

分子印迹胶体阵列检测对硝基苯酚

薛飞 王一飞 王秋鸿 孟子晖* 薛敏 黄舒悦 芦薇

(北京理工大学化工与环境学院, 北京 100081)

摘 要 以对硝基苯酚(*p*-NP)为印迹模板, 丙烯酰胺为功能单体, 制备单分散的对硝基苯酚分子印迹胶体微球。通过垂直沉降法将分子印迹胶体微球自组装为分子印迹胶体阵列, 采用胶带将分子印迹胶体阵列粘贴固定。固定于胶带上的分子印迹胶体阵列膜显示出良好的稳定性, 而且对目标分子 *p*-NP 具有明显的光学响应。分子印迹微球吸附目标分子发生溶胀, 引起胶体阵列溶胀, 分子印迹胶体阵列(MICA)反射峰位置发生移动。实验结果显示, MICA 随着 *p*-NP 浓度增加, 反射峰红移近 60 nm, MICA 表面颜色由红色逐渐变为蓝紫色; 而非印迹胶体阵列红移量只约 40 nm。MICA 简化了光子晶体凝胶传感材料的制备步骤, 为开发新型高性能生化传感器材料提供了新思路。

关键词 光子晶体; 胶体阵列; 分子印迹; 对硝基苯酚

1 引 言

对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol, *p*-NP)是一种常见的环境内分泌干扰物, 能够刺激并抑制中枢神经, 严重时将出现高铁血色素症和呼吸困难^[1], 因此对其监测和评价有重要的应用价值。传统 *p*-NP 检测方法主要基于高效液相色谱等分析手段, 仪器贵重, 操作复杂耗时^[1~3]。因此, 实现简便操作, 微型化, 直观裸眼检测等性能成为新型分析传感材料的主要研究方向。

光子晶体(Photonic crystal, PC)具有完美的光学调控性能, 根据布拉格衍射定律, 其结构的微变能够引起衍射波长的显著变化^[4, 5]。这为实现“裸眼检测”提供了可能, 所以近年来光子晶体在分析化学, 尤其是化学传感器领域的应用受到了科研工作者的高度重视^[6, 7]。目前文献中所报道的光子晶体传感材料大致可分为两类: 一类用胶体晶体模板反向复制法制备具有三维有序大孔结构的光子晶体凝胶材料^[8~10]; 另一类在胶体晶体的间隙填充功能化凝胶^[11, 12]。两种方法均需要有高分子凝胶聚合的步骤, 而这一过程通常会破坏胶体晶体的规则排列结构, 而且也增加了制备的步骤和周期; 另外, 功能化凝胶通常对带有特定官能团的一类物质都有响应, 其选择性并不高。分子印迹技术是当前发展高选择性材料的主要方法之一, 分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymers, MIPs)对模板分子具有高度的选择识别性能^[13]。研究表明, 将分子印迹技术与光子晶体相结合, 可以提高光子晶体传感材料的选择性^[14~16]。

鉴于常规光子晶体传感材料突显的缺点, 本研究用单分散的分子印迹胶体微球自组装成分子印迹胶体阵列(Molecularly imprinted colloidal array, MICA), 然后通过用胶带将印迹胶体阵列粘下, 达到固定的效果。MICA 本身就具有光子晶体结构, 而且胶体阵列是由带印迹的胶体微球组成, 本身就能够识别模板分子, 所以不需要在阵列间隙再填充其它凝胶。印迹微球特异性吸附模板分子引起微球溶胀, 使密堆积的 MICA 发生溶胀, 进而使 MICA 的衍射光学信号发生变化, 达到了传感的目的。

MICA 既将分子印迹技术与光子晶体技术相结合, 提升光子晶体传感材料的选择性, 同时避免了材料微观规则结构的破坏, 更重要的是简化了制备光子晶体传感材料的步骤。

2 实验方法

2.1 仪器与试剂

2011-06-25 收稿; 2011-08-19 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20775007) 863 计划(No. 2007AA10Z433) 环境毒理国家重点实验室开放基金(No. KF2009-08) 资助

* E-mail: m_zihui@yahoo.com

IKA RW20 数字搅拌器、IKA C-MAG HS7 控温仪(IKA 公司);HWS-ISO 恒温恒湿箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);S-4800 扫描电镜(HITACHI);Avaspec-2048TEC 微型光纤光谱仪(Avantes),其中光源型号是 AvaLight-DH-S-BAL,光纤型号是 FC-UV600-2-SR;LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-20A 紫外检测器(岛津公司)。色谱条件: C_8 反相色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m, Agela 公司);流动相为甲醇-水(55:45, V/V),流速: 1 mL/min;柱温为室温,检测波长 260 nm。钻石牌盖玻片(24 mm×50 mm),胶带(宽12 mm,得力集团)。

对硝基苯酚,间硝基苯酚,苯酚,3-氨基苯酚(分析纯,国药集团);丙烯酰胺(AM,分析纯,天津市科密欧试剂开发中心);甲基丙烯酸甲酯(MMA,分析纯,天津博迪化工),过硫酸钾(KPS,分析纯,汕头市西陇化工厂);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);乙酸,浓 H_2SO_4 , 30% H_2O_2 (分析纯,北京化工厂);超纯水由 AWL-0502-U 艾科浦超纯水系统制备(艾科浦公司)。

2.2 p -NP 分子印迹胶体微球的制备

将模板 0.6956 g (5 mmol) p -NP 和单体 1.0662 g (15 mmol) AM 超声溶于 30 mL MMA 中,并与 255 mL 去离子水在烧瓶中混合,氮气保护下搅拌加热至 80 $^{\circ}C$,再加入 15 mL 0.04 g/mL 引发剂 KPS 溶液,恒温搅拌 45 min 后,反应液依次用甲醇-乙酸(8:2, V/V) 溶液,甲醇,去离子水反复离心、去除上层清液,重新超声分散洗剂 3 次,以除去模板分子 p -NP。制备非印迹胶体微球时,除不加模板分子,其它方法同上。

2.3 p -NP 分子印迹胶体微球的印迹效果评价

将合成的分子印迹胶体微球和非印迹胶体微球置于 60 $^{\circ}C$ 的真空干燥箱干燥。分别称取 2.5 mg 印迹微球,并加入 1 mL 0.5 g/L p -NP 溶液,分别吸附 5, 10, 20 和 40 min 后,离心,取上清液供 HPLC 检测。

分别称取 10 mg 印迹微球,并分别加入 1 mL 浓度分别为 1, 5, 10, 25 和 50 g/L 的 p -NP 甲醇-水(4:6, V/V) 溶液,振荡吸附 1 h,离心,取上清液供 HPLC 检测。

2.4 p -NP 分子印迹胶体阵列的制备及其传感性能评价

以盖玻片为基片,将盖玻片浸泡到浓 H_2SO_4 - H_2O_2 (7:3, V/V) 溶液中 12 h 后,用去离子水清洗干净后吹干。将基片垂直贴于玻璃槽内,加入质量浓度为 0.3% 分子印迹胶体微球溶液,于恒温恒湿(30 $^{\circ}C$ 、湿度 50%) 培养箱中控制溶液匀速挥发,小球通过表面张力自组装于基片上形成 MICA,用胶带将 MICA 从盖玻片上粘下。将 MICA 膜分别浸于浓度为 0、10、20 和 30 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0) 中,用微型光纤光谱仪检测 MICA 膜的反射光谱。

2.5 MICA 对实际水样的传感响应

分别以实验室自来水、百里峡景区泉水和玲珑公园湖水为实际水样,未检出 p -NP。将上述实际水样进行抽滤,以除去其中的悬浮颗粒,再加入适量 p -NP,分别配制成浓度为 20 mmol/L p -NP 溶液。将 MICA 膜浸于上述实际水样中,用微型光纤光谱仪检测 MICA 膜的反射光谱。

3 结果与讨论

3.1 p -NP 分子印迹胶体微球的制备

丙烯酰胺(AM)作为功能单体常用于识别硝基苯酚类化合物^[17]。在聚合之前,将模板 p -NP 和功能单体 AM 溶解在 MMA 中,超声使模板与单体之间的氢键充分形成。模板 p -NP 与功能单体 AM 之间形成的氢键复合体随着 MMA 聚合被包埋于微球之中。本研究所制备的分子印迹胶体微球单分散性好,球形度好,粒径均一约为 280 nm(图 1)。

3.2 p -NP 分子印迹胶体微球的印迹效果评价

3.2.1 吸附动力学 实验表明, p -NP 分子印迹胶体微球的吸附速度高于非印迹胶体微球,在 10 min 基本达到饱和。非印迹胶体微球也具有一定的吸附能力,可能的原因

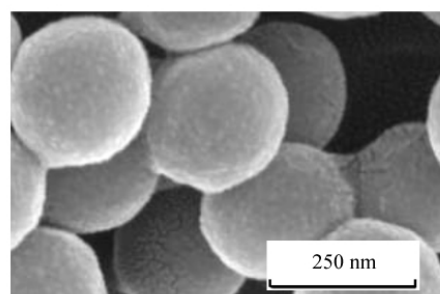


图 1 p -NP 分子印迹胶体微球的扫描电镜图
Fig. 1 SEM image of p -nitrophenol (p -NP) molecularly imprinted colloidal microspheres

是非印迹胶体微球表面的功能单体 AM 与 *p*-NP 的非特异性氢键作用所致;但是,与印迹胶体微球相比,非印迹胶体微球上并没有立体的特异性识别位点,所以吸附能力较弱(图 2)。

3.2.2 平衡吸附实验 图 3 为分子印迹胶体微球及非印迹胶体微球对不同浓度的 *p*-NP 溶液的吸附等温线。分子印迹胶体微球的吸附量随 *p*-NP 浓度的增加而增大;且分子印迹胶体微球对 *p*-NP 的吸附量明显高于非印迹胶体微球。这是因为分子印迹胶体微球在预聚合阶段模板分子与功能单体由于氢键作用,形成配合物。配合物对模板分子具有印迹效果,交联聚合后,形成稳定坚固的三维孔穴。在本研究的浓度范围内,非印迹微球对 *p*-NP 也有吸附,但随浓度变化不大;这可能是非印迹胶体微球的非特异性氢键作用所致,故在模板分子浓度较小时,非印迹胶体微球就已经达到吸附饱和。根据评价分子印迹聚合物结合特性的 Scatchard 模型,拟合得到分子印迹胶体微球结合位点的解离常数 $K_D = 90.1 \text{ mmol/L}$,最大表观结合量为 $Q_{\max} = 1.8 \text{ mmol/g}$ 。

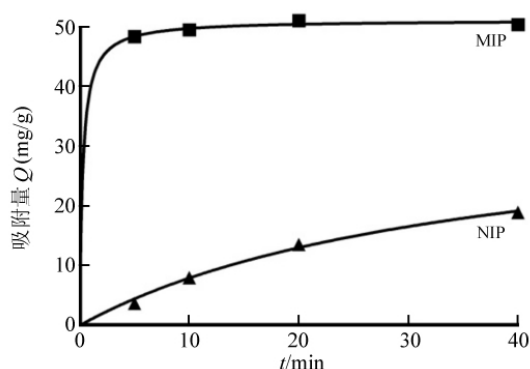


图 2 *p*-NP 分子印迹胶体微球与非印迹胶体微球的吸附动力学曲线

Fig. 2 Adsorption kinetics of *p*-nitrophenol on molecularly imprinted colloidal microspheres (MIP) and non-molecularly imprinted colloidal microspheres (NIP)

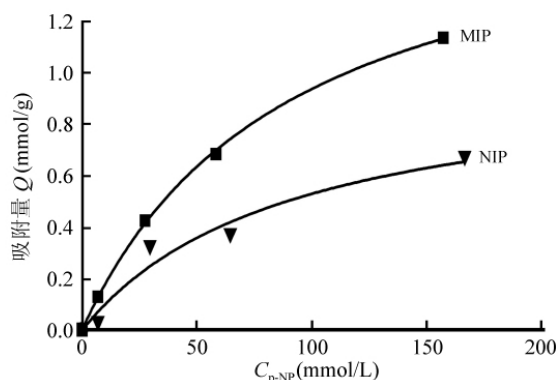


图 3 分子印迹胶体微球与非印迹胶体微球的吸附等温曲线

Fig. 3 Adsorption isotherms of *p*-nitrophenol on molecularly imprinted colloidal microspheres and non-molecularly imprinted colloidal microspheres

3.3 *p*-NP 分子印迹胶体阵列的制备及其传感性能评价

3.3.1 *p*-NP 分子印迹胶体阵列的制备 通过垂直沉降法将单分散的分子印迹胶体微球自组装为密堆积的胶体阵列。胶体阵列具有光子晶体结构,能够产生布拉格衍射,反射特定波长的光,如果反射光处于可见光波区,胶体阵列即可显示由于光子晶体结构引起的结构色。本研究所制备的分子印迹胶体微球尺寸约 280 nm,反射光位置处于 720 nm 左右,结构色为红色。通过垂直沉降法自组装得到分子印迹胶体阵列,电镜图显示印迹微球呈整齐的密堆积结构(图 4)。

处于基片上的 MICA 并不稳定,触碰或浸入液体中均会破坏胶体阵列的结构。采用普通的透明胶带将 MICA 从基片上粘下,得到阵列固定好的 MICA 膜。将 MICA 膜浸于水中,MICA 膜仍能显示出明显的结构色,在光纤光谱仪下仍能显示出良好的反射峰,说明胶条起到了很好的固定阵列的作用,同时处于胶体上的胶体阵列便于裁剪、检测等操作。

3.3.2 *p*-NP 分子印迹胶体阵列传感性能评价 MICA 是由单分散的 *p*-NP 分子印迹微球自组装而成的具有光子晶体结构的胶体微球阵列,遵循布拉格衍射定律,能够反射特定波长的光。对于密堆积的胶体阵列,有改进的布拉格衍射公式^[4]:

$$\lambda_{\max} = 1.633d(n^2 - \sin^2\theta)^{1/2} \quad (1)$$

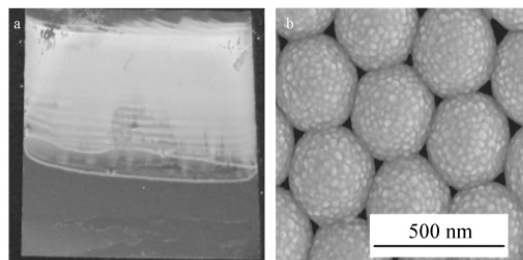


图 4 分子印迹胶体阵列的实物照片 (a) 和扫描电镜图 (b)

Fig. 4 Picture (a) and SEM image (b) of molecularly imprinted colloidal array (MICA)

式中 λ_{\max} 为反射峰波长, d 是胶体微球的直径, n 是光子晶体的平均折光指数, θ 是入射光与晶面的夹角。衍射条件表明 θ 一定时, λ_{\max} 正比于 d , 即胶体微球体积的改变可通过改变反射峰位置表现。由衍射方程可以推断, 如果分子识别过程能够引起分子印迹胶体微球的溶胀或收缩, 光学信号就可以被观察到。如果反射峰处于可见光波区, 胶体阵列结构的变化则可通过颜色的变化体现。

将固定于胶带上的 MICA 浸于一系列不同浓度的 p -NP 磷酸缓冲溶液中, 用光纤光谱仪检测其反射光谱。实验表明, 随着 p -NP 浓度增加, MICA 反射峰不断红移, 到达 30 mmol/L 后, 红移量约达 60 nm。为了验证 MICA 的选择性, 同时测试了非印迹胶体阵列 (Non-imprinted colloidal array, NICA) 膜对 p -NP 溶液的光谱响应。由于 NICA 的微球在聚合时, 没有 p -NP 充当模板, 所以微球表面和内部的有效识别位点没有 MICA 多, 对 p -NP 的吸附性能也就相应差一些。随着 p -NP 浓度增加, NICA 也发生红移, 但是红移量明显低于 MICA。当浓度为 30 mmol/L 时, NICA 反射光红移量为 42 nm。由于 p -NP 的磷酸盐缓冲溶液呈黄色, 掩盖了 MICA 膜的结构色变化, 将吸附平衡的 MICA 膜从不同浓度的 p -NP 溶液中取出, 吹干, 便可以明显看到 MICA 表面结构色由红色变为蓝紫色 (图 5)。

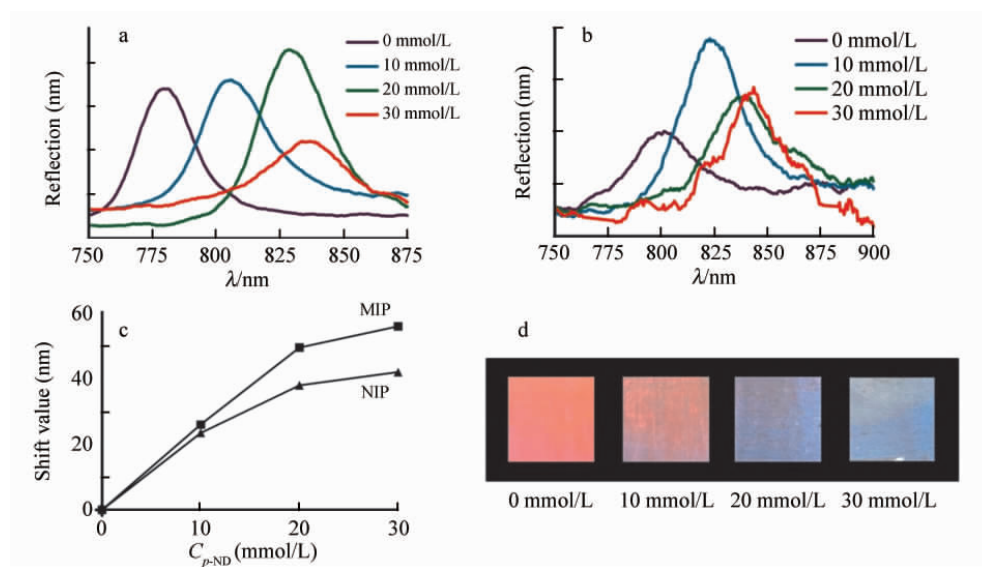


图 5 MICA (a) NICA (b) 膜对不同浓度 p -NP 磷酸缓冲溶液的光学传感性能; (c): MICA NICA 膜在不同浓度 p -NP 溶液中反射峰红移量比较; (d): MICA 膜吸附不同浓度 p -NP 溶液后的颜色变化
Fig. 5 Optical response of non-imprinted colloidal array (MICA) (a) and NICA (b) films in buffers with various concentrations of p -NP. (c) Plots of reflection shifts of MICA and NICA films vs. p -NP concentrations. (d) Color change induced by the adsorption of p -NP at different concentrations

选取与 p -NP 结构类似的间硝基苯酚 (m -NP) 对氨基苯酚、苯酚等作为参考物, 进行光学传感性能的测试, 以验证 MICA 膜的选择性。如图 6 所示, MICA 膜对对氨基苯酚和苯酚溶液的浓度响应较弱, 但是对 m -NP 的光学响应与 p -NP 相差不多。这是因为 m -NP 与 p -NP 的分子结构非常类似, 特异性识别 p -NP 分子的印迹胶体微球表面的印迹结合位点同样适应于 m -NP 分子。

3.4 MICA 对实际水样的传感响应

用实验室自来水、百里峡泉水和玲珑公园湖水为实际水样, 检验 MICA 对以实际水样为溶液配制的 p -NP 溶液的光学性质。结果表明, MICA 对实际水样响应明显, 在实验室自来水、百里峡泉水和玲珑公园湖水样品中, MICA 分别红移了 45.0, 40.5 和 45.0 nm。实际样品溶液的酸碱性和离子强度等性质有较大差异, 但 MICA 对 p -NP 的响应仍较明显, 说明 MICA 对检测环境的适应性较强。

4 结 论

MICA 具有光子晶体结构, 同具有贯通孔结构的光子晶体响应性凝胶类似, MICA 对外界刺激具有光学响应, 而且分子印迹胶体微球赋予了胶体阵列较好的选择性。采用胶带固定胶体阵列的方法简单

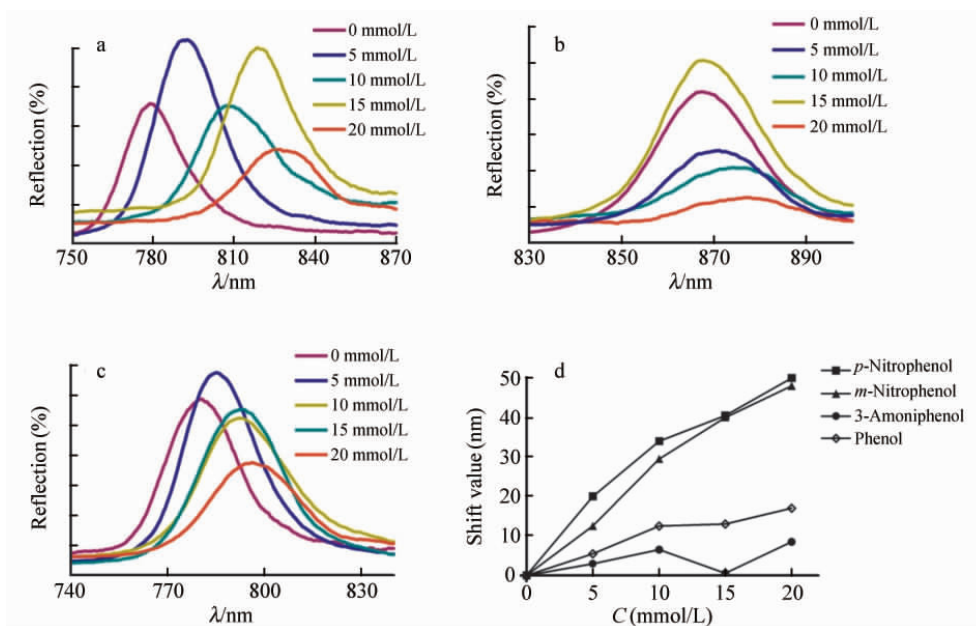


图 6 MICA 膜对结构类似物 *m*-NP (a) , 3-氨基苯酚 (b) , 苯酚 (c) 溶液的光学传感性能与对 *p*-NP 光学传感性能的比较; (d) MICA 膜吸附不同浓度结构类似物溶液后的反射峰红移量比较
Fig. 6 Optical response of MICA films in buffers with various concentrations of *m*-nitrophenol (a) , 3-aminophenol (b) , phenol (c) . (d) Plots of reflection shifts of MICA films vs. *p*-NP and its analogues concentrations

有效,节省了胶体阵列膜的制备周期,固定于胶带上的 MICA 便于存储和操作,为传感材料的小型化和便携化提供了可能。MICA 对 *p*-NP 的响应可以通过表面结构色变化的方式呈现,这为裸眼检测、直观检测提供了新方法。MICA 是光子晶体传感材料的优化和改进,为传感材料制备方法简便化及裸眼检测提供了新途径。

References

- 1 WANG Ruo-Yan, ZHOU Xiao-Ping, DU Sai, WU Hong-Miao. *Chinses Journal of Health Laboratory Technology*, **2010**, 20(6): 1362 ~ 1363
王若燕, 周晓萍, 杜赛, 吴红苗. *中国卫生检验杂志*, **2010**, 20(6): 1362 ~ 1363
- 2 XUAN Dong-Liang, LI Yuan-Qian. *China Public Health*, **2002**, 18(9): 1102 ~ 1104
宣栋梁, 黎源倩. *中国公共卫生*, **2002**, 18(9): 1102 ~ 1104
- 3 JIANG Han-Shuo, ZHANG Shu-Qin, ZHANG Wen-Rong, ZHENG Zhao-Xia. *Industrial Health and Occupational Diseases*, **1992**, 18(1): 48 ~ 50
姜汉硕, 张淑琴, 张文荣, 郑照霞. *工业卫生与职业病*, **1992**, 18(1): 48 ~ 50
- 4 Park S H, Xia Y N. *Langmuir*, **1998**, 15(1): 266 ~ 273
- 5 Holtz J H, Asher S A. *Nature*, **1997**, 389(23): 829 ~ 832
- 6 DUAN Ting-Rui, LI Hai-Hua, MENG Zi-Hui, Liu Feng, DU Ming-Jun. *Chemistry*, **2009**, (4): 298 ~ 306
段廷蕊, 李海华, 孟子晖, 刘烽, 都明君. *化学通报*, **2009**, (4): 298 ~ 306
- 7 CHEN Yi, LI Jin-Cheng. *Chinese Journal of Chromatography*, **2009**, 27(5): 573 ~ 583
陈义, 李晋成. *色谱*, **2009**, 27(5): 573 ~ 583
- 8 Hu X B, Li G T, Huang J, Zhang D, Qiu Y. *Advanced Materials*, **2007**, 19(24): 4327 ~ 4332
- 9 Honda M, Seki T, Takeoka Y. *Advanced Materials*, **2009**, 21(18): 1801 ~ 1804
- 10 Hong W, Hu X B, Zhao B Y, Zhang F, Zhang D. *Advanced Materials*, **2010**, 22(44): 5043 ~ 5047
- 11 Muscatello M M W, Asher S A. *Advanced Functional Materials*, **2008**, 18(8): 1186 ~ 1193
- 12 Liu Y, Zhang Y J, Guan Y. *Chem. Commun. (Camb)*, **2009**, (14): 1867 ~ 1869
- 13 Alexander C, Andersson H S, Andersson L I, Ansell R J, Kirsch N, Nicholls I A, O'Mahony J, Whitcombe M J. *Journal*

