联苯三唑醇磁性分子印迹聚合物的制备及其在食品检测中的应用

田景升，张展展，秦思楠，高文惠*

（河北科技大学生物科学与工程学院，河北 石家庄 050000）[1]

摘要：采用表面印迹技术，以表面接枝硅烷偶联剂 KH570 的 Fe_3O_4@SiO_2 微球为磁性载体，联苯三唑醇为模板分子，建立了制备联苯三唑醇磁性分子印迹聚合物（MMIP）的方法。采用红外光谱、透射电镜、磁响应性能测定等方法对优化条件下制备的聚合物进行了表征；通过静态吸附试验考察了聚合物对模板分子的吸附能力；并以该聚合物作为固相萃取材料，对小米、小麦等样品中的目标物质进行固相萃取，同时使样品得以净化，并采用高效液相色谱法对样品中目标物进行检测。研究结果表明，制备的核-壳结构的联苯三唑醇 MMIP 对联苯三唑醇和其结构类似物具有分子识别能力，所建检测方法的线性关系好（r≥0.9996），检出限为 0.01 μg/mL~0.02 μg/mL，平均回收率在 87.7%~104.3%之间，相对标准偏差（RSDs）≤3.46%（n=5）。该磁性印迹聚合物适用于食品中三唑类农药的快速分离和净化，其检测方法能选择性地快速分析食品中三唑类农药残留量。

关键词：联苯三唑醇；磁性分子印迹技术；分子印迹聚合物；固相萃取；快速分析

Preparation of Bitertanol Magnetic Molecularly Imprinted Polymer and its Application in Food Detection

TIAN Jingsheng, ZHANG Zhanzhan, QIN Sinan, GAO Wenhui*

(College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: A method was developed that the magnetic molecularly imprinted polymer (MMIP) of bitertanol was prepared by surface imprinting technology, and in which Fe_3O_4@SiO_2 grafted with KH570 was used as magnetic carrier, bitertanol as template molecule. The MMIP was characterized utilizing these methods such as infrared spectoscopy, transmission electron microscopy, magnetic measurement, etc. The adsorption properties of the MMIP to bitertanol were evaluated by static adsorption test. The MMIP was used as solid phase extraction (SPE) adsorbent to extract the target compounds in various food samples such as millet, wheat, etc, and to cleanse simultaneously the samples. And the target compounds in the food samples were detected by high performance liquid chromatography. The results indicated that the bitertanol MMIP exhibited molecular recognition ability for bitertanol and its structural analogues; the linear relationship of the method was good with r≥0.9996, the detection limits were 0.01 μg/mL~0.02 μg/mL, the average recoveries were between 87.7% and 104.3%, the relative standard deviations were less than 3.46% (n=5). The bitertanol MMIP was suitable for separation and cleansing of triazole pesticides in foods, the detection method could selectively and fast analyzed triazole pesticide residues in foods.

KeyWords: Bitertanol; magnetic molecular imprinting technology; molecularly imprinted polymer; solid phase extraction; high

---

基金项目：河北省重点研发计划项目（19275505D），石家庄市科学技术研究与发展计划项目（181490372A）

第一作者简介：田景升（1995—）（ORCID: 0000-0002-1923-4662），男，硕士研究生，研究方向为食品安全与检测。E-mail: 911845932@qq.com

*通信作者简介：高文惠（1963—）（ORCID: 0000-0002-7581-1524），女，教授，博士，研究方向为食品安全与质量控制技术。E-mail: wenhuigao@126.com

performance liquid chromatography; rapid analysis

中图分类号：O657.7　　文献标志码：A

DOI：10.7506/spkx1002-6630-20190717-234

联苯三唑醇是一种常见的广谱、高效、低毒、内吸性三唑类杀菌剂[1]，其结构式如图 1 所示。三唑类农药不仅可以通过破坏细胞膜结构，致使膜渗漏加剧，从而铲除病原菌；而且可以缓解植物叶绿素分解、提高内源脱落酸分解以达到治疗植物的目的；更可通过种子内吸进入植株根系，长时间存留在种子区或根围土壤中，进而对植物起保护作用，它主要用于防治果树黑星病、腐烂病、麦叶穿孔病等[2-6]。但是由于施药不合理及超量使用，使三唑类农药在食品中残留甚至超标，进而对人体健康产生危害，造成较为严重的食品安全问题[7]，因此建立相关的检测方法具有重要意义。目前针对三唑类农药的检测方法主要有高效液相色谱法（High performance liquid chromatography, HPLC）[8-10]、气相色谱法[11]、色谱质谱联用技术[12-17]等。近年来，采用分子印迹技术制备联苯三唑醇印迹聚合物对样品进行前处理已有报道[18-20]，但对其磁性分子印迹聚合物的研究尚未见报道。

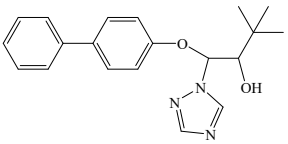


图 1　联苯三唑醇的结构式

Fig. 1　Structure of bitertanol

磁性聚合物微球是近些年来分子印迹技术重点研究的内容之一，磁性聚合物微球可以在外磁场的作用下迅速与溶液分离，不需额外附加离心或者过滤过程即可达到主动的识别和分离[21-23]；与此同时，由于增大了聚合物微球的比表面积，使得聚合物的网络中存在很多印迹空穴，所以该材料具有高度的识别选择性[24-26]；目前磁性聚合物微球已在物质的提取与分离[27]、特异性识别[28,29]、食品安全检测[30]等方面得到应用。本实验以 Fe_3O_4 作为磁核，通过包覆 SiO_2 并在其表面接枝硅烷偶联剂 KH570（甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷）得到磁性载体，然后采用表面印迹法，以联苯三唑醇为模板分子，制备具有核-壳结构的磁性印迹聚合物。考察乙腈加入量、聚合温度及充氮气时间等条件对印迹聚合物印迹效果的影响。以该磁性印迹聚合物为固相萃取材料富集和净化样品，并结合 HPLC 对食品样品中三唑类农药进行检测。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

LC-1260 型高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；SHZ-82A 型恒温水浴振荡器，上海跃进医疗器械厂；HH-4 型恒温水浴锅，上海晖创化学仪器有限公司；DZF-6320 型真空干燥箱，四川中浪科技有限公司；KH5200 型超声波清洗器，上海沪粤明科学仪器有限公司；SHB-3A 型循环水式真空泵，陕西太康生物科技有限公司；TENSOR37 型傅立叶变换红外光谱仪，德国 Brμker 公司；JEM-2100 型透射电镜，日本 HITACHI 公司。

联苯三唑醇（Bitertanol,　99%），江苏常州市武进振华化工厂；二氯化铁（$FeCl_2 \cdot 4H_2O$,　99.7%），三氯化铁（$FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 99%）上海市宝山区合众化工厂；硅酸四乙酯（99%），硅烷偶联剂（KH-570, 97%），篮西科技有限公司；α-甲基丙烯酸酯（methacrylic　acid,　MAA,　分析纯），常州畅通化工有限公司；二甲基丙烯酸乙二醇酯（ethylene　dimethacrylate,　EDMA,　分析纯），四川海诺威科技有限公司；氨水，乙酸（分析纯），成都欣正通化工

有限公司；2,2'-二偶氮异丁腈（azobisisobutyronitrile, AIBN, 分析纯），常州畅通化工有限公司；乙腈，甲醇，无水乙醇，异丙醇（分析纯），成都欣正通化工有限公司；实验用水为超纯水。

1.2 磁核载体的制备及改性

1.2.1 共沉淀法制备四氧化三铁

分别称取 4.72 g $FeCl_3·6H_2O$ 和 1.72 g $FeCl_2·4H_2O$，放入 250 mL 的三口烧瓶中，然后向其加入 80 mL 水，在通入 N_2 和水浴温度为 80 ℃的反应条件下，逐滴加入 10 mL 浓氨水，搅拌条件下（800 rpm），熟化 30 min，再使用磁铁将所得产物分离，然后使用除氧水将产物洗至中性，无水乙醇洗涤 3 次后，于 50 ℃下真空干燥 24 h，即得实验用 Fe_3O_4。

1.2.2 二氧化硅包覆四氧化三铁

称取 300 mg Fe_3O_4，置于 250 mL 三口瓶中，分别加入 4 mL 水和 50 mL 异丙醇，超声混匀 20 min，连续搅拌（800 rpm）下，加入 5 mL 氨水，再将 2 mL 硅酸四乙酯逐滴加入，在室温条件下反应 12 h，然后用磁铁将产物分离，用水将产物洗涤至中性，再用无水乙醇洗涤 3 次，随后在 50 ℃下真空干燥 24 h，得到实验用 $Fe_3O_4@SiO_2$。

1.2.3 $Fe_3O_4@SiO_2$ 接枝 KH570

称取 200 mg $Fe_3O_4@SiO_2$，置于 250 mL 三口瓶中，加入 50 mL 甲醇，超声混匀。连续搅拌（550 rpm）下，将 3 mL KH570 逐滴加入，在室温条件下反应 24 h，用磁铁将产物分离后，用无水乙醇和水交替洗涤产物数次，并在 50 ℃下真空干燥 24 h，得到实验用 $Fe_3O_4@SiO_2$-KH570。

1.3 方法

1.3.1 磁性印迹聚合物的制备

取 0.2 mmol 联苯三唑醇和 0.8 mmol MAA 溶于乙腈中，超声振荡 30 min，放入冰箱内预聚合 6 h，使 MAA 与联苯三唑醇充分作用，随后加入 100 mg $Fe_3O_4@SiO_2$-KH570，1.5 mL EDMA 和 40 mg AIBN，对其进行超声脱气，充氮气 10 min 使其内部无氧，密封后恒温振荡（150 rpm）24 h；并用甲醇-乙酸(9:1, *V*/*V*)对磁分离得到的聚合物产物进行洗涤，以去除模板分子和未反应的功能单体、交联剂等，再用甲醇洗涤去除乙酸。60 ℃真空干燥（0.04 MPa）至恒重后得到磁性分子印迹聚合物（magnetic molecularly imprinted polymer, MMIP），放入干燥器内。在不加联苯三唑醇的条件下，按上述制备过程制得磁性非印迹聚合物（magneticnon-imprinted polymer,MNIP）。

1.3.2 不同聚合物吸附性能研究

在具塞玻璃管中分别放入适量的按不同乙腈量(15 mL、30 mL、50 mL、70 mL)、不同充氮气时间(5 min、10 min、15 min、20 min)、不同聚合温度(50 ℃、60 ℃、70 ℃)下制备的 MMIP 及 MNIP，再分别加入 5 mL 联苯三唑醇乙腈标准溶液（0.1 mmol/L），在 25 ℃下恒温振荡 24 h，离心(10000 r/min，5 min)，静置，取上清液。采用 HPLC 对聚合物吸附平衡后的浓度进行测定，聚合物对目标物的结合量 *Q* 利用溶液浓度的差值进行计算，平行测定 3 次后取其平均值。

1.3.3 静态吸附实验

在具塞玻璃管中分别放入适量的 MMIP 及 MNIP，并分别加入 5 mL 浓度为 0 μmol/L~5μmol/L 联苯三唑醇乙腈标准溶液，25 ℃下恒温振荡 24 h 后，用 HPLC 检测联苯三唑醇的浓度，并计算平行测定 3 次实验结果的平均值，聚合物对目标物的结合量 *Q* 用溶液浓度的差值计算，以初始溶液浓度 C_0 为横坐标，结合量 *Q* 为纵坐标作图，并对其进行 Scatchard 分析[31]。

Q 的计算公式如(1)所示。

$$Q=\frac{(C\text{-}C_e)V}{m} \quad (1)$$

式中：

C——联苯三唑醇的初始浓度(μmol/g)；C_e——联苯三唑醇的平衡浓度(μmol/g)；V——吸附溶液的体积(mL)；M——聚合物的质量(mg)。

1.4 磁性印迹聚合物产率的测定

根据制备过程和需要对聚合物进行称量，获得以下质量数据以计算聚合物产率。

(1)称取干燥的圆底烧瓶（100 mL）质量 m_1。

(2)称取加入了反应液(模板分子+MAA+乙腈)的烧瓶的质量 m_2。

(3)向已在冰箱中放置过夜的装有反应液的烧瓶中加入 EDMA、磁性微球后，称量反应体系的质量 m_3。

(4)加入 AIBN，超声，除氧气，60 ℃水浴反应 24 h，此过程宜避光进行。

(5)待反应完成后，自然放置至室温，称量其质量 m_4。

(6)将反应体系中的固体聚合物与液体分离开，待其自然晾干后，称量装有聚合物的烧瓶的质量 m_5。

(7)向上述装有聚合物的烧瓶中加入适量的乙腈，浸洗 2 次后，待其自然晾干，称量装有聚合物的烧瓶的质量 m_6。

(8)用甲醇-醋酸(9:1，*V*/*V*)对聚合物进行超声，使其分散，然后洗脱去除模板分子，再用甲醇洗去残留在聚合物中的乙酸，最后在真空干燥箱内(60 ℃，0.04 MPa)进行干燥。称量装有聚合物的烧瓶的质量 m_7。

聚合物的产率%=聚合物的质量/$m_{(M+C)}$×100%

$=(m_7- m_1)/(m_3- m_2+ m_{MAA})$×100%

1.5 聚合物的表征

1.5.1 傅里叶变换红外光谱的测定

表征样品与溴化钾混合后进行研磨、压制，于 400 cm^{-1}~4000 cm^{-1} 的波长范围内对 Fe_3O_4、Fe_3O_4@SiO_2、磁性分子印迹聚合物和非印迹聚合物进行扫描，得到所对应的红外光谱，扫描扣除 CO_2 干扰。

1.5.2 透射电子显微镜的测定

将少量 Fe_3O_4、磁性分子印迹聚合物放入离心管中，用无水乙醇对其溶解，超声使其分散均匀，分散后取一小滴放到铜网上，用红外灯照射使其干燥，然后用透射电子显微镜进行测定。

1.5.3 磁响应性能的测定

称取少量磁性印迹聚合物置于 10 mL 离心管中，加入 5 mL 乙腈溶液，超声 10 min 混合均匀。在离心管侧面放置磁铁，并连续拍照，记录聚合物的磁分离过程。

1.6 样品测定

1.6.1 样品的预处理

分别称取样品（小米、小麦、白菜、梨、苹果等）10.000 g（市售），磨碎或切碎，果蔬样品中加入无水硫酸钠 5.000 g，除去过多的水分，（谷物中不加），用乙腈（20 mL）溶解，进行提取(分两次，每次 10 mL)，搅匀，超声 20 min，离心 10 min（1000 r/min），吸取上清液 1 mL 经磁性印迹聚合物萃取，用水（20 mL）淋洗，再用甲醇-乙酸(9:1，*V*/*V*)（10 mL）洗脱，收集洗脱液进行检测[32]。

1.6.2 磁性印迹聚合物对模板分子的磁萃取分离与测定

称量 10 mg 磁性分子印迹聚合物置于 10 mL 具塞三角瓶中，加入 5.00 mL 试样液，室温条件下，振荡（150

rpm）5 h，磁分离收集平衡液。然后用 2 mL 乙腈分两次洗去聚合物微球表面非特异性吸附的干扰物质，磁分离弃去洗涤液。再用 2 mL 甲醇-乙酸(9:1，*V/V*)分两次将吸附在磁性聚合物上的目标化合物洗脱下来，磁分离收集洗脱液。然后，对洗脱液进行蒸发、干燥，用 1.00 mL 甲醇对其进行复溶，用微孔滤膜（0.45 μm）过滤，待 HPLC 检测。

1.6.3 HPLC 测定条件

色谱柱：Hypersil BDS C_{18}(25 mm ×4.6 mm, 5 μm)；紫外检测波长：210 nm；流动相是甲醇-水（83:17，*V/V*）的混合液；流速为 1 mL/min；柱温为 25 ℃；进样量为 20 μL。

1.7 数据统计及图表绘制方法采用 Origin 8.0 和 Excel 2007 对实验数据进行作图及统计分析，每组实验重复测量 3 次，数据均为 3 次平行实验平均值。

2 结果与分析

2.1 不同聚合条件对聚合物吸附性能的影响

固定联苯三唑醇、功能单体和交联剂的条件不变，通过考察乙腈的加入量、充氮气时间、聚合温度研究其对聚合物吸附性的影响（见表 1），实验结果用印迹因子 *IF* 表示，*IF* 是评价印迹效果的有效指标。*IF* 的计算公式如(2)所示。

$$IF=Q_{MIP}/Q_{NIP} \quad (2)$$

式中：

Q_{MIP}——印迹聚合物吸附联苯三唑醇的量

Q_{NIP}——非印迹聚合物吸附联苯三唑醇的量

表 1 不同聚合条件对聚合物吸附性能的影响

Table 1 Effect of different polymerization conditions on the adsorption properties of polymers

不同聚合条件	Q_{MIP}/(μmol/g)	Q_{NIP}/(μmol/g)	*IF*
乙腈 15 mL(充氮气 15 min、聚合温度 60 ℃)	20.73	20.52	1.01
乙腈 30 mL(充氮气 15 min、聚合温度 60 ℃)	23.67	13.30	1.78
乙腈 50 mL(充氮气 15 min、聚合温度 60 ℃)	31.45	15.05	2.09
乙腈 70 mL(充氮气 15 min、聚合温度 60 ℃)	29.88	17.79	1.68
充氮气 5 min(乙腈 30 mL、聚合温度 60 ℃)	18.66	16.51	1.13
充氮气 10 min(乙腈 30 mL、聚合温度 60 ℃)	20.45	12.94	1.58
充氮气 20 min(乙腈 30 mL、聚合温度 60 ℃)	30.21	15.98	1.89
聚合温度 50 ℃(乙腈 30 mL、充氮气 15 min)	23.69	12.40	1.91
聚合温度 70 ℃(乙腈 30 mL、充氮气 15 min)	27.53	16.58	1.66

从表 1 的实验数据分析得出，乙腈 50 mL、充氮气 15 min、聚合温度 60 ℃时吸附量大且印迹效果好。因为，当乙腈用量为 15 mL 时，聚合反应与本体聚合效果相当，即生成的聚合物为块状；随着乙腈用量的增加，乙腈不仅起到溶解作用，而且也有致孔作用，导致聚合物会更加松散，当乙腈用量为 50 mL 时能形成较多聚合物，但当乙腈用

量增加到 70 mL 时，聚合物不易形成，因此，实验选择 50 mL 为最佳乙腈用量。实验研究了充氮气时间，当冲入氮气 5 min 时，产生的聚合物很少，这是由于充入的氮气量少不能将氧气完全赶出；当充氮气 20 min 时产生的聚合物明显少于充氮气 15 min 时产生的聚合物，这是因为充气时间过长会导致致孔剂挥发；而充氮气 10 min 时生成聚合物所需时间过长，只有在充氮气 15 min 条件下，反应 8 h 左右聚合物基本全部生成。实验还研究了聚合温度对聚合物的影响，随着温度的升高，聚合速率加快，70 ℃时，在 6 h 能生成大量的 MMIP；60 ℃时，8 h 左右出现大量 MMIP；50 ℃时，反应 24 h 以后，能够生成较多的 MMIP；实验还尝试了在 45 ℃下聚合，反应 48 h 以后，反应液仍为澄清，无聚合物生成。结果表明，聚合温度过高（如 70 ℃）时，体系容易发生爆聚，导致聚合物结构不均一；而低温制备的聚合物其分子识别性好，但是如果温度过低，就不能达到引发剂 AIBN 进行热分解的温度，不能发生聚合反应，因此实验中选用 60 ℃作为最佳反应温度。

2.2　聚合物的吸附性能

2.2.1　静态吸附等温线

以初始质量浓度 C_0 为横坐标，吸附量 Q 为纵坐标作图，得到 MMIP 和 MNIP 的静态吸附等温线，如图 2 所示。

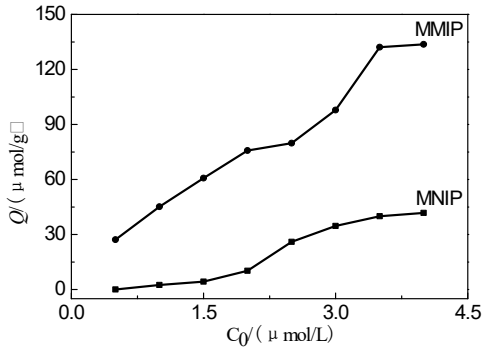


图 2　MMIP 和 MNIP 对联苯三唑醇的静态吸附等温线

Fig. 2　The static adsorption isotherms of MMIP and MNIP to bitertanol

由图 2 可以看出，MMIP 比 MNIP 对模板分子有更好的吸附性能，在相同的浓度下，MMIP 的吸附量远远大于 MNIP 的吸附量，这是由于在 MMIP 的合成过程中其内部形成的空间结构能够与模板分子吻合，形成印迹空穴，它可以“记住”模板分子，可以特异吸附模板分子。而 MNIP 中不存在模板分子，也不能形成印迹空穴，因此 MNIP 对模板分子无特异吸附性。

2.2.2　Scatchard 分析

使用 Scatchard 模型对聚合物的吸附性能进行评价，如公式(3)所示。

$$Q/C_0=(Q_{max}-Q)/K_d \quad (3)$$

式中：

Q_{max}——结合位点的最大表观量

Q——MMIP 吸附模板分子的量

C_0——模板分子的初始质量浓度

K_d——结合位点的平衡解离常数

以 Q 为横坐标，Q/C_0 为纵坐标绘制 Scatchard 曲线，如图 3 所示。

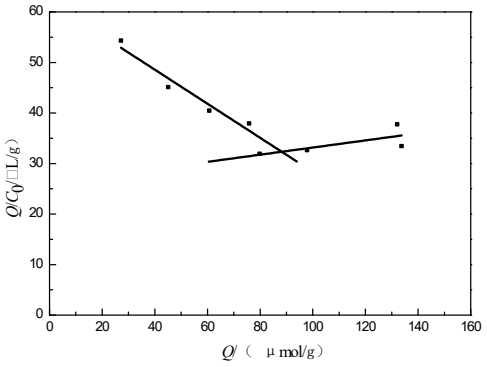


图 3　MIP 吸附性的 Scatchard 曲线

Fig. 3　Scatchard curve of MIP adsorption

图 3 表明，Q/C_0与 Q 不存在单一的线性关系，这意味着 MMIP 中的结合位点不是等价的，说明 MMIP 吸附目标物质时，作用位点非均一，其具有两类结合位点，分别为特定孔穴引起的高结合位点和一些非共价键引起的低结合位点，每种结合形式有独特的作用性质。由图 3 可看到两条直线，故可推断它们之间有两种结合位点，说明联苯三唑醇与 MAA 在形成聚合物时有两种结合形式，并且在洗脱模板分子后形成两种结合性质不同的结合位点。通过作图拟合，得到两个线性方程：第一类吸附位点的方程为 y=62.051-0.337x，K_{d1}=2.97 μmol/L，Q_{max1}=184.29 μmol/g；第二类吸附位点的方程为 y=0.0707x+26.089，K_{d2}=14.14 μmol/L，Q_{max2}=368.90 μmol/g。

2.3　聚合物产率的计算

本实验采用的计算方法中聚合物的质量不包括模板分子的质量，因此需要洗脱掉聚合物中的模板分子。

聚合物的产率%=聚合物的质量/$m_{(M+C)}$×100%

$=(m_7- m_1)/(m_3 - m_2 + m_{MAA})$×100%

=76.4%

2.4　磁性印迹聚合物的表征

2.4.1　红外光谱分析

实验测定了 Fe_3O_4、Fe_3O_4@SiO_2、MMIP 和 MNIP 的红外光谱(见图 4)。由图 4(a)可见，572 cm^{-1} 为 Fe-O 的特征吸收峰，说明已制备了 Fe_3O_4 粒子。图 4(b)中 1097 cm^{-1}、952 cm^{-1}、563 cm^{-1} 处分别为 Si-O-Si 的反对称伸缩振动峰，Si-O-H 的弯曲振动吸收峰和 Fe-O 的特征峰，794 cm^{-1} 和 468 cm^{-1} 处分别是 Si-O 的伸缩和弯曲振动峰，这些特征峰的增加说明 SiO_2 已成功包裹在 Fe_3O_4 粒子上。图 4(c)为磁性印迹聚合物的红外谱图，3440 cm^{-1}、1094 cm^{-1}、948 cm^{-1}、578 cm^{-1} 处分别为硅胶表面的 O-H 基团的伸缩振动峰、Si-O-Si 反对称伸缩振动峰、Si-O-H 的弯曲振动吸收峰和 Fe-O 的特征峰，803 cm^{-1} 和 463 cm^{-1} 处分别是 Si-O 的伸缩和弯曲振动峰，除此之外，2990 cm^{-1}、1736 cm^{-1} 处为饱和 C-H 的伸缩振动吸收峰和 C=O 伸缩振动吸收峰，1631 cm^{-1} 处对应的 C=C 伸缩振动吸收峰很小，说明交联剂与功能单体大部分进行了交联聚合反应，这些特征峰的增加说明在包裹了 SiO_2 的 Fe_3O_4 表面有聚合物生成。图 4(d)为磁性非印迹聚合物的红外谱图，它的吸收峰位置与图 4(c)的吸收峰位置基本一致，但 1736 cm^{-1} 处 C=O 伸缩振动吸收峰相对于 1093 cm^{-1} 处 Si-O-Si 反对称伸缩振动峰，相对峰值明显减小，说明在磁性微球表面发生聚合的非印迹聚合物较少。结果表明，功能单体 MAA 与模板分子联苯三唑醇在磁性微球表面预聚合形成复合物时有利于聚合物的聚合。磁性非印迹聚合物的吸收峰位置与图 4(c)磁性印迹聚合物的吸收峰位置基本一致，证明磁性印迹聚合物与磁性非印迹聚合物两种交联共聚物骨架结构的化学组成相同。结果表明，在包覆有 SiO_2 的磁性 Fe_3O_4 载体的表面有印迹聚合反应发生。

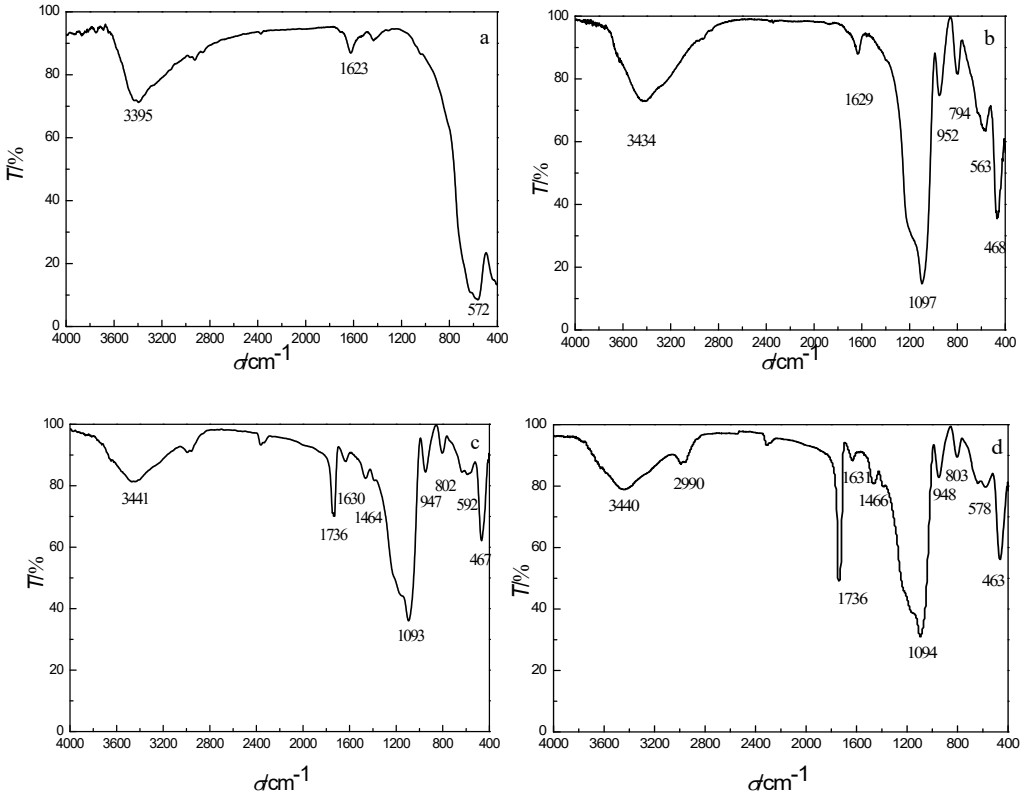


图 4　Fe_3O_4(a)、Fe_3O_4@SiO_2(b)、MMIP(c)和 MNIP(d)的红外光谱图

Fig. 4　IR spectrograms of Fe_3O_4 (a), Fe_3O_4@SiO_2 (b), MMIP(c) and MNIP(d)

由联苯三唑醇的分子结构分析可知，联苯三唑醇分子中含有三唑环，存在着带有孤对电子的 N 原子，电负性较大，可与羧基中的 H 形成氢键；联苯三唑醇分子中还含有羟基，可与 MAA 中羰基上的 O 形成氢键；此外联苯三唑醇分子还显示一定的碱性，可以和功能单体 MAA 的羧基产生离子作用；由此可推测印迹分子联苯三唑醇与功能单体 MAA 的作用形式，如图 5 所示。

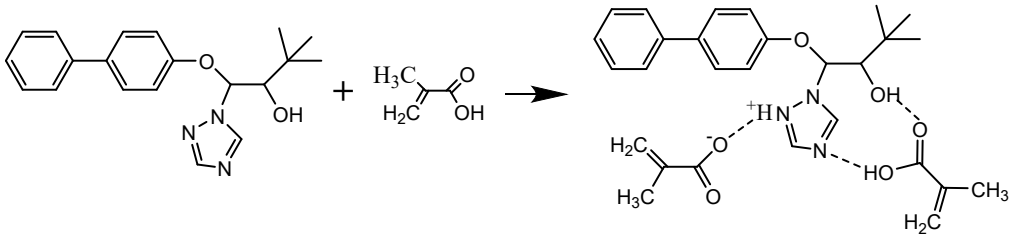


图 5　联苯三唑醇与功能单体作用形式

Fig. 5　The action form between bitertanol and functional monomer

2.4.2　透射电子显微镜分析

通过 Fe_3O_4 和 MMIP 透射电镜图像(见图 6)表征其形貌，由图 6(左)可知，Fe_3O_4 为大小约 10 nm 的球形粒子，且有一定的团聚，说明制备所得 Fe_3O_4 为纳米级粒子。由图 6(右)可知，印迹聚合物粒径约为 100 nm，其粒径较 Fe_3O_4 粒子大很多，说明在 Fe_3O_4 表面确实聚合上了聚合物层。

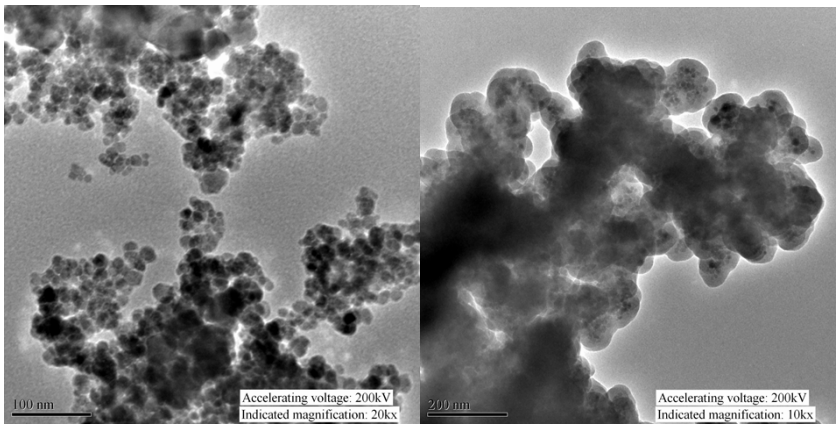
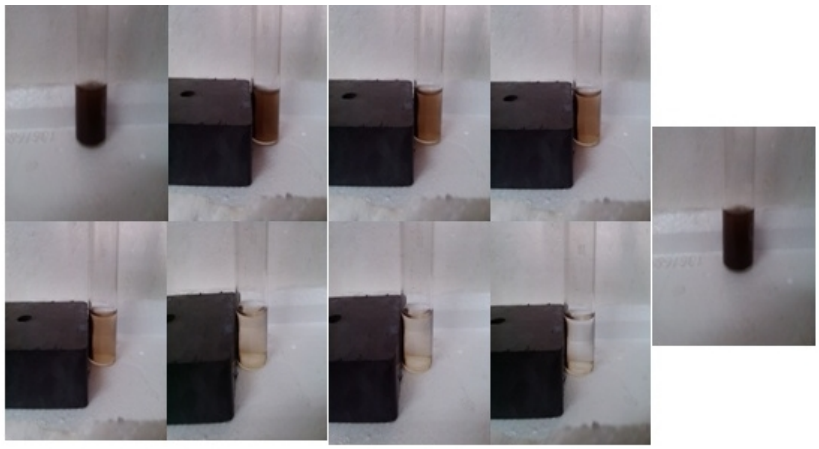


图 6　Fe_3O_4（左）和聚合物（右）的透射电镜图

Fig.6　Transmission electron micrographs of Fe_3O_4 (left) and polymer (right)

2.4.3　磁响应性能分析

为了考察印迹聚合物的磁响应性能，将其置于乙腈溶剂中，超声使其均匀分散，并将其置于磁铁的一侧，每隔 1 s 拍照一次，记录其在外加磁场下与溶液的分离过程，拍摄的照片如图 7(左)所示。实验发现，磁性印迹聚合物在磁场作用下，能迅速聚集在与磁铁右端接触的管壁上，当与磁铁接触 10 s 时磁性印迹聚合物即完全聚集在管壁上，溶液澄清。当撤走外加磁场后，聚合物粒子很快会重新分散在乙腈溶剂中，得到稳定的磁流体，如图 7(右)所示。实验结果表明，在乙腈溶剂中，磁性印迹聚合物具有良好的磁响应和再分散性能。



左　　右

图 7　在外磁场作用下印迹聚合物聚集过程(左)和分散性能(右)的照片

Fig. 7　Photographs of the gather process of the imprinted polymers (left) under the external magnetic field and dispersion performance (right)

2.5　线性范围与检出限

实验将 4 种三唑类农药储备液(100 μg/mL)分别配制成不同质量浓度（0.01 μg /mL~100 μg /mL）的标准溶液，经测定后，以待测物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，结果如表 2 所示。由表 2 可知，联苯三唑醇线性范围为 0.06 μg/mL ~100 μg/mL，三唑酮、戊唑醇和烯唑醇的线性范围为 0.03 μg/mL ~100 μg/mL，线性关系好，检出限在 0.01 μg/mL~0.02 μg/mL 之间。

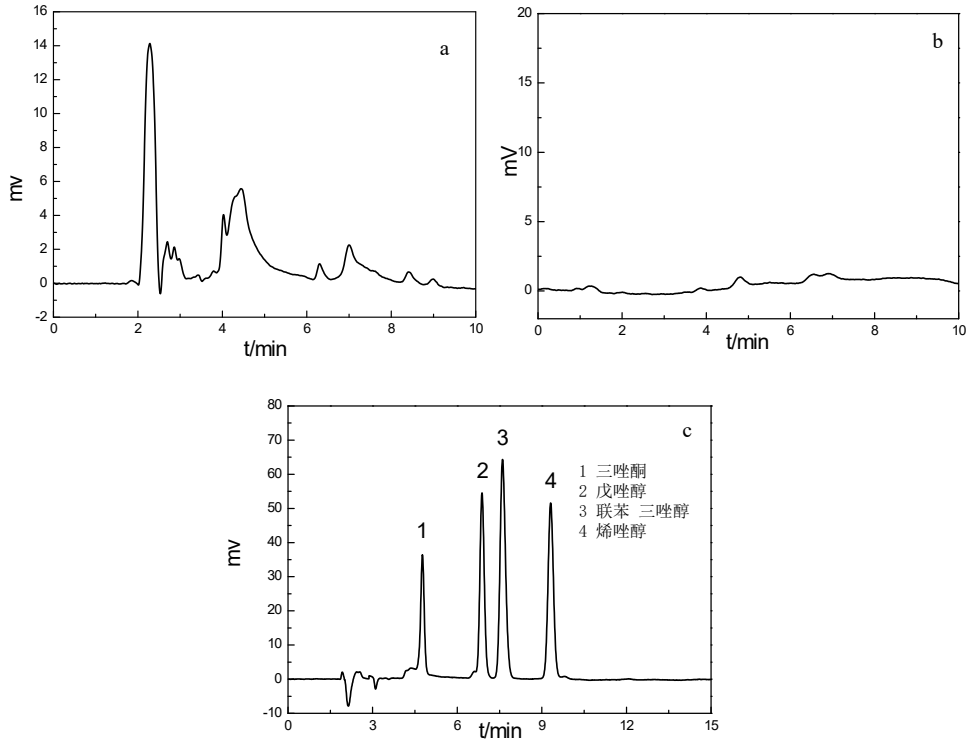
表 2　四种三唑类农药线性关系及检出限

Table 2　Linear relationship and detection limit of the four triazole pesticides

项目	线性方程	线性相关系数	线性范围/(μg/mL)	检出限/(μg/mL)
三唑酮	$y=2.32\times10^4x+2.80\times10^3$	0.9999	0.03~100	0.01
戊唑醇	$y=1.07\times10^4x+1.76\times10^5$	0.9999	0.03~100	0.01
联苯三唑醇	$y=1.79\times10^4x+2.22\times10^3$	0.9996	0.06~100	0.02
烯唑醇	$y=1.57\times10^4x+1.13\times10^5$	0.9998	0.03~100	0.01

2.6　联苯三唑醇 MMIP 对样品的净化和吸附能力

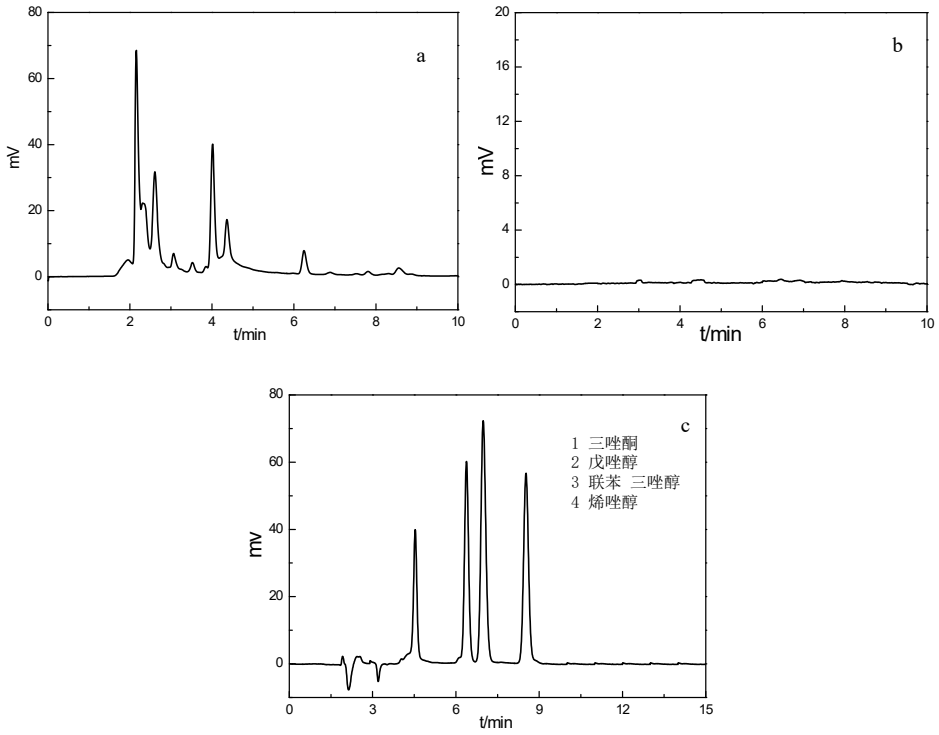
为了考察联苯三唑醇 MMIP 对样品中三唑类农药的吸附和净化能力，以联苯三唑醇 MMIP 作为固相萃取材料，样品按 1.6.1 方法处理，在 1.6.3　HPLC 测定条件下进行测定。实验结果显示，本实验所测的多种样品中均未检出上述 4 种三唑类农药。图 8 和图 9 为具有代表性样品的色谱分离图。



a 样品提取液；b 样品提取液经 MMIP 处理后的洗脱液；c 样品加标提取液经 MMIP 处理后的洗脱液

图 8　分子印迹固相萃取小米样品吸附净化效果谱图

Fig. 8　The molecularly imprinted solid phase extraction chromatograms of millet



a 样品提取液；b 样品提取液经 MMIP 处理后的洗脱液；c 样品加标提取液经 MMIP 处理后的洗脱液

图 9 分子印迹固相萃取梨样品吸附净化效果谱图

Fig. 9 The molecularly imprinted solid phase extraction chromatograms of pear

由图 8(a)和图 8(b)与图 9(a)和图 9(b)可知，聚合物不能吸附杂质，可以很好地净化样品。由图 8(c)和图 9(c)可知，磁性分子印迹萃取材料只能吸附模板分子和它的结构类似物，这充分表明了它可以很好的分离和富集复杂基质中的目标物质。

2.7 回收率和精密度实验

采用本方法对小米、小麦、白菜、梨、苹果等多种样品（均为市售）在 0.1 μg/mL 和 10 μg/mL 2 个添加水平下进行测定，其结果见表 3。

表 3 回收率和精密度实验结果(n=5)

Table 3 Experimental results of recovery and precision (n=5)

农药		小米		小麦		白菜		梨		苹果	
		加标水平/(μg/mL)									
		0.1	10	0.1	10	0.1	10	0.1	10	0.1	10
三唑酮	AR/%	93.2	95.3	89.5	93.4	93.2	95.3	94.2	102.7	92.8	94.9
	RSD/%	2.16	2.23	1.87	2.16	2.16	2.23	2.02	2.11	2.25	2.35
戊唑醇	AR/%	88.6	93.8	87.7	91.2	88.6	93.8	95.2	96.6	95.5	104.3
	RSD/%	3.23	2.78	3.13	3.05	2.43	2.25	2.39	3.11	2.31	2.54

联苯三唑醇	AR/%	97.3	92.6	90.5	94.4	97.3	92.6	90.8	97.3	94.7	95.5
	RSD/%	3.46	2.35	2.12	2.46	3.46	2.35	1.53	3.39	2.08	2.33
烯唑醇	AR/%	95.3	92.6	90.5	92.4	95.3	92.6	89.4	102.3	92.6	96.6
	RSD/%	2.19	1.49	2.68	2.51	2.19	3.13	1.54	2.26	1.39	2.03

由表 3 可知，4 种农药的平均回收率在 87.7%~104.3%之间，相对标准偏差(RSD)为 1.39%~3.46%(n=5)。该检测方法对三唑类农药的回收率高，精密度好。并将试验制备的印迹传感器与其他文献方法检测实际样品进行比较，如表 4 所示，该方法样品前处理简便，且检出限更低。

表 4　该方法与其他测定联苯三唑醇的方法比较

Table 4　Comparison of this method with other methods for the determination of bitertanol

方法	线性范围/(μg/mL)	检出限/(μg/mL)	文献
GC-MS	0.17～4.20	0.05	[33]
MIP-HPLC	1～200	0.5	[34]
MMP-HPLC	0.06～100	0.02	This work

3　结论

以 Fe_3O_4@SiO_2 为磁性载体，联苯三唑醇为模板分子，通过表面印迹的方法，合成了具有核壳结构的聚合物微球，并优化了聚合工艺，当致孔剂乙腈用量为 50 mL、聚合温度为 60 ℃、充氮气时间为 15 min 时印迹因子 *IF* 最高，特异性吸附能力最好，且聚合物的产率为 76.4%。静态吸附结果表明，MMIP 有很好的吸附性；由 Scatchard 分析可知联苯三唑醇和 MAA 有两种结合位点，K_{d1}=2.97 μmol/L、K_{d2}=14.14 μmol/L。通过红外光谱、透射电镜及磁响应对聚合物进行了表征，结果表明，MMIP 聚合成功印迹聚合物粒径约为 100 nm，且聚合物磁响应性和再分散性能较好。以最优条件下制备的聚合物为固相萃取材料，对多种样品进行萃取净化，并采用高效液相色谱法进行测定。结果为样品加标回收率为 87.7%~104.3%，RSD 为 1.39%~3.46%(n=5)。该方法简单快速、选择性强，有利于促进样品的快速前处理实现。

参考文献：

[1] 胡方华. 三唑类化合物的环境毒性研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2012: 1.

[2] RUTKOWSKA E, LOZOWICKA B, KACZYNSKI P. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 20-29. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.130.

[3] WANG X M,WU H L, et al. Rapid Determination of Bitertanol Content in Banana Using Three-dimensional Fluorescence Coupled with Second-order Calibration[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(6):811-816. DOI: 10.1016/s1872-2040(08)60109-7.

[4] 何静. 基于苯醚甲环唑分子印迹的电化学传感器研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 4-5.

[5] 白雪, 周成合, 米佳丽. 三唑类化合物研究与应用[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(7):721-729. DOI: 10.3969/j.issn.1004-1656.2007.07.001.

[6] 罗金辉, 王明月. 优化气相色谱法测定香蕉中三唑醇残留量[J]. 农药, 2011, 50(2):128-129. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0413.2011.02.016.

[7] 陈顺琴. 黔产食品中三唑类杀菌剂与有机氯农药的残留检测技术研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2015: 1.

[8] 赵春娟, 高文惠. 高效液相色谱法检测饲料中三唑类杀菌剂残留[J]. 中国饲料, 2015(3): 24-25. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20150307.

[9] 李樱红, 周萍, 徐权华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂王浆中 7 种高风险农药残留[J]. 色谱, 2018, 36(2): 136-142.DOI: 10.3724/SP.J.1123.2017.10012.

[10] REJCZAK T, TUZIMSKI T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO2-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 225-233. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.095.

[11] 余颖.气相色谱法测定水产品中 4 种三唑类农药残留[J].渔业研究，2018，40(3)：209-216. DOI: 10.14012/j.cnki.fjsc. 2018.03.006.

[12] LOPEZ A, COSCOLLA C, YUSA V. Evaluation of sampling adsorbents and validation of a LC-HRMS method for determination of 28 airborne pesticides[J]. Talanta, 2018, 198: 211-219. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.06.078.

[13] MARTINS M L, KEMMERICH M, PRESES O D, et al. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis.[J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1514: 36-45. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.080.

[14] Li Y, Dong F, Liu X, et al. Simultaneous enantio selective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2012, 1224: 51-60. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.044.

[15] 韩丙军, 黄海珠, 何燕, 等. UPLC-MS/MS 测定动物源食品中 4 种农药残留[J]. 食品研究与开发, 2017(20): 140-144. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2017.20.027.

[16] SILVA E A S, Avila V L, PAWLISZYN J. Fast and robust direct immersion solid phase microextraction phase microextraction coupled with gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicides in fruits[J]. Journal of ChromatographyA,2013, 1313(25): 139-146. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.071.

[17] RUTKOWSKA E, LOZOWICKA B, KACZYNSKI P. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 20-29. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.130.

[18] 刘博, 尹航, 高文惠. 虚拟模板分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测果蔬中三唑类杀菌剂[J]. 河北科技大学学报, 2013, 34(5): 417-421. DOI: 10.7535/hbkd.2013yx05009.

[19] 高文惠, 刘博, 庞军, 等. 虚拟模板分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测食品中联苯三唑醇与烯唑醇[J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2504-2508. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2013.10.015.

[20] 高文惠, 刘博, 尹航, 等. 联苯三唑醇分子印迹聚合物的合成及吸附性能研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 1761-1765. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2013.08.018.

[21] XIE L, GUO J, ZHANG Y, et al. Novel molecular imprinted polymers over magnetic mesoporous silica microspheres for selective and efficient determination of protocatechuic acid in syzygium aromaticum[J]. Food Chemistry, 2015, 178: 18-25. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.069.

[22] 赵旭. 磁性碳微球表面印迹聚合物的制备与吸附性能研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2018: 7-8.

[23] CHANG L, CHEN S, LI X. Synthesis and properties of core-shell magnetic molecular imprinted polymers[J]. Applied Surface Science, 2012, 258(17): 6660-6664. DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.03.102.

[24] GHOLAMI H, ARABI M, GHAEDI M, et al. Column packing elimination in matrix solid phase dispersion by using water compatible magnetic molecularly imprinted polymer for recognition of melamine from milk samples[J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1594: 13-22. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.02.015.

[25] ANSARI S, KARIMI M. Recent configurations and progressive uses of magnetic molecularly imprinted polymers for drug analysis[J]. Talanta, 2017, 167: 470-485. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.02.049.

[26] Li Z, Lei C, Wang N, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers with double functional monomers for the extraction and detection of chloramphenicol in food[J]. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2018, 1100-1101: 113. DIO: 10.1016/j.jchromb.2018.09.032.

[27] 葛昊, 黄海龙, 徐敏. 具有高选择性吸附的表面分子印迹磁性纤维素微球的制备与性能[J]. 高等学校化学学报, 2016, 37(8): 1551-1558. DOI: 10.7503/cjcu20160248.

[28] HEMMATIK, MASOUMI A, GHAEMY M. Tragacanthgum-based nanogel as a superparamagnetic molecularly imprinted polymer for quercetin recognition and controlled release[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 630-640. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.09.006.

[29] Wei X X, Wang Y Z, Chen J, et al. Ionic liquids skeleton typed magnetic core-shell molecularly imprinted polymers for the specific recognition of lysozyme[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1081:81-92. DOI: 10.1016/j.aca.2019.07.025.

[30] 单艺, 王象欣, 陈美君, 等. 磁性分子印迹聚合物提取-超高效液相色谱-串联质谱法测定乳及乳制品中的 4 种伪蛋白[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 318-325. DOI: 0.7506/spkx1002-6630-20171020-216.

[31] 刘蒙, 刘珺, 王颜红, 等. 沉淀聚合法制备灭多威分子印迹聚合物及其性能考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(3): 243-248. DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2016.03.012.

[32] 高林, 李亚丽, 刘博, 等. 混合三模板分子印迹固相萃取柱应用于粮谷中三唑类农药的检测[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(10): 131-136. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0174.2016.10.022.

[33] 王卉, 杨金川, 杨森,等. 气相色谱-质谱法同时测定黄瓜中腈苯唑与联苯三唑醇的残留量[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(7):29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1002-5480.2012.07.015

[34] 刘博, 尹航, 刘文红, 等. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测饲料中联苯三唑醇[J]. 中国饲料, 2013(15):33-34. DOI：10.3969/j.issn.1004-3314.2013.15.009