

联苯三唑醇分子印迹电化学传感器的制备及识别性能研究

高文惠, 庞军, 王姣姣, 高林, 贾英民

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北省发酵工程技术研究中心, 河北石家庄 050000)

摘要:以联苯三唑醇为模板分子, 通过电聚合邻苯二胺, 在玻碳电极表面制备了对模板分子具有特异识别的分子印迹电化学传感器。实验选用铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]$)作为电活性探针, 采用循环伏安法(CV)和差分脉冲伏安法(DPV)研究了该传感器的电化学特性, 并且优化了制备条件, 研究了印迹传感器对模板分子及其结构类似物的选择性响应。结果表明: 在最佳聚合条件下, pH=7.2, 模板分子:功能单体=1:4(c/c), 聚合圈数 15 圈, 洗脱时间为 13 min, 洗脱剂: 0.5 mol/L 硫酸:乙腈=1:9 (V/V), 连续洗脱 10 次之后, 相对标准偏差为 5.2%, 且传感器性能无衰减现象。该分子印迹电化学传感器灵敏度高, 抗干扰能力强, 对联苯三唑醇及其结构类似物具有良好的选择性响应, 可以对结构类似物分别进行测定, 为快速检测食品中联苯三唑醇奠定了基础。

关键词: 联苯三唑醇; 电聚合; 分子印迹技术; 传感器

文章编号: 1673-9078(2015)1-96-100

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.018

Preparation and Recognition Properties of a Bitertanol Electrochemical Sensor Based on Molecular Imprinting Technology

GAO Wen-hui, PANG Jun, WANG Jiao-jiao, GAO Lin, JIA Ying-min

(College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Center for Fermentation Engineering of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: A sensitive, molecularly imprinted electrochemical sensor using bitertanol as the template molecule for the detection of bitertanol in foods was prepared by the electropolymerization of *o*-phenylenediamine on a glassy carbon electrode. The electrochemical properties of the molecularly imprinted sensor were studied by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) using $K_3[Fe(CN)_6]$ as the probe; the preparation conditions were optimized, and the selective responses of the molecularly imprinted sensor towards the template molecule and compounds with similar structures were investigated. The results showed that the optimal conditions to prepare the sensor were as follows: pH of 7.2; ratio of template molecule to functional monomer = 1:4; 15 polymerization circles; elution time of 13 min; 0.5 mol/L sulfuric acid : acetonitrile = 1:9 (V/V) as eluent. The relative standard deviation was 5.2% and the sensor performance was not attenuated after continuous elution of the electrode 10 times. The sensor had a high sensitivity, strong anti-interference ability, and good selective response towards bitertanol and compounds with similar structures. Using this sensor, compounds with similar structures could be determined separately, laying the foundation for the rapid detection of bitertanol in foods.

Key words: bitertanol; electropolymerization; molecular imprinting technology; sensor

联苯三唑醇 (Bitertanol) 是主链上含有羟基、取代苯基和 1, 2, 4-三唑基团的有机杂环类化合物 (结构式见图 1), 具有高效、广谱、持效期长、内吸性强等特点, 兼具保护、治疗、铲除和熏蒸作用。正是由

收稿日期: 2014-07-01

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013BAD10B03); 河北省科技支撑计划项目 (14227504D, 14236602D-13)

作者简介: 高文惠 (1963-), 女, 教授, 硕士生导师

通讯作者: 贾英民 (1961-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品生物技术与安全

于其良好的防病治病效果, 被广泛应用于小麦等粮食作物以及果蔬等农产品的种植过程中, 但是由于农药的滥用及不合理使用, 势必会造成食品中农药残留超标, 进而对人体及动物体内分泌系统带来极大的伤害, 因此建立一种快速、灵敏的检测方法显得尤为重要。

分子印迹 (Molecular imprinting) 是基于分子识别理论而迅速发展起来的前沿研究领域。制备的分子印迹聚合物具有亲和性高, 抗干扰能力强, 稳定, 使用寿命长等诸多优点^[1-2], 而电化学传感器具有设计简单、价格低廉、灵敏度高、易微型化等优点。近年来,

人们兼具二者的优势制备出具有各种特异识别性能的分
子印迹电化学传感器^[3-5]。因此,分子印迹电化学传
感器以其制备简单,操作方面,检测快速灵敏的优点
成为当今科学研究的热点。电聚合是比较常用的一种
制备方法,通过选择合适的电聚合功能单体进行电聚
合,在基体电极表面制备具有识别性能的分
子印迹聚合物薄膜。分子机构中带有活性基团的物质,如带有
氨基、羟基的物质可以在不同的介质中与模板分子通
过静电或氢键等非共价键的作用结合^[6],而且在相应
的电位下可以被电沉积至基体电极表面^[7]。基于上述
特性,人们发现了多种适合于电聚合的功能单体,
并成功的应用于分子印迹电化学传感器的制备,如邻
氨基酚^[8]、邻苯二胺^[9]、邻苯二酚^[10]等。

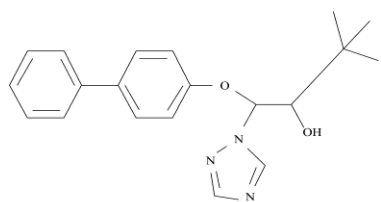


图1 联苯三唑醇的结构式

Fig.1 Structure of bitertanol

本实验首次以联苯三唑醇为模板分子,邻苯二胺
(OPD)为功能单体,采用电聚合的方法制备联苯三
唑醇分子印迹电化学传感器。选用铁氰化钾
($K_3[Fe(CN)_6]$)为电化学探针,结合差分脉冲伏安法
(DPV)研究了该传感器对模板分子及其结构类似物
的识别性能,结果表明,该传感器响应快速、灵敏度
高、识别性能良好,为快速检测食品中联苯三唑醇奠
定了良好的基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LK98B II型微机电化学分析系统(天津市兰力科
化学电子高技术有限公司)。三电极体系:直径为3 mm
的玻碳电极为工作电极,铂丝电极为辅助电极,
Ag/AgCl电极为参比电极。电极和抛光材料均购自上
海辰华仪器有限公司。

联苯三唑醇(纯度99%,上海酶联生物科技有限
公司);腈菌唑(纯度97.7%,上海酶联生物科技有限
公司);烯唑醇(纯度98%,上海酶联生物科技有限
公司);邻苯二胺(纯度99%,上海精纯生化有限公司);
 $K_3[Fe(CN)_6]$,氯化钾(分析纯,天津市永大化学试剂
有限公司);甲醇、乙腈(分析纯,天津市光复精细化
工研究所);醋酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、四硼
酸钠均为分析纯。

1.2 玻碳电极预处理

将玻碳电极依次用0.5 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的
 Al_2O_3 粉在麂皮上抛光成镜面,用超纯水冲洗后在无
水乙醇和超纯水中分别超声洗涤1 min,除去表面的
吸附物。然后将电极置于0.5 mol/L的 H_2SO_4 溶液中
循环扫描10圈,取出电极再次用超纯水冲洗,然后置
于 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中循环扫描,如果得不到准可逆的
循环伏安峰(峰电流比为1:1,峰电位差小于90 mV),
则重新处理电极。

1.3 联苯三唑醇分子印迹电化学传感器的制 备

将玻碳电极置于含1 mmol/L的联苯三唑醇和4
mmol/L OPD的PBS(pH=7.2)溶液中,在扫描速度
为50 mV/s、电位范围为0~0.8 V时,循环扫描聚合
15圈,得到嵌有联苯三唑醇模板分子的致密不导电聚
合膜电极,氮气吹干。将印迹电极置于0.5 mmol/L硫
酸:乙腈(1:9, V/V)溶液中浸泡13 min,以去除镶嵌在
聚合膜内的联苯三唑醇模板分子,即制得联苯三唑醇
印迹的聚邻苯二胺分子印迹聚合物传感器。

非印迹电极(即不含有联苯三唑醇的聚邻苯二胺
修饰电极)的制备除不加模板分子外,其余步骤与印
迹电极的制备完全相同。

1.4 实验方法

在室温下,采用CV和DPV法优化实验条件和检
测传感器的识别性能。测量参数设置如下,电位增量:
4 mV;脉冲宽度:0.05 s;脉冲幅度:0.05 V;脉冲间
隔:0.1 s。每次测定后,将电极置于0.5 mmol/L硫酸
-乙腈(1:9, V/V)溶液中洗脱,以去除模板分子,再进
行下一次测量。

2 结果与讨论

2.1 功能单体的选择

在电极表面直接进行电聚合的功能单体很多,针
对某一模板分子,制备分子印迹膜时,选择功能单体
的基本原则就是根据模板分子的结构及其与功能单体
的相互作用类型。如结构式中含有氨基、羟基的化合
物,如邻苯二胺、邻氨基酚、苯酚等物质常作为电聚
合的功能单体已经成功的应用于实验中。

本实验研究了 α -甲基丙烯酸(MAA)、邻苯二酚、
和OPD分别作为电聚合功能单体进行聚合的性质。

结果表明, MAA 在电解质溶液中不能电离, 无法形成聚合物薄膜, 不适合作为电聚合的功能单体, 邻苯二酚作为功能单体时形成的聚合物薄膜绝缘能力差, 影响测定结果的准确性。而在 OPD 电聚合时, 由于 OPD 氧化生成阳离子自由基, 在 0.39 V 处出现一个明显的氧化峰, 并且随着扫描圈数的增加, 氧化峰电流明显下降, 表明邻苯二胺在电聚合时是一个不可逆的过程, 形成致密的不导电聚合物薄膜, 适合作为电聚合的功能单体, 聚合曲线如图 2 所示, 因此本实验选择邻苯二胺为最佳电聚合功能单体。

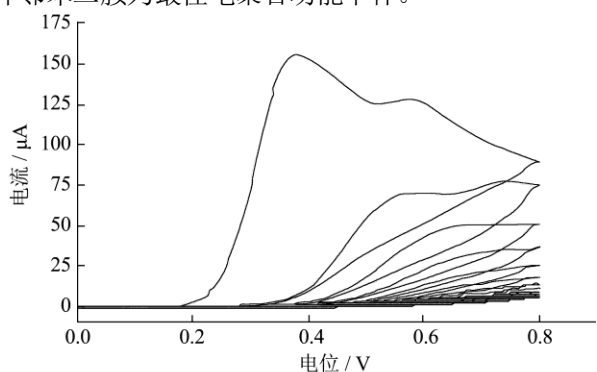


图 2 6mmol/L OPD 在 PBS 缓冲溶液中 (pH 7.2) 的电聚合曲线

Fig.2 Cyclic voltammograms for electropolymerization of 6 mmol/L OPD in PBS (pH 7.2)

2.2 模板分子与功能单体比例的确定

模板分子与功能单体的比例是制备分子印迹膜的一个重要因素。如果功能单体的浓度太大, 则会导致电极表面形成的印迹膜不均匀且容易脱落; 而浓度太低, 则在电极表面形成的识别位点少, 影响印迹效应。本实验固定模板分子在聚合液中的浓度为 1 mmol/L, 选择 OPD 的浓度分别为 2、4、6、8 mmol/L, 使模板分子和功能单体在聚合底液中的浓度比例分别为 1:2、1:4、1:6、1:8, 并进行单次电聚合。实验结果发现, 当模板分子与功能单体的浓度比为 1:4 时, 形成均匀致密的不导电印迹膜, 且容易洗脱, 洗脱之后氧化还原电流值最大, 因此本实验选择模板分子:功能单体=1:4(c/c)为最佳的聚合比例。

2.3 印迹膜聚合条件选择

2.3.1 聚合电解质的选择

固定模板分子的浓度、电位范围和扫描速度, 分别研究了在 pH 为 5.2 的 HAc-NaAc 电解质溶液、pH 为 7.2 的 PBS 电解质溶液及 pH 为 9.0 的硼砂电解质溶液中的聚合性质, 结果表明, 在硼砂电解质中进行电聚合时不能形成致密的不导电的聚合物薄膜, 而在 pH 为 5.2 的 HAc-NaAc 电解质溶液和 pH 为 7.2 的 PBS

电解质溶液中均能形成不导电聚邻苯二胺膜(图 3), 但是由图 3 可以看出, 在 PBS 溶液中成膜速度快, 形成的聚合物膜更稳定、绝缘能力强, 因此选择 pH 为 7.2 的 PBS 溶液为最佳聚合电解质。

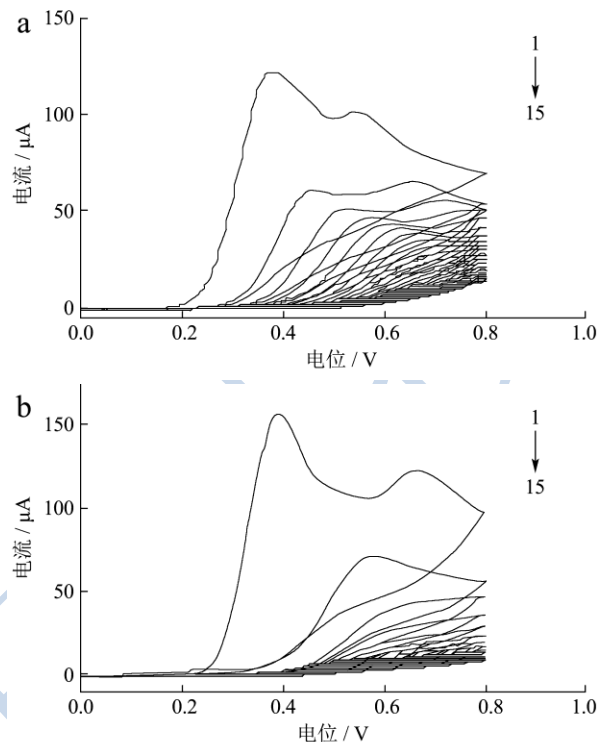


图 3 邻苯二胺在联苯三唑醇存在时的电聚合曲线

Fig.3 Cyclic voltammograms for the electropolymerization of OPD in the presence of bitertanol

注: a: HAc-NaAc pH=5.2; b: PBS pH=7.2.

2.3.2 聚合圈数的选择

实验分别选择了聚合 5、10、15、18、20、25 圈, 将聚合好的玻碳电极洗脱模板后, 采用 DPV 表征, 由图 4 可以看出, 聚合 15 圈时, 洗脱模板后响应电流值最大。因此, 实验选择聚合 15 圈为最佳聚合圈数。

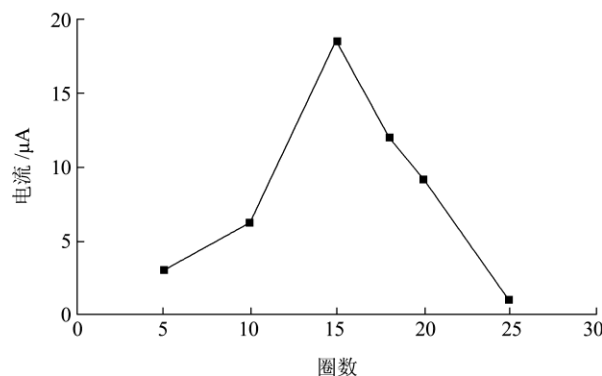


图 4 聚合圈数对洗脱效果的影响

Fig.4 Effect of polymerization cycles on the removal of template molecules

2.4 洗脱剂及洗脱时间的选择

实验根据模板分子的溶解性质,分别考察了醋酸-甲醇、0.5 mmol/L 硫酸-乙腈、醋酸-无水乙醇作为洗脱剂的洗脱效果,将印迹电极于溶液中浸泡一段时间后,于电活性探针溶液中扫描,通过 $K_3[Fe(CN)_6]$ 峰电流值的大小比较模板去除的效果,结果发现经醋酸-甲醇和醋酸-乙腈浸泡后的电极,在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中扫描,峰电流值很小,短时间内不能将模板分子洗脱下来,不适合作为洗脱剂,而硫酸-乙腈作为洗脱剂时,洗脱效果良好,响应电流值大,故最终选择 0.5 mmol/L 硫酸:乙腈为 1:9 (V:V) 的混合溶液作为最佳洗脱剂。

在确定了洗脱剂之后,本实验对洗脱时间进行了考察,对比了印迹电极和非印迹电极在同样的洗脱剂中,洗脱相同时间后的响应电流值。由图 5 可知,非印迹电极在洗脱过程中无响应电流,说明不导电,而印迹电极随着洗脱时间的增加,响应电流值增大,表明印迹膜中的模板分子逐渐溶出,电极表面的印迹空穴逐渐增多,当超过 13 min 后,峰电流值达到最大值,并保持不变,因此实验选择 13 min 为最佳洗脱时间。

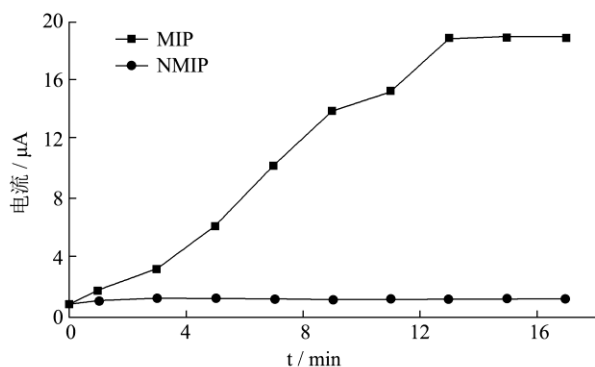


图 5 模板洗脱时间的优化

Fig.5 Optimization of the elution time in the removal of template molecules

2.5 吸附时间的确定

将洗脱模板后的印迹电极置于待测液中吸附不同的时间后,采用 DPV 表征,实验选取吸附 1、2、3、4、5 min,结果发现吸附大于 3 min 之后,DPV 响应电流不再变化,因此选择 3 min 为最佳吸附时间。

2.6 分子印迹膜的电化学表征

实验分别采用 CV 和 DPV 两种不同的电化学分析方法对聚合膜电极的分子印迹效应进行表征,图 6 与图 7 分别为 CV 和 DPV 的伏安曲线图。分别比较了裸电极、印迹膜电极未洗脱时、印迹膜电极洗脱后、印迹膜电极洗脱后再吸附的电化学行为。

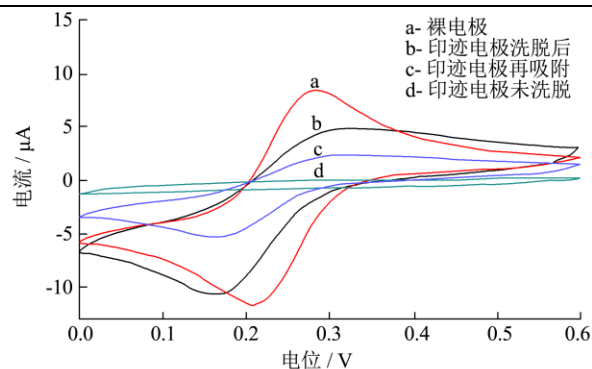


图 6 不同电极在电活性探针溶液中的循环伏安图

Fig.6 Cyclic voltammograms of different electrodes in the probe

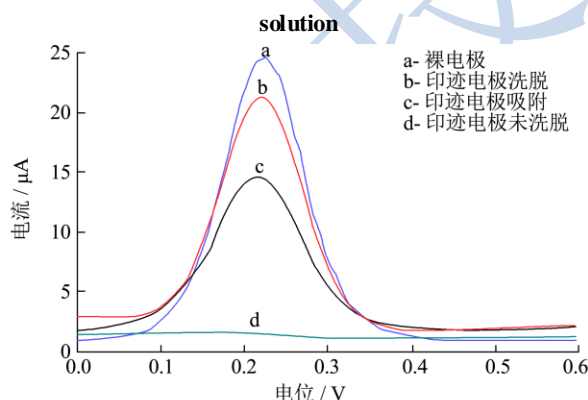


图 7 不同电极在电活性探针溶液中的差分脉冲伏安图

Fig.7 Differential pulse voltammograms of different electrodes in the electroactive probe solution

由图 6 d 与图 7 d 可以看出,聚合后的印迹膜电极未洗脱时,在电极表面没有发生电化学反应,说明该印迹电极为不导电的聚合膜,探针离子无法扩散至电极表面发生电子传递;由图 6 b 与图 7 b 可以看出,采用硫酸-乙腈洗脱模板分子后的印迹电极表面发生了电化学反应,出现了明显的氧化还原峰(图 7 b),说明镶嵌在印迹膜中的模板分子被洗脱后形成了一些具有特异性识别性能的空腔,导致探针离子进入空腔至电极表面而发生氧化还原反应,同时与裸电极的伏安曲线比较可以看出,印迹电极上的峰电流值明显小于裸电极上的电流值,表明印迹电极表面除了一些特异性识别的空腔外,还覆盖有一层聚邻苯二胺膜,导致峰电流值降低;图 6 c 与图 7 c 显示了印迹电极吸附一定浓度的模板分子之后,再次进行电化学表征时,峰电流值降低,表明印迹膜电极上的部分空腔被模板分子占据,导致探针分子只能在剩余空腔之间进行电子传递,导致峰电流值减下。综上所述,该印迹电极的印迹效果良好。

2.7 选择性研究

实验选取了与联苯三唑醇呈结构类似物的烯唑醇和腈菌唑, 以及与其结构差异较大的三氟氯氰菊酯、胺菊酯对印迹电极进行选择实验。将 5 种物质配制成相同浓度 (0.01 mmol/L) 的标准溶液, 采用 DPV 法对其进行吸附测定, 由相对峰电流值(ΔI)表征其选择性, ΔI 为未吸附目标物质时与吸附一定浓度的目标物质时 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液的峰电流变化值。结果如图 8 所示。由图可以看出该传感器对联苯三唑醇的相对峰电流 (ΔI) 值最大, 选择性最好, 其次是对结构类似物也有较好的选择性, 由于其结构类似物在分子结构上相似, 且分子尺寸要小于联苯三唑醇的分子尺寸, 因此, 烯唑醇和腈菌唑分子能够进入到印迹空穴, 说明该传感器可以对其结构类似物分别进行测定, 而对分子结构差异较大的三氟氯氰菊酯与胺菊酯的选择性较差, ΔI 值最低, 说明了菊酯类农药分子无法进入到印迹空穴而造成干扰, 所以该传感器具有较好的选择性。

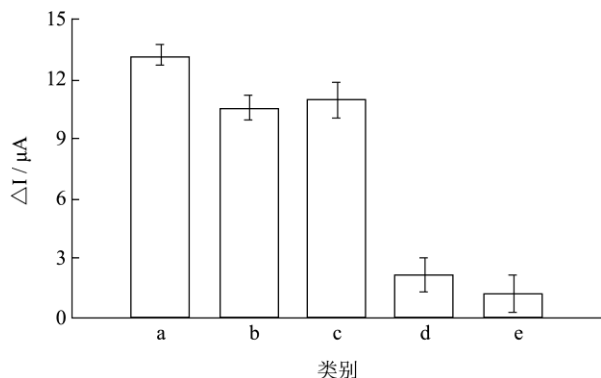


图 8 印迹电极的选择性研究

Fig.8 Selectivity study of the imprinted electrode

注: a: 联苯三唑醇; b: 烯唑醇; c: 腈菌唑; d: 胺菊酯; e: 三氟氯氰菊酯。

2.8 印迹传感器的稳定性和使用寿命

将制备的联苯三唑醇分子印迹电化学传感器连续洗脱、吸附模板分子, 所得 ΔI 的相对标准偏差为 5.2% ($n=10$), 表明该传感器具有良好的重复性, 并且性能无衰减。

3 结论

实验以联苯三唑醇为模板分子, 邻苯二胺为功能单体, 采用电聚合的方式首次制备出联苯三唑醇分子印迹电化学传感器。采用循环伏安法(CV)和差分脉冲伏安法(DPV)研究了该传感器的电化学响应特性, 并且优化了制备条件, 研究了印迹传感器对模板分子及其结构类似物的选择性响应。结果表明: 该传感器具有较好的识别性能, 可以对结构类似物分别进行测定, 连续洗脱 10 次之后传感器性能无衰减现象。该传感器

灵敏度高, 抗干扰能力强, 为快速、灵敏检测食品中联苯三唑醇奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 胡静, 吴晓燕, 高文惠. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法分析 2 种三唑类杀菌剂残留 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6): 1043-1047
HU Jin, WU Xiao-yan, GAO Wen-hui. HPLC analysis of two triazole fungicide residues by molecularly imprinted solid phase extraction [J]. Chin. J. Pharm. Anal., 2012, 32(6): 1043-1047
- [2] 高文惠, 刘博, 庞军, 等. 虚拟模板分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测食品中联苯三唑醇与烯唑醇 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2504-2508, 2497
GAO Wen-hui, LIU Bo, PANG Jun, et al. Determination of bitertanol and diniconazole in food by virtual-template molecularly imprinted solid phase extraction-HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(10): 2504-2508, 2497
- [3] Kong L, Jiang X, Zeng Y, et al. Molecularly imprinted sensor based on electropolymerized poly (o-phenylenediamine) membranes at reduced graphene oxide modified electrode for imidacloprid determination [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 185: 424-431
- [4] Chen H, Zhang Z, Cai R, et al. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on nickel nanoparticles-graphene nanocomposites modified electrode for determination of tetrabromobisphenol A [J]. Electrochimica Acta, 2014, 117: 385-392
- [5] Yan X, Deng J, Xu J, et al. A novel electrochemical sensor for isocarbophos based on a glassy carbon electrode modified with electropolymerized molecularly imprinted terpolymer [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 171: 1087-1094
- [6] 蒋挺大. 壳聚糖 [M]. 北京市: 化学工业出版社, 2001
JIANG Ye-ping. Chitosan [M]. Bei Jing: Chemical Industrial Press, 2011
- [7] 连惠婷, 陈娟娟, 薛艳, 等. 久效磷分子印迹传感器的电化学响应特性 [J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2011, 32(2): 182-187
LIAN Hui-ting, CHEN Juan-juan, XUE Yan, et al. Electrochemical characteristic of monocrotophos molecularly imprinted sensor [J]. Journal of Huaqiao University (Natural Science), 2011, 32(2): 182-187
- [8] Li J, Zhao J, Wei X. A sensitive and selective sensor for dopamine determination based on a molecularly imprinted electropolymer of o-aminophenol [J]. Sensors and Actuators B:

- Chemical, 2009, 140(2): 663-669
- [9] Duan Y, Luo X, Qin Y, et al. Determination of epigallocatechin-3-gallate with a high efficiency electrochemical sensor based on a molecularly imprinted poly (o-phenylenediamine) film [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2013, 129(5): 2882-2890
- [10] Li H, Wang Z, Wu B, et al. Rapid and sensitive detection of methyl-parathion pesticide with an electropolymerized, molecularly imprinted polymer capacitive sensor [J]. Electrochimica Acta, 2012, 62: 319-326

现代食品科技