

检测猪肉中地西洋的分子印迹仿生传感器的研制

刘晓芳 姚冰 刘国艳 柴春彦*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘 要 在一次性丝网印刷电极上原位制备地西洋的分子印迹膜, 将丝网印刷电极通过电极插口与便携式电导仪相连接, 组装成检测地西洋残留的电导型传感器, 建立了检测地西洋的标准曲线并测试了实际肉类样品中的地西洋含量。通过扫描电镜分析了该膜的表征, 与非印迹膜相比, 印迹膜表面形成了大量印迹微孔。本传感器装置对地西洋具有很高的灵敏度和特异性, 检出限为 0.008 mg/L , 线性范围为 $0.039 \sim 1.25 \text{ mg/L}$, 基于肉品的检测回收率为 $91.3\% \sim 95.0\%$, 可实现现场快速检测。

关键词 地西洋; 分子印迹膜; 电导型传感器

1 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。分子印迹聚合物和分子印迹膜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、检测领域得到广泛地应用^[1~10]。A riffin 等应用地西洋分子印迹聚合物固相萃取柱, 采用液质联用技术检测血液中地西洋含量^[11], 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。有研究者利用电化学方法在柱状金属电极上制备印迹膜^[12~14]或热聚合法制备分子印迹物^[15]作为检测传感器的感受器部分。但是电化学法印迹膜难以批量制备, 利用印迹物制备的传感仪组装过程较复杂, 均不适用于大通量快速检测。有关利用分子印迹膜为感受器检测肉品中地西洋的电导型传感方法的研究尚未见报道。

本实验采用原位聚合的方法, 直接在一次性丝网印刷电极条上制备地西洋分子印迹膜, 并将这种电极条与电导分析仪相连接, 组装了检测地西洋的电导型传感器。通过更换带有印迹膜的电极条, 将微量待测样品直接滴入电极条工作区即可实现多个样品的快速检测。此电导型传感器具有灵敏度高、特异性强、检测速度快和成本低等优点, 具有实际应用前景。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Hardwee C_{18} 固相萃取小柱 (500 mg, 3 mL, 德国 Hardwee 公司); FEI SR DN200 型场发射扫描电镜 (美国 FEI 公司); XM TD-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); CON 6/TDS 6 电导仪 (新加坡 OAKTON 公司); 一次性丝网印刷电极条 (台湾芯宝科技股份有限公司), 其基本结构是在 PVC 基板上按设计图案印制导电银浆层、导电碳浆层及绝缘层。

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; 偶氮异丁腈 (AIBN)、二甲亚砜 (DMSO)、甲醇、丙酮、乙酸及其它分析纯试剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司。磷酸盐缓冲液 (PBS) 以 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 配制; 伯瑞坦 罗比森缓冲溶液 (B-R) 以磷酸、乙酸、硼酸配制; 碳酸盐缓冲液以 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 配制; 缓冲液 pH 调节液为 HCl 和 NaOH 溶液。实验用水均为二次蒸馏水。

2009-11-06 收稿; 2010-01-25 接受

本文系国家“863”计划项目 (No. 2006AA10Z439) 和上海市兽医生物技术重点实验室开放课题资助

* E-mail: cychai88@hotmail.com

2.2 印迹膜(MIF)的制备

取 0.2847 g (1 mmol) 地西洋和 0.516 mL (6 mmol) MAA 溶于 10 mL 二甲亚砜中, 超声 10 min, 放置 2 h 进行预聚合。加入 5.667 mL (30 mmol) EGDMA 和 0.061 g A·BN, 超声混合均匀, 充氮气除氧 10 min, 量取 1.2 μL 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(MIF)修饰的丝网印刷电极。用甲醇-乙酸(9:1, V/V)溶液洗脱 48 h, 用甲醇洗去乙酸, -4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

带有非印迹膜(NMIF)的丝网印刷电极条的制作方法参照上述方法, 区别在于聚合过程中不加入模板分子。

2.3 传感检测方法的建立

检测装置示意图如图 1 所示。将分别修饰有 MIF 与 NMIF 的两条丝网印刷电极条通过两块加样控制挡板粘合为一体, 两电极工作区之间的间隙组成测试样品加样区, 然后将组装好的测试电极通过 USB 接口与电导仪相连。

用 B-R 缓冲液 (pH 7.0) 配制 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25 mg/L 的地西洋标准溶液。取 30 μL 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 μL , 稳定后记录电导值 (终值)。每次检测结束后更换带有 MIF 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。

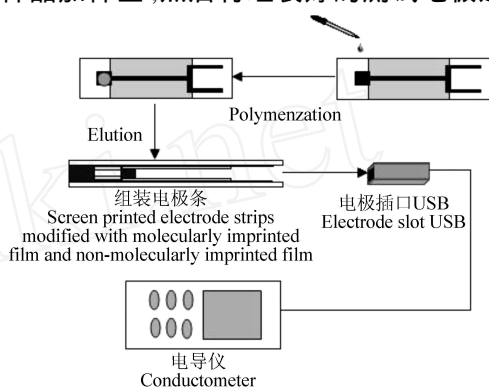


图 1 实验检测装置示意图

Fig 1 Schematic structure of analytical system

3 结果与讨论

3.1 MIF 与 NMIF 表征分析

随机选取数个制备好的 MIF 和 NMIF, 进行扫描电镜分析。本实验制备的 MIF 与 NMIF 厚度介于 20 ~ 40 μm 之间。非印迹膜表面较为光滑, 并有小量小泡样阴影分布 (图 2A), 可能主要由于聚合分子在聚合结束后, 聚合分子牵拉及堆积而成。而分子印迹膜上则有大量的分子印迹孔穴存在, 在膜表面广泛分布 (图 2B), 在孔穴样分子聚合物表面存在着大量的印迹微孔, 可能是由于模板分子被洗脱后而遗留的结构, 该结构与分子印迹膜对模板分子的识别和吸附作用密切相关。表面立体扫描发现, 非印迹膜表面结构较为均一, 无明显的穴状结构; 而分子印迹膜表面结构不均一, 分布有大量的凹陷及孔穴样结构。

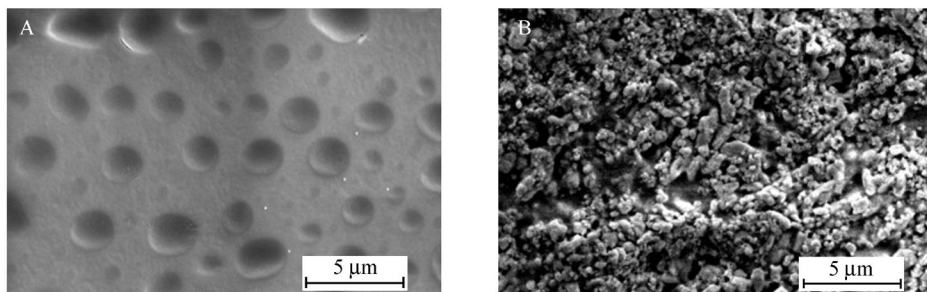


图 2 非印迹膜(A)及印迹膜(B)电镜扫描图 (×10000)

Fig 2 Scanning electron microscopy (SEM) images of N-molecularly imprinted film (MIF) (A) and MIF (B) (×10000)

3.2 基于 MIF 传感器的测试标准曲线

以分子印迹膜为敏感元件的电导传感方法检测地西洋的标准曲线, 回归方程为 $Y = 23.28787x +$

1.9741 ($r=0.9995$), 检出限为 0.008 mg/L; 在 0.039 ~ 1.25 mg/L 范围内具有良好的线性关系。而以非印迹膜为感受器在相同条件下检测地西泮标准溶液, 在不同溶液浓度下所获得的电导值无明显变化。说明洗脱后的 MIF 存在可以与地西泮分子结构相互补的孔穴, 溶液中具有电化学活性的地西泮分子被特异性吸附至 MIF 表面后, 膜本身的电化学活性改变。随着溶液中地西泮浓度的变化, 产生相应的电导率信号。而 N-MIF 对地西泮分子具有一定程度的非特异性吸附。当这种吸附趋于饱和时, 所得到的电导率值在一定范围内表现出缓慢的变化; 当溶液中待测物浓度增大时, 电导响应值也随之增加, 但是这种非特异性吸附引起的电导率变化远远低于 MIF 的特异性吸附。

3.3 测试条件对检测信号的影响

用 0.1 mol/L B-R 缓冲液 (pH 7.0) 配制浓度分别为 0.039、0.156、0.625 和 1.25 mg/L 的地西泮测试液, 按照 2.3 中所建立的传感方法进行测试, 分别在 0、30、60、120、180、240 和 300 s 时记录电导值, 实验结果见图 3A。检测不同浓度地西泮溶液时, 电导信号值均随着数据采集时间的延长而增大。检测值在初始 60 s 内显著增加, 但是在较低浓度下变化趋势不明显; 180 s 后检测值趋于稳定。由本实验可知, MIF 对溶液中地西泮分子的特异性吸附主要发生在前 60 s 内, 180 s 后达到吸附平衡状态。因此, 本实验选取 180 s 作为检测数据采集时间。

为探讨不同缓冲液对测试地西泮含量的影响, 分别以 pH 6.0 (0.2 mol/L) 的 PBS 缓冲液、pH 7.0 (0.1 mol/L) 的 B-R 缓冲液和 pH 9.5 (0.1 mol/L) 的碳酸盐缓冲液为支持液, 检测结果表明, 以 PBS 缓冲液为支持液时, 检测值在较低浓度时呈递增趋势, 但高浓度的检测值变化平缓; 以碳酸盐缓冲液为支持液, 测试结果呈波动性变化; 而以 B-R 缓冲液为支持液, 检测值具有良好的线性关系 (图 3B)。因此, 本实验选用 pH 7.0 (0.1 mol/L) 的 B-R 缓冲液作为支持液。

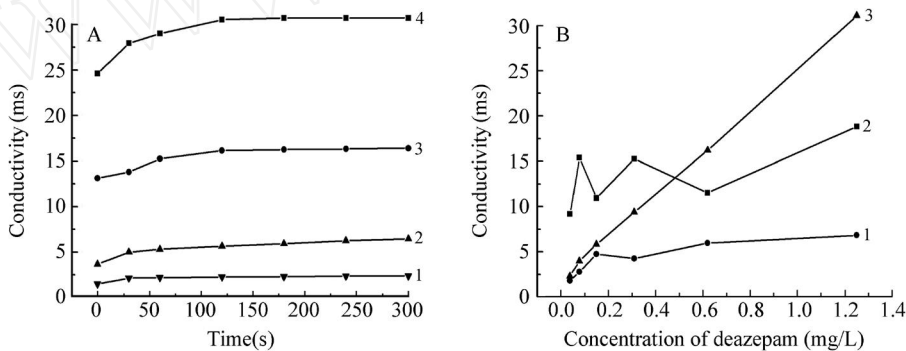


图 3 基于 MIF 的电导传感方法检测度地西泮的时间 响应曲线 (A) 及不同缓冲液体系对检测信号的影响 (B)

Fig 3 Conductivity versus time in detection of diazepam with different concentrations (A) and influence of different buffers to detection of diazepam by conductimetric sensor based on MIF (B)

Concentration of diazepam (A): 1. 0.039 mg/L; 2. 0.156 mg/L; 3. 0.625 mg/L; 4. 1.25 mg/L. Buffers (B):

1. pH 6.0 (0.2 mol/L) phosphate buffer; 2. pH 9.5 (0.1 mol/L) bicarbonate buffer; 3. pH 7.0 (0.1 mol/L)

Britton-Robinson buffer

3.4 干扰实验

本实验选用畜禽肉中可能含有的违禁兽药琥珀酸氯霉素与己烯雌酚作干扰物质, 将地西泮和每种干扰物质用 0.1 mol/L B-R 缓冲液分别配制成干扰测试液, 各物质的加入量见表 1。实验发现, 两种干扰测试液的地西泮检出量均略高于溶液中地西泮的实际含量。其中己烯雌酚对检出量的影响比琥珀酸氯霉素更大, 说明分子构型差异很大但分子量接近的物质会对检测造成干扰。这主要是由于检测过程中 MIF 同时对各特征基团和分子整体进行识别, 琥珀酸氯霉素的分子结构和分子大小与地西泮差异明显, 不能稳定结合在印迹孔穴中, 大部分以布朗运动的形式在印迹孔穴中出入。己烯雌酚虽然与地西泮的分子结构也有很大差异, 但其分子量与地西泮相当, 且少量分子的酚羟基可以与印迹孔穴通过氢键、范德华力相结合, 造成检测值偏高。该推断与文献 [16] 的研究结果一致。因而在实际样品测试时, 为

消除这种干扰,可以通过简单的预处理分离富集待测物质。

表 1 干扰物质对 0.5 mg/L 地西洋溶液检测结果的影响

Table 1 Effect of interfering substance on the detection of 0.5 mg/L diazepam solution

干扰物质 Interfering substance	干扰物质加入量 Added interfering substance (mg/L)	地西洋的检出量 Found of Diazepam (mg/L)
琥珀酸氯霉素 Chloramphenicol succinate	0.5	0.530 ±0.017
	2.0	0.574 ±0.008
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	0.5	0.572 ±0.025
	2.0	0.598 ±0.034

本实验也在肉品如牛肉、猪肉(包括鲜肉、熏肉和腊肉)样品中进行了待测物的标加实验,结果表明,不同来源肉品、色素、防腐剂等物质对同一浓度的地西洋测试未有显著影响。另外,维生素 C、Fe³⁺等具有高氧化还原活性的物质对测试地西洋的影响并不显著,可能该实验建立的电导测试模式能有效地排除这些物质的干扰。离子在电导型传感测试中为必须考虑的影响因素之一。测试了不同离子类型和强度对电导传感法测试地西洋的影响,发现样品中含有 0.2 mol/L 的碳酸盐、磷酸盐,对测试结果影响并不显著,但 5 mol/L 的 NaCl、KCl 等强电解质对电导测试结果有显著影响,可使电导值增加 2.52 ~ 4.85 ms,因而建议在样品前处理过程中通过液-液萃取将高浓度的离子除去。

3.5 回收率实验

参照商业标准^[17]对标加样品进行前处理。称量 10 g 猪肉匀浆试样两份,加入地西洋标样,分别经提取、萃取得到的样品洗脱液于 50 ℃ 水浴氮气吹干。取一份氮气吹干物,用 1 mL 1% 高氯酸水溶液和 2 mL 正己烷复溶,静置分层后取下层水相过 0.2 μm 滤膜,供 HPLC 分析。取另一份氮气吹干物,用 3 mL 甲醇-水(1:99, V/V)溶液复溶,过 0.2 μm 滤膜,供传感测试。每个样品平行 6 次。标准加入实验结果表明,该传感方法检测结果与 HPLC 法检测结果一致(表 2),回收率为 91.3% ~ 95.0%,略低于 HPLC 法测定的回收率(92.0% ~ 100.7%)。

表 2 回收率的测定结果

Table 2 Recovery of diazepam in meat samples

加入量 Added (mg/L)	传感方法 By sensor		高效液相色谱法 By HPLC	
	检出量 Found (mg/L)	Recovery (%, n=6)	检出量 Found (mg/L)	Recovery (%, n=6)
0.05	0.046 ±0.004	91.3	0.047 ±0.003	92.0
0.1	0.094 ±0.003	94.2	0.096 ±0.002	96.0
0.5	0.455 ±0.015	91.0	0.468 ±0.032	93.6
1.0	0.938 ±0.023	93.8	0.969 ±0.054	96.9
1.5	1.430 ±0.039	95.0	1.510 ±0.042	100.7

3.6 传感器性能

采用本方法对液体样品中的地西洋残留进行检测,可在 3 min 内完成。更换同一批次制作的带有 MIF 的电极条,对相同浓度的地西洋标加样品进行检测,5 次测试得出的结果一致,相对标准差小于 2.8%。随机抽取 5 批次制作的带有 MIF 的电极条,检测同一浓度的地西洋标加样品,相对标准差小于 3.5%;将制备好的带有 MIF 的电极条在 -4 ℃ 条件保存 3 个月后,检测同一浓度的地西洋标加样品,与刚制备好的电极条检测结果相比,相对标准误差小于 3.8%;4 个月后进行检测,与初次检测相比,相对标准误差小于 4.6%。因此该传感仪的敏感元件的使用寿命在 4 个月以上。通过更换带有 MIF 的一次性丝网印刷电极条,该传感仪可长期使用。用过本实验制备的基于 MIF 为感受器的电导型传感仪具有检测速度快、重复性好、稳定性高、使用时间长等优点,有很大的实际应用价值。

References

1 Alexander C, Andersson H S, Andersson L I, Ansell R J, Kirsch N, Nicholls I A, O Mahony J, Whitcombe M J. *J. Mol. Recognit.*, **2006**, 19(2): 106 ~ 180

2 Syritski V, Reut J, Menaker A, Gyurcsanyi R E, Pál A. *Electrochim. Acta*, **2008**, 53(6): 2729 ~ 2736



- 3 He C, Long Y, Pan J, Li K, Liu F. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70(2): 133 ~ 150
- 4 ZHANG Nuo-Wei(张挪威), DING Ming-Xing(丁明星), LIU Guo-Yan(刘国艳), SONG Wei-Wei(宋巍巍), CHAI Chun-Yan(柴春彦). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 25(1): 82 ~ 87
- 5 Silvestri D, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G. *J. Membr. Sci.*, **2006**, 282(1-2): 284 ~ 295
- 6 Tokonami S, Shiigi H, Nagaoka T. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 641(1-2): 7 ~ 13
- 7 HU Xiao-Gang(胡小刚), LI Gong-Ke(李攻科). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(7): 1035 ~ 1041
- 8 Puoci F, Emma F, Cirillo G, Curcio M, Parisi O I, Spizzirri U G, Picci N. *Eur. Polym. J.*, **2009**, 45(6): 1634 ~ 1640
- 9 Sellergren B, Allender C J. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57(12): 1733 ~ 1741
- 10 Cacho C, Schweitz L, Turiel E, Pérez-Conde C. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1179(2): 216 ~ 223
- 11 Ariffin M M, Miller E I, Comack P A, Anderson R A. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(1): 256 ~ 262
- 12 Zhang Z, Long Y, Nie L, Yao S. *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21(7): 1244 ~ 1251
- 13 Fang C, Yi C, Wang Y, Cao Y, Liu X. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(10): 3164 ~ 3169
- 14 Lakshmi D, Bossi A, Whitcombe M J, Chianella I, Fowler S A, Subrahmanyam S, Piletska E V, Piletsky S A. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(9): 3576 ~ 3584
- 15 Prasad B B, Tiwari K, Singh M, Shama P S, Patel A K, Srivastava S. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1198-1199: 59 ~ 66
- 16 YANG Jun(杨俊), ZHU Xiao-Lan(朱晓兰), SU Qing-De(苏庆德), CAI Ji-Bao(蔡继宝), HU Yan(胡雁), GAO Yun(高芸). *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), **2007**, 27(6): 1152 ~ 1155
- 17 GB/T 10501-2008. *Determination of Diazepam in Muscle of Livestock and Poultry-High Performance Liquid Chromatography* (畜禽肉中地西洋的测定 高效液相色谱法). Commercial Standards of the People's Republic of China (中华人民共和国商业行业标准)

Bionic Sensor for Detection of Diazepam in Meat Using Molecularly Imprinted Film

LIU Xiao-Fang, YAO Bing, LIU Guo-Yan, CHAI Chun-Yan*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract Molecularly imprinted films (MIF) were synthesized in situ using diazepam as the template on screen printed electrodes (SPE). A sensor based on MIF for the detection of diazepam was assembled by connecting the SPE to a portable conductometer through an electrode slot. Standard calibration curve was established and the detection of diazepam in meat samples was performed on this sensor. Superficial characteristic of the MIF was investigated using scanning electron microscope. The results showed that there were numbers of imprinted micro-pores on the surface of MIF. The sensor based on MIF showed high selectivity and specificity towards the target diazepam. The response of the conductometric sensor to the concentration of diazepam displayed a linear correlation over a range of 0.039 - 1.25 mg/L with a detection limit of 0.008 mg/L, and the recoveries were 91.3% - 95.0% based on meat samples. This method is a quick and practical approach for the detection of diazepam on sites.

Keywords Diazepam; Molecularly imprinted films; Conductometric sensor

(Received 6 November 2009; accepted 25 January 2010)