

孔雀石绿分子印迹电化学传感器的制备与应用

韦寿莲¹ 吴嘉喻¹ 黄象金^{*2} 谢春生¹

¹(肇庆学院环境与化学工程学院, 肇庆 526061) ²(肇庆市食品检验所, 肇庆 526060)

摘 要 以孔雀石绿(MG)为模板分子,通过电聚合邻苯二胺,在多孔碳纳米纤维(PCNF)修饰的玻碳电极表面制备了可特异性识别 MG 的分子印迹传感器。采用差分脉冲伏安法(DPV)、循环伏安法(CV)和电化学阻抗法(EIS)表征了传感器的电化学性能,优化了 PCNF 的滴涂量、模板分子与功能单体的摩尔比、CV 扫描圈数、洗脱剂、洗脱时间、样品溶液 pH 值及孵化时间等实验参数。在最佳条件下,DPV 峰电流强度与 MG 浓度在 0.10 ~ 10.0 nmol/L 范围内呈良好的线性关系,检出限为 0.042 nmol/L (3S/k)。此传感器具有良好的选择性、重现性和稳定性。将本方法应用于市售新鲜草鱼及养殖水样品中 MG 的含量测定,加标回收率为 82.0% ~ 96.5%。

关键词 分子印迹电化学传感器; 电聚合; 多孔碳纳米纤维; 孔雀石绿

1 引言

孔雀石绿(Malachite green, MG)是一种阳离子三苯甲烷染料,因其对鱼类的真菌和寄生虫感染有很好的抑制作用,曾在水产养殖中被用作抗菌和抗寄生虫药^[1]。MG 很容易被鱼组织吸收,并大部分被代谢成亲脂的隐色孔雀绿,它在鱼组织中可持续存在很长时间^[2]。MG 及其代谢物对人类具有致畸、致癌和致突变作用,许多国家禁止在水产养殖和水产品中使用 MG^[3,4]。但因 MG 的抗菌效果显著、价格低,在一些地区仍被用于水产养殖,给水体、鱼类产品和人体健康造成危害。因此,建立灵敏、准确、简便的 MG 检测方法具有重要的意义。

目前,MG 的检测方法包括高效液相色谱^[5,6]、液相色谱-质谱联用技术^[7,8]、毛细管电泳法^[9]、表面增强拉曼光谱法^[10]和电化学方法^[11,12]等。其中电化学方法具有响应快、灵敏度高、操作简单和易于微型化等优点,特别适合于常规分析。分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymers, MIPs)是一种人工合成聚合物,拥有与模板分子的尺寸、形状和功能基团互补的印迹位点,对模板分子具有高亲和力和选择性,因其具有稳定性好、可重复利用、造价低廉等优点,在电化学传感领域具有良好的应用前景^[13~15]。已有文献报道将分子印迹技术与电化学分析法相结合用于不同样品中痕量 MG 的高选择性测定。如 Huang 等^[16]开发了一种分子印迹电化学发光法,用于检测鱼类样品中的微量 MG,检出限为 7.3 ng/kg。尽管 MIPs 在提高选择性方面具有很好的优势,但在电化学检测中其灵敏度较低。因此,各种纳米材料被用于修饰电极以提高电极的有效比表面积、电子传递速率和电催化活性^[17],从而提高分子印迹电化学传感器的检测灵敏度。纳米碳纤维具有稳定性好、比表面积大、电导性高等优良性能,在电化学分析中受到越来越多的关注^[18,19]。尤其是以细菌纤维素为碳源制备的多孔碳纳米纤维(Porous carbon nanofiber, PCNF),因其较强的机械强度、高孔隙率和廉价易得而备受关注,并且已被作为电极修饰材料应用于重金属离子的高灵敏电化学检测^[20]。

本研究以细菌纤维素为碳源制备了 PCNF 材料,并以其作为电极增敏材料。以 MG 为模板分子,邻苯二胺为功能单体,通过电聚合法在 PCNF 修饰的玻碳电极上合成 MG 的 MIPs,构建了 MG 分子印迹电化学传感器,并用于实际样品中 MG 的测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM, 荷兰 Philips 公司); Tristar 3000 比表面积分析仪(BET, 美国 Micromeritics 公司); CHI660E 电化学工作站(上海辰华仪器公司)。采用三电极体系, 玻碳电极(Glassy carbon electrode, GCE, 直径为 2 mm)或其修饰电极为工作电极, 铂丝为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极。

MG 标准品(上海阿拉丁试剂有限公司); 乙腈(色谱纯, 上海安谱公司); 邻苯二胺、 $K_3[Fe(CN)_6]$ (分析纯, 广州化学试剂厂); 酸性 Al_2O_3 、盐酸羟胺(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 其它试剂均为分析纯。实验用水为超纯水。0.2 mol/L PBS 缓冲溶液由 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 配制; 0.05 mol/L 乙酸铵缓冲溶液由乙酸铵和乙酸配制; 0.2% (w/w) 壳聚糖溶液由 1% (V/V) 乙酸溶液配制。

2.2 实验方法

2.2.1 PCNF 的制备 使用超纯水将细菌纤维素洗至中性, 冷冻干燥 24 h。将干燥后的细菌纤维素放至管式炉中, 在氮气保护下进行程序控温热处理, 升温速率为 $10^\circ C/min$, 在 $800^\circ C$ 下碳化 2 h, 得到 PCNF 材料。

2.2.2 分子印迹电极及非印迹电极的制备 在麂皮上用 $0.5\ \mu m$ 的 Al_2O_3 粉末将玻碳电极打磨抛光, 然后依次用无水乙醇、水冲洗干净, 晾干。称取 5 mg PCNF 于 5.0 mL 0.2% 壳聚糖溶液中, 超声混匀, 制得 1.0 mg/mL 的 PCNF 分散液。吸取 4.0 μL PCNF 分散液滴涂于处理好的玻碳电极表面, 在红外灯下烘干, 即得到 PCNF 修饰电极(PCNF/GCE)。将 PCNF/GCE 置于 10 mL PBS 缓冲液(pH 7.0)中, 此缓冲液含有 1.0 mmol/L MG 和 4.0 mmol/L 邻苯二胺。以 PCNF/GCE 为工作电极, 铂丝为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 在 0~0.8 V 电压范围内, 以 100 mV/s 循环扫描 20 圈, 形成 MG 印迹膜。将聚合后的电极置于 80% (V/V) 的甲醇-乙酸混合液中搅拌洗脱 25 min, 去除模板分子, 即获得 MG 分子印迹电化学传感器(MIPs/PCNF/GCE)。非印迹电化学传感器(NIPs/PCNF/GCE)按上述同样步骤制备, 但不加 MG。

2.2.3 电化学测试 将印迹电极在 MG 溶液中孵育 20 min, 取出电极, 用超纯水冲洗电极表面, 采用电化学测试。每次测试完成后将电极置于 20% (V/V) 的乙酸-甲醇溶液中进行洗脱 25 min, 再用水冲洗干净, 待继续使用。差分脉冲伏安法(DPV)、循环伏安法(CV)和电化学阻抗(EIS)测试采用三电极体系, 在含 0.10 mol/L KCl 的 5.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行。DPV 扫描电位为 -0.2~0.6 V, 电位增量为 4 mV, 振幅为 50 mV, 脉冲周期为 0.5 s; EIS 频率范围为 0.1 Hz~100 kHz, 振幅为 5 mV。

2.2.4 样品制备 养殖水样取自肇庆市周边的鱼塘。水样经 $0.22\ \mu m$ 滤膜过滤后进行电化学检测。草鱼从肇庆当地市场购买。鱼去皮, 取可食部分切片, 匀浆。称取 5.00 g 样品于 50 mL 离心管中, 依次加入 1.5 mL 0.25 g/mL 盐酸羟胺溶液、3.5 mL 0.05 mol/L 乙酸铵缓冲溶液(pH 4.5), 涡旋 30 s。然后加入 10 mL 乙腈涡旋提取 10 min, 再加入 5 g 酸性 Al_2O_3 和 2 g NaCl, 涡旋 2 min, 以 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。再用 10 mL 乙腈重复提取残渣, 合并上清液, 于 $40^\circ C$ 下氮气吹至近干, 用纯净水溶解, 定容至 10.0 mL, 经 $0.22\ \mu m$ 滤膜过滤后, 采用本方法进行检测。

3 结果与讨论

3.1 PCNF 的表征

由 PCNF 的透射电镜图(图 1A)可见, PCNF 的直径为 20~80 nm, 大量 PCNF 相互交错形成多孔的网状结构, 这些互通的孔隙为电解质离子提供了充足的扩散通道。 N_2 吸脱附等温曲线见图 1B, 此 N_2 吸脱附等温线属于典型的 IV 类曲线, 在相对压力为 0.45~0.97 下具有明显的 H2 滞后环, 说明 PCNF 存在介孔结构; 在较高的相对压力(0.97)下, 曲线尾部急剧上升, 这是由于 PCNF 间形成的大孔中 N_2 的多层吸附引起的^[21], 这些大孔可在透射电镜图中观察到。根据 N_2 吸脱附等温曲线计算得到 PCNF 的比表面积为 $687\ m^2/g$ 。由图 1B 插图可知, PCNF 具有窄的孔径分布, 集中在 3 nm 附近。

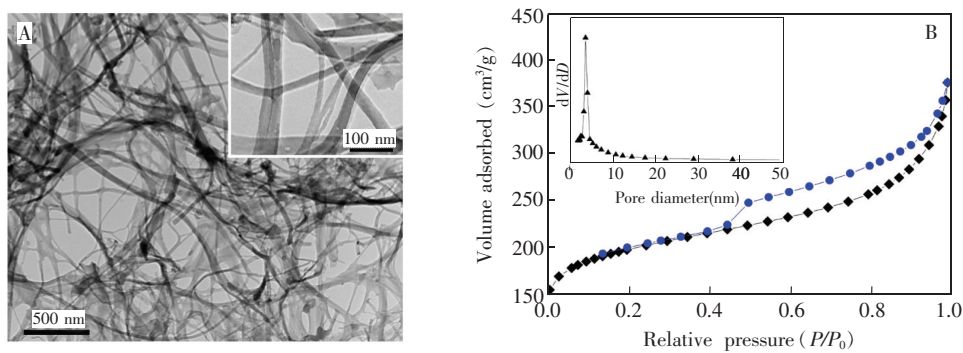


图 1 (A)PCNF 的透射电镜图; (B)PCNF 的 N₂ 吸脱附曲线,插图为孔径分布图

Fig.1 (A) Transmission electron microscope (TEM) image and (B) N₂ adsorption-desorption isotherms of porous carbon nanofiber (PCNF). Inset in B is pore diameter distribution of PCNF

3.2 电聚合制备分子印迹膜

图 2 为含 MG 的聚合液在 PCNF/GCE 表面电聚合过程的 CV 曲线。由 CV 曲线可知,邻苯二胺的电聚合是一个不可逆的氧化过程,峰电流随着电聚合圈数增加而显著减小,这是由于电极表面形成了致密的不导电聚合膜,阻碍了电极与溶液之间的电子转移。插图为不加 MG 的邻苯二胺电聚合的 CV 曲线,与电聚合制备 MIPs 的 CV 曲线相比无明显差异,说明 MG 在 0~0.8 V 电聚合过程中无电活性。

3.3 分子印迹传感器的电化学表征

3.3.1 差分脉冲伏安法表征 图 3 为不同电极在含有 0.10 mol/L KCl 的 5.0 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]溶液的 DPV 曲线。由图可见,PCNF/GCE(曲线 f)的[Fe(CN)₆]^{3-/4-}峰电流远高于裸玻碳电极(曲线 c),这是由于修饰的 PCNF 材料提高了电极的导电性及活性表面积; PCNF/GCE 表面电聚合了分子印迹膜后,无明显电流峰(曲线 a),说明修饰电极表面已被致密的非导电聚合膜覆盖,阻碍了[Fe(CN)₆]^{3-/4-}向电极表面扩散;洗脱模板分子后的印迹电极出现了一个较大的电流峰(曲线e),是因为分子印迹膜形

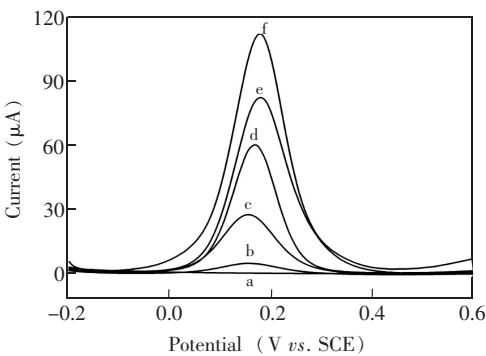
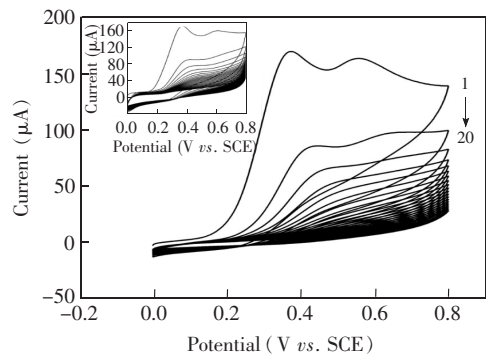


图 2 含 MG 聚合液的电聚合制备 MIPs 的循环伏安图,插图为不含 MG 聚合液的电聚合制备 NIPs 的循环伏安图,扫速为 100 mV/s

Fig. 2 Cyclic voltammograms (CV) of electropolymerization process for preparation of molecularly imprinted polymers (MIPs) in the presence of malachite green (MG). Inset is CV curves of electropolymerization for preparation of non-molecularly imprinted polymers (NIPs) in the absence of MG. Scan rate is 100 mV/s.

图 3 不同电极的差分脉冲伏安图:(a) 未洗脱模板的 MIPs/PCNF/GCE; (b) NIPs/PCNF/GCE; (c) GCE; (d) 在 10 nmol/L MG 溶液中孵化 5 min 的 MIPs/PCNF/GCE; (e) 洗脱模板后的 MIPs/PCNF/GCE; (f) PCNF/GCE

Fig.3 Differential pulse voltammograms (DPV) of (a) MIPs/PCNF/glassy carbon electrode (GCE) before removal of the template; (b) NIPs/PCNF/GCE; (c) GCE; (d) MIPs/PCNF/GCE after incubated in 10 nmol/L MG solution for 5 min; (e) MIPs/PCNF/GCE after removal of the template and (f) PCNF/GCE

成大量的印迹孔穴,使 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 可以到达电极表面发生氧化还原反应而产生电流信号;将洗脱模板分子的印迹电极重新吸附 MG,其峰电流明显下降(曲线 d),原因是 MG 占据了部分印迹孔穴,导致印迹电极表面的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 扩散通道减少。非印迹电极(曲线 b)由于 NIPs 膜的非导电特性和无印迹位点而产生很弱的 DPV 电流响应。

3.3.2 电化学阻抗表征 电化学阻抗是表征电极表面电子转移动力学的一种有效方法。在 EIS 谱图中,高频区半圆的直径等于电子转移电阻 R_{ct} 。图 4 为不同电极的电化学阻抗图谱,可见裸电极具有较小的电子转移电阻(337 Ω , 曲线 b),而 PCNF/GCE 的电子转移电阻显著减小(31 Ω , 曲线 a),说明 PCNF 的引入促进了电极与电解质之间的电子传递;非印迹电极(4473 Ω , 曲线 f)和未洗脱模板(5214 Ω , 曲线 e)的印迹电极由于表面覆盖了非导电聚合膜,阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电子传递,导致电子转移电阻急剧增大;洗脱模板分子后,印迹膜表面形成大量印迹孔穴,有利于 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的渗透和电子转移,印迹电极的电子转移电阻显著减小(960 Ω , 曲线 c);重新吸附 MG 后的印迹电极的电子转移电阻明显增加(1956 Ω , 曲线 d),说明一部分印迹孔穴又被堵塞,致使电子传递受阻,与 DPV 表征结果相符。

3.3.3 循环伏安法表征 在含有 0.10 mol/L KCl 的 5.0 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中,洗脱模板后的 MIPs/PCNF/GCE 的循环伏安曲线见图 5,可见随着扫描速率增加,峰电流逐渐增大。阳极峰电流(i_{pa})和阴极峰电流(i_{pc})与扫描速率的平方根呈良好的线性关系,线性方程分别为 $i_{pa} = 5.828v^{1/2} + 6.815$ ($R^2 = 0.9989$) 和 $i_{pc} = -6.511v^{1/2} - 14.074$ ($R^2 = 0.9996$),说明 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在 MIPs/PCNF/GCE 上的电化学反应是一个扩散控制过程^[22]。

3.4 实验条件的优化

3.4.1 PCNF 涂覆量的影响 考察了玻碳电极上修饰不同用量(0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 μL) PCNF 的响应电流变化,结果表明,当 PCNF 涂覆量为 4.0 μL 时,PCNF 修饰电极上的峰电流最大,即 4.0 μL 为 PCNF 的最佳用量。

3.4.2 模板分子与功能单体摩尔比的影响 传感器制备过程中模板分子与单体的摩尔比影响印迹膜中印迹位点的数量,进一步影响传感器的再结合和识别性能。在含有固定浓度 MG(0.10 mmol/L)和不同浓度邻苯二胺(摩尔比为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:10、1:20 和 1:40)的电聚合溶液中制备了不同的传感器。结果表明,模板分子与单体摩尔比为 1:4 的传感器具有最大的响应电流。当摩尔比大于 1:4 时,响应电流较小,这是因为单体的数量太少,不能结合足够的模板分子。而过量的单体可能占据了电极表面,使得有效的识别位点减少,因而响应电流减小。因此,模板分子与单体的最佳摩尔比为 1:4。

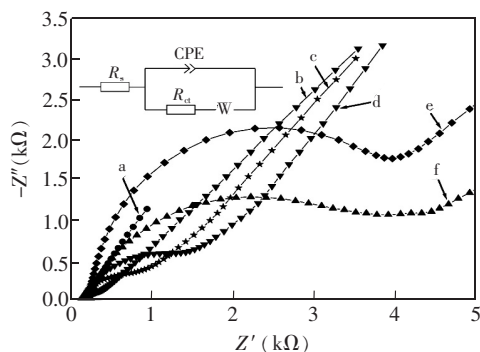


图 4 不同电极的电化学阻抗图:(a) PCNF/GCE; (b) GCE; (c) 洗脱模板后的 MIPs/PCNF/GCE; (d) 在 10 nmol/L MG 溶液中孵化 5 min 的 MIPs/PCNF/GCE; (e) 未洗脱模板的 MIPs/PCNF/GCE; (f) NIPs/PCNF/GCE; 插图为电化学阻抗图的等效电路图

Fig. 4 Electrochemical impedance spectra of (a) PCNF/GCE, (b) GCE, (c) MIPs/PCNF/GCE after removal of the template, (d) MIPs/PCNF/GCE after incubated in 10 nmol/L MG solution for 5 min, (e) MIPs/PCNF/GCE before removal of the template, and (f) NIPs/PCNF/GCE. Inset is the equivalent circuit model for impedance spectra.

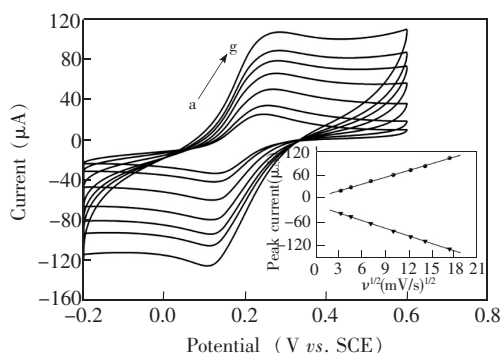


图 5 MIPs/PCNF/GCE 在不同扫描速率的循环伏安图,插图为峰电流与扫描速率的平方根的线性关系

Fig. 5 CV curves of MIPs/PCNF/GCE at different scan rates (a to g: 10, 20, 50, 100, 150, 200 and 300 mV/s). Inset is the linear relationship between peak currents and square root of scan rate.

3.4.3 扫描圈数的影响 电聚合扫描圈数会影响聚合膜的厚度,从而影响传感器的灵敏度和稳定性。考察了不同聚合圈数的电极的性能。结果显示,当扫描圈数从5圈增加到20圈时,峰电流显著增加。当扫描圈数超过20圈时,峰电流随扫描圈数的增加而减小,可能是形成较厚的聚合膜,导致位于聚合物膜中心区域的模板分子不能完全去除。选择20圈作为最佳扫描圈数。

3.4.4 洗脱剂和洗脱时间的影响 模板分子洗脱直接影响印迹孔穴的数量,所选洗脱剂应尽可能将模板分子洗脱下来而不破坏印迹聚合物膜的结构。基于孔雀石绿易溶于水、乙醇和甲醇,而酸能够破坏模板分子与功能单体之间结合的氢键,选择纯水、无水乙醇、纯甲醇、10% (V/V) HAc 溶液、10% (V/V) HAc-乙醇溶液、10% (V/V) HAc-甲醇溶液、1.7 mol/L HCl 溶液为洗脱剂,考察洗脱模板分子后的印迹电极的电流响应。结果发现,10% (V/V) HAc-甲醇溶液和10% (V/V) HAc-乙醇溶液洗脱效果最好,其次是10% (V/V) HAc 溶液、纯甲醇、无水乙醇,再次是1.7 mol/L HCl,而纯水的洗脱效果最差。由于10% (V/V) HAc-甲醇溶液稍优于10% (V/V) HAc-乙醇溶液,因此选择其为洗脱剂进一步优化其配比。考察10%、20%、30%、40%、50% (V/V) 的 HAc-甲醇溶液洗脱模板分子的效果。结果发现,以20% (V/V) HAc-甲醇为洗脱液,印迹电极孵化前后的电流变化值最大,随 HAc 体积分数增大,电流变化值下降,可能是 HAc 与 MG 之间极易形成氢键,有利于模板分子洗脱,但 HAc 的用量过大可能破坏印迹膜的结构,使得印迹膜的印迹效果变差。故选择20% (V/V) HAc-甲醇溶液为洗脱液。同时考察印迹电极在20% (V/V) HAc-甲醇洗脱液中洗脱不同时间的效果。研究发现,随着洗脱时间增加,峰电流不断增大,当洗脱时间超过25 min 时,峰电流不再增大,这说明洗脱时间太短,印迹膜上的模板分子未能完全去除;洗脱时间达到25 min 时,模板分子已完全被洗脱下来;继续延长洗脱时间,不仅影响实验效率,还可能破坏印迹聚合物膜的结构。因此,选择洗脱时间为25 min。

3.4.5 样品溶液 pH 值的影响 以含10.0 nmol/L MG 的0.20 mol/L 磷酸盐溶液为样品溶液,考察印迹电极在 pH 4.5~8.5 的样品溶液中孵化对孔雀石绿的选择吸附效果。结果表明,在 pH 7.0 时峰电流降至最低,说明在中性溶液中吸附效果最好。这可能因为 MG 的 $pK_a=6.9$,当样品溶液 $pH < pK_a$ 时, MG 主要以阳离子为主要型体,聚合膜在酸溶液中因氨基得质子带正电,导致聚合膜对 MG 的吸附作用弱;当样品溶液 $pH > pK_a$ 时, MG 主要以中性分子形式存在,聚合膜上氨基在碱溶液中给出质子能力很弱,不利于聚合膜对 MG 的选择识别,导致 MG 的吸附弱。因此,印迹电极选择在中性样品溶液中孵育。

3.4.6 孵化时间的影响 将洗脱模板后的印迹电极置于10.0 nmol/L MG 溶液中,对孵化时间进行优化。结果显示,峰电流随孵化时间的延长而减小,20 min 后峰电流趋于平稳,说明模板分子与印迹电极之间达到了吸附平衡。因此,选择孵化时间为20 min。

3.5 分子印迹传感器的分析性能

3.5.1 线性范围及检出限 在最优条件下,利用 MIPs/PCNF/GCE 对不同浓度的 MG 进行测试。如图6所示,DPV 峰电流随 MG 浓度的增加而逐渐减小,在0.10~10.0 nmol/L 浓度范围内,峰电流 (μA) 与 MG 浓度 (nmol/L) 呈良好的线性关系(图6插图),线性方程为 $i(\mu A) = -3.672c(\text{nmol/L}) + 79.39$ ($R^2=0.997$),检出限为0.042 nmol/L ($3S/k$),其中 S 为空白溶液测定8次的峰电流的标准偏差, k 为校准曲线斜率的绝对值。本方法的检出限低于大多数文献报道的电化学方法(表1),高于文献报道的 Ru (bpy)₃²⁺ 电化学发光法^[16],但其使用的发光试剂 Ru (bpy)₃²⁺ 价格昂贵。

3.5.2 选择性及干扰性 为了评价传感器的选择性,选择结晶紫、氯霉素、洛美沙星等几种常见的抗菌药物作为干扰物质。定义选择因子^[26] $K = \Delta i_i / \Delta i$,

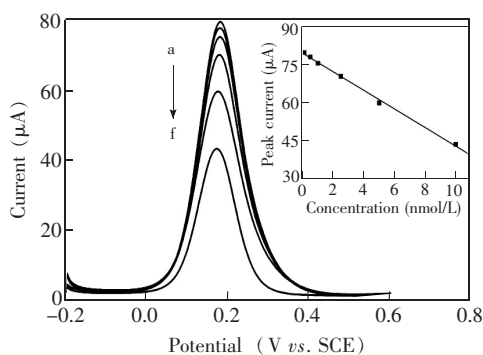


图6 MIPs/PCNF/GCE 测定不同浓度 MG 样品的 DPV 图,插图为峰电流与 MG 浓度的线性关系

Fig.6 DPV curves of MIPs/PCNF/GCE incubated with different concentrations of MG (a to f: 0.10, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 nmol/L). Inset is linear relationship between peak current and concentration of MG

表 1 不同电化学方法检测 MG 的比较
Table 1 Comparison of different electrochemical methods for MG detection

方法 Method	线性范围 Linear range	检出限 Detection limit	参考文献 Reference
GO/En/CPE	8 ~ 800 nmol/L	5.0 nmol/L	[11]
MWNT-DHP modified GCE	50 ~ 8000 nmol/L	6.0 nmol/L	[12]
Ru(bpy) ₃ ²⁺ -ECL	0.29 ~ 290 μg/kg	7.3 ng/kg	[16]
RAM-MIPs	32 ~ 1×10 ⁶ nmol/L	7.0 nmol/L	[23]
CPE adsorbed with SDBS	8 ~ 500 nmol/L	4.0 nmol/L	[24]
Ag/Cu-MOF-modified GCE	10 ~ 140 nmol/L	2.2 nmol/L	[25]
MIPs/PCNF/GCE	0.1 ~ 10 nmol/L	0.042 nmol/L	This work

GO: graphene oxide; En: ethylenediamine; CPE: carbon paste electrode; MWNT: multi-wall carbon nanotube; DHP: dihexadecyl hydrogen phosphate; ECL: electrochemiluminescence; RAM: restricted accessmedia; SDBS: sodium dodecylbenzenesulfonate; Ag/Cu-MOF: Cu-based metal-organic frameworks modified by silver.

其中, Δi_1 为空白电极产生的峰电流与存在干扰物质产生的峰电流的差值, Δi 为空白电极产生的峰电流与存在 MG 产生的峰电流差值, K 值越小, 证明印迹电极对模板分子的选择性越好。将洗脱模板分子后的印迹电极分别在 10.0 nmol/L 的结晶紫、氯霉素、洛美沙星中吸附 5 min 后, 进行 DPV 扫描。结晶紫、氯霉素、洛美沙星的选择因子分别为 0.47、0.22 和 0.15。尽管结晶紫与 MG 的结构相似度高, 使得印迹膜上的孔穴对结晶紫产生吸附, 产生一定的电流响应, 但未对 MG 的测定形成明显干扰, 表明印迹膜与 MG 的结合能力除了两者互补的官能团决定外, 印迹膜上的孔穴的空间结构对两者的结合作用也产生较大的影响。结果表明, 此传感器能够对 MG 进行特异性识别。同时也考察 NIPs/PCNF/GCE 对结晶紫、氯霉素、洛美沙星的电流响应。发现 NIPs 传感器对上述物质响应不灵敏, 对 MG 无特异性识别作用。

此外, 在 10.0 nmol/L MG 溶液中, 考察了一些可能共存的生物小分子和离子对 MG 测定的影响。结果表明, 200 倍的赖氨酸和葡萄糖, 500 倍的 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^{-} 、 PO_4^{3-} 对于 MG 的测定无显著影响(电流信号变化小于 5%), 表明所构建的传感器具有良好的抗干扰能力。

3.5.3 重现性和稳定性 在相同条件下制备的 5 支印迹电极分别对 2.0 nmol/L MG 溶液进行测定, 测得峰电流的相对偏差(RSD)为 7.2%。同一支印迹电极平行测定 6 次, RSD 为 3.6%。将 5 支印迹电极保存于 4℃ 下, 10 天后再对 2.0 nmol/L MG 溶液测定, 电流响应为初始响应值的 91%, 表明此电极有良好的重现性和稳定性。

3.6 实际样品分析

将 MIPs/PCNF/GCE 用于市售新鲜草鱼及养殖水样中的 MG 检测, 草鱼及养殖水样中未检出 MG。对实际样品进行了加标回收实验。由表 2 可知, 不同加标浓度下的回收率为 82.0% ~ 96.5%, RSD < 8.0%, 说明此方法对于不同基质样品中 MG 的测定具有较高的准确度和精密度, 可用于实际样品中 MG 的检测。

表 2 实际样品中 MG 的加标回收率实验结果
Table 2 Recovery of MG in real samples

样品 Sample	加标浓度 Added (nmol/L)	检测浓度 Found (nmol/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%, n=3)
草鱼 Grass carp	0.50	0.41	82.0	7.8
	2.00	1.75	87.5	4.3
	5.00	4.79	95.8	5.6
养殖水 Aquaculture water	0.50	0.44	88.0	4.9
	2.00	1.93	96.5	2.2
	5.00	4.68	93.6	3.7

4 结论

构建了一种基于 PCNF 的 MG 分子印迹电化学传感器。在 0.10 ~ 10.0 nmol/L 浓度范围内, MIPs/

PCNF/GCE 对 MG 表现出良好的线性响应,检出限为 0.042 nmol/L,低于大多数文献报道的电化学方法。此传感器不仅对 MG 具有较高的灵敏度和选择性,而且具有良好的重现性和稳定性,为 MG 提供了一种简单、经济、灵敏的电化学检测方法。将此传感器用于检测市售新鲜草鱼及养殖水样品中 MG 含量,结果令人满意,有望应用于实际样品中 MG 残留量的检测。

References

- 1 LIU Ming-Yang, XIAO Shan-Shan, YU Bing, YANG Chun-Guang, ZHAO Jing-Hong, JIN Yan, ZHU Cheng-Yun. *Journal of Food Safety & Quality*, **2015**, 6(1): 35–40
刘名扬, 肖珊珊, 于兵, 杨春光, 赵景红, 金雁, 朱程云. 食品安全质量检测学报, **2015**, 6(1): 35–40
- 2 Bueno M J M, Herrera S, Uclés A, Agüera A, Hernando M D, Shimelis O, Rudolfsson M, Fernández-Alba A R. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 665(1): 47–54
- 3 Srivastava S, Sinha R, Roy D. *Aquat. Toxicol.*, **2004**, 66(3): 319–329
- 4 Li L, Peng A H, Lin Z Z, Zhong H P, Chen X M, Huang Z Y. *Food Chem.*, **2017**, 229: 403–408
- 5 Long C, Mai Z, Yang Y, Zhu B, Xu X, Lu L, Zou X. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(12): 2275–2281
- 6 WANG Li-Bo, SU Li-Qiang, HAN Chao-Nan, LÜ Yan-Rong. *Journal of Analytical Science*, **2018**, 34(2): 229–233
王丽博, 苏立强, 韩超男, 吕艳荣. 分析科学学报, **2018**, 34(2): 229–233
- 7 GONG Xiao-Ming, HUA Meng-Meng, WANG Hong-Tao, WANG Bing-Jun, MA Rong-Hui. *Journal of Instrumental Analysis*, **2017**, 36(7): 897–901
宫小明, 华萌萌, 王洪涛, 王炳军, 马荣桢. 分析测试学报, **2017**, 36(7): 897–901
- 8 Kwan P P, Banerjee S, Shariff M, Ishak N A S, Yusoff F M. *Food Control*, **2018**, 92: 101–106
- 9 Maxwell E J, Tong W G. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1020: 29–35
- 10 Xu K X, Guo M H, Huang Y P, Li X D, Sun J J. *Talanta*, **2018**, 180: 383–388
- 11 Zhang K, Song G, Yang L, Zhou J, Ye B. *Anal. Methods*, **2012**, 4(12): 4257–4263
- 12 Yi H, Qu W, Huang W. *Microchim. Acta*, **2008**, 160(1-2): 291–296
- 13 TANXue-Cai, WU Jia-Wen, HU Qi, LI Xiao-Yu, LI Peng-Fei, YU Hui-Cheng, LI Xiao-Yan, LEI Fu-Hou. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(3): 387–393
谭学才, 吴佳雯, 胡琪, 李晓宇, 李鹏飞, 余会成, 李小燕, 雷福厚. 分析化学, **2015**, 43(3): 387–393
- 14 Lu B, Xia J, Wang Z, Zhang F, Yang M, Li Y, Xia Y. *RSC Adv.*, **2015**, 5: 82930–82935
- 15 LI Ying, XU Wen-Kai, LI Ping, ZHU Xiao-Xue, HUANG Yan-Feng, ZHANG Ji-Mei. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(7): 1047–1054
李颖, 徐文凯, 李苹, 朱小雪, 黄艳凤, 张纪梅. 分析化学, **2018**, 46(7): 1047–1054
- 16 Huang B, Zhou X, Chen J, Wu G, Lu X. *Talanta*, **2015**, 42: 228–234
- 17 Yang B, Fu C, Li J, Xu G. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2018**, 105: 52–67
- 18 Sun J, Liu Y, Lv S, Huang Z, Cui L, Wu T. *Electroanalysis*, **2016**, 28(3): 439–444
- 19 Sakthivel M, Ramaraj S, Chen S M, Dinesh B, Ramasamy H V, Lee Y S. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1006: 22–32
- 20 Qin D, Gao S, Wang L, Shen H, Yalikun N, Sukhrobov P, Wagberg T, Zhao Y, Mamat X, Hu G. *Microchim. Acta*, **2017**, 184: 2759–2766
- 21 Yuan D, Huang X, Yan J, Yu W, Meng H, Rong J. *Sci. Adv. Mater.*, **2013**, 5(11): 1–7
- 22 Han S, Li B, Song Z, Pan S, Zhang Z, Yao H, Zhu S, Xu G. *Analyst*, **2017**, 142(1): 218–223
- 23 GAI Pan-Pan, GUO Zhi-Yong, DUAN Jing, ZHANG Hui-Na, WANG Sui, WEI Dan-Yi. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, **2010**, 23(8): 1062–1065
盖盼盼, 郭智勇, 段静, 张会娜, 王邃, 魏丹毅. 传感技术学报, **2010**, 23(8): 1062–1065
- 24 Huang W, Yang C, Qu W, Zhang S. *J. Electrochem.*, **2008**, 44(8): 946–951
- 25 Zhou Y, Li X, Pan Z, Ye B, Xu M. *Food Anal. Methods*, **2019**, 12(5): 1246–1256
- 26 LUAN Chong-Lin, LI Ming-Jie, LI Zhong-Jin, SU Xiu-Xia, JIANG Xiao-Hua. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, **2011**, 47: 885–893
栾崇林, 李铭杰, 李仲谨, 苏秀霞, 蒋晓华. 理化检验-化学分册, **2011**, 47: 885–893

Preparation and Application of Malachite Green Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer

WEI Shou-Lian¹, WU Jia-Yu¹, HUANG Xiang-Jin^{*2}, XIE Chun-Sheng¹

¹(College of Environmental and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

²(Zhaoqing Institute for Food Control, Zhaoqing 526060, China)

Abstract A molecularly imprinted electrochemical sensor for specific recognition of malachite green (MG) was prepared by electropolymerization of *o*-phenylenediamine on the surface of porous carbon nanofiber (PCNF) modified glassy carbon electrode with MG as template molecule. The electrochemical performance of the sensor was characterized by differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The experimental parameters, such as the amount of PCNF, molar ratio of template molecule to functional monomer, scan cycle of CV, eluent, elution time, pH value of sample solution and incubation time, were optimized. Under optimal conditions, the peak current was linear to MG concentration in the range of 0.10–10.0 nmol/L, with a detection limit of 0.042 nmol/L. The prepared sensor possessed excellent selectivity, reproducibility and stability, and was applied to the detection of MG in commercially available fresh grass carp and aquaculture water samples with recoveries of 82.0%–96.5%.

Keywords Molecularly imprinted electrochemical sensor; Electropolymerization; Porous carbon nanofiber; Malachite green

(Received 23 June 2019; accepted 19 November 2019)

This work was supported by the College Students' Innovative Entrepreneurial Training Program from Zhaoqing University (No. 201810580019) and the Science and Technology Planning Project of Zhaoqing City (No. 2018N017).