

分子印迹电化学传感器的制备 及其对啉虫脒的响应特性

刘斌*, 黄咏星, 连惠婷, 吴红梅

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 应用恒电位沉积法制备了以壳聚糖为功能基体, 啉虫脒为模板分子、戊二醛为交联剂的印迹膜电极, 并构建印迹传感器. 借助阳离子指示探针 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 研究该印迹传感器的电化学响应特性及其对模板分子啉虫脒的分子识别性能. 结果表明, 印迹传感器具有良好的印迹效果, 相较于结构类似物如吡虫啉等, 对啉虫脒有较高的结合速率和特异性识别能力, 且在啉虫脒浓度为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内呈线性响应, 为农药残留物中啉虫脒的选择性分析提供新的思路.

关键词: 分子印迹; 电化学传感器; 壳聚糖; 啉虫脒

中图分类号: O657

文献标识码: A

电化学传感器具有设计简单、价格低廉、灵敏度高、易微型化等优点^[1], 而分子印迹材料则因其对模板分子能起“锁与钥匙”的关系^[2], 且具有天然的生物识别体系无法比拟的稳定性而得到广泛应用. 利用分子印迹聚合材料作为识别元件构建的分子印迹电化学传感器展示了很好的应用前景^[3]. 目前已研发出相当多的分子印迹材料用于构造化学传感器的识别元件^[4-5]. 利用电聚合方法在基体电极原位制备分子印迹膜, 操作简便, 电极性能可控. 但文献指出^[6], 现今用于分子印迹聚合物合成的单体有限, 常用的如丙烯酸(AA)、苯二胺(PA)、4-乙烯基吡啶(4-VP)、甲基丙烯酸(MAA)等通常均在有机相中合成, 且合成过程较为繁琐.

壳聚糖(Chitosan, CTS)分子中含有丰富的 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 活性基团^[7]. 聚糖膜抗张强度大, 韧性好, 而且耐碱和耐有机溶剂, 因而是一种很好的功能基体^[8-10]及载体材料^[11].

分子印迹化学传感器已在农药的检测上广泛应用^[12], 但至今用于检测啉虫脒分子的印迹传感器尚未见报道. 啉虫脒(Acetamiprid, Actip)是一种高效、广谱、机制新颖的杀虫剂, 对害虫具有触杀、

胃毒和内吸作用. 但在农作物以及施药环境中如残留过量, 会造成人畜毒害. 据文献报道, 啉虫脒的检测方法已有气相色谱法^[13]、高效液相色谱法^[14-15]、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法^[16]和荧光分析法^[17]等. 本文尝试将分子印迹技术和电化学传感技术相结合, 研制一种能够快速用于农药残留物中啉虫脒的分离、富集与检测同步进行的分子印迹电化学传感器. 方法如下: 利用壳聚糖在负电位下电沉积于金电极表面^[18-19], 形成 Ac-tip-CTS 复合物膜, 然后洗脱模板分子啉虫脒, 即制得具有选择性识别的啉虫脒分子印迹膜电极. 由于啉虫脒没有电活性, 因此本实验借助阳离子 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 作指示探针, 并由微分脉冲伏安法(Differential Pulse Voltammetry, DPV)构建可间接测定啉虫脒的分子印迹传感器.

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

CHI660A 电化学工作站(上海辰华); 三电极系统: 圆盘金电极($\Phi 3 \text{ mm}$)为工作电极、饱和甘汞电极(SCE)为参比电极、铂丝为对电极; S-3500N 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司); NIGOLET-

Nexus470 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司)。

壳聚糖(CTS, Sigma, 脱乙酰度 $\geq 75\%$), 三氯六胺合钌($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, AR, Acdrich, 纯度 $\geq 98\%$), 啉虫脒、吡虫啉及甲胺磷(Fluka, 纯度 $\geq 98\%$), 25% 戊二醛(BR, 国药集团), 其它试剂均为分析纯。称取 0.50 g CTS, 用 0.1 mol/L HCl 溶解, 然后用 0.1 mol/L NaOH 溶液调至 $\text{pH} = 5.0$, 配成 5.0 g/L 的 CTS 储备液。

1.2 啉虫脒分子印迹传感器制备

将金电极依次用 1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光打磨成镜面, 分别经无水乙醇、纯水超声清洗 5 min 后, 将电极置于 1.0 mol/L 硫酸溶液中, 循环伏安扫描至稳定。

以上述预处理的金电极作工作电极, 置于含 1.17 mmol/L 啉虫脒的壳聚糖储备液中, 在 -1.1 V (vs. SCE, 下同) 下恒电位沉积 5 min, 使啉虫脒与 CTS 同时沉积至金电极表面。取出, 滴加适量的 0.1% 戊二醛, 再用水洗去表面多余的戊二醛, 晾干, 即得 Actip-CTS 交联膜修饰电极。将膜电极放在 0.01 mol/L KCl 溶液中, 于 0.0 ~ 1.0 V 电位区间内循环伏安扫描 50 圈以洗去模板分子, 再用水淋洗, 制成保留有啉虫脒分子识别位点的分子印迹膜电极(MIP/Au)。流程如图 1 示意。

对照电极(N-MIP/Au)的制备, 除不含模板分子外, 其它步骤同上。

1.3 电化学实验方法

以印迹膜电极 Actip-MIP/Au 为工作电极, 置于 5.0 mmol/L $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ + 1.0 mol/L KCl 溶液中, 于 0.2 ~ -0.5 V 电位区间内分别以循环伏安法(CV)和微分脉冲伏安法(DPV)测定该电极的响应性能。设置参数如下: CV, 扫描速率 0.1 V/s, 灵敏度 $1\text{e-}5$ A/V; DPV, 振幅 0.05 V, 脉冲宽度 0.2 s, 灵敏度 $1\text{e-}5$ A/V。记录 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 在电极表面的还原峰电流的变化, 用以指示传感器对模板分子浓度的变化。

2 结果与讨论

2.1 制备条件优化

1) 电沉积时间的影响

在含有同一浓度啉虫脒的壳聚糖沉积液中, 改变沉积时间, 其它实验条件不变, 分别于预处理后的金电极上电沉积壳聚糖, 比较沉积壳聚糖的分子印迹传感器对啉虫脒吸附特性的影响。方法是: 计算 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}$ 在印迹膜传感器上的还原峰电流降低值 ΔI_p ($I_{p, \text{elution}} - I_{p, \text{absorption}}$) 随吸附时间 t 的变化。结果如图 2 所示, 电流降低值 ΔI_p 越大, 则该印迹膜对模板分子的再结合能力越强, 其响应的灵敏度就越高。从而可据此选择合适的电沉积时间。图中曲线 a、b、c 的沉积时间分别为 1、3 和 5 min, 三者的 ΔI_p 都随着电沉积时间的延长而增加, 膜厚度增加其印迹位点数自然也相应增加, 表现在相同吸附时间内, 膜对啉虫脒的结合量增加从而使探针在印迹电极上的电流降低值 ΔI_p 也增大。然而, 倘若电沉积时间增至 7 min (曲线 d), ΔI_p 值反而有所下降。这可能是因为随着电沉积时间增长, 因膜过厚而不利于处在膜中心的模板分子的洗脱和再结合, 并且偏厚的膜也阻碍探针在印迹膜电极上的电化学响应速率。综合考虑, 电沉积时间选择当以 5 min 为宜。

2) 洗脱方式和洗脱时间的影响

以 0.01 mol/L KCl 为洗脱介质, 分别在不同恒定电位(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 V)下洗脱一定时间, 显示 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 探针在印迹膜电极上的响应还原峰电流都基本不变, 说明应用恒电位诱导不能将模板分子从膜上很好洗脱出来。

再以 0.01 mol/L KCl 为洗脱介质, 在 0.0 ~ 1.0 V 电位区间内采取 CV 法协同洗脱, 结果如图 3A 所示。探针在洗脱前的响应曲线(b)相比裸电

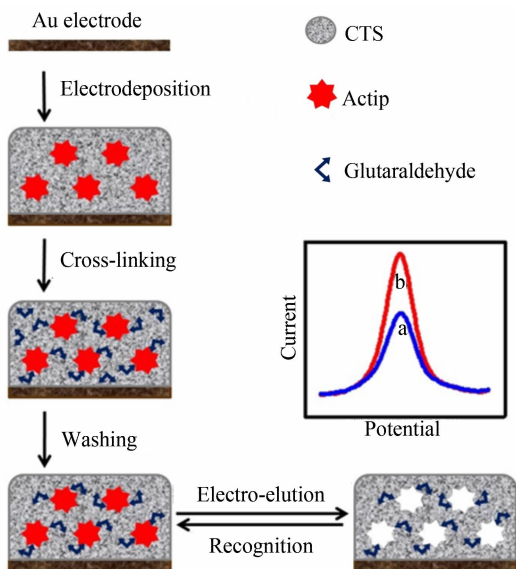


图 1 啉虫脒分子印迹电化学传感器的制备流程示意
Fig. 1 Scheme of the Actip MIP electrochemical sensor

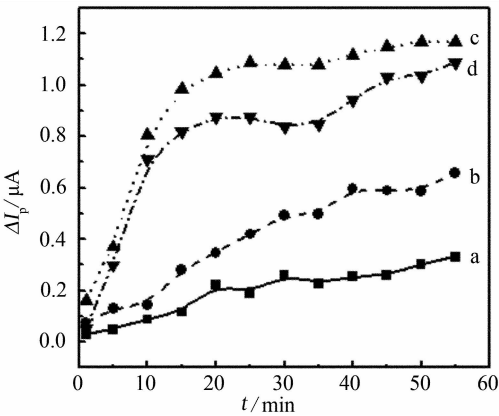


图 2 沉积时间为 1 min(a)、3 min(b)、5 min(c) 和 7 min(d) 的印迹膜对同一浓度啉虫脒再结合引起的探针电流变化曲线

Fig. 2 The response current changes of the inductor due to the Actip rebinding into the imprinted membrane deposited for 1 min (a), 3 min (b), 5 min (c) and 7 min (d)

极的(a),不仅是峰电流,而且峰电位的可逆性都大大降低,说明电沉积形成的膜阻碍了界面探针的传质.经洗脱后,当洗脱时间为 4 min 时,探针的氧化还原峰电流明显增大,峰电位的可逆性也变好,意味模板分子已从膜上洗脱下来,产生的位点有利于探针的传质.但洗脱时间达 5 min 后电流基本不变,表明模板分子啉虫脒已基本洗脱.对非印迹膜(见图 3B)在相同条件下未洗脱与洗脱 5 min 的其氧化还原峰电流基本不变(b、d),进一步佐证了图 3A 中曲线 b、d 的峰电流和峰电位变化乃是由于模板分子从膜上洗脱下来所致.据此即以 CV 法作协同洗脱,选择 0.0 ~ 1.0 V 电位区间洗脱 5 min.

2.2 印迹传感器的表征及性能研究

1) 形貌表征

图 4 分别示出未交联壳聚糖膜(A)与啉虫脒印迹膜(B)的 SEM 照片.由图可见,前者(A)膜表面较致密均匀,立体感较强;后者(B) Actip-MIPs 是一种多孔的交联膜,这是由于在分子印迹过程中,啉虫脒的—Cl 与 CTS 的—NH₂ 通过氢键作用结合在一起,使得啉虫脒被洗脱之后,留下了与其互补的空间和结合位点,并且在聚合膜表面的大孔中也存在较小的孔隙,为啉虫脒的扩散或洗脱提供了良好的通道.可见应用分子印迹技术得到的聚合膜乃有一定孔径分布的多孔结构,有利于啉虫脒的吸附和分离.

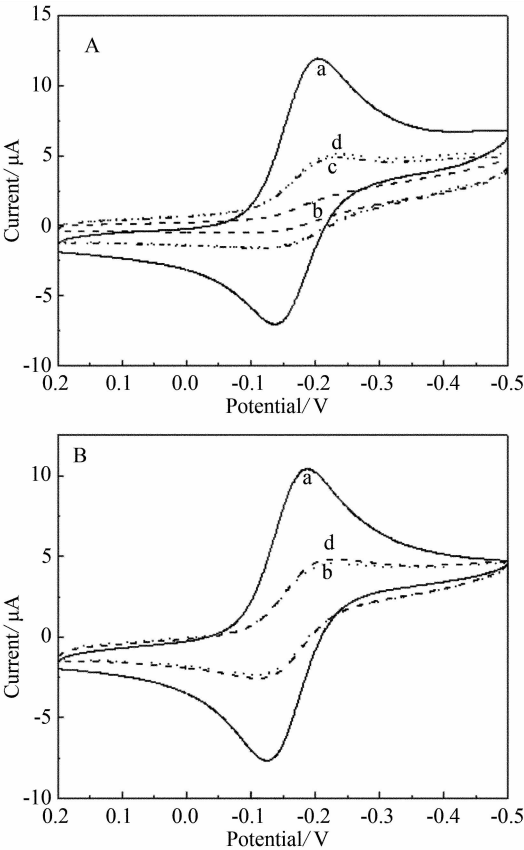


图 3 [Ru(NH₃)₆]³⁺ 在印迹膜电极(A)和非印迹膜电极(B)上的 CV 曲线

Fig. 3 Cyclic voltammetric responses of [Ru(NH₃)₆]³⁺ at imprinted membrane electrode (A) and non-imprinted membrane electrode (B)
a. bare Au, b. imprinted membrane without elution, c. washed 4 min, d. washed 5 min

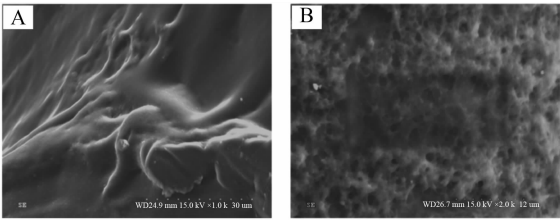


图 4 壳聚糖(A)和啉虫脒分子印迹(B)膜的 SEM 照片
Fig. 4 SEM images of the CTS (A) and Actip MIPs (B)

2) 特异性识别比较

将 Actip-MIP/Au 分别置于含 1.0×10^{-5} mol/L 啉虫脒、甲胺磷、吡虫啉的 Ru(NH₃)₆Cl₃ 溶液中,观察探针在印迹膜传感器上的电流降低值 ΔI_p 随吸附时间的变化.结果如图 5 所示.显然啉虫脒的曲线(a)斜率远大于吡虫啉的(b),原因即在尽管吡虫啉的结构与啉虫脒的较为相似,但由于啉虫

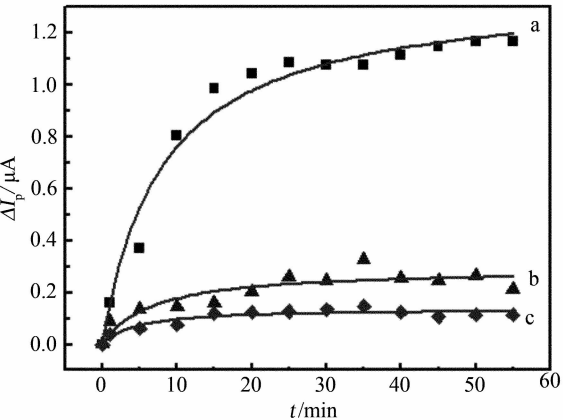


图5 印迹传感器对啉虫脒(a)、吡虫啉(b)和甲胺磷(c)的识别动力学曲线

Fig.5 Recognition kinetic curves of the acetamiprid (a), imidacloprid (b) and methamidophos (c) at imprinted sensors

脒在印迹膜中的识别位点的空间构型与吡虫啉的仍不匹配,两者再结合的能力弱以致探针电流变化远远更小. 甲胺磷(c)的结构与啉虫脒的差别更大,在印迹膜电极上则几乎没有引起探针的电流变化.

假设模板分子与识别位点的结合符合一级动力学方程,依照 Langmuir 吸附模型,拟合上述传感器吸附不同物质的动力学曲线:

$$\Delta I_p = \Delta I_{pm} \cdot \frac{t}{k + t}$$

式中, t ,吸附时间,min; ΔI_p , t 时刻传感器吸附溶液中物质的响应电流变化值, μA ; ΔI_{pm} ,平衡时的响应电流变化值, μA ; k ,动力学速率常数,min.

拟合参数如表 1 所示. 可见模板分子的结合速率 k 最大,拟合相关性最好. 再根据 ΔI_{pm} 值,计算印迹电化学传感器对以上述 3 种物质的印迹因子 α ($\alpha = \frac{\Delta I_{pm}(\text{MIP} - \text{Actip})}{\Delta I_{pm}(\text{other})}$) 分别为 4.711 和 9.992. 由此可知,啉虫脒印迹膜上形成的结合位点对啉虫脒有较高的选择性结合.

图 6 示出印迹膜传感器(a)和非印迹膜传感器(b)分别在含相同浓度啉虫脒的 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 溶液中, ΔI_p 随吸附时间的变化. 如图,曲线 a 的 ΔI_p 明显大于 b,表明印迹膜对模板分子啉虫脒的再结合量大于非印迹的,这种差别正是由于印迹电极的膜内存在大量可与吸附物结合的识别位点而引起的.

3) 响应时间

表 1 啉虫脒印迹传感器的吸附动力学曲线参数

Tab.1 Adsorption kinetic parameters of the Actip imprinted sensor

Curve	R^2	$\Delta I_{pm}/\mu A$	k/min
a	0.9755	1.3699	7.9950
b	0.8148	0.2908	6.4420
c	0.8633	0.1371	4.3286

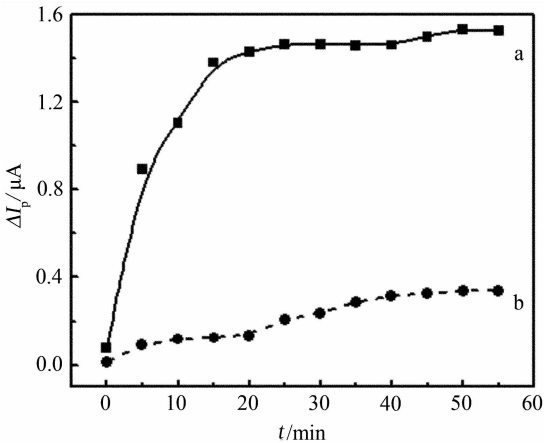


图6 啉虫脒在印迹膜传感器(a)和非印迹膜传感器(b)上的动力学响应曲线

Fig.6 Kinetic responses of the Actip at imprinted sensor (a) and non-imprinted sensor (b)

根据吸附动力学曲线即可判别吸附达到平衡的时间(图 6). 可见,随着吸附时间的增长,探针在印迹传感器上的电流降低值 ΔI_p 逐渐增大,20 min 后趋于稳定,意味该印迹膜电极对啉虫脒的响应达到了平衡. 实验同时表明对其他浓度的啉虫脒溶液,其平衡时间也约 20 min,大体不变.

4) 响应特性

图 7 表明,在上述优化条件下,探针在印迹传感器的峰电流降低值 ΔI_p 与啉虫脒浓度于 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内呈现良好的响应特性. 线性方程为 $\Delta I_p = 0.281 + 0.575C$, 相关系数 $R = 0.951$ (见图中插图). 但如啉虫脒浓度大于 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 则 ΔI_p 继续增长幅度变缓. 这是由于一旦溶液中有模板分子存在时,因识别空穴被目标分析物所占据,致使探针传质过程受到影响,此时沿着识别空穴通道进入探针的分子量也跟着大大减少,因此探针的电流强度和啉虫脒的浓度存在一定内在关系. 又因印迹膜上的识别位点是有限的,当识别位点被目标分子占据并逐渐

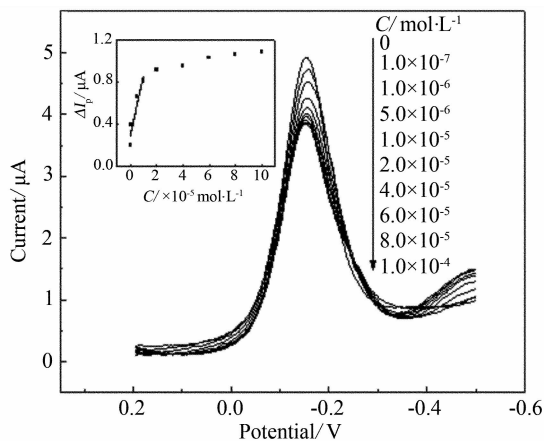


图7 不同浓度的啉虫脒在印迹传感器上的 DPV 响应

Fig.7 DPV responses of the Actip with different concentrations(the inset shows the plots of ΔI_p vs. concentration of Actip)

达到饱和后,其响应电流也就逐渐趋于稳定. 根据以上结果,可利用上述线性方程在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内作啉虫脒的定量检测.

5) 重复性实验

以含有 2.0×10^{-5} mol/L 的啉虫脒溶液作 10 次平行测试,其响应值的相对标准偏差 (RSD) 为 2.9%,说明该印迹传感器对啉虫脒的响应性能稳定. 此外,该印迹传感器经连续使用一周后,其响应灵敏度略有降低,但选择性和重现性依然良好.

3 结 论

由本文制备的以壳聚糖 (CTS) 为功能基体、啉虫脒为模板分子、戊二醛为交联剂共电沉积于金电极表面构建的,以循环伏安法诱导洗去模板分子制备的分子印迹传感器,其工艺方法具有可行性. 与结构相似物吡虫啉相比,本文制备的印迹传感器对模板分子啉虫脒的选择性识别性能好,印迹因子 α 达 4.711,而对甲胺磷的则达 9.992. 响应速率较快,且当啉虫脒浓度为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内与探针电流变化量呈线性关系,该传感器具有良好的稳定性和重现性,这为选择性检测啉虫脒提供了一种新的有效方法,在环境监测领域展现出应用价值.

参考文献 (References):

[1] Grundler Peter. Chemical sensor[M]. 5th ed. Beijing: Science Press,2008.
[2] Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, et al. Drug assay

using antibody mimics made by molecular imprinting [J]. Nature,1993,361:645-647.

- [3] Blanco-lopez M C, Lobo-Castarion M J. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymers [J]. Trends in Analytical Chemistry,2004,23(1):36-48.
[4] Piletsky S A, Turner A P F. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers[J]. Electroanalysis,2002,14(5):317-323.
[5] Xie Cheng-gen, Li Huai-fen, Li Shan-qi, et al. Surface molecular self-assembly for organophosphate pesticide imprinting in electropolymerized poly (*p*-aminothiophenol) membranes on a gold nanoparticle modified glassy carbon electrode [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(1):241-249.
[6] Yan Shou-lei(严守雷), Gao Zhi-xian(高志贤), Chen Yi-yong(程义勇), et al. Progress of molecular imprinting technique on the determination of pesticides residues [J]. Journal of Hygiene Research(卫生研究), 2005, 34(2):227-230.
[7] Wei Jun(魏俊), Sun Xiang-ying(孙向英), Liu Bin(刘斌). Preparation and properties of molecular imprinting polymer for chiral separation of proline [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学), 2006, 23(12):1336-1441.
[8] Yang Yun(杨芸), Lian Hui-ting(连惠婷), Liu Bin(刘斌), et al. Preparation and properties of trichlorfon molecularly imprinted polymers[J]. Journal of Huaqiao University (Natural Science)(华侨大学学报(自然科学版)), 2009, 30(3):84-88.
[9] Ge Bin(葛斌). Studies on chitosan modified electrodes for bioanalysis[D]. Changsha:Hunan Normal University, 2008.
[10] Maogen Z, Audrey S, Waldemar G. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(17):5045-5050.
[11] Zhou Qing-mei, Xie Qing-ji, Fu Ying-chun, et al. Electrodeposition of carbon nanotubes-chitosan-glucose oxidase biosensing composite films triggered by reduction of *p*-benzoquinone or H_2O_2 [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(38):11276-11284.
[12] Zhang Hui-ting(张慧婷), Ye Gui-biao(叶贵标), Pan Can-ping(潘灿平), et al. The application of molecularly imprinted polymer sensor in pesticide detection [J]. Chinese Journal of Pesticide Science(农药学报), 2006, 8(1):08-13.
[13] Li Er-hu(李二虎), Hu Min(胡敏), Wu Bing-bing

- (吴兵兵), et al. Determination of acetamiprid pesticide residues in cucumber by gas chromatography[J]. Agrochemicals(农药), 2006, 45(7): 479-480.
- [14] Zhang Yao-zhong(张耀中). Uncertainty evaluation for measurement acetamiprid by HPLC[J]. Chemical Analysis and Meterage(化学分析计量), 2008, 17(5): 10-12.
- [15] Qian Xun(钱训). Analysis of acetamiprid by HPLC[J]. Pesticides(农药), 1997, 36(11): 24-25.
- [16] Wang Jun(王骏). Determination of acetamiprid residues in vegetable and fruit by HPLC/MS[J]. Agrochemicals(农药), 2007, 46(7): 535-537.
- [17] Wang Yu-tian(王玉田), Li Yan-chun(李艳春), Cui Li-chao(崔立超). Acetamiprid detector based on fluorescence technique[J]. Journal of Applied Optics(应用光学), 2006, 27(2): 159-162.
- [18] Zangmeister R A, Park J J, Rubloff G W, et al. Electrochemical study of chitosan films deposited from solution at reducing potentials[J]. Electrochimica Acta, 2006, 51(25): 5324-5333.
- [19] Huang Yong-xing, Sun Xiang-ying, Liu Bin, et al. Preparation and electrochemical characters of parathion molecule imprinted polymeric sensors[J]. Chemical Research Chinese Universities(高等学校化学学报, 英文版), 2011, 27(1): 28-33.

Preparations and Characters for Acetamiprid of Molecular Imprinted Polymer Electrochemical Sensors

LIU Bin*, HUANG Yong-xing, LIAN Hui-ting, WU Hong-mei

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China)

Abstract: A novel molecularly imprinted membranes electrochemical sensor with good memory capacity to acetamiprid was developed. Based on electrodeposition technique, chitosan was deposited onto the surface of gold electrode as a functional polymer matrix along with aimed molecules acetamiprid and glutaraldehyde as a crosslinking agent. Cationic probe $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ was employed to indirectly investigate the electrochemical electrochemical response characteristics as well as the imprinted effect of the sensors. The results showed that the sensors had a specific recognition to acetamiprid compared to the structural similarity midacloprid and other pesticide. There is more sensitive response to acetamiprid at imprinted sensors than that at nonprinted sensors with a good linearity over the concentration range of $1.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ mol/L. The prepared sensors can be exploited for the separation and analysis performing simultaneously to acetamiprid in the pesticide residue samples.

Key words: molecular imprinting; electrochemical sensor; chitosan; acetamiprid