

# 苯并咪唑类杀菌剂分子印迹预聚体系的筛选及其吸附性能

苏君梅<sup>1,2</sup>, 池建伟<sup>2</sup>, 张瑞芬<sup>2</sup>, 张名位<sup>1,2</sup>, 贾栩超<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

**摘要:** 采用沉淀聚合法制备苯并咪唑类杀菌剂的分子印迹聚合物, 以其共有的母核 2-氨基苯并咪唑 (AMB) 为模板分子, 采用 Gaussian 软件结合核磁共振氢谱对预聚体系进行筛选, 确定功能单体的种类、比例和致孔溶剂种类, 通过正交试验优化分子印迹聚合物 (MIPs) 的最佳制备条件。采用扫描电镜、比表面积及孔隙分析仪、红外光谱仪、热重分析仪以及吸附实验对聚合物进行结构表征和吸附性能研究。基于计算机分子模拟与核磁共振谱手段筛选的预聚体系为 AMB-衣康酸 (IA) 摩尔比 1:2, 致孔溶剂为乙腈。通过正交试验确定了 MIPs 的最佳制备条件。最优条件下制备的 MIPs 具有良好的热稳定性, 对多菌灵 (CBZ) 的动态吸附平衡时间为 120 min, 吸附过程符合二级动力学反应模型。MIPs 对 CBZ 的静态平衡吸附量  $Q$  为 8.87 mg/g, 印迹因子 IF 为 2.89。Scatchard 方程分析表明 MIPs 存在两类吸附位点。MIPs 不仅对 CBZ 具有良好的吸附性, 对其它苯并咪唑类杀菌剂噻菌灵、阿苯达唑和苯菌灵也具有较好的吸附性。该方法合成的 MIPs 作为固相萃取填料对石斛多糖提取液中四种苯并咪唑类杀菌剂的脱除率均达 92% 以上, 总糖的损失率为 14.94%。

**关键词:** 苯并咪唑类杀菌剂; 计算机分子模拟; 预聚体筛选; 分子印迹聚合物; 吸附性能

文章编号: 1673-9078(2021)10-297-307

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0221

## The Screening of Molecularly Imprinted Pre-assembly System for Benzimidazole Fungicides and Its Adsorption Properties

SU Jun-mei<sup>1,2</sup>, CHI Jian-wei<sup>2</sup>, ZHANG Rui-fen<sup>2</sup>, ZHANG Ming-wei<sup>1,2</sup>, JIA Xu-chao<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(2. Sericultura & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** Molecularly imprinted polymers (MIPs) of benzimidazole fungicides were synthesized by the precipitation polymerization method. The common maternal nucleus, 2-aminobenzimidazole (AMB), was selected as template molecule, Gaussian 09W molecular modelling software and H-NMR were involved to determine types and proportions of functional monomers and types of solvents in preassembled system. The optimum preparation conditions of MIPs were optimized through orthogonal experiment design. Under optimal conditions, structural characterization and adsorption properties of MIPs were studied by scanning electron microscopy (SEM), brunauer-emmett-teller (BET), fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermal gravimetric analyser (TGA) and adsorption experiment. According to computer molecular simulation and nuclear magnetic spectral analysis, itaconic acid (IA) and acetonitrile were selected as function monomer and solvent,

引文格式:

苏君梅,池建伟,张瑞芬,等.苯并咪唑类杀菌剂分子印迹预聚体系的筛选及其吸附性能[J].现代食品科技,2021,37(10):297-307

SU Jun-mei, CHI Jian-wei, ZHANG Rui-fen, et al. The screening of molecularly imprinted pre-assembly system for benzimidazole fungicides and its adsorption properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 297-307

收稿日期: 2021-03-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602102-2); 科技创新战略专项资金-高水平农科院建设 (R2017YJ-YB2006; R2018QD-081)

作者简介: 苏君梅 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: sjm@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 贾栩超 (1989-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然产物研究与功能食品开发, E-mail: jiaxuchao@gdaas.cn

respectively. The molar ratio of AMB and IA was determined as 1:2. Based on the above results, the optimum imprinting conditions were established through orthogonal experiments. MIPs were prepared under the above mentioned preparation conditions, indicating a good thermal stability. The results of dynamic adsorption experiments showed that the adsorption process of MIPs to carbendazim (CBZ) conformed to the pseudo-second-order kinetic model, and the adsorption equilibrium time was 120 min. The equilibrium adsorption capacity (Q) of CBZ was 8.87 mg/g, and the imprinting factor (IF) was 2.89. The Scatchard analysis showed that MIPs had two classes of adsorption sites. MIPs showed good adsorbability not only to CBZ, but also to other benzimidazole fungicides such as thiamidazim, albendazole and benzimidazim. The MIPs synthesized by this method were used as solid-phase extraction fillers to remove the benzimidazole fungicides in *Dendrobium* polysaccharide extract. The removal rates of four benzimidazole fungicides were higher than 92% and the loss rate of total sugar was 14.94%.

**Key words:** benzimidazole fungicides; computer molecular simulation; prepolymer screening; molecularly imprinted polymers; adsorption characteristics

植物提取物因具有抗氧化、抗炎、提高免疫力、调节糖脂代谢、抗肿瘤等多种良好的生理活性<sup>[1-3]</sup>,已成为保健食品和功能食品的重要原料。然而,农药残留超标严重阻碍了植物提取物行业的优质高效发展<sup>[4,5]</sup>。苯并咪唑类杀菌剂是一类广谱性杀菌剂,主要包括多菌灵、噻菌灵、阿苯达唑和苯菌灵等,被广泛应用于农业病原菌的防治。但该类杀菌剂具有致畸、致突变以及胚胎毒性,残留超标会严重危害人体健康<sup>[6]</sup>。近年来,已有多起因该类农药残留超标引起的安全问题和贸易受阻<sup>[7]</sup>。因此,建立一种高效的苯并咪唑类杀菌剂农药残留脱除技术,对于提升植物提取物行业质量安全水平和促进产业快速良性发展具有重要意义。

近年来,MIPs作为一类性质稳定、成本低且对目标物具有特异识别性能的新型吸附材料<sup>[8]</sup>,被广泛应用于色谱分离<sup>[9]</sup>、固相萃取<sup>[10]</sup>和传感器<sup>[11]</sup>等领域。FAROOQ等<sup>[12]</sup>以CBZ为模板分子, $\beta$ -环糊精为功能单体,采用沉淀聚合法制备的MIPs,对CBZ的最大吸附容量为3.65 mg/g。Raif等<sup>[13]</sup>同样以CBZ为模板分子,制备了具有磁性的MIPs,对CBZ的吸附能力为 $2.31 \pm 0.63$  mg/g,可应用于苹果和橙中CBZ残留的检测。MIPs的制备通常采用试错法,该法试错周期长且试错成本高<sup>[14]</sup>。随着计算化学和波谱技术的发展,基于计算机分子模拟以及波谱分析的预聚体筛选手段显著提高了分子印迹材料的合成效率及吸附性能<sup>[15]</sup>。李璐等<sup>[16]</sup>借助Materials Studio软件分子模拟和紫外光谱分析手段筛选功能单体和致孔剂,制备的溴氰菊酯MIPs静态吸附量达到68.61 mg/g。Farrington等<sup>[17]</sup>通过核磁共振分析手段结合计算机分子模拟筛选功能单体及致孔剂,合成的MIPs对咖啡因表现出良好的富集效果。

目前,以苯并咪唑类农药为模板合成MIPs的研究已有报道,但合成的分子印迹材料主要以分析型的固相萃取填料为主,吸附量较低,且对同类型农药的

吸附广谱性较差。此外,目前选择合成分子印迹材料功能单体和致孔溶剂的方法主要以试错法为主,效率较低且盲目性高。基于计算机分子模拟合成苯并咪唑类杀菌剂MIPs的研究尚未见报导。因此急需科学高效的合成一种对苯并咪唑类杀菌剂具有广谱吸附性的分子印迹材料。本研究以苯并咪唑类杀菌剂的共有母核结构AMB为模板分子,通过高斯化学计算软件结合核磁共振分析手段筛选功能单体种类、模板分子与功能单体比例以及致孔溶剂种类,通过正交试验优化合成MIPs的最优条件,解决现有分子印迹材料合成周期长、广谱性差的问题,为植物提取物中苯并咪唑类杀菌剂的脱除提供一种高性能吸附填料。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Avance III HD 400 M 超导核磁共振波谱仪,德国Bruker公司; S-7300N 钨灯丝扫描电子显微镜,日本Hitachi公司; Gemini VII 2390 全自动比表面积及孔隙分析仪,美国麦克公司; Vertex 70 傅里叶变换红外光谱仪,德国Bruker公司; Netzsch TG 209 F1 Libra 热重分析仪,德国Netzsch公司。

多菌灵(carbendazim, CBZ)、2-氨基苯并咪唑(2-aminobenzimidazole, AMB)、噻菌灵、阿苯达唑、苯菌灵购于上海阿拉丁生化科技有限公司; 甲基丙烯酸(methacrylic acid, MAA)、丙烯酸(acrylic acid, AA)、丙烯酰胺(acrylamide, AAM)、甲基丙烯酸甲酯(methyl methacrylate, MMA)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-Methylenebisacrylamide, MBA)、衣康酸(itaconic acid, IA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯、偶氮二异丁腈购于上海麦克林生化科技有限公司; 色谱级甲醇购于美国Fisher公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 分子印迹预聚体模拟筛选

### 1.2.1 功能单体种类及比例的筛选

以 AMB 为模板分子,选择常见制备 MIPs 的功能单体甲基丙烯酸 (MAA)、丙烯酸 (AA)、丙烯酰胺 (AAM)、甲基丙烯酸甲酯 (MMA)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (MBA) 以及衣康酸 (IA),参考杨文明<sup>[18]</sup>的方法,用 Gaussian 09W 中的 Restricted Hartree-Fock (RHF) 自洽场理论和 NBO 理论,在真空中,运用 6-31G 基组优化模板分子、功能单体分子及两者不同比例混合物的几何结构,得到最低稳定能量,以式(1)计算模板分子与各功能单体的结合能  $\Delta E$ 。

$$\Delta E = E_{\text{预聚体}} - E_{\text{模板分子}} - nE_{\text{功能单体}} \quad (1)$$

式中:

$E$ —各组分的单点能, kJ/mol;

$n$ —功能单体的数量。

### 1.2.2 致孔溶剂的筛选

选择氯仿、N,N-二甲基甲酰胺、乙腈和正己烷 4 种具有代表性的致孔溶剂。参考陈晓龙等<sup>[19]</sup>的方法,采用 RHF 方法, 6-31G 基组, 极化连续溶剂模型 (Polarizable continuum model, PCM), 按式(2)计算溶剂化能。

$$\Delta E_{\text{致孔溶剂}} = E_{\text{PCM}} - E_{\text{HF}} \quad (2)$$

式中:

$\Delta E_{\text{致孔溶剂}}$ —体系的溶剂化能, kJ/mol;

$E_{\text{PCM}}$ —溶剂状态下体系的单点能, kJ/mol;

$E_{\text{HF}}$ —真空状况下体系的单点能, kJ/mol。

### 1.3 AMB 与功能单体预聚体的核磁氢谱分析

参考 Farrington 等<sup>[17]</sup>的方法,将 AMB、不同功能单体及 AMB 与不同功能单体形成的预聚体均用氘代氯仿溶解(浓度均为 0.04 mol/L),经 Avance III HD 400 M 核磁共振波谱仪测定核磁氢谱。

### 1.4 MIPs 的制备

采用沉淀聚合法制备分子印迹聚合物<sup>[20]</sup>,称取一定量 AMB 和功能单体分散于致孔溶剂中,搅拌 1 h。加入一定量乙二醇二甲基丙烯酸酯和 144.5 mg (0.88 mmol) 偶氮二异丁腈,搅拌均匀后超声 10 min,充氮气 10 min,在 60 °C 的磁力搅拌水浴锅中密闭反应 24 h。所得聚合物用甲醇-乙酸溶液(体积比 9:1)洗脱,每 30 min 更换一次洗脱液直到检测不到模板分子,用甲醇和蒸馏水除去乙酸,60 °C 真空干燥,得到的白色粉末状聚合物即为 MIPs。非印迹聚合物(non-imprinted polymers, NIPs)的制备与 MIPs 相同,但不加入模板

分子。

### 1.5 正交试验

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design test

水平	试验因素		
	模板分子 用量/mmol	交联剂 用量/mmol	溶剂 用量/mL
1	0.50	10	40
2	1.00	20	50
3	1.50	30	60

根据对计算机模拟与波谱分析的研究结果以及单因素试验结果,进一步采用  $L_9(3^4)$  设计正交试验,其因素和水平设计如表 1 所示。

### 1.6 MIPs 的结构表征

#### 1.6.1 扫描电镜检测

用扫描电镜对最优条件下合成的 MIPs 以及 NIPs 进行形貌表征。将待测样品均匀涂覆在导电胶上,采用离子溅射仪对 MIPs 喷金,然后在室温下进行扫描电镜测试。

#### 1.6.2 比表面积与孔容孔径参数测定

MIPs 和 NIPs 的比表面积和孔容孔径采用 Gemini VII 2390 分析仪测量。样品在 110 °C 下脱气 24 h 后,采用氮吸附法进行参数测定<sup>[21]</sup>。

#### 1.6.3 红外光谱检测

采用 Vertex 70 傅里叶变换红外光谱仪对 CBZ 标准品、MIPs 和吸附 CBZ 后 MIPs 的化学结构进行表征,采用溴化钾压片法,将样品和 KBr 以 1:100 的质量比混合后研磨均匀,20 MPa 压力下压片得到薄片进行波谱扫描,扫描波数范围为 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[22]</sup>。

#### 1.6.4 热重分析

采用 Netzsch TG 209 F1 Libra 热重分析仪对 MIPs 和 NIPs 进行热重分析。在氮气保护下,将样品以 10 °C/min 的升温速率和 30 mL/min 的氮气流量从 30 加热至 600 °C 进行测试<sup>[23]</sup>。

### 1.7 MIPs 吸附性能的测定

#### 1.7.1 动态吸附曲线测定与吸附动力学分析

参考颜滕滕<sup>[24]</sup>的方法,分别称取 10 mg MIPs 和 NIPs,加入 100 mg/L 的 CBZ 标准品溶液 10 mL,在室温下,震荡不同时间间隔(10~240 min)。离心(6000 r/min, 10 min),测定上清液中 CBZ 的浓度。根据公式(3),计算其不同时间对应的吸附量。采用一级动力学反应模型公式(4)和二级动力学反应模型公式(5)

对 MIPs 的动态识别机制进行深入探讨。

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (3)$$

式中:

$Q$ —平衡时 MIPs 对分析物的吸附量, mg/g;

$C_0$ —分析物的初始浓度, mg/L;

$C_e$ —分析物的上清液终浓度, mg/L;

$V$ —加入吸附溶液的体积, L;

$m$ —加入 MIPs 的质量, g。

一级动力学反应模型公式:

$$\log(Q_{eq} - Q_t) = \log Q_{1cal} - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (4)$$

式中:

$Q_{eq}$ —MIPs 的平衡吸附量, mg/g;

$Q_t$ —MIPs 在不同时间下的吸附量, mg/g;

$Q_{1cal}$ —一级动力学模型理论吸附量, mg/g;

$k_1$ —一级动力学模型吸附速率常数;

$t$ —吸附时间, min。

二级动力学反应模型公式:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_2 Q_{2cal}^2} + \frac{t}{Q_{2cal}} \quad (5)$$

式中:

$Q_{2cal}$ —二级动力学模型理论吸附量, mg/g;

$k_2$ —二级动力学模型吸附速率常数。

### 1.7.2 静态吸附曲线测定与 Scatchard 分析

具体过程参照动态吸附实验,根据 1.7.1 部分实验结果固定吸附时间, CBZ 的浓度设定为 0.1~100 mg/L。根据公式 (3) 计算不同浓度对应的吸附量。通过公式 (6) 进行 Scatchard 方程分析<sup>[24]</sup>。

$$\text{Scatchard 方程: } \frac{Q}{C_e} = \frac{Q_{max} - Q}{K_D} \quad (6)$$

式中:

$Q_{max}$ —最大表现吸附量, mg/g;

$K_D$ —平衡常数。

### 1.7.3 苯并咪唑类杀菌剂广谱吸附实验

参考周刘梅<sup>[25]</sup>的方法,并稍作修改。称取 4 份 MIPs 10 mg, 分别加入 100 mg/L CBZ、噻菌灵、阿苯达唑和苯菌灵的标准溶液。于室温下震荡 2 h 后离心 (6000 r/min) 10 min, 根据式 (3)、(7) 和 (8) 计算 MIPs 对各底物的静态吸附量  $Q$  (mg/g)、静态分配系数  $K$  和印迹因子 IF。

$$K = \frac{C_p}{C_s} \quad (7)$$

式中:

$C_p$ —底物结合在 MIPs 上的浓度, mg/L;

$C_s$ —上清液中底物的浓度; mg/L。

$$IF = \frac{K_{MIPS}}{K_{NIPS}} \quad (8)$$

式中:

$K_{MIPS}$ —MIPs 的静态分配系数;

$K_{NIPS}$ —NIPs 的静态分配系数。

## 1.8 MIPs 固相萃取实验

MIPs 固相萃取柱的制备: 参考陈晓龙<sup>[26]</sup>的方法, 并稍作修改。称取 100 mg MIPs 作为固相萃取填料置于柱体积为 5 mL、底部有聚乙烯筛板的聚丙烯空柱中, 作为 MIPs 固相萃取小柱。

加标石斛多糖提取液的制备: 称取 3.0 g 新鲜石斛, 加入 80 mL 蒸馏水匀浆后沸水浴提取 30 min, 抽滤除去滤渣得到石斛多糖提取液。提取液中分别加入 2.0 mg CBZ、噻菌灵、阿苯达唑和苯菌灵, 加蒸馏水定容至 200 mL。

MIPs 固相萃取柱对农药的脱除: 控制抽气泵的压力为 15 MPa, 用 10 mL 乙腈活化分子印迹填料, 10 mL 加标石斛多糖提取液上样, 再用 10 mL 正己烷淋洗, 最后用 10 mL 甲醇-乙酸溶液 (9:1,  $V/V$ ) 进行洗脱, 分别收集上样流出液、淋洗流出液和洗脱液, 检测上样液与流出液中四种农药以及总糖的含量<sup>[27]</sup>, 计算农药脱除率以及总糖损失率。

## 1.9 数据统计分析

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行方差分析, 并用 Origin 9.1 对数据进行制图。显著性水平  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子印迹预聚体的模拟筛选

#### 2.1.1 功能单体种类及比例的筛选

分子印迹聚合过程中, 模板分子与功能单体形成预聚体的结合能  $\Delta E$  越低, 表明它们的相互作用越大, 形成的 MIPs 越稳定<sup>[28]</sup>。AMB 与各功能单体预聚体的最低能量构象见图 1, 不同聚合体的结合能见表 2。由表 2 可知, AMB 与 AA 之间相互作用最强, MAA、IA 次之。进一步选择 AA、MAA 和 IA, 筛选它们与 AMB 的最适比例。结果如图 2 所示, AMB-IA 预聚体的结合能较 AMB-MAA 和 AMB-AA 而言最低, 且在摩尔比为 1:2 时下降趋势最为明显, 说明 AMB-IA 预聚体摩尔比为 1:2 时合成的 MIPs 较稳定。

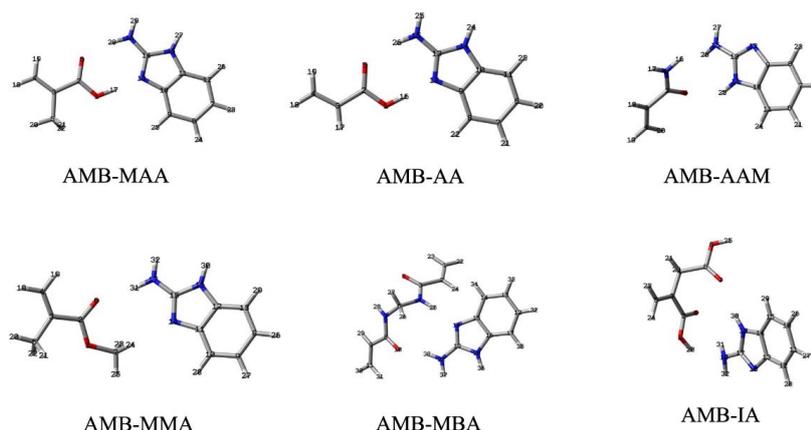


图 1 AMB 与功能单体的最低能量构象

Fig.1 Lowest energy conformation of AMB and functional monomer

表 2 AMB、功能单体以及预聚体的结合能

Table 2  $\Delta E$  of AMB, functional monomer and prepolymers

目标物类型	E/(a.u.)	$\Delta E$ /(a.u.)	$\Delta E$ /(kJ/mol)
2-氨基苯并咪唑 AMB	-432.34		
甲基丙烯酸 MAA	-304.56		
丙烯酸 AA	-265.53		
丙烯酰胺 AAM	-245.72		
甲基丙烯酸甲酯 MMA	-343.56		
N,N-亚甲基双丙烯酰胺 MBA	-529.29		
衣康酸 IA	-492.07		
AMB-MAA	-736.93	-0.034	-88.20
AMB-AA	-697.91	-0.034	-89.62
AMB-AAM	-678.08	-0.020	-52.30
AMB-MMA	-775.91	-0.014	-37.10
AMB-MBA	-961.66	-0.029	-75.34
AMB-IA	-924.44	-0.032	-82.64

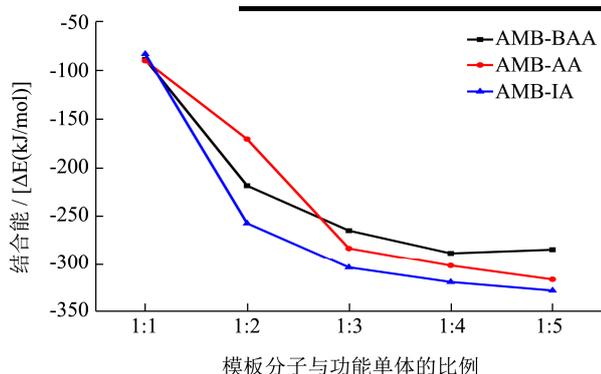


图 2 AMB 与不同功能单体在不同比例下的结合能

Fig.2  $\Delta E$  of AMB and different functional monomers at different ratios

### 2.1.2 致孔溶剂的筛选

AMB 与 MAA、AA 和 IA 形成的预聚体在氯仿、N,N-二甲基甲酰胺、乙腈和正己烷这 4 种常用致孔溶

剂中的溶剂化能如表 3 所示。其中， $\Delta E_{乙腈}$  最高，表明乙腈与各预聚体的相互作用最小，有利于提供较好的聚合环境。

### 2.2 预聚体核磁氢谱分析

核磁共振谱图中分子间相互作用的强弱反映在质子的化学位移变化上<sup>[29]</sup>。由图 3 可知，AMB 中 3 个质子 (A、B 和 C) 的峰位移大小为  $\delta_{AMB-IA} > \delta_{AMB-AA} > \delta_{AMB-MAA} > \delta_{AMB-AAM} > \delta_{AMB-MBA} > \delta_{AMB-MMA}$ 。表明 AMB 与 IA 的相互作用最强，形成的预聚体最稳定。这与计算机模拟结果相一致。FARRINGTON 等<sup>[17]</sup>通过核磁共振分析法结合计算机分子模拟，筛选制备咖啡因 MIPs 的最适致孔溶剂、功能单体及比例。两种预聚体筛选方法的结合有助于提高制备 MIPs 的效率，降低盲目性。

表 3 AMB 与功能单体复合物在不同溶剂中的溶剂化能

Table 3  $\Delta E$  between AMB and functional monomer complex in different solvents

溶剂	AMB-MAA		AMB-AA		AMB-IA	
	$\Delta E$ /(a.u.)	$\Delta E$ /(kJ/mol)	$\Delta E$ /(a.u.)	$\Delta E$ /(kJ/mol)	$\Delta E$ /(a.u.)	$\Delta E$ /(kJ/mol)
氯仿	-0.0261	-68.64	-0.0267	-70.00	-0.0351	-92.04
N,N-二甲基甲酰胺	-0.0235	-61.78	-0.0241	-63.16	-0.0171	-44.75
乙腈	-0.0235	-61.74	-0.0240	-63.11	-0.0170	-44.69
正己烷	-0.0298	-78.11	-0.0303	-79.46	-0.0254	-66.75

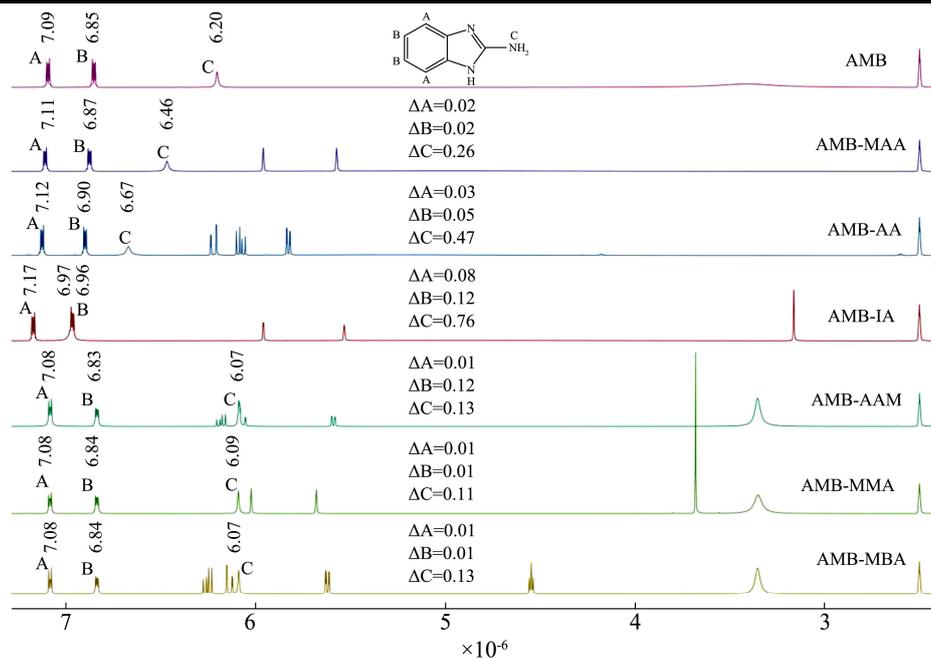


图 3 AMB 与 AMB-功能单体预聚体的核磁氢谱

Fig.3 NMR spectra of AMB and AMB-functional monomer prepolymers

表 4 正交试验方案及结果

Table 4 Results of orthogonal design

序号	模板分子用量 A	交联剂用量 B	溶剂用量 C	空白列	吸附量 Qe/(mg/g)
1	1	3	3	2	2.62
2	2	1	2	2	8.61
3	3	2	1	2	3.72
4	1	1	1	1	1.24
5	3	1	3	3	5.17
6	1	2	2	3	4.83
7	3	3	2	1	5.78
8	2	3	1	3	6.26
9	2	2	3	1	7.71
$k_1$	2.90	5.01	3.74	4.91	
$k_2$	7.53	5.42	6.41	5.42	
$k_3$	4.90	4.89	5.17	4.98	
极差 R	4.63	0.53	2.67	0.51	
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>		

主次顺序 A>C>B, 最优组合 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>

注:  $k_1$ - $k_3$  分别表示各因素各水平下值的总和。

### 2.3 正交试验结果

根据 AMB 与不同功能单体预聚体系的研究结果, 选择 IA 作为功能单体, 乙腈作为致孔溶剂, 固定 AMB 与 IA 的摩尔比为 1:2。根据前人研究表明<sup>[18]</sup>, 乙二醇二甲基丙烯酸甲酯 (EGDMA) 为常用交联剂, 由它制备出 MIPs 具有良好选择性。此外, 偶氮二异丁腈 (AIBN) 为常用引发剂, 故将 EGDMA 作为交联剂, AIBN 作为引发剂, 采用沉淀聚合法制备 MIPs。

以 MIPs 对代表性的苯并咪唑类杀菌剂 CBZ 的吸附量为评价指标, 对制备条件进行优化。由单因素试验结果可知, 固定 EGDMA 用量为 20 mmol, 乙腈用量为 50 mL 时, AMB 用量为 1 mmol 的条件下, MIPs 的吸附量最大, 为 7.58 mg/g; 固定 AMB 用量为 1 mmol, 乙腈用量为 50 mL 时, EGDMA 用量为 20 mmol 的条件下, MIPs 的吸附量最大, 为 8.47 mg/g; 固定 AMB 用量为 1 mmol, EGDMA 用量为 20 mmol 时, 乙腈用量为 50 mL 的条件下, MIPs 的吸附量最大, 为 7.53 mg/g。

表 5 正交试验方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal design results					
因素	偏差平方和	自由度	F 值	p 值	显著性
A	32.33	2	69.98	0.00	*
B	0.47	2	1.02	0.14	
C	10.68	2	23.11	0.00	*
误差	0.46	2			

注: \*代表差异显著,  $p < 0.05$ 。

在单因素试验基础上, 进一步通过正交试验优化 MIPs 的制备条件, 结果如表 4、5 所示。由极差分析可知, 最佳试验组合是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, 各因素对 MIPs 吸附性能的影响由大到小为模板分子用量>致孔溶剂用量>交联剂用量。方差分析也表明, 模板分子和致孔溶剂的用量对 MIPs 的吸附性能具有显著影响。李璐等<sup>[16]</sup>的研究表明, 适量的模板分子有助于形成选择性识别位点; 但模板分子过量则易产生自身缔结作用, 增加非特异性识别位点。Cormack 等<sup>[30]</sup>的研究表明致孔溶剂的用量不仅影响印迹效果, 还影响 MIPs 的物理形态 (如形貌状态、机械强度等)。也有学者研究表明, 交联剂用量不足, 会使印迹孔穴稳定性下降, 特异性吸附效率降低; 交联剂使用过量, 会使模板分子难以洗脱, 造成聚合物吸附量低<sup>[19]</sup>, 而本试验结果表明, 交联剂用量对 MIPs 的吸附性能没有显著影响。这可能是由于单因素试验已把交联剂用量缩小至合适范围内, 弱化了正交试验中交联剂用量对 MIPs 吸附性能的影响。

### 2.4 MIPs 的表征

#### 2.4.1 MIPs 的微观结构

MIPs 和 NIPs 的扫描电镜如图 4a 和图 4b 所示。MIPs 表面疏松多孔, 而 NIPs 团聚现象严重。MIPs 的比表面积为 203.40 m<sup>2</sup>/g, 孔容为 0.47 cm<sup>3</sup>/g, 孔径为 23.11 nm; NIPs 的比表面积为 134.62 m<sup>2</sup>/g, 孔容为 0.37 cm<sup>3</sup>/g, 孔径为 26.59 nm。MIPs 的孔径小于 NIPs, 但具有更大的比表面积和孔容, 这使 MIPs 比 NIPs 具有更好的特异性吸附能力<sup>[31]</sup>。

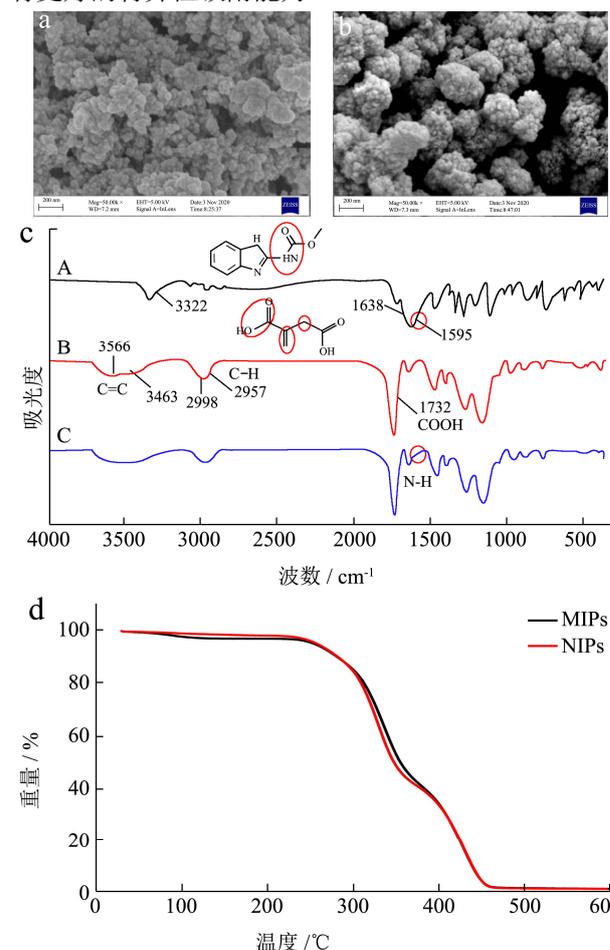


图 4 聚合物的形貌表征

Fig.4 Characterization of the polymers

注: a.分子印迹聚合物; b.非印迹聚合物; c. CBZ、MIPs 和吸附 CBZ 后的 MIPs 的傅里叶红外光谱 (A 为 CBZ; B 为 MIPs; C 为吸附 CBZ 后的 MIPs); d.热重分析。

#### 2.4.2 傅里叶红外光谱分析

由图 4c 可知。CBZ 中仲酰胺的特征吸收峰分别在 3322、1630 和 1595 cm<sup>-1</sup> 处。吸附 CBZ 后的 MIPs 在 1595 cm<sup>-1</sup> 处有仲胺-NH 的伸缩振动, 表明 CBZ 被成功吸附在 MIPs 上。MIPs 和吸附 CBZ 后的 MIPs 的谱图上均有 IA 结构中 3564 和 3453 cm<sup>-1</sup> 处 C=C 的特征吸收峰, 2990 和 2957 cm<sup>-1</sup> 处 C-H 的特征吸收峰以

及 1730  $\text{cm}^{-1}$  处 C=O 的特征吸收峰, 表明功能单体 IA 成功接枝在了 MIPs 上。

### 2.4.3 热重分析

由图 4d 可知, 当温度低于 240  $^{\circ}\text{C}$  时, MIPs 与 NIPs 没有明显的质量损失。表明 MIPs 有良好的热稳定性, 对应用环境具有较好的耐受性。

## 2.5 MIPs 的吸附性能

### 2.5.1 动态吸附实验及动力学分析

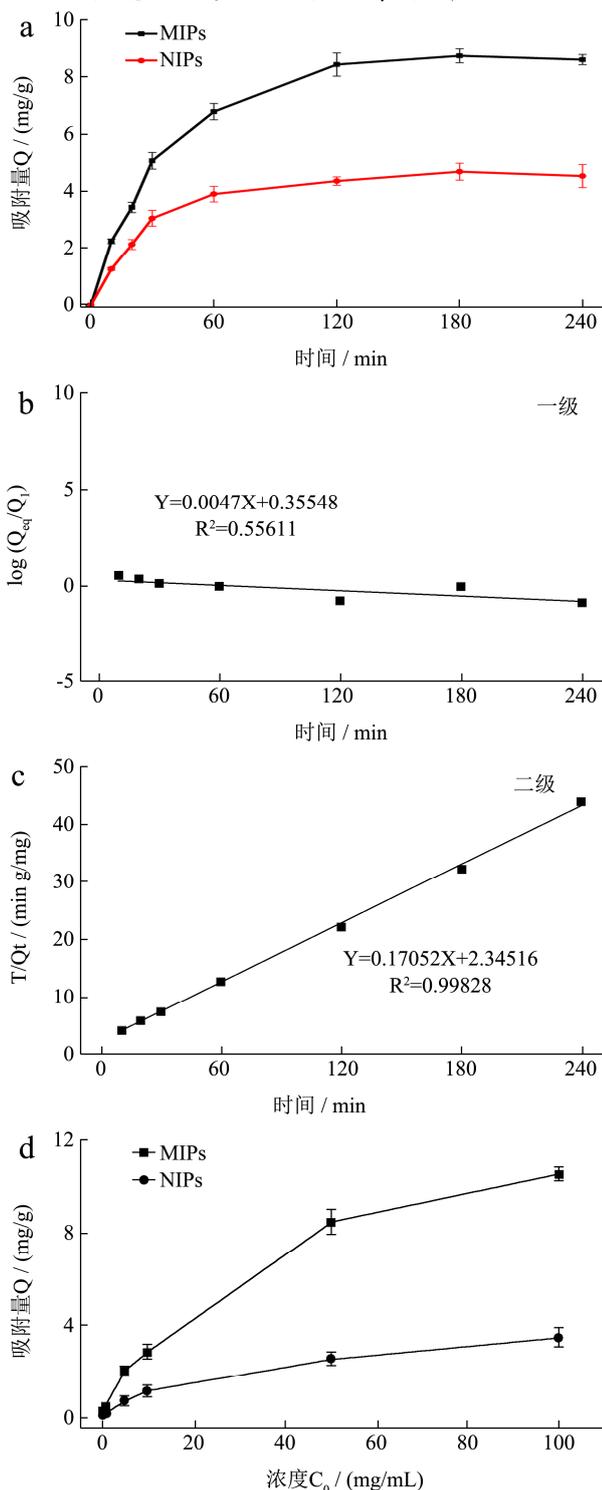


图 5 聚合物的吸附性能

Fig.5 Adsorption properties of polymers

注: a.MIPs 和 NIPs 对 CBZ 的动态吸附曲线; b.MIPs 对 CBZ 的一级吸附动力学曲线; c.MIPs 对 CBZ 的二级吸附动力学曲线; d.MIPs 和 NIPs 对 CBZ 的静态吸附曲线; e.MIPs 的 Scatchard 方程曲线; f.MIPs 的选择性吸附

由图 5a 可知, MIPs 对 CBZ 的吸附量在 120 min 内达到平衡。因此, 后续实验中 MIPs 的吸附时间为 120 min。静态平衡吸附量  $Q$  为 8.87 mg/g, 明显高于 Farooq 等<sup>[12]</sup>以  $\beta$ -环糊精作为功能单体, 二甲基亚砜为致孔溶剂合成的 MIPs 对 CBZ 的吸附量 3.65 mg/g 以及 Raif 等<sup>[13]</sup>以甲基丙烯酸为功能单体, N,N-二甲基甲酰胺为致孔溶剂合成的 MIPs 对 CBZ 的吸附量  $2.31 \pm 0.63$  mg/g。其原因可能是合成 MIPs 所选的功能单体和溶剂的种类及用量不同, 合成的 MIPs 上特异性识别位点和数量上有差异, 导致吸附量的明显差异。由图 5b 和图 5c 可知, 准二级动力学方程的  $R_2^2$  远高于准一级动力学方程的  $R_1^2$ , 理论吸附量分别为  $Q_{1cal}=2.27$  mg/g,  $Q_{2cal}=8.58$  mg/g。二级动力学模型的理论吸附量  $Q_{2cal}$  更接近于实验值, 说明 MIPs 对 CBZ 的吸附过程更符合二级动力学模型。

### 2.5.2 静态吸附实验及 Scatchard 分析

由图 5d 可知, MIPs 相对于 NIPs 对 CBZ 有更好的吸附性。Scatchard 分析如图 5e 所示,  $Q/Ce$  对  $Q$  并不存在线性关系, 但两端可拟合出较好的线性。有学者推测左端直线可能代表高特异性、高亲和力结合位点, 右端直线可能代表低亲和力、低选择性结合位点

[24]。对两端线性部分进行拟合,得到的解离常数分别为  $K_{D1}=3.40$  mg/L 和  $K_{D2}=28.60$  mg/L, 对应的最大表观吸附量分别为  $Q_{max1}=4.18$  mg/g 和  $Q_{max2}=14.00$  mg/g。

### 2.5.3 MIPs 的选择性吸附

MIPs 和 NIPs 对所选的苯并咪唑类杀菌剂 CBZ、噻菌灵、阿苯达唑和苯菌灵的静态吸附量如图 5f 所示。 $Q_{多菌灵}=8.87$  mg/g、 $Q_{噻菌灵}=5.89$  mg/g、 $Q_{阿苯达唑}=6.26$  mg/g、 $Q_{苯菌灵}=7.06$  mg/g。说明 MIPs 除了对 CBZ 有较高的吸附性,对苯并咪唑结构类似物也具有较好的吸附广谱性。此外, MIPs 对各底物的印迹因子分别为  $IF_{多菌灵}=2.89$ 、 $IF_{噻菌灵}=2.29$ 、 $IF_{阿苯达唑}=1.93$ 、 $IF_{苯菌灵}=2.59$ , 表明对苯并咪唑类杀菌剂而言, MIPs 相比于 NIPs 有明显的印迹效果。

### 2.6 MIPs 的固相萃取

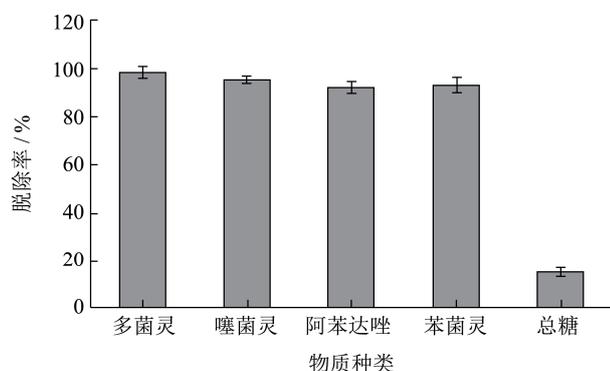


图 6 MIPs 固相萃取柱对加标石斛多糖提取液中物质的脱除率

Fig.6 Removal rate of substances in the extraction of *Dendrobium polysaccharide* by MIPs solid phase extraction column

石斛是一种药食同源的兰科植物,其多糖含量较高,是石斛药理学活性的主要作用因子<sup>[32]</sup>。多菌灵是石斛种植过程中使用最多的农药之一<sup>[33]</sup>。因此,使用加标石斛多糖提取液作为样液,检测 MIPs 固相萃取柱对加标石斛多糖提取液中四种苯并咪唑类杀菌剂的脱除率以及总糖的脱除率(损失率)。结果如图 6 所示, MIPs 固相萃取柱对四种杀菌剂均有较好的脱除效果,脱除率分别为 CBZ 98.46%、噻菌灵 95.03%、阿苯达唑 92.10%以及苯菌灵 96.31%。此外,对加标石斛多糖提取液中总糖的脱除率(损失率)为 14.94%。表明 MIPs 作为固相萃取的吸附填料,可以有效地脱除石斛水提液中苯并咪唑类杀菌剂,而对其总糖的损失较小。

## 3 结论

3.1 与 AMB 相互作用最强的功能单体是 IA, AMB 与 IA 最适的摩尔比为 1:2, 对预聚体影响最小的致孔剂为乙腈。通过 Gaussian 软件模拟和核磁氢谱进行预聚体

系筛选为 MIPs 合成提供科学指导,缩短了试错周期,降低了试错成本。

3.2 模板分子和致孔剂的用量对合成的 MIPs 的吸附性能有显著影响,合成 MIPs 的最佳制备条件为 AMB 用量 1 mmol, 交联剂用量 20 mmol, 乙腈用量 50 mL。该条件下制备的 MIPs 吸附能力最强。

3.3 制备的 MIPs 动态吸附平衡时间为 120 min, 吸附过程符合二级动力学反应模型。对 CBZ 的静态平衡吸附量  $Q$  为 8.87 mg/g, 印迹因子  $IF$  为 2.89。MIPs 不仅对 CBZ 具有良好的特异性吸附能力,对其它苯并咪唑类杀菌剂噻菌灵、阿苯达唑和苯菌灵也具有较好的吸附广谱性。故可进一步将其作为脱除苯并咪唑类农药残留的吸附填料。

3.4 以 MIPs 作为填料的固相萃取柱,对加标石斛多糖提取液中四种苯并咪唑类杀菌剂具有较好的脱除效果,脱除率均达 92% 以上,且对多糖类活性物质影响较小(总糖损失为 14.94%)。

## 参考文献

- [1] Francisco Fernandez M, Charfi C, Piloto-Ferrer J, et al. Targeting ovarian cancer cell cytotoxic drug resistance phenotype with *Xanthium strumarium* L. extract [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019: 1-13
- [2] Yu Y, Zhang Y, Wang S, et al. Inhibition effects of patchouli alcohol against influenza a virus through targeting cellular PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling pathways [J]. Virology Journal, 2019, 16(1): 163
- [3] Pan L, Ma X K, Zhao P F, et al. Weeping forsythia extract alleviates dexamethasone-induced oxidative injury of breast muscles in broilers [J]. Animal, 2019, 13(11): 2660-2668
- [4] 任琰,钟根秀,于婧怡.出口植物提取物质量安全现状及监管对策[J].浙江农业科学,2016,57(12):1956-1959  
REN Yan, ZHONG Gen-xiu, YU Jing-yi. Status quo of quality and safety of export plant extracts and countermeasures of supervision [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2016, 57(12): 1956-1959
- [5] 刘佳悦,徐军,董丰收,等.中草药中禁用农药残留限量标准及分析方法研究进展[J].现代农药,2020,19(5):1-8,35  
LIU Jia-yue, XU Jun, DONG Feng-shou et al. Research progress on residues limits standards and analysis methods of banned and restricted pesticides in herbal medicines [J]. Modern Agrochemicals, 2020, 19(5): 1-8, 35
- [6] 孙丽华,周彦刚.反相离子对 HPLC 法测定中药材中苯并咪唑类农药残留的研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(1):6-7,57

- SUN Li-hua, ZHOU Yan-gang. Determination of residual benzimidazole in medicinal plants by reverse phase ion pair high-performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(1): 6-7, 57
- [7] 张萍,李宁新,李明华,等.2019年全国中药材及饮片质量分析报告[J].中国现代中药,2020,22(5):663-671
- ZHANG Ping, LI Ning-xin, LI Ming-hua et al. Report of supervision and quality of Chinese materia medica and decoction pieces in 2019 [J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(5): 663-671
- [8] Ma X, Ji W, Chen L, et al. Molecularly imprinted polymers with synthetic dummy templates for the preparation of capsaicin and dihydrocapsaicin from chili peppers [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(1): 100-107
- [9] 赵风年.基于磁性纳米分子印迹技术的三唑类农药多残留检测方法研究[D].北京:中国农业科学院,2017
- ZHAO Feng-nian. Study on the multi-residues detection of triazole pesticides based on magnetic nano molecularly imprinted technology [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017
- [10] Ge S, Lu J, Ge L, et al. Development of a novel deltamethrin sensor based on molecularly imprinted silica nanospheres embedded CdTe quantum dots [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79(5): 1704-1709
- [11] Shi X, Liu J, Sun A, et al. Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1227: 60-66
- [12] Farooq S, Nie J, Cheng Y, et al. Selective extraction of fungicide carbendazim in fruits using  $\beta$ -cyclodextrin based molecularly imprinted polymers [J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(6): 1145-1153
- [13] İlkaç R, Aksuner N, Henden E. Selective and sensitive fluorimetric determination of carbendazim in apple and orange after preconcentration with magnetite-molecularly imprinted polymer [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 174: 86-93
- [14] Huang X, Zhang W, Wu Z, et al. Computer simulation aided preparation of molecularly imprinted polymers for separation of bilobalide [J]. Journal of Molecular Modeling, 2020, 26(8): 198
- [15] Marć M, Kupka T, Wiczorek P P, et al. Computational modeling of molecularly imprinted polymers as a green approach to the development of novel analytical sorbents [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 98: 64-78
- [16] 李璐,周刘梅,解新安,等.溴氰菊酯农药残留检测的分子印迹预聚体系筛选及吸附性能[J].农业工程学报,2019,35(1):269-277
- LI Lu, ZHOU Liu-mei, XIE Xin-an, et al. Screening of molecularly imprinted pre-assembly system for detection of deltamethrin pesticide residues and its specific adsorption properties [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2019, 35(1): 269-277
- [17] Farrington K, Magner E, Regan F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 566(1): 60-68
- [18] 杨文明.表面分子印迹聚合物的制备与性能研究及计算机辅助设计[D].镇江:江苏大学,2013
- YANG Weng-ming. Preparation and properties research of surface molecularly imprinted polymers and computer-assisted design [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2013
- [19] 陈晓龙,李耀,阚建全.花椒麻味物质分子印迹预组装体系的分子模拟与吸附性能[J].中国食品学报,2019,19(5):76-84
- CHEN Xiao-long, LI Yao, KAN Jian-quan. Molecular simulation and adsorption properties of the molecularly imprinted polymer of numb-taste components [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(5): 76-84
- [20] 郑亚丽.氯磺隆分子印迹聚合物的合成及其在烟叶农药残留分析中的应用[D].昆明:昆明理工大学,2017
- ZHENG Ya-li. Synthesis of chlorsulfuron molecularly imprinted polymer and its application in the analysis of pesticide residues in tobacco leaves [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2017
- [21] Suenaga S, Osada M. Preparation of  $\beta$ -chitin nanofiber aerogels by lyophilization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 1145-1149
- [22] Su J, Sun Y, Li Z, et al. Effect of tannic acid on lysozyme activity through intermolecular noncovalent binding [J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2019, 1: 100004
- [23] 张梦晓.烟叶中三嗪类农残的分子印迹固相萃取检测技术及应用[D].昆明:昆明理工大学,2017
- ZAHNG Meng-xiao. Molecularly imprinted solid phase extraction detection technology and application of triazine pesticide residues in tobacco leaves [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2017
- [24] 颜朦朦.基于分子印迹-表面增强拉曼散射的农药残留分析

- 方法研究[D].北京:中国农业科学院,2019
- YAN Meng-meng. Research on detection of pesticide residues based on molecular imprinting-surface enhanced Raman scattering [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2019
- [25] 周刘梅. 溴氰菊酯分子印迹聚合物的制备与性能研究[D]. 广州:华南农业大学,2018
- ZHOU Liu-mei. Study on preparation and performance of molecularly imprinted polymer of deltamethrin [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018
- [26] 陈晓龙. 花椒麻味物质分子印迹纯化技术的研究及应用[D]. 重庆:西南大学,2018
- CHEN Xiao-long. Research and application of molecularly imprinted purification technology for zanthoxylum [D]. Chongqing: Southwest University, 2018
- [27] Dubois M, Gilles K, Hamilton J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. Nature, 1951, 168(4265): 167
- [28] Bakas I, Oujji N B, Moczko E, et al. Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1274: 13-18
- [29] O Mahony J, Molinelli A, Nolan K, et al. Towards the rational development of molecularly imprinted polymers:  $^1\text{H}$  NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20(9): 1884-1893
- [30] Cormack P A G, Elorza A Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 804(1): 173-182
- [31] 张连科,刘心宇,王维大,等. 油料作物秸秆生物炭对水体中铅离子的吸附特性与机制[J]. 农业工程学报,2018,34(7):218-226
- ZHANG Lian-ke, LIU Xin-yu, WANG Wei-da, et al. Characteristics and mechanism of lead adsorption from aqueous solutions by oil crops straw-derived biochar [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(7): 218-226
- [32] 杨虹,王顺春,王峥涛,等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药理学杂志,2004,39(4):254-256
- YANG Hong, WANG Shun-chun, WANG Zheng-tao, et al. Structural analysis of polysaccharides from *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2004, 39(4): 254-256
- [33] 陈福艺. 安全优质的铁皮石斛种植技术的筛选研究[D]. 昆明: 云南中医学院,2018
- CHEN Fu-yi. Screening research on the planting technique of safe and high-quality *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [D]. Kunming: Yunnan University of Chinese Medicine, 2018

(上接第 179 页)

- [22] 王建华,卫亚丽,文宗河. 蛋白质结构的 FT-IR 研究进展[J]. 化学通报,2004,67(7):12-16
- WANG Jian-hua, WEI Ya-li, WEN Zong-he. Advances in application of FT-IR to the research of protein structure [J]. Chemistry Bulletin, 2004, 67(7): 12-16
- [23] Susi H, Byler D M. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes [J]. Method Enzymol, 1986, 130: 290-311
- [24] L I Khomutova, N A Lasheka, N M Ptitchkina, et al. Temperature-composition phase diagram and gel properties of the gelatin-starch-water system [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 28(4): 341-345
- [25] Kuijpers A J, Engbers G H M, Feijen J, et al. Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels [J]. Macromolecules, 1999, 32(10): 3325-3333
- [26] 孙哲浩. 明胶与卡拉胶共凝胶体的热力学特性及微观结构的研究[J]. 现代食品科技,2008,24(7):649-651,663
- SUN Zhe-hao. Thermodynamic properties and microstructure of gelatin-carrageenan co-gels [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(7): 649-651, 663