基于三聚氰胺膜电催化与酶催化放大的分子印迹电化学传感器 测定绿麦隆

李建平* 李玉平 魏小平

(桂林理工大学化学与生物工程学院 桂林 541004)

摘要 以三聚氰胺(MA)作为功能单体, 制备了一种检测环境中农药残留绿麦隆(CH)的分子印迹膜电化学传感器. 基于CH与辣根过氧化物酶(HRP)标记绿麦隆(HRP-CH)的竞争反应实现对CH的检测. 利用聚三聚氰胺膜(PMA)和HRP对过氧化氢的催化效应产生的双放大效应有效地提高传感器检测的灵敏度. 采用计时电流法测量, CH浓度与峰电流差值在0.01~0.8 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈现良好的线性关系, 检出限为2.64 nmol/L. 传感器对CH具有很好的选择识别性能.

关键词 绿麦隆; 分子印迹电化学传感器; 双放大效应; 聚三聚氰胺; 辣根过氧化物酶

Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors Based on the Double-amplification from the Electro-catalysis of Poly-melamine and the Enzymatic Catalysis of HRP for Chlortoluron Determination

Li, Jianping* Li, Yuping Wei, Xiaoping

(College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004)

Abstract A molecularly imprinted electrochemical sensor for the determination of the residue of chlortoluron (CH) in environment was prepared with melamine (MA) as functional monomer. The electropolymerization of poly-melamine-molecularly-imprinted-polymer (PMA-MIP) on the GC electrode was conducted in a 1.0 mol/L H_2SO_4 by cyclic voltammetry (CV) at room temperature (25 $^\circ\text{C}$). Then the template molecule (CH) on the PMA-MIP film was removed by nitric acid. The experimental conditions (including electrocatalysis of the MA film, pH effects, incubation and competition times) were optimized. The incubation time chosen for the subsequent experiments was 12 min and 12-min was also recommended as the optimized competition time. The Amperometric $i-t$ curves were recorded during the determination. The detection of CH relied on a competition reaction between CH and horseradish peroxidase labeled chlortoluron (HRP-CH) coupled with the subsequent catalytic reduction of hydrogen peroxide by the poly-MA film. Highly sensitive detection of CH was achieved by the double amplification derived from the electro-catalysis of H_2O_2 on MA film and the enzymatic effect of HRP. There was linear relationship between the current changes and CH concentration in the range of 0.01~0.8 $\mu\text{mol/L}$ with a detect limit of 2.64 nmol/L by chronoamperometric method. The proposed PMA-MIP sensor displayed excellent analytical performance (e.g., high sensitivity, good selectivity, and good reproducibility). Some analogues (difenoxuron, neburon, isoproturon and fluometuron) were also used as interferences to examine the selectivity. The changes in the current response of 94-time difenoxuron, 62-time neburon, 38-time fluometuron and 20-time isoproturon are negligible compared with chlortoluron. In addition, the feasibility of its practical applications has been demonstrated in the analysis of samples of tap water and soil extract solution. Recoveries were ranged from 97.0% to 107.0%, and the RSDs were less than 2%, which can be indicators of good recovery and practicability.

Keywords chlortoluron; molecularly imprinted electrochemical sensors; double amplification; poly-melamine; horseradish peroxidase (HRP)

1 引言

绿麦隆(CH)是一种广泛使用的低毒的苯基脲类除草剂. 但CH施用时间不当或者滥用, 不仅对农作物产生危害, 还会污染环境. 绿麦隆的降解速度非常慢, 会长时间地存在于农作物和地下水中^[1]. 由于其残留量较

低, 寻求一种对绿麦隆具有高选择性和高灵敏度的检测方法有非常重要的意义. 目前, 绿麦隆的检测方法主要是色谱法^[2]和色谱-质谱联用法^[3], 但这些方法样品前处理复杂, 且仪器及操作成本昂贵.

近年来, 分子印迹电化学传感器(MIECS)在药物分

* E-mail: likianping@263.net

Received June 1, 2012; published August 10, 2012.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21165007) and the Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2012jjAA20076).

项目受国家自然科学基金(No. 21165007)和广西自然科学基金(No. 2012jjAA20076)资助.

析、生物分析、环境监测、农兽药残留检测等众多领域展现了良好的应用前景^[4-6]。MIECS 检测的电化学信号有电导^[7]、电位^[8]、电容^[9]和电流^[10-12]。其中, 电流型的 MIECS 因更灵敏而研究较多。已报道的 MIECS 都是通过印迹分子进入印迹膜前后电化学探针或印迹分子本身电化学信号的变化进行检测的, 印迹膜上孔穴数量少导致在电极上发生电极反应的印迹分子或探针分子数量少, MIECS 的灵敏度不高。本课题组^[13,14]曾将酶放大技术引入了 MIECS, 显著地提高了测定灵敏度。但是, 通常的分子印迹膜大多数都是不导电的, 酶与电子媒介体反应的产物透过 MIP 在基底电极上进行电极反应受到限制, 导致产生的电化学信号不够强, 灵敏度提高受到很大局限。

三聚氰胺(MA)可以进行电化学氧化聚合^[15]生成导电的聚三聚氰胺(PMA)膜, 且 PMA 对过氧化氢还原有较强的催化作用。本文在玻碳电极上电聚合三聚氰胺制备分子印迹膜 PMA, 绿麦隆分子通过与孔穴中功能位点的作用连接在分子印迹膜上, 产生类似抗原-抗体间的免疫反应。辣根过氧化物酶(HRP)标记的 CH 进入印迹孔穴后, HRP 在电极表面产生酶催化反应, 使过氧化氢浓度改变, 从而影响 H_2O_2 在 PMA 膜上的电催化还原。因此, PMA 不仅能对 CH 有特异选择性识别功能, 而且还可以电催化还原 H_2O_2 。通过耦联 HRP 对过氧化氢的酶催化反应, 实现双放大。根据监测 H_2O_2 产生的电化学信号, 间接地对样品中的 CH 进行检测。该传感器的原理如图 1 所示。图中由于 HRP-CH 的空间位阻效应, 导致部分孔穴只能识别 CH 分子, 而不能识别 HRP-CH, 从而限制了检测限的降低, 因此引入了“掩蔽”这一步骤, 将所有的印迹孔穴用 CH 占据, 然后将传感器在 HRP-CH 溶液中进行孵化。当传感器放在样品中孵化的时候, CH 置换出 HRP-CH, HRP 量的变化使 H_2O_2 在 PMA 上催化电流发生改变。

图 1 绿麦隆分子印迹电化学传感器制作及测定原理图

Figure 1 Schematic diagram of the preparation and competition assay principle of the chlortoluron molecularly imprinted electrochemical sensors

2 结果与讨论

2.1 分子印迹膜的电聚合

图 2 是在玻碳电极表面于 1.0 mol/L 硫酸溶液中电

聚合绿麦隆的分子印迹膜的循环伏安曲线。由图可知, 随着循环伏安扫描的进行, 电极表面被生成的分子印迹膜覆盖, 电子传输能力减弱, 电流下降; 循环伏安曲线达到 8 圈时在电极表面已经形成了致密的分子印迹膜, 电流趋于稳定。

图 2 绿麦隆分子印迹膜的电聚合伏安图

Figure 2 CVs of the electropolymerization of MA-molecularly imprinted polymers (MA-MIP) 1.0 mol/L H_2SO_4 , 1 mmol/L melamine, 0.3 mmol/L chlortoluron

2.2 分子印迹膜上 MA 的表征

为了验证分子印迹膜上三聚氰胺对 H_2O_2 的催化能力, 对该印迹膜进行了相关的表征。将电聚合得到的基于三聚氰胺的印迹膜置于含 5 mmol/L H_2O_2 的 PBS (0.1 mol/L, pH 7.0) 中, 并进行循环伏安扫描。如图 3 所示, 裸电极上没有观察到明显的还原电流(a)。然而, 在修饰了 PMA-MIP 的电极上却出现明显的还原电流(b), 表明聚合上三聚氰胺的分子印迹膜 PMA 表现出了良好的催化活性, 可以电催化还原 H_2O_2 。

图 3 裸 GC 电极(a)和 PMA-MIP 修饰电极(b)在 PBS 中的循环伏安图
Figure 3 Cyclic voltammograms (CVs) of the (a) bare and PMA-MIP-modified GC electrode (b) 5 mmol/L H_2O_2 in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0, containing 0.1 mol/L KCl)

2.3 分子印迹膜对绿麦隆的识别性能

本实验在含 5 mmol/L H_2O_2 和 0.1 mol/L KCl 的 PBS

(0.1 mol/L, pH 7.4)中分别对在 HRP-CH 孵化后的裸电极和各种修饰电极进行了表征以验证分子印迹膜的选择性识别性能. 如图 4 所示, 裸电极(曲线 a)和非分子印迹膜(nMIP, 曲线 b)电流响应信号较小. 这是由于裸电极(曲线 a)和非分子印迹膜(nMIP, 曲线 b)表面没有对 CH 的特异性识别的分子印迹孔穴, 孵化过程中酶标的绿麦隆没有进入到电极表面, 没有放大信号. 而非分子印迹膜(nMIP, 曲线 b)的电流响应大于裸电极上(曲线 a)产生的信号, 这是由于非分子印迹膜(nMIP, 曲线 b)是三聚氰胺膜, MA 可以催化还原 H_2O_2 产生一定的电信号. 由图 4 可以明显地看出, 曲线 c 表现出了灵敏的电化学信号. 这正是基于 HRP 参与三聚氰胺对 H_2O_2 催化反应, 表现出了良好的电催化还原电流响应. 这也是因为分子印迹膜上大量的分子印迹孔穴对绿麦隆的选择性识别, HRP-CH 中的 CH 进入到了分子印迹膜中对 CH 有特异性识别位点的模板分子孔穴, 而其中的辣根过氧化物酶参与三聚氰胺催化扩散至电极表面的 H_2O_2 的反应.

为了进一步验证分子印迹膜对样品中绿麦隆的特异性识别, 本文还将制得的不同修饰物的分子印迹电极置于 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 绿麦隆的样品中进行竞争取代反应. 图 4 中曲线 a', b' 和 c' 分别是裸电极、非分子印迹膜和分子印迹膜在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 绿麦隆中竞争后的电流-时间曲线. 分子印迹电极(曲线 c')对 H_2O_2 的电化学信号明显地降低. 这是由于样品中的绿麦隆富集在电极上竞争取代了辣根过氧化物酶标记的绿麦隆. 随着 HRP 的减少, 分子印迹膜对 H_2O_2 的电催化还原电流信号降低. 此外, 由于没有分子印迹孔穴, 裸电极(曲线 a')和非分子印迹膜(nMIP, 曲线 b')只发生了微小的电流变化.

图 4 玻碳电极、nMIP-sensor 和 MIP-sensor 分别在 HRP-CH 中孵化后(a, b 和 c)及 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CH 中竞争后(a', b' 和 c')的电流-时间曲线
Figure 4 *i-t* curves of (a, a') the bare electrode, (b, b') the non-MIP (nMIP) sensor, and (c, c') the MIP sensor after incubation of horseradish peroxidase-labeled chlortoluron (HRP-CH) and competition with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ chlortoluron (a', b' and c'), respectively

2.4 缓冲溶液 pH 的选择

试验中选择了磷酸缓冲溶液作为测定底液溶液, 并研究了底液的 pH 值对传感器响应信号的影响. 三聚氰胺膜催化 H_2O_2 电还原需在中性环境中, 而酶的催化反

应条件都是比较温和的. 参照上述的条件, 评估该实验的 pH 范围为 6.0~8.0, 并进行相关的优化. 当 PBS 的 pH 7.4 时, 传感器表现出了最大的电化学响应.

2.5 孵化时间和竞争时间的优化

孵化实验是在 8 $\mu\text{g/mL}$ 的辣根过氧化物酶标记的绿麦隆溶液中进行的, 每隔 3 min 进行一次电流-时间曲线扫描, 记录稳定的电流响应信号. 如图 5(a)所示, 随着孵化时间的不断增加, 电流的响应信号在不断增大, 直至孵化时间为 12 min 以后, 分子印迹膜上的辣根过氧化物酶标记的绿麦隆和绿麦隆的置换会达到一个平衡, 使电流信号不再增大, 趋于稳定状态. 所以选择在辣根过氧化物酶标记的绿麦隆中的孵化时间为 12 min.

竞争实验是在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的绿麦隆标准溶液中进行. 在 0~21 min 之间, 每隔 3 min 进行一次电流-时间曲线扫描, 记录稳定的电流响应信号. 如图 5(b)所示, 电流的响应信号随着竞争时间的不断增加而降低, 直至 12 min 才趋于稳定状态. 说明当竞争时间达到 12 min 时, 溶液中的绿麦隆与分子印迹膜上的 HRP-CH 的竞争已趋于平衡. 所以选择在绿麦隆中进行竞争的时间为 12 min.

图 5 孵化时间(a)和竞争时间(b)在传感器上的响应信号
Figure 5 Effects of (a) the incubation time and (b) the competition time on the sensor response

2.6 工作曲线

孵化后的分子印迹传感器置于一系列不同浓度的绿麦隆标准溶液中进行竞争, 利用电流-时间曲线检测绿麦隆的含量. 如图 6 所示, 随着溶液中 CH 浓度的增加, 分子印迹膜传感器识别位点上的 HRP-CH 被标准溶液中的 CH 置换出来的能力越强, 从而导致分子印迹膜上的 HRP 越少, 催化 H_2O_2 的能力减弱, PMA 催化还原 H_2O_2 的电流响应信号相应的减小. 在 0.01~0.8 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 峰电流差值 ΔI 与 CH 标准溶液的浓度 C 呈良好的线性关系. 线性方程为: $\Delta I (\mu\text{A}) = 19.36C (\mu\text{mol/L}) + 0.964$ ($r = 0.9986$). 该分子印迹传感器对绿麦隆测定的检出限为 2.64 nmol/L ($S/N = 3$). 与其他检测 CH 的方法相比^[16,17], 本传感器的检出限显著降低. 同时也大大低于一般电化学分子印迹传感器的检测下限^[10]. 这种较

高的灵敏度归功于酶放大作用及电活性敏感膜的电催化作用。

图6 不同浓度绿麦隆(CH)竞争的分子印迹传感器的电流响应信号*i-t*图(a→j)分别为0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 0.6和0.8 μmol/L CH)

Figure 6 *i-t* curves of the MA-MIP sensor after incubation in sample with varying CH concentrations: (a→j) 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 0.6 and 0.8 μmol/L CH, respectively

2.7 分子印迹传感器的重现性和稳定性

该电化学传感器每次使用后都必须洗脱更新, 重新进行CH与HRP-CH的竞争过程. 使用同一支MA-MIP传感器, 其每次更新后对0.1 μmol/L绿麦隆进行检测, 相对标准偏差为2.6% ($n=5$); 同样, 同批次制备的五支传感器对0.1 μmol/L绿麦隆进行检测, 相对标准偏差为5.5%.

传感器的稳定性是为了将其应用于实际的一个重要决定因素, 而本实验制备的传感器的稳定性取决于MA膜的稳定性和酶标绿麦隆的活性. 传感器在冰箱中(4 °C)保存. 通过对0.1 μmol/L绿麦隆电化学信号变化的研究, 30 d后电流只降低了8.3%.

2.8 分子印迹传感器的选择性

对与绿麦隆有类似化学结构的除草剂进行试验, 实验表明, 摩尔浓度为94倍的枯莠隆、62倍的草不隆、38倍的伏草隆、20倍的异丙隆对绿麦隆的测定不产生干扰, 说明该传感器对绿麦隆有很好的选择识别性.

2.9 样品中绿麦隆的测定

选择样品为自来水和土壤浸出液. 按照上述的实验方法对样品进行测定, 同时进行加标回收实验, 测定回收率. 结果显示, 该分子印迹电化学传感器对样品中绿麦隆测得的回收率在97.0%~107.0%之间(如表1所示).

3 结论

本文制备了一种基于导电聚合物三聚氰胺的分子印迹电化学传感器, 并用于农药残留绿麦隆的间接检测. 该分子印迹电化学传感器对模板分子的检测表现出了高选择性识别、高灵敏度和很好的稳定性及重现性.

表1 水样中绿麦隆的分析

Table 1 Results of the analysis of chlortoluron in water samples

样品	测得值/ (μmol·L ⁻¹)	加入值/ (μmol·L ⁻¹)	测得总值/ (μmol·L ⁻¹) ($n=5$)	相对标准 偏差/%	回收率 /%
自来水	— ^a	0.100	0.097	1.8	97.0
—	—	0.500	0.491	1.7	98.2
土壤浸	—	0.100	0.107	1.6	107.0
出液	—	0.500	0.512	1.9	102.4

^a未检出.

相较于目前现有的分子印迹传感器灵敏度大大提高, 为研究新型高灵敏农药残留检测传感器提供了一种新途径.

4 实验部分

4.1 分子印迹膜和非分子印迹膜修饰电极的制备

将已处理好的GC电极置于含 1×10^{-3} mol/L MA和 3×10^{-4} mol/L CH的1.0 mol/L的硫酸溶液中, 在0~+1.6 V的电位范围内, 以0.1 mV/s的扫描速度循环伏安扫描20圈. 将电极取出用二次水冲洗干净后置室温下晾干.

电聚合完成后, 用硝酸溶液($V/V=1:3$)搅拌浸泡数分钟, 以洗脱除去分子印迹膜中的模板分子绿麦隆和其他的一些吸附物. 由此制得有模板分子印迹孔穴的分子印迹膜传感器.

非分子印迹膜传感器的制备类似于分子印迹传感器的制备, 只是在电聚合过程中不加入模板分子绿麦隆.

4.2 掩蔽、竞争和孵化过程

洗脱CH分子后, 将印迹膜传感器于5 mL 3×10^{-4} mol/L绿麦隆溶液中浸泡10 min, 该步骤是为了掩蔽印迹孔穴. 由于辣根过氧化物酶的空间位阻效应, 分子印迹膜上的印迹孔穴有的能同时识别绿麦隆和酶标绿麦隆, 而有些只能识别绿麦隆. 因此, 在检测之前, “掩蔽”是非常有必要的. 冲洗印迹膜传感器后, 将其置于8 μg/mL的辣根过氧化物酶标绿麦隆溶液中孵化12 min. 经过孵化阶段, 酶标绿麦隆可以将电极表面同时识别绿麦隆和酶标绿麦隆的分子特异性识别位点中的绿麦隆置换出来. 在进行检测的时候, 将孵化后的传感器置于不同浓度的绿麦隆测试液中进行竞争12 min.

4.3 实验方法

本实验用循环伏安法(CV)和电流-时间曲线(*i-t*)进行相关的测定. 在电聚合制备分子印迹膜的过程中, 循环伏安法扫描的电位范围是0~+1.6 V, 在进行MA表征时电位扫描范围为0~-0.6 V; 相关测定的电流-时间曲线是在含5 mmol/L H₂O₂的0.1 mol/L PBS (pH 7.4)缓冲溶液中进行, 施加电位为-0.3 V.

References

- [1] Poulain, L.; Mailhot, G.; Wong-Wah-Chung, P.; Bolte, M. *J. Photochem. Photobiol. A* **2003**, *159*, 81.
- [2] Wang, Y.; You, J. Y.; Bao, C.; Zhang, H. Q.; Yu, A. M.; Yu, Y. *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 785.
- [3] Ferrer, I.; Hennion, M.-C.; Barceló, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4508.
- [4] Wang, L. Y.; Lu, F.; Wu, F. Q.; Gu, R. A.; Yao, J. L.; Zhang, H. L.; Deng, Z. W. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2011**, *27*, 1451. (汪莲艳, 陆枫, 吴福全, 顾仁敖, 姚建林, 张海禄, 邓宗武, 物理化学学报, **2011**, *27*, 1451.)
- [5] Whitcombe, M. J.; Chianella, I.; Larcombe, L.; Piletsky, S. A.; Noble, J.; Porter, R.; Horgan, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1547.
- [6] Huang, J. X.; Hu, Y. F.; Pan, J. L.; Xu, Z. G.; Li, G. K. *Chin. Sci. B* **2009**, *39*, 733. (黄健祥, 胡玉斐, 潘加亮, 许志刚, 李攻科, 中国科学 B 辑, **2009**, *39*, 733.)
- [7] Piletsky, S. A.; Piletskaya, E. V.; Elgersma, A. V.; Yano, K.; Karube, I. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 959.
- [8] Liang, R. N.; Song, D. A.; Zhang, R. M.; Qin, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *122*, 2610.
- [9] Cheng, Z. L.; Wang, E. K.; Yang, X. R. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 179.
- [10] Li, J. P.; Li, Y. P.; Zhang, Y.; We, G. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1888.
- [11] Tan, X. C.; Wang, L.; Li, P. F.; Gong, Q.; Zhao, D. D.; Lei, F. H.; Huang, Z. Y. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1. (谭学才, 王琳, 李鹏飞, 龚琦, 刘力, 赵丹丹, 雷福厚, 黄在银, 化学学报, **2012**, *70*, 1.)
- [12] Jin, G.; Li, W.; Yu, S.; Peng, Y.; Kong, J. *Analyst* **2008**, *133*, 1367.
- [13] Li, J. P.; Jiang, F. Y.; Wei, X. P. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6074.
- [14] Li, J. P.; Chen, Z. Q.; Li, Y. P. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 255.
- [15] Jin, G. D.; Du, S.; Ren, Y. Y.; Hu, X. Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, *37*, 66. (金根娣, 杜诗, 任艳艳, 胡效亚, 分析化学, **2009**, *37*, 66.)
- [16] Xiao, L.; Wang, Y. C.; Cheng, M. R. *J. Tea Sci.* **2010**, *30*, 52.
- [17] Zeng, H. J.; Yang, R.; Wang, Q. W.; Li, J. J.; Qu, L.-B. *Food Chem.* **2011**, *127*, 842.

(Cheng, F.)