

链霉素分子印迹电化学传感器的制备及应用 ——推荐一个分析化学综合实验

冯佳蓉, 段焯堦, 楚楚, 谢德珍, 曹秋娥, 刘鹏*

云南大学化学科学与工程学院, 化学化工国家级实验教学示范中心(云南大学), 昆明 650091

摘要: 设计了一个将分子印迹技术引入到本科教学的探究性仪器分析综合实验。本实验首先通过电聚合法制备链霉素分子印迹电化学传感器(STR-MIM/GCE), 然后以循环伏安法和扫描电镜对传感器进行表征, 再以铁氰化钾为探针, 采用差分脉冲伏安法建立传感器测定链霉素的电化学分析方法, 并以牛奶为实际样品进行检测。本实验涉及电极表面的修饰与表征、电化学分析方法的建立与应用, 有助于拓宽学生思维, 激发科研兴趣, 同时实验所用试剂价廉易得, 不涉及大型仪器设备, 实验时长合理, 适合本科教学。

关键词: 分子印迹技术; 电化学传感器; 链霉素

中图分类号: G64; O6

Preparation and Application of a Streptomycin Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor: A Suggested Comprehensive Analytical Chemical Experiment

Jiarong Feng, Yejie Duan, Chu Chu, Dezhen Xie, Qiu'e Cao, Peng Liu *

School of Chemical and Technology, Yunnan University, National Demonstration Center for Experimental Chemistry and Chemical Engineering Education (Yunnan University), Kunming 650091, China.

Abstract: This paper outlines a comprehensive, inquiry-based instrumental analysis experiment to integrate molecular imprinting technology into undergraduate education. The experiment commences with the fabrication of a streptomycin molecular imprinting electrochemical sensor (STR-MIM/GCE) via the electropolymerization method. Subsequent characterization of the sensor employs cyclic voltammetry and scanning electron microscopy. Utilizing potassium ferricyanide as a probe, a differential pulse voltammetry technique is developed for the electrochemical quantification of streptomycin, with milk serving as a real-world sample for testing. This experiment involves the modification and characterization of electrode surface, alongside the development and application of electrochemical analysis methods. The experiment uses readily available and cost-effective reagents, avoids the need for sophisticated instrumentation, and is designed with a duration suitable for undergraduate coursework.

Key Words: Molecular imprinting technology; Electrochemical sensor; Streptomycin

1 引言

链霉素(Streptomycin, 简称STR)属于氨基糖苷类抗生素, 其化学结构如图1所示。当肺部感染结核杆菌时, 能用链霉素进行治疗^[1], 它能与细菌核糖体30S亚基中的S12核糖体蛋白和16S rRNA形成

收稿: 2024-01-05; 录用: 2024-03-11; 网络发表: 2024-04-12

*通讯作者, Email: pliu@ynu.edu.cn

基金资助: 云南大学2023年度教育教学改革研究项目(2023Y44); 云南省大学生创新创业训练项目(S202310673227)

不可逆的结合^[2], 这种作用机制是通过阻断转译过程来抑制蛋白质的合成, 从而抑制细菌的生长, 对于革兰氏阴性菌表现出很强的抑制活性^[3]。链霉素不仅用于人类对抗疾病, 还广泛应用于农业和畜牧业^[4]。然而, 超标的STR会对人体造成极大的副作用, 如耐药性、过敏反应、听力下降和肾脏毒性等, 因此, 发展食品、环境中链霉素的快速、简单分析检测方法非常必要。

目前, 国内外对于链霉素的分析检测方法主要有各类大型仪器分析法如液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、微生物检测法和免疫学检测法等^[5,6], 其中, 大型仪器分析法虽然灵敏度较高, 但操作复杂、分析成本高, 而且链霉素无紫外吸收, 往往需要经过繁琐的衍生化处理, 耗时费事; 微生物检测法易受环境干扰; 免疫学检测法在反应过程中可能会有交叉反应, 结果准确性难以保证。电化学分析法不需要大型的仪器设备, 是一种灵敏、准确且经济、简便的检测方法, 适合于食品、环境中链霉素的简单快速分析。但是, 电化学分析法的选择性有待提高, 而且链霉素在常规的电化学检测电位范围内没有电活性, 因此限制了其对食品、环境等复杂体系中链霉素的分析应用。

分子印迹技术(Molecular Imprinting Technology, MIT)是一种以目标分子为模板, 然后为其“量身定做”具有与其空间结构和官能团都互补的三维网络结构(称为印迹空穴)的高分子聚合物(称为分子印迹聚合物, Molecularly Imprinted Polymers, MIPs)的一种合成技术。因此, 分子印迹聚合物对目标分子具有高“预定”选择性, 能从复杂体系中选择性富集目标分子^[7,8]。将分子印迹聚合物作为识别元素引入电化学传感器中, 即形成了分子印迹电化学传感器(Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor, MIECS)。显然, 该传感器兼具了分子印迹技术和电化学传感器的优点, 不仅简单、快速、经济, 而且灵敏度高、选择性好, 能用于间接检测非电活性物质。

基于上述分析, 考虑到现有的本科实验中并没有涉及分子印迹技术以及间接电化学检测法的内容, 本实验以链霉素为研究对象, 通过制备链霉素分子印迹电化学传感器, 并基于该传感器采用间接电化学分析法测定复杂体系如牛奶中的链霉素, 丰富和补充现有的本科实验。实验以STR为模板分子, 邻苯二胺(o-PD)为功能单体, 磷酸缓冲溶液为聚合环境, 采用简单、可控的电聚合法在玻碳电极(GCE)表面构建聚合膜, 经洗脱模板分子链霉素后, 制备得到链霉素分子印迹电化学传感器(STR-MIM/GCE), 并应用于牛奶中STR的检测。本实验不仅锻炼了学生的动手能力, 而且实验所涉及的原理和应用具有普遍的指导意义, 在保证内容新的同时, 保证了内容的基础性、通用型和普适性, 适合本科生实验教学, 有助于锻炼学生的实践能力, 培养学生的科学素养, 激发学生的科研兴趣。

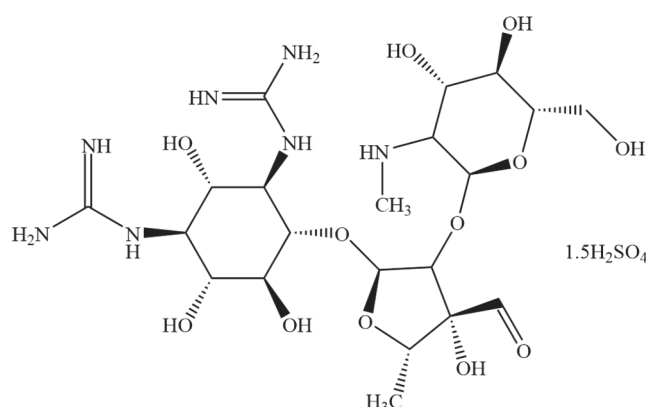


图1 硫酸链霉素的化学结构式

2 实验部分

2.1 实验目的

- (1) 掌握分子印迹技术的原理以及电聚合法制备分子印迹电化学传感器的方法;
- (2) 掌握差分脉冲伏安法的原理、相关操作和应用;

- (3) 加深对电化学工作站和循环伏安法的认识;
- (4) 了解电化学分析法在间接检测非氧化还原性物质方面的应用;
- (5) 基于分子印迹技术对目标分子的“预定”选择性, 培养基于目标导向的科研思维。

2.2 实验原理

链霉素是一种不具有电化学活性的物质, 因此不能通过电化学传感器对其进行直接检测。针对这一问题, 本实验设计以链霉素为印迹分子、邻苯二胺为聚合单体, 用循环伏安法(CV)进行电聚合制备得到链霉素分子印迹电化学传感器(STR-MIM/GCE), 使用铁氰化钾作为探针, 从而实现对链霉素分子的间接电化学检测, 进而将其应用到实际样品中STR的检测。实验原理如下:

(1) 分子印迹技术的原理: 分子印迹技术是以目标分子为模板分子(又称印迹分子), 然后为其“量身定做”含有能与目标分子匹配的印迹空穴的聚合物(分子印迹聚合物)的一种技术, 其制备过程如下: ① 在致孔剂中预聚合形成功能单体-模板分子复合物; ② 在交联剂、引发剂、光或热等作用下形成稳定的刚性聚合物; ③ 利用洗脱剂将模板分子从聚合物中脱除, 得到分子印迹聚合物(MIPs)。所以, MIPs中含有大量能与模板分子再次特异性识别并结合的三维分子印迹孔穴, 当MIPs暴露在含有模板分子的环境中时, MIPs能再次结合目标分子^[9,10]。分子印迹技术的原理如图2所示^[11]。

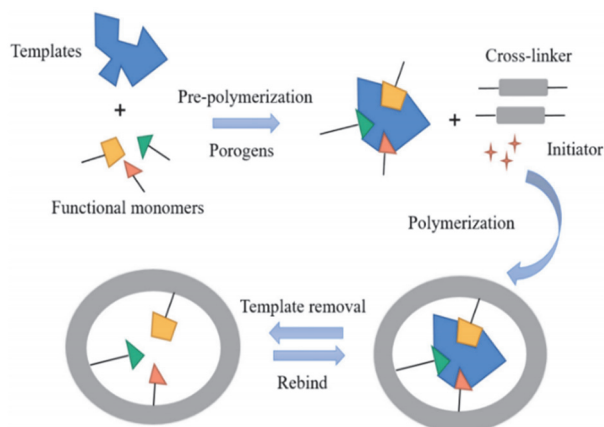


图2 分子印迹技术的原理示意图^[11]

(2) STR-MIM/GCE的制备及用其采用间接电化学法检测链霉素的原理: 分子印迹电化学传感器是将分子印迹技术和电化学传感器技术结合得到的一种电化学传感器, 一般是采用原位聚合法、电聚合法、滴涂法等方法将分子印迹材料引入工作电极表面制备得到。本实验基于电聚合法制备链霉素分子印迹电化学传感器, 因为电聚合法简单、可控性好, 因此制备的传感器稳定性和重复性好^[12]。电化学传感器分为电阻型、电流型、电位型等, 本实验构建的是电流型(也称安培型或伏安型)电化学传感器。电流型电化学传感器是基于扩散电流理论, 测量有电化学活性的待测物在传感器表面发生氧化还原反应所引起电流值的变化, 然后依据得到的电流大小和待测物浓度之间的特定线性关系进行分析。但是链霉素没有电活性, 因此本实验采用了间接电化学分析法, 以铁氰化钾为探针, 基于STR-MIM/GCE对链霉素进行检测, 原理如下: ① 当STR-MIM/GCE置于含有铁氰化钾的电解质溶液中时, 虽然分子印迹膜STR-MIM是不导电的, 但是STR-MIM中具有三维网孔结构的印迹孔穴, 这些印迹孔穴可以作为探针 Fe^{3+} 的通道, Fe^{3+} 通过传感器表面分子印迹膜中的印迹孔穴到达玻碳电极表面, 发生氧化还原反应, 从而在电极上形成铁氰化钾的氧化-还原峰; ② 当把STR-MIM/GCE先置于含有链霉素的溶液中孵化一段时间后, 再将其置于含有铁氰化钾的电解质溶液中, 由于在孵化时链霉素已经占住了STR-MIM/GCE表面印迹膜层中的全部或部分印迹孔穴, 阻碍了探针 Fe^{3+} 到达玻碳电极表面的通道, 导致电极上铁氰化钾的氧化-还原峰下降。因此, 基于电极上铁氰化钾的峰电流下降

程度可以实现对链霉素的检测。STR-MIM/GCE的制备及其采用间接电化学法检测链霉素的原理如图3所示。

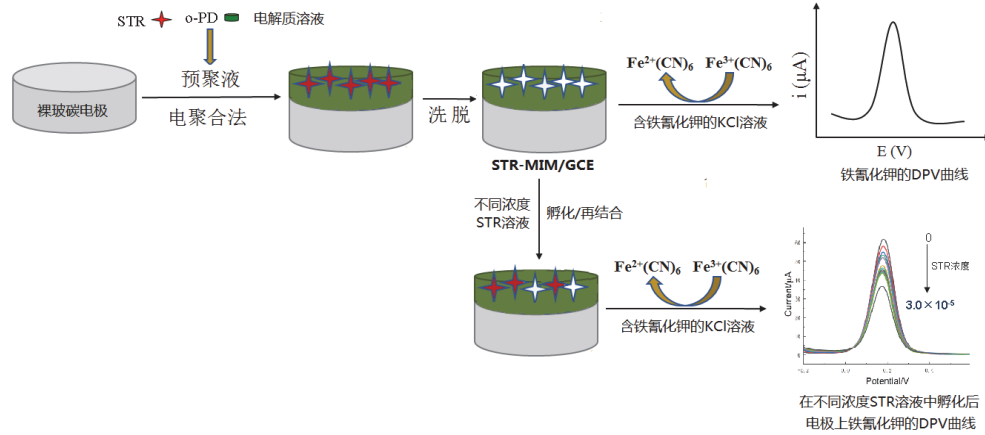


图3 STR-MIM/GCE的制备及其采用间接电化学法检测链霉素的原理示意图

2.3 试剂、材料和仪器

实验中所用到的试剂和材料见表1；用到的主要仪器见表2。

2.4 实验步骤/方法

2.4.1 STR-MIM/GCE及NIM/GCE的制备

(1) **裸玻碳电极的处理：**在湿润的人造麂皮上，按顺序添加500 nm和50 nm的 Al_2O_3 粉末由粗到细将玻碳电极(GCE)打磨至表面光滑，按水、乙醇和水的顺序依次超声清洗10 s以洗去电极表面残留的氧化铝粉末和其他杂质。然后在含有 $5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KCl}$ 的支持电解质溶液进行循环伏安法(CV)扫描(扫描测定参数见表3)，直至电极上 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的氧化和还原峰电位之差 $\Delta E_p \leq 0.1 \text{ V}$ 后(如图4, $\Delta E_p = 0.085 \text{ V}$)，表明电极处理达到要求。

表1 实验中所用到的试剂和材料

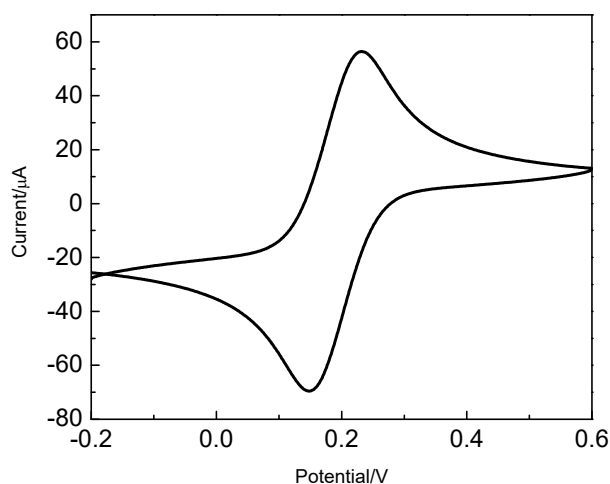
试剂名称	试剂纯度	生产厂家
铁氰化钾($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	≥ 99.5%	天津市风船化学试剂科技有限公司
甲醇	≥ 99.5%	天津市风船化学试剂科技有限公司
冰乙酸(CH_3COOH)	≥ 99.5%	天津市风船化学试剂科技有限公司
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	≥ 99.0%	天津市风船化学试剂科技有限公司
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	≥ 99.0%	天津市风船化学试剂科技有限公司
氧化铝(Al_2O_3)	≥ 99.0%	天津艾达恒晟科技有限公司
邻苯二胺(o-PD)	99.0%	上海泰坦科技股份有限公司
硫酸链霉素	> 95.0%	梯希爱(上海)化成工业发展有限公司
硫酸新霉素	> 97.0%	梯希爱(上海)化成工业发展有限公司
硫酸卡那霉素	—	上海泰坦科技股份有限公司
硫酸庆大霉素	≥ 98.0%	上海泰坦科技股份有限公司
氨苄青霉素钠	—	碧云天生物技术有限公司
盐酸土霉素	≥ 97.0%	上海泰坦科技股份有限公司
无水乙醇	≥ 99.7%	成都市科隆化学品有限公司
三氯甲烷	≥ 99.0%	成都市科隆化学品有限公司
三氯乙酸(CCl_3COOH)	≥ 99.0%	广东光华科技股份有限公司

表2 实验中所用到的主要仪器

仪器名称	仪器型号	生产厂家
电化学工作站	CHI760E	上海辰华仪器有限公司
工作电极	玻碳型	武汉高仕睿联科技有限公司
电镜表征电极	玻碳型	武汉高仕睿联科技有限公司
辅助电极	铂柱型	武汉高仕睿联科技有限公司
参比电极	饱和甘汞型	天津艾达恒晟科技发展有限公司
超声清洗器	SG7200HE	上海冠特超声仪器有限公司
恒温加热磁力搅拌器	2A型	巩义市予华仪器有限公司
离心机	CHI1650	湖南湘立科学仪器有限公司
扫描电子显微镜	日立SU3500	日本株式会社日立制作所

表3 循环伏安法(CV)的测定参数

静置时间	扫描电压	扫描速率	采样间隔
2 s	-0.2 – 0.6 V	0.1 V·s ⁻¹	0.001 V

图4 处理好的裸玻碳电极在含有5.0 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]和0.1 mol·L⁻¹ KCl的支持电解质溶液的CV图

(2) 链霉素分子印迹及非印迹预聚溶液的制备：准确称量0.05 mmol功能单体邻苯二胺和0.01 mmol模板分子链霉素溶于10 mL pH 5.8的磷酸缓冲溶液中，超声5 min使链霉素分子和邻苯二胺充分溶解并相互作用，接着通氮气10 min除氧，得到链霉素分子印迹预聚液。上述溶液在制备过程中除去添加链霉素的步骤，则得到本实验的非印迹预聚液。以上两种预聚液均需现配现用。

(3) STR-MIM/GCE及NIM/GCE的制备：将处理好的裸玻碳电极放入链霉素分子印迹预聚液中，用循环伏安法(CV)电聚20圈，电位范围为0–0.8 V，扫描速度0.1 V·s⁻¹。接着冲洗干净，在室温下晾干，然后倒悬于甲醇/50%乙酸水溶液(2 : 1, v/v)中，磁力搅拌250 s，得链霉素分子印迹电化学传感器(STR-MIM/GCE)。非印迹电化学传感器(NIM/GCE)是将处理好的裸玻碳电极放入非印迹预聚液中，其余步骤和链霉素分子印迹电化学传感器的制备完全相同。

2.4.2 STR-MIM/GCE及NIM/GCE的表征

(1) 电化学性能表征：采用循环伏安(CV)法对所制备的分子印迹电极的电化学性能进行表征。

以裸玻碳电极或STR-MIM/GCE或非印迹电极为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极、铂柱电极为对电极组成三电极系统，将三电极垂直放入10.0 mL含有5.0 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]和0.1 mol·L⁻¹ KCl的电解池中，按表3的参数进行CV测定，以表征不同电极的电化学性能。

(2) **表面形貌的表征(该表征没有条件可以不做)**: 采用扫描电镜(SEM)对所制备的分子印迹电极的表面形貌进行表征。将制备好的电极采用扫描电镜进行表征。扫描电镜测定条件为: 加速电压: 15 kV, 束流(spot): 30, 工作距离: 5 mm, 放大倍数: 4.5 k倍。

2.4.3 差示脉冲伏安法(DPV)的测定条件及工作曲线的绘制

采用差示脉冲伏安法(DPV)进行链霉素的测定。配制一系列不同浓度(0.0、5.1 × 10⁻⁹、9.0 × 10⁻⁹、9.0 × 10⁻⁸、3.0 × 10⁻⁷、8.1 × 10⁻⁷和9.0 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹)的链霉素标准水溶液，然后将STR-MIM/GCE插入链霉素标准溶液中孵化1.5 min，之后以孵化后的STR-MIM/GCE为工作电极，按2.4.2第(1)部分的方法组成三电极体系，并垂直放入10.0 mL含5.0 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] (作探针)和0.1 mol·L⁻¹ KCl (作电解质)的支持电解质溶液中，进行DPV扫描(DPV测试条件见表4)。以DPV响应电流($\Delta i = i_0 - i$ ，其中 i_0 和 i 分别为传感器在孵化前后于含有铁氰化钾的电解质溶液中测得的DPV电流值，单位为 μA)为纵坐标，STR的浓度(c ，单位为mol·L⁻¹)为横坐标，绘制检测链霉素的工作曲线。

表4 差示脉冲伏安法(DPV)的测定参数

静置时间	扫描电压	电位增量	振幅	脉冲宽度	采样宽度	脉冲周期
2 s	-0.2 - 0.6 V	0.004 V	0.05 V	0.05 s	0.0167 s	0.5 s

2.4.4 牛奶样品的处理与测定

(1) **牛奶样品的准备(由老师完成)**: 实验前由老师准备一份阴性牛奶样品，并在其中准确加入一定量的链霉素，配制含有确定浓度的牛奶加标样品作为实际样品供学生实验。

(2) **牛奶样品溶液的配制**: 准确量取12.5 mL老师提供的牛奶加标样品，用水稀释至25.0 mL，加入2.0 mL三氯甲烷和2.0 mL 10%的三氯乙酸混合溶液作为提取剂，振荡将其混匀，超声提取30 min，在8000 r·min⁻¹转速下离心10 min，上清液用提取剂定容至25.0 mL，经0.45 μm 滤膜过滤得到牛奶样品溶液，放入冰箱冷藏保存待用。

(3) **牛奶样品溶液的测定**: 取处理后的牛奶样品溶液按2.4.3的DPV方法和表4的仪器参数进行5次平行测定，由2.4.3得到的工作曲线计算牛奶样品中链霉素的含量，然后计算结果的相对标准偏差(RSD值)，并根据老师给出的准确含量计算测定结果的相对误差。

2.4.5 加标回收实验

为了培养学生分析化学的综合应用能力，设计了加标回收实验。取牛奶样品溶液3份，分别加入不同浓度的链霉素溶液，配制加标量分别为0.1、0.3、0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的牛奶加标样品，按照2.4.3的方法和表4的仪器参数进行DPV测定，计算加标回收率以及RSD值。

3 结果与讨论

3.1 扫描电镜表征

对STR-MIM/GCE表面的印迹膜在洗脱模板前(a)和洗脱模板后(b)的情况进行了扫描电镜表征。由图5所示，洗脱模板前的印迹膜表面光滑平整，膜的连续性好；洗脱模板后的膜依旧很平整，只是稍显粗糙。上述结果说明，洗脱过程没有破坏印迹膜的完整性。

3.2 电化学性质表征

STR-MIM/GCE的CV表征: 对洗脱模板前后以及再次结合模板分子(孵化)后的STR-MIM/GCE进行CV表征。图6可见，在GCE表面覆盖一层未洗脱模板分子的聚合膜后，CV曲线没有出现氧化还原峰(曲线a)，说明聚合膜很致密而且是不导电的。当聚合膜中模板分子STR被洗脱后，CV曲线上出

现了明显的铁氰化钾的氧化还原峰(曲线b), 说明洗脱STR的膜中产生了大量的STR印迹孔穴, 探针能通过这些孔穴达到玻碳电极表面发生氧化还原反应。当传感器在含有链霉素的溶液中孵化后, CV曲线的氧化还原峰相对于曲线b变小(曲线c), 但依旧远大于曲线a, 这是因为电极表面印迹膜中的印迹孔穴部分结合链霉素分子, 使得探针的通道减少, 电流降低。上述结果说明可以基于STR-MIM/GCE采用铁氰化钾为探针检测对链霉素进行间接电化学法检测。

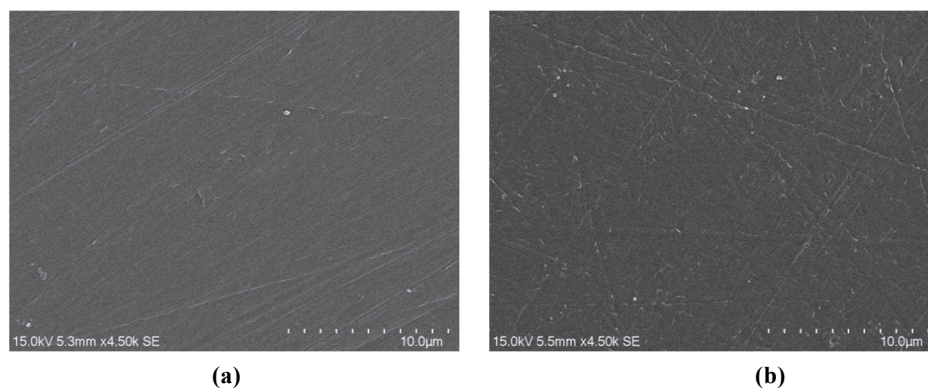


图5 STR-MIM/GCE洗脱前(a)和洗脱后(b)的SEM图

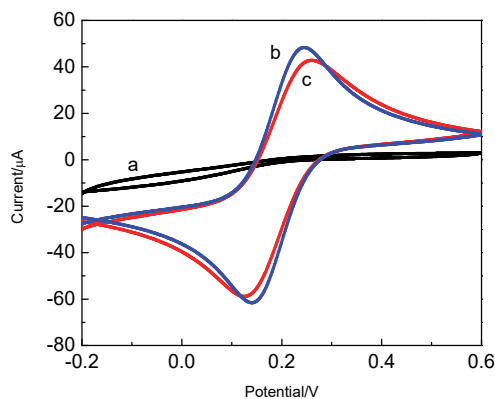


图6 洗脱模板前(a)和后(b)以及在链霉素溶液中孵化后(c)的STR-MIM/GCE的CV曲线

NIM/GC的CV表征: 对洗脱前后的NIM/GCE同样进行了CV分析(图7)。可见, NIM/GC在洗脱前后的CV曲线几乎没有发生变化, 都没有出现氧化还原峰, 说明非印迹膜在洗脱后没有出现分子印迹孔穴, 始终覆盖着致密的邻苯二胺电聚膜, 也说明洗脱过程没有对膜造成破坏。

3.3 STR-MIM/GCE的工作曲线及检出限

对2.4.3配制的不同浓度的链霉素溶液进行了DPV测定, 得到的DPV曲线如图8(左)所示。可见, 随着链霉素浓度的不断增加, 传感器上的DPV峰电流逐渐降低, 说明链霉素分子不断进入电极表面的分子印迹空穴中, 从而阻碍了电流的传导。

将DPV响应电流(Δi , 单位为 μA)对STR的浓度(c , 单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行线性拟合, 其线性关系曲线如图8(右)所示。可见, DPV响应电流与STR的浓度在 $5.1 \times 10^{-9} - 9.0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内有线性关系, 对应的回归方程为 $\Delta i = 8.149c + 5.987$ ($R^2 = 0.9945$), 表明 Δi 值与链霉素溶液的浓度之间的线性关系良好, 符合分析要求。

按 $3\sigma/k$ (σ 为空白值的标准偏差, k 为工作曲线斜率)计算方法的检出限, 检出限为 $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

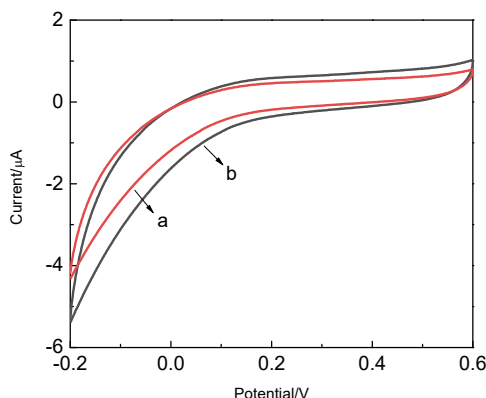


图7 洗脱前(a)和后(b)的NIM/GCE的CV曲线

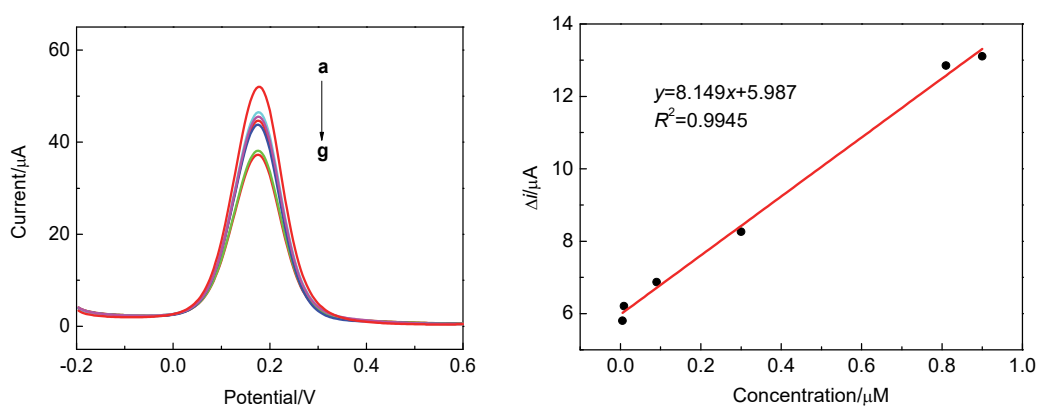
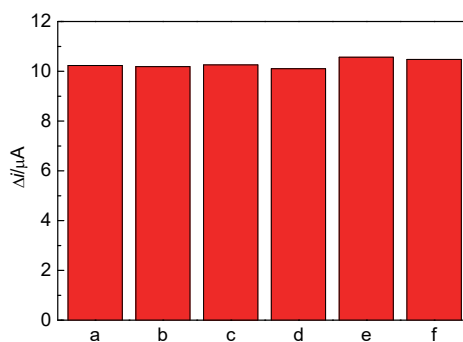


图8 STR-MIM/GCE在含不同浓度链霉素溶液中孵化后的DPV曲线(左)及其检测链霉素的工作曲线(右)

左图中曲线从a至g对应链霉素的浓度依次为 0.0 、 5.1×10^{-9} 、 9.0×10^{-9} 、 9.0×10^{-8} 、 3.0×10^{-7} 、 8.1×10^{-7} 和 $9.0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

3.4 STR-MIM/GCE的抗干扰能力

为了验证STR-MIM/GCE的实际应用能力,在 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的STR溶液分别加入浓度均为 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的新霉素、氨苄青霉素钠、土霉素、庆大霉素及卡那霉素,配制了系列含有不同其它抗生素的STR溶液,然后分别测定了STR-MIM/GCE在这些溶液中孵化后的DPV响应电流 Δi 值,结果如图9所示。可见,在有10倍量其他抗生素的存在下,STR-MIM/GCE的DPV响应电流 Δi 值与不含其它抗生素时的 Δi 值差别不大,说明STR-MIM/GCE具有良好的抗干扰能力,有用于检测实际样品中链霉素的应用潜力。


 图9 STR-MIM/GCE对STR (a)及STR+新霉素(b)、STR+氨苄青霉素钠(c)、STR+土霉素(d)、STR+庆大霉素(e)、STR+卡那霉素(f)的DPV响应电流 Δi

3.5 STR-MIM/GCE的稳定性和重现性

实验由5位同学各制备了1支STR-MIM/GCE,并由他们各自测定自己制备的STR-MIM/GCE对 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ STR溶液的DPV响应电流 Δi ,结果如图10(左)所示,算得5位同学测得的DPV响应电流的RSD值为3.03%,说明实验有很好的重现性。

由同一位同学对同一传感器在 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的STR浓度下重复测定48次。图10(右)的结果表明,DPV响应电流逐渐下降,但即使用48次后,其DPV响应电流仍能保持其初始值的89.8%,说明该STR-MIM/GCE有很好的稳定性和再生能力,可多次重复使用。

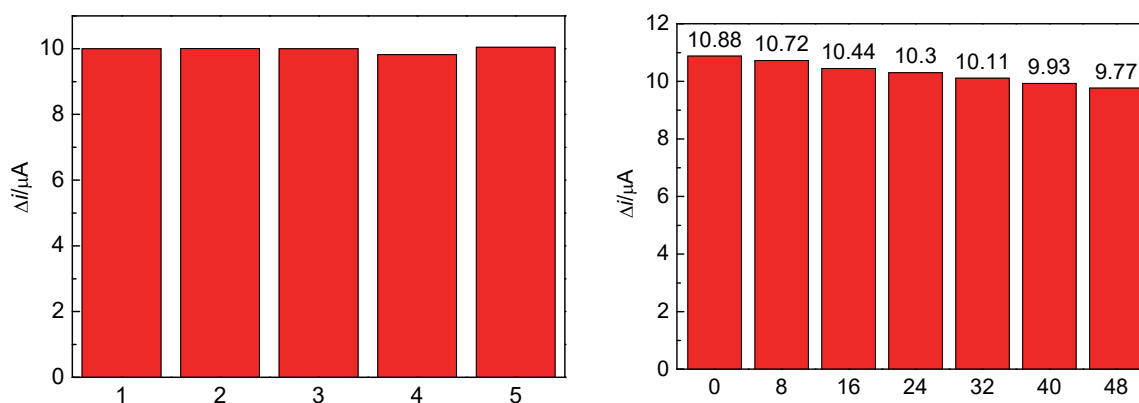


图10 5位同学在相同条件下制备的STR-MIM/GCE的响应电流 Δi (左)及同一支STR-MIM/GCE多次重复使用后对STR的DPV响应电流 Δi (右)

3.6 牛奶样品的检测结果

对老师提供的牛奶样品(加标样品)进行5次平行测定,所得结果见表5。可见,测定结果的相对标准偏差(RSD)为2.41%,相对误差为3.7%,结果可靠。对样品溶液按低、中、高三个浓度进行加标回收实验,所得结果见表6。可见,不同加标浓度下的回收率均位于94.7%–105.0%间,进一步证明了测定结果的准确性。

表5 牛奶样品的测定结果* ($n = 5$)

单次测定结果($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均值($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	实际值($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) *	相对误差(%)
0.313、0.298、0.315、0.311、0.317	0.311	2.41	0.300	3.7

*样品为老师由阴性样品配制的加标样品,加标量即定义为样品的实际值。

表6 样品溶液的加标回收测定结果

加标量($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	测定值($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率(%)
0.100	0.416	105.0
0.300	0.595	94.7
0.500	0.800	97.8

4 实验注意事项

(1) 为了保证印迹电极制备的重现性,印迹电极在制备过程中要注意:① 裸玻碳电极处理好后,应马上进行印迹电极的制备;② 功能单体邻苯二胺溶液要现用现配,因为邻苯二胺易氧化;③ 预聚合溶液中各组分的浓度要保持不变。

(2) 为了保证测定结果的可重现性, 在每一次测定结束后, 印迹电极均需在甲醇/50%乙酸水溶液(2:1, v/v)中搅拌洗脱250 s, 以除去电极表面吸附的物质。

(3) 分子印迹膜MIP存在的一个主要问题是其使用一段时间后容易损坏, 尤其是使用不当时。因此, 使用过程中, 应避免电极表面与器皿的接触。同时在实验过程中, 如发现实验数据偏离过大时, 说明电极表面的分子印迹膜可能损坏, 需重新制备电极进行实验。

5 实验组织运行方式

(1) 本实验适用于已经学习过电化学分析理论知识的学生。实验重点是让学生掌握分子印迹技术的原理、电聚合法制备分子印迹电化学传感器的基本方法; 理解电化学传感器在间接检测非氧化还原性物质方面的应用; 学会循环伏安法和差示脉冲法的应用; 巩固电化学工作站的操作技术。

(2) 实验相关原理的学习安排在课外及线上进行, 学生通过阅读教师提供的参考文献和线上学习资料以及通过线上辅导答疑等方式掌握分子印迹技术、分子印迹电化学传感器、循环伏安法、差示脉冲伏安法等实验相关内容的基本原理。通过课前提问以及预习报告检验学习效果。

(3) 实验开始之前由指导老师向学生讲解电化学工作站的使用方法, 以及CV法、DPV法的原理和参数设定、操作流程、实验注意事项等。

(4) 实验采用分组教学, 建议2-3人一组。学时数建议安排为课堂实验8学时+课外含线上理论学习不少于8学时。课堂实验8学时分为四个阶段进行。第一阶段为传感器的制备, 包括裸玻碳电极的处理、链霉素分子印迹及非印迹预聚液的配制、链霉素分子印迹电化学传感器及非印迹电化学传感器的制备; 第二阶段为传感器的表征, 包括电化学性能及表面形貌表征, 其中表面形貌表征没有条件的实验室可以不做; 第三阶段为分析方法的建立, 包括工作曲线的绘制、检出限测定、抗干扰能力以及重现性与稳定性研究, 其中重现性与稳定性研究可以不做; 第四阶段为实际样品分析, 包括实际样品处理、结果测定和加标回收实验。课堂实验学时安排具体见表7。

表7 实验学时安排

实验内容	学时安排
STR-MIM/GCE及NIM/GCE的制备	2学时
STR-MIM/GCE及NIM/GCE的表征	2学时
STR-MIM/GCE的分析性能(工作曲线、检出限、抗干扰能力、重现性与稳定性)研究	2学时
样品处理、分析与加标回收实验	2学时

*电极的扫描电镜表征和重现性与稳定性研究为可选内容

(5) 完成规定的实验内容后, 如时间允许或学生有兴趣, 可以让学生进行非印迹电极工作曲线及抗干扰能力研究, 同时与印迹电极进行比较, 分析讨论两种电极差异产生的原因, 加深对分子印迹技术原理和应用的理解。

(6) 通过课后思考题引导学生思考, 包括: 分子印迹技术应用于电化学传感器带来的主要优势有哪些? 影响分子印迹电化学传感器性能的关键因素有哪些? 在电聚合法制备分子印迹电化学传感器时, 选择功能单体要考虑哪些因素? 除采用电聚合法外, 还可以采用什么方法制备分子印迹膜? 采用间接法进行电化学分析时, 除使用铁氰化钾为探针外, 还可以采用哪些物质作为探针?

6 结语

本实验用电聚合法构建了一种链霉素分子印迹电化学传感器, 并研究其性能与应用, 内容包括分子印迹电化学传感器的制备、表征、分析方法的建立及其对实际样品的分析检测和测定结果的验

证, 具有很好的系统性和完整性, 可以有效培养学生分析化学的综合应用能力和高阶思维。此外, 实验基于分子印迹电化学传感器采用间接电化学分析法对链霉素进行检测, 不仅提升了学生对电化学分析法的应用能力, 同时也促进了学生对分子印迹技术及分子印迹电化学传感器这些前沿知识的理解与掌握, 拓展了学生对电化学分析方法应用范围的了解, 培养了学生以目标为导向的研究思路。更重要的是, 本实验设计的电化学传感器制备简单、稳定性和重现性好, 实验过程安全环保, 所用试剂、耗材价廉易得, 总时长约8学时, 满足本科实验教学的要求, 具有很好的推广价值。

参 考 文 献

- [1] Kerantzas, C. A.; Jacobs, W. R.; Rubin, E. J.; Collier, R. J. *mBio* **2017**, 8 (2), e01586-16.
- [2] Dookie, N.; Rambaran, S.; Padayatchi, N.; Mahomed, S.; Naidoo K. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, 73 (5), 1138.
- [3] Rodriguez-Garcia, A.; Mares-Alejandre, R. E.; Munoz-Munoz, P. L.; A Ruvalcaba-Ruiz, S.; Gonzalez-Sanchez, R. A.; Bernaldez-Sarabia, J.; Melendez-Lopez, S. G.; Licca-Navarro, A. F.; Ramos-Ibarra, M. A. *Antibiotics (Basel)* **2021**, 10 (7), 807.
- [4] Luo, Y. N.; Tan, X. C.; Young, D. J.; Chen, Q. Y.; Huang, Y. H.; Feng, D. F.; Ai, C. H.; Mi, Y. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1115, 33.
- [5] Liu, B. Q.; Tang, D. P.; Zhang, B.; Que, X. H.; Yang, H. H.; Chen, G. N. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 41, 551.
- [6] 陈怡, 刘利娟, 高杨, 张晓清, 曹晶, 张娟琨. *分析化学*, **2014**, 42 (1), 5.
- [7] Kalogiouri, N. P.; Tsalbouris, A.; Kabir, A.; Furton, K. G.; Samanidou, V. F. *Microchem. J.* **2020**, 157, 104965.
- [8] Nawaz, N.; Abu Bakar, N. K.; Mahmud, H. N. M. E.; Jamaludin, N. S. *Anal. Biochem.* **2021**, 630, 114328.
- [9] Belbruno, J. J. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (1), 94.
- [10] 张攀, 姜丽艳, 马玖彤, 贾琼. *分析化学*, **2021**, 49 (1), 24.
- [11] Liu, Y. H.; Lian, Z. R.; Li, F. F.; Majid, A.; Wang, J. T. *Mar. Pollut. Bull.* **2021**, 169, 112541.
- [12] Falone, M. F.; Buffon, E.; Stradiotto, N. R. *Fuel* **2022**, 307, 121783.