

类分子印迹纳米多孔膜修饰电极制备三聚氰胺 电化学传感器

赵 畅¹, 余 波¹, 陈振兴¹, 晋冠平^{1,2,*}

(1. 合肥工业大学化工学院应用化学系, 安徽 合肥 230009;

2. 可控化学与材料化工安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 采用电化学法在充蜡石墨电极上, 原位修饰了一种基于三聚氰胺/纳米银/聚榭皮素的类分子印迹-纳米多孔膜。场发射扫描电镜、X-射线光电子能谱、红外光谱和电化学验证了该类分子印迹-纳米多孔膜为三维网状结构。该纳米多孔膜修饰电极对三聚氰胺显示良好的选择性富集作用, 氧化峰(0.17V)电流和三聚氰胺的浓度在 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内, 呈良好线性关系, 检出限为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ (3σ)。该修饰电极有较好的抗干扰能力, 可用于牛奶样品中三聚氰胺的测定。

关键词: 类分子印迹纳米多孔膜; 传感器; 电化学; 三聚氰胺

Preparation of Electrochemical Sensor Modified by Molecularly Imprinted Nano-porous Film for Melamine Determination

ZHAO Chang¹, YU Bo¹, CHEN Zhen-xing¹, JIN Guan-ping^{1,2,*}

(1. Department of Application Chemistry, School of Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. Anhui Key Laboratory of Controllable Chemistry Reaction & Material Chemical Engineering, Hefei 230009, China)

Abstract: A molecularly imprinted nano-porous film for melamine adsorption was electrochemically generated *in situ* on a paraffin-impregnated graphite electrode with a melamine/chitosan/nano-silver/polyquercetin complex. The film displayed a 3D network structure as characterized using field emission scanning electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, infrared spectroscopy and electrochemical techniques. The modified electrode exhibited a highly selective enrichment for melamine. Oxidation peak current and melamine concentration in the range of $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ showed an excellent linear relationship. The detection limit of the method was $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ (3σ). The modified electrode had excellent anti-interference performance and allowed the determination of melamine in milk.

Key words: molecularly imprinted nano-porous film; sensor; electrochemistry; melamine

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0214-05

三聚氰胺原本为工业上合成三聚氰胺甲醛树脂的原料。由于三聚氰胺分子中氮的含量高达66%, 近年来, 一些不法商贩和企业将其掺入到乳制品中, 使蛋白质含量虚高^[1-2]。当人体摄入三聚氰胺的量超过安全范围($5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$)时会引起肾衰竭甚至死亡, 因此快速准确的检测三聚氰胺具有重要的食品安全意义。目前, 测定三聚氰胺的常用方法主要有气相色谱分析法、液相色谱分析法、毛细管电泳分析法、酶联免疫吸附法、红外光

谱分析法、表面增强拉曼光谱分析法等^[3]。与这些分析方法相比, 电化学法因成本低、灵敏度高、简便快速, 已受到广泛的关注。Cao等^[4]利用铁氰化钾为探针的间接电化学法、Li等^[5]采用单扫描极谱分析法、Liang等^[6]采用分子印迹膜电位法、Zhu等^[7]利用铜离子和三聚氰胺生成电活性复合物的间接电化学法, 分别成功地测定了乳制品中三聚氰胺的含量。此外, 由于采用分子印迹技术制备的聚合物具有优良的选择性, 目前该技术已被

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(NSFC, 21076054); 教育部留学回国科研启动基金项目(2009JYLH0522);

安徽省教育厅自然科学重点项目(2009AJZR0596); 合肥工业大学创新实验项目(2010-37)

作者简介: 赵畅(1986—), 男, 本科生, 主要从事电分析化学研究。E-mail: Zhaochang@hfut.edu.cn

*通信作者: 晋冠平(1963—), 女, 教授, 博士, 主要从事电分析及应用电化学研究。E-mail: jgp@hfut.edu.cn

用于电化学传感器的制备^[6]。

本实验采用电化学法在充蜡石墨电极上, 制备了一种基于三聚氰胺/壳聚糖/Nafion/纳米银/聚槲皮素修饰电极的类分子印迹-纳米多孔膜修饰充蜡石墨电极, 标记为 MIP/WGE。采用各种表征方法表征了电极的特性, 并将该电极用于三聚氰胺的检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲜奶样品产自合肥市当地牛奶公司。

三聚氰胺(melamine, MEL)、槲皮素(quercetin, Qu)和壳聚糖(chitosan, Ch) 上海化学试剂厂; 其他试剂均为分析纯; 所有溶液均用二次蒸馏水配制; 所有实验在氮气气氛、常温条件下进行。

1.2 仪器与设备

所有电化学实验均在 CHI660B 电化学工作站(上海辰华公司)上进行; 电化学实验采用常规的三电极系统: 工作电极为类分子印迹纳米多孔膜修饰石墨电极, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE/KCl), 辅助电极为铂电极(Pt); JSM-600 型场发射扫描电镜(FE-SEM) 日本 Jeol 公司; ESCALABMK2 型 X- 射线光电子能谱仪(XPS) 美国 Vg Corporation 公司; IR 200 型红外光谱仪(IR) 美国 Nicolet 公司。

1.3 类分子印迹-纳米多孔膜修饰充蜡石墨电极的制备

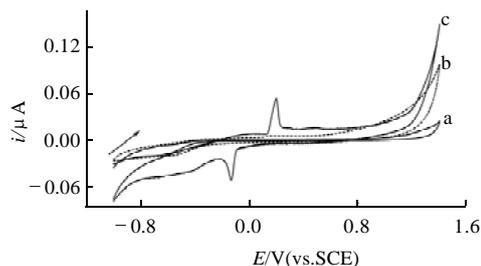
根据文献[8]方法, 采用电化学法制备纳米银聚槲皮素修饰充蜡石墨电极(Ag/Qu/WGE); 将 300 μ L 15g/L 壳聚糖、100 μ L 0.01mol/L 三聚氰胺、500 μ L 2mmol/L H₂SO₄ 溶液和 2 μ L 质量浓度 1g/100mL Nafion 超声混合 2min, 将制成的混合溶液储存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中待用。

取 20 μ L 混合溶液直接滴涂在 Ag/Qu/WGE 表面, 室温下自然晾干, 制得的电极记为 MEL-MIP/WGE。然后将 MEL-MIP/WGE 置于 0.1mol/L PBS(pH7.0)中, 电压 1.4V, 恒电位降解 40min 以除去三聚氰胺; 将制得的电极记为 MIP/WGE, 保存在 4 $^{\circ}$ C、0.1mol/L PBS(pH7.0)中备用。

2 结果与分析

2.1 类分子印迹-纳米多孔膜的电化学行为

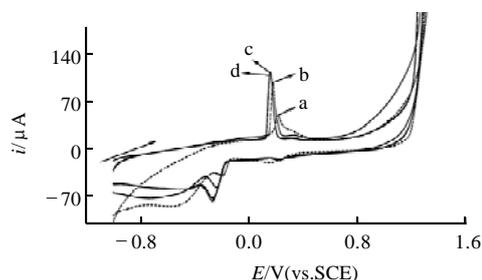
由图 1 可见, 曲线 b 中, 在 0.22、-0.55V 处呈现一对 Qu 的特征氧化还原峰^[10]; 曲线 c 中, 在 0.22、0.47、-0.13V 处显示的三个峰对应于 Ag \rightarrow AgO \rightarrow Ag₂O 的过程^[11], 而在 0.2V 处峰的增强是由于 Qu 和 Ag 的氧化峰重叠所致, 表明 Qu 对 Ag⁺ 存在较强的络合作用^[8]。



缓冲溶液 0.1mol/L PBS(pH7.0)。

图 1 WGE(a)、Qu/WGE(b)、Ag/Qu/WGE(c)的 CV 图

Fig.1 CV plots of WGE, Qu/WGE, Ag/Qu/WGE in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0)



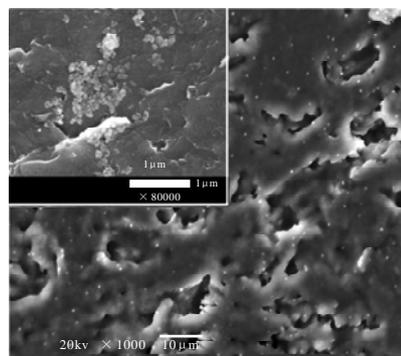
缓冲溶液 0.1mol/L PBS(pH7.0)。

图 2 MEL-MIP/WGE 降解 0(a)、30(b)、40(c)、50(d)min 后的 CV 图

Fig.2 CV plots of MEL-MIP/WGE after degradation at 1.4 V for 0(a), 30(b), 40 min(c) and 50 min(d)

由图 2 可见, 由于三聚氰胺在 0.1mol/L PBS(pH7.0) 中电化学活性较弱^[4], 随着降解时间的延长, Ag 的氧化峰随着三聚氰胺的清除而逐渐增强, 在 40min 后氧化峰基本恢复(曲线 c), 表明随着三聚氰胺被降解清除, 类分子印迹-纳米多孔膜可能已形成。

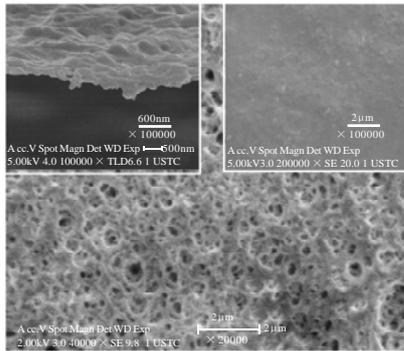
2.2 类分子印迹-纳米多孔膜的 FE-SEM 表征



电压 1.4V, 时间 40min, 缓冲溶液: 0.1mol/L PBS(pH7.0)。

图 3 Ag/Qu/WGE (插图)、Ch/Ag/Qu/WGE 降解后的 FE-SEM 图

Fig.3 FE-SEM plots of Ag/Qu/WGE and Ch/Ag/Qu/WGE after degradation



电压 1.4V, 时间 40min, 缓冲溶液: 0.1mol/L PBS(pH7.0)。

图4 MEL-MIP/WGE 降解前(左插图)和降解后、MEL/Ch/Qu/WGE 降解后(右插图)的 FE-SEM 图
Fig.4 FE-SEM plots of MEL-MIP/WGE and MEL/Ch/WGE before and after degradation

由图 3 所示, 将不含三聚氰胺的膜混合液直接涂布在 Ag/Qu/WGE 上, 经 1.4V 恒电位处理后, 形成的膜上呈现出大量不规则的孔洞, 粒径在(2 ± 1)µm; 图 3 插图显示纳米 Ag 粒径为(40 ± 20)nm。然而, 将含三聚氰胺的膜混合液直接涂布在 Ag/Qu/WGE 上, 经 1.4V 恒电位处理后, 由图 4 可见, 形成的膜上呈现出三维网状纳米多孔结构, 直径为(100 ± 50)nm; 其原因可能是: 在纳米 Ag 的电催化及恒电位的氧化协同作用下, 膜中三聚氰胺发生了降解, 其机制可能类似于微生物对三聚氰胺的生物降解过程^[9], 即: 三聚氰胺逐步水解生成三聚氰酸, 经氧化后生成缩二脲, 再水解生成 NH₃ 和 CO₂ (图 5), 使膜上形成孔洞。此外, 图 4 左插图显示该复合膜厚度约 100 nm。将含三聚氰胺的混合液直接涂布在 Qu/WGE 上, 经 1.4V 恒电位处理后, 由图 4 右插图可见, 形成的膜表面平整, 未出现明显的孔洞, 表明纳米银在多孔的形成上起着重要的作用。

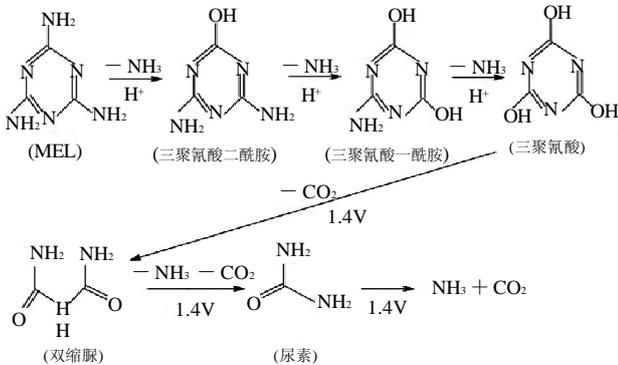
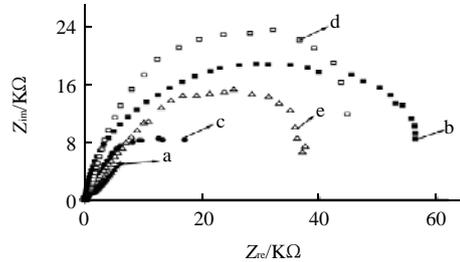


图 5 类分子印迹纳米多孔膜形成机理
Fig.5 Formation mechanisms of molecularly imprinted nano-porous film

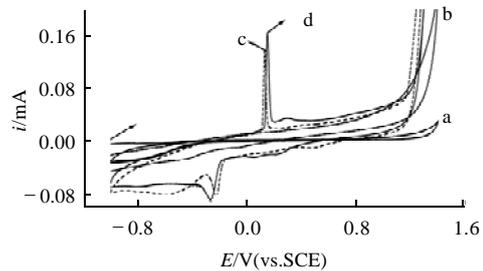
2.3 [Fe(CN)₆]³⁻ 在类分子印迹 - 纳米多孔膜上的交流阻抗(R_{ct})表征



1.0mmol/L K₃[Fe(CN)₆]/0.1mol/L PBS (pH7.0)。
图6 WGE(a)、Qu/WGE(b)、Ag/Qu/WGE(c)、MEL-MIP/WGE (d) and MIP/WGE(e)的 电化学交流阻抗图
Fig.6 EIS plots of WGE, Qu/WGE, Ag/Qu/WGE, MEL-MIP/WGE and MIP/WGE

由图 6 可见, 由于聚鞣皮素修饰在 WGE 表面, 增加了 [Fe(CN)₆]³⁻ 传质的阻力, Qu/WGE(b)的 R_{ct} 明显大于 WGE(a)的; 当纳米银沉积到 Qu/WGE 时, 改善了电极的导电性, Ag/Qu/WGE(c)的 R_{ct} 明显小于 Qu/WGE (b)的; 而曲线 d 中, 未除去三聚氰胺的分子印迹膜使 [Fe(CN)₆]³⁻ 的电子传递变得困难, MEL-MIP/WGE(d)的 R_{ct} 明显大于 Ag/Qu/WGE(c)的; 随着三聚氰胺的降解, 类分子印迹 - 纳米多孔膜的生成, [Fe(CN)₆]³⁻ 的电子传递得到了改善, MIP/WGE(e)的 R_{ct} 明显小于 MEL-MIP/WGE (d)的。

2.4 三聚氰胺的电化学检测

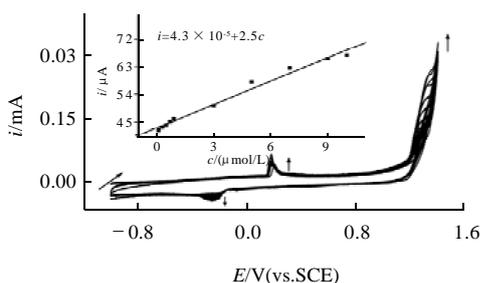


扫速 50mV/s、缓冲溶液 0.1mol/L PBS(pH7.0)、富集时间 140s。
图7 0.1mmol/L MEL 在 WGE(a)、MIP-Qu/WGE(b)、MIP-MIP/WGE (d)上和 MEL-MIP/WGE(c)在空白 PBS 中的 CV 图
Fig.7 CV plots of 0.1 mmol/L MEL on WGE, MIP-Qu/WGE and MIP-MIP/WGE, and CV plots of MEL-MIP/WGE in blank PBS at pH 7.0

实验以 7.0 µmol/L 三聚氰胺为探针, 研究了不同体积膜混合液构成的类分子印迹 - 纳米多孔膜修饰电极

(MIP/WGE)对三聚氰胺检测的影响。在电极上分别涂布 10~50 μL 的膜混合液,富集时间为 180s,实验发现:在添加 MEL 前后, MIP/WGE 上 0.17V 处的氧化峰电流差值(Δi)随着膜混合液体积的增加而增大,在 20 μL 时到达最大值,之后成平衡趋势,所以选用 20 μL 为最佳膜混合液体积。实验也调查了富集时间对三聚氰胺检测的影响。在相同条件下,随着富集时间的增加, MIP/WGE 上 0.17V 处峰电流差值 Δi 逐渐增加,在 140s 处到达最大值,之后呈平衡趋势,240s 后 Δi 降低 5%,可能是传质阻力增大所致,所以选用 140s 为最佳富集时间。

由图 7 可见,三聚氰胺在 WGE 和 Qu/WGE 上均没有出现明显的氧化还原峰;然而,相对于 MIP/WGE 在空白溶液中的曲线 c,当三聚氰胺存在时,0.14V 处的氧化峰明显增高,表明 MIP/WGE 对三聚氰胺的氧化有电催化作用,这为三聚氰胺在该修饰电极上的电化学检测提供了依据。



扫速 50mV/s、缓冲溶液 0.1mol/L PBS (pH7.0)、富集时间 140s。

图 8 不同浓度的 MEL 在 MIP/WGE 上的 CV 图(插图: MEL (0.17V) 的浓度与氧化峰电流的线性关系)

Fig.8 CV plots of MEL at various concentrations on MIP/WGE with a graph inserted as a plot showing the linear relationship between MEL concentration and oxidation peak current

由图 8 可见,随着 MEL 浓度的逐渐增加, MIP/WGE 上 0.17、1.33V 和 -0.23V 处的峰电流均逐渐增大。MEL 在 0.17V 处的氧化峰电流差值 Δi 与其浓度在 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内呈现良好的线性关系(插图),线性方程为: $\Delta i = 4.3 \times 10^{-5} + 2.5c$, $r = 0.992$,检出限为 $1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ (3σ), $n = 3$ 。

研究将 MIP/WGE 用于鲜奶样品中 MEL 的测定。鲜奶经以下步骤进行预处理^[4]:称取 5g 鲜奶,加入 5mL 61mmol/L Cl_3CCOOH 和 35mL 4.9mol/L CH_3OH ,混合超声 15min,在转速 10000r/min 的离心机上,离心 10min 后取上清液,使用粒径为 0.45 μm 的滤网膜过滤,获得测定所需的样品溶液。目前,市场销售的鲜奶不含

MEL,实验将不同体积的 MEL 标准液直接加入样品液中,通过标准加入法计算出 MEL 的浓度。表 1 显示:测得的 0.17V 处,氧化峰电流差值的回收率均在(100 \pm 5)% 以内,表明该测定方法是可靠的。

表 1 鲜奶样品中三聚氰胺的测定

Table 1 Spike recoveries for MEL in a blank liquid milk sample

样品	MEL 浓度/ $\mu\text{mol/L}$			回收率/%
	原始值	添加量	检测量	
1	0.00	0.90	0.94	104.4
2	0.00	7.00	7.10	101.4
3	0.00	9.00	8.98	99.7

注:检测量为 3 次测定平均值。

2.5 电极的干扰和稳定性

实验以 7.0 $\mu\text{mol/L}$ 三聚氰胺为探针,研究不同可能共存的物质对 MEL 测定的影响。研究结果发现 1000 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ ; 500 倍葡萄糖、丙氨酸、络氨酸、精氨酸、谷氨酸和牛血清白蛋白; 300 倍的 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 Ac^- ; 100 倍的抗坏血酸和尿酸不干扰 MEL 的测定。表明该修饰电极对 MEL 的测定具有良好的选择性。

实验以 7.0 $\mu\text{mol/L}$ 三聚氰胺为探针,研究 MIP/WGE 的稳定性和重现性。在冰箱保存 10d 后, MEL 在 MIP/WGE 上的电流响应为初始电流响应的 97%,保存 30d 后,其电流响应为初始电流响应的 87%。每次测定后,将 MIP/WGE 置于 0.1mol/L PBS(pH7.0)溶液中,1.4V 下恒电位降解 300s 以去除吸附的 MEL。实验发现采用该法处理的电极,5 次独立测定的峰电流差值(0.17V)相对标准偏差为 2.9%。

3 结论

研究建立在充蜡石墨电极上,原位制备类分子印迹-纳米多孔膜的方法。FE-SEM 图显示该膜的厚度为(100 \pm 10)nm,孔的直径为(100 \pm 50)nm。电化学研究表明:该类分子印迹-纳米多孔膜修饰电极对三聚氰胺具有良好的选择性吸附作用,可用于三聚氰胺在实际样品中的测定,从而为三聚氰胺的检测提供了一种较好的方法。

参考文献:

- [1] FILIGENZI M S, PUSCHNER B, ASTON L S, et al. Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(17): 7593-7599.
- [2] OGASAWARA H, IMAIDA K, ISHIWATA H, et al. Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation[J]. Carcinogenesis, 1995,

- 16(11): 2773-2777.
- [3] YAN Na, ZHOU Lei, ZHU Zaifang, et al. Determination of melamine in dairy products, fish feed, and fish by capillary zone electrophoresis with diode array detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(3): 807-811.
- [4] CAO Qiao, ZHAO Hong, ZENG Lixi, et al. Electrochemical determination of melamine using oligonucleotides modified gold electrodes[J]. Talanta, 2009, 80(2): 484-488.
- [5] LI Ping, HUANG Ying, XIANG Shixue, et al. Study on the determination of melamine by the single sweep polarography[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 1993, 29(5): 270-272.
- [6] LIANG Rongning, ZHANG Ruiming, QIN Wei. Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 141(2): 544-550.
- [7] ZHU Hong, ZHANG Songxin, LI Meixian, et al. Electrochemical sensor for melamine based on its copper complex[J]. Chemical Communications, 2010, 46(13): 2259-2261.
- [8] JIN Guanping, PENG Xua, CHEN Qunzhi. Preparation of novel arrays silver nanoparticles modified polyrutin coat-paraffin-impregnated graphite electrode for tyrosine and tryptophan's oxidation[J]. Electroanalysis, 2008, 20(8): 907-915.
- [9] EL-SAYED W S, EL-BAZ A F, OTHMAN A M. Biodegradation of melamine formaldehyde by *Micrococcus* sp. strain MF-1 isolated from aminoplastic wastewater effluent[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006, 57(2): 75-81.
- [10] KRESGE C T, LEONOWICA M E, ROTH W J, et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism[J]. Nature, 1992, 359: 710-712.
- [11] DEKANSKI A, STEVANOVIĆ J, STEVANOVIĆ R, et al. Glassy carbon electrodes: II. Modification by immersion in AgNO₃[J]. Carbon, 2001, 39(8): 1207-1216.
- [12] FENG Daming, ZHOU Zhengmao, BO Meiping. An investigation of the thermal degradation of melamine phosphonite by XPS and thermal analysis techniques[J]. Polymer Degradation and Stability, 1995, 50(1): 65-70.
- [13] SUN Xuefei, WANG Shuguang, LIU Xianwei, et al. The effects of pH and ionic strength on fulvic acid uptake by chitosan hydrogel beads[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, 324(1/3): 28-34.
- [14] ONO S, FUNATO T, INOUE Y, et al. Determination of melamine derivatives, melame, meleme, ammeline and ammelide by high-performance cation-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 815(2): 197-204.