柚皮苷分子印迹传感器的制备与应用

马秀玲[1]　陈日耀[1]　郑曦[1]　陈晓[1]　陈震*[1,2]
[1]（福建师范大学化学与材料学院，福州 350007）　[2]（宁德师范高等专科学校化学系，宁德 352100）

摘　要　以邻氨基酚为单体，无电化学活性的柚皮苷为模板分子，采用循环伏安法（扫速为 100 mV/s）在碳电极上往复扫描 30 次，电聚合出具有识别柚皮苷分子功能的敏感膜。以扫描电子显微镜（SEM）、X 射线全反射（XRR）及电化学方法对该印迹传感器进行表征。结果表明，印迹传感器敏感膜与非印迹膜在形貌结构和电化学特性方面有明显的不同。此传感器对柚皮苷有较好的选择性，响应快（30 s），在 $6.0\times10^{-5}\sim1.4\times10^{-4}$ mol/L 范围内呈线性关系，且重现性好（RSD = 1.8%，$n=5$）；传感器对柚皮苷的检出限为 1.6×10^{-5} mol/L。

关键词　柚皮苷；分子印迹；传感器；邻氨基酚

1　引　言

柚皮苷（Naringin，NG）是一种双氢黄酮类化合物，有抗氧化性（抑制氧化酶活性）、抗病毒、抑菌等多种生物学活性和药理作用。研究表明，黄酮类化合物具有抗氧化和促进氧化的双重作用。NG 是黄酮类化合物中促进氧化作用最强的物质之一，对人体基因具有诱导毒害作用[1]。通常采用分光光度法[2]和高效液相色谱法[3]检测 NG。分光光度法选择性低，而液相色谱法仪器较贵，因此，有必要寻找一种高效、快速且廉价的检测方法。分子印迹技术以其构效预定性、特异识别性和广泛实用性而备受关注[4~7]。分子印迹聚合物的一个重要应用是在传感器中取代物质分子作为识别元件，研制耐受性强、低成本的分子印迹传感器[8~12]。本研究以 NG 为印迹分子，通过电化学聚合制备了具有识别 NG 功能的印迹敏感膜传感器，并采用扫描电镜（SEM）、X 射线全反射（XRR）及电化学方法对此传感器进行了表征。以 $K_3Fe(CN)_6$ 为电活性探针分子，对 NG 实现了间接、快速的测定。

2　实验部分

2.1　仪器与试剂

XL30ESEM-TMP 扫描电镜（荷兰 Philips-FEI 公司）；CHI660 型电化学工作站（上海辰华仪器公司）；X′Pert Pro MPD X 射线全反射仪（荷兰 Philips 公司）；Prostar 240 型 HPLC（美国 Varian 公司）。柚皮苷（NG，>98%，南京泽朗医药公司）；邻氨基酚（OAP，分析纯，国药集团化学试剂有限公司），其余试剂均为分析纯。

2.2　分子印迹传感器敏感膜的制备[13]

将碳工作电极抛光，在二次蒸馏水和无水乙醇中分别超声洗涤 5 min，并重复 3 次，然后进行电化学活化处理，即在 0.5 mol/L H_2SO_4 中于 −0.3 ~ 1.5 V 进行循环伏安扫描，直至获得稳定的循环伏安响应曲线。

电化学聚合采用传统的三电极系统。以分析纯碳棒（$\Phi=5$ mm）为工作电极，铂丝电极为辅助电极，饱和 Ag/AgCl 电极为参比电极。将 0.2588 g OAP 溶于 0.1 mol/L $HClO_4$ 中，用 0.4 mol/L NaOH 调节 pH 值呈弱酸性，定容至 50 mL；取 20 mL 溶液，加入 10 mL 0.01 mol/L NG 溶液中。用循环伏安法扫描 30 次，扫描范围 −0.2 ~ 1.0 V，扫描速率为 100 mV/s。电聚合完成后，分别用甲醇和 0.5 mol/L H_2SO_4 浸泡 12 h，以去除聚合物基质中的 NG，制成保留有 NG 分子构型孔穴的分子印迹高分子膜传感器。非印迹敏感膜电极的制备除了不加入印迹分子 NG 外，其余步骤与印迹膜相同。

2.3　检测方法

采用三电极检测装置：印迹传感器为工作电极，铂丝电极为辅助电极，饱和 Ag/AgCl 电极为参比电

2009-06-10 收稿；2009-10-07 接受
本文系福建省自然科学基金项目（No. D0710009）和福建省发展与改革委员会项目（No. 2008-762）资助
* E-mail：zc1224@pub1.fz.fj.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

极;在室温下,以0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 为测试底液,采用循环伏安法、交流阻抗技术对印迹传感器进行电化学表征。此外,采用差分脉冲法评价 NG 印迹传感器的分子印迹效应;以恒电位计时安培法评价传感器的选择性。

3　结果与讨论

3.1　分子印迹电聚合

图 1 为在模板分子 NG 存在下,电极上 OAP 电聚合形成敏感膜过程的示意图。OAP 在碳电极上的电化学聚合是完全不可逆的过程,在0.25 V 处有一个明显的氧化峰且无对应的还原峰出现。随着扫描次数的增多,峰电流明显降低,扫描十几次后氧化峰基本消失,在碳电极表面生成了非导电的致密的聚 OAP 敏感膜,可通过扫描的次数方便地控制膜厚度。

在酸性溶液中,聚 OAP 膜的结构[13] 如图 1 所示。膜中存在的功能基团 —NH 易与 NG 的 —OH 形成氢键,在 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中,NG 分子通过氢键作用进入分子印迹传感器中,引起 $K_3Fe(CN)_6$ 峰电流变化值的响应。在强酸性溶液中,分子印迹传感器膜中的氢键作用将被破坏,导致 NG 分子从传感器膜立体孔穴中逸出。

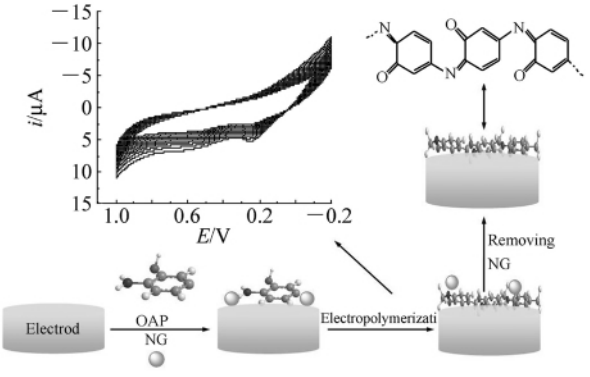

图 1　NG 印迹邻氨基酚膜电聚合示意图

Fig. 1　Schematic diagram of naringin (NG) imprinting *o*-aminophenol (OAP) membrane

3.2　传感器敏感膜的表征

3.2.1　膜形貌表征　印迹膜与非印迹膜的 SEM 形貌如图 2 所示。由图 2 可见,二者的表面形态有明显的区别。非印迹膜的表面形貌呈致密的结构(图 2a);印迹膜(图 2b)因印迹分子 NG 洗脱出后在膜表面形成了许多不规则的空穴。

3.2.2　膜粗糙度表征　在传感器敏感膜应用中,组成材料的表面及彼此间的界面对整体材料的用途起着决定性作用。以 Ω-2θ 扫描方式进行连续扫描,XRR 谱图表明,印迹敏感薄膜和非印迹敏感薄膜的反射图有明显的差异:印迹敏感膜的膜表面粗糙度明显大于非敏感薄膜。

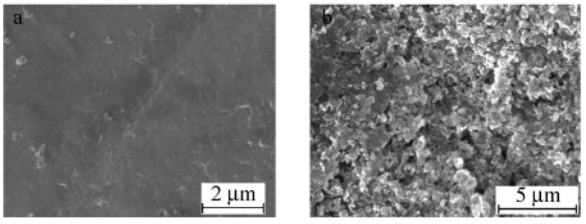

图 2　非印迹膜(a)与印迹膜(b)的 SEM 形貌

Fig. 2　SEM photographs of non-imprinted membrane (a) and imprinted membrane (b)

3.2.3　膜电化学特性表征　采用循环伏安法对敏感膜特性进行表征。在 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中,测得的循环伏安曲线如图 3 所示。$Fe(CN)_6^{3-}$ 在印迹传感器出现一对明显的氧化还原峰,与在裸电极的氧化还原峰[14] 相一致;而在非印迹膜电极上则无氧化还原峰。这主要是因为非印迹膜致密的表面结构阻碍 $Fe(CN)_6^{3-}$ 向电极表面扩散,而除去印迹分子后的印迹膜表面生成了许多不规则的空穴,$Fe(CN)_6^{3-}$ 可通过空穴扩散到电极表面进行氧化还原反应。

用交流阻抗(EIS)表征传感器膜表面性质,结果如图 4 所示。在 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中,裸碳电极的阻抗值最小。印迹传感器与非印迹的阻抗相比,非印迹膜阻抗较大,这是由于非印迹膜致密的表面结构使 $Fe(CN)_6^{3-}$ 向电极表面扩散的阻力增大。

考察了峰电流大小与扫描速率的关系。以 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 溶液为测试底液,在扫速 50 ~ 700 mV/s(分别为 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 和 700 mV/s)范围内,随着扫描速率的不断增加,峰电流值也逐渐增加,且氧化还原峰峰电流值与扫描速率的平方根($v^{1/2}$)成正比,表明传感器反应是受扩散控制的过程。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

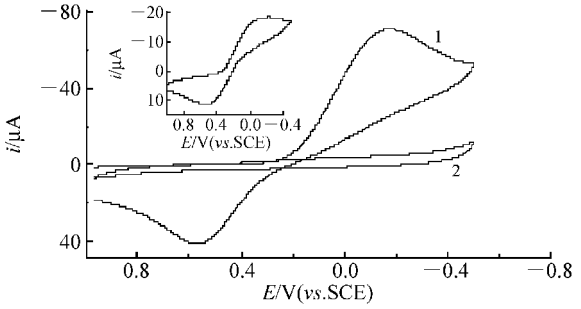

图3 底液为0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$、扫速为50 mV/s时电极的循环伏安图

Fig. 3 Cyclic voltammograms of the electrodes in 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ solution at scan rate of 100 mV/s

1. 印迹传感器(Imprinted sensor);2. 非印迹膜电极(non-Imprinted electrode);内插图为裸电极(Iinset: bared electrode)。

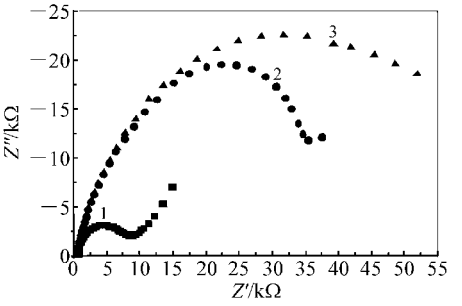

图4 底液为0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 时电极的交流阻抗图

Fig. 4 Electrochemical impedance spectrograph (EIS) (Init E = 0 V, High Freq. = 1×10^4 Hz, Low Freq. = 0.15 Hz, Amplitude = 0.005 V) of different electrodes in 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$

1. 裸电极(Bared electrode); 2. 印迹传感器(Imprinted sensor); 3. 非印迹电极(non-Imprinted electrode)。

3.3 分子印迹效应评价

采用差分脉冲法(电位范围:0.2~0.8 V; 电位增量:0.005 V; 振幅:0.05 V; 脉冲宽度:0.1 s; 采样宽度:0.02 s)对传感器进行印迹效应评价。在0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$溶液中,对不同浓度NG(1.0×10^{-6}、1.0×10^{-4}和1.0×10^{-3} mol/L)的测试结果见图5。因分子印迹后所得的膜保留有能对模板分子NG识别的三维孔穴,$Fe(CN)_6^{3-}$分子通过孔穴扩散至传感器表面,发生电化学反应;当溶液中NG分子进入印迹孔穴后,孔穴封闭,$Fe(CN)_6^{3-}$扩散受阻,传感器表面的$Fe(CN)_6^{3-}$浓度减少,从而使电流下降,当溶液中NG浓度越大,孔穴封闭越多,传感器表面的$Fe(CN)_6^{3-}$浓度越低,峰电流值依模板分子NG浓度的增大而减小。如图5所示,曲线3(1.0 mmol/L)浓度最大,其峰电流值最小;曲线1(1.0 μmol/L)浓度最小,但其峰电流值最大。

3.4 传感器的选择性和重现性

为证明聚合膜内的识别位点对模板分子具有特异选择性,以恒电位计时安培法,记录结构类似的不同化合物的电流随时间变化情况(见图6)。随着NG的逐渐加入,$K_3Fe(CN)_6$的还原峰电流逐渐降低,在每个浓度阶段都会出现一个平台(曲线1),30 s内趋于稳定,表明NG印迹传感器具有较快的响应时间。NG印迹传感器对二氢查尔酮柚皮苷(曲线2)和新橙皮苷(曲线3)几乎没有响应,说明在印迹传感

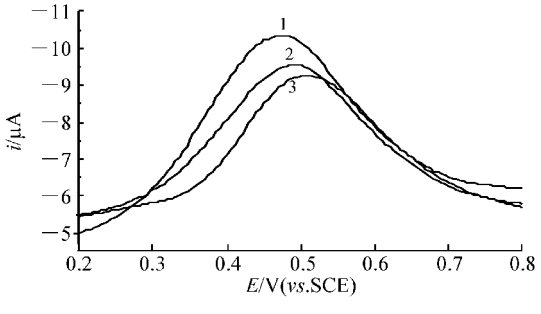

图5 测试底液为0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 时印迹传感器对不同浓度NG差分脉冲曲线

Fig. 5 Differential pulse voltammmetric responses of the imprinted sensor to different concentration

1. 1.0×10^{-6}; 2. 1.0×10^{-4}; 3. 1.0×10^{-3} mol/L) of naringin in 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ solution.

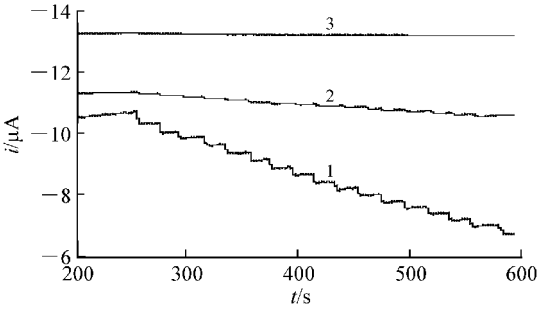

图6 测试底液为0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$、工作电位为0 V时传感器的计时电流响应曲线图

Fig. 6 Chronoamperometric response of the imprinted electrode in 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ solution at applied potential of 0 V

1. NG; 2. 二氢查尔酮柚皮苷(Naringin dihydrochalcone); 3. 新橙皮苷(Neohesperidin)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

器聚合膜中形成的 NG 识别位点在识别过程中起着重要作用。在 60 ~ 140 μmol/L 范围内,$K_3Fe(CN)_6$ 的峰电流变化值与 NG 的浓度呈线性关系,线性方程为:$y = 0.25x - 0.14$,相关系数为 0.9976。NG 浓度大于 4.0 mol/L 时,因识别位点趋于饱和,影响检测结果。检出限为 16 μmol/L。

将使用过的传感器在 0.50 mol/L H_2SO_4 溶液中超声震荡洗涤 20 min,用蒸馏水淋洗过后可使传感器基本恢复到响应前的状态。应用该传感器,采用差分脉冲法(条件同 3.3 节),在 NG 浓度为 0.1 mmol/L 时(测试液中含 0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$),平行测定,电流响应变化值(Δi)平均为 0.47 μA,相对标准偏差为 1.8%。此传感器具有良好的重现性。

3.5　试样分析

取 3 种止咳糖浆(1# ~ 3#)样品各 5 mL,用 80% 甲醇溶液稀释至 10 mL。上述样品分别用 NG 印迹传感器(测试底液为0.01 mol/L $K_3Fe(CN)_6$;应用差分脉冲法:电位范围:0.2 ~ 0.8 V;电位增量:5 mV;振幅:0.05 V;脉冲宽度:0.1 s;采样宽度:0.02 s)和液相色谱(分析条件:Microsorb-MV 100-5 C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm),检测波长 283 nm,以甲醇-2% HAc(38∶62, *V/V*)为流动相,流速:1.0 mL/min)分析 NG 浓度,各平行3 次,取平均值。结果见表 1。从表 1 可见,NG 印迹传感器和 HPLC 测定的结果相近,说明此传感器可望用于快速检测药物中的 NG。

表 1　NG 印迹传感器与高效液相色谱分析结果比较

Table 1　Comparison of the results of imprinted sensor (IS) and HPLC

样品 Sample	本方法测量值 Found by this method (μmol/L)	HPLC 测量值 Found by HPLC (μmol/L)
1#	30.1	33.8
2#	16.3	18.4
3#	42.2	45.1

References

1 Fuhr U. *Drug Saf.*, **1998**, 18(4): 251 ~ 272

2 LI He-Sheng(李和生), WANG Hong-Fei(王鸿飞), ZHOU Shi-Lei(周石磊), LI Di-Ping(励迪平). *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*(农业机械学报), **2006**, 37(4): 76 ~ 79, 90

3 ZHOU Da-Yong(周大勇), XU Qing(徐 青), XUE Xing-Y(薛兴亚), ZHANG Fei-Fang(章飞芳), LIANG Xin-Miao(梁鑫淼). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2006**, 34: S31 ~ S35

4 Yang T, Li Y H, Wei S, Li Y, Deng A P. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(8): 2905 ~ 2914

5 Reza P, Ebrahim V F, Seyed A S. *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 35(3): 352 ~ 356

6 HU Yu-Ling(胡玉玲), ZHU Fei(朱 飞), LI Jia-Wei(李家威), LI Gong-Ke(李攻科). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(3): 466 ~ 470

7 Tasselli F, Donato L, Drioli E. *Journal of Membrane Science*, **2008**, 320(1-2): 167 ~ 172

8 Lieberzeit P A, Dickert F L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(5): 1629 ~ 1639

9 Piletsky S A, Turner N W, Laitenberger P. *Medical Engineering & Physics*, **2006**, 28(10): 971 ~ 977

10 ZHAO Jun(赵 钧), LI Jian-Ping(李建平), Jiang Fu-Yang(蒋复阳). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(8): 1219 ~ 1222

11 Pesavento M, Agostino G D, Biesuz R, Alberti G. *Electroanalysis*, **2009**, 21(3): 604 ~ 611

12 ZHANG Nuo-Wei(张挪威), DING Ming-Xing(丁明星), LIU Guo-Yan(刘国艳), SONG Wei-Wei(宋巍巍), CAI Chun-Yan(蔡春艳). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2008**, 36(10): 1380 ~ 1384

13 Ramanaviciene A, Ramanavicius A. *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, 20(6): 1076 ~ 1082

14 WU Wu-Ai(武五爱), YIN Zhi-Fen(尹志芬), WEI Jing-Rui(尉景瑞), GUO Man-Dong(郭满栋). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2008**, 29(7): 1334 ~ 1338

15 FU Ping(付 萍), YUAN Ruo(袁 若), CHAI Ya-Qin(柴雅琴), YIN Bing(殷 冰), CAO Shu-Rui(曹淑瑞), CHEN Shi-Hong(陈时洪), LI Wan-Yang(李宛洋). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), **2008**, 66(15): 1796 ~ 1802

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Preparation and Application of Naringin Sensor Based on Molecularly Imprinting Technique

MA Xiu-Ling[1], CHEN Ri-Yao[1], ZHENG Xi[1], CHEN Xiao[1], CHEN Zhen*[1,2]

[1](*College of Chemistry and Materials Science, Fujian Normal University, Fuzhou* 350007)

[2](*Chemistry Department of Fujian Ningde Teachers College, Ningde* 352100)

Abstract The sensor of naringin(NG), a non-electroactive substance, was prepared based on the molecular imprinting technique. Using cyclic voltammetry technique(scan rate is 100 mV/s), the naringin imprinting sensitive film, poly-*o*-aminophenol was coated on the surface of a graphite electrode in the presence of naringin which was considered as the template, and characterized by SEM and X-ray reflective spectrophotometry (XRR). Using $K_3Fe(CN)_6$ as an electroactive marker, the electrochemical properties of the NG sensor were investigated by CV, electrochemical impedance spectroscopy (EIS), differential pulse voltammmetric and chronoamperometric. The results showed that the imprinted electrode was significantly different from the non-imprinted electrode in morphologies and electrochemical properties, and a linear relationship between the peak current and the naringin concentration was found in the range of $6.0\times10^{-5}-1.4\times10^{-4}$ mol/L with a detection limit of 1.6×10^{-5} mol/L. Moreover, the imprinted electrode exhibited a good selectivity and rapid response to the naringin template molecules, as well as an excellent reproducibility(RSD = 1.8%, $n=5$).

Keywords Naringin; Molecular imprinting; Sensor; *o*-Aminophenol

(Received 10 June 2009; accepted 7 October 2009)

2008年化学类期刊影响因子和总被引频次排序表(部分)

期刊名称	影响因子	学科排名	总被引次数	学科排名	期刊名称	影响因子	学科排名	总被引次数	学科排名
分子催化	1.647	1	891	19	煤炭转化	0.596	18	474	25
分析化学	1.200	2	4175	2	分析科学学报	0.584	19	727	21
催化学报	1.108	3	1807	6	中国科学B	0.556	20	1017	15
色谱	1.093	4	1684	7	应用化学	0.550	21	1526	10
化学学报	0.866	5	2894	3	结构化学	0.497	22	630	23
分析测试学报	0.864	6	1530	9	化学通报	0.446	23	994	16
高分子学报	0.849	7	1584	8	Chinese Journal of Polymer Science	0.441	24	246	31
化学进展	0.843	8	1030	14	化学研究与应用	0.378	25	921	18
燃料化学学报	0.832	9	946	17	影响科学与光化学	0.364	26	201	34
高等学校化学学报	0.814	10	4177	1	电化学	0.351	27	312	28
物理化学学报	0.793	11	1822	5	化学与生物工程	0.333	28	444	27
有机化学	0.754	12	1425	12	化学试剂	0.324	29	644	22
无机化学学报	0.739	13	1842	4	Whemical Research in Chinese Universities	0.314	30	246	31
环境化学	0.701	14	1381	13	合成化学	0.296	31	448	26
分析试验室	0.690	15	1468	11	Chinese Chemical Letters	0.265	32	627	24
分子科学学报	0.686	16	254	30	化学与黏合	0.229	33	263	29
高分子通报	0.665	17	844	20	化学研究	0.226	34	215	33

摘自2009版中国科技期刊引证报告

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net