

纳米材料在电化学生物传感器中的应用进展

游春苹^{1,2}, 吴正钧¹, 王荫榆¹, 孔继烈², 刘宝红², 郭本恒^{1*}

(1. 光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200436)

(2. 复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要: 生物传感技术结合了信息技术与生物技术, 涉及化学、生物学、物理学以及电子学等交叉学科, 在医药工业、食品检测 and 环境保护等诸多领域有着广阔的应用前景。其中电化学生物传感器以其高选择性、高灵敏度、高检测速度和易于微型化以及便于在线监测等特点得到广泛研究和应用。其研制过程中的一个关键因素是生物分子的固定化。纳米技术的兴起为此带来无穷想象和诸多可能。近年来, 越来越多的纳米材料如纳米颗粒、碳纳米管、纳米多孔材料和介孔材料等, 被用于生物组分的固定, 在保持固定化生物组分活性的同时又促进有效的电子转移。按照结构的不同类别, 综述了近十年来纳米材料在电化学生物传感器方面的研究和应用进展。

关键词: 纳米材料; 电分析; 生物传感器; 电化学; 生物分子; 蛋白质

Proceedings of nanomaterials applied in electrochemical biosensors

You Chun-ping^{1,2}, Wu Zheng-jun¹, Wang Yin-yu¹, Kong Ji-lie², Liu Bao-hong², Guo Ben-heng^{1*}

(1. Technical Center, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China)

(2. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Biosensors, combining informatics and biotechnology, as an interdisciplinary frontier related to chemistry, biology, physics and electronics, will have broad applications in clinical medicine, food inspection and environment protection. Among them, electrochemical biosensors have been extensively studied and applied, due to the high selectivity, high sensitivity, fast responses and advantages in miniaturization and online detection. A key factor in biosensor development is the immobilization of biomolecules. The progress in nanotechnology brought infinite imaginations and great potentials. Recently, nanomaterials such as nanoparticles, carbon nanotubes, nanoporous materials and mesoporous materials have been increasingly employed to immobilize biocomponents, retaining their bioactivities and meanwhile promoting the effective electron-transfer. This paper reviews the proceedings during the last ten years of nanomaterials with different structures applied in electrochemical biosensors.

Key words: nanomaterials; electroanalysis; biosensor; electrochemistry; biomolecule; protein

0 引言

广义上的纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1~100 nm)或由它们作为基本单元构成的材料, 如纳米颗粒、纳米棒(管)、纳米薄膜、纳米块体材料等。纳米材料再按成相数目可以分为纳米相材料和纳米复合材料。

纳米相材料是指单相纳米颗粒组成的材料; 纳米复合材料是指两相或多相构成, 其中至少有一相为纳米级的材料。纳米材料的尺寸处在原子、分子为代表的微观世界和宏观物体交界的过渡区域。这样的系统既非典型的微观系统也非典型的宏观系统, 存在表面效应、体积效应、量子效应和宏观量子隧道效应等四大突出效应, 在催化、光

学、磁学、电学、热学和力学等方面表现出很多独特性能,并且已经在很多行业得到了很好的应用。

生物传感器作为一门涉及化学、生物学、物理学以及电子学等领域的交叉学科,在临床医药、发酵生产、食品检验和环境保护等诸多领域有着广阔的应用前景。结合电分析技术与生物传感技术的电化学生物传感器是其中非常重要的一类。它是由生物材料作为敏感元件,电极作为转换元件,以电势、电流或电导等作为特征检测信号的传感器。其研制过程中的一个关键因素是生物分子的固定化。如何在电极表面有效地固定生物分子,无论是对于研究蛋白质等生物分子的性质,还是对于研制新型电化学生物传感器都至关重要。理想的生物分子的固定方法要求既能促进有效的电子转移,又能保持被固定生物分子的活性。近年来,纳米技术逐步进入电分析和生物传感器领域,引发了突破性的进展。通过将新型纳米材料修饰到电极表面,可以有效地固定生物分子,并促进其氧化还原中心与电极之间的直接电子转移,从而研制新一代的生物传感器及其它生物器件。在此将按照纳米材料结构的分类,就近十年来纳米材料在现代电分析和生物传感器方面的应用进行综述。

1 纳米颗粒

1.1 纳米颗粒标记

胶体金可以用于生物分子的标记,从而实现信号的放大,一直广泛地应用于 TEM、SEM 表征,试纸条显色。有文献报道了胶体金在各种生物传感器中的信号放大作用^[1]。González-García 等^[2]利用胶体金标记,结合电化学方法来研究生物素-亲和素之间的作用。首先把生物素化的白蛋白吸附在电极表面,然后与 10 nm 直径胶体金标记的亲和素反应,由胶体金引起的电流响应和亲和素浓度线性相关 ($2.5 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L)。许多文献也报道了金属纳米颗粒在电化学生物传感器中的应用,一些生物催化电极通过将氧化还原酶分子和金纳米颗粒共沉积到电极上,从而被应用于生物传感器。通过将 apo-葡萄糖氧化酶与 1.4 nm Au₅₅ 纳米颗粒重组,可以实现葡萄糖氧化酶与电极的高效电连接^[3]。与金纳米颗粒重组

的葡萄糖氧化酶在没有介体的条件下与电极表面能够直接发生电子转移,且对葡萄糖具有催化作用。纳米颗粒也可以用来定位肿瘤,荧光素标记的识别因子,与肿瘤受体结合,可以在体外用仪器显影确定肿瘤的大小和位置。另一个重要的方法就是用纳米磁性颗粒标记识别因子,与肿瘤表面的靶标识别器结合后,在体外测定磁性颗粒在体内的分布和位置,从而给肿瘤定位^[4-6]。

1.2 纳米颗粒用作固定载体

纳米粒子具有高比表面积,与普通生物分子载体相比,可以增加固定的分子数量,从而增强响应信号。Singh 等^[7]用 sol-gel(溶胶-凝胶)方法合成硅纳米颗粒,其直径为 20 nm 或 200 nm。为了构建有机磷农药生物传感器,该纳米颗粒用于固定乙酰胆碱脂酶,具有较高的比表活性,结合离子敏场效应管检测,响应迅速(< 10 s),灵敏度高,对有机磷杀虫剂 paraoxon 的检测下限可达 1×10^{-6} mol/L。Cai 等^[8]把胶体金纳米颗粒固定在胱氨酸修饰的金电极表面,增大了有效固定面积,可以结合更多的 ssDNA,使得检测下限延长。

2 纳米孔结构材料

2.1 纳米微管

Miao 等引入了聚吡咯纳米微管固定法^[9]。聚吡咯微管基于模板合成方法而得到,即利用化学或电化学方法使吡咯单体在模板孔隙中生长,以得到与模板相应结构的纳米管。这种微管具有直径统一、上下连通、管壁多孔的特点。它 also 具有较大的比表面积,能容纳大量的酶分子,并减少反应物和产物的扩散障碍,有效地提高酶电极的性能。

2.2 纳米孔金属氧化物

最近,几种纳米孔金属氧化物材料如纳米氧化钛和氧化锌材料等,被用于固定氧化还原蛋白质如细胞色素 c 和血红蛋白,同时被制成固定这些蛋白质的电极^[10-12]。此外,也有报道将细胞色素 c 富集在 TiO₂ 肌醇六磷酸纳米膜上并测定其活性^[13]。这些纳米孔金属氧化物一般是半导体,具有电活性;也具有良好的生物相容性,如氧化钛被广泛应用于牙膏和白色涂料;同时其孔径是纳米尺寸,能够充分允许蛋白质分子固定。这些材料的表面积也很大,保证了足够多的生物分子

固定。这些特点表明纳米孔金属氧化物材料在生物传感器领域具有很大的应用潜力。Durrant 等^[14]还应用纳米孔氧化锌膜材料吸附绿色荧光蛋白, 研究了其光谱和电化学性质。

3 碳纳米管及其复合物

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)是由碳六元环构成的类石墨平面卷曲而成的纳米级中空管, 其中每个碳原子通过 sp^2 杂化与周围 3 个碳原子发生完全键合^[15]。根据碳管壁中碳原子层的数目而划分为单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWNTs)和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWNTs)。MWNTs 的层间距一般为 0.34 nm。碳纳米管的内径可控制在 10 nm 左右, 外径达几十个纳米, 轴向长度却可达几十微米甚至更长。与 MWNTs 相比, SWNTs 具有直径分布范围小、缺陷少、均匀一致性更高等特点。

碳纳米管的比表面积大, 孔径大小在一定范围内可控; 其侧壁由片状结构的石墨组成, 碳原子的 sp^2 杂化形成高度离域化的 π 电子, 疏水性强, 可与含有 π 电子的物质通过 π - π 非共价键结合; 而酸化处理的碳纳米管则具有羧基官能团, 可与含有 $-NH_2$ 基团的化合物共价结合。因此, 碳纳米管可以通过非共价吸附或共价键合方式组装蛋白质和酶分子, 其优良的导电性能会很好地促进生物电活性分子的电子传递, 是一种良好的生物传感器的材料。

Dekker 等^[16]使用单根单壁碳纳米管制备生物传感器, 通过键合分子将葡萄糖氧化酶分子固定到碳纳米管管壁上, 可以有效的检测葡萄糖和监测 pH 变化。Gooding 等^[17]利用单壁碳纳米管阵列获得了葡萄糖氧化酶与电极之间的直接电连接。李南强等研究了单壁碳纳米管对生物分子如多巴胺、肾上腺素和抗坏血酸等的良好的电催化作用^[18]。Davis 等^[19]将不同的金属蛋白和酶分子吸附在氧化与净化过的单壁碳纳米管上, 并测定了其生物活性。Joseph Wang 等^[20]将碳纳米管与 Teflon 混合用于葡萄糖氧化酶和乙醇脱氢酶的固定, 制备了碳纳米管复合电化学传感器, 分别测定了葡萄糖和 NADH。Tachikawa 等^[21]利用单壁碳纳米管通过静电作用层层组装葡萄糖氧化酶研究了其直接电化学。董绍俊等^[22]和陈洪渊等^[23]

利用碳纳米管-壳聚糖复合物修饰电极也探测到了葡萄糖氧化酶的直接电化学并用于生物传感。李景虹等^[24]则将碳纳米管-量子点复合物修饰电极用于葡萄糖氧化酶的直接电化学和葡萄糖传感器研究。毛兰群等利用碳纳米管修饰的玻碳电极获得了同型半胱氨酸的灵敏检测^[25]; 利用多壁碳纳米管修饰的碳纤维微电极对鼠脑中的抗坏血酸进行了原位伏安法检测^[26]; 另外也对碳纳米管复合物, 如溶胶-凝胶驱动的陶瓷-碳纳米管复合物^[27]和聚合物辅助合成的结构均一且具有电活性的 MnO_2 -碳纳米管复合物^[28], 进行了电化学研究和电催化应用。陈金华等^[29-30]利用硼掺杂的碳纳米管修饰电极研究了葡萄糖氧化酶的直接电化学和生物传感。

4 介孔材料及其复合物

介观结构材料是指三维空间尺度中至少有一维的尺寸处于介观上的固体材料, 或者说其显微结构中的物相具有介观尺度的材料。按照国际纯粹与应用化学协会(IUPAC)的定义^[31], 孔径在 2~50 nm 范围的多孔材料称为介孔(中孔)材料。介孔材料具有较大的比表面积和孔体积、均一的且在纳米尺寸上连续可调的孔径、从一维到三维的规则有序的孔道结构、可控的形貌、表面基团可官能化、 SiO_2 无生理毒性等优点, 使得它们在大分子吸附、分离、传感器、生物医学、化工催化、环境保护以及纳米材料的合成等领域展现出传统沸石分子筛无可比拟的优越性和广阔的应用前景。

按照介孔是否有序, 介孔材料可分为无定形(无序)介孔材料和有序介孔材料。前者如普通的 SiO_2 气凝胶、微晶玻璃等, 孔径范围较大, 孔道形状不规则; 后者是以表面活性剂形成的超分子结构为模板, 利用溶胶-凝胶工艺, 通过有机物无机物之间的界面定向导引作用组装成一类孔径约在 1.5~30 nm, 孔径分布窄且有规则孔道结构的无机多孔材料, 如 M41S^[32]等。其中有序介孔材料是 20 世纪 90 年代初迅速兴起的一类新型纳米结构材料, 它利用有机分子表面活性剂作为模板剂, 与无机源进行界面反应, 以某种协同或自组装方式形成由无机离子聚集体包裹的规则有序的胶束组装体, 通过煅烧或萃取方式除去有机物

质后,保留下无机骨架,从而形成多孔的纳米结构材料,在催化^[33]、吸附^[34]、分离^[35-37]及光、电、磁^[38-39]等许多领域有着潜在的应用价值。

目前,国内外介孔材料和功能化介孔材料用于修饰电极研究才起步不久。近年来的研究成果主要有:

鞠幌先^[40-41]等研究了辣根过氧化物酶、血红蛋白和肌红蛋白在六方介孔硅上的直接电化学,探讨了介孔分子筛与这些蛋白质间的相互作用,构建了过氧化氢和亚硝酸根的新型生物传感器。其中固定化的血红蛋白表现出两对可逆的氧化还原峰,分别对应于吸附在表面的和内嵌的血红蛋白^[41]。该研究小组还制备了导电的介孔碳硅复合物用于葡萄糖氧化酶的固定和生物传感研究^[42]。

Hyeon 和 Kim 等^[43]将介孔碳泡沫(mesocellular carbon foam)用于葡萄糖氧化酶的固定,制备了灵敏快速的葡萄糖生物传感器。这种介孔碳泡沫的介孔孔道用于酶分子负载,微孔孔道用于传质,制备的传感器与基于聚合物制得的生物传感器相比,表现出更高的催化活性和检测灵敏度。

Walcarus 等^[44]将二茂铁接在有序介孔硅上,得到功能化介孔硅,研究了该材料的电化学行为,发现该材料通过电子跃动实现长程电子转移,这种介孔结构材料是固载氧化还原探针的理想载体。

陈洪渊小组^[45]用壳聚糖为交联剂通过层层组装将介孔碳 CMK-3(比表面积 1 060 m²/g,孔体积 1.1 cm⁻³)-血红蛋白多层膜固定在玻碳电极表面,得到的修饰电极对过氧化氢具有很好的电催化效应。

Dai 等^[46]利用含 Ti 的 MCM-41 介孔氧化硅修饰电极固定葡萄糖氧化酶制备了葡萄糖生物传感器。

贾能勤等^[47]研究了多巴胺(DA)和抗坏血酸(AA)在介孔碳修饰电极上的电化学和电催化行为,与玻碳电极相比,介孔碳电极显示出快速电子转移速度和较大的响应电流,在 AA 存在条件下对 DA 表现出高选择性和灵敏度。

郭黎平等制备了介孔碳-聚合物膜修饰电极^[48],对亚硝酸盐还原具有一定的电催化活性;

有序介孔碳修饰电极作为半胱氨酸的传感器,检出限为文献报道中的最低值^[49];以离子交换聚合物 Nafion 为分散剂,将有序介孔碳分散其中,以该分散液涂覆在玻碳电极表面制得的修饰电极^[50],在 pH 值范围 2.00~10.00 内,可以选择性检测肾上腺素(EP)而不受 AA 干扰;二茂铁与介孔碳的复合材料修饰电极具有较好的稳定性和重现性,在检测尿酸(UA)的生物物质时抗干扰能力强^[51-52];介孔碳与富勒烯的复合材料修饰电极^[53]对很多无机和有机电活性物质(如铁氰化钾、NADH、UA、AA、DA、EP 等)的电子传递都有明显的促进作用,尤其是极大地降低了 NADH 的氧化过电位(与未修饰的裸电极相比)。

董绍俊等^[54]利用有序介孔碳修饰电极分别固定脱氢酶和氧化酶,制备了相应的生物传感器。

Zhu 等^[55]研究了有序介孔碳糊电极对很多氧化还原物质(如 AA、UA、NADH、DA、EP 和 H₂O₂)的电催化研究,并用于固定葡萄糖氧化酶制备葡萄糖生物传感器。

曾百肇等^[56]用介孔碳 CMK-3 与 Pt 纳米粒子的复合物修饰电极固定葡萄糖氧化酶,所制备的生物传感器对葡萄糖有良好稳定的响应。

刘宝红课题组设计并分别制备了二维和三维高度有序的介孔碳用于固定葡萄糖氧化酶分子以研究其可逆的电子传递^[57]。与二维有序的介孔碳材料相比,三维有序的介孔碳材料对蛋白质表现出更高的负载能力,其固定化的酶分子保持了更高的生物活性,所制备的葡萄糖生物传感器表现出灵敏度高、响应迅速、线性范围宽和检测限低等特点。该小组进一步制备了具有更高对称性和更高有序度的双连续螺旋介孔碳(Bicontinuous gyroidal mesoporous carbon, BGMC),并构建了一系列具有不同孔径的 BGMC 纳米复合物薄膜来固定不同尺寸的蛋白质(肌红蛋白(Mb)和葡萄糖氧化酶(GOx))^[58]。实验表明 BGMC 的孔径对蛋白质固定及其电子转移具有较大影响。这也意味着可以通过调控介孔碳的孔径、拓扑结构等来制备适宜于不同尺度生物分子的固定基质,以促进异相电子转移并提高固定化蛋白质的生物电催化性能。

5 总结与展望

纳米技术和生命科学是 21 世纪最前沿的两大学科,纳米技术的介入为生物传感器的发展提供了无穷的想象。在生物电分析化学研究和电化学生物传感器的研制中,生物分子的固定化是一个关键因素。这涉及到生物分子氧化还原中心与电极之间的电连接。因此找到一种可靠且有效的方法来保持固定化生物分子的高活性同时允许电极和氧化还原活性中心之间有效的电子传递至关重要。纳米材料具有如电学、磁学、力学、电化学等诸多特异性质,同时能够有效固定生物组分,在生物传感器中具有极大的应用潜力,日益引起人们的关注。

总的说来,纳米颗粒可以广泛地应用于敏感分子的固定(纳米金、纳米硅胶),信号的检测和放大(纳米金、纳米磁粒子、荧光纳米颗粒),待测物质的富集和浓缩(纳米磁粒子)。纳米碳管既可以用于分子的固定,也可以用于纳米器件的设计(纳米碳管具有优异的场效应管性能)。介孔材料和功能化介孔材料由于其较大的比表面积和较大的孔容以及尺寸可调控的孔径等特点,开始用于不同尺寸生物分子尤其是较大分子氧化还原蛋白质(如葡萄糖氧化酶)的固定和生物传感研究。

实际上,生物分子本身就可以看作具有特定功能的纳米器件,如酶分子对底物分子的识别和作用,它可以切断底物分子的化学键并进行重组。细菌视紫红质的蛋白质对光的敏感性,使它暴露于光下时会发射出质子,从而产生出可以检测的微小电信号。这种对特定频率光的响应受溶液中不同离子浓度的影响,因而可以用来检测离子。纳米技术与生物传感器的交叉发展中,最终期望能制造出智能型纳米机器,集测试、功能于一体。当前纳米粒子的研究已经进入到药物的控制释放领域。纳米粒子在人体内的传输非常方便。由纳米粒子包裹的智能药物进入人体后,可主动识别并攻击癌细胞或修补损伤组织。一种糖尿病患者专用的超微型传感器,可植入患者皮下,适时监控体内血糖水平,根据需要释放胰岛素。现在,科学家正在制造纳米智能机器人,这种机器人在人体中巡游,随时监控人体各项生理指

标,根据预先设定的指令,清除有害物质,自动释放药物,并进行自身组织的构建和修复。纳米技术已经而且将继续为生物传感器的发展带来突破,它们的有机结合为人类展望了美好的未来。

参考文献

- [1] Woodbury R G, Wendin C, Clendenning J, et al. Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13 (10): 1 117 ~ 1 126.
- [2] González-García M B, Fernández-Sánchez C, Costa-García A. Colloidal gold as an electrochemical label of streptavidin-biotin interaction [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15 (5-6): 315 ~ 321.
- [3] Xiao Y, Patolsky F, Katz E, et al. "Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle [J]. *Science*, 2003, 299 (5614): 1 877 ~ 1 881.
- [4] Perez J M, O'Loughin T, Simeone F J, et al. DNA-based magnetic nanoparticle assembly acts as a magnetic relaxation nanoswitch allowing screening of DNA-cleaving agents [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124(12): 2 856 ~ 2 857.
- [5] Deng Y H, Deng C H, Yang D, et al. Preparation, characterization and application of magnetic silica nanoparticle functionalized multi-walled carbon nanotubes [J]. *Chem. Commun.*, 2005, (44): 5 548 ~ 5 550.
- [6] Deng Y H, Wang C C, Shen X Z, et al. Preparation, characterization, and application of multistimuli-responsive microspheres with fluorescence-labeled magnetic cores and thermoresponsive shells [J]. *Chem-Eur. J.*, 2005, 11 (20): 6 006 ~ 6 013.
- [7] Singh A K, Flounders A W, Volponi J V, et al. Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14 (8-9): 703 ~ 713.
- [8] Cai H, Xu C, He P G, et al. Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA [J]. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 510 (1-2): 78 ~ 85.
- [9] Miao Y Q, Qi M, Zhan S Z, et al. Construction of a glucose biosensor immobilized with glucose oxidase in the film of polypyrrole nanotubules [J]. *Anal. Lett.*, 1999, 32 (7): 1 287 ~ 1 299.

- [10] Topoglidis E, Campbell C J, Cass A E G, et al. Factors that affect protein adsorption on nanostructured titania films. A novel spectroelectrochemical application to sensing [J]. *Langmuir*, 2001, 17 (25): 7 899 ~ 7 906.
- [11] Xu X, Tian B Z, Zhang S, et al. Electrochemistry and biosensing reactivity of heme proteins adsorbed on the structure-tailored mesoporous Nb₂O₅ matrix [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 519 (1): 31 ~ 38.
- [12] Xu X, Tian B Z, Kong J L, et al. Ordered mesoporous niobium oxide film: A novel matrix for assembling functional proteins for bioelectrochemical applications [J]. *Adv. Mater.*, 2003, 15 (22): 1 932 ~ 1 936.
- [13] McKenzie K J, Marken F. Accumulation and reactivity of the redox protein cytochrome c in mesoporous films of TiO₂ phytate [J]. *Langmuir*, 2003, 19(10): 4 327 ~ 4 331.
- [14] Topoglidis E, Cass A E G, O'Regan B, et al. Immobilisation and bioelectrochemistry of proteins on nanoporous TiO₂ and ZnO films [J]. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 517 (1-2): 20 ~ 27.
- [15] Ajayan P M. Nanotubes from carbon [J]. *Chem. Rev.*, 1999, 99 (7): 1 787 ~ 1 799.
- [16] Besteman K, Lee J O, Wiertz F G M, et al. Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors [J]. *Nano. Lett.*, 2003, 3 (6): 727 ~ 730.
- [17] Liu J Q, Chou A, Rahmat W, et al. Achieving direct electrical connection to glucose oxidase using aligned single walled carbon nanotube arrays [J]. *Electroanalysis*, 2005, 17 (1): 38 ~ 46.
- [18] Luo H X, Shi Z J, Li N Q, et al. Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode [J]. *Anal. Chem.*, 2001, 73 (5): 915 ~ 920.
- [19] Azamian B R, Davis J J, Coleman K S, et al. Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124 (43): 12 664 ~ 12 665.
- [20] Wang J, Musameh M. Carbon nanotube/teflon composite electrochemical sensors and biosensors [J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75 (9): 2 075 ~ 2 079.
- [21] Zhang J, Feng M, Tachikawa H. Layer-by-layer fabrication and direct electrochemistry of glucose oxidase on single wall carbon nanotubes [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22 (12): 3 036 ~ 3 041.
- [22] Liu Y, Wang M K, Zhao F, et al. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21 (6): 984 ~ 988.
- [23] Zhou Y, Yang H, Chen H Y. Direct electrochemistry and reagentless biosensing of glucose oxidase immobilized on chitosan wrapped single-walled carbon nanotubes [J]. *Talanta*, 2008, 76 (2): 419 ~ 423.
- [24] Liu Q, Lu X B, Li J, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and electrochemical biosensing of glucose on quantum dots/carbon nanotubes electrodes [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22 (12): 3 203 ~ 3 209.
- [25] Gong K P, Dong Y, Xiong S X, et al. Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 20 (2): 253 ~ 259.
- [26] Zhang M N, Liu K, Xiang L, et al. Carbon nanotube-modified carbon fiber microelectrodes for in vivo voltammetric measurement of ascorbic acid in rat brain [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79 (17): 6 559 ~ 6 565.
- [27] Gong K P, Zhang M N, Yan Y M, et al. Sol-gel-derived ceramic-carbon nanotube nanocomposite electrodes: Tunable electrode dimension and potential electrochemical applications [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76 (21): 6 500 ~ 6 505.
- [28] Gong K P, Yu P, Su L, et al. Polymer-assisted synthesis of manganese dioxide/carbon nanotube nanocomposite with excellent electrocatalytic activity toward reduction of oxygen [J]. *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111(5): 1 882 ~ 1 887.
- [29] Deng C Y, Chen J H, Chen X L, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23(8): 1 272 ~ 1 277.
- [30] Chen X L, Chen J H, Deng C Y, et al. Amperometric glucose biosensor based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode [J]. *Talanta*, 2008, 76 (4): 763 ~ 767.
- [31] Everett D H. IUPAC manual of symbols and terminology [J]. *Pure. Appl. Chem.*, 1972, 31 : 578 ~ 638.
- [32] Beck J S, Vartuli J C, Roth W J, et al. A New Family of Mesoporous Molecular-Sieves Prepared with Liquid-Crystal Templates [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114 (27): 10 834 ~ 10 843.
- [33] Ying J Y, Mehnert C P, Wong M S. Synthesis and applications of supramolecular-templated mesoporous materials [J]. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1999, 38(1-2): 56 ~ 77.
- [34] Raimondo M, Perez G, Sinibaldi N, et al. Mesoporous M41S materials in capillary gas chromatography [J]. *Chem. Commun.*, 1997, (15): 1 343 ~ 1 344.

- [35] Hartmann M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis [J]. *Chem. Mater.*, 2005, 17 (18): 4 577~4 593.
- [36] Zhao J W, Gao F, Fu Y L, et al. Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography [J]. *Chem. Commun.*, 2002, (7): 752~753.
- [37] Han Y J, Stucky G D, Butler A. Mesoporous silicate sequestration and release of proteins [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121 (42): 9 897~9 898.
- [38] Scott B J, Wirnsberger G, Stucky G D. Mesoporous and mesostructured materials for optical applications [J]. *Chem. Mater.*, 2001, 13 (10): 3 140~3 150.
- [39] Zhang W H, Shi J L, Chen H R, et al. Synthesis and characterization of nanosized ZnS confined in ordered mesoporous silica [J]. *Chem. Mater.*, 2001, 13 (2): 648~654.
- [40] Dai Z H, Xu X X, Ju H X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized on a hexagonal mesoporous silica matrix [J]. *Anal. Biochem.*, 2004, 332 (1): 23~31.
- [41] Dai Z H, Liu S Q, Ju H X, et al. Direct electron transfer and enzymatic activity of hemoglobin in a hexagonal mesoporous silica matrix [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19 (8): 861~867.
- [42] Wu S, Ju H X, Liu Y. Conductive mesocellular silica-carbon nanocomposite foams for immobilization, direct electrochemistry, and biosensing of proteins [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2007, 17 (4): 585~592.
- [43] Lee D, Lee J, Kim J, et al. Simple fabrication of a highly sensitive and fast glucose biosensor using enzymes immobilized in mesocellular carbon foam [J]. *Adv. Mater.*, 2005, 17 (23): 2 828~2 833.
- [44] Delacote C, Bouillon J P, Walcarius A. Voltammetric response of ferrocene-grafted mesoporous silica [J]. *Electrochim. Acta*, 2006, 51 (28): 6 373~6 383.
- [45] Feng J J, Xu J J, Chen H Y. Direct electron transfer and electrocatalysis of hemoglobin adsorbed on mesoporous carbon through layer-by-layer assembly [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22 (8): 1 618~1 624.
- [46] Dai Z H, Fang M, Bao J C, et al. An amperometric glucose biosensor constructed by immobilizing glucose oxidase on titanium-containing mesoporous composite material of no. 41 modified screen-printed electrodes [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 591 (2): 195~199.
- [47] Jia N Q, Wang Z Y, Yang G F, et al. Electrochemical properties of ordered mesoporous carbon and its electroanalytical application for selective determination of dopamine [J]. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9 (2): 233~238.
- [48] Zhou M, Guo L P, Lin F Y, et al. Electrochemistry and electrocatalysis of polyoxometalate-ordered mesoporous carbon modified [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 587 (1): 124~131.
- [49] Zhou M, Ding J, Guo L P, et al. Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79 (14): 5 328~5 335.
- [50] Zhou M, Guo L P, Hou Y, et al. Immobilization of Nafion-ordered mesoporous carbon on a glassy carbon electrode: Application to the detection of epinephrine [J]. *Electrochim. Acta*, 2008, 53 (12): 4 176~4 184.
- [51] Ndamanisha J C, Guo L P, Wang G. Mesoporous carbon functionalized with ferrocenecarboxylic acid and its electrocatalytic properties [J]. *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2008, 113 (1-3): 114~121.
- [52] Ndamanisha J C, Guo L P. Electrochemical determination of uric acid at ordered mesoporous carbon functionalized with ferrocenecarboxylic acid-modified electrode [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23 (11): 1 680~1 685.
- [53] Zhou M, Guo J D, Guo L P, et al. Electrochemical sensing platform based on the highly ordered mesoporous carbon-fullerene system [J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80 (12): 4 642~4 650.
- [54] Zhou M, Shang L, Li B L, et al. Highly ordered mesoporous carbons as electrode material for the construction of electrochemical dehydrogenase- and oxidase-based biosensors [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24 (3): 442~447.
- [55] Zhu L, Tian C, Zhu D, et al. Ordered mesoporous carbon paste electrodes for electrochemical sensing and biosensing [J]. *Electroanalysis*, 2008, 20 (10): 1 128~1 134.
- [56] Yu J J, Yu D L, Zhao T, et al. Development of amperometric glucose biosensor through immobilizing enzyme in a Pt nanoparticles/mesoporous carbon matrix [J]. *Talanta*, 2008, 74 (5): 1 586~1 591.
- [57] You C P, Xu X, Tian B Z, et al. Electrochemistry and biosensing of glucose oxidase based on mesoporous carbons with different spatially ordered dimensions [J]. *Talanta*, 2009, 78 (3): 705~710.
- [58] You C P, Yan X W, Kong J L, et al. Direct electrochemistry of myoglobin based on bicontinuous gyroidal mesoporous carbon matrix [J]. *Electrochem. Commun.*, 2008, 10 (12): 1 864~1 867.

表面增强拉曼光谱在环境分析中的研究进展

龚继来*, 吕璞, 曾光明

(湖南大学环境科学与工程学院, 湖南长沙 410082)

摘要: 表面增强拉曼散射(SERS)效应是一种异常的表面光学效应,其增强因子最大可达到 $10^{14} \sim 10^{15}$ 。环境污染导致人类生存环境受到严重影响,某些污染物,比如持久性污染物,在环境介质中含量低,毒性大,很少能够直接检测出来,因此必须采用更灵敏的方法和技术。由于SERS效应的高灵敏性,SERS技术有望成为超灵敏分析环境污染物的一种工具。该文综述了表面增强拉曼光谱在环境污染物检测中的研究进展,并提出SERS传感器将是很重要的发展方向。

关键词: 表面增强拉曼散射; 传感器; 环境分析

Recent advancements in environmental analysis based on surface-enhanced Raman spectroscopy

Gong Ji-lai*, Lv Pu, Zeng Guang-ming

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Surface-enhanced Raman scattering is an unusual surface optical phenomenon and the enhancement factor is up to $10^{14} \sim 10^{15}$. Environmental pollution greatly influences the human survivals. It is necessary for us to take more sensitive methods to detect environmental pollutants such as persistent organic pollutants, which are low level, high toxicity and hard to be detected. SERS technology has the potential to become an exceedingly sensitive tool for the analysis of environmental pollutants due to its high sensitivity. This article reviewed development trends in environmental analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy technology and the potential application of SERS sensor.

Key words: surface-enhanced Raman scattering; sensor; environmental analysis

0 引言

拉曼光谱属于分子振动光谱,可以反映分子的特征结构。然而,拉曼散射效应是一个非常弱的过程,拉曼散射光强约是其入射光强的 10^{-10} ,从而大大地限制了拉曼光谱的应用。1974年,Fleischmann等^[1]首次报道了电化学体系中吸附在银电极上吡啶分子的高质量拉曼光谱,他们把这种现象归结于电化学粗糙化导致电极表面积增加,从而可检测到更多的吡啶分子。直到1977年,Jeanmaire和Van Duyne等^[2]通过实验验证和理论计算,发现吸附在粗糙银电极表面上吡啶的

拉曼散射信号与溶液中相同数量的吡啶拉曼散射信号相比,增加了约6个数量级,这是一种与粗糙表面有关的巨大的增强效应,即表面增强拉曼散射(SERS)效应。

SERS效应发现后,很快在生物、医学、材料、环境等方面得到广泛地应用^[3-5]。当人们从实验和理论上对SERS进行了较全面和仔细地研究后,便意识到SERS技术的缺点如其优点一样显著,比如:SERS技术的灵敏度很高但其重现性较差导致定量分析困难;SERS基底仅限于金、银、铜这些金属;对于SERS机理,人们还没有完全弄明白,虽然目前人们普遍认为存在两种机理,

* 通讯联系人, Tel: 0731-8822829, E-mail: jilaigong@hnu.cn

即电磁增强机理和化学增强机理^[6]。因此,发现重现性好、稳定性高的 SERS 基底;拓宽具有 SERS 效应的新型基底;弄清 SERS 的机理一直是人们努力的方向。世界上一些研究小组对此进行了不懈的探索和研究并取得了一些突破性的进展。厦门大学田中群小组在一系列纯过渡金属(第Ⅷ副族元素)体系观察到 SERS 效应。到目前为止,SERS 效应已拓宽至具有重要和广泛应用背景的铂、铈、铁、钴、镍、钨、钨和铂铱合金等^[7]。由于 SERS 效应的高灵敏性,SERS 技术已提升为研究单分子的工具^[8-9]。SERS 技术在生物领域应用方面,一般借助于具有生物相容性的 SERS 纳米粒子标记物^[10]。聂书明小组^[11]把具有特异识别性的 SERS 纳米颗粒标记物注入老鼠中,采用拉曼光谱方法活体检测老鼠中的肿瘤。湖南大学俞汝勤小组^[12-16]制备了多种核壳型 SERS 纳米粒子标记物并用于生物分析。为了解决 SERS 定量分析问题,人们必须获得重现性好、稳定性高的 SERS 基底。目前,人们已经取得了一些进展,并结合一些数学计算方法,人们已经成功地制备了一些 SERS 传感器。目前,SERS 传感器已成功地运用于检测一系列小分子和蛋白质包括 DNA,抗原,生物战剂以及食源性病原菌等等^[17]。1995 年,Vo-Dinh 综述了用于环境和生物分析的 SERS 化学传感器和生物传感器^[18]。2006 年,Kneipp 报道了基于 SERS 的纳米传感器在活细胞的应用^[19]。2008 年,Zhao 研究小组介绍了他们近期关于新型纳米结构的 SERS 生物传感检测低含量的病毒、细菌,并区分不同种类的病毒等方面的研究工作^[20]。

环境污染导致人类生存环境受到严重影响,从而引起社会各界越来越多的关注,然而某些污染物,比如持久性污染物(POPs),在环境介质中含量低,毒性大,很少能够直接检测出来,一般都必须经过样品预处理,分离浓缩后才能检测出来。由于表面增强拉曼光谱具有发射谱带窄,信息量大,光谱稳定性高,不同的物质具有特征的拉曼光谱指纹等特点,并且具有巨大的增强拉曼散射信号^[21],其最大增强因子可达到 $10^{14} \sim 10^{15}$,因此,人们开始把表面增强拉曼光谱应用于环境污染,比如多环芳烃、农药、病原微生物、重金属离子、无机阴离子以及毒品等的分析和检

测^[22-24]。该文对表面增强拉曼光谱在环境分析中应用的最新进展做一下简要的介绍。

1 多环芳烃

多环芳烃是一类致癌性很强的环境污染物,是环境污染物中最重要的监测项目之一,多环芳烃的监测已越来越受到人们的重视。世界各国也制定了相关法律来控制多环芳烃对人类生活环境的危害。多环芳烃大多是石油、煤等化石燃料以及木材、天然气、汽油、重油、有机高分子化合物、纸张、作物秸秆、烟草等含碳氢化合物的物质经不完全燃烧或在还原性气氛中经热分解而生成。环境中存在的多环芳烃几乎都在 $10^{-12} \sim 10^{-9}$ g/L 水平,又受基体的不同和大量共存物干扰,是一项复杂的痕量分析课题。

2004 年,Schmidt 小组^[25]报道了一种可进行野外操作的 SERS 传感器现场检测海水中六种多环芳烃。这种 SERS 传感器基底制备采用银胶体包覆在硅溶胶-凝胶膜中,检测限与多环芳烃的分子量和溶解性有关,它们的检测限范围在 $\mu\text{g/L}$ 至 ng/L 之间。采用后向光散射模式可以避免浊度小于 1 200 NTU 的悬浮颗粒物的干扰。2006 年, Sanchez-Cortes 小组^[26]采用金属性单壁碳纳米管作为纳米银表面和待测物芘之间的化学组装体,根据所产生的 SERS 信号,能检测到芘的最低浓度为 10^{-9} mol/L。他们采用理论计算证明芘-碳纳米管之间通过 $\pi-\pi$ 电子堆积发生了反应,芘-碳纳米管的距离是 3.4 \AA ,在纳米银表面和碳纳米管/芘系统之间存在电荷转移。2008 年,Campos-Valette 小组^[27]通过实验和理论计算证明腐殖酸作为纳米银表面和待测物屈和芘之间的化学组装体产生 SERS 信号检测多环芳烃屈和芘。与此同时,Sanchez-Cortes 研究小组^[28]发现在纳米银溶液中加入紫精二阳离子时产生了高灵敏度和高选择性的 SERS 热粒子。所产生的这种热粒子可用等离子吸收光谱进行表征。并且这种方法可应用于检测多环芳烃芘。随后,Sanchez-Cortes 研究小组^[29]报道了二硫代氨基甲酸盐杯芳烃修饰的纳米银与多环芳烃结合时产生 SERS 效应,并据此检测多环芳烃芘、苯并菲、三亚苯和苯晕。2009 年,Guerrini 等^[30]报道了基于紫精二阳离子在纳米银颗粒之间形成的空穴捕获多环芳烃时

产生很强的 SERS 信号的纳米传感器。Guerrini 对不同的紫精二阳离子,如:光泽精、敌草快和百草枯检测苾和苯并菲做了比较。研究发现,光泽精修饰的纳米银所提供的纳米传感器最稳定、信号最好,采用 SERS 信号在宏观装置中能检测苾的最小浓度为 10^{-9} mol/L,采用微观装置(即单个的纳米粒子团聚体)能检测苾的最小浓度为 zmol 范围。除此之外,SERS 光谱也能为紫精二阳离子与多环芳烃反应的机理提供重要的结构信息,结果表明,在紫精二阳离子与多环芳烃之间形成了电荷转移复合物。与此同时,Haynes 小组^[17]报道了一种 SERS 传感器检测多环芳烃蒽和苾。采用葵硫醇自组装膜修饰的纳米银/银膜 (AgFON) 基底,利用葵硫醇自组装分散层对多环芳烃的预浓缩作用,从而在 AgFON 上产生很强的 SERS 信号从而对蒽和苾进行检测。这种 SERS 传感器所用的基底可以重复使用,其增强因子为 2.5×10^6 ,这种 SERS 传感器能检测蒽和苾的最低检测限为 300 pmol/L 和 700 pmol/L。

2 农药残留

有机氯、有机磷、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类农药是最常用的农药,在农业生产上起到了一定的积极作用,但同时带来了农药残留问题。农药残留已危害人体健康,越来越引起人们的关注。目前人们利用表面增强拉曼光谱开展了农药残留检测方面的工作。2003 年,Shende 等^[31]采用表面增强拉曼光谱法监测了食品中的农药残留,能检测到 mg/L 浓度范围的农药。2004 年,Shende 等^[32]又采用表面增强拉曼光谱方法对水果上农药残留进行了分析。2006 年, Lee 等^[33]采用共聚焦表面增强拉曼光谱在三维聚二甲基硅氧烷微流控通道里定量检测甲基对硫磷杀虫剂,检测下限为 0.1 mg/L。2008 年, Sanchez-Cortes 研究小组^[34]成功地把双吡啶黄嘌呤二阳离子光泽精作为纳米银颗粒与有机氯农药-硫丹之间的组装分子,由于纳米银-双吡啶黄嘌呤二阳离子光泽精-硫丹能形成很强的 SERS 信号,根据这种方法可以检测硫丹,检测下限为 20 $\mu\text{g/L}$ 。目前, Strickland 小组^[35]采用在金纳米棒上修饰环糊精内包复合物,采用表面增强拉曼光谱方法检测苯并咪唑类杀菌剂多菌灵。采用偏小二乘法进行

定量分析,结果表明这种 SERS 传感器能准确检测 50 $\mu\text{mol/L}$ 的多菌灵。

3 环境病原微生物

表面增强拉曼散射光谱技术已经广泛地应用于环境病原微生物的检测与鉴定。2002 年, Mirkin 小组^[36]制备了多种 SERS 纳米粒子标记的核酸探针,采用核酸分子杂交技术同时检测了 A 型肝炎、B 型肝炎、艾滋病、埃博拉病毒、天花病毒和 Bacillus anthracis 抗原等六种病原微生物。2005 年, Van Duyne 小组^[37]采用 SERS 传感器快速检测炭疽热生物标志物。与此同时, Porter 小组^[38]采用表面增强拉曼免疫分析方法检测低含量的病毒病原体。2008 年, Kahraman 等^[39]将大肠杆菌、革兰氏阴性布氏杆菌、金色葡萄球菌和革兰氏阳性球菌等细菌和纳米银采用对流组装成有序结构,采用表面增强拉曼散射方法对上述病原菌结构进行检测。2008 年 Jarvis 等^[40]把纳米金沉积在细胞内,采用表面增强拉曼散射检测了 Geobacter sulfurreducens 细菌。与此同时, Porter 小组^[41]报道了表面增强拉曼免疫分析副结核分枝杆菌。

4 其它

表面增强拉曼光谱也广泛地应用于其它环境污染物的分析。苏州大学姚建林小组^[42]把对巯基苯甲酸作为拉曼标记和自组装分子,采用金属基底-对巯基苯甲酸/重金属离子/对巯基苯甲酸-纳米颗粒三明治结构,采用表面增强拉曼光谱对重金属离子 Cu^{2+} 进行了检测。研究表明该修饰基底可循环再生使用。Gu 等^[43]采用表面增强拉曼光谱法检测高氯酸根离子。Haynes 等^[44]报道采用表面增强拉曼散射检测和区分多氯联苯。Mosier-Boss 等^[45]把表面增强拉曼光谱基底固定在热电冷却装置上检测挥发性有机污染物。湖南大学俞汝勤小组^[46]报道了基于表面增强拉曼光谱的适体生物传感器检测可卡因。

5 前景与展望

表面增强拉曼光谱由于能提供分子的结构信息,有很强的增强信号,因此有望在环境分析领域得到越来越广泛的应用。由于材料学、纳米

技术的发展,表面增强拉曼基底的重现性和稳定性将会大大地提高,同时结合内标技术和化学计量学,基于表面增强拉曼光谱的定量分析将会越来越完善,其中 SERS 传感器将是一个很有发展前途的方向。

参考文献

- [1] Fleischmann M, Hendra P J, McQuillan A. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26(2):163~166.
- [2] Jeanmaire D L, Van Duyne R P. Surface Raman spectroelectrochemistry Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [J]. 1977, 84(1):1~20.
- [3] Lee Y H, Farquharson S, Rainey P. Surface-enhanced Raman sensor for trace chemical detection in water [C]. *Chemical Microsensors and Applications II*, 1999, 3857: 76~84.
- [4] Vi-Dinh T, Yan F, Wabuye M B. Surface-enhanced Raman scattering for biomedical diagnostics and molecular imaging [J]. *Topics in Applied Physics*, 2006, 103: 409~427.
- [5] Graham D, Goodacre R. Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced Raman scattering spectroscopy [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37: 883~884.
- [6] Tian Z Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, 36: 466~470.
- [7] Tian Z Q, Yang Z L, Ren B, et al. SERS from transition metals and excited by ultraviolet light [J]. *Topics in Applied Physics*, 2006, 103: 125~147.
- [8] Qian X M, Nie S M. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37: 912~920.
- [9] Kneipp K, Kneipp H, Bohr H G, Single-molecule SERS spectroscopy [J]. *Topics in Applied Physics*, 2006, 103: 261~278.
- [10] Porter M D, Lipert R J, Siperko L M, et al. SERS as a bioassay platform: fundamentals, design, and applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37: 1 001~1 011.
- [11] Qian X, Peng X H, Ansari D O, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26: 83~90.
- [12] Gong J L, Jiang J H, Liang Y, et al. Synthesis and characterization of surface-enhanced Raman scattering tags with Ag/SiO₂ core-shell nanostructures using reverse micelle technology [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, 298: 752~756.
- [13] Gong J L, Jiang J H, Yang H F, et al. Novel dye-embedded core-shell nanoparticles as surface-enhanced Raman scattering tags for immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 564: 151~157.
- [14] Gong J L, Liang Y, Huang Y, et al. Ag/SiO₂ core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007 22: 1 501~1 507.
- [15] Liang Y, Gong J L, Huang Y, et al. Biocompatible core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering probes for detection of DNA related to HIV gene using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools [J]. *Talanta*, 2007, 72: 443~449.
- [16] Chen J W, Jiang J H, Gao X, et al. Gold-aggregated, dye-embedded, polymer-protected nanoparticles (GDPNs): a new type of tags for detection with SERS [J]. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007,294: 80~85.
- [17] Jones C L, Bantz K C, Haynes C L. Partition layer-modified substrates for reversible surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394: 303~311.
- [18] Vo-Dinh T. SERS chemical sensors and biosensors: new tools for environmental and biological analysis [J]. *Sensors and Actuators B*, 1995, 29: 183~189.
- [19] Kneipp J. Nanosensors based on SERS for applications in living cells [J]. *Topics in Applied Physics*, 2006, 103: 335~350.
- [20] Tripp R A, Dluhy R A, Zhao Y. Novel nanostructures for SERS biosensing [J]. *Nanotoday*, 2008, 3: 31~37.
- [21] Nie S, Emory S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Science*, 1997, 275:1 102~1 106.
- [22] Stokes D L, Alarie J P, Ananthanarayanan V, et al. Fiber optics SERS sensors for environmental monitoring [C]. *Environmental Monitoring and Remediation Technologies*, 1999, 3534: 647~654.
- [23] Wabuye M B, Martin M E, Yan F, et al. Portable Raman integrated tunable sensor (RAMiTs) for environmental field monitoring [C]. *Advanced Environmental, Chemi-*

- cal, and Biological Sensing Technologies II, 2004, 5586: 60~67.
- [24] Baia M, Danciu V, Cosoveanu V, et al. Porous nanoarchitectures based on TiO₂ aerogels and Au particles as potential SERS sensor for monitoring of water quality [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2008, 48: 206~209.
- [25] Schmidt H, Ha N B, Pfannkuche J, et al. Detection of PAHs in seawater using surface-enhanced Raman scattering (SERS) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49: 229~234.
- [26] Leyton P, Gomez-Jeria J S, Sanchez-Cortes S, et al. Carbon nanotube bundles as molecular assemblies for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110: 6 470~6 474.
- [27] Leyton P, Cordova I, Lizama-Vergara P A, et al. Humic acids as molecular assemblers in the surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2008, 46: 77~81.
- [28] Guerrini L, Garcia-Ramos J V, Domingo C, et al. Building Highly Selective Hot Spots in Ag Nanoparticles Using Bifunctional Viologens Application to the SERS Detection of PAHs [J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112: 7 527~7 530.
- [29] Guerrini L, Garcia-Ramos J V, Domingo C, et al. Sensing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Dithiocarbamate-Functionalized Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81: 953~960.
- [30] Guerrini L, Garcia-Ramos J V, Domingo C, et al. Nanosensors based on viologen functionalized silver nanoparticles few molecules surface-enhanced Raman spectroscopy detection of polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Interparticle Hot Spots [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81: 1 418~1 425.
- [31] Shende C, Gift A, Inscore F, et al. Inspection of pesticide residues on food by surface-enhanced Raman spectroscopy [C]. *Monitoring Food Safety, Agriculture and Plant Health*, 2004, 5271: 28~34.
- [32] Shende C, Inscore F, Gift A, et al. Analysis of pesticides on or in fruit by surface-enhanced Raman spectroscopy [C]. *Nondestructive Sensing Food Safety, Quality and Natural Resources*, 2004, 5587:170~176.
- [33] Lee D, Lee S, Seong G H, et al. Quantitative analysis of methyl parathion pesticides in a polydimethylsiloxane microfluidic channel using confocal surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 2006, 60: 373~377.
- [34] Guerrini L, Aliaga A E, Carcamo J, et al. Functionalization of Ag nanoparticles with the bis-acridinium lucigenin as a chemical assembler in the detection of persistent organic pollutants by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 624, 286~293.
- [35] Strickland A D, Batt C A. Detection of carbendazim by surface-Enhanced Raman scattering using cyclodextrin inclusion complexes on gold nanorods [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81: 2 895~2 903.
- [36] Charles Cao Y W, Jin R, Mirkin C A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection [J]. *Science*, 2002, 297(30): 1 536~1 540.
- [37] Zhang X, Young M A, Lyandres O, et al. Rapid Detection of an Anthrax Biomarker by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy [J]. *Journal of American Chemical Society*, 2005, 127: 4 484~4 489.
- [38] Driskell J D, Kwarta K M, Lipert R J, et al. Low-Level Detection of Viral Pathogens by a Surface-Enhanced Raman Scattering Based Immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77:6 147~6 154.
- [39] Kahraman M, Yazici M M, Sahin F, et al. Convective assembly of bacteria for surface-enhanced Raman scattering [J]. *Langmuir*, 2008, 24, 894~901.
- [40] Jarvis R M, Law N, Shadi I T, et al. Surface-enhanced Raman scattering from intracellular and extracellular bacterial locations [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 6 741~6 746.
- [41] Jean Yakes B, Lipert R J, Bannantine J P, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by a sonicate immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, 15: 227~234.
- [42] 袁亚仙, 马君银, 王梅, 等. 基于表面增强拉曼光谱的重金属离子检测 [J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27: 2 140~2 143.
- [43] Gu B H, Ruan C M, Wang W. Perchlorate Detection at Nanomolar Concentrations by Surface-Enhanced Raman Scattering [J]. *Applied Spectroscopy*, 2009, 63: 98~102.
- [44] Bantz K C, Haynes C L. Surface-enhanced Raman scattering detection and discrimination of polychlorinated biphenyls [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, 50: 29~35.
- [45] Mosier-Boss P A, Lieberman S H. Detection of volatile organic compounds using surface enhanced Raman spectroscopy substrates mounted on a thermoelectric cooler [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 488, 15~23.
- [46] Chen J W, Jiang J H, Gao X, et al. A New Aptameric Biosensor for Cocaine Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy [J]. *Chemistry - A European Journal*, 2008, 14: 8 374~8 372.

用于微量锌离子检测的荧光探针技术

潘忠*, 黎敏

(武汉理工大学物理系, 湖北武汉 430070)

摘要: 该文对近年来用于微量锌离子检测的荧光探针按荧光检测技术的需求, 根据锌荧光探针基团的不同, 对其进行了细致的分类; 在此基础上对不同基团探针的效率、光化学性质、工艺和局限性进行了对比和讨论, 最后对微量锌检测技术的发展前景和新的研究点进行了展望。

关键词: 传感器; 荧光探针; Zn^{2+} ; 定量检测

Research development of fluorescent probe measurement of trace element zinc

Pan Zhong*, Li Min

(Department of Physics, Wuhan University Of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Zn^{2+} fluorescent probes were classified meticulously based on their fluorophore and recent advances in fluorescent probes in zinc measurement were summarized comprehensively. Furthermore, the quantum efficiency, photochemical properties, typical technologies and limitations of various fluorophores were discussed in detail.

Key words: sensor; fluorescent probe; zinc(II); quantitative detection

0 引言

荧光探针法是利用荧光传感技术, 通过测量微量元素离子的出现或浓度的改变所引起荧光强度、寿命、光谱等参数的变化量实现测量。巧妙设计的荧光探针能够将可测量的荧光参数与被测离子的浓度一一对应, 可实现高精度的定量测量。因此荧光探针的优化设计是实现荧光法测量的关键问题之一。从20世纪70年代开始的微量元素研究, 目前仍然面临着准确、快速、低成本测定的问题, 其核心问题之一即难于获得高选择性的探针分子。为此世界范围的生化领域开展了大量的研究工作^[1]。

锌是一种重要的人体必需的微量元素, 广泛分布于人体的细胞和体液中。 Zn^{2+} 参与了很多生

物学过程, 例如DNA合成、基因表达、微管的多聚化、基体免疫、酶催化等诸多方面, 其重要性得到了广泛的认同。因此 Zn^{2+} 的检测, 尤其是活体细胞和组织中锌的测定与荧光显微成像成为近年来生物化学家非常关注的领域。不同于其它过渡金属离子(如 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+}), 由于最外层电子分布为 $3d^{10}4s^0$, Zn^{2+} 不显现任何波谱或磁信号, 因此常用的紫外光谱、圆二色谱、核磁共振、电子顺磁共振和穆斯保尔光谱仪等均不适用于 Zn^{2+} 的测定, 而常用的分析方法中, 荧光法用于测定 Zn^{2+} 具有选择性好、灵敏度高、简便、快捷等优点。此前, 已有数篇生化专业的文献对 Zn^{2+} 的阶段性发展作了综述^[2-3], 但其是按照荧光探针的发光机理和设计原理不同进行分类, 侧重于性能优良的新型 Zn^{2+} 荧光探针的获取, 对其应用于微量 Zn^{2+} 检测

技术考虑较少。该文从 Zn^{2+} 荧光检测技术的需求出发, 针对 Zn^{2+} 荧光法测量的关键问题—— Zn^{2+} 探针分子, 分析、类比和总结了不同 Zn^{2+} 荧光探针的特异性基团在 Zn^{2+} 含量检测中的效果和适用性, 为利用荧光法高精度测量 Zn^{2+} 含量提供进一步研究的基础和参考。

1 Zn^{2+} 荧光探针

1.1 染料类荧光探针

染料类荧光探针以喹啉及其衍生物为主, 常见类型包括氨基喹啉和羧基喹啉及其衍生物类。使用最广泛的类型是以 8-氨基喹啉和 8-羟基喹啉为基体, 其中, 几种具有代表性的探针分别是: TSQ, ZinquinA, QQB, Danquin 和 TAEA-IR-780 等。

TSQ (如图 1 所示)^[4] 是源于 1987 年, 最初用

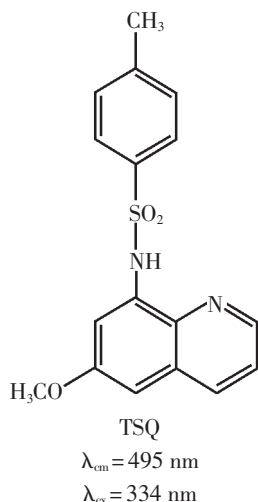


图 1 分子结构 1

Fig.1 structure of molecule 1

同样是为了提高 TSQ 类荧光探针的水溶性, 刘育等^[6] 将水溶性的 β -环糊精引入到 TSQ 分子的设计中, 合成了化合物 3 (如图 3 所示)。该探针分子已经被用于巨噬细胞中 Zn^{2+} 的荧光成像。

吴红梅等^[7] 设计合成了 QQB (如图 4 所示)。该探针与 Zn^{2+} 结合后荧光发射光谱由 405 nm 红移到 510 nm, 且荧光强度增强, 具有较高的检测灵敏度。

以上几种荧光探针的激发光都是紫外光, 而紫外激发容易对生命细胞产生伤害, 也会产生 Zn^{2+} 动力学活动的假象。在氨基喹啉的基础上, 添

于神经细胞中锌的荧光成像, 是生物荧光技术发展史上的一个里程碑。TSQ 和 Zn^{2+} 结合后激发和发射波长分别位于 380 nm 和 495 nm, 荧光强度增强 100 倍, 但 TSQ- Zn^{2+} 络合物的结构和稳定常数 (TSQ/ Zn^{2+} 可能以 1:1 或 2:1 的形式络合) 不确定, 并且络合物的荧光强度在不同介质中变化较大, 所以用 TSQ 进行 Zn^{2+} 的定量分析还有待进一步的研究。

为了提高 TSQ 的水溶性和透膜性, Zalewski 等在 TSQ 的 6 位上引进了酯基, 生成 Zinquin (如图 2 所示)^[5]。Zinquin 能检测的 Zn^{2+} 浓度范围在 100 pmol/L ~ 10 nmol/L 之间, Zinquin 在酶的作用下水解生成羧酸根阴离子 ZinquinA (如图 2 所示) 后可以长时间停留在细胞内, 从而考察 Zn^{2+} 在细胞生长规律中的作用, 对细胞内 Zn^{2+} 动力学进行研究, 其激发和发射波长分别为 370 nm 和 490 nm。

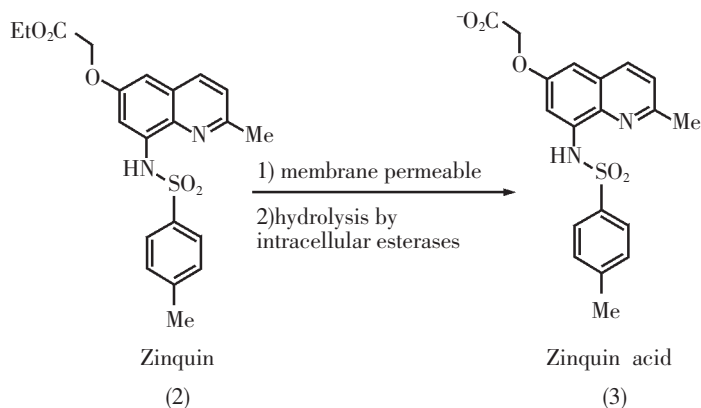


图 2 分子结构 2 和分子结构 3

Fig.2 structure of molecule 2,3

加一个 1-二甲基氨基萘-5-磺酰, 即可合成由可见光激发的荧光指示剂 Danquin (如图 5 所示)^[8]。其激发和发射波长分别为 395 nm 和 465 nm。

唐友云等^[9] 以三碳菁近红外荧光染料 IR-780 为原料, 合成了一种用于检测 Zn^{2+} 的近红外荧光探针 TAEA-IR-780 (如图 6 所示)。TAEA-IR-780 的激发和发射波长分别位于 683 nm 和 750 nm, 其检测下限达 1 nmol/L, 其在活体细胞内的表现尚不明确。

1.2 助染剂类荧光探针

助染剂类荧光探针以吡啶衍生物为主。特别

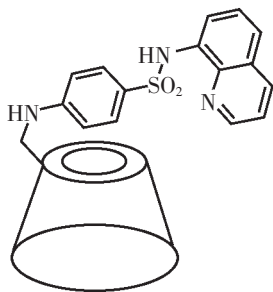


图 3 分子结构 3

Fig.3 structure of molecule 3

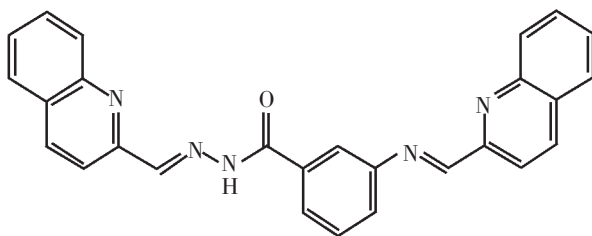
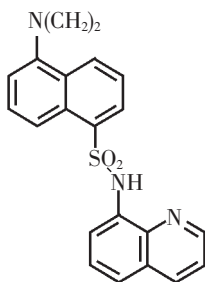


图 4 分子结构 4

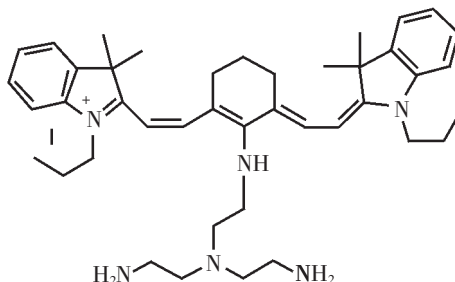
Fig.4 structure of molecule 4



Danquin

图 5 分子结构 5

Fig.5 structure of molecule 5



TAEA-IR-780

图 6 分子结构 6

Fig.6 structure of molecule 6

是 DPA (如图 7 所示) 和具有良好水溶性和透膜性的 TPEN (如图 8 所示)。DPA 的链状敞开式结构能快速与金属离子络合, 保证检测的实时性, 是一种常见的 Zn^{2+} 荧光探针。TPEN 是一种高选择性的过渡金属阳离子螯合剂, 和 Zn^{2+} 有很好的亲和性 (解离常数 $K_d = 2.60 \times 10^{-16}$ mol/L)。一些含 DPA, TPEN 等螯合剂的 Zn^{2+} 荧光探针得到了广泛的运用, 比如: Zinpyr-1, ZnAF-1, ZnAF-2, Zinbo-5, [Co(bpy)₂ODHIP]³⁺, DPA-Cy, DIPCY 等。

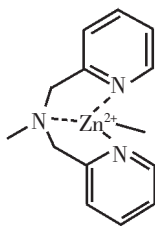
1.2.1 Zinpyr-x 类

Zinpyr-x 类荧光探针利用光诱导电子转移的

机理来检测 Zn^{2+} , Zinpyr-1 (如图 9 所示)^[10] 是这类探针中的典型代表, 与 Zn^{2+} 结合后, 其荧光量子效率从 0.39 增加到 0.87, 激发和发射波长分别为 500 nm 和 530 nm。Zinpyr-1 的激发谱与 488 nm 的氩离子激光谱线完全重叠, 这一性质有利于其在激光共聚焦显微扫描技术上的应用。

1.2.2 ZnAF-x 类

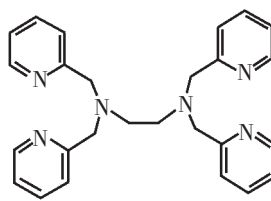
Tomoya Hirano 等把 DPA 引入 5-或 6-氨基荧光素, 合成了 ZnAF-1 和 ZnAF-2 (如图 10 所示)^[11]。其激发和发射波长分别为 492 nm 和 514 nm, 背景荧光量子效率仅为 0.02, 结合 Zn^{2+} 后荧



DPA

图 7 分子结构 7

Fig.7 structure of molecule 7



TPEN

图 8 分子结构 8

Fig.8 structure of molecule 8

光强度分别增强 17 倍和 51 倍。但 ZnAF-1 和 ZnAF-2 都不适合于弱酸性条件下 Zn^{2+} 的检测。为此, 在 ZnAF- x 分子中引入吸电子基 F 合成

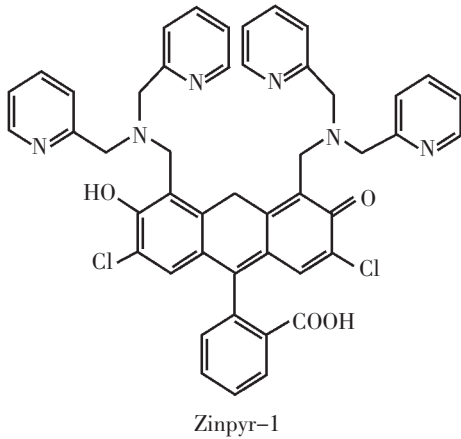


图 9 分子结构 9

Fig.9 structure of molecule 9

中性以及弱酸性条件下有更稳定的荧光。

此外, 为解决该类探针用于 Zn^{2+} 定量检测问题, 以苯并咪唑为荧光团, DPA 为受体, 基于分子内共轭电荷转移原理设计而成了 Zn^{2+} 荧光探针 ZnAF-R1 和 ZnAF-R2 (如图 11 所示)^[13], ZnAF-R2 的水溶性及荧光性质好, 更适合生物体系中 Zn^{2+} 检测。随着 Zn^{2+} 的增加, ZnAF-R2 的最大激发波长从 365 nm 蓝移到 335 nm, 且荧光强度比例 (I_{335}/I_{365}) 不断增大, 测定该比值即可计算出 Zn^{2+} 的浓度。

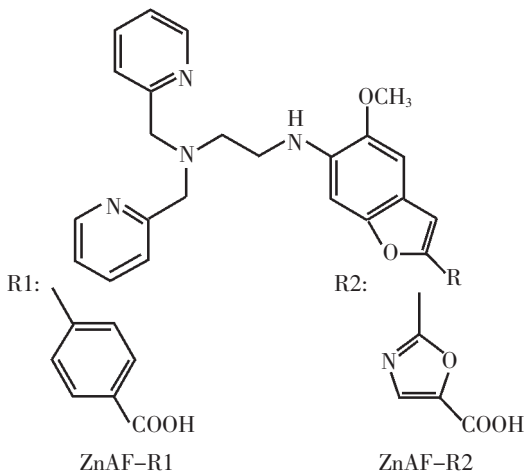


图 11 分子结构 11

Fig.11 structure of molecule 11

ZnAF-1F 和 ZnAF-2F(如图 10 所示)^[12]。F 原子的引入降低了共轭体系的电子云密度, 从而降低探针分子的解离度, 使得 ZnAF-1F 和 ZnAF-2F 在

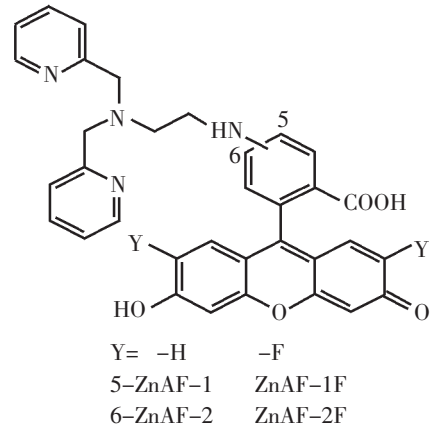


图 10 分子结构 10

Fig.10 structure of molecule 10

1.2.3 Zinbo- x 类

Zinbo- x 类荧光探针由具有高荧光特性的苯并恶唑和各种不同 Zn^{2+} 螯合团组合而成。比例计量型 Zn^{2+} 荧光探针 Zinbo-5 (如图 12 所示)^[14] 对 Zn^{2+} 有较强的亲和力(解离常数 $K_d=2.2$ nmol/L) 与高选择性。Zinbo-5 在结合 Zn^{2+} 前其激发和发射波长分别为 337 nm 和 407 nm, 结合 Zn^{2+} 离子后其激发和发射波长分别红移至 376 nm 和 443 nm, 伴随着荧光量子效率增加 5 倍。随着 Zn^{2+} 浓度的增加, 荧光强度比例 (I_{443}/I_{376}) 增大了 30

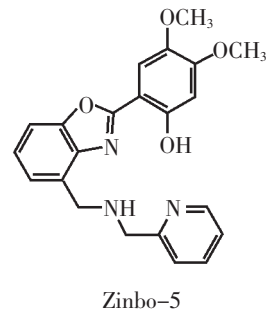


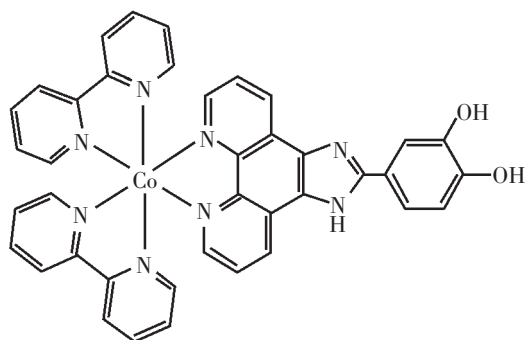
图 12 分子结构 12

Fig.12 structure of molecule 12

倍。Zinbo-5 可以用来探测纤维细胞内 Zn^{2+} 浓度的改变。

1.2.4 DNA 参与键合与识别类

近十几年来,对小分子过渡金属配合物与大分子 DNA 键合与识别机理的研究一直是国际上生物无机化学领域十分活跃的热点。张黔玲等^[15]合成多吡啶钴(III)配合物 $[Co(bpy)_2ODHIP]^{3+}$ (如图 13 所示)的研究显示,与 Zn^{2+} 配位形成的双核



$[Co(bpy)_2ODHIP]^{3+}$

图 13 分子结构 13

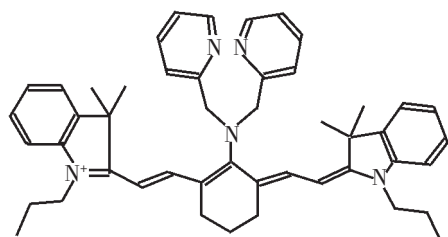
Fig.13 structure of molecule 13

配合物 $[Co(bpy)_2(ODHIP)Zn]^{5+}$ 具有强的荧光,但配体 ODHIP 的两个-OH 可以与很多金属离子配位形成双核配合物,因此该荧光探针对 Zn^{2+} 的选择性低。

1.2.5 三碳菁染料与 DPA 结合类

两种以 DPA 为受体合成的近红外 Zn^{2+} 荧光探针 DPA-Cy(结构如图 14 所示)^[16]。和 DIPCY(如图 15 所示)^[17],分别以丙基取代的三碳菁染料和三碳菁染料为荧光团,都对 Zn^{2+} 有很高的亲和力。DPA-Cy 的激发和发射波长分别为 730 nm 和 780 nm,结合 Zn^{2+} 后荧光量子效率增大 20 倍,该探针已经用于活体巨噬细胞中 Zn^{2+} 的检测。DIPCY 结合 Zn^{2+} 后,最大激发波长从 627 nm 红移到 671 nm,且随着 Zn^{2+} 浓度的增加,荧光强度(I_{671}/I_{627})增强 5 倍。但是还没有该探针的生化应用报道。

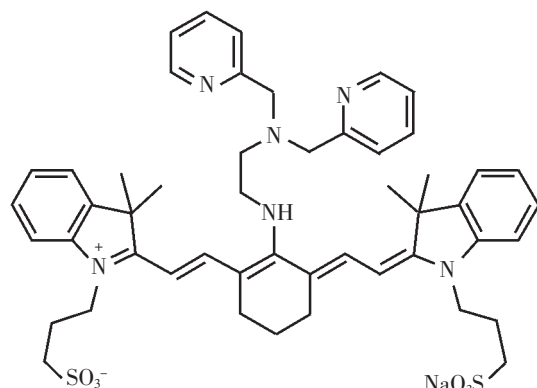
最近报道合成了 5-5'-乙炔基-2,2'-联吡啶衍生物 16(如图 16a~c 所示)^[18]。a~c 的激发和发射波长分别为 407 nm 和 537 nm。c 在生物体 pH 值环境中对 Zn^{2+} 有很好的选择性,是理想的 Zn^{2+}



DPA-Cy

图 14 分子结构 14

Fig.14 structure of molecule 14



DIPCY

图 15 分子结构 15

Fig.15 structure of molecule 15

荧光探针,检测分辨率达到纳摩尔量级。

1.3 肽和蛋白类荧光探针

相对于那些小分子荧光探针,对于 Zn^{2+} 探针的另一研究焦点是基于肽和蛋白质的大分子的荧光探针。

1.3.1 肽荧光探针

1996 年,Walkup 等设计出了一种以肽为 Zn^{2+} 配体的荧光探针 ZNS1(结构如图 17 所示)^[19]。其中,配体部分是 Cys_2/His_2 , 荧光母体是丹磺酰

胺。ZNS1 的最大发射波长是 560 nm,随着 Zn^{2+} 浓度的增加,发射波长蓝移到 475 nm,荧光强度呈线性增加。但由于分子中肽的存在,对任何金属引起的构型变化都很敏感;而且半胱氨酸(Cys)容易被氧化,所以不适合在一些含氧化剂的溶液中应用。

1.3.2 蛋白质类荧光探针

蛋白类荧光探针的合成比肽类的合成要困难许多。常见有两种类型的蛋白类荧光探针,一

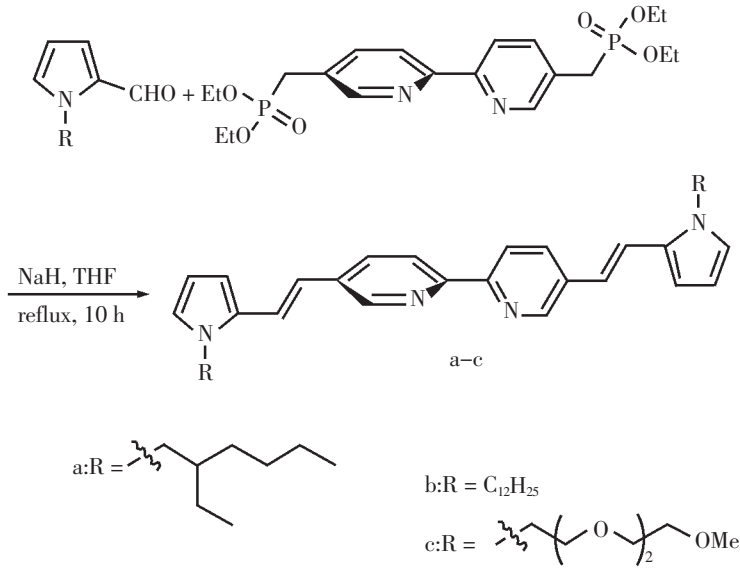


图 16 分子结构 16

Fig.16 structure of molecule 16

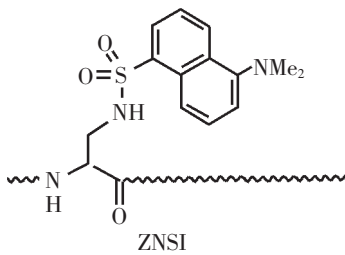


图 17 分子结构 17

Fig.17 structure of molecule 17

种基于碳酸酐酶(CA)发展而来,另一种是基于绿荧光蛋白(GFP)^[20]发展起来的。

1940年, Mann 和 Keilin 报道了磺酰胺能够抑制含有锌的 CA 的荧光^[21]。1967年, Chen 和 Kernohan 提出了牛红细胞 CA 和等摩尔的丹磺酰胺(如图 18 所示)可反应生成高荧光配合物^[22]。丹磺酰胺的发射波长为 580 nm, 荧光量子效率仅为 0.055, 而结合 CA 后发射波长蓝移到

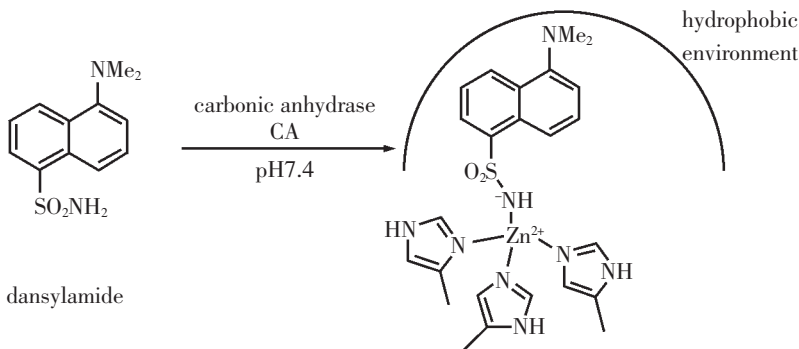


图 18 分子结构 18

Fig.18 structure of molecule 18

468 nm, 同时量子效率增大到 0.84, 并且 Kiefer 等发现这种荧光特性不同于酶蛋白 CA 和自由的丹磺酰胺的荧光特性。因此, 常用结合了芳基磺酰胺荧光团的酶蛋白 CA 来对 Zn²⁺进行荧光测定^[23]。

Thompson 在基于 CA 的丹磺酰胺与 Zn²⁺结合方面做了大量的研究^[4, 24~25]。其报道的磺酰胺-荧光素结合物 19(结构如图 19 所示)^[26]以及 dapoxy 磺酰胺 20(结构如图 20 所示)^[27]是这一类型荧光探针的进一步发展。化合物 19 能和含有

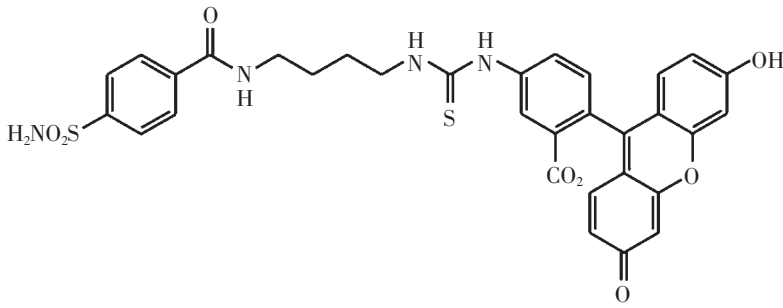


图 19 分子结构 19

Fig.19 structure of molecule 19

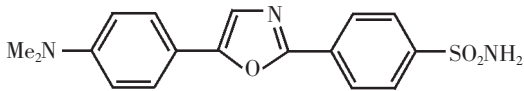


图 20 分子结构 20

Fig.20 structure of molecule 20

Zn²⁺的 CA 紧密结合(解离常数 $K_d=2.30$ nmol/L), 荧光各向异性和络合的 Zn²⁺浓度在 10 nmol/L~1 μmol/L 范围内成比例。化合物 20 络合 CA 后荧光强度增大 90 倍, 光谱从 605 nm 蓝移到 530 nm (解离常数 $K_d=3.00$ μmol/L), 通过计算 dapoxyl 磺酰胺在 535 nm 和 685 nm 处的荧光强度实现对 Zn²⁺的定量检测。

1990 年以来, 绿荧光蛋白类(GFP)探针也见诸于报道。Getzoff 等报道了一个 GFP 的突变 BFPms1(结构如图 21 所示), 在其共轭生色团位置结合 Zn²⁺后, 发射波长为 508 nm 的荧光, 荧光量子效率达到 0.79^[28]。

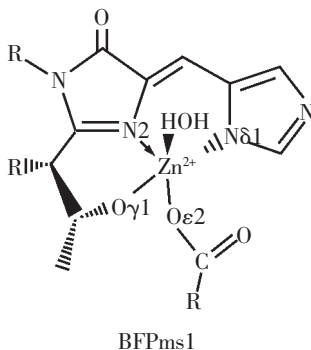


图 21 分子结构 21

Fig.21 structure of molecule 21

1.4 水杨醛类荧光探针

近年来, 针对过渡金属离子具有选择性荧光响应的有机小分子荧光探针的研究也备受关注。报道可见多种以水杨醛酰肼作为金属离子络合

基团的有机小分子荧光探针。水杨醛也称为邻羟基苯甲醛, 是制取多种整合配体的原料。典型的几种基于水杨醛的 Zn²⁺荧光探针有: DSOD, SABAQ, H₂L 等。

梁卓文等^[29]合成的双水杨醛草酰二脲 DSOD (如图 22 所示), 其荧光强度与 Zn²⁺的浓度在 0~1 μmol/L 的范围内呈良好的线性关系, 检测下限为 4.6 nmol/L。

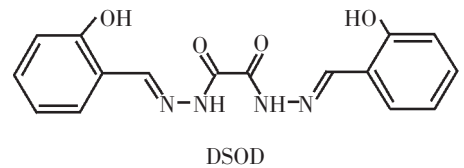


图 22 分子结构 22

Fig.22 structure of molecule 22

何慧等^[30]设计合成了水杨醛-4-乙氧基苯甲酰肼(如图 23 所示), Zn²⁺的加入使得该 Zn²⁺探针的长波长荧光(530 nm)增强 415 倍。

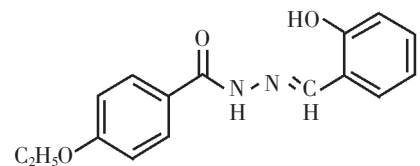


图 23 分子结构 23

Fig.23 structure of molecule 23

用于粮食中痕量锌测定的物质水杨醛 5,7-二溴-8-氨基喹啉 SABAQ(如图 24 所示)^[31]其激发和发射波长分别为 400 nm 和 475 nm, Zn²⁺的含量在 0~4.43 μmol/L 内与荧光发射强度表现为线性, 测量下限为 21.5 nmol/L。

李永强等^[32]合成了荧光探针水杨醛缩邻氨基苯酚 H₂L(如图 25 所示), 其激发和发射波长为

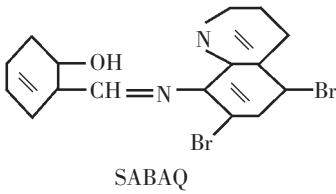


图 24 分子结构 24

Fig.24 structure of molecule 24

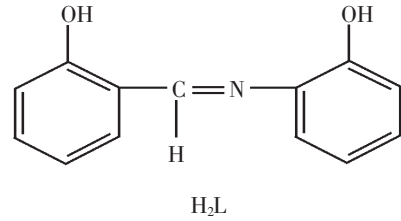


图 25 分子结构 25

Fig.25 structure of molecule 25

405 nm 和 517 nm, Zn^{2+} 的含量在 0.01 ~ 2.43 $\mu\text{mol/L}$ 范围内与荧光发射强度成线性关系, 检测下限为 7.08 nmol/L。

最近的两篇文献[33~34]最新报道了卟啉等类型的 Zn^{2+} 荧光探针, 它们都表现出对 Zn^{2+} 很好的选择性。

2 各类型 Zn^{2+} 荧光探针的对比与讨论

根据 Zn^{2+} 荧光探针的激发和发射谱, 把 Zn^{2+} 荧光探针分为紫外激发, 可见光激发, 近红外激

发和比例计量型四种类型, 并对各类荧光探针的激发和发射特性, 量子效率特性等进行了归纳总结与对比, 为 Zn^{2+} 荧光探针的实际应用提供参考。

由表 1 可知, 紫外光激发的 Zn^{2+} 荧光探针其发射波长都在可见光范围内, 这给用肉眼直接观察实验发生提供了条件, 避免了激发光对发射光的观察干扰, 减小了外界光对实验的干扰, 但紫外激发容易对生命细胞产生伤害, 也会产生 Zn^{2+} 动力学活动的假象, 这在一定程度上也限制了其

表 1 紫外激发 Zn^{2+} 荧光探针Tab.1 UV-Excitable Fluorescent Zn^{2+} Probes

Probe	λ ex/nm free(Zn^{2+})	λ em/nm free(Zn^{2+})	ϕ , free (Zn^{2+})	property
TSQ	334	495	(0.1)	poisonless, permeable
ZinquinA	370	490		permeable ester
ZNS1	333	560(475)		easily oxidized
Dansylamide	326	580(468)	0.055(0.84)	good selectivity

在生物体 Zn^{2+} 检测上的应用。

表 2 总结了可见光激发的 Zn^{2+} 荧光探针, 该类探针与紫外激发的荧光探针相比优点在于, 当用于细胞 Zn^{2+} 检测时, 可见光大大降低了紫外光对细胞的毒性作用, 有效减小了细胞自发荧光干扰, 可被大多数有激光光源的仪器 (包括激光共

聚焦显微镜及流式细胞仪) 有效激发, 可见光激发使实时测定细胞中的锌的可操作性增强, 观察者不必顾忌紫外光对人眼的损害。

近红外 Zn^{2+} 荧光探针有很好的应用前景, 特别是在 650 nm 到 900 nm 的光学窗口下, 该类荧光探针的激发光具有穿透皮肤和组织的能力, 并

表 2 可见光激发 Zn^{2+} 荧光探针Tab.2 Visible-Excitable Fluorescent Zn^{2+} Probes

Probe	λ ex/nm free(Zn^{2+})	λ em/nm free(Zn^{2+})	ϕ , free (Zn^{2+})	property
Zinpyr-1	500	530	0.39(0.87)	high autofluorescence
ZnAF-1	489(492)	514	0.022(0.23)	
ZnAF-2	490(492)	514	0.023(0.36)	permeable ester
ZnAF-1F	489(492)	514	0.004(0.17)	
ZnAF-2F	490(492)	514	0.006(0.24)	permeable ester

只产生极小的自发荧光和低的背景光散射。由表 3 可知该类荧光探针还有待进一步的研究,目前该类探针仅仅局限于用三碳菁染料作为荧光团。

比例计量型 Zn^{2+} 荧光探针就是荧光探针与锌结合后激发或发射波长发生明显改变,通过测定 Zn^{2+} 诱导的双发射(或激发)峰的比例变化可实现

对 Zn^{2+} 的定量检测。由于探针分子的量子产率易受环境影响,而自由探针和结合 Zn^{2+} 后的探针受环境影响相似,因此比例计量型荧光探针可以避免检测环境的影响,可实现对 Zn^{2+} 动态变化过程高灵敏度的定量检测。正是由于这一优点,寻找这类探针的研究工作已成为目前 Zn^{2+} 荧光探针研

表 3 近红外激发 Zn^{2+} 荧光探针

Tab.3 Near-Infrared Fluorescent Zn^{2+} Probes

Probe	λ ex/nm free(Zn^{2+})	λ em/nm free(Zn^{2+})	ϕ , free (Zn^{2+})	property
TAEA-IR-780	683	750		good selectivity
DPA-Cy	730	780	0.02(0.41)	permeable

表 4 比例计量型 Zn^{2+} 荧光探针

Tab.4 Ratiometric Fluorescent Zn^{2+} Probes

Probe	λ ex/nm free(Zn^{2+})	λ em/nm free(Zn^{2+})	ϕ , free (Zn^{2+})	property
QQB	350(420)	405(510)	(0.03)	good selectivity
DIPCY	627(671)	758(765)	0.02(0.02)	
ZnAF-R1	359(329)	532(528)	0.088(0.031)	
ZnAF-R2	365(335)	495(495)	0.17(0.10)	permeable ester
Zinbo-5	337(376)	407(433)	0.02(0.10)	permeable ester
DSOD	395(410)	500(525)		good selectivity

究的热点。

3 荧光探针法与微量锌离子测量技术的发展

随着人文素质及生活水平的提高,人们深入认识到微量元素的缺乏和过量都会对健康产生不良影响。因此准确、快速、方便地检测人体微量元素就成为亟需解决的问题。目前 Zn^{2+} 检测方法主要为原子吸收光谱法、分光光度法、离子色谱法等,其中精度最高的是原子吸收光谱法。原子吸收光谱法(AAS, atomic absorption spectroscopy)是根据原子从入射辐射中吸收能量的程度与被测元素的含量成正比,进而通过测量吸收光谱和吸光度,求得被测元素的含量。原子吸收光谱法同时具备高选择性和高灵敏度的优势,火焰原子吸收法的灵敏度是 ppm 到 ppb 级,石墨炉原子吸收法绝对灵敏度可达到 $10^{-10} \sim 10^{-14}$ g。但是,原子吸收光谱法成本太高,这也是人体微量锌检测无

法普及的重要原因之一。为此人们为 Zn^{2+} 的检测做了很多新的尝试,马恩陵等^[35]将离子交换色谱法用于人血清微量元素锌的测定,由业诚等^[36]用高效液相色谱光度法用于微量锌离子的研究。而荧光是目前公认的一种非常有前景的高效、便捷的检测方法,光纤荧光传感技术是其中最有潜力的一种实用化技术。

光纤荧光传感技术是基于荧光效应的,利用光纤作为传感头和传输媒质的光学测量方法。目前光纤荧光传感技术主要用于测量温度^[37]、血氧^[38]和 pH 值^[39]等。胡春海等^[40]根据温度与荧光寿命的关系,设计一种基于荧光寿命的光纤温度传感器,将荧光敏感材料粘贴到被测物体表面实现非接触测温。Sibel Derinkuyu 等设计的光纤荧光 pH 值传感器检测范围为 7.0~12.0。以上研究证明光纤荧光传感器具有足够的测量精度和实用化前景。而将其应用于微量 Zn^{2+} 检测的核心问题就是获得性能优良的探针分子,这也会促使

人们不断寻找新的荧光团和识别配体来合成新的 Zn^{2+} 荧光探针分子。

4 新探针的研究展望

在开发新的锌探针领域,随着纳米技术的空前发展,一类极具研究和商业前景的材料——量子点荧光探针被期待为微量 Zn^{2+} 的测量提供更好的荧光响应。

量子点是一种三维尺寸均限制在纳米尺度的半导体纳米晶,其特殊的微观结构使它展现出许多不同于宏观体材料的物理化学性质和独特的光学性质:

(1)量子点的激发光谱很宽——满足能量大于其最小激发波长的光都可以对其进行激发;

(2)性质比有机荧光分子更稳定,可以进行反复多次激发;

(3)发射荧光波长可以通过控制量子点的大小和组成的材料来“调谐”。

量子点的光致发光性质与其表面修饰有很大的关系。很多金属离子可以通过不同的作用机制对量子点的光学性质产生显著影响。利用金属离子与量子点作用引起荧光猝灭或荧光增强,变化建立金属离子浓度与荧光强度的关系,从而实现利用量子点探针对金属离子的含量进行测定。已经报道显示,以 CdTe 为量子点核心材料,巯基乙醇为其载体可实现对 Zn^{2+} 的检测^[41]。随着量子点技术的不断发展与完善,量子点荧光探针用于微量元素的检测将是今后的研究热点之一。

基于荧光探针的生物体 Zn^{2+} 检测以其选择性好,灵敏度高,成本低等特点无疑是最具潜力的定量测量方法,并且已经证明 Zn^{2+} 的检测分辨率可以达到皮摩尔级。可以预测,随着测试技术的发展和新型荧光探针的不断出现,人体微量锌的检测会逐渐简单化,并开发出通用便携式仪器,而锌离子荧光探针将是其核心。

参考文献

[1] Emily L Que, Dylan W domaille, Christopher J Chang. Metals in neurobiology: probing their chemistry and biology with molecular imaging[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(5): 1517~1549.

[2] 樊江莉, 彭孝军, 吴云扣, 等. 生物应用锌(II)荧光探针研究进展[J]. 化学研究与应用, 2005, 17(2): 137~

142.

[3] 张宇, 郭祥峰, 贾丽华, 等. 喹啉衍生物锌离子荧光传感器[J]. 化学进展, 2008, 20(12): 1945~1950.

[4] Thompson R B, Peterson D, Mahoney W, et al. Fluorescent zinc indicators for neurobiology [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2002, 118(1): 63~75.

[5] Zaleski P D, Forbes I J, Betts W H. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin[(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II) [J]. Biochemical Journal, 1993, 296(2): 403~408.

[6] Liu Y, Zhang N, Chen Y, et al. Fluorescence sensing and binding behavior of aminobenzenesulphonamido-quinolino-cyclodextrin to Zn^{2+} [J]. Organic Letters, 2007, 9(2): 315~318.

[7] 吴红梅, 周珊, 赵亮, 等. 基于喹啉功能团的 Zn^{2+} 荧光探针[J]. 发光学报, 2008, 29(6): 1091~1095.

[8] Jiang P, Chen L, Lin J, et al. Novel zinc fluorescent probe bearing dansyl and aminoquinoline groups [J]. Chem Commun, 2002, 13: 1424~1425.

[9] 唐友云, 罗春华, 吴朝阳, 等. 一种新型 Zn^{2+} 近红外荧光探针的研究[J]. 化学学报, 2007, 65(13): 229~233.

[10] Christian R Goldsmith, Stephen J Lippard. 6-Methylpyridyl for pyridyl substitution tunes the properties of fluorescent zinc sensors of the zinpyr family [J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(2): 555~561.

[11] Hirano T, Kikuchi K, Urano Y, et al. Highly zinc-selective fluorescent sensor molecules suitable for biological application [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(49): 12399~12400.

[12] Hirano T, Kikuchi K, Urano Y, et al. Improvement and biological applications of fluorescent probes for zinc, ZnAFs [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(23): 5644~5645.

[13] Maruyama S, Kikuchi K, Hirano T, et al. A novel, cell-permeable, fluorescent probe for ratiometric imaging of zinc ion [J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(36): 10650~10651.

[14] Masayasu Taki, Janet L. wolford, Thomas V O'halloran. Emission ratiometric imaging of intracellular zinc: design of a benzoxazole fluorescent sensor and its application in two-photon microscopy [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(3): 712~713.

[15] 张黔玲, 刘剑洪, 任祥忠, 等. 多吡啶钴(III)配合物与 Zn^{2+} 形成的新型“关-开”荧光探针[J]. 无机化学学报, 2006, 22(5): 885~889.

[16] Tang B, Huang H, Xu K H, et al. Highly sensitive and

- selective near-infrared fluorescent probe for zinc and its application to macrophage cells[J]. *Chemical Communications*, 2006, 34: 3 609~3 611.
- [17] Kazuki Kiyose, Hirotsu Kojima, Yasuteru Urano, et al. Development of a ratiometric fluorescent zinc ion probe in near-infrared region, based on tricarbo-cyanine chromophore[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(20): 6 548~6 549.
- [18] Ayyappanpillai Ajayaghosh, Priya Carol, Sivaraman-icker Sreejith. A ratiometric fluorescence probe for selective visual sensing of Zn^{2+} [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(43): 14 962~14 963.
- [19] Walkup G K, Imperiali B. Design and evaluation of a peptidyl fluorescent chemosensor for divalent zinc [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118 (12): 3 053~3 054.
- [20] Hellinga H W, Marvin J S. Protein engineering and the development of generic biosensors [J]. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16(4): 183~189.
- [21] Mann T, Keilin D. Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase[J]. *Nature*, 1940, 146(3692): 164~165.
- [22] Chen R F, Kernohan J C. Combination of bovine carbonic anhydrase with a fluorescent sulfonamide [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(24): 5 813~5 823.
- [23] Abir L Banerjee, Shakila Tobwala, Bratati Gangulu, et al. Molecular basis for the origin of differential spectral and binding profiles of dansylamide with human carbonic anhydrase I and II [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(10): 3 673~3 682.
- [24] Richard B Thompson, Eric R Jones. Enzyme-based fiber optic zinc biosensor [J]. *Analytical Chemistry*, 1993, 65 (6): 730~734.
- [25] Richard B Thompson, Marcial W Patchan. Lifetime - Based fluorescence energy transfer biosensing of zinc[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 227(1): 123~128.
- [26] Richard B Thompson, Elbaum D, Nair S K, et al. Structure-based design of a sulfonamide probe for fluorescence anisotropy detection of zinc with a carbonic anhydrase-based biosensors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(35): 8 381~8 387.
- [27] Richard B Thompson, Maliwal B P, Zeng H H. Improved fluorophores for zinc biosensing using carbonic anhydrase[J]. *SPIE proceedings series*, 1999, 3603: 14~22.
- [28] Barondeau D P, Kassmann C J, Tainer J A, et al. Structural chemistry of a green fluorescent protein Zn biosensor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(14): 3 522~3 524.
- [29] 梁卓文, 孟建新. 双水杨醛草酰二胺的合成及其检测锌的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(6): 1 145~1 147.
- [30] 何慧, 李爱芳, 杨睿, 等. 水杨醛-4-乙氧基苯甲酰胍酮对锌离子的高选择性识别[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(6): 808~811.
- [31] 康信煌. 水杨醛缩 5,7-二溴-8-氨基喹啉荧光光度法测定粮食中的痕量锌[J]. *分析实验室*, 2001, 20(2): 49~51.
- [32] 李永强, 刘晓霞, 王崇妍, 等. 水杨醛缩邻氨基苯酚-锌荧光反应的研究[J]. *冶金分析*, 2007, 27(3): 29~32.
- [33] Li Chun-Yan, Zhang Xiao-Bing. A porphyrin derivative containing 2-(oxymethyl)pyridine unit showing unexpected ratiometric fluorescent recognition of Zn^{2+} with high selectivity [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 616 (2): 214~221.
- [34] Partha Roy, Koushik Dhara. Selective fluorescence zinc ion sensing and binding behavior of 4-methyl-2,6-bis(((phenylmethyl)imino)methyl)phenol: biological application[J]. *Inorganic Chemistry*, 2007, 46(16): 6 405~6 412.
- [35] 马恩陵, 何桂珍, 王秀荣, 等. 离子交换色谱法同时测定人血清微量元素铜和锌 [J]. *中国临床营养杂志*, 2003, 11(1): 28~31.
- [36] 由业诚, 李玉光, 郭明, 等. 高效液相色谱光度法测定痕量镉和锌的研究[J]. *光谱实验室*, 2001, 18(2): 223~225.
- [37] Seungin Beak, Yoonchan Jeong, Johan Nilsson, et al. Temperature-dependent fluorescence characteristics of an ytterbium-sensitized erbium-doped silica fiber for sensor applications [J]. *Optical Fiber Technology*, 2006, 12(1): 10~19.
- [38] Rolfe P. 光纤传感器在生物医学中的应用进展[J]. *中国计量学院学报*, 2006, 17(4): 257~260.
- [39] Sibel Derinkuyu, Kadriye Ertekin, Ozlem Oter, et al. Fiber optic PH sensing with long wavelength excitable Schiff bases in the PH range of 7.0-12.0[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 588(1): 42~49.
- [40] 胡春海, 邹晓红, 王玉田. 光纤荧光温度传感器用于高压设备温度在线监测的研究[J]. *工业仪表与自动化装置*, 2004, 5: 53~54.
- [41] 吴东平, 张勇, 刘露琛, 等. 量子点作为化学荧光探针的应用[J]. *信阳师范学院(自然科学版)*, 2008, 21(1): 150~153.

基于壳聚糖-纳米 TiO₂ 复合膜/CdSe 固定血红蛋白的过氧化氢生物传感器的研究

孙妮, 袁若*, 柴雅琴, 李文娟, 闵丽根
(西南大学化学化工学院, 重庆市分析化学重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 以壳聚糖/nano-TiO₂ 复合膜为基底固载量子点硒化镉(CdSe)和血红蛋白(Hb)制备过氧化氢生物传感器。用循环伏安法对修饰电极进行了表征,并用计时电流法对过氧化氢(H₂O₂)生物传感器的性能进行了研究。结果表明,在优化的实验条件下,该传感器的响应电流与其浓度在 $3.9 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-2}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系,检出限为 1.0×10^{-6} mol/L。该传感器的米氏常数为 1.65 mmol/L,表明所固定的酶具有较高的生物活性。

关键词: 纳米 TiO₂; 壳聚糖; CdSe; 血红蛋白; 生物传感器

Study of the hydrogen peroxide biosensor based on CS/nano-TiO₂/CdSe/ hemoglobin

Sun Ni, Yuan Ruo*, Chai Ya-qin, Li Wen-juan, Min Li-gen
(Chongqing Key Laboratory of Analytical Chemistry, College of Chemistry and Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: A highly sensitive biosensor based on CS/nano-TiO₂/CdSe/hemoglobin has been prepared. The electrochemical characteristic of the biosensor were studied by cyclic voltammetry and chronoamperometry. The biosensor showed a linear response to H₂O₂ over a concentration range from $3.9 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-2}$ mol/L with the detection limit of 1.0×10^{-6} mol/L. In this experiment, Hemoglobin can retain a higher bioactivity with the Michaelis-menten Constant of 1.65 mmol/L.

Key words: nano-TiO₂; chitosan; cdSe; hemoglobin; biosensor

0 引言

纳米材料在电化学生物传感器的主要作用有加速电子转移速率,增强氧化还原物质在电极表面反应的可逆性、催化反应,固定生物分子,标记生物分子^[1]等。纳米 TiO₂ 是目前研究活跃的无机纳米材料之一。与常规材料相比,纳米 TiO₂ 具有比表面积大、光吸收性好、表面活性大、催化效率高、分散性能好等独特的性能,可以增强酶的吸附量和提高酶的活性,同时还具有优异的化学

稳定性、热稳定性、无毒性等性能,已广泛应用于卫生保健、污水处理以及纺织行业^[2-4]等诸多领域。壳聚糖(CS)是天然提取物,具有良好的生物降解性、抗菌性、可再生性和成膜性^[5-7]。利用纳米材料的一些特性,在有机相中引入无机纳米材料,得到的复合材料不仅可以提高壳聚糖的生物活性和热稳定性,而且研究进一步表明由该复合材料制得的复合膜的断裂强度明显高于纯膜^[5]。近年来,量子点的光学和电子特征已在生命科学中的应用受到极大关注^[8-12]。该文将 Hb 固定在

以壳聚糖-纳米 TiO₂ 复合膜为介质并吸附了量子点 CdSe 的金电极表面, 制备出第三代过氧化氢生物传感器。该传感器制备方法简单, 具有较高的稳定性, 较长的使用寿命, 较低的检出限, 和较强的抗干扰能力等优点, 同时保持了酶的良好生物活性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660A 电化学分析系统(上海辰华仪器公司); BRANSONIC 200 超声清洗仪(德国 BRANSONIC ULTRASCHALL 公司); AB203-S 电子天平(瑞士 Mettler&Toledo 公司)。

血红蛋白(Hb, Sigma 公司); H₂O₂(浓度 30%, 水溶液), 精确浓度经高锰酸钾溶液标准溶液滴定; 壳聚糖(浓度 5%, 分析纯, Sigma 公司); 其余试剂如三巯基丙酸(3-MPA, Sigma 公司)等均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水, 所有实验均在室温下操作。

1.2 TiO₂ 纳米粒子及壳聚糖-纳米 TiO₂ 溶液的制备

参照文献[3,5]方法, 精确配制 0.5 mol/L 的 TiCl₄ 溶液, 在 95 °C 下水解, 将得到的白色沉淀离

心分离、水洗、干燥即得到纳米 TiO₂ 颗粒。取壳聚糖 2 mL 及 TiO₂ 50 μL 混合, 超声震荡, 混合均匀, 得到的为壳聚糖-纳米 TiO₂ 的混合溶液。

1.3 CdSe 量子点的合成

按照文献[8,12], 取适量 CdO 粉末加入油酸与石蜡的混合溶液中; 另取一定量的 Se 粉加入石蜡溶液中。分别将两溶液在 N₂ 脱氧条件下加热, 再将两溶液混合搅拌至室温即得 CdSe 量子点溶液。取 1 mL 氯仿加入量子点溶液中, 反应片刻后加入到一定体积的三巯基丙酸中, 将得到的沉淀离心干燥, 再溶于 pH=7.4 的 PBS 中即得到巯基化的 CdSe 量子点溶液。

1.4 修饰电极的制备

将金电极依次用 0.3 μm, 0.05 μm 的 Al₂O₃ 粉末抛光, 然后依次用乙醇, 二次蒸馏水超声清洗。随后将电极置于 0.5 mol/L 的硫酸溶液中。在 -0.5 V ~ 1.4 V 的电位范围内进行循环伏安扫描极化处理至循环伏安图稳定为止。最后在处理好电极表面滴涂 CS/nano-TiO₂ 复合材料, 晾干后置于 CdSe 溶液中约 6 h。最后将电极浸泡在 Hb 溶液中 8 h。该电极不用时放置在冰箱(4 °C)中以保持酶的活性备用。图 1 为电极制备过程示意图。

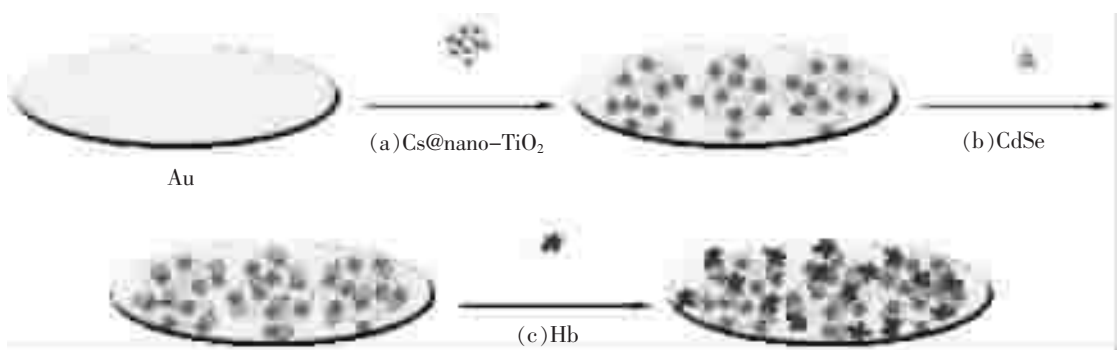


图 1 酶电极制备过程示意图

Fig.1 Schematic illustration of the preparation process of enzyme electrode

1.5 测试方法

采用三电极系统检测装置: 酶修饰电极为工作电极, 铂电极为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, 以下所有电位都是相对参比电极而言。电极在 5 mL 0.1 mol/L pH=6.0 的 PBS 缓冲溶液中, 于 0.1 ~ -0.6 V 电位范围内进行循环伏安扫描, 并记录生物传感器对 H₂O₂ 的安培响应。测

定过程是在支持电解质溶液中通入高纯氮气以除去氧气的条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 生物传感器对 H₂O₂ 的直接电化学响应

图 2 为酶电极在 0.1 mol/L PBS 中的循环伏安图。(a) 为未加入 H₂O₂ 时的循环伏安, 当向溶液

中加入 0.35 mmol/L H_2O_2 (b)时,还原峰电流升高氧化峰电流降低,继续加入 0.7 mmol/L H_2O_2 (c)时,还原峰电流进一步升高氧化峰电流进一步降低,说明 H_2O_2 在电极表面发生了催化还原反应。

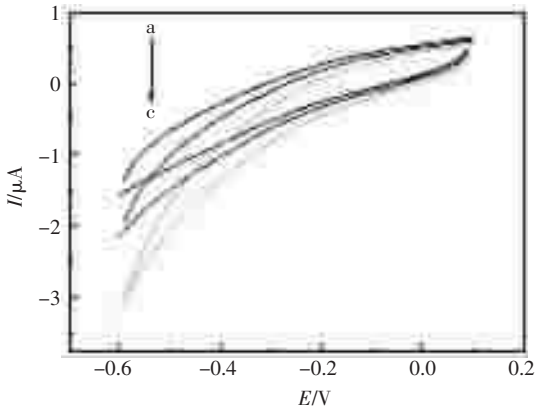


图 2 生物传感器在含有不同浓度 H_2O_2 中的 (0.1 mol/L PBS, pH=6.0)循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of the biosensor in 0.1 mol/L PBS of pH = 6.0 in the presence of 0 (a), 0.35 mmol/L (b) and 0.7 mmol/L H_2O_2 (c)

2.2 pH 对修饰电极的影响

图 3 为 pH 对生物传感器的电流响应的影 响。由图可见,pH 对酶的催化活性和稳定性影响很大。实验表明 pH 为 6.0 时,生物传感器对 H_2O_2 的电催化达到了最大值,因此实验均在 pH 为 6.0 下进行测定。

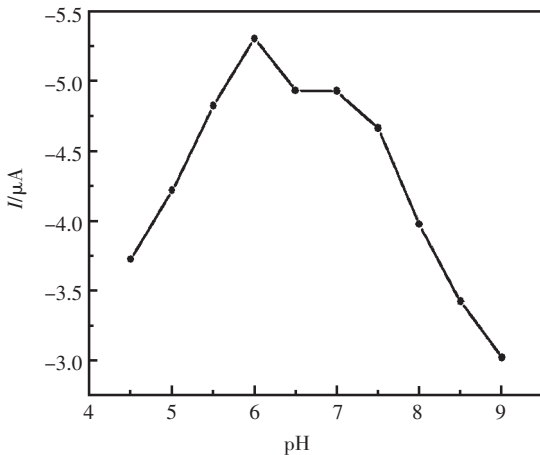


图 3 pH 对生物传感器的安培电流响应的影 响

Fig.3 Effect of pH on amperometric current response on the biosensor

2.3 电位对修饰电极的影响

图 4 体现了不同工作电位对生物传感器的

电流响应的影 响。可以看出,随着工作电位的不断负移,响应电流逐渐增大,但考虑到传感器在过负电位下抗坏血酸等物质对电极的干扰较为严重,所以实验中选择 -0.35 V 作为工作电位。

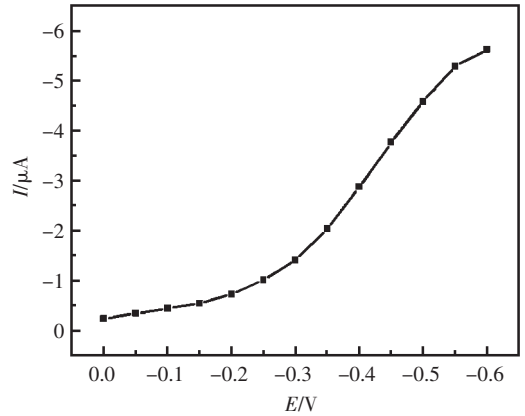


图 4 工作电位对生物传感器的安培电流响应的影 响
Fig.4 Effect of applied potential on amperometric current response on the biosensor

2.4 扫速对传感器电流响应的影 响

图 5 为不同扫速对传感器的电流响应的影 响。从图可见,随着扫速的不断增加,峰电流值也不断地增加,当扫速达到 300 mV/s 时,仍可以得到对称性良好的循环伏安曲线。且在 30~300 mV/s 范围内,峰电流与扫速的平方根成线性关系,表明修饰电极在 PBS 中的电化学反应是受表面控制的。

2.4 生物传感器的性能测定

图 6 为酶电极在最佳的实验条件下,连续加入过氧化氢后电流对时间的响应及校准曲线。 H_2O_2 在 $3.9 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-2}$ mol/L 浓度范围内与还原峰峰电流呈良好的线性关系,检出限为 1.0×10^{-6} mol/L。

2.5 重现性、稳定性及干扰性实验

在 H_2O_2 浓度为 7.0×10^{-4} mol/L 时,重复 10 次平行实验,相对标准偏差为 3.6%。同一支电极在含 H_2O_2 的溶液中循环扫描 100 圈,电流响应值为初始电流的 91.2%。实验所制备的传感器在 4 °C 的冰箱中保存。20 天后在相同条件下测定,能保持原有响应的 79.6%。干扰情况可从存在干扰物时的响应电流与仅有同浓度 H_2O_2 时的响应电流值之比来判断。2 倍浓度的抗坏血酸,乙醇和赖氨酸加入含 H_2O_2 的 PBS (pH=6.0) 中,实验结

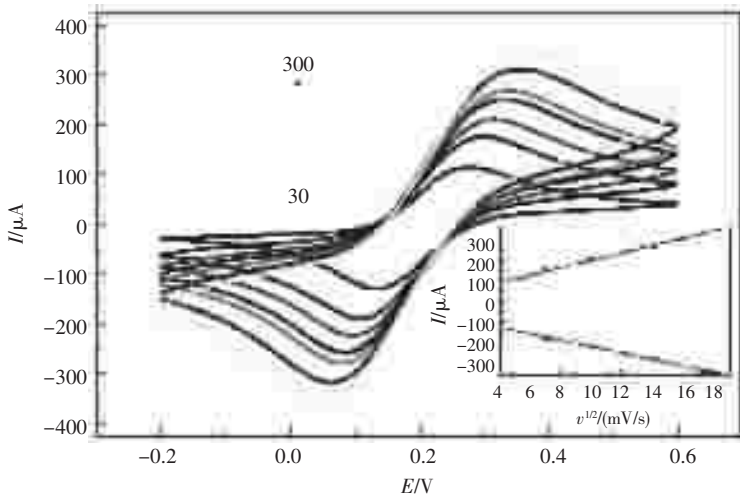


图 5 扫速对生物传感器安培电流响应的影响

Fig.5 Effect of scan rate on amperometric current response

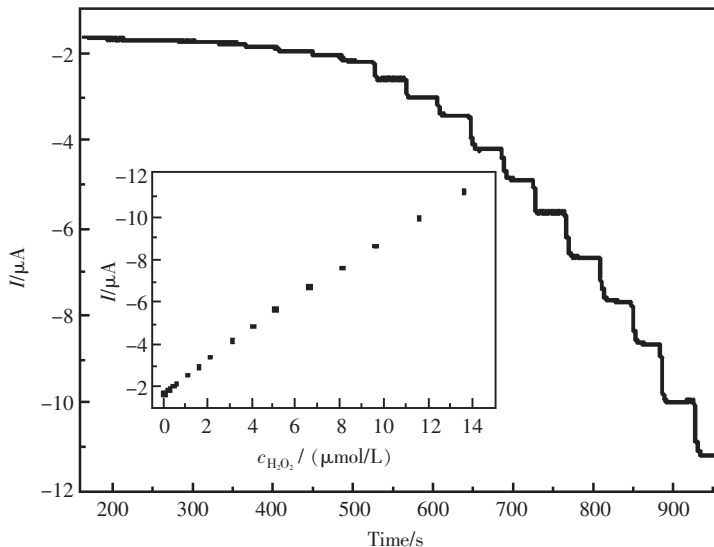


图 6 生物传感器对连续加入不同浓度 H₂O₂ 的计时安培电流图

Fig.6 Typical current-time response of the biosensor on successive injection of different concentration H₂O₂

果显示所测物质干扰甚微,表明该传感器具有一定的抗干扰能力。

2.6 米氏常数的测定

米氏常数 K_m 为酶促反应的特征动力学参数,是表征酶与底物之间亲和力大小的统计标准。据图 6 的电流响应曲线与校准曲线,求得 $K_m=1.65$ 。较低的米氏常数说明 Hb 有较高的活性,与 H₂O₂ 有较强的亲和力。

3 结论

该实验以壳聚糖-纳米 TiO₂ 复合膜为基底吸

附量子点 CdSe,再吸附 Hb 制得了新型的过氧化氢生物传感器。该酶生物传感器制备方法简单,且具有稳定性好及重现性较高、线性范围较宽、检测限较低等优点,该方法还能用于其它酶传感器的制备。

参考文献

- [1] 扎热木,萨迪克,都颖,等.纳米材料在电化学生物传感器中的应用[J].分析科学学报,2009,25(2):217~222.
- [2] 徐鹏,王玉国,刘学武,等.纳米 TiO₂ 的制备、表面处理及表征的研究进展 [J]. 现代涂料与涂装,2006,6:

- 39~42.
- [3] 钟霞, 欧朝凤, 袁若, 等. TiO_2 纳米颗粒增强的过氧化氢生物传感器[J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2007, 29(5): 40~43.
- [4] Zhang Y, He P L, Hu N F, et al. Horseradish Peroxidase Immobilized in TiO_2 Nanopartical Films on Pyrolytic Graphite Electrodes: Direct Electrochemistry and Bioelectrocatalysis[J]. *Electrochimica Acta*, 2004, 49(12): 1981~1988.
- [5] 张显策, 张顺花, 李慧艳. 壳聚糖/纳米 TiO_2 复合膜的制备及其性能分析[J]. 浙江理工大学学报, 2007, 24(6): 621~624.
- [6] Yang Y H, Yang H F, Yang M H, et al. Amperometric glucose biosensor based on a surface treated nanoporous ZrO_2 /chitosan composite film as immobilization matrix [J]. *Analytical Chimica Acta*, 2004, 525(1): 213~220.
- [7] Kang X H, Mai Z B, Zou X Y, et al. Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol-gel chitosan/silica hybrid [J]. *Talanta*, 2008, 74: 879~886.
- [8] 杨东芝, 孙世安, 陈启凡, 等. CdSe 量子点与蛋白质的作用研究[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 527~531.
- [9] 林章碧, 苏星光, 张家焯, 等. 纳米粒子在生物分子中的应用[J]. 分析化学, 2002, 30(2): 237~241.
- [10] 李步洪, 张镇西, 谢树森. 量子点在生物学中的研究进展[J]. 激光生物学报, 2006, 15(2): 214~220.
- [11] 邱婷, 彭洪亮, 何治柯. 水溶性量子点 CdSe/ZnS 与蛋白质非特异性相互作用研究[J]. 化学传感器, 2007, 27(2): 26~30.
- [12] Deng Z T, Cao L, Tang F Q, et al. A New Route to Zine-blende CdSe Nanocrytals: Mechanism and Synthesis[J]. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 16671~16675.

间接竞争 ELISA 方法用于脱落酸的检测

周振华, 楚霞*, 沈国励, 俞汝勤

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 湖南长沙 410082)

摘要: 该文研制了植物激素脱落酸(ABA)间接竞争酶联免疫试剂盒, 该试剂盒可对 ABA 进行快速检测。文中成功制备了脱落酸和牛血清蛋白的交联物(ABA-BSA), 并对交联物的浓度、抗体稀释度、酶标二抗稀释度对实验的影响进行了考察。结果表明, 该试剂盒具有高灵敏性, 最低检出浓度为 1.38 ng/mL, 在 10 ng/mL ~ 1 000 ng/mL 之间, 吸光度与浓度的对数呈良好的线性关系。样品添加回收率在 95.98% ~ 102.25% 之间, 平均回收率为 100.18%, 变异系数(CV)在 1.27% ~ 4.68% 之间, 平均变异系数为 3.18%。

关键词: 脱落酸; ELISA; 间接竞争

Establishment of indirect competitive ELISA for the determination of abscisic acid

Zhou Zhen-hua, Chu Xia*, Shen Guo-li, Yu Ru-qin

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics,

College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: ABA was coupled to carrier protein bovine serum albumin(BSA), and an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ciELISA) was developed for the quantitative determination to ABA. The concentration of ABA-BSA of coating ELISA plates, antibody dilution and enzyme labeled antibody dilution were optimized, The results showed the working range was assigned to concentrations for 1 ng/mL ~ 1 000 ng/mL, with the detect ion limit being 1.38 ng/mL, The linear range of the assay was between 10 ng/mL ~ 1 000 ng/mL. The ELISA-kit was stable, simple, rapid, sensitive and can meet the demand of practical work. The recovery rate of fortified sample was between 95.98% ~ 102.25%, and mean recovery rate was 100.18%. The Coefficient of variance was between 1.27% ~ 4.68%, and mean coefficient of variance of intra-assays was 3.18%.

Key words: abscisic acid; ELISA; indirect competitive

0 引言

脱落酸(abscisic acid)是一种具有倍半萜结构的植物激素, 与生长素、赤霉素、细胞分裂素和乙烯一起被列为世界公认的五大类天然植物激素。脱落酸具有调节植物发育、种子休眠、促进气孔关闭、影响开花和性分化、果实成熟的作用^[1], 并使植物对于干旱、寒冷、盐碱、病害等环境胁迫具有响应能力^[2-4]。由于脱落酸的重要作用, 所以, 研制一种快速、简便、灵敏的脱落酸检测方法是十分必要的。

目前用于检测脱落酸的方法有很多, 主要有放射免疫法^[5]、高效液相色谱法^[6]、毛细管电泳和激光诱导荧光检测法^[7]、气相色谱-质谱联用法^[8]等, 但是这些方法往往需要复杂的分离纯化步骤和较昂贵的仪器, 步骤繁琐, 难以实时监控。酶联免疫吸附检测技术(ELISA)操作简便、特异性好、灵敏度高、试剂稳定性好。因此, 该文基于 ELISA 间接竞争方法研制了检测脱落酸的试剂盒, 该试剂盒具有稳定、快速、简便、高灵敏等特点, 能够应用于实际样品的快速检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Lamber 800 紫外光谱仪(PERKIN ELMER,美国);96 孔酶标板、脱落酸(ABA)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(HRP-羊 IgG)和牛血清白蛋白(BSA)均购自北京鼎国生物技术有限责任公司;脱落酸鼠单克隆抗体由湖南农业大学提供;碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购于阿法埃莎天津化学试剂有限公司;四甲基联苯胺显色试剂盒(TMB 显色液 A+TMB 显色液 B)和终止液购于北京赛默生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯,所用水为二次蒸馏水。

所用溶液包括:包被液:碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH9.6;洗涤液:含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBST), pH7.3;封闭液:含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液;抗体稀释液:磷酸盐缓冲液, pH7.3;终止液:2 mol/L H₂SO₄。

1.2 偶联抗原的制备

将 ABA(25 mg, 0.1 mmol)、NHS(13.8 mg, 0.12 mmol)、EDC(23.0 mg, 0.12 mmol)溶于 1 mL 无水 DMF 中,室温下搅拌 5 h,离心取上清液。30 mg BSA 溶于 2 mL 的碳酸盐缓冲液中,逐滴加入 50 μL 上清液,室温下搅拌 4 h,反应结束后,装入透析管,用磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)透析,每 8 h 换液一次,共换液 3 次。透析后保存于 4 °C 待用。

1.3 间接竞争酶联免疫吸附分析方法的建立

(1) 抗原包被:酶标板中加入由包被液稀释的一定浓度的偶联抗原(BSA-ABA),每孔 100 μL,4 °C 过夜;

(2) 洗板:用 PBST 缓冲液洗板 3 次,每次 5 min;

(3) 封闭:每孔加入 100 μL 封闭液,37 °C 封闭 1 h,重复洗板过程;

(4) 加 ABA 标准品和抗体:将不同浓度的 50 μL ABA 标准品(5 000 ng/mL、1 000 ng/mL、500 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、1 ng/mL、0.1 ng/mL)和 50 μL 一定浓度的抗体混合,加入酶标板中,37 °C 孵育 1 h,进行间接竞争 ELISA 反应,重复洗板过程;

(5) 与酶标二抗反应:加入 HRP 酶标记的山羊抗小鼠 IgG,每孔 100 μL,37 °C 孵育 1 h,重复洗板过程;

(6) 加入底物:将 TMB 显色液 A 与 B 等比例混合,每孔加入 100 μL,37 °C 反应 30 min;

(7) 终止反应:每孔加入 50 μL 终止液,终止反应;

(8) 检测:用紫外可见分光光度计测定 450 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 ABA-BSA 偶联物的鉴定

采用紫外光谱鉴定偶联抗原是否合成成功,并对半抗原与载体蛋白偶联结果进行鉴定。偶联物、牛血清蛋白和脱落酸半抗原的紫外光谱示于图 1。从图中可以看出,脱落酸半抗原在 244 nm 有最大吸收峰,载体蛋白 BSA 在 278 nm 有最大吸收峰。与载体蛋白和半抗原相比,合成偶联物的吸收曲线发生明显变化,说明有新的物质出现(如图 1)。

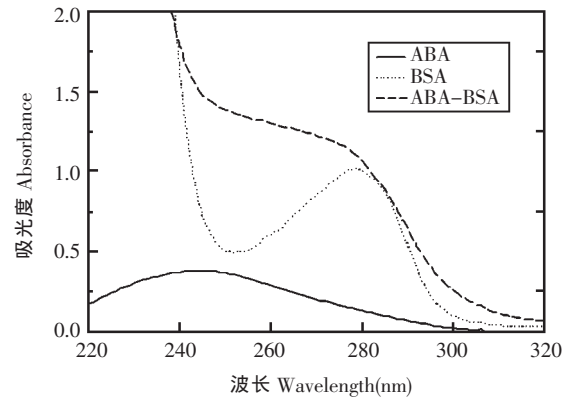


图 1 牛血清蛋白、脱落酸及其偶联物紫外扫描图
Fig.1 Ultraviolet absorbance spectra of BSA, ABA and synthesis antigen

根据朗伯-比尔定律,波长一定时,混合物的紫外吸收具有加和性。根据公式^[9]

$$\frac{C_{\text{ABA}}}{C_{\text{BSA}}} = \frac{D_{244 \text{ nm 偶}} * K_{\text{BSA } 278 \text{ nm}} - D_{278 \text{ nm 偶}} * K_{\text{BSA } 244 \text{ nm}}}{D_{278 \text{ nm 偶}} * K_{\text{ABA } 244 \text{ nm}} - D_{244 \text{ nm 偶}} * K_{\text{ABA } 278 \text{ nm}}}$$

计算出 ABA 与 BSA 的摩尔结合比为 2.67:1。

另外分别用 ABA-BSA 与 BSA 组装过夜,经过酶联免疫分析测得在 450 nm 处的紫外吸收光谱有显著区别,也能证明脱落酸已成功偶联到载体蛋白上(如图 2)。

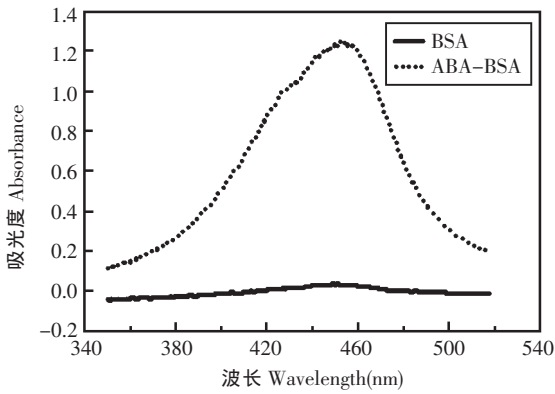


图2 BSA、ABA-BSA 分别包被酶联板的吸光度
Fig.2 The absorbance of BSA and ABA-BSA coated microtiter plates

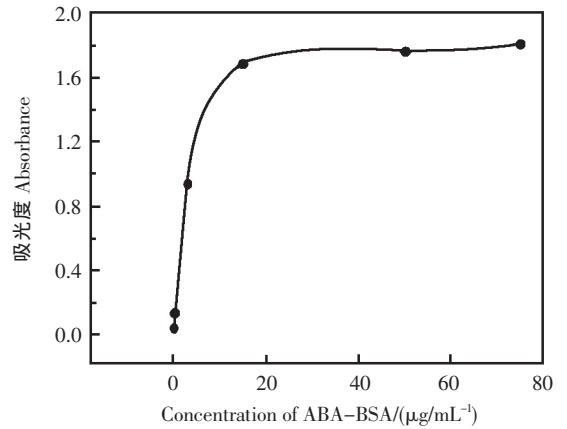


图3 交联物浓度优化图
Fig.3 Optimization of the concentration of ABA-BSA

2.2 包被抗原浓度的优化

对间接竞争 ELISA 方法的包被抗原浓度进行优化,用碳酸盐缓冲液将合成的偶联物逐级稀释,浓度分别为 0.03 µg/mL、0.3 µg/mL、3 µg/mL、15 µg/mL、50 µg /mL、75 µg/mL。结果表明,随着偶联物浓度的增大,吸光度随之增大,当偶联物浓度达到 15 µg/mL 时,吸光度趋于稳定(如图 3),

因此,实验中采用偶联物的浓度为 15 µg/mL。

2.3 抗体浓度的优化

对实验中建立的 ELISA 方法进行抗体浓度的考察(图 4)。吸光度随抗体稀释比的减小而明显增大,当抗体的稀释比减小到 1:50 时,吸光度趋于稳定,为避免吸光度过大引起信号失真,在绘制标准曲线中采用抗体稀释比为 1:100 和

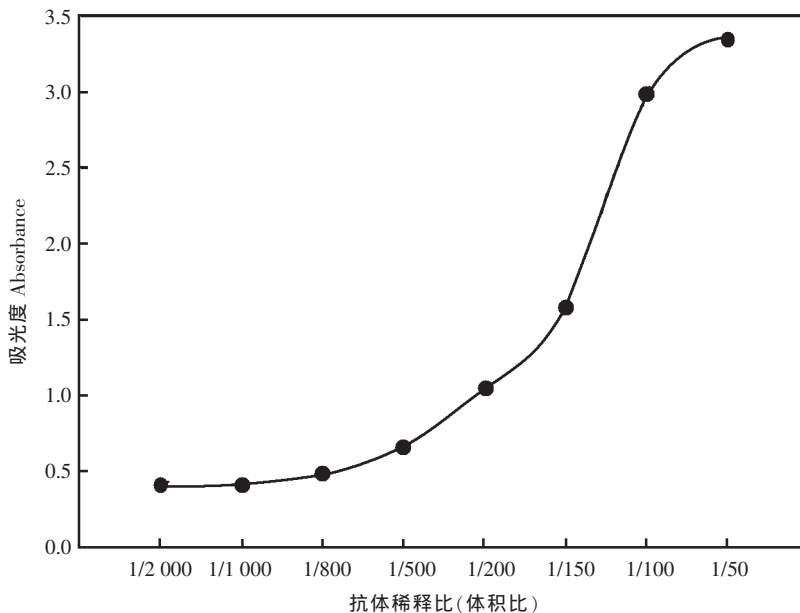


图4 抗体稀释度优化图
Fig.4 Optimization of the concentration of ABA antibody

1:150。

2.4 酶标二抗稀释比的优化

对建立的 ELISA 方法进行酶标二抗稀释比

的优化,如图 5 所示。吸光度随着酶标二抗稀释比的增大而明显下降,当酶标二抗的稀释比由 1:250 变化到 1:500 时,吸光度信号明显降低,酶

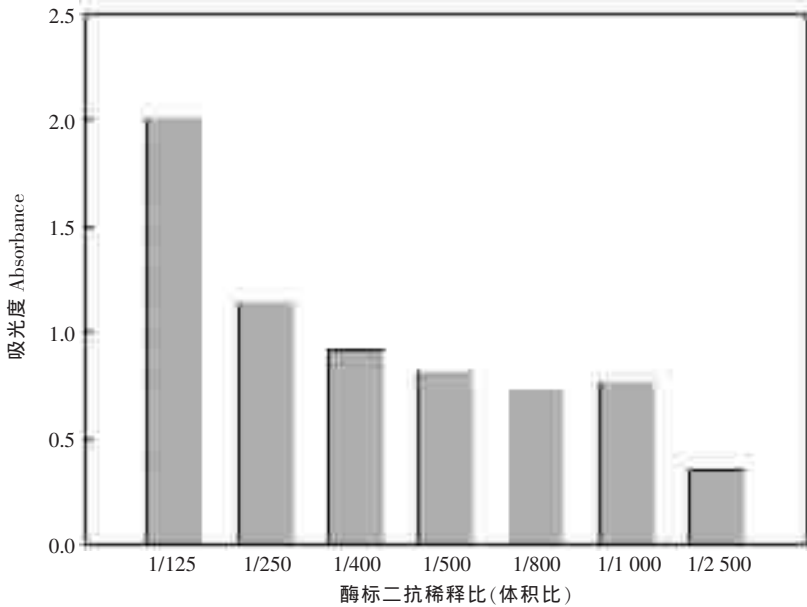


图5 酶标二抗稀释度优化图

Fig.5 Optimization of the concentration of goat-anti-mouse IgG labelled by HRP

标二抗的稀释比由 1:500 变化到 1:2 000 时,吸光度变化不太明显,但是当稀释到 1:5 000,吸光度的信号明显减弱,可见过度稀释就会大大降低酶标二抗的浓度。因此,在实验中采用酶标二抗的稀释比为 1:125。

2.5 间接竞争 ELISA 分析方法的竞争抑制曲线

如图所示,根据建立的 ELISA 方法绘制单抗与脱落酸标准品的竞争抑制标准曲线。随着脱落酸标准品浓度的增大,吸光度明显减弱。分别考察抗体稀释比 1:100 和 1:150 下的竞争抑制反应,以脱落酸标准品对数值作为横坐标,加入对应浓度抗体测得的吸光度 OD_{450} 作为纵坐标,绘制标准曲线。如图 6 所示,当抗体稀释比为 1:100 时,在 10 ng/mL~1 000 ng/mL 之间,吸光度与浓度呈良好的线性关系,回归方程为 $y = -0.9016x + 3.0517$, $r^2 = 0.9911$,最低检测浓度为 1.38 ng/mL。当抗体稀释比为 1:150 时,在 1 ng/mL~1 000 ng/mL 之间,吸光度与浓度呈良好的线性关系,回归方程为 $y = -0.2802x + 1.0995$, $r^2 = 0.9891$,最低检测浓度为 5.15 ng/mL。

2.6 样品的测定

从标准物的添加回收情况来看,在 33.0 ng/mL、66.1 ng/mL、132.2 ng/mL、330.5 ng/mL、661.0 ng/mL、1 322.0 ng/mL 六个加标浓度下,回

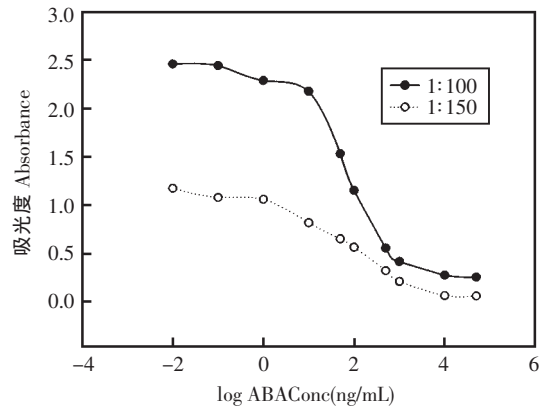


图6 脱落酸与单克隆抗体竞争抑制标准曲线

Fig.6 The curve of ABA standard sample detected by indirect competitive ELISA

收率在 95.98%~102.25% 之间,变异系数在 1.27%~4.68% 之间,相对标准偏差在 1.55%~5.72% 之间,实验结果基本令人满意(表 1)。

3 结论

该实验利用间接竞争酶联免疫反应测定脱落酸的含量,由于脱落酸是一种相对分子量只有 264.3 的小分子半抗原,采用碳二亚胺方法进行了半抗原与载体蛋白的偶连,其反应原理是利用碳二亚胺(EDC)使羟基和氨基间脱水形成酰胺键,半抗原上的羧基先与 EDC 反应生成一个中间

表 1 实际样品中 ABA 的检测
Tab.1 Detection of ABA in the real sample

ABA 加标浓度 (ng/mL) Concentration of ABA standard	测定值 (ng/mL) Measurement value	回收率 (%) recovery rate	变异系数 (%) CV	相对标准 偏差 (%) RSD
33.0	32.83 ± 1.88	99.48 ± 5.70	4.68	5.72
66.1	67.56 ± 3.51	102.21 ± 5.31	4.19	5.19
330.5	317.20 ± 4.93	95.98 ± 1.49	1.27	1.55
661.0	667.48 ± 20.85	101.00 ± 3.15	3.43	4.20
1 322.0	1351.66 ± 44.55	102.25 ± 3.37	2.33	3.29

物,然后再与蛋白质偶联。该方法简单易行,副反应少。对脱落酸的抗原性影响不大,随后的检测结果也证明了这种方法的可靠性。

在获得了 ABA 特异性单克隆抗体和包被抗原的基础上,对影响实验结果的各种条件进行优化。该方法可以用于植物中脱落酸的测定,其最低检测下线为 1.38 ng/mL。在 10 ng/mL ~ 1 000 ng/mL 之间,脱落酸浓度对数与吸光度具有良好的线性关系。向样品中添加不同浓度的脱落酸,测得平均添加回收率为 100.18%,平均变异系数为 3.18%,平均标准偏差为 3.99%。

该方法简便易操作,非特异性吸附少,具有较高的灵敏度和特异性,回收率高。且预处理简单、仪器设备投资少、测定成本低廉。因此在进一步完善该方法的基础上,可以组装试剂盒在农业中推广使用。

参考文献

- [1] Dik Hagenbeek, Ralph S Quatrano, Christopher D Rock, et al. Trivalentions activate abscisicAcid- inducible promoters through an ABI1 - dependent pathway in rice protoplasts[J]. PlantPhysiol ,2000 ,123 :1 553~1 560.
- [2] 杨洪强, 接玉玲. 植物脱落酸合成缺陷与反应敏感型突变[J]. 生命科学, 2001,14(1): 20~22.
- [3] 潘瑞炽. 植物生理学 (第 5 版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [4] 郭栋梁, 李玲.ABA 对植物侧根发生的调节[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 67~69.
- [5] Elmar W Weiler. Radioimmunoassaya for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts[J]. Plant, 1980, 148: 262~272.
- [6] 吴耕西, 毕桂红. 高效液相色谱测定苹果叶片中的吲哚乙酸和脱落酸[J]. 山东农业大学学报, 1994, 25(1): 25~29.
- [7] Liu X, Ma L, Lin Y W, et al. Determination of abscisic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. J. Chromatogr., A 2003, 1021, 209~213.
- [8] Muller A, Duchting P, Weiler E W. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to Arabidopsis thaliana [J]. Planta 2002, 216, 44~56.
- [9] 杨杨, 王茜, 生吉萍, 等. 脱落酸人工抗原合成及多克隆抗体制备[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 355~358.

基于室温离子液体的胍蒸气传感器

孙洁, 李艳, 冯依玲, 王荣*, 吴霞琴

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 利用电化学循环伏安法研究了水合胍蒸气在室温离子液体 BmimPF₆ 中的电化学行为, 测得其在 0.94 V 处可以被电化学氧化, 且该氧化峰电流受胍在 BmimPF₆ 中的扩散所控制并推算出其氧化反应电子数为 0.8。在此基础上, 构建了以 BmimPF₆ 为电解质的准固态胍蒸气电化学气体传感器。该传感器对浓度范围为 1.1~25.4 μmol/L 的水合胍蒸气呈线性响应。同时, 该传感器也表现出了良好的稳定性与重复性。

关键词: 离子液体; 水合胍; 气体传感器; 电化学

Hydrazine gas sensors based on room-temperature ionic liquid

Sun Jie, Li Yan, Feng Yi-ling, Wang Rong*, Wu Xia-qin

(College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The electrochemical behavior of hydrazine in room temperature ionic liquid (BmimPF₆) was studied by cyclic voltammetry. Results suggested that hydrazine could be oxidized at the potential of 0.94 V with the electron number of 0.8. The electrochemical reaction was under the diffusion control of hydrazine in BmimPF₆. And also, an electrochemical hydrazine gas sensor, using BmimPF₆ thin films as the electrolyte, was fabricated. The sensor showed a linear response to the hydrazine gas concentrations in the range of 1.1~25.4 μmol/L, with a good stability and reproducibility.

Key words: ionic liquid; hydrazine; gas sensor; electrochemistry

0 引言

水合胍(N₂H₄·H₂O), 又名水合联氨, 无色发烟液体, 弱碱性。其蒸气及液体能经皮肤、呼吸道迅速吸收, 毒性有蓄积作用, 对血液和神经有毒害。因此, 建立低浓度水合胍气体的检测方法具有重要的意义。目前对液体水合胍的测定方法有分光光谱法^[1]、荧光法^[2]、电化学法^[3-4]、高效液相色谱法^[5]、气相色谱-质谱联用法^[6]、化学发光法^[7]和传感器法^[8-9]等。

传统电化学传感器的电解液是水溶液, 但水会随着时间而挥发, 从而使传感器失效。离子液体作为新型的电解质材料, 由于其具有高室温离子导电性、宽电化学窗口、低蒸气压和高化学稳

定性等优点, 特别适用于作为电化学气体传感器的电解质材料。近年来, 已有关于 SO₂^[10]、O₂^[11] 和 NH₃^[12] 在离子液体中的电化学行为及气体传感器研究的相关报道。虽然, 胍在水溶液及有机溶剂中的电化学行为已被广泛研究^[13-15], 但其在离子液体中的电化学行为还未见报道。该文将研究胍在离子液体 1-丁基-3 甲基咪唑六氟磷酸 (BmimPF₆) 中的电化学行为, 并在此基础上开发基于离子液体的胍蒸气传感器。

1 实验部分

1.1 实验试剂

水合胍(85%)及其它药品均购自国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯。离子液体

基金项目: 国家自然科学基金(20503016); 上海市科委启明星基金(07QA14044); 上海市科学技术委员会自然科学基金(04ZR14014); 上海市教育委员会科学项目(04DC29); 湖南大学生物传感与计量学国家重点实验室开放基金。

* 通讯联系人, Tel: 021-64322930, E-mail: wangrong@shnu.edu.cn

BmimPF₆ 按文献[16]所述方法合成,并通过质谱和红外验证其纯度。

不同浓度的胍蒸气配制:将高纯 N₂ 通入装有 100 mL 85% 水合胍的洗气瓶中,获得饱和胍蒸气,并与另一路高纯 N₂ 混合,利用质量流量控制器与单向阀(北京七星华创电子有限公司)控制总流速为 1 L/min,调节两路气体的流速比获得所需浓度的胍蒸气。胍蒸气浓度通过紫外吸收法进行标定。

1.2 胍蒸气浓度的标定

水合胍母液的配置:移取 2.5 mL 水合胍(85%)于 25 mL 容量瓶内,用水稀释至刻度,此水合胍母液浓度为 1.7 mol/L;水合胍使用液:移取 25 μL 胍母液于 250 mL 容量瓶,用水稀释至刻度,此溶液浓度为 0.17 mmol/L;显色剂对二甲氨基苯甲醛溶液:称取 4 g 对二甲氨基苯甲醛,溶于 200 mL 乙醇及 20 mL 盐酸中。

胍溶液标准曲线的绘制:取水合胍使用液 0~800 μL 于 10 mL 比色管,在比色管中加入 5 mL 对二甲氨基苯甲醛显色剂,用 0.1 mol/L H₂SO₄ 定容,配成浓度为 0~13.6 μmol/L 胍测试液,使用

紫外可见分光光度计(UV 755B,上海精密科学仪器有限公司),在 449 nm 波长处测其吸光度,获得标准曲线为 $A = 0.0458 \times c$ (μmol/L)(相关系数 0.9995)。

胍蒸气浓度的标定:在 0 °C 冰浴下,在洗气瓶中加入 50 mL 0.1 mol/L H₂SO₄ 作为吸收液,通入不同浓度比例的水合胍蒸气 5 min。取其中 1 mL 加入 10 mL 比色管,加 5 mL 对二甲氨基苯甲醛显色剂,用 0.1 mol/L H₂SO₄ 定容,测其吸光度。并利用 $C = 48.9 \times A$ (μmol/L) 获得该胍蒸气的浓度。

1.3 胍蒸气传感器的制作及测试

胍蒸气传感器采用两电极体系,即以微金丝($\phi = 50 \mu\text{m}$)为工作电极,铂盘为参比电极及对电极,并将其封装于环氧树脂中,在表面覆盖上浸润有离子液体 BmimPF₆ 的多孔聚乙烯薄膜,即制成胍蒸气传感器。传感器的性能测定在电化学工作站(CHI 910,上海辰华仪器公司)上进行。在电化学测试前,由传感器进气口通入一定浓度胍蒸气 5 min 以上,以保证 BmimPF₆ 液膜中的胍浓度与气相中的胍浓度达到平衡。图 1 为传感器及测试系统示意图。

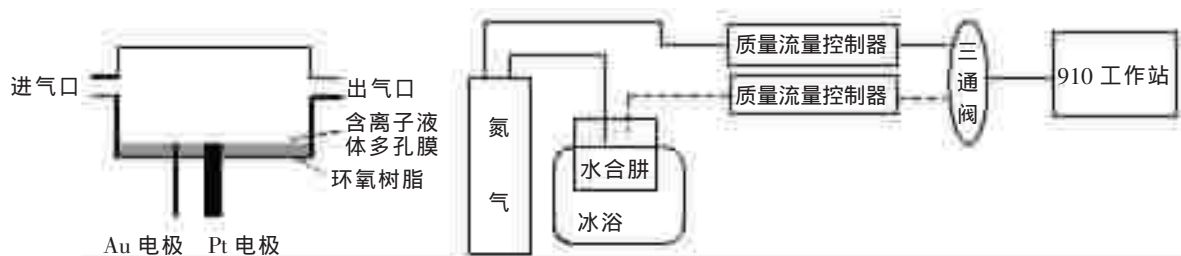


图 1 基于离子液体的气体传感器结构及测试系统示意图

Fig.1 Diagram of gas sensor and the experiment

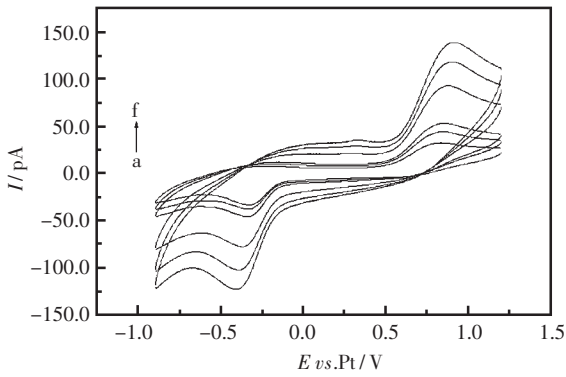
2 结果与讨论

2.1 胍蒸气在离子液体中的电化学反应

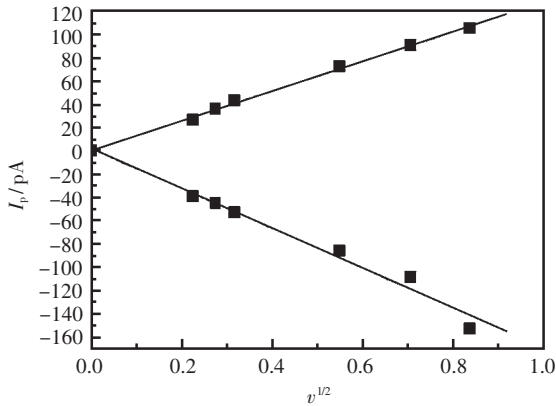
胍在水溶液中的电化学氧化被认为是一个 4 电子的不可逆反应过程生成 N₂, 即: $\text{N}_2\text{H}_4 + \text{OH}^- \rightarrow \text{N}_2 + 4\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^-$, 而在有机溶剂如 DMSO 中胍被氧化时则是生成 N₂H₂ 即: $3\text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow \text{HN}=\text{NH} + 2\text{N}_2\text{H}_5^+ + 2\text{e}^-$ [14]。无论是在水溶液中还是有机溶液中电极材料均对胍的氧化电位具有显著的影响。

图 2 为 BmimPF₆ 液膜中胍在 Au 电极上的循环伏安图。由图中可以看出在 0.94 V 和 -0.45 V

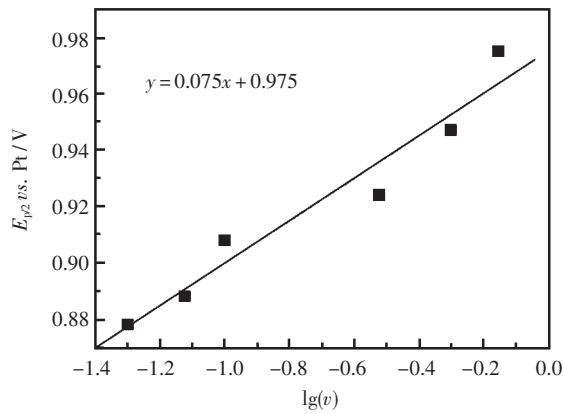
处有一对水合胍的氧化还原峰(图 2a)。氧化还原的峰电流与扫描速度的平方根呈良好的线性关系,相关系数分别为 0.999 与 0.990(图 2b),说明电极反应受胍在 BmimPF₆ 液膜中的扩散所控制。氧化还原峰电位差近 1.4 V,说明该电化学反应的可逆性差。根据峰电位与扫描速度对数的关系作图可以得到其斜率为 75 mV(图 2c),由此说明,该电极反应的速度决定步骤的 $\alpha_a n_a$ 为 0.40 左右。由于氧化还原峰电流的比值接近于 1,因此可以假设 $\alpha_a = 0.5$, 则反应电子数为 0.8 个电子。这可能是由于在离子液体中胍的氧化过程类似



(a)



(b)



(c)

图 2 (a) 不同扫描速度下离子液体传感器对 $1.1 \mu\text{mol/L}$ 胍蒸气的电化学循环伏安图; (b) 氧化峰、还原峰电流与扫速的平方根关系图; (c) 氧化峰的半峰电位与扫速的对数的关系图

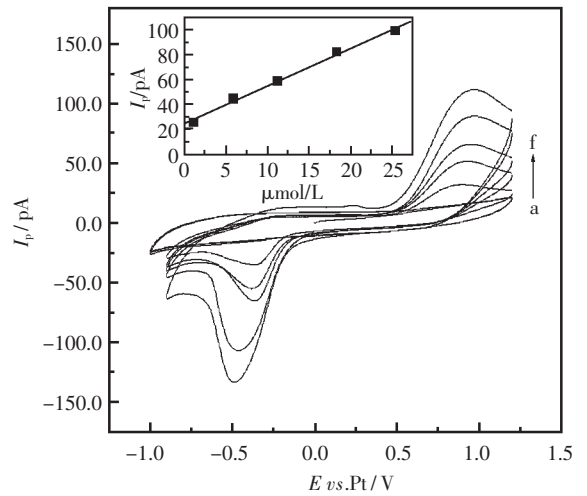
Fig.2 (a) The cyclic voltammetric responses of $1.1 \mu\text{mol/L}$ hydrazine at different scan rates (0.05, 0.075, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 V/s); (b) Relationship of current and square of scan rate; (c) Plot of $E_{p/2}$ against $\lg(v)$

于其在有机溶剂中的氧化过程,即部分的胍被用于接收反应产生的质子,而变得稳定。此外,氧化

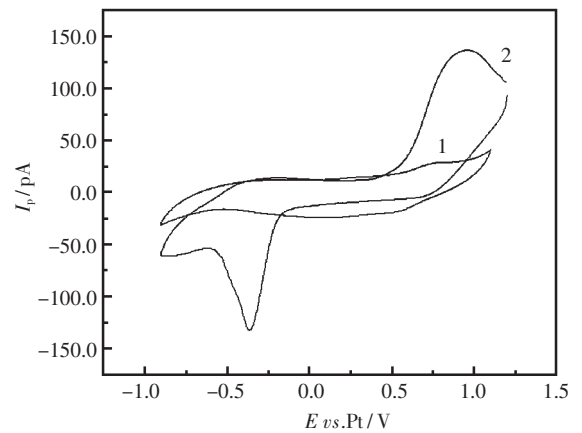
峰电流与还原峰电流之比接近 1,也说明了经过一个周期的循环伏安扫描,胍仍可以被回复到初始状态,不会有氧化的产物滞留于传感器中,从而保障了传感器的重现性。

2.2 传感器对不同水合胍浓度的响应曲线

图 3 为 BmimPF_6 气体传感器对不同浓度胍蒸气响应的循环伏安曲线。在胍蒸气浓度为 $1.1 \sim 25.4 \mu\text{mol/L}$ 范围内,传感器的氧化峰电流与紫外光谱法测得的胍蒸气浓度呈良好的线性,其相关系数为 $r=0.997$ 。该传感器在使用两个月后依然



(a)



(b)

图 3 (a) 基于 BmimPF_6 离子液体的气体传感器对不同浓度的胍蒸气响应曲线图及峰电流对吸光度作图(a 为氮气基底, b-f 依次为浓度为 $1.1 \sim 18.3 \mu\text{mol/L}$ 的胍蒸气); (b) 氨蒸气(1)和水合胍蒸气(2)在传感器上的循环伏安响应图

Fig.3 (a) The cyclic voltammetric responses to different concentration of hydrazine(0, 1.1, 5.9, 11.2, 18.3, 25.4 $\mu\text{mol/L}$); (b) The cyclic voltammetric responses obtained at gas sensor to ammonia (1) and hydrazine (2). scan rate: 0.1 V/s

具有较好的重现性。

实验中考察了传感器的抗干扰性能,即通入由 25%氨水溶液产生的饱和蒸气时,传感器没有测到明显的氧化还原电流(图 3b 曲线 1),说明氨蒸气不会对测定产生干扰,这可能是由于氨在离子液体中的氧化过电位较高。Marisa C. Buzzeo 等在研究 NH_3 在离子液体[EMIM][N(Tf)₂]中的电化学行为时,曾发现其在 Pt 电极上的氧化峰电位为 1.6 V 左右^[12]。

3 结论

研究了水合胍在 BmimPF₆ 中的电化学氧化还原过程,观察到在 0.94 V 和 -0.45 V 电位处有一对氧化还原峰,该氧化还原峰电流受胍在 BmimPF₆ 中的扩散所控制,计算得反应的表现电子数为 0.8。制作的微型气体传感器对水合胍蒸气具有良好的响应,线性范围为 1.1~25.4 $\mu\text{mol/L}$,且不受氨蒸气的干扰。

参考文献

- [1] 华蕾,董淑英. 水中水合胍测定方法改进——对二甲氨基苯甲醛的分光光度法[J]. 卫生研究, 1993, 22(2): 90~93.
- [2] Chen X T, Xiang Y, Li Z F, et al. Sensitive and selective fluorescence determination of trace hydrazine in aqueous solution utilizing 5-chlorosalicylaldehyde [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 625(1): 41~46.
- [3] Maleki N, Safavi A, Farjami E, et al. Palladium nanoparticle decorated carbon ionic liquid electrode for highly efficient electrocatalytic oxidation and determination of hydrazine [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(2): 151~155.
- [4] Majidi M R, Jouyban A, Zeynali A K. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode [J]. *Electrochimica Acta*, 2007, 52(21): 6 248~6 253.
- [5] Seifart H I, Gent W L, Parkin D P, et al. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995, 674(2): 269~275.
- [6] Sun M J, Bai L, Liu D Q. A generic approach for the determination of trace hydrazine in drug substances using in situ derivatization-headspace GC-MS [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 49(2): 529~533.
- [7] Safavi A, Baezzat M R. Flow injection chemiluminescence determination of hydrazine [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 358(2): 121~125.
- [8] Quintino M S M, Araki K, Toma H E, et al. New hydrazine sensors based on electropolymerized meso-tetra(4-sulphonatophenyl)porphyrinate manganese (III)/silver nanomaterial [J]. *Talanta*, 2008, 74(4): 730~735.
- [9] Abbaspour A, Shamsipur M, Siroueinjad A, et al. Renewable-surface sol-gel derived carbon ceramic-modified electrode fabricated by a newly synthesized polypyridil and phosphine Ru (II) complex and its application as an amperometric sensor for hydrazine [J]. *Electrochimica Acta*, 2009, 54(10): 2 916~2 923.
- [10] 蔡琪, 鲜跃仲, 李辉, 等. 采用离子液体的二氧化硫电化学传感器的研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版). 2001, 3: 57~60.
- [11] Wang R, Okima T, Kitamura F, et al. A Novel Amperometric O₂ Gas Sensor Based on Supported Room Temperature Ionic Liquid Porous Polyethylene Membrane-Coated Electrodes[J]. *Electroanalysis*, 2004, 16(1-2): 66~72.
- [12] Buzzeo M C, Giovanelli D, Lawrence N S, et al. Elucidation of the Electrochemical Oxidation Pathway of Ammonia in Dimethylformamide and the Room Temperature Ionic Liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide [J]. *Electroanalysis*, 2004, 16(11): 888~896.
- [13] Asazawa K, Yamada K, Tanaka H, et al. Electrochemical oxidation of hydrazine and its derivatives on the surface of metal electrodes in alkaline media [J]. *Journal of Power Sources*, 2009, 191(2): 362~365.
- [14] Cao X Q, Wang B C, Su Q. Anodic oxidation of hydrazine on glassy carbon electrodes in acetonitrile [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1993, 361(1-2): 211~214.
- [15] Michlmayr M, Sawyer D T. Electrochemical oxidation of hydrazine and of the dimethylhydrazines in dimethylsulfoxide at a platinum electrode [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1969, 23(3): 375~385.
- [16] Lu X B, Hu J Q, Yao X, et al. Composite System Based on Chitosan and Room Temperature Ionic Liquid: Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Hemoglobin [J]. *Biomacromolecules*, 2006, (7):975~980.

以丙二酰肼席夫碱为中性载体的钴离子选择性电极的研究

刘新露^{1,2}, 袁若^{1*}, 柴雅琴¹, 马钰华¹

(1. 西南大学化学化工学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715)

(2. 四川理工学院化学系, 四川自贡 643000)

摘要: 以双水杨醛缩丙二酰肼为中性载体制备了PVC膜Co²⁺离子选择性电极。该电极对Co²⁺呈现出良好的选择性和近Nernst电位响应性能。电极斜率为31.1 mV/dec, 线性范围为 $1.0 \times 10^{-1} \sim 3.2 \times 10^{-5}$ mol/L, 检测下限 1.0×10^{-5} mol/L。采用交流阻抗技术研究了电极响应机理, 并将电极作为指示电极初步应用于EDTA的电位滴定及Co²⁺的回收率实验, 结果令人满意。

关键词: 双水杨醛缩丙二酰肼; PVC膜; 钴离子选择性电极

Study on a new cobalt(II)-selective electrode based a Schiff base of malonic dihydrazide as a neutral carrier

Liu Xin-lu^{1,2}, Yuan Ruo^{1*}, Chai Ya-qin¹, Ma Yu-hua¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. College of Chemistry and Pharmaceutical, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: A PVC membrane electrode for cobalt(II) ions based on a Schiff base of bis(salicylaldehyde)-malonic dihydrazide as a neutral carrier was investigated. The prepared electrode displays a good selectivity toward cobalt(II) and exhibits a near Nernstian response for cobalt(II) over a linear range of $3.2 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$ mol/L with a detection limit of 1.0×10^{-5} mol/L and a slope of 31.1 mV/dec. The response mechanism was discussed in view of the A.C. impedance technique. The electrode was used as an indicator electrode in potentiometric titration of cobalt(II) with EDTA and applied to the recovery of determination with satisfactory results.

Key words: bis(salicylaldehyde)-malonic dihydrazide; PVC membrane; cobalt(II)-selective electrode

0 引言

钴是一种重要的金属,在合金、电镀、玻璃、染色等方面都有广泛应用;钴还是维生素B₁₂的组成部分,缺钴会引起贫血,在人体中必不可少。然而,过量的钴会对动物的蛋白质、氨基酸、辅酶和脂蛋白的合成产生有害的影响,引起钴中毒。

因此在药物、临床及环境分析中,快速、准确、有效地检测出各种样本中钴离子的含量对于生态环境的监测和保护以及人类的健康有着重要的意义。检测钴的方法有很多,例如分光光度法^[1],化学发光法^[2],原子吸收光谱法(AAS)^[3],高效液相色谱法(HPLC)^[4],电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)等^[5],但这些方法由于其昂贵的仪

器或复杂的样品预处理及操作流程受到了限制。离子选择性电极具有制作简单、成本低廉、操作简便等优点,可直接应用于复杂样品中钴含量的检测。近年来国内外报道的钴离子选择性电极较少^[6~10],该文研究了原料易得、易于合成的双水杨醛缩丙二酰肼席夫碱,并以其为中性载体制备了聚氯乙烯(PVC)溶剂聚合膜电极,研究结果表明该电极对钴离子具有良好的选择性和电极电位响应性能。

1 实验部分

MP230 酸度计(瑞士 Mettler-Toledo 公司); PHS-3C 型离子酸度计(上海大中分析仪器厂); IM6e 型交流阻抗测试系统(德国 Zahner Elektrik 公司)。增塑剂邻硝基苯基辛基醚(*o*-NPOE)参照文献[11]制备。载体双水杨醛缩丙二酰肼席夫碱参照文献[12]合成(图1)。其余试剂均为市售分析纯,水为二次去离子水经高锰酸钾处理重

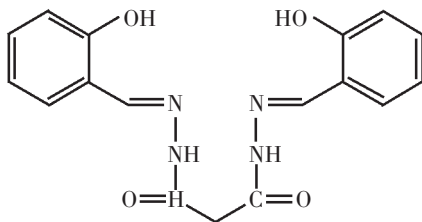


图1 载体的结构式

Fig.1 Structural formula of the ionophore

蒸馏。

按照 Thomas 和 Moody 创立的常规方法^[13]制备 PVC 敏感膜及安装电极,其电极电位由下列电池测定:Ag | AgCl KNO₃ (0.1 mol/L) || PVC 膜待测液 || KCl (饱和) | Hg₂Cl₂ | Hg

2 结果与讨论

2.1 电极的电位响应特性

离子选择性电极的电位响应性能很大程度上取决于增塑剂的性质^[14~15]以及载体的含量。在 pH=3.5 的硝酸缓冲溶液中,测试了分别以邻硝基苯基辛基醚(*o*-NPOE)、邻苯二甲酸二正辛酯(DOP)和癸二酸二正辛酯(DOS)等不同增塑剂,载体含量不同的电极对 Co²⁺ 的电位响应性能(表1)。从表1可以看出,以邻硝基苯基辛基醚为增塑剂,膜相中载体的质量分数为 3.4% 时对 Co²⁺ 具有最佳电位响应性能,可得 Co²⁺ 电极的最佳膜组成为: $w(\text{载体}) : w(\text{PVC}) : w(o\text{-NPOE}) = 3.4\% : 32.3\% : 64.3\%$ 。该电极对 Co²⁺ 在 $1.0 \times 10^{-1} \sim 3.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的浓度范围内呈能斯特响应,检测下限为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,斜率为 31.1 mV/dec,响应时间 $t_{95}\%$ 为 10 s。该电极在 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 Co(NO₃)₂ 溶液中连续测试 10 h, 电极电位的标准偏差为 1.2 mV ($n=40$); 在 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 Co(NO₃)₂ 溶液中交替测试 5 h, 电极电位读数的标准偏差为 1.0 mV ($n=10$)。电极在使用一个月以后电位响应性能未见下降。

表1 膜组成不同的电极电位响应性能

Tab.1 Response characteristics of electrodes employing various membrane ingredients

NO.	Membrane composition($w, \%$)			Slope(mV/dec)	Linear range(mol/L)
	Carrier	PVC	Plasticizer		
1	3.4	32.2	64.4(DOS)	9.8	$7.3 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-1}$
2	3.4	32.3	64.3(DOP)	12.9	$2.6 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-1}$
4	3.4	32.3	64.3(<i>o</i> -NPOE)	31.1	$3.2 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$
5	2.7	32.4	64.8(<i>o</i> -NPOE)	28.6	$4.8 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$
6	4.0	32.0	64.0(<i>o</i> -NPOE)	28.2	$5.2 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$
7	4.6	31.8	63.6(<i>o</i> -NPOE)	28.0	$5.4 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$
8	5.0	31.6	63.4(<i>o</i> -NPOE)	27.8	$6.5 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$

2.2 电极的 pH 值应用范围

电极的电位响应性能与溶液的 pH 值密切相关。以硝酸为缓冲溶液配制了浓度分别为

1.0×10^{-3} 和 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 不同 pH 值的一系列 Co²⁺ 溶液,测试了电极在不同 pH 值条件下对 Co²⁺ 的电极电位(图2)。从图2可以看出,电极电

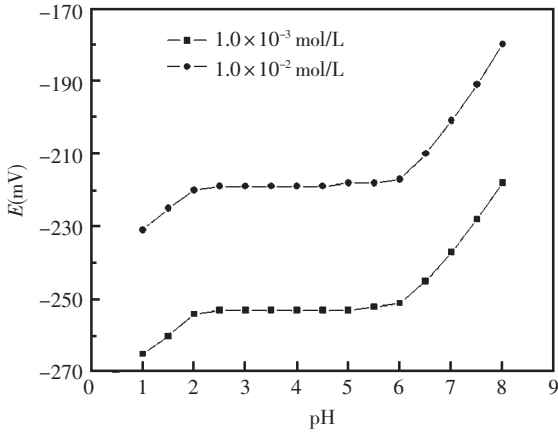


图2 溶液 pH 值对电极电位响应的影响

Fig.2 Effect of pH of the test solution on the response of the proposed electrode

位在 pH 值 2~6 之间基本保持恒定, 这就是该电极的 pH 值应用范围。当 $\text{pH} > 6$ 时, 随着溶液中 OH^- 的浓度增加, Co^{2+} 和 OH^- 生成氢氧化物, 溶液中的 Co^{2+} 数减少; 当 $\text{pH} < 2$ 时, 随着 H^+ 浓度的增加, 载体发生质子化作用, 因而电极电位产生较大变化^[16]。

2.3 电极的选择性

电极的选择性是离子选择性电极的重要参数, 选择性用选择性系数 K_{ij}^{pot} 来描述, 它表示被测离子 i 与共存干扰离子 j 的选择性系数。选择性系数值越小, 则电极对 i 离子的选择性越好, 即 j 离子的干扰越小。对于该 PVC 膜电极, 采用分别溶液法^[17]测定了常见阳离子对 Co^{2+} 的选择性系数 $\lg K_{\text{Co}^{2+}, j}^{\text{pot}}$, 其结果见表 2。由表 2 可得, 以水杨醛缩水杨酰肼席夫碱载体的膜电极对 Co^{2+} 有较高的选择性。

2.4 膜交流阻抗行为研究

在 20°C , 频率范围为 $10^6 \sim 10^{-2}$ Hz, 激励电压为 25.0 mV 条件下, 测试了以双水杨醛缩丙二酰肼为中性载体的 PVC 膜在含不同浓度的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中 ($\text{pH} 3.5$) 的交流阻抗行为 (图 3)。图 3 中高频区呈现规则的膜本体及表面阻抗半圆, 低频区可观察到 Warburg 阻抗。当溶液中 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 浓度分别为 1.0×10^{-4} 和 1.0×10^{-2} mol/L 时, 所对应的膜本体阻抗分别为 1.95×10^2 和 1.85×10^2 k Ω , 膜本体阻抗随着 Co^{2+} 浓度的增加呈下降趋势。以上实验现象表明, Co^{2+} 离子参与了传输且载体携带 Co^{2+} 通过膜相的传输过程受扩散控制。

表 2 以水杨醛缩水杨酰肼为载体的电极选择性系数

Tab.2 Selectivity coefficient of the electrode based on salicylaldehyde salicyloyl hydrazone

Interfering ion	$\lg K_{\text{Co}^{2+}, j}^{\text{pot}}$
Mg^{2+}	-1.74
Al^{3+}	-1.53
Zn^{2+}	-2.06
Cu^{2+}	-1.51
Pb^{2+}	-1.96
Mn^{2+}	-1.64
Sr^{2+}	-1.89
Ca^{2+}	-1.80
Ba^{2+}	-1.90
Cr^{3+}	-1.91
La^{3+}	-1.53
NH_4^+	-2.85
Li^+	-2.80
K^+	-3.57
Cd^{2+}	-2.44
Na^+	-3.48

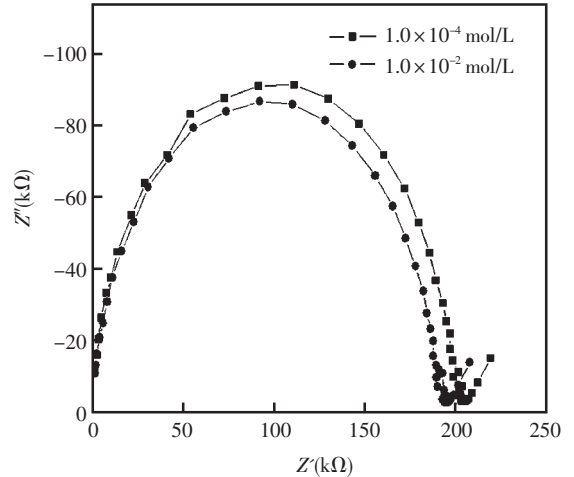


图3 PVC膜在不同浓度的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中的交流阻抗谱图

Fig.3 Impedance plots of PVC membrane in the solutions containing different concentration of $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

2.5 电极的初步应用

2.5.1 电位滴定

在硝酸盐缓冲溶液中 ($\text{pH} 3.5$), 以 1.0×10^{-2} mol/L 的 EDTA 标准溶液作为滴定剂, 以双水杨醛缩丙二酰肼为载体的 PVC 膜电极作为指示电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 滴定 25.00 mL 浓

度为 1.0×10^{-3} mol/L 的 Co^{2+} 溶液。其滴定曲线如图 4 所示,由图 4 可得该电极能够比较准确的测定溶液中的钴离子的含量。

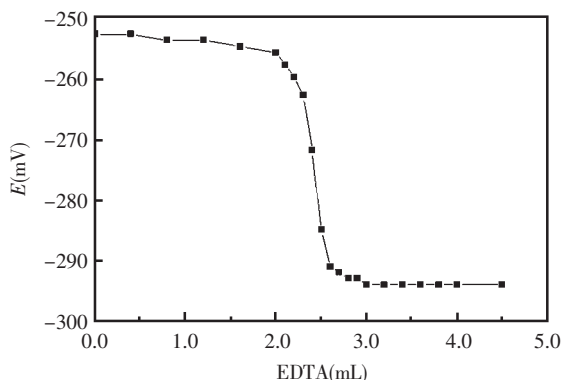


图 4 电位滴定曲线

Fig.4 Potentiometric titration curve

2.7.2 回收率实验

以双水杨醛缩丙二酰肼为载体的 PVC 膜电极为指示电极,饱和甘汞电极为参比电极,以 1.0×10^{-3} mol/L 的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 (pH3.5) 为测试底物,进行回收率实验,其回收率测定结果在 98.6% ~ 103.0% 之间 (表 3)。

表 3 Co^{2+} 的回收率测定结果

Tab.3 Recovery of determination of cobalt (II)

No.	Added cobalt content (mmol)	Found cobalt content (mmol)	Recovery (%)
1	1.50	2.48	98.7
2	2.00	2.98	99.0
3	2.50	3.47	98.8
4	3.00	4.03	101.0
5	3.50	4.45	98.6
6	4.00	5.12	103.0

参考文献

- [1] Linnik R P, Zaporozhets O A. Solid-phase reagent for molecular spectroscopic determination of heavy metal speciation in natural water [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375 (8): 1 083~1 088.
- [2] Zhang L, Zhou J M, Hao Y H, et al. Determination of Co^{2+} based on the cobalt (II)-catalyzed electrochemiluminescence of luminol in acidic solution. *Electrochim Acta* [J]. 2005, 50 (16-17): 3 414~3 419.
- [3] Belarra M A, Crespo C, Martínez-Garbayo M P, et al. Direct determination of cobalt and zinc in samples of different volatility by means of solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry [J]. *Spectrochim Acta B*, 2003, 58 (10): 1 847~1 858.
- [4] 吴宪龙,冯士宏,所小沛. $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -四(5-磺基噻吩)卟啉柱前衍生反相液相色谱法分离测定铜、镉和钴[J]. *冶金分析*, 2003, 23 (1): 34~36.
- [5] 吕水源,王凯云,刘伟,等. ICP-AES 同时测定混合矿物素中的磷、钙、铁、铜、锌、锰、镁、钴[J]. *光谱实验室*, 2003, 20 (2): 266~268.
- [6] Gupta V K, Singh A K, Mehtab S, et al. A cobalt (II)-selective PVC membrane based on a Schiff base complex of N,N-bis(salicylidene)-3,4-diaminotoluene [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 566 (1): 5~10.
- [7] Singh A K, Mehtab S, Saxena P. A novel potentiometric membrane sensor for determination of Co^{2+} based on 5-amino-3-methylisothiazole [J]. *Sens Actu B*, 2007, 120 (2): 455~461.
- [8] Singh A K, Singh R P, Saxena P. Cobalt (II)-selective electrode based on a newly synthesized macrocyclic compound [J]. *Sens Actu B*, 2006, 114 (2): 578~583.
- [9] Kumar P, Shima Y-B. A novel cobalt (II)-selective potentiometric sensor based on p-(4-n-butylphenylazo) calix[4]arene [J]. *Talanta*, 2009, 77 (3): 1 057~1 062.
- [10] Gupta V K, Jain A K, Khayab M Al, et al. Electroanalytical studies on cobalt (II) selective potentiometric sensor based on bridge modified calixarene in poly (vinyl chloride) [J]. *Electrochim Acta*, 2008, 53 (16): 5 409~5 414.
- [11] Horning E C. *Org Synth Coll Vol. III* [M]. New York: John Wiley, 1955. 140~141.
- [12] 屈永年,李贵华,周明华. 丙二酰肼席夫碱及其金属配合物合成与表征 [J]. *化学与生物工程*, 2004, 2, 54~56.
- [13] Moody G J, Oke R B, Thomas J D R. A calcium sensitive electrode based on a liquid ion exchanger in a polyvinylchloride matrix [J]. *Analyst*, 1970, 95 (1136): 910~918.
- [14] Koryta J. Theory and applications of ion-selective electrodes [J]. *Anal Chim Acta*, 1990, 233: 1~30.
- [15] Shamsipur M, Rouhani S, Mohajeri A, et al. A bromide ion-selective polymeric membrane electrode based on a benzo-derivative xanthenium bromide salt [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 418 (2): 197~203.
- [16] Mashhadizadeh M H, Mostafav A, Allah-Abadi H, et al. New Schiff base modified carbon paste and coated wire PVC membrane electrode for silver ion [J]. *Sens Actu B*, 2006, 113 (2): 930~936.
- [17] Guilbault G G, Durst R A, Thomas J D R. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes [J]. *Pure Appl Chem*, 1976, 48 (1): 127~132.

SAW-SXFA 气体传感器敏感膜性质的研究

潘 勇*, 黄启斌, 王艳武, 曹丙庆
(防化研究院, 北京 102205)

摘要: 以 SXFA 聚合物为敏感膜材料制备了能够检测有机磷化合物的声表面波传感器, 介绍了敏感膜材料 SXFA 的镀膜方法, 以理论计算和原子力显微镜对敏感膜进行了证实, 研究了 SAW-SXFA 传感器在不同膜厚度下的频率变化、不同膜厚度的传感器对检测有机磷化合物的响应结果, 并对检测机理进行了初步讨论。

关键词: SAW; SXFA; 传感器; 敏感膜; 性质

Study of sensitive coating character of SAW-SXFA gas sensor

Pan Yong*, Huang Qi-bin, Wang Yan-wu, Cao Bing-qing
(Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China)

Abstract: Surface acoustic wave (SAW) sensor which could be used to detect organophosphorus compounds was prepared with fluoroalcoholpolysiloxane (SXFA) sensitive material. The preparing method of SXFA coating was introduced, the sensitive coating was proved with theory calculation and atom force microscope technology. The frequency drifts of different thickness coating sensor, the response to organophosphorus compounds detected by different thickness coating sensor were studied, and the detection mechanism was discussed.

Key words: SAW; SXFA; sensors; sensitive coating; character

0 引言

声表面波 (Surface Acoustic Wave, SAW) 传感技术经过近三十年的发展^[1], 由于其灵敏度高、体积小、便于携带、易集成化等特点受到广泛关注, 而敏感膜材料的选择仍是人们研究的重点。在已经研究的各种结构、不同性质的膜材料当中, 聚合物膜材料因其具有性能稳定、结构规律性强、选择和设计容易、镀膜方法简单等优点成为研究最多、应用最广的一种敏感膜材料^[2-3]。迄今为止, 已经合成的氢键酸性聚合物有: FPOL^[4]、P4V^[5]、SXFA^[6]、BSP3、BSP6^[7]等。这几种聚合物各具特色, 但就对有机磷化合物吸附的选择性和灵敏度而言, 六氟-2-羟基异丙基聚硅氧烷 (SXFA) 是最强的^[8]。它以六氟异丙醇为特征官能

团, 线性聚硅氧烷为骨架的聚合物。HFIP 中的 -OH 由于受到临位 -CF₃ 的影响使得氢键酸性增强, 能够选择性地吸附氢键碱性的气体如有机磷化合物。SXFA 的选择吸附能力曾通过线性溶解能关系^[9]的定量计算得到证实。另外, 聚硅氧烷骨架有利于降低聚合物的玻璃化转变温度 (T_g), 使 T_g 低于室温, 聚合物在常温下呈粘弹态, 增强了气体分子进入聚合物膜的渗透能力, 提高了传感器的灵敏性^[3,7]。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甲苯, 分析纯, 北京化工厂; 无水乙醇, 分析纯, 北京化工厂; DMMP, 99%, 防化研究院, GC 分析。

声表面波振荡器,双通道延迟线,中心频率 300 MHz,延迟线面积 4 mm²;频率计,Proteck C3100 及相应工作站,韩国;扫描电镜,TSM-6460 系列,美国。

1.2 实验方法

SAW 传感器延迟线表面经过 Piranha 溶液 ($V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{H}_2\text{O}_2) = 3:1$) 清洗后,以高纯水多次清洗后氮气吹干。在 SAW 延迟线上以溶剂挥发法连续镀以 SXFA/甲苯溶液,分别记录镀膜前后频率的变化。以所制备不同膜厚度的 SAW-SXFA 传感器分别对 200 mg/m³ 的 DMMP 进行检测,记录检测频率的变化。

2 结果与讨论

2.1 聚合物溶剂的选择

溶剂挥发法镀膜的关键步骤之一是对溶剂的选择,一般要选择能够溶解聚合物而且挥发速率中等的溶剂。这是因为,如果溶剂挥发较慢,镀膜时间延长会导致溶液扩散到非镀膜区域,造成传感器停振;如果溶剂挥发较快,溶液平铺能力减弱,造成镀膜不均匀。

SXFA 主链是极性较弱的聚硅氧烷,因此只能溶解到非极性或弱极性的溶剂如乙醚、苯、甲苯、四氢呋喃等,难溶于极性强的溶剂如甲醇、乙醇等。在实验中选择使用挥发性中等的溶剂甲苯来配制 SXFA 溶剂。

2.2 膜厚的计算

2.2.1 理论计算

敏感膜厚度常用 Sauerbrey 公式进行估算:

$$\Delta f_s = -1.26 \times 10^6 f_0^2 h \rho \quad (1)$$

其中, $\Delta f_s(\text{Hz})$ 为镀膜前后的频率差, $f_0(\text{MHz})$ 为振荡器中心频率, $h(\text{cm})$ 是 SXFA 膜厚度, ρ 为 SXFA 的密度。SAW 传感器中心频率为 300 MHz, SXFA 的密度 ρ 为 1.48 g/cm³,代入(1)得:

$$\Delta f_s = -1.68 \times 10^{11} h \quad (2)$$

2.2.2 实验验证

为了验证 Sauerbrey 公式频移与厚度的关系,这里采用层层镀膜的方法对膜厚度与频率变化的关系加以验证;如图 1,从图上可以看出,随着镀膜次数的增加,传感器频率变化的绝对值也呈线性增加,拟合出的线性方程为:

$$\Delta f_s(\text{kHz}) = -4.49 - 4.42 N \quad (3)$$

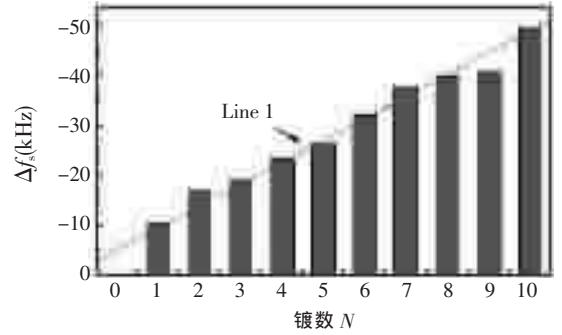


图 1 传感器频率的变化与镀膜次数的关系

Fig.1 The relationship between thickness of polymer and response signal

N 为镀膜次数,相关系数 $r = 0.988$ 。虽然拟合的直线不过原点,但与原点非常接近。这一结论验证了 Sauerbrey 公式可以用来计算敏感膜的厚度。

2.2.3 膜厚对传感器噪音的影响

传感器噪音的研究是为了确定传感器的检测下限。一定时间内传感器噪音 (Δf_N) 的计算公式如 4:

$$\Delta f_N = \pm (f_{\max} - f_{\min}) / 2 \quad (4)$$

其中: f_{\max} 为传感器最大频率, f_{\min} 为传感器最小频率。

表 1 镀膜次数与传感器频移变化的关系

Tab.1 The response signal of different thickness coating of SAW sensor

镀膜次数	传感器频率变化 Δf_s (kHz)	传感器噪音 Δf_N (kHz)
0	0.0	$\pm 0.024 2$
1	10.5	$\pm 0.045 7$
2	17.0	$\pm 0.088 0$
3	19.4	$\pm 0.077 9$
4	23.3	$\pm 0.027 7$
5	26.6	$\pm 0.034 3$
6	32.1	$\pm 0.055 2$
7	38.1	$\pm 0.061 5$
8	39.8	$\pm 0.035 6$
9	41.1	$\pm 0.076 1$
10	49.8	$\pm 0.098 3$

从数据分析上看,传感器镀膜前后的噪音与传感器频率相比非常小。表 1 中给出了多次镀膜后的噪音,发现噪音变化范围为 25 Hz~100 Hz 之间,大于镀膜前的噪音,这是因为镀膜后延迟

线表面的聚合物为疏松多孔状,平整度小于镀膜前的石英表面而造成的。

2.2.4 不同膜厚的 SAW-SXFA 传感器对 DMMP 的检测

以不同膜厚的 SAW-SXFA 传感器对 DMMP 进行检测,记录每次镀膜前后及检测 DMMP 的频率变化,并根据验公式(2)计算理论膜厚,结果如表 2。

表 2 膜厚对 DMMP 响应频移的影响

Tab.2 The response to DMMP of different thickness coating

镀膜次数 N	镀膜前后 传感器频 移(kHz)	理论膜厚 $h(\text{nm})$	传感器对 DMMP 的 响应频移(kHz)
0	0.0	0.0	0.0
1	76.4	4.5	5.8
2	77.1	4.6	6.8
3	82.6	4.9	8.6
4	87.7	5.2	12.3

从表 2 中,可以看出,传感器在未镀膜时,SAW 延迟线与 DMMP 气体间不产生相互作用,因此无响应信号;当 SXFA 敏感膜材料制备在延迟线上后,由于 SXFA 与 DMMP 间的相互作用,

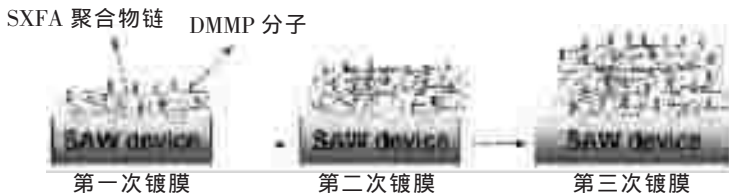


图 3 SXFA 聚合物膜对 DMMP 的多层立体吸附示意图

Fig.3 Polymer multilayer sorption to vapor molecules

吸附,区别与单分子层的二维表面吸附,也区别与多层吸附。这是因为无定性聚合物在传感器表面形态不规则,而且具有多孔结构,比表面积较大。气体不仅与聚合物表面的官能团作用,而且还可以渗入到聚合物内部,与内部空间的官能团作用,表现为立体吸附。

这里所测的 DMMP 浓度相对较高,聚合物表面的氢键位点只能满足少量的 DMMP 的吸附,而大量的 DMMP 都要渗透到聚合物内部,与膜内部的氢键位点作用,形成立体吸附。因此,敏感膜的厚度直接决定了吸附 DMMP 的能力。敏感膜越

使得膜表面质量发生了变化,进而产生了频率变化,而且随着敏感膜厚度的增加,检测同浓度 DMMP 的频移也随之增加,基本呈线性关系, $\Delta f = 4.912h - 34.51$,相关系数 $r = 0.987$ 。 $\Delta f(\text{kHz})$ 为传感器对待测气体的响应频移, $h(\text{nm})$ 为敏感膜的厚度,如图 2。

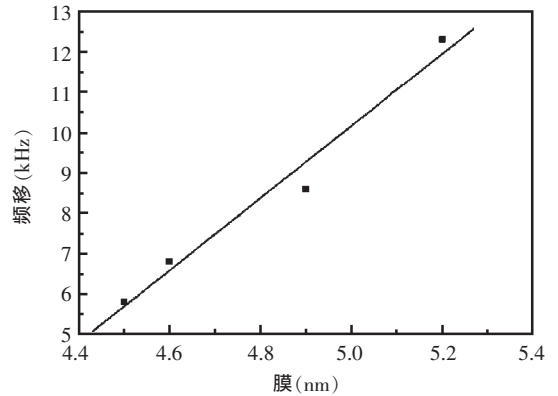


图 2 不同膜厚的传感器对 DMMP 响应的影响

Fig.2 The response shift of SAW sensor with different thickness coating

传感器的响应频移之所以随着膜厚的增加而增加,这是因为 SXFA 聚合物对 DMMP 的吸附为立体吸附(如图 3)。

无定性聚合物膜吸附气体一般是三维立体

厚,提供的氢键位点越多,吸附的 DMMP 越大,传感器质量负载越大,频移越大;反之,频移越小。

2.2.5 扫描电镜对膜表面的表征

扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM),其成像原理是电子探针(即聚焦的电子束)轰击(照射)试样表面时,大约有 90% 的能量会转化为热能,剩余的能量则产生一系列信息,如二次电子、俄歇电子、背散射电子、特征 X 射线、阴极荧光、电子-空穴对和吸收电流等,薄膜样品还有透射电子。如将电子探针对试样进行扫描,将产生的二次电子信息,用探测器逐点加

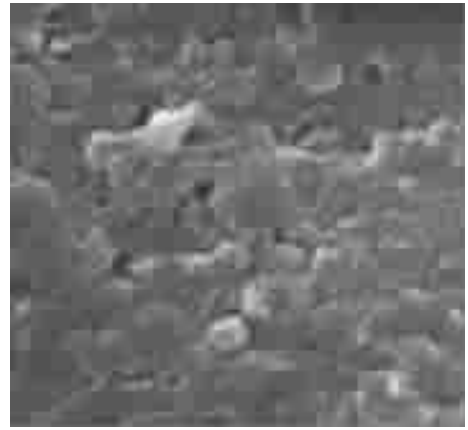
以收集,经过适当的处理和放大,并以此放大信号来调制作同步扫描的显象管的亮度,显象管的荧光屏上就可得到该信息的样品图像。SEM 要求试样为导体,不是良导体的试样事先应镀上一层

金、银或碳等导电材料。

由于延迟线石英表面和聚合物膜均为不良导体,因此先在延迟线表面镀上金膜,再在 SEM 中观察形貌,扫描结果如图 4。



(A) SAW 传感器镀膜前的延迟线表面($\times 30\ 000$)
粗糙度 $R_q = 1.374\ \text{nm}$



(B) SAW 传感器镀膜后的延迟线表面($\times 30\ 000$)
粗糙度 $R_q = 17.957\ \text{nm}$

图 4 SAW 传感器镀膜前(A)与镀膜后(B)的延迟线表面

Fig.4 Te surface of uncoated(A) and coated delayline (B)

从图 4 可以看出:未镀膜时,延迟线表面光滑整洁,粗糙度 $1.374\ \text{nm}$;镀膜后,延迟线表面因聚合物的存在,光滑度明显下降,粗糙度增加到 $17.957\ \text{nm}$ 。溶剂挥发后,聚合物变得疏松多孔,比表面积增大,有利于立体吸附。另外,还可以看到聚合物没有规则的几何外形,因此可以断定, SXFA 为非晶态聚合物。

3 结论

以溶剂挥发法的镀膜方法制备了不同膜厚度的 SAW-SXFA 传感器,发现敏感膜的厚度与镀膜前后频率的变化基本呈线性关系,验证了 Sauerbrey 经验公式在计算膜厚中的实用性;此外对有机磷化合物 DMMP 进行检测,频率检测信号也随着镀膜厚度的增加呈线性增加;通过扫描电镜观察镀膜后的形貌,发现聚合物为非静态,呈疏松多孔状,有利于立体吸附待测气体;而传感器的检测下限、选择性、响应频移与气体浓度的关系等方面的工作仍是下一步研究的重点。

参考文献

[1] Henry W, Raymond D. Surface Acoustic Wave Probe for

Chemical Analysis[J]. Anal. Chem., 1979, 51:1 458 ~ 1 475.

[2] Arthur Snow, Hank Wohltjen. Poly (ethylene maleate)-Cyclopentadiene:A Model Reactive Polymer-Vapor System for Evaluation of a SAW Microsensor [J]. Anal. Chem., 1984, 56: 1 411 ~ 1 416.

[3] Tokuhisa H, Crooks R M. Interactions between Organized, Surface-Confined Monolayers and Vapor-Phase Probe Molecules. 12. Two New Methods for Surface-Immobilization and Functionalization of Chemically Sensitive Dendrimer Surfaces [J]. Langmuir, 1997, 13:5 608 ~ 5 612.

[4] Jay W Grate, Arthur Snow. Determination of Partition Coefficients from Surface Acoustic Wave Vapor Sensor Responses and Correlation with Gas-Liquid Chromatographic Partition Coefficients[J]. Anal. Chem., 1988, 60: 869 ~ 875.

[5] Susan L Rose-Pehrsson, Jay W Grate. Detection of Hazardous Vapors Including Mixtures Using Pattern Recognition Analysis of Responses from Surface Acoustic Wave Devices[J]. Anal. Chem., 1988, 60: 2 801 ~ 2 811.

[6] David S Ballantine, Hank Wohltjen. Surface Acoustic Wave Devices for Chemical Analysis [J]. Anal. Chem., 1989, 61(11): 704A ~ 712A.

[7] Jay W Grate, Mark Klusty. Surface Acoustic Wave Vapor Sensors Based on Resonator Devices [J]. Anal Chem., 1991, 63(17): 1 719~1 727.

[8] Jay W Grate, Stephen J Martin, Richard M White. Acoustic Wave Microsensors. Part II [J]. Anal Chem., 1993, 65(22): 987A~996A.

[9] Jay W Grate, Mark Klusty, Hank Wohltien. Smart Sensor System for Trace Organophosphorus and Organosulfur Vapor Detection Employing a Temperature -Controlled Array of Surface Acoustic Wave Sensors, Automated Sample Preconcentration, and Pattern Recognition [J]. Anal. Chem., 1993, 65: 1 868~1 881.

《化学传感器》编辑部声明

凡向本刊所投稿件,视为作者将该论文的复制权、发行权、信息网络传播权、翻译权、汇编权等权利转让给本刊。本刊已加入中国学术期刊网络出版总库、万方数据数字化期刊群,被中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库收录。凡被本刊录用的稿件将同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务。稿件一经刊用,付给作者的稿酬包括印刷版、光盘版和网络版等各种使用方式著作权使用费。

基于纳米 MnO_2 的免标记型的电化学生物传感器用于腺苷的测定

李哲建, 刘志敏*

(河南工业大学化学化工学院, 河南郑州 450052)

摘要: 以纳米 MnO_2 作为适体固定的构建平台, 制备了一种用于腺苷灵敏测定的电化学交流阻抗型生物传感器。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 作为氧化还原探针监测传感器表面电子传递电阻的变化, 表面电子传递电阻的变化值与腺苷的浓度在 $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mol/L 范围内有很好的线性关系, 最低检测限为 8.0×10^{-10} mol/L。传感器显示出高的灵敏度、好的选择性和稳定性。

关键词: 纳米 MnO_2 ; 适体; 腺苷; 电化学交流阻抗; 生物传感器

Label-free detection of adenosine based on nano- MnO_2 modified electrochemical aptasensor

Li Zhe-jian, Liu Zhi-min*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: A simple and highly sensitive electrochemical impedance spectroscopy (EIS) biosensor based on nano- MnO_2 as a platform for the immobilization of the aptamer was developed for the determination of adenosine. In the measurement of adenosine, the change in interfacial electron transfer resistance (R_{ct}) of the biosensor using a redox couple of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as the probe was monitored. The change of the electron transfer resistance (ΔR_{ct}) of the biosensor was linear with the concentration of adenosine in the range from 1.0 nmol/L to 100 nmol/L, with a detection limit of 8.0×10^{-10} mol/L. The fabricated sensor was shown to exhibit high sensitivity, desirable selectivity and good stability.

Key words: nano- MnO_2 ; aptamer; adenosine; electrochemical impedance spectroscopy; biosensor

0 引言

许多疾病的诊断中, 通常采用基于抗体抗原的检测方法^[1]。但是, 由于不是所有的蛋白质都能找到与之相对应的抗体或抗原, 并且对蛋白进行标记又容易造成蛋白的失活, 所以发展高灵敏度、高选择性的蛋白质检测技术尤其重要。核酸适配体是经过一种新的体外筛选技术-SELEX (指数富集配体系统进化), 从随机单链寡聚核苷酸文库中筛选出来能够特异结合蛋白质、小分子、

无机离子等的单链寡聚核苷酸^[2]。核酸适配体的出现, 使抗原抗体的反应发生了革命性的变化, 弥补了现有抗体的不足。因为核酸适体不仅具有类似抗体对目标分子高亲和力和高特异性, 而且具有许多抗体都无法比拟的优点, 如分子量小、配体广泛、无免疫原性、体外筛选不依赖动物或细胞并且可进行多种修饰等^[3]。因此, 利用核酸适配体的高度特异性发展新型蛋白质识别技术受到了极大关注^[4]。目前已有利用荧光检测法^[5]、石英微天平法^[6]、电化学方法^[7-9]等的基于

核酸适配体的蛋白质检测技术报道,并且相关的蛋白质识别技术正在迅速地发展。

目前,纳米材料因其独特的物理和化学性质而广泛应用在生化分析和生物分离等方面。纳米 MnO_2 是一种很有吸引力的无机材料,主要用在催化和构制锂电池方面^[10]。Yao 等报道了基于纳米 MnO_2 的过氧化氢传感器^[11]。纳米 MnO_2 可用作固载生物分子的良好平台。但目前尚未见关于纳米 MnO_2 构制核酸适配体电化学传感器的报道。该文通过室温固相法制备纳米 MnO_2 ,进而构制了基于纳米 MnO_2 的免标记型的电化学核酸适配体传感器。应用此电化学适配体传感器,以电化学阻抗法对腺苷进行免标记检测,其线性范围为 $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mol/L,检测限为 8.0×10^{-10} mol/L。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

壳聚糖 (CHIT, Sigma); 乙酸锰 ($\text{Mn}(\text{Ac})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 天津光复精细化工研究所); 腺苷、尿苷、胞苷和鸟苷 (Sigma); 探针 DNA (ssDNA, 大连宝生物工程有限公司); $3'\text{-SH}-(\text{CH}_2)_3\text{-tctcttggaccc-5}'$; 腺苷适体 (aptamer, 大连宝生物工程有限公司): $5'\text{-agagaacctgggggagtattgcggaggaaggt-3}'$; DNA 序列溶液使用含 0.1 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4) 配制。其它试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

电化学实验采用 CHI650C 电化学工作站(上海辰华仪器公司)并使用三电极体系: 玻碳电极 (GCE, $\phi = 3$ mm) 及其修饰电极为工作电极,饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极,铂丝电极为对电极。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米二氧化锰的制备

参考文献[12],称取摩尔比为 3:2 的 $\text{Mn}(\text{Ac})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 KMnO_4 置于研钵中,研磨 40 min,在 80 °C 水浴中恒温数小时,产物用去离子水、无水乙醇各洗涤 3 次,105 °C 下干燥数小时,即得黑色纳米 MnO_2 。纳米 MnO_2 的粒径约为 30 nm^[12]。

1.2.2 适配体传感器的制备

玻碳电极依次用 0.3、0.1 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉在麂皮上打磨并超声清洗。5 μL 的分散液 (2.0 mL 0.4% CHIT 与 3.0 mg/mL MnO_2 混合)

滴加到干净的玻碳电极表面,冰箱中干燥 12 h,取出后用 PBS 清洗得 $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 修饰电极,紧接着 5 μL 的探针 DNA 溶液 (1.0×10^{-6} mol/L) 滴加至 $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 修饰电极的表面,放置 1 h 后用 1 mmol/L BSA 封闭,制得 ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 修饰电极,最后将探针修饰电极与 2 $\mu\text{mol/L}$ 的腺苷适体在 37 °C 杂交 1 h,即可制得 aptamer/ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 修饰电极。

1.2.3 电化学检测

以 10.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (含有 0.2 mol/L KCl) 为电解质,记录各修饰玻碳电极的电化学阻抗谱。交流阻抗记录的外加电压为 0.24 V,频率变化范围为 100 kHz ~ 0.1 Hz。通过 aptamer/ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 修饰电极与一定浓度的腺苷在 37 °C 杂交 1 h 前后电极表面电子传递电阻的变化对腺苷进行定量检测。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极的电化学特征

电化学阻抗法是在频率变化过程中测量电极表面阻抗值的变化。在 Nyquist 图中,交流阻抗图谱半圆弧的直径等于表面电子传递电阻 (R_{ct})。图 1 是在 10 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中,分别以 (a) GCE; (b) $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$; (c) ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$; (d) aptamer/ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 和 (e) 10 nmol/L 腺苷处理后的 (d) 电极为工作电极的 Nyquist 图。与裸 GCE (图 1a) 比较, $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 由于表面的 MnO_2/CHIT 膜,增强了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在电极表面的电子传递,表面电子传递电阻 (R_{ct}) 减小 (图 1b)。 $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 固定 ssDNA 后 (ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$), 其负电荷的磷酸骨架会排斥同样电性的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 阻碍其到达电极表面并降低电极表面的电子传递能力,使表面电子传递电阻增加 (图 1c)。当适体与探针杂交形成双链 DNA 后 (图 1d), 表面电子传递电阻进一步增加,而当 aptamer/ssDNA/ $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 使用一定浓度的腺苷处理后 (图 1e), R_{ct} 又有所减小,这主要是由于腺苷适体与腺苷结合的高度专一性,导致一部分腺苷适体从传感界面上解离。

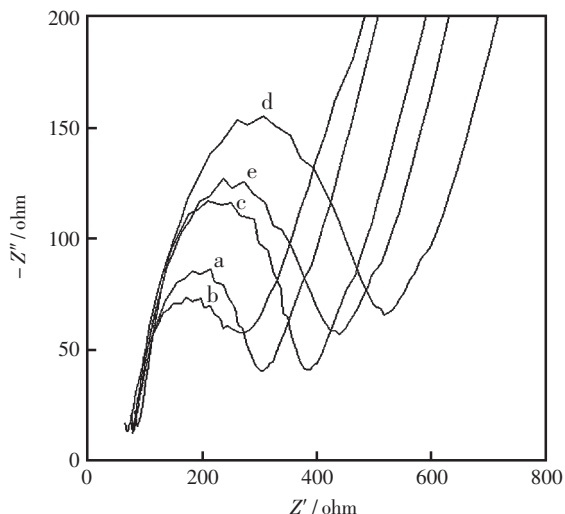


图 1 不同修饰电极的 Nyquist 曲线

Fig.1 Nyquist plots of impedance spectra obtained at

(a) bare GCE; (b) $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$;
(c) $\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$; (d) $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$; (e) (d) treated with 10 nmol/L adenosine

2.2 界面的固定

探针的固定界面直接影响传感器的性能。该文实验中,通过交流阻抗法比较了裸 GCE 和 $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 两种不同的固定界面对传感器性能的影响。结果表明,电极表面探针的固定能减小 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的电化学响应,导致电极表面的 R_{ct} 增大。 R_{ct} 的变化能反映出探针的固定量。由于 $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 固定界面的 ΔR_{ct} (160Ω) 比裸 GCE (54Ω) 的 ΔR_{ct} 大,为了增加探针的固定量,实验选择 $\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 作为探针的固定界面。

2.3 传感器的性能

在优化的实验条件下,通过 $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 电极与不同浓度的腺苷杂交,以电化学交流阻抗图的 R_{ct} 的变化作为检测信号对腺苷进行检测。以三次平行测量的 R_{ct} 的差值 ΔR_{ct} 的平均值对腺苷浓度的对数作图,如图 2 所示, ΔR_{ct} 的平均值与腺苷浓度的对数值在 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 到 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 浓度范围内呈较好的线性关系,相关系数 $r = 0.9987$,检测限为 $8.0 \times 10^{-10} \text{ nmol/L}$ (信噪比 $S/N = 3$)。

为了验证腺苷与其核酸适体是特异性结合的,用其它蛋白(例如尿苷、胞苷、鸟苷等)在同样

的实验条件下代替腺苷进行实验。图 3a 和 3b 分别为 $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 分别与 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 尿苷和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 胞苷杂交前后的 Nyquist 曲线。由图可见,浓度比腺苷高 1 000 倍的尿苷和胞苷的加入基本没有改变 $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 的 R_{ct} 值。 $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 电极与 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的鸟苷杂交后, R_{ct} 的变化值较大(图 3c),这也许是由于鸟苷与腺苷具有相似的结构引起的^[13]。但当 $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 电极与 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的腺苷杂交后, R_{ct} 的变化值很大(图 3d),说明基于 $\text{aptamer}/\text{ssDNA}/\text{MnO}_2/\text{CHIT}/\text{GCE}$ 的电化学适体传感器对腺苷具有很高的特异性识别能力。

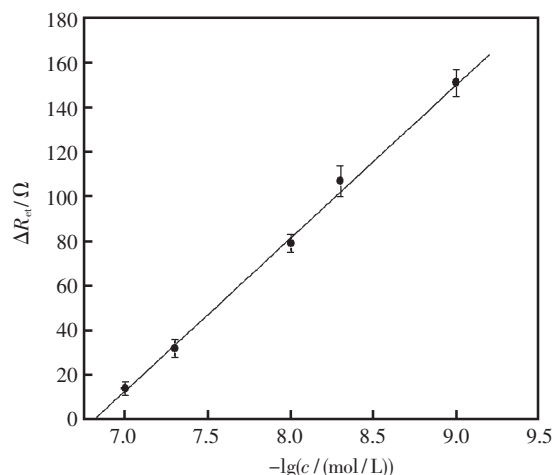


图 2 ΔR_{ct} 与腺苷浓度负对数的线性关系图

Fig. 2 The plot of ΔR_{ct} vs. the negative logarithm of the adenosine concentration

$\Delta R_{ct} = R_{ct,i} - R_{ct,0}$, $R_{ct,i}$ is the electron transfer resistance in the presence of adenosine and $R_{ct,0}$ is that in the absence of adenosine

2.4 传感器的重现性和再生性

通过研究 5 支按相同方法制备的适体修饰电极与同一浓度 (50 nmol/L) 的腺苷杂交前后表面电子传递电阻的变化值 (ΔR_{ct}) 来考察传感器的重现性,5 支测定结果的 RSD 为 5.8%。说明所研制的传感器有良好的重现性。将杂交后的电极在 200 nmol/L 的腺苷适体中浸泡 1 h ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) 可实现传感器的再生,结果显示,再生 10 次后,传感器的响应信号下降了 15%。

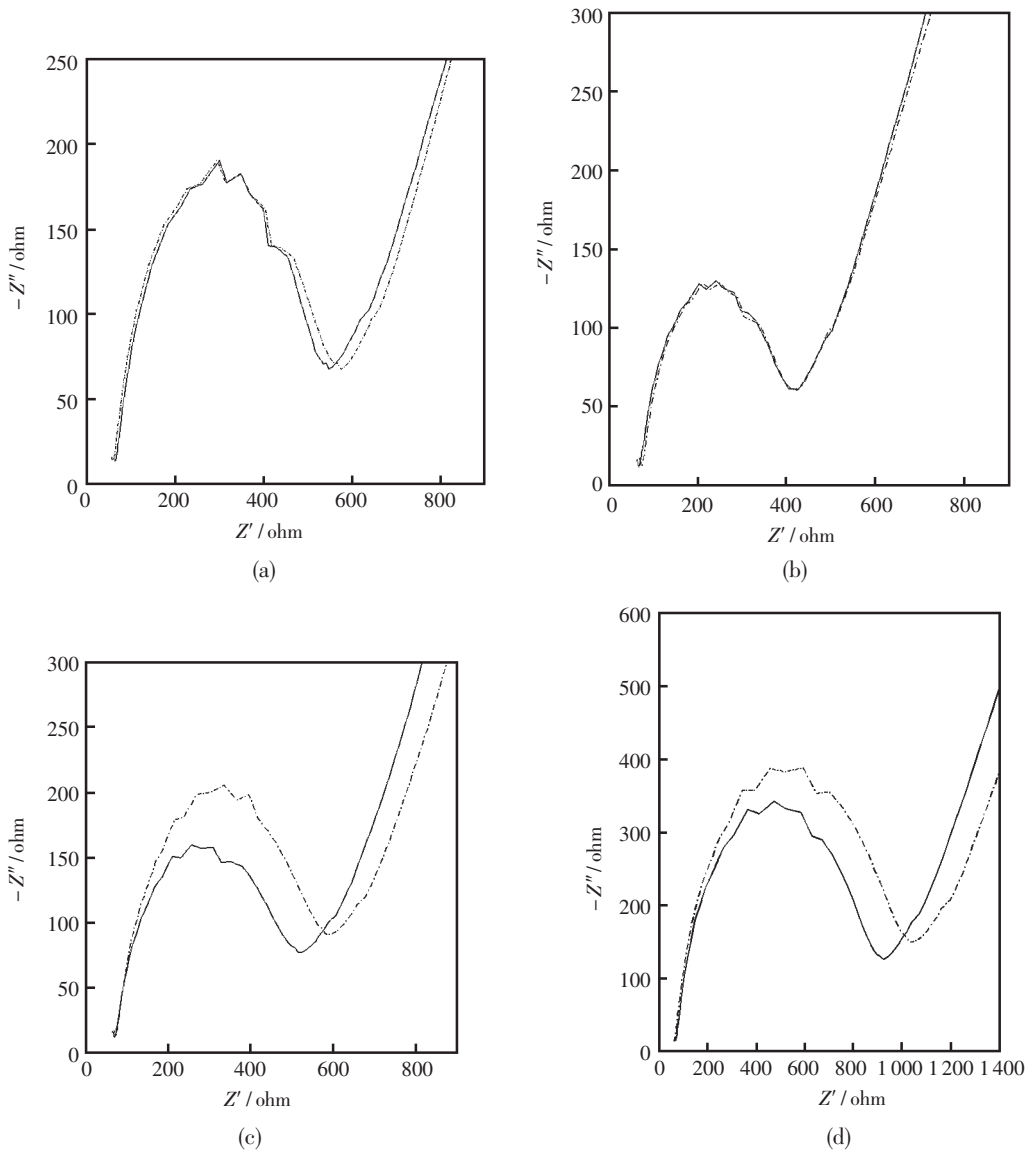


图3 aptamer/ssDNA/MnO₂/CHIT/GCE 与四种核酸杂交前(虚线)及杂交后(实线)的交流阻抗图谱

Fig.3 The impedance spectra of the sensing system before (dash dot line) and after (solid line)

being reacted with four nucleotides. (a) 1 mmol/L uridine;

(b) 1 mmol/L cytidine; (c) 1 mmol/L guanosine; (d) 1 μmol/L adenosine

3 结论

该文采用纳米MnO₂ 制备了一种新型电化学适体传感器,采用电化学交流阻抗法检测腺苷有较高的灵敏度和较宽的线性范围。由于免除了杂交指示剂的加入,操作程序大大简化,因此具有很好的应用前景。

参考文献

[1] Wang M J, Wang L Y, Wang G, et al. Application of

impedance spectroscopy for monitoring colloid Au - enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions [J]. Biosens. Bioelectron., 2004, 19 (6) : 575~582.

[2] Tuerk C, Gol L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249 (4968): 505 ~ 510.

[3] Lee J F, Hesselberth J R, Meyers L A, et al. Aptamer database. Nucleic acids Res [J]. 2004, 32 Database issue: D95.

- [4] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20(12): 2 424~2 434.
- [5] Merino E J, Weeks K M. Fluorogenic resolution of ligand binding by a nucleic acid aptamer [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(41): 12 370~12 371.
- [6] Liss M, Petersen B, Wolf H, et al. An aptamer-based quartz crystal protein biosensor [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74(17): 4 488~4 495.
- [7] Xu D, Yu X, Liu Z, et al. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77(16): 5 107~5 113.
- [8] Li X X, Shen L H, Zhang D D, et al. Electrochemical impedance spectroscopy for study of aptamer-thrombin interfacial interactions [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23(11): 1 624~1 630.
- [9] Feng K J, Sun C H, Kang Y, et al. Label-free electrochemical detection of nanomolar adenosine based on target-induced aptamer displacement [J]. *Electrochem. Commun.*, 2008, 10(4): 531~535.
- [10] Bai Y H, Du Y, Xu J J, et al. Choline biosensors based on a bi-electrocatalytic property of MnO_2 nanoparticles modified electrodes to H_2O_2 [J]. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9(10): 2 611~2 616.
- [11] Yao S J, Xu J H, Wang Y, et al. A highly sensitive hydrogen peroxide amperometric sensor based on MnO_2 nanoparticles and dihexadecyl hydrogen phosphate composite film [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 557(1-2): 78~84.
- [12] 李娟, 李清文, 夏熙, 等. 纳米 MnO_2 粉末的固相合成及其电化学性能的研究 [J]. *应用科学学报*. 1999, 17(2): 245~249.
- [13] Zheng F, Wu Z S, Zhang S B, et al. Aptamer-based electrochemical biosensors for highly selective and quantitative detection of adenosine [J]. *Chem. Res. Chinese Universities*, 2008, 24(2): 138~142.

纳米金结合银增强用于质量放大压电免疫传感器的设计

张万强^{1,2}, 王宏胜¹, 许志红¹, 吴朝阳^{2*}

(1. 许昌学院化学化工学院, 河南许昌 461000)

(2. 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 湖南长沙 410082)

摘要: 提出了一种基于纳米金结合银增强的质量放大方法以提高压电免疫传感器的灵敏度。通过夹心法将纳米金引入传感器表面后滴加银增强试剂,在纳米金的催化下可使银沉积在传感器上,从而对免疫反应引起的质量变化进行放大。以检测正常人 IgG 为例,对该方法的可行性作了研究,设计的传感器可在 0.3~5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内实现对正常人 IgG 的定量检测。

关键词: 压电免疫传感器; 纳米金; 银增强; 质量放大

The design of mass amplified piezoelectric immunosensor with gold nanoparticle and silver enhancement

Zhang Wan-qiang^{1,2}, Wang Hong-sheng¹, Xu Zhi-hong¹, Wu Zhao-yang^{2*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xuchang University, Xuchang 461000, China)

(2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A new approach was proposed to improve the sensitivity of piezoelectric immunosensors based on gold nanoparticle and silver enhancement. Gold nanoparticles were introduced onto the surface of immunosensor by sandwiched immunoassay, then the silver-enhancement solution was dropped to the surface of sensor and subsequently silver deposited around the nanoparticles, which amplified the mass change caused by immunoassay. Sensors for detecting normal human IgG were designed with this method, which allowed the quantitative detection of human IgG in the range of 0.3~5 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: piezoelectric immunosensor; gold nanoparticle; silver enhancement; mass amplification

0 引言

纳米金又称胶体金,是指分散相粒子直径在 1~150 nm 之间的纳米金溶胶,属于多相不均匀体系,能稳定、迅速地吸附蛋白质,而且蛋白质的生物活性无明显改变,在分子识别和标记、基因分析及催化等领域有广泛应用。最早在 1939 年,James 等发现亚硝酸银在对苯二酚存在下,可以在纳米金表面被还原。1983 年 Holgate 等^[1]发表

了银增强免疫金方法的论文,把早先由 James 等发现的金催化银还原现象运用到组织化学的研究中来,创立了免疫金银染色法(IGSS)。利用银的增强作用使得在光镜下可视粒子的半径比单独的金颗粒增加 10~50 倍,极大提高了其灵敏度。此后,基于 IGSS 的各种生物免疫分析方法相继被报道。Taton^[2]及 Park^[3]先后在 Science 上报道了基于 IGSS 的 DNA 微阵列分析方法,其检测下限可低至 0.5 pmol/L。Liang 等^[4]将 IGSS 体系应

用于蛋白质微阵列分析,根据银增强后阵列灰度的不同,建立了一种基于比色法的高灵敏度免疫分析方法,可检测出溶液中纳克级的人 IgG 抗体。楚霞等^[5]将 IGSS 与高灵敏的金属溶出分析相结合,提出了一种新的、高灵敏的金属免疫分析方法,成功地对人 IgG 进行了电化学免疫检测。

该文实验将纳米金-银增强体系用于质量放大压电免疫传感器的设计,以检测正常人 IgG 为例,考察了纳米金-银增强体系用于压电免疫传感器检测信号放大的可行性。将石英晶体的金电极用十二硫醇封闭后,以旋转涂膜的方法在晶体表面形成一层胺化聚氯乙烯(PVC-NH₂)膜,戊二醛活化后固定兔抗人 IgG,待测人 IgG 和羊抗人 IgG 修饰的纳米金依次结合在传感器上。滴加银增强试剂后,在纳米金催化下,大量的银沉积在传感器上,对抗原-抗体的识别信号放大,从而提高了压电免疫传感器的灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CN3165 型高分辨计数器(石家庄无线电工厂);石英晶体,AT 切割(JA5 型),9 MHz,两面镀金电极,晶片直径 12 mm,电极直径 6 mm,振荡电路为自制 TTL 电路。恒温水浴箱(上海实验仪器厂有限公司)。旋转匀胶机(中科院微电子研究所)。

胺化聚氯乙烯(PVC-NH₂, Aldrich),银增强试剂及氯金酸(HAuCl₄)购于 SIGMA,兔抗人 IgG,正常人 IgG 及羊抗人 IgG 均购于北京鼎国生物公司。所用试剂均为分析纯,实验用水均为三次蒸馏水。

1.2 纳米金的制备

实验所用纳米金以 Frens 法^[6]制备,实验所用玻璃器皿均用新配制的王水(HCl:HNO₃ 的体积比为 3:1)浸泡 120 min,并用蒸馏水冲洗 3 次,真空干燥箱中干燥后使用。取 100 mL 0.1%的 HAuCl₄ 溶液于 250 mL 三口烧瓶中,电动搅拌器搅拌下加热至沸腾回流后,迅速加入适量 1%的柠檬酸三钠溶液,溶液由无色变为蓝色,并逐渐变为酒红色,继续加热搅拌 10 min 后撤去加热装置,任其自然冷却至室温。所制纳米金于 4 °C 冰

箱中保存。纳米金粒径可由加入柠檬酸三钠溶液的量来控制,实验中分别加入 1.5、2.0 和 4.0 mL 的柠檬酸三钠,制得粒径约为 20、15 和 10 nm 的纳米金。

1.3 羊抗人 IgG 包被的纳米金的制备

制备方法见文献[7]。用 0.1 mol/L K₂CO₃ 将纳米金 pH 值调至 9.0,磁力搅拌器搅拌下向 5 mL 纳米金中加入 200 μL 1 mg/mL 羊抗人 IgG,30 min 后加入适量的 5%牛血清白蛋白(BSA),摇匀并静置 60 min 后,分别以 8 000 r/min(20 nm 纳米金)、12 000 r/min(15 nm 纳米金)和 16 000 r/min(10 nm 纳米金)离心 30 min。弃去上层清液后用 1%的 BSA 溶液重新分散纳米金。所得产物在冰箱中于 4 °C 保存备用。

1.4 传感器的制备

用新配制的 Piranha 溶液(30% H₂O₂ 与浓 H₂SO₄ 的体积比为 1:3)清洗石英晶体的金电极表面,再将其置于丙酮中超声 10 min,分别用乙醇和蒸馏水冲洗并用氮气吹干后,立即将晶体置于 0.05 mol/L 十二硫醇的乙醇溶液中浸泡 120 min,然后用乙醇和蒸馏水冲洗并吹干,将石英晶体置于旋转匀胶机上,滴加 20 mg/mL PVC-NH₂ 的环己酮-四氢呋喃溶液(V(环己酮):V(四氢呋喃) = 3:2),以 1 000 r/min 连续两次旋转涂膜。涂膜后的石英晶体于干燥箱中干燥 20 min 以使有机溶剂充分挥发,然后滴加 2.5%戊二醛溶液,反应 40 min,蒸馏水冲洗后滴加 20 μL 1 mg/mL 兔抗人 IgG,于 37 °C 恒温水浴箱中反应 60 min,水洗干净后滴加 30 μL 3%牛血清白蛋白反应 40 min,以封闭醛基活性位点,蒸馏水冲洗后氮气吹干备用。

1.5 测定方法

将固定了兔抗人 IgG 的石英晶体置于不同浓度的人 IgG 溶液中,于 37 °C 恒温水浴箱中孵育 60 min。蒸馏水冲洗后滴加羊抗人 IgG 修饰的纳米金,于 37 °C 恒温水浴箱中反应 60 min,磁力搅拌器搅拌下用含 0.9% NaCl 的 PBS 洗涤 5 min,石英晶体用氮气吹干后置于盛有变色硅胶和无水氯化钙的干燥瓶中,30 min 后测定石英晶体频率 f_1 ,取银增强试剂 A 和 B 等体积混合,立即滴加到晶体表面并将晶体置于暗处,反应 10 min 后迅速用蒸馏水冲洗,干燥 30 min 后测定频率 f_2 , f_2 与 f_1 之差即为频率变化值。

2 结果与讨论

2.1 金电极的封闭

银增强试剂极其敏感, 不仅纳米态的金, 其它形态的金单质也会催化银的沉积, 因此完全封闭石英晶体的金电极是该银增强质量放大方法的关键, 只有银的沉积仅由通过免疫反应结合到晶体上的纳米金引发, 银的沉积量才能正确反映待测物的浓度。银增强试剂中的 Ag^+ 具有很强的氧化性, 用于封闭金电极的物质必须有很好的化学惰性。Lee 等^[8] 首先在金电极表面组装一层 11-巯基十一烷酸, 然后多次交替组装带正电的聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH) 和带负电的聚苯乙烯磺酸钠 (PSS), 在电极表面形成三层聚电解质 (PAH/PSS) 自组装膜, 较好地消除了金电极对银增强试剂的影响, 成功地将纳米金-银增强体系用于对 DNA 杂交的分析。但这种处理方法步骤繁琐, 需时较长。该文实验探索了新的方法, 即首先在金电极上自组装一层十二硫醇单层膜, 然后以旋转涂膜的方法在晶体表面形成一层 PVC-NH₂ 膜, 成功消除了金电极对银增强过程的干扰。长链硫醇很容易在金质基底形成自组装单层膜, 常用于金电极的封闭, 该膜具有很强的疏水性, 但会存在针孔状缺陷^[9]。PVC-NH₂ 膜具有良好的化学惰性, 进一步封闭十二硫醇膜缺陷的同时, 提供了可用于交联抗体的氨基。实验考察了封闭前后晶体在银增强试剂中的频率变化情况(见图 1), 在

10 min 内, 未封闭的晶体频率变化值超过 1 000 Hz, 由于十二硫醇自组装膜存在针孔状缺陷, 以其封闭的晶体也会有 100 Hz 左右的频率变化, 共同使用十二硫醇和 PVC-NH₂ 封闭的晶体只有 40 Hz 的频率变化, 较好地消除了金电极对银增强过程的干扰。

2.2 抗体的固定

抗体的固定是压电免疫传感器设计过程中重要步骤, 它直接影响着传感器的灵敏度、重现性及被固定分子的生物活性。戊二醛交联法是常用的抗体固定化方法, 这种方法需要首先在晶体表面建立一层惰性疏水物质作载体, 常用的是半胱胺和聚乙烯亚胺, 然后用戊二醛作为交联试剂与抗体结合, 这种交联手段通过蛋白质中的赖氨酸残基进行^[10]。实验中用 PVC-NH₂ 作载体, 除提供了可用于抗体交联的氨基, 而且较好地封闭了晶体的金电极。PVC-NH₂ 具有良好的化学惰性及成膜性, 常用于离子选择性电极的研制。实验中发现其成膜性与所用溶剂有关, 以四氢呋喃作溶剂旋转涂膜时, 所得到的膜较厚且表面粗糙, 涂膜后的晶体在振荡电路中的频率变得不稳定。以环己酮:四氢呋喃的体积比为 3:2 作溶剂取得了较好的成膜效果, 晶体涂膜后频率下降了 10 000 Hz 左右, 晶体频率在振荡电路中仍能保持较好的稳定性。

抗体在晶体表面的固定量会影响传感器的性能, 实验考察包被时间对抗体固定量的影响, 从图 2 可知, 60 min 后晶体频率不再随时间的

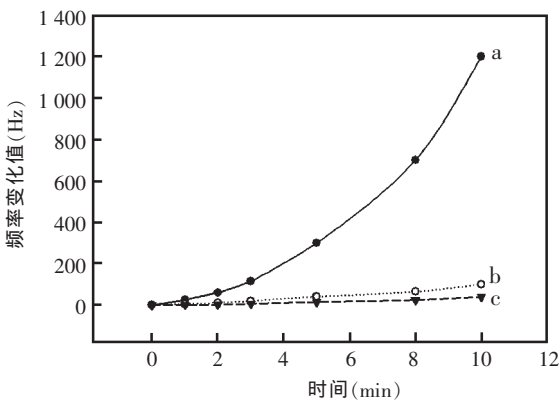


图 1 石英晶体在银增强试剂中的频率响应

(a) 未封闭; (b) 以十二硫醇封闭; (c) 共同使用十二硫醇和 PVC-NH₂ 封闭

Fig.1 Frequency responses of quartz crystals in silver enhancement solution

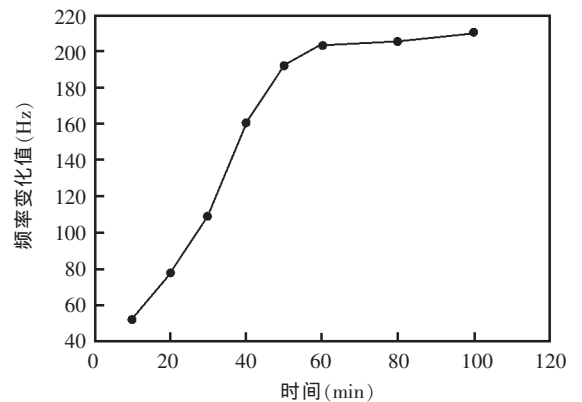


图 2 晶体频率变化值与抗体固定时间的关系曲线

Fig.2 Curve of the relationship between frequency variation of crystal and the time of immobilization of antibody

增加而明显增大,可以认为此时抗体的固定量已基本饱和,因此实验中采用 60 min 的抗体固定时间。

2.3 银增强时间的影响

银增强时间强烈影响传感器的频率响应,显然,银增强时间越长,纳米金催化沉积的金属银越多,石英晶体的频率响应值越大。但即使没有纳米金的催化,银增强试剂本身也会缓慢发生反应,时间越长,这种自发反应就会越快,自发反应生成的银单质会沉积于晶体上,从而产生较大的背景干扰。实验发现,在 10 min 的时候,这种背景干扰达 40 Hz。综合考虑传感器高的频率响应和低的背景干扰这两个因素,实验中选用 10 min 的银增强时间。

2.4 纳米金粒径的影响

纳米金具有很强的催化活性,它能够催化 CO 和 H₂ 的氧化、NO 的还原、CO₂ 的氢化以及甲醇的燃烧等^[11],其催化活性与纳米金的粒径有很大关系^[12]。银在纳米金表面的沉积同样基于其催化性能,其催化原理是:当银增强试剂与纳米金接触时,试剂中的 Ag⁺与还原剂同时被吸附至金颗粒表面并发生电子的转移,Ag⁺被还原为银单质而沉积在纳米金表面^[13]。实验考察了纳米金粒径对传感器响应频率的影响,对浓度同为 3 μg/mL 的人 IgG,采用粒径为 10、15 和 20 nm 的纳米金,晶体的响应频率分别为 299、280、262 Hz,即使用小粒径的纳米金具有更好的催化活性,传感器的响应频率更大,因此实验选用 10 nm 的纳米金。

2.5 传感器响应特性

以 1.5 所述方法测定一系列不同浓度的人 IgG 引起的频率响应值,得到频率变化值(Δf)与人 IgG 浓度(c)的关系曲线(图 3),在 0.3~5 μg/mL 范围内,传感器的频移值与人 IgG 的浓度存在良好的线性关系,线性回归方程为:Δf=72.4c+82.3,相关系数为 0.9953。

2.6 石英晶体的再生

实验结束后,将石英晶体用 Piranha 溶液清洗 5 min,晶体表面沉积的银可被溶解,蒸馏水冲洗后置于四氢呋喃中超声 10 min,PVC-NH₂ 即被洗掉,用无水乙醇冲洗后,晶体频率基本回到实验前的状态,可继续用于下一次实验。

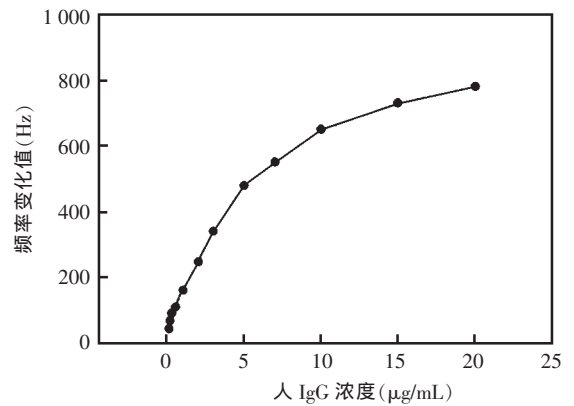


图 3 传感器对不同浓度人 IgG 的频率响应
Fig.3 Frequency response of the sensor to a series of concentration of human IgG

3 结论

将纳米金-银增强质量放大体系应用于压电免疫传感器的设计,以检测人 IgG 为例,对纳米金-银增强体系在质量放大压电免疫传感器中的应用作了研究,采用十二硫醇自组装膜和 PVC-NH₂ 封闭晶体,较好消除了晶体金电极对银增强过程的影响;采用小粒径的纳米金具有更好的银增强效果。实验设计的传感器可在 0.3~5 μg/mL 范围内定量检测人 IgG。该质量放大方法有望用于其它临床分析物的免疫检测。

参考文献

- [1] Holgate C S, Jackson P, Cowen P N, et al. Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity[J]. J Histochem Cytochem., 1983, 31: 938~944.
- [2] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes [J]. Science, 2000, 289(5485): 1757~1760.
- [3] Park S, Taton T A, Mirkin C A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes [J]. Science, 2002, 295(5559): 1503~1506.
- [4] Liang R Q, Tan C Y, Ruan K C. Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement[J]. Journal of Immunological Methods, 2004, 285(3): 157~163.
- [5] Chu X, Fu X, Chen K. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label[J]. Biosens. Bioelectron, 2005, 20(9): 1805~1812.

- [6] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension[J]. Nature Physical Science, 1973, 241(105): 20~21.
- [7] 芦光新. 胶体金标记探针的制备方法及其应用[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2004, 122(13): 43~46.
- [8] Lee T M H, Li L L, Hsing I M. Enhanced Electrochemical Detection of DNA Hybridization Based on Electrode - Surface Modification[J]. Langmuir, 2003,19(10): 4 338 ~ 4 343.
- [9] 李景虹, 程广金, 董绍俊. 自组装膜技术在电分析化学中的应用[J]. 分析化学, 1996, 24(9): 1 093~ 1 099.
- [10] 陈志敏, 刘仲明, 刘芳. 压电免疫传感器固定方法[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 99~101.
- [11] 周华, 董守安. 纳米金负载型催化剂的研究进展[J]. 贵金属, 2004, 25(2): 48~56.
- [12] 王东辉, 郝郑平, 程代云, 等. 负载型金催化剂在化工中的应用[J]. 化工进展, 2002, 21(7): 462~465.
- [13] Kangatharalingam N, Essenberg M. Modified pyrogallol-initiated immuno - gold - silver enhancement technique applicable to prokaryotes [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 41(3): 211~217.

纳米金、聚天青 I 修饰铂电极的电流型葡萄糖传感器

李群芳¹, 娄方明¹, 丁雁南¹, 张倩茹¹, 袁若^{2*}

(1. 遵义医学院药理学系, 贵州遵义 563003)

(2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要: 用循环伏安法在铂金电极上电聚合一层稳定的天青 I 聚合物膜, 研究了这层膜在 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH6.5) 中的电化学性质。用纳米金溶胶与聚乙烯醇缩丁醛 (PVB) 构成复合固酶基质, 采用溶胶-凝胶法固定葡萄糖氧化酶 (GOD) 于天青 I 修饰的铂金电极表面, 制成了新型葡萄糖生物传感器。实验发现, 所制备的传感器具有响应快、灵敏度高、稳定性好, 对葡萄糖的线性响应范围为 $1.2 \times 10^{-5} \sim 7.5 \times 10^{-3}$ mol/L, 检测下限为 6.0×10^{-6} mol/L。并具有抗坏血酸、尿酸干扰的特点。

关键词: 聚天青 I; 纳米金; 铂电极; 电流型葡萄糖生物传感器

A new biosensor for glucose based on Au colloid modified electrode and poly-azure mediation

Li Qun-fang¹, Lou Fang-ming¹, Ding Yan-nan¹, Zhang Qian-ru¹, Yuan Ruo^{2*}

(1. Pharmacy Department, Zunyi medical college, Zunyi 563003, China)

(2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: A new approach to construct an amperometric biosensor was describe. A stable electropolymerized azure films are electropolymerized on the surface of Pt electrode. Their electrochemical quality is studied extensively in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH6.5). Glucose oxidase (GOD) adsorbed to colloidal gold sols combined with polyvinyl butyral (PVB) immobilized onto the surface of electropolymerized azure films to make a glucose biosensor. The experiments proved that the biosensor exhibited fast response, high sensitivity, fine stability and linear dependence on the analyte concentration in the range of $1.2 \times 10^{-5} \sim 7.5 \times 10^{-3}$ mol/L, with the limit of 6.0×10^{-6} mol/L. In the meantime the biosensor can effectively eliminate interference from common interferents, such as ascorbic acid and uric acid.

Key words: poly(azure); gold nanoparticles; platinum electrode; glucose biosensor

0 引言

自从 Shinakawa 等于 20 世纪 70 年代采用电聚合方法合成出导电聚乙炔以来, 导电聚合物的研究和应用取得许多进展。1986 年, Foulds 和 Lowe 将葡萄糖氧化酶 (GOD) 包埋固定于聚吡咯中, 构建了酶传感器, 揭开了导电聚合物构建生物传感器的序幕。随后, 许多学者相继将不同的酶、辅酶、抗体、DNA、甚至细胞和组织等生物活

性物质固定于不同的导电聚合物中, 形成各种新型的生物传感器。导电聚合物生物传感器的主要特点是响应性能强, 制作过程简单可控, 因而被广泛使用。天青 I^[1] 作为一种生物染料, 是一种比较活泼的电子转移体, 单体在导电基质上具有良好的电化学行为, 天青 I 可以在铂电极上电聚合合成导电聚合薄膜后具有良好的电活性和电催化性能。

近年来发现, 可在一些纳米材料如金胶体、

银胶体上固定生物分子如酶,利用纳米颗粒比表面积大,表面自由能高,吸附能力强,因而可使酶在纳米颗粒表面得到强有力的固定,不易从酶膜中渗漏。金溶胶具有很好的生物相容性,并且是电的良导体,可在酶的氧化还原中心与电极之间传递电子等优点被广泛地应用于各类传感器的制备。

袁若、柴雅琴实验小组^[2-3]曾探索用纳米颗粒如纳米金,纳米银吸附酶于电极表面,在测定底液中加入电子媒介体制备了一类新型的生物酶传感器。该类传感器具有响应范围宽、灵敏度高、稳定性好的特点,但此类传感器的缺点是背景电流大,操作过程复杂。该文的思路是将天青 I 聚合在电极表面,用纳米金颗粒吸附葡萄糖氧化酶,将导电聚合物的性能和纳米颗粒的优良性能结合起来,探索出一种新型第三代生物传感器的制备方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CHI660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司),CS 501-SP 型超级数显恒温器(重庆四达实验仪器厂制造),H-600 透射电子显微镜(TEM,日立公司),葡萄糖氧化酶(GOD,EC 1.1.3.4,157,500 units/g, Sigma 公司),天青 I(上海试剂厂), β -D 葡萄糖(A.R,上海试剂厂),聚乙烯醇缩丁醛(PVB,上海化学试剂公司)、氯金酸(Sigma 公司、闭光保存)、鞣酸(上海化学试剂公司)。其它试剂如 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 $NaHPO_4$ 、KCl 均为分析纯试剂,实验用水均为二次蒸馏水。标准储备葡萄糖溶液放置过夜后使用。保存于 4 °C 冰箱中。参照文献^[4]制备金溶胶,其粒径用透射电子显微镜测试为 12 nm。

1.2 酶电极的制备

将空白铂电极放入到一定量天青 I 的磷酸缓冲溶液中(pH6.5),先在 -1.4~1.6 V 电位范围内循环扫描 10 min,然后在 -0.8~0.8 V 电位范围内循环扫描至峰电流稳定,铂电极表面即能制备出性能优良的聚天青 I 膜。

把一定量的葡萄糖氧化酶溶液和纳米金溶胶混合,几分钟后再将 3 mL 的 $w(PVB)=2\%$ 的无水乙醇溶液倒入混合液,并用聚天青 I 修饰的铂

丝搅拌浸涂其中 10 min,使葡萄糖氧化酶吸附组装到铂电极上,取出晾干后,悬于 pH6.5 磷酸缓冲液上方在 4 °C 下保存过夜。

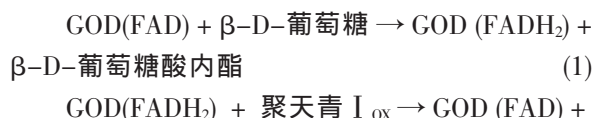
1.3 检测方法

采用三电极检测装置:饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为对电极,葡萄糖氧化酶电极为工作电极。在 4 mL pH6.5 浓度为 0.1 mol/L 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(含 0.1 mol/L KCl 作为支持电解质),温度控制为 (25 ± 0.2) °C 的条件下进行循环伏安测试。电位扫描速率为 50 mV/s,扫描电位范围为 -0.2~0.5 V(vs. SCE)。记录葡萄糖逐渐加入时工作电极响应的循环伏安图,根据氧化峰电流值与葡萄糖浓度成正比进行定量测定。酶电极不使用时,将其于 4 °C 下贮存在 pH6.5 磷酸缓冲液上方。

2 结果与讨论

2.1 该传感器的电化学响应及检测机理

图 1 是制备该传感器不同状况下的循环伏安图。图 1a 为空白电极即裸铂电极在 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液中的循环伏安图,此时电极上基本无氧化还原电对。图 1b 为电极表面修饰有聚天青 I 膜之后的循环伏安图,此时电极上出现了一个氧化还原电对,氧化峰电位 E_{pa} 为 0.15 V,还原峰电位 E_{pc} 为 -0.03 V, $\Delta E_p=0.18$ V。 $i_{pc}/i_{pa}=1.10$, $Q_c/Q_a=1.05$ 。另外,当扫速较低的时候, ΔE_p 基本保持不变。这些结果表明,该峰具有很好的可逆性。在不同的扫速条件时,峰电流值与扫描速度的平方根成正比,说明这种情况下氧化还原反应受扩散控制。图 1c 是用纳米金溶胶与聚乙烯醇缩丁醛(PVB)构成复合固酶基质,以溶胶-凝胶法固定葡萄糖氧化酶(GOD)于聚天青 I 膜修饰的铂电极表面后的循环伏安图。由于外面包敷有一层不导电的 PVB 后,增加了电极的电阻,使得氧化还原峰电流都降低。图 1d 为该传感器在加入了 5 mmol/L 葡萄糖后的响应情况。此时,氧化峰明显地增强,而还原峰基本无变化,表明该传感器中聚合的天青 I 能有效地催化葡萄糖氧化酶对葡萄糖的氧化。其响应机理可表示如下:



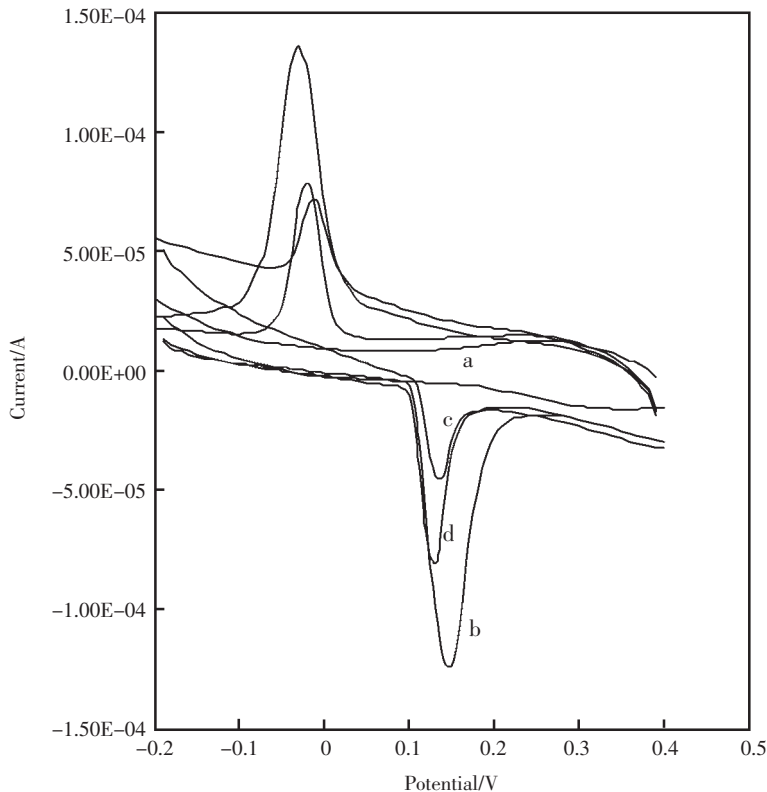


图 1 不同电极在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中 (pH6.5) 的循环伏安图

Fig.1 Cyclic Voltammograms of deferent electrodes in 0.1 mol/L Phosphate Buffer(pH6.5)

聚天青 I_{RED} (2)

聚天青 I_{RED} → 聚天青 I_{OX} + e⁻ (3)

反应(3)即为电极反应。此时产生氧化峰的电位为 0.15 V, 在这样低的电位条件下尿酸、抗坏血酸以及一些氨基酸不易发生氧化。有效地提高了测定的选择性和灵敏度。

2.2 电子媒介体的最优聚合 pH 值

考察了不同 pH 条件下, 天青 I 在电极表面的聚合情况。实验发现天青 I 在 pH6.5 时, 聚合的效果最好, 并由此制成的葡萄糖传感器性能最佳, 故选取聚合的 pH 为 6.5, 如图 2 所示。

2.3 传感器对葡萄糖响应的最佳 pH

考察了该传感器在不同 pH5.0~pH8.0 范围的磷酸缓冲溶液中, 对 5 mmol/L 葡萄糖的响应(图 3)。结果表明, 在 pH6.5 该传感器有最大响应值。

葡萄糖在很宽的 pH 范围内(2.7~8.5)有活性。当氧作为电子媒介体时, 最佳的 pH 值为 4.8~6.0。实验中最佳的 pH 值为 6.5, 说明该传感器显然受其它因素影响。大量早期实验证明最佳

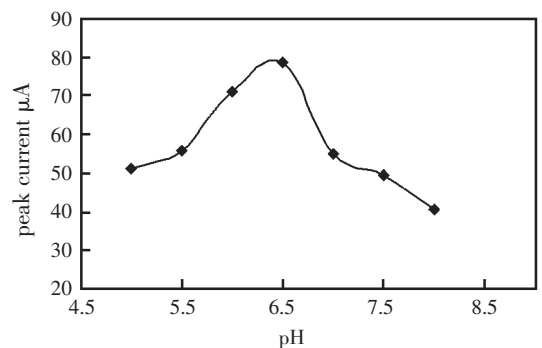


图 2 电子媒介体的聚合最佳 pH 图

Fig.2 The peak currents of Electropolymerized azure films on the surface of Pt electrode with different pH values

pH 的移动是由于新的电子媒介体的引入产生。而酶的固定也是一个改变因素之一^[5]。因此, 最佳的 pH 值为 6.5 并不能说明酶的活性已经改变。聚天青 I 对葡萄糖氧化酶有最佳催化是在 pH6.5, 而 pH 超过 8.0 以后, 固定酶的膜也开始不稳定。传感器在 pH6.5 为最好的响应是酶、电子媒介体和膜的最佳 pH 协同作用的结果。以后一系列的实验都采用 pH6.5 的磷酸缓冲溶液。

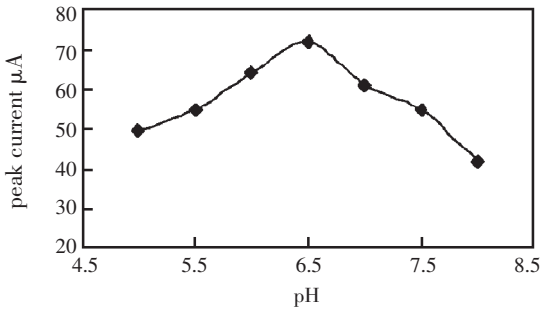


图3 传感器在不同 pH 的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammogram of glucose sensor with different pH Values

2.4 电子媒介体浓度对葡萄糖传感器的影响

电子媒介体浓度是影响这类传感器性能的重要因素。考察了聚天青 I 浓度为 0.025 mmol/L ~ 0.5 mmol/L, 该传感器对 5 mmol/L 葡萄糖的响应。结果表明,随着电子媒介体的浓度增加氧化电流增大,从而提高其响应灵敏度。但电子媒介体的浓度超过 0.2 mmol/L 后,氧化电流反而降低。这是因为一方面当电子媒介体的浓度较低时,电流响应受酶-媒介体动力学控制,而较高的媒介体导致电流响应受酶-底物动力学控制。另一方面,较高浓度的媒介体时产生的背景电流给检测造成困难。以电子媒介体的第二类传感器的研究也有类似的现象^[6-7]。在 0.2 mmol/L 该传感器有最大响应值,故媒介体的浓度选择为 0.2 mmol/L。

2.5 温度对传感器电流响应的影响

温度是影响酶催化反应的一个重要因素。酶的活性也与温度有直接关系,温度升高时,酶催化反应速度增加,但高温会使酶蛋白变性而失活。改变底液的温度,结果发现氧化峰峰电流随着温度的升高逐渐增大,但温度升至 45 °C 后,氧化峰峰电流逐渐下降。综合考虑电流响应以及酶活性,选择温度为(30±0.2) °C。

2.6 传感器的线性范围、检测限、重现性和稳定性

在最优的实验条件下,测得传感器在 1.2×10^{-5} ~ 7.5×10^{-3} mol/L 范围内电流响应与葡萄糖浓度成线性关系,其检测下限为 6.0×10^{-6} mol/L (S/N=3)。对 5.0 mmol/L 的葡萄糖溶液连续扫描 200 次,电流响应仅下降 7.94%。该电极不使用时,用水冲洗,吸干,悬于 4 °C 的磷酸缓冲溶液上方保存。30 d 后,该电极的响应下降约 5.4%。一个月

后,该电极的活性下降约 17.6 %。

2.7 干扰物质的影响

研究了尿酸、抗坏血酸及人体血清中常见的氨基酸对该传感器响应的影响,当葡萄糖浓度为 5.0 mmol/L 时,1.5 倍的抗坏血酸,1.0 倍的尿酸,1.0 倍 L-半胱氨酸、甘氨酸、胱氨酸的存在对响应电流基本无影响,可见该葡萄糖生物传感器,具有良好的抗干扰能力。

3 结论

用循环伏安法在铂金电极上电聚合一层稳定的天青 I 聚合物膜,用纳米金溶胶与聚乙烯醇缩丁醛(PVB)构成复合固酶基质,采用溶胶-凝胶法固定葡萄糖氧化酶(GOD)于天青 I 修饰的铂金电极表面,制备的葡萄糖生物传感器,具有良好的选择性、抗干扰能力,寿命长等优点,制备较简单,适用于其它媒介体和酶体系,

参考文献

- [1] Xu J J, Chen H Y. Amperometric Glucose Sensor Based on Coimmobilization of Glucose Oxidase and Poly (p-phenylenediamine) at a Platinum Microdisk Electrode [J]. Anal Biochem, 2000, 280: 221 ~ 226.
- [2] 李群芳,袁若,刘颜,等. 天青 I 为电子媒介体金纳米颗粒修饰葡萄糖生物传感器[J]. 分析化学, 2005, 33: 631 ~ 634.
- [3] Yuan R, Liu Y, Li Q F, et al. Electrochemical characteristics of a platinum electrode modified with a matrix of polyvinyl butyral and colloidal Ag containing immobilized horseradish peroxidase [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381: 762 ~ 768.
- [4] Slot J W, Geuze H J. A new method of prepare gold probes for multiple labeling cytochemistry[J]. Eup. J. cell Bio., 1985, 38(1):87 ~ 93.
- [5] Wilson R, Turner A P F. Glucose oxidase: an ideal enzyme[J]. Biosens. Bioelectron, 1992, 7:165 ~ 185.
- [6] Bharathi S, Nogami M. A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme[J]. Analyst, 2001, 126: 1 919 ~ 1 922.
- [7] Jia J B, Wang B Q, Wu A G. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network[J]. Anal. Chem., 2002, 74: 2 217 ~ 2 223.

基于番红花红聚合膜的生物传感器的应用研究

牛凌梅, 连靠奇, 康维钧, 李珊*, 刘汝俊
(河北医科大学公共卫生学院, 河北石家庄 050017)

摘要: 研究了尿酸(UA)在番红花红(SFR)聚合膜修饰的玻碳电极上的电化学行为,发现 SFR 聚合膜电极对 UA 的氧化能够起到明显的电催化作用。分别利用循环伏安法(CV)、差分脉冲法(DPV)、计时电流法研究了 UA 在 pH4.4 的磷酸缓冲溶液中的线性关系,发现其浓度分别在 $2.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-4}$ mol/L(CV), $6.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L、 $2.0 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-4}$ mol/L(DPV), $4.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L(计时电流法)范围内呈良好的线性关系。该电极用于实际样品的测定,结果满意。

关键词: 番红花红; 玻碳电极; 尿酸

Study of biosensor and application of poly (safranin T) modified glassy carbon electrode

Niu Ling-mei, Lian Kao-qi, Kang Wei-jun, Li Shan*, Liu Ru-jun
(School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: The electrochemical behavior of uric acid (UA) at poly (safranin T) modified electrode was investigated. It was found that the poly (SFR) modified electrode shows an obvious electrocatalytic activity for the oxidation of UA. In phosphate buffer(pH4.4), the linear relationship between peak current and concentration of UA was studied by the cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), chronoamperometry method and the linear range for determination of UA was $2.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-4}$ mol/L(CV), $6.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L、 $2.0 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-4}$ mol/L(DPV), $4.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L(chronoamperometry), respectively. The poly(SFR) modified electrode can be applied to the determination of UA in the practical injection samples with satisfactory results.

Key words: safranin T; glassy carbon electrode; uric acid

0 引言

尿酸(2,6,8-三羟基嘌呤,UA)是人体内嘌呤代谢的主要产物^[1]。血清中 UA 的正常水平为 $2.4 \times 10^{-4} \sim 5.2 \times 10^{-4}$ mol/L,尿液中 UA 的正常浓度为 $1.4 \times 10^{-3} \sim 4.4 \times 10^{-3}$ mol/L^[2]。血液或尿液中 UA 浓度异常可引起很多疾病,例如痛风、高尿酸血症等^[3]。因此,对体液中 UA 浓度的监测可在早期预防这些疾病的发生^[4]。

近年来,电导聚合物由于在有机电池、电铬显示、电催化及微电子装置方面均有着广泛的应

用,而越来越受到重视。该文中则用番红花红(SFR)聚合物膜修饰的玻碳电极对 UA 进行了测定研究,发现此修饰电极对 UA 的氧化起到明显的电催化作用,峰电流明显升高,并且此番红花红(SFR)聚合物膜性质稳定,可用于实际样品的测定。SFR 的结构如图 1。

1 实验部分

1.1 试剂

番红花红(SFR)购于上海化学试剂有限公司;UA(Fluka 公司)储备液:0.01 mol/L;使用二次

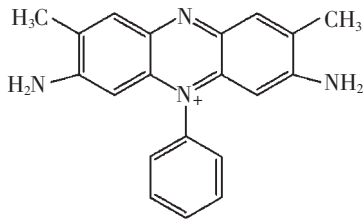


图1 SFR 的结构图
Fig.1 Structure of SFR

水,其它试剂均为分析纯。所有实验均在室温下进行(约为 25 °C)。

1.2 仪器

AD300 电化学工作站(天津艾达仪器有限公司);电极采用三电极系统:铂丝为对电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,工作电极为聚(SFR)修饰的玻碳电极。所有电位均相对于 Ag/AgCl 参比电极而言。

2 结果与讨论

2.1 聚(SFR)膜修饰电极的制备

将裸玻碳电极置于 Al_2O_3 粉末的悬浆之中进行打磨至镜面,依次用 1:1 的 HNO_3 、1:1 的丙酮、二次蒸馏水,各超声清洗 5 min,氮气吹干。将处理好的电极浸入 2.0×10^{-3} mol/L 的 SFR 溶液中(含有 0.1 mol/L H_2SO_4),在 $-0.20 \sim 1.80$ V 范围内进行循环电位扫描 20 圈,即可得到蓝紫色聚合物膜。在酸性溶液中进行电位扫描是因为酸的加入(如 H_2SO_4)有利于膜的形成,且电位扫描法比恒电位聚合法更有利于形成光滑均匀的聚合物膜^[5]。如图 2 所示,第一圈扫描在 -0.25 V 电位附近出现了一对氧化还原峰,这可能是由于单体的 2 个电子转移的可逆反应^[6]。另外,还有 2 个氧化峰,分别出现在 1.1 V 和 1.5 V。第一个氧化峰是由于产生了自由基阳离子,第二个氧化峰则表明自由基阳离子被进一步氧化并形成了低聚物。但此两个氧化峰电流却随着电位扫描次数的增加而逐渐降低,这是因为没有形成相应的还原峰的缘故^[6]。如文献[7]中所述,SFR 聚合物在电极表面增长的机理与聚苯胺形成相似,均是借助于在酸性环境中胺自由基与芳环碳原子的结合^[6]。换句话说,若想获得 SFR 聚合物膜,必须将电位扫描至能够将胺基氧化的电位,这也是为什么在 $-0.30 \sim 1.00$ V 之间扫描则得不到 SFR

聚合物膜的原因。SFR 的聚合机理见图 2。

2.2 UA 在聚(SFR)膜修饰电极上的电化学响应

利用循环伏安法研究了 UA 在裸玻碳及修饰电极上的电化学响应。由图 3 可以看出,在裸玻碳电极(实线)表面,UA 的氧化峰电流及峰电位分别为 16.32×10^{-6} A, 0.61 V。而在修饰电极(虚线)表面,UA 的峰电流却大大增加 (21.98×10^{-6} A),且峰电位负移(0.48 V),说明在修饰电极表面,UA 的氧化变得更加容易。其反应过程可通过以下机理来解释:聚(番红花红)的结构与聚(酚藏花红)类似,是一种阳离子聚合物^[8]。Dougherty 曾报道, π -阳离子之间的相互作用可使得此主体对于水溶性的客体有高度的选择性和亲和性^[9]。而 UA 即为这样水溶性的客体,可以通过分子间氢键与聚合物膜相互作用,加速电子的传递,从而使得峰电流大大提高。

2.3 SFR 聚合浓度对 UA 测定的影响

SFR 聚合的浓度不同,对 UA 的响应也不同,如图 4 所示,当 SFR 聚合 10 圈时,对 UA 的响应随着 SFR 溶液浓度的增大而增加。在 SFR 浓度为 2.0×10^{-3} mol/L 时,对 UA 的响应达到最大值,之后随着 SFR 浓度的继续增大,聚合膜过厚,对于电子的传递起到了阻碍作用。结果,UA 的响应峰电流逐渐降低。因此,在后续实验中, 2.0×10^{-3} mol/L 选作 SFR 的聚合浓度。

2.4 溶液 pH 值对 UA 测定的影响

溶液 pH 对 UA 测定的影响用循环伏安法(CV)在不同 pH 值的磷酸缓冲溶液中进行了研究,结果发现,UA 的氧化峰随着溶液 pH 值的增加而逐渐增加,并在 pH4.4 处达到最大值,之后逐渐减小。这可能是因为 UA($\text{pK}_a=5.4$)^[10]在 pH 小于 5.4 时呈质子化状态,这有利于与聚合物膜形成分子间氢键,并且其相互作用力在 pH4.4 时达到最大,考虑到对 UA 有最大的响应,pH4.4 作为支持溶液的 pH 值。

2.5 工作曲线

分别利用循环伏安法(CV)、差分脉冲法(DPV)、计时电流法(图 5)研究了 UA 在 SFR 聚合膜修饰电极上的线性关系。发现 UA 的氧化峰电流均随着其浓度的增加而线性增加。其线性范围、线性方程、检出限列于表 1。根据下列公式^[11]和计时电流法的测定结果,可计算出 UA 在此修

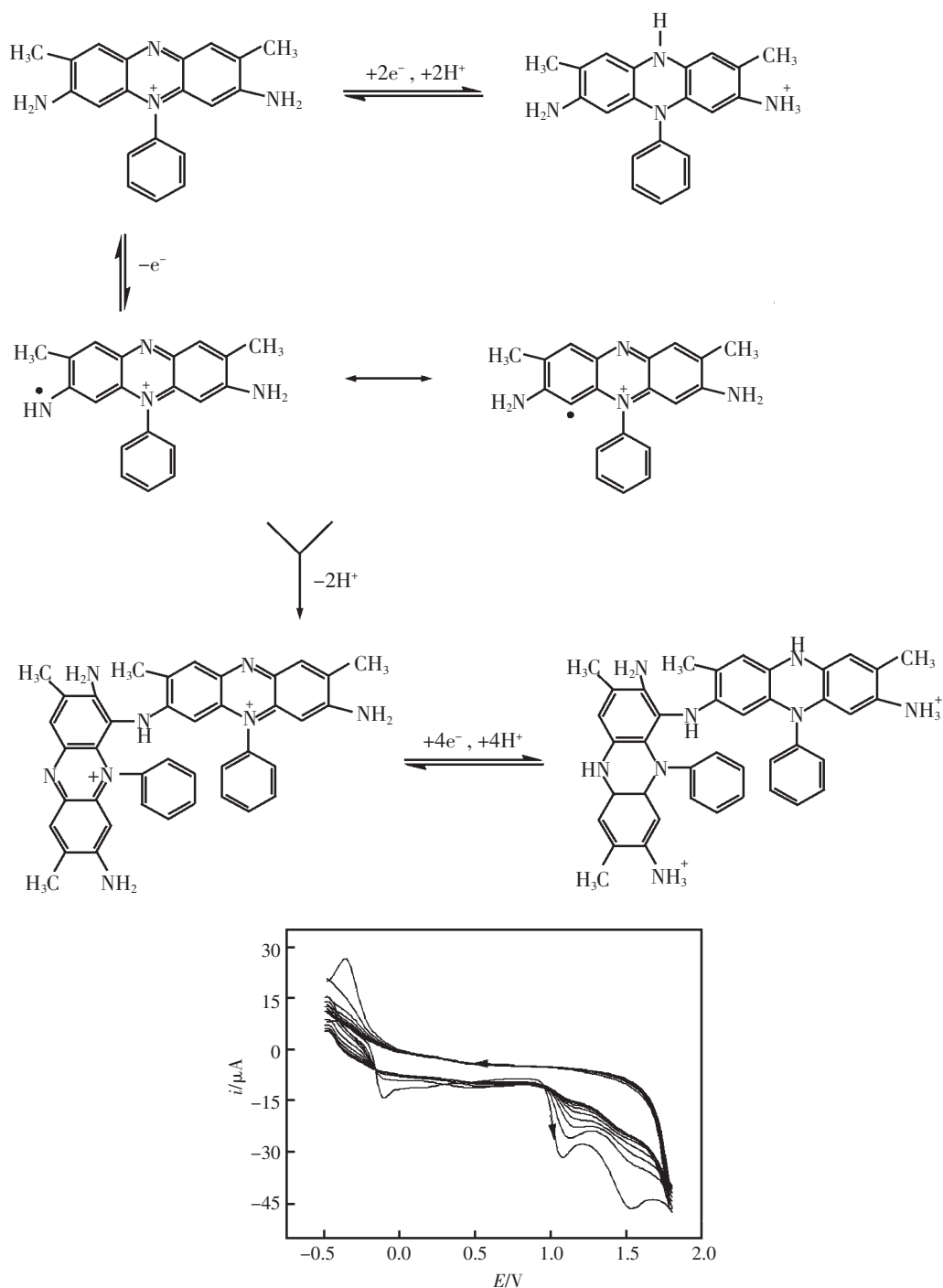


图2 SFR 聚合过程中的循环伏安曲线

SFR 溶液: 2.0×10^{-3} mol/L (含 0.1 mol/L H_2SO_4); 扫描速率: 50 mV/s

Fig.2 Consecutive cyclic voltammograms recorded during electropolymerization; Electrolyte: 2.0×10^{-3} mol/L safranin T solution in 0.1 mol/L H_2SO_4 ; scan rate: 50 mV/s

饰电极上的扩散系数 $D(\text{cm}^2/\text{s})$

$$i = nFA D^{1/2} c / (\pi^{1/2} t^{1/2})$$

其中 c 为 UA 浓度 (mol/L), A 为电极面积 (cm^2),

n 为电子转移数, 此时 $n=2$ ^[12], F 为法拉第常数。

由 $i-c$ 的线性关系, 可得 D 为 $1.17 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

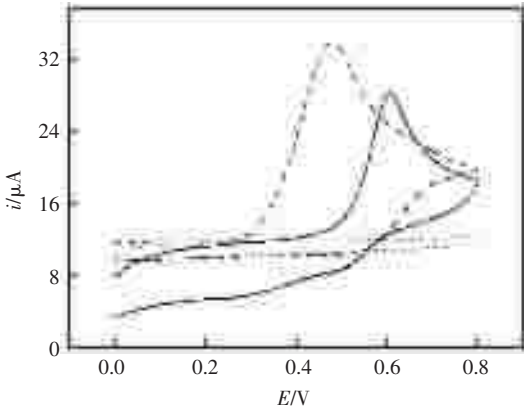


图3 裸玻碳电极(实线)与聚(SFR)修饰电极(虚线及点线)在 UA(实线,虚线)及空白溶液(点线)中的循环伏安曲线

UA 浓度: 8.0×10^{-4} mol/L; pH4.4; 扫描速度: 50 mV/s
 Fig.3 CVs at bare GC electrode (solid line) and poly(SFR) electrode (dot and dash line) in the presence (solid and dash line) and absence (dot line) of UA solution; Concentration: 8.0×10^{-4} mol/L; pH4.4; scan rate: 50 mV/s

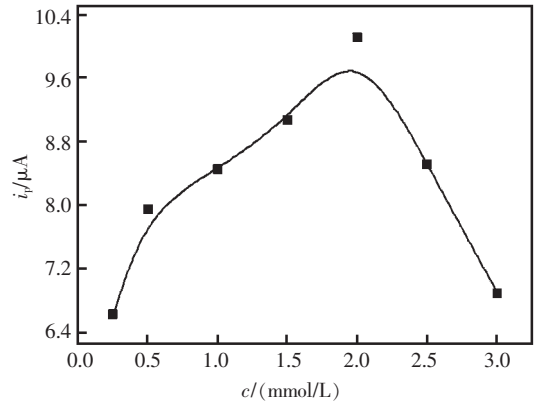


图4 SFR 聚合浓度对 UA 测定的影响
 SFR 聚合圈数: 10, UA 浓度: 4.0×10^{-4} mol/L

Fig.4 Effect of SFR concentration on determination of UA; Cycle number of SFR: 10; concentration: 4.0×10^{-4} mol/L

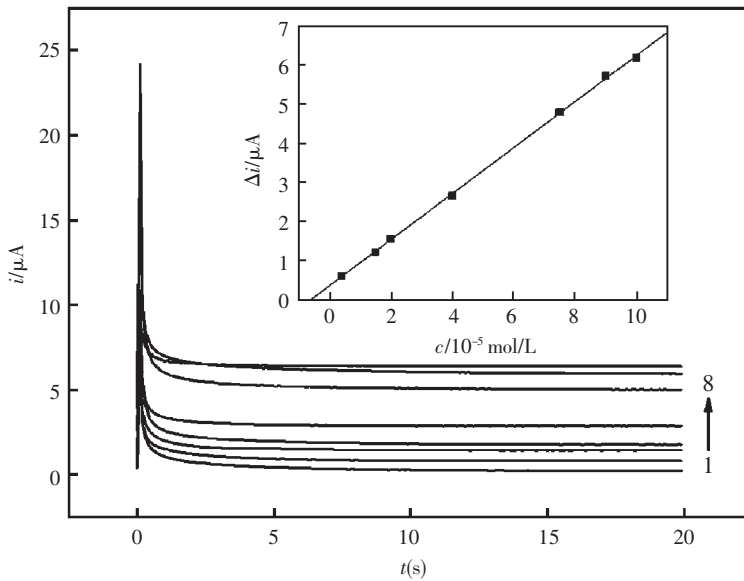


图5 UA 不同浓度的计时电流曲线

UA 浓度 (10^{-5} mol/L): (1) 0, (2) 0.4, (3) 1.5, (4) 2.0, (5) 4.0, (6) 7.5, (7) 9.0, (8) 10; 内置图为 UA 的线性关系
 Fig.5 Chronoamperograms of UA at different concentrations. Concentration of UA (10^{-5} mol/L): (1) 0, (2) 0.4, (3) 1.5, (4) 2.0, (5) 4.0, (6) 7.5, (7) 9.0, (8) 10, respectively; The inset is the plot of anodic peak currents to the corresponding concentrations of UA

表1 不同方法测定 UA 的线性情况

Tab.1 Linear relationship of UA determination by various methods at poly(SFR) electrode

方法	线性方程 ($i_p; 10^{-6}$ A)	线性范围 (mol/L)	检出限 (mol/L)
CV	$i_p = 0.7282 + 2.3882c$ ($r: 0.9984, c: 10^{-4}$ mol/L)	$2.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-4}$	1.7×10^{-6}
DPV	$i_p = 0.4886 + 3.1116c$ ($r: 0.9993, c: 10^{-4}$ mol/L)	$6.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$	4.5×10^{-6}
	$i_p = 3.9056 + 1.1423c$ ($r: 0.9963, c: 10^{-4}$ mol/L)	$2.0 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-4}$	1.2×10^{-5}
$i \sim t$	$i_p = 0.3573 + 0.5874c$ ($r: 0.9998, c: 10^{-5}$ mol/L)	$4.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$	3.0×10^{-5}

2.6 SFR 聚合膜的稳定性

在 3.0×10^{-4} mol/L 的 UA 溶液中考察了聚(SFR)膜的稳定性。20 次连续测定之后,UA 峰电流的改变在 4% 之内,将此修饰电极置于磷酸缓冲溶液(pH7.0)中 60 天后,仍保留 92% 的电催化活性。以上结果均表明此聚合物膜有着很好的稳定性。

2.7 干扰物测定

研究了各种干扰物对浓度为 3.0×10^{-4} mol/L UA 测定的影响。在相对误差 5% 的限度之内,200 倍的 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 、 Mg^{2+} ,30 倍的 L-赖氨酸、葡萄糖、L-天门冬酰胺,20 倍的谷氨酸、甘氨酸、胱氨酸,10 倍的 NADH 对于测定不产生干扰,说明此修饰电极有很好的选择性。

2.8 样品测定

利用 SFR 聚合膜电极对尿液中的 UA 进行了测定。将样品稀释 100 倍,用差分脉冲法对四个稀释后样品的测定结果如表 2 所示。根据测定结果及稀释倍数可得样品中尿酸的含量为 3.2×10^{-3} mol/L。

表 2 尿酸注射液中 UA 的测定结果

Tab.2 Results for the determination of UA in human urine samples

样品	加入量 (10^{-5} mol/L)	测定值* (10^{-5} mol/L)	回收率(%)
1	—	3.2	—
2	2.0	5.1	98.1
3	3.0	6.3	102

* 五次测定平均值

参考文献

- [1] Thiagarajan S, Chen S M. Preparation and characterization of PtAu hybrid film modified electrodes and their use in simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid [J]. Talanta, 2007, 74: 212~222.
- [2] Behera S, Raj R. Mercaptoethylpyrazine promoted electrochemistry of redox protein and amperometric biosensing of uric acid [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23: 556~561.
- [3] Liu A H, Honma I, Zhou H S. Simultaneous voltammetric

detection of dopamine and uric acid at their physiological level in the presence of ascorbic acid using poly (acrylic acid)-multiwalled carbon-nanotube composite-covered glassy-carbon electrode[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23: 74~80.

- [4] Wang G F, Meng J, Fang B. Determination of uric acid in the presence of ascorbic acid with hexacyanoferrate lanthanum film modified electrode [J]. Electrochim acta, 2008, 53: 2 837~2 843.
- [5] Ohsaka T, Koichiro T. Electrocatalysis of poly (thionine)-modified electrodes for oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide [J]. J Chem Soc Chem Commun, 1993, 2: 222~224.
- [6] Komura T, Ishihara M. Charge-transporting properties of electropolymerized phenosafranin in aqueous media [J]. J Electroanal Chem, 2000, 493: 84~92.
- [7] Zhou D M, Sun J J. Electrochemical polymerization of toluidine blue and its application for the amperometric determination of β -D-glucose [J]. Electrochim Acta, 1998, 43: 1 803~1 809.
- [8] Selvaraju T, Ramaraj R. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and serotonin at poly (phenosafranin) modified electrode [J]. Electrochem Commun, 2003, 5: 667~672.
- [9] Kearney P C, Mizoue L S. Molecular recognition in aqueous media. New binding studies provide further insights into the cation- π interaction and related phenomena [J]. J Am Chem Soc, 1993, 115: 9 907~9 919.
- [10] Li J, Lin X Q. Electrodeposition of gold nanoclusters on overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode and its application for the simultaneous determination of epinephrine and uric acid under coexistence of ascorbic acid [J]. Anal Chim Acta, 2007, 596: 222~230.
- [11] Li N B, Kwak J Y. Characterization and electrocatalytic properties of Prussian blue electrochemically deposited on nano-Au/PAMAM dendrimer-modified gold electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23: 1 519~1 526.
- [12] Niu L M, Luo H Q, Li N B. Electrochemical Behavior of Uric Acid at a Meso-2,3-Dimercaptosuccinic Acid Self-Assembled Gold Electrode [J]. Instrument Sci Tech, 2007, 35: 59~73.

《化学传感器》征稿启事

《化学传感器》是经国家科委批准,由中国仪器仪表学会主办的专业科技刊物。1981年创刊,国内外公开发行,国内统一刊号 CN32-1406/TP,国际标准刊号 ISSN1008-2298,本刊的主要任务是交流有关化学传感器的研制、理论研究、在各个领域的应用、仪器及与微机联用技术等方面的学术论文,促进化学传感器在各生产科技部门的普及与推广应用。是冶金、地质、卫生防疫、环境保护、食品检验、生理医学、化工、农业、国防、科研、大专院校等一切从事化学分析、工业过程控制与自动检测的科技工作者的理想工具,得力助手。

1 征稿内容

a. 化学及生物传感器进展评述; b. 化学传感技术基础理论; c. 新型敏感材料; d. 新型化学传感器研究(离子敏、气敏、光敏、生物敏、温敏、热敏、电化学压电晶体及表面声波、基于微生物技术的薄膜及厚膜传感器等); e. 化学传感器在各领域的新应用; f. 敏感器件制造技术; g. 传感器的信号处理; h. 化学传感器的产业化; i. 化学传感器测量仪与自动控制系统。

2 投稿须知(为使来稿格式符合国家科技期刊格式标准,特向广大作者提出相关要求,请务必配合)

2.1 来稿一律用电子邮件(附件)发送到 chxj.jy@public.tz.js.cn(同时抄送至 chxj.jy@163.com)。稿件以文本(*.TXT)或 WORD(*.DOC)格式存贮发送,邮件中附上作者的详细联系方式和通讯地址。来稿不退,请作者自留底稿。

2.2 请勿一稿两投。编辑部收稿后,10天内发出收稿通知。来稿审阅一般需2个月时间,3个月以上未收到本部的处理意见者,作者可自行改投他刊。

2.3 计量单位一律采用国家法定计量单位。各种符号应符合国家标准(所有的字母和符号必须分清大小写、正斜体、上下角)。

2.4 本刊不发表涉及保密的稿件,涉及者应有单位证明。作者对来稿文责自负。

2.5 稿件要求论点明确、内容充实、条理清楚、术语准确、文字精练、数据可靠、文字、标点使用规范。论文应以第三人称写出,文中不应出现“本文、我们、作者”之类的词语。

2.6 稿中作者不止一位时,请确定一位联系人(姓名右上角加*号),注明地址、邮政编码、电话及E-mail地址。

2.7 基金项目指文章产出的资助背景,项目名称应按国家有关部门规定的正式名称填写;多项基金项目应依次列出,中间用“;”隔开,每个项目后给出编号,用()括起。写在论文首页下方。

2.8 中文题名不应超过20个汉字。并应译成相对应的英文题名,英文题名仅仅第一单词的第一字母大写。

2.9 中国作者的英译名用汉语拼音,姓氏首字母大写;名字首字母大写,双名中间加“-”。不同工作单位的,在姓名的右上角加注阿拉伯数字序号,中间用“;”隔开。所有作者的工作单位,均应包括单位名称(院校给到系),所在省、市名及邮政编码。多作者的工作单位名称之前加与作者姓名序号相同的数字,工作单位的英译文给出全称,不能用缩写词(系名除外)。还应在邮政编码之后加“,China”。

2.10 中文摘要为200~300字。摘要的内容应包括目的、方法、结果和结论;综述文章可写指示性摘要。英文摘要应与中文相对应。中文摘要前加“摘要:”;英文摘要前加“Abstract:”。

2.11 关键词:3~8个关键词,中间用“;”隔开。中、英文关键词应一一对应。中文前冠以“关键词:”,英文前冠以“Key words:”。

2.12 文章中的图表及公式

2.12.1 每篇文章的图表一定要有图序、图题、表序、表题,并要有对应的英译文(图释或说明语只标出中文并排在图题之上)。

2.12.2 坐标图四周加方框,纵坐标的标值线在左竖线框内,横坐标在下横线框内。方框的左侧和下侧分别标出该坐标的物理量名称、符号和单位。表格用三线表(只有三条横线,没有竖线)。

2.12.3 公式中的符号第一次出现时,应加注表示的物理意义(物理量符号在式中、图表中、正文中均使用斜体);并应加注单位(单位用正体标出)。

2.13 参考文献

2.13.1 作者,三名以内的,全部列出;超过三名时,只列出三名,中间皆用逗号分开,后面加“等.”。

2.13.2 非正式出版物不宜列入参考文献。“论文集”无出版地,出版者,不可作为参考文献。

2.13.3 参考文献中的作者,应姓在前,名在后,姓后不加逗号,缩写字不加缩写点。

2.13.4 参考文献在正文中标出引用位置。用方括号标在引用词语末的右上方。

2.13.5 参考文献类型及其标识:

2.13.5.1 参考文献类型及其标识:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

2.13.5.2 对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识采用单字母“A”;对于其他未说明的文献类型,采用单字母“Z”。

2.13.5.3 对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

2.13.5.4 电子文献的载体类型及其标识

对于非纸张型载体的电子文献,当被引用为参考文献时需参考文献类型标识中同时标明其载体类型。请采用双字母表示电子文献载体类型:磁带(magnetic tape)——MT,磁盘(disk)——DK,光盘(CD-ROM)——CD,联机网络(online)——OL,并以下列格式表示包括了文献载体类型的参考文献类型标识:

[文献类型标识/载体类型标识]

如:[DB/OL]——联机上数据库(database online)

[DB/MT]——磁带数据库(database on magnetic tape)

[M/CD]——光盘图书(monograph on CD-ROM)

[J/OL]——网上期刊(serial online)

[EB/OL]——网上电子公告(electronic bulletin board online)

2.13.6 文后参考文献编排格式:(格式中的符号,必须严格使用括号中的符号)

a. 专著、论文集、学位论文、报告

[序号] 作者名(.) 文献题名 {专著([M]); 论文集([C])} (.) 出版地(:) 出版者(,) 出版年(.) 起止页码(.)

[序号] 作者名(.) 文献题名 {学位论文([D]); 报告([R])} (.) 收藏地(:) 收藏者(,) 出版年(.) 起止页码(.)

b. 期刊文章

[序号] 作者名(.) 文章名([J].) 期刊名(,) 年(,) 卷(期)(,) 起止页码(.)

c. 论文集中析出的文献

[序号] 析出文章作者(.) 析出文章名([A].) 原主要责任者(任选)(.) 原文献题名([C].) 出版地(:) 出版者(,) 出版年(.) 析出文献起止页码(.)

d. 报纸文章

[序号] 作者名(.) 文章名([N].) 报纸名(,) 出版日期(版次)(.)

e. 国际、国家标准

[序号] 标准编号(,) 标准名称([S].)

f. 专利

[序号] 专利所有者(.) 专利题名([P].) 专利国别(:) 专利号(,) 出版日期(.)

g. 电子文献

[序号] 作者名(.) 电子文献题名 [电子文献及载体类型标识] (.) 电子文献的出处或可获得的地址(,) 发表或更新日期/引用日期(任选)(.)

本刊地址:江苏省姜堰市八二二信箱(姜堰大道66号)

电话:0523-88819706

http://www.jiangfen.com.cn

邮政编码:225500

传 真:0523-88819768

E-mail: chxj.jy@public.tz.js.cn

《化学传感器》征订启事

《化学传感器》是经国家科委批准,由中国仪器仪表学会主办的专业科技刊物,1981年创刊,国内外公开发行,国内统一刊号 CN 32-1406/TP,国际标准刊号 ISSN 1008-2298。本刊的主要任务是交流有关化学传感器的研制、理论研究、在各个领域的应用、仪器及与微机联用技术等方面的学术论文、促进化学传感器在各生产科技部门的普及与推广应用。是冶金、地质、卫生防疫、环境保护、食品检验、生理医学、化工、农业、国防、科研、大专院校等一切从事化学分析、工业过程控制与自动检测的科技工作者的理想工具,得力助手。得到了广大化学分析科技工作者及有关大专院校师生的热情支持和好评。

本刊每年出版四期,每期定价 5.00 元、全年 20.00 元(内含邮费),欢迎单位及个人订阅。本刊各期刊物尚有少量库存,需要者可来函补订。

邮局汇款:225500 江苏省姜堰市八二二信箱《化学传感器》编辑部 收

银行汇款:收款单位:江苏江分电分析仪器有限公司(注明汇款用途)

开户银行:中国银行姜堰市支行 帐号:17417408091001

电话:0523-88819706 传真:0523-88819768

<http://www.jiangfen.com.cn> E-mail:chxj.jy@public.tz.js.cn

本刊已参加“全国非邮报刊联合征订”,并入编《全国非邮发报刊联合征订目录》。联订服务部在国际互联网上的网站现已开通(网址:www.lhzd.com),《联订目录》及本刊均已上网,欢迎上网查阅期刊、下载“电子订单”并订阅期刊。

《化学传感器》编辑部