DOI: 10.3724/SP.J.1096.2014.30665

硫酸链霉素分子印迹传感器的研究

陈 怡 刘利娟 高 杨 张晓清 曹 晶 张娟琨*

(天津科技大学 生物工程学院,教育部工业微生物重点实验室,天津市工业微生物重点实验室,天津 300457)

摘 要 基于分子印迹技术,以硫酸链霉素(STR)为模板分子,邻苯二胺(OPD)为功能单体,通过循环伏安电聚合在玻碳电极表面构建出对 STR 具有选择特异性的电化学传感器,且制备过程中 STR 无需衍生处理。以 K_3 [Fe(CN)。]为探针的方波伏安(SWV)分析,模板分子与单体的摩尔配比为 1:4、洗脱溶剂为 70% 乙醇溶液,在此条件下制备的传感器性能良好。传感器得到的方波伏安峰电流变化值与硫酸链霉素浓度在 2.5×10^{-8} ~ 1.2×10^{-6} mol/L 范围内线性关系较好,检出限为 1.2×10^{-8} mol/L 基于蜂蜜样品的测定中链霉素回收率介于 102.10% ~ 119.2% 之间。

关键词 硫酸链霉素; 邻苯二胺; 分子印迹; 电聚合; 电化学传感器

1 引言

链霉素(Streptomycin) 是一种氨基糖苷类广谱抗生素 对革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌有显著的抗菌活性 广泛应用于饲料添加剂和动物疾病治疗中 临床上一般使用其硫酸盐。然而 链霉素具有肾毒性和耳毒性 能够引起过敏反应 滥用、不遵守休药期、超量用药造成的药物残留直接或通过诱导抗性菌株间接威胁人、畜的健康[1~4]。链霉素残留物主要存在于肉类 肝 肾 牛奶以及蜂蜜中。

目前 国内外关于链霉素检测的报道主要有基于微生物的检测法^[5]、免疫学检测法^[6,7]和仪器分析法^[1,8,9]。微生物法所需设备简单,但不易筛选到特异敏感菌株,易受条件限制,灵敏度低;酶联免疫法和微生物法易产生假阳性结果,通常仅用于普通筛查;高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)等方法灵敏高。但是,链霉素缺少紫外吸收生色基团,往往需要进行一系列柱前或者柱后衍生处理后再进行检测,操作繁琐、耗时长,而且大型设备的使用对操作人员要求较高,检测成本高^[10]。

分子印迹聚合物(MIPs) 具有成本低 ,易于合成 ,在高温、有机溶剂、酸碱等条件下稳定性高的特点 ^[11] ,已作为传感器识别元件应用于环保、生物分析、食品和医药等领域 ,提供定量或半定量检测分析 ^[12-14]。采用电聚合方法制备分子印迹聚合膜操作简便 ,膜厚可控 ,特异性强 ,重现性高 ,且可以水溶液中完成聚合 ^[15]。文献 [16 ,17]采用此法制备的分子印迹聚合膜选择性、灵敏度及重现性良好。本实验以硫酸链霉素为模板分子、邻苯二胺为功能单体 经电化学聚合制备了硫酸链霉素分子印迹电化学传感器 ,实验过程中无需对链霉素进行衍生处理 ,而是间接地通过电化学手段分析 ,操作简单快捷 ,特异性强 ,灵敏度较高 ,成本低 ,为小型化和自动化的电化学传感器的研究提供依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LK2005A 型电化学工作站(天津市兰力科化学电子高技术有限公司); 三电极系统: 玻碳电极 (GCE $\mathcal{\Phi}$ =4 mm) 为工作电极 Ag/AgCl 电极为参比电极 知片电极为对电极(天津艾达恒晟科技发展有限公司); 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

硫酸链霉素(Streptomycin sulfate ,STR ,纯度>99% ,上海生工生物有限公司);邻苯二胺(o-Phenylenediamine ,OPD ,分析纯 ,北京鼎国生物科技有限责任公司); K_3 [Fe(CN) $_6$](分析纯 ,天津市永大化学试剂开发中心);其余试剂均为分析纯。

²⁰¹³⁻⁰⁷⁻⁰⁹ 收稿; 2013-10-22 接受

本文系天津市滨海新区科委项目(No.2012-XJR21047), 天津市科委项目(No.12ZXCXSY07500), 科技部项目(No.12C26211200512)资助

^{*} E-mail: zhangjk@ tust.edu.cn

2.2 玻碳电极预处理

将玻碳电极依次在涂有 0.3 和 0.05 μm Al_2O_3 浆液的麂皮上抛光至镜面 ,再用 HNO_3 溶液(1:1 , V/V)、无水乙醇和二次蒸馏水分别超声清洗 3 min。将电极置于 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中 ,在 -1.0 -1.0 +0.8 V 电位区间内 ,以 0.1 V/s 的扫速进行循环伏安(CV) 扫描 ,待循环伏安响应稳定 ,氧化峰和还原峰的电位差小于 80 mV ,电极预处理完成。

2.3 分子印迹膜的制备

将处理好的电极浸入含有 20 mmol/L 邻苯二胺、5 mmol/L 硫酸链霉素和 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS $_{10}$ H 5.0) 的聚合底液(含 0.1 mol/L KCl 作为支持电解质) ,通纯 N_{2} 预聚合 10 min 后 在 $0\sim0.8$ V 的电位区间内采用 CV 扫描 20 圈 ,扫速为 0.05 V/s。电极取出后 ,经 70% 乙醇溶液洗脱后得到硫酸链霉素分子印迹聚合膜电极(MIP/GCE)。非印迹聚合膜电极(NIP/GCE)的制备以同样的方法进行,只是聚合物底液中不加入模板分子。

2.4 印迹膜的洗脱

制备多支印迹及非印迹电极,分别浸入到 1 mol/L NaOH 溶液、 $1 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 溶液和 70% 乙醇溶液中洗脱若干分钟,取出后用二次蒸馏水淋洗 5 min,以洗脱出模板分子,并在含有 4 mmol/L K_3 [Fe(CN) $_6$] 的 PBS 缓冲液中洗脱,采用方波伏安法(SWV) 比较洗脱效果。实验中印迹膜电极制备的条件相同,但是由于裸玻碳电极每次打磨抛光情况不能确保一致,会造成制备的印迹膜存在轻微差异。为了减小误差,洗脱效果用溶剂洗脱前后电极在 K_3 [Fe(CN) $_6$] 溶液中检测到的方波伏安峰电流变化值(Δi_6) 表征。

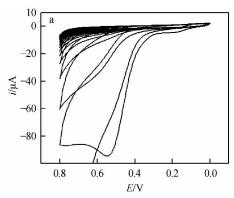
2.5 电化学检测及校准曲线绘制

将制备好的分子印迹膜电极置于 $10 \text{ mL } 4 \text{ mmol/L } K_3$ [Fe(CN) $_6$]缓冲溶液体系中,采用方波伏安法 (SWV) 检测洗脱模板分子后的峰电流。将此电极置于含有一定浓度的硫酸链霉素的磷酸盐溶液 (pH 5.0) 中,于搅拌条件下(500 r/min) 吸附 25 min。用二次蒸馏水淋洗后,再在 $4 \text{ mmol/L } K_3$ [Fe(CN) $_6$]溶液中 SWV 检测,记录两次检测到的 K_3 [Fe(CN) $_6$]峰电流值,并计算出 K_3 [Fe(CN) $_6$] 电流的变化值与硫酸链霉素溶液浓度的关系,间接测得硫酸链霉素的含量。

3 结果与讨论

3.1 分子印迹的电聚合

链霉素中含有多羟基结构,可与邻苯二胺中的氨基形成氢键,且二者间存在静电作用。通过 CV 扫描模板分子与功能单体可沉积在玻碳电极表面。链霉素与邻苯二胺在玻碳电极表面沉积的电化学行为见图 la。随着扫描的进行,峰电流发生正移并且电流值迅速衰减;扫描 20 圈后,法拉第电流基本稳



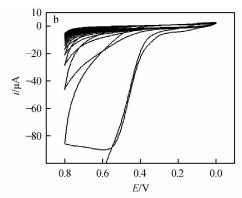


图 1 循环伏安电聚合曲线: (a) 邻苯二胺和硫酸链霉素聚合; (b) 邻苯二胺单体聚合。扫速: 0.05~V/s~ 扫描次数: 20

Fig.1 Electropolymerization curves by cyclic voltammetry: (a) polymerization of *o*-phenylenediamine and streptomycin; (b) *o*-phenylenediamine monomer polymerization. Scan rate: 0.05 V/s, sweep cycle: 20

定 说明电极表面形成了低导电性的致密印迹聚合膜。对比图 1a 与图 1b ,MIP 膜与 NIP 膜的 CV 曲线峰形、峰位置及变化的趋势相似。MIP 膜聚合过程中没有出现额外的峰 ,说明链霉素在 0~0.8 V 的电位区间内不参与电化学氧化反应 ,这就保证了其在聚合膜中可以保持自身的三维结构 ,有利于形成特异性识别位点。

3.2 印迹膜性能的分析

 K_3 [Fe(CN)₆]具有良好的电化学稳定性,可保证实验结果的可靠性。由图 2 可知 K_3 [Fe(CN)₆] 在裸玻碳电极表面形成的峰电流最大(图 2a) 在洗脱处理后的印迹膜表面形成的峰电流次之(图 2b), 而在洗脱处理后的非印迹膜表面几乎无响应(图 2d)。结果表明,经过洗脱处理后,模板分子 STR 被有

效去除,在分子印迹膜表面留下了一些空穴,为 K_3 [Fe(CN)₆] 扩散提供通道。由于这些印迹空穴含有的识别位点与链霉素分子在大小、形状、空间和构型上相匹配,当 MIP 电极重新浸入含有硫酸链霉素的溶液中吸附一段时间后,STR 便会特异性地重新占据空穴,使方波峰电流值(图 2c) 较曲线 2b 的峰电流降低,从而证实印迹膜可用于链霉素的间接检测。

3.3 模板分子与功能单体配比的优化

考察了不同的模板分子与功能单体摩尔配比对分子印迹聚合膜的影响。利用 Spartan~08(v1.2.0) 软件模拟模板—单体预聚合,当 n_{STR} : $n_{OPD}=1:4$ 时,获得的复合物构象具有最小能量,说明此配比条件下可形成相对稳定的聚合物。由图 3 可知,模板分子和功能单体摩尔配比为 1:4 时,制备的印迹电极经过洗脱后峰差(Δi_p) 最大($75.16~\mu A$),即获得的电流可变化限度最大,有利于提高检测的灵敏度。当功能单体量过少,难以在聚合过程中将模板分子束缚在印迹膜中,导致洗脱后留有的空腔不足 Δi_p 较低;功能单体量过多,会造成洗脱时链霉素从交联结构中

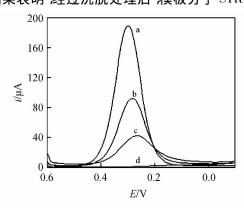


图 2 不同电极在含 4 mmol/L K₃ [Fe(CN)₆]的 PBS 溶液中的方波伏安图: (a) 裸玻碳电极; (b) MIP/GCE; (c) MIP/GCE 重键合 STR; (d) NIP/GCE。电位增量: 0.004 V 方波幅度: 0.025 V 频率: 15 Hz

Fig. 2 Square wave voltammograms of different electrodes dipped in 0.4 mmol/L $\rm K_3$ [Fe(CN) $_6$] aqueous phosphate buffer pH 5.0: (a) bare GCE; (b) MIP/GCE; (c) MIP electrode after rebinding streptomycin sulfate (STR); (d) NIP/GCE. Step potential: 0.004 V , amplitude: 0.025 V , frequency: 15 Hz

脱除受阻,洗脱后空腔量显著减低。模板分子和功能单体摩尔配比为 1:6 时, $\Delta i_{\rm p}$ = 30.17 μA ,同时造成重键合时链霉素不易接近印迹位点。因此 模板分子和功能单体摩尔配比选取 1:4 进行电聚合制备分子印迹膜。

3.4 洗脱剂和洗脱时间的优化

从高交联度的聚合膜中脱除模板分子是形成印迹位点的关键步骤。链霉素易溶于水,不溶于大多数有机溶剂,分子结构中含有的多羟基通过氢键与邻苯二胺相互作用,故选用温和的溶剂脱除模板分子。为了选择出高效、快捷的洗脱方法,实验选取 $1 \mod/L \operatorname{NaOH}$ 溶液、 $1 \mod/L \operatorname{H}_2\operatorname{SO}_4$ 溶液和 70% 乙醇溶液作为洗脱剂。结果表明,洗脱时间相同条件下, $1 \mod/L \operatorname{NaOH}$ 溶液、 $1 \mod/L \operatorname{H}_2\operatorname{SO}_4$ 溶液的洗脱效果均不明显,而采用 70% 乙醇溶液进行一次洗脱后,MIP 膜的方波峰电流较大 $(74.01\ \mu\text{A})$,在洗脱15 \min 后 MIP 膜峰电流趋于稳定 $(67.32\ \mu\text{A})$,并且对 NIP 膜的影响较小 $(11.43\ \mu\text{A})$ 。因此,选择 70% 乙醇溶液作为洗脱溶剂。

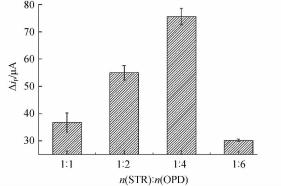


图 3 不同模板-单体摩尔配比对应的 K_3 [Fe(CN) $_6$] 峰电流变化

Fig. 3 Changed peak currents of different ratios of template–monomer in K_3 [Fe(CN) $_6$] solution

3.5 校准曲线的绘制

脱除模板分子的印迹电极放入含有一定浓度的硫酸链霉素溶液中吸附 25 min ,取出后用二次蒸馏水淋洗干净 ,置于 4 mmol/L K_3 [Fe(CN) $_6$]的 PBS 溶液中检测电流。由图 4 可知 ,随着硫酸链霉素浓度的增大 ,MIP 膜中越来越多的印迹空腔被相匹配的印迹分子占据 ,峰电流值降低 ,继而 ΔI 随之增大 ,且

 ΔI 与 STR 浓度在2.5×10⁻⁸ ~ 1.2×10⁻⁶ mol/L 范围内表现出较好的相关性。其线性方程为 ΔI (μ A) = 48.209C(μ mol/L) +4.405 , R^2 = 0.988 , 检出限为 1.2×10^{-8} mol/L。

3.6 印迹膜的选择性

庆大霉素和硫酸链霉素同为氨基糖苷类抗生素 结构类似,而红霉素虽为大环内酯类,但其结构中多羟基,可与邻苯二胺单体形成氢键,故选取二者进行选择性实验。1.0 μmol/L STR 引起的峰电流52.19 μA,而5倍浓度的庆大霉素和17倍浓度的红霉素引起的电流变化很小,分别为4.31 和6.62 μA,可见硫酸链霉素分子印迹传感器的选择性良好。

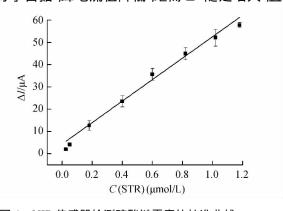


图 4 MIP 传感器检测硫酸链霉素的校准曲线 Fig. 4 Calibration curve of streptomycin sulfate on imprinted electrode

3.7 印迹膜的重现性

使用过的电极经二次洗脱 20 min ,重现的响应值可与原响应值基本一致。此传感器对 1.0 µmol/L 硫酸链霉素溶液平行测试 4 次 响应值的 RSD 为 1.3% ,显示出良好的重现性。此传感器连续使用7 次 ,最终响应值降到初始值的 79.2% ,可能是由于电极在反复洗脱与吸附的过程中 ,印迹空腔的空间结构逐渐被破坏 ,识别位点也随之失去对链霉素分子的键合能力。

3.8 实际样品分析

为研究此传感器在实际样品检测中的可行性,对蜂蜜样品中的 STR 残留量进行了空白样加标回收实验。取 $5\,\mathrm{mL}$ 蜂蜜样品溶于磷酸盐缓冲液,混匀并调至pH $5.0\,$,定容至 $50\,\mathrm{mL}$,5000 r/min 离心

 $10 \, \text{min} \, \text{ 取上清液待用 , 空白样品经检定不含 链霉素。取 3 份样品各 <math>10 \, \text{mL}$, 分别加入 0.4 , $0.6 \, \text{m} \, 0.8 \, \mu \text{mol/L}$ 链霉素 ,用实验中制备的 印迹 电 极 经 吸 附 后 ,于 4 mmol/L K₃ [Fe(CN) $_6$] 的 PBS 溶液中进行检测 (表 1)。结果表明 本方法具有较高准确性。

表 1 蜂蜜样品中 STR 的检测 Table 1 Detection results of STR in honey sample

样品 Sample	加入量 Spiked (µmol/L)	测得量 Found (µmol/L)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, n=3)
1	0.4	0.477	119.2	2.7
2	0.6	0.621	103.5	1.9
3	0.8	0.817	102.1	2.0

References

- 1 Granja R H, Niño A M M, Zucchetti R A, Niño R E M, Patel R, Salerno A G. Anal. Chim. Acta, 2009, 637(1): 64-67
- 2 ZHANG Xiao-Yan , XU Jin-Zhong , SHENG Cong-Yu , CHEN Hui-Lan , WU Bin. Chinese J. Chromatogr. , 2008 , 26(3): 395-397

张晓燕,徐锦忠,沈崇钰,陈惠兰,吴斌. 色谱,2008,26(3):395-397

- 3 Marazuela M , Bogialli S. Anal. Chim. Acta , 2009 , 645(1-2): 5-17
- 4 CHEN Yi-Zi, HU Bin. J. Food Sci. Biotechnol., **2009**, 28(2): 162-166 陈一资,胡滨. 食品与生物技术学报, **2009**, 28(2): 162-166
- 5 Oka H, Nakazawa H, Ken-Ichi H, Macneil J D. J. AOAC Int., 1995: 452
- 6 Wu J X , Zhang S E , Zhou X P. J. Zhejiang University Sci. B , 2010 , 11(1): 52-60
- 7 Liu B, Zhang B, Cui Y, Chen H, Gao Z, Tang D. ACS Appl. Mater. Inter., 2011, 3(12): 4668-4676
- 8 Horie M , Saito H , Natori T , Nagata J , Nakazawa H. J. Liq. Chromatogr. R. T. , 2005 , 27(5): 863-874
- 9 Lopez M I , Pettis J S , Smith I B , Chu P S. J. Agric. Food. Chem. , 2008 , 56(5): 1553-1559
- 10 Holzgrabe U , Nap C-J , Kunz N , Almeling S. J. Pharm. Biomed. Anal. , 2011 , 56(2): 271-279

- 11 Chen L , Xu S , Li. J. Chem. Soc. Rev. , 2011 , 40(5): 2922-2942
- 12 SHEN Qing, CUI Li-Feng, ZHAO Shuo, LI Ke. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(3): 442-445 申 晴,崔莉凤,赵硕,李科.分析化学, **2012**, 40(3): 442-445
- 13 Sharma P S , Pietrzyk-Le A , D'Souza F , Kutner W. Anal. Bioanal. Chem. , 2012 , 402(10): 3177-3204
- 14 Suriyanarayanan S, Cywinski P J, Moro A J, Mohr G J, Kutner W. Top. Curr. Chem. , 2010 , 325 : 165-265
- Blanco-López M , Lobo-Castanon M , Miranda-Ordieres A ,Tunon-Blanco P. TrAC , Trends Anal. Chem. , 2004 , 23(1): 36–48
- 16 ZHANG Jin , XU Lan , WANG Ya-Qiong , LV Rui-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2009** , 37(7): 1041-1044 张 进 , 徐 岚 , 王亚琼 , 吕瑞红. 分析化学 , **2009** , 37(7): 1041-1044
- 17 ZHAO Jun , LI Jian-Ping , JIANG Fu-Yang. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2009** , 37(8): 1219-1222 赵 钧 , 李建平 , 蒋复阳. 分析化学, **2009** , 37(8): 1219-1222

Development of a Voltammetric Sensor Based on a Molecularly Imprinted Polymer for Streptomycin Sulfate Detection

CHEN Yi , LIU Li-Juan , GAO Yang , ZHANG Xiao-Qing , CAO Jing , ZHANG Juan-Kun*

(Key Laboratory of Industrial Microbiology of the Ministry of Education , Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology ,

College of Bioengineering , Tianjin University of Science & Technology , Tianjin 300457 , China)

Abstract An electrochemical sensor based on molecularly imprinted films for streptomycin sulfate (STR) measurement was investigated. The sensitive layer was prepared by electropolymerization of o-phenylenediamine (OPD) on a glassy carbon electrode in the presence of the template (STR), without derivatization during the preparation. It was shown the MIP sensor electroplymerizing STR with OPD in 1:4 molar ratio and extracting by 70% ethanol solution led to good performance via the analysis of the square wave voltammetry (SWV) with the K_3 [Fe(CN) $_6$] as a probe. A linear range of 2.5×10^{-8} mol/L to 1.2×10^{-8} mol/L was obtained between the peak current changes of SWV and the concentration of STR. The detection limit of the sensor was calculated to be 1.2×10^{-8} mol/L. This sensor was used successfully for STR determination in spiked honey samples with the recovery ranging from 102.1%-119.2%.

Keywords Streptomycin sulfate; *o*-Phenylenediamine; Molecularly imprinted polymers; Electropolymerization; Electrochemical sensor

(Received 9 July 2013; accepted 22 October 2013)

《应用电化学基础》

本书是电化学专业入门学习的基础读物,介绍电化学基础理论以及少量常见的应用电化学知识,包括电化学的定义及研究内容、电化学技术应用、电化学史话等;化学电池、电极与电解质溶液。实用电池与电解的应用,电极电势与电池电动势,平衡态电化学,电极过程动力学;电化学测试的基础术语及常用的电化学测试技术;腐蚀电化学的基本原理与术语、金属腐蚀破坏的形态与金属在自然环境中的腐蚀、防腐蚀技术与腐蚀监测等。

书 号: 978-7-122-17862-6 定价: 49.0元

出版时间: 2013 年 10 月 开本: 16 化学工业出版社出版