



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102323323 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110194327. 3

(22) 申请日 2011. 07. 12

(71) 申请人 南京医科大学

地址 210029 江苏省南京市汉中路 140 号

(72) 发明人 周学敏 姜慧君 李芸 文婷婷

袁丽华 周萍 王若禹 吴晓丽

王舒

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

代理人 徐冬涛 高原

(51) Int. Cl.

G01N 27/48 (2006. 01)

C25B 3/00 (2006. 01)

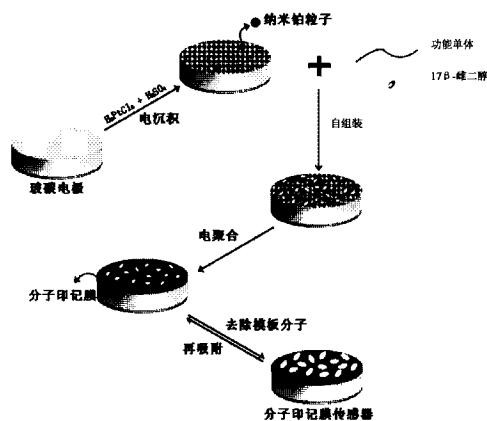
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种 17β-雌二醇分子印记膜电化学传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 17β-雌二醇分子印记膜电化学传感器的制备方法,该方法依次经过电极预处理、纳米铂粒子修饰电极、分子自组装膜修饰电极、电聚合反应以及模板分子洗脱步骤制备得到 17β-雌二醇分子印记膜电化学传感器。本发明制备的分子印记电化学传感器具有选择性高、响应快速、灵敏度高、稳定性和耐受性良好,可实现水样中痕微量 17β-雌二醇的高效、灵敏和实时检测,对环境污染监测有重要意义。



1. 一种 17β -雌二醇分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

a) 电极预处理:将玻碳电极抛光后,放入 Piranha 溶液中浸泡后洗净;

b) 纳米铂粒子修饰电极:将洗净的玻碳电极置于含硫酸和六氯铂酸的混合溶液中,于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内,以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环扫描 $3 \sim 28\text{min}$;然后依次用无水乙醇和去离子水淋洗,氮气吹干,再置于 Piranha 溶液中浸泡后,去离子水淋洗干净,氮气吹干,即得纳米铂粒子修饰电极;

c) 分子自组装膜修饰电极:将修饰电极浸入到含功能单体和 17β -雌二醇的四氢呋喃混合溶液中,充氮后密封,室温避光环境中放置 $16 \sim 24\text{h}$;其中, 17β -雌二醇和功能单体摩尔比为 $1 : 1 \sim 1 : 8$;

d) 电聚合反应:配制含功能单体、 17β -雌二醇和 KCl 的 PBS 溶液,氮吹 $20 \sim 30\text{min}$ 后,插入“c)”步骤得到的分子自组装膜修饰电极,于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围,以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环伏安扫描 $7 \sim 28$ 圈,取出,去离子水淋洗,氮气吹干;其中, 17β -雌二醇和功能单体摩尔比范围为 $1 : 1 \sim 1 : 48$ 。

e) 洗脱模板分子:将电聚合后电极浸入 H_2SO_4 溶液中,在 $0.2 \sim 1.0\text{V}$ 电位下处理 $5 \sim 10\text{min}$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“b)”中所述的混合溶液为含 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸和 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 六氯铂酸的混合溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“b)”中所述的循环扫描时间为 $15 \sim 25\text{min}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“c)”和“d)”中所述的功能单体为巯基类化合物。

5. 根据权利要求 4 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于所述的巯基类化合物为 6-巯基烟酸、4-巯基苯甲酸或 2-巯基嘧啶。

6. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“c)”中所述的混合溶液中,功能单体与 17β -雌二醇的摩尔比为 $2 : 1 \sim 4 : 1$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“d)”中所述的 PBS 溶液中含摩尔比为 $12 : 1 \sim 36 : 1$ 的功能单体与 17β -雌二醇。

8. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“e)”中所述的 H_2SO_4 溶液的浓度为 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

9. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“e)”中将电聚合后电极浸入 H_2SO_4 溶液中,在 $0.2 \sim 1.0\text{V}$ 电位下处理 5min 。

10. 根据权利要求 1 所述的分子印记膜电化学传感器的制备方法,其特征在于步骤“a)”中玻碳电极在 Piranha 溶液中浸泡 $2 \sim 5\text{min}$ 。

一种 17 β -雌二醇分子印记膜电化学传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析检测技术领域,具体涉及一种 17 β -雌二醇分子印记膜电化学传感器的制备方法。

背景技术

[0002] 随着人类生产活动的发展,大量有害化学物质不断进入人类生活环境中,环境雌激素的残留对人类健康造成很大的危害。早在 90 年代初,环境雌激素对人类生殖、发育的影响及与激素依赖性肿瘤和自身免疫性疾病等的关系引起社会和医学界的重视。其中内源性雌激素(雌二醇)具有强的生理活性,即使在极低浓度下(大多在 ppt ~ ppb 水平或更低)也会对生物产生极大的影响,因此雌二醇的检测与控制已经成为全球性关注的热点问题。我国国家自然科学基金委员会在 1997 年设立了有关环境雌激素方面的基金项目。

[0003] 目前,对实际样品中内源性雌激素的检测仍存在着许多困难与挑战。从以下分析可以看出雌二醇在环境中分析难度较大:(1) 水质、土壤等样品基体的组成复杂;(2) 在环境中的浓度极低;(3) 随着现代科技的迅速发展,各种新的检测分析仪器在适用性和灵敏度方面都有很大的提高,特别是带有质谱检测器的气相色谱和液相色谱的普及大大推动了雌二醇检测的进步,但仍需要繁杂样品前处理过程,难以做到快速分离和检测。因此迫切需要建立一种快速、简便、价廉且具有高灵敏度和高选择性的实时检测分析方法。

[0004] 传感器是一种重要的电子器件,因具设计简单、灵敏度高、价格低廉、且可实现在体检测等优点可满足临床诊断、环境分析、食品分析和产品检测的需要,从而越来越受到人们的关注,但选择性差成为其发展的瓶颈。目前用于测定雌激素的传感器多为生物传感器,虽具有较高的灵敏度和选择性,但天然的生物识别体系易受外界化学或物理环境的影响,使用条件要求较高,稳定性差,难以长期保存,检测对象有限,使其应用受到限制。

[0005] 1987 年 Tabushi 首次尝试用分子印迹聚合物作为敏感材料,并成功用于检测维生素。此后,分子印迹聚合物传感器引起了人们广泛的兴趣。分子印记聚合物(Molecular Imprinted Polymers, MIPs)是一种人工合成受体,因其具有良好的物理化学稳定性和对目标分子的高吸附量、高选择性,已被广泛应用于食品药品和环境有害残留物的分离、富集及测定。尤其是能耐受高温、高压、酸碱、有机溶剂等优点被认为是生物分子的理想替代物,成为传感器敏感材料的研究热点。因此,分子印记技术和传感器研究相结合将获得相得益彰的效果。

[0006] 目前大多分子印记电化学传感器的制备是通过电沉积法或滴涂法使分子印记聚合物附着在电极上,其膜厚难以控制,均匀性较差,从而影响了传感器的灵敏度。另外,传统本体聚合法合成的分子印记聚合物普遍存在多数结合位点被埋藏、易产生模板分子残留、吸附容量低、印记空穴不稳定和目标分子传质过程缓慢等问题。

[0007] 表面分子印记技术,是将模板分子以一定作用力结合到刚性无机材料上制备对特定目标分子(模板分子)具有特异预定选择性聚合物的过程。其印记结合位点均在材料表面,具有更多的结合位点,表现出高的选择性和快的吸附动力学等特点。电聚合法通过化学

键作用在电极表面直接成膜,具有速度快、膜厚可控和膜稳定好等优点。因此,电聚合法是制备分子印记传感器敏感膜最有潜力的方法。目前已有电聚合法分子印记膜电化学传感器的研究,但电聚合法制备雌二醇自组装分子印记膜电化学传感器未见报道。

[0008] 另外,2009年王富生科研小组的发明专利(CN101650334A)公开了:“用于双酚A的分子印记膜检测装置及其制备、检测方法”制备方法。它采用了“相似相容”原理,将电极浸于乙醇和水中浸泡3-6小时去除模板分子。但该方法洗脱时间较长。

发明内容

[0009] 本发明针对上述现有技术的不足,通过表面分子印记技术、纳米技术与电化学传感器的交叉研究,基于纳米金属修饰电极,采用电聚合法制备出稳定的雌二醇自组装分子印记膜电化学传感器,并根据静电斥力和氢键在酸性溶液中易断裂的机理快速去除模板分子。本发明方法制备得到的高灵敏度、高选择性特性的自组装分子印记膜电化学传感器可实现水样中痕微量雌二醇的快捷、灵敏和实时检测,对环境污染监测有重要意义。

[0010] 本发明的目的是通过以下方式实现的:

[0011] 一种17 β -雌二醇(E2)分子印记膜电化学传感器的制备方法包括以下步骤:

[0012] a) 电极预处理:将玻碳电极经抛光后,放入Piranha溶液中浸泡后洗净;本发明所述的Piranha溶液为30% H₂O₂:浓H₂SO₄=3:7, V/V。

[0013] b) 纳米铂粒子修饰电极:将洗净的玻碳电极置于含硫酸和六氯铂酸的混合溶液中,于-0.2~0.6V电位范围内,以50mV·s⁻¹的扫描速率循环扫描3~28min;然后依次用无水乙醇和去离子水淋洗干净,氮气吹干,再置于Piranha溶液中浸泡后,去离子水淋洗干净,氮气吹干,即得纳米铂粒子修饰电极;Piranha溶液中浸泡时间可为3~8min。

[0014] c) 分子自组装膜修饰电极:将修饰电极浸入到含功能单体和17 β -雌二醇的四氢呋喃混合溶液中,充氮后密封,室温避光环境中放置16~24h;其中,17 β -雌二醇和功能单体摩尔比为1:1~1:8;

[0015] d) 电聚合反应:配制含功能单体、17 β -雌二醇和KCl的PBS溶液,氮吹20~30min后,插入“c)”步骤得到的自组装膜修饰电极,于-0.2~0.6V电位范围,以50mV·s⁻¹的扫描速率循环伏安扫描7~28圈,取出,去离子水淋洗,氮气吹干;其中,17 β -雌二醇和功能单体摩尔比范围为1:1~1:48。

[0016] e) 洗脱模板分子:将电聚合后电极浸入H₂SO₄溶液中,在0.2~1.0V电位下处理5~10min。

[0017] 步骤“b)”中所述的混合溶液优选为含0.5mol·L⁻¹硫酸和5mmol·L⁻¹六氯铂酸的混合溶液,所述的循环扫描时间优选为15~25min,最优选20min。步骤“c)”和“d)”中所述的功能单体可为巯基类化合物,优选6-巯基烟酸、4-巯基苯甲酸或2-巯基哌啶,最优选6-巯基烟酸。步骤“c)”中所述的混合溶液中功能单体与17 β -雌二醇的摩尔比优选为2:1~4:1,最优选为2:1,该混合溶液最优选采用含6mmol·L⁻¹6-巯基烟酸和3mmol·L⁻¹17 β -雌二醇的四氢呋喃混合溶液。

[0018] 步骤“d)”中所述的PBS溶液中优选含摩尔比为12:1~36:1(最优为24:1)的功能单体与17 β -雌二醇,最优选为含6mmol·L⁻¹6-巯基烟酸,0.25mmol·L⁻¹17 β -雌二醇和0.1mol·L⁻¹KCl的PBS溶液。步骤“e)”中步骤“e)”中优选将电聚合后电极浸入

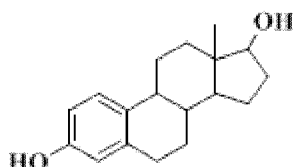
H₂SO₄ 溶液中,在 0.2 ~ 1.0V 电位下处理 5min。所述的 H₂SO₄ 溶液的浓度优选为 0.5mol · L⁻¹。

[0019] 步骤“a)”中玻碳电极可在 Piranha 溶液中浸泡 2 ~ 5min。所述的抛光可为玻碳电极经 0.05 μm 的 Al₂O₃ 悬浊液抛光。

[0020] PBS 溶液是 0.05mol/L 的磷酸二氢 (KH₂PO₄) 和 0.05mol/L 的磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 水溶液配制成一定 pH 值的缓冲溶液。本发明中优选采用 pH6-7 的缓冲溶液,最优选是 pH 值 6.86 的缓冲溶液。

[0021] 使用的模板分子为 17β-雌二醇,英文名为 17β-Estradiol,结构式为:

[0022]



[0023] 本发明通过以下方法对本发明电化学传感器进行检测:

[0024] 电化学检测方法和条件:

[0025] 循环伏安法 (CV) 法:检测电位范围为 -0.2 ~ 0.6V,扫描速率为 50mV · s⁻¹。测试底液为 0.1mol · L⁻¹ KCl 和 1mmol · L⁻¹ 铁氰化钾溶液。

[0026] 差示脉冲法 (DPV) 法:测试底液为含 0.1mol · L⁻¹ KCl 的 PBS 溶液 (0.05mol · L⁻¹, pH6.86),检测电位范围为 0.2 ~ 1.0V,扫描速率为 50mV · s⁻¹,电位增量为 0.005V,振幅为 0.05V,脉冲宽度为 0.05s,采样宽度为 0.0167s,静止时间为 2s。测试前电极在 H₂SO₄ 溶液中清洗至背景电流恢复。为使吸附完全,实验中选择 E2 富集时间为 4min,温度均控制在 (25 ± 5) °C。

[0027] 样品测定:

[0028] 取本市某医院妇科处理前后用水和自来水,过滤除去固体杂质,将其作为溶剂配制 pH6.86 的 PBS (0.05mol · L⁻¹) 溶液,采用 DPV 法测定三份样品中 E2 的浓度。

[0029] (一) 以下通过优化实验条件的选择进一步说明本发明的技术方案:

[0030] 1、电沉积时间对纳米铂修饰电极影响

[0031] 纳米铂沉积的厚度可由沉积时间控制,以 1mmol · L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] 为探针分子,循环伏安响应值为指标,考察电极电沉积最佳时间。图 2 中循环伏安响应随着沉积时间的延长逐渐增大,在 20min 达到最大值表明纳米铂粒子显著增加了电极的电传导性能。但沉积时间的继续延长循环伏安响应反而降低,可能是因产生的膜太厚阻碍了电极与电解液之间电子传递。结果表明 20min 为最佳电沉积时间。图 2 内插图 of 电沉积扫描过程图,可见在电压 -0.1V 处,氧化还原峰响应值随着沉积时间的延长逐渐增大。

[0032] 2、功能单体和模板分子反应摩尔比

[0033] (1) 单体与模板分子的摩尔比直接影响分子印记膜中印记孔穴的形成及识别位点的量,进而影响其吸附性能。在自组装过程中加入模板分子,通过氢键作用使 E2 选择性组装到电极表面,有利于在电极表面形成有效的印记位点,使 MIS 对目标物有更好的吸附性。取浓度为 6mmol L⁻¹ 的 MNA 溶液,配制 E2 和 6-巯基烟酸 (MNA) 摩尔比为 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 6 和 1 : 8 的四氢呋喃系列组装液,在不同配比组装液中分别制备传感器 (MIS)。采用 DPV 法检测电极对 PBS 溶液中 E2 (50 μmol · L⁻¹) 的响应,均可响应。而当摩尔比为 1 : 2 ~

1 : 4 时, MIS 电流响应值较大。而当摩尔比为 1 : 2 时, MIS 电流响应值最大。

[0034] (2) 在电聚合过程中补充加入模板分子, 可有效增加印记位点, 提高 MIS 对 E2 的响应灵敏度。取浓度为 6mmol L^{-1} 的 MNA 溶液, 配制 E2 和 MNA 摩尔比为 1 : 1, 1 : 6, 1 : 12, 1 : 24, 1 : 36 和 1 : 48 的 PBS 系列溶液, 分别制备 MIS。采用 DPV 法检测电极对 PBS 溶液中 E2 ($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的响应。结果表明, 当摩尔比为 1 : 12 ~ 1 : 36 时, 电聚合形成的分子印记膜响应较大, 摩尔比为 1 : 24 时, 电聚合形成的分子印记膜响应最大。摩尔比低于 1 : 1 时, 响应值很低, 推测因单体比例相对较高, 单位体积中印记孔穴和识别位点数相应减少, 同时过高交联程度造成模板分子很难到达印记孔穴, 使响应减弱。摩尔比高于 1 : 48 时, 单体量不能满足有效印记孔穴和识别位点形成, 使响应降低。优选择 E2 和 MNA 摩尔比 1 : 24 为最佳比例。

[0035] 3、电聚合圈数对印记膜厚的影响

[0036] 聚合物膜的厚度可以通过电聚合循环扫描的圈数来控制。图 3 为不同圈数制得的 MIS 在含 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ E2 的 PBS 溶液中 DPV 响应。实验结果表明, 循环扫描 10 圈制得的电极性能最好。聚合圈数少于 7 圈时, 形成的印记孔穴和识别位点相对较少、电流响应值低; 聚合圈数多于 28 圈, 尽管产生的印记位点量增多, 但因膜太厚, 印记位点的可接近性差, 阻碍了 MIS 与电解液之间电子的传递, 电流响应值降低。

[0037] 4、模板分子的洗脱

[0038] 模板分子是否彻底洗脱对电极的测定结果有着重要的影响。传统的洗脱方法往往采用有机溶剂或缓冲溶液淋洗电极, 这些方法一般需要的时间长, 且不能够完全除去模板分子。本发明根据静电斥力和氢键在酸性溶液中易断裂的机理, 将电聚合后电极浸入 H_2SO_4 溶液中, 在 $0.2\sim 1.0\text{V}$ 电位下处理 $5\sim 10\text{min}$ 使聚合膜上形成正电荷聚集, E2 酚羟基上的氧在酸性溶液中可吸氢使其带正电荷, 从而发生静电斥力, E2 脱离识别孔穴。优选 H_2SO_4 溶液的浓度为 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在酸性溶液中氢键作用将被破坏, 自组装的 E2 分子可从分子印记膜孔穴中逸出。

[0039] (二) MIS 制备过程的表征

[0040] 1、MNA 修饰电极和 E2 预组装傅里叶红外表征

[0041] 红外分析表明, 自组装过程中, MNA 上 S-H 键断裂, S 因与 Pt 有较强的亲和作用, 而形成稳定的 Pt-S 键, 使 MNA 固定在 GCE 表面, 2541cm^{-1} 处为 -SH 的伸缩振动吸收峰, 自组装形成 Pt-S 键后该处的 -SH 吸收峰完全消。此外, 3420cm^{-1} 和 1382cm^{-1} 分别为 O-H 和 C=O 的伸缩振动, -H 伸缩振动发生红移至 3380cm^{-1} ; C=O 的伸缩振动轻微移向高波数至 1400cm^{-1} , 表明 MNA 上的羧基和 E2 上羟基的氢键作用使 E2 聚集到电极表面。

[0042] 2、PtNPs 修饰电极和 MIS 膜的扫描电子显微镜表征

[0043] 因玻碳电极无法直接进行 SEM 表征, 本发明在导电玻璃上采用实施例 1 方法制备了 PtNPs/GCE 和 MIS。采用 SEM 分别表征了 PtNPs 修饰导电玻璃 (图 4a, b) 和 MIS 膜导电玻璃 (图 4c, b)。从图中可以看出纳米铂呈球状, 均匀分散在导电玻璃表面。其粒径范围在 $50\sim 100\text{nm}$ 之间。电聚合反应后形成致密、有序分子印记膜, 其粒径明显增大, 且模板分子的去除使粒子表面显得较粗糙, 证明了印记孔穴的形成。

[0044] 3、MNA 在电极表面的电聚合

[0045] 在模板分子 E2 存在下, 修饰电极上 MNA 电聚合过程中的 CV 曲线见图 5。由图可

知, MNA 阳极峰电位为 0.45V ;且 MNA 在电极上的电化学反应是一个完全不可逆过程, 随着扫描圈数的增加, 峰电流明显下降, 最后趋向于一直线, 表明电聚合引发 MNA 形成了致密、弱导电性聚合膜, 并逐渐覆盖在电极表面上, 导致伏安响应受到抑制。

[0046] 4、MIS 制备过程的循环伏安表征

[0047] 以 $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 为探针分子, 采用 CV 法表征修饰电极制备过程中膜的电化学行为。纳米铂修饰后 (图 6b) MIS 的峰电流值较裸电极 (图 6a) 显著增加, 这是因为纳米铂增大了电极的催化活性。形成分子印记膜后峰电流明显降低 (图 6c), 是因电聚合时, 电位扫描产生自由基负离子, 在电极表面引发 MNA 聚合反应形成致密、有序的弱导电性聚合膜, 而模板分子被包埋于聚合膜中, 阻碍了探针分子到达电极表面发生电化学反应。洗脱模板分子后 (图 6d), 在聚合膜内形成了 E2 的特有识别孔穴, 这些带有识别位点的孔穴逐个相连并与电极表面接触, 使得探针分子可通过聚合膜到达电极表面发生氧化还原反应, 致使峰电流值增大。NIS (图 6e) 几乎没有电流产生, 进一步证实聚合膜为致密的、弱导电性膜。

[0048] 以上实验表明 MIS 具有以下优点: ①纳米铂具有高比表面积, 可容纳较多的结合位点, 其高催化活性可有效提高电化学传感器的灵敏度; ②分子印记的特异识别性大大提高电化学传感器的选择性; ③在纳米铂修饰电极上形成 MNA 和 E2 自组装膜, 增加表面有效印记位点, 并提高形成分子印记膜稳定性; ④用电聚合方法制备自组装分子印记膜, 克服了传统滴涂法和电沉积法制备的印记膜膜厚难控制所导致的传质和电荷传递慢、模板分子洗脱困难及检测限高等缺点, 且提高了膜稳定性。

[0049] (三) MIS 性能测试

[0050] 在扫描速度 $10\text{--}200\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的范围内, 考察了 E2 在 MIS 上的电化学反应, 结果表明 E2 在 MIS 上是一不可逆反应。

[0051] 1、静态吸附试验

[0052] 分别用 MIS 和 NIS 测试一系列浓度 ($0.500\text{--}250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) E2 标准溶液。如图 7 所示, 浓度为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 电流值变化趋于平缓, 认为此时识别位点几乎被全部占据, 表明印记空穴及活性结合位点对 E2 具有高度亲合力和特异的识别能力。NIS 几乎无电流变化, 提示可能因没有印记孔穴提供通道导致。

[0053] 2、选择性吸附试验

[0054] 电子在膜相中传递是由于电活性物质渗透进分子印记膜, 进而在电极表面发生氧化还原反应。识别过程中响应分子通过与识别孔穴的空间匹配作用、E2 分子上苯环与识别位点苯环间 $\pi-\pi$ 共平面作用及羟基和识别位点羧基间氢键的共同作用, 形成稳定的复合物, 而产生电化学反应。为证明聚合膜内的识别位点对模板分子具有特异选择性, 选择一组与 E2 结构具有不同类似度的化合物 (E3、EE、BPA 和 phenol) 分别进行选择吸附试验。具体方法为: 将 MIS 放入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 的 PBS 溶液, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 分别和 $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E3、EE、BPA 的混合 PBS 溶液中反应达到平衡, DPV 法扫描得到氧化峰电流值, 最后以浓度对峰电流值比值 (I_m/I_0) 作图, 其中 I_m 为 E2 在 0.65V 处的氧化峰, I_0 为干扰物共存时 E2 的氧化峰。如图 8-A 所示, 在高浓度的干扰物共存时, I_m/I_0 的波动范围在 0.95-1.03 内, 表明共存的结构类似物对 E2 的测定无明显干扰。

[0055] MIS 在 E2 和 10 倍浓度的干扰物 E3 共存的溶液中所获得的峰电流曲线与在 E2 溶液

中接近,如图 8-B 所示,说明结构类似物 E3 对 E2 的测定无明显干扰,进一步证实 MIS 对 E2 有良好的选择性。

[0056] (四) 样品测定方法学研究

[0057] 1、标准曲线与检测限

[0058] E2 的 DPV 氧化峰电流与其浓度在 3.0×10^{-8} – $5.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内呈良好的线性关系,线性回归方程为 $I_p = 0.6368C + 11.71$,相关系数 $r = 0.996$ 。

[0059] 由于铂纳米粒修饰而产生大的比表面积,铂优良的电传导和氧化催化活性,以及 MIS 具有的选择富集与吸附特性,使检测限 (LOD) 可达到 $1.6 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$),与已报道的传感器相比有更高的灵敏度,如表 1 所示。

[0060] 表 1 与其它检测方法的比较

	提取方法	分析方法	样品种类	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	参考文献
	C18/SPE	高效液相紫外法	水	160.0	[1]
	PMIPs/DSPE	高效液相紫外法	鸡肉组织	5.4	[2]
[0061]	Pt/MWNTs/GCE	方波伏安法	血清	51.9	[3]
	CNTs	方波伏安法	无蛋白血清	17.3	[4]
	/Ni(cyclam)/GCE				
	MIP/PtNPs/GCE	差式脉冲法	水	4.6	本发明实施例 1

[0062] SPE: 固相萃取; PMIPs/DSPE: 名义模板分子印记聚合物 / 分散式固相萃取; MWNTs: 多壁碳纳米管; CNTs: 多碳纳米管。

[0063] 2、MIS 的稳定性和重现性

[0064] 在本实验中,制备 5 根 MIS (按照实施例 1 方法),均置于 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 的 PBS 溶液中吸附后,在相同条件下测定,相对标准偏差为 2.9%;将其中一根 MIS 连续使用 50 次后,DPV 响应的相对标准偏差为 2.3%。由结果可以推测,目标分子与印记膜中的识别位点之间存在可逆的结合作用。说明 MIS 的可逆性、再生性和重现性都较好。

[0065] MIS 置于 PBS 溶液中 4°C 保存 35 天,间断性测定 5 次,电流响应降为初始时的 90%,说明 MIS 有较好的稳定性。另外,将 MIS 置于去离子水中超声 10min,其电流响应无明显变化,说明 MIS 有较好的耐受性。

[0066] 性能测试表明,本发明制备的 MIS 选择性高、响应快速、灵敏度高、稳定性和耐受性良好,实现了在水相中进行印记和识别,对环境水样品中的目标物选择性富集测定,获得了较好的准确度和精密度。MIS 可实现对环境水样品中 EES 实时快速检测,具有良好的应用前景。

[0067] 与现有技术比较本发明的有益效果:本发明首次以环境雌激素污染物 E2 为模板分子,结合自组装法、电聚合法、纳米材料和表面分子印记技术,在纳米铂修饰电极表面成功构建了 MNA 自组装膜分子印记电化学传感器,并成功应用于环境水样中痕微量雌激素的测定。本发明兼有纳米材料、分子印记聚合物和传感器的优点,吸附试验结果表明制得的传感器具有高吸附容量和高选择性,对结构相似的雌三醇和炔雌醇响应不灵敏,对结构差异较大的化合物几乎无响应。采用差势脉冲法,在含 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的 PBS 溶

液 ($0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH6.86) 中, $0.2 \sim 1.0\text{V}$ 电位范围内, 以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率, 利用制备的 MIS 直接测定医院妇科处理前后水和自来水, 结果分别为: 加样回收率测得回收率在 $95.37\% \sim 101.4\%$ 范围, $\text{RSD} < 3.69\%$ 。表明 MIS 可实现水样品痕微量雌激素的即时测定。并且, 测试样品无需复杂的前处理过程。

附图说明

[0068] 图 1 为 17β -雌二醇分子印记膜电化学传感器的制备工艺流程图。

[0069] 图 2 为 PtNPs/GCE 循环伏安电流响应图, 内插图 of 电沉积扫描过程图。

[0070] 图 3 为 MIS 在 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{E}_2$ 的 PBS 溶液中 DPV 响应图。

[0071] 图中, a \rightarrow d: 电聚合循环扫描的圈数分别为 7, 10, 14, 28 制得的 MIS 在含 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{E}_2$ 的 PBS 溶液中 DPV 响应。

[0072] 图 4 为电子显微镜扫描图: 放大 6000 倍 Pt 纳米粒子修饰导电玻璃 (a) 和 MIS 膜修饰导电玻璃 (b); 放大 15000 倍 Pt 纳米粒子修饰导电玻璃 (c) 和 MIS 膜修饰导电玻璃 (d)。

[0073] 图 5 为 MNA 在电极上电聚合过程图。

[0074] 图 6 为 (a) 裸电极, (b) PtNPs/GCE, (c) MIS 洗脱模板分子前, (d) MIS 洗脱模板分子后和 (e) NIS 在 $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 和 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{KCl}$ 混合溶液中的 CV 图。

[0075] 图 7 为 MIS 和 NIS 静态吸附曲线图。

[0076] 图 8-A 为 MIS 对 E_2 及其类似物选择性吸附试验 (E_2 峰电流值分别和 E_3 、 EE 、 BPA 及 phenol 共存时的峰电流值比值)。

[0077] 图 8-B 为 MIS 分别在 E_2 (a) 以及 E_2 与 10 倍浓度干扰物 E_3 共存 (b) 时的电流响应曲线。

具体实施方式

[0078] 药品和试剂: Al_2O_3 ($0.05\mu\text{m}$, 上海辰华仪器有限公司), 17β -雌二醇 (E_2 , 浙江仙琚制药股份有限公司), 双酚 A (Bisphenol, BPA, 国药集团化学试剂有限公司), 氯化钾 (KCl)、铁氰化钾 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (分析纯, 上海新宝精细化工厂), 无水乙醇、乙腈 (分析纯, 国家集团化学试剂有限公司), 六氯铂酸 (H_2PtCl_6 , 阿法埃莎化学有限公司), 苯酚 (phenol)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) (分析纯, 上海凌峰化学有限公司), 6-巯基烟酸、4-巯基苯甲酸、2-巯基嘧啶 (Sigma-Aldrich 公司), 浓盐酸 (HCl, 上海中试化工总公司), 四氢呋喃 (上海试四赫维化工有限公司), 硫酸 (H_2SO_4 , 上海化学试剂有限公司), 实验用水为二次蒸馏水。PBS 溶液是 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4$ 水溶液配制 pH 6.86 的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS)。

[0079] 实施例 1

[0080] (1) 玻碳电极预处理

[0081] 玻碳电极 ($\Phi = 3\text{mm}$) 经 $0.05\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浊液抛光后, 放入 Piranha 溶液 ($30\% \text{H}_2\text{O}_2$: 浓 $\text{H}_2\text{SO}_4 = 3:7$, V/V) 中浸泡 2min, 然后依次用无水乙醇、去离子水各超声清洗 2min。

[0082] (2) 纳米 Pt 粒子修饰玻碳电极

[0083] 将抛光洗净的玻碳电极 (GCE) 置于 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4 + 5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 溶液中,

于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内,以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环扫描 10min 电沉积 Pt,然后依次用无水乙醇和去离子水淋洗干净,氮气吹干,再置于 Piranha 溶液中浸泡 5min,去离子水淋洗干净,氮气吹干,即得纳米铂粒子修饰玻碳电极 (PtNPs/GCE),在 PBS 溶液中保存。

[0084] (3) 分子自组装膜修饰电极

[0085] 配制含 $6\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MNA 和 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 的四氢呋喃混合溶液,将纳米铂粒子修饰玻碳电极浸入到混合液中,充氮后密封,室温避光环境中保持 18h,完成自组装膜修饰电极。

[0086] (4) 电聚合法制备 MIS

[0087] 配制含 $6\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MNA, $0.25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 和 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的 PBS 溶液,氮吹 20min 后,插入自组装膜修饰电极,于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内,以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环伏安扫描 10 圈。取出,去离子水反复淋洗干净,氮气吹干。

[0088] 0.2V 恒电位下,在 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液中 5min,去除模板分子。取出,去离子水反复淋洗干净,氮气吹干,即得分子印记膜电化学传感器 (MIS)。MIS 的制备过程示意图 1。

[0089] 经 MIS 测定,医院妇科处理前水中 E2 的含量为 $32.94\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,医院妇科处理后水和自来水中均未检测出 E2。分别在已测 E2 含量的水样品中加入低、中、高 3 个浓度的 E2 标准溶液,进行加样回收率试验,每个样品平行测定 5 次。测得回收率在 $97.95\% - 101.4\%$ 范围, $\text{RSD} < 3.69\%$ (见表 2)。

[0090] 表 2 水样品中 E2 的含量测定 ($n = 5$)

[0091]

	测得量($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加入量($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加样回收率(%)	R.S.D. (%)
自来水	--	67.65	98.89	2.52
		135.3	99.34	2.73
		270.6	97.95	1.63
医院妇科处理前用水	32.94	17.13	98.90	3.69
		33.20	100.2	1.96
		66.54	98.32	2.01
医院妇科处理后用水	--	67.65	98.83	3.16
		135.3	99.71	2.94
		270.6	101.4	2.15

[0092] 实施例 2

[0093] (1) 玻碳电极预处理

[0094] 玻碳电极 ($\Phi = 3\text{mm}$) 经 $0.05 \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浊液抛光后,放入 Piranha 溶液 ($30\% \text{H}_2\text{O}_2 : \text{浓} \text{H}_2\text{SO}_4 = 3 : 7, \text{V/V}$) 中浸泡 5min,然后依次用无水乙醇、去离子水各超声清洗 2min。

[0095] (2) 纳米 Pt 粒子修饰玻碳电极

[0096] 将抛光洗净的 GCE 置于 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{H}_2\text{SO}_4 + 5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2PtCl_6 溶液中,于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内,以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环扫描 10min 电沉积 Pt,然后依次用无水乙醇和去离子水淋洗干净,氮气吹干。再置于 Piranha 溶液中浸泡 8min,去离子水淋洗干净,氮气吹干,即得纳米铂修饰玻碳电极 (PtNPs/GCE),在 PBS 溶液中保存。

[0097] (3) 分子自组装膜修饰电极

[0098] 配制含 $12\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MNA 和 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 的四氢呋喃混合溶液, 将修饰电极浸入到混合液中, 充氮后密封, 室温避光环境中保持 16h, 完成自组装膜修饰电极。

[0099] (4) 电聚合法制备 MIS

[0100] 配制含 $9\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MNA, $0.25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 和 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的 PBS 溶液, 氮吹 25min 后, 插入分子自组装膜修饰电极, 于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内, 以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环伏安扫描 7 圈。取出, 去离子水反复淋洗干净, 氮气吹干。

[0101] 0.2V 恒电位下, 在 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液中处理 5min, 去除模板分子。取出, 去离子水反复淋洗干净, 氮气吹干, 即得分子印记膜电化学传感器 (MIS)。

[0102] 经 MIS 测定, 医院妇科处理前水中 E2 的含量为 $29.73\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 医院妇科处理后水和自来水中均未检测出 E2。分别在已测 E2 含量的水样品中加入低、中、高 3 个浓度的 E2 标准溶液, 进行加样回收率试验, 每个样品平行测定 5 次。测得回收率在 $95.37\% - 97.93\%$ 范围, $\text{RSD} < 3.91\%$ 。

[0103] 实施例 3

[0104] (1) 玻碳电极预处理

[0105] 玻碳电极 ($\Phi = 3\text{mm}$) 经 $0.05\ \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浊液抛光后, 放入 Piranha 溶液 ($30\% \text{H}_2\text{O}_2 : \text{浓} \text{H}_2\text{SO}_4 = 3 : 7, \text{V/V}$) 中浸泡 3min, 然后依次用无水乙醇、去离子水各超声清洗 2min。

[0106] (2) 纳米 Pt 粒子修饰玻碳电极

[0107] 将抛光洗净的 GCE 置于 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{H}_2\text{SO}_4 + 5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2PtCl_6 溶液中, 于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内, 以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环扫描 28min 电沉积 Pt, 然后分别用无水乙醇和去离子水淋洗干净, 氮气吹干。再置于 Piranha 溶液中浸泡 3min, 去离子水淋洗干净, 氮气吹干, 即得纳米铂修饰玻碳电极 (PtNPs/GCE), PBS 溶液中保存。

[0108] (3) 分子自组装膜修饰电极

[0109] 配制含 $24\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基哌啶和 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 的四氢呋喃混合溶液, 将修饰电极浸入到混合液中, 充氮后密封, 室温避光环境中保持 24h, 完成自组装膜修饰电极。

[0110] (4) 电聚合法制备 MIS

[0111] 配制含 $12\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基哌啶, $0.25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 和 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的 PBS 溶液, 氮吹 15min 后, 插入自组装膜修饰电极, 于 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 电位范围内, 以 $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速率循环伏安扫描 28 圈。取出, 去离子水反复淋洗干净, 氮气吹干。

[0112] 0.2V 恒电位下, 在 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液中处理 5min, 去除模板分子。取出, 去离子水反复淋洗干净, 氮气吹干, 即得分子印记膜电化学传感器 (MIS)。

[0113] 经 MIS 测定, 医院妇科处理前水中 E2 的含量为 $33.01\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 医院妇科处理后水和自来水中均未检测出 E2。分别在已测 E2 含量的水样品中加入低、中、高 3 个浓度的 E2 标准溶液, 进行加样回收率试验, 每个样品平行测定 5 次。测得回收率在 $94.82\% - 97.40\%$ 范围, $\text{RSD} < 3.76\%$ 。

[0114] 实施例 4

[0115] (1) 玻碳电极预处理

[0116] 玻碳电极 ($\Phi = 3\text{mm}$) 经 $0.05\ \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浊液抛光后, 放入 Piranha 溶液 (30%

H₂O₂ : 浓 H₂SO₄ = 3 : 7, V/V) 中浸泡 3min, 然后依次用无水乙醇、去离子水各超声清洗 2min。

[0117] (2) 纳米 Pt 粒子修饰玻碳电极

[0118] 将抛光洗净的 GCE 置于 0.5mol · L⁻¹H₂SO₄+5mmol · L⁻¹H₂PtCl₆ 溶液中, 于 -0.2 ~ 0.6V 电位范围内, 以 50mV · s⁻¹ 的扫描速率循环扫描 3min 电沉积 Pt, 然后分别用无水乙醇和去离子水淋洗干净, 氮气吹干。再置于 Piranha 溶液中浸泡 5min, 去离子水淋洗干净, 氮气吹干, 即得纳米铂修饰玻碳电极 (PtNPs/GCE), PBS 溶液中保存。

[0119] (3) 分子自组装膜修饰电极

[0120] 配制含 3mmol · L⁻¹4- 巯基苯甲酸和 3mmol · L⁻¹E2 的四氢呋喃混合溶液, 将修饰电极浸入到混合液中, 充氮后密封, 室温避光环境中保持 20h, 完成自组装膜修饰电极。

[0121] (4) 电聚合法制备 MIS

[0122] 配制含 0.25mmol · L⁻¹4- 巯基苯甲酸, 0.25mmol · L⁻¹E2 和 0.1mol · L⁻¹KCl 的 PBS 溶液, 氮吹 20min 后, 插入自组装膜修饰电极, 于 -0.2 ~ 0.6V 电位范围内, 以 50mV · s⁻¹ 的扫描速率循环伏安扫描 10 圈。取出, 去离子水反复淋洗干净, 氮气吹干。

[0123] 0.2V 恒电位下, 在 0.5mol · L⁻¹H₂SO₄ 溶液中处理 10min, 去除模板分子。取出, 去离子水反复淋洗干净, 氮气吹干, 即得分子印记膜电化学传感器 (MIS)。

[0124] 经 MIS 测定, 医院妇科处理前水中 E2 的含量为 31.59nmol L⁻¹, 医院妇科处理后水和自来水中均未检测出 E2。分别在已测 E2 含量的水样品中加入低、中、高 3 个浓度的 E2 标准溶液, 进行加样回收率试验, 每个样品平行测定 5 次。测得回收率在 94.34% -97.93% 范围, RSD < 3.93%。

[0125] 参考文献

[0126] [1] Stafiej A, Pyrzynska K, Regan F. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection[J]. Journal of Separation Science, 2007, 30(7) :985-991.

[0127] [2] Wang S, Li Y, Wu X L, Ding M J, Yuan L H, Wang R Y, Wen T T, Zhang J, Chen L N, Zhou X M, Li F. Construction of uniformly sized pseudo template imprinted polymers coupled with HPLC-UV for the selective extraction and determination of trace estrogens in chicken tissue samples[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(2-3) :1513-1519.

[0128] [3] Lin X Q, Li Y X. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 22(2) :253-259.

[0129] [4] Liu X Q, Wong D K Y, Mica A. Electrocatalytic detection of estradiol at a carbon nanotube|Ni(Cyclam) composite electrode fabricated based on a two-factorial design[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 594(2) :184-191.

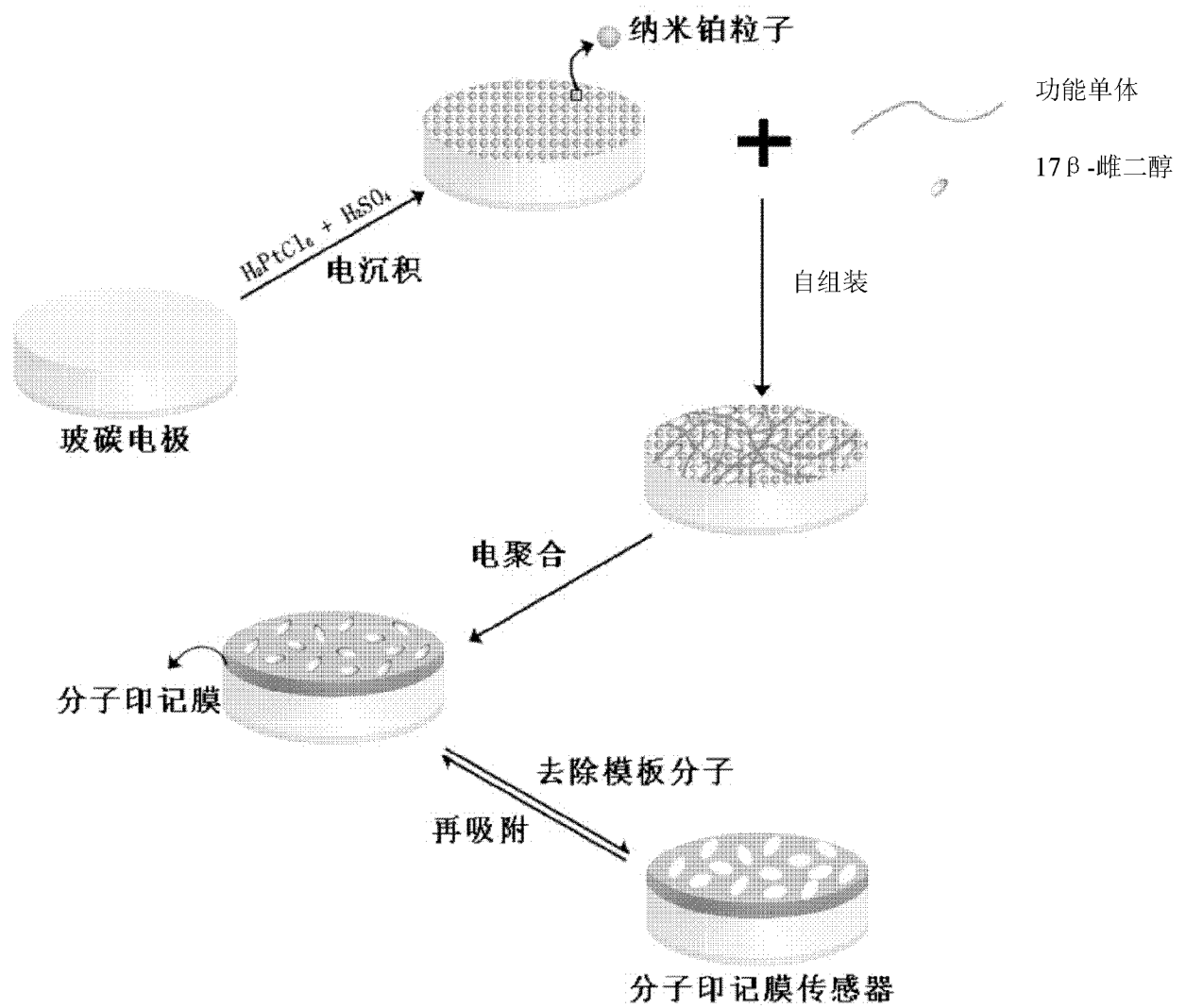


图 1

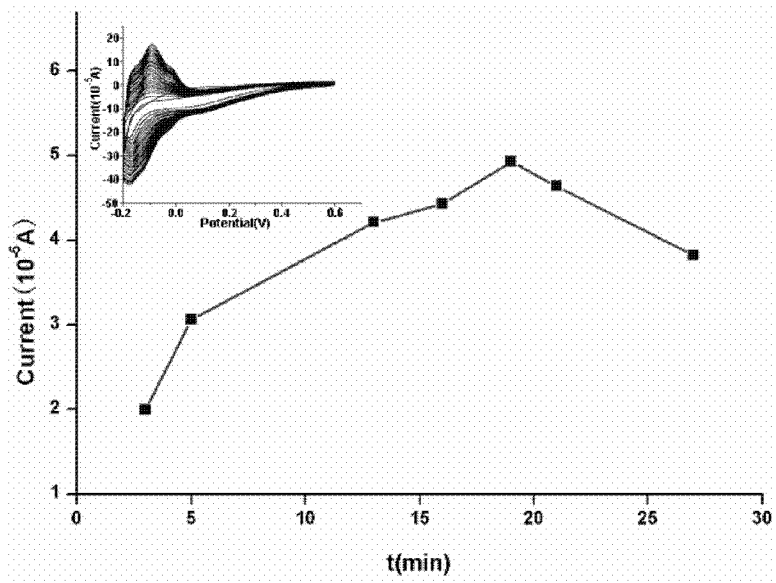


图 2

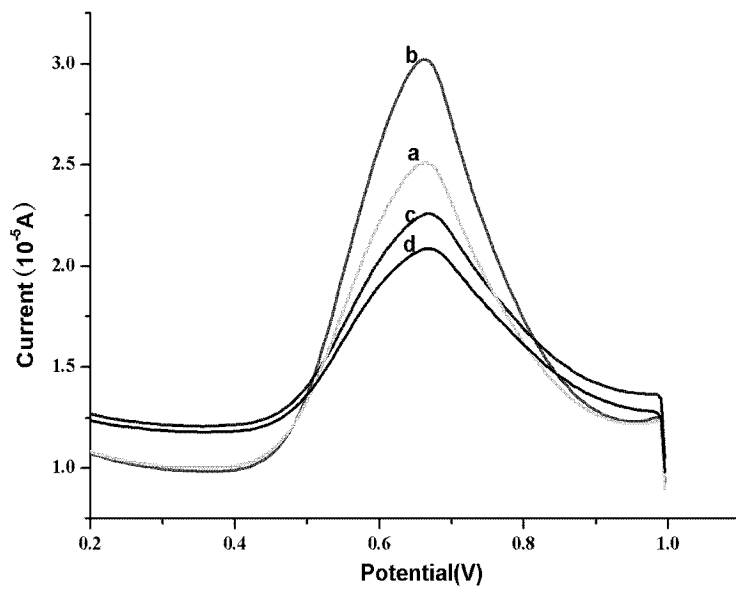


图 3

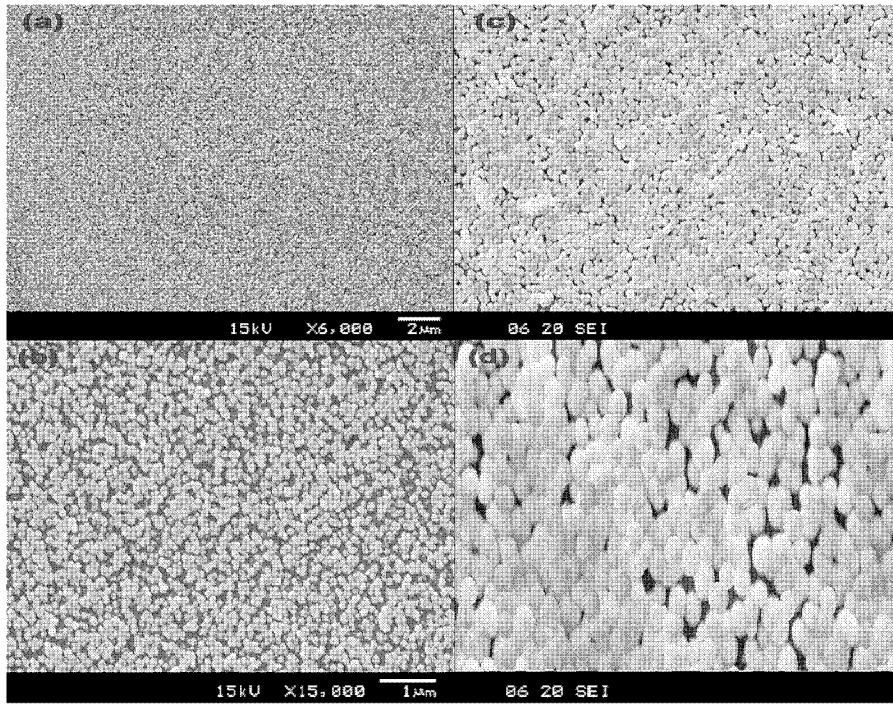


图 4

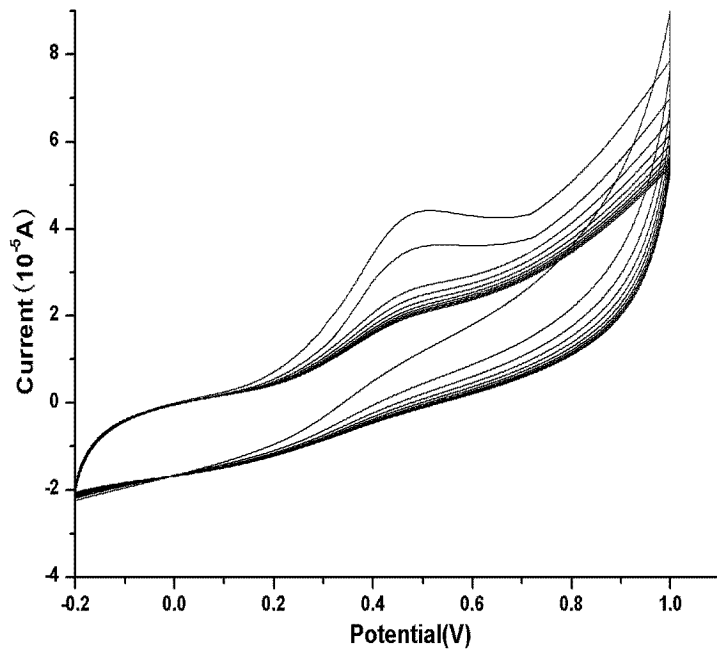


图 5

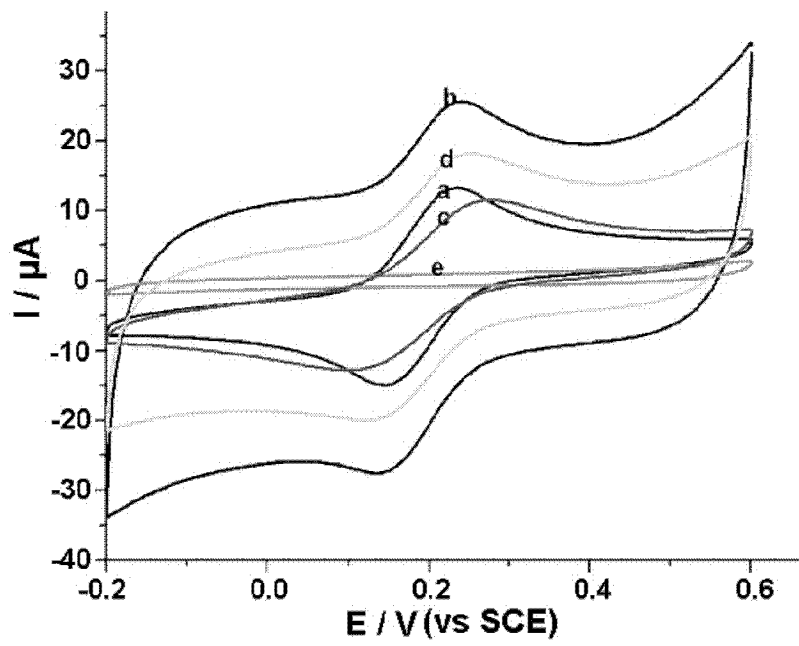


图 6

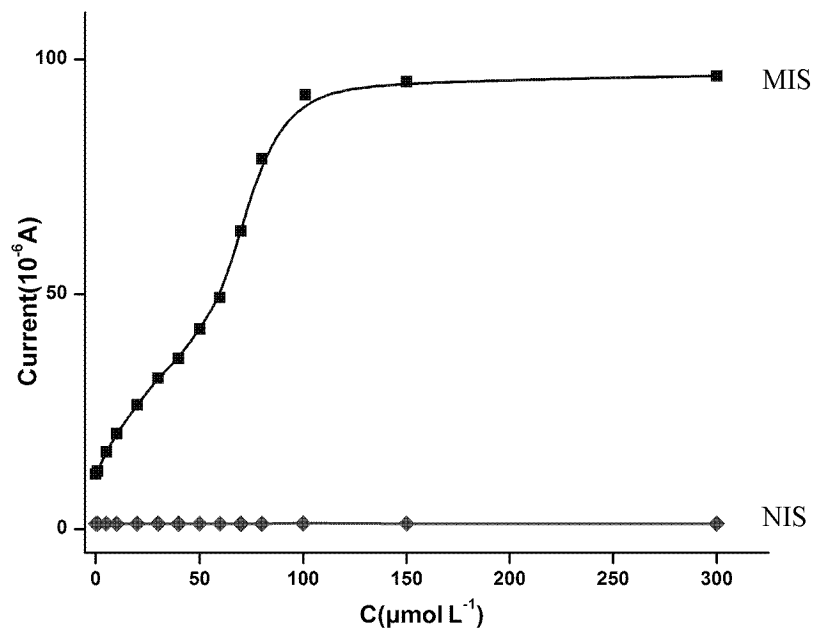


图 7

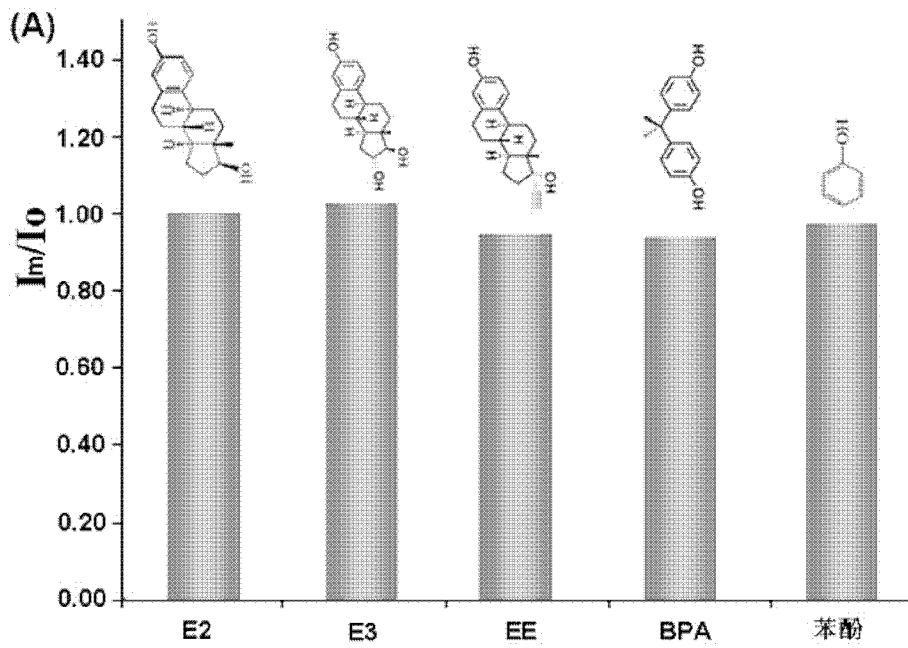


图 8-A

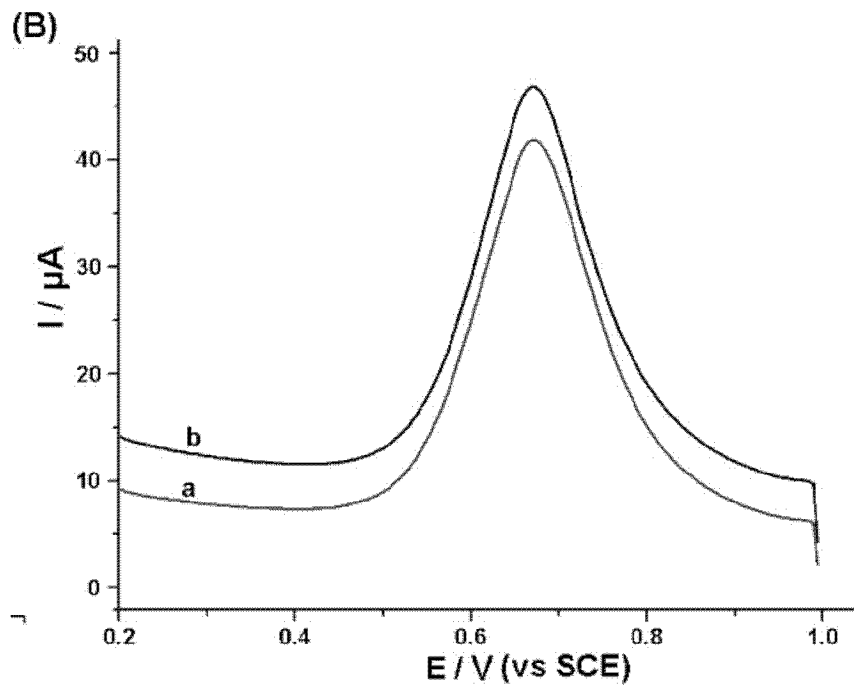


图 8-B