

# 联苯三唑醇分子印迹聚合物的合成及吸附性能研究

高文惠, 刘博, 尹航, 王姣姣, 贾英民

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北省发酵工程技术研究中心, 河北石家庄 050018)

**摘要:** 制备联苯三唑醇分子印迹聚合物(BMIP)并研究其特异识别能力。以联苯三唑醇为模板分子,  $\alpha$ -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 采用本体聚合合成分子印迹聚合物(MIP)。考察不同致孔剂对模板物质与功能单体相互作用力的影响, 以及采用不同比例模板分子与功能单体合成的聚合物对联苯三唑醇的吸附量的影响, 通过静态吸附实验研究吸附性能, 并进行 Scatchard 分析。结果表明乙腈和四氢呋喃为致孔剂时, 联苯三唑醇的最大吸收波长均发生红移, 分别红移了 5 nm 和 6 nm, 且吸收峰均增强。由 Scatchard 分析可知, 联苯三唑醇与 MAA 形成了两类结合位点, 其解离常数  $K_{D1}=3.16$  mmol/L、 $K_{D2}=107.53$  mmol/L。四氢呋喃和乙腈更适合用于联苯三唑醇分子印迹聚合物的制备。合成的印迹聚合物对模板分子具有很强的亲和力和良好的识别能力, 可以用做联苯三唑醇的分离材料。

**关键词:** 联苯三唑醇; 分子印迹聚合物; 静态吸附; Scatchard 分析

文章编号: 1673-9078(2013)8-1761-1765

## Synthesis and Adsorption Property of Bitertanol Molecularly Imprinted Polymer

GAO Wen-hui, LIU Bo, YIN Hang, WANG Jiao-jiao, JIA Ying-min

(College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, R&D Center for Fermentation Engineering of Hebei Province, Shijiazhuang 050018, China)

**Abstract:** A bitertanol molecularly imprinted polymer (BMIP) was prepared by the method of bulk polymerization under different ratios between template molecular and functional monomer, using bitertanol as template molecule and methacrylate acid (MAA) as functional monomer and its specific recognition ability was studied. The influence of different pore-foaming agents on the interaction between template molecular and functional monomer was investigated. The effect of the prepared polymer using different ratios template molecular and functional monomer on the adsorption content of bitertanol was also studied. Adsorption property of bitertanol was examined by static adsorption test and analyzed by Scatchard analysis. The maximum absorption wavelength of bitertanol by using acetonitrile and tetrahydrofuran as pore-foaming agents showed 5 nm and 6 nm red shifts, respectively, and its absorption intensity increased. Scatchard analysis showed that bitertanol template molecule and functional monomer MAA formed two types of binding sites and the dissociation constants of the binding sites were 3.16 mmol/L and 107.53 mmol/L, respectively. Tetrahydrofuran and acetonitrile were more suitable for the preparation of BMIP. The molecularly imprinted polymer can be used as the separation media of bitertanol with high affinity and good specific recognition ability.

**Key words:** bitertanol; molecularly imprinted polymer; static adsorption; scatchard analysis

分子印迹技术 (Molecular imprinting technique, MIT) 是制作能够与某一特定分子 (模板分子) 具有特异性结合的一项技术。制备得到的不带有模板分子的聚合物称为分子印迹聚合物 (MIP)<sup>[1]</sup>。近几年分

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013BAD10B03); 河北省科技支撑计划项目 (10276902D); 石家庄市科技支撑计划项目 (12149472A)

作者简介: 高文惠 (1963-), 女, 博士, 教授, 主要研究方向: 食品安全与分离科学

通讯作者: 贾英民 (1961-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品生物技术与安全

子印迹得到了快速发展, 主要因为分子印迹具有高度选择性、可反复使用、耐苛刻条件、简化前处理、制作简单等优点。广泛应用于固相萃取、化学仿生传感器、模拟酶催化、膜分离技术领域<sup>2-5]</sup>。

联苯三唑醇是广谱内吸杀菌剂, 主要用来防治由黑星菌属和核盘菌属菌引起的果树病害, 以及球腔菌属菌引起的香蕉病害和花生叶斑病。联苯三唑醇被广泛应用于小麦等粮食作物种植以及果蔬等种植过程, 而且它的使用量逐步增加, 由其残留引发的食品安全问题受到人们的广泛关注<sup>6-8]</sup>。在粮食及果蔬加工产品中这种杀菌剂的超标残留会给人体内分泌系统带来极

大的伤害。这些伤害主要有：(1)损害神经系统；(2)机体的生殖机能下降或异常现象；(3)降低生物体的免疫能力并诱发肿瘤。

样品前处理对于样品检测是非常重要的环节，传统的方法如液液萃取法，它们不仅操作复杂，有机溶剂消耗大而且有时很难将检测物质从复杂的食品环境中分离出来，而分子印迹固相萃取技术有效的克服了传统方法的缺陷，将分子印迹聚合物制作成为固相萃取柱用于复杂样品中目标物的分离富集，简化样品检测前处理过程，它具有有机溶剂消耗小、净化效果明显等特点。所以分子印迹固相萃取技术在样品前处理环节有很大的应用空间。

采用本体聚合法首次合成了联苯三唑醇分子印迹聚合物(BMIP)，以此聚合物为固相萃取剂，考察了模板分子与功能单体 MAA 在不同比例下制备的 MIP 对模板分子的吸附性能，并进行 Scatchard 分析。为其进一步应用于食品中农残检测奠定基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

联苯三唑醇(纯度 $\geq 99\%$ )，上海酶联生物科技有限公司；甲醇、乙腈，色谱纯，天津市光复精细化工研究所； $\alpha$ -甲基丙烯酸酯(MAA，分析纯)天津市化学试剂一厂，使用前需要重蒸以除去阻聚剂；乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA，分析纯)，抚顺安信化学有限公司；偶氮二异丁腈，AIBN，化学纯，天津市大茂化学试剂厂。

LC-20A 高效液相色谱仪，日本岛津公司；TU-1810 紫外可见分光光度计，北京普析通用有限责任公司；SHZ-82A 型恒温水浴振荡器，江苏省太仓医疗器械厂；KH5200 型超声波清洗器，昆山禾创超声仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 紫外光谱测定

称取适量的联苯三唑醇，以乙腈为溶剂，配制成浓度为 1 mmol/L 溶液，取 150  $\mu$ L 该溶液于 10 mL 具塞比色管中，在具塞比色管中分别加入 2 mmol/L MAA 乙腈溶液，使联苯三唑醇与 MAA 浓度比为 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10，并用乙腈定容至 10 mL，以乙腈为空白，测定其紫外光谱变化。以四氢呋喃和乙酸乙酯为致孔剂的紫外光谱测定方法同上。

#### 1.2.2 聚合物的制备

0.2 mmol 将联苯三唑醇和相应比例的  $\alpha$ -甲基丙

烯酸酯 MAA 放入 50 mL 的安瓿瓶中，加 15 mL 乙腈使其反应，超声 1 h，振荡 30 min 后，再加交联剂 EDMA 8 mmol 和引发剂 AIBN 0.02 g。超声 30 min，混匀后通入  $N_2$  脱氧 15 min 后，抽真空 1 min 后密封，在 55  $^{\circ}C$  的恒温水浴振荡器中振荡 24 h，得乳白色块状固体 MIP。经研磨、粉碎，过 200 目筛，再用去离子水沉降聚合物 3 次出去过细粉末。将最终得到的 MIP 颗粒用甲醇-乙酸(体积比为 95:5)溶液洗脱至无模板分子，最后用甲醇浸泡 1 h 除去残留的乙酸，洗脱后的聚合物放入真空干燥箱中(45  $^{\circ}C$ )干燥 6 h，得到 BMIP。空白聚合物(NMIP)除了未加模板分子外其余操作同上。

#### 1.2.3 结合特性实验

配制 2.5 mmol/L 的联苯三唑醇-乙腈溶液，功能单体 MAA 的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.15、0.2 mmol/L (模板分子和功能单体的比例分别为 1:0、1:2、1:4、1:6、1:8)，在 25  $^{\circ}C$  恒温水浴振荡器中振荡 12 h，使之充分反应，用相应浓度的功能单体溶液作参比测定其紫外吸收光谱，考察波长移动的情况。

#### 1.2.4 结合量实验

##### 1.2.4.1 不同聚合物吸附性能考察

分别称取上述按不同比例功能单体制备的 BMIP 及 NMIP 各 20 mg 放入 10 mL 具塞玻璃管中，加入 5 mL 5 mmol/L 联苯三唑醇的乙腈溶液将其混合，混合物在 25  $^{\circ}C$  下恒温振荡 24 h。然后在 4000 r/min 转速下离心 10 min，取一定量的上清液用高效液相色谱法在 256 nm 处测定吸附平衡后溶液浓度，根据结合前后溶液浓度变化计算聚合物对底物的结合量  $Q$ ，平行测定三次后取平均值。其中吸附量可由下式计算： $Q=(C_0-C)V/W$  式中  $C_0$  和  $C$  分别为模板分子的起始浓度和平衡浓度(mmol/L)， $V$  为溶液的体积(mL)， $W$  为印迹聚合物的质量(g)。

##### 1.2.4.2 静态吸附实验

称取模板分子与功能单体按 1:4 反应制得的 BMIP 及 NMIP 各 20 mg 放入 10 mL 具塞玻璃管中，加入 5 mL 联苯三唑醇的乙腈溶液，浓度变化范围为 0~5 mmol/L，混合物在 25  $^{\circ}C$  下恒温振荡 24 h。以下操作同 1.2.3.1，计算其吸附量  $Q$ ，以初始浓度  $C_0$  为横坐标，吸附量  $Q$  为纵坐标绘制吸附等温线，然后进行 Scatchard 分析。NMIP 的静态吸附实验操作和处理同上。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模板分子与功能单体之间作用力的紫外

光谱分析

联苯三唑醇的结构式如图 1 所示, 其在不同极性的溶剂中紫外吸收光谱有所不同, 在乙腈和四氢呋喃溶剂中有两个吸收峰, 主峰则分别在 200 nm (乙腈) 及 220 nm (四氢呋喃) 附近。弱极性乙酸乙酯溶剂中联苯三唑醇仅有一个吸收峰。

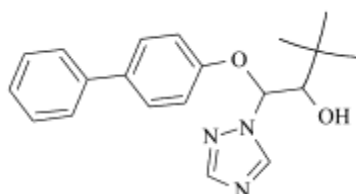


图 1 联苯三唑醇结构式

Fig.1 Chemical structural formula of bitertanol

在乙腈溶剂中, 随着联苯三唑醇与 MAA 浓度比降低 (浓度比由 1:0 变化到 1:10), 溶液最大吸收波长发生红移, 由 198 nm 变化到 203 nm, 红移了 5 nm, 而且从图 2 可知随着 MAA 用量增加, 溶液吸收峰的强度增加; 253 nm 附近的小峰由 253 nm 红移到了 254 nm, 该吸收峰强度略有增加。结果表明联苯三唑醇与 MAA 之间产生了较强的分子间作用力。

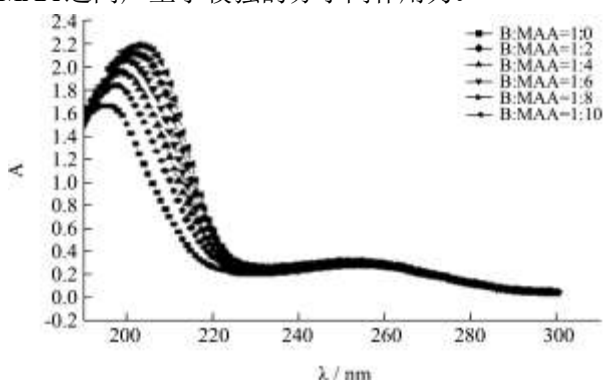


图 2 联苯三唑醇与 MAA-乙腈溶液不同比例紫外扫描图

Fig.2 UV spectra of bitertanol under the presence of MAA and acetonitrile

在四氢呋喃溶剂中有相似结果, 随着联苯三唑醇与 MAA 浓度比减小, 溶液最大吸收波长也发生了红移, 从 229 nm 到 235 nm, 红移量为 6 nm, 而且从图 3 也可以看出随着 MAA 用量增加, 溶液的吸收强度增强; 另外, 253 nm 附近的小峰由 253 nm 红移到了 254 nm, 该吸收峰强度略有增加。结果表明联苯三唑醇与 MAA 之间产生了较强的分子间作用力。

在乙酸乙酯中, 随着联苯三唑醇与 MAA 浓度比降低, 溶液最大吸收波长也发生红移, 不过从 261 nm 变化到 262 nm, 红移量仅为 1 nm; 从图 4 可知随着 MAA 加入量增加, 溶液的吸收峰强度只有少量增强。这说明在乙酸乙酯溶剂中, 联苯三唑醇与 MAA 之间

的分子间作用力较弱。

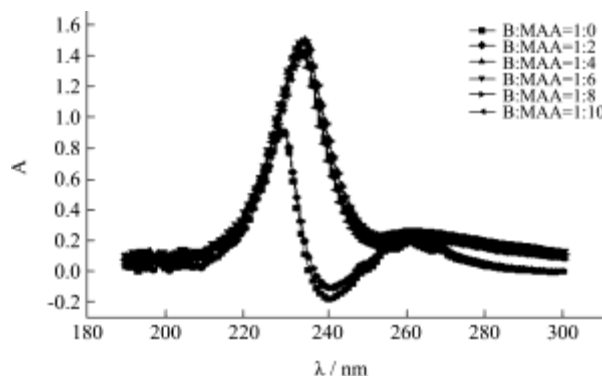


图 3 联苯三唑醇与 MAA-四氢呋喃溶液不同比例紫外扫描图

Fig.3 UV spectra of bitertanol under the presence of MAA and tetrahydrofuran

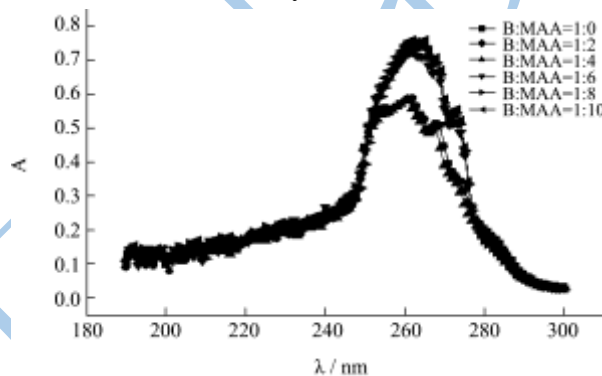


图 4 联苯三唑醇与 MAA-乙酸乙酯溶液不同比例紫外扫描图

Fig.4 UV spectra of bitertanol under the presence of MAA and ethyl acetate

以上结果表明, 联苯三唑醇与 MAA 在乙酸乙酯溶剂中产生的非共价键作用力小, 在乙腈和四氢呋喃溶剂中产生的作用力大。可见致孔剂的种类对模板物质与功能单体间作用力的大小有直接的影响。当模板物质与功能单体间作用力大时, 合成的聚合物的特异性识别位点对模板物质的识别能力才强。

2.2 联苯三唑醇和 MAA 之间相互作用的紫外光谱分析

本实验采用乙腈为致孔剂, 以 MAA 作为功能单体, 在浓度为 1 mmol/L 的联苯三唑醇-乙腈溶液中, 分别加入不同量的功能单体, 当功能单体与模板分子的摩尔比分别为 0:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1 时, 联苯三唑醇紫外光谱的变化如图 2 所示。

从图 2 可看出, 在联苯三唑醇的乙腈溶液中加入 MAA, 随着功能单体用量的增大, 光谱发生了红移, 说明模板分子联苯三唑醇与功能单体 MAA 发生了作用, 由于联苯三唑醇分子中存在着带有孤对电子的 N 原子, 电负性较大能和羧基中的 H 原子形成氢键, 由

此可推测模板分子与功能单体 MAA 的作用形式。

### 2.3 功能单体用量对分子印迹聚合物吸附性能的影响

能的影响

在固定模板分子和交联剂用量（联苯三唑醇和 EDMA 分别加入量为 0.04 g 和 1.50 mL）的条件下，改变 MAA 的加入量，实验考察了模板分子与功能单体的摩尔比对聚合物吸附性能的影响，结果见表 1。为了比较印迹效果定义印迹因子 IF，

$$IF = Q_{MIP} / Q_{NMIP}$$

注：Q<sub>MIP</sub> 为印迹聚合物吸附模板物质的量，Q<sub>NMIP</sub> 为空白聚合物吸附模板物质的量。

其中 IF 值越大分子印迹的效果越好。

表 1 功能单体对聚合物吸附性能的影响

Table 1 Effect of functional monomer on the adsorption property of polymer

聚合物	模板分子与功能单体摩尔比	Q <sub>BMIP</sub> / (μmol/g)	Q <sub>NMIP</sub> / (μmol/g)	IF
BMIP1	1:2	186.90	171.70	1.08
BMIP2	1:4	208.90	182.60	1.14
BMIP3	1:6	203.90	198.80	1.03
BMIP4	1:8	188.10	178.00	1.06

从表 1 的实验结果可以看出，当模板分子与功能单体 MAA 的摩尔比为 1:4 时，制备的 BMIP 不仅具有较大的吸附量，且具有最好的印迹效果；这是因为在较低的模板分子与功能单体摩尔比（如 1:2）时，模板分子印迹不充分，使得 BMIP 吸附量低；而当模板分子与功能单体 MAA 的摩尔比过高（如 1:8）时，过量的功能单体会导致 BMIP 中非特异性识别位点增加，印记效果降低。故实验确定模板分子与功能单体 MAA 的摩尔比为 1:4。

### 2.4 聚合物对模板分子的吸附选择性及 Scatchard 分析

通过静态吸附实验研究了 BMIP 和 NMIP 上的吸附行为，吸附等温线见图 5。

由图 5 可见 BMIP 对联苯三唑醇具有一定的吸附能力，而 NMIP 对联苯三唑醇吸附小。表明 BMIP 对联苯三唑醇具有印迹能力，联苯三唑醇可通过氢键和空间匹配达到吸附；而对于 NMIP 来说，虽然对联苯三唑醇有非特异性吸附，但由于位置关系，不具有作用位点匹配性，因此 NMIP 对联苯三唑醇吸附力弱。

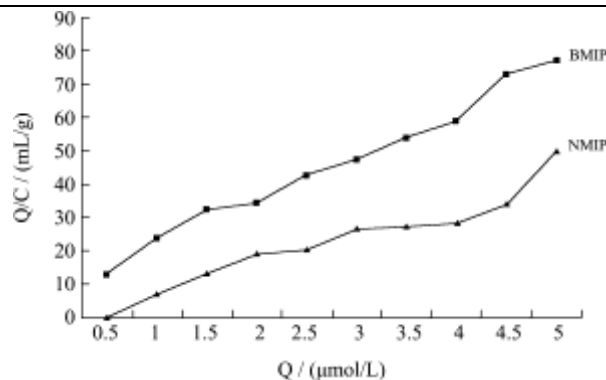


图 5 BMIP 和 NMIP 对联苯三唑醇的吸附等温线

Fig.5 Binding isotherm of BMIP and NMIP

通过 Scatchard 分析可获得吸附位点的结合类型、结合平衡常数及最大结合量等重要信息。依据 Scatchard 方程：

$$Q/C = (Q_{max} - Q) / K_D$$

注：Q 为 MIP 对模板分子的吸附量，C 为模板分子的平衡浓度，Q<sub>max</sub> 为结合位点的最大表现结合数，K<sub>D</sub> 为结合位点的平衡解离常数。

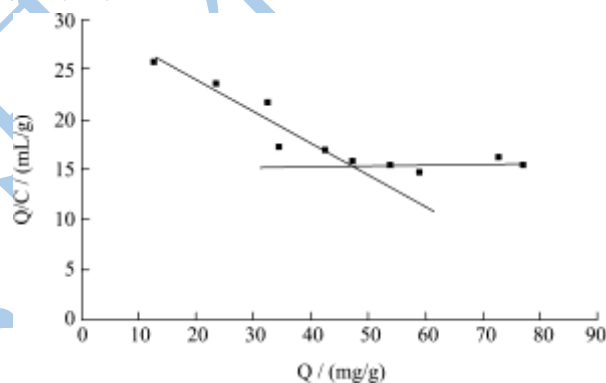


图 6 联苯三唑醇聚合物吸附性的 Scatchard 曲线

Fig.6 Scatchard curve of the binding nature of BMIP

联苯三唑醇在其 BMIP 上的 Scatchard 分析见图 6。由图中 Scatchard 曲线可以看出 Q/C 对 Q 明显是非线性的，说明 BMIP 中的结合位点不是等价的。因为在制备非共价型分子印迹聚合物时，功能单体与模板物质结合方式可以是多种方式，不同类型的结合方式会形成具有不同性质的结合位点。从图中可以看出，有两个线性较好的部分，说明主要存在两类不同的结合位点，导致这样结果的原因为：在预组装体系中功能单体 MAA 与联苯三唑醇主要形成了两种不同的结合物，这两种结构不同的结合物经交联剂交联后都进入了聚合物母体中，因此在除去模板分子后在聚合物中形成了两种结合性质不同的结合位点。由两条直线的斜率和截距可求得具有高亲和力结合位点的回归方程为  $y = 30.268 - 0.3161x$ ，解离常数  $K_{D1} = 3.16 \text{ mmol/L}$ ，最大表现结合量  $Q_{max1} = 95.76 \text{ μmol/g}$ ；而低亲和力的结

合位点的回归方程为  $y=14.904+0.0093x$ , 解离常数  $K_{D2}=107.53$  mmol/L, 最大表观结合量  $Q_{\max 2}=1602.58$   $\mu\text{mol/g}$ 。

### 3 结论

3.1 致孔剂对模板物质与功能单体间作用力的大小有直接的影响, 联苯三唑醇与 MAA 在乙腈和四氢呋喃溶剂中产生的作用力大。只有在模板物质与功能单体间作用力大时, 合成的聚合物的特异性识别位点对模板物质的识别能力才强。

3.2 以联苯三唑醇为模板分子, MAA 为功能单体, EDMA 为交联剂, 乙腈为致孔剂, 采用本体聚合方法合成了 BMIP, 考察了不同功能单体比例下制备得到的 BMIP 吸附模板物质的吸附性能, 进行了 Scatchard 分析。实验结果表明, 所制得的 BMIP 对模板分子具有较强的印迹能力, 印迹能力通过氢键和空间匹配作用得以产生; 由 Scatchard 分析可知联苯三唑醇和功能单体 MAA 形成了两类结合位点, 解离常数  $K_{D1}=3.16$  mmol/L、 $K_{D2}=107.53$  mmol/L。由于 BMIP 具有很强的亲和力和良好的识别能力, 故可进一步将其用做联苯三唑醇的分离材料。

### 参考文献

- [1] 郑平, 姚剑, 徐业平. 分子印迹固相萃取技术及其在食品安全分析中的应用 [M]. 合肥工业大学出版社, 2011  
Zheng P, Yao J, Xu Y P. Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction Technology And Its Application In Food Safety Analysis [M]. Hefei Industrial University Press, 2011
- [2] Yang L Q, Zhao X M, Crescenzi C, et al. Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79: 3099-3104
- [3] 郑红, 胡力玫. 氧乐果分子印迹聚合物的制备与性能研究 [D]. 化学试剂, 2012, 34(2): 162-164  
Zheng H, Hu L M. Preparation Of Omethoate Imprinted Polymer And Its Application [J]. Chemical Reagents, 2012, 34(2): 162-164
- [4] Yu Y, Edward P C Lai. An investigation of porous structure in molecularly imprinted polymer for sensor development: Non-linear fluorescence quenching of  $17\beta$ -estradiol bound inside MIP submicron particles by sodium nitrite and methacrylamide [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2010, 213: 123-128
- [5] Kira K, Munawar H, Ghulam M, et al. MIP sensors on the way to biotech applications: Targeting selectivity [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013
- [6] Gillard C L, Ranatunga N K, Conner R L. The control of dry bean anthracnose through seed treatment and the correct application timing of foliar fungicides [J]. Crop Protection, 2012, 37: 81-90
- [7] Yun S K, Ki D K. Evidence of a potential adaptation of *Magnaporthe oryzae* for increased phosphorothiolate-fungicide resistance on rice [J]. Crop Protection, 2009, 28: 940-946
- [8] Giuseppe L, Raffaello C, Filippo D C, et al. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 60: 164-172