DOI:10.12441/spyswjs.20240721003 [文章编号] 1673-1689(2025)11-0059-11

分子印迹电化学传感器NH_2-MWCNTs@4-FPBA检测乳品中表皮生长因子的方法建立

张蕊月[1] 王艺伟[1] 曾洪秀[1] 王毕妮[1] 张富新[1] 霍振泉[2] 刘玉芳[1*]

(1.陕西师范大学食品工程与营养科学学院,陕西 西安 710119;2.忠梦昌健康科技股份有限公司,浙江 杭州 310063)

摘要:【目的】构建一种快速、准确的表皮生长因子(EGF)检测方法。**【方法】**将4-甲酰基苯硼酸(4-FPBA)共价锚定到氨基碳纳米管(NH_2-MWCNTs)表面,合成纳米复合材料(NH_2- MWCNTs@4-FPBA),将NH_2-MWCNTs@4-FPBA修饰于玻碳电极上,当存在EGF时,4-FPBA通过苯甲醛基捕获EGF模板,再将电极浸入吡咯溶液中,电聚合形成吡咯分子印迹层,最后在酸性溶液中解离去除EGF模板后,即可形成与EGF模板互补的三维空腔。**【结果】**该传感器具有0.45~500.00 pg/mL的宽线性范围和0.45 pg/mL的低检测限,并具有良好的选择性、重复性和稳定性。**【结论】**利用该分子印迹电化学传感器检测出酸奶中EGF质量浓度为3.67 pg/mL,超高温瞬时灭菌牛乳中EGF质量浓度为29.03 pg/mL。

关键词:表皮生长因子;分子印迹;电化学传感器;乳制品

Establishment of a Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor NH_2-MWCNTs@4-FPBA for the Detection of Epidermal Growth Factor in Dairy Products

ZHANG Ruyue[1] *WANG Yiwei*[1] *ZENG Hongxiu*[1] *WANG Bini*[1] *ZHANG Fuxin*[1]
HUO Zhenquan[2] *LIU Yufang*[1*]

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China; 2. Zhongmengchang Health Technology Co., Ltd., Hangzhou 310063, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to develop a rapid and accurate method for detecting epidermal growth factor (EGF). [**Method**] 4-Formylphenylboronic acid (4-FPBA) was covalently anchored to the surface of aminocarbon nanotubes (NH_2-MWCNTs) to synthesize nanocomposites (NH_2-MWCNTs@4-FPBA), and NH_2-MWCNTs@4-FPBA was modified on a glassy carbon electrode. When EGF was present, 4-FPBA captured the EGF template through benzaldehyde, and then the electrode was immersed in pyrrole solution to electropolymerize to form a pyrrole molecularly imprinted layer. Finally, after dissociation and removal of the EGF template in an acidic solution, a three-dimensional cavity complementary to the EGF template was formed. [**Result**] The sensor had a wide linear range of 0.45~500.00 pg/mL and a low detection limit of 0.45 pg/mL, with excellent selectivity, reproducibility, and stability. [**Conclusion**] The measurement using this molecularly imprinted electrochemical sensor showed that the mass concentration of EGF was 3.67 pg/mL in yoghurt and 29.03 pg/mL in ultra-high temperature transiently sterilized cow milk.

Keywords: epidermal growth factor; molecular imprinting; electrochemical sensor; dairy product

---

基金项目:国家自然科学基金项目(32572492)。

通信作者:刘玉芳(1987—),女,博士,副教授,主要从事功能性食品研究与开发、动物食品营养与功能研究。E-mail:yufang.liu@snnu.edu.cn

收稿日期:2024-07-21 **修回日期:**2024-09-21

表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）是一种含有53个氨基酸的低相对分子质量多肽[1]，在细胞增殖、胚胎发育和组织再生中起重要作用[2-3]。Chekmareva等[4]通过观察伤口肉芽组织的电子显微镜和放射显像，记录了含EGF的生物活性涂层激活血管细胞（内皮细胞和周细胞）和成纤维细胞的增殖过程，表明EGF明显激活了细胞的早期分化（3~4 d）和伤口的快速上皮化。Fu等[5]在大鼠胚胎和新生、成年大鼠中均发现EGF阳性免疫组化信号，表明EGF在胚胎发育中发挥着关键作用。EGF还参与多种上皮细胞离子通道的调控[6]，包括上皮钠通道（ENaC）[7]、$Na^+/K^+/2Cl^-$共转运体（NKCC1）[8]和跨膜蛋白16A（TMEM16A）[9]等，这些代谢通道与无机离子及其他营养物质吸收有关，因此，EGF具有维持血压、调节电解质平衡等生理功能[10]。由于EGF具有促进细胞生长、加速创面愈合、参与营养物质运输等多种生理功能，已经作为新型食品、药品添加剂被广泛应用于医疗保健和食品工业中，例如婴幼儿配方奶粉、配方乳等功能性乳制品[11]。目前，有关EGF的传统检测方法主要包括高效液相色谱法、气相色谱法、放射免疫测定法、酶联免疫吸附法等，这些方法大多灵敏度高、重现性好，但存在成本高，前处理复杂，不适宜大量样品规模化测定等缺点。因此，构建一种快速准确的EGF检测方法对功能性乳制品的研究与开发具有重要意义。

分子印迹技术（molecular imprinting technology，MIT）是指模板和功能单体在交联剂和引发剂的作用下发生聚合反应，再用萃取或酸解的方式将印迹分子从聚合体中剥离，制备拥有与印迹分子大小、形状、化学基团等互补的分子印迹聚合物（molecular imprinting polymers，MIPs），模拟“钥匙”和“孔”的作用，特异性地识别模板分子的技术[12]，具有选择性强、成本低、易于制备的优点。电化学传感器以电极作为转换元件和固定载体，将生物敏感物质固定在电极上，通过生物分子之间的特异性识别作用将目标分子与其反应信号转化成电信号，从而实现对目标物的定性或定量检测[13]，由于其灵敏度高、特异性好、响应速度快等优点，在有毒物质检测和保健食品开发中得到了广泛应用[14]。分子印迹电化学传感器是以MIPs作为生物识别物质，将其与目标分子的反应信号转化为电信号进行检测，具有分子印迹和电化学传感双重识别优势，已被应用于生物活性物质的检测。Yan等[15]以吡咯和邻苯二胺为功能单体，抗坏血酸为模板分子，制备了分子印迹传感器，该传感器线性范围为1×10^{-6}~1×10^{-3} mol/L，检出限为2.63×10^{-7} mol/L。Yang等[16]以邻苯二胺为功能单体，凝血酶为模板分子，在多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面电聚合制备了分子印迹聚合物薄膜，去除凝血酶后，得到对凝血酶具有特异性识别作用的聚邻苯二胺分子印迹膜。传感器在对凝血酶具有良好的线性响应，相关系数为0.999，最低检出限为1.7 fg/mL。但目前针对EGF的分子印迹电化学传感器研究尚未见报道。

碳纳米管（CNT）由于具有特殊的电子、机械和结构性能，易与其他物质复合，可以作为提高电化学传感器电导率和灵敏度的候选材料[17]。Rao等[18]制备了一种基于羧酸功能化的多壁碳纳米管（F-MWCNT），用其修饰丝网印刷碳电极构建了一种用于儿茶酚测定的一次性电化学传感器。甲酰基苯硼酸中的苯甲醛基与EGF中的氨基在中性的水相中，无需催化剂或引发剂即可发生反应，在酸性/强碱环境中会发生解离[19]，且硼酸可与碳纳米管结合，共同应用于含顺式二元醇生物大分子的检测中。

本研究拟以氨基碳纳米管（NH_2-MWCNTs）为载体，将4-甲酰基苯硼酸（4-FPBA）共价锚定到氨基碳纳米管表面，合成纳米材料NH_2-MWCNTs@4-FPBA。再将NH_2-MWCNTs@4-MPBA修饰到玻碳电极上，捕获EGF模板分子，将电极置于吡咯溶液中，通过电聚合在电极表面镀上由吡咯产生的分子印迹层，在酸性溶液中解离去除EGF模板后，分子印迹层中形成与EGF模板互补的三维空腔，以期为富含EGF的功能性乳制品的研究与开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

乙二胺（EDA）、肽耦联试剂（HBTU）、甲醇、4-甲酰基苯硼酸（4-FPBA）、硼氢化钠（$NaBH_4$）、吡咯（Py）、磷酸盐缓冲液（PBS）：阿拉丁试剂（上海）有限公司；表皮细胞生长因子（EGF，纯度95%）、生长激素（GH，纯度98%）、白细胞介素-10（IL-10，

纯度98%）、白细胞介素-6（IL-6，纯度98%）、类胰岛素生长因子（IGF-2，纯度95%）：上海源叶生物科技有限公司；试验用水为Milli-Q超纯水。

1.2　仪器与设备

电化学工作站：CHI660E型，上海辰华仪器有限公司；场发射扫描电子显微镜（SEM）：Nava NanoSEM 450型，美国赛默飞世尔科技有限公司；透射电子显微镜（TEM）：Talos F200i型，美国赛默飞世尔科技有限公司；能量色散X射线光谱仪（EDS）：Talos F200i型，美国赛默飞世尔科技有限公司；傅里叶红外光谱分析仪（FTIR）：Nicolet iS10型，美国赛默飞世尔科技有限公司；X射线光电子能谱（XPS）：Escalab Xi+型，美国赛默飞世尔科技有限公司；高分辨X射线衍射仪（XRD）：SmartLab（9）型，日本理学电子株式会社；高速离心机：Z206A型，德国HERMLE公司；恒温水浴锅：FM型，上海福玛实验设备有限公司；真空冷冻干燥机：FDU-1200 EYEL4型，上海爱朗仪器有限公司。

1.3　纳米材料的制备

1.3.1　MWCNTs的制备

将碳源气体（CH_4）和载气（H_2）通入CVD反应系统，底物为涂有金属催化剂（Fe）的薄膜，800 ℃反应24 h，用无水乙醇和去离子水交替洗涤，离心，得到多壁碳纳米管（MWCNTs）。

1.3.2　NH_2-MWCNTs的制备

参照Ding等[20]的方法。纯化后的MWCNTs先用硫酸与硝酸混合物（硫酸与硝酸体积比3∶1）于40 ℃下超声3 h，在MWCNTs表面引入羧基，得到羧化MWCNTs。将羧化MWCNTs过10 μm滤纸，用蒸馏水洗涤，80 ℃干燥4 h；取20 mg羧化MWCNTs超声分散于10 mL乙二胺，加入2 mg HBTU，持续超声4 h，用200 mL甲醇稀释后，10 μm滤纸过滤，滤液用过量甲醇洗涤，得到NH_2-MWCNTs，80 ℃干燥4 h。

1.3.3　NH_2 -MWCNTs@4-FPBA的制备

采用He等[21]的方法。取NH_2-MWCNTs和4-甲酰基苯硼酸（4-FPBA）分散至20 mL乙醇中，室温搅拌12 h，每4 h加入50 mg $NaBH_4$，得NH_2-NWCNTs@4-FPBA，离心，用无水乙醇和去离子水交替洗涤，45 ℃真空干燥。

1.4　材料的表征

1.4.1　场发射扫描电子显微镜（FE-SEM）

通过FE-SEM观察分子印迹纳米复合材料制备过程中微观结构的变化。将样品黏附于铝带上，108 Auto镀金仪（CRESSINGTON）中涂金。真空条件下，用Nava NanoSEM 450扫描电镜于10.0 kV加速电压下进行检测。

1.4.2　透射电子显微镜（TEM）

将纳米复合材料溶液滴于铜网上，置于透射电子显微镜和能量色散X射线光谱仪中，于真空条件下观察样品结构以及元素构成。

1.4.3　X射线衍射（XRD）

采用SmartLab X射线衍射仪，使用Ni滤波的Kα-Cu辐射（X射线波长1.54）进行检测，扫描角为5°~80°，扫描速率为5（°）/min。

1.4.4　傅里叶红外光谱（FTIR）

采用傅里叶变换红外光谱仪检测纳米材料的结构，检测范围4 000~500 cm^{-1}，分辨率4 cm^{-1}。

1.4.5　X射线光电子能谱（XPS）

利用Escalab Xi+光谱仪测量X射线光电子能谱，以284.8 eV的C1s信号作为结合能值校准其他元素。

1.5　电化学表征分析

1）循环伏安法（CV）：电位范围为−0.2～0.6 V。

2）差分脉冲伏安法（DPV）：电位范围为−0.2~0.6 V，调制时间50 ms。

3）电聚合分子印迹法：在0.1 mol/L吡咯溶液中进行，电位范围为−0.3~0.8 V，扫描速率为50 mV/s，扫描圈数为10圈。

所有电化学试验均采用Ag/AgCl（饱和KCl溶液）为参比电极，铂丝电极为对电极，金电极（GE）为工作电极的三电极电池系统，在含有0.1 mol/L KCl的5 mmol/L铁氰化钾溶液中进行。

1.6　电化学传感器的制备

玻碳电极用粒径为0.05 μm的氧化铝膏进行抛光处理，用超纯水和乙醇超声清理后通氮气干燥。将30 μL合成的NH_2-MWCNTs@4-FPBA滴到预处理后的玻碳电极上，干燥。将修饰后的电极浸入模板分子EGF溶液中12 h，通过苯甲醛基将EGF吸附于电极上。将电极置于0.1 mol/L的吡咯溶液中，通过CV法，镀上由吡咯电聚合产生的分子印迹层，在0.2 mol/L的盐酸中解离去除

EGF模板，得到可以特异性识别EGF的电化学生物传感器，将电极于200 μL不同质量浓度的EGF溶液中孵育90 min，取出后置于铁氰化钾溶液中检测DPV电流值。同时对照组传感器NIP-MWCNTs@4-FPBA在合成时不添加模板分子EGF，其余步骤与试验组一致。

1.7 试验条件优化

采用DPV记录当下峰值电流（I）以及存在、不存在EGF时的DPV峰值电流差值（ΔI）。

1）NH_2-MWCNTs@4-FPBA体积：分别取10、20、30、40、50 μL合成的NH_2-MWCNTs@4-FPBA滴至预处理后的玻碳电极上，空气中干燥，置于铁氰化钾溶液中检测GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA的DPV电流值。将不同体积NH_2-MWCNTs@4-FPBA修饰下的电极浸入模板分子EGF溶液中12 h，吸附EGF，取出后将电极插入吡咯溶液中，电聚合上吡咯的分子印迹层，于0.2 mol/L的盐酸中解离去除EGF模板，将电极于300 pg/mL的EGF溶液（200 μL）中孵育90 min，取出后置于铁氰化钾溶液中检测ΔI值。

2）扫描速率：将30 μL NH_2 -MWCNTs@4-FPBA滴至玻碳电极上，空气中干燥，将修饰后的电极浸入模板分子EGF溶液中12 h，吸附EGF，取出后将电极插入吡咯混合溶液中，分别以不同的电聚合扫描速率（5、25、50、75、100 mV/s）扫描10圈，电聚合上吡咯的分子印迹层，将电极置于铁氰化钾溶液中记录DPV电流值。将不同扫描速率下的电极置于0.2 mol/L的盐酸中解离去除EGF模板30 min，将电极于300 pg/mL的EGF溶液（200 μL）中孵育90 min，分析DPV的ΔI值。

3）洗脱时间：将30 μL NH_2-MWCNTs@4-FPBA滴至玻碳电极上，空气中干燥，将修饰后的电极浸入模板分子EGF溶液中12 h，吸附EGF，取出后将电极插入吡咯溶液中，以50 mV/s扫描速率扫描10圈，电聚合上吡咯的分子印迹层，于0.2 mol/L的盐酸中分别去除模板10、20、30、40、50 min，将电极置于铁氰化钾溶液中记录DPV电流值。将不同洗脱时间下的电极于300 pg/mL的EGF溶液（200 μL）中孵育90 min，记录DPV的ΔI值。

4）孵育时间：将30 μL NH_2-MWCNTs@4-FPBA滴至玻碳电极上，空气中干燥，将修饰后的电极浸入模板分子EGF溶液中12 h，吸附EGF，取出后将电极插入吡咯溶液中，以50 mV/s扫描速率扫描10圈，电聚合上吡咯的分子印迹层，于0.2 mol/L的盐酸中去除模板30 min，将电极于300 pg/mL的EGF溶液（200 μL）中分别孵育30、60、90、120、150、180 min，将电极置于铁氰化钾溶液中记录DPV电流值和ΔI值。

1.8 传感器的电化学测定

将30 μL NH_2-MWCNTs@4-FPBA滴至玻碳电极上，空气中干燥，将修饰后的电极浸入模板分子EGF溶液中12 h，吸附EGF，取出后将电极插入吡咯溶液中，以50 mV/s扫描速率扫描10圈，电聚合上吡咯的分子印迹层，于0.2 mol/L的盐酸中去除模板30 min，将电极于不同质量浓度的EGF溶液（200 μL）中孵育90 min，置于铁氰化钾溶液中，记录DPV电流信号对EGF溶液质量浓度（0、0.05、0.50、5.00、10.00、25.00、50.00、100.00、200.00、300.00、400.00、500.00 pg/mL）的反应情况。以EGF溶液质量浓度为横坐标，DPV的ΔI值为纵坐标绘制标准曲线。

1.9 传感器的重复性、稳定性和选择性

制备6个相同的检测EGF溶液的电极（GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF/MIP），记录最终的DPV电流值来表示传感器的重复性。将制备的电极分别于4 ℃贮藏0、3、6、9、12、15、18、21 d，检测电极的DPV峰值电流来表示传感器的稳定性。分别用构建的传感器检测相同质量浓度（300 pg/mL）的EGF与其他激素，包括类胰岛素细胞生长因子-2（IGF-2）、生长激素（GH）、白细胞介素-10（IL-10）、白细胞介素-6（IL-6），记录DPV的ΔI值来表示传感器的选择性。

1.10 样品前处理

将乳制品样品于3 000 r/min离心10 min以去除上层脂肪，取上清液作为待测液，采用所建立的电化学检测方法对样品中EGF进行测定。

1.11 数据处理

采用Origin 2022软件绘图，各试验重复3次，采用Excel 2019软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 NH_2-MWCNTs分子印迹电化学传感器检测原理

NH_2-MWCNTs分子印迹电化学传感器检测

原理如图 1 所示。首先合成氨基化碳纳米管 NH_2-MWCNTs，然后通过胺醛缩合反应将硼酸分子修饰到碳纳米管上，再将 NH_2-MWCNTs@4-FPBA 滴至玻碳电极表面，空气中自然干燥，纳米材料的高比表面积以及高表面能使材料通过静电吸附作用，稳定固定于电极表面。将电极置于 EGF 溶液中，利用 GCE/NH_2 -MWCNTs@4-FPBA 中丰富的位点通过多个共价键与 EGF 结合。再将电极插入吡咯中，以吡咯为功能单体，电聚合形成分子印迹聚合物层。在盐酸中去除分子印迹中的 EGF 后，露出可以特异性识别 EGF 的腔洞，此时电极表面空间位阻降低，电流值增加。当待测样品中存在 EGF 时，特异性识别 EGF 的孔洞被重新填上，阻碍电子转移，使得电流值下降。因此，通过 DPV 记录电信号，可以检测 EGF 的质量浓度。

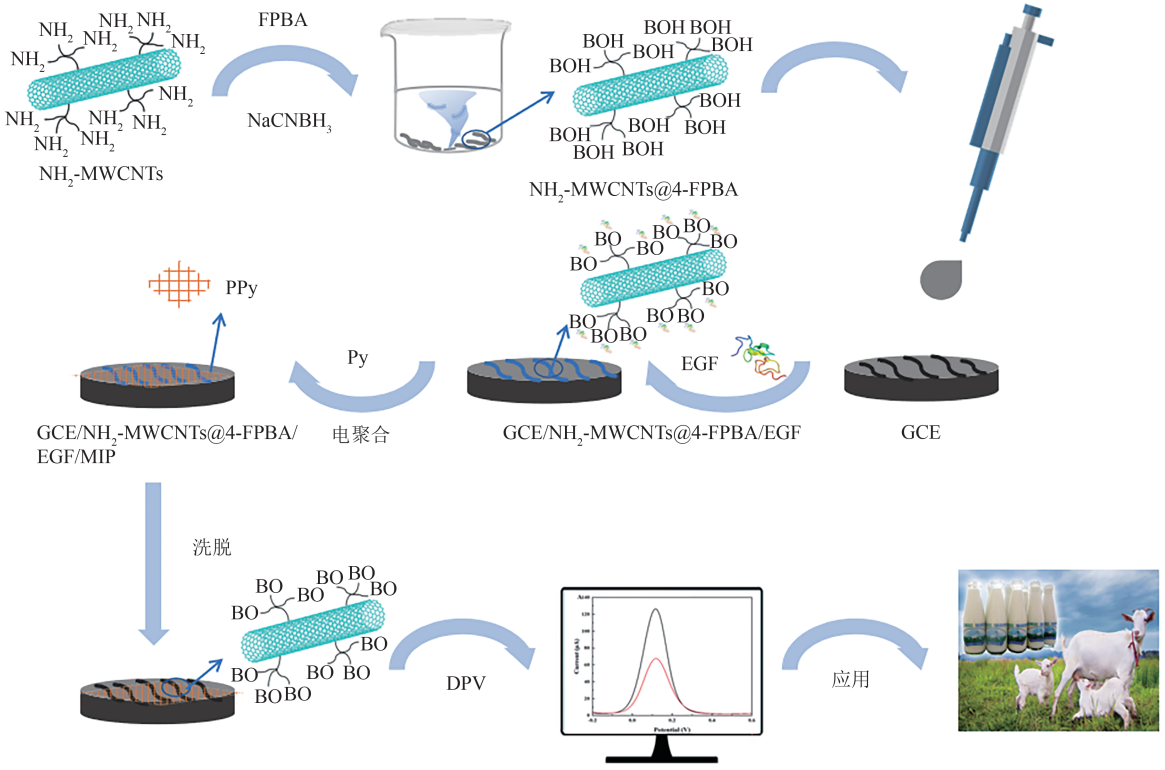


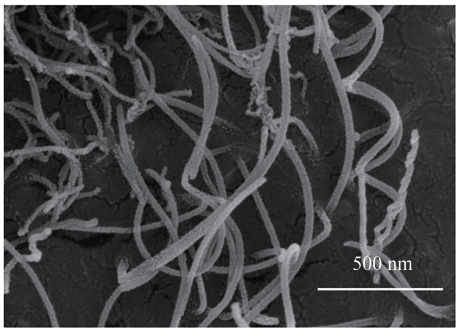
图 1　分子印迹电化学传感器构建过程示意图

Fig. 1　Schematic diagram of the construction process of the molecularly imprinted electrochemical sensor

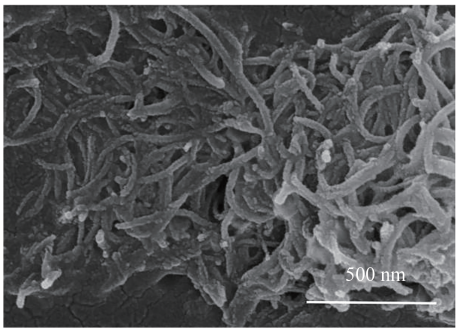
2.2　纳米复合材料的表征

采用 SEM 和 TEM 对 NH_2-MWCNTs 以及 NH_2-MWCNTs@4-FPBA 纳米复合材料的形貌结构进行表征，结果如图 2 所示。由图 2 可知，结合硼酸 4-FPBA 后，碳纳米管表面覆盖了一层薄膜，碳纳米管的排列更加紧密，且直径略微增大。

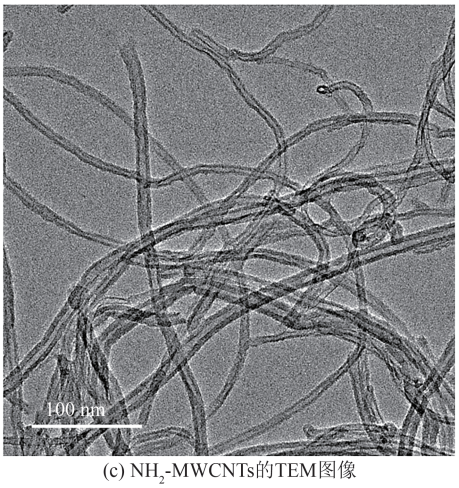
由图 3（a）可知，NH_2-MWCNTs 和 NH_2-MWCNTs@4-FPBA 在同一位置出现了 2 个衍射峰，分别表示（002）（碳的最强峰，2θ=26°）和（100）（碳的次衍射峰，2θ=43°）2 个晶面[22]，说明 4-FPBA 与 NH_2-MWCNTs 结合未改变 NH_2-MWCNTs 的晶体结构。由图 3（b）可知，FTIR 谱图中 3 460 cm^{-1} 处的特征峰为—NH 伸缩振动引起的；1 586、1 384 cm^{-1} 处出现的特征峰分别对应 N—H 平面拉伸和 C—N 键拉伸；2 850、2 925 cm^{-1} 处出现的特征峰对应 C—H 拉伸振动，这与 Ding 等[20]的研究结果一致。由图 3（c）可知，NH_2-MWCNTs 中只有位于 284.1 eV 处的 C 1s、位于 400 eV 处的 N 1s 与位于 533 eV 处的 O 1s，而 NH_2-MWCNTs@4-FPBA 中还有位于 187.3 eV 处的 B 1s 和位于 1 072.8 eV 处的 Na 1s，表明 NH_2-MWCNTs 与 4-FPBA 成功结合。由图 3（d）可知，NH_2-MWCNTs@4-FPBA 中的高分辨率 B 1s 光谱表示位于 195.5 eV 的 B—O 键和位于 194.7 eV 的 B—C 键[23]。



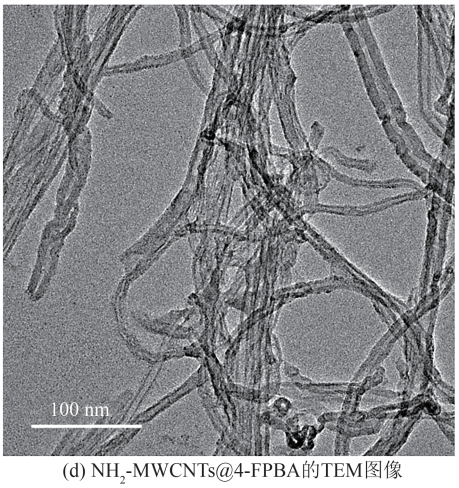
(a) NH_2-MWCNTs的SEM图像



(b) NH_2-MWCNTs@4-FPBA的SEM图像



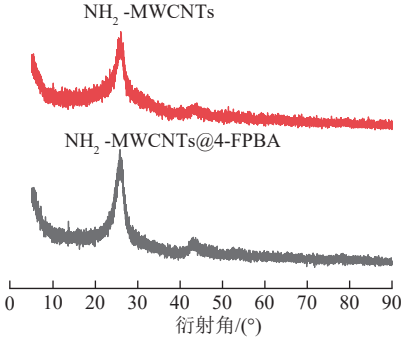
(c) NH_2-MWCNTs的TEM图像



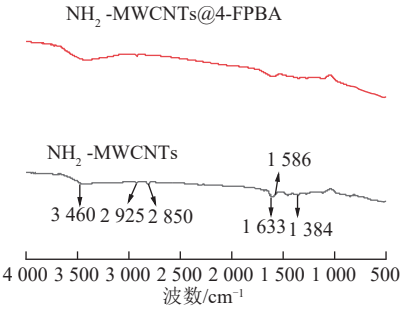
(d) NH_2-MWCNTs@4-FPBA的TEM图像

图 2　NH_2-MWCNTs、NH_2-MWCNTs@4-FPBA 的 SEM 和 TEM 图像

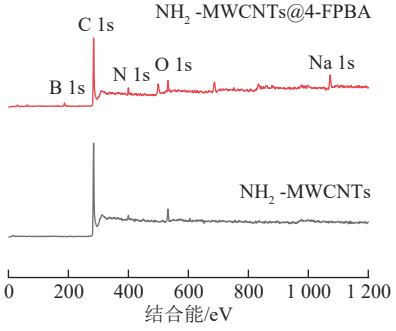
Fig. 2　SEM images and TEM images of NH_2-MWCNTs and NH_2 -MWCNTs@4-FPBA



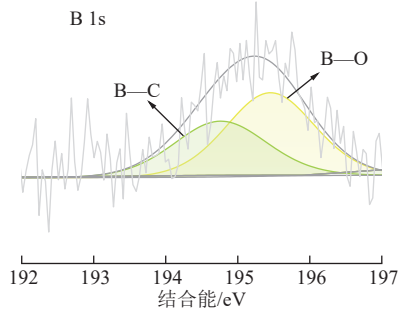
(a) 纳米复合材料的XRD谱图



(b) 纳米复合材料的FTIR谱图



(c) NH_2-MWCNTs和NH_2-MWCNTs@4-FPBA的 XPS谱图



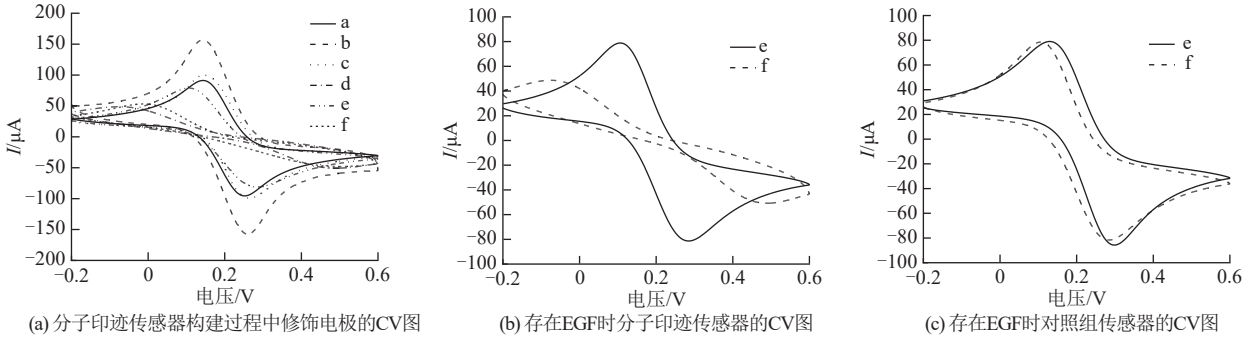
(d) NH_2-MWCNTs@4-FPBA的B 1s三维XPS谱图

图 3　纳米复合材料的 XRD 谱图、FTIR 谱图和 XPS 谱图

Fig. 3　XRD patterns, FTIR spectra, and XPS spectra of nanocomposites

2.3　传感器构建过程的电化学表征

由图4可知，经预处理后的GCE电极的峰值电流可以达到99.7 μA，用合成的纳米复合材料NH_2-MWCNTs@4-FPBA修饰电极后，电流值显著提升（57.3%），表明复合材料的导电性良好。将EGF结合在纳米材料表面后，EGF阻碍了材料的电子转移，GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF的电流值下降。通过电聚合将吡咯的分子印迹层镀在纳米材料表面，由于EGF的存在，形成的吡咯-EGF分子印迹层相当于一个反对电流传输的绝缘层，因此GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF/MIP的电流值进一步下降。在盐酸中解离EGF后，电极上暴露出可以特异性识别EGF的腔洞，电流值显著提升，此时曲线e（GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/MIP）的峰值电流小于曲线c（GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF），说明在酸溶液中洗脱后，电极表面仍带有分子印迹层。将电极插入含有EGF的样品中，EGF进入分子印迹层中的腔洞，电流值再次降低。将构建过程中未添加模板分子的对照组（GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF/NIP）插入含EGF和不含EGF的样品中，对电流值影响较小，说明对照组的分子印迹层中没有能识别EGF的特异性空腔。阻抗曲线中半圆直径的大小代表电子从电极表面到液相的转移率，即半圆直径越大，电流值越小。由图5可知，ELS的结果与CV的一致。

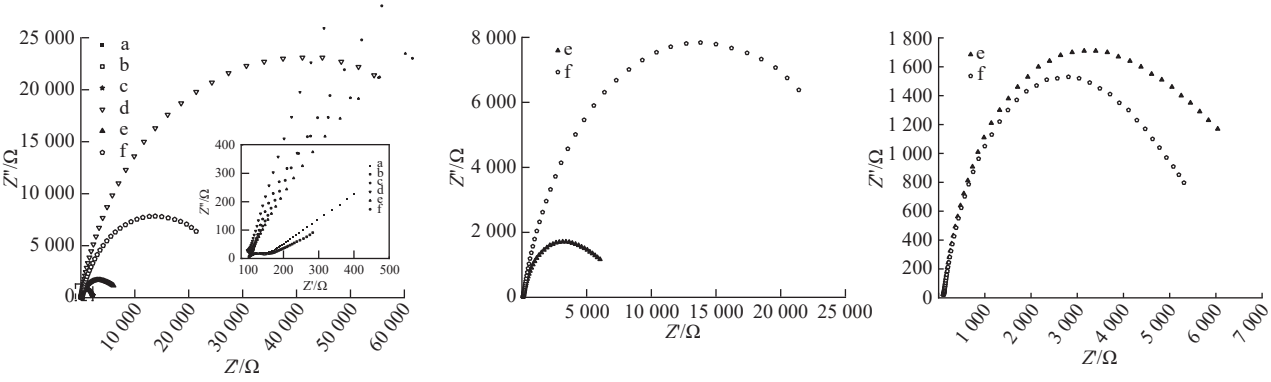


(a) 分子印迹传感器构建过程中修饰电极的CV图　(b) 存在EGF时分子印迹传感器的CV图　(c) 存在EGF时对照组传感器的CV图

a—裸GCE；b—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA；c—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF；d—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF/MIP；e—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/MIP；f—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/MIP/EGF。

图4　分子印迹传感器构建过程中不同修饰电极的CV图

Fig. 4　CV diagrams of different modified electrodes during the construction of molecularly imprinted sensor



(a) 分子印迹传感器构建过程中修饰电极的EIS图　(b) 存在EGF时分子印迹传感器的EIS图　(c) 存在EGF时对照组传感器的EIS图

a—裸GCE；b—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA；c—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF；d—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF/MIP；e—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/MIP；f—GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/MIP/EGF。

图5　分子印迹传感器构建过程中不同修饰电极的EIS图

Fig. 5　EIS diagram of different modified electrodes during the construction of molecularly imprinted sensor

2.4　检测条件优化

由图6（a）可知，用NH_2-MWCNTs@4-FPBA修饰玻碳电极，由于材料优秀的导电性，当NH_2-MWCNTs@4-FPBA体积从10 μL增加到30 μL时，电流值增大，由

于材料已经完全覆盖电极，继续增加材料添加量，I值无明显变化，且材料过多，在电极上堆积过厚，会使ΔI下降，对电极检测效果有一定影响。因此，选择30 μL作为NH_2-MWCNTs@4-FPBA的最佳体积。

由图6(b)可知，随着循环圈数的增加，形成的分子印迹层逐渐变厚，DPV电流值逐渐降低。由图6(c)可知，随着扫描速率增大，MIP层过于紧密，阻碍电子转移，DPV电流值下降。当循环圈数过少时，形成的MIP层过薄，难以形成完整的印迹腔，ΔI值较小，当循环圈数>10圈时，形成的MIP层太厚，使得EGF的嵌入过深导致难以洗脱，从而降低检测性能，ΔI值变小。Sharma等[24]制备的分子印迹电化学传感器在循环圈数过多时，模板分子同样难以洗脱，未取得满意效果。在较低的扫描速率下，合成的较为致密的薄膜使得完全去除模板较为困难，从而导致检测性能变差。在较高的扫描速率下合成松散的聚合物，导致低识别和弱检测信号。综上，选择最优的循环圈数为10圈，扫描速率为50 mV/s。

由图6(d)可知，随着洗脱时间的延长，模板分子被逐渐洗去，形成较多的印迹空腔，分子印迹层的空间位阻减小，电流值增加，当洗脱时间<30 min时，模板分子EGF未从MIP印迹孔洞中完全去除，ΔI值较低；当洗脱时间>30 min时，酸性溶液对分子印迹层造成破坏，电流值增大，而ΔI值降低。因此，选择30 min作为最优洗脱时间。

由图6(e)可知，20~90 min，EGF逐渐被固定于电极上，电流变低，ΔI增高，90 min后，未见明显变化，表明电极表面的EGF已达到饱和。因此，选择90 min作为最佳孵育时间。

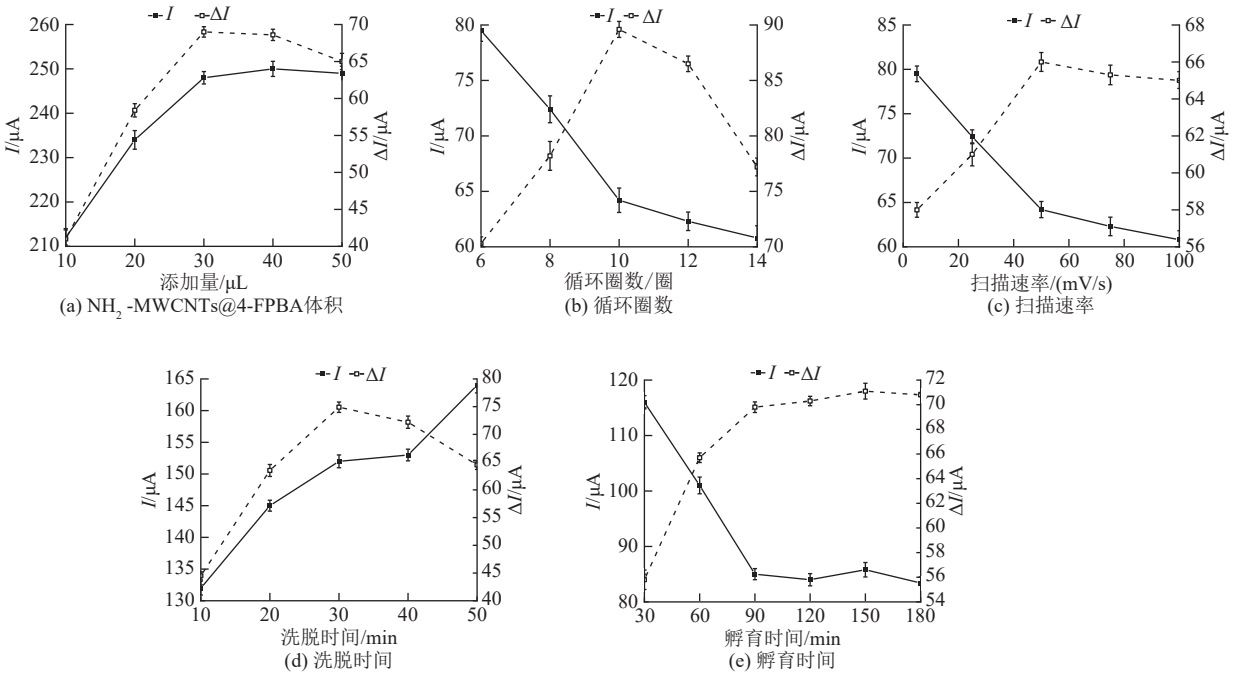


图6 不同条件下的I值和ΔI

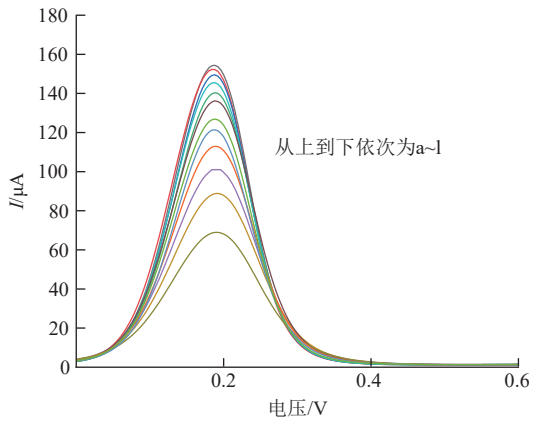
Fig. 6 I and ΔI under different conditions

2.5 传感器的电化学分析

由图7可知，随着EGF质量浓度的增大，DPV峰值电流明显减弱。ΔI与EGF质量浓度的线性关系为ΔI=0.207C_{EGF}+5.05，R^2=0.993。根据空白样品的标准偏差和回归方程的斜率计算出检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为0.45、1.49 pg/mL。由表1可知，试验方法显示出较宽的检测范围和较低的检出限。NH_2-MWCNTs@4-FPBA的导电性良好，可实现信号放大，提高传感器检测能力；NH_2-MWCNTs的表面积大，可以提供分子印迹识别位点，识别吸附EGF；分子印迹技术为EGF打造的特异性腔洞，对EGF的亲和力高，选择性好。

2.6 传感器的重复性、稳定性和选择性

由图8可知，采用相同的GCE/NH_2-MWCNTs@



a—0 pg/mL EGF；b—0.05 pg/mL EGF；c—0.50 pg/mL EGF；d—5.00 pg/mL EGF；e—10.00 pg/mL EGF；f—25.00 pg/mL EGF；g—50.00 pg/mL EGF；h—100.00 pg/mL EGF；i—200.00 pg/mL EGF；j—300.00 pg/mL EGF；k—400.00 pg/mL EGF；l—500.00 pg/mL EGF。

图7　不同质量浓度EGF的DPV响应

Fig. 7　DPV responses of different mass concentrations of EGF

4-FPBA/MIP分子印迹传感器来测量相同质量浓度的EGF，RSD为1.95%，表示重复性较好。该传感器具有良好的稳定性，在4 ℃的贮藏电极（GCE/NH_2-MWCNTs@4-FPBA/EGF/MIP）中，DPV电流值分别为初始值的98.1%、97.2%、94.8%、93.1%、91.3%、89.0%、88.2%。用分子印迹电化学传感器检测相同质量浓度的EGF和各种干扰物质（IGF、GH、IL-10、IL-6），ΔI越大，表明传感器对该物质的反应越强，该分子印迹传感器能选择性识别EGF。

表1　与其他检测EGF方法的比较

Table 1　Comparison of reported methods for the detection of EGF

方法	单位	检测范围	LOD	参考文献
免疫层析法	pg/mL		10	[25]
凝胶电泳法	mg/L		0.500	[26]
高效液相色谱法	ng/mL	50×10^4	50	[27]
电化学	ng/mL	1~10	0.2	[28]
试验方法	pg/mL	0.45~500.00	0.45	本研究

2.7　实际样品检测

为了研究传感器在实际样品检测中的可靠性，通过方程$\Delta I=0.207C_{EGF}+5.05$计算实际样品中的EGF质量浓度，并与ELISA计算结果进行比较。由表2可知，P值为0.98，表明2组数据无显著性差异。试验建立的电化学检测方法测得酸奶中EGF质量浓度为3.67 pg/mL，而ELISA法无法检测出来，说明试验方法的应用范围更广。试验方法检测出超高温瞬时灭菌牛乳、牛奶粉、生牛乳1、生牛乳2、牛初乳、婴幼儿配方奶粉中EGF质量浓度分别为29.03、61.41、46.79、38.91、31.68、38.01 pg/mL，与ELISA法的结果较为接近，表明试验建立的电化学检测方法可以成功应用于多种复杂食品样本中EGF的定量检测。

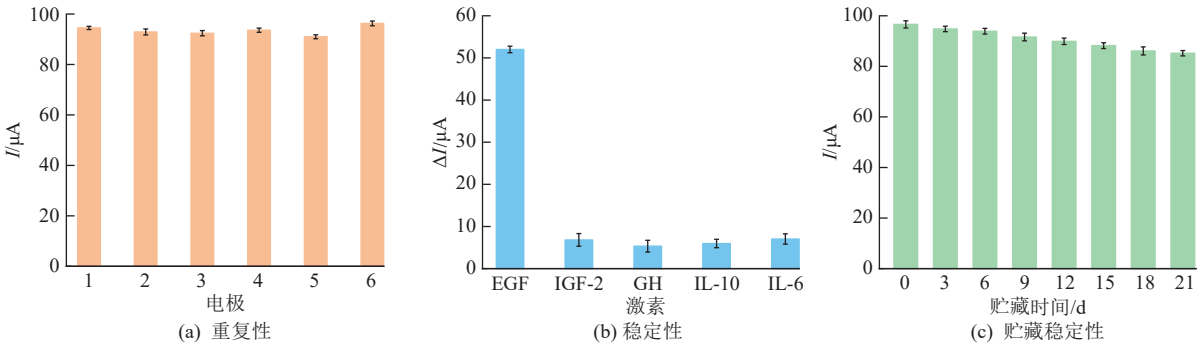


图8　化学分子印迹传感器的重复性、稳定性和特异性

Fig. 8　Repeatability, stability, and specificity of the molecularly imprinted electrochemical sensor

表2　分子印迹电化学传感器检测实际样品中的EGF

Table 2　Detection of EGF in real samples by the molecularly imprinted electrochemical sensor　　单位：pg/mL

方法	酸奶	超高温瞬时灭菌牛乳	牛奶粉	生牛乳1	生牛乳2	牛初乳	婴幼儿配方奶粉
电化学	3.67±0.18	29.03±5.45	61.41±6.12	46.79±5.38	38.91±4.62	31.68±6.74	38.01±7.76
ELISA		24.58±13.55	68.33±21.21	47.50±22.63	29.31±16.24	34.58±8.83	40.83±24.75

3 结论

本研究建立了一种基于NH_2-MWCNTs@4-FPBA纳米材料的表皮生长因子（EGF）电化学检测方法。通过胺醛缩合反应合成纳米复合材料NH_2-MWCNTs@4-FPBA，并用其修饰玻碳电极，采用吡咯合成分子印迹层，构建检测EGF的分子印迹电化学传感器。该分子印迹电化学传感器具有较宽的线性检测范围（0.45~500.00 pg/mL）、较低的检出限LOD（0.45 pg/mL）以及良好的重复性、稳定性和选择性，并成功应用于多种复杂食品样本中EGF的定量检测，为乳制品中EGF的检测提供了快速简便的方法，也为其他活性物质的检测提供了新思路。目前实现了针对EGF的单一检测，后续研究将构建可以同时识别多种生物活性物质的电化学传感器，为乳制品中生物活性物质的检测提供更简便快捷的方法。

参考文献

[1] NAKAMURA T，TAKASUGI H，AIZAWA T，et al. Peptide mimics of epidermal growth factor（EGF）with antagonistic activity[J]. Journal of Biotechnology，2005，116(3)：211-219.

[2] COHEN S，CARPENTER G. Human epidermal growth factor：isolation and chemical and biological properties[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，1975，72(4)：1317-1321.

[3] ZENG F H，HARRIS R C. Epidermal growth factor，from gene organization to bedside[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology，2014，28：2-11.

[4] CHEKMAREVA I A，VTYURIN B V，ADAMYAN A A，et al. Specific effect of epidermal growth factor immobilized on wound coating with soluble collagen on healing of experimental wounds [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine，2000，129（4）：392-395.

[5] FU X B，SUN T Z，YANG Y H. The expression characteristics and their biological significance of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor in rat skins at different development stages[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi，2001，15(6)：321-324.

[6] LEVCHENKO V，ZHELEZNOVA N N，PAVLOV T S，et al. EGF and its related growth factors mediate sodium transport in mpkCCDc14 cells *via* ErbB2（neu/HER-2）receptor[J]. Journal of Cellular Physiology，2010，223(1)：252-259.

[7] ZHELEZNOVA N N，WILSON P D，STARUSCHENKO A. Epidermal growth factor-mediated proliferation and sodium transport in normal and PKD epithelial cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta，2011，1812(10)：1301-1313.

[8] O' MAHONY F，TOUMI F，MROZ M S，et al. Induction of $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter expression mediates chronic potentiation of intestinal epithelial Cl^- secretion by EGF[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology，2008，294(6)：C1362-C1370.

[9] MROZ M S，KEELY S J. Epidermal growth factor chronically upregulates Ca^{2+}-dependent Cl^- conductance and TMEM16A expression in intestinal epithelial cells[J]. The Journal of Physiology，2012，590(8)：1907-1920.

[10] 汤小朋，刘虎，杨淑芬，等. 表皮生长因子在动物肠道无机离子及其他营养物质吸收中的作用[J]. 动物营养学报，2016，28(8)：2317-2323.
TANG X P，LIU H，YANG S F，et al. Roles of epidermal growth factor on absorption of inorganic ions and other nutrients in animal intestine[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition，2016，28(8)：2317-2323.（in Chinese）

[11] LÖNNERDAL B. Infant formula and infant nutrition：bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas 1 2 3[J]. The American Journal of Clinical Nutrition，2014，99(3)：712-717.

[12] 刘艺丹，栗鑫，王婧丽，等. 基于Fe_3O_4磁分子印迹纳米粒子比色检测蔬菜中6-苄氨基腺嘌呤残留[J]. 食品与机械，2024，40(6)：69-76，103.
LIU Y D，LI X，WANG J L，et al. Colorimetric detection of 6-benzylaminopurine residues in vegetables based on Fe_3O_4magnetic molecular-imprinted nanoparticles[J]. Food & Machinery，2024，40(6)：69-76，103.（in Chinese）

[13] 谢耀聪，俞建峰，石赛. 基于微流控芯片的茶多酚电化学检测方法研究[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(8)：105-111.
XIE Y C，YU J F，SHI S. Electrochemical detection of tea polyphenols based on microfluidic chip[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(8)：105-111.（in Chinese）

[14] 王松磊，李亚蕾，马亮，等. 基于泡沫镍载纳米材料的电化学传感器检测肉制品中亚硝酸盐[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(9)：90-98.
WANG S L，LI Y L，MA L，et al. Electrochemical sensor based on nickel-foamed nanocomposites for detecting nitrite in meat products[J]. Journal of Food

Science and Biotechnology，2023，42（9）：90-98.（in Chinese）

[15] YAN C L，LIU X，ZHANG R X，et al. A selective strategy for determination of ascorbic acid based on molecular imprinted copolymer of o-phenylenediamine and pyrrole[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry，2016，780：276-281.

[16] YANG S M，LI L L，ZHANG X R，et al. Electrochemical determination of thrombin with molecularly imprinted polymers and multiwalled carbon nanotubes[J]. Canadian Journal of Chemistry，2017，95（7）：799-805.

[17] WEI L，LIU G L，QIAN S R，et al. Molecular dynamics study of the mechanical properties of hydrated calcium silicate enhanced by functionalized carbon nanotubes[J]. Journal of Molecular Modeling，2024，30（2）：48.

[18] RAO M M，SETTU R，CHEN S M，et al. Electrochemical determination of catechol using functionalized multiwalled carbon nanotubes modified screen printed carbon electrode[J]. International Journal of Electrochemical Science，2018，13（6）：6126-6134.

[19] SHAN B H，WU F G. Hydrogel-based growth factor delivery platforms：strategies and recent advances[J]. Advanced Materials，2023，36（5）：2210707.

[20] DING M Y，ZHENG R. Preparation of amino-functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites [J]. Chinese Journal of Chemistry，2010，28（2）：208-212.

[21] HE P Y，ZHU H J，MA Y，et al. Rational design and fabrication of surface molecularly imprinted polymers based on multi-boronic acid sites for selective capture glycoproteins[J]. Chemical Engineering Journal，2019，367：55-63.

[22] 洪日，王铎，高从堦. 多壁碳纳米管的酰氯化和氨化改性及其结构表征[J]. 材料导报，2011，25（14）：100-102.
HONG R，WANG D，GAO C J. Acyl chloride/amino modification and characterization of multi-wall carbon nanotubes[J]. Materials Review，2011，25（14）：100-102.（in Chinese）

[23] LIU L，YE Z P. Effects of modified multi-walled carbon nanotubes on the curing behavior and thermal stability of boron phenolic resin [J]. Polymer Degradation and Stability，2009，94（11）：1972-1978.

[24] SHARMA P S，PIETRZYK-LE A，D'SOUZA F，et al. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry，2012，402（10）：3177-3204.

[25] BYZOVA N A，LUKHVERCHIK L N，ZHERDEV A V，et al. Development of an immunochromatographic test system for the detection of human enidermal growth factor [J]. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia，2013，49（6）：606-612.

[26] 陈科，郭狄，苏志坚，等. 化妆品中表皮生长因子的快速检测[J]. 日用化学工业，2010，40（1）：67-70.
CHEN K，GUO D，SU Z Q，et al. Rapid detection of epidermal growth factor in cosmetics[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics，2010，40（1）：67-70.（in Chinese）

[27] LEE K W，HWANG K H，KIM C S，et al. Determination of recombinant human epidermal growth factor（rhEGF）in a pharmaceutical formulation by high performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Archives of Pharmacal Research，2001，24（4）：355-359.

[28] CENTANE S，MGIDLANA S，OPENDA Y，et al. Electrochemical detection of human epidermal growth factor receptor 2 using an aptamer on cobalt phthalocyanines-Cerium oxide nanoparticle conjugate[J]. Bioelectrochemistry，2022，146：108146.