

基于电化学技术的 II 型拟除虫菊酯分子印迹膜的研制

马良^{1,2,3}, 戴芳芳¹, 周瑶¹, 张宇昊^{1,2}, 焦必宁^{3,4}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716) (2. 西南大学国家食品科学与工程实验教学示范中心, 重庆 400715) (3. 农业部柑桔产品质量安全风险评价实验室(重庆), 重庆 400712) (4. 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆市 400712)

摘要: 拟除虫菊酯类农药残留造成的安全问题已受到越来越广泛的关注, 开发快速检测技术可为农副产品中拟除虫菊酯类农药残留的监控提供技术支持。本实验以邻氨基酚为功能单体, 以 II 型拟除虫菊酯农药结构类似物间苯氧基苯甲酸为模板分子, 采用循环伏安法电聚合技术在玻碳电极表面聚合形成可检测含间苯氧基苯甲酸结构的 II 型拟除虫菊酯农药的分子印迹膜, 用于 II 型拟除虫菊酯类农药的检测研究。5 min 可完成对农药的响应, 其响应电流变化值与一定浓度范围内的溴氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯、氯氟氰菊酯呈良好的线性关系, 相关系数 r 分别为 0.991、0.992、0.992、0.990, 精密度分别为 2.20%、2.80%、2.50%、2.12%, 检出限在 0.01 mg/kg~0.30 mg/kg 之间。对加标红桔、贡桔和椪柑样品进行检测, 准确性高。

关键词: II 型拟除虫菊酯农药; 分子印迹膜; 电化学; 柑橘

文章编号: 1673-9078(2016)2-121-129

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.019

Preparation of Molecularly Imprinted Membrane for Type II-pyrethroid Determination Based on Electrochemical Technique

MA Liang^{1,2,3}, DAI Fang-fang¹, ZHOU Yao¹, ZHANG Yu-hao^{1,2}, JIAO Bi-ning^{3,4}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China) (2. National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China) (3. Laboratory of Risk Assessment for Citrus Quality and Safety of Ministry of Agriculture (Chongqing), Chongqing 400712, China) (4. Chinese Agriculture Academy of Sciences Institute of Citrus, Chongqing 400712, China)

Abstract: Recently, increasing attention has been paid to the hazards of pyrethroid insecticide residues. Rapid detection techniques can provide technical support for monitoring the pyrethroid pesticide residues in agricultural products. Using *o*-aminophenol (OAP) as the functional monomer and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) (the structural analog of type II-pyrethroid insecticides) as the template molecule, the electropolymerized molecularly imprinted membrane (MIM) was prepared for the detection of type II-pyrethroid insecticides; MIM was synthesized on the surface of glassy carbon electrode (GCE) by the method of cyclic voltammetry in this study. The prepared MIM was applied in the detection of type II-pyrethroid insecticides and responses to the insecticides were completed within five minutes. The changes in the peak current value showed a good linear correlation with deltamethrin, fenvalerate, fenprothrin, and cyhalothrin within a certain concentration range; the corresponding correlation coefficients were 0.991, 0.992, 0.995, and 0.990, respectively; precisions were 2.20%, 2.80%, 2.50%, and 2.12%, respectively; and detection limits ranged from 0.01 mg/kg to 0.30 mg/kg. The system was used for measurements of spiked citrus samples such as tangerine, Gong orange, and Ponkan, and results showed high accuracy.

Key words: type II-pyrethroid pesticides; molecularly imprinted membrane; electrochemistry; citrus

拟除虫菊酯类农药是一种人工模拟天然除虫菊

收稿日期: 2015-02-13

基金项目: 国家现代农业(柑橘)产业技术体系建设专项(CARS-27); 重庆市应用开发(重点)项目(cstc2013yykfB0165); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2013B035; 2362014kx11)

作者简介: 马良(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全与检测

素合成的仿生杀虫剂, 其按结构可分为两类, 即不含 α -氰基的 I 型(以胺菊酯、联苯菊酯等为代表)拟除虫菊酯类农药和含有 α -氰基的 II 型(以甲氰菊酯、氟氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯等为代表)拟除虫菊酯类农药。II 型的药效和稳定性较好, 因此目前 II 型拟除虫菊酯类农药被广泛用于谷物、果蔬、茶叶等的病虫防

治。由于 II 型拟除虫菊酯类农药在喷洒时与果蔬、粮食直接接触,随着使用量的不断增加,其残留超标风险亦不断加大^[1]。最近研究表明,拟除虫菊酯类农药具有神经毒性、遗传毒性和生殖毒性和一定的蓄积毒性,长期接触即使是低剂量也会引发一些慢性疾病,部分品种甚至对人体有致癌、致畸、致突变作用^[2]。Kalsu^[3]研究表明含 α -氰基比不含 α -氰基的拟除虫菊酯类农药毒性大,有卤原子取代则毒性增加。由 II 型拟除虫菊酯类农药残留超标导致的食品安全问题已引起人们越来越多的关注,加大对其检测技术的研究力度,对正确指导该农药的合理开发、使用与监测、保障食品安全等具有重要意义。

目前 II 型拟除虫菊酯类农药的检测方法主要有色谱法、免疫分析法、生物传感器等。色谱法具有灵敏度高、准确度高、选择性好等优点,但难以快速检测柑橘蔬菜等含色素较多的样品,且色谱法所需仪器设备昂贵、需专业操作人员,不适用于基层检测机构和快速检测。免疫法具有灵敏、快速、准确、成本低等特点,是目前小分子污染物检测的主流速测技术,但目前研究只是对某一种或几种拟除虫菊酯类农药进行分析,且部分研究存在单克隆抗体和多克隆抗体对拟除虫菊酯类农药的特异性不高、抗体不易保存等问题。电化学传感器因具有设计简单、灵敏度高、价格低廉、携带方便、易于微型化和自动化等优点,在临床诊断、环境监测、食品分析等方面受到人们越来越多的关注,但该技术近年来用量增长迅猛的 II 型拟除虫菊酯类农药残留检测的研究应用还鲜见报道。分子印迹技术是指以某一特定的目标分子(模板分子、印迹分子或烙印分子)为模板,制备对该分子具有特异选择性聚合物的过程,具有预定性、特异识别性、稳定等特点。目前,在农药残留检测中应用分子印迹技术较多的是固相萃取和传感器,且主要集中在有机磷、氨基甲酸酯类农药的研究,对其他类农药的检测研究还相对较少。本实验将电化学传感器与分子印迹技术相结合,研制了针对具有间苯氧基苯甲酸结构的 II 型拟除虫菊酯类农药分子印迹膜,采用电化学检测体系,并将其运用于红桔、贡桔和椪柑样品中 II 型拟除虫菊酯类农药的快速检测提供了一种简便的产品开发思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

间苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)

德国 Sigma 化学试剂公司;邻氨基酚(o-aminophenol, OAP)阿拉丁试剂(上海)有限公司;铁氰化钾($\geq 99.5\%$)天津市大茂化学试剂厂;氯化钾($\geq 99.5\%$)、氢氧化钠 成都市科龙化工试剂厂;甲醇、二氯甲烷、乙腈 天津市四友精细化学品有限公司;高氯酸(70%~72%)天津政成化学制品有限公司;硫酸(95%~98%)重庆科试化学有限公司;溴氰菊酯、甲氰菊酯、氰戊菊酯、氯氟氰菊酯 天津农业部环境监测中心;残杀威、久效磷、乐果 红太阳集团; Al_2O_3 粉(粒径 1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm) 武汉高仕瑞联科技有限公司;所用试剂均为分析纯;实验用水为二次蒸馏水。

背景溶液: pH=6 的 5 mmol/L 铁氰化钾和 0.1 mol/L 氯化钾(1:1,V/V)混合溶液。

1.2 仪器与设备

CHI610E 电化学工作站、CHI104 型工作电极(直径为 3mm 的玻碳盘电极)、CHI150 型饱和甘汞参比电极、CHI115 型铂丝对电极(铂丝规格 37mm \times 0.5mm) 上海辰华仪器有限公司; Elix10 纯水仪 法国 MILLIPORE 公司; KQ-50 超声清洗机 昆山超声仪器有限公司; PHS-25 型号 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; CJ78-1 磁力搅拌器 上海将任实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 玻碳电极的预处理^[4]

将玻碳电极依次用粒径 1.0、0.3、0.05 μm 的 Al_2O_3 悬浊液在 Microcloth 抛光布上进行打磨、抛光,抛光后先用二次蒸馏水洗去表面污物,再在纯水中超声 2~3 min,重复 2~3 次,直至得到一个平滑光洁的电极表面。将处理干净的玻碳电极作为工作电极,置于 10 ml 背景液中扫描得到循环伏安图,其中扫描速度为 50 mV/s,扫描范围为 -0.1 V~+0.6 V,观察可逆峰电位差,若峰电位差大于 90 mV,应用蒸馏水冲净电极表面后,重复之前的步骤进行抛光,直至可逆峰电位差小于 90 mV。

1.3.2 分子印迹膜(molecularly imprinted membrane, MIM)的制备

称取 4×10^{-4} mol OAP 溶于 2 mL 0.5 mol/L 的高氯酸溶液中,用 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液调节其 pH 值至 6.0,加入 0.05 mol/L 3-PBA 乙腈溶液 2 mL,用乙腈定容至 10 mL 制得聚合液。将聚合液超声 5 min,氮吹除氧 10 min。将处理好的三电极体系(玻碳电极为工作电极,铂丝电极为辅助电极,饱和甘汞电极为

参比电极) 浸入电解池中, 于 $-0.2\text{ V}\sim+1.2\text{ V}$ 电位范围内, 以 50 mV/s 的扫描速度扫描 15 圈聚合得到嵌有 3-PBA 模板的不导电聚合膜。

将电聚合后的工作电极下端置于 0.5 mol/L 硫酸-乙腈 ($4/1, \text{ V/V}$) 混合溶液中磁力搅拌洗脱 12 h 以除去电聚合膜中的模板分子 (3-PBA), 得到具有 3-PBA 分子空穴的 MIM。非分子印迹膜的制备除在电聚合液中不加模板分子 3-PBA 外, 其余步骤与 MIM 的制备完全相同。

1.3.3 电化学检测方法

1.3.3.1 电极导电性测定

参照栾崇林等^[5]的方法: 用循环伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV) 法作导电性检测: 电位范围为 $-0.1\text{ V}\sim+0.6\text{ V}$, 扫描速度为 50 mV/s 。

1.3.3.2 电化学定量测定

用背景电流比 cv 法低、灵敏度比 cv 法高的差分脉冲伏安法 (differential pulse voltammetry, DPV) 作定量分析, DPV 的条件^[6]为: 电位范围 $-0.1\text{ V}\sim+0.6\text{ V}$, 电位增量为 0.004 V , 振幅为 0.05 V , 脉冲宽度为 0.05 s , 采样宽度为 0.0167 s 。

定量测量步骤参照 Liu^[6]的方法: 将 1.3.2 中制备的印迹电极浸入 $\text{pH}=6$ 的 5 mmol/L 铁氰化钾和 0.1 mol/L 氯化钾 ($1/1, \text{ V/V}$) 的背景液中, 测定溶液的还原峰电流 i_0 , 然后将其浸入含一定浓度拟除虫菊酯农药的待测溶液中, 富集 5 min 后取出, 二次蒸馏水冲洗, N_2 干燥, 再浸入背景液中, 测定其还原峰电流 i_k , 以 $\Delta i=(i_0-i_k)$ 作为电极对该浓度农药的响应值。

1.3.4 分子印迹聚合膜的再生

将测试后的印迹电极浸入 $25\text{ mL } 0.5\text{ mol/L}$ 硫酸-

乙腈混合液 ($4/1, \text{ V/V}$) 中磁力搅拌下洗脱 15 min 后, 用二次蒸馏水洗净, 室温干燥后即可用 1.3.3.2 法对 3-PBA 再次进行测定。

1.3.5 实际样品的前处理方法

从超市购买红桔、贡桔和椪柑, 用去离子水清洗 3 次以上, 分别在豆浆机中绞碎后制成试样。称取试样 10 g , 置于 50 mL 离心管中, 准确加入 25 mL 乙腈, 漩涡震荡混匀后以 5000 r/min 离心 10 min , 将上层清液转移至布氏漏斗中减压抽滤, 过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, 取滤液备用。

1.3.6 样品加标方法

取 1.3.5 处理后的柑橘类水果滤液, 向其中分别加入一定量的 II 型菊酯类农药 (选甲氰菊酯、溴氰菊酯、氯氟氰菊酯和氰戊菊酯四种作为代表) 标准溶液, 放入研制的传感器平衡 5 min , 在检测背景溶液用 DPV 法检测。再根据建立的菊酯类农药标准曲线, 确定柑橘中农药含量。

1.3.7 数据分析

每个数据做三组平行, 取三组数据的平均值用 origin 作图, 计算三组平行数据的标准差作为数据的误差线。

2 结果与分析

2.1 模板分子和功能单体的选择

常见的残留毒性大或对食品农产品安全风险高的几种拟除虫菊酯农药的分子结构见表 1。本实验拟研究可以识别一类具有共同结构的多种拟除虫菊酯农药的通用型分子印迹膜。

表 1 几种重要拟除虫菊酯结构

Table 1 Chemical structures of several important pyrethroids

拟除虫菊酯	结构	拟除虫菊酯	结构
甲氰菊酯		氯氟氰菊酯	
氰戊菊酯		溴氰菊酯	
氯氰菊酯		氟氰戊菊酯	

表 1 中多种重要 II 型拟除虫菊酯农药的化学结构都由醇部分、酸部分和酯键三部分组成。3-PBA (表 2) 是多种 II 型拟除虫菊酯农药的中间体, 具有与 II 型拟除虫菊酯类农药类似的酯键和酸部分, 溴氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯等都具有该结构; 间苯氧基苯甲氰醇和间苯氧基苯甲醛 (表 2) 作为 II 型拟除虫菊酯

农药的中间体与结构 3-PBA 相似, 但 3-PBA 含有羧基, 能够更好的与功能单体反应, 而间苯氧基苯甲氰醇和间苯氧基苯甲醛分别含羟基、醛基, 形成不了稳定的聚合物; 而且, 3-PBA 的价格低于间苯氧基苯甲氰醇及间苯氧基苯甲醛, 使用 3-PBA 做目标分子可降低检测成本。因此, 本试验选择 3-PBA 作为模板分子。

表 2 II 型拟除虫菊酯结构类似物结构

Table 2 Chemical structures of type II-pyrethroid analogs

结构类似物	结构
间苯氧基苯甲酸	
间苯氧基苯甲腈醇	
间苯氧基苯甲醛	

邻氨基酚 (OAP) 作为苯胺的衍生物, 具有氨基和酚羟基两种活性功能团, 邻氨基酚比苯胺能提供更多的修饰基团, 能与模板分子 3-PBA 通过氢键形成更多的结合位点, 且邻氨基酚在酸性、中性和碱性溶液中都能形成聚合膜^[7-8], 形成的聚邻氨基酚膜在酸性、中性和碱性溶液中都不溶解^[9], 可用于复杂化学环境中的目标物质检测, 因此本研究选择 OAP 作为功能单体。

因此采用 3-PBA 为模板分子, 邻氨基酚 (OAP) 为功能单体, 含氨基、羧基的 OAP 可以与模板分子 3-PBA 中的羧基、苯环形成氢键、 $\pi-\pi$ 键等作用力, 运用电聚合的方法直接于玻碳电极表面可以制备出嵌有 3-PBA 的聚邻氨基酚分子印迹膜, 用于多种 II 型拟除虫菊酯农药的检测。

2.2 分子印迹膜的电聚合过程

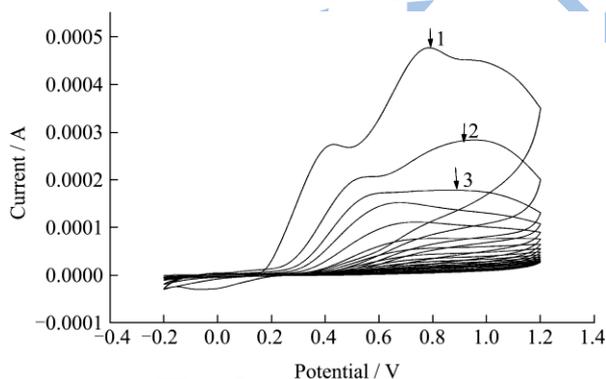


图 1 OAP 和 3-PBA 聚合过程的循环伏安图

Fig.1 Cyclic voltammograms of the polymerization processes of *o*-aminophenol and 3-phenoxybenzoic acid

图 1 为按 1.3.2 法制备 MIM 时的循环伏安图。膜的生成形貌与电解液阴离子、浓度及电位控制有关^[10]。从图 1 可以看出, 扫描从起始电位起正向进行, 第一圈有两个氧化峰和一个还原峰, 其中位于 0.4240 V 的氧化峰是 OAP 上羟基氧化形成的, 位于 0.7821 V 的氧化峰是 OAP 上氨基氧化形成。第二圈 0.5383 V

和 0.8866 V 处的氧化峰是 OAP 单体聚合生成二聚物形成的; 第三圈时, 氧化峰逐渐消失, 扫描十二次后氧化还原峰基本消失, 氧化电流逐渐降低, 分析原因可能为玻碳电极表面的 OAP 分子上的羟基或氨基发生氧化后与未发生氧化的 OAP 分子的 -OH、-NH₂ 位点通过氢键结合生成二聚物, 二聚物的氧化使得聚合进一步进行, II 型拟除虫菊酯农药类似物 3-PBA 在聚合过程中由氢键、 $\pi-\pi$ 键等作用随之嵌入 OAP 聚合膜的骨架中, 形成了嵌有模板分子的导电性弱的致密的分子印迹膜^[11]。

2.3 电极的电化学性质

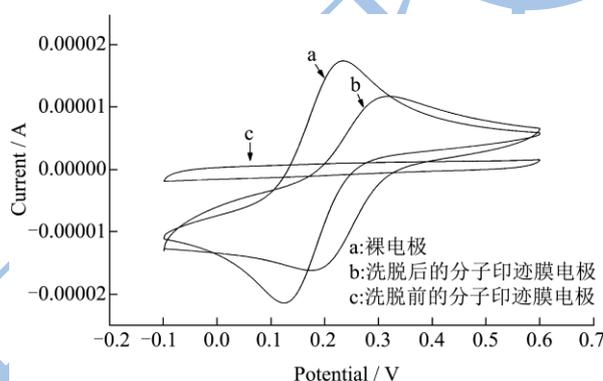


图 2 铁氰化钾溶液中电极的循环伏安图

Fig.2 CV curves of the electrodes in K₃[Fe(CN)₆] solution

将裸玻碳电极 (a)、未洗脱的印迹电极 (c) 和洗脱后的印迹电极 (b) 置于 10 mL 背景液中按 1.3.3.1 法进行 CV 扫描, 验证 MIM 聚合过程电极表面变化过程。结果如图 2 所示。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 在裸玻碳电极 (a)、洗脱后的印迹电极 (b) 上, 均有一对明显的氧化还原峰, 但分子印迹电极上得到的峰电流略小于裸电极, 这是因为聚合膜致密的表面结构阻碍 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 向电极表面扩散, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 只能通过印迹空穴扩散到电极表面进行氧化还原反应。而在聚合后的印迹电极 (c) 上无氧化还原峰出现, 是因为裸玻碳电极 (a) 表面形成的 MIM 阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 在底液和电极表面之间的电子传递, 以致峰电流从 a 急剧降低至 c。即聚合了未洗脱 3-PBA 的 MIM 电极由于膜阻碍 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 的传递导电性弱, 洗脱 3-PBA 后, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 可从印迹空穴传递, 电极导电性恢复, 这与用扫描电镜观察到的结果一致: 在扫描电镜中可观察到 MIM 洗脱前为致密的膜, 而洗脱后膜上出现许多空穴。

2.4 影响印迹膜性能的参数

2.4.1 聚合液 pH

聚合液 pH 是聚合膜形成过程的重要影响因素, 邻氨基酚在酸性溶液中能得到活性均匀的膜^[12]。实验

研究了 pH 分别为 3.5、4.5、5.5、6.0、6.5、7.5 的聚合液中所制得的 MIM 洗脱前后对铁氰化钾的电流响应变化(图 3), pH 3.5~6.0 时, 分子印迹膜的峰电流变化 (Δi) 随着缓冲液 pH 的增大而增大, 当 pH 大于 6.0 时分子印迹膜的峰电流变化 (Δi) 呈下降趋势, 说明聚合液 pH 对聚合膜的峰电流值变化 (Δi) 有较大影响。当 pH=6.0 时, 洗脱前后的峰电流值变化 (Δi) 最大, 即印迹的 3-PBA 量最大, 因此 pH=6.0 条件下进行印迹, 可获得最多的印迹位点。

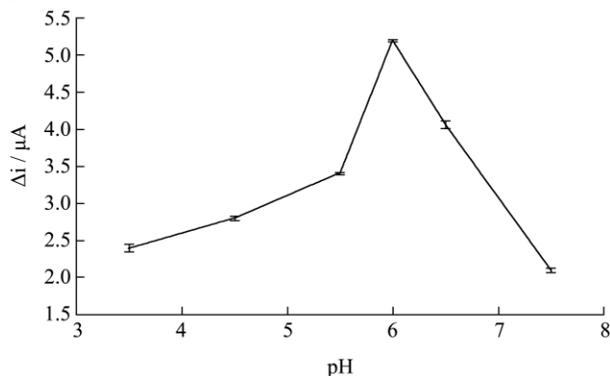


图 3 聚合液 pH 对分子印迹膜峰电流值变化 (Δi) 的影响

Fig.3 Effect of the pH of polymerization solution on Δi of MIM

2.4.2 模板分子和功能单体比例

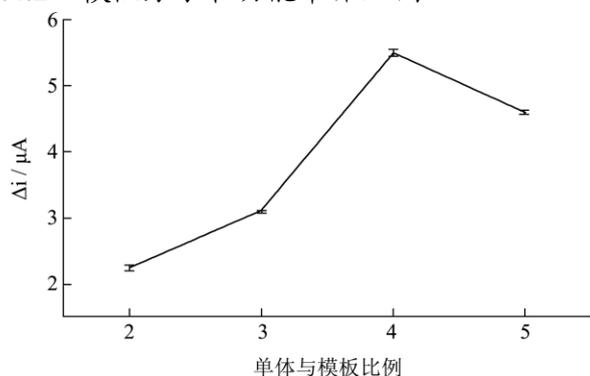


图 4 单体与模板比例对分子印迹膜峰电流值变化 (Δi) 的影响

Fig.4 Effect of the ratio of monomer/template on Δi of MIM

OAP 单体与 3-PBA 模板分子的比例与分子印迹过程中识别孔穴的产生关系密切, 比例增大可使印迹分子进行充分预组装, 但功能单体过量会使非选择性结合位点增多, 且功能单体浓度过大会因自身的聚合而减少选择性结合位点数, 因此适当比例的单体和模板分子对分子印迹膜的特异性、选择性具有至关重要的影响^[13]。实验研究了 OAP 单体与 3-PBA 模板的投入量比例分别为 2:1、3:1、4:1、5:1 时(保持 3-PBA 的浓度为 10 mmol/L 不变)所制得的 MIM 洗脱前后对铁氰化钾的电流响应变化 (Δi) (图 4), 继而判断分子印迹聚合膜的性能变化。由图可知, 功能单体与模板分子比值偏低时, 峰电流值变化 (Δi) 偏小,

这时会由于过多的模板分子存在阻碍单体间的聚合, 得到的印迹位点少, 不易形成聚合膜; 而当功能单体与模板分子比值偏高时, 峰电流值变化 (Δi) 减小, 这是由于单体之间的直接聚合以及印迹分子位点包埋导致洗脱后的印迹空穴数量少, 不利于 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 与电极表面之间的电子传递。当功能单体与模板分子比例为 4:1 时, 制得的 MIM 洗脱后的峰电流值变化 (Δi) 最大, 制得的膜均匀、稳定且具有较好选择性, 所以选定功能单体/模板分子比例 4:1 作为最优比例。

2.4.3 电聚合扫描圈数的影响

电聚合扫描圈数会影响印迹膜的厚度, 从而影响电极表面识别位点的数量和聚合膜的导电性能, 并最终影响分子印迹膜的印迹性能。圈数过少聚合膜上印迹的模板分子数量较少, 能够被洗脱成为空穴的部分就较少。随着扫描圈数的增加, 分子印迹膜的厚度也会随之增加, MIP 的识别位点也会增多。但扫描圈数过多, 会导致电聚合膜过厚, 印迹空穴被包埋, 洗脱困难。本实验分别研究了电聚合扫描圈数分别取为 10、15、20、25 时所制得的印迹膜洗脱 12 h 后对铁氰化钾的电流响应与洗脱前的差值, 以推测电极表面识别位点的数量。从图 5 可知, 扫描 10 圈时, 聚合膜的峰电流变化 (Δi) 小, 说明电极表面可让 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 向电极表面扩散的印迹空穴数量少, 这可能是由于聚合时间过短, 聚合在膜上的 3-PBA 较少, 相应地洗脱后的空穴就较少或者是因为形成的膜较薄而不稳定。聚合 15 圈制得的膜洗出的模板分子空穴最多, 而 20 圈和 25 圈的电流变化值相比 15 圈下降, 可能是因为扫描圈数多, 膜较厚, 不易洗脱, 从而阻碍了铁氰化钾探针分子的传质过程, 因此选择扫描 15 圈作为聚合扫描圈数。

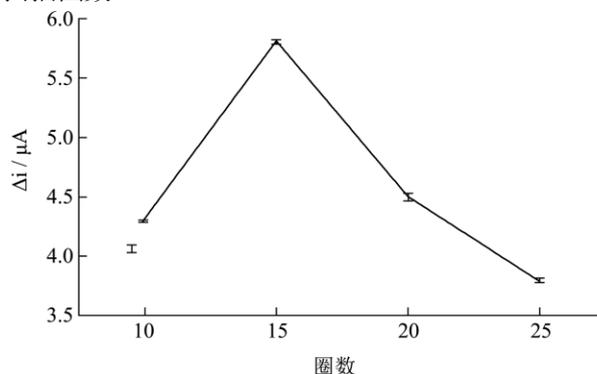


图 5 扫描圈数对分子印迹膜峰电流值变化 (Δi) 的影响

Fig.5 Effect of scanning cycles on Δi of MIM

2.4.4 洗脱溶剂、洗脱方式和洗脱时间

分别用甲醇、二氯甲烷、甲醇-二氯甲烷、乙腈、乙腈与 0.5 mol/L 硫酸混合溶液作为洗脱溶剂, 将印迹电极浸泡于磁力搅拌方式进行洗脱。将印迹电极于溶

剂中浸泡磁力洗脱 12 h 后,于背景溶液中扫描,通过铁氰化钾峰电流的高低比较模板去除效果,模板未洗脱时,铁氰化钾无法通过不导电聚合膜到达电极表面,因此电流几乎为零。将电极在甲醇(曲线 d)、二氯甲烷(曲线 e)、甲醇-二氯甲烷(曲线 f)、乙腈(曲线 h)中浸泡 12 h 后,模板的去除效果均很不理想,结果如图 6 所示。0.5 mol/L 硫酸与乙腈混合溶液(V:V, 4:1)作为洗脱溶剂时,洗脱效果最好,得到的电流响应信号最大。

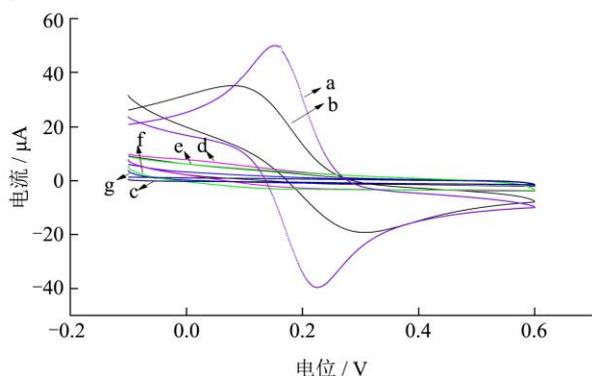


图 6 印迹电极于不同洗脱剂溶液中的洗脱效果

Fig.6 Eluting result of molecular imprinting electrode in different eluents

注: (a)裸电极, (b)于 0.5 M 硫酸/乙腈(V/V=4:1)中洗脱 12 h, (c)洗脱前, (d)于甲醇中 12 h, (e)于二氯甲烷中 12 h, (f)于甲醇-二氯甲烷中 12 h, (g)于乙腈中 12 h。

对洗脱液 0.5 mol/L 硫酸与乙腈混合溶液(体积比 4:1)的最佳洗脱方式进行了研究,实验选择溶剂浸泡洗脱、超声洗脱和磁力搅拌洗脱三种洗脱方式进行研究,结果表明溶剂浸泡洗脱耗时很长,浸泡洗脱 24 h 后电流信号仍较低,即洗出的模板分子少,得到的印迹空穴数量少;超声洗脱时间较短,整个洗脱过程只需 10~15 min,但超声洗脱容易破坏印迹膜的表面结构,造成膜的破坏,减少了膜的可重复利用次数及稳定性。而聚合膜在磁力搅拌洗脱 12 h 后 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 的还原峰电流值即保持恒定,其电流响应值接近裸电极的电流响应值。

2.5 分子印迹膜的电化学分析特性

2.5.1 响应时间

根据 GB 2763-2014 对柑橘中甲氰菊酯、溴氰菊酯、氟氰菊酯、氰戊菊酯的最大残留限量标准分别为 5 mg/kg、0.05 mg/kg、0.2 mg/kg、1 mg/kg,选取不高于最大残留限量标准的农药浓度进行分子印迹膜的电化学分析。将除去模板分子后的印迹电极分别放入浓度为 1.00 mg/kg 甲氰菊酯、0.05 mg/kg 溴氰菊酯、0.10 mg/kg 氟氰菊酯和 1.00 mg/kg 氰戊菊酯溶液中,

发现峰电流随时间的增加而急剧下降,即农药分子占据的结合位点增多,阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 传导,四种 II 型菊酯类农药在反应几分钟后电极信号达到稳定虽反应平衡时间略有不同,但都小于 5 min,说明该分子印迹膜对 II 型菊酯类农药有快速识别的能力。因此,四种农药的平衡时间选择为 5 min。之前文献报道的 GC-MS 法^[14]将提取液经 ENVI-Carb 固相萃取柱进行初步净化,在线 GPC 进一步净化除去大分子干扰物质后进行检测,检测时间 40 min,本实验方法只需将提取液过滤膜后进行电化学检测,不仅前处理步骤相对 GC-MS 简便,而且检测时间也缩短了 8 倍。

2.5.2 重复性和稳定性

用研究确定的优化条件制备的印迹膜电极分别对 1.00 mg/kg 甲氰菊酯、0.05 mg/kg 溴氰菊酯、0.10 mg/kg 氟氰菊酯和 1.00 mg/kg 氰戊菊酯平行测定五次以考察印迹电极的重现性,其相对标准偏差如表 3 所示。

表 3 同一印迹电极的重现性

Table 3 Reproducibility of the same imprinted electrode

待测溶液	浓度/(mg/kg)	RSD(n=5)/%
溴氰菊酯	0.05	2.20
甲氰菊酯	1.00	2.50
氟氰菊酯	0.10	2.12
氰戊菊酯	1.00	2.80

再用同一条件下制备的 5 只不同电极在 1.00 mg/kg 甲氰菊酯、0.05 mg/kg 溴氰菊酯、0.10 mg/kg 氟氰菊酯和 1.00 mg/kg 氰戊菊酯溶液中测试不同批次制备的电极之间的重复性,其响应电流变化的相对标准偏差如表 4 所示,均小于 3.8%,说明该技术制备的分子印迹膜电极的重现性良好。

表 4 同一条件下制备的不同印迹电极之间的重现性

Table 4 Reproducibility of different imprinted electrodes prepared under the same conditions

待测溶液	浓度/(mg/kg)	RSD(n=5)/%
溴氰菊酯	0.05	3.70
甲氰菊酯	1.00	3.60
氟氰菊酯	0.10	3.80
氰戊菊酯	1.00	3.10

此外,还研究了该分子印迹膜电极的再生性,此电极在连续使用 30 次后,最终响应性降到初始值的 81%。膜电极响应逐渐降低,至 42 次时完全失效。因此,研究制备的分子印迹膜可重复再生使用 30 次均保证回收率在 80% 以上。

2.5.3 选择性

本实验考察了三种有机磷农药(残杀威、乐果和

久效磷)和两种不包括 3-PBA 结构的菊酯类农药(胺菊酯和联苯菊酯)对分子印迹膜电极的干扰作用。选取农药的浓度分别为 1.00 mg/kg 甲氰菊酯、0.05 mg/kg 溴氰菊酯、0.10 mg/kg 氯氟氰菊酯和 1.00 mg/kg 氰戊菊酯。定义电流响应选择性系数为 K ($K = \Delta i_{\text{干扰物}} / \Delta i$), 其中 $\Delta i_{\text{干扰物}}$ 为印迹电极对干扰物质的响应值, Δi 为印迹电极分别对四种菊酯类农药的响应值。结果显示, 摩尔浓度为各农药 2 倍的残杀威、乐果、久效磷以及与各农药等摩尔浓度的胺菊酯、联苯菊酯测定的 K 值均小于 0.14。这说明不具备 3-PBA 结构的农药不影响具有 3-PBA 结构的 II 型菊酯类农药的检测, 该分子印迹膜具有良好的选择性。

表 5 分子印迹膜的选择性

Table 5 Selectivity of molecularly imprinted film

干扰组分	选择性系数 K	干扰组分	选择性系数 K
残杀威	0.12	胺菊酯	0.14
乐果	0.09	联苯菊酯	0.12
久效磷	0.11		

2.5.4 线性范围及检出限

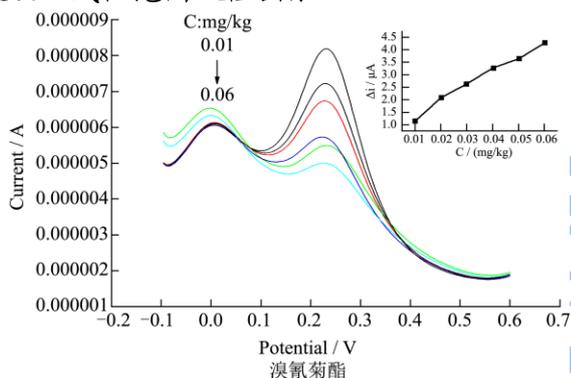


图 7 印迹电极对不同浓度溴氰菊酯的 DPV 响应
Fig.7 DPV response of MIP electrode to different concentrations of deltamethrin

将印迹后的工作电极浸入含一定浓度待测农药的标准溶液中, 按方法 1.3.3.2 研究了 MIM 的检测范围, 计算了方法检出限。由图 7 可以看出, 溴氰菊酯的浓度在 0.01~0.06 mg/kg 范围内与分子印迹膜的响应电流变化值 (Δi) 呈线性关系, 线性回归方程为 $y = 60.53x + 0.71$, 相关系数为 0.991, 方法的检出限 (3σ) 为 0.01 mg/kg; 从图 8 可以看出, 氰戊菊酯的浓度在 0.20~1.40 mg/kg 范围内与分子印迹膜的响应电流变化值 (Δi) 呈线性关系, 线性回归方程 $y = 2.84x + 0.20$, 相关系数为 0.992, 方法的检出限 (3σ) 为 0.10 mg/kg; 从图 9 可以看出, 甲氰菊酯的浓度在 0.50~5.50 mg/kg 范围内与分子印迹膜的响应电流变化值 (Δi) 呈线性关系, 线性回归方程 $y = 0.46x + 0.35$, 相关系数为 0.992, 方法的检出限 (3σ) 为 0.30 mg/kg; 图 9 可以看出,

氯氟氰菊酯的浓度在 0.09~0.24 mg/kg 范围内与分子印迹膜的响应电流变化值 (Δi) 呈线性关系, 线性回归方程 $y = 0.28x + 2.73$, 相关系数为 0.990, 方法的检出限 (3σ) 为 0.05 mg/kg (方法检出限根据公式 $x_L = \bar{x}_{bi} + kS_{bi}$ ($k=3$) 计算得出, 其中 x_L 是用该方法能检测出的 3-PBA 的最低检测浓度即检出限, x_{bi} 为测定时空白样品所得的背景电流还原峰值的平均值, S_{bi} 则为空白样品背景电流还原峰值的标准差); 综上可以发现, 以 3-PBA 为模板分子的分子印迹膜可特异性识别溴氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯、氯氟氰菊酯等含有 α -氰基的拟除虫菊酯类农药, 均具有较好的线性相关性, 能满足 II 型拟除虫菊酯类农药实际测定的需要。

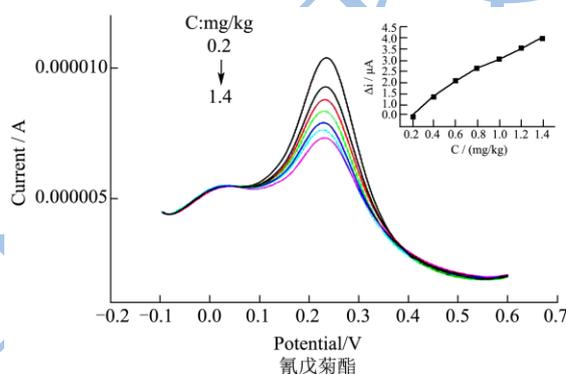


图 8 印迹电极对不同浓度氰戊菊酯的 DPV 响应
Fig.8 DPV response of MIP electrode to different concentrations of fenvalerate

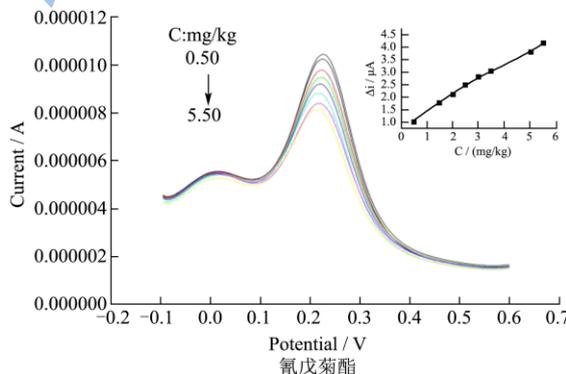


图 9 印迹电极对不同浓度甲氰菊酯的 DPV 响应
Fig.9 DPV response of MIP electrode to different concentrations of fenpropathrin

2.6 分子印迹膜的应用

在红桔、贡桔和椪柑的加标样品检测中, 分子印迹膜测定溴氰菊酯的回收率为 90.00%~110.00%, 氰戊菊酯的回收率为 91.00%~109.10%, 甲氰菊酯回收率为 93.40%~110.00%, 氯氟氰菊酯回收率为 86.67%~103.50%, 说明该方法制得的分子印迹膜对多种含 3-PBA 类似结构的 II 型拟除虫菊酯类农药均有良好的识别作用, 检测准确性高, 有望用于快速检测实际样

品中残留的II型拟除虫菊酯类农药。

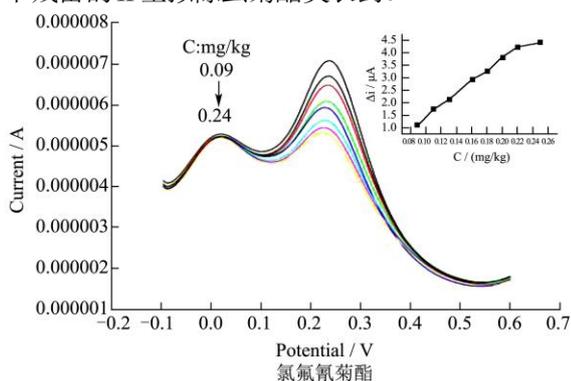


图 10 印迹电极对不同浓度氯氟氰菊酯的 DPV 响应

Fig.10 DPV response of MIP electrode to different concentrations of cyhalothrin

表 6 柑橘类水果中溴氰菊酯标样的回收率

Table 6 Recoveries of deltamethrin in spiked citrus fruit samples

样品	加标量/(mg/kg)	回收率/%
贡桔	0.01	110.00
	0.03	106.67
	0.05	106.00
红桔	0.01	90.00
	0.03	103.33
	0.05	98.00
椪柑	0.01	90.00
	0.03	106.67
	0.05	102.00

表 7 柑橘类水果中氰戊菊酯标样的回收率

Table 7 Recoveries of fenvalerate in spiked citrus fruit samples

样品	加标量/(mg/kg)	回收率/%
贡桔	0.20	91.50
	0.60	104.50
	1.00	109.10
红桔	0.20	92.00
	0.60	107.17
	1.00	108.00
椪柑	0.20	108.50
	0.60	98.00
	1.00	91.00

3 结论

本研究以II型拟除虫菊酯类农药结构类似物间苯氧基苯甲酸为模板分子，邻氨基酚为功能单体，用循环伏安法制备了可用于II型拟除虫菊酯农药检测的分子印迹膜。通过对该分子印迹膜的制备过程进行优化，发现当功能单体与模板分子比例为4:1，聚合

液pH为6.0，扫描圈数为15圈，在0.5 mol/L硫酸与乙腈的混合溶液中(V:V=4:1)磁力搅拌洗脱12 h能得到性能较好的分子印迹膜。印迹膜具有吸附目标分子的特异性孔穴，可对含有3-PBA结构的II型拟除虫菊酯农药进行特异识别和监测，对有机磷农药和不含3-PBA结构的拟除虫菊酯类农药具有抗干扰性。该MIM结合电化学检测应用于加标贡桔、红桔、椪柑样品的测定，回收率86.67%~110.00%，准确度较高且MIM可再生重复利用30次，单次再生与检测过程仅耗时20 min左右，可满足II型拟除虫菊酯农药快速检测的要求，但本研究方法的检出限有待进一步提高，以便检测出环境中II型拟除虫菊酯的痕量残留，后续可进一步修饰聚合材料，开发研究相应配套使用的基于分子印迹膜的便携式电化学分析仪。

表 8 柑橘类水果中甲氰菊酯标样的回收率

Table 8 Recoveries of fenpropathrin in spiked citrus fruit samples

样品	加标量/(mg/kg)	回收率/%
贡桔	2.00	107.55
	3.00	93.40
	4.00	105.75
红桔	2.00	110.00
	3.00	100.67
	4.00	99.25
椪柑	2.00	105.05
	3.00	107.47
	4.00	104.30

表 9 柑橘类水果中氯氟氰菊酯标样的回收率

Table 9 Recoveries of cyhalothrin in spiked citrus fruit samples

样品	加标量/(mg/kg)	回收率/%
贡桔	0.09	103.33
	0.14	92.86
	0.20	93.00
红桔	0.09	88.89
	0.14	95.00
	0.20	102.00
椪柑	0.09	86.67
	0.14	95.00
	0.20	103.50

参考文献

[1] Palmquist K, Salatas J, Fairbrother A. Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology [M]. Insecticides—Advances in Integrated Pest Management. INTECH Open

- Access Publisher, 2012
- [2] Saleem U, Ejaz S, Ashraf M, et al. Mutagenic and cytotoxic potential of endosulfan and lambda-cyhalothrin-*in vitro* study describing individual and combined effects of pesticides [J]. Journal of Environmental Sciences, 2014, 26(7): 1471-1479
- [3] Kalsui H. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish [J]. Environ Toxicology and Chemistry, 1989, 8: 381-385
- [4] Dong S J, Che G L, Xie Y W. Chemically modified electrodes [J]. Kexue Chubanshe, Beijing, 1995: 52-8
- [5] 栾崇林,李铭杰,李仲谨,等.胺菊酯分子印迹电化学传感器的制备及性能[J].理化检验-化学分册,2011,47:885-893
LUAN Chong-lin, LI Ming-jie, LI Zhong-jin, et al. Preparation and performance of molecularly imprinted electrochemical sensor of tetramethrin [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2011, 47: 885-893
- [6] Liu Y T, Deng J, Xiao X L, et al. Electrochemical sensor based on a poly (para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk [J]. Electrochimica Acta, 2011, 56(12): 4595-4602
- [7] Guerrieri A, Ciriello R, Centonze D. Permeable and enzyme-entrapping behaviours of an electropolymerized, non-conducting, poly (o-aminophenol) thin film-modified electrode: A critical study [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24(6): 1550-1556
- [8] Sharma P S, Pietrzyk-Le A, D'Souza F, et al. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 402(10): 3177-3204
- [9] 张爱强,陈衍珍,田昭武.邻氨基酚电聚合膜的研究[J].物理化学学报,1991,7(2):146-150
ZHANG Ai-qiang, CHEN Yan-zhen, Tian Shao-wu. Studies of electropolymerized poly-ortho-aminophenol film [J]. ACTA Physico-chimica Sinica, 1991, 7(2):146-150
- [10] 杨涛,焦奎,杨婕,等.聚邻氨基酚/Ni²⁺修饰碳糊电极的制备及其对葡萄糖的电催化氧化[J].分析化学研究简报,2006, 34(10):1415-1418
YANG Tao, JIAO Kui, YANG Jie, et al. Electrocatalytic oxidation of glucose by poly (o-aminophenol)/nickel modified carbon paste electrode [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry. 2006, 34(10): 1415-1418
- [11] Simões M, Martins N, Cabrita M J, et al. Tailor-made molecularly imprinted polymers for dimethoate and deltamethrin recognition: synthesis, characterization and chromatographic evaluation [J]. Journal of Polymer Research, 2014, 21(3): 1-13
- [12] 迟玉霞,王英龙,朱兆友.多巴胺在聚邻氨基酚/Ni²⁺修饰碳糊电极的伏安行为[J].计算机与应用化学,2009,26(5): 566-577
CHI Yu-xia, WANG Ying-long, ZHU Zhao-you. Voltammetric behavior of dopamine at poly (o-aminophenol) /nickel modified carbon paste electrode [J]. Computers and Applied Chemistry, 2009, 26(5): 566-577
- [13] Zhou J, He X, Li Y. Binding study on 5, 5-diphenylhydantoin imprinted polymer constructed by utilizing an amide functional group [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 394(2): 353-359
- [14] 薛丽,钟艳梅.固相萃取-在线凝胶渗透色谱-气相色谱质谱联用测定蔬菜干制品中的18种有机磷和拟除虫菊酯残留[J].现代食品科技,2012,28(8):1088-1090
XUE Li, ZHONG Yan-mei. Determination of 18 organic phosphorus and pyrethroid pesticides in dried vegetables using solid-phase extraction and on-line gel permeation chromatography-GC/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 1088-1090