

用于快速检测沙丁胺醇的分子印迹传感器的制备及其在食品检测中的应用

杜平

(滨州学院化学工程系, 山东滨州 256600)

摘要: 首先通过电沉积纳米金, 电聚合聚硫堇对玻碳电极表面进行了修饰, 之后利用沙丁胺醇为模板分子, 通过电聚合 α -甲基丙烯酸, 制备了一种选择性具有特异识别功能的纳米金/聚硫堇/沙丁胺醇分子印迹电化学传感器。实验采用循环伏安法和差分脉冲法, 对不同的修饰电极进行了表征, 优化电极的制备和测定条件, 研究了印迹传感器对模板分子的选择性响应。结果表明: 最佳制备条件下, 模板分子:功能单体=1:4, 聚合 15 圈, 以 0.5 mmol/L 硫酸: 乙腈 (1:9, V/V) 洗脱 10 min, 在 pH=7.0 的 PBS 溶液中进行 DPV 检测, 线性范围为 $2.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L, 检测限为 6.0×10^{-8} mol/L, $S/N=3$ 。该传感器灵敏度高, 抗干扰能力强, 重现和稳定性好。利用制备的分子印迹电化学传感器对食品中的沙丁胺醇进行了测定, 回收率在 86.5%~111.9% ($n=3$), 结果令人满意。

关键词: 沙丁胺醇; 纳米金; 壳聚糖; 分子印迹技术; 电化学传感器

文章篇号: 1673-9078(2017)2-250-255

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.038

Preparation of Molecular Imprinting Electro-biosensor for the Rapid Detection of Salbutamol and Its Application in Food

DU Ping

(Department of Chemical Engineering of Binzhou University, Binzhou 256600, China)

Abstract: A glass electrode was initially modified by electrodeposition of nanogold and polymerization of polythionine. Then, using salbutamol as a molecular template, a nano-Au/polythionine/salbutamol molecular imprinting electro-biosensor, with specific recognition capability, was prepared by electropolymerization of α -methacrylic acid (MAA) on the surface. Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were employed to characterize the different modified electrodes; preparation of the modified electrodes and the detection conditions were optimized, and the selectivity responses of the biosensor towards the template molecule were investigated. The results showed that under the optimum condition, the ratio of molecular template to functional monomer was 1:4; 15 polymerization cycles were carried out, and 0.5 mmol/L sulfuric acid and acetonitrile=1:9 (V/V) was used to elute for 10 min. The DPV measurement was conducted at pH 7.0 in phosphate-buffered saline (PBS) solution, the linear range was $2.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L, and the detection limit was 6.0×10^{-8} mol/L ($S/N=3$). The sensor has good sensitivity, strong anti-interference ability, and good reproducibility and stability. The prepared biosensor was applied in the detection of salbutamol in food with a recovery of 86.5%~111.9% ($n=3$), and the results were satisfactory.

Key words: salbutamol; nanogold; chitosan; molecular imprinting technology; electro-biosensor

沙丁胺醇 (Salbutamol, SAL) 一种 β 类动物生长促效剂, 化学名为: 1-(4-羟基-3-羟甲基苯基)-2-(叔丁氨基)乙醇。SAL 能够促进动物骨骼肌生长, 加快动物生长速率, 减少脂肪蓄积, 常被添加到畜禽饲料中(又名瘦肉精)^[1]。动物体内残留的 SAL 通过食物链进入人

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 山东省高校科技发展计划项目 (2012GGX10206); 滨州学院重大项目博士基金项目 (2009Y02, 2014Y08, BZXYG1515); 滨州市科技发展计划项目政策引导类 (2013ZC1603)

作者简介: 杜平 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 电化学生物传感器

体在体内富集, 会产生心悸、头痛、肌肉疼痛颤抖和发烧等副作用^[2-4]。中国和欧盟许多国家都明令禁止使用 SAL^[5]。因而, 建立一种灵敏和快速的 SAL 检测方法非常重要。

目前, 食品中 β -激动剂的检测方法主要有液相色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法以及酶联免疫法^[1], 这些方法都具有前处理复杂, 价格昂贵以及携带不方便等缺点^[1]。分子印迹材料 (Molecular imprinting materials, MIPs) 具有较强的特异性分子识别能力, 抗干扰力和亲和力强, 还有耐温、耐压、耐腐蚀和寿命长等优点, 引起了研究者的高度兴趣^[6]。

分子印迹技术能够高效地从复杂样品中分离富集目标分子,清除基体干扰,从而降低检出限,提高分析的精度和准确性,在传感器研究中备受关注^[7,8]。

纳米金具有大的比表面积,良好的光学和生物相容性而被广泛的应用于电化学传感器,其良好的导电性,能有效的提高电子的传输^[9]。硫堇属于噻吩嗪类物质,其单体在导电基质中具有良好的电化学行为,其导电聚合物膜聚硫堇是一种高性能的电子交换聚合物,在电极表面不仅有强大的附着力,而且电子转移能力很强,稳定性好,已被用来构建修饰电极的功能基质膜^[10]。本研究以甲基丙烯酸为单体,沙丁胺醇为模板,通过两步电聚合方法制备了纳米金/聚硫堇复合膜/沙丁胺醇分子印迹电化学传感器,与文献^[11-13]中其他传感器分子印迹方法相比,本体系两步电聚合不仅克服了传统聚合存在的方法复杂,膜厚度大和涂布不均匀的缺点,此外纳米金和硫堇在电极表面的电聚合大大增强了电荷在电极上传递速度,缩短了电极响应时间,增强了电极的可逆性,使得电极的灵敏度和稳定性大大增强。同时通过差分脉冲伏安法研究了该传感器对沙丁胺醇及其结构类似物的识别性能,建立了一种快速检测沙丁胺醇的分析方法,结果表明,该传感器响应快速、灵敏度高、识别性能好,为快速检测食品中的沙丁胺醇提供了更宽的线性范围和更低的检测限,并成功应用于实际样品中沙丁胺醇的检测,为保证食品安全和健康具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂材料

LK98B II型微型电化学分析系统(天津市兰力科化学电子高技术有限公司)。三电极系统:工作电极为玻碳电极(直径3 mm),对电极为铂丝电极,参比电极为Ag/AgCl电极。沙丁胺醇(纯度99%,Sigma); HAuCl₄(Sigma); 双氯醇胺(99%,深圳华英生物技术有限公司); 吡丁醇(99%,深圳华英生物技术有限公司)。

1.2 玻碳电极的预处理

将玻碳电极一次用0.5 μm、0.3 μm和0.05 μm的Al₂O₃粉末在麂皮上进行抛光,清洗后在无水乙醇和超纯水中分别超声洗涤。之后将电极放入0.5 mol/L的H₂SO₄溶液中进行循环伏安扫描,取出电极冲洗后,在放于K₃[Fe(CN)₆]溶液中循环扫描,得到峰电位差约为65 mV的可逆伏安峰。

1.3 分子印迹电化学传感器的制备

将预处理的玻碳电极(GCE)置于入5.0 mmol/L HAuCl₄溶液中,循环伏安法沉积纳米金,得到Au/GCE,扫描电位:1.5~0 V,扫描圈数20,扫速0.1 V/s。将清洗后的修饰电极放入含0.5 mmol/L的硫堇(THI)的ABS(pH=6.0)溶液中,再次进行循环伏安扫描,电位范围-0.4~0.1 V,扫速50 mV/s,圈数15圈,待CV图稳定后,取出电极晾干,得到Au/THI/GCE修饰电极。将上述修饰电极放入含1 mmol/L沙丁胺醇和4 mmol/L甲基丙烯酸的甲醇溶液中,然后再加入10 mmol/L的乙二醇二甲基丙烯酸酯和20 mg偶氮二异丁腈,通氮除氧5 min后,60 °C下进行循环伏安扫描12圈,电位范围为0~1.0V,扫速为50 mV/s,得到嵌有SAL的分子印迹修饰电极。将电极取出,用氮气吹干后,置于0.5 mmol/L硫酸:乙腈(1:9, V/V)溶液中浸泡10 min,除去聚合膜中的SAL,即得到Au/THI/SAL/GCE分子印迹传感器。非印迹传感器制备过程中没有加入模板分子SAL,其它制备步骤与分子印迹传感器相同。

1.4 实验方法

室温下,修饰电极浸在不同浓度的沙丁胺醇的PBS(pH=7.0)溶液中,3 min后进行差分脉冲伏安检测。扫描电位为-0.6~0.4 V,电位-0.6~0.4 V,电位增量0.004 V,脉冲宽度0.2 s,每次扫描后,将修饰电极置于空白底液中进行循环扫描至无峰后,用水淋洗晾干,可重复使用。实验条件的优化部分采用的数据均经平行实验(n=3)获得。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极的表征

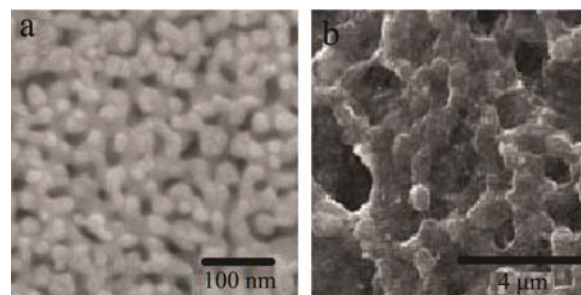


图1 扫描电镜图

Fig.1 SEM images of the modified electrodes

注: a, Au/GCE 修饰电极; b, 洗脱后的 Au/THI/SAL/GCE 修饰电极。

如图 1a 所示, 纳米金粒子经电化学聚合后有效的分布于电极的表面, 大大增加了电极的比表面积。图 1b 所示, 分子印迹膜均匀的分布在电极表面, 洗脱后, 分子印迹膜上产生了很多能特异性识别沙丁胺醇的立体空穴。

2.2 电极修饰过程的循环伏安测定

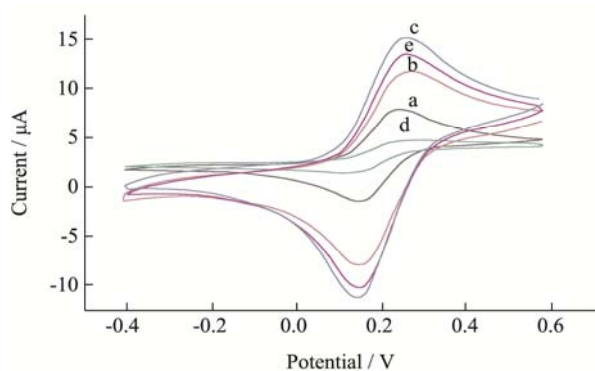


图 2 不同电极在含 5.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 0.2 mol/L KCl 水溶液中的循环伏安图

Fig.2 CV plots of different modified electrodes in 5.0 mol/L potassium ferricyanide and 0.2 mol/L potassium chloride solutions

注: a 表示 GCE; b 表示 Au/GCE; c 表示 Au/THI/GCE; d 表示洗脱的 Au/THI/SAL/GCE 印迹电极; e 表示洗脱后的 Au/THI/SAL/GCE 印迹电极。

通过循环伏安法对不同电极进行了表征, 由图 2 曲线 b 和 c 可以看出, 电极通电化学聚合分别修饰上纳米 Au 和聚 THI 后, 电流响应明显增大, 表明 Au 和 THI 的修饰, 使得电极的有效表面积和电子传输效率明显增强, 而聚合后的印迹膜电极洗脱时 (曲线 d), 其电极响应电流大幅度下降, 说明该印迹电极聚合膜导电性变差, 在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 KCl 溶液中, 离子在修饰电极表面的电子传递收到较大阻碍。采用硫酸和乙腈洗脱后的印迹电极 (曲线 e) 在, 再次出现了明显的氧化还原峰, 且电流相应明显高于曲线 a 和 d, 而低于曲线 c, 说明 SAL 的成功洗脱, 使得电极表面出现了具有识别功能的孔穴, 使得电子在电极表面的传递速率增加, 同时甲基丙烯酸聚合物膜的覆盖, 又导致其电流相应比 Au/THI/GCE 电极要小。

2.3 电极修饰材料的优化

印迹单体一般含有活性功能基团, 能够跟模板分子在不同介质中通过静电或氢键等非共价键的作用结合, 同时又能通过控制电化学电位沉积在电极基体表面上^[4]。由于 SAL 的结构中含有氨基和羟基等官能团, 实验研究了 α -甲基丙烯酸、邻苯二酚、邻苯二胺

等物质进行电聚合实验。结果表明邻苯二酚形成的聚合物薄膜绝缘能力差, 邻苯二胺和 α -甲基丙烯酸均能够形成不导电膜, 但 α -甲基丙烯酸形成的膜绝缘性和致密性更好, 故实验选择 α -甲基丙烯酸作为最佳的印迹单体。

2.4 沉积纳米金尺寸的优化

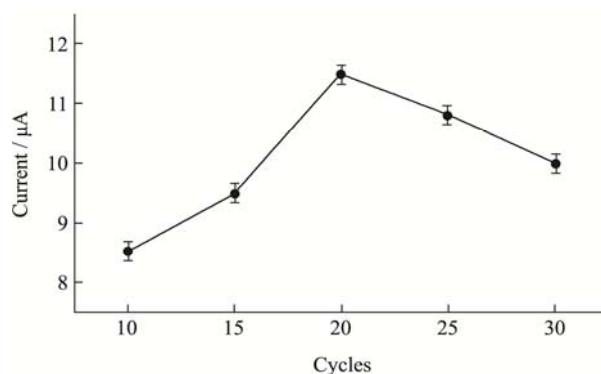


图 3 扫描圈数对电极电流信号的影响

Fig.3 Effect of cycles on the electrode current signals

纳米金在该分子印迹传感器构建中起到至关重要的作用, 研究考察了电沉积不同尺寸纳米金构建传感器的影响。改变扫描圈数, 发现圈数为扫描圈数为 20 圈时, 电极电流信号最大, 故选择扫描圈数为 20 圈。

2.5 模板分子和单体比例的优化

分子印迹膜制备过程中, 模板分子和功能单体的比例是重要影响因素。研究固定电聚合中模板分子 SAL 浓度为 1 mmol/L, 改变模板分子和单体的比例, 选择 MAA 的浓度分别为 2、4、6 和 8 mmol/L 进行电聚合。结果发现, 当 MAA 的浓度为 4 mmol/L 时, 形成的分子印迹膜均匀、致密, 且洗脱后电化学氧化还原电流最大, 因此选择 MAA 的聚合浓度为 4 mmol/L。

2.6 洗脱剂及洗脱时间和吸附时间的选择

分别考察了硫酸和乙腈、醋酸和乙醇、甲醇和醋酸洗脱剂的洗脱效果, 通过将修饰电极在上述溶液中浸泡一段时间后, 电极电流响应判断 SAL 的去除效果, 结果发现醋酸和乙醇、甲醇和醋酸浸泡后的电极在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 KCl 溶液中的峰电流值较小, 说明其在短时间内对 SAL 的洗脱效果不好; 而硫酸和乙腈, 峰电流较大, 适合 SAL 的洗脱, 故选择 0.5 mmol/L 硫酸: 乙腈 (1:9, V/V) 混合溶液作为最佳洗脱液。

洗脱和吸附时间是印迹电化学传感器的重要参数。实验对比了印迹电极和非印迹电极在相同洗脱条件和时间下在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 KCl 溶液中的 CV 电化学响应。由图 3a 所示, 非印迹电极在洗脱过程中无电流

响应, 而印迹电极随着时间的增加, 电流响应增大, 在 10 min 左右时, 达到最大, 之后基本不变, 说明 SAL 已洗脱溶出, 选择 10 min 为洗脱的最佳时间。同时, 实验对印迹电极在含 2.5×10^{-5} mol/L SAL 的 PBS 溶液中进行吸附。如图 3b 所示, 随着吸附时间的延长, DPV 电流逐渐减小, 3 min 后, 电流大小基本不再变化, 故将 3 min 作为最佳吸附时间。

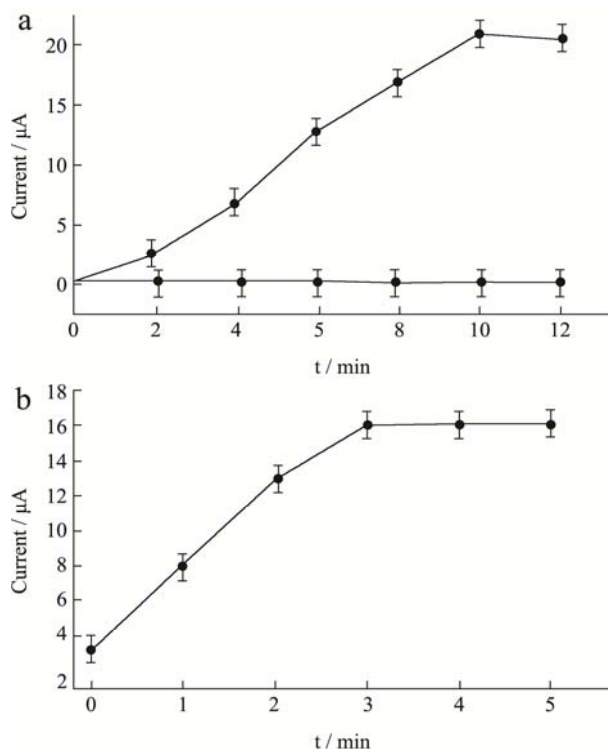


图4 不同洗脱时间 (a) 和吸附时间 (b) 下的电流响应

Fig.4 Current responses with different (a) elution times and (b) adsorption times

2.7 测定 pH 的影响

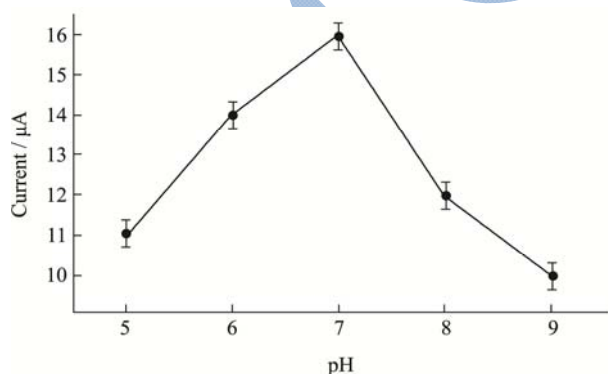


图5 pH 值对 SAL 测定响应电流的影响

Fig.5 Influence of pH on the current response during the detection of SAL

将修饰电极浸入不同 pH 含有 SAL 的 PBS 缓冲溶液中, 吸附 3 min 后, 考察 DPV 电流随 pH 变化。如图 5, pH=7.0 时, 峰电流值最大。pH 较低, SAL 易

发生质子化; pH 较高时, 电极表面吸附物质氧化还原电位增加, 导致电化学信号降低。故实验选择 7.0 为测定 pH 值。

2.8 检测线性范围与检出限

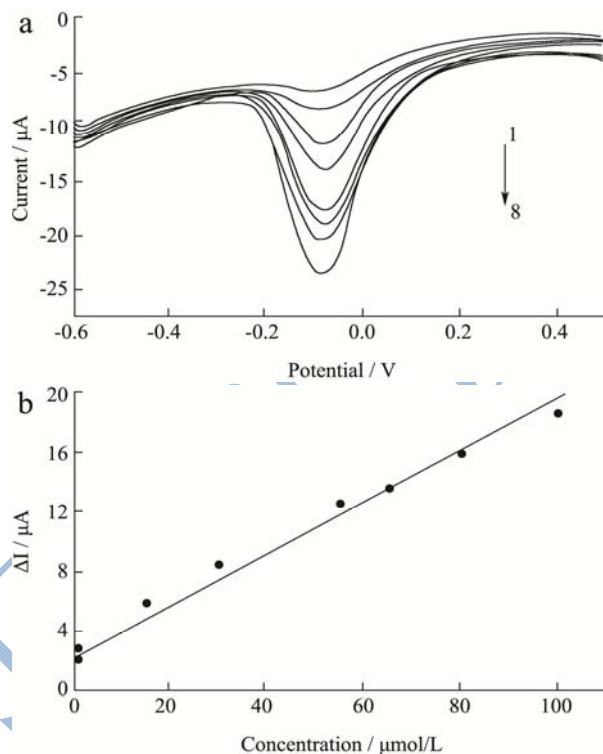


图6 印迹电极对 SAL 的测定

Fig.6 Detection of SAL with the MIPs electrode

注: a, DPV 测定曲线; b, 测定工作曲线浓度分别为: 0.2、1、15、30、55、65、80 和 100 $\mu mol/L$ 。

考察了峰电流随沙丁胺醇浓度变化的情况 (图 6) 结果显示, SAL 浓度增大, DPV 电流响应增大。SAL 浓度在 $2.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内与峰电流呈现良好的现象关系, 回归方程为 $I=1.2567x+3.5018$, 相关系数为 0.9536, 检测限为 6.0×10^{-8} mol/L, $S/N=3$ 。与已报道的 SAL 的检测方法相比, 检测限较低^[6,11-16]。

2.9 干扰实验

表1 印迹电极和非印迹电极在干扰物存在下对 SAL 的电流响应

| 吸附物浓度/ $\mu mol/L$ | 电流响应/ μA | |
|----------------------|---------------|-------|
| | 印迹电极 | 非印迹电极 |
| 沙丁胺醇 (5.0) | -11.8 | -0.7 |
| 沙丁胺醇 (5.0)+双氯醇胺 (15) | -11.3 | -0.4 |
| 沙丁胺醇 (5.0)+吡丁醇 (15) | -11.5 | -0.5 |

最佳条件下, 实验选取 SAL 结构类似物双氯醇胺和吡丁醇作为干扰物测定印迹电极的选择性。相同条

件下,将印迹电极在相同浓度的三种溶液中进行吸附后,浸入PBS溶液中进行DPV检测,所得SAL的响应电流如表1所示。在干扰物存在下,印迹电极对SAL响应电流的变化均较小,且印迹电极电流响应远大于非印迹电极,说明印迹电极对SAL测定具有特异性和选择性。

2.10 电极的稳定性和重现性

将制备的印迹电化学传感器连续洗脱、吸附进行DPV检测,10次后,所得的电流响应的相对标准偏差为4.8%。室温条件下7d后,电流响应达到原来的86%左右,说明该传感器具有良好的重现性和稳定性。

2.11 实际样品的检测

表2 沙丁胺醇的测定结果 (n=3)

Table 2 Detection of SAL (n=3)

| 样品 | SAL 添加量 (ng/mL) | SAL 测定平均量 (ng/mL, n=3) | 回收率 /% | RSD /% |
|----|--------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| 羊肉 | 100.0 | 98.6 | 98.6 | 3.6 |
| | 1000.0 | 1016.5 | 101.6 | 4.2 |
| | 5000.0 | 4486.4 | 89.7 | 3.2 |
| 鸡肉 | 100.0 | 93.2 | 93.2 | 2.6 |
| | 1000.0 | 1028.5 | 102.9 | 4.3 |
| | 5000.0 | 4854.3 | 97.1 | 3.8 |
| 猪肝 | 100.0 | 111.9 | 111.9 | 2.5 |
| | 1000.0 | 865.4 | 86.5 | 3.2 |
| | 5000.0 | 4821.6 | 96.4 | 4.0 |
| 猪肉 | 100.0 | 101.2 | 101.2 | 2.8 |
| | 1000.0 | 906.1 | 90.6 | 3.4 |
| | 5000.0 | 4795.0 | 96.0 | 4.2 |

称取(1+0.0050 g)实际样品(羊肉、鸡肉、猪肝和猪肉)于10 mL样品管中,加入不同量的SAL标准溶液和3 mL的乙腈-丙酮提取液(V/V=4:1),多次超声离心处理后,将上层溶液转移至氮吹管中,浓缩蒸发,之后转移至1.0 mL、pH=7.0的PBS缓冲溶液中进行DPV检测,表2所示。羊肉、鸡肉、猪肝和猪肉的回收率分别为86.5%~111.9% (n=3),标准偏差为2.5%~4.3%。结果表明,该传感器可用于实际样品中SAL的检测。

3 结论

本文以沙丁胺醇为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,利用纳米金和硫堇,通过电化学聚合法对电极进行修饰,制备了纳米金/聚硫堇/沙丁胺醇分子印迹电化学传感器。通过差分脉冲法优化了实验及制备条

件。该传感器对沙丁胺醇的检测线性范围为 $2.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L,检测限为 6.0×10^{-8} mol/L, S/N=3。该传感器具有良好的灵敏度和选择性,并成功进行了实际样品的检测,测定回收率在86.5%~111.9% (n=3)。

参考文献

- [1] 吴珺,张洁,邵科峰,等.一种检测沙丁胺醇的高灵敏度复合纳米免疫电化学传感器的研制[J].食品科学,2014,35(12): 243-248
WU Jun, ZHANG Jie, SHAO Ke-feng, et al. An Immunosensor for detection of salbutamol based on composite nanomaterial modified electrode [J]. Food Technology, 2014, 35(12): 243-248
- [2] Vanoosthuyze K E I, Artsc J M, Peteghem C H V. Development of a fast and simple method for determination of β -agonists in urine by extraction on empor membranes and detection by a test strip immunoassay [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1997, 45(8): 3129-3137
- [3] Shelver W L, Helver W L, Smith D J. Determination of ractopamine in cattle and sheeo urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(13): 3721-3751
- [4] Brambilla G, Cenci T, Franconi F, et al. A loizzo clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy [J]. Toxicology Letters, 2000, 114(3): 47-53
- [5] Hu L, Zuo P, Ye B. Multicomponent mesofluidic system for the detection of veterinary drug residues based on competitive immunoassay [J]. Analytical Biochemistry, 2010, 405(1): 89-95
- [6] 高文惠,庞军,王姣姣,等.联苯胺三唑醇分子印迹电化学传感器的制备及识别性能研究[J].现代食品科技,2015, 31(1): 96-100
GAO Wen-hui, PANG-jun, WANG Jiao-jiao, et al. Preparation and recognition properties of a bitertanol electrochemical sensor based on molecular imprinting technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(1): 96-100
- [7] 高杨,王伟,刘英姿,等.盐酸金霉素分子印迹电化学传感器的研制[J].分析化学研究报告,2015,43(2):212-217
GAO Yang, WANG Wei, LIU Ying-zi, et al. Preparation of an electrochemical sensor for determination of chlortetracycline based on molecularly imprinted film [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(2): 212-217

- [8] Zhou H, Bi P, Wu X, et al. Improved polysaccharide production in submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the addition of coixinolide [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(3): 1497-1505
- [9] Zhang J J, Cheng F F, Zhang T T, et al. Design and implementation of electrochemical cytosensor for evaluation of cell surface carbohydrate and glycoprotein [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(9): 3547-3555
- [10] 白万乔,黄华宇,郭睿,等.石墨烯/聚硫堇膜修饰玻碳电极上沙丁胺醇的电化学行为研究[J].*分析测试学报*,2014,33(3): 264-269
BAI Wan-qiao, HUANG Hua-yu, GUO Rui, et al. Electrochemical behaviors of salbutamol on graphene/polythionine modified glassy carbon electrode [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2014, 33(3): 264-269
- [11] 刘平.纳米粒子/分子印迹聚合物电化学传感器的制备及其应用研究[D].武汉:湖北大学,2012
LIU Ping. Study on the preparation of nanoparticle/molecularly imprinted polymer electrochemical sensor and its application[D]. Wuhan: Hubei University, 2012
- [12] 朱楠楠.基于石墨烯修饰的分子印迹电化学传感器对沙丁胺醇的检测[D].大连:辽宁师范大学,2014
ZHU Nan-nan. Detection of albuterol by molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene modified [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2014
- [13] 齐玉冰,刘瑛,宋启军.碳纳米管修饰电极分子印迹传感器快速测定沙丁胺醇[J].*分析化学研究报告*,2011,39(7):1053-1057
QI Yu-bing, LIU Ying, SONG Qi-jun. A salbutamol sensor based on carbon nanotubes modified electrode and molecularly imprinted polymers [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39(7): 1053-1057
- [14] 蒋挺大.壳聚糖[M].北京:化学工业出版社,2001
JIANG Ting-da. Chitosan [M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2011
- [15] Wang H, Zhang Y, Li H, et al. A silver-palladium alloy nanoparticle-based electrochemical biosensor for simultaneous detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 14-19
- [16] Li S X, Zhang J, Deng W P. A highly sensitive amperometric immunosensor for clenbuterol detection in livestock urine [J]. *Electroanalysis*, 2013, 25(4): 867-873