

# 地西洋分子印迹聚合物的光谱学特性及其在传感测试中的应用

刘晓芳, 李 锋, 姚 冰, 王 莉, 刘国艳, 柴春彦\*

上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

**摘 要** 制备地西洋的分子印迹聚合物, 应用紫外光谱(ultraviolet spectra, UV spectra)和红外光谱(infrared spectra, IR spectra)分析该聚合物的识别特性及模板分子和功能单体的结合作用。在丝网印刷电极上原位制备地西洋的分子印迹膜, 并在此基础上建立了检测地西洋的电导型传感方法。实验结果表明模板分子与功能单体可形成 1:2 型氢键配合物, 印迹聚合物中存在可与模板分子通过协同氢键相互作用的官能团, 该聚合物对地西洋有高度特异的识别力, 电导型传感方法对地西洋的检测限达  $0.008 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 线性范围为  $0.039 \sim 0.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 可实现现场快速检测。

**关键词** 地西洋; 分子印迹聚合物; 光谱分析; 电导型传感器

中图分类号: O657 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)08-2228-04

## 引 言

地西洋又名安定, 属于第二代安眠镇静药, 国家明令禁止在动物饲料和饮水中使用。但一些养殖企业为了提高饲料报酬, 违禁使用安定类药物的现象时有发生, 动物性产品中此类药物的残留对消费者健康和对外贸易均产生很大危害。因此建立快速、有效的测定地西洋的方法十分必要。分子印迹聚合物对目标化合物具有高度选择性, 在样品中待测化学物质的分离、富集、检测领域具有广阔的研究前景<sup>[1-12]</sup>。有资料报道应用地西洋分子印迹聚合物固相萃取柱, 采用液质联用检测血液中地西洋含量, 该方法前处理步骤繁琐, 需要大型仪器, 不适合现场快速检测<sup>[3]</sup>。目前, 地西洋分子印迹聚合物的光谱特征还不清楚, 也还没有将分子印迹技术与传感技术相结合检测地西洋的报道。本文以地西洋为模板分子制备对地西洋有高选择性的印迹聚合物。通过紫外光谱和红外光谱探讨模板分子和功能单体的相互作用及聚合物的识别机理, 拟建立一种基于地西洋分子印迹膜的快速检测地西洋的电导型传感方法。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

地西洋标准品(Diazepam)、甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇

二甲基丙烯酸酯(EGDMA)均购于 sigma 公司; 偶氮二异丁腈(AIBN)、二甲亚砜(DMSO)、甲醇、丙酮、乙酸及其他分析纯均购于中国医药集团上海化学试剂公司; 实验用水均为双蒸水。

EQUINOX 55 傅里叶变换红外-拉曼光谱仪(Bruker, Germany), UV1800PC 紫外-可见分光光度计(Shimadzu, Japan), XMTD-204 电热恒温水浴锅(上海博泰实验设备有限公司), 索氏提取器(江苏海门华盛实验仪器有限公司), SB-80 超声波仪(宁波新芝生物科技股份有限公司), 一次性丝网印刷电极条(Newpro Co Ltd, Taiwan), CON 6/TDS 6 电导仪(新加坡 OAKTON 公司)。

### 1.2 地西洋分子印迹聚合物(MIP)的制备

取地西洋  $0.2847 \text{ g}$  ( $1 \text{ mmol}$ )、MAA  $0.516 \text{ mL}$  ( $6 \text{ mmol}$ )溶于  $10 \text{ mL}$  二甲亚砜中, 超声  $10 \text{ min}$ , 放置  $2 \text{ h}$  进行预聚合。加入 EGDMA  $5.667 \text{ mL}$  ( $30 \text{ mmol}$ ), AIBN  $0.061 \text{ g}$ , 超声混合均匀, 充氮气除氧  $10 \text{ min}$ , 密封, 置于  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中反应  $24 \text{ h}$ , 得玻璃状聚合物。将该聚合物粉碎, 丙酮反复沉降以除去细小颗粒, 蒸干丙酮后放入索氏提取器中, 用体积比 9:1 的甲醇-乙酸溶液洗脱  $48 \text{ h}$ , 用甲醇洗去乙酸,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  干燥后得到印迹聚合物(MIP)备用; 非印迹聚合物(NIP)的制备除不加模板分子外, 其他步骤同上。

### 1.3 预聚合液的紫外光谱分析

固定模板分子地西洋的浓度为  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 分别加入  $0, 0.2, 0.6, 0.8, 1.0, 4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MAA, 超声使

收稿日期: 2009-11-10, 修订日期: 2010-02-20

基金项目: 国家(863计划)项目(2006AA10Z439)资助

作者简介: 刘晓芳, 女, 1986年生, 上海交通大学农业与生物学院硕士研究生

e-mail: liuxiaofang08@hotmail.com

\* 通讯联系人 e-mail: cychai88@hotmail.com

分散均匀, 预聚合 2 h。用相应浓度的 MAA 二甲亚砷溶液作参比, 得到一系列模板分子的紫外吸收光谱图。

### 1.4 分子印迹聚合物的红外光谱分析

以 KBr 压片法制备样品, 在 500~4 500  $\text{cm}^{-1}$  范围内测定 MIP 和 NIP 的红外光谱。

### 1.5 丝网印刷电极原位合成地西洋分子印迹膜及传感方法检测地西洋的标准曲线建立

聚合液配制同 1.2 节, 量取 1.2  $\mu\text{L}$  聚合液均匀涂布在丝网印刷电极工作区, 将电极条固定在密闭容器底部, 容器抽真空后置于 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴中, 当丝网印刷电极上涂布聚合液的区域出现半透明蜡状物质后, 取出电极条置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷却, 得到地西洋分子印迹膜修饰的丝网印刷电极。洗脱步骤同 1.2 节。

用 B-R 缓冲液 (pH 7.0) 配制 0.039, 0.078, 0.15, 0.31, 0.46, 0.62  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的地西洋标准溶液。取 30  $\mu\text{L}$  B-R 缓冲液滴入丝网印刷电极的工作区, 待传感仪读数稳定后, 记录此刻电导值 (背景值), 然后用吸水纸吸干电极工作区的缓冲液, 加待测样品 30  $\mu\text{L}$ , 稳定后记录电导值 (终值)。每次检测结束后更换带有印迹膜修饰的丝网印刷电极条, 共测试 6 个浓度, 平行测定 3 次。以响应信号值 (信号值 = 终值 - 背景值) 为纵坐标, 以地西洋的质量浓度为横坐标, 作标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模版分子与功能单体预聚合液的紫外光谱特征

地西洋分子具有苯并二氮杂卓 2 酮的结构, 其共轭系统在 295 nm 附近有特征吸收峰。采用紫外吸收光谱法分析印迹分子地西洋与单体 MAA 在溶剂中的相互作用, 计算主客体配合物的结合常数和配位比<sup>[14]</sup>。由图 1 可见, 随着溶剂中 MAA 浓度增大, 地西洋分子的最大吸收波长向长波长方向移动, 即发生了红移现象, 同时吸收峰的强度也逐渐增加。这种移动可能是由于 MAA 作为质子供体与地西洋的生色团形成氢键, 吸收波长移动所对应的能量差即为氢键的强度。

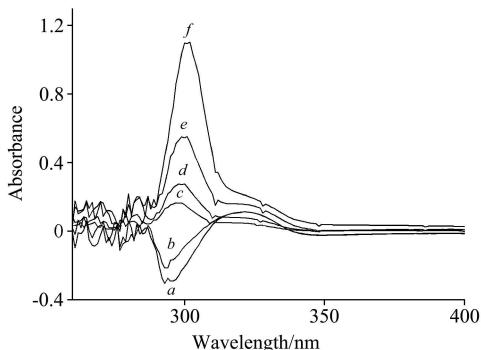


Fig 1 UV adsorption spectra of diazepam and MAA system in DMSO solution

$a_0(\text{dia}) = 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $b_0(\text{MAA}) / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} =$   
 a: 0; b: 0.2; c: 0.6; d: 0.8; e: 1.0; f: 4.0

为  $b_0$ , 化学配位比为  $n$ , 则结合反应如下



$$K = [\text{dia}[\text{MAA}]_n] / [\text{dia}][\text{MAA}]_n \quad (2)$$

根据物料平衡

$$[\text{dia}] + [\text{dia}[\text{MAA}]_n] = a_0 \quad (3)$$

$$[\text{MAA}] + [\text{dia}[\text{MAA}]_n] = b_0 \quad (4)$$

因为  $b_0$  远大于  $a_0$ , 可忽略  $[\text{dia}[\text{MAA}]_n]$ , 所以

$$[\text{MAA}] \approx b_0 \quad (5)$$

将 (3) 和 (4) 带入 (2) 得

$$[\text{dia}[\text{MAA}]_n] = a_0 b_0^n K / (1 + b_0^n K) \quad (6)$$

根据 Lambert Beer 定律, 若溶液中只有 dia 与  $[\text{MAA}]_n$  有吸收, 设  $\epsilon_1$  和  $\epsilon_2$  分别为地西洋和配合物的摩尔吸收系数, 则总吸光度为

$$A = \epsilon_1 l [\text{dia}] + \epsilon_2 l [\text{dia}[\text{MAA}]_n] = \epsilon_1 l (a_0 - [\text{dia}[\text{MAA}]_n]) + \epsilon_2 l [\text{dia}[\text{MAA}]_n] = (\epsilon_2 - \epsilon_1) l [\text{dia}[\text{MAA}]_n] + \epsilon_1 l a_0 \quad (7)$$

令  $A_0 = \epsilon_1 l a_0$ , 则吸光度的变化为

$$\Delta A = A - A_0 = (\epsilon_2 - \epsilon_1) l [\text{dia}[\text{MAA}]_n] = \Delta \mathcal{E} [\text{dia}[\text{MAA}]_n] \quad (8)$$

将 (7) 带入 (5) 得

$$\Delta A / b_0^n = -K \Delta A / + K \Delta \mathcal{E} l a_0 \quad (9)$$

化学配位比  $n$  分别取 1, 2, 3 时, 以  $\Delta A / b_0^n$  对  $\Delta A$  作图, 发现  $n = 2$  时  $\Delta A / b_0^n$  与  $\Delta A$  的函数有线性关系, 回归方程为  $\Delta A / b_0^n = 1.5323 \Delta A + 2.1187 (R = 0.9412)$ 。推测在此聚合反应中, 模板分子与功能单体通过协同氢键形成 1:2 型配合物, 结合常数  $K$  为  $1.5323 \times 10^6 \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ , 表明该类氢键配合物十分稳定。

### 2.2 印迹聚合物化学基团的红外光谱特征

在地西洋的红外光谱中 (图 2), 1690  $\text{cm}^{-1}$  附近为二氮杂卓结构内酰胺中  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动峰, 内酰胺中的  $\text{C}=\text{O}$  是强的质子接受体, 易与 MAA 的  $\text{COOH}$  作用形成氢键<sup>[15]</sup>。在未经洗脱的印迹聚合物中, 该谱带向高波数段移动至 1730  $\text{cm}^{-1}$ , 表明地西洋分子中内酰胺的  $\text{C}=\text{O}$  氧原子可能是与甲基丙烯酸中的  $\text{COOH}$  的氢原子形成氢键的一个结合位点。图 3a 中所示乙二醇二甲基丙烯酸酯  $\text{C}=\text{C}$  双键较强的伸缩振动峰出现在 1636  $\text{cm}^{-1}$  处, 交联聚合后聚合物 1636  $\text{cm}^{-1}$  附近的  $\text{C}=\text{C}$  振动峰强度大大降低, 说明功能单体和交联剂大部分都进行了聚合, 能把

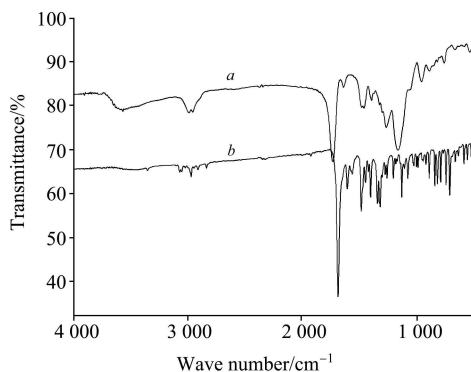


Fig 2 IR spectra of MIP without eluting a and diazepam b

设主体地西洋 (缩写为 dia) 浓度为  $a_0$ , 客体 MAA 浓度

模板分子交联在聚合物中。另外, 印迹聚合物中较宽的一OH 振动吸收峰相对于 MAA 的一OH 不对称振动吸收峰发生了较大红移, 也说明了模板分子与单体之间发生了结合作用。从图 4 可以看出, 洗脱后的印迹聚合物与非印迹聚合物的  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{—OH}$  和  $\text{C}=\text{C}$  双键等明显吸收峰的峰型基本一致, 说明印迹聚合物中的地西洋分子被洗脱, 留下了与其官能团相匹配的空穴。此印迹聚合物可有效的识别待测液中的地西洋分子并与之发生特异性的结合。

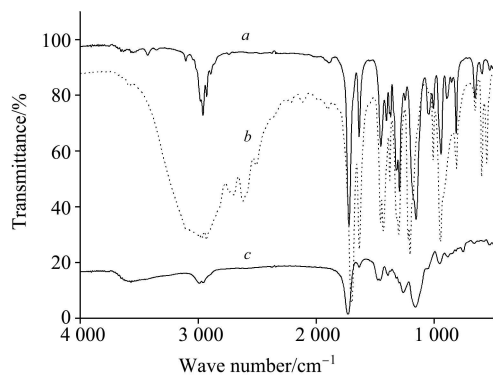


Fig 3 IR spectra of EGDMA *a*, MAA *b* and MIP without eluting *c*

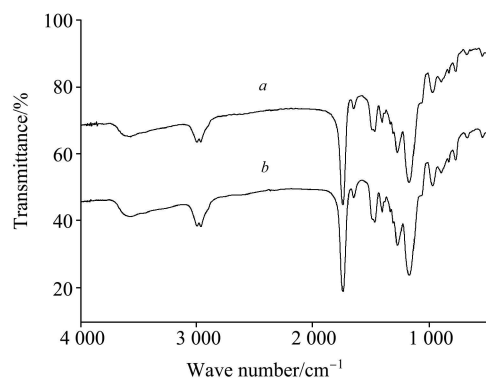


Fig 4 IR spectra of eluted MIP *a* and NIP *b*

本实验用热聚合法成功合成了地西洋的分子印迹聚合物及聚合膜, 且利用常规的洗脱方法能较为容易地将模板分子洗脱, 表明预聚合液中模板分子与功能单体以非共价方式形成稳定的主客体配合物, 此结果与相关报道一致<sup>[16]</sup>。模板分子地西洋二氮杂卓结构中的氮原子呈弱碱性, 因此选择酸性的甲基丙烯酸作为功能单体, 具有更大的分子间作用力。推

测地西洋分子二氮杂卓中的 N 原子和羰基与 MAA 的羧基可以通过氢键作用形成识别位点, 加入交联剂、引发剂后, 这些识别位点被交联固定在聚合物中。洗脱掉模板分子的印迹聚合物具有立体空穴结构和特异的识别位点, 对地西洋表现出高的选择性。

### 2.3 基于分子印迹膜的电导型传感方法检测地西洋的标准曲线

本实验在成功地制备地西洋分子印迹聚合物的基础上, 结合电化学传感技术, 建立了以分子印迹膜修饰的一次性丝网印刷电极做为敏感元件的电导传感方法。该方法检测地西洋的标准曲线见图 5, 回归方程为  $Y = 22.289X + 2.7416$  ( $R = 0.9936$ ), 检测限达  $0.008 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在  $0.039 \sim 0.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围具有良好的线性关系。这种基于分子印迹技术的电导型传感器检测地西洋特异性强、灵敏、成本低、高通量, 能对样品进行现场快速检测, 随着分子印迹技术和传感技术的不断完善, 该电导型传感器将在食品安全检测领域发挥更大的作用。

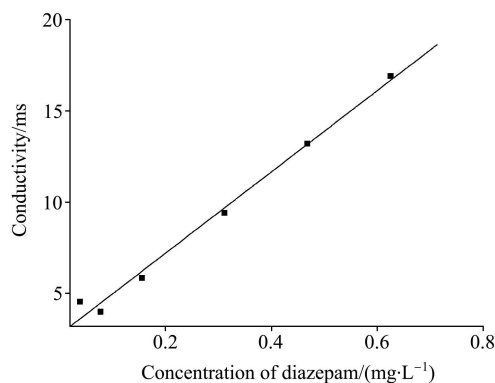


Fig 5 Calibration curve for determination of diazepam

## 3 小结

采用分子印迹技术制备了对地西洋分子具有特异选择性的印迹聚合物和分子印迹膜, 紫外光谱和红外光谱分析表明地西洋和甲基丙烯酸能通过氢键形成主客体配合物, 该聚合物通过协同氢键专一地结合地西洋。初步探索了以该分子印迹膜修饰的一次性丝网印刷电极在电导型传感检测中的应用。这种电导型传感器灵敏度高, 响应时间短, 特异性强, 成本低, 能对多个样品进行现场、快速检测, 随着分子印迹理论的不断进步与完善, 该电导型传感器将在食品安全检测领域发挥更大的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Alexander C, Andersson H S, Andersson L I, et al. *J. Mol. Recognit*, 2006, 19(2): 116.
- [2] He C, Long Y, Pan J, et al. *Biochem. Bioph. Methods*, 2007, 70(2): 133.
- [3] Silvestri D, Barbani N, Cristallini C, et al. *J. Membr. Sci.*, 2006, 282(1/2): 284.
- [4] HU Xiaogang, LI Gongke (胡小刚, 李攻科). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2006, 34(7): 1035.
- [5] Sellergren B, Allender C J. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, 57(12): 1733.
- [6] Fang C, Yi C L, Wang Y, et al. *Biosen. Bioelectron*, 2008, 24(10): 3164.

- [ 7 ] Francesco P, Francesca L, Giuseppe C, et al. *J. European Polymer.*, 2009, 45(6): 1634.
- [ 8 ] Umporn A, Martin K, Nenad G E, et al. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25(1): 82.
- [ 9 ] Carmen C, Leif S, Esther T, et al. *J. Chromatography A*, 2008, 1179(2): 216.
- [ 10 ] Shiho T, Hiroshi S, Tsutomu N. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 641(1-2): 7.
- [ 11 ] Vitali S, Jekaterina R, Anna M, et al. *Electrochimica Acta*, 2008, 53(6): 2729.
- [ 12 ] Prasad B B, Tiwari K, Singh M, et al. *J. Chromatography A*, 2008, 1198~ 1199: 59.
- [ 13 ] Marinah M A, Eleanor I M, Peter A G C, et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79(1): 256.
- [ 14 ] SHEN Zhong lan, YANG Jun, ZHU Xiaolan, et al(申中兰, 杨俊, 朱晓兰, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2009, 29(1): 78.
- [ 15 ] Yang J, Zhu X L, Cai J B, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 384(3): 761.
- [ 16 ] Matsui J, Miyoshi Y, Doblhoff Doer O, et al. *Analytical Chemistry*, 1998, 70: 4404.

## Spectroscopic Study of Diazepam Molecularly Imprinted Polymers and Initiative Application to Conductimetric Sensor Based on Molecularly Imprinted Films

LIU Xiaofang, LI Feng, YAO Bing, WANG Li, LIU Guoyan, CHAI Chunyan\*

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract** The molecularly imprinted polymers were synthesized using diazepam as the template and molecularly imprinted films (MIF) prepared on screen printed electrodes (SPE). The binding mechanism and recognition characteristics of the molecularly imprinted polymers were studied by ultraviolet (UV) spectra and infrared (IR) spectra. In addition, a conductimetric sensor for diazepam was established preliminarily based on diazepam MIF modified SPE. The results of UV spectra indicated that template molecules and functional monomers had formed 1: 2 hydrogen bonding complexes; the results of IR spectra showed that there were some functional groups in the molecularly imprinted polymers which could interact with the template molecules. The molecularly imprinted polymers manifested highly recognition to diazepam. The response of the conductimetric sensor to the concentration of diazepam displayed a linear correlation over a range of 0.04 to 0.62 mg · L<sup>-1</sup> with a detection limit of 0.008 mg · L<sup>-1</sup>. The sensor is suitable for on the spot detection of diazepam.

**Keywords** Diazepam; Molecularly imprinted polymer; Spectroscopy; Conductometric sensor

(Received Nov. 10, 2009; accepted Feb. 20, 2010)

\* Corresponding author