

申请号 21110801105

密 级 _____

河南科技学院

硕士学位论文

高磁性吸附萃取搅拌棒的制备及在食品分析中的应用

学科专业：农产品加工及贮藏工程

研究方向：食品营养与安全

申请人姓名：刘坤峰

导师姓名：张裕平 教授

导师团队：魏新军 教授

李 波 教授

二〇一四年六月

独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。除文中特别加以标注和致谢的地方外，文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果，也不包括为河南科技学院或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料，对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做了明确的说明，并表示了谢意。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：刘坤峰

日期：2014年6月16日

导师签名：

日期：2014年6月19日

学位论文使用授权声明

本人完全了解河南科技学院有关保留、使用学位论文的规定，即学生必须按学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本，学校有权保留提交论文的印刷本和和电子本，允许论文被查阅和借阅。本人授权河南科技学院可以将本学位论文的全部或部分编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或者其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该学位论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为河南科技学院。

注：保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名：刘坤峰

日期：2014年6月16日

导师签名：

日期：2014年6月19日

**The preparation of high magnetic stir bar sorptive
extraction and application in food analysis**

A Dissertation Submitted
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Agronomy

Candidate: Liu Kunfeng
Supervisor: Prof. Zhang Yuping

Henan Institute of Science and Technology
June, 2014

摘 要

分子印迹技术具有专一选择性和特异识别性等优点,可以对分子结构类似的几种物质实现有效的分离,已广泛应用到食品安全、环境保护及生物技术等领域的检测分析,且应用前景广阔。近年来,固相微萃取和搅拌棒吸附萃取作为样品预处理技术已应用于环境样品、生物样品和食品检测等领域。本文主要制备了一系列的磁性搅拌棒和一种不锈钢丝固相微萃取头,并将它们用于食品样品分析中。

1. 采用原位聚合法将修饰过的磁粉与(甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯)(MAA-EDMA)材料结合,制备出了吸附萃取搅拌棒。系统考察了萃取溶剂、萃取时间、解吸时间和盐浓度等实验条件对萃取效率的影响。在优化条件下,用高效液相色谱法测定了水样中的邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)。结果表明,加标水样中的 DBP、DMP、DEP 的回收率分别为 89.2%~92.1%、91.9%~96.6%和 94.3%~96.7%;线性范围为 5 -800 $\mu\text{g/L}$;检出限为 93-210 ng/L 。

2. 将修饰过的钕铁硼磁粉和双酚 A 的印迹溶液装入玻璃管(60 × 4 mm)中,通过热聚合制备了一种新颖的分子印迹整体式搅拌棒。系统考察了萃取时间、解吸时间、pH 和盐浓度对萃取效率的影响。结果表明:在所得的最优条件下,将分子印迹吸附萃取搅拌棒(MIP-SBSE)与高效液相色谱(HPLC)联用测定了矿泉水中的双酚 A、对羟基联苯、苯酚。在三个加标水平上,BPA, PP 和 P 的回收率分别为 88.5-96.1%, 78.2-89.7%, 81.3-89.5%。

3. 采用高磁性超顺材料钕铁硼磁粉作为磁性供体,以孔雀石绿(MG)为模板、 α -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂,利用原位聚合法制备了新型整体式分子印迹吸附萃取搅拌棒,并与 HPLC 联用测定了鱼饲料中的孔雀石绿。考察了萃取溶剂、吸附和解吸时间、pH 值和盐浓度对目标化合物的萃取性能的影响。结果表明:在所得的最优条件下,MIP-SBSE 可对模板分子进行有效的选择性吸附,线性范围为 10-500 $\mu\text{g/L}$;检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$,用该方法对鱼饲料中的孔雀石绿进行分析测定,测得加标回收率为 87.5%-94.0%。

4. 采用原位聚合法在经修饰的不锈钢丝表面键合(甲基丙烯酸丁酯-乙二醇二甲基丙烯酸酯)(BMA-EDMA)材料,制作了不锈钢丝固相微萃取(SPME)纤维,与 HPLC 联用测定了豆腐乳中的苏丹红 I、II、III。系统考察了萃取时间、解吸时间、盐浓度等

实验条件对萃取效率的影响，建立了测定豆腐乳中苏丹红的 SPME-HPLC 方法。实验结果表明，方法的柱内（n=3）和柱间（n=6）精密度（RSD）分别小于 9.19%和 16.48%，实际样品的加标回收率在 79.54%~86.37%之间；3 种苏丹红化合物的线性范围为 50~900 $\mu\text{g/L}$ ，线性相关系数 $r^2 > 0.9232$ ，检出限在 0.303 $\mu\text{g/L}$ ~1.808 $\mu\text{g/L}$ 之间。

关键词：分子印迹，高效液相色谱，固相微萃取，吸附萃取搅拌棒，邻苯二甲酸丁酯，双酚 A，孔雀石绿

ABSTRACT

Molecular imprinting technology has the advantages of specific selectivity and specific identification, which the compounds with similar structure can be effectively separated, so it has been widely applied to food safety, environmental protection and biological technology, and application prospect is broad. In recent years, solid phase microextraction(SPME) and stir bar sorptive extraction(SBSE) as sample pretreatment technology has been applied in environmental samples, biological samples and food testing and other fields. This paper mainly prepared a series of magnetic stir bar and a kind of steel fiber and used them to pretreat some food samples, coupled with high performance liquid chromatography(HPLC).

1. A novel monolithic stir bar based on molecularly imprinted polymer (MIP) was firstly developed by filling modified neodymium magnet ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$) powders into a glass tube (60×4 mm), followed by the imprinted grafting with bisphenol A (BPA) as the template molecule by thermal polymerization. The experimental conditions of MIP-SBSE, such as, extraction time, desorption time, pH and salt concentration were optimized. Under the optimal extraction conditions, a simple method based on the coupling of MIP-SBSE with HPLC was used for the selective determination of the model mixtures of BPA, 4-phenylphenol (PP) and phenol (P) in bottled water. The recoveries of BPA, PP and P were in the range of 88.5-96.1%, 78.2-89.7%, 81.3-89.5% at three spiked levels, respectively.

2. The new matrix of $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ powders with high magnetic and super paramagnetic property was used as a muddler magnetic supply in order to prepare sorptive extraction stir bars based on the molecular imprinting technique. It was carried out by a stepwise polymerization using malachite green (MG) as template, methacrylic acid (MAA) as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross linking agent. The experimental conditions such as extraction and desorption time, pH value and concentration of salt were optimized in SBSE process. It was successfully applied to the pretreatment and analysis of MG by HPLC in real samples. The experimental results indicated that under the optimized experimental conditions, the method showed good linearity in the range of 10-500 $\mu\text{g/L}$ with a detection limit of 0.10 $\mu\text{g/L}$ for MG and a spiked recovery in the range of 87.5%-94.0%.

3. An in-situ polymerization method was used in the preparation of a novel SPME coating, where butyl methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate (BMA-EDMA) was directly bonded to the surface of a modified stainless steel wire. Coupled to HPLC, the prepared coating was applied to the extraction and

determination of sudan I —III dyes in fermented bean curd. The experimental conditions of SPME, such as extraction time, desorption time and salt concentration were optimized. As a result, the run-to-run (n=3) and fiber-to-fiber (n=6) relative standard deviations of this method were lower than 9.19% and 16.48%, respectively; and the recoveries of Sudan I —III dyes were in the range of 79.54%~86.37%; the linear relationships between the concentration 50 µg/L and 900 µg/L for Sudan I —III dyes were obtained ($r^2 > 0.9232$); the limits of detection ranged from 0.303 µg/L to 1.808 µg/L in the optimal conditions.

4. An in-situ polymerization method was used in the preparation of a novel SBSE, where α -methyl acrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate (MAA-EDMA) was directly bonded to the surface of modified Magnetic powder. The experimental conditions of SBSE, such as extraction solvent, extraction time, desorption time and salt concentration were optimized. Coupled to HPLC, the prepared stir bar sorptive extraction was applied to the extraction and determination of plasticizers in water sample.. As a result, the recoveries of DBP, DMP and DEP were 89.2%~92.1%, 91.9%~96.6% and 94.3%~96.7%, respectively; the linear relationships between the concentration 5 µg/L and 800 µg/L for DBP were obtained; the limits of detection ranged from 0.09 µg/L to 0.21 µg/L in the optimal conditions.

KEY WORDS: molecular imprinting, high performance liquid chromatography, solid phase microextraction, stir bar sorptive extraction, DBP, bisphenol A, beverage, malachite green

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
第一章 绪论	1
1.1 分子印迹技术.....	1
1.1.1 分子印迹技术的原理.....	1
1.1.2 分子印迹聚合物的制备.....	2
1.1.3 分子印迹技术的应用.....	3
1.2 固相微萃取和搅拌棒吸附萃取.....	3
1.2.1 固相微萃取.....	4
1.2.2 搅拌棒吸附萃取技术.....	5
1.3 课题的研究意义与研究内容.....	6
1.3.1 研究意义.....	6
1.3.2 研究内容.....	7
第二章 磁力搅拌棒前处理水样中塑化剂的研究	9
2.1 引言.....	9
2.2 实验部分.....	9
2.2.1 试剂与仪器.....	9
2.2.2 搅拌棒的制备过程.....	10
2.2.4 磁力搅拌棒电镜表征.....	11
2.2.5 SBSE 过程.....	11
2.2.6 HPLC 检测条件.....	11
2.2.7 样品预处理.....	11
2.3 结果与讨论.....	11
2.3.1 搅拌棒的表征.....	12
2.3.2 SBSE 过程的优化.....	12
2.3.3 搅拌棒的吸附曲线.....	15
2.3.4 重现性.....	16
2.3.5 线性范围与检出限.....	16
2.3.6 实际样品测定.....	16
第三章 双酚 A 分子印迹磁性吸附搅拌棒的应用	19
3.1 引言.....	19
3.2 实验部分.....	19

3.2.1	试剂与仪器.....	19
3.2.2	BPA MIP-SBSE 的制备.....	20
3.2.3	双酚 A MIP 的表征.....	21
3.2.4	HPLC 检测条件.....	21
3.3	结果与讨论.....	21
3.3.1	MIP-SBSE 的扫描电镜表征.....	21
3.3.6	线性范围与检出限.....	26
3.3.7	实际样品测定.....	27
3.4	本章小结.....	28
第四章	应用分子印迹磁性搅拌棒检测鱼饲料中的孔雀石绿.....	29
4.1	引言.....	29
4.2	实验部分.....	29
4.2.1	试剂与仪器.....	29
4.2.3	萃取头的表征.....	31
4.2.4	HPLC 检测条件.....	31
4.2.5	样品预处理.....	31
4.3	结果与讨论.....	32
4.3.1	配方的优化.....	32
4.3.2	MIP-SBSE 的扫描电镜表征.....	32
4.3.3	SPME 过程优化.....	33
4.3.4	MIP-SBSE 的选择性.....	34
4.3.5	MIP 和 NIP 吸附饱和曲线.....	35
4.3.6	线性范围、检出限及重现性.....	36
4.3.7	实际样品测定.....	36
4.4	本章小结.....	38
第五章	涂覆型不锈钢丝固相微萃取—高效液相色谱联用.....	39
测定豆腐乳中的苏丹红.....		39
5.1	引言.....	39
5.2	实验部分.....	39
5.2.1	试剂与仪器.....	39
5.2.2	不锈钢丝固相微萃取头的制备.....	40
5.2.3	萃取头的表征.....	41
5.2.4	SPME-HPLC 分析.....	41
5.2.5	HPLC 检测条件.....	41

5.3 结果与讨论.....	41
5.3.1 涂层的表征.....	41
5.3.2 萃取条件的优化.....	42
5.3.3 线性范围、精密度和检出限.....	43
5.3.4 实际样品测定.....	44
5.4 本章小结.....	44
第六章 全文总结与展望.....	45
6.1 全文总结.....	45
6.2 创新点.....	46
6.3 展望.....	46
参考文献.....	47
致 谢.....	57
攻读学位期间取得的研究成果目录.....	59

英文缩略表及中文对照

缩略词	英文全称	中文全称
MIT	Molecular imprinting technique	分子印迹技术
MIP	Molecular imprinted polymer	分子印迹聚合物
SPME	Solid phase microextraction	固相微萃取
MIP-SBSE	Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction	分子印迹吸附萃取搅拌
DBP	Dibutyl phthalate	邻苯二甲酸二丁酯
DMP	Dimethyl phthalate	邻苯二甲酸二甲酯
DEP	Diethyl phthalate	邻苯二甲酸二乙酯
BPA	Bisphenol A	双酚 A
PHE	Phenol	苯酚
P-HP	4-Phenylphenol	对羟基联苯
DOP	Dioctyl phthalate	邻苯二甲酸二辛酯
MAA	α -Methacrylic acid	α -甲基丙烯酸
EDMA	Ethylene dimethacrylate	乙二醇二甲基丙烯酸酯
AIBN	Azodiisobutyronitrile	偶氮二异丁腈
NIP	Non-imprinted polymer	空白印迹聚合物
PLS	Poly(styrene/divinylbenzene)	聚苯乙烯/二乙烯基苯
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
SBSE	Stir bar sorptive extraction	吸附萃取搅拌棒
AA	Acetic acid	乙酸
EA	Ethyl acetate	乙酸乙酯
ACN	Acetonitrile	乙腈

RSD	Relative standard deviation	相对标准偏差
LOD	Limit of detection	检出限
MG	Malachite Green	孔雀石绿
LMG	Leucomalachite Green	隐形孔雀石绿
CV	Crystal Violet	结晶紫

第一章 绪论

“民以食为天，食以安为先”。食品安全直接影响到人类的身体健康和生命安全，其重要性不言而喻。近年来，食品安全问题日益受到人们的关注。食品中非法添加剂的使用以及农药、兽药残留等一系列的问题层出不穷，给我们带来危害。于是，各国政府开始积极出台相关的法律政策，并着力研究开发新的、快速、高效、准确的检测方法来应对实际需要。由于食品样品种类繁多，且基质复杂，于是给食品分析检测造成很大的困难，因此，样品前处理技术就成为关键。本课题针对固相微萃取和吸附萃取搅拌棒技术与分子印迹技术相结合对食品样品有害物质的分析检测进行了研究。

1.1 分子印迹技术

分子印迹技术 (Molecular imprinting technique, MIT) 又称分子印记技术，起源于免疫学，是一种新兴的分子识别技术，属于超分子化学范畴，通过 MIT 合成的对模板分子有特异选择性的分子印迹聚合物具有结构可控、较高的机械强度、亲和性高和选择性好等优点。其发展史可追溯到 20 世纪 40 年代，Pauling 提出了以抗原为模板来合成抗体的想法，1949 年，Dickey 提出了“专一性吸附”这一概念，但没有得到人们的足够的重视。1972 年 Wulff^[3] 小组首次报道制备出共价型分子印迹聚合物之后，才使分子印迹技术的研究有了迅猛的发展，直到 20 世纪 80 年代，Mosbach^[4] 在《Nature》发表了有关合成非共价型茶叶碱分子印迹聚合物的报道之后，使分子印迹技术有了新的发展方向，自此成为 21 世纪超分子领域研究的热点。

1.1.1 分子印迹技术的原理

分子印迹聚合物 (Molecularly Imprinted Polymer, MIP) 的合成试剂主要包括模板分子、功能单体、交联剂、致孔剂、引发剂，其基本合成原理如图 1-1 所示。MIPs 的制备过程如下：将印迹分子与功能单体在置于适当的溶剂中，通过共价键或非共价键作用，结合成一种可逆的化合物或配合物；然后加入交联剂和引发剂，在一定条件下交联剂和功能单体共聚成具有一定刚性的高分子共聚物；最后利用化学或物理的方法将印迹分子从聚合物中洗脱出来，这样就得到了一个在空间结构上与模板分子完全匹配，并含有与模板分子专一结合的功能基团的三维空穴。该孔穴对模板分子具有特异识别功能，它能够对混合液中的模板分子进行有效识别，进而达到分离富集模板分子的目的。

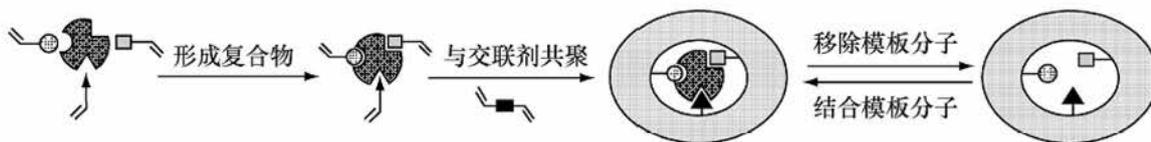


图 1-1 分子印迹聚合物制备原理图

Figure1-1 Schematic representation of the preparation of molecularly imprinted polymer

1.1.2 分子印迹聚合物的制备

分子印迹技术的核心是分子印迹聚合物，近年来，分子印迹聚合物的制备方法有了很大的进展，目前，MIP 的制备方法通常有本体聚合^[5,6]、原位聚合^[7-9]、沉淀聚合^[10,11]、溶胀悬浮聚合^[12-14]和表面分子印迹法^[15,16]等。其各自的制备工艺及优缺点见表 1-1。

表 1-1 分子印迹聚合物的制备方法

Table1-1 Preparation of molecularly imprinted polymer

方法名称	制备工艺	优点	缺点
本体聚合	将模板分子、功能单体、交联剂与引发剂按比例溶于适当溶剂中，脱气密封后经热引发或光引发得块状聚合物，再研磨、筛分，除去模板分子，干燥即得	该方法成熟，普适性强；实验条件要求不高；所制备的 MIP 对模板分子有较高的识别性能	研磨与筛分费时费力，易破坏印迹位点；聚合物粒径不均匀；内部模板分子不易洗脱
原位聚合	直接将模板分子、功能单体、交联剂及引发剂和溶剂装在色谱柱或管内合成聚合物	操作过程简单；具有较高的渗透性；柱子寿命长，可避免 MIP 从毛细管内壁上脱落	聚合反应程度不易控制；模板分子较难洗脱等问题
沉淀聚合	将模板分子、功能单体、交联剂及引发剂溶于适当的溶剂中，该溶剂可与以上单体互溶，但聚合反应生成的聚合物微球因不易溶解而沉淀出来	不需加入任何稳定剂；操作简单；且制得的聚合物微球粒径范围分布较窄	对溶剂的要求较高，其粘性一定要小，才有利于聚合物微球粒径的均一；对于较大粒径的聚合物微球较难制备
溶胀悬浮聚合	首先采用无皂乳液法或乳液聚合法等制备出粒径较小的种球，后加入制孔剂、功能单体、模板及引发剂将种球进行溶胀，溶胀后再	可有效制备单分散的大粒径聚合物微球	制备过程较复杂且制备周期较长

	聚合		
表面印迹	将模板、功能单体、交联剂、引发剂与微球溶于一定的溶剂中，在微球表面进行涂敷或修饰	有利于模板分子的快速结合与洗脱；制备方法简单	聚合物结合量较少；稳定性较差；可重复使用次数较少

1.1.3 分子印迹技术的应用

分子印迹聚合物是一种新型的高分子仿生材料，因具有亲和力高，环境耐受性好和特异识别性等优点，目前，分子印迹技术在色谱分离^[17-19]、固相萃取和固相微萃取^[20-22]、仿生传感^[23-25]、膜分离^[26-28]以及酶模拟催化^[29,30]等领域都已显示出广阔的应用前景（见表 1-2）。

表 1-2 分子印迹技术的应用

Table1-2 The application of molecular imprinting technology

应用领域名称	具体应用方面	优点	缺点
色谱分离	将合成的聚合物用作不锈钢柱或毛细管柱的固定相，来分离分析样品	柱子寿命较长；选择性高；可耐高压和极性溶剂	装柱较麻烦；柱效不够高
固相萃取及固相微萃取	将合成的聚合物作为固相萃取柱或微萃取头的吸附材料，从而对样品进行纯化富集	制备简单；选择性高；在极性溶剂和水中均可用；简化了样品前处理	容量不够大；富集倍数不高；大多体系研究的是标准溶液
仿生传感	将合成的聚合物制成膜或者可装柱多孔珠，以此作为传感器的识别原件，固定于传感器和待测物之间	克服了生物传感器的不稳定性；提高了其灵敏度	大多仍处于实验室阶段
膜分离	利用分步法、同步法或复合法将印迹聚合物与膜结合起来	制备简单；分离快；针对性强；无污染	制膜方法、膜材料等有待进一步开发
酶模拟催化	将分子印迹聚合物的制备方法应用到酶的制备上	提高了酶的选择性、热稳定性和耐有机溶剂性	印迹酶的选择性与催化活性有待提高

1.2 固相微萃取和搅拌棒吸附萃取

近年来，由于现代工业的迅速发展和生态环境的恶化，使食品在生产、储存、加工和流通过程中有可能受到有毒、有害化学物品的污染。这些有毒有害的物质被人体吸收

后，会在组织或器官中进行富集，进而威胁人类的健康。所以需对食品进行安全检测。目前，食品中有机污染物的含量一般不高，且样品本身成分复杂，含有多种化合物，如蛋白质、脂肪、氨基酸、无机盐等，这些组分的含量都有可能比待测物质高数百倍甚至是上万倍，待分析的物质一般与样品有很强的亲和力。样品基质不但对待测物质检测造成干扰，而且还对仪器造成污染，减少设备的使用寿命。因此如何将待测组分从试样中分离出来成为了重要的一环，目前在食品行业中常用的样品前处理方法有液-液萃取、索氏提取、色谱分离、蒸馏、吸附、离心、过滤等几十种。但这些前处理存在劳动强度大，时间周期长，容易损失样品，误差也比较大，并且消耗大量的有机溶剂，对人体的健康和环境有害。近几年出现的超临界流体萃取、吹扫捕集和加速溶剂萃取的方法虽然有着无可替代的优点，却因其设备价格昂贵，在我国应用受到一定的限制。而固相微萃取和搅拌棒吸附萃取技术集萃取、浓缩、解析于一体，具有成本低、操作简便快速、灵敏等特点，特别适用于因样品量小、不能直接进行分析的试样。是一种新型的样品前处理技术。

1.2.1 固相微萃取

固相微萃取（solid phase microextraction，简称为 SPME）是在固相萃取基础上发展起来的一种样品分析前处理新技术，于 1990 年由加拿大学者 Pawliszyn 和 Arhturhe^[31] 提出，并在 1933 由 Supelco 公司（美国）推出商业化固相微萃取装置。SPME 作为一种新型的样品前处理技术，它克服了传统的溶剂萃取耗时长、效率低等缺点，具有灵敏度高、费用少、操作简便、无溶剂化等一系列优点，可实现现场取样分析。该技术日趋成熟，在食品分析等领域获得了广泛的应用。

（1）固相微萃取的原理

固相微萃取是根据有机物和溶剂之间“相似相溶”的原理，利用石英纤维表面上的涂层对样品中待测物吸附作用，富集待测物，完成样品前处理过程^[32]。SPME 利用萃取头表面涂有的色谱固定相作为固相吸附剂，吸附样品中的挥发性或半挥发性有机污染物，分析物质在石英纤维上的涂层与试样间扩散、吸附，经过一段时间后，待测组分在涂层与试样之间达到吸附平衡。SPME 萃取后，经毛细管电泳或色谱流动相将吸附在固定相上的分析物解析下来，再由检测器进行分析。SPME 的选择性和灵敏度可通过改变萃取头表面固定相的类型、pH 值、基质种类、厚度、样品冷却处理或加热等因素来调整^[33]。SPME 作为一种样品的预处理技术，由于其独特的优点，其应用领域也从最初

的环境分析扩展到其他行业领域,目前该技术在食品分析领域的应用受到越来越多的食品工作者的重视。

(2) SPME 在食品分析中的应用

SPME 自出现以来就有人利用这一技术检测食品样品。近 10 年来,已广泛应用于食品中风味物质、食品中农药残留和食品中有机物的检测分析。

①食品风味的研究

Hawthorne 和 Pawliszyn 等^[34]将固相微萃取与气相色谱质谱联用对可乐型饮料、咖啡和茶中的咖啡因进行了快速定量测定,测量结果的相对标准偏差为 5%。Contarini 等^[35]采用 SPME-GC-MS 联用法对不同厂家生产的高温巴氏杀菌乳、超高温灭菌乳、灭菌乳等经不同热处理的牛乳中的风味化学物进行了分析。王云川等^[36]采用 SPME-GC-MS 方法从啤酒中定性出 74 种微量香味组分。Young 等^[37]采用 SPME-GC-MS 的方法,研究了 13 种苹果的挥发性风味组分,对其中的 40 种酯类化合物和 α -金合欢烯的含量进行了测定,并采用主成分分析法(PCA)对测定结果进行了分析。

②食品中农药残留

Correia 等^[38]将 PDMS 萃取头浸入 3 mL 葡萄酒样品中 30min,测定了包含 9 种有机氯、11 种有机磷在内的 23 种农药,检出限平均达到 5 g/L。Rodrigues 等^[39]以聚二甲基硅氧烷-二乙烯基苯纤维萃取头作为萃取材料,用顶空 SPME 与 GC-MS 联用,测定了牛奶中 10 种有机磷农药残留,检出限为 2.16 g/L。我国的袁宁等^[40]采用这一技术测定茶叶中的有机氯和拟除虫菊酯农药残留,有效地减少了复杂基体的干扰,测定的灵敏度达到了 ng/L 量级。

③ 食品中其他有害物质

刘杨岷等^[41]采用固相微萃取与气相色谱法分析了酱油中的防腐剂:对羟基苯甲酸酯。通过对萃取时间、萃取头种类等条件的优化,选择了 100 μm 的 PDMS 萃取头进行测定,线性范围为 0~10 $\mu\text{g/mL}$,结果表明该方法简单快速、重现性好、干扰少、灵敏度高。Hu 等^[42]以苏丹 I 为模板分子,制备成涂敷式的厚度只有 0.55 μm 的纤维萃取头,从而使得模板分子得以快速吸附和解吸,建立了 MI-SPME-LC-MS 检测加标茄汁辣椒酱和红辣椒中 4 种苏丹红,其检测限为 21-55 ng/L。

1.2.2 搅拌棒吸附萃取技术

搅拌棒吸附萃取技术(stir barsorptive extraction, SBSE)是由 Baltussen E 及合作者在

1999年提出来的^[43]。是在固相微萃取(solid phase micro-extraction, SPME)技术基础上发展的一种新的样品前处理技术^[44,45],萃取时能够自身完成搅拌,避免了搅拌子的加入对目标物的物理性吸附。同时,SBSE固定相的体积一般为55-250 μL ,是SPME所用固定相体积的50-500倍,萃取量也相应提高了50倍以上。目前该技术在环境样品^[46-50]、农残检测^[51-54]、食品中的污染物^[55-57]以及生物样品^[58-60]的分析中得到了广泛的关注。

目前对于SBSE技术的研究主要集中于新涂层材料的开发和新涂层的制备方法。2004年,关亚凤课题组^[61-64]首次使用Sol-gel法在玻璃棒上键合交联PDMS涂层,该涂层厚度可达36 μm ,并将其应用于分析检测蔬菜中的有机磷农药和海水中的有机氯农药,检出限分别为0.15 ng/g和0.05~2.53 ng/L;近年来又通过浸入沉淀法将耐热工程塑料--聚醚砜酮(PPEK)涂覆在内封磁芯的玻璃棒表面,制得了针对极性化合物萃取分析的搅拌棒,其对苦参中的有机氯农药检出限为3~17 pg/g, RSD<17%,回收率为82%~128%。2005年Lambert J. P等^[65]将烷基二醇硅(ADS)的限进材料(RAM)作为SBSE的萃取涂层,用于分馏生物样品中的蛋白质,避免了在直接萃取血浆等生物样品时,蛋白质对涂层受的污染和堵塞,增加了SBSE的使用寿命。Hu^[66]在制备SBSE时采用了PDMS和 β -环糊精复合涂层,并将其应用于对水中雌性激素和双酚A的萃取分析。Wang L.等^[67]将PDMS直接键合在钛管上,克服了玻璃管容易破碎的缺点。Yang等^[68]将PDMS键合到直径为0.5 mm的玻璃微球上,与PDMS萃取搅拌棒相比,在相同条件下萃取水样中塑化剂,显著的缩短了萃取时间。2007年,厦门大学Huang^[69]首次将整体柱材料与吸附萃取搅拌技术相结合,制备了基于整体柱材料的吸附萃取搅拌棒,并与高效液相色谱相结合分析了尿液中的8种多环芳烃。随后该课题组对此方面的研究与应用做了很多工作^[70-73],将其与商品化SBSE相比,整体柱材料的吸附萃取搅拌棒对非极性或弱极性有机化合物、甚至对无机离子^[74]也具有很好的萃取效果。

1.3 课题的研究意义与研究内容

1.3.1 研究意义

食品安全问题关系到每个人的切身利益,而近些年不断曝光的食品添加剂事件,如三聚氰胺,苏丹红,瘦肉精等,使人们更加关注食品质量的监控与监督,而对食品中微量及痕量成分分析提出了更高的要求。本论文在查阅了大量中外文文献的基础上,结合科研前沿与我国国情,提出了高磁性吸附搅拌棒的制备合成方法,并成功地应用于豆腐

乳中的苏丹红、水样中的增塑剂及酚类，以及鱼饲料中的非法添加剂孔雀石绿的分析检测，具有较大的应用价值。

1.3.2 研究内容

(1) 采用原位聚合法将修饰过的磁粉与（甲基丙烯酸—乙二醇二甲基丙烯酸酯）（MAA-EDMA）材料结合，制备出了吸附萃取搅拌棒。用高效液相色谱法测定水样中的邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)这三种塑化剂。

(2) 采用高磁性超顺材料钆铁硼磁粉作为磁性供体，利用原位聚合法制备以双酚A（BPA）为模板的新型整体式分子印迹吸附萃取搅拌棒（MIP-SBSE），并与 HPLC 联用测定了矿泉水中的双酚 A。

(3) 采用高磁性超顺材料钆铁硼磁粉作为磁性供体，以孔雀石绿（MG）为模板，利用原位聚合法制备了新型整体式分子印迹吸附萃取搅拌棒（MIP-SBSE），并与 HPLC 联用测定了鱼饲料中的孔雀石绿。

(4) 采用原位聚合法在经修饰的不锈钢丝表面键合（甲基丙烯酸丁酯—乙二醇二甲基丙烯酸酯）(BMA-EDMA) 材料，制作了不锈钢丝固相微萃取（SPME）纤维头，与 HPLC 联用测定了豆腐乳中的苏丹红 I、II、III。

第二章 磁力搅拌棒前处理水样中塑化剂的研究

2.1 引言

塑化剂又叫增塑剂,是一种增强柔韧性的高分子材料助剂,可以增强塑料的柔韧性,在工业上广泛应用^[75,76]。2011年初,台湾的“塑化剂”事件引起了全世界范围内的关注,成为了重大食品安全事件,2012年的“酒鬼酒”事件引起了人们对塑化剂的进一步关注和思考^[77]。大量研究表明,塑化剂具有雌激素活性,能够影响人类的内分泌功能,还可能会增加心血管疾病的风险,若长期使用,甚至会导致癌细胞增殖^[78]。由于塑化剂通常以痕量形式存在于较为复杂的样品中,需对样品进行一定的前处理,目前,对于邻苯二甲酸酯的前处理方法主要包括液-液萃取(LLE)^[79-81]、固相萃取(SPE)^[82-84]、机械震荡萃取^[85]、超声萃取^[86,87]、微波溶出^[88,89]、索氏提取^[90]和固相微萃取(SPME)^[91,92]等。近些年来,报道过的主流检测方法主要有分光光度法^[93]、荧光光度法^[94]、气相色谱法(GC)^[95-98]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[99-101]、气相色谱-串联质谱法(GC-MS-MS)^[102]、液相色谱法(HPLC)^[103-105]和液相色谱-质谱联用^[106-108]。目前对塑化剂的检测主要以色谱法为主。因此,探索一种识别性强、干扰小的富集方法具有十分重要的意义。

样品中待测物的净化浓缩与仪器检测方法联用技术是当前食品安全检测方法的研究方向,这样能节省检测时间,提高分析效率。搅拌棒吸附萃取是近年发展起来的一种新的品前处理技术。Cacho等^[109]将搅拌棒吸附萃取技术与气质联用结合测定蔬菜样品提取液中的PAEs。实验证明该方法富集效果好、灵敏度高,检出限低至12.7和105.8 pg g⁻¹,适用于食品和其他样品中PAEs的富集提取与GC联用方法的建立。但是他们采用的搅拌棒在进行搅拌萃取时涂层会有部分的磨损脱落,影响其萃取效果。本实验介绍了磁力搅拌棒的合成方法,将聚合溶液与修饰后的磁粉在玻璃管内混合,经水浴原位聚合后制备成磁性搅拌棒,萃取时能够自身完成搅拌,避免了搅拌子的加入对目标物的竞争吸附。实验利用所制备的搅拌棒,成功地建立了SBSE与HPLC联用测定实际水样中的痕量塑化剂。

2.2 实验部分

2.2.1 试剂与仪器

邻苯二甲酸二丁酯(DBP, 99.5%), 邻苯二甲酸二甲酯 (DMP, 99.5%) 及邻苯二甲酸二乙酯 (DEP, 99.5%) 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司提供; 正硅酸乙酯 (TEOS, 98%, 北京百灵威); α -甲基丙烯酸 (MAA, 99.5%, New Jersey. USA); 丙基甲基丙烯酸酯(γ -MPS, 98%, 北京百灵威); 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA, 98%, New Jersey. USA); 2, 2'-偶氮二异丁腈(AIBN, 天津市光复精细化工研究所, 分析纯); 丙酮 (99.5%, 孟津县平乐村试剂厂); 氯仿 (湖南农业大学提供); 乙腈 (色谱纯, 天津赛孚瑞科技有限公司); 甲苯 (Toluene, 色谱纯, 洛阳市化学试剂厂); 甲醇 (色谱纯, 天津赛孚瑞科技有限公司); 冰乙酸 (CH_3COOH , 分析纯, 天津市德恩化学试剂有限公司); 氯化钠 (洛阳市化学试剂厂); 实验用水为二次蒸馏水; 其余试剂均为分析纯。

依利特 P1201 液相色谱仪 (大连依利特分析仪器有限公司); Quanta200 扫描电子显微镜 (FEI, Hillsboro, Oregon, USA); P1201 紫外检测器 (大连依利特分析仪器有限公司); 磁力分离架 (郑州英诺生物科技有限公司); TWCL-D 磁力搅拌器 (河南爱博特科技发展有限公司); KQ-5200DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (河南智诚科技发展有限公司); DZF—6020 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); GM-0.5A 型隔膜真空泵 (天津市津腾实验设备有限公司); BOS60-S 数显恒速直流电动搅拌器 (金华市华欧实验仪器厂)。

2.2.2 搅拌棒的制备过程

取一塑料烧杯, 先将磁粉用丙酮溶液浸泡处理 30 min, 再用 1 mol/L 的 NaOH 溶液于 80 °C 条件下浸泡 20 min, 然后用二次纯水清洗三次, 取出真空干燥备用。

磁粉的 SiO_2 包覆: 取 20 g 处理过的干燥磁粉置于 250 ml 三颈瓶中, 先加入 50 ml 的丙酮和 4 mL 二次纯水, 混匀, 然后在室温机械搅拌 (500 rpm) 条件下先后逐滴加入 5 mL 氨水和 5 mL TEOS, 搅拌反应 4 h。完成后用磁性分离架分离磁粉, 并用二次纯水清洗六次, 最后在 100 °C 条件下真空干燥得到包覆有 SiO_2 的磁粉。

γ -MAPS 修饰: 将 20 mmol (3.334 mL) γ -MAPS 溶于甲苯溶液中制成 10 % (V/V) 的溶液, 将 20 g 包裹过的磁粉浸泡于上述甲苯溶液中, 室温下搅拌反应 2 h 进行 γ -MAPS 修饰。用磁力分离架分离出磁粉, 用甲苯洗涤 3 次, 并在真空干燥箱中 120°C 条件下干燥得到修饰过的磁粉。

磁粉的聚合: 准确移取 4 mmol (0.341 mL) MAA, 30 mmol (5.67 mL) EDMA, 溶解在 5.0 mL 氯仿中, 然后加入 0.1 g 乙基纤维素, 超声直至乙基纤维素完全溶解, 最

后加入 0.03 g AIBN，超声溶解密封放置在冰箱中待用。

取内径0.4 cm，长度8 cm的玻璃管，将300微升的上述溶液与修饰过的干燥磁粉2.48 g分6次以先溶液再磁粉的顺序在超声的条件下装填于玻璃管中。装填完后超声10 min，使其硬实。再用橡皮塞密封，然后放入80 °C水浴锅中聚合42 h。取出敲碎外面的玻璃管，得到磁力棒，切割成长度1 cm磁力搅拌转子备用。

2.2.3 搅拌棒洗脱

将反应制得的磁力搅拌棒用甲醇/乙酸（v:v=90:10）洗脱，每1 h换一次洗脱液，洗脱12 h，然后用纯甲醇溶液洗脱，每30 min换一次，直至上液相检测不到杂质分子为止。

2.2.4 磁力搅拌棒电镜表征

采用Quanta 200电子扫描显微镜对所制备的磁性搅拌棒的表现结构进行分析。

2.2.5 SBSE 过程

萃取：准确移取待萃取溶液5 mL至安培瓶内，加入制备好的磁力搅拌转子，用橡胶塞将瓶子密封。然后放在磁力搅拌器上于室温下以400 rpm的速度萃取70 min。

解吸：取1.5 mL的离心管，向其中加入200 μ L的乙腈溶液，从萃取瓶内取出磁性搅拌子，用去离子水洗去吸附在其表面的杂质，然后置于离心管内，使得乙腈淹没搅拌棒，密封，超声解吸20 min，取出搅拌子后解吸液立即过滤上液相进行测定。

2.2.6 HPLC检测条件

依利特 ODS-C₁₈ 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μ m），流动相为乙腈/水（V/V=80/20），柱温为室温，流速为 1 mL/min，检测波长为 224 nm，进样量 20 μ L。

2.2.7 样品预处理

水样品采自河南科技学院西湖，然后再用0.45 μ m的滤膜进行过滤，去除沙石及杂质后置于阴凉处。取处理好的水样分别制成浓度为0.1 ppm、0.2 ppm、0.4 ppm邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯和邻苯二甲酸二甲酯三种物质的混合水样，然后按照2.2.5过程进行萃取解吸。

2.3 结果与讨论

2.3.1 搅拌棒的表征

扫描电镜表征所制备的磁力搅拌棒的形貌和表面结构，如图2-1所示a、b、c、d的放大倍数分别为23、26、400、5000倍。从图可见，磁力搅拌棒的形貌光滑，表面结构致密，具有网络结构的介孔。

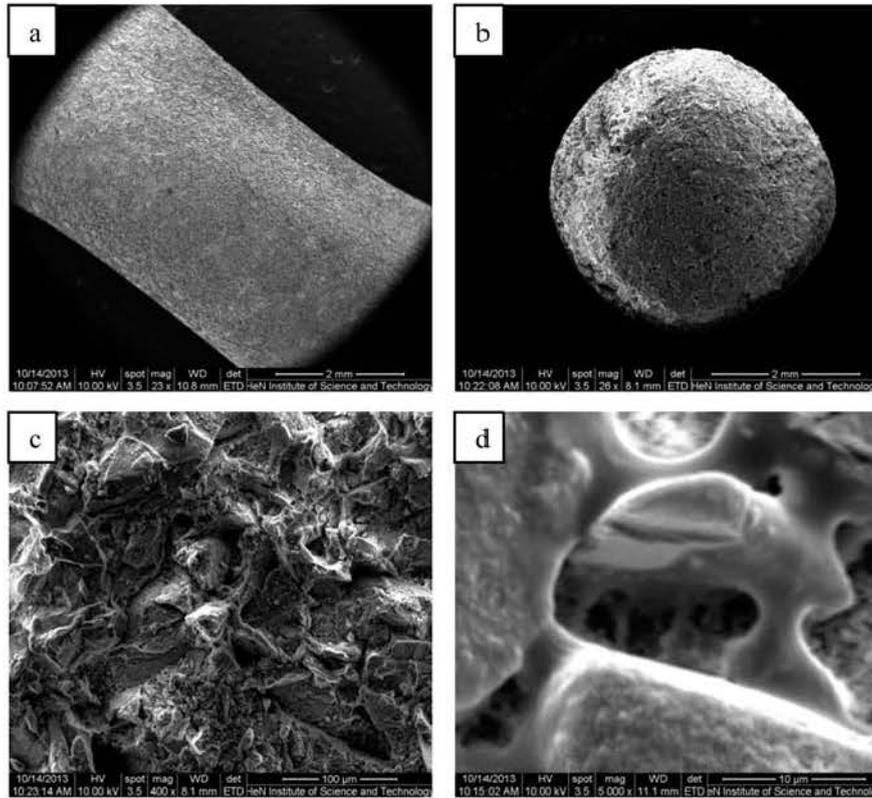


图 2-1 搅拌棒在不同放大倍数下的扫描电镜图

Fig 2-1 Scanning electron micrographs of stirring bar with different magnifications.

2.3.2 SBSE过程的优化

为获得最佳的实验条件，对所制备的搅拌棒进行萃取条件的优化，实验考察了萃取溶剂、萃取时间、解吸时间和盐浓度的影响，考察时选取的是 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 DBP 溶液。

(1) 萃取溶剂的影响

根据溶剂的极性不同，考察了常见萃取溶剂：正己烷、甲苯、氯仿、乙腈和水。按照 2.2.5 的过程进行萃取解析。由图 2-2 可见，用水做萃取溶剂时，萃取效果最好，故实验选取水作为萃取溶剂。

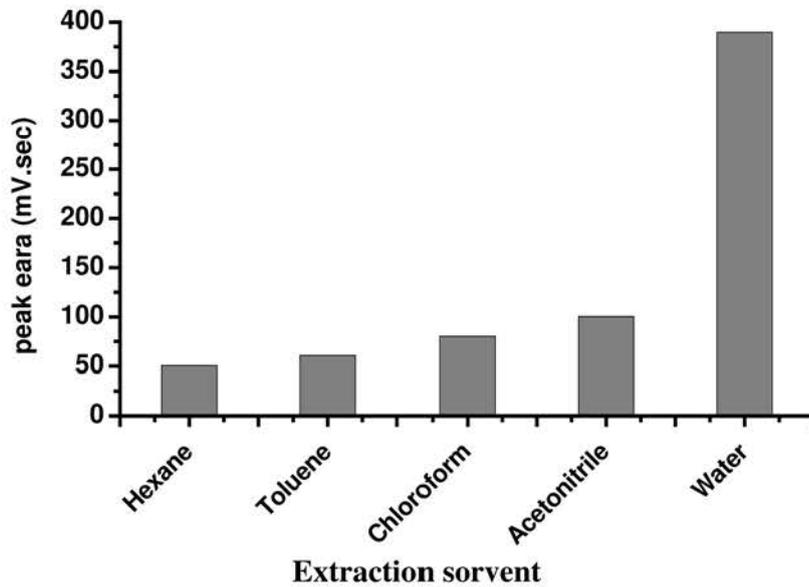


图 2-2 萃取溶剂对萃取效率的影响

Figure 2-2 Influence of extraction solvent on extraction efficiency

(2) 萃取时间的影响

萃取时间是影响萃取效率的一大重要因素，只有当目标物在萃取溶剂中达到吸附平衡，才能够获得最大的萃取效率。按照 2.2.5 的液相条件，固定乙腈为解吸溶剂，考察了萃取时间在 30 min-110 min 内搅拌棒对 DBP 萃取效果的影响。由图 2-3 可见，在前 70 min 内，DBP 的萃取量急剧增大，当达到 70 min 后其萃取量开始趋于平衡，因此，确定最优萃取时间为 70 min。

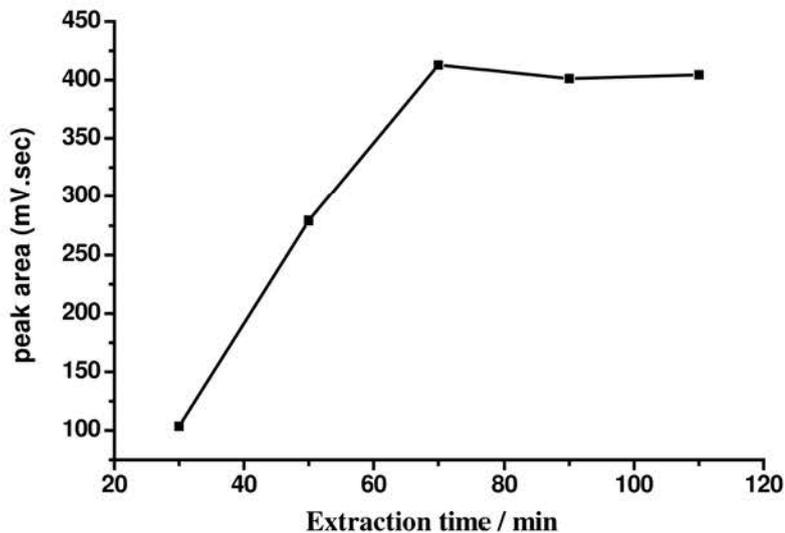


图 2-3 萃取时间对萃取效率的影响

Figure 2-3 Influence of extraction time on extraction efficiency

(3) 解吸时间的影响

以水为萃取溶剂，在磁力搅拌仪器上搅拌萃取 70 min，依次考察解吸时间为 10、20、30、40 和 50 min 时对解吸效果的影响。由图 2-4 可知，在 20 min 时，解吸已基本达到平衡，因此，确定最优解吸时间为 20 min。

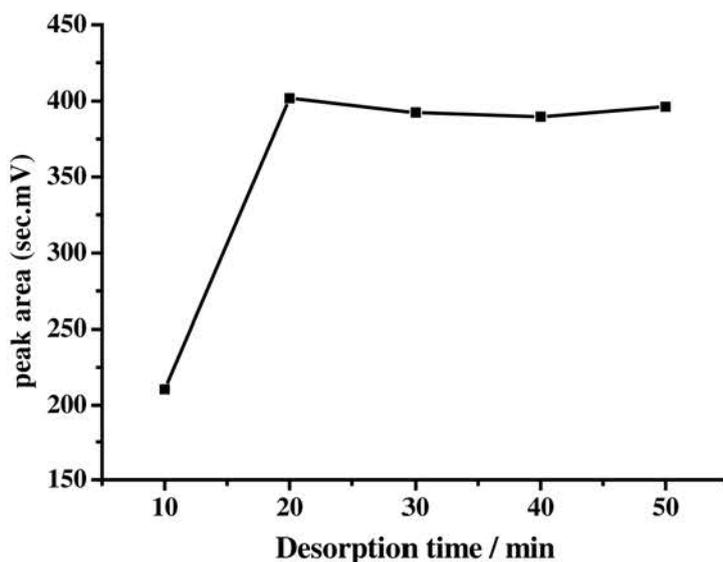


图 2-4 解吸时间对萃取效率的影响

Figure 2-4 Influence of desorption time on the extraction efficiency

(4) 盐浓度的影响

本实验通过添加不同量的 NaCl 来改变基底的离子强度，添加量分别为 0 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %，观察离子强度对结果的影响。由图 2-5 可知，随着 NaCl 浓度的增加，搅拌棒对 DBP 的吸附量呈先增大后减小的趋势，在盐浓度为 15 % (w/v) 时，搅拌棒的萃取能力最好。原因可能是盐可以提高溶液的离子强度，降低了有机物在水中的溶解度，起到盐析的作用，使得 DBP 在搅拌棒上富集，当盐浓度过大时，可能会沉积在搅拌棒上使其发生堵塞。所以确定 NaCl 最佳添加量为 15 %。

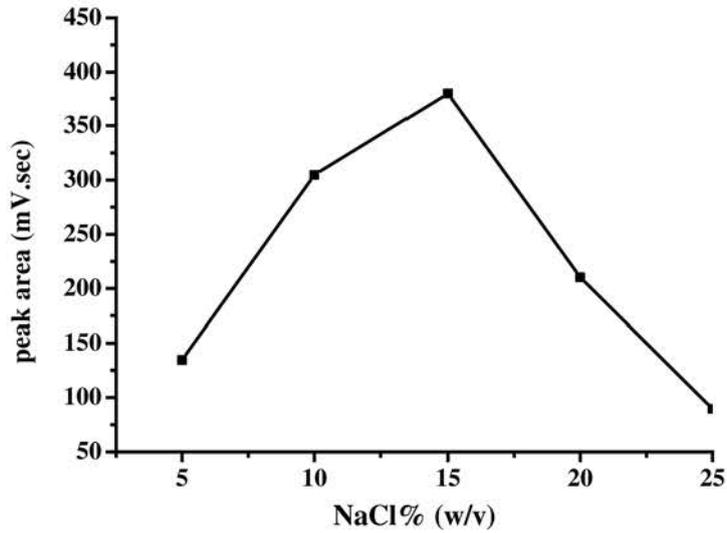


图 2-5 NaCl 加入量对萃取效率的影响

Figure 2-5 Influence of the amount of NaCl on the extraction efficiency

2.3.3 搅拌棒的吸附曲线

实验考察了不同浓度范围内（5-2500 $\mu\text{g/L}$ ）搅拌棒对目标物DBP的萃取性能，图2-6是搅拌棒对DBP的吸附量曲线。很明显，在5-800 $\mu\text{g/L}$ 的范围内，随着萃取液浓度的增加，搅拌棒 DBP的吸附量也随之增大，当浓度达到800 $\mu\text{g/L}$ 时，搅拌棒对DBP的吸附已经趋于饱和。

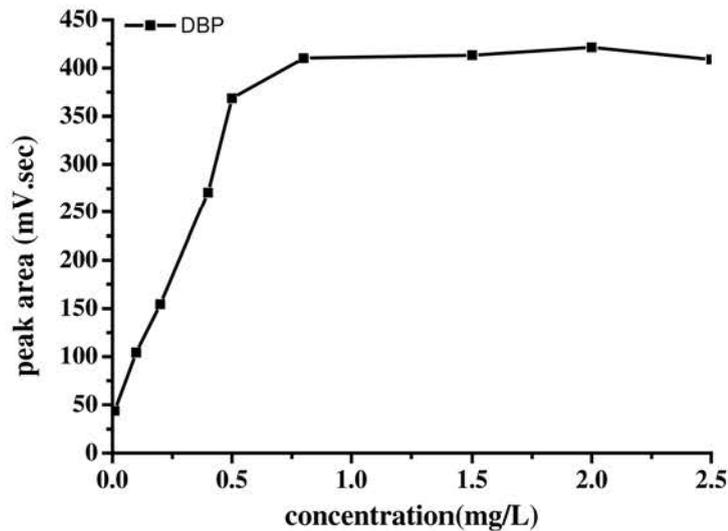


图 2-6 搅拌棒随 DMP 浓度变化的吸附曲线

Figure 2-6 Adsorption curve of stir bar changed with DMP concentration

2.3.4 重现性

实验考查了同一根搅拌棒（萃取次数为 5），同批次制备的搅拌棒（萃取头数为 5）和不同批次（3 批）制备的搅拌棒对 DBP 萃取效果的重现性，选取的萃取液均是 500 $\mu\text{g/L}$ 的 DBP 水溶液。结果，同一搅拌棒萃取 5 次所得的 DBP 峰面积的相对标准偏差为 3.4%，同批次的搅拌棒萃取所得 DBP 峰面积的相对标准偏差为 4.7%，不同批次搅拌棒所得 DBP 峰面积的相对标准偏差为 5.6%。

2.3.5 线性范围与检出限

采用浓度范围为 5-800 $\mu\text{g/L}$ 的 DBP、DEP、DMP 混合标准溶液考察磁力搅拌棒吸附/HPLC 联用方法，并测定 DBP、DEP、DMP 这 3 种塑化剂的线性关系，得到三种物质的标准曲线分别为 DMP: $y=89.895x+13.11$ ($R=0.998$), DEP: $y=84.573x+11.3$ ($R=0.996$), DBP: $y=85.527x+8.5813$ ($R=0.998$); DMP、DEP 和 DBP 萃取后的检出限 ($3S/N$) 分别是 93 ng/L, 150 ng/L, 210 ng/L。这表明磁力搅拌棒吸附/HPLC 联用方法对于塑化剂多残留分析具有较高灵敏度。

2.3.6 实际样品测定

将吸附搅拌萃取与 HPLC 联用检测加标水样品，考察磁力搅拌棒在实际样品的萃取性能，如图 2-7。并用上述方法测定预处理过的加标湖水溶液中 3 种塑化剂的相对回收率，结果如表 2-1 所示。DMP 回收率为 91.9%~96.6%、RSD 为 2.5%~4.1%；DEP 为 94.3%~96.7%、RSD 为 3.2%~5.4%；DBP 为 89.2%~92.1%、RSD 为 2.9%~4.7%，效果令人满意。

表 2-1 加标湖水的相对回收率 (n=5)

Table 2-1 Relative recoveries of spiked lake water (n = 5)

化合物	湖水					
	100 $\mu\text{g/L}$		200 $\mu\text{g/L}$		400 $\mu\text{g/L}$	
	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
DMP	94.1	2.5	91.9	3.4	96.6	4.1
DEP	94.3	3.2	96.7	4.1	95.5	5.4
DBP	89.2	2.9	91.3	4.0	92.1	4.7

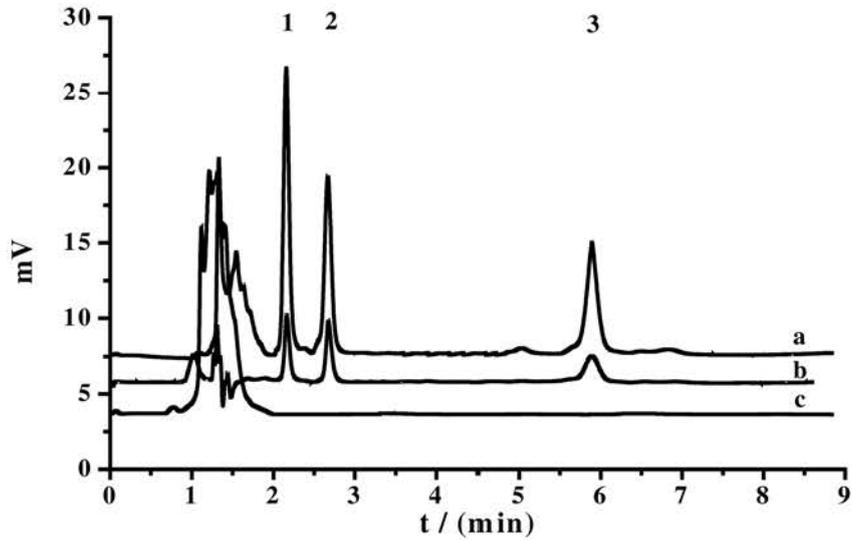


图 2-7 湖水样品液相色谱图

Figure2-7 HPLC chromatograms of lake water sample

图 2-7 1-DMP, 2-DEP, 3-DBP; (a) 经萃取后加标浓度为 0.1ppm 的湖水样品, (b) 0.1ppm 的混标标液, (c) 空白湖水;

2.4 本章小结

本实验建立了磁力搅拌棒吸附 / HPLC 联用检测 DMP、DEP、DBP 的分析方法, 考察了磁力搅拌棒的吸附性能。结果表明, 磁力搅拌棒对结构类似的塑化剂具有吸附容量大, 稳定性好等特点。对于 DMP、DEP、DBP 这三种塑化剂, 此方法的线性范围为 5.0-800 $\mu\text{g/L}$; 检出限在 93-210 ng/L 范围内。采用上述方法测定加标湖水中 DMP、DEP、DBP 的回收率为 89.2 %~96.7 %之间, 当加标量为 0.1 ppm 时, 富集倍数为 7 左右, 达到了良好的萃取效果, 实现了复杂样品中痕量残留的同时分析。

第三章 双酚 A 分子印迹磁性吸附搅拌棒的应用

3.1 引言

双酚 A 是一种外源性内分泌干扰物^[110], 同时也是生产聚碳酸酯和环氧树脂的一种重要的化工原料^[111-112], 在食品包装、婴儿奶瓶、矿泉水、牙齿填充物所用的密封胶等都含有 BPA。它在环境中广泛的存在, 并且能够很容易的转移的人的体内, 进而对健康产生不利的影晌。因此需要建立一种从复杂样品中检测 and 选择萃取 BPA 的方法。

目前测定 BPA 常用的分析方法有高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法-质谱联用法 (GC-MS) 和高效液相色谱-质谱联用法^[113-115]。由于 BPA 在实际样品中含量较低, 在分析之前必须从实际样品中对其进行富集分离。常用的预处理方法有固相萃取 (SPE)^[116]、固相微萃取 (SPME)^[117]、液相微萃取 (LPME)^[118]和中空纤维膜微萃取 (HFME)^[119]等。这些预处理方法虽然在 BPA 测定中有一定的应用, 但也存在不足, 如 SPE 需要大量的有机溶剂, SPME、LPME 和 HFME 的萃取容量较低。另外, 上述前处理方法对 BPA 不具有选择萃取性能, 在萃取目标化合物的同时, 也对非目标化合物进行萃取, 这会对随后的分离过程产生一定的影响。

目前商品化的 SBSE 涂层只有聚二甲基硅烷 (PDMS) 硅橡胶管一种, 其对非极性化合物具有较高的萃取效率, 但对极性有机物的萃取效率比较低下, 还必须对样品进行复杂的衍生化^[120]。因此本文用磁粉作为磁力供给, 以 BPA 为模板分子, 将聚合溶液与磁粉混合, 经水浴原位聚合制备成磁性搅拌棒, 利用此搅拌棒, 建立了 SBSE 与 HPLC 联用测定实际水样中的痕量 BPA。

3.2 实验部分

3.2.1 试剂与仪器

双酚 A (BPA, 99%)、苯酚 (P, 95%) 和对羟基联苯 (p-HP, 99%) 均购于 Alfa Aesar 公司; α -甲基丙烯酸 (MAA, 99.5%), 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA, 98%)、偶氮二异丁腈 (AIBN, 分析纯, 天津光复精细化工研究所); 3-(三甲氧基硅烷基) 丙基甲基丙烯酸酯 (γ -MAPS, New Jersey, USA)、乙腈 (CAN, 色谱纯)、甲醇 (色谱纯)、甲苯 (天津化学试剂公司)、正硅酸乙酯 (TEOS, 北京百灵威); 铷铁硼 (烧结铷铁硼

磁体, 主相 $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ 的 Nd: Fe 正分比值为 1:7。密度 ≥ 7.5 , 过剩磁感应强度 Remanence induction: 典型值 12.5 KGs, 最大磁能积 maximum Energy product: 粒径 $\leq 30\mu\text{m}$, 北京中科三环高新技术股份有限公司提供); 其他所用试剂均为分析纯; 全部实验用水均为二次蒸馏水。

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (Agilent, USA); UV-2100 双光束紫外-可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器有限公司); Quanta 200 扫描电子显微镜 (FEI, Hillsboro, Oregon, USA); DZF-6020 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); GM-0.5A 型隔膜真空泵 (天津市津腾实验设备有限公司); KQ-5200 DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (河南智诚科技发展有限公司); HZS-H 水浴恒温振荡器 (哈尔滨东联电子技术公司)。

3.2.2 BPA MIP-SBSE 的制备

磁粉预处理: 将磁粉先用丙酮溶液处理 30 min 再用 1 mol/L 的 NaOH 溶液于 80°C 条件下浸泡 20 min 除去磁粉表面的有机物, 然后用二次纯水清洗三次, 取出真空干燥备用。

磁粉的 SiO_2 包覆: 取 40 g 处理过的干燥磁粉放入 100 mL 丙酮和 8 mL 二次纯水混合溶液中, 在常温机械搅拌 (500 rpm) 条件下先后逐滴加入 5 mL 氨水和 5 mL 的 TEOS, 搅拌反应 10 h。用磁性分离架分离磁粉, 并用二次纯水清洗六次, 在真空干燥箱中 120°C 干燥得到包覆有 SiO_2 的磁粉。

磁粉的 γ -MAPS 修饰: 取 40 mmol γ -MAPS 溶于甲苯中制成 10% (V/V) 的溶液, 在锥形瓶中将 40 g 磁粉浸泡于上述甲苯溶液, 室温下振荡反应 2 h 进行 γ -MAPS 键合修饰。用磁性分离架分离磁粉, 用甲苯洗涤 3 次。并在真空干燥箱中 120°C 条件下干燥得到修饰过的磁粉。

磁粉的分子印迹聚合: 将 1 mmol (0.228 g) 双酚 A, 4 mmol (0.341 mL) MAA 溶于 5 ml 乙腈中, 超声 15 min 后充氮气密封静置 30 min 进行分子自组装。然后加入 20 mmol (3.78 ml) EDMA, 0.04 g 的 AIBN (约为总体积的 1%), 超声直到至完全溶解。取内直径 0.4 cm, 长度 8 cm 的玻璃管, 取上述印迹溶液 500 μL 和修饰的干燥磁粉 2.48 g 交替着装填于玻璃管中。装填好后将溶液与磁粉混匀, 使磁粉全部在液面以下。然后用橡皮塞密封, 放在 60°C 水浴锅中聚合 48 h, 得到磁性棒。敲碎外面的玻璃管, 切割成长度 1 cm 磁性搅拌转子, 图 3-1 为其印迹原理示意过程。

空白分子印迹搅拌棒的合成：除了不加入模板分子以外，其它条件及步骤同上。

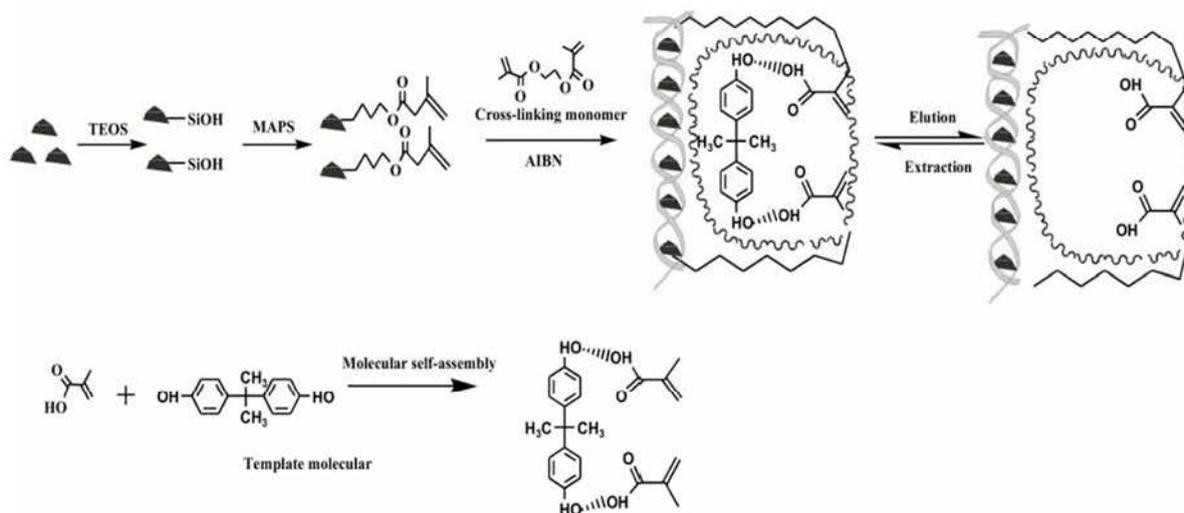


图 3-1 MIP 制备示意图

Fig 3-1 Schematic representation of preparation procedures of MIP

模板分子的洗脱：将制备好的磁性搅拌转子放入 5ml 的甲醇溶液中，依靠其自身的磁力，固定转速 400rpm，每隔两小时换一次甲醇溶液，直至洗脱液上液相无杂质峰出现。

3.2.3 双酚 A MIP 的表征

利用扫描电子显微镜对 MIP-SBSE 的表观结构和粒径大小进行分析。

3.2.4 HPLC 检测条件

色谱柱为 C18 柱 (200 mm*4.6 mm, 5.0 μm)，柱温为室温，流动相：(乙腈：水) = (65：35)，流速为 0.8 mL/min，进样量 20 μL ，检测波长为 218 nm。

3.3 结果与讨论

3.3.1 MIP-SBSE 的扫描电镜表征

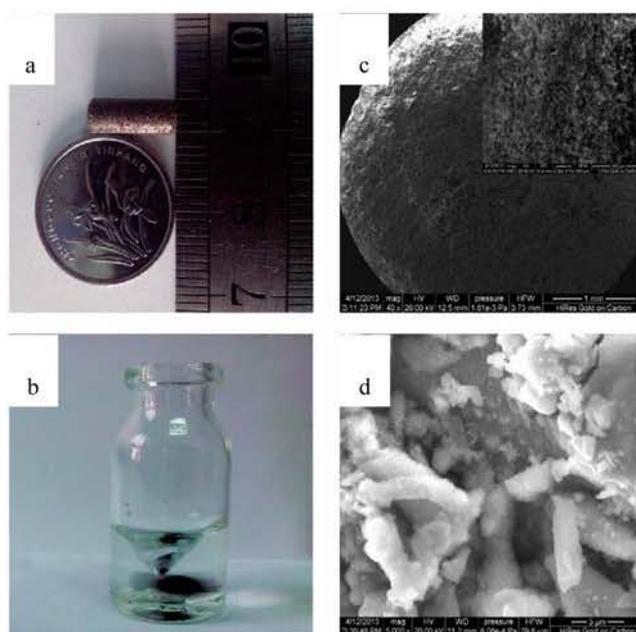


图 3-2 搅拌吸附棒表面不同放大倍数的扫描电镜图

Fig 3-2 Scanning electronmicrographs of magnetic-stirring bar with different magnifications.

我们对所制备的整体式搅拌棒外观结构形态进行了表征，如图 3-2 所示。a 和 b 为相机拍摄的实物图，c 和 d 分别为放大 40 和 5000 倍的电镜图，从图中可以看出，搅拌棒的横切面和纵剖面均具有较好的孔径结构，这种结构增加了样品与搅拌棒之间的接触面积，有利于提高传质速率和萃取效率，从而不会导致过长的萃取时间。

3.3.2 SBSE 萃取条件的优化

影响萃取的因素 包括吸附时间、解吸时间、盐浓度和 pH，为了取得最佳实验条件，对它们进行了优化，优化时选用的是 500 $\mu\text{g/L}$ 的混标水溶液。

(1) 吸附时间的影响

图 3-3 给出了 3 种酚类的响应峰面积随时间变化的曲线。结果表明,当萃取时间小于 70 min 时,随着萃取时间的延长,峰面积一直增加,且增幅较大。当萃取时间大于 70 min 时,萃取基本达到平衡,且对 BPA 的吸附量高于其它酚类。因此,选择 70 min 为最佳萃取时间。

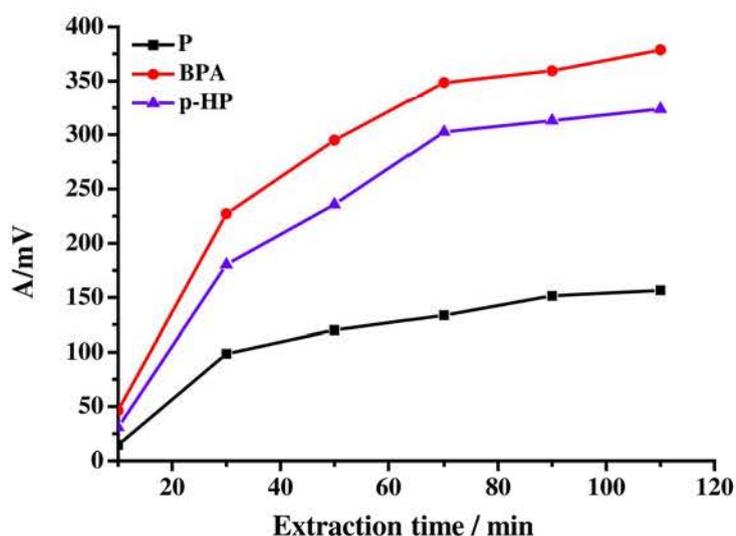


图 3-3 萃取时间对萃取效率的影响

Fig 3-3 Effect of extraction time on desorption efficiency

(2) 解吸时间的影响

以 ACN 为解吸溶剂,考察不同解吸时间对解吸效果影响,实验结果表明解吸时间为 15 min 时,目标化合物可以从 MIP-SBSE 上被完全解吸,因此解吸时间确定为 15 min。

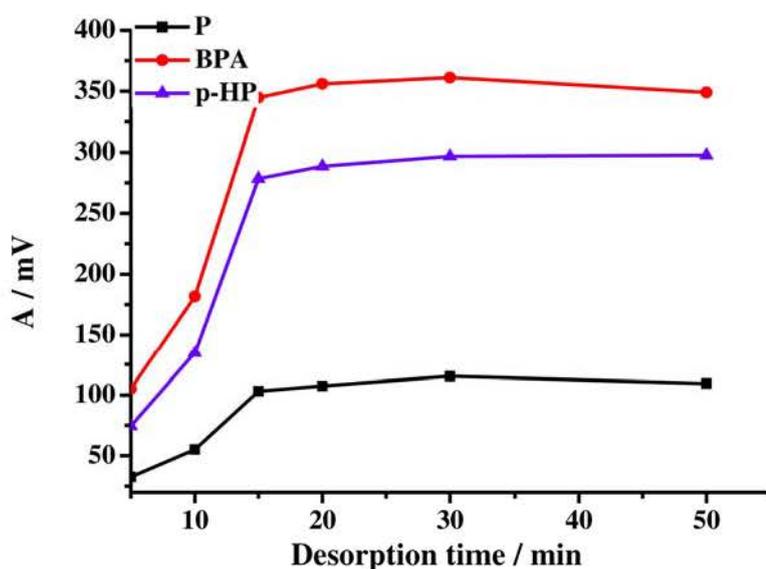


图 3-4 解析时间对萃取效率的影响

Fig 3-4 Effect of desorption time on desorption efficiency

(3) 离子强度的影响

本实验通过添加不同量的 NaCl 来改变基底的离子强度,添加量分别为 0 %、5 %、

10 %、15 %、20 %、25 %，观察离子强度对结果的影响。由图可知，加入 NaCl 后，三种酚类的峰面积有一定的变化，但是萃取效率并没有显著的增加，相反，当 NaCl 的浓度持续增加时，它们的峰面积反而会降低，其原因可能是离子强度高消弱了氢键作用力，所以本实验选择不加 NaCl。

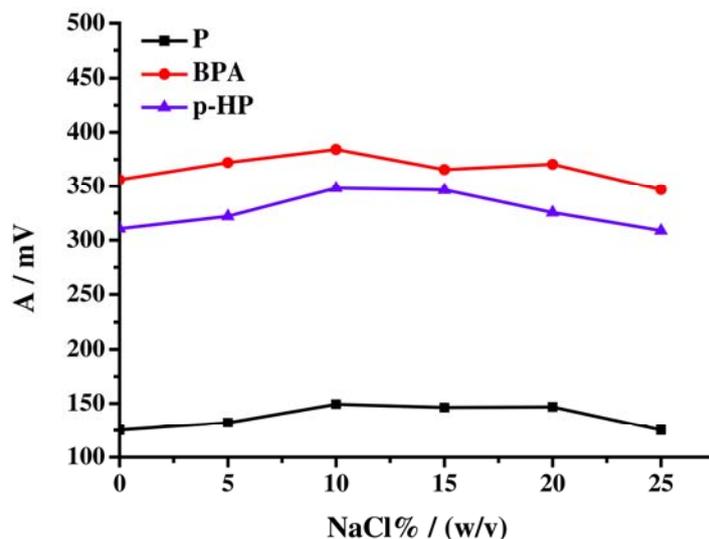


图 3-5 盐浓度对萃取效率的影响

Fig 3-5 Effect of NaCl mass concentration on the extraction efficiency

(4) pH 值的影响

考察了样品 pH 值在 3.0 和 11.0 之间对酚类萃取效率的影响,结果如图 6 所示。当溶液 pH 值为 5.0-9.0 时，酚类大多以分子形态存在于溶液中，这时氢键的存在也能对分子识别起到一定的作用，当溶液的 pH 值大于 9 时，所有酚类化合物的萃取效率明显降低。这主要是因为，pH 较高时，酚类主要以离子状态存在，严重的影响了疏水性相互作用，不利于搅拌棒对他们的吸附。所以最佳 pH 为 9.0。

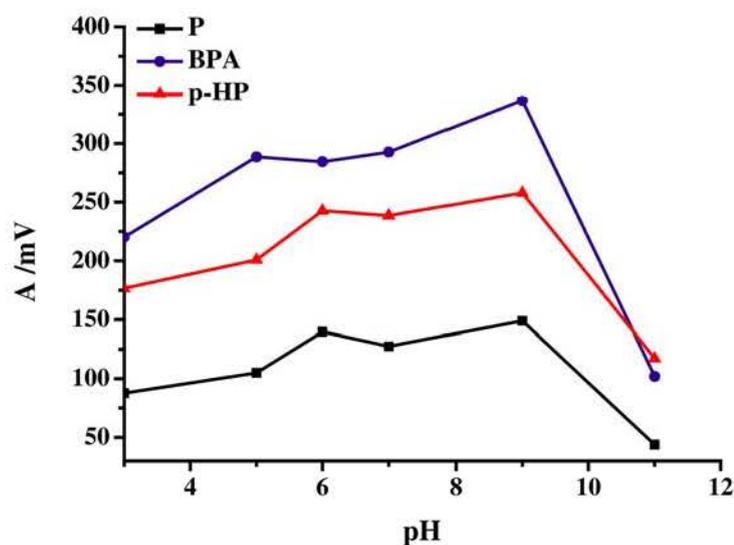


图 3-6 pH 对萃取效率的影响

Fig 3-6 Effect of pH value on the extraction efficiency

3.3.3 MIP-SBSE 的选择性

在最佳萃取条件下，MIP-SBSE 和 NIP-SBSE 对 3 种酚类、萃取效果见图 3-7。MIP-SBSE 对 3 种酚类物质吸附性能均明显高于 NIP-SBSE，显示较强的选择吸附性能。

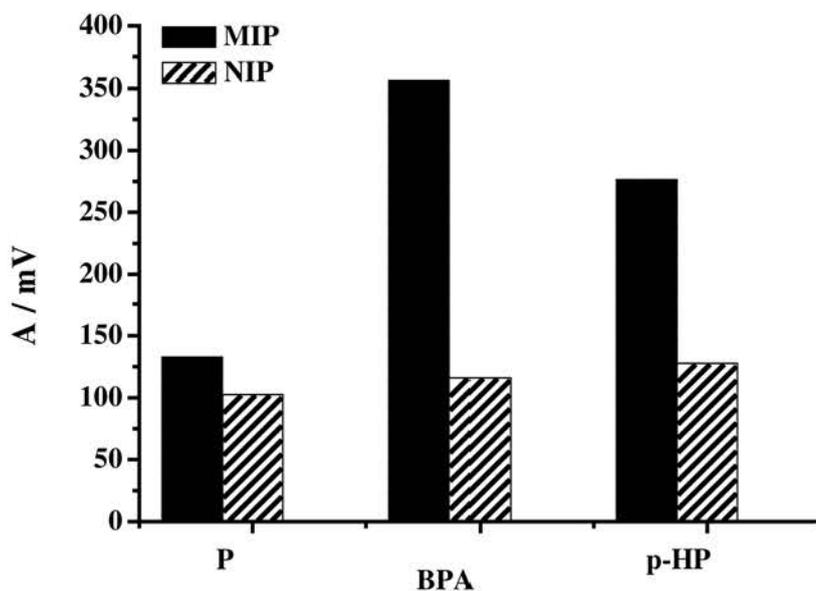


图 3-7 MIP 和 NIP 对三种物质萃取效果的比较

Fig 3-7 Comparison of three substances extracted with MIP-SBSE and NIP-SBSE

3.3.4 MIP 和 NIP 的吸附饱和曲线

实验考察了不同浓度范围内（10-1000 $\mu\text{g/L}$ ）MIP 和 NIP 搅拌棒对目标物 BPA 的吸附性能。图 3-8 是 MIP 和 NIP 对 BPA 的吸附曲线。在 10-500 $\mu\text{g/L}$ 的范围内，随着萃取液浓度的增加，MIP 和 NIP 对 BPA 的吸附量也随之增大，当浓度达到 500 $\mu\text{g/L}$ 时，MIP 和 NIP 对 BPA 的吸附已经趋于饱和。与 NIP-SBSE 相比，MIP-SBSE 对 BPA 显示了很强的结合能力。这主要是因为 MIP-SBSE 上形成了与 BPA 在大小、形状和功能基团相互匹配的、具有多重作用点的孔穴。在特定空穴的作用下，使得 MIP-SBSE 对 BPA 表现出了特异性吸附。

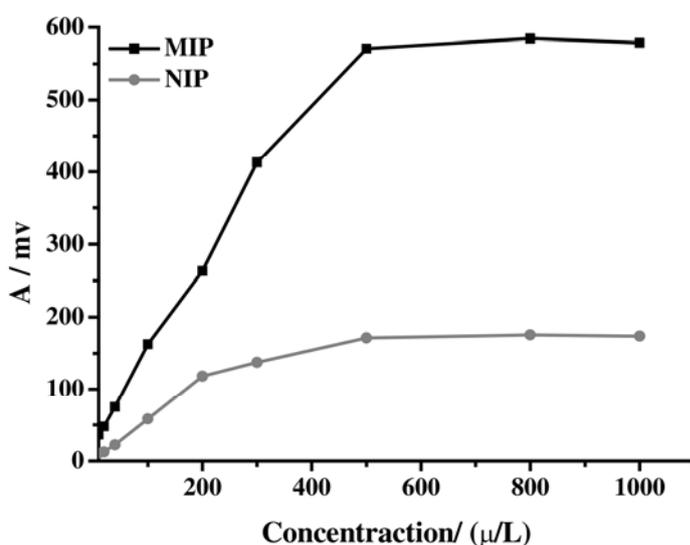


图 3-8 MIP 和 NIP 对 BPA 的等温吸附曲线

Fig 3-8 adsorption isotherms of BPA-MIPs and NIPs

3.3.5 重现性

实验考查了同一批次不同搅拌棒（5 根），和不同批次搅拌棒（3 批）模板分子 BPA 萃取效果的重现性，选取的萃取液均是 500 $\mu\text{g/L}$ 的 BPA 水溶液。结果，同批次不同搅拌棒萃取解析后所得 BPA 的峰面积之间的相对标准偏差为 3.6%，不同批次搅拌棒萃取解析后所得 BPA 的峰面积之间的相对标准偏差为 5.68%。

3.3.6 线性范围与检出限

按上面的液相条件及优化过萃取条件，分别对 10-500 $\mu\text{g/L}$ 苯酚、双酚 A 和对羟基

联苯混合水溶液进行测定，考察方法的线性相关系数、检出限和线性范围。

表 3-1 方法的线性范围和检出限

Table 3-1 The linear range and detection limit of the method

化合物	线性方程	相关系数	线性范围 $\mu\text{g/L}$	检出限 ng/L
苯酚	$y=0.3059x+4.2725$	0.9976	10-500	231
双酚 A	$y=0.9653x+1.7084$	0.9989	10-500	105
对羟基联苯	$y=0.8352x-1.2478$	0.9996	10-500	159

3.3.7 实际样品测定

本实验将 MIP-SBSE 和 HPLC 联用，对两个实际水样进行测定，结果在两种矿泉水中均未检出 BPA。

为了考察搅拌棒在实际水样中的性能,通过选取三个浓度水平 (50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$) 的苯酚, 双酚 A 和对羟基联苯混合溶液, 进行了加标回收率的测定。测定实际水样不同加标量的回收率。由表 3-2 可知, 所建立的方法在三种不同加标量(50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$)情况下均具有理想的回收率,同时实验的 RSD 值均小于 7%, 这表明本方法有良好的实验重现性。

表 3-2 实际水样分析结果

Table 3-2 Analytical results of the real sample

化合物	矿泉水					
	50 $\mu\text{g/L}$		100 $\mu\text{g/L}$		200 $\mu\text{g/L}$	
	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
苯酚	81.3	6.7	86.2	5.6	89.5	4.8
双酚 A	88.5	5.8	91.3	4.3	96.1	4.5
对羟基联苯	86.8	6.3	89.7	5.1	78.2	4.2

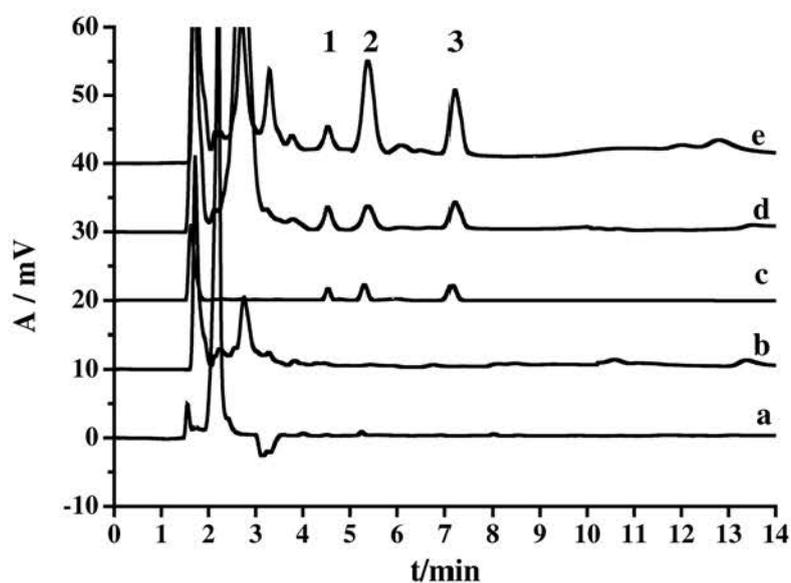


图 3-9 矿泉水样品液相色谱图

Figure 3-9 HPLC chromatograms of bottled water sample

1-苯酚, 2-双酚 A, 3-对羟基联苯; (a)空白矿泉水, (b) 经 MIP 萃取后的空白矿泉水, (c) 500 µg/L 的混标溶液, (d) 经 NIP 萃取加标浓度为 200 µg/L 矿泉水样品, (e) 经 MIP 萃取加标浓度为 200 µg/L 矿泉水样品

3.4 本章小结

本研究制备了以 BPA 为模板的分子印迹聚合物, 并将其与磁粉混合, 水浴聚合所得的 MIP-SBSE 可对模板分子 BPA 进行有效的选择性萃取。同时, 所建立起来的 MIP-SBSE /HPLC 在最佳条件下可灵敏测定实际水样中的 BPA。研究表明, 本方法具有操作简便、灵敏度高、重现性好、精密度高、使用有机溶剂少等优点。

第四章 应用分子印迹磁性搅拌棒检测鱼饲料中的孔雀石绿

4.1 引言

孔雀石绿 (Malachite green, MG) 为三苯甲烷类工业染料, 曾被用于制陶业、纺织业、皮革业、食品颜色剂和细胞化学染色剂等^[121,122]。MG 也可在水产养殖业中用来预防和治疗鱼的水霉病, 鳃霉病等, 而且为了使鳞受损的鱼延长生命, 也常用在运输过程中和存放池内。孔雀石绿及其代谢产物隐色孔雀石绿 (Leucomalachite green, LMG) 能长期存在于生物体内, 具有高毒性、高残留和三致等毒副作用^[123-125]。世界上许多国家已将孔雀石绿列为水产养殖禁用药, 我国也于 2002 年 5 月宣布严禁在水产养殖中使用孔雀石绿, 并规定其不得检出^[126]。由于孔雀石绿对水生动物性食品和人类健康的不利影响, 用于检测实际样品如水样和鱼饲料中孔雀石绿的高灵敏度、高选择性的分析方法引起了人们的关注。目前测定 MG 常用的分析方法有高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法-质谱联用法 (GC-MS) 和高效液相色谱-质谱联用法^[127-133]。但这些方法用于实际水样时不能达到痕量分析要求, 因此在分析之前需对样品进行预处理, 在孔雀石绿实际水样分析中, 主要采用固相萃取 (SPE) 作为前处理方法^[134]。但固相萃取技术比较耗时, 且不具有特异性识别。因此, 需要考虑一种新的前处理方法用来分离富集孔雀石绿。

本课题组首次采用具有高磁性超顺材料的钕铁硼磁粉作为磁力供给, 通过正硅酸乙酯 (TEOS) 有效包裹, 同时在表面引入烯键, 最后以孔雀石绿为模板分子, 将聚合溶液与修饰后的磁粉在玻璃管内混合, 经水浴原位聚合后制备成磁性搅拌棒, 由于聚合物镶嵌在磁粉骨架内, 使得该搅拌棒既具有磁粉的硬度, 又能避免搅拌时涂层的磨损。实验利用所制备的搅拌棒, 成功地建立了 SBSE 与 HPLC 联用测定实际样品中的痕量 MG。

4.2 实验部分

4.2.1 试剂与仪器

孔雀石绿 (MG)、隐形孔雀石绿 (LMG)、和结晶紫 (CV) 均购于 Alfa Aesar 公司; 2, 2'-偶氮二异丁腈 (AIBN, 天津市光复精细化工研究所); α -甲基丙烯酸 (MAA, New Jersey, USA) 和乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA, New Jersey, USA,) 使用前均纯化; 乙腈、甲醇 (色谱纯) 均购于天津化学试剂公司; 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷、

TEOS 均购于北京百灵威；钕铁硼（烧结钕铁硼磁体，主相 Nd₂Fe₁₄B 的 Nd: Fe 正分比值为 1:7。密度 ≥ 7.5 ，过剩磁感应强度 Remanence induction: 典型值 12.5KGs，最大磁能积 maximum Energy product: 粒径 $\leq 30 \mu\text{m}$ 由北京中科三环高新技术股份有限公司提供；其他所用试剂均为分析纯；实验用水均为二次蒸馏水。

P1201 液相色谱仪（大连依利特分析仪器有限公司）； MTN-2800W 氮吹浓缩装置（天津奥特赛恩斯有限公司）； DZF-6020 型真空干燥箱（上海一恒科技有限公司）； FTIR-7600 傅里叶红外（天津天光光学仪器有限公司）； Quanta 200 扫描电子显微镜（FEI, Hillsboro, Oregon, USA）； KQ-5200 DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

4.2.2 孔雀石绿 MI-SBSE 搅拌棒的制备

磁粉的预处理: 将磁粉先用丙酮溶液处理 30 min 再用 1 mol/L 的 NaOH 溶液于 80 °C 条件下浸泡 20 min 除去磁粉表面的有机物，然后用二次纯水清洗三次，取出真空干燥备用。取 40 g 处理过的干燥磁粉放入 100 mL 丙酮和 8mL 二次纯水混合溶液中，在常温机械搅拌（500 rpm）条件下先后逐滴加入 5 mL 氨水和 5 mL 的 TEOS，搅拌反应 10 h。用磁性分离架分离磁粉，并用二次纯水清洗六次，在真空干燥箱中 120 °C 干燥得到包覆有 SiO₂ 的磁粉。取 40 mmol γ -MAPS 溶于甲苯中制成 10 % (V/V) 的溶液，在锥形瓶中将 40 g 磁粉浸泡于上述甲苯溶液，室温下振荡反应 2 h 进行 γ -MAPS 键合修饰。用磁性分离架分离磁粉，用甲苯洗涤 3 次，并在真空干燥箱中 120 °C 条件下干燥得到修饰过的磁粉。

磁粉的分子印迹聚合聚合: 将 1 mmol MG，6 mmol MAA 溶于 10 mL 乙腈中，超声 15 min 后充氮气密封静置 30 分钟进行分子自组装，然后加入 20 mmol EDMA，0.04 g 的 AIBN（约为总体积的 1 %），超声直至完全溶解。取内径 0.4 cm，长为 8 cm 的玻璃管，将 500 μL 印迹溶液和 3 g 修饰干燥的磁粉装填于玻璃管中，待溶液与磁粉混匀后，用橡皮塞密封，放入 60 °C 水浴锅中聚合 48 h。取出敲碎外面的玻璃管，然后分别切割成长度 1cm 磁性搅拌转子，图 4-1 为其印迹原理示意过程。

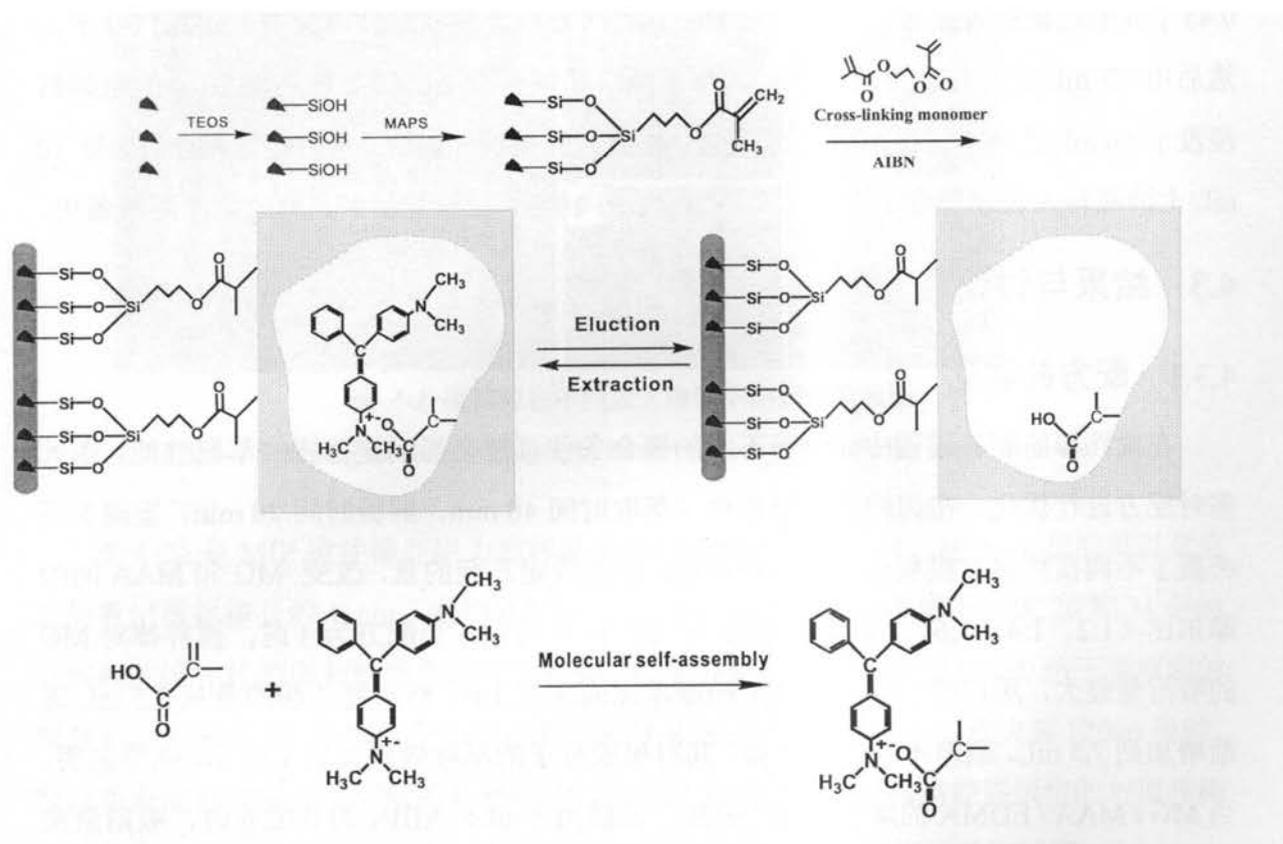


图 4-1 MIP 制备示意图

Fig 4-1 Schematic representation of preparation procedures of MIP

NIP 搅拌棒作为空白对照,除了不加入模板分子以外,其它均与 MIP 制备步骤相同。将制备好的磁性搅拌转子放入 5 ml 的甲醇溶液中,依靠其自身的磁力,固定转速 400 rpm,每隔两小时换一次甲醇溶液,直至在 620 nm 下检测不到孔雀石绿为止。

4.2.3 萃取头的表征

采用扫描电子显微镜对磁性搅拌棒的表现结构进行分析。

4.2.4 HPLC 检测条件

色谱柱为 C18 柱(150 mm*4.6 mm, 5.0 μm),柱温为室温,流动相:(乙腈:50 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液)(pH 4.5)=60:40,流速为 1 mL/min,进样量 20 μL ,孔雀石绿和结晶紫的检测波长为 608 nm,隐色孔雀石绿的检测波长为 267 nm。

4.2.5 样品预处理

实际样品为废水和鱼饲料,废水来自本实验室,鱼饲料来自于当地市场。废水需用

0.45 μm 的过滤膜过滤除去杂质，取 10 ml 过滤好的废液放到玻璃管中，用氮气吹干，然后用 10 mL 的超纯水重新溶解，等待萃取。鱼饲料样品的预处理：将 20 g 的鱼饲料浸没于 50 mL 乙腈中，超声提取 20 min，再缓慢的搅拌 30min，然后静置几分钟，取 10 mL 上清液转入玻璃管中，用氮气吹干，最后用 10 mL 二次水溶解，制成待测溶液备用。

4.3 结果与讨论

4.3.1 配方的优化

在搅拌棒的制备过程中，由于不同的聚合条件可能会影响搅拌棒的萃取性能，因此需对配方进行优化。在相同的实验条件（萃取时间 40 min，解析时间 20 min，室温）下考察了不同搅拌棒对模板分子的吸附性能。首先固定乙腈的量，改变 MG 和 MAA 间的摩尔比（1:2、1:4、1:6、1:8），由配方 1、2、3、4 可知，当配方为 3 时，搅拌棒对 MG 的吸附量最大，所以将 MG 与 MAA 的摩尔比固定在 1:6。然后将乙腈的量从 2.5 mL 逐渐增加到 7.5 mL，制得不同的搅拌棒，其对模板分子的萃取效果如表 1 所示。结果表明，当 MG / MAA / EDMA 的摩尔比为 1:6:20，乙腈为 5 mL，AIBN 为 0.02 g 时，吸附量最大，萃取效果最好，因此实验采取该配方制备搅拌棒。

表 4-1 聚合物溶液配方优化

Table 4-1 The formula optimization of polymer solution

Formulation	MG(mmol)	MAA(mmol)	EDMA(mmol)	AIBN(g)	ACN(mL)	Absorption amount (μg)
1	0.5	0.5	10	0.02	5	0.614
2	0.5	1	10	0.02	5	0.671
3	0.5	2	10	0.02	5	0.690
4	0.5	3	10	0.02	5	0.751
5	0.5	4	10	0.02	5	0.710
6	0.5	3	10	0.02	2.5	0.675
7	0.5	3	10	0.02	3.75	0.594
8	0.5	3	10	0.02	6.25	0.561
9	0.5	3	10	0.02	7.5	0.546

4.3.2 MIP-SBSE 的扫描电镜表征

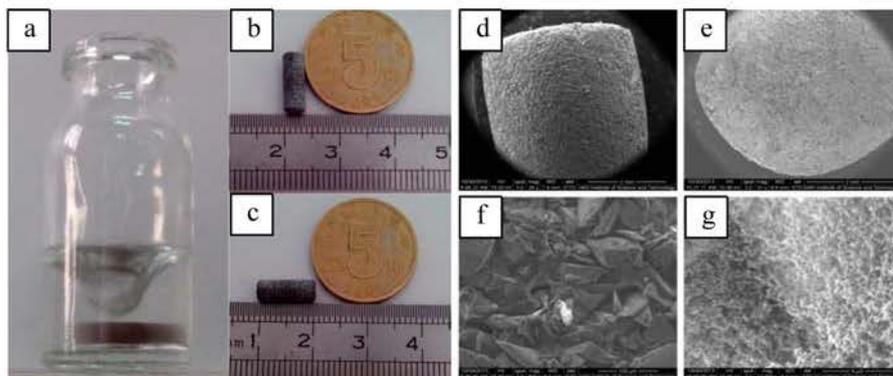


图 4-2 搅拌棒在不同放大倍数下的扫描电镜图

Fig 4-2 Scanning electron micrographs of stirring bar with different magnifications.

图 4-2a 是 MIP 搅拌棒在磁力搅拌器上转动时所拍摄的图片，由 b、c 我们可以更直观的看出搅拌棒长约 1 cm，宽约 0.4 cm，d、e 分别是在扫描电镜下放大 26 和 31 倍时观察到的搅拌棒侧面和横截面的形态结构。f、g 分别是放大 400 和 12000 倍下观察到的搅拌棒的表面形态。从图中我们可以看到搅拌棒表面均匀，致密。当放大到 12000 倍时，搅拌棒表面有很多相互交联的孔径结构，由于孔穴的存在，目标物能够很快的与搅拌棒表面和内部的识别位点相结合，有利于提高萃取性能，从而缩短了萃取时间。

4.3.3 SPME 过程优化

对配方 4 所制备的整体棒进行了萃取条件的优化，实验考察了萃取时间、解吸时间、盐浓度和 pH 值的影响，萃取时将搅拌棒浸入到 5 mL 300 $\mu\text{g/L}$ 的模板分子水溶液中。

(1) 萃取时间

图 4-3a 是搅拌棒对孔雀石绿的吸附量随时间变化的曲线。结果表明，随着萃取时间的延长，萃取量快速的增加，在 40 min 萃取基本达到平衡。这可能于 MIP-SBSE 的特异亲和性及其表面疏松多孔的结构有关。

(2) 解析时间对萃取能力的影响

以 ACN 为解吸溶剂，考察不同解吸时间对解吸效果影响。如图 4-3b 所示，随着时间的延长，解吸量也快速的增加，当解吸时间超过 20 min 时，解吸量基本变化不大，因此解吸时间选为 20 min。

(3) 离子强度对萃取能力的影响

本实验通过添加不同质量浓度(0~25 g/100 mL)的 NaCl 来考察离子强度对孔雀石绿萃取效率的影响。结果如图 4-3c 所示，当 NaCl 含量为 5 g/100 mL 时萃取效率最高，

随着 NaCl 浓度进一步增大, 萃取效率反而下降, 这可能是因为适量的 NaCl 能增加溶液的离子强度, 加大目标物孔雀石绿从水相到有机相的传质效率, 而当 NaCl 浓度过大时, 过高的离子强度削弱了氢键作用力, 故实验选择加入 5 g/100 mL 的 NaCl 来调节离子强度。

(4) 样品基质 pH 对萃取能力的影响

考察样品基质 pH 值在 3.5 和 11.5 之间对孔雀石绿萃取量的影响, 如图 4-4d 所示。结果表明, 随着 pH 的升高萃取量逐渐增加, 当 pH 值高于 5.5 时, 萃取量逐渐降低。这可能是当 pH 小于 5.5 时, 目标物在基质中以离子态为主, 不利于其与 MIP 搅拌棒上的印迹位点相互作用。当在碱性溶液中, 印记聚合物上的羧基会电离, 且孔雀石绿在碱性条件下非常的不稳定。因此 pH 值为 5.5 时为最佳萃取条件。

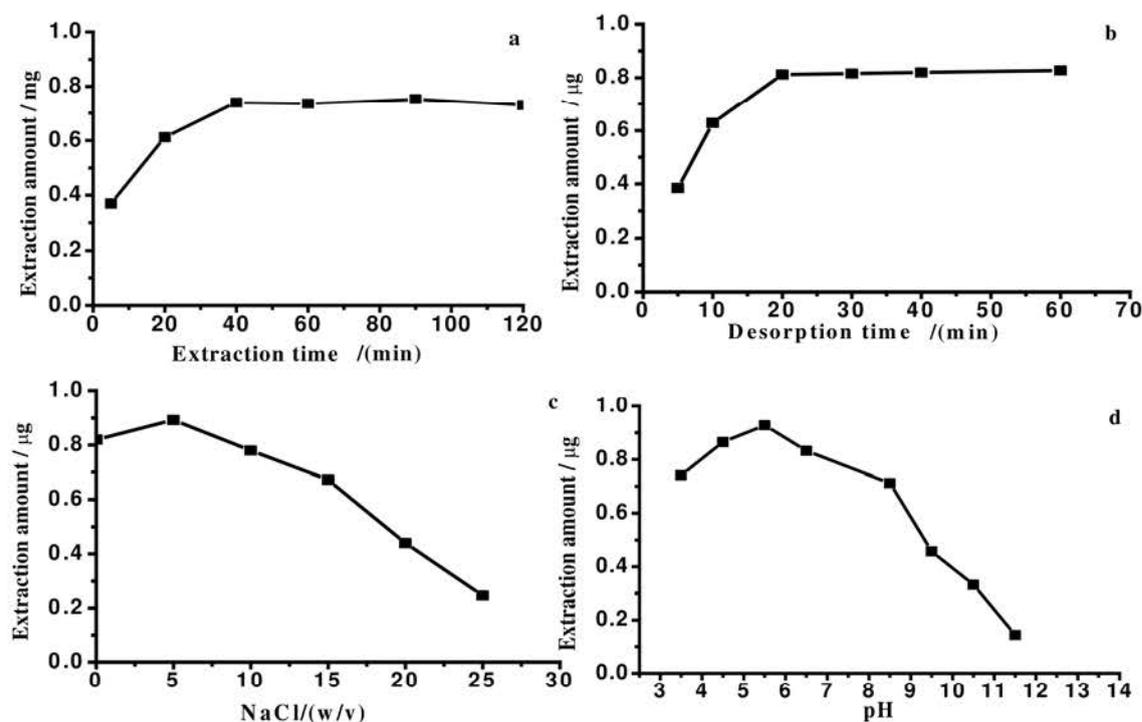


图 4-3 各种因素对孔雀石绿萃取量的影响

Fig 4-3 Effect of different factors on extraction yield of MG

综上, 最优萃取条件为: 在盐浓度为 5 g/100 mL, pH 值为 5.5 的样品中, 萃取 40 min, 用乙腈解吸 20 min。

4.3.4 MIP-SBSE 的选择性

实验选择了与 MG 结构相似的 CV 和 LMG 以及与其结构差异大的 Sudan II 进行了选择性实验。四种物质的结构式如图 4-4 所示, MIP 和 NIP 对 4 种物质的吸附量见图 5-5。

结果表明，MIP 对结晶紫和隐形孔雀石绿也具有的选择性，而对于结构差别较大的 Sudan II 萃取量很低。MIP 对 MG、CV、LMG 和 Sudan II 的萃取量分别为 0.89 μg 、0.69 μg 、0.73 μg 、0.07 μg ，NIP 对这四种物质的萃取量分别为 0.19 μg 、0.19 μg 、0.18 μg 、0.05 μg ，可以看出 MIP 萃取选择性明显优于 NIP。这主要是由于 NIP-SBSE 没有亲和位点，依赖的是非特异性吸附，所以吸附效率比较低。

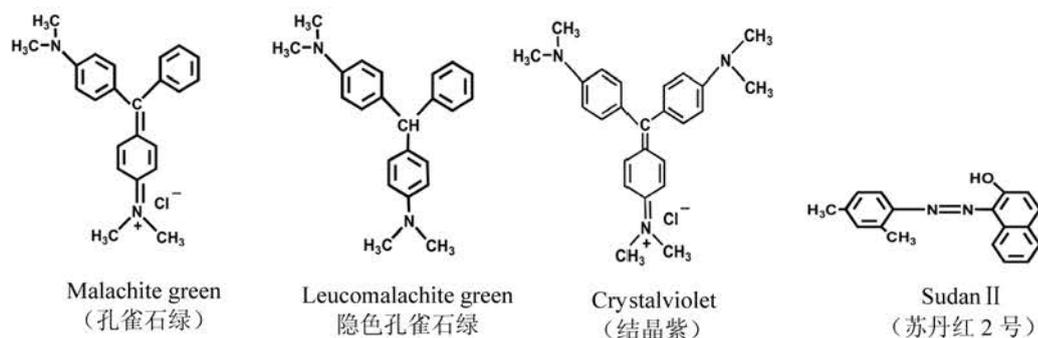


图 4-4 各物质的结构式
Fig 4-4 Structures of all compounds

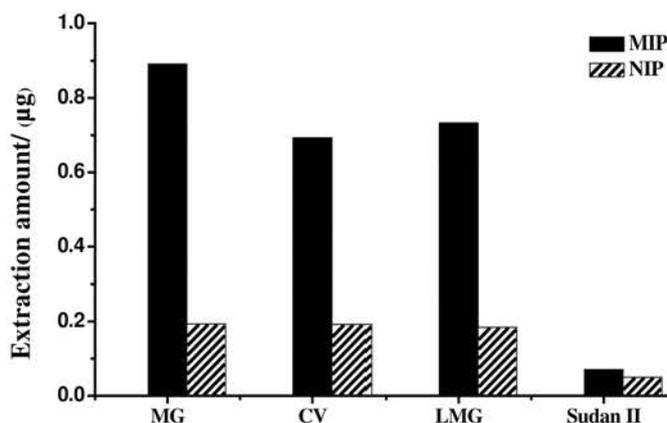


图 4-5 MIP 和 NIP 对四种物质萃取效果的比较

Fig 4-5 Comparison of four substances extracted with MIP-SBSE and NIP-SBSE

4.3.5 MIP 和 NIP 吸附饱和曲线

实验考察了不同浓度范围内 (10-1000 $\mu\text{g}/\text{L}$) MIP 和 NIP 搅拌棒对目标物 MG 的吸附性能。图 4-6 是 MIP 和 NIP 对 MG 的吸附曲线。在 10-500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的范围内，随着萃取液浓度的增加，MIP 和 NIP 对 MG 的吸附量也随之增大，当浓度达到 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时，MIP 和 NIP 对 MG 的吸附已经趋于饱和，此时 MIP 对 MG 的吸附量为 1.44 μg ，而 NIP 的吸附量仅为 0.22 μg ，印迹倍数为 6.5 倍以上。与 NIP-SBSE 相比，MIP-SBSE 对 BPA 显示了很强的结合能力。这主要是因为 MIP-SBSE 上形成了与 MG 在大小、形状和功能基

团相互匹配的、具有多重作用点的孔穴。在特定空穴和的作用下，使得 MIP-SBSE 对 MG 表现出了特异性吸附。

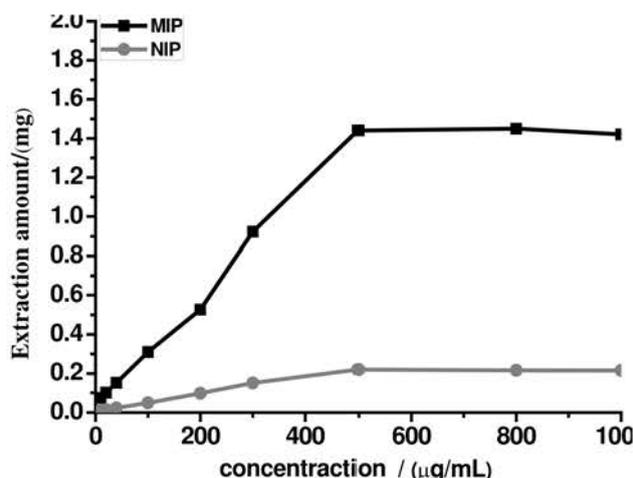


图 4-6 MIP 和 NIP 对孔雀石绿的等温吸附曲线

Fig 4-6 Adsorption isotherms of MG-MIPs and NIPs

4.3.6 线性范围、检出限及重现性

按上述液相条件及优化萃取条件，分别在 10~500 μg/L 浓度范围内对孔雀石绿、结晶紫和隐色孔雀石绿混合水溶液进行测定，得到其峰面积 (y) 与对应浓度 (x) 之间的关系，结果如表 4-2 所示。MG、CV 和 LMG 在 10~500 μg.L⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r^2 > 0.9978$)；以 S/N=3 时对应的浓度作为检出限，MG、CV 和 LMG 的检出限分别为 103、136、215 ng.L⁻¹。考察了方法的重现性，同一个搅拌棒萃取 6 次所得峰面积之间的相对标准偏差为 3.9 %，同批次的不同搅拌棒(n=5)的相对标准偏差为 4.8 %，不同批次搅拌棒 (n=4) 的相对标准偏差为 6.1 %。

表 4-2 方法的线性范围和检出限

Table 4-2 The linear range and detection limit of the method

化合物	线性方程	相关系数(r^2)	线性范围($\mu\text{g.L}^{-1}$)	检测限 (ng.L ⁻¹)
孔雀石绿	$y=0.933x+15.231$	0.9978	10~500	103
结晶紫	$y=1.217x+33.155$	0.9986	10~500	136
隐色孔雀石绿	$y=1.014x+14.317$	0.9987	10~500	215

4.3.7 实际样品测定

在最佳实验条件下，用 MIP-SBSE 对处理后的鱼饲料和废水进行测定。如图 4-7A 所示，未经萃取的空白鱼饲料未检出 MG 和 CV，在色谱死时间后有小的杂质峰(图 7a)，

但经过搅拌富集解析后液相色谱检测的杂质峰明显减少,图 7b 为 500 $\mu\text{g/L}$ 的 MG 和 CV 的混标溶液,c 和 d 是通过非印迹和印迹的搅拌棒萃取经处理的鱼饲料中的添加量为 100 $\mu\text{g/L}$ MG 和 CV 混标溶液后所得的色谱图,可以看出印迹搅拌棒的富集效果更好,且 MG、CV 最大富集倍数可分别达到 15 和 10 倍。图 7e 是处理后的废液直接上液相所得的色谱图, f 是废液经 MIP-SBSE 萃取后所得的色谱图。结果表明,废液中只检测到了 MG,其浓度为 1.45 $\mu\text{g/L}$ 。由 e 和 f 可知,经印迹搅拌棒萃取后,杂质峰明显减小,通过峰面积计算, MG 富集了 15 倍。

为了验证方法的准确性和精密度,对鱼饲料样品进行加标实验。在每个浓度点重复测定 5 次,结果如表 4-3 所示。在加标浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 时,孔雀石绿和结晶紫的回收率分别为 87.3%~94.1% 和 85.2%~92.6%,相对标准偏差(RSD)分别为 4.2%~5.7% 和 4.5%~5.9%。

表 4-3 鱼饲料样品中孔雀石绿的加标回收率 (n=5)

Table 4-3 Recoveries of MG in fish feed samples(n=5)

化合物	鱼饲料					
	50 $\mu\text{g/L}^{-1}$		100 $\mu\text{g/L}^{-1}$		200 $\mu\text{g/L}^{-1}$	
	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
孔雀石绿	87.3	5.7	92.7	4.8	94.1	4.2
结晶紫	85.2	5.9	89.3	5.1	92.6	4.5
隐性孔雀石绿	82.4	6.4	86.5	5.6	89.3	4.7

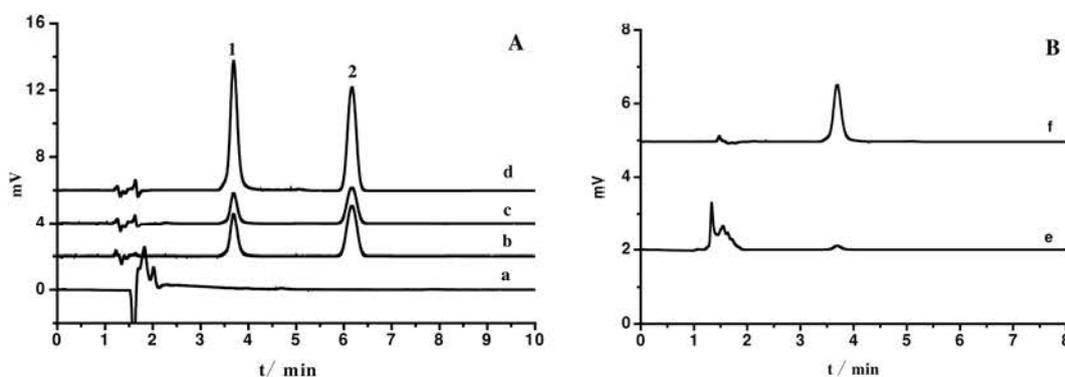


图 4-7 鱼饲料 (A) 和废水样品 (B) 的色谱图

Fig 4-7 Chromatograms of the fish feed sample (A) and waste water (B)

(a) 未经萃取的空白鱼饲料, (b) 500 $\mu\text{g/L}$ 的混标溶液, (c) 经 NIP 萃取后加标浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 鱼饲料样品, (d) 经 MIP 萃取后加标浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 鱼饲料样品, (e) 收集的液相色谱流动相废液, (f) 经 MIP 萃取后的废水样品。峰序: 1-MG, 2-CV。

4.4 本章小结

本实验以玻璃管为模型，将分子印迹聚合溶液和磁粉按照一定的比例加入玻璃管中，采用原位聚合，制备出了对孔雀石绿有特异吸附能力的分子印迹吸附萃取搅拌棒，并与 HPLC 联用检测实际水样和鱼饲料中的孔雀石绿。研究表明，本方法具有成本低、灵敏度高、重现性好、适用于快速分析实际样品中的孔雀石绿及其类似物。

第五章 涂覆型不锈钢丝固相微萃取—高效液相色谱联用

测定豆腐乳中的苏丹红

5.1 引言

固相微萃取 (SPME) 技术是 20 世纪 90 年代兴起的一种样品前处理技术, 它集采样、萃取、浓缩和进样于一体, 具有无溶剂、操作简便、易于实现自动化及适于现场野外分析等优点, 引起了广大分析工作者的广泛关注。30 多年来, 固相微萃取技术有了很大的发展, 萃取载体也发展出多种形式, 有纤维萃取头^[135,136]、管内固相微萃取^[137,138]和微型吸附搅拌棒等。Belardi and Pawliszyn^[135]在九十年代发明并商品化的萃取头是在一根石英纤维上涂敷固相微萃取涂层, 外套细不锈钢管作支撑。这种萃取头如果操作不当, 很容易把石英纤维弄断; 后来, 人们探索制备使用寿命更长、操作更简便的不锈钢为载体的 SPME 纤维^[139-143]。

严秀平^[173]等采用氢氟酸蚀刻不锈钢丝与气相色谱联用测定环境水样中多环芳烃, 实验证明用蚀刻的不锈钢丝作萃取头即可有良好的富集效果, 检出限低至 0.24-0.63 $\mu\text{g/L}$; 胡小刚^[140]等制备了分子印迹不锈钢萃取头与液相色谱联用测定大豆和玉米中的酰胺类除草剂, 具有良好的印迹效果, 印迹的萃取头比非印迹的萃取效果提高了 4 倍; 杨绍贵^[141]等在不锈钢丝表面原位聚合了 (甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 材料, 与液相色谱联用测定了牛奶中磺胺类药物, 方法的检出限在 2-10 $\mu\text{g/L}$ 之间。本研究采用原位聚合的方法, 在处理过的不锈钢丝表面涂覆了 (甲基丙烯酸丁酯—乙二醇二甲基丙烯酸酯) (BMA-EDMA) 涂层, 制备了 Poly (BMA-EDMA) 不锈钢丝萃取头, 克服了石英纤维头易断的缺点, 与高效液相色谱联用测定了豆腐乳中的苏丹红 I、II、III。

5.2 实验部分

5.2.1 试剂与仪器

甲基丙烯酸丁酯 (BMA, New Jersey, USA, 使用前用 5% NaOH 萃取除去阻聚剂); 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA, New Jersey, USA, 使用前用 10% NaOH 萃取除去阻聚剂); 乙烯基三乙氧基硅烷 (98%, 百灵威科技有限公司); 正丙醇、1,4-丁二醇、甲醇及乙腈 (天津科密欧化学试剂有限公司); 苏丹红 I (中国派尼化学试剂厂, 生物染色

剂), 苏丹红 II (沈阳市试剂三厂, 生物染色剂), 苏丹红 III (北京通县育才精细化工厂, 生物染色剂), 氢氧化钠 (天津市瑞金特化学品有限公司, 分析纯), 碳酸钠 (天津市博迪化工有限公司, 分析纯), 三元磷酸钠 (天津市天力化学试剂有限公司, 分析纯), 亚硝酸钠 (天津市瑞金特化学品有限公司), 丙酮 (天津市德恩化学试剂有限公司, 分析纯), 豆腐乳 (新乡胖东来超市购买), 实验用水为二次蒸馏水; 其余试剂均为分析纯。

高压输液泵 (型号: P1201 高压恒流泵, 大连依利特分析仪器有限公司); 紫外检测器 (UV1201 紫外-可见检测器, 大连依利特分析仪器有限公司); C18 色谱柱 (250 mm*4.6 mm, Hypersil ODS 5 μm); 5 mL 的萃取瓶、微型磁转子 (美国 Supelco 公司); 不锈钢丝 (型号: 304, 直径 300-310 μm , 徐州博瑞特钢有限公司); Quanta 200 扫描电子显微镜 (FEI, Hillsboro, Oregon, USA); 磁力搅拌器 (型号: TWCL-D, 河南爱博特科技发展有限公司); DZF-6020 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); 溶剂过滤器 (1000 mL, 天津津腾有限公司); 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

5.2.2 不锈钢丝固相微萃取头的制备

不锈钢丝表面预处理: 首先, 将不锈钢丝截成 10 cm 长, 用丙酮浸泡 30 min, 接着在溶液 1 (NaOH 50 g/L、碳酸钠 20 g/L、三元磷酸钠 20 g/L) 中 80 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 20 min, 再于溶液 2 (亚硝酸钠 50 g/L、碳酸钠 10 g/L) 中 60 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 30 min, 最后甲醇冲洗三次。这样, 就除去了不锈钢丝表面的杂质。然后, 把不锈钢丝浸泡在 (乙烯基三乙氧基硅烷: 水: 甲醇=1:8:1) 溶液中 30 min 进行甲硅烷基化处理, 以便接下来在不锈钢丝表面涂覆涂层; 随后在 150 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 2 h, 接着用乙醇冲洗 3 次, 吹干放好待用^[140]。具体实验过程如图 5-1 所示。

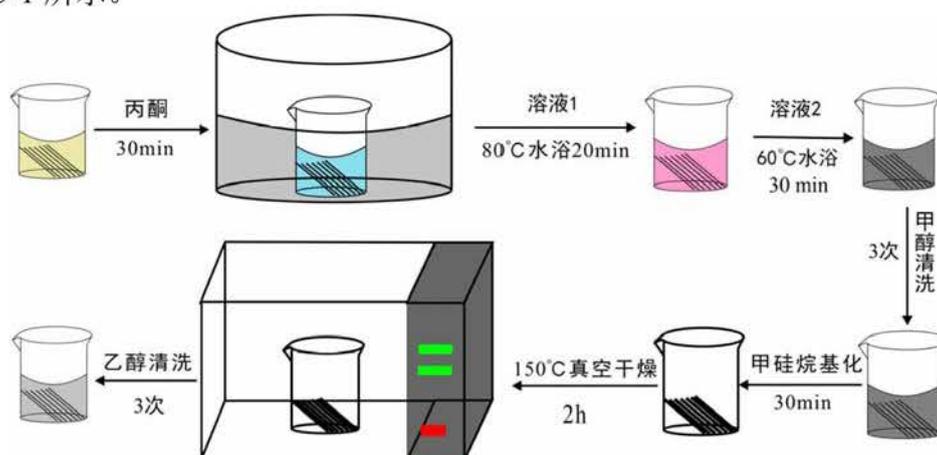


图 5-1 不锈钢丝预处理过程示意图

Fig 5-1 The process of stainless steel pretreatment

不锈钢丝萃取头的制备：准确移取 BMA 240 μL ，EDMA160 μL ，正丙醇 330 μL ，1,4-丁二醇 210 μL ，水 60 μL 配成聚合溶液，然后将上述已处理过的不锈钢丝放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合溶液中，观察到有明显聚沉现象（约 20 min 后），将不锈钢丝取出，80 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥 1h，这样在不锈钢丝表面就涂上了一层 BMA-EDMA 材料；如此反复涂覆十次即可制得不锈钢丝萃取头^[144]。随后将制得的不锈钢丝萃取头插入甲醇中磁力搅拌（200 r/min）洗脱 1 h，重复洗脱 5 次，直至洗脱液用高效液相色谱检测不再有杂峰出现为止。

5.2.3 萃取头的表征

采用 Quanta 200 电子扫描显微镜对不锈钢丝萃取头的形态进行了表征。

5.2.4 SPME-HPLC 分析

将制备好的不锈钢丝萃取头插入 5 mL 萃取液（不同浓度的苏丹红标准水溶液）中，在 200 r/min 下萃取 20 min 后取出，放入 200 μL 乙腈的解吸池中进行超声解吸。解吸液采用流动相为乙腈和水（95:5, v/v），流速为 1 mL/min，检测波长为 1-6 min 478 nm（苏丹红 I），6-12 min 520 nm（苏丹红 II、苏丹红 III）的色谱条件进行分离分析，以峰面积进行定量^[145]。

5.2.5 HPLC 检测条件

依利特 ODS-BP C18 色谱柱(200 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm)，流动相为乙腈和水(95:5, v/v)，流速为 1 mL/min，柱温为室温，检测波长为 1-6 min 478 nm（苏丹红 I），6-12 min 520nm（苏丹红 II、苏丹红 III），进样量为 20 μL 。

5.3 结果与讨论

5.3.1 涂层的表征

用扫描电子显微镜（SEM）对所制备的萃取头形态进行了表征，如图 5-2 所示。从图中可以看出，所制备的萃取头涂层厚度均一（约 3-4 μm ），表面均匀致密，涂覆的涂层与不锈钢丝结合紧密，且表面存在一定大小的孔穴，可吸附苏丹红化合物进行富集。

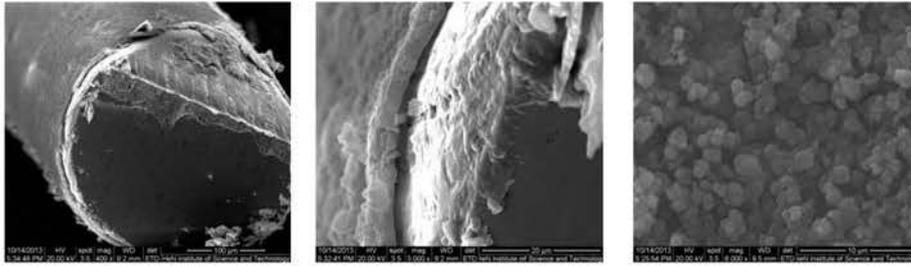


图 5-2 不锈钢丝固相微萃取涂层电镜扫描图

Fig 5-2 Scanning electron micrographs of stainless steel wire solid phase microextraction(SPME) fiber

5.3.2 萃取条件的优化

(1) 萃取时间

萃取时间是影响 SPME 萃取效率的一个重要因素，在 0-60 min 范围内，考察萃取时间对萃取效率的影响，如图 5-3a 所示。从图中可以看出，随萃取时间的延长，萃取效率逐渐提高。苏丹红 I 在 45 min 时接近最大萃取效率，而苏丹红 II 和苏丹红 III 分别在 30 min、15 min 时接近最大。根据 SPME 非平衡理论^[146]，综合考虑样品分析时间，最后选取样品萃取 20 min，因为在 20 min 时，苏丹红 II 和苏丹红 III 已接近最大萃取效率，而苏丹红 I 的萃取效率也足够满足分析实验要求。苏丹红类化合物能够快速吸附到不锈钢丝萃取头上，可能有两个原因：第一，是不锈钢丝表面 3-4 μm 厚的涂层上有可有效吸附苏丹红类化合物的结合位点；第二，涂层表面高度交联的多空骨架结构有利于苏丹红类化合物在涂层中的扩散^[144]。

(2) 解吸时间

本研究考察了 1-45 min 内解析时间对萃取效率的影响，如图 5-3b 所示。随着解吸时间的不断延长，解吸量也不断增大；但是，超过 15 min 后，样品的萃取效率变化不明显。相对于萃取时间来说，解吸过程要快得多。从图 5-3b 中可以看到，在 5 min 内已有约 50-64% 的苏丹红 I -III 被解吸出来，这可能跟涂层的孔径结构和大比表面积有关。

(3) 盐浓度

本文还研究了盐浓度对萃取效率的影响（见图 5-3c）。一般来说，盐析效应可能会降低非极性化合物在水中的溶解度使吸附量增大；但是，NaCl 的加入也可能会改变萃取头表面静态液层的物理结构而导致吸附量降低^[147]。为考察盐浓度对苏丹红类化合物萃取效率的影响，在萃取液中分别加入 10、50、100 g/L 的氯化钠。从图 5-3c 中可以看

到，随盐浓度的增加，萃取效率逐渐降低。说明了溶液盐强度对不锈钢丝萃取头与苏丹红 I -III 分子之间存在的电荷诱导偶极-偶极相互作用产生的影响，不利于其在不锈钢丝 SPME 萃取头表面上吸附。所以，选取实验条件为不加盐。

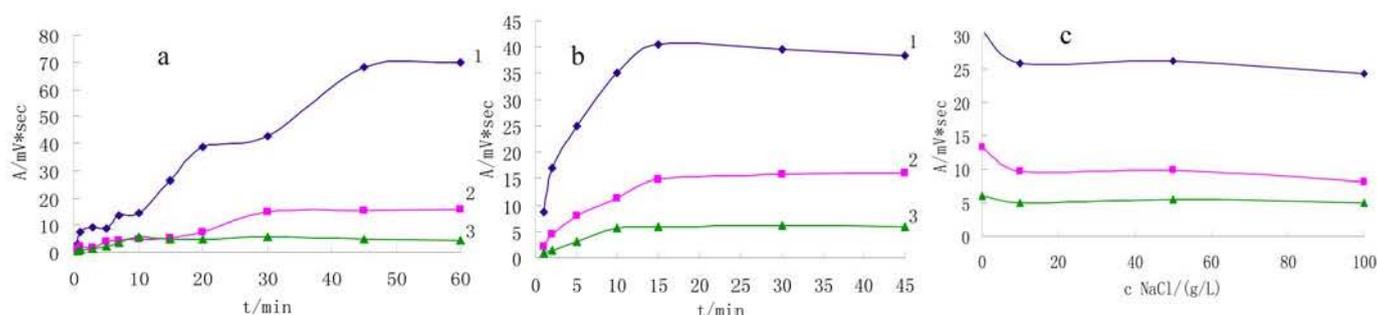


图 5-3 各种因素对 3 种苏丹红类化合物萃取效率的影响

Fig 5-3 Effect of different factors on extraction efficiency of sudan dyes

a-萃取时间；b-解析时间；c-盐浓度。1-苏丹红 I； 2-苏丹红 II； 3-苏丹红 III

5.3.3 线性范围、精密度和检出限

对比研究了 HPLC 法直接进样和不锈钢丝 SPME-HPLC 法的灵敏度，如图 5-4 所示。只有经过 SPME-HPLC，苏丹红 I -III 才可被检测到，说明不锈钢丝萃取头对苏丹红 I -III 有比较明显的富集效果。苏丹红 I 的富集倍数可达 7.2 倍，极大的提高了分析检测的灵敏度。

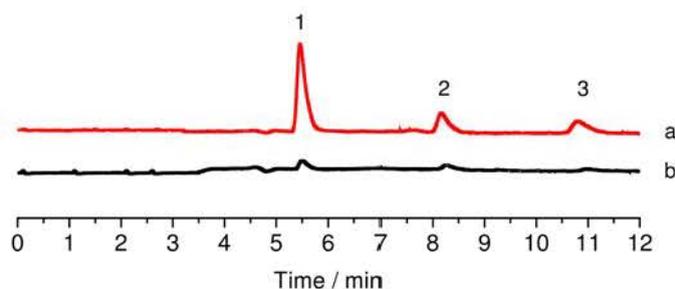


图 5-4 苏丹红类化合物萃取进样(a)与直接进样(b)的色谱图

Fig 5-4 Chromatograms of sudan dyes with SPME-HPLC (a) and direct sampling (b)

1-苏丹红 I； 2-苏丹红 II； 3-苏丹红 III

在优化的萃取条件下，对方法的线性范围、检出限和精密度进行了考察，结果如表 2-1 所示：3 种苏丹红化合物在 50~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系较好 ($r^2 > 0.9232$)；以 $S/N=3$ 时对应浓度作为检出限，3 种苏丹红化合物的检出限均在 2 $\mu\text{g/L}$ 以下。采用相同的实验条件，用同一根不锈钢丝萃取头，连续测定 3 次，3 种苏丹红化合物的保留时间

的 RSD 在 3.88%~9.19%之间; 同时制备 6 根不锈钢丝萃取头, 相同实验条件下, 3 种苏丹红化合物的保留时间的 RSD 在 10.23%~16.48%之间。实验结果表明, 制备的不锈钢丝固相微萃取头重现性良好, 可满足日常分析需要。

表 5-1 方法的线性关系、检出限和精密度

Table 5-1 Linear range, detection limits, correlation coefficient and RSD of the method

分析物	线性范围 (µg/L)	相关系数 (r ²)	检出限 (µg/L)	RSD(%)	
				run-to-rum(n=3)	fiber-to-fiber(n=6)
苏丹红 I	50-1000	0.9872	1.604	4.82	10.23
苏丹红 II	50-900	0.9771	1.808	9.19	16.48
苏丹红 III	50-900	0.9232	0.303	3.88	14.96

5.3.4 实际样品测定

用所建立的分析方法对王致和牌豆腐乳进行检测, 均未检出苏丹红化合物。准确加入不同浓度的苏丹红标准溶液, 同时作空白样品, 确定加标回收率。表 5-2 为各加标浓度的回收率结果, 加标回收率在 79.54%~86.37%之间, 可满足分析要求。

表 5-2 样品添加回收率

Table 5-2 Recoveries of sudan dyes samples

化合物	豆腐乳		
	100 µg/L 回收率 %	300 µg/L 回收率%	500 µg/L 回收率%
苏丹红 I	84.20	86.37	83.05
苏丹红 II	80.14	79.54	81.10
苏丹红 III	82.70	84.73	80.18

5.4 本章小结

本文建立了一种新型的 BMA-EDMA 不锈钢丝固相微萃取的样品预处理方法, 并与 HPLC 联用检测环境豆腐乳中的苏丹红 I -III。该方法成本低, 一次可制得多根萃取头, 且自制 SPME 萃取头可重复多次使用; 方法操作简单, 快速、灵敏, 精密度好, 实际样品分析的回收率高, 该方法适用于快速分析豆腐乳中的苏丹红 I -III。

第六章 全文总结与展望

6.1 全文总结

食品安全问题近几年来日益凸显,由于大部分食品样品基质复杂,对目标物的检测干扰较大,故建立快速有效的样品前处理技术对检测方法的灵敏性和准确性显得至关重要。本文分别制备了不锈钢丝固相微萃取头和吸附萃取搅拌棒分别对食品中的苏丹红、塑化剂、双酚 A 和孔雀石绿进行了分析测定,利用电镜对萃取头和搅拌棒进行了形态表征,优化了 SPME 和 SBSE 的萃取条件,研究了 MI-SBSE 对不同物质的选择性,并结合 HPLC 对矿泉水中的双酚 A 和鱼饲料中的孔雀石绿进行了分析测定。结果表明,所建立的 MI-SBSE 样品前处理技术具有选择性高、重现性好、稳定性强的优点,从而为双酚 A 和孔雀石绿的分离富集提供了一种新方法。

(1) 采用原位聚合法将制备出了吸附萃取搅拌棒,与高效液相色谱联用测定了水中 DBP、DMP 和 DEP。实验结果表明,在最优条件下,同根 (n=5)、同批次(n=5)和不同批次 (n=3) 搅拌棒间的精密度分别为 4.1%、5.6%和 7.2%。水样中 DBP、DMP、DEP 的加标回收率分别为 89.2%~92.1%、91.9%~96.6%、94.3%~96.7%,线性范围为 5~800 $\mu\text{g/L}$,方法检出限分别为 210 ng/L、93 ng/L、150 ng/L。

(2) 以双酚 A 为模板分子,利用原位聚合法制备了新型整体式分子印迹吸附萃取搅拌棒(MIP-SBSE),并与高效液相色谱 (HPLC) 联用测定了矿泉水中的双酚 A。实验结果表明,在最优条件下, MIP-SBSE 对 BPA, PP 和 P 的吸附量分别是 NIP-SBSE 的 3.07, 2.17 和 1.29 倍。该方法的线性范围为 10-500 $\mu\text{g/L}$; 检出限为 0.10 $\mu\text{g/L}$,用该方法对矿泉水中的双酚 A 进行分析测定,测得加标回收率为 88.50%-96.1%。

(3) 以孔雀石绿为模板,磁粉为磁力供体,利用原位聚合法制备了新型整体式分子印迹吸附萃取搅拌棒(MIP-SBSE),并与高效液相色谱(HPLC)联用测定了鱼饲料中的孔雀石绿。对萃取过程的优化结果为:萃取时间为 40 min, NaCl 的加入量为 5% (w/v),解吸时间为 20 min, pH 值为 5.5; 实验结果表明,在最优条件下, MIP 对结晶紫和隐形孔雀石绿也具有选择性,而对于结构差别较大的 Sudan II 萃取量很低。MIP 对 MG、CV、LMG 和 Sudan II 的萃取量分别为 0.89 μg 、0.69 μg 、0.7 μg 、0.07 μg , NIP 对这四种物质的萃取量分别为 0.19 μg 、0.19 μg 、0.18 μg 、0.05 μg ,可以看出 MIP 萃取选择性明显

优于 NIP。该方法的线性范围为 10-500 $\mu\text{g/L}$ ，检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$ ，用该方法对鱼饲料中的孔雀石绿进行分析测定，测得加标回收率为 87.5%-94.0%。

(4) 采用原位聚合法制备了不锈钢丝固相微萃取纤维，与高效液相色谱联用测定了豆腐乳中的苏丹红 I、II、III。实验结果表明，在优化好的 SPME 条件下，建立了 SPME-HPLC 分离测定豆腐乳中苏丹红的方法。柱内 ($n=3$) 和柱间 ($n=6$) 精密度 (RSD) 分别小于 9.19% 和 16.48%，对苏丹红 I、II、III 的加标回收率在 79.54%~86.37% 之间；3 种苏丹红的线性范围为 50~900 $\mu\text{g/L}$ ，线性相关系数 $r^2 > 0.9232$ ，检出限在 0.303 $\mu\text{g/L}$ ~1.808 $\mu\text{g/L}$ 之间。

6.2 创新点

本文以不锈钢丝和磁粉为支撑，分别制备了不锈钢丝固相微萃取头和吸附萃取搅拌棒，不锈钢丝固相微萃取头具备一定的刚性，在使用过程中，不容易折断，提高了使用次数。磁性搅拌棒在萃取时能够自身的完成搅拌，且聚合物镶嵌在搅拌棒内部，避免了使用过程中涂层易脱落的问题。

6.3 展望

将 MIT 与 SBSE 技术相结合，极大地提高了 SBSE 技术的选择性和灵敏度，因此，近年来在环境、生物及食品分析领域取得了一定的成果。但是 MIT 目前还处于探索和开发阶段，无论是理论研究还是方法应用方面都不够系统和成熟。本文也有一些方面需要进一步改进和解决：

(1) 由于分子印迹聚合物镶嵌在搅拌棒内部，模板分子不容易洗脱，且在洗脱过程中需要大量溶剂，同时 MIP 结合位点的作用机理以及识别过程的传质机理还不太清楚，要从分子水平理解的话还需要进一步探索和研究。

(2) 不锈钢丝固相微萃取头在制备过程中比较费时，需要多次的涂覆，且涂层在多次使用过程中易出现脱落的问题。

参考文献

- [1] Wulff G, Sarhan A, Zabrocki K. Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates [J]. *Tetrahedron Lett*, 1973, 14(44): 4329-4332.
- [2] Wulff G, Vesper W, Grobe - Einsler R, et al. Enzyme - analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates[J]. *die Makromolekulare Chemie*, 1977, 178(10): 2799-2816.
- [3] 小宫山真. 分子印迹学—从基础到应用[M]. 吴世康, 汪鹏飞, 译. 北京: 科学出版社, 2006: 8-11.
- [4] 姜忠义. 分子印迹聚合物制备与应用[J]. *化学世界*, 2003, 44(2): 105-108.
- [5] 怀其勇, 杨俊佼. 用于分子识别的分子印迹聚合物固定相[J]. *分析测试学报*, 2001, 20(6): 84-89.
- [6] 梁金虎, 罗林, 唐英. 分子印迹技术的原理与研究进展[J]. *重庆文理学院学报: 自然科学版*, 2009, 28(5): 38-43.
- [7] Matsui J, Doblhoff Dier O, Takeuchi T. Atrazine-selective polymer prepared by molecular imprinting technique[J]. *Chem Lett*, 1995, 24(6): 489-492.
- [8] Sellergren B. Imprinting dispersion polymers : a new class of easily accessible affinities stationatay mimics[J]. *J Chromatogr, A*, 1994, 673(1): 133-141.
- [9] Nisson K, Lindell J, Norrlof O, et al. Imprinted polymers as antibody mimetics and new gels for selection in capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr*, 1994, 680(1): 57-61.
- [10] Ye L, Cormack P A G, Mosbach K. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay[J]. *Analytical Communications*, 1999, 36(2): 35-38.
- [11] Ye L, Weiss R, Mosbach K. Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres[J]. *Macromolecules*, 2000, 33(22): 8239-8245.
- [12] Hosoya K, Yoshizako K, Tanaka N, et al. Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique[J]. *Chemistry Letters*, 1994 (8): 1437-1438.
- [13] Haginaka J, Takehira H, Hosoya K, et al. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 849(2): 331-339.
- [14] Glad M, Reinholdsson P, Mosbach K. Molecularly imprinted composite polymers based on trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) particles for efficient enantiomeric separations[J]. *Reactive polymers*, 1995, 25(1): 47-54.
- [15] 张立永, 成国祥. 分子印迹聚合物微球的制备及应用[J]. *高技术通讯*, 2002, 12(7): 108-110.
- [16] Hart B R, Shea K J. Molecular imprinting for the recognition of N-terminal histidine peptides in aqueous solution[J]. *Macromolecules*, 2002, 35(16): 6192-6201.
- [17] 赖家平, 何锡文, 郭洪声, 等. 分子印迹技术的回顾, 现状与展望[J]. *分析化学*, 2001, 29(7): 836-844.

- [18] Jiang M, Shi Y, Zhang R L, et al. Selective molecularly imprinted stationary phases for bisphenol A analysis prepared by modified precipitation polymerization[J]. *Journal of separation science*, 2009, 32: 3265-3273.
- [19] Khan H, Khan T, Park J K. Separation of phenylalanine racemates using d-phenylalanine imprinted microbeads as HPLC stationary phase[J]. *Separation and Purification Technology*, 2008, 62(2): 363-369.
- [20] Sellergren B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer[J]. *Analytical chemistry*, 1994, 66(9): 1578-1582.
- [21] Li Y, Fu Q, Liu M, et al. Separation and enrichment of trace ractopamine in biological samples by uniformly-sized molecularly imprinted polymers[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 2(6): 395-402.
- [22] Ma C, Chen H, Sun N, et al. Preparation of molecularly imprinted polymer monolith with an analogue of thiamphenicol and application to selective solid-phase microextraction[J]. *Food Analytical Methods*, 2012, 5(6): 1267-1275.
- [23] Pietrzyk A, Suriyanarayanan S, Kutner W, et al. Selective histamine piezoelectric chemosensor using a recognition film of the molecularly imprinted polymer of bis (bithiophene) derivatives[J]. *Analytical chemistry*, 2009, 81(7): 2633-2643.
- [24] Thoelen R, Vansweevelt R, Duchateau J, et al. A MIP-based impedimetric sensor for the detection of low-MW molecules[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23(6): 913-918.
- [25] 周路, 叶光荣, 袁若, 等. 甲磺酸帕珠沙星分子印迹手性电容型传感器[J]. *中国科学: B 辑*, 2007, 37(1): 48-53.
- [26] Piletsky S A, Panasyuk T L, Piletskaya E V, et al. Receptor and transport properties of imprinted polymer membranes—a review[J]. *Journal of membrane science*, 1999, 157(2): 263-278.
- [27] Sueyoshi Y, Fukushima C, Yoshikawa M. Molecularly imprinted nanofiber membranes from cellulose acetate aimed for chiral separation[J]. *Journal of Membrane Science*, 2010, 357(1): 90-97.
- [28] Lehmann M, Brunner H, Tovar G E M. Molecularly imprinted nanoparticles as selective phase in composite membranes: Hydrodynamics and separation in nanoscale beds[J]. *Chemie Ingenieur Technik*, 2003, 75(1-2): 149-153.
- [29] Leonhardt A, Mosbach K. Enzyme-mimicking polymers exhibiting specific substrate binding and catalytic functions[J]. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, 1987, 6(2): 285-290.
- [30] Cheng Z, Li Y. The role of molecular recognition in regulating the catalytic activity of peroxidase-like polymers imprinted by a reductant substrate[J]. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2006, 256(1): 9-15.
- [31] Arthur C L, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers[J]. *Analytical chemistry*, 1990, 62(19): 2145-2148.
- [32] 王旭, 冯晓翔. 固相微萃取技术在色谱分析中的研究进展[J]. *天津化工*, 2010, 24(2): 5-7.
- [33] 江燕, 王文静, 袁方. 固相微萃取在食品农药残留检测中应用[J]. *粮食与油脂*, 2007, 8: 44-46.

- [34] Hawthorne S B, Miller D J, Pawliszyn J, et al. Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers[J]. *Journal of Chromatography A*, 1992, 603(1): 185-191.
- [35] Contarini G, Povolo M. Volatile fraction of milk: comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(25): 7350-7355.
- [36] 王云川, 李红, 刘伟成, 等. 采用气相色谱-质谱分析啤酒中的风味物质 [J][J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(11): 90-94.
- [37] Young J C, Chu C L G, Lu X, et al. Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, 52(26): 8086-8093.
- [38] Correia M, Delerue-Matos C, Alves A. Multi-residue methodology for pesticide screening in wines[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 889(1): 59-67.
- [39] González-Rodríguez M J, Liebanas F J A, Frenich A G, et al. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005, 382(1): 164-172.
- [40] 袁宁, 余彬彬, 张茂升, 等. 微波辅助萃取-固相微萃取-气相色谱法同时测定茶叶中的有机氯和拟除虫菊酯农药残留[J]. *色谱*, 2006, 24(6): 636-640..
- [41] 王林祥, 刘杨岷, 王建新. 酱油风味成分的分离与鉴定[J]. *中国调味品*, 2005, (1): 45-48.
- [42] Hu X, Fan Y, Zhang Y, et al. Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fiber prepared by surface reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization for monitoring of Sudan dyes in chilli tomato sauce and chilli pepper samples[J]. *Analytica chimica acta*, 2012, 731: 40-48.
- [43] Baltussen E, Sandra P, David F, et al. Study into the equilibrium mechanism between water and poly (dimethylsiloxane) for very apolar solutes: Adsorption or sorption?[J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(22): 5213-5216.
- [44] Frank D, Tienpont B, Sandra P. Development of a stir bar sorptive extraction[J]. *LCGC North America*, 2003, 21(2): 1-7.
- [45] Popp P, Bauer C, Wennrich L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 436(1): 1-9.
- [46] David F, Sandra P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1152(1): 54-69.
- [47] Jordy Vercauteren, Christophe Pérès, Christophe Devos, Pat Sandra, Frank Vanhaecke, and Luc Moens. Stir Bar Sorptive Extraction for the Determination of ppq-Level Traces of Organotin Compounds in Environmental Samples with Thermal Desorption Capillary Gas Chromatography-ICP Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(7), 1509-1514.

- [48] González-Toledo E, Prat M D, Alpendurada M F. Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 923(1-2): 45-52.
- [49] V. M León, B Álvarez, M.A Cobollo, S Muñoz, I Valor. Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry: I. Method optimization[J]. *Journal of Chromatography A*. 2003, 999(1–2): 91–101.
- [50] Pacolay B D, Ham J E, Wells J R. Use of solid-phase microextraction to detect and quantify gas-phase dicarbonyls in indoor environments[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1131(1-2): 275-280.
- [51] Cai L, Xing J, Dong L, et al. Application of polyphenylmethylsiloxane coated fiber for solid-phase microextraction combined with microwave-assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in Chinese teas[J]. *Journal of Chromatography A* , 2003, 1015(1-2): 11-21.
- [52] RodilR, Popp P. Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils[J]. *Jouranal of Chromatography A*. 2006, 1124(1–2): 82–90.
- [53] Vânia Gomes Zuin, Manuela Schellin, Larisse Montero, Janete H. Yariwake,Fabio Augusto, Peter Popp. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane–assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1114(2): 180–187.
- [54] Fidalgo-Used N, Centineo G, Sanz-Medel A, et al. Solid-phase microextraction as a clean-up and preconcentration procedure for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1017(1-2): 35-44.
- [55] Sandra P, Tienpont B, David F. Multi–residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000(1): 299–309.
- [56] Ridgway K, Lalljie S P D, Smith R M. An alternative method for analysis of food taints using stir bar sorptive extraction[J]. *Analytica chimica acta*, 2010, 677(1): 29–36.
- [57] Huang X, Lin J, Yuan D. A new anionic exchange stir bar sorptive extraction coating based on monolithic material for the extraction of inorganic anion. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(30), 4898–4903.
- [58] B. Tienpont, F. David, K. Desmet, P. Sandra. Stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary GC–MS applied to biological fluids[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002, 373(1–2), 46–55.
- [59] Balbão M S, Bertucci C, Bergamaschi M M, et al. Rifampicin determination in plasma by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2010, 51(5): 1078–1083.
- [60] C. Prado C, Marín P, Periago J F. Application of polyphenylmethylsiloxane coated fiber for solid-phase microextraction combined with microwave-assisted extraction for the determination of

- organochlorine pesticides in Chinese teas[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1011(1-2): 125-134.
- [61] Liu W, Wang H, Guan Y. Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol-gel technology[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1045(1): 15-22.
- [62] Liu W, Hu Y, Zhao J, et al. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction[J]. *Journal of chromatography A*, 2005, 1095(1): 1-7.
- [63] Guan W, Wang Y, Xu F, et al. Poly (phthalazine ether sulfone ketone) as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction of organochlorine compounds and organophosphorus pesticides[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1177(1): 28-35.
- [64] 王彦娟, 观文娜, 王华, 等. 固态萃取搅拌棒技术与气相色谱联用测定植物中的有机氯农药[J]. *分析化学*, 2008, 26(7): 1004-1008.
- [65] Lambert J P, Mullett W M, Kwong E, et al. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1075(1): 43-49.
- [66] Hu Y, Zheng Y, Zhu F, et al. Sol-gel coated polydimethylsiloxane/ β -cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1148(1): 16-22.
- [67] Wang L, Hosaka A, Watanabe C, et al. Development of a novel solid-phase extraction element for thermal desorption gas chromatography analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1035(2): 277-279.
- [68] Yang C, Ji X, Lan X. Preparation of PDMS-coated microspheres by sol-gel method for sorptive extraction of PAHs[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2008, 19(8): 996-999.
- [69] Huang X, Yuan D. Preparation of stir bars for sorptive extraction based on monolithic material[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1154(1): 152-157.
- [70] Huang X, Qiu N, Yuan D. Direct enrichment of phenols in lake and sea water by stir bar sorptive extraction based on poly (vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1194(1): 134-138.
- [71] Huang X, Yuan D, Huang B. Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection[J]. *Talanta*, 2008, 75(1): 172-177.
- [72] Huang X, Qiu N, Yuan D. Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high performance liquid chromatography analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(46): 8240-8245.
- [73] Huang X, Qiu N, Yuan D, et al. Sensitive determination of strongly polar aromatic amines in water samples by stir bar sorptive extraction based on poly (vinylimidazole-divinylbenzene) monolithic material and liquid chromatographic analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(20): 4354-4360.
- [74] Huang X, Qiu N, Yuan D, et al. A novel stir bar sorptive extraction coating based on monolithic

- material for apolar, polar organic compounds and heavy metal ions[J]. *Talanta*, 2009, 78(1): 101-106.
- [75] 汤轶伟, 魏立巧, 兰建兴, 等. 食品中塑化剂残留检测技术最新研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(22): 348-354.
- [76] 赵静, 徐方旭, 孟实, 等. 食品中“塑化剂”检测技术与应对策略[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(6): 141-145.
- [77] 邓莉, 郝学财. 分散固相萃取技术分析油脂类食品中塑化剂含量[J]. *分析化学*, 2013, 41(7): 1037-1043.
- [78] Liu Y, Guan Y, Yang Z, et al. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18(3): 293-303.
- [79] 吴惠勤, 朱志鑫, 黄晓兰, 等. 不同类别食品中 21 种邻苯二甲酸酯的气相色谱-质谱测定及其分布情况研究[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(10): 1079-1087.
- [80] Cai Y, Cai, Shi Y, et al. A liquid-liquid extraction technique for phthalate esters with water-soluble organic solvents by adding inorganic salts[J]. *Microchimica Acta*, 2007, 157:73-79.
- [81] Self R L, Wu W H. Rapid qualitative analysis of phthalates added to food and nutraceutical products by direct analysis in real time/orbitrap mass spectrometry[J]. *Food Control*, 2012, 25: 13-16.
- [82] Guo Z, Wei D, Wang M, et al. Determination of six phthalic acid esters in orange juice packaged by PVC bottle using SPE and HPLC-UV: Application to the migration study[J]. *Journal of chromatographic science*, 2010, 48(9): 760-765.
- [83] 郑向华, 林立毅, 方恩华, 等. 固相萃取-气相色谱-质谱法测定食品中 23 种邻苯二甲酸酯[J]. *色谱*, 2012, 30(1): 27-32.
- [84] Russo M V, Notardonato I, Cinelli G, et al. Evaluation of an analytical method for determining phthalate esters in wine samples by solid-phase extraction and gas chromatography coupled with ion-trap mass spectrometer detector[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012, 402(3): 1373-1381.
- [85] 李一尘, 徐静, 董伟峰, 等. 气相色谱及气相色谱-质谱法检测食品中增塑剂[J]. *检验检疫学刊*, 2012, 22(5): 40-44.
- [86] 刘俊, 朱然, 田延河, 等. 气相色谱-质谱法对食品包装材料中邻苯二甲酸酯类与己二酸酯类增塑剂的同时测定[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(9): 943-947.
- [87] 卢春山, 李玮, 屠海云, 等. 气相色谱-质谱联用测定食品中的邻苯二甲酸酯[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(10):1036-1040.
- [88] Liang P, Zhang L L, Peng L L, et al. Determination of phthalate esters in soil samples by microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Bull Environ Contam*, 2010, 85: 147-151.
- [89] Cortazar E, Bartolomé L, Delgado A, et al. Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534(2): 247-254.

- [90] Huang L, Liu Z, Yi L, et al. Determination of the Banned Phthalates in PVC Plastic of Toys by the Soxhlet Extraction-Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method[J]. *International Journal of Chemistry*, 2011, 3(2), 169-173.
- [91] Meng J, Bu J, Deng C H, et al. Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography–mass spectrometry analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(12): 1585-1591.
- [92] Luo Y B, Yu Q W, Yuan B F, et al. Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes[J]. *Talanta*, 2012, 90: 123-131.
- [93] 颜文红, 叶常明. 分光光度法同时测定水中邻苯二甲酸和邻苯二甲酸二甲酯[J]. *环境化学*, 1995, 14(2):145-150.
- [94] 李满秀, 王华燕. 荧光法测定环境样品中的邻苯二甲酸酯[J]. *分析化学*, 2005, 33(9):1315-1317.
- [95] 王鑫, 许小苗, 俞晔, 等. 固相萃取气相色谱法同时测定水中的酞酸酯类环境激素[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(4): 287-289.
- [96] Ostrovský I, Čabala R, Kubinec R, et al. Determination of phthalate sum in fatty food by gas chromatography[J]. *Food chemistry*, 2011, 124(1): 392-395.
- [97] Farajzadeh M A, Mogaddam M R A. Air-assisted liquid–liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography–flame ionization detection[J]. *Analytica chimica acta*, 2012, 728: 31-38.
- [98] Adeniyi A A, Okedeyi O O, Yusuf K A. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria[J]. *Environmental monitoring and assessment*, 2011, 172(1-4): 561-569.
- [99] Farahani H, Ganjali M R, Dinarvand R, et al. Screening method for phthalate esters in water using liquid-phase microextraction based on the solidification of a floating organic microdrop combined with gas chromatography–mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2008, 76(4): 718-723.
- [100] Cacho J I, Campillo N, Vinas P, et al. Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1241: 21-27.
- [101] Wu X, Hong H, Liu X, et al. Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 444: 224-230.
- [102] Cavaliere B, Macchione B, Sindona G, et al. Tandem mass spectrometry in food safety assessment: the determination of phthalates in olive oil[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1205(1): 137-143.
- [103] 李任伟, 程明川, 李想, 等. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱法检测食用油中邻苯二甲酸酯的含量[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(12): 484-485.
- [104] Ranjbari E, Hadjmohammadi M R. Magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid

- microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of phthalate esters in drinking and environmental water samples[J]. *Talanta*, 2012, 100: 447-453.
- [105] 庞世敏, 袁敏, 赵桂兰, 等. 气相色谱法测定邻苯二甲酸酯类增塑剂的研究[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*. 2010, (4): 70-74.
- [106] Mortensen G K, Main K M, Andersson A M, et al. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005, 382(4): 1084-1092.
- [107] Feás C P, Alonso M C, Peña-Vázquez E, et al. Phthalates determination in physiological saline solutions by HPLC-ES-MS[J]. *Talanta*, 2008, 75: 1184-1189.
- [108] 李拥军, 熊文明, 陈坚文, 等. 固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定罗非鱼中 9 种邻苯二甲酸酯[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(3): 278-283.
- [109] Cacho J I, Campillo N, Vinas P, et al. Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1241: 21-27.
- [110] Vom Saal F S, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of Bisphenol A shows the need for a new risk assessment [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(8): 926-933.
- [111] Haighton L A, Hlywka J J, Doull J, et al. An evaluation of the possible carcinogenicity of Bisphenol A to humans[J]. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 2002, 35(2): 238-254.
- [112] Xu J P, Osuga Y, Yano T, et al. Bisphenol A induces apoptosis and G2- to-M arrest of ovarian granulosa cells[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2002, 292(2): 456-462.
- [113] Safe S H, Pallaroni L, Yoon K, et al. Problems for risk assessment of endocrine-active estrogenic compounds[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(Suppl 6):925- 929.
- [114] Wen Y, Zhou B, Xu Y, et al. Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1133(1-2): 21-28.
- [115] 马强, 白桦, 王超, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定纺织品和食品包装材料中的壬基酚、辛基酚和双酚 A [J]. *分析化学*, 2010, 38(2): 197-201.
- [116] 李向丽, 林里, 邹世春, 等. 衍生化固相微萃取与气相色谱-质谱联用测定生活垃圾渗沥液中双酚 A [J]. *分析化学*, 2006, 34(3): 325-328.
- [117] 颜流水, 郑鄂湘, 杨晓燕, 等. 固相萃取-液质联用法同时测定饮用水中双酚 A 和邻苯二甲酸丁酯[J]. *分析实验室*, 2007, 26(6): 10-14.
- [118] Chang C M, Chou C C, Lee M R. Determining leaching of bisphenol A from plastic containers by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 539(1-2): 41-47.
- [119] Rezaee M, Yamini Y, Shariati S, et al. Dispersive liquid-liquid chromatography-UV detection as a

- very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water sample[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(9): 1511–1514.
- [120] 关文娜, 许峰, 孟子辉, 等. 固态萃取搅拌棒技术/气相色谱联用分析废水中的痕量爆炸物[J]. *高等学校化学学报*, 2008, 3(3), 468–472.
- [121] 宫向红, 徐英江, 任传博, 等. HPLC 测定水产品中孔雀石绿, 亚甲基蓝, 结晶紫及其代谢物的残留量[J]. *食品科学*, 2012, 33(04): 144-147.
- [122] 冯雷, 孙文通, 李波, 等. 水产品中残留孔雀石绿和无色孔雀石绿液质联用分析方法研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(4), 193-196.
- [123] Pierrard M A, Kestemont P, Delaive E, et al. Malachite green toxicity assessed on asian catfish primary cultures of peripheral blood mononuclear cells by a proteomic analysis[J]. *Aquat Toxicol*, 2012, 114 /115: 142-152.
- [124] Bueno M J M, Herrera S, Ucles A, et al. Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 665(1): 47-54.
- [125] He Huan, YANG Shaogui, YU Kai, et al. Microwave induced catalytic degradation of crystal violet in nano-nickel dioxide suspensions[J]. *Journal of hazardous materials*, 2010, 173(1): 393-400.
- [126] 张志刚, 施冰, 陈鹭平, 等. 液相色谱法同时测定水产品中孔雀石绿和结晶紫残留[J]. *分析化学*, 2006, 34(5), 663-667.
- [127] Villar-pulido M, Gilbert-lópez B, García-reyes J F, et al. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1419-1427.
- [128] Bilandžić N, Varenina I, Kolanović B S, et al. Malachite green residues in farmed fish in Croatia[J]. *Food Control*, 2012, 26(2): 393-396.
- [129] Tao Y F, Chen D M, Chao X Q, et al. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up[J]. *Food Control*, 2011, 22(8): 1246-1252.
- [130] Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1089(1): 187-192.
- [131] 陶艳玲, 岑为禧, 邓爱妮, 等. 整体式固相微萃取搅拌棒-分光光度法测定孔雀石绿[J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2011, 24(2): 66-70.
- [132] Ahn S, Kim B, Lee Y, et al. Accurate Determination of malachite green and leucomalachite green in fish using isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry (ID-LC/MS)[J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2010, 31(11): 3228-3232.
- [133] Chen S, Yu X, He X, et al. Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature

- cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 1297-1300.
- [134] Stubbings G, Tarbin J, Cooper A, et al. A multi-residue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin[J]. *Analytica chimica acta*, 2005, 547(2): 262-268.
- [135] Dietz C, Sanz J, Camara C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1103(2): 183-192.
- [136] 王超英, 李碧芳, 李攻科. 固相微萃取/高效液相色谱联用分析水样中邻苯二甲酸酯[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(5): 35-38.
- [137] Fan Y, Zhang M, Feng Y Q. Poly (acrylamide-vinylpyridine-N, N'-methylene bisacrylamide) monolithic capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1099(1): 84-91.
- [138] Wen Y, Wang Y, Feng Y Q. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography[J]. *Talanta*, 2006, 70(1): 153-159.
- [139] Xu H, Li Y, Jiang D, et al. Hydrofluoric acid etched stainless steel wire for solid-phase microextraction[J]. *Analytical chemistry*, 2009, 81(12): 4971-4977.
- [140] Hu X, Dai G, Huang J, et al. Molecularly imprinted polymer coated on stainless steel fiber for solid-phase microextraction of chloroacetanilide herbicides in soybean and corn[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(38): 5875-5882.
- [141] 彭英, 何欢, 孙成, 等. 新型固相微萃取-高效液相色谱测定牛奶中 4 种磺胺类药物残留[J]. *分析化学*, 2013, 41(4): 529-533.
- [142] 贾其娜, 赵广超. 石墨烯固相微萃取纤维的制备及对多氯联苯的检测[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(5): 541-546.
- [143] 许志刚, 胡玉玲, 罗学军, 等. 固相微萃取涂层制备方法研究进展[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(2): 250-256.
- [144] Hu X, Cai Q, Fan Y, et al. Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fibers for determination of Sudan I-IV dyes in hot chili powder and poultry feed samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1219: 39-46.
- [145] 张云, 李今中, 郑敬峰, 等. 液相色谱-串联质谱法快速检测番茄制品中苏丹红[J]. *分析实验室*, 2012, 31(12): 78-81.
- [146] Ai J. Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations[J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(6): 1230-1236.
- [147] 江桂斌. 环境样品前处理技术. 北京:化学工业出版社, 2004: 10.

致 谢

岁月如梭，转眼间三年的研究生求学生活即将结束，回首这三年，奋斗和辛劳已成为丝丝的记忆。在论文的完成过程中，除了我自己的学习之外，还得到过他人的许多帮助与支持，在这里，我要向他们致以最诚挚的谢意！

首先，我要对我的导师—张裕平教授，表示我最由衷的感谢，感谢张老师在我攻读硕士期间对我付出的所有心血。张老师为人谦和，朴实无华，在生活上给我以莫大的关心和帮助，使我懂得了什么是为人师表，什么叫师德；在科研上，他严谨的治学态度、精益求精的工作作风深深的影响了我；在学习上，他严格要求自己，也要求我们，他那渊博的专业知识、扎实的英语写作功底都令我敬佩不已。虽历时三载，却赋予我终生受益无穷之道。本论文从选题到完成，几经易稿，每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血，在此，我向张老师致以深深的谢意！

其次，我要感谢河南科技学院食品学院的全体教师，谢谢他们三年来的悉心授课及对论文所提出的良好的意见和建议。同时，还要感谢化学化工学院的张毅军老师、陈军老师和陈娜老师。谢谢他们平日对我科研上的指导与生活上的帮助，张毅军老师学识渊博，陈军老师热情慷慨，陈娜老师求真务实，他们每个人都是我学习的榜样。

再次，还要感谢帮助过我的李伟师兄、靳亚峰师姐、胡梅师妹，还有室友以及所有帮助过我的本科生们。谢谢他们对我的帮助！

另外，还要感谢我的父母和朋友，谢谢父母对我二十多年的养育之恩，谢谢朋友多年来的支持与鼓励！

最后，感谢所有参与我论文评审及答辩的各位老师。谢谢他们给予我这样一个审视自己几年来研究成果的机会，并指明今后的发展方向。

再次感谢所有帮助过我的老师、同学、亲戚和朋友！谢谢他们！祝他们一生幸福、平安！

攻读学位期间取得的研究成果目录

- [1] Kun-Feng Liu, Rui Feng, Yu-Ping Zhang, Jun Chen, Lian-Yang Bai. Selective solid-phase extraction of bisphenol A using a novel stir bar based on molecularly imprinted monolithic material.[J] Journal of the chinese chemical society, 2014, 61, 420-424.
- [2] 刘坤峰, 陈军, 陈娜, 胡梅, 张裕平. 应用分子印迹磁性搅拌棒检测鱼饲料中的孔雀石绿[J]. 分析测试学报. 已接收
- [3] Jun Chen, Lian-Yang Bai, Kun-Feng Liu, Run-Qiang Liu, Yu-Ping Zhang. Atrazine molecular imprinted polymers: comparative analysis by far-infrared and ultraviolet induced polymerization[J]. International journal of molecular sciences, 2014, 15(1): 574-587.
- [4] 陈娜, 刘坤峰, 张裕平. 涂覆型不锈钢丝固相微萃取—高效液相色谱联用测定豆腐乳中的苏丹红[J]. 分析测试学报. 已接收
- [5] 靳亚峰, 刘坤峰, 张裕平. 邻苯二甲酸二正辛酯分子印迹聚合物微球的制备及表征[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2012, 40(6): 48-53.
- [6] 河南科技学院. 一种中空纤维膜包覆的分子印迹整体吸附棒及其制备方法和用途[P]. 中国发明专利, CN103433008A. 2013-12-11
- [7] 河南科技学院. 一种分子印迹整体吸附棒及其制备方法[P]. 中国发明专利, CN103520955. 2014-01-22.