



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150179

## 分子印迹传感器对标本中塑化剂直接快速检测

陶强, 张娟琨, 刘英姿, 鞠小翠, 左娟娟

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 本文构建了能够快速检测邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)的分子印迹电化学传感器. 首先利用分子印迹技术以热聚合的方法制备了分子印迹聚合物颗粒(MIPs); 然后将优化的MIPs与琼脂糖溶液混匀固定在玻碳电极表面制备成DINP分子印迹电化学传感器; 传感器可以特异性结合模板分子DINP且其电化学信号与DINP的浓度相关. 再利用传感器检测样品中DINP的含量, 检测过程不需要样本前处理, 可以用于现场直接检测. 该方法的线性方程为 $\Delta I = 0.03c + 3.07$ , 相关系数 $R^2 = 0.998$ , 线性范围 $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L, 检测限为 $2.7 \times 10^{-8}$  mol/L, 在实际样品中的加标回收率为105.3% ~ 115.7%.

**关键词:** 邻苯二甲酸二异壬酯; 分子印迹聚合物颗粒; 电化学传感器; 检测; 循环伏安

**中图分类号:** TQ212.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2016)05-0014-05

## Quick Detection of DINP in Samples by Molecular Imprinted Sensor

TAO Qiang, ZHANG Juankun, LIU Yingzi, JU Xiaocui, ZUO Juanjuan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** An electrochemical sensor based on molecularly imprinted sensor for quick detection of DINP was developed in this research. Firstly, imprinted polymer particles (MIPs) were prepared through thermal polymerization. Then, MIPs and agarose were mixed in proportion. The electrochemical sensor for DINP was fixed by the mixture on a glassy carbon electrode. The sensor can be combined with the template molecule DINP and its electrochemical signals are influenced by DINP concentration. Thus, it could be used to detect DINP levels in samples, and DINP concentration was quickly detected in wine samples without sample pretreatment. The linear equation in this study was  $\Delta I = 0.03c + 3.07$ , the correlation coefficient is  $R^2 = 0.998$ , the linear range was  $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L, the sensitivity limit was  $2.7 \times 10^{-8}$  mol/L, and the recovery rate was 105.3% - 115.7%.

**Key words:** diisononyl phthalate; molecularly imprinted polymer particles; electrochemical sensor; detection; cyclic voltammetry

邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)是一种无色透明液体, 与其他增塑剂相比具有低密度性、低挥发性和安全系数高等优点, 被广泛作为增塑剂应用于食品包装、电线电缆和玩具鞋材等方面<sup>[1]</sup>. 作为邻苯二甲酸酯类(PAEs)的重要类型, DINP的毒性已受到学者的广泛关注. 研究发现<sup>[2-4]</sup>DINP对胚胎及成年期睾丸间质细胞产生影响, 使雄激素水平降低. Gray等<sup>[5]</sup>研究发现DINP诱导能使生殖畸形的发生率增加, 且会出现改变性分化.

2005年欧盟规定进口儿童玩具及护理品中DINP浓度不得高于0.1%<sup>[6]</sup>. 2007年美国标准规定儿童用品中DINP的含量不得高于0.1%<sup>[7]</sup>. 我国在2008年就已颁布GB/T 21911—2008《食品中邻苯二甲酸酯的测定》<sup>[8]</sup>, 对于食品中PAEs物质的测定, 含油脂样品和非油脂样品的检出限分别为1.5 mg/kg和0.05 mg/kg. 2011年的中国台湾起云剂事件及2012年大陆酒鬼酒塑化剂事件, 再一次引发了人们对食品安全的担忧<sup>[9]</sup>, 准确、快速测定食品中塑化剂

收稿日期: 2015-10-26; 修回日期: 2016-03-03

基金项目: 国际合作项目(14RCCFSF00140)

作者简介: 陶强(1990—), 男, 河南人, 硕士研究生; 通信作者: 张娟琨, 教授, zhangjk@tust.edu.cn.

的含量成为了当前分析检测领域研究的热门课题。

目前 PAEs 的测定方法主要有气质联用(GC-MS)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)和液质联用(HPLC-MS)法等。GC-MS 法样品前处理复杂,检出限高,易受其他有机物污染<sup>[10]</sup>,运行成本高,且 PAEs 在 GC-MS 色谱柱中有较高残留,会污染色谱柱与离子源<sup>[9]</sup>;HPLC 法很难将各种塑化剂完全分开,方法特异性不强<sup>[11]</sup>;GC 法测定过程中无法定性,存在假阳性可能<sup>[12]</sup>;HPLC-MS 法使用费用较高,并且较大的仪器本底值也限制样品中塑化剂的检测<sup>[13]</sup>。而 DINP 分子印迹生物传感器具有制备过程简单、造价低廉、灵敏度高的优点,可实现对 DINP 的特异性检测。样品不需要进行前处理,加标回收率和样品测定结果均在合理范围内,有望在白酒及食品检测中得到应用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与主要试剂

UV-1800 型紫外光谱扫描仪,日本岛津公司;SU1510 型扫描电子显微镜,日本株式会社日立高新技术那珂事业所;LK2005A 型电化学工作站,天津市兰力科化学电子高技术有限公司。

邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)、偶氮二异丁腈(AIBN)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)、邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP),天津希恩生化科技有限公司; $\alpha$ -甲基丙烯酸(MAA),天津市瑞金特化学品有限公司;甲基丙烯酸甲酯(MMA),天津市化学试剂一厂;丙烯酰胺,天津市北方天医化学试剂厂;铁氰化钾( $K_3Fe(CN)_6$ ),天津市永大化学试剂开发中心。以上试剂均为分析纯。

### 1.2 传感器的制备

使用热聚合法制备 DINP 分子印迹聚合物颗粒。向 50 mL 锥形瓶中加入 0.5 mmol DINP、1.5 mmol MAA 和 10 mL 乙腈溶剂,放置在摇床上预作用 6 h。再加入 15 mmol 的交联剂(EGDMA)和 20 mg 的 AIBN,充分混匀后通入氮气除氧 10 min,真空密封转移至 60 °C 恒温水浴锅中热聚合 24 h。得到白色块状聚合物,干燥粉碎后通过 0.28 mm 分样筛,得到大小均一的固体颗粒。再用甲醇-乙酸溶液(体积比为 9 : 1)超声清洗制备的颗粒至完全洗净,然后用甲醇洗去多余乙酸,再用双蒸水洗去多余甲

醇,干燥至质量恒定,待用。非分子印迹聚合物颗粒(NIPs)以同样方法制备,只是不加入模板分子 DINP。

取 20 mg MIPs 加入到 1 mL、2% 的琼脂糖溶液中,制得 20 mg/mL 的 MIPs 溶液。然后均匀涂布 3  $\mu$ L MIPs 溶液于玻碳电极表面(玻碳电极打磨好且经过活化),待干燥后电极表面即形成一层 MIPs 膜。

### 1.3 电化学检测

将制备好的传感器 MIPs 膜放入 5 mmol/L 铁氰化钾的 PBS 溶液(含 0.1 mol/L KCl, pH 7.0)中通过循环伏安法来检测目标分子 DINP 的标准曲线。DINP 的检测浓度为 50 ~ 1 000 nmol/L,每个浓度的吸附时间为 5 min,循环电位为 -0.1 ~ 0.6 V,每次扫描循环 3 次,记录 MIPs 膜吸附 DINP 前后对应氧化峰的电流变化( $\Delta I$ ),并作出  $\Delta I$  与对应 DINP 浓度的关系曲线。

### 1.4 功能单体的选择及优化

配制 0.01 mmol/L DINP 溶液、0.04 mmol/L MAA、MMA 和丙烯酰胺溶液(结合前)以及相同浓度 DINP 和各功能单体的混合溶液(结合后)各 10 mL,分别进行全波长扫描。结合前为理论值,即 DINP 与各功能单体扫描后的加和;结合后为实测值,是 DINP 与各功能单体相互作用后的实际测量值。

准确称量 5 份不同比例 MAA 制备的 MIPs 各 10 mg,分别放入对应标记为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5 的盛有 6 mL 的 DINP-乙腈溶液的 5 支试管中,其中 DINP 浓度均为 0.02 mmol/L。再将试管放入恒温振荡器中振荡吸附 12 h。然后将吸附后的溶液转移至离心管中离心,紫外光谱扫描上清液,按照式(1)计算对应的 MIPs 颗粒对 DINP 的吸附量。

$$Q = \frac{(c_0 - c) \cdot V \cdot M}{m} \quad (1)$$

式中: $Q$  为 DINP 的平衡吸附量,mg/g; $c_0$  为 DINP 初始浓度,mmol/L; $c$  为平衡吸附后上清液中 DINP 的浓度,mmol/L; $V$  为溶液体积,mL; $M$  为 DINP 相对分子质量; $m$  为 MIPs 的质量,mg。

### 1.5 交联剂的优化

准确称量 6 份不同比例 EGDMA 的 MIPs 各 10 mg,分别放入对应标记 A、B、C、D、E、F 的 6 支试管中,DINP : MAA : EGDMA 的物质的量比:A 为 1 : 3 : 15,B 为 1 : 3 : 20,C 为 1 : 3 : 25,D 为

1 : 3 : 30, E 为 1 : 3 : 35, F 为 1 : 3 : 40, 操作与 1.5 中相同.

### 1.6 扫描电子显微镜观察

采用扫描电子显微镜扫描 MIPs 以观察 MIPs 的形貌特征, 对比洗脱前后 MIPs 的形状.

### 1.7 实际样品分析验证

取市场上某品牌白酒, 通过电化学测定, 未检测出 DINP. 然后加入 DINP 配制成 100、200、300 nmol/L 的溶液各 25 mL, 标号为 A、B、C. 用制备好的传感器吸附 DINP 后, 进行空白样加标回收实验验证.

## 2 结果与讨论

### 2.1 等温吸附曲线结果

配制 5 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$  的 DINP 乙腈溶液, 恒温培养箱中 29  $^{\circ}\text{C}$  振荡吸附, 分别用 10 mg MIPs 与 NIPs 平衡吸附, 等温吸附曲线如图 1 所示. 随着 DINP 浓度的不断增大, NIPs 在 10  $\mu\text{mol/L}$  时的吸附量逐渐接近饱和, 而 MIPs 的吸附量仍然继续增大, 同时 MIPs 对 DINP 的吸附量明显大于 NIPs. MIPs 对 DINP 的最大吸附量 2.29 mg/g 是对应 NIPs 最大吸附量 0.50 mg/g 的 4.58 倍. 结果表明 MIPs 与 DINP 的结合能力更强, 能对 DINP 特异性吸附.

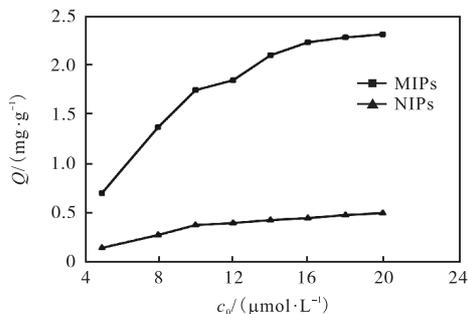


图 1 MIPs 和 NIPs 对 DINP 的等温吸附曲线  
Fig. 1 Adsorption isotherm of MIPs and NIPs for DINP

### 2.2 电化学检测

#### 2.2.1 电化学分子印迹膜的选择性

配制 10 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  的 DINP 及干扰物溶液, 分别用修饰膜印迹电极进行检测, 检测液为 1 mmol/L 铁氰化钾溶液, 峰电流变化值与对应浓度关系如图 2 所示. 由图 2 可知: DEHP 有一定的电流变化, 而 DMP 和 BBP 只具有微弱的电流响应, 说明 DMP 和 BBP 与 DINP 的结构差别较大, 电化学响应信号微弱, 而 DEHP 与 DINP 的结构较相似, 使得

DEHP 能够被吸附到印迹分子的孔穴上, 引起一定的电化学信号变化; 但并未对 DINP 形成显著干扰, 说明印迹膜电极与 DINP 之间的作用除了与其互补的官能团决定外, MIPs 上的孔穴结构也对二者的结合能力有较大影响, 本研究制备的 MIPs 能够对 DINP 进行特异性检测.

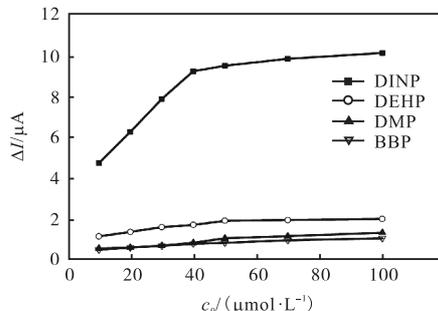
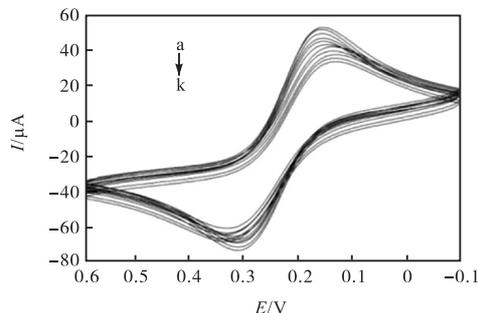


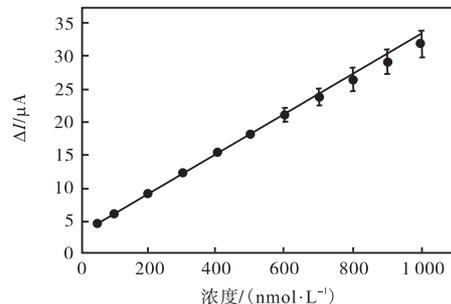
图 2 不同物质在分子印迹膜电极上的相对峰电流变化  
Fig. 2 Peak current changes of MIP sensor vs concentration of different substances

#### 2.2.2 电化学检测标准曲线绘制结果

制备好的印迹聚合膜对 11 组 DINP 溶液进行检测, 结果如图 3 所示.



(a) 循环伏安图



(b) DINP 浓度与峰电流差的关系

图 3 不同 DINP 浓度下的循环伏安图以及 DINP 浓度与峰电流差的关系

Fig. 3 Cyclic voltammety curves of different concentrations of DINP and relationship between DINP concentration and current peak difference

图 3(a) 中 a—k 表示 11 组 DINP 浓度为 50 ~ 1 000 nmol/L 时对应的循环伏安曲线. 随着 DINP 浓

度的增大, MIPs 膜中颗粒的印迹空穴越来越多的被 DINP 占据, 电流  $I$  降低, 即  $\Delta I$  越来越大(图 3(b)).  $\Delta I$ (单位为  $\mu\text{A}$ )与 DINP 的浓度( $c$ , 单位为  $\text{nmol/L}$ )在  $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  成良好的线性关系, 线性方程为  $\Delta I = 0.03c + 3.07$  ( $R^2 = 0.998$ ), 检测限为  $2.7 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ .

### 2.3 功能单体的选择及优化

溶液中若只有互不产生影响的物质存在, 则该溶液的吸光度等于这些物质吸光度的加和. 模板分子与不同功能单体之间的相互作用力的强弱可以由功能单体和模板分子相互作用的理论吸光度和实际吸光度的差值大小来判断, 差值越大则说明该功能单体与模板分子的相互作用就越强<sup>[14]</sup>. DINP 与各功能单体结合前后紫外吸收光谱如图 4 所示.

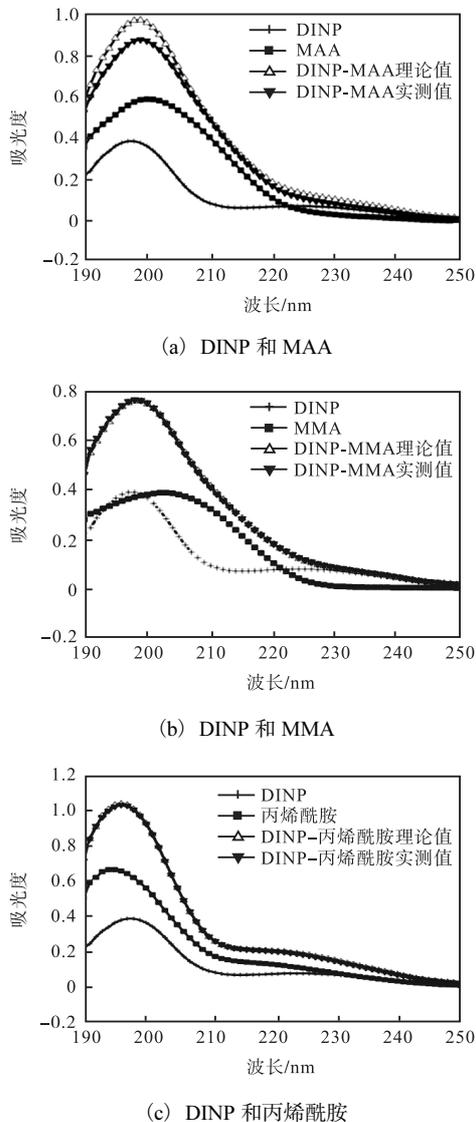


图 4 DINP、3种单体及其混合物紫外吸收光谱图  
Fig. 4 UV absorption spectra of DINP, three monomers and the mixtures of each monomer with DINP

图 4 中 DINP 与 MAA 作用前后差值最大即与 MAA 的相互作用力最强, 即结合能力最强. 则以 MAA 为功能单体最适合制备 MIPs.

得到不同比例 MAA 的 MIPs 对乙腈溶液中 DINP 的吸附结果如图 5 所示.

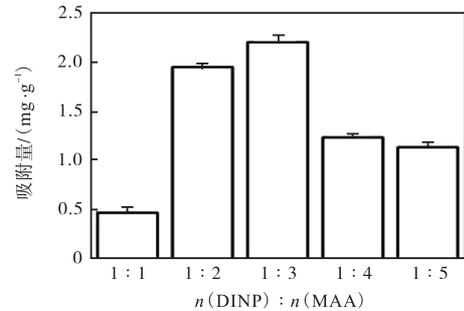


图 5 不同比例功能单体的 MIPs 对 DINP 的吸附量  
Fig. 5 Adsorption of different ratios of template-monomer MIPs in DINP solution

图 5 中 DINP 与 MAA 的物质的量比为 1:1 时 MIPs 的吸附量最小, 物质的量比为 1:3 时吸附量最大, 说明 DINP 与 MAA 的最佳物质的量比为 1:3.

### 2.4 交联剂的优化

交联剂优化吸附结果如图 6 所示. 当 DINP : MAA : EGDMA 的物质的量比为 1:3:30 时吸附量最大, 即 DINP 与 EGDMA 的物质的量比为 1:30 时 MIPs 对 DINP 的吸附量最强, 即 1:30 为最佳物质的量比.

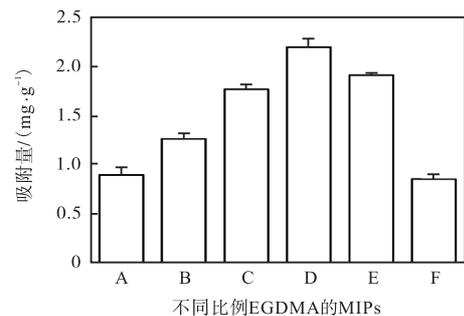


图 6 不同比例交联剂的 MIPs 对 DINP 的吸附量  
Fig. 6 Adsorption of different ratios of crosslinker MIPs in DINP solution

### 2.5 MIPs 颗粒洗脱前后的形貌特征比较

洗脱前的 MIPs 表面比较粗糙, 形成的网状结构不规则; 而洗脱后的 MIPs 存在交错的网状结构, 相比于洗脱前孔结构变得更多更紧密, 并且相互贯穿联通, 具有一定的层次结构(图 7). 这是因为模板分子与功能单体预聚合形成稳定的预聚合物, 模板分子周围的聚合物链进行有序的排列, 洗脱掉模板分子后

留下分布均匀、形状相对规整、能与模板分子互补的印迹孔穴和通道,这种孔穴和通道结构能够提高 MIPs 对印迹分子的结合速度,增加 MIPs 对印迹分子的特异性识别能力。

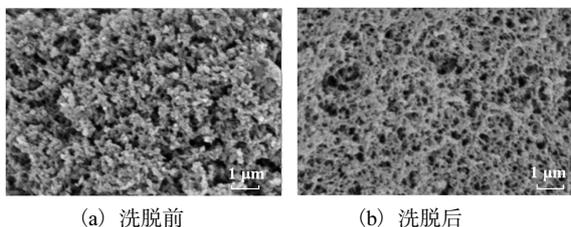


图 7 MIPs 洗脱前和洗脱后的扫描电镜图

Fig. 7 Scanning electron microscopy image of MIPs uneluted and eluted

## 2.6 实际样品分析结果

循环伏安法扫描后通过方程计算得到加标回收实验结果见表 1,回收率为 105.3% ~ 115.7%,平行实验间的相对标准偏差(RSD)为 0.4% ~ 1.2%,均小于 5%,说明本方法有较高的准确性。

表 1 白酒中 DINP 的加标回收率 ( $n=5$ )

Tab. 1 Recovery of DINP in white spirit sample ( $n=5$ )

样品	加入量/ ( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收量/ ( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收率/%	RSD/%
A	100	105.3	105.3	1.2
B	200	231.3	115.7	0.6
C	300	338.7	112.9	0.4

## 3 结 论

本研究成功制备了 MIPs,用于特异性检测 DINP. 通过电化学循环伏安法检测,线性检测范围为  $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ,检测限为  $2.7 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ,同时对实际样品进行了加标回收实验,加标回收率为 105.3% ~ 115.7%,平行实验间相对标准偏差(RSD)为 0.4% ~ 1.2%,实验过程有较高的准确性。

本研究方法能够快速检测白酒中 DINP 的含量,不需要进行样本前处理,可应用于现场检测;并且具备专一性强、检测成本低、操作简单、检测时间短等优点,能够为食品安全监督提供一种快速、准确、灵敏的检测方法. 同时,本方法制备的 MIPs 对 DINP 也有较强的吸附能力,对于白酒及食品生产过程中塑化剂的吸附去除也有较为理想的应用前景。

### 参考文献:

[1] 陈梯递,黄朝财,Krevalis M A. 邻苯二甲酸二异壬酯和邻苯二甲酸二异癸酯在电线电缆中的应用[J]. 中国

塑料,2000,14(6):70-73.

- [2] Wilson V S, Lambright C, Furr J, et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced in expression in the fetal rat testis[J]. Toxicology Letters, 2004, 146(3): 207-215.
- [3] Akingbmi B T, Youker R T, Sottas C M, et al. Modulation of rat leydig cell steroidogenic function by di(2 ethylhexyl) phthalate[J]. Biology of Reproduction, 2001, 65(4): 1643-1648.
- [4] Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, et al. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): A cross-sectional study in China[J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(11): 1643-1648.
- [5] Gray L E, Ostby J, Furr J, et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat[J]. Toxicological Sciences, 2000, 58(2): 350-365.
- [6] 王立鑫,杨旭. 邻苯二甲酸酯毒性及健康效应研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(3): 276-281.
- [7] 狄青,周丽佳. 塑化剂的毒性及安全标准研究[J]. 科技资讯, 2013(5): 230.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21911-2008 食品中邻苯二甲酸酯的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
- [9] 李俊儒,胡继红,段琼,等. 我国邻苯二甲酸酯类检测方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2): 180-183.
- [10] 魏宇曦,林春滢,王良填,等. 浅谈加工食品增塑剂污染的风险及对策[J]. 粮食与食品工业, 2013, 20(1): 45-46.
- [11] 朱慧,李言郡,赵志红,等. 邻苯二甲酸酯危害和检测方法的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2013, 20(6): 56-60.
- [12] 庞世敏,袁敏,赵桂兰,等. 气相色谱法测定邻苯二甲酸酯类增塑剂的研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2010, 11(4): 70-74.
- [13] 杨荣静,卫碧文,高欢,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测食品接触材料中的 17 种邻苯二甲酸酯类增塑剂[J]. 环境化学, 2012, 31(6): 925-929.
- [14] 朱秋劲,顾小红,汤坚,等. 17 $\beta$ -雌二醇及类似物与功能单体的相互作用[J]. 北京化工大学学报:自然科学版, 2007, 34(1): 19-23.

责任编辑:郎婧