

孔雀石绿分子印迹表面等离子共振传感器的制备及分析应用

李 洁, 陈长宝*, 张丽丽, 周 杰

(山东农业大学化学与材料科学学院, 山东泰安 271018)

摘 要:利用表面等离子共振 (SPR) 光谱, 结合分子印迹技术, 制备了孔雀石绿分子印迹 SPR 传感器, 建立了检测孔雀石绿的分析方法。探讨了 pH 值对分子印迹膜吸附特性的影响, 并在最佳 pH 下对其吸附选择性进行了考察。研究表明, 与相应非印迹传感膜相比, 孔雀石绿印迹传感膜对孔雀石绿具有较高的吸附选择性能。该方法测定河水及河泥中孔雀石的线性范围为 $8.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ mol/L, 检出限 (S/N=3) 分别为 8.83×10^{-11} mol/L 和 1.55×10^{-10} mol/L, 平均回收率分别为 91.97% 和 93.88%, 相对标准偏差分别为 1.2% 和 2.1%。该方法具有简单、快速、灵敏度高、重复性好等特点, 适用于河水和河泥中孔雀石绿的测定。

关键词:分子印迹聚合物膜; 表面等离子共振; 传感器; 孔雀石绿

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 1006-6144(2014)06-873-06

表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 传感器是一种利用光学原理, 基于金属表面介质动态折射率变化进行测定的一种传感技术^[1-2]。SPR 传感器与传统检测手段相比, 该技术具有不需对样品进行标记, 可实时监测, 灵敏度高突出优点。因此, SPP 技术在生命科学、食品、环境、药物研制等领域得到广泛应用^[3-5]。分子印迹聚合物 (MIPs) 具有高度选择性、理化稳定性以及成本低、易制备等优点, 将分子印迹膜作为传感器的识别元件可以提高 SPR 传感器选择性和使用寿命。1998 年, Lai 等人^[6]首先成功制备了茶碱、黄嘌呤和咖啡分子印迹 SPR 传感器, 随后分子印迹 SPR 传感器在其他许多检测物中得到了研究和应用^[7-8]。

孔雀石绿 (Malachite Green, MG) 是一种三苯甲烷类染料, 因对鱼类的水霉病、鳃霉病、小瓜虫病等具有明显效果而被用于水产养殖中^[9]。研究表明, 孔雀石绿具有致癌、致畸和致突变的副作用, 已经被许多国家禁止用于水产养殖中^[10]。目前, 检测孔雀石绿主要有高效液相色谱、液相色谱-质谱、酶联免疫法、光谱分析等方法^[10-13]。但这些方法大多耗时、费力、需要较繁琐的前处理步骤和大量的有机溶剂, 检测成本较高。最近, 高志贤等人使用粘结剂将引发剂固定在 SPR 金片表面, 然后热聚合制备了孔雀石绿分子印迹 SPR 传感器^[14]。本文利用表面化学固定引发剂的方法, 结合分子印迹技术, 在 SPR 传感芯片上通过光引发聚合制备了均匀的孔雀石绿分子印迹薄膜, 并对其吸附选择性和 pH 值对吸附特性影响, 以及样品的分析应用等进行了系统研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

FT-SPR 100 型表面等离子体共振仪 (美国, Thermo 公司); 传感芯片 (1.8 × 1.8 cm, 美国 Thermo 公

收稿日期: 2013-12-24 修回日期: 2014-02-19

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 21175083)

* 通讯作者: 陈长宝, 男, 硕士, 实验师, 主要从事生物分析化学研究。

司);1810-B 型石英自动双重纯水蒸馏器(江苏金坛中大仪器厂);pHS-3D 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司);CHI 660C 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);Dimension Icon 型扫描探针显微镜(Veeco 仪器公司)。

甲基丙烯酸(MAA, Aldrich 公司),乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA, Aldrich 公司),11-巯基十一烷酸(COOH-thiol, 95%, Aldrich 公司),2-乙基-5-苯基异恶唑-3-磺酸盐(NEPIS, 95%, Aldrich 公司),2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAH, 97%, Aldrich 公司)均为分析纯;孔雀石绿(MG, 天津巴斯夫化工有限公司);结晶紫(CV, 上海试剂三厂);甲基紫(MV, 天津风船化学试剂科技有限公司);冰乙酸(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司);铁氰化钾(分析纯, 上海试剂一厂);乙腈(色谱纯, 天津永大化学试剂有限公司);所有溶剂为色谱纯, 实验用水均为重蒸水。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 0.1825 g (5.0×10^{-4} mol)的孔雀石绿,用乙腈溶解并定容于 50 mL 的容量瓶中,配制成 1.0×10^{-2} mol/L 的孔雀石绿溶液,置于冰箱中 4 °C 保存,使用前用缓冲溶液稀释至所需浓度。其它几种类似物用同样的方法配制。

1.3 孔雀石绿分子印迹 SPR 传感膜的制备

将 SPR 裸芯片放入新配制的 10 mL Piranha 洗液(70% H_2SO_4 , 30% H_2O_2)中清洗 2 min,取出芯片用大量的重蒸水冲洗,氮气吹干。然后将芯片放入 20 mL 1.0×10^{-3} mol/L 的 COOH-thiol 乙醇溶液中,在 4 °C 冰箱中放置过夜,取出芯片用乙醇、重蒸水反复冲洗芯片表面后,再将芯片转入 10 mL 1.0×10^{-2} mol/L 的 NEPIS 溶液中,静置 30 min,最后将芯片转入到 10 mL 0.20 mol/L 的 ABAH 溶液中,20 °C 下反应 3 h,取出芯片用氮气吹干,备用。

将 9.5×10^{-5} mol 的 MG 和 1.1×10^{-3} mol 的 MAA 加入到 7 mL 乙腈中,充分溶解后静置 2 h,然后向溶液中加入 7.0×10^{-4} mol 的 EGDMA,搅拌均匀。将上述传感芯片放入其中,通氮气除氧 15 min,密闭,于 4 °C 下在 365 nm 的紫外灯照射下反应 2 h。非印迹薄膜制备方法除不加 MG 外,其它步骤与以上方法相同。

1.4 FT-SPR 分析步骤

将上述制备好的传感芯片安装到 FT-SPR 100 型表面等离子共振仪上。SPR 100 上配置有测角仪和样品流动池,并和 Nicolet 6700 分光光度计连接。分光光度计以近红外卤钨灯作为光源。每次实验之前,调节入射角使其有最小的反射率,波数固定在 $9\,000\text{ cm}^{-1}$ 附近,此时砷化镓检测器在其灵敏度最高区域内。采用乙酸缓冲溶液(pH=6.0)作为流动缓冲溶液,优化后选择 5%乙酸和 20%乙腈水溶液为芯片再生液,检测温度 25 °C。在每次样品的结合试验测定前,SPR 传感芯片用再生液以流速 $2\,860\ \mu\text{L}/\text{min}$ 冲洗,然后用乙酸缓冲液冲洗直至得到稳定的 SPR 基线为止。将不同浓度的被检测物溶解于流动缓冲液中,以流速 $225\ \mu\text{L}/\text{min}$ 进入到流动池中,直到波数变化达到稳定值。FT-SPR 实时记录波数变化。

1.5 河水和河泥样品的制备

河水样品取自泰安市奈河。将 50.0 mL 样品过滤,然后加入一定量的 MG 标准溶液使其浓度为 8.0×10^{-9} mol/L,超声混匀,调节 pH 为 6.0。河泥样品取自泰安市奈河,烘干后过 200 目筛。向 1.0 g 处理好的样品中加入 0.4 mL 1.0×10^{-6} mol/L MG 标准溶液,然后加入 7.5 mL 乙腈,充分混匀后放置 1 h,超声搅拌 5 min,离心 30 min($4\,000\text{ r}/\text{min}$)。倒出上清液,重复萃取 2 次,合并上清液,在减压状态下蒸至近干。将残余物重新溶解于 50.0 mL(pH=6.0)的乙酸缓冲液中,待测。

2 结果与讨论

2.1 孔雀石绿分子印迹薄膜表面形貌的表征

利用 Dimension Icon 型扫描探针显微镜,采用 Tapping 模式,对裸芯片,浸泡 COOH-thiol 溶液后的芯片,以及印迹、非印迹传感膜完成后的芯片进行表面形貌表征,扫描面积为 $3 \times 3\ \mu\text{m}$ 。由图 1 可知,浸泡 COOH-thiol 后的芯片(b)表面粗糙度要大于裸芯片(a),说明在芯片表面形成 COOH-thiol 单层。非印迹传感膜(c)粗糙度与 COOH-thiol 膜相似,但是表面颗粒形状大小不同,说明在芯片表面形成了聚合膜。印迹传感膜(d)与非印迹传感膜相比,表面粒状明显,排列规则,可能是由于印迹聚合膜内形成了刚性空穴所致。

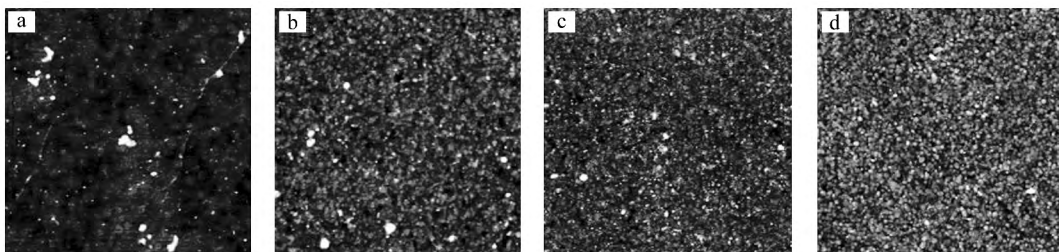


图 1 芯片表面形貌图

Fig. 1 Surface topography of Au modified chips
a. Bared Au; b. COOH-thiol/Au; c. NIP/Au; d. MIP/Au.

2.2 孔雀石绿分子印迹薄膜厚度的估算

运用 Piacham 的方法^[14],按照图 2 所示的路线,在很稀的 MG、MAA 和 EGDMA 的混合溶液中,利用表面固定 ABAH 引发的自由基聚合方法,在 SPR 传感芯片上制得了薄的印迹膜。

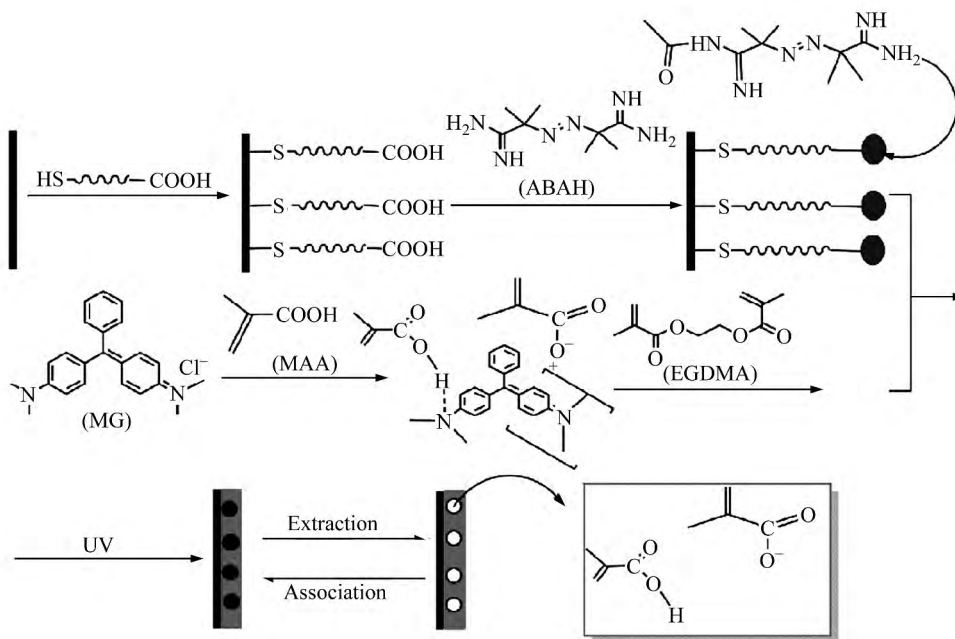


图 2 分子印迹薄膜形成示意图

Fig. 2 Illustration of the formation of MIP film

图 3 是裸芯片和聚合上印迹膜及非印迹膜后的芯片在乙酸缓冲液中的 SPR 光谱图。由图 3 可知,裸芯片结合上非印迹聚合物膜后,波数红移了 223.29 cm^{-1} ,结合上印迹聚合物膜后,波数红移了 375.36 cm^{-1} 。这进一步证明在 SPR 传感器表面形成了一定厚度的印迹和非印迹薄膜。按照 Corn 和 Weibel 报道的估算膜厚度的经验方法^[15],估算 SPR 芯片上结合的印迹聚合物和非印迹聚合物涂层厚度分别约为 9 nm 和 5 nm。同时,采用原子隧道显微镜(AFM)测定了传感膜的厚度,通过扣除金涂层的厚度获得非印迹传感膜的厚度为 6.4 nm,印迹传感膜的厚度为 10.5 nm。与 Corn 的经验方法所得的结果基本一致。

2.3 电化学表征

电化学阻抗谱^[16]是检测电极表面特征的有效手段。利用 CHI 660C 电化学工作站,采用三电极体系:以裸金片、COOH-thiol、非印迹膜或印迹膜修饰的金片为工作电极,铂电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,用含有 10 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的 1 mol/L KCl 的乙腈溶液为电解质溶液,测得的电化学阻抗谱图见图 4。由图 4 可知,裸电极的阻抗值为 $300\ \Omega$ 。在电极表面接上 COOH-thiol 后阻抗值变为 $1\ 700\ \Omega$ 。此时在电极表面为一层羧基负离子与溶液中的负离子相斥阻碍电子流动使得阻抗增大。形成非印迹聚合膜后阻抗值为 $3\ 100\ \Omega$,形成印迹聚合膜后阻抗值为 $4\ 900\ \Omega$ 。在金电极表面聚合形成印迹/非印迹薄膜后,金电极表面膜的厚度增加,空间位阻增大,阻抗值也增大,而印迹膜洗去 MG 后存在孔穴

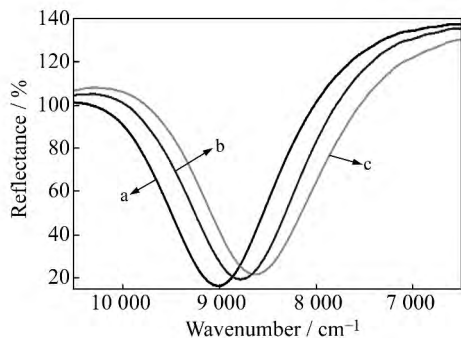


图 3 传感芯片厚度 SPR 光谱图
Fig. 3 SPR spectra recorded on the sensor chips
a. Bared sensor chip; b. NIP sensor chip; c. MIP sensor chip.

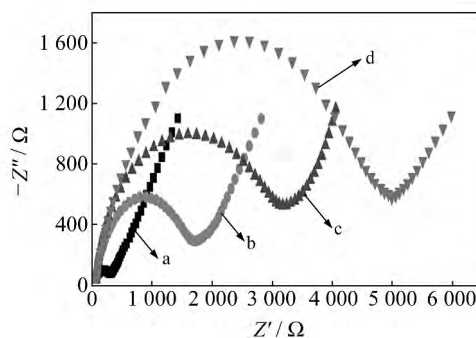


图 4 传感芯片的阻抗谱图
Fig. 4 Nyquistplots of modified Au electrode
a. Bared Au; b. COOH-thiol/Au; c. NIP/Au; d. MIP/Au.

空隙大于非印迹膜,因此形成印迹膜后要比形成非印迹膜的阻抗值大。这也表明金片表面成功地聚合形成了一层薄膜。

2.4 pH 值对吸附性能的影响

本实验在 pH 值 3.0~7.0 范围考察了溶液 pH 值对孔雀石绿分子印迹薄膜吸附量的影响。如图 5 所示,检测溶液的浓度为 1.0×10^{-6} mol/L,当 pH 值从 3.0~6.0 时波数位移增加,pH 从 6.0~7.0 时波数位移下降,在 pH 值为 6.0 时达到最大。原因可能是孔雀石绿与 MAA 以非共价作用力相结合,孔雀石绿分子中含有 $-NH$ 和 $=N^+$ 可与酸性较强的 MAA 中的 $-COOH$ 生成氢键和离子键^[17],在 pH=6.0 附近,印迹位点与模板分子的非共价作用最强,导致波数位移最大。因此,实验中溶液的 pH 值固定为 6.0。

2.5 孔雀石绿分子印迹聚合物的吸附性

在最佳的 pH 条件下,对分子印迹膜和非分子印迹膜吸附 MG 的性能进行了比较。图 6 表明,印迹传感芯片在孔雀石绿浓度为 8.0×10^{-5} mol/L 时达到饱和,波数变化达到 50 cm^{-1} ,而非印迹传感芯片达到饱和时的波数变化为 31 cm^{-1} 。这说明由于印迹效应,分子印迹聚合物比非印迹聚合物对孔雀石绿的吸附

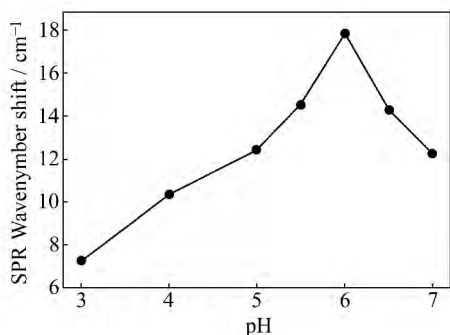


图 5 pH 对吸附性能的影响
Fig. 5 Influence of pH on the adsorption property

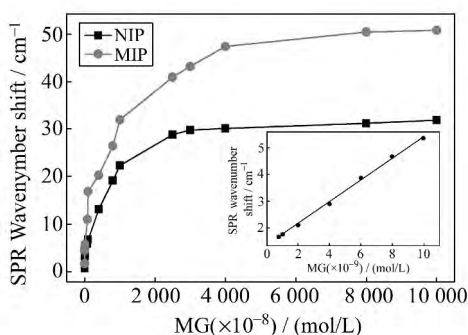


图 6 MG 在印迹和非印迹聚合物上的吸附等温线
Fig. 6 Adsorption isotherms of MG on the MIP and NIP

效果好。从图 6 插图中可以看出,浓度在 $8.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ mol/L 之间时,印迹 SPR 传感器对孔雀石绿的波数响应与其浓度呈现好的线性关系($R=0.9988$)。

孔雀石绿和分子印迹聚合物之间的结合常数可以由朗格缪尔等温模型^[18]得到:

$$\frac{1}{\theta} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha K_{ass}} [MG] \tag{1}$$

其中, θ 代表孔雀石绿所占据的结合位点, α 代表总的结合位点数。

将图 6 等温线曲线实验数据代入式(1)得到印迹膜朗格缪尔等温线方程式为: $1/\theta = 0.1692 + 4.050 \times 10^{-10} [MG]$,相关系数 $R=0.9989$ 。根据其直线方程的截距与斜率的比值求得孔雀石绿和分子印迹聚合物之间的结合常数为 $4.2 \times 10^8 \text{ L/mol}$ 。

实验进一步研究了孔雀石绿和分子印迹聚合物之间结合的热力学参数(吉布斯自由能的变化),由范

特霍夫^[19]等式:

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{ass}} \quad (2)$$

其中, R 代表气体常数, T 代表热力学温度, K_{ass} 代表孔雀石绿和分子印迹聚合物之间的结合常数, ΔG 代表吉布斯自由能的变化。

经计算吉布斯自由能的变化值是 -49.18 kJ/mol , 负值说明了孔雀石绿和分子印迹聚合物之间的结合是自发进行的。

2.6 孔雀石绿分子印迹聚合物的选择性

实验对 MG 的结构类似物 MV 和 CV 进行了选择性吸附研究, 采用印迹因子和选择性因子^[17]比较了印迹膜的印迹效应和吸附选择性, 实验结果见表 1。由表 1 可知, 孔雀石绿分子印迹聚合物显示出了对模板分子的高选择性, 但非印迹聚合物却没有。表明印迹过程中在聚合物的内部形成了对模板分子识别的特异性结合位点, 这些结合位点在结构形状大小和功能基位置都与目标物相匹配。

表 1 孔雀石绿印迹聚合物的选择因子和印迹因子
Table 1 Selective factors and imprinting factors of MG-MIP

Analyte ^a	Selective factors ^b		Imprinting factor ^c
	Imprinted film	Non-imprinted film	
MG	1	1	2.76
CV	1.61	0.81	1.38
MV	2.89	1.33	1.28

a. Analytes concentration = $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; b. Selective factors = Amount of MG adsorbed/amount of MG analogues adsorbed for the same sensor chip; c. Imprinting factors = Amount adsorbed by MIP/amount adsorbed by NIP for the same substrate.

2.7 方法的回收率实验

为了检验本文建立的孔雀石绿分子印迹 SPR 测定方法适用于实际样品中微量分析的可行性, 我们取河水和河泥样品分别加标 $0.1460 \mu\text{g}$ MG 进行分析。由图 6 插图显示的波数位移与 MG 的浓度的线性关系计算的相关数据见表 2。由表 2 可见, 河水中 MG 的回收率为 91.97% , 河泥中为 93.88% ; 由信噪比为 3 计算, 获得的河水和河泥的检出限分别为 $8.83 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ 和 $1.55 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, 表明方法的准确度和灵敏度均较高。

表 2 河水和河泥样品的平均回收率和相对标准偏差 ($n=3$)

Table 2 Average recoveries and relative standard deviations (RSD) for the river water and river mud samples ($n=3$)

Sample	Added (μg)	Found (μg)	RSD (%)	Recovery (%)
River water (50.0 mL)	0.1460	0.1343	1.2	91.97
River mud (1.0 g)	0.1460	0.1371	2.1	93.88

3 结论

本研究通过在 SPR 传感芯片表面固定引发剂制得分子印迹薄膜, 可实现分子印迹 SPR 联用技术对河水和河泥样品中孔雀石绿残留的实时分析。所测定的孔雀石绿和分子印迹位点之间的结合常数为 $4.2 \times 10^8 \text{ L/mol}$, 孔雀石绿测定的线性范围为 $8.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ($R=0.9988$), 河水和河泥的检出限分别为 $8.83 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ 和 $1.55 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, 回收率分别为 91.97% 和 93.88% 。印迹传感膜对孔雀石绿有较高的选择性, 并且该方法具有简单、快速、灵敏度高、重复性好等特点, 能够用于样品中孔雀石绿的残留分析。

参考文献:

- [1] Patching S G. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes [J], 2014, **1838**(1): 43.
- [2] LIU Xia (刘霞), LI Lei (李蕾), LI Wen-jin (李文进), YANG Yang (杨阳), MAO Lu-gang (毛禄刚). Journal of Food Safety & Quality (食品安全质量检测学报) [J], 2013, **2**: 3.
- [3] Altintas Z, Uludag Y, Gurbuz Y, et al. Anal Chim Acta [J], 2012, **712**: 138.

- [4] Nooke A, Beck U, Hertwig A, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*[J], 2010, **149**(1):194.
- [5] Cooper M A. *Nature Reviews Drug Discovery*[J], 2002, **1**(7):515.
- [6] Lai E P, Fafara A, VanderNoot V A, et al. *Canadian Journal of Chemistry*[J], 1998, **76**(3):265.
- [7] Taniwaki K, Hyakutake A, Aoki T, et al. *Anal Chim Acta*[J], 2003, **489**(2):191.
- [8] Matsui J, Takayose M, Akamatsu K, et al. *Analyst*[J], 2009, **134**(1):80.
- [9] HE Xiu-lian(何秀莲), WEI Qi-feng(魏琦峰), QU Jing(曲 径), XU Cheng-gang(徐成刚). *Chemical Analysis and Meterage(化学分析计量)*[J], 2006, **15**(4):32.
- [10] Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J. *J Chromatogr A*[J], 2005, **1089**(1):187.
- [11] ZHANG Li(张 莉), WEN Hong(文 红), WANG Hong(王 红). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology (中国卫生检验杂志)*[J], 2005, **15**(12):1483.
- [12] Scherpenisse P, Bergwerff A A. *Anal Chim Acta*[J], 2005, **529**(1):173.
- [13] HUANG Bao-mei(黄宝美), WANG Xiu-feng(王秀峰), CHEN Hong(陈 红). *Journal of Mianyang Normal University(绵阳师范学院学报)*[J], 2007, **26**(8):52.
- [14] Piacham T, Josell A, Arwin H, et al. *Anal Chim Acta*[J], 2005, **536**(1):191.
- [15] Corn R M, Weibel S C. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*[M]. Wiley, New York; J Chalmers, Griffiths Press, 2002:1057.
- [16] Liu X G, Peng Y H, Qu X J, et al. *Journal of Electroanalytical Chemistry*[J], 2011, **654**(1):72.
- [17] CAO Hui(曹 慧), ZHANG Xiao-gang(张小刚), XU Fei(徐 斐), YU Jin-song(于劲松). *Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)(四川大学学报(自然科学版))*[J], 2012, **49**(6):1319.
- [18] Riskin M, Tel-Vered R, Lioubashevski O, et al. *J Am Chem Soc*[J], 2009, **131**(21):7368.
- [19] Matharu Z, Bandodkar A J, Sumana G, et al. *The Journal of Physical Chemistry B*[J], 2009, **113**(43):14405.

Preparation of Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Malachite Green Molecularly Imprinted Polymer and Its Analytical Application

LI Jie, CHEN Chang-bao*, ZHANG Li-li, ZHOU Jie

(College of Chemistry and Material Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: In this paper, a new SPR sensor for the detection of malachite green was prepared by combining the molecularly imprinted technique with surface plasmon resonance spectroscopy. The surface topography of the imprinted SPR sensor was undertaken by atomic force microscopy. The effect of pH value on the adsorption of the imprinted membrane was investigated. Meanwhile, we also evaluated the properties of its adsorptivity and selectivity at the optimal pH. Compared to the non-imprinted film, the imprinted film showed higher adsorption efficiency and selectivity for malachite green. The method showed good linearity between 8.0×10^{-10} and 1.0×10^{-8} mol/L. When the developed method was used to determine malachite green in the river water and river mud, the detection limits were 8.82×10^{-11} mol/L and 1.55×10^{-10} mol/L based on a signal to noise ratio of 3. The mean recoveries were 91.97% and 93.88%, and the relative standard deviations(RSD) obtained were 1.2% and 2.1%, respectively. The results indicated that the developed SPR sensor for the detection of malachite green possessed the advantages such as simplicity, high-speed, high sensitivity and good recovery.

Keywords: Molecularly imprinted film; Surface plasmon resonance; Sensor; Malachite green