

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00569

己烯雌酚分子印迹传感器的制备及其性能研究

刘 瑛* 管良慧 黄 新 宋启军

(江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122)

摘 要 应用分子印迹技术,以邻苯二胺为功能单体、己烯雌酚为模板,采用循环伏安法在玻碳电极表面合成了性能稳定的己烯雌酚分子印迹聚合膜,并用 50% (V/V) 乙醇溶液迅速去除模板,得到对己烯雌酚响应的分子印迹电化学传感器。研究了此分子印迹传感器的分析性能,建立了以 $K_3Fe(CN)_6$ 为电子传递媒介的间接分析法。在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 5.1 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内,己烯雌酚的浓度与 $K_3Fe(CN)_6$ 的相对峰电流变化呈线性关系。选择性实验表明,此传感器对结构相似的分子有较强的抗干扰能力。

关键词 分子印迹聚合膜; 己烯雌酚; 电化学聚合; 邻苯二胺

1 引 言

己烯雌酚 (DES) 是一种非甾体激素,曾被广泛用于促进动物生长、增加瘦肉率,其药物原形或代谢产物不可避免地残留于食品动物的器官、组织或通过排泄物进入外界环境,成为环境雌激素,对人们的健康存在潜在性影响。2002 年农业部 176 号和 193 号公告中明令禁止使用己烯雌酚,但由于己烯雌酚作为畜禽增重剂效果好、经济回报高,仍有违法使用的现象发生。因此研究己烯雌酚的快速检测方法具有现实意义。目前,己烯雌酚的化学分析方法主要有气相色谱法^[1,2]、液相色谱法^[3,4]、毛细管电泳法^[5,6]、光谱法^[7]及电化学法^[8,9]等。而基于分子印迹技术的己烯雌酚的电化学传感器研究尚未见报道。

分子印迹技术是指制备对某一特定目标分子(模板)具有特异选择性的分子印迹聚合物,即将某个模板加入到功能单体中,二者通过共价键或非共价键发生作用,然后再加入交联剂、引发剂进行聚合反应,形成高度交联的固态高分子。利用化学或物理方法将印迹分子从高分子中移出,在分子内部形成大量的空腔结构,它们的形状以及空腔内各官能团的位置都与该模板分子互补,可以与印迹分子发生特殊作用。与其它检测己烯雌酚的方法相比,基于分子印迹技术的己烯雌酚电化学传感器具有选择性高、成本小、检出限低、物理尺寸可调、易自动化等优点。此传感器有望实现对己烯雌酚的快速准确检测。

本研究采用易于成膜且膜厚易于控制的电化学聚合技术^[10-13],以邻苯二胺为单体,制备了己烯雌酚分子印迹聚合膜传感器,并对其性能进行了研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

IM6 电化学工作站(德国 Zahner 公司)。三电极体系:直径为 2 mm 的玻碳电极为工作电极,铂片电极为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极。

己烯雌酚、三氯生(美国 Alfa Aesar 公司);氢化可的松、泼尼松龙、泼尼松(德国 Dr. Ehrenstorefer GmbH 公司);甘草素(江南大学化学与材料工程学院合成);邻苯二胺(化学纯,国药集团化学试剂公司)。其余试剂均为国产分析纯。实验用水为超纯水。

2.2 玻碳电极的预处理

将玻碳电极依次用 0.5 和 0.05 μm Al_2O_3 粉在麂皮上抛光后,于超纯水和乙醇中分别超声洗涤数分钟。然后将电极于 $K_3Fe(CN)_6$ 中扫描,如果得不到准可逆的循环伏安峰(峰电流比为 1:1,峰电位差小于 90 mV),则重新处理电极。

2009-06-20 收稿;2009-09-28 接受

本文系江南大学青年基金(No. 20070344)资助项目

* E-mail: kusao@sina.com

2.3 分子印迹膜传感器的制备

以含 6.0 mmol/L 邻苯二胺和 0.10 mmol/L 己烯雌酚的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH = 7.2) 为聚合底液, 在扫描速度为 50 mV/s、电位范围为 0 ~ 0.8 V 时, 循环扫描聚合 20 圈, 即得到嵌有己烯雌酚模板的不导电聚合膜, 此电极用符号 DES-POPD/GC 表示。将此电极浸泡在 50% 乙醇溶液中 10 min, 完全除去镶嵌在聚合膜内的己烯雌酚模板, 即可制得与己烯雌酚结构相匹配的分子印迹膜修饰电极, 此电极用符号 Imprinted-POPD/GC 表示。非印迹膜 (不含己烯雌酚的聚合膜) 的制备除不加模板分子己烯雌酚外, 其余步骤与印迹膜的制备完全相同, 得到的电极记作 Nonimprinted-POPD/GC。

3 结果与讨论

3.1 邻苯二胺在电极表面的电聚合

图 1a 为邻苯二胺在不含己烯雌酚模板时的电聚合曲线, 图 1b 为邻苯二胺在含己烯雌酚模板时的电聚合曲线。由图 1a 可知, 邻苯二胺在玻碳电极表面的电聚合是一个不可逆过程。随着扫描圈数的增加, 邻苯二胺在电极表面逐渐形成致密的不导电聚合膜, 阻碍了邻苯二胺单体在电极表面的电子传递, 使得氧化峰电流逐渐下降至零。比较图 1a 和图 1b 可发现, 有无己烯雌酚存在时的聚合图非常相似, 说明己烯雌酚没有干扰邻苯二胺的电聚合。

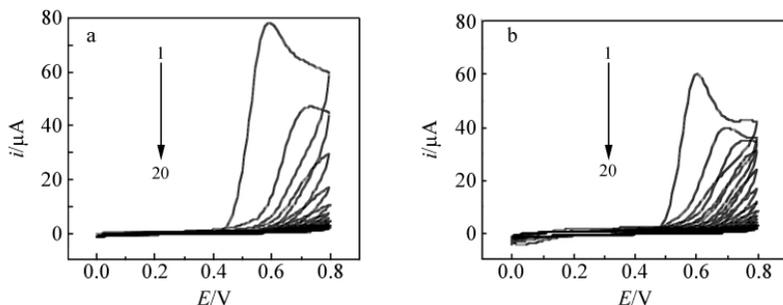


图 1 邻苯二胺在无己烯雌酚 (a) 和有己烯雌酚时 (b) 的电聚合曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms for electropolymerization of *o*-phenylenediamine in the absence of diethylstilbestrol (a) and in the presence of diethylstilbestrol (b)

Sweep cycle: 20; Scan rate: 50 mV/s.

3.2 印迹效应的证实

图 2a 为 DES-POPD/GC 电极于 PBS 空白溶液中的循环伏安曲线; 图 2c 为去除模板后的 Imprinted-POPD/GC 电极于 PBS 空白溶液中的循环伏安曲线; 图 2b 为 Imprinted-POPD/GC 电极在含一定浓度的己烯雌酚的 PBS 溶液中的循环伏安曲线。将 DES-POPD/GC 电极在 PBS 溶液中循环伏安扫描时于 1.1 V 附近出现一个明显的氧化峰 (图 2a); 将此电极于 50% 乙醇溶液中浸泡 10 min 后, 该氧化峰消失 (图 2c), 表明该氧化峰为膜中的己烯雌酚在电极表面发生氧化反应所致, 浸泡后该峰消失, 表明模板被清除; 再将此电极于含己烯雌酚的 PBS 溶液中循环伏安扫描时, 大约于 0.84 V 处又出现一个氧化峰, 该峰为溶液中的己烯雌酚通过“空穴”到达电极表面发生氧化反应而产生。图 2a 中的氧化峰电位明显大于图 2b, 是因为膜中的己烯雌酚发生氧化反应时要克服与聚合膜骨架的作用力而导致峰电位显著正移。

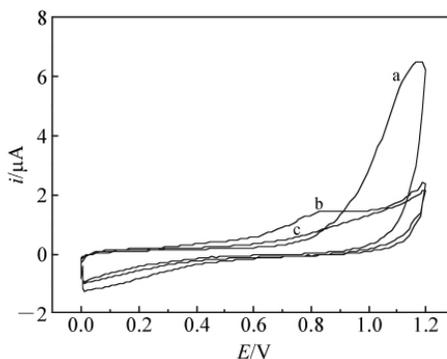


图 2 不同电极在 PBS 中的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of different electrodes in PBS solution

a. diethylstilbestrol-poly (*o*-phenylene-diamine) (DES-POPD) /GC electrode in PBS solution; b. Imprinted-PPD/GC electrode in PBS solution containing DES; c. Imprinted-PPD/GC electrode in PBS solution. 扫描速度 (Scan rate): 100 mV/s.

3.3 模板去除条件的优化

3.3.1 模板去除溶剂的选择 根据己烯雌酚的物理性质,己烯雌酚溶于乙醇和稀 NaOH 溶液;在氯仿中微溶,在水中几乎不溶。因此选择乙醇和 0.10 mol/L NaOH 溶液为去除模板的溶剂。但是,NaOH 溶液对嵌入聚合膜中的己烯雌酚的溶解效果较差,因此选择乙醇作为去除模板的溶剂。考察了无水乙醇、50% 乙醇和 75% 乙醇溶液对模板的去除效应。实验表明,聚合膜在无水乙醇中会发生轻微的溶胀现象,不利于膜的稳定。而 50% 乙醇溶液能迅速地去除模板,又能维持聚合物膜骨架的稳定。因此选择 50% 乙醇溶液作为去除模板的溶剂。

3.3.2 模板去除时间的选择 将 DES-POPD/GC 电极浸泡于 50% 乙醇溶液中一段时间,取出电极,用超纯水洗涤 3 次。将电极置于 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中进行循环伏安扫描。结果表明,刚制备的 DES-POPD/GC 电极无电化学活性,在 $K_3Fe(CN)_6$ 中的峰电流几乎为零;随着浸泡时间的延长,由己烯雌酚溶出而留下的“空穴”逐渐增多, $K_3Fe(CN)_6$ 到达电极表面产生的峰电流逐渐变大。当浸泡时间超过 10 min 后, $K_3Fe(CN)_6$ 的峰电流不再变化,表明膜中的己烯雌酚已全部溶出。因此确定浸泡 10 min 去除模板。

3.4 分子印迹电极的分析性能

本方法是将一定浓度的己烯雌酚溶液加入到 PBS 缓冲溶液中,搅拌均匀后,将 Imprinted-POPD/GC 电极置于其中进行孵化一定时间。将电极取出用超纯水洗净,再置于 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中进行循环伏安扫描。在孵化过程中,己烯雌酚会通过氢键、疏水作用和空腔匹配作用^[13]等作用力重新进入膜中与其结构相匹配的“空穴”,导致电极表面的“空穴”变少。因此将经己烯雌酚溶液孵化过的印迹电极再于 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中扫描时, $K_3Fe(CN)_6$ 的峰电流会下降。己烯雌酚浓度越大,电极表面聚合膜中的“空穴”被填补得越多, $K_3Fe(CN)_6$ 的峰电流越低。由此可建立己烯雌酚的分子印迹间接分析法。己烯雌酚直接在电极表面发生反应时,反应产物易吸附在电极表面难以去除,间接分析法可克服这一缺点。

3.4.1 孵化时间的选择 己烯雌酚回到聚合膜重新填补“空穴”的过程会受到溶液的传质阻力及聚合膜骨架的阻力的影响。随着孵化时间的延长,孵化后电极于 $K_3Fe(CN)_6$ 中的峰电流逐渐下降。当 Imprinted-PPD/GC 电极于含 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 己烯雌酚的 PBS 溶液中孵化时间达到 20 min 时,峰电流出现平台,表明己烯雌酚在膜中达到饱和。因此选择 20 min 为最佳孵化时间。

3.4.2 己烯雌酚浓度与 $K_3Fe(CN)_6$ 峰电流的关系

将去除模板后的 Imprinted-POPD/GC 电极于不同浓度的己烯雌酚溶液中孵化 20 min,取出电极用超纯水洗净,再于 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中扫描。图 3 为此电极在不同浓度的己烯雌酚中浸泡后,电极在 $K_3Fe(CN)_6$ 中的循环伏安图。纵坐标为 $K_3Fe(CN)_6$ 的还原峰电流。由图 3 可知,峰电流随着己烯雌酚浓度的增加而下降。考虑到不同电极及同一电极不同次预处理后电极表面电化学活性的差异,用相对峰电流 $\Delta i/i_0$ 描述峰电流的变化,其中 i_0 为印迹电极在不含己烯雌酚的 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中的电流值, Δi 为加入某一浓度的己烯雌酚后引起的电流变化值。

结果表明,相对峰电流与己烯雌酚浓度在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 5.1 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内呈线性关系,检出限为 3.0×10^{-8} mol/L。线性回归方程: $\Delta i/i_0 (\%) = 4.29C (\mu\text{mol/L}) + 1.045$, $r = 0.9942$ 。当己烯雌酚浓度较大时,电极表面的印迹点趋于饱和,线性关系被破坏。

3.5 方法的选择性

利用与己烯雌酚结构相似的酚类化合物泼尼松、泼尼松龙、氢化可的松、甘草素和三氯生做干扰实

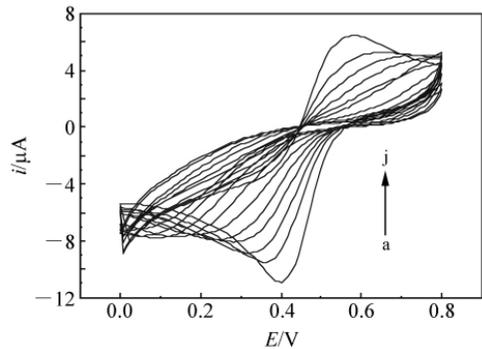


图3 印迹电极在不同浓度的 DES 溶液中孵化后于 $K_3Fe(CN)_6$ 中的循环伏安图

Fig. 3 Cyclic voltammograms of imprinted-POPD/GC electrode in $K_3Fe(CN)_6$ solutions after incubating in DES solution with different concentration

己烯雌酚 (Diethylstilbestrol): a. 0; b. 1.7×10^{-6} ; c. 3.4×10^{-6} ; d. 5.1×10^{-6} ; e. 6.8×10^{-6} ; f. 8.5×10^{-6} ; g. 1.0×10^{-5} ; h. 1.2×10^{-5} ; i. 1.4×10^{-5} ; j. 1.5×10^{-5} mol/L. 1.0 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$; 扫描速度 (Scan rate): 100 mV/s.

验。定义选择因子 $K = \Delta i_r / \Delta i$ 其中 Δi_r 为 Imprinted-POPD/GC 电极对 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 干扰物质产生的相对峰电流变化, Δi 为此电极对 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 己烯雌酚产生的相对峰电流变化。分子体积比己烯雌酚大的泼尼松、泼尼松龙和氢化可的松表现出良好的选择性, 选择因子分别为 0.13、0.14 和 0.11; 由于己烯雌酚的分子结构及尺寸与甘草素和三氯生相近, 此电极对甘草素和三氯生的选择性稍差, 选择因子分别为 0.26 和 0.30。但总体而言, 己烯雌酚分子印迹膜对结构类似化合物表现出较好的选择性。

3.6 重现性与使用寿命

将使用过的电极用 50% 乙醇洗涤 20 min, 即可使电极基本恢复到使用前的状态。以此传感器对 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 己烯雌酚溶液平行测试 6 次, 响应值的 RSD 为 1.4%, 显示了良好的重现性。此传感器在连续使用 20 次, 最终响应值降到初始值的 83%。随着使用次数增加, 传感器响应逐渐降低而失效。

References

- 1 Quintana J B, Carpinteiro J, Rodríguez I, Lorenzo R A, Carro A M, Cela R. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1024 (1-2): 177 ~ 185
- 2 Basheer C, Jayaraman A, Kee M K, Valiyaveetil S, Lee H K. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1100(2): 137 ~ 143
- 3 Yan W, Zhao L X, Feng Q Z, Wei Y L, Lin J M. *Chromatographia*, **2009**, 69(7-8): 621 ~ 628
- 4 Chavesa A R, Silva S M, Queiroz R H, Lanças F M, Queiroz M E. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 850(1-2): 295 ~ 302
- 5 Liu S F, Xie Z H, Wu X Q, Lin X C, Guo L Q, Chen G N. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1092(2): 258 ~ 262
- 6 G Themelis D, Trellopoulos A V, Tzanavaras P D, Karlberg B. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, 39(3-4): 559 ~ 563
- 7 Lopez C S, Lopez G A V, Martinez C. *Anal. Lett.*, **2000**, 33(11): 2231 ~ 2242
- 8 LU Hao(吕昊), ZHANG Zhu-Jun(章竹君), GUO Zhi-Hui(郭志慧), LI Zhi-Xian(李志仙). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(1): 143 ~ 145
- 9 Fei J J, Wen X Q, Yi L H, Ge F, Zhang Y, Chen X M. *J. Appl. Electrochem.*, **2008**, 38(11): 1527 ~ 1533
- 10 Panasyuk T L, Mirsky V M, Piletsky S A, Wolfbeis O S. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(20): 4609 ~ 4613
- 11 Özcan L, Sahin Y. *Sensors and Actuators B*, **2007**, 127(2): 362 ~ 369
- 12 Yeh W M, Ho K C. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542(1): 76 ~ 82
- 13 Liu Y, Song Q J, Wang L. *Microchem. J.*, **2009**, 91(2): 222 ~ 226
- 14 LIU Zhi-Hang(刘志航), HUAN Shuang-Yan(宦双燕), SHEN Guo-Li(沈国励), YU Ru-Qin(俞汝勤). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2005**, 26(6): 1049 ~ 1051

Preparation and Properties of Diethylstilbestrol Molecular Imprinted Polymers Sensor

LIU Ying*, GUAN Liang-Hui, HUANG Xin, SONG Qi-Jun

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract An electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted polymers (MIPs) for diethylstilbestrol (DES) detection is reported. The sensor was prepared by electropolymerizing *o*-phenylenediamine (OPD) on a glassy carbon electrode in the presence of template diethylstilbestrol. Template can be quickly removed by 50% (volume fraction) ethanol-water solution. The analytical performance of the molecularly imprinted polymer was studied and indirect analytical method based on the medium of potassium ferricyanide was established. A linear relationship between the concentration of DES and relative peak current change of potassium ferricyanide was obtained with a range from 1.0×10^{-7} to 5.1×10^{-6} mol/L. The result shows that this sensor provides an efficient way for eliminating interferences from compounds with similar structures to that of DES.

Keywords Molecularly imprinted polymers; Diethylstilbestrol; Electropolymerization; *o*-Phenylenediamine

(Received 20 June 2009; accepted 28 September 2009)