烯丙基荧光素–丙烯酰胺沉淀共聚荧光分子印迹选择性荧光检测三氟氯氰菊酯残留

高　林，郑旭东，刘恩秀，刘恩利，李春香

（江苏大学化学化工学院，江苏镇江　212013）

摘要：设计并使用沉淀聚合法合成一种新颖的用于检测蜂蜜中超痕量三氟氯氰菊酯（lambda-cyhalothrin，LC）的荧光分子印迹聚合物（fluorescent molecularly imprinted polymer，FMIP）微球。以三氟氯氰菊酯为模板分子、丙烯酰胺（AM）为功能单体、烯丙基荧光素为荧光单体、二甲基丙烯酸乙二醇酯（EGDMA）为交联剂，合成微米尺寸具有特异识别位点的 FMIP 微球。FMIP 微球展现出规则的几何构型、强烈的荧光发光特性以及对目标分子的高度选择识别性。而且 FMIP 微球的荧光强度与三氟氯氰菊酯的浓度呈良好的线性关系，由此建立了线性回归方程$(I_0/I)-1=0.29\cdot C_C-0.006\ 08$，$R^2=0.993\ 6$，检出限（limit of detection，LOD）= 0.004 nmol/L；实际样品检测结果证明，该方法制备的 FMIP 微球可以在复杂样品中有选择性地检测三氟氯氰菊酯浓度；再生实验证明 FMIP 微球至少可以重复利用 5 次且无明显的信号损失。

关键词：分析化学；荧光传感器；三氟氯氰菊酯；选择性

中图分类号：O656　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2017)19-2125-07

Selective detection of lambda-cyhalothrin residues by fluorescence molecular imprinting with precipitation polymerisation of allyl fluorescein and acrylamide

GAO Lin, ZHENG Xudong, LIU Enxiu, LIU Enli, LI Chunxiang

(*School of Chemistry and Chemical Engineering*, *Jiangsu University*, *Zhenjiang*, *Jiangsu*　212013, *China*)

Abstract: A novel fluorescent molecularly imprinted polymer (FMIP) microspheres are fabricated via precipitation polymerisation, and used for detecting uitratrace amounts of lambda-cyhalothrin (LC) in honey. Using LC as template molecule, acrylamide (AM) as functional monomer, allyl fluorescein as fluorescent monomer, and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as crosslinker, the FMIP microspheres are prepared to form recognition sites with micrometer. The as-synthesized microspheres exhibit regular geometry, which possess high fluorescence intensity and highly selective recognition for target molecule. Moreover, the fluorescence intensity of FMIP microspheres show a good linear relationship with the concentration of LC, which are described by the Stern-Volmer equation with a correlation coefficient of 0.993 6. A lower limit of detection (LOD) is found to be 0.004 nmol/L. The results of practical detection suggest that FMIP microspheres by the developed method are satisfactory for selective determination of LC concentration in honey samples. The FMIP microspheres has certified that they could be reused for no less than 5 times without remarkably loss of signal intensity.

Key words: analytical chemistry; fluorescent sensor; lambda-cyhalothrin; selectivity

作者简介：高林（1987—），男，硕士研究生，主要研究方向：荧光单体构筑的分子印迹传感器

通信联系人：李春香，教授，主要研究方向：绿色高效分离富集新技术. E-mail: lcx@mail.ujs.edu.cn

0　引言

拟除虫菊酯类杀虫剂（pyrethroid pesticides，PPs）是一类仿生合成的广谱性杀虫剂，具有速效、无臭、低毒、触杀作用强及残留时间长等特点[1~2]。目前，对环境中 PPs 残留的监控分析、迁移、细菌抗药性等方面的研究已成为环境化学家关注的热点，美国环境保护局已将环境中 PPs 残留的最大值限定为 0.05 μg/g[3].

本研究通过沉淀聚合反应合成一个新颖的 FMIP 传感器用于光学检测超痕量三氟氯氰菊酯[4]。以三氟氯氰菊酯为模板，AM 为功能单体，烯丙基荧光素为荧光单体，EGDMA 为交联剂，偶氮二异丁腈为引发剂，乙腈为制孔剂，制备 FMIP 传感器。去除模板分子后，FMIP 内部形成了与三氟氯氰菊酯有较强亲和势的选择性识别位点[5]。本文详细阐述了 FMIP 微球的结构、形貌、光物理等性质，并对比荧光分子非印迹聚合物（fluorescent non imprinted polymer，FNIP），阐述 FMIP 的选择性、抗干扰性、检测范围、LOD 及目标浓度与荧光强度的线性关系。以实际样品的检测结果来说明 FMIP 传感器的应用情况。

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

1）试剂：乙醇、乙腈由国药集团化学试剂有限公司（上海，中国）提供；三氟氯氰菊酯、氟氯氰菊酯、氢戊菊酯、联苯菊酯购自应天意标准样品公司（北京，中国）；AM、EGDMA、偶氮二异丁腈均为分析纯，购自阿拉丁试剂公司（上海，中国）；偶氮二异丁腈经过甲醇重结晶后使用；实验用水为二次蒸馏水。

2）仪器：傅里叶变换红外光谱仪（Fourier transform infrared spectrometer，FTIR），美国，Themo Nicolet NEXUS 470 型，采用 KBr 压片测试，扫描次数 32 次，波数范围 4 000～400 cm^{-1}；扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM），日本，S-4800；荧光分光光度仪，美国，Cary Eclipse；激光共聚焦扫描显微镜，德国，Leica TCS SP5 II，固态激发光源波长为 488 nm.

1.2　荧光分子印迹传感器的制备

以 EGDMA 为交联剂、烯丙基荧光素（0.005 3 g）为信号基团（即荧光单体）、AM 为功能单体、三氟氯氰菊酯为模板分子共同在 60 mL 乙腈中进行反应[6]。具体实验操作过程：称取适量三氟氯氰菊酯、AM、烯丙基荧光素、EDGMA 和自由基引发剂偶氮二异丁腈倒入 100 mL 圆底烧瓶中，同时加入 60 mL 乙腈进行溶解。各组分具体用量如表 1 所示。溶液在超声波清洗器内脱气 5 min，充氮气 20 min 以净化空气，然后将烧瓶浸入油浴并以最慢速度搅拌（约 20 r/min），随后温度升高至 60℃并保持反应 24 h. 反应结束后，采用离心机进行离心分离并在 40℃下进行真空干燥。干燥后的微球通过索氏提取器去除模板后于 40℃下真空干燥。FNIP 微球的制备过程除无模板分子外其他条件与 FMIP 相同。通过重量分析，FMIP 产率为 68%，FNIP 产率为 64%.

表 1　制备 FMIP 的各组分用量

Tab. 1　Dosage of each component of prepared FMIP

FMIP 序号	AM/g	EGDMA/mL	三氟氯氰菊酯/g
1	0.284 4	0.8	0.499 5
2	0.213 3	0.6	0.374 6
3	0.142 2	0.4	0.249 7

1.3　荧光检测

1）配置 FMIP 分散液和不同浓度菊酯农药的溶液。准确称取 100 mg FMIP 固体加入 100 mL 无水乙醇的锥形瓶中，超声分散备用；准确配置 0，0.1，0.2，0.5，1.0 nmol/L 三氟氯氰菊酯溶液装入容量瓶中备用。

2）分别准确量取 5 mL FMIP 分散液和不同浓度的三氟氯氰菊酯溶液加入比色管中，超声混合后静置 2 h 达到吸附平衡。摇匀后，利用荧光分光光度计进行荧光测量。为精确检测数据，此过程重复 5 次。

3）绘制坐标图，拟合线性关系。

1.4 选择性识别测试

分别配置 1 nmol/L 的氟氯氰菊酯、氢戊菊酯、联苯菊酯的乙醇溶液 100 mL，分别量取 5 mL 上述 3 种溶液加入装有 5 mL FMIP 分散液的比色管中，震荡混合。检测荧光强度变化（激发波长 496 nm）。重复 5 次。

1.5 干扰实验

选取与模板分子结构相似的氟氯氰菊酯、氢戊菊酯、联苯菊酯作为干扰化合物。配置 1.0 nmol/L 含有三氟氯氰菊酯、氟氯氰菊酯、氢戊菊酯和联苯菊酯的乙醇混合溶液 100 mL，量取 5 mL 上述混合溶液加入装有 5 mL FMIP 分散液的比色管中，震荡混合。检测荧光强度变化（激发波长 496 nm）。重复 5 次。

2 结果与讨论

2.1 FMIP 微球的 FTIR 光谱分析

FMIP 微球的结构性能通过 FTIR 光谱分析得出，如图 1 所示，位于 1 730，1 258，1 151 cm^{-1} 处的特征峰归属于EGDMA 中的C═O 和C—O 键，3 440 cm^{-1} 和 1 613 cm^{-1} 处的特征峰是 AM 中亚胺基团的伸缩振动峰[7]。同时，1 677 cm^{-1} 处出现的特征峰为 AM 羰基基团中 C═O 键的伸缩振动峰。此外，1 391 cm^{-1} 处的特征峰归因于 AM 中 C—N 键的伸缩震动，上述特征峰说明功能单体和交联剂聚合反应成功。FTIR 光谱证明 FMIP 微球合成成功。

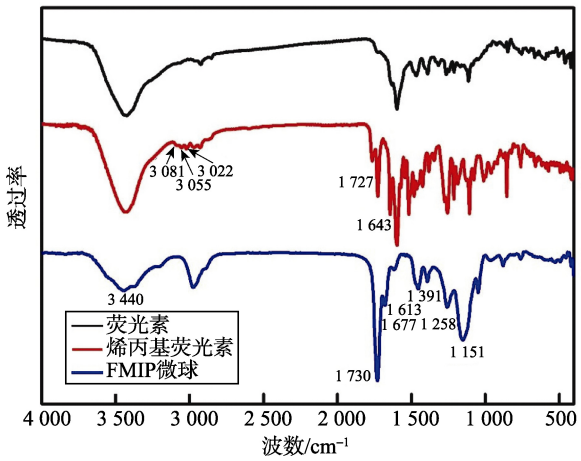
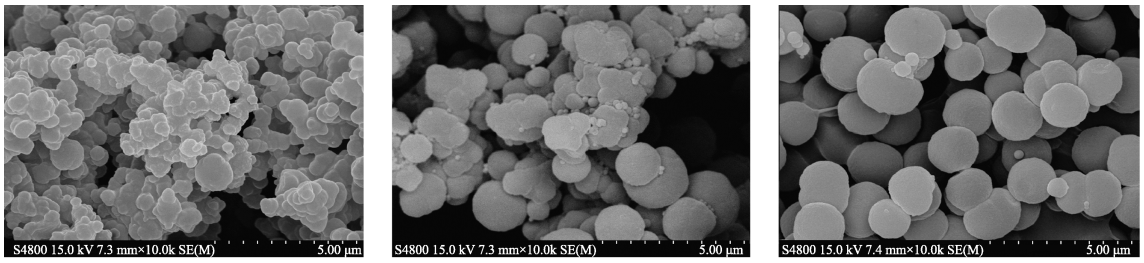


图 1 荧光素、烯丙基荧光素和 FMIP 微球的 FTIR 谱图

Fig. 1 FTIR spectra of fluorescein, allyl fluorescein and FMIP microspheres

2.2 SEM 分析

用 SEM 分别观察了不同组分的 FMIP 形貌特征，结果如图 2 所示。随着交联剂和单体用量的减少（由 FMIP **1** 至 FMIP **3**），微球逐渐呈现规则的球形形状。由图 2c 可以看出，FMIP **3** 具有规则球形形状、良好单分散性和光滑的外表面。在此最优的条件下，FMIP **3** 微球的平均粒径约为 2.0 μm. 在本实验中，微球通过沉淀聚合反应制备，沉淀聚合反应的原理决定了在聚合反应过程中，只有当发生聚合的聚合物链聚集到足够大的尺寸才会产生沉淀作用而沉降到反应器的



a—FMIP **1** b—FMIP **2** c—FMIP **3**

图 2 FMIP 微球随单体和交联剂用量变化的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of FMIP microspheres with the decreased amount of monomer and crosslinker

底部。因此，通过沉淀聚合反应制备的聚合物粒径理论值为0.5～2 μm，但通常在1～2 μm之间。

2.3　FMIP微球的光物理性能

图3展示了FMIP微球的激光共聚焦扫描显微镜图像，可以看出FMIP微球呈现强烈的绿色荧光发射，这是因为烯丙基荧光素的荧光发射峰位在520 nm处为强的绿色荧光（如图4中红色曲线所示）。同时由图3也可以很明显地看出，FMIP粒子具有较规则的球形几何形状且呈现出较好的单分散性。为更好地研究烯丙基荧光素和FMIP微球的发光性质，对其进行了荧光性质表征。所有荧光光谱均在室温条件下、激发波长固定为496 nm时进行测量。由图4可以看出，FMIP微球的荧光最大发射峰相对于乙醇中烯丙基荧光素发生了32 nm的蓝移，这是因为烯丙基荧光素由自由状态转变为聚合物层中固定状态而发生的环境变化导致。

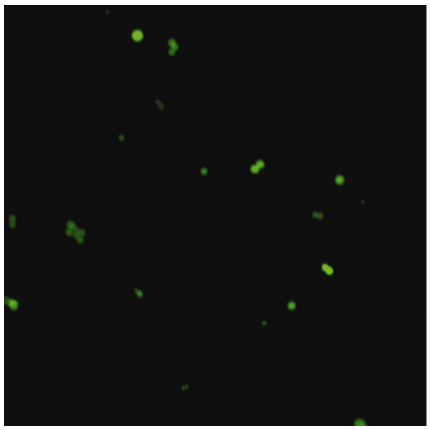


图3　FMIP微球的激光共聚焦扫描显微镜图像

Fig. 3　Confocal laser scanning microscope image of FMIP microspheres

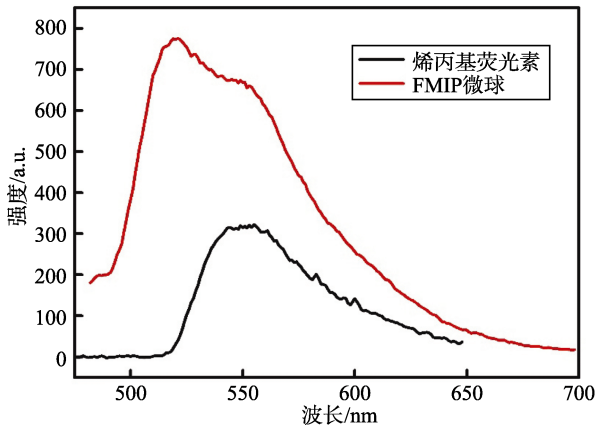


图4　烯丙基荧光素和FMIP微球的荧光光谱

Fig. 4　Fluorescence spectra of allyl fluorescein and FMIP microspheres

2.4　荧光检测实验与线性回归分析

回归分析法是根据实验数据建立两个或两个以上变量的数量关系（回归方程）并据此由一个或几个变量的值估计另一个变量的值的数理统计方法。在荧光分析中，先测量一系列不同浓度的标准样品溶液的荧光强度，作出荧光强度与浓度的关系曲线，即标准曲线，再由计算机程序绘制回归直线并得出回归方程。然后测定样品溶液的荧光强度，在标准曲线上查出样品溶液中待测物质的浓度，从而求得样品中待测物质的含量。

本实验通过研究三氟氯氰菊酯对FMIP微球荧光猝灭的规律，绘制标准曲线并拟合Stern-Volmer方程[如式（1）所示]从而得出回归方程。

$$(I_0/I)-1=K_{SV}\cdot C_C, \qquad (1)$$

其中，I_0为无三氟氯氰菊酯时FMIP分散液的初始荧光强度；I为存在三氟氯氰菊酯时FMIP分散液的荧光强度；K_{SV}为猝灭常数；C_C为猝灭剂浓度。

如图5所示，FMIP分散液的荧光强度随三氟氯氰菊酯的增加而逐渐减少，相对应的FNIP分散液的荧光强度却未发生明显变化，这说明在印迹过程中，烯丙基荧光素参与了具有选择性的印迹位点的形成，而在FNIP合成过程中未能形成有效的识别位点，这样从另一方面证明成功制备了FMIP微球。由图5a中的插图可以看出，三氟氯氰菊酯浓度为0～1.0 nmol/L时，荧光强度猝灭情况呈线性关系。通过软件Origin 2012拟合Stern-Volmer方程得出FMIP微球的线性回归方程$(I_0/I)-1=0.29\cdot C_C-0.006\ 08$，$R^2=0.993\ 6$，

LOD（3s/S，s 为标准偏差，S 为回归方程的斜率）为 0.004 nmol/L.

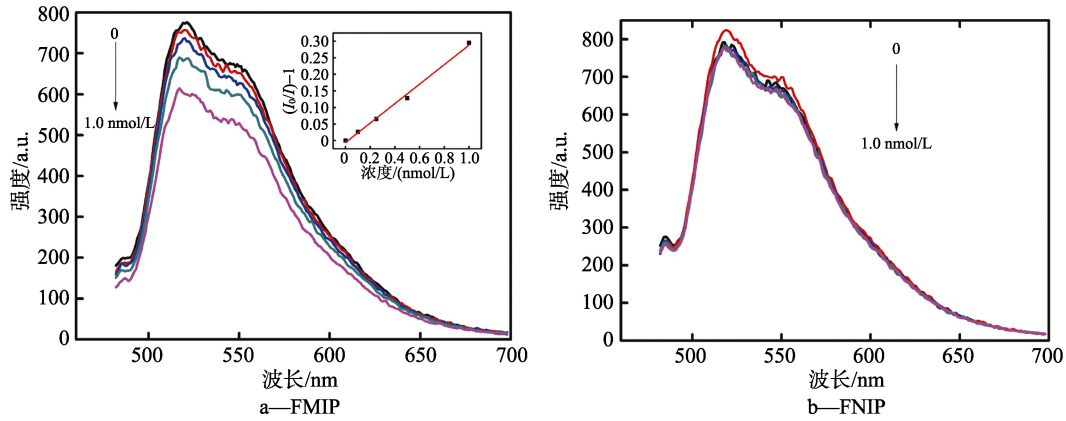


图 5 FMIP 微球与 FNIP 微球对 0～1.0 nmol/L 三氟氯氰菊酯的响应

Fig. 5 Responses of the FMIP microspheres and FNIP microspheres to LC in the concentration range from 0 to 1.0 nmol/L

2.5 选择性测定

为深入研究 FMIP 微球的选择性识别特性，选择化学结构与三氟氯氰菊酯相近的氟氯氰菊酯、氰戊菊酯、联苯菊酯作为竞争化合物。通过检测分析每种菊酯溶液对 FMIP 微球乙醇分散液荧光强度的猝灭程度来评价 FMIP 微球的选择识别性能。图 6 显示三氟氯氰菊酯对 FMIP 的猝灭能力高于其他 3 种竞争化合物，但是对 FNIP 的猝灭能力未见明显区别。因此，证明 FMIP 内部的选择性识别位点起决定性作用。

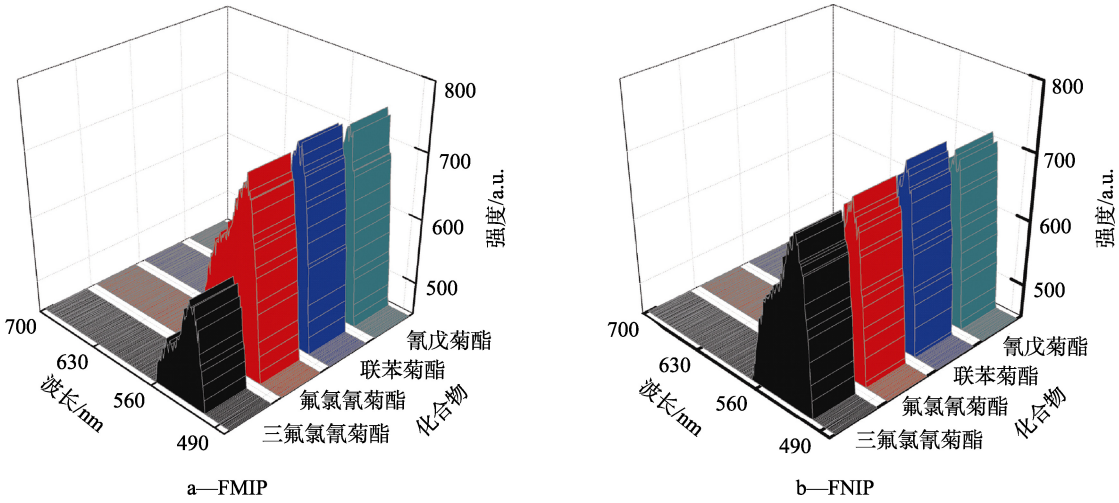


图 6 4 种 1.0 nmol/L 菊酯对 FMIP 微球和 FNIP 微球的猝灭程度

Fig. 6 Quenching degree of FMIP microspheres and FNIP microspheres by 4 kinds of 1.0 nmol/L pyrethroids

2.6 干扰性评估

抗干扰能力是评估传感器的重要指标。因此，考察 FMIP 传感器的抗干扰能力是初步评价复杂样品检测中应用的因素。为更深入地研究 FMIP 传感器的抗干扰能力，选择结构相似物氟氯氰菊酯、氰戊菊酯、联苯菊酯作为干扰化合物加入三氟氯氰菊酯溶液中形成混合溶液。如图 7 所示，3 种竞争杀虫剂的加入对荧光猝灭强度的下降无明显作用，竞争物未展现出明显的猝灭干扰，可以证明 FMIP 微球对于三氟氯氰菊脂具有高选择性，对来自相似化合物的干扰具有很高的抗干扰性。

2.7　对蜂蜜样品的应用与再生评估

对 FMIP 微球检测实际食品中三氟氯氰菊酯的适用性进行初步评价，将 5.0 g 蜂蜜样品溶解于三氟氯氰菊酯溶液（0，0.1，0.25，0.5，1.0 nmol/L），使用 1.4 节所述方法进行分析，相应结果如表 2 所示。其结果清晰地说明 FMIP 微球可以有效地应用于检测蜂蜜样品中的三氟氯氰菊酯。

表 2　蜂蜜样品中不同浓度三氟氯氰菊酯的检测结果

Tab. 2　Detection results of different concentrations of LC in honey samples

三氟氯氰菊酯浓度/(nmol/L)	检出浓度/(nmol/L)	检出率/%
0	0	—
0.10	0.13	103
0.25	0.26	104
0.50	0.49	98
1.00	0.97	97

为评价 FMIP 微球的荧光再生性，将 100 mg FMIP 微球加入 100 mL 三氟氯氰菊酯溶液静置 2 h 后进行荧光测试。测试后，使用甲醇和醋酸（体积比为 9:1）的混合溶液洗脱 FMIP 微球中吸附的三氟氯氰菊酯，使用离心机收集，并用乙醇清洗 3 次，检测分散液的荧光强度，如此重复 5 次。结果如图 8 所示，经过 5 次重复使用后，FMIP 的荧光强度未出现大幅度降低，因此 FMIP 微球可进行多次重复使用。

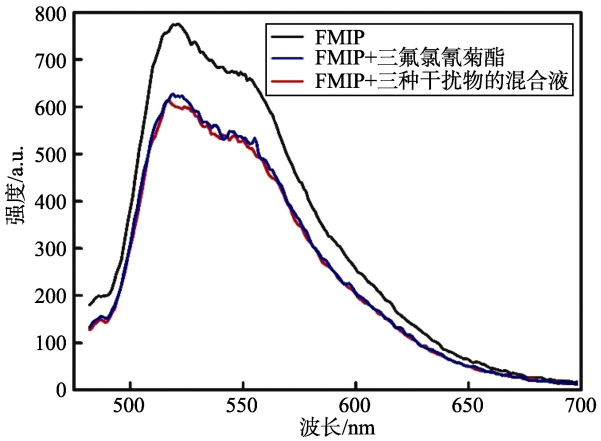


图 7　不同菊酯杀虫剂对 FMIP 的干扰性实验

Fig. 7　Interference test of different pyrethroids on the fluorescence response toward LC of FMIP microspheres

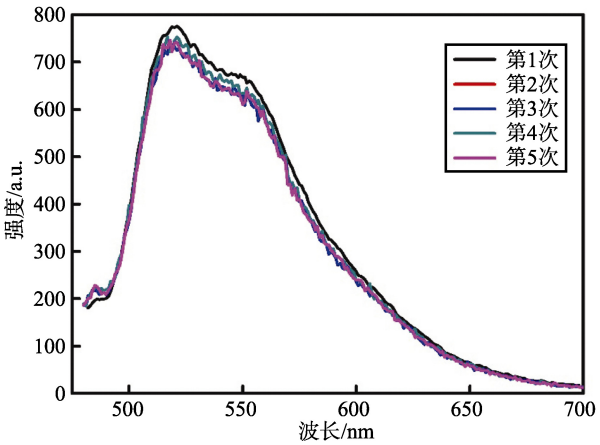


图 8　FMIP 微球重复使用后的荧光强度

Fig. 8　Effect of reuse of FMIP microspheres on fluorescence intensity

3　结论

本文利用烷基化反应设计合成了一种带有 C═C 双键的荧光单体，并结合沉淀聚合法制备了荧光分子印迹传感器。利用现代分析测量手段对所制备的荧光传感器形貌特征、热稳定性、化学结构、荧光性质等进行了细致地表征。以三氟氯氰菊酯污染物为研究对象，研究了分子印迹传感器的荧光检测范围、识别选择性、抗干扰性、响应时间，探讨了荧光传感器的选择性识别机理和检测方法。检测结果非常符合实际值，证实制备的荧光传感器可应用于分析检测领域。制备的荧光传感器具有优良的光学性能和理想的选择性、检测范围及 LOD。同时，荧光传感具有优良的再生性，可以重复利用。

[参考文献] (References)

[1]　HUGHES M F, ROSS D G, EDWARDS B C, et al. Tissue time course and bioavailability of the pyrethroid insecticide bifenthrin in the Long-Evans rat[J]. Xenobiotica, 2016, 46(5): 430-438.

[2]　FAZOLIN M, ESTRELA J L V, MEDEIROS A F M, et al. Synergistic potential of dillapiole-rich essential oil with synthetic

pyrethroid insecticides against fall armyworm[J]. Ciência Rural, 2016, 46(3): 382-388.

[3] BARRO R, GARCIA-JARES C, LLOMPART M, et al. Active sampling followed by solid-phase microextraction for the determination of pyrethroids in indoor air[J]. Journal of Chromatography Science, 2006, 44(7): 430-437.

[4] JIN Y Z, HIROSE K, NAKAMURA T, et al. Preparation and evaluation of a chiral stationary phase covalently bound with a chiral pseudo-18-crown-6 ether having a phenolic hydroxy group for enantiomer separation of amino compounds[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1129(2): 201-207.

[5] LIU H M, ZHANG M L, GUO Y, et al. Solid-phase extraction of flavonoids in honey samples using carbamate-embedded triacontyl-modified silica sorbent[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 56-61.

[6] RUBERT J, LACINA O, ZACHARIASOVA M, et al. Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 201-209.

[7] YAN W W, WANG N N, ZHANG P M, et al. Simultaneous determination of sucralose and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 358-364.