Chem, 2017, 41:955-966.
- [9] Mei J, Chen H, Wang H, et al. Synthesis of 2-phenylethanol by bio-conversion in aqueous/organic solvent two-phase system [J]. Chinese Journal of Process Engineering, 2011, 11(5):782-785.
- [10] Li C X, Han J, Wang Y, et al. Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real water samples by use of ionic liquidsalt aqueous two-phase system [J]. Anal Chim Acta, 2009, 653:178-183.
- [11] Wang L, Zhang X H, Chang Q Y, et al. A graphene-coated magnetic nanocomposite for the enrichment of fourteen pesticides in tomato and rap samples prior to their determination by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Methods, 2014, 6(1):253-260.
- [12] Tang T, Qian K, Shi T, et al. Determination of triazole fungicides in environmental water samples by high performance liquid chromatography with cloud point extraction using polyethylene glycol 600 monooleate [J]. Anal Chim Acta, 2010, 680(1):26-31.
- [13] 张敏,黄其亮,殷帅,等.基于离子液体的分散液相微萃取-高效液相色谱法测定水中三唑类农药[J].华中农业大学学报,2012,31(3):341-345. ■
- [14] molecular sensors [J]. Chemistry-A European Journal, 2007, 13(26):7543-7552.
- [15] Zhou Z G, Yu M X, Yang H, et al. FRET-based sensor for imaging chromium (III) in living cells [J]. Chemical Communications, 2008, 29(29):3387-3389.
- [16] Liang F C, Luo Y L, Kuo C C, et al. Novel magnet and thermoresponsive chemosensory electrospinning fluorescent nanofibers and their sensing capability for metal ions [J]. Polymers, 2017, 9(4):136.
- [17] Chen B Y, Kuo C C, Huang Y S, et al. Novel highly selective and reversible chemosensors based on dual-ratiometric fluorescent electrospun nanofibers with pH-and Fe<sup>3+</sup>-modulated multicolor fluorescence emission [J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2015, 7(4):2797-2808.
- [18] Wang W, Yang Q B, Sun L, et al. Preparation of fluorescent nanofibrous film as a sensing material and adsorbent for Cu<sup>2+</sup> in aqueous solution via copolymerization and electrospinning [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 194(1/2):185-192. ■
- [19] (上接第 230 页)
- [20] Ma L J, Liu K L, Yin M Z, et al. Fluorescent nanofibrous membrane (FNFM) for the detection of mercuric ion (II) with high sensitivity and selectivity [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 238:120-127.
- [21] Zhang C D, Wan L Y Q, Wu S H, et al. A reversible colorimetric chemosensor for naked-eye detection of copper ions using poly(aspartic acid) nanofibrous hydrogel [J]. Dyes and Pigments, 2015, 123:380-385.
- [22] Wei Z, Zhao H, Zhang J H, et al. Poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibrous membrane modified with spirolactam-rhodamine derivatives for visible detection and removal of metal ions [J]. RSC Advances, 2014, 4(93):51381-51388.
- [23] Nolan E M, Lippard S J. A "turn-on" fluorescent sensor for the selective detection of mercuric ion in aqueous media [J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(47):14270-14271.
- [24] Wang J B, Qian X H, Qian J H, et al. Micelle-induced versatile performance of amphiphilic intramolecular charge-transfer fluorescent