

电化学发光免疫传感器研究进展

毛俐^{1,2}, 袁若^{1*}, 杨霞¹, 袁世蓉¹, 廖玉红¹, 牛欢¹, 刘慧静¹, 曹雅玲¹, 甘贤雪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. 西华师范大学化学化工学院, 化学合成与污染控制四川省重点实验室, 四川南充 637002)

摘要: 电致化学发光在免疫分析、酶分析和适配体传感器等方面有广泛的应用。许多电致化学发光体系如光泽精、联吡啶钌、鲁米诺和量子点等纷纷应用于生物传感器构建。该综述按照发光体系分类,就各发光体系在免疫传感器中的应用进行了简要介绍,并初步展望了今后几年电致化学发光免疫传感器的研究趋势。

关键词: 电致化学发光; 免疫传感器; 联吡啶钌; 鲁米诺; 量子点

Progress in electrochemiluminescence immunosensor

Mao Li^{1,2}, Yuan Ruo^{1*}, Yang Xia¹, Yuan Shi-rong¹, Liao Yu-hong¹, Niu Huan¹,

Liu Hui-jing¹, Cao Ya-ling¹, Gan Xian-xue¹

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

(2. Chemical Synthesis and Pollution Control Key Laboratory of Sichuan Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: ECL systems have been extensively employed in the regions of immunoassay, enzyme and aptamer. Some luminophores, such as lucigenin, tris (2,2-bipyridyl) ruthenium, luminol and quantum dots, have been used to fabricate the biosensors. In this review, the progress in electrochemiluminescence immunosensor has been summarized as the classification of luminophores, and the future research trends have been proposed.

Key words: electrochemiluminescence; immunosensor; tris(2,2-bipyridyl) ruthenium; luminol; QDs

0 引言

电致化学发光 (Electrogenerated chemiluminescence), 也称电致化学发光(Electrochemiluminescence), 简称 ECL, 是通过电极对含有化学发光物质的体系施加一定的电压或通过一定的电流, 电极氧化还原产物之间或电极氧化还原产物与体系其它共存物质之间发生化学反应并生成某种不稳定的中间态物质, 该物质分解而产生的化学发光现象。电致化学发光技术是电化学与化学发光相结合的检测技术, 该技术既集成了发光与电化学分析技术的优点, 又具有二者结合产生的可

控性、选择性、重现性好、灵敏度高、检测限低及动力学响应范围宽等新优势^[1-3]。

电致化学发光免疫传感器是一种将电致化学发光技术与免疫学分析方法相结合而发展起来的具有高灵敏度、高选择性、低背景等特点的生物传感器。其以免疫抗原抗体生物分子作为识别元件, 通过固定化技术将免疫蛋白结合到感受器(电极)表面, 当抗体分子超变区与抗原决定簇发生特异的免疫识别反应后, 生成的免疫复合物与产生的电致化学发光信号相关联, 由换能器转化这些与待测分析物浓度(或活度)相关的信号, 再通过二次仪表放大输出, 从而实现对待测免疫

基金项目: 国家自然科学基金(Nos. 21075100)、教育部重点项目(Nos. 708073)资助

* 通讯联系人, E-mail: yuanruo@swu.edu.cn

分子的定量检测。20世纪70年代之前,有关 ECL 免疫传感器的研究发展缓慢。80年代以后,大量有机化合物、无机化合物甚至半导体纳米材料等新型电致化学发光活性物质被合成。寻找新的高量子产率电致化学发光试剂或修饰这些发光试剂分子以用于生物分子标记成为合成并研究这些新型发光试剂的源动力^[2-3]。近代临床医学对疾病标志物免疫分子快速、灵敏的检测要求,极大的推动了信号放大型的电致化学发光免疫传感器的研究。且随着生物技术和纳米材料技术的迅速发展,利用化学、材料及生物等多种技术特异性地转化并放大与免疫反应有关的检测信号,成为电致化学发光免疫传感器的重要研究方向。

1 电致化学发光主要发光体系

电致化学发光体系归纳起来主要分为三大类:无机化合物发光体系,有机化合物发光体系和半导体纳米材料发光体系。

1.1 无机金属配合物电致化学发光体系

很多无机金属的配合物和团簇分子都显示出做为 ECL 发光体必需的电化学和光学性质,其中包括 Ag、Al、Au、Cd、Cr、Cu、Eu、Hg、Ir、Mo、W、Os、Pd、Pt、Re、Ru、Si、Tb、Tl 等^[3]。Ru(bpy)₃²⁺及其衍生物由于具有发光效率高、在室温的水或非水溶剂中稳定性好及在较低电位下单电子转移过程可逆等光化学和电化学优点,在电致化学发光体系及生物分析中的研究最为广泛^[4-6]。

1.2 有机化合物电致化学发光体系

有机化合物的电致化学发光反应体系主要有三大类:(1)以 9,10-二苯基蒽(DPA)及光泽精(DMBADN)为代表的稠环芳烃类(PAHs)化合物体系;(2)以鲁米诺为代表的酰肼类化合物体系;(3)以三键桥联喹啉或异喹啉的电子接受体和芳环的电子给予体为代表的电子给体-受体型化合物体系。以苯蒽和氮蒽(吡啶)为代表的稠环芳烃类化合物水溶性差,其电致化学发光反应要求在除氧和除杂的非水介质如:乙腈、四氢呋喃等中进行,其机理是通过在质子惰性的溶剂中自由基湮灭产生电致化学发光,所以该类型反应在分析应用尤其是生物分子分析上受到很大限制^[2]。近年来,仅有以光泽精(N,N'-二甲基-9,9-双)为代表的

吡啶酯类化合物在过氧化氢存在下也表现出了 ECL 活性,并被用于检测核黄素、人绒毛膜促性腺激素及卟啉铁等^[7-10]。酰肼类电致化学发光化合物以鲁米诺(Luminol)及其衍生物为代表,具有发光效率高、试剂稳定及反应可在水相中进行等特点,其 ECL 机理研究已十分成熟。Luminol 发光需在碱性条件下且有共反应物 H₂O₂ 存在时才能进行^[11]。由于 H₂O₂ 和溶解氧都能增强 Luminol 的 ECL 信号,又是生物体内许多底物(如葡萄糖、胆碱和乳酸等)及其相应酶的代谢产物,因此 Luminol-H₂O₂ 体系的酶促 ECL 反应是分析检测生物酶反应底物的有效方法^[12-14]。电子给体-受体型化合物由于水相发光不稳定而极少用于生物分析中。

1.3 半导体纳米材料发光体系

半导体纳米材料(NPs),也称纳米晶或量子点(quantum dots, QDs)。2002年首次报道了 SiNPs 在乙腈溶液中的自身湮灭发光和与共反应试剂 C₂O₄²⁻、S₂O₈²⁻的电致化学发光^[15]。除了单一元素半导体材料,如:Si 和 Ge 具有电致化学发光性质之外,许多半导体化合物,如: CdS、CdSe 和 CdTe 也可以产生电致化学发光。半导体纳米颗粒修饰层固相 ECL 的研究还包括 PbSe^[16]、分子有机相中的单层 CdSe^[17]、CdSe/ZnS^[18]、ZnS/CdSe 及 CdSe/CdS 的核壳型修饰层^[19]。因为半导体的纳米颗粒可以应用在光电子系统或作为未来纳米电子设备的一部分,所以这些半导体纳米颗粒固相修饰层的 ECL 研究对生物传感器构建极为重要。

2 电致化学发光体系在免疫传感器中的应用

将免疫分析法与高灵敏的传感技术相结合构建快速、灵敏、选择性高、操作简便的免疫传感器,可使抗体或抗原固定在固体基质上,通过异相反应从复杂组分中富集抗原或抗体,让固定化的免疫敏感膜发生信号变化,达到检测特定抗原或抗体的目的。近年来,利用电致化学发光的高灵敏、高特异及操作简单等优势,构建免疫传感器成为当前研究的热点课题之一。在众多电致化学发光体系中,仅有少数在水相中有较高量子产率且发光稳定的发光试剂,如:联吡啶钌及其衍生物,鲁米诺(Luminol),量子点(QDs)等,被用做生

物探针用于免疫传感器构建。

2.1 基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 及其衍生物的 ECL 免疫传感器

联吡啶钌及其衍生物的电致化学发光免疫传感器是第一个用于商业应用的 ECL 免疫传感器。由于激发态 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在近电极表面可发射一个光子而生成基态 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, 因此一个 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 分子可参与多个 ECL 反应循环, 从而产生多个光子增加灵敏度并降低检测限。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 是这类 ECL 免疫传感器中最常用的发光体系。鉴于联吡啶钌及其衍生物水溶性好, 分子结构无官能团可共价交联而难于固载的特点, 磁头固载一抗, Ru 信号物标记二抗的夹心

免疫检测模式, 是该类传感器在商业检测中的主要模式^[20]。衍生物 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -N 羟基琥珀酸胺酯 (NHS) 共价交联或聚苯乙烯微球吸附 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 是这类模式中二抗的主要方式^[21-23]。通过磁性微头固载抗体结合抗原, 最后夹心式固相结合已标记信号物的二抗以分离并冲洗掉未标记的 ECL 信号物, 可实现低非特异性吸附的 ECL 免疫检测。与肿瘤、生育激素、甲状腺功能、心脏功能、肝炎、骨髓、老年痴呆、贫血病、糖尿病及传染病等相关的标志物检测, 是应用该类 ECL 免疫传感器较为活跃的研究领域^[24-27]。近年来, 用 ECL 发光剂标记二抗进行相关免疫分析列于表 1 中。

为进一步在传感器界面特异性放大与免疫

表 1 分析物浓度与 ECL 发光标记物相关的免疫测定
Tab.1 Assays That Relate Emitter to Analyte Concentration

Analyte	Detection method	Ref
AFP	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[28]
anti-Borna disease antibodies	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[29]
cancer antigen 15-3	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[30]
cancer antigen 19-9	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[27]
cancer antigen 72-4	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[31]
cancer antigen 125	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[32]
carcinoembryonic antigen	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[27]
anti-CMV antibodies	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[33]
FSH, follitropin	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[34]
HCG	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[35]
HBsAg, hepatitis B virus surface antigen	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[36]
HIV 1 p7 antigen	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[37]
IgE, immunoglobulin E	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[38]
Legionella antigen	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{triethylamine}$	[39]
prostate-specific antigen	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$	[39]

反应相关的电致化学发光信号, 纳米材料、酶催化、生物放大等技术先后应用到基于联吡啶钌及其衍生物的电致化学发光免疫传感器中。Zhou 和 Roovers^[40] 设计合成了树枝状的联吡啶钌衍生物标记抗体, 以提高 ECL 信号分子标记量, 减少标记位点, 该方法有效避免了多位点标记引起的蛋白失活, 在检测信号上有明显提高。Miao 和 Bard^[41] 及汪尔康研究组^[42] 分别将生物素/亲和素多位点耦联应用到以 Ru -NHS 为二抗标记物的电致化学发光免疫传感器中, 利用生物放大技术增加免疫结合信号标记物数量, 实现 ECL 免疫

检测信号的特异性放大。Yin 等^[43] 用共反应试剂 4-二甲基胺丁酸(DMBA)标记 BSA 和 anti-IgG 抗体分子制备夹心式免疫传感器, 通过生物素/亲和素定向连接和纳米金颗粒放大一抗固载量, 以提高免疫结合共反应试剂标记物 DMBA 的数量, 增强传感器在 1 mmol/L 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 底液中的 ECL 响应, 其灵敏度比同类型免疫传感器提高了 6~10 倍。Deiss 等^[22] 将生物素/亲和素定向标记联吡啶钌于二抗构建的电致化学发光免疫传感器与电子显微镜技术结合可进一步实现电致化学发光的可视化免疫分析。

随着纳米材料技术的发展,越来越多的研究者将纳米标记技术应用到电致化学发光免疫传感器中。如:由油水微乳相法合成的 SiO_2 纳米颗粒(SiNPs)是典型的油包水结构,其内层可包埋大量水溶性 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 分子,外表面则含有带负电荷的羟基,可与蛋白分子上的羧基酯化交联用于固载或标记生物分子。汪尔康研究组^[44]首先合成了联吡啶钌掺杂 SiO_2 包裹多壁碳纳米管($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -doped SiO_2 @MWNTs)的管状复合纳米材料,用于固载联吡啶钌,表现出很好的稳定性。随后,用油水微乳相法合成出 SiO_2 包埋联吡啶钌(SiRu)的球形纳米颗粒^[45],通过层层自组装修饰生物分子到该纳米颗粒表面并研究其表面 ECL 性质变化。刘松琴课题组^[46]与袁若研究小组^[47-48]先后将这一 SiRu 纳米颗粒用做标记材料标记二抗构建 ECL 免疫传感器,用于检测不同的抗原 AFP 和小鼠 IgG。与单分子标记相比, SiRu 纳米颗粒可包埋大量 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记于二抗分子上,因而放大了 ECL 响应信号。此外,利用纳米材料表面掺杂也可结合联吡啶钌及其衍生物,从而放大信号物标记量。Sun 等^[49]通过在负电荷的 Pt 纳米溶胶中滴加正电荷联吡啶钌,利用静电结合使纳米溶胶沉降并将联吡啶钌吸附在 Pt 纳米材料上(Pt@Ru)以固载联吡啶钌,取得较好的效果。袁若课题组^[50-51]随后将这一 Pt@Ru 纳米颗粒用于构建固相电致化学发光免疫传感器,分别通过直接法和夹心法先后实现对 AFP 及人 IgG 抗原的定量检测。

脂质体是由磷脂双分子层组成的,内部为水相的密闭双分子单层或多层囊泡。其合成粒径可控,脂质体膜内水相可包埋或吸附大量信号物质或其它生物识别分子。将脂质体引入免疫传感器,可以放大免疫反应信号,提高免疫分析灵敏度,有效避免非特异性吸附干扰,增强免疫反应的选择性。Zhan 和 Bard^[52]将联吡啶钌的衍生物包裹在粒径为 100 nm 左右的脂质体中用于标记二抗,通过夹心免疫反应结合到电极表面后,直接将联吡啶钌释放到含共反应试剂的底液中检测,从而实现人 C 反应蛋白的定量测定。Egashira 等^[53]用免疫脂质体包裹联吡啶钌结合到传感器表面后,再溶胞释放加热收集用于检测。脂质体增加了标记到二抗的联吡啶钌分子数量,特异性

放大了免疫分析信号。袁若课题组^[54]随后将这一免疫脂质体技术与适配体识别小分子技术相结合,利用脂质体包埋并放大可卡因小分子数量构建免疫检测平台,溶胞释放小分子后用适配体特异性收集结合可卡因小分子到近电极表面增强联吡啶钌的 ECL 信号,通过检测小分子可卡因浓度,间接实现对抗原浓度的测定。该方法通过脂质体包埋和适配体近电极表面键合共反应剂底物实现了 ECL 检测信号的多级放大,增强了检测的特异性,对心衰标志物 NT-proBNP 检测,其检测限可达 0.77 pg/mL。

酶催化用于联吡啶钌类免疫传感器的研究相对较少,Zhang 等^[55]利用乙醇脱氢酶(ADH)催化乙醇与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)反应生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),NADH 可与联吡啶钌的氧化态反应生成激发态,因而可增强联吡啶钌发光,用于对乙醇小分子的检测。袁若课题组 Liao 等^[56]发展了由抗坏血酸酯在碱性磷酸酶的催化作用下在电极表面原位生成抗坏血酸增强联吡啶钌发光的反应,构建电致化学发光适体传感器用于凝血酶蛋白的测定,检出限为 0.33 fmol/L,达到了超痕量级。

2.2 基于 Luminol 及其衍生物的 ECL 免疫传感器

Luminol 及其衍生物的分子结构上有氨基等官能团,其既易于固载,又易于与蛋白分子的羧基共价交联而标记到抗原抗体等免疫蛋白分子上,所以基于 Luminol 及其衍生物发光的 ECL 免疫传感器研究成为 ECL 免疫传感器中的一个重要分支。

基于 Luminol 电化学发光的免疫分析最初采用均相电化学发光免疫分析法。1998 年,Marquette 和 Blum^[57]报道了将除草剂 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)固载在玻碳电极表面,以 Luminol 为发光标记物标记 anti-2,4-D 抗体,竞争免疫结合于电极表面后,在流动注射(FIA)系统中通过 H_2O_2 放大抗体上的 Luminol 的 ECL 信号并进行检测,从而测定 2,4-D 浓度。随后,张成孝课题组^[58]将小分子鲁米诺标记在小分子地高辛半抗原上,建立了地高辛抗体和地高辛的均相电化学发光免疫分析,克服了小分子电化学发光标记物标记在大分子抗体或抗原后发光效率严重

降低的问题。其后,又将电化学发光标记物和小分子半抗原地高辛标记在载体大分子蛋白质上,建立了多标记均相电化学发光免疫分析法^[59]。利用直接法测定地高辛标记抗体,竞争免疫法测定小分子半抗原地高辛^[60]。

此外,还有许多的研究集中在 Luminol 及其衍生物类的固相电致化学发光免疫传感器方面。1999年,Arai等^[61]报道了 Luminol 的衍生物 N-丁基胺-N-乙基鲁米诺(ABEI)为 ECL 标记物标记 anti-hIgG,以碳纤维电极为敏感界面,在含 H₂O₂ 的 FIA 系统中,检测 hIgG 的 ECL 免疫传感器。张成孝课题组^[62]将 ABEI 标记抗体检测 hIgG 的 ECL 免疫检测方法发展到纳米金颗粒修饰的石蜡灌注石墨电极表面,制备固相 ECL 传感器直接在底液中检测,简化了装置,并用纳米颗粒进一步放大信号,降低了检测限。陈国南等^[63]合成新型的钛酸盐纳米管用固载胆碱氧化酶,利用胆碱在胆碱氧化酶作用下生成 H₂O₂ 催化均相鲁米诺底液的电致化学发光,从而实现样品中生物分子胆碱浓度的测定。

2.3 基于量子点的 ECL 免疫传感器

由于量子点表面可通过配位连接或聚合物修饰等方式包覆上有机分子或生物大分子,所以量子点(QDs)常做为生物探针应用到酶、抗原抗体、小分子键合蛋白和适配体的生物传感器中^[64]。从 2004 年鞠焜先研究小组^[65]首次构建出量子点 ECL 传感器并成功地用于 H₂O₂ 检测以来,基于 QDs 的 ECL 传感器以其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单、操作方便、分析快速等优势,成为电分析化学中一个十分活跃的研究领域。

量子点的 ECL 性质受颗粒表面状态影响较大,利用生物蛋白分子在表面包覆会导致量子点 ECL 淬灭,研究者构建了一系列直接型的 ECL 免疫传感器。其原理是将量子点通过静电结合或共价连接等方式固载在电极表面,修饰上抗体后,利用抗原抗体免疫复合物阻碍固相中量子点与底液中共反应试剂 S₂O₈²⁻ 的反应,从而使量子点 ECL 淬灭,ECL 淬灭程度与免疫结合上的抗原浓度相关。朱俊杰、陈洪渊研究小组^[66]将半胱氨酸接枝的 CdS 固载在纳米金颗粒覆盖的电极表面,通过半胱氨酸共价结合抗体 apoB-100,直接检测

抗原,其检测限达 6 pg/mL。用同样的方法固载 CdSe 量子点^[67],并用于人血清蛋白(PAB)检测,其检测限达 0.01 ng/mL。在随后的研究中,他们用不同的方法掺杂碳纳米管(CNTs)于固相固载的量子点 CdSe 薄膜中,以增强量子点的 ECL 强度,提高蛋白检测的灵敏度。如:用壳聚糖分散的碳纳米管(CNT-CHIT)吸附 CdSe 量子点固载于金电极表面,通过 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APS)用戊二醛共价交联抗体 anti-IgG,构建 ECL 免疫传感器用于检测人 IgG,检测限达 1 pg/mL^[68];用聚甲基二烯丙基氯化铵(PDDA)正电荷化 CNT-CdSe,结合纳米金,再结合抗体,通过 PDDA 和 nanoAu 对 CdSe 量子点 ECL 的双重增强作用放大信号提高检测灵敏度^[69]。此外,张书圣等^[70]将以上方法综合,用 PDDA 将 CNTs 正电荷化后,利用静电作用结合负电荷 CdS 量子点,以连接壳聚糖包裹的纳米金,固载抗体,检测抗原。

除了基于量子点的阴极发光检测外,近来鞠焜先等^[71]还提出了一种在+0.90 V 电位下(vs Ag/AgCl)下基于激发态 QDs 的阳极 ECL 被酪氨酸的电致氧化产物淬灭的检测方法。该方法旨在引入催化剂来加快传感器 ECL 反应速率,达到更快、更灵敏的检测效果。该传感器能在较低的阳极电势下通过结合微量酪氨酸酶催化循环反应来加速氧化产物产生和能量转移过程,极灵敏地检测较宽浓度范围内的酪氨酸,将检测限提高到了亚皮摩尔(subpicomolar)水平。

2.4 基于 S₂O₈²⁻ 的 ECL 免疫传感器

S₂O₈²⁻ 是 ECL 体系中常用的共反应剂之一,通常与发光试剂共反应增强光信号。但是,Kovalchuk 的工作小组发现了 S₂O₈²⁻ 水溶液在镁、银和铂电极表面有 ECL 现象,并且提出其可能机理为 S₂O₈²⁻ 被电化学还原为 SO₄⁻,当水溶液与 SO₄⁻ 这一强氧化态的中间体反应后产生发光物质,包括 ¹O₂ 和 ³O₂^[72]。到目前为止有大量的关于 S₂O₈²⁻ 水溶液 ECL 机理的研究,而将其用于生物分子检测的报道十分少见。问题的关键在于找到一种有效增强 S₂O₈²⁻ 水溶液阴极发光的方法,以放大信号构建传感器用于生物分子测定。袁若课题组^[73]利用半胱氨酸对 S₂O₈²⁻ 发光的增强作用,首次构建了基于 S₂O₈²⁻ 阴极电致化学发光的无标记型免疫传感器,用于甲胎蛋白的检测,为高灵

敏的 ECL 免疫分析开辟一片新领域。

3 展望

电致化学发光免疫传感器经过近三十年的发展,在新体系探索、信号放大、实际分析应用及与其它技术的结合等方面都取得了很大的进展。今后几年内电致化学发光免疫传感器的研究可能围绕以下几方面展开:(1)新的高效发光试剂的开发及在免疫传感器中的应用。尤其是半导体纳米材料类发光试剂的研究,由于半导体纳米颗粒可应用在光电子系统或作为微型电子设备的一部分,其可为免疫传感器的集成化、微型化打下坚实的基础,与微流控芯片分析结合将会在临床疾病标志物实时快速分析领域拥有广阔的应用前景;(2)多通道电致化学发光免疫传感器研究。电致化学发光拥有很宽的电压检测范围,且不同物质有不同的发光电压,很容易实现两种及其以上信号物 ECL 信号的同时检测,这对于构建多组分同时检测的免疫传感器极为有利。同时询证医学的发展必然会进一步推动这一 ECL 多组分免疫分析的研究;(3)电致化学发光与可视化分析技术(如:电子显微镜等)结合实现免疫检测的可视化分析。电致化学发光集成了电化学可控和光学可视的特性,电致化学发光分析仪与可视化装置结合对生物分子进行检测,将对分子水平的生物研究起到极大的推动作用。

参考文献

- [1] Miao W-J. Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications[J]. Chem. Rev., 2008, 108: 2 506 ~ 2 553.
- [2] Richter M M. Electrochemiluminescence(ECL) [J]. Chem. Rev., 2004, 104: 3 003 ~ 3 036.
- [3] 王晓英. 基于电致化学发光技术的纳米生物传感器的设计与研究[D] 上海: 华东师范大学博士学位论文, 2008. 1 ~ 2.
- [4] Zu Y B, Bard A J. Electrogenerated Chemiluminescence. 66. The Role of Direct Coreactant Oxidation in the Ruthenium Tris (2,2')bipyridyl/Tripropylamine System and the Effect of Halide Ions on the Emission Intensity [J]. Anal. Chem., 2000, 72: 3 223 ~ 3 232.
- [5] Ketter J B, Wightman R M. Tuning Emissive States in Electrogenerated Chemiluminescence. J [J]. Am. Chem. Soc., 2004, 126: 10 183 ~ 10 189.
- [6] Lai R-Y, Fleming J J, Merner B L, et al. Electrogenerated Chemiluminescence. 74. Photophysical, Electrochemical, and Electrogenerated Chemiluminescence Studies of Selected Nonplanar Pyrenophanes[J]. J. Phys. Chem. A, 2004, 108: 376 ~ 383.
- [7] Haapakka K E, Kankare J J. Electrogenerated chemiluminescence of lucigenin in aqueous alkaline solutions at a platinum electrode [J]. Anal. Chim. Acta, 1981, 130: 415 ~ 418.
- [8] Zhang C, Qi H. Highly sensitive determination of riboflavin based on the enhanced electro-generated chemiluminescence of lucigenin at a platinum electrode in a neutral aqueous solution [J]. Anal. Sci., 2002, 18: 819 ~ 822.
- [9] Lin J-M, Yamada M. Electrogenerated Chemiluminescence of Methyl-9-(p-formylphenyl) Acridinium Carboxylate Fluorosulfonate and Its Applications to Immunoassay[J]. Microchem. J., 1998, 58: 105 ~ 116.
- [10] Chen G N, Zhang L, Lin R-E, et. al. The electrogenerated chemiluminescence behavior of hemin and its catalytic activity for the electrogenerated chemiluminescence of lucigenin[J]. Talanta, 2000, 50: 1 275 ~ 1 281.
- [11] Haapakka K E, Kankare J J. Apparatus for mechanistic and analytical studies of the electrogenerated chemiluminescence of luminol [J]. Anal. Chim. Acta, 1982, 138: 253 ~ 262.
- [12] Zhu L-D, Li Y-X, Zhu G-Y. A novel flow through optical fiber biosensor for glucose based on luminol electrochemiluminescence [J]. Sensor. Actuat.B-chem., 2002, 86: 209 ~ 214.
- [13] Tsafack V C, Marquette C A, Leca B, et al. An electrochemiluminescence-based fibre optic biosensor for choline flow injection analysis [J]. Analyst, 2000, 125: 151 ~ 155.
- [14] Zhang G F, Chen H Y. Studies of poly(luminol) modified electrode and its application in electrochemiluminescence analysis with flow system [J]. Anal. Chim. Acta, 2000, 419: 25 ~ 31.
- [15] Ding Z, Quinn B M, Haram S K, et al. Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots [J]. Science, 2002, 296: 1 293 ~ 1 297.
- [16] Wehrenberg B L, Guyot-Sionnest P. Electron and hole injection in PbSe quantum dot films[J]. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125: 7 806 ~ 7 807.

- [17] Guyot-Sionnest P, Wang C. Light emission and amplification in charged CdSe quantum dots[J]. *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107: 7 355 ~ 7 359.
- [18] Hikmet R A M, Talapin D V, Weller H. Study of conduction mechanism and electroluminescence in CdSe/ZnS quantum dot composites [J]. *J. Appl. Phys.*, 2003, 93: 3 509 ~ 3 514.
- [19] Poznyak S K, Talapin D V, Shevchenko E V, et al. Quantum Dot Chemiluminescence [J]. *Nano Lett.*, 2004, 4: 693 ~ 698.
- [20] Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology[J]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7: 43 ~ 54.
- [21] Namba Y, Usami M, Suzuki O. Electrochemiluminescence immunoassay using the ruthenium chelate-labeled antibody bound on the magnetic micro beads [J]. *Anal. Sci.*, 1999, 15: 1 087 ~ 1 093.
- [22] Deiss F, LaFratta C N, Symer M, et al. Multiplexed sandwich immunoassays using electrochemiluminescence imaging resolved at the single bead level [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 6 088 ~ 6 089.
- [23] Miao W -J, Bard A J. Electrogenerated chemiluminescence 80. C-reactive protein determination at high amplification with $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ -Containing microspheres[J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 7 109 ~ 7 113.
- [24] Haese A, Dworschack R T, Piccoli S P, et al. Clinical Evaluation of the Elecsys Total Prostate-specific Antigen Assay on the Elecsys 1010 and 2010 Systems [J]. *Clin. Chem.*, 2002, 48: 944 ~ 947.
- [25] Seghaye M -C, Qing M, Bernuth G. Systemic inflammatory response to cardiac surgery: does female sex really protect[J]. *Crit. Care.*, 2001, 5: 280 ~ 282.
- [26] Kulmala S, Hakansson M, Spehar A -M, et al. Heterogeneous and homogeneous electrochemiluminoimmunoassays of hTSH at disposable oxide-covered aluminum electrodes[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 458: 271 ~ 280.
- [27] Collinson P O, Jorgensen B, Sylven C, et al. Recalibration of the point-of-care test for CARDIAC T Quantitative with Elecsys Troponin T 3rd generation [J]. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 307: 197 ~ 203.
- [28] Yilmaz N, Erbagci A B, Aynacioglu A S. Cytochrome P4502C9 genotype in Southeast Anatolia and possible relation with some serum tumour markers and cytokines [J]. *Acta Biochim. Pol.*, 2001, 48: 775 ~ 782.
- [29] Yamaguchi K, Sawada T, Yamane S, et al. Synthetic peptide-based electro-chemiluminescence immunoassay for anti-Borna disease virus p40 and p24 antibodies in rat and horse serum [J]. *Ann. Clin. Biochem.*, 2001, 38: 348 ~ 355.
- [30] Stiebler P, Molina R, Chan D W, et al. Evaluation of the Analytical and Clinical Performance of the Elecsys CA 15-3 Immunoassay[J]. *Clin. Chem.*, 2001, 47: 2 162 ~ 2 164.
- [31] Bruno J G, Kiel J L. Use of Magnetic Beads in Selection and Detection of Biotin Aptamers by Electrochemiluminescence and Enzymatic Methods [J]. *Biotechniques*, 2002, 32: 178 ~ 183.
- [32] Hubl W, Chan D W, Van Ingen H E, et al. Multicenter evaluation of the Elecsys CA 125 II assay[J]. *Anticancer Res.*, 1999, 19: 2 727 ~ 2 733.
- [33] Ohlin M, Silvestri M, Sundqvist V A, et al. Cytomegalovirus glycoprotein B-specific antibody analysis using electrochemiluminescence detection-based techniques[J]. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 1997, 4: 107 ~ 111.
- [34] Gassler N, Peuschel T, Pankau R. Pediatric reference values of estradiol, testosterone, luteinizing hormone and prolactin[J]. *Clin. Lab.*, 2000, 46: 553 ~ 560.
- [35] Ehrhardt V, Assman G, Baetz O, et al. Results of the multicentre evaluation of an electrochemiluminescence immunoassay for HCG on Elecsys 2010 [J]. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1998, 110: 61 ~ 67.
- [36] Weber B, Bayer A, Kirch P, et al. Improved detection of hepatitis B virus surface antigen by a new rapid automated assay[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37: 2 639 ~ 2 647.
- [37] de Baar M P, van der Horn K H M, Goudsmit J, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 in vitro and in vivo [J]. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37: 63 ~ 67.
- [38] Kobrynski L, Tanimune L, Pawlowski N A, et al. A comparison of electrochemiluminescence and flow cytometry for the detection of natural latex-specific human immunoglobulin E [J]. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 1996, 3: 42 ~ 46.
- [39] Yoon C -H, Cho J -H, Oh H -I, et al. Development of a membrane strip immunosensor utilizing ruthenium as an electro-chemiluminescent signal generator [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 19: 289 ~ 296.
- [40] Zhou M, Roovers J, Robertson G -P, et al. Multilabeling biomolecules at a single site. 1. Synthesis and characterization of a dendritic label for electrochemiluminescence assays[J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 6 708 ~ 6 717.

- [41] Miao W-J, Bard A-J. Electrogenerated Chemiluminescence. 72. Determination of Immobilized DNA and C-Reactive Protein on Au(III) Electrodes Using Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Labels[J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 5 825 ~ 5 834.
- [42] Fang L-Y, Lü Z-Z, Wang E-K, et al. Quantitative electrochemiluminescence detection of proteins: Avidin-based sensor and tris(2,2'-bipyridine) ruthenium(II) label[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1 645 ~ 1 651.
- [43] Yin X-B, Qi B, Sun X-P, et al. 4-(Dimethylamino)butyric acid labeling for electrochemiluminescence detection of biological substances by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 3 525 ~ 3 530.
- [44] Guo S-J, Wang E-K. A novel sensitive solid-state electrochemiluminescence sensor material: Ru(bpy)₃²⁺ doped SiO₂@MWNTs coaxial nanocable[J]. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 1 252 ~ 1 257.
- [45] Wei H, Liu J-F, Zhou L-L, et al. [Ru(bpy)₃]²⁺-Doped Silica Nanoparticles within Layer-by-Layer Biomolecular Coatings and Their Application as a Biocompatible Electrochemiluminescent Tag Material[J]. *Chem. Eur. J.*, 2008, 14: 3 687 ~ 3 693.
- [46] Qian J, Zhou Z-X, Liu S-Q, et al. Electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive detection of biomarker using Ru(bpy)₃²⁺-encapsulated silica nanosphere labels [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2010, 665: 32~38.
- [47] Yang X, Yuan R, Chai Y-Q, et al. Ru (bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles labeling for a sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25: 1 851 ~ 1 855.
- [48] Yuan S-R, Yuan R, Chai Y-Q, et al. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on Ru-silica@Au composite nanoparticles labeled anti-AFP [J]. *Talanta*, 2010, 82: 1 468 ~ 1 471.
- [49] Sun X-P, Du Y, Zhang L-X, et al. Pt Nanoparticles: Heat Treatment-Based Preparation and Ru(bpy)₃²⁺-Mediated Formation of Aggregates That Can Form Stable Films on Bare Solid Electrode Surfaces for Solid-State Electrochemiluminescence Detection [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 6 674 ~ 6 677.
- [50] Mao L, Yuan R, Chai Y-Q, et al. Potential controlling highly-efficient catalysis of wheat-like silver particles for electrochemiluminescence immunosensor labeled by nano-Pt@Ru and multi-sites biotin/streptavidin affinity [J]. *Analyst*, 2011, 136: 1 450 ~ 1 455.
- [51] Cao Y-L, Yuan R, Chai Y-Q, et al. A Solid-State Electrochemiluminescence Immunosensor Based on MWCNTs-Nafion and Ru(bpy)₃²⁺/Nano-Pt Nanocomposites for Detection of α -Fetoprotein [J]. *Electroanalysis*, 2011, 23: 1 418 ~ 1 426.
- [52] Zhan W, Bard A J. Electrogenerated Chemiluminescence. 83. Immunoassay of Human C-Reactive Protein by Using Ru(bpy)₃²⁺-Encapsulated Liposomes as Labels[J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 459 ~ 463.
- [53] Egashira N, Morita S, Hifumi E, et al. Attomole Detection of Hemagglutinin Molecule of Influenza Virus by Combining an Electrochemiluminescence Sensor with an Immunoliposome That Encapsulates a Ru Complex [J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 4 020 ~ 4 025.
- [54] Mao L, Yuan R, Chai Y Q, et al. Signal-enhancer molecules encapsulated liposome as a valuable sensing and amplification platform combining the aptasensor for ultrasensitive ECL immunoassay [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26: 4 204 ~ 4 208.
- [55] Zhang L-H, Xu Z-A, Sun X-P, et al. A novel alcohol dehydrogenase biosensor based on solid-state electrogenerated chemiluminescence by assembling dehydrogenase to Ru(bpy)₃²⁺-Au nanoparticles aggregates[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 1 097 ~ 1 100.
- [56] Liao Y-H, Yuan R, Chai Y-Q, et al. In-situ Produced Ascorbic Acid as Coreactant for an Ultrasensitive Solid-state Tris(2,2'-bipyridyl) Ruthenium(II) Electrochemiluminescence Aptasensor [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, doi:10.1016/j.bios.2011.04.019.
- [57] Marquette C A, Blum L J. Electrochemiluminescence of luminol for 2,4-D optical immunosensing in a flow injection analysis system [J]. *Sensor. Actuat.B-chem.*, 1998, 51: 100~106.
- [58] Qi H L, Zhang C X. Homogeneous electrogenerated chemiluminescence immunoassay for the determination of digoxin[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 501: 31~35.
- [59] 张毅. 纳米粒子组装电化学发光免疫分析研究[D]. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文, 2005. 30 ~ 32.
- [60] Zhang C-X, Zhang H-H, Feng M-L. Homogeneous electrogenerated chemiluminescence immunoassay using a lumino1-labeled digoxin hapten[J]. *Anal. Lett.*, 2003, 36: 1 103 ~ 1 114.
- [61] Arai K, Takahashi K, Kusu F. An electrochemiluminescence flow-through cell and its applications to sensitive immunoassay using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol

- [J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 2 237 ~ 2 240.
- [62] Qi H L, Zhang Y, Zhang C-X, et al. Homogenous electro-generated chemiluminescence immunoassay for human immunoglobulin G using N-(aminobutyl)-N-ethyliso-luminol as luminescence label at gold nanoparticles modified paraffin-impregnated graphite electrode[J]. *Talanta*, 2008, 75: 684 ~ 690.
- [63] Dai H, Chi Y-W, Chen G-N, et al. Biocompatible electrochemiluminescent biosensor for choline based on enzyme/titanate nanotubes/chitosan composite modified electrode [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25: 1 414 ~ 1 419.
- [64] Algar W R, Tavares A J, Krull U J. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2010, 673: 1 ~ 25.
- [65] Zou G-Z, Ju H-X. Electrogenerated chemiluminescence from a CdSe nanocrystal film and its sensing application in aqueous solution[J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 6 871 ~ 6 876.
- [66] Jie G-F, Zhu J-J, Chen H-Y, et al. CdS Nanocrystal - Based Electrochemiluminescence Biosensor for the Detection of Low -Density Lipoprotein by Increasing Sensitivity with Gold Nanoparticle Amplification [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 5 574 ~ 5 581.
- [67] Jie G-F, Huang H-P, Zhu J-J, et al. Electrochemiluminescence of CdSe quantum dots for immunosensing of human prealbumin [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1 896 ~ 1 899.
- [68] Jie G-F, Chen H-Y, Zhu J-J, et al. Electrochemiluminescence Immunosensor Based on CdSe Nanocomposites [J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 4 033 ~ 4 039.
- [69] Jie G-F, Li L-L, Zhu J-J, et al. Enhanced electrochemiluminescence of CdSe quantum dots composited with CNTs and PDDA for sensitive immunoassay[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24: 3 352 ~ 3 358.
- [70] Jie G-F, Liu P, Zhang S-S, et al. Electrochemiluminescence immunosensor based on nanocomposite film of CdS quantum dots -carbon nanotubes combined with gold nanoparticles -chitosan[J]. *Electrochem. Commun.*, 2010, 12: 22 ~ 26.
- [71] Liu X, Ju H X. Coreactant Enhanced Anodic Electrochemiluminescence of CdTe Quantum Dots at Low Potential for Sensitive Biosensing Amplified by Enzymatic Cycle[J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 5 377 ~ 5 382.
- [72] Yao W, Wang L, Wang H -Y, et al. Cathodic electrochemiluminescence behavior of norfloxacin /peroxydisulfate system in purely aqueous solution [J]. *Electrochim. Acta*, 2008, 54: 733 ~ 737.
- [73] Niu H, Yuan R, Chai Y-Q, et al. Electrochemiluminescence of peroxydisulfate enhanced by L-cysteine film for sensitive immunoassay [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26, 3 175 ~ 3 180.

多巴胺电化学传感器的研究进展

刘蓉, 钟桐生*, 雷存喜

(湖南城市学院化学与环境工程系, 湖南益阳 413000)

摘要: 多巴胺(DA)是哺乳动物中枢神经系统中的一种非常重要的信息传递物质,与多种病症,如帕金森病、亨丁顿舞蹈症和多动症等息息相关,因此在日常的检测分析中,建立简单、快速而又准确的分析方法是必要的。该文综述了目前所使用的电化学分析测 DA 的各种方法及所用的物质,并对 DA 电化学传感器发展方向和趋势进行了展望。

关键词: 多巴胺; 抗坏血酸; 传感器; 修饰电极; 电化学测定

Current development of dopamine electrochemical sensors

Liu Rong, Zhong Tong-sheng*, Lei Cun-xi

(Department of Chemistry and Environmental Engineering; Hunan City University, Yiyang 413000, China)

Abstract: Dopamine (3, 4-dihydroxyphenyl ethylamine, DA) is an important neurotransmitter and has been related to kinds of illness, such as Parkinson's disease, senile dementia, Huntington's disease, motivation habit and the regulation of motor function. It is very useful to summarize these thesis which determine dopamine by rapid and simple methods in routine analysis. The recent progress achieved of electrochemical DA sensor was highlighted in this article, and the effect of different technology and materials on electrochemical DA sensor were discussed. The future development was given at the end of this article.

Key words: dopamine; ascorbic acid; sensor; modified electrodes; electrochemical determination

0 引言

多巴胺(Dopamine, DA)的化学名称为 3, 4-二羟基- β -苯乙胺, 是一种广泛存在于脊椎和非脊椎动物中的重要神经递质。1910 年, 英国科学家 George 首次在实验室合成了多巴胺。1958 年, 瑞典科学家 Nils-Åke 在化学实验室首次发现多巴胺可以作为神经传递素。得到 DA 不只是甲状腺素和去甲肾上腺素的前驱, 而是脑内信息传递者的这一结论使 Carlsson 获得了 2000 年的诺贝尔奖^[1]。

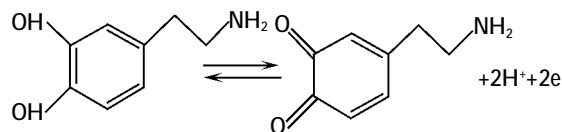
DA 是一种神经传导物质, 用来帮助细胞传送脉冲, 神经功能失调是精神分裂症和帕金森氏症的重要原因。此外, 多巴胺为拟肾上腺素药, 具有兴奋心脏、增加肾血流量的功能, 广泛用于治

疗神经紊乱、支气管哮喘、高血压、先天性心血管性及感染性休克。根据研究, 多巴胺还能够治疗抑郁症; 而 DA 不足则会令人失去控制肌肉的能力, 严重时会让病人的手脚不由自主地颤动或导致帕金森氏症。因此, 对其在脑、血液、尿和组织中的含量测定方法的研究无论是在生理功能研究还是在临床应用方面都具有重要的实际意义。

测量 DA 浓度的方法很多, 如滴定法^[2]、分光光度法^[3]、液相色谱法^[4]等。因为 DA 的苯环上连有两个羟基, 能够被氧化生成醌后再还原成酚, 从而具有电化学活性, 可以用电化学方法进行测量。电化学方法具有灵敏度高、选择性好等优点, 尤其是电化学型生物传感器能够进行活体分析, 这一优点是其它方法无法比拟的。DA 在电

* 通讯联系人, E-mail: rongrong8208@163.com; tzhong67@126.com

极表面的反应式为:



抗坏血酸(Ascorbic acid, AA)、多巴胺常共存于大脑和体液中,AA 的浓度一般从 10^{-7} ~ 10^{-3} mol/L 不等且易被氧化失去两个氢原子而转变成脱氢抗坏血酸,而 DA 的浓度为 10^{-8} ~ 10^{-6} mol/L, AA 的浓度远高于 DA 的浓度,而且在裸电极上两者的氧化电位相近而使氧化峰重叠,如何在高浓度 AA 存在下测量 DA 的含量一直是电化学分析家非常感兴趣的并成为电化学分析研究的重要课题之一。另外,尿酸(UA)也与 DA 和 AA 共存于体液中,但是因为其含量较低,所以对 DA 的干扰远不如 AA 明显,只有少部分的学者在研究 AA 干扰的同时也研究了 UA 的影响。

化学修饰电极是以导体或半导体为基底电极,在电极表面嫁接或涂敷具有选择性的单分子、多分子、离子或聚合物的化学物薄膜(从单分子到几个微米),借 Faraday(电荷消耗)反应而呈现出此修饰薄膜的化学、电化学及光学等性质^[5],因其具有高选择性和高灵敏性的检测特点,使得化学修饰电极在分析化学中得到了广泛的应用。在 DA 的测定中,常见的电极修饰分为以下几大类:聚合膜、Nafion 膜、碳纳米管、碳纳米管/纳米粒子/聚合膜和氨基酸法。

1 化学修饰多巴胺传感器的分类

化学修饰电极除了可以在高浓度的 AA 中测定 DA 外,还能增加 DA 的传质速率,从而提高测定 DA 的灵敏度。为了提高测定 DA 的选择性,目前出现的修饰膜有很多,诸如:聚合膜、Nafion 膜、碳纳米管和氨基酸膜等,所有这些化学修饰膜的主要思路基于两条:一是将阳离子选择性膜通过各种方法修饰在电极表面以达到排除抗坏血酸阴离子干扰的目的,由于这些修饰膜在一定的 pH 值下带负电荷,同时使得 AA ($pK_a=4.1$)带负电荷,而 DA($pK_a=8.87$)带正电荷,通过静电相互作用,可选择性地对 DA 阳离子进行响应,而抑制阴离子 AA 在电极表面的氧化反应,从而达到选择性测定多巴胺的目的;二是选择适当修饰剂

的化学修饰电极,该修饰膜的骨架带有正电荷,通过静电吸引力使带负电荷的 AA 的氧化峰负移,使带正电荷的 DA 的氧化峰正移,尽可能地将两者的氧化峰分开而实现对两物质的同时检测。

1.1 聚合膜

聚合膜因为具有良好的稳定性和重现性,在近几年的 DA 测量中受到广泛的应用。聚合在电极表面的聚合膜对 DA 的测定原理主要是以下两种:(1)聚合以后,聚合膜在待测溶液中带负电荷,使得 AA 没有响应,而直接测 DA;(2)将 AA 和 DA 的峰分开而选择性测定 DA 或者分别测定 DA 和 AA。

1.1.1 AA 没有响应,而直接测 DA

孙登明等^[6]用掺杂聚 L-酪氨酸修饰玻碳电极同时测定 DA 和 AA,两种组分同时测定的线性范围分别为 5.0×10^{-6} ~ 1.0×10^{-4} mol/L 和 3.0×10^{-5} ~ 1.0×10^{-3} mol/L。Zhao 等^[7]在玻碳电极上聚合聚(2-吡啶甲酸)膜,在 pH 为 7.0 的 PBS 中,加入 1.0×10^{-3} mol/L AA 对测量 1.0×10^{-4} mol/L DA 的结果无明显影响,进一步实验表明 150 倍 AA 不干扰其 DA 的结果。陈伟等^[8]研究了 DA 在聚刚果红修饰电极上的电化学行为,此电极对 DA 有明显的电催化作用,并能有效消除 AA 对 DA 测定的干扰。咸洋^[9]采用层层自组装方法应用无机介孔材料 SBA-15,高分子聚合物聚丙烯酸(PAA)和聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDDA)制备了层层组装修饰电极,结果表明通过利用 SBA-15 的离子筛功能,PDDA(PAA/SBA-15)层层自组装膜成功实现了 AA 共存条件下神经递质 DA 的选择性测定。即使 AA 浓度高达 1.0×10^{-4} mol/L 时仍无响应,对 2.0×10^{-5} mol/L 的 DA 无干扰。该研究通过调节溶液的 pH 值和离子强度来有效的控制离子通道的“开关”状态,达到了排除阴离子 AA 的干扰,提高了测定 DA 的选择性和灵敏度的目的。Li 等^[10]用分子印迹法,以 DA 为模板分子,在金电极上电聚合邻氨基酚法制备了多巴胺分子印迹膜传感器。传感器线性范围为 2.0×10^{-8} ~ 0.25×10^{-6} mol/L,检出限为 1.98×10^{-9} mol/L。该传感器可在高浓度抗坏血酸(AA)存在下测定 DA (DA 与 AA 摩尔比为 1/1 000),因为制得的印迹聚合膜具有特定形状的识别孔穴,能够选择性识别多巴胺,多巴胺进入识别位点后会引发电流变

化,而大大提高了其选择性。

1.1.2 将 AA 和 DA 的峰分开测定

Balamurugan 等^[11]利用聚(3,4-乙烯二氧噻吩-连-(2-磺酸萘)) (PEDOT-PANs) 测得 DA 和 AA 的氧化峰分别为 0.33 V 和 0.1 V, PEDOT-PANs 膜中的磺酸基团可以使得 AA 的峰电位负移,从而使得 AA 和 DA 的峰分开。Zhang 等^[12]采用聚(氨基磺酸)对 1.0×10^{-5} mol/L DA 和 1.0×10^{-3} mol/L AA 的混合溶液进行测量, DA 和 AA 的氧化峰分别为 0.163 V 和 -0.012 V。Jin 等^[13]利用聚(氨基苯磺酸)膜修饰电极同时测定 DA 和 AA, 差示脉冲伏安法(DPV)的结果, DA 和 AA 的氧化峰分别为 0.196 V 和 0.008 V。Ensafi 等^[14]用聚偶氮砷测得 AA、DA 和 UA 的氧化峰分别为 0.17 V、0.35 V 和 0.50 V。万其进等^[15]研究了聚茜素红膜修饰电极(PARE)的制备及其对 DA 和 AA 的电催化性能表明,二者的氧化峰电位分开近 200 mV, 可通过控制不同的电位范围进行分步扫描,实现了对同一体系中 DA 和 AA 的分别测定。Roy 等^[16]用聚(N, N-二甲基苯胺)修饰玻碳电极可以同时测定 DA 和 AA, 且将两者的氧化峰分开约 300 mV。Lin 等^[17]用对硝基偶氮间苯二酚(NBAR)修饰玻碳电极,在 pH 为 4.0 的磷酸缓冲溶液中,当 AA 和 UA 的浓度比 DA 分别高 30 和 3 倍时,不影响对 DA 的测定结果,在 NBAR 修饰玻碳电极上 DA 和 AA 的峰分别出现在 0.390 V 和 0.195 V。还有用通过电聚合聚苯二胺^[18]、甲酚红^[19]可以通过将二者的峰分开来测定 DA。

1.2 Nafion 膜

近年来研究得比较多的阳离子交换剂中,使用最多并且最成功的就数 Nafion 膜。Nafion 膜是典型的全氟磺酸质子交换膜,具有优异的电化学性能、良好的化学和机械稳定性,经过 Nafion 膜修饰后,传感器对 AA 的响应灵敏度随着吸附时间的延长而逐渐降低,而 DA 的响应则逐渐上升。另外 Nafion 膜具有渗透性,根据溶液中分子或离子的大小、荷电及空间结构等差异能有选择地使某些分子或离子透过膜孔起到“分子筛”的作用,从而达到使待测物富集的目的,同时 Nafion 膜中存在阳离子传递通道,有利于 DA 分子的扩散,从而提高了传感器的灵敏度,缩短了响应时间。

方禹之等^[20]根据碳纤维表面的多孔性,用

Nafion 来修饰碳纤维微电极表面,在 AA 共存下选择性测定神经递质去甲肾上腺素和 DA,不仅有效地消除了高含量 AA 的干扰,而且大大降低了电极的噪音,使电极测定 DA 的灵敏度大大提高。林祥钦等^[21]制备了胆碱(Ch)共价键植的碳纤维电极(Ch/CFE),进而吸附涂敷一薄层 Nafion 膜得到了 Nafion/Ch/CFE。使用 DPV 法,该电极能良好抵抗 AA 的干扰而选择性测量 DA,适用于活体监测。张亚等^[22]用 Nafion 和亲水性离子液体溴化 1-辛基-3-甲基咪唑([OMIM]Br) 作修饰剂制作了 Nafion-离子液体-修饰碳糊电极,在 0.1 mol/L PBS (pH=7.40) 中,该修饰电极降低了 DA 氧化、还原反应的过电位,增大了其氧化、还原反应的峰电流,而 AA 和 UA 在该修饰电极上无响应,该法可用于注射液和模拟生物样品中 DA 的测定。

1.3 碳纳米管

1991 年日本科学家 Iijima^[23]用真空电弧蒸发石墨电极,并对产物作高分辨透射电镜观察,发现了具有纳米尺寸的碳纳米管 (Carbon nanotubes, CNTs)。作为一维纳米材料,重量轻,直径细,结构多变,六边形结构连接完美,有独特的物理、化学特征,在纳米材料科学与加工技术、分子电子器件及生命科学领域中吸引了人们的广泛注意。

王宗花等^[24]制备了碳纳米管(CNT)修饰电极(镶嵌、涂层),并首次研究了电分离 DA 和 AA 的机理,结果表明,该电极的表面有一个多孔性的立体界面层,不仅对 DA 和 AA 具有较强的电催化作用,而且二者的氧化峰电位差达 250 mV 以上。用酸处理后的多壁碳纳米管修饰的石墨电极可以使 DA 和 AA 的氧化峰明显地分开,对两者的氧化均具有明显的电催化作用,可以同时测定 DA 和 AA。但碳纳米管在用酸处理时,酸的氧化性不宜太强,否则将不利于在 AA 存在下对 DA 的测定。这是因为酸的氧化性越强,碳纳米管表面生成的羧基和羟基越多,使碳纳米管的电负性增强,碳纳米管与 AA 的静电斥力增大,这使 AA 的峰电位正移,与 DA 的峰电位差减小,影响 DA 的测定^[25]。Baldrich 等^[26]用磁性纳米粒子(MP)吸附 CNT 制得 MP/CNT 电极,这样的电极既继承了 CNT 将 DA 和 UA 之间分开的优点,又继承了 MP 纳米粒子增敏的特点。与一般电极相比,MP/CNT

电极上的峰电流可增大 2.6~5 倍。杨瑞兰^[27]将 CNT 制成糊状电极(CNTPE),研究了该电极在 DA 和 AA 共存时的电化学反应,并且将其与传统的碳糊电极(CPE)作了比较。结果表明,CNTPE 比 CPE 具有更明显的催化作用,而且使 DA 的氧化峰位正移,两者的氧化峰位分离达 200 mV,并在 AA 存在的情况下成功地测定了 DA 的含量。羧基化 CNT 将 AA 和 DA 的峰分开,且使得 AA 和 DA 的峰电流明显增大,主要原因有:(1) MWNT 特有的管、空腔及携带的-COOH 和-OH 基团,容易与 DA 分子酚羟基中的氢形成氢键,电子通过 O-H-O 键传递,从而使酚羟基活化,削弱了苯环上 O-H 键之间的键能,使 DA 更容易被氧化,因而降低了氧化过电位^[28];(2) MWNT 上特有的空腔及-COOH 和-OH 基团,提供较多的反应位点和传输空间,MWNT 上带点较多的含氧基起着质子的接受体的作用,同时空间界面有利于质子、电子的传输^[29],从而使 DA 和 AA 在该修饰电极上的峰电流显著增大。

1.4 碳纳米管/纳米粒子/聚合膜

纳米金粒子有大的比表面积和良好的导电性,是优良电子导线和活性催化剂^[30],可显著提高现有分析方法的灵敏度。在多层膜中,金纳米粒子作为电子导线大大加快了电子传递速率。另外,金属纳米粒子还具有提高电化学敏感膜中电活性物质氧化还原可逆性的功能。

近年来,将能够分别测定 DA 的聚合膜和碳纳米管联用,并加入具有良好的催化活性性能的纳米粒子制成碳纳米管/纳米粒子/聚合膜,其优点在于形成了新的复合材料,并通过协同效应保留了单组分的性能。现已研究出的此类复合材料有聚苯胺/多壁碳纳米管(PAN I/MCNT),聚对苯乙烯/碳纳米管(PPV/CNT)、聚二氧乙基噻吩/碳纳米管(PEDOT/CNT)等,目前有部分已经用于 DA 的测定。

1.4.1 AA 没有响应,而直接测 DA

李春香等^[31]利用 2,6-吡啶二甲酸(PDA)与多壁碳纳米管(MCNT)共聚修饰玻碳电极,制成了聚 2,6-吡啶二甲酸/多壁碳纳米管(PPDA/MCNT)修饰电极,并将其应用于 DA 的测定,与 MCNT 修饰电极相比,前者更具有响应灵敏、检出限低、选择性高及基线电流低的优势。该实验发现在

DA 浓度为 1.0×10^{-7} mol/L 时,AA (2.0×10^{-5} mol/L)对 DA 测定无明显干扰。当 AA 浓度为 DA 浓度的 1 000 倍时,能使 DA 峰电流降低 7.2%。这表明该修饰电极具有良好的选择性,能用于实际样品的检测。Zhang 等^[32]制备的聚苯乙烯磺酸/单壁碳纳米管成功地测得了 DA 的含量,在 pH 为 7.0 的 PBS 中,带负电荷的聚苯乙烯磺酸可以吸引带正电荷的 DA,并排斥带负电荷的 AA 从而消除 AA 的干扰。马曾燕等^[33]在玻碳电极上通过电聚合制备了聚 L-半胱氨酸/多壁碳纳米管 (poly-L-Cys/MWNT) 复合修饰电极,实验表明,poly-L-Cys/MWNT 修饰电极对 DA 有良好的电催化作用,且 AA 对 DA 检测无干扰。郑娜等^[34]研究了聚磺基水杨酸/多壁碳纳米管修饰玻碳电极的制备及 DA 在此修饰电极上的电化学反应,pH=7.4 PBS 中,在 1.0×10^{-3} mol/L AA 共存的条件下,DA 氧化峰电流与其浓度在 $5.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内分段呈线性关系,结果表明:聚磺基水杨酸/多壁碳纳米管修饰电极结合了多壁碳纳米管灵敏度高和聚磺基水杨酸选择性好的优点,可用于 AA 共存条件下 DA 的测定。马曾燕等^[35]制备了聚吡咯/多壁碳纳米管(PPy/MWNT)复合膜修饰电极,pH=4.10 的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,DA 在该修饰电极上的 CV 曲线于 0.31 V 和 0.28 V 处出现一对灵敏的氧化还原峰,峰电位差 ΔE_p 比裸玻碳电极降低 58 mV,比 PPy 修饰电极低 28 mV,峰电流显著增加。

1.4.2 将 AA 和 DA 的峰分开分别测定

王宗花等^[36]采用电聚合方法将茜素红修饰到碳纳米管上,制备了聚茜素红/碳纳米管修饰电极,该电极能显著提高电极的灵敏度和分子识别性能,DA 和 AA 的氧化峰位分离达 240 mV,在 AA 的存在下,DA 的差分脉冲伏安法峰电流在 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系。

1.5 氨基酸法

黄燕生^[37]将 L-赖氨酸玻碳修饰电极上,通过 DPV 测得 AA 和 DA 的氧化峰峰间距为 460 mV;L-酪氨酸玻碳修饰电极的 DPV 图上峰间距为 408 mV,实验结果表明玻碳电极上 DA 和 AA 重叠的单氧化峰在氨基酸修饰玻碳电极上分开成为两个完全独立的氧化峰,从而实现了选择性检测 DA。张雷等^[38]采用电氧化法制备了一种新型

γ -氨基丁酸(ABA)修饰的玻璃碳电极, DA 与 AA 分别于 0.45 V 和 0.07 V 出现独立的阳极方波伏安峰, 表明此修饰电极可用于这两种物质的同时测定。陈贤光等^[39]表明 L-半胱氨酸(L-Cys)自组装金电极对多巴胺有明显的电催化氧化作用, DA 与 AA 的氧化峰均可以得到足够大的分离, 用 CV 和 DPV 测得其电位差分别为 385 mV 和 400 mV, 进一步的试验结果表明, 在相对误差 $\pm 5\%$ 以内, 3 倍的 AA 不影响 3.3×10^{-4} mol/L DA 的循环伏安法测定^[39]。

1.6 其他方法

连靠奇^[40]研究了在强碱溶液中活化粗糙玻璃碳电极(ARE)的制备方法及其对 DA 和 AA 电催化性能。表明 ARE 使 DA 和 AA 的氧化峰得到了很好的分离, 在 pH=5.72 的溶液中峰位差为 200 mV, 在 pH=1.98 的溶液中峰位差达 230 mV, 实现了 DA 和 AA 共存时的同时测定。Zhao 等^[41]研究了 DA、AA 在离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑六氟合磷(OMIMPF₆)/多壁碳纳米管凝胶修饰电极上的电化学行为, 实现了对 DA、AA 的催化、分离, 发现可同时检测这两种生物小分子而互不干扰。Milczarek 等^[42]利用 2,2-双(3-氨基-4-羟基苯基)六氟丙烷修饰电极测得 DA 和 AA 的氧化峰分别是 -0.073 V 和 0.131 V, 溶液中 4 000 倍 AA 不干扰 DA 的测定结果。Li 等^[43]用 β -环糊精在 5 mmol/L 的 AA 中, 在 1~200 μ mol/L 的范围内, DA 的氧化峰电流与其浓度成正比。Li 等^[44]制得 DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)/Cys(半胱氨酸)/Au, 相比 5.0×10^{-6} mol/L DA 的氧化峰的峰电流值, 此电极对 5.0×10^{-5} mol/L UA 和 5.0×10^{-5} mol/L AA 几乎不响应, 在 pH 值为 7.4 的 PBS 中, 具有五个羧基的 DTPA 带大量负电荷可吸引带正电荷的 DA 分子, 使得 DA 在电极上的氧化峰非常明显; 同时带负电荷的 DTPA 能够排斥带负电荷的 AA, 使得 AA 无法靠近修饰电极而无法显现明显的氧化峰, 这样就达到了消除 AA 干扰的目的。

2 多巴胺传感器的展望

建立具有选择性好、灵敏度高的 DA 测定方法在临床应用、探讨其生理机制方面具有重要的实际意义, 从该综述中可以看出虽然其研究已经取得了较多成果, 但理论方面不是非常具体, 而

且实际应用也是处在发展之中。聚合物修饰电极的发展将对 DA 检测起重大作用; 纳米金属或金属氧化物颗粒掺杂聚合物修饰电极因其对 DA 有较好的电催化活性, 在 DA 检测中有较大的应用前景。纳米结构的电极上电催化氧化机理的深入探索, 灵敏度高、选择性好和稳定性好的 DA 传感器的制备不仅在实际应用中得到进一步地发展, 而且其理论内容也越来越丰富。

参考文献

- [1] Benes F M, Carlsson and the discovery of dopamine[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2001, 22(1): 46~47.
- [2] Salem F B. Spectrophotometric and titrimetric determination of catecholamines[J]. Talanta, 1987, 34 (9): 810~812.
- [3] Mamiński M, Olejniczak M, Chudy M, et al. Spectrophotometric determination of dopamine in microliter scale using microfluidic system based on polymeric technology [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 540 (1): 153~157.
- [4] Guan C L, Ouyuang J, Li Q L, et al. Simultaneous determination of catecholamines by ion chromatography with direct conductivity detection[J]. Talanta, 2000, 50 (6): 1 197~1 203.
- [5] 董绍俊, 车广礼, 谢远武. 化学修饰电极 [M]. 北京: 科学出版社, 1995. 210.
- [6] 孙登明, 田相星, 马伟. 银掺杂聚 L-酪氨酸修饰电极同时测定多巴胺、肾上腺素和抗坏血酸[J]. 分析化学, 2010, 38(12): 1 742~1 746.
- [7] Zhao H, Zhang Y Z, Yuan Z B. Electrochemical determination of dopamine using a poly(2-picolinic acid)-modified glassy carbon electrode[J]. Analyst, 2001, 126 (3): 358~360.
- [8] 陈伟, 林新华, 黄丽英, 等. 多巴胺在聚刚果红修饰电极上的伏安行为及其测定[J]. 福建医科大学学报, 2005, 39 (1): 61~64.
- [9] 咸洋. 新型纳米生物传感器界面的设计与应用研究 [D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2007.
- [10] Li J, Zhao J, Wei X. A sensitive and selective sensor for dopamine determination based on a molecularly imprinted electropolymer of o-aminophenol [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 140(2): 663~669.
- [11] Balamurugan A, Chen S M. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co-(5-amino-2-naphthalene sulfonic acid))(PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid[J]. Analytica Chimica Acta,

- 2007, 596 (1): 92~98.
- [12] Zhang Y, Jin G, Yang Z. Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly (amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode[J]. *Microchimica Acta*, 2004, 147 (4): 225~230.
- [13] Jin G, Zhang Y, Cheng W. Poly(p-aminobenzene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 107 (2): 528~534.
- [14] Ensafi A A, Taei M, Khayamian T, et al. Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly (sulfonazo III) modified glassy carbon electrode [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 147(1): 213~221.
- [15] 万其进, 喻玖宏, 王刚, 等. 聚茜素红膜修饰电极控制电位扫描法分别测定多巴胺和抗坏血酸[J]. *高等学校化学学报*, 2000, 21(11): 1 651~1 654.
- [16] Roy P R, Okajima T, Ohsaka T. Simultaneous electroanalysis of dopamine and ascorbic acid using poly (N,N-dimethylaniline) -modified electrodes [J]. *Bioelectrochemistry*, 2003, 59(1-2): 11~19.
- [17] Lin X H, Zhang Y F, Chen W, et al. Electrocatalytic oxidation and determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid at a poly (p-nitrobenzenazo resorcinol) modified glassy carbon electrode[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 122 (1): 309~314.
- [18] Ekinci E, Erdogdu G, Karagozler A E. Preparation, optimization, and voltammetric characteristics of poly(o-phenylenediamine)film as a dopamine -selective polymeric membrane [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 79 (2): 327~332.
- [19] Chen W, Lin X H, Huang L Y, et al. Electrochemical characterization of polymerized cresol red film modified glassy carbon electrode and separation of electrocatalytic responses for ascorbic acid and dopamine oxidation[J]. *Microchimica Acta*, 2005, 151 (1-2): 101~107.
- [20] 方禹之, 于雁灵, 何品刚. Nafion 修饰电化学活性碳纤维微电极测定去甲肾上腺素[J]. *分析化学*, 1995, 23 (12): 1 440~1 443.
- [21] 林祥钦, 康广凤, 柴颖. Nafion/胆碱双层膜碳纤维电极探测小白鼠大脑内的多巴胺[J]. *分析化学*, 2008, 36 (2): 157~161.
- [22] 张亚, 张宏芳, 郑建斌. Nafion-离子液体-修饰碳糊电极在抗坏血酸和尿酸存在下选择性测定多巴胺[J]. *分析实验室*, 2008, 27(12): 34~37.
- [23] Iijima S. Helical microtubes of graphite carbon[J]. *Nature*, 1991, 354: 56~58.
- [24] 王宗花, 刘军, 颜流水, 等. 碳纳米管修饰电极的孔性界面对电分离多巴胺和抗坏血酸的影响[J]. *高等学校化学学报*, 2003, 24(2): 236~240.
- [25] 袁倬斌, 王月伶, 张君, 等. 碳纳米管在电分析中的应用[J]. *化学通报*, 2004, 67(7): 473~476.
- [26] Baldrich E, Gómez R, Gabriel G, et al. Magnetic entrapment for fast, simple and reversible electrode modification with carbon nanotubes: Application to dopamine detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26 (5): 1 876~1 882.
- [27] 杨瑞兰. 碳纳米管修饰电极在电化学生物传感器中的应用研究[D]. 吉林: 东北师范大学, 2008.
- [28] Dalmia A, Liu C C, Savinell R F. Electrochemical behavior of gold electrodes modified with self-assembled monolayers with an acidic end group for selective detection of dopamine[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1997, 430(1-2): 205~214.
- [29] 王歌云, 王宗花, 肖素芳, 等. 碳纳米管修饰电极对多巴胺和肾上腺素的电分离及同时测定[J]. *分析化学*, 2003, 31(11): 1 281~1 285.
- [30] 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.
- [31] 李春香, 曾云龙. 聚 2, 6-吡啶二甲酸/多壁碳纳米管修饰电极的电催化性能[J]. *分析化学*, 2006, 34(7): 999~1 002.
- [32] Zhang Y Z, Cai Y J, Su S. Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid by poly (styrene sulfonic acid) sodium salt/single-wall carbon nanotube film modified glassy carbon electrode[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 350 (2): 285~291.
- [33] 马曾燕, 李将渊, 向伟. 多巴胺在聚 L-半胱氨酸/多壁碳纳米管修饰电极上的电化学行为及其伏安测定[J]. *应用化学*, 2009, 26(2): 224~227.
- [34] 郑娜, 侯书荣, 周霞, 等. 聚磺基水杨酸/碳纳米管修饰电极在抗坏血酸共存时测定多巴胺[J]. *分析实验室*, 2009, 28(5): 6~10.
- [35] 马曾燕, 李将渊, 向伟. 聚吡咯/多壁碳纳米管修饰电极对多巴胺的测定[J]. *化学研究与应用*, 2008, 20 (12): 1 570~1 574.
- [36] 王宗花, 张旭麟, 张菲菲, 等. 聚茜素红功能化碳纳米管修饰电极对多巴胺和抗坏血酸的电化学研究[J]. *分析实验室*, 2007, 26(10): 17~20.
- [37] 黄燕生. L-赖氨酸、L-酪氨酸单分子层玻碳修饰电极在抗坏血酸共存下对多巴胺的检测[D]. 北京: 首都师范大学, 2006.
- [38] 张雷, 林祥钦. 单分子层 γ -氨基丁酸共价修饰玻碳电

- 极同时测定多巴胺、尿酸和抗坏血酸[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(4): 591 ~ 594.
- [39] 陈贤光, 张素娟, 欧阳良琪, 等. L-半胱氨酸自组装电极循环伏安法测定多巴胺[J]. 分析实验室, 2007, 26(4): 30 ~ 33.
- [40] 连靠奇. 神经递质多巴胺与小分子药物的电化学研究[D]. 河北: 河北大学, 2005.
- [41] Zhao Y F, Gao Y Q, Zhan D P, et al. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes -ionic liquid gel modified electrode[J]. Talanta, 2005, 66(1): 51 ~ 57.
- [42] Milczarek G, Ciszewski A. 2, 2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl) hexafluoropropane modified glassy carbon electrodes as selective and sensitive voltammetric sensors. Selective detection of dopamine and uric acid[J]. Electroanalysis, 2004, 16 (23): 1 977 ~ 1 983.
- [43] Li J P, Wu X Z, Yu Y, et al. Self-assembled sulfonated β -Cyclodextrin layer on gold electrode for the selective electroanalysis of dopamine. Journal of Solid State [J]. Electrochemistry, 2009, 13(12): 1 811 ~ 1 818.
- [44] Li J P, Liu R, Yu J G, et al. A gold electrode modified with self-assembled diethylenetri-aminepentaacetic acid via charge-based discrimination[J]. Analytical sciences, 2009, 25(11): 1 289 ~ 1 293.

《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。

树枝状大分子在传感器中的应用

陈少珠, 杨园园, 李冰心, 侯静亚, 徐 岚*

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

摘要: 树枝状大分子是一种三维的、高度枝化的树枝状高分子, 具有单分散性、无免疫原性、细胞毒性较低、生物可降解等特性, 目前在传感器方面的应用引起了高度关注。该文简要地综述了近年来树枝状大分子在生物传感器、离子传感器、气敏传感器方面的研究进展, 并对树枝状大分子的研究动向作了展望。

关键词: 树枝状大分子; 生物传感器; 离子传感器; 气敏传感器

Application of dendrimers in sensors

Chen Shao-zhu, Yang Yuan-yuan, Li Bing-xin, Hou Jing-ya, Xu Lan*

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

Abstract: Dendrimers, described as three-dimensional and hyper-branched macromolecules, are of particular interest because of their single dispersion, no immunogenicity, lower cytotoxicity and biodegradability. This paper briefly reviews the applications of dendrimers in biosensor, ion sensor, gas sensor and proposes the research trends.

Key words: dendrimers; biosensor; ion sensor; gas sensor

0 引言

传感器是能感受规定的被测量信号并按照一定规律将其转换成可测信号(主要是电信号)的器件或装置, 它通常由敏感元件(敏感结构材料和载体)、转换元件及检测器件所组成。其中敏感元件是传感器的核心, 它决定传感器的选择性、灵敏度、线性度、稳定性等。因此, 选择并优化新功能材料的开发和应用一直是传感器研究的热点。在这方面, 树枝状大分子由于其优越的性能而广泛地应用于传感器。

1985年, 美国DOW化学公司Tomalia等^[1-2]首次合成了一种可围绕中心核进行星状发散式增长的分子, 即所谓的“星爆状(Starburst)”树枝状大分子, 后来简称为树枝状大分子(Dendrimer), 由于其具有特殊的结构和优异的物理化学性能, 因此树枝状大分子的研究和应用取得了许多进展。树枝状大分子作为传感器的载体

材料具有如下优点:

(1) 树枝状大分子是一类三维的、高度有序的单分散性大分子化合物^[3-4]。

(2) 完整的树枝状分子由中心核、数层重复树枝单元和大量外围基团所组成, 具有内外受体的能力, 其大量的外围基团可提供更多的活性位点, 从而提高了传感器的灵敏度。

(3) 树枝状大分子由于反应步骤的可控制性从而具有高度分支的精确结构, 因此大大提高了传感器的重现性。

(4) 树枝状大分子具有良好的生物兼容性, 可以直接和酶等试剂进行共价结合。另外, 可以改变其外围的功能基, 用于检测不同的分析对象, 从而扩大了分析的范围。

目前, 研究工作主要构建不同代(G)的聚丙烯胺树枝状大分子(Polypropyleneimine dendrimers, PPI)和聚酰胺-胺树枝状大分子(Polyamidoamine dendrimer, PAMAM)、碳硅烷类

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(No. XDJK2009C091)资助项目

* 通讯联系人, E-mail: xulan@swu.edu.cn, Tel: 023-68253544

树枝状大分子和硅氧烷类树枝状大分子及其衍生物作为传感器的载体,树枝状大分子由于具有较好的稳定性和生物兼容性,可方便地沉积在各种基片上,并且可与其它功能材料共聚或复合等优点,因而受到传感器研究者的青睐。其中由于聚酰胺-胺(PAMAM)(图 1)树枝状大分子既具有树枝状大分子的共性,又有自身特点。它精确的分子

结构,大量的表面官能团,分子内存在空腔,相对分子质量具有可控性,分子量分布可达单分散性,分子本身具有纳米尺寸,高代数分子呈球状等优点。因而是目前研究最广泛,最深入的树状大分子之一。该文主要综述了近年来树枝状大分子传感器特别是生物传感器的研究进展,并对树枝状大分子的研究动向作了展望。

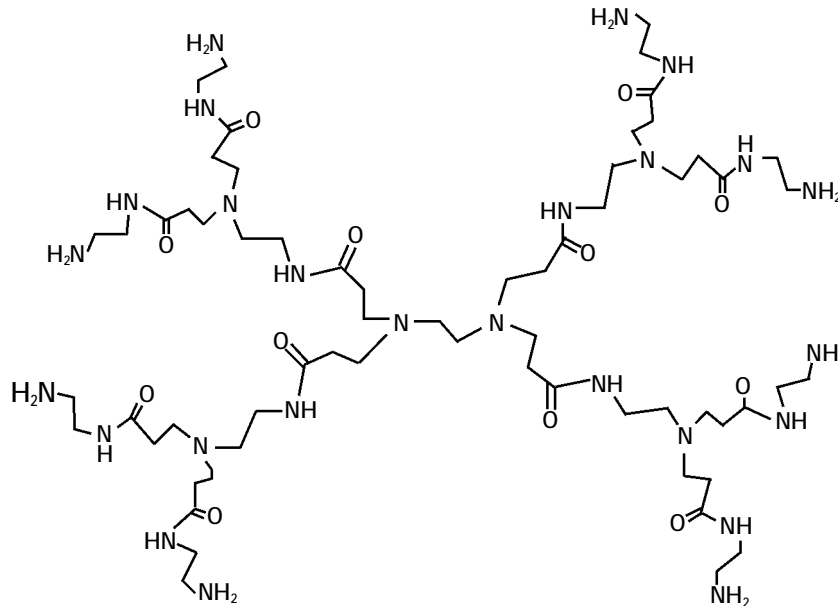


图 1 PAMAM 的结构

Fig.1 Structure of PAMAM

1 树枝状大分子固载到基底的方法

从树枝状大分子和固体基底的相互作用方式看,有静电作用力、共价键作用、氢键和范德华作用力,目前以静电作用和共价键作用居多。

1.1 静电作用力结合

早在几年前, Tsukruk 等^[5]提出树枝状大分子可以通过静电作用自组装到电荷化的基底形成完全的、均匀的薄膜。如图 2 所示,带负电的硅基底或者先组装了有机小分子带上正电的硅基底可以通过静电作用力吸附带异性电荷的树枝状大分子。这类树枝状大分子以 PAMAM 为代表,通过此类方法制备出的 PAMAM 树枝状大分子代数数为 G_4, G_6, G_{10} 的自组装膜^[6-7]。

在很多情况下,树枝状大分子通过与金属离子静电作用吸附在自组装膜 (self-assembly monolayers, SAMs) 上^[8-10]。Regen 等^[8]利用整代的

PAMAM 树枝状分子的胺端基,将其沉积到用 Pt^{2+} 离子活化的表面,重复这一过程即得到多层膜结构。Schryver 等^[9]通过 Cu^{2+} 离子把 $G_2Td(COOH)_{16}$ (末端基团为羧基的聚苯撑树枝状化合物) 吸附到 Au 的 SAM 上。末端为 COOH 的 SAM 在碱溶液中生成 COO^- , 然后 Cu^{2+} 离子通过静电作用 ($-COO^- \cdots Cu^{2+}$) 强烈地吸附在 SAM 上,再将其浸入加有 KOH 的 $Td(COOH)_{16}$ 的溶液中,碱的加入既破坏分子间的氢键,又使 $Td(COOH)_{16}$ 被中和而带上负电荷,可以通过静电力使树枝状分子吸附到 SAM 上,重复几次,就可形成树枝状分子吸附多层膜。

1.2 共价键结合

以共价键结合的制备方式通常需要一中问媒介,一般先在基底上形成有机单分子自组装膜,然后利用自组装的末端官能团和树枝状大分子反应生成共价键。这一方面, Crooks 工作小组

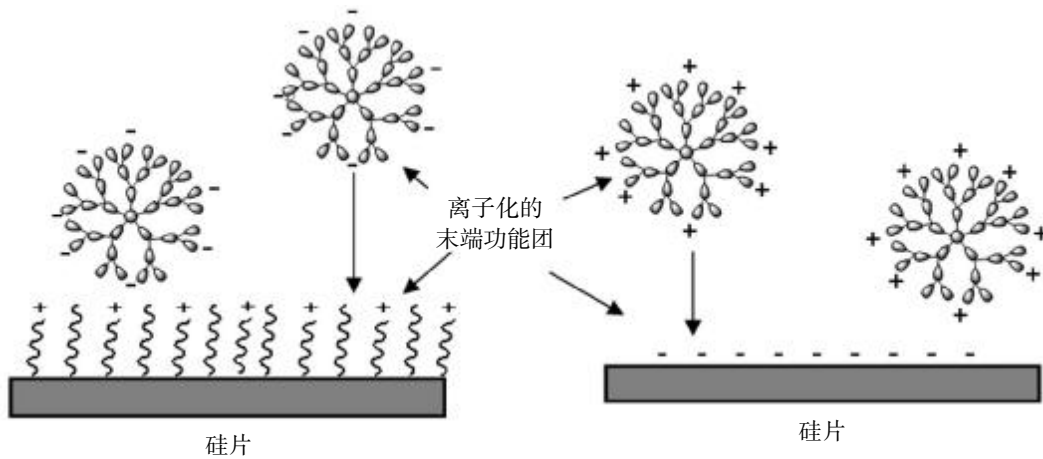


图2 通过静电作用力树枝状大分子的自组装的一般过程

Fig.2 The general process of self-assembly of dendritic macromolecules by electrostatic interaction

较早地进行了相关研究并取得了很多成果。

树枝状大分子可以通过多个作用点接在 SAM 表面上(如图 3i)^[11]。例如, ω -巯基十一烷酸(MUA)在 Au 表面的自组装膜末端的羧基功能团可以和末端是胺基的树枝状化合物 PAMAM 反应生成酰胺共价键^[12]。Crooks 最初研究表明树枝状大分子以图 3i 所示方式的结合容易造成化合物的形变。另外,末端活性基团密度大小(如图 3ii 所示)的结合避免了化合物的形变。例如,MUA 与十二硫醇两种有机分子形成混合自组装膜,由于表面的 SAM 末端-COOH 官能团一部分被甲基所取代,大大的稀释了-COOH 在表面的浓度^[13],导致末端羧基只能和每个树枝状大分子中

的一个或者少数几个官能产生共价键,这就避免了化合物的形变。

树枝状化合物也能直接固定在 Au 表面而不需要表面先固定上一层有机小分子^[14-18](如图 3iii)。张希等^[14]先合成带有硫醇官能团的 Frechet 类型树枝状化合物,硫醇官能团能直接组装到金属表面。Won^[15]和 Evenson^[17]研究小组在大分子基底上制备 PAMAM 薄膜。Won 首先在空气或者马来酸酐环境中对聚二甲基硅烷(PDMS)表面进行等离子体处理,使表面接上过氧键或酸酐等官能团,胺基结尾 PAMAM 再直接与表面反应,形成稳定的薄膜。这类薄膜对气体的渗透有明显的阻碍作用,同时也可用来制备粘合性的功

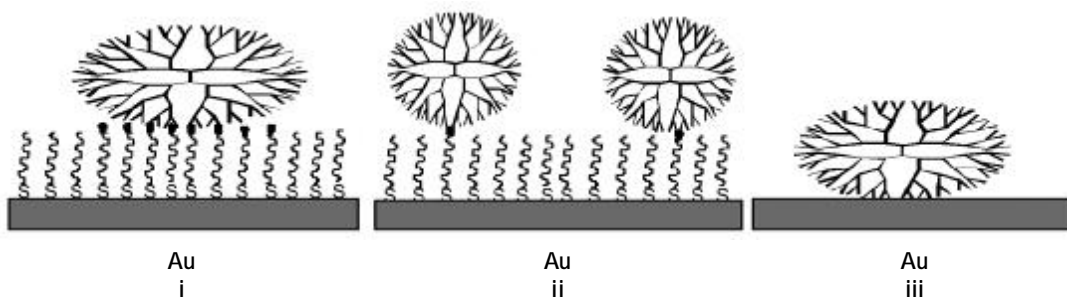


图3 三种共价键结合的形式

Fig.3 Three kinds of forms by covalent bonds

能化表面。

2 树枝状大分子在生物传感器中的应用

2.1 生物传感器的工作原理

树枝状大分子的生物传感器主要是以树枝

状大分子作为载体固定生物活性成分(酶、抗原、抗体、微生物等),并将其固定在活化的基质上作为敏感元件,再与适当的信号转换和检测装置结合而成的器件。

2.2 DNA 生物传感器

2005年,Rosi和Mirkin发表了一些关于树枝状大分子在DNA微阵列和生物传感器中应用的评论^[19]。工作原理是通过共价作用在载玻片上固载核苷酸,分析荧光标记核酸的混合物,所具有的荧光能够对DNA链的杂交作用进行定量。目前,将树突生长在载玻片上的方法^[20]已经得到较大改进^[21-22]。在2001年,Niemeyer研究小组^[23]开辟了PAMAM树枝状大分子的领域并获得了稳定的荧光强度,与非树枝状交联剂相比,荧光强度显著地增加。期间,PPI树枝状大分子也在这方面得到应用^[24]。随后,当使用更高代的带有末端醛的树枝状大分子和胺化的载玻片时,强度增加更大并具有较高的灵敏度^[25-28]。Lim研究小组^[28]将抗生素蛋白修饰的树枝状G₃-PAMAM与生物素结合的复合物固载到载玻片上,并用AFM,SEM对较低浓度的DNA进行检测,结果表明增加了荧光标记的目标DNA的灵敏度。Reinoud研究小组^[29-30]也报道了一种精美的图形方法包括微印刷邮票,这种方法提出了微阵列复制。该邮票用PPI树枝状大分子喷黑,并用荧光素标记的DNA孵化(培养),然后洗掉在载玻片上印刷后的树枝状大分子,这样图案化了的DNA微阵列能够进行荧光分析。

带正电树枝化大分子和寡核苷酸之间通过静电作用的也有研究,这种研究本质上可直接用于基因转移^[31]。关于不同的物理方法的相互作用^[32-37]在2001年Florence也发表了评论^[32]。

2.3 三磷酸腺苷(ATP)传感器

ATP是DNA的一个片段,是一种细胞的能量的来源和细胞的信使者。它能用阳离子传感器通过静电连接作用识别。如二茂铁基^[38]或二茂钴基^[39]氧化还原系统。其阳离子形式能够和ATP的阴离子基形成了离子对。然而,如果这种传感器是线性的,这种相互作用太弱而不能引起氧化还原电位较大的变化。端基为二茂铁基的树枝状大分子显示了一种正树枝效应,如在CV中,当ATP加入到低代或高代的端基为二茂铁基的树枝状大分子中时,一种新的二茂铁基氧化还原峰出现在较低的正电位下。因此,在端基为二茂铁基树枝状大分子离子对中,二茂铁基通过烷基链简单地连接到核中并在树枝状大分子内部参与

了对ATP的包裹,与具有线性的烷基二茂铁相比,引起了较强的相互作用,这能够对ATP溶液进行滴定分析^[40]。

引入其他的超分子也能够增强在ATP磷酸基和二茂铁部分离子的相互作用。比如,包含末端硅基二茂铁基的金纳米核树枝状大分子显示了一种增强的相互作用,当存在和不存在ATP时二茂铁基树枝状大分子之间引起较大的电位差^[41-43]。这可能是由于在硅二茂铁形式下硅原子较高的价态引起的。因此,尽管硅原子在四等硅烷基中没有氧的亲合力,但在硅二茂铁中硅的部分正电荷导致了硅的高价态^[44-49]。另外一种超分子相互作用在三唑基二茂铁基^[50]或者三唑基甲基二茂铁树枝状大分子^[41]中,通过唑基末端与乙炔基二茂铁反应或者炔末端树枝状大分子和三唑甲基二茂铁反应,提供了温和的电化学识别和ATP的滴定反应。Beer研究小组^[51-53]开创了通过电子受体对二氢磷酸识别,并在1997年是第一例公开发表的对二氢磷酸具有识别能力的树枝状电子受体。与此同时,一种动态的正树枝效应使用端基为氨基二茂铁基的树枝状大分子,当树枝状大分子代数较高时具有较大的氧化还原电位差,识别较容易。氨基能够引起较大的氧化还原电位差,是由于氨基与二氢磷酸的两个氢键之间的协同作用^[47]。Alonso等^[48]报道了端基为二茂铁碳酰胺的树枝状大分子能够成功地对氢磷酸检测,并且以无机钼簇为核的末端硅二茂铁树枝状大分子也能够对ATP进行检测^[49]。

另外,尺寸较大的二茂铁树枝状大分子的优势是它比较容易地全部吸附在Pt电极上,通过衍生化的树枝状大分子电极更方便检测,电极能够允许ATP的洗脱和电极传感器的再使用。这也是Au纳米核树枝状大分子的一个优点^[44-45]。二氢磷酸阴离子是很好的ATP模式,但端基为二茂铁基树枝状大分子对二氢磷酸阴离子的检测比对ATP较容易些^[46]。然而,具有较大尺寸的末端[Fe₄Cp₄(CO)₄]簇代替了末端二茂铁,与二茂铁末端(Fe^{III/II})相比,ATP的识别较容易并观察到了[Fe₄Cp₄(CO)₄]⁺⁰具有较大的氧化还原电位变化,那是因为较大的[Fe₄Cp₄(CO)₄]簇与ATP大小更匹配^[54]。

2.4 葡萄糖传感器

葡萄糖生物传感器已经广泛地形成并对糖尿病人的血糖进行监测。Losada 等^[55]研究了硅二茂铁基树枝状大分子作为电子媒介体在安培传感器中的应用。结果表明了当加入葡萄糖时,树枝状载体和葡萄糖氧化酶修饰的碳糊电极能够快速识别并具有稳态的安培响应。后续的主要工作,Losada 小组也发展了其他树枝状大分子的电化学方法,如以 PPI 为核的聚甲基二茂铁基树枝状大分子沉积到 Pt 电极上,研究了膜厚度和浓度的影响,通过氧化酶催化定量了 H_2O_2 的产生。另外, H_2O_2 和乳酸氧化酶的酶电极也被研究^[56-59]。链激酶、葡萄糖氧化酶和磷酸胆碱固载到聚甘油树枝状大分子上,该生物共轭结构能够对葡萄糖进行检测。这种材料作为葡萄糖氧化媒介体并用于优越的氧化还原酶可移植的生物传感器中^[60]。其他的葡萄糖氧化酶-葡萄糖生物传感系统包括 Pt 纳米-多壁碳纳米管和树枝状大分子金纳米膜。通过引入氧化还原电子媒介体,具有高容量的膜基质对于酶的固载具有环境稳定性^[61]。

基于荧光非电化学法能够对葡萄糖进行检测。Lee 等^[62]报道了基于荧光卟啉树枝状大分子的蛋白质共轭葡萄糖敏感表面。与非树枝状表面相比,树枝状大分子表面蛋白质活性更高,葡萄糖氧化酶介导的葡萄糖氧化反应会引起卟啉核荧光猝灭,猝灭光和葡萄糖的浓度成定量关系。该方法的优势在于树枝状大分子修饰表面提供三维骨架,具有大量的功能基能够高密度的固载蛋白质并很好的保持了蛋白质的活性,很好的用于目标物的分析。

2.5 抗体和抗原生物传感器

基于高特异性识别的免疫传感器广泛地应用在临床诊断、环境监测、食品安全分析等领域。免疫传感表面可逆的亲合作用基于功能性抗原和抗体分子间的生物特异的结合和可移动的反应。一个典型的抗原和抗体例子是生物素和抗生素系统。Yoon 等^[63]研究了具有功能化二茂铁基和生物素化的 PAMAM 树枝状大分子,功能化的单层对具有单克隆抗生素免疫球蛋白特异性识别提供了一个平台,具有末端功能化二茂铁基作为电子媒介体。

另外,一种新颖的电化学免疫传感器对苯并芘的检测使用 PAMAM 树枝状大分子和功能化的亚甲基蓝/ SiO_2 纳米粒子连接的葡萄糖氧化酶和葡萄糖二抗结合体,较大的增强了苯并芘分析的灵敏度。 G_2 的 PAMAM 树枝状大分子的修饰增加了功能基苯并芘抗原的固载量。亚甲基蓝/ SiO_2 纳米粒子连接的葡萄糖氧化酶用作免疫传感器的检测标记,得到的传感器显示了相对较宽的线性范围和较低的检出限^[64]。该设计对一些污染物环境监测具有很好的应用前景。

在临床中免疫测定促进了灵敏和特异的技术的发展,能够在样品中检测特异抗原的存在。比如,非竞争荧光免疫检测通过 PAMAM 皮质醇-树枝状大分子俘获抗体的非连接位点^[65],能够对皮质醇进行分析。树枝状纤维素能够作为对人工抗原的支架,在人类中提供了对发展临床测试材料的工具,它能够研究对药物的反免疫学响应^[66]。免疫治疗法研究阿尔茨海默病, β -淀粉样蛋白斑特异抗原决定簇识别治疗阿尔茨海默痴呆病的抗体,对疫苗的发展提供了基础。因此,由一种淀粉样蛋白斑特异的抗原决定簇构成的生物结合的设计目前也已报道^[67]。

3 树枝状大分子在离子传感器中的应用

离子传感器也称离子选择性电极。膜的电极电位分别对被测离子存在 Nernst 响应,根据这些原理可制成相应的离子电位传感器。后来研究发现以树枝状大分子为载体的传感器对某些离子也有响应,制成了离子传感器,其机理为离子识别实际上主客体之间通过非共价相互作用的过程,主体分子具有特定的分子几何结构能够选择性与客体分子互补,从而与目标离子形成相对较强的作用力实现对离子的检测。最近发现许多功能化的树枝状大分子探测许多金属离子,它们在痕量金属离子的探测、污水处理、乃至重金属离子传感器等方面都显示出巨大的应用前景。Zhang 等^[68]研究了基于丹酰化的 8-羟基喹啉为核的 PAMAM 树枝状大分子的荧光传感器用于对 Fe^{3+} 进行检测,结果表明 G_3 的树枝状大分子比 G_1 和 G_2 具有较高的灵敏度,并且该传感器对 Fe^{3+} 具有较好的选择性和灵敏度。Gupta 等^[69]研究了基于 G_2 的硅氧烷类树枝状大分子为载体的 Li^+ 选

择性电极电位传感器对 Li^+ 的识别具有较好的选择性,并且在一价、二价、三价的阳离子的存在下不对 Li^+ 造成干扰。端基为三乙二醇醚的碳硅烷树枝状大分子作为离子载体对 K^+ 的识别,该电极对 K^+ 具有较宽的线性范围并且响应时间较快^[70]。Lopez 等^[71] 构建了 G_4 六氰合铁酸镍 PAMAM 树枝状大分子修饰的金电极用于水溶液中 K^+ 的检测,该活性表面不仅能够增加六氰合铁酸镍的表面覆盖量,而且可以在水溶液中定量 K^+ 的浓度变化。另外, Sethi 等^[72] 研究了末端硅冠的碳硅烷树枝状大分子为载体的 PVC 膜并对 Na^+ 进行检测,该传感器对碱离子,碱土金属离子,重金属离子具有较好的选择性和较宽的线性范围。以 15-冠-碳硅烷树枝状大分子为载体的离子传感器用于 NH_4^+ 的检测,响应时间为 6 s 左右^[73]。因此,以树枝状大分子为载体的离子传感器不仅可以提高选择性,而且增加了被测离子的灵敏度。

另外,由于阴离子在生物体和环境保护中的重要性,对阴离子的识别也引起了广泛的兴趣,其代表之一是二茂铁树枝状大分子,由于二茂铁有良好的稳定性、电化学性质及反应活性,因此作为阴离子受体的二茂铁基化合物对阴离子的检测方面得到了应用。如, Cuadrado 等^[74] 研究了硅二茂铁树枝状大分子具有四面体的空腔对识别四面体的 H_2PO_4^- 和 HSO_4^- 更有利,而 Stone 和 Smith^[75] 以二茂铁为核的树枝状大分子一种选择性识别趋势为 $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ 。然而,为了在实际中得到广泛的应用,二茂铁树枝状大分子传感器的灵敏度和选择性有待进一步提高。目前许多检测都在有机溶剂中开展而在水溶液中检测阴离子还很困难,这将是一个进一步研究的课题。

4 树枝状大分子在气体传感器中的应用

树枝状大分子气体传感器的研究近年来得到了很大的发展,这是由于树枝状大分子气体传感器具有高灵敏度、高选择性等优点,因而也成为气体传感器研究领域的热点,并已经广泛应用于环境等实际应用研究中。其检测原理是:树枝状大分子气体传感器是以树枝状大分子为载体,为目标分子的选择性吸附提供位点,通过检测相互作用导致的物性变化(如导电率变化)而得知检测气体分子存在的信息。

通过层层自组装构建含有金纳米粒子的树枝状薄膜,它们有效地作为具有导电率测试的阻抗器对甲苯、丙醇和水蒸气进行检测,膜的选择性基于树枝状大分子的溶解特性^[76]。基于 PAMAM 树枝状大分子薄膜具有高 CO_2/N_2 选择性,对 CO_2 进行分离^[77-78]。Gao 等^[79] 研究了炭黑-树枝状复合物能够检测挥发性的有机胺和羧酸,与非树枝状绝缘炭黑复合物相比,末端氨基或羧基修饰的树枝状炭黑复合物能够增加对挥发性羧酸和胺检测的灵敏度。Duan 等^[80] 在壳聚糖层中将玻璃酸加入到 PAMAM 树枝状大分子组成膜中,它能够增加膜的溶胀度从而提高 CO_2 的分离性能。一种硅醚树枝状金纳米复合物用作 CO 传感器,CO 的浓度与电流成正比^[81]。 G_0 - G_6 PAMAM 树枝状大分子膜也能够对具有挥发性的不同功能基的有机化合物进行检测。研究发现 G_4 是最优的一代,原因可能由于它是最小的球形代并具有易进入的内腔。另外, Liang 等^[82] 设计了在功能化的 SBA-15 上逐步生长末端氨基的三聚氰胺树枝状大分子的方法并用做 CO_2 吸附剂, CO_2 的吸附能力得到增强。

5 树枝状大分子在传感器中的研究展望

树枝状大分子材料的出现为传感器的设计制作引发了新的思路,特别是在生物传感器、气体传感器和离子传感器方面具有广阔的应用前景。以下几个方面是未来树枝状大分子可能的发展方向。

(1) 开发和制备新的、多功能的树枝状大分子,研究和开发其新的优异性能,是今后研究的主流之一。

(2) 多功能树枝状大分子阵列及其微型化的研究。

(3) 高选择性的分子印迹树枝状大分子传感器是很有前景的研究方向,现已有报道^[83-85]。树枝状大分子作为主体分子和客体分子相互作用,在环境、医疗、催化、材料科学等领域的实际应用还需要进一步研究。

(4) 树枝状大分子能够作为支架、稳定纳米粒子,合适的支架能够获得耐压纤维、纳米胶、纳米管并将其应用在航空电子设备、半导体、发光二极管、粘合剂等领域,目前仍是一个难题。

参考文献

- [1] Tomalia D A, Dewald J R. US Patent [P]us: 4 507 466, 1985.
- [2] Tomalia D A, Dewald J R. US Patent [P]us: 4 568 737, 1986.
- [3] Newkome G R, He E, Moore C N. Suprasupermolecules with novel properties: metal dendrimers [J]. Chem Rev, 1999, 99: 1 689~1 746.
- [4] Astruc D, Chardac F. Dendritic catalysts and dendrimers in catalysis [J]. Chem Rev, 2001, 101: 2 991~3 024.
- [5] Tsukruk V V, Rinderspacher F, Bliznyuk V N. Self-assembled multilayer films from dendrimers [J]. Langmuir, 1997, 13: 2 171~2 176.
- [6] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites [J]. Science, 1997, 277: 1 232~1 237.
- [7] Tsukruk V V. Assembly of supramolecular polymers in ultrathin films [J]. Progr Polymer Sci, 1997, 22: 247~311.
- [8] Wanabe S J, Regen S L. Dendrimers as building block for multilayer construction [J]. J Am Chem Soc, 1994, 116: 8 855~8 856.
- [9] Zhang H, Grim P C M, Liu D, et al. Probing carboxylic acid groups in replaced and mixed self-assembled monolayers by individual ionized dendrimer molecules: an atomic force microscopy study [J]. Langmuir, 2002, 18: 1 801~1 810.
- [10] Cheng L, Cox J A. Preparation of multilayered nanocomposites of polyoxometalates and poly (amidoamine) dendrimers [J]. Electrochem Commun, 2001, 3: 285~289.
- [11] Wehs M, Crooks R M. Interactions between organized, surface-confined monolayers and vapor-phase probe molecules. 10. preparation and properties of chemically sensitive dendrimer surfaces [J]. J Am Chem Soc, 1996, 118: 3 988~3 989.
- [12] Zhu N N, Gu Y F, Chang Z, et al. PAMAM Dendrimers-Based DNA Biosensors for Electrochemical Detection of DNA Hybridization [J]. Electroanalysis, 2006, 18: 2 107~2 114.
- [13] Tokuhsa 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.
- [14] Zhang L, Huo F W, Wang Z Q, et al. Investigation into self-assembled monolayers of a polyether dendron thiol: chemisorption, kinetics and patterned surface [J]. Langmuir, 2000, 16: 3 813~3 817.
- [15] Cha B J, Kang Y S, Won J. Preparation and characterization of dendrimer layers on poly (dimethylsiloxane) films [J]. Macromolecules, 2001, 34: 6 631~6 636.
- [16] Rahman K M A, Duming C J, Turro N J, et al. Adsorption of poly (amidoamine) dendrimers on gold [J]. Langmuir, 2000, 16: 10 154~10 160.
- [17] Fail C A, Evenson S A, Ward L J, et al. Controlled attachment of PAMAM dendrimers to solid surfaces [J]. Langmuir, 2002, 18: 264~268.
- [18] Tokuhsa H, Zhao M, Baker L A, et al. Preparation and characterization of dendrimer monolayers and dendrimeralkanethiol mixed monolayers adsorbed to gold [J]. J Am Chem Soc, 1998, 120: 4 492~4 501.
- [19] Rosi N L, Mirkin C A. Nanostructures in biodiagnostics [J]. Chem Rev, 2005, 105: 1 547~1 562.
- [20] Beier M, Hoheisel J D. Versatile derivatization of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27: 1 970~1 977.
- [21] Oh S J, Ju J, Kim B C, et al. DNA microarrays on a dendron-modified surface improve significantly the detection of single nucleotide variations in the p53 gene [J]. Nucleic Acid Res, 2005, 33: e90.
- [22] Hong B J, Sunkara V, Park J W. DNA microarrays on nanoscale-controlled surface [J]. Nucleic Acid Res, 2005, 33: e106.
- [23] Benters R, Niemeyer C M, Wohrle D. Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays [J]. ChemBioChem, 2001, 2: 686~694.
- [24] Talor S, Smith S, Windle B, et al. Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: e87.
- [25] Trevisol E, Leberre-Anton V, Leclaire J, et al. Dendrids, dendrichips: a simple chemical functionalization of glass slides with phosphorus dendrimers as an effective means for the preparation of biochips [J]. New J Chem, 2003, 27: 1 713~1 719.
- [26] Le Berre V, Trevisol E, Dagkessamanskaia A, et al. Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: e88.
- [27] Chaize B, Nguyen M, Ruyschaert T, et al. Microstructured liposome array [J]. Bioconjugate Chem, 2006, 17:

- 245-247.
- [28] Lim S B, Kim K W, Le C W, et al. Improved DNA chip with poly (amidoamine) dendrimer peripherally modified with biotin and avidin [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2008, 13: 683 ~ 689.
- [29] Rozkiewicz D I, Brugman W, Kerkhoven R M, et al. Dendrimer-mediated transfer printing of DNA and RNA microarrays [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 11 593 ~ 11 599.
- [30] Rozkiewicz D I, Gierlich J, Burley G A, et al. Transfer Printing of DNA by "Click" Chemistry [J]. *Chem-BioChem*, 2007, 8: 1 997 ~ 2 002.
- [31] Ritort F, Mihardja S, Smith S B, et al. Condensation transition in DNA-polyaminoamide dendrimer fibers studied using optical tweezers [J]. *Phys Rev Lett*, 2006, 96: 118 301 ~ 118 304.
- [32] Al-Jamal K T, Ramaswamy C, Florence A T. Supramolecular structures from dendrons and dendrimers [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2005, 57: 2 238 ~ 2 270.
- [33] Kim B S, Lebedeva O V, Koynov K, et al. Effect of dendrimer generation on the assembly and mechanical properties of DNA/phosphorus dendrimer multilayer microcapsules[J]. *Macromolecules*, 2006, 39: 5 479 ~ 5 483.
- [34] Maiti P K, Bagchi B. Structure and dynamics of DNA-dendrimer complexation: role of counterions, water, and base pair sequence[J]. *Nano Lett*, 2006, 6: 2 478 ~ 2 485.
- [35] Kostianen M A, Szilvay G R, Smith D K, et al. Multivalent Dendrons for High-Affinity Adhesion of Proteins to DNA[J]. *Angew Chem, Int Ed*, 2006, 45: 3 538 ~ 3 542.
- [36] Kostianen M A, Smith D K, Ikkala O. Optically Triggered Release of DNA from Multivalent Dendrons by Degrading and Charge-Switching Multivalency [J]. *Angew Chem, Int Ed*, 2007, 46: 7 600 ~ 7 604.
- [37] Su C J, Liu Y C, Chen H L, et al. Two-dimensional densely packed DNA nanostructure derived from DNA complexation with a low-generation poly (amidoamine) dendrimer [J]. *Langmuir*, 2007, 23: 975 ~ 978.
- [38] Astruc D, Daniel M C, Ruiz J. Dendrimers and gold nanoparticles as exo-receptors sensing biologically important anions[J]. *Chem Commun*, 2004, 23: 2 637 ~ 2 649.
- [39] Alonso E, Valerio C, Ruiz J, et al. Polycationic metallo-dendrimers with cobalticinium and FeCp (arene)⁺ termini [J]. *New J Chem*, 1997, 21: 1 139 ~ 1 141.
- [40] Ornelas C, Ruiz J, Astruc D. Dendritic and Ion-Pairing Effects in Oxo-anion Recognition by Giant Alkylferrocenyl Dendrimers [J]. *Organometallics*, 2009, 28: 4 431 ~ 4 437.
- [41] Daniel M C, Ruiz J, Astruc D. Supramolecular H-bonded assemblies of redox-active metallo-dendrimers and positive and unusual dendritic effects on the recognition of H₂PO₄⁻ [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 1 150 ~ 1 151.
- [42] Labande A, Astruc D. Colloids as redox sensors: recognition of H₂PO₄⁻ and HSO₄⁻ by amidoferrocenylalkylthiol-gold nanoparticles [J]. *Chem Commun*, 2000, 12: 1 007 ~ 1 008.
- [43] Daniel M C, Ruiz J, Nlate S, et al. Gold nanoparticles containing redox-active supramolecular dendrons that recognize H₂PO₄⁻ [J]. *Chem Commun*, 2001, 19: 2 000 ~ 2 001.
- [44] Daniel M C, Ba F, Ruiz J, et al. Assemblies of Redox-Active Metallo-dendrimers Using Hydrogen Bonding for the Electrochemical Recognition of the H₂PO₄⁻ and Adenosine-triphosphate (ATP²⁻) Anions [J]. *Inorg Chem*, 2004, 43: 8 649 ~ 8 657.
- [45] Deng L, Wang L, Yu H, et al. Synthesis and electrochemical properties of phloroglucin-based ferrocenyl compounds and their application in anion recognition [J]. *J Appl Polym Sci*, 2008, 107: 1 539 ~ 1 546.
- [46] Astruc D, Daniel M C, Ruiz J. Dendrimers and gold nanoparticles as exo-receptors sensing biologically important anions [J]. *Chem Commun*, 2004, 23: 2 637 ~ 2 649.
- [47] Daniel M C, Juiz J, Blais J C, et al. Synthesis of Five Generations of Redox-Stable Pentamethylamidoferrocenyl Dendrimers and Comparison of Amidoferrocenyl- and Pentamethylamidoferrocenyl Dendrimers as Electrochemical Exoreceptors for the Selective Recognition of H₂PO₄⁻, HSO₄⁻, and Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) Anions: Stereoelectronic and Hydrophobic Roles of Cyclopentadienyl Permethylation [J]. *Chem A-Eur J*, 2003, 9: 4 371 ~ 4 379.
- [48] Alonso B, Casado C M, Cuadrado I, et al. Effective recognition of H₂PO₄⁻ by a new series of dendrimers functionalized with ferrocenyl-urea termini [J]. *Chem Commun*, 2002, 16: 1 778 ~ 1 779.
- [49] Mery D, Plault L, Ornelas C, et al. From Simple Monopyridine Clusters [Mo₆Br₁₃(Py-R)][n-Bu₄N] and Hexapyridine Clusters [Mo₆X₈(Py-R)₆][OSO₂CF₃]₄ (X= Br or I) to Cluster-Cored Organometallic Stars, Dendrons, and Den-

- drimers [J]. *Inorg Chem*, 2006, 45:1 156 ~ 1 167.
- [50] Ornelas C, Ruiz J, Cloutet E, et al. Click Assembly of 1,2,3 - Triazole - Linked Dendrimers, Including Ferrocenyl Dendrimers, Which Sense Both Oxo Anions and Metal Cations [J]. *Angew Chem*, 2007, 119: 890 ~ 895.
- [51] Beer P D. Anion recognition and sensing: the state of the art and future perspectives [J]. *Angew Chem, Int Ed*, 2001, 40: 486 ~ 516.
- [52] Beer P D, Bayly S R. Anion sensing by metal -based receptors [J]. *Top Curr Chem*, 2005, 255: 125 ~ 162.
- [53] Valerio C, Fillaut J L, Ruiz J, et al. The dendritic effect in molecular recognition: ferrocene dendrimers and their use as supramolecular redox sensors for the recognition of small inorganic anions [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 2 588 ~ 2 589.
- [54] Aranzaes J R, Belin C, Astruc D. Assembly between gold -thiolate nanoparticles and the organometallic cluster $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\mu\text{-3-CO})_4]$ toward redox sensing of oxo-anions [J]. *Chem Commun*, 2007, 23: 3 456 ~ 3 458.
- [55] Losada J, Cuadrado I, Moran M, et al. Ferrocenyl silicon-based dendrimers as mediators in amperometric biosensors [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 338: 191~198.
- [56] Armada M, Losada J, Zamora M, et al. Electrocatalytic properties of polymethylferrocenyl dendrimers and their applications in biosensing [J]. *Bioelectrochemistry*, 2006, 69: 65 ~ 73.
- [57] Losada J, Zamora M, Armada P G, et al. Bienzyme sensors based on novel polymethylferrocenyl dendrimers [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385: 1 209~1 217.
- [58] Armada M P G, Losada J, Cuadrado I, et al. Preparation of biosensors based in a siloxane homopolymer with interacting ferrocenes for the amperometric detection of peroxides [J]. *Sens Actuators B*, 2004, 101: 143 ~ 149.
- [59] Armada M P G, Losada J, Cuadrado I, et al. A siloxane homopolymer with interacting ferrocenes as a new material for the preparation of sensors based on the detection of hydrogen peroxide [J]. *Electroanalysis*, 2003, 15: 1 109 ~ 1 114.
- [60] Fernandes E G R, De Queiroz A A A. A bioconjugated polyglycerol dendrimer with glucose sensing properties [J]. *J Mater Sci: Mater Med*, 2009, 20: 473 ~ 479.
- [61] Crespiho F N, Ghica M E, Florescu M, et al. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator [J]. *Electrochem Commun*, 2006, 8: 1 665 ~ 1 670.
- [62] Lee Y, Kim J, Kim S Y. Protein -conjugated, glucose -sensitive surface using fluorescent dendrimer porphyrin [J]. *J Mater Chem*, 2009, 19:5 643 ~ 5 647.
- [63] Yoon H C, Lee D, Kim H S. Reversible affinity interactions of antibody molecules at functionalized dendrimer monolayer: affinity -sensing surface with reusability [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 456: 209 ~ 218.
- [64] Lina M, Liua Y J, Liub C H, et al. Sensitive immunosensor for benzo[a]pyrene detection based on dual amplification strategy of PAMAM dendrimer and amino -modified methylene blue/SiO₂ core -shell nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011 26: 3 761 ~ 3 767.
- [65] Rios L, Garcia A A. Dendrimer based non -competitive fluoroimmunoassay for analysis of cortisol [J]. *React Funct Polym*, 2008, 68: 307 ~ 314.
- [66] Montanez M I, Perez -Inestrosa E, Suau R, et al. Dendrimerized Cellulose as a Scaffold for Artificial Antigens with Applications in Drug Allergy Diagnosis [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1 461 ~ 1 466.
- [67] Manea M, Przybilski M, Hudecz F, et al. Design, structural, and immuno-analytical properties of antigenic bioconjugates comprising a β -amyloid -plaque specific epitope[J]. *Peptide Science*, 2008, 90: 94 ~ 104.
- [68] Zhang Q, Sha Y W, Wang J H. 8 -Hydroxyquinoline Dansylates Modified with PAMAM Dendrimer as Fluorescent Fe³⁺ Sensors [J]. *Molecules*, 2010, 15: 2 962 ~ 2 971.
- [69] Gupta V K , Chandra S, Agarwal S, et al. Lithium-selective potentiometric sensor based on a second generation carbosiloxane dendrimer [J]. *Sens Actuators B*, 2005, 107: 762 ~ 767.
- [70] Chandra S, Buschbeck R, Lang H. Triethylene Glycol Ether End -grafted Carbosilane Dendrimer: A Potential Ionophore for Potassium Ion Recognition [J]. *Anal Sci*, 2006, 22: 1 327 ~ 1 332.
- [71] Lopez J A, Manriquez J , Mendoza S, et al. Design and construction of nickel hexacyanoferrate -Starburst PAMAM dendrimer modified gold electrodes for the potentiometric detection of potassium in aqueous media [J]. *Electrochem Commun*, 2007, 9: 2 133 ~ 2 139.
- [72] Sethi B, Chandra S , Kumar S, et al. Crown ether -dendrimer based potentiometric Na⁺ sensor electrode [J]. *J Electroanal Chem*, 2011, 651: 185 ~ 190.
- [73] Chandra S, Buschbeck R, Lang H. A 15 -crown -5 -functionalized carbosilane dendrimer as ionophore for ammonium selective electrodes [J]. *Talanta*, 2006,70: 1 087 ~

- 1 093.
- [74] Casado C M, Cuadrado I, Alonso B, et al. 1,1'-Bis(dimethylvinylsilyl) ferrocene as a Two-Directional Core for the Construction of Homo- and Heterometallic Systems [J]. *J Electroanal Chem*, 1999, 463: 87 ~ 92.
- [75] Stone D L, Smith D K. Anion binding at the core of branched ferrocene derivatives [J]. *Polyhedron*, 2003, 22: 763 ~ 768.
- [76] Krasteva N, Besnard I, Guse B, et al. Self-assembled gold nanoparticle/dendrimer composite films for vapor sensing applications [J]. *Nano Lett*, 2002, 2: 551 ~ 555.
- [77] Duan S, Kouketsu T, Kasama S, et al. Development of PAMAM dendrimer composite membranes for CO₂ separation [J]. *J Membr Sci*, 2006, 283: 2 ~ 6.
- [78] Kouketsu T, Duan S, Kai T, et al. PAMAM dendrimer composite membrane for CO₂ separation: Formation of a chitosan gutter layer [J]. *J Membr Sci*, 2007, 287: 51 ~ 59.
- [79] Gao T, Tillman E S, Lewis N S. Detection and classification of volatile organic amines and carboxylic acids using arrays of carbon black-dendrimer composite vapor detectors [J]. *Chem Mater*, 2005, 17: 2 904 ~ 2 911.
- [80] Duan S, Chowdhury F A, Kai T, et al. PAMAM dendrimer composite membrane for CO₂ separation: addition of hyaluronic acid in gutter layer and application of novel hydroxyl PAMAM dendrimer [J]. *Desalination*, 2008, 234: 278 ~ 285.
- [81] Koo B W, Song C K, Kim C. CO gas sensor based on a conducting dendrimer [J]. *Sens Actuators B*, 2001, 77: 432 ~ 436.
- [82] Liang Z, Fahdel B, Schneider C J, et al. Stepwise growth of melamine-based dendrimers into mesopores and their CO₂ adsorption properties [J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2008, 111: 536 ~ 543.
- [83] Zimmerman S C, Zharov I, Wendland M S, et al. Molecular Imprinting Inside Dendrimers [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 13 504 ~ 13 508.
- [84] Elmer S L, Lemcoff N G, Zimmerman S C. Exploring the reversibility of the ring-closing metathesis mediated cross-linking of dendrimers [J]. *Macromolecules*, 2007, 40: 8 114 ~ 8 118.
- [85] Mertz E, Zimmerman S C. Cross-linked dendrimer hosts containing reporter groups for amine guests [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 3 424 ~ 3 425.

纳米二氧化硅颗粒免疫凝聚用于霍乱毒素的检测研究

余红伟¹, 王源升^{1,2*}, 李瑜¹, 蒋健晖³, 吴海龙³, 魏徵¹, 沈国励³, 俞汝勤³

(1. 海军工程大学理学院化学与材料系, 湖北武汉 430033)

(2. 四川大学高分子材料科学与工程国家重点实验室, 四川成都 610065)

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

摘要: 提出了一种基于 SiO₂ 纳米颗粒免疫凝聚反应的压电传感器对霍乱毒素的直接检测, 研究发现待测物霍乱毒素会同时被晶振表面固定的霍乱毒素抗体和检测体系中 SiO₂ 标记的霍乱毒素抗体识别, 引起检测体系中的 SiO₂ 在传感界面上特异性凝聚, 从而引起晶振表面的巨大质量变化和检测介质密度和粘度变化。实验结果表明, 该方法修饰的探针能够有效地对霍乱毒素进行检测。

关键词: 纳米二氧化硅; 免疫凝聚; 霍乱毒素

The detection of cholera toxin based on agglutination reaction with amplification of silica nanoparticles

Yu Hong-wei¹, Wang Yuan-sheng^{1,2*}, Li Yu¹, Jiang Jian-hui³, Wu Hai-long³, Wei Zheng¹

Shen Guo-li³, Yu Ru-qin³

(1. Naval University of Engineering, Wuhan 430033, China)

(2. State Key Laboratory of Polymer Materials Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

(3. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A simple piezoelectric immunoagglutination assay technique has been developed for direct detection of cholera toxin. It was based on the specific agglutination of cholera toxin antibody-coated silica nanoparticles in the presence of cholera toxin. The antibody modified on the probe surface would combine with antibody-coated nanoparticles in the presence of antigen (cholera toxin) when the surface agglutination reaction took place, which couples both the mass effect and the viscoelastic effect acting on the probe. The results indicated that the probe signal can be observably multiplied.

Key words: silica nanoparticles; immunoagglutination; cholera toxin

0 引言

胶乳凝集试验方法(LAT)是将抗体结合到胶乳微粒(直径约 1.0 μm)表面,通过抗体识别相应抗原的特异性凝集反应,实现了对目标抗原的灵敏检测^[1],LAT 具有简单、轻便、快速、选择性高等优点。1990年, Kurosawa 等^[2]首次将胶乳凝集法应用于压电传感检测领域,提出了一种胶乳型压电免疫检测方法(LPEIA),利用压电晶体对胶

乳免疫凝集反应引起溶液密度、粘度等非质量参数变化的灵敏响应进行检测。其后,人们利用这种非质量效应型压电传感分析模式检测了多种生化物质^[3-7]。近年来,人们采用纳米或亚微米级颗粒取代传统微米级胶乳进行凝集试验的研究发展很快^[7-9]。相对传统 LAT 而言,基于纳米或亚微米级颗粒的免疫凝集试验具有许多优点:颗粒的悬浮稳定性高、背景响应信号低、易于获得较低检测下限等^[7-9]。特别是 SiO₂ 颗粒作为亲水型

* 通讯联系人

材料,比普通胶乳具有更高的密度、比表面积和物理化学稳定性,同时易于制备和进行功能化处理,从而用作生物活性物质的载体(标记体)进行生化检测具有许多优势。

李瑜等进行了一系列基于压电 LAT 技术结合 SiO₂ 纳米颗粒对目标物的检测研究^[10-14],该文以 SiO₂ 纳米颗粒替代传统胶乳微粒标记霍乱毒素抗体,根据压电免疫凝集传感原理建立了一种改进的 LPEIA 技术用于霍乱毒素的直接、快速的检测。实验中,将修饰好的探针浸入磷酸盐缓冲液中,接着加入霍乱毒素抗体标记的 SiO₂ 纳米颗粒。反应体系中 SiO₂ 纳米颗粒表面的霍乱毒素抗体与霍乱毒素发生免疫凝集反应,使得溶液的粘度发生变化。该实验先在晶振表面固定霍乱毒素抗体,再用 BSA 封闭金电极表面未结合抗体的位点,以有效地减少非特异性吸附,而且探针上修饰的抗体可以结合抗原-SiO₂-抗体复合物。因此,该传感器的信号通过两个因素获得有效放大:一是溶液性质的变化包括密度和粘度;二是吸附在晶振表面的物质的质量变化。将压电检测的质量效应和溶液粘弹性的变化有效结合,很好的起到信号放大作用,实现了对目标物的直接、快速、灵敏的检测。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正硅酸乙酯(TEOS)和曲拉通 X-100(广东省汕头市西陇化工厂);霍乱毒素(Cholera Toxin from *Vibrio cholerae*)及其抗体(Anti-Cholera Toxin antibody produced in rabbit)、3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTES)(Sigma-Aldrich 公司);氨水(30%)、丙酮、乙醇、聚乙二醇(PEG, MW 6.0 kD)(天津天泰精细化工公司);戊二醛(GLU)(Fluka 试剂公司);血清白蛋白(BSA)(北京鼎国生物制品有限公司)。

9 MHz、AT-切型双面镀金石英晶振(QCM)(北京晨星无线电设备厂);压电分析仪(QCA922)(美国普林斯顿应用研究所);磁力搅拌器(Model JB-2)(上海分析仪器厂);CSS501 型恒温箱(重庆实验装备厂);TCL-16A 型台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);透射电子显微镜(TEM, HITACHI-H800)(日本 HITACHI 公司);铜

栅(No.50-230)(中国科学院北京科学仪器公司);B220S-T 型超声清洗器(上海必能信超声有限公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 纳米二氧化硅颗粒的制备及标记

按文献[13]报道的通过氨水催化正硅酸乙酯(TEOS)水解制备 SiO₂ 颗粒,在此实验中所用到的玻璃器皿均先用王水浸泡再用超纯水清洗。压电免疫凝集过程通过将石英晶片浸于含缓冲溶液(PBS, pH7.4)的自制的反应池来测定。

具体流程如下:

制备二氧化硅颗粒:

①将 15 mL 曲拉通 X-100、60 mL 环己烷、15 mL 正己醇依次加入到 250 mL 的三颈烧瓶中于室温下(25 °C)剧烈搅拌反应 15 min,搅拌器转速为 400 r/min(下文中搅拌器均为此转速)。②加入 4 mL 去离子水到三颈烧瓶中,室温下搅拌 15 min。③加入 2 mL 氨水(30%)到三颈烧瓶中,室温下搅拌 15 min。④加入 2 mL 正硅酸乙酯(TEOS)到三颈烧瓶中,于室温下搅拌 24 h。⑤将制得的 SiO₂ 纳米颗粒悬混于丙酮进行离心分离,再采用乙醇和水进行超声洗涤和分离,以除去“油”和表面活性剂分子。透射电镜分析结果表明这样制出的 SiO₂ 纳米颗粒的粒径大约为 50 nm(见图 1)。

二氧化硅颗粒的氨基硅烷化及抗体标记:

①取一定量(30 mg) SiO₂ 颗粒悬混于 10 mL 甲醇中,加入 0.30 mL APTES,超声分散 15 min 后,再于室温下搅拌反应 12 h,离心分离;然后依次采用甲醇和 PBS 溶液(pH7.0)进行超声洗涤,再离心分离,即完成 SiO₂ 颗粒的氨基硅烷化。②取 10 mL 氨基硅烷化的 SiO₂ 颗粒悬浊液,先超声分散 15 min,再加入 5.0 mL 2.5%戊二醛,于室温下搅拌反应 3 h,再离心分离,即完成颗粒的醛基化。③将醛基化的 SiO₂ 颗粒悬混于 4.0 mL PBS 溶液,超声分散 15 min 后,加入 1.0 mL 霍乱毒素抗体原液,于 37 °C 下温育 1 h,离心分离,即制得霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒。然后,将颗粒悬混于 4.0 mL PBS 溶液中,加入 1 mL 浓度为 10 mg/mL 的 BSA,于室温下搅拌反应 1.5 h,以封闭霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒表面非特异性结合(醛基)位点,离心分离,最后以 PBS 溶液超声洗涤,并悬混

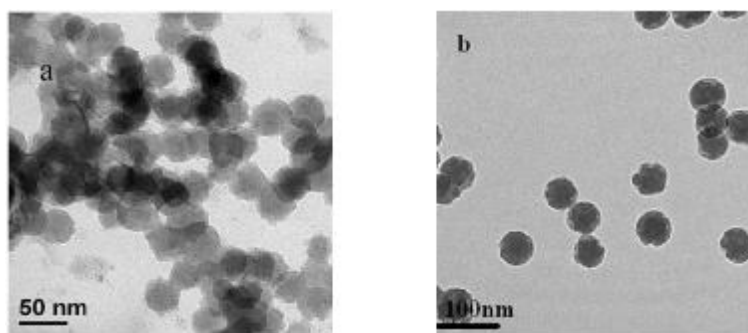


图1 纳米二氧化硅的透射电镜图:(a)凝聚后的硅颗粒;(b)氨基硅烷化的硅颗粒

Fig.1 TEM figures of silica nanoparticles: (a) agglutinated silica nanoparticles; (b) amine-derivatized silica nanoparticles

于 3.0 mL PBS 溶液,直接用于分析或于 4 °C 下保存(一般可稳定 2 个月)。

1.2.2 传感器金电极修饰

滴加 30 μL 滴度为 900 的霍乱毒素抗体溶液到洗净的压电探针表面,晶振的一面用 O 型橡胶圈和塑料片封闭,使之单面触液于 37 °C 恒温槽中温育 1 h 后用去离子水将晶振表面洗净晾干,加 30 μL 浓度为 10 mg/mL BSA 溶液到压电探针表面,在 37 °C 恒温槽下温育 1 h 以封闭其表面蛋白吸附位点,再以 PBS 溶液(pH7.4)洗涤后,晾干备用。

1.2.3 凝聚检测

将修饰好的压电传感探针安装于盛有一定体积的 PBS 溶液 (pH6.7, 1.5 mg/mL PEG, 40 mmol/L NaCl) 的检测池中。在缓慢搅拌下向反应池中注入一定量的霍乱毒素抗体-SiO₂ 悬浊液,检测池中溶液的总容积为 200 μL 。待探针的响应频率达到稳定后,再加入不同浓度的霍乱毒素到反应池中。在免疫反应进行期间,频率响应数据均被记录,直到响应达到平衡。对压电石英晶振的响应性能的考察主要包括以下方面:探针表面修饰,分析介质的组成以及相应的控制实验。所有实验数据都重复三次以上,实验温度控制在 25 °C。

2 结果与讨论

在凝聚反应体系中,随着免疫反应的进行,免疫凝集物逐渐在溶液中形成。这些免疫凝集物不仅能改变吸附在晶振表面的质量负载,而且能同时改变体系溶液的密度及粘度。为了得到理想

的频率响应,晶振表面必须通过修饰来消除非特异性吸附。非特异性吸附一般是由于血清成分与传感器表面之间的静电作用引起的^[15]。Chen 等^[14]考察了多种界面修饰方案来降低由非特异性吸附而造成的背景干扰。晋晓勇等^[12]也考察了不同的界面修饰对免疫凝聚的影响。研究结果表明,晶振表面用抗体和 BSA 封闭后可以有效地抑制探针表面的非特异性吸附。因此在该实验中,先在晶振表面修饰霍乱毒素抗体,再用 BSA 进行封闭。这样处理后,BSA 作为封闭剂可以有效地降低非特异性吸附;霍乱毒素抗体修饰的传感界面可以特异性结合抗原-SiO₂-抗体复合物,从而引起显著的频率响应。

2.1 分析介质优化

分析介质的优化对于提高免疫凝集分析的灵敏度和消除血清成分非特异性吸附非常重要。在该实验中,免疫凝集分析介质包括以下几个主要因素:pH 值对凝集反应的影响;NaCl 浓度对凝集反应的影响;抗体标记的纳米二氧化硅颗粒的合适用量;一定量的 PEG 作为免疫凝集反应的促进剂。

由于免疫凝集过程与胶体的带电量及其性质密切相关,因而受环境 pH 条件的影响较大。图 2(a)显示了溶液 pH 值对特异性凝集反应的影响。从图中可看出,在 pH7.0 溶液中,免疫凝集反应的响应频率达到峰值。表明中性条件有利于霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒免疫识别相应抗体,这可能因为中性 pH 值条件下,霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒间以及抗体与抗原间静电排斥力较小,从而有利于颗粒发生免疫凝集反应而且利于反应主体间

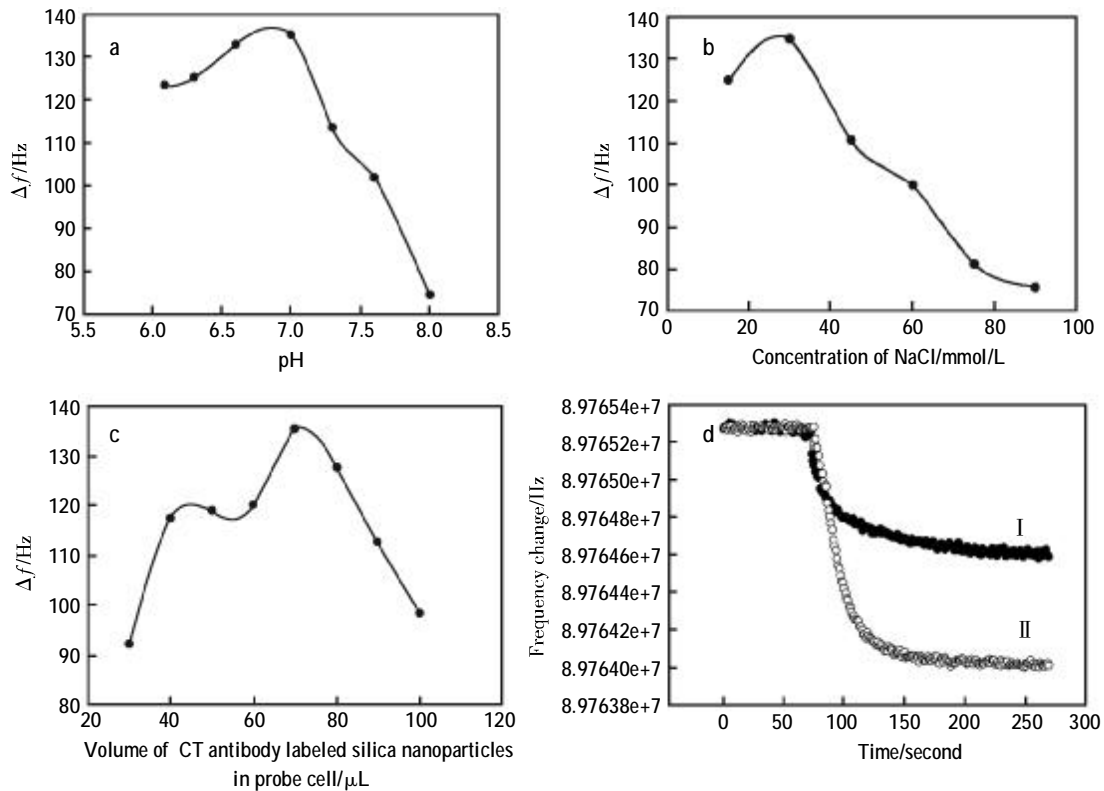


图 2 分析介质的优化

(a)不同 pH 值下晶振对 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 霍乱毒素的频率响应;(b)不同盐离子(NaCl)浓度下晶振对 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 霍乱毒素的频率响应,溶液的 pH 值为 7.0;(c)压电探针表面检测池中抗体标记纳米二氧化硅的用量对霍乱毒素的频率响应;(d)PEG 对凝聚反应的影响: I 为未使用 PEG 时压电探针对 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 霍乱毒素的实时频率响应, II 为使用 PEG 后压电探针的实时频率响应

Fig.2 Optimization of the assay medium, the concentration of cholera toxin in the experiment is 2.5 $\mu\text{g/mL}$
 (a) pH dependence of the probe in pH(6.0 ~ 8.0); (b) ion-strength dependence of the probe in 10 ~ 90 mmol/L NaCl, the pH of the solution is 7.0; (c) frequency responses of the probe, where the volume of the CT antibody labeled silica nanoparticles in probe cell varied from 20 μL to 100 μL , the total volume of the solution in probe cell is 200 μL ; (d) comparison of frequency response processes between without (I) PEG and (II) with PEG amplified immunoagglutinations

保持凝集所需的合适库仑作用力^[17]。因此,实验选择在 pH7.0 的 PBS 溶液中进行免疫凝集检测。

实验通过向缓冲溶液中加入不同浓度 NaCl 考察了离子强度对免疫凝集反应的影响。从图 2 (b)可看出,免疫凝集反应的响应频移值随着溶液中 NaCl 的浓度增加而增加,至 NaCl 浓度为 30 mmol/L 时达到峰值。当 NaCl 浓度超过 30 mmol/L 时,响应频移值即随其浓度的增加而递减。表明 30 mmol/L NaCl 为免疫凝集反应适宜的离子强度。适宜的 NaCl 浓度不仅有助于促进或加速免疫识别/凝集过程^[17],而且对非特异性凝集/吸附具有一定的抑制作用^[5]。

实验通过加入不同用量的霍乱毒素抗体-

SiO₂ 颗粒于检测缓冲液中,检测池中溶液的总积为 200 μL 。考察了颗粒用量对免疫凝集反应的影响。由图 2(c)可知,霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒浓度对免疫凝集反应的影响明显,并当颗粒用量为 70 μL 时响应频移值最大。这是因为霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒浓度过低,引起的溶液密度和粘度变化小;而颗粒浓度过高则导致溶液中密度和粘度过大,免疫凝集反应的传质位阻增加,凝集反应的响应频移值随即下降^[12]。

聚乙二醇 (PEG) 是一种水溶性的聚合物,PEG 作为凝集反应促进剂已被广泛用于胶乳型免疫凝集分析或作为沉淀剂用于不同种类物质的分离。实验中,通过加入 PEG 于检测缓冲溶液

中,考察了 PEG 对霍乱毒素抗体-SiO₂ 颗粒免疫凝集反应的促进作用。图 2(d)比较了实验使用和未使用 PEG 进行免疫凝集反应时探针的频率响应结果。由图 2(d)可知,PEG 的应用大幅度地提高了凝集反应的响应频率值大小及其速率,PEG 分子中含有大量醚键,可以很容易通过氢键与蛋白质分子绑定,从而降低了蛋白质分子与水分子之间的亲和力^[15]。促进凝聚反应的进行,该实验中使用 PEG 的浓度参考文献[13],检测介质中 PEG 的终浓度为 1.5 mg/mL。

2.2 免疫凝聚检测霍乱毒素

在最优化的实验条件下(检测溶液的 pH 值为 7.0、NaCl 浓度为 30 mmol/L、200 μL 检测介质中抗体标记的纳米二氧化硅颗粒为 70 μL、溶液中 PEG 的终浓度为 1.5 mg/mL),检测了一系列不同浓度的霍乱毒素的频率响应值与浓度关系。图 3 为该传感器的频率变化值和不同浓度的霍乱毒素之间的校准曲线。如图 3 中的插图所示,在霍乱毒素浓度为 0.50~1.5 μg/mL 的范围内,压电免疫传感器的频率变化值与霍乱毒素浓度成线性

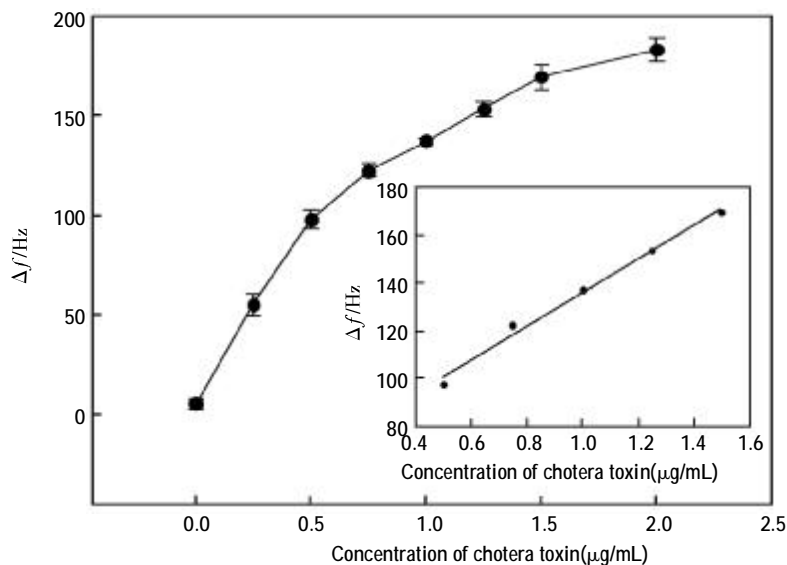


图 3 传感器对霍乱毒素的检测曲线,内插图均为线性范围的线性拟合,实验数据均是在最优化条件下获得,每一个点的数据都平行测定三次取平均值,误差棒所示为三次测定的标准偏差

Fig.3 Calibration curve describing the relationship between the frequency responses and varying concentrations of cholera toxin under the optimized conditions. Inset: linear relationship between the frequency responses and the different cholera toxin concentration. Each data point represents the average of the frequency responses of triplicate measurements. The error bars are standard deviations

关系,相关系数为 0.996。根据 3σ 规则估算出检测下限为 0.049 3 μg/mL。

2.3 传感器的选择性实验

为了验证免疫凝集检测的选择性,该文进行了控制实验。实验过程和检测霍乱毒素相似,将修饰好的压电传感探针安装于盛有 130 μL PBS 溶液 (pH7.0, 1.5 mg/mL PEG, 30 mmol/L NaCl) 的反应池中,在缓慢搅拌下向反应池中注入 70 μL 霍乱毒素抗体-SiO₂ 悬浊液。待探针的响应频率达到稳定后,再加入含有一定量的 BSA、HAS、羊 IgG、兔 IgG 等干扰物的待测样品到反应池中。在免疫反应进行期间,频率响应数据均被记录,直

到响应达到平衡。表 1 描述了该压电免疫凝集方法对不同检测物的试验结果。从表中可知,干扰物蛋白质引起的频率响应相对于霍乱毒素特异性凝集所引起的频率响应,可以忽略不计。

3 结论

该文系统研究了基于 SiO₂ 纳米颗粒免疫凝集的压电免疫传感器对霍乱毒素的直接检测。该压电免疫凝集检测体系拓展了 LPEIA 技术,发展了一种新的基于凝集反应的免疫检测方法。实验中,应用 TEM 考察并证实了 SiO₂ 标记的霍乱毒素抗体与相应抗原霍乱毒素的免疫凝集现象。所

表 1 传感器针对不同蛋白质的频率响应

Tab.1 Frequency response to cholera toxin, BSA, Goat IgG, Rabbit IgG and HSA evaluated by the developed immunoagglutination system

Samples	Concentration	Δf (Hz)	R.S.D. (%)
Cholera toxin(霍乱毒素)	2.0 $\mu\text{g/mL}$	173.0	3.1
BSA(牛血清白蛋白)	50 mg/mL	12.0	5.3
Rabbit IgG(兔 IgG)	原液	23.0	6.5
Goat IgG(羊 IgG)	原液	17.4	5.0
HAS(人血清白蛋白)	30 mg/mL	15.3	7.5

* Δf 为最优化条件下三次测定频率响应的平均值; R.S.D. (%)为三次测量的相对标准偏差

* Δf (Hz): Each of the frequency responses (F(Hz)) represents the average, value of triplicate assays under the optimized conditions. R.S.D. (%): Relative standard deviations (R.S.D. (%)) of three assays

研制的霍乱毒素抗体修饰的且用 BSA 封闭的探针对于样本具有更高的生物相容性与传感响应性能。这是由于探针的信号通过两个因素得到有效地放大—溶液性质的变化(密度及粘度)和晶振吸附的抗原-纳米颗粒-抗体复合物的质量变化。免疫凝集促进剂 PEG 及离子强度控制剂 NaCl 的使用显著提高了方法的检测灵敏度并降低了其敏感下限。该方法能够检测到霍乱毒素的最低浓度为 0.049 3 $\mu\text{g/mL}$ 。

参考文献

- [1] Singer J M, Plotz C M. The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. The American Journal of Medicine, 1956, 21 (6): 888 ~ 892.
- [2] Kurosawa S, Tawara E, Kamo N, et al. Latex piezoelectric immunoassay detection of agglutination of antibody-bearing latex using a piezoelectric quartz crystal[J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38: 1 117~1 120.
- [3] Muratsugu M, Kurosawa SKamo N. Detection of anti-streptolysin O antibody: application of an initial rate method of latex piezoelectric immunoassay[J]. Analytical Chemistry, 1992, 64(21): 2 483~2 487.
- [4] Ghourchian H O, Kamo N, Hosokawa T A, et al. Improvement of latex piezoelectric immunoassay detection of rheumatoid factor[J]. Talanta, 1994, 41(3): 401 ~ 406.
- [5] Chu X, Shen G L, Xie F Y, et al. Polymer agglutination-based piezoelectric immunoassay for the determination of human serum albumin[J]. Analytical Letters, 1997, 30 (10): 1 783 ~ 1 796.
- [6] Chen Huan, Zheng Yue, Jiang Jian-Hui, et al. An Ultrasensitive Chemiluminescence Biosensor for Cholera Toxin Based on Ganglioside -Functionalized Supported Lipid Membrane and Liposome[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 24: 684 ~ 689.
- [7] Ziemann P J. Particle Mass and Size Measurement Using Mass Spectrometry[J]. Trends in Analytical Chemistry, 1998,17(6): 322 ~ 328.
- [8] Medcalf E, Newman D, Gorman E, Price C. Rapid, robust method for measuring low concentrations of albumin in urine[J]. Clinical Chemistry, 1990, 36(3): 446 ~ 449.
- [9] Simo J M, Joven J, Cliville X, et al. Automated latex agglutination immunoassay of serum ferritin with a centrifugal analyzer [J]. Clinical Chemistry, 1994, 40: 625 ~ 629.
- [10] Santra S, Zhang P, Wang K, et al. Conjugation of biomolecule with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers [J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(20): 4 988 ~ 4 993.
- [11] Wang H, Lei C X, Li J S, et al. Highly sensitive potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen diagnosis [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 19(7): 701~709.
- [12] Jin Xiaoyong, Jin Xuefang, Ding Yanjun, et al. A novel piezoelectric immunosensor based on agglutination reaction with amplification of silica nanoparticles[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2008, 26: 2 191 ~ 2 196.
- [13] Zhu Shiguo, Lu Hongbin, Xiang Juanjuan, et al. A novel nonviral nanoparticle gene vector: Poly-L-lysine-silica nanoparticles[J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(8): 654 ~ 658.
- [14] Chen H, Jiang J H, Li Y F, et al. A novel piezoelectric immunoagglutination assay technique with antibody-modified liposome [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(6): 993 ~ 999.

- [15] Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, et al. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles[J]. *Science*, 1997, 277(5329): 1 078 ~ 1 081.
- [16] Wang H, Zhang Y, Yan B, et al. Rapid, Simple, and Sensitive Immunoagglutination Assay with SiO₂ Particles and Quartz Crystal Microbalance for Quantifying *Schistosoma japonicum* Antibodies [J]. *Clinical Chemistry*, 2006, 52 (11): 2 065 ~ 2 071.
- [17] Holownia P, Perez A S, Price C P. Effect of poly(ethylene glycol), tetramethylammonium hydroxide, and other surfactants on enhancing performance in a latex particle immunoassay of C-reactive protein [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(14): 3 426 ~ 3 431.

《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,国内外公开发行人,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

基于葡萄糖氧化酶-空壳钯修饰的新型葡萄糖传感器

齐骏飞, 杨卉彦, 胡 赢, 黄杉生*
(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 制备了空壳钯纳米粒子, 通过 TEM 对其空壳结构进行了表征。将空壳钯纳米粒子和葡萄糖氧化酶 (GOD) 修饰在玻碳电极 (GC) 表面, 构建了新型的葡萄糖传感器。空壳钯纳米粒子对过氧化氢 (H_2O_2) 具有良好的催化还原作用, 通过检测酶反应产生的 H_2O_2 可检测葡萄糖的浓度。在 -0.3 V 工作电位下, 在 $2.5 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 到 $2.7 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 范围内, 葡萄糖浓度与电流呈良好的线性关系, 检测限为 $10\ \mu\text{mol/L}$ (三倍信噪比)。该传感器还具有较好的稳定性、重现性、抗干扰性。

关键词: 空壳钯; 葡萄糖氧化酶; 葡萄糖; 生物传感器

A novel glucose sensor based on hollow palladium and glucose oxidase

Qi Jun-fei, Yang Hui-yan, Hu Ying, Huang Sha-sheng*
(Life and Environmental College, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The hollow Pd nanoparticles were synthesized and characterized by TEM. A novel biosensor based on hollow palladium and glucose oxidase immobilized on the surface of glassy carbon electrode for glucose detection was developed. The glucose can be determined by detecting H_2O_2 generated in enzyme reaction due to the electro-catalytic activity of hollow Pd toward H_2O_2 . Under the optimal conditions, a linear dependence of the catalytic current upon glucose concentration was obtained in the range of $2.5 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ to $2.7 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ with a detection limit of $10\ \mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$). The sensor also exhibits long-term stability, good reproducibility and good anti-interference ability.

Key words: hollow Pd nanoparticles; glucose oxidase; glucose; biosensor

0 引言

人体血液中的各种化学成分一直是评价人体健康状况的重要信息。而血糖水平则是衡量新陈代谢能力和糖尿病临床诊断的重要指标。糖尿病是我国的第三大高发疾病, 对人体有巨大的危害^[1]。如何控制和治疗糖尿病已经成为一项重要的任务。是否患有糖尿病, 主要根据患者血液中葡萄糖的浓度水平来判断。目前, 测试血糖浓度的方法有三种: 显色法、葡萄糖传感器及荧光法。三种方法各有优点, 其中葡萄糖传感器具有仪器装置简单, 选择性和灵敏度高、检测快速、

使用方便等优点, 在葡萄糖的定量检测方面显示出来独特的优越性, 所以葡萄糖传感器的研究备受人们关注^[2]。其中, 酶生物传感器因为快响应, 高敏感, 特异性和高选择性而被广泛关注。

近年来, 由于纳米材料在电学、光学、电磁性、催化等方面独特的性能, 在纳米传感器、纳米电子器件以及催化剂等领域具有巨大的应用潜力^[3-7]。其中纳米粒子, 如铂纳米粒子^[8-10]、铜纳米粒子^[11]等表现出了对过氧化氢 (H_2O_2) 良好的催化性能并被广泛的应用于传感器的制备。同时, 合成一些形貌可控的纳米材料越来越受人们的关注。通过控制实验条件, 可以制备各种

* 通讯联系人, E-mail: sshuang@shnu.edu.cn

形貌不同的纳米材料,如纳米纤维,纳米齿轮,纳米盘以及如树枝、星星或泡沫形状的各种纳米材料^[12-13]。但是很少有文献报道采用空壳钯作为敏感元件制备传感器。空壳材料代表了一类新型的催化性能良好的纳米材料^[14],由于它的空壳腔体,空壳纳米粒子可以在溶液中高度分散;而且它的比表面积大,暴露的活性位点多,所以能够有效的提高它催化性能。另一个优势是在催化过程中,空壳的腔体可以形成一个微小的反应器,充分与被催化的物质接触,从而增强它的催化性能。到目前为止,有很多的葡萄糖传感器都是通过葡萄糖氧化酶催化葡萄糖产生过氧化氢,而过氧化氢在电极上产生电信号来进行葡萄糖浓度监测的^[15]。所以,降低过氧化氢在电极上氧化或还原的过电位就成了很多研究关注的焦点。而在电极上过氧化氢发生氧化或还原一般都是在较高的电位条件下进行的,这样会导致许多干扰物质,如:尿酸、抗坏血酸等等,这样容易对葡萄糖的检测造成干扰^[16],而采用一种能够对过氧化氢具有良好催化还原性能的材料就可以较好的解决这个问题。

该文利用空壳钯纳米粒子对过氧化氢具有良好的催化还原性能,能够有效的降低过氧化氢在电极上还原的过电位的特性,将空壳钯纳米粒子和葡萄糖氧化酶(GOD)修饰在玻碳电极(GC)表面,构建了新型的葡萄糖传感器(GOD/hollow Pd/GC)。以循环伏安等方法研究了传感器的电化学响应特性,表明该电极能够有效的用于葡萄糖的检测。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

四丁基溴化磷(Bu_4PBr)购于百灵威;壳聚糖(Chits)、氯化钯(PdCl_2)、戊二醛购于国药集团上海分公司;葡萄糖氧化酶(GOD)、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 H_2O_2 购于生活试剂公司;磷酸盐缓冲液(PBS)由0.1 mol/L Na_2HPO_4 和0.1 mol/L NaH_2PO_4 配制。实验中所用试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

电化学工作站(CHI 760C,上海辰华公司);实验中采用三电极体系,修饰电极为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极

(SCE);循环伏安法(CV)、电化学阻抗谱图(EIS)在CHI 760C电化学工作站(上海辰华仪器公司,中国)上进行,采用三电极体系;透射电子显微镜(TEM, JEM-2010,日本)。所有的实验条件均在室温下进行。

1.2 传感器的制备

1.2.1 空壳钯纳米粒子的制备

空壳钯纳米粒子的制备根据Li等报道的方法进行^[17],并在其基础上进行了一定的改进。在温度25℃时,将320 mL含10 mmol/L的 Bu_4PBr 水溶液与16 mL 10 mmol/L的 PdCl_2 水溶液混合,混合液置于500 mL的反应容器内,不停地搅拌约4 min,在强力搅拌过程中将一定量的新制备好的 KBH_4 溶液快速加入到上述溶液中,溶液的颜色从桔黄色变成亮黑色,随着搅拌的进行,逐渐变成黑色的悬浊液,继续搅拌30 min左右,将产物离心分离,分别用超纯水和乙醇反复洗涤,得到空壳钯纳米球,最后将空壳钯纳米粒子储存在乙醇溶液中备用。

1.2.2 修饰电极的制备

玻碳电极分别用1.0、0.3、0.05 mm的氧化铝粉末抛光,直至产生一个光亮、平滑的表面,然后将电极分别置于1:1的硝酸、无水乙醇、超纯水中超声清洗3 min,得到干净的玻碳电极,用氮气吹干后备用。称取1 mg的空壳钯纳米颗粒将其溶于0.5%的壳聚糖溶液中,混合液超声30 min,得到混合均匀分散的电极修饰液,移取8 μL 1 mg/mL的hollow Pd-chit混合液滴涂在处理干净的玻碳电极表面,在干燥器中室温晾干;将5 mg GOD溶解于1 mL 0.1 mol/L PBS(pH = 7.0)的PBS中得到葡萄糖氧化酶的溶液浓度为5 mg/mL,然后将5 mg/mL葡萄糖氧化酶溶液50 μL , 5 mg/mL牛血清蛋白溶液50 μL , 25 mg/mL戊二醛溶液50 μL 充分混合后,取混合液8 μL 滴涂到修饰了空壳钯纳米粒子的玻碳电极上,将修饰好的电极放在冰箱中保持4℃干燥过夜,即得到修饰电极GOD/hollow Pd/GC。修饰电极不用时保存在4℃下0.1 mol/L的PBS(pH=7.0)中。

2 结果与讨论

2.1 空壳钯纳米粒子的TEM表征

以TEM对空壳钯纳米粒子的形貌进行了表

征。图 1 为空壳钯纳米粒子的 TEM 图,由图中表明,所制备的空壳钯纳米粒子直径在 50~100 nm 之间,且分散程度较好。

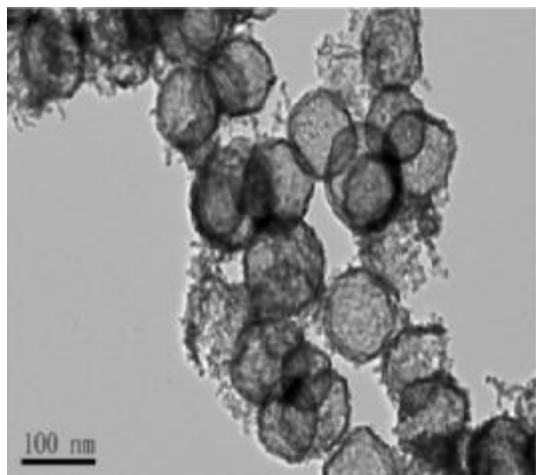


图 1 空壳钯纳米粒子的 TEM 图
Fig.1 TEM images of hollow Pd

2.2 修饰电极的 electrochemical impedance spectroscopy

电化学阻抗谱图(EIS)是一种最常用、高灵敏度的界面研究技术,被广泛用于修饰电极的界面特性分析。半圆的直径,也就是电子转移阻抗 R_{et} ,可以用来描述电极的界面性质。图 2 显示了不同修饰层电极在 10 mmol/L $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KNO_3 溶液中的电化学阻抗谱图,各曲线分别代表裸玻碳电极(GC),hollow Pd/GCE 和 GOD/hollow Pd/GCE 层层修饰的电极。由图可知,裸的 GC(曲线 a)抗图是一个半圆,当修饰了空壳钯纳

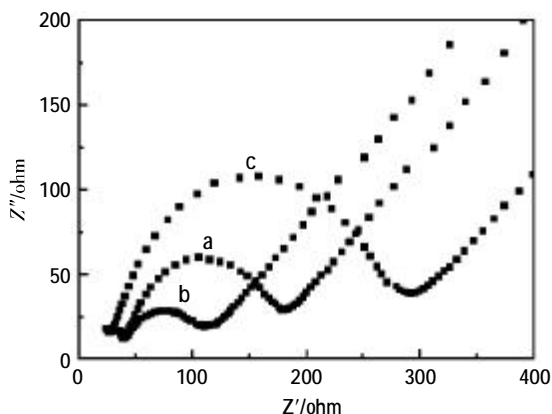
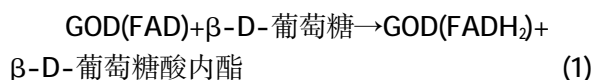


图 2 不同修饰层电极的阻抗谱图
(a)裸 GC;(b)hollow Pd/GC;(c)GOD/hollow Pd/GC
Fig.2 The EIS images of different layers modified electrode

米粒子后,曲线 b 的半圆的直径明显变小,这归功于空壳纳米粒子具有能够作为微小的导电中心,从而使得电子转移更加容易,这个现象说明修饰了空壳钯纳米粒子后电极的电子传递性能增加;曲线 c 是修饰了葡萄糖氧化酶后的电化学阻抗曲线,由图可以看出曲线 c 的半圆的直径明显变大,这是因为电极表面修饰的酶阻碍了 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 在电极表面的电子传递过程。通过电化学阻抗谱图的表征,可以看到空壳钯能够增强电极表面的电子传导能力;通过各修饰层阻抗曲线的变化,表明电极的修饰是成功的。

2.3 空壳钯纳米粒子对 H_2O_2 的催化还原表征

在许多研究中,基于葡萄糖氧化酶制备的葡萄糖传感器所产生的电信号很多都是由中间产物 H_2O_2 所产生的。修饰电极与底液接触后,溶液中的葡萄糖分子扩散到电极的表面,在氧存在条件下葡萄糖分子被 GOD 催化氧化成葡萄糖酸内酯,同时生成 H_2O_2 , H_2O_2 被氧化或还原,从而在电路中产生响应电流,如反应式(1),(2)所示。因此可以通过检测 H_2O_2 在电极上产生的响应电流来测定葡萄糖的浓度^[18-20]。



众所周知, H_2O_2 在裸的玻碳电极上也可以发生氧化或还原,但是氧化或还原的电位均较高,从而引起较大的背景电流和较多干扰物质的影响。此外,利用过氧化氢在电极上氧化产生电信号进行检测时,许多还原性的干扰物,如:尿酸、抗坏血酸等也容易被氧化从而产生较大的干扰电流。所以,选择一种新型的催化材料能够催化过氧化氢还原从而降低过氧化氢在电极上还原的过电位,可以有效的解决上述两个问题。为了探讨 hollow Pd 对 H_2O_2 的催化还原作用,以循环伏安法对其进行了研究。图 3 显示 hollow Pd/GC 和裸 GC(内插图)在不含 H_2O_2 (曲线 a)和含有 H_2O_2 (曲线 b)溶液中的循环伏安曲线。由内插图可以看到,在裸 GC 上 H_2O_2 的还原要在 -0.6 V 后才能发生,而且响应电流很小;然而,在修饰电极 hollow Pd/GC 上,自 -0.2 V 开始, H_2O_2 就可以发生还原反应,而且产生的响应电流明显增大。这些现象都归因于空壳钯纳米粒子对过氧化氢具

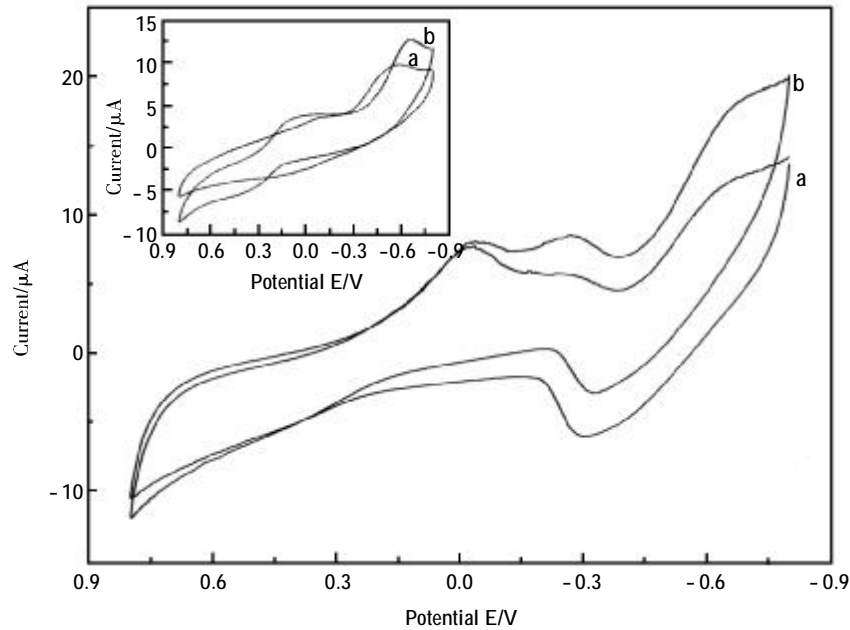


图3 不同修饰层电极裸 GC(内插图)和 hollow Pd/GC 在不含 H_2O_2 (a)和含有 H_2O_2 (b)时的循环伏安图,底液为 0.1 mol/L PBS(pH=7.0);扫描速度:100 mV/s

Fig.3 The cyclic voltammograms of every layer modified electrodes in 0.1 mol/L PBS(pH=7.0) without(a) and with(b) H_2O_2 ; Scan rate: 100 mV/s

有良好的催化还原性能,有效的降低了过氧化氢还原的过电位,同时增大了响应电流。所以,选择空壳钨催化葡萄糖氧化的中间产物 H_2O_2 ,可以通过检测过氧化氢产生的电信号,来得到响应电流与葡萄糖浓度之间的关系,该传感器有效的降低了还原的过电位,排除了干扰,提高了电流响应。

2.4 实验最佳条件的选择

2.4.1 pH 的选择

因为酶的活性受到溶液酸碱性的影响,所以实验中考察了 pH 值对传感器响应电流的影响。图 4 为不同 pH 与响应电流之间的关系,由图 4 中可以看出,当底液的 pH 值小于 7 时,响应电流随着 pH 的增大而增大;当 pH 值等于 7 时,响应电流达到最大值,此时葡萄糖氧化酶的活性最好;而当 pH 值大于 7 时,随着 pH 值的增大,响应电流反而变小,这是因为酸性或碱性过强都会使得酶的活性下降。因此,在该实验中,选择 pH 值等于 7.0 的 PBS 作为测试底液。

2.4.2 温度的选择

温度的变化将影响酶的活性和酶的催化速率,该实验考察了在 $10\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $50\text{ }^\circ\text{C}$ 范围内响应电流和温度之间的关系。图 5 显示修饰电极产生的响

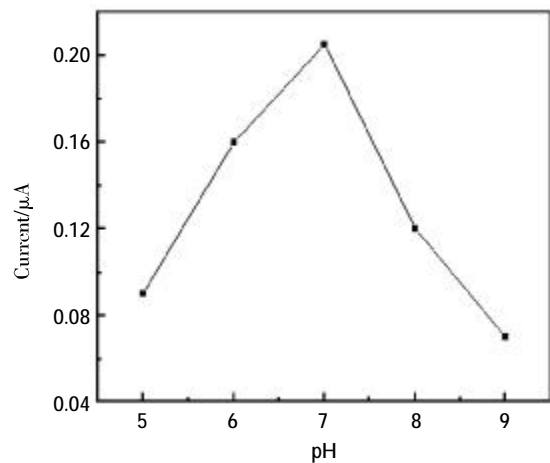


图4 不同 pH 对传感器响应电流的影响

Fig.4 Effect of pH on the current response of modified electrode

应电流和不同温度之间的关系曲线图。从图中可见,在 $10\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $35\text{ }^\circ\text{C}$ 范围内响应电流随着温度的升高而增大,但是当温度超过 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 时,响应电流急剧减小,这可能是由于温度过高会导致酶的活性降低而引起的。考虑到酶电极的使用寿命和电极灵敏度等因素,实验中选择 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 作为实验温度。

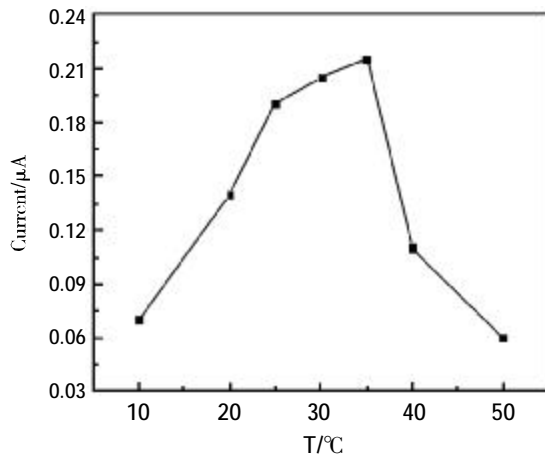


图 5 温度对传感器响应电流的影响

Fig.5 Effect of temperature on the current response of modified electrode

2.4.3 工作电位的选择

该葡萄糖传感器是基于空壳钯催化还原过氧化氢产生电信号来进行检测的,实验采用计时电流法测定葡萄糖。过氧化氢在 hollow Pd/GC 上的还原从 -0.2 V 开始,所以考察了不同电位对响应电流的影响(图 6)。从图 6 可见,在 -0.30 V 和 -0.35 V 电位处,响应电流接近最大值,但是电

位较低时产生的背景电流干扰较小,所以实验中选择 -0.30 V 作为工作电位。

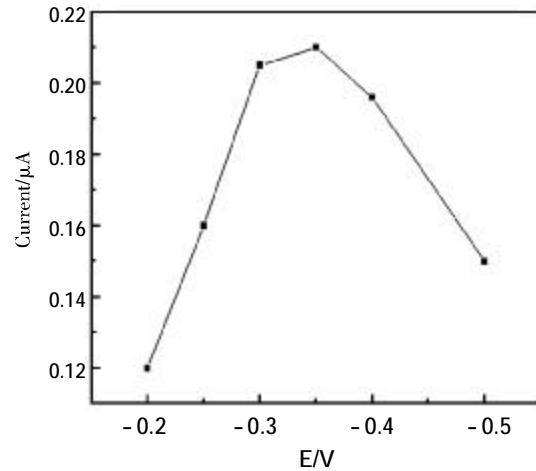
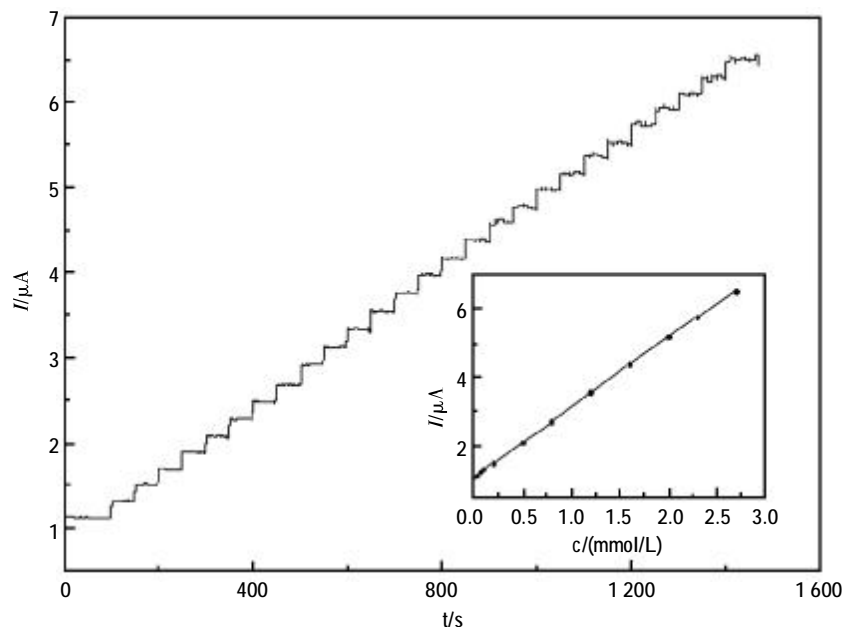


图 6 不同工作电位对响应电流的影响

Fig.6 Effect of the working potential on the current response of modified electrode

2.5 葡萄糖在传感器的电化学反应

图 7 为在 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.0$)溶液中,葡萄糖在 GOD/hollow Pd/GC 上计时电流响应图(内插图是相应的线性校准曲线)。从图中可以看出,

图 7 葡萄糖在 GOD/hollow Pd/GC 的计时电流响应曲线;底液: 0.1 mol/L 的 PBS($\text{pH}=7.0$),葡萄糖加入的浓度梯度为 0.1 mmol/L ,工作电位: -0.3 V Fig.7 Current-time response obtained by successive addition of 0.1 mmol/L glucose into the test solution at GOD/ hollow Pd/GC. The applied potential was -0.3 V , solution: 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.0$)

在 2.5×10^{-5} mol/L 到 2.7×10^{-3} mol/L 的范围内传感器线性响应良好,线性相关方程为: $I(\mu A) = 1.095 + 2.023c(\text{mmol/L})$, 相关系数为 0.999 9。最低检测限为 10 $\mu\text{mol/L}$ (三倍信噪比)。

实验考察了传感器的重现性、稳定性及抗干扰性。在 5 mL 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.0) 的溶液中加入 2.0×10^{-6} mol/L 葡萄糖溶液, 连续测定 8 次, 得到相对标准偏差为 4.3%, 说明该传感器具有较好的重现性。把该传感器保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS (pH=7.0) 中, 两个星期后, 传感器的响应信号为初始信号的 90% 左右, 说明该传感器具有较好的稳定性。维持葡萄糖的浓度为 0.1 mmol/L, 实验考察了传感器的抗干扰性, 对可能造成干扰的物质, 如:

尿酸、抗坏血酸、L-半胱氨酸等进行了干扰测定, 数据显示几乎没有干扰。这归功于该葡萄糖传感器的工作电位是负电位, 而这些干扰物质属于还原性的物质, 所以在此工作电位下不会发生还原反应而产生干扰。

2.6 实际样品的测定

取市售的葡萄糖注射液作为实验测定的实际样品, 对其进行稀释, 取 3 份稀释后的葡萄糖注射液, 分别向 3 份实际样品中加入 1.0 mmol/L 的葡萄糖标准溶液, 进行回收率的测定。结果如表 1 所示, 该方法测定的回收率为 96.8% ~ 103.1%。说明该方法制备的葡萄糖传感器为测定葡萄糖实际含量提供了一种较为准确的方法。

表 1 样品的检测(n=3)

Tab.1 Determination results of samples (n=3)

试样 Samples	测定值 Detection*/(mmol/L)	测定标准偏差 R.S.D%	加入量 Added/(mmol/L)	测定总量 Found/(mmol/L)	回收率 Recovery/%
1	0.25	2.3	1.0	1.21	96.8
2	0.31	3.05	1.0	1.35	103.1
3	0.22	2.6	1.0	1.20	98.3

3 结论

该文报道了一种新型的葡萄糖生物传感器。该传感器是通过在玻碳电极表面修饰空壳钡, 然后再固定葡萄糖氧化酶来制备的。利用空壳钡可以催化还原过氧化氢, 通过测定酶反应产生的过氧化氢来测定葡萄糖。实验表明, 空壳钡对过氧化氢具有良好的催化还原作用, 通过计时电流法表明在一定浓度范围内响应电流与葡萄糖的浓度成较好的线性关系。此外, 该传感器还具有稳定性好, 抗干扰能力强等特点, 为检测葡萄糖提供了一种简单有效的方法。

参考文献

- [1] Turner A P F, Pickup J C. Diabetes -mellitus-biosensors for research and management[J]. Biosensors, 1985, 1: 85 ~ 115.
- [2] Tkac J, Vostiar I Gemeiner P, Sturdik E. Monitoring of ethanol during fermentation using a microbial biosensor with enhanced selectivity[J]. Bioelectrochemistry, 2002, 56(1-2): 127 ~ 129.
- [3] Chen H M, He J H, Zhang C B, et al. Self-assembly of

novel mesoporous manganese oxide nanostructures and their application in oxidative decomposition of formaldehyde[J]. Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(49): 18 033 ~ 18 038.

- [4] Cheng F Y, Zhao J Z, Song W, et al. Facile controlled synthesis of MnO_2 nanostructures of novel shapes and their application in batteries [J]. Inorganic Chemistry, 2006, 45(5): 2 038 ~ 2 044.
- [5] Murakami T, Ajima K, Miyawaki J, et al. Drug-loaded carbon nanohorns: adsorption and release of dexamethason in vitro [J]. Molecular Pharmaceutics, 2004, 1(6): 399 ~ 405.
- [6] Kinsella J M, Lvanisevic A. Enzymatic clipping of DNA wires coated with magnetic nanoparticles [J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127 (10): 3 276 ~ 3 277.
- [7] Maxwell D J, Taylor J R, Nie S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules [J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(32): 9 606 ~ 9 612.
- [8] Chu X, Duan D, Shen G, et al. Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon

- nanotube electrode[J]. *Talanta*, 2007, 71:2 040 ~ 2 047.
- [9] Qu F, Yang M, Shen G, et al. Electrochemical biosensing utilizing synergic action of carbon nanotubes and platinum nanowires prepared by template synthesis[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22 :1 749 ~ 1 755.
- [10] Cui H, Ye J, Zhang W, et al. Selective and sensitive electrochemical detection of glucose in neutral solution using platinum-lead alloy nanoparticle/carbon nanotube nanocomposites[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 594: 175 ~ 183.
- [11] Vijayalakshmi A, Karthikeyan R, Berchmans Sheela. Nonenzymatic Reduction of Hydrogen Peroxide Produced during the Bioelectrocatalysis of Glucose Oxidase on Urchin-like Nanofibrillar Structures of Cu on Au Substrates[J]. *J. Phys. Chem. C*, 2010, 114(50): 22 159 ~ 22 164.
- [12] Ah C S, Yun Y J, Park H J, et al. Size-controlled synthesis of machinable single crystalline gold nanoplates[J]. *Chemistry of Materials*, 2005, 17(22): 5 558 ~ 5 561.
- [13] Song Y, Steen W A, Pena D, et al. Foamlike nanostructures created from dendritic platinum sheets on liposomes [J]. *Chemistry of Materials*, 2006, 18(9):2 335 ~ 2 346.
- [14] Liang H P, Lawrence S N, Wan L J, et al. Controllable Synthesis of Hollow Hierarchical Palladium Nanostructures with Enhanced Activity for Proton/Hydrogen Sensing[J]. *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112: 338 ~ 344.
- [15] Sulak M T, Gokdogan O, Gulce A, et al. Amperometric glucose biosensor based on gold-deposited polyvinylferrocene film on Pt electrode [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21:1 719 ~ 1 726.
- [16] Wu B Y, Hua S H, Yin F, et al. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 838 ~ 844.
- [17] Li H, Liu H, Xie S H, et al. Vesicle-Assisted Assembly of Mesoporous Ce-Doped Pd Nanospheres with a Hollow Chamber and Enhanced Catalytic Efficiency [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2008, 18: 3 235 ~ 3 241.
- [18] Ricci F, Palleschi G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21: 389 ~ 407.
- [19] Zhang D, Zhang K, Yao Y L, et al. Multilayer Assembly of Prussian Blue Nanoclusters and Enzyme-Immobilized Poly(toluidine blue) Films and Its Application in Glucose Biosensor Construction[J]. *Langmuir*, 2004, 20: 7 303 ~ 7 301.
- [20] Marystela F, Pablo A F, Osvaldo N O, et al. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19: 1 611 ~ 1 615.

纳米 Au 修饰电化学传感器检测沙林机理的研究

赵建军*, 刘卫卫, 秦墨林, 黄启斌
(防化研究院, 北京 102205)

摘要: 采用 Raman 光谱和循环伏安法研究了纳米 Au/Au 电极检测沙林的电化学反应机理。研究发现,以 Fe^{3+} 作为检测沙林分子中 F 的探针离子, 纳米 Au 修饰的 Au 电极电化学传感器检测液相中的沙林, 可同时检测到沙林分子中 F 和 P=O 基团, 实验结果具备特征性。

关键词: 纳米 Au; 沙林; 电化学传感器; 拉曼光谱; 循环伏安法

Mechanism of nano-Au modified electrochemical sensors for detecting GB

Zhao Jian-jun*, Liu Wei-wei, Qin Mo-lin, Huang Qi-bin
(Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China)

Abstract: In this paper, the electrochemical reactive mechanism of detecting GB was discussed by Raman and cyclic voltammetric (CV). It was found that electrochemical GB sensors with nano-Au modified on the surface of Au-electrode can detect simultaneously F and P=O of GB in liquid while Fe^{3+} is used as the probe of F, So the experimental result displayed characteristic.

Key words: nano-Au; GB; electrochemical sensors; Raman; cyclic voltammetric(CV)

0 引言

文献[1]报道了纳米 Au 修饰 Au 电极检测沙林(GB)方法的研究,但文中对检测机理的探讨有重大错误,同时 GB 分子中特征基团 F 也未能检测出,不具备检测 GB 的特征性。

采用 Raman 光谱和循环伏安法,深入研究了电化学反应机理,纠正以往的错误;以 Fe^{3+} 作为检测 GB 分子中 F 的探针离子,纳米 Au/Au 电极电化学传感器循环伏安法检测液相中的 GB, 具备检测 GB 的特征性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

电化学实验采用 Model-283 电化学分析仪(美国 PerkinElmer);实验采用三电极系统: Au 电极(自制,长 15 mm,直径 1 mm)和纳米 Au 修饰

Au 电极为工作电极;饱和甘汞电极(SCE)为参比电极;Pt 电极为对电极。表面增强 Raman 光谱仪(Bruker 公司)。

沙林(GB, > 95%, 防化研究院), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich 公司)。其它试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米 Au 修饰的 Au 电极电化学传感器的制备

Au 电极表面的清洁、活化处理以及 Au 电极表面制备纳米 Au 的实验方法如文献[1]所述。纳米 Au 修饰的 Au 电极采用原子力显微镜(AFM)表征其表面形貌。

1.2.2 纳米 Au 修饰的 Au 电极电化学传感器 CV 法检测液相中沙林

用 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠 (NaAc-HAc, pH4.3, 含 0.1 mmol/L Fe^{3+}) 电解质溶液配制不同

* 通讯联系人, E-mail: zhaojj2001@sohu.com

GB 浓度的测试溶液；制备出的纳米 Au 修饰 Au 电极在此溶液体系中进行循环伏安扫描，扫描顺序为：预先进行 2.0 ~ -2.0 V 循环伏安扫描，然后进行 1.4 ~ -0.8 V 范围循环伏安扫描；如果没有说明，扫描速率均为 50 mV/s。所有实验均对电解质溶液通 N₂ 除氧条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 纳米 Au 修饰 Au 电极的表面形貌表征

图 1 为纳米 Au 修饰 Au 电极的原子力显微镜图。纳米 Au 直径为 30~80 nm。

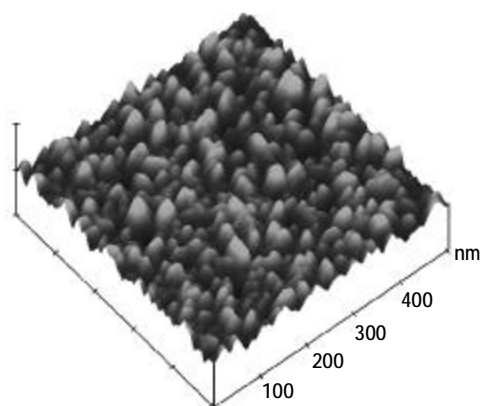


图 1 纳米 Au 修饰 Au 电极的原子力显微镜图
Fig.1 The AFM of nano-Au-modified on Au electrode

2.2 纳米 Au 修饰 Au 电极检测沙林的电化学反应机理

Au 电极在 NaAc-HAc 电解质溶液中进行 CV 扫描，见图 2。

从图 2 可见，曲线 a 中，在 0.49 V 处还原峰的左侧 0.44 V 处有一个不呈现峰形的斜坡；曲线 b 中，在 0.49 V 处还原峰的左侧 0.44 V 出现一个明显的还原峰，峰形如同 0.49 V 处还原峰的裂分峰；曲线 c 中，溶液有 GB，在 1.4 ~ 0.1 V 范围 CV 扫描之前，事先没有进行 2.0 ~ -2.0 V 范围 CV 扫描，0.94 V 处有一个氧化峰，0.53 V 处有一个还原峰。

图 3、图 4 分别为 GB 的 Raman 光谱图和 GB 在 Au 表面吸附后的 Raman 光谱图。

从图 3 可见，830 cm⁻¹ 为 P-F 吸收峰，1 090 cm⁻¹ 为 P-O-C 吸收峰，1 260 cm⁻¹ 为 P=O 吸收峰^[2]。

将 Au 电极在含 GB 的溶液中浸泡 10 min 以

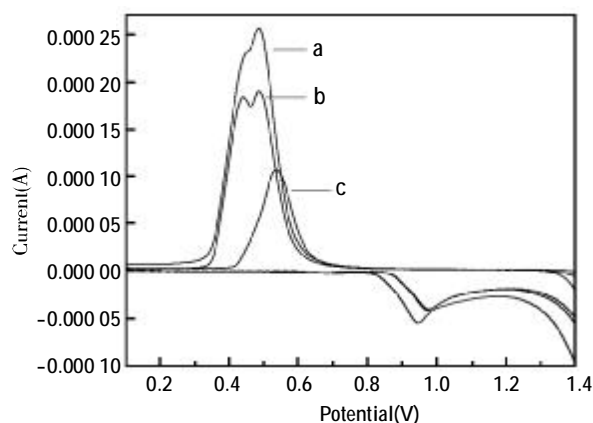


图 2 纳米 Au 修饰 Au 电极的循环伏安图
(a: 沙林浓度 0 mg/mL; b: 沙林浓度 0.07 mg/mL; 1.4 ~ 0.1 V 范围 CV 扫描前，预先进行 2.0 ~ -2.0 V 范围 CV 扫描; c: 沙林浓度 0.07 mg/mL, 1.4 ~ 0.1 V 范围 CV 扫描前，事先没有进行 2.0 ~ -2.0 V 范围 CV 扫描)
Fig.2 Cyclic voltammograms of Au-nanoparticles-modified on Au electrodes(a: GB 0 mg/mL; b: GB 0.07 mg/mL, 1.4 ~ 0.1 V CV after 2.0 ~ -2.0 V CV; c: GB 0.07 mg/mL, no 2.0 ~ -2.0 V CV before 1.4 ~ 0.1 V CV)

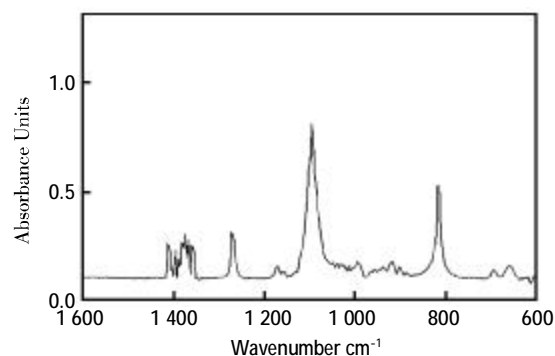
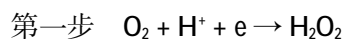


图 3 GB 的 Raman 光谱图
Fig.3 The Raman of GB

上，用二次蒸馏水轻柔清洗，N₂ 吹干后，进行 Raman 光谱表征，实验结果见图 4。

从图 4 可见，830 cm⁻¹ P-F 吸收峰、1 090 cm⁻¹ P-O-C 吸收峰依然存在，但在 1 260 cm⁻¹ 处的 P=O 吸收峰减弱并消失，表明 GB 在 Au 表面产生吸附，其分子中的 P=O 基团在 Au 表面形成 Au--O=P。

在循环伏安扫描过程中，事先进行 2.0 ~ -2.0 V 循环伏安扫描接近结束时，当扫描电位 ≥ 1.7 V，Au 电极表面生成 O₂，在随后的 1.4 ~ 0.1 V 循环伏安扫描过程中，O₂ 在 Au 电极表面发生二步 O₂ 的还原反应^[3-5]：



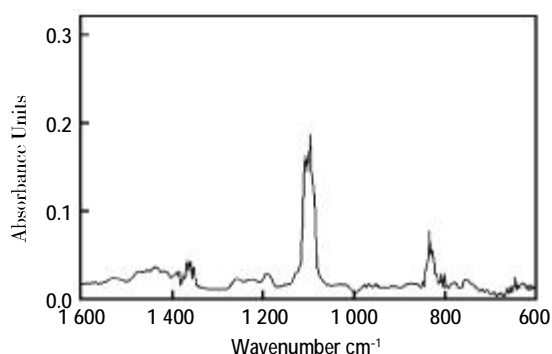


图 4 GB 在 Au 表面吸附后的 Raman 光谱图

Fig.4 The Raman of GB on Au electrode

第二步 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{e} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

在图 2 中曲线 a 和 b, 0.49 V 处为第一步 O_2 的还原反应, 0.44 V 处为第二步 H_2O_2 的还原反应, 二步反应连续发生; 当电解质溶液中存在 GB 分子时, 其分子中 P=O 在 Au 表面形成 Au--O=P, 对 Au 表面 O_2 的生成有抑制作用, 影响 Au 电极表面发生的二步 O_2 还原反应, 表现为在 0.49 V 处还原峰旁侧的 0.44 V 处再出现一个还原峰, 峰形如同 0.49 V 处还原峰的裂分峰, 二个还原峰的强度相应减小, GB 浓度越大, 抑制程度越大, 还原峰的峰电流越小; 当电解质溶液中没有 GB 分子时, 对 Au 表面 O_2 的生成没有抑制作用, 二步 O_2 还原反应顺利进行, 还原峰不产生裂分现象; 曲线 c 中, 由于没有预先进行 2.0 ~ -2.0 V 循环伏安扫描, Au 表面不生成 O_2 , 只有自身 Au 和 AuO 的氧化还原反应过程, 其 0.94 V 处氧化峰为 $\text{Au} \rightarrow [\text{AuO}]$ 氧化反应过程, 0.53 V 处还原峰为 $[\text{AuO}] \rightarrow \text{Au}$ 还原反应过程。

裸 Au 电极和其它含有 O=P 结构的有机磷分子也有相同的实验结果。因此, 0.49 V 处还原峰左侧 0.44 V 处出现的还原峰, 不能作为检测 GB 的特征峰, 只能作为含有 O=P 结构有机磷化合物的标志。

2.3 纳米 Au 修饰的 Au 电极检测沙林

GB 分子中的 F 是重要官能团, 没有 F, 将失去其毒性, 沙林酸分子中没有 F, 毒性极低, 因此, 同时检测出 F 和 O=P 的电化学信号, 才能视为检测到 GB。

F 在电化学反应中, 氧化还原电位一般在 2.0 V 以上, 而 2.0 V 以上往往是电化学强析氧过程, F 难以检测到, 到目前为止很少用电化学方法进行研究。

GB 分子中的 F 会随时间和所处溶液状态发生解离, 即使纯 GB, 也能发生一定程度的解离; F 与 Fe^{3+} 可以形成 $[\text{FeF}_6]^{3-}$ 配合物, $[\text{FeF}_6]^{3-} + \text{e} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{F}^-$ 标准还原电位为 0.4 V, 因此可以用 Fe^{3+} 作为检测 F 的探针离子, 间接检测 F。

表 1 为不同 pH 值, Fe^{3+} 与 OH^- 、 Ac^- 、 F^- 的 $\log \alpha_{\text{ML}}^{\text{L}}$ 值^[6]。从表 1 可见, pH 值在 6 以上, Fe^{3+} 与 OH^- 的结合能力强, 容易产生 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀; pH 值在 3 以下, Fe^{3+} 与 OH^- 的结合能力减小, 产生 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀的趋势减弱; pH 值 4~5 之间, Ac^- 与 Fe^{3+} 的结合能力大于 Fe^{3+} 与 OH^- 的结合能力, 远小于 Fe^{3+} 与 F^- 的配位能力; 实验结果表明, 当 NaAc-HAc 电解质的 pH 值为 4.3 时, Fe^{3+} 不产生 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀, 并能与 F 有效产生配合作用; pH 4.3 时, 也能保证 GB 的稳定性。因此, 采用 pH 4.3、含 0.1 mmol/L Fe^{3+} 的 0.1 mol/L NaAc-HAc

表 1 不同 pH 值, Fe^{3+} 与 OH^- 、 Ac^- 、 F^- 的 $\log \alpha_{\text{ML}}^{\text{L}}$ 值Tab.1 Coordinated constant of Fe^{3+} and OH^- , Ac^- , F in different pH

pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F^-	1.4	3.3	5.7	7.9	8.7	8.9	8.9	8.9	9.8	11.7	13.7	15.7	17.7	19.7
OH^-				0.4	1.8	3.7	5.7	7.7	9.7	11.7	13.7	15.7	17.7	19.7
Ac^-			0.2	1.3	3.5	5.2	6.0	7.7	9.7	11.7	13.7	15.7	17.7	19.7

缓冲溶液为电解质溶液。

图 5 为纳米 Au 修饰 Au 电极对不同浓度 GB 的循环伏安响应曲线。

从图 5 可见, 0.44 V、0.49 V 处的二个还原峰峰电流随 GB 浓度增大而减小, 其原因为 GB 分

子中 P=O 基团在 Au 表面形成 Au--O=P, 对 Au 表面生成 O_2 的过程产生抑制作用, 进而影响二步 O_2 的还原反应, 二个还原峰的峰电流随 GB 浓度的增加而减小; -0.19 ~ -0.13 V 处还原峰为 GB 分子中解离的 F 与 Fe^{3+} 配位后, $[\text{FeF}_6]^{3-} + \text{e} \rightarrow$

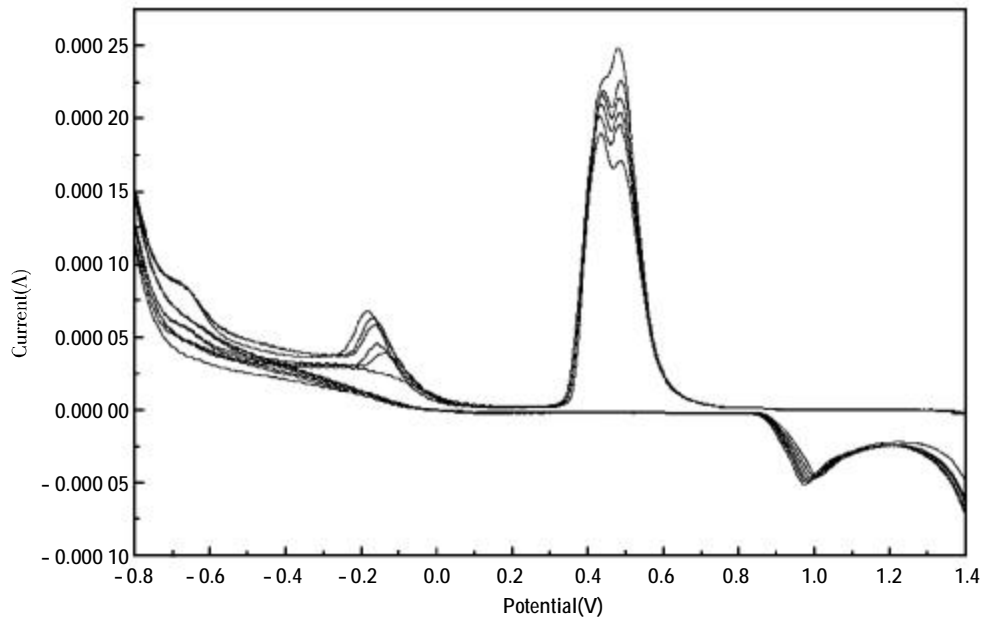


图5 纳米 Au 修饰 Au 电极检测 GB 的循环伏安曲线
(GB 为 0, 0.001, 0.005, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)

Fig.5 Cyclic voltammograms of Au-electrode detecting GB
(GB 0, 0.001, 0.005, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)

$\text{Fe}^{2+} + \text{F}^-$ 反应的还原峰,该还原峰的峰电流随 GB 浓度增大而增大,可以作为 F 的特征峰;当没有 GB 时,0.44 V 和 0.49 V 处不产生裂分峰, -0.19 ~ -0.13 V 处无还原峰。

-0.19 ~ -0.13 V 处的还原峰峰电流与 GB 分子中 F 的解离程度有关,不能作为定量检测 GB 浓度的依据,可以作为判断 GB 纯度的依据,峰电流越小,GB 纯度越高;0.44 V、0.49 V 处二个还原峰的峰电流与 GB 浓度相关,依然可以采用文献 [1]报道的方法对 GB 浓度进行定量。

由于有 $\text{P}=\text{O}$ 对 O_2 抑制作用和 F 的二个特征电化学信号,使检测 GB 的实验结果更具特征性。

3 结论

采用 Raman 光谱和循环伏安法,深入研究了电化学反应机理,纠正以往的错误;以 Fe^{3+} 作为检测 GB 分子中 F 的探针离子,纳米 Au/Au 电极电化学传感器循环伏安法检测液相中的 GB,实验结果具备特征性。

参考文献

- [1] 赵建军, 刘卫卫, 潘勇, 等. 纳米 Au 修饰电化学传感器直接检测液相中沙林的研究[J]. 化学传感器, 2011, 31(1): 42~47.
- [2] 赵国辉, 寿伟椿. 军用毒剂化学[M]. 北京: 军事译文出版社, 1987. 218~219.
- [3] El-Deab M S, Ohsaka T. Hydrodynamic voltammetric studies of the oxygen reduction at gold nanoparticles - electrodeposited gold electrodes[J]. *Electrochimica Acta*, 2002, 47: 4 255~4 261.
- [4] El-Deab M S, Ohsaka T. An extraordinary electrocatalytic reduction of oxygen on gold nanoparticles - electrodeposited gold electrodes [J]. *Electrochemistry Communications*, 2002, 4: 288~292.
- [5] Sarapuu A, Tammeveski K, Tenno T T, et al. Electrochemical reduction of oxygen on thin-film Au electrodes in acid solution[J]. *Electrochemistry Communications*, 2001, 3: 446~450.
- [6] 杭州大学化学系分析化学教研室. 分析化学手册-第一分册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997. 179~180.

全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极的研制及应用

杨 渝, 李 龙, 刘红伟, 杜宝中*
(西安理工大学 应用化学系, 陕西西安 710054)

摘 要: 该文报道了一种树脂接界全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极, 无需电镀氯化, 制备工艺简单, 性能稳定, 是对电解型 Ag/AgCl 参比电极的一大改进。可代替饱和甘汞电极作为通用型参比电极, 同时可减少汞对环境所造成的二次污染, 在温度大于 75 °C 时仍能保持良好性能, 突破了甘汞电极的局限。

关键词: 全固态; 树脂接界; 裸露式; Ag/AgCl 参比电极; 性能

Preparation and application of all-solid exposed Ag/AgCl reference electrode

Yang Yu, Li Long, Liu Hong-wei, Du Bao-zhong*
(Department of Applied Chemistry, Xian University of Technology, Xian 710054, China)

Abstract: This paper reports a kind of all-solid exposed Ag/AgCl reference electrode. The preparation craft is simple, no complex plating and can substitute SCE as common-used reference electrode. It improves characteristics of existing Ag/AgCl reference electrode. At the same time it reduces the mercury's second pollution and it can be well used the place in which temperature surpasses 75 °C, breaking through the SCE's limitation completely.

Key words: all-solid; resin junction; exposed; Ag/AgCl reference electrode; property

0 引言

在电化学分析测量中, 通常使用饱和甘汞电极或电解型 Ag/AgCl 电极作为参比电极, 构成化学电池才能进行测量。测量时, 由于参比电极的内参比溶液与被测溶液的组成不同, 因而形成无法消除的液接电位。液接电位除了与两接触溶液性质密切相关外, 还受诸如接界材料等多种条件的影响, 至今还无法精确度量^[1]。另外, 目前广泛使用的 Ag/AgCl 参比电极均为银丝经阴极氯化而制成, 其缺点在于 AgCl 镀层裸露在氯化银饱和的氯化钾溶液中, 往往因氯化银晶体的机械摩擦作用而剥落, 同时在氯化钾溶液中易形成可溶性的聚氯络银 AgCl₂⁻³ 或 AgCl₄⁻⁴, 使得 AgCl 镀层逐渐溶解而失去参比电极功能^[2], 加之其液接电势的不确定性, 直接影响测量精度和准确度。为此

该文在总结前人经验的基础上^[3-4], 自行研制了内阻低、耐一定温度和压力的树脂全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极, 以及树脂-电解质构成的可任意成型的新盐桥接界。并与其它离子选择电极配套用于各种溶液的电位测量, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

pHS-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂), pH 玻璃电极(上海雷磁仪器厂), 饱和甘汞电极(江苏江分电分析仪器有限公司), 99.5%Ag 丝(上海试剂厂), 全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极(自制), 脲醛树脂(工业品, 西安树脂厂), KNO₃(分析纯, 西安化学试剂厂), KCl(分析纯, 天津市红岩化学试剂厂), AgCl(分析纯, 西安化学试剂厂), pH 标准缓冲液, pW 缓冲液(自制)。所用试剂均为分析

基金项目: 陕西省工业攻关计划项目(2009K08-17), 全国大学生创新性试验计划项目(101070034)

* 通讯联系人, E-mail: bzhd@xaut.edu.cn, Tel: 029-82066325

纯,水均为二次蒸馏水。

1.2 全固态裸露式 Ag/AgCl 电极制备

将 $\phi 0.5 \text{ mm}$ 银丝用金相砂纸打磨,以除去表面的氧化层,然后分别用滤纸和擦镜纸抛光,备用;将 KNO_3 在玛瑙研钵中研细,与脲醛树脂的质量比以 2:4 混合均匀,用 1 mol/L HCl 调 $\text{pH}4 \sim \text{pH}5$,注入电极腔体前端制得树脂-电解质盐桥接口;另将 KCl 粉末与脲醛树脂的质量比以 2:4 混合均匀,加入少量 AgCl 粉末,用 1 mol/L HCl 调 $\text{pH}4 \sim \text{pH}5$,将该凝胶注入已制好盐桥的洁净电极管中,插入 Ag 丝,室温固化 24 h。制得无需添加内充液和电解氯化物的裸露式 Ag/AgCl 参比电极,如图 1 所示。

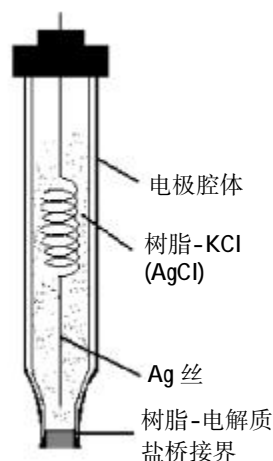


图 1 全固态 Ag/AgCl 参比电极

Fig.1 The whole-solid Ag/AgCl electrode

2 结果与讨论

2.1 电极的稳定性及重现性

将全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极与饱和甘汞电极插入 0.1 mol/L KCl , 1 mol/L KCl , 饱和 KCl , $\text{pH}4.00$, $\text{pH}6.86$, $\text{pH}9.18$ 标准缓冲溶液中,连续 24 h 观察电位随时间变化关系。结果见表 1。

结果表明,全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极电位漂移 $\Delta E \leq 2 \text{ mV/24 h}$,说明该电极电位稳定;同时,在 $\text{pH}4.00$ 、 $\text{pH}6.86$ 、 $\text{pH}9.18$ 缓冲液中连续测定 10 次, $\text{RSD} \leq 0.1\%$,重现性良好,能满足 pX 电位测量要求。

2.2 响应时间

温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,将全固态裸露式 Ag/AgCl 电极和甘汞电极分别放入 pW 缓冲液, $\text{pH}4.00$ 、 $\text{pH}6.86$ 、 $\text{pH}9.18$ 标准缓冲液中,响应时间均小于 30 s ,可见电极具有较快的响应速度。

2.3 温度的影响

将全固态裸露式 Ag/AgCl 电极和甘汞电极各自放入同种标准缓冲溶液中,以盐桥将两试液相连,测量温度对电极电位影响(见图 2)。

由图 2 可以看出,温度在 $20 \sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,电位值基本不变。温度 $70 \sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,温度每增加 $1 \text{ }^\circ\text{C}$,电位值升高 $\leq 1 \text{ mV}$ ($0.01 \text{ pH/}^\circ\text{C}$,在误差允许的范围内)。说明全固态裸露式 Ag/AgCl 电极在温度 $20 \sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内具有较好的稳定性。但在测量过程中,当温度升至 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上时,达稳定所需时间

表 1 Ag/AgCl 电极稳定性

Tab.1 The stability of Ag/AgCl electrode

E/mV	t/h									
		1	2	3	4	...	21	22	23	24
0.1 mol/L KCl		508	508	508	508	...	508	507	507	507
1 mol/L KCl		509	509	509	509	...	509	509	508	508
饱和 KCl		509	509	509	509	...	509	510	510	509
$\text{pH}4.00$ 缓冲液		509	509	509	509	...	510	512	511	511
$\text{pH}6.86$ 缓冲液		508	508	508	508	...	510	510	511	510
$\text{pH}9.18$ 缓冲液		510	510	510	510	...	512	510	510	510

延长。这是由于在此温度下,饱和甘汞电极发生歧化反应: $\text{Hg}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{Hg} + \text{HgCl}_2$, 致使电极电势产生漂移。

2.4 电极的可逆性

对全固态 Ag/AgCl 参比电极进行小幅循环

伏安极化扫描(见图 3), 在 $-500 \text{ mV} \sim +500 \text{ mV}$ 的电位范围内正向和反向极化曲线几乎完全重合而且呈良好的线性关系。表明自制的 Ag/AgCl 参比电极具有良好的可逆性。

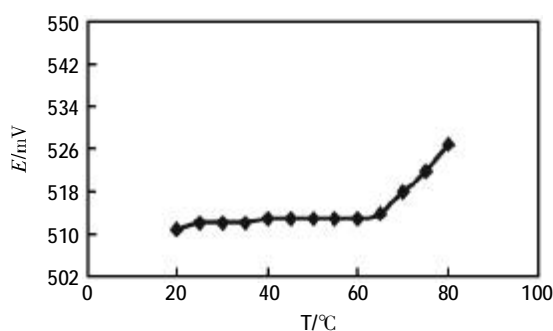


图2 Ag/AgCl 参比电极温度特性

Fig.2 Temperature curve of the Ag/AgCl electrode

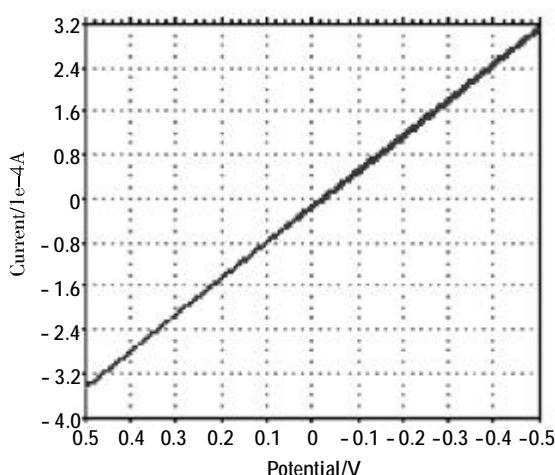


图3 Ag/AgCl 电极的可逆性

Fig.3 Reversibility of the Ag/AgCl electrode

2.5 电极寿命

该电极在正常使用的情况下,常温下避光保存;如长时间不用,用前应在 0.1 mol/L KCl 溶液中浸泡 24 h 后再用,这样电极的寿命至少在 1 年以上。

2.6 电极体电阻

参照文献[2]的方法,测得电极体电阻 < 20 kΩ。其内阻很低,是由于三维网状结构的脲醛树脂-电解质体系具有亲水性。

3 电极应用

用 pH 玻璃电极和离子选择电极与全固态 Ag/AgCl 参比电极组成测量电池来测量 pH 标准溶液及实际样品的 pH 和 pX, 并与玻璃 pH 复合电极和离子选择电极-饱和甘汞电极组成的测量结果作对照。

3.1 样品 pH 测定

样品 pH 测定结果如表 2 所示。

3.2 样品 pX 测定

分别以氟离子和硫离子选择电极与全固态 Ag/AgCl 参比电极采用校正曲线法测定实际样品中 F⁻和 S²⁻的含量,并在回收试验的基础上与饱和甘汞电极为参比进行对照,结果如表 3 所示。

由测定结果可知,以全固态 Ag/AgCl 电极作

表 2 样品 pH 测定结果

Tab.2 The results of pH determination of samples

电极	样品	pH	pH	pH	蒸馏水	河水	雪碧	芬达	牛奶
		4.00	6.86	9.18					
pH 玻璃电极-Ag/AgCl 电极		4.01	6.86	9.20	6.42	8.07	3.65	2.89	6.56
玻璃 pH 复合电极		4.00	6.86	9.19	6.41	8.05	3.62	2.86	6.53
ΔpH		0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03

表 3 样品 pX 测定结果(n=5)

Tab.3 The results of pX determination of samples(n=5)

电极	样品	地下水	工业废水	河水	土壤	回收率	RSD
		F ⁻ (mol/L)	F ⁻ (mol/L)	S ²⁻ (mol/L)	S ²⁻ (mol/L)	%	%
F ⁻ 电极-Ag/AgCl 电极		4.39×10 ⁻⁵	7.65×10 ⁻⁴			95~98	2.1
F ⁻ 电极-饱和甘汞电极		4.30×10 ⁻⁵	7.72×10 ⁻⁴			97~101	0.91
S ²⁻ 电极-Ag/AgCl 电极				1.15×10 ⁻⁴	2.19×10 ⁻⁴	97~102	2.5
S ²⁻ 电极-饱和甘汞电极				1.18×10 ⁻⁴	2.25×10 ⁻⁴	95~99	2.7

参比用于 pH 和 pX 的测定, $\Delta\text{pH} < 0.05 \text{ pH}$, 回收率 95%~102%, $\text{RE} \leq 2.7\%$ (与饱和甘汞电极作参比对照)。

4 结论

全固态裸露式 Ag/AgCl 参比电极是对现有电解型 Ag/AgCl 参比电极的一大改进, 无需电解氯化、制备工艺简单, 以及树脂-电解质构成的可任意成型的新盐桥接界; 具有良好的稳定性、重现性和可逆性, 用于 pH 和 pX 测量, 结果与饱和甘汞电极作参比相吻合。

参考文献

- [1] 杨林楚, 巫金昌, 徐秀珍, 等. 固体参比电极的研制及应用[J]. 化学传感器, 1993, 13(1): 67-71.
- [2] 谢声洛. 离子选择电极分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1985. 117-120.
- [3] 黄超伦, 任聚杰, 冀国荣, 等. 一种双固体树脂接界的参比电极的研究[J]. 分析科学学报, 2004, 20(1): 29-31.
- [4] 周海晖, 陈范才, 张小华, 等. Ag/AgCl 固体参比电极的研究[J]. 腐蚀科学与防护技术, 2001, 13(4): 234-235.

采用荧光探针测定五氯酚

姚英华¹, 李娟秀², 陈贝贝², 蔡青云^{2*}

(1. 湖南益阳龙州中学, 湖南益阳 431000)

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

摘要: 在紫外光照射下五氯酚能光解生成酸性产物, 导致溶液酸度改变。该文以荧光素为探针, 基于荧光素对溶液酸度的敏感性, 提出了一种荧光探针检测五氯酚的方法。该方法无需对五氯酚进行荧光标记, 简化了检测过程。在最优条件下, 检测限为 2.0×10^{-9} mol/L, 线性范围为 $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-9}$ mol/L。光照条件下不能光解或者光解产物不能引起溶液酸度变化的物质不干扰测定。

关键词: 荧光探针; 五氯酚; 荧光素; pH

Fluorescence detection of pentachlorophenol by fluorescein

Yao Ying-hua¹, Li Juan-xiu², Chen Bei-bei², Cai Qing-yun^{2*}

(1. Yiyang Longzhou Public School, Hunan, Yiyang 431000, China)

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

Abstract: Pentachlorophenol (PCP) can be photolysed under ultraviolet(UV) light in aqueous resulting in a pH change. The pH change can be sensitively indicated by fluorescein as the fluorescence intensity of fluorescein is pH-dependent. Based on this, fluorescence detection of pentachlorophenol is proposed without using fluorescence label. Under the optimal conditions, a detection limit of 2.0×10^{-9} mol/L is achieved with a linear range of $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-9}$ mol/L. Compounds which could not change the pH of the solution during illumination process, such as phenol, chlorphenol and dichlorphen show little interferences on the detection.

Key words: fluorescent probe; pentachlorophenol; fluorescein; pH

0 引言

五氯酚(pentachlorophenol, PCP, C_6Cl_5OH)是一易电离、难溶于水的氯代芳香族有机污染物, 曾被广泛用作杀菌剂、除草剂、杀虫剂和木材防腐剂。通常条件下, 五氯酚难氧化, 难水解, 难挥发。这也是我国红壤资源退化的重要原因之一。另外, 五氯酚有蓄积作用, 在高有机质含量的酸性土壤或沉积物上具有很高的吸附性, 强烈地吸附在土壤中, 可被植物吸收通过生物富集而进入食物链, 产生生物毒性。美国环境保护署(USEPA)把五氯酚划分为 B2(一种潜在的致癌

物质), 在毒理学中属中等毒性。五氯酚对水生生物的半致死量(LD 50)一般为 0.32~0.77 mg/L, 对小鼠和大鼠的经口半致死量(LD 50)分别为 36~177 mg/kg 和 25~175 mg/kg。

因此, 发展能快速、灵敏地检测五氯酚的方法就尤为迫切。目前, 五氯酚的检测主要是基于液相-质谱或气相-质谱的联用技术^[1-3]。这些方法稳定灵敏, 但是耗时, 并且需要复杂的前处理技术进行有效的富集分离以适应环境中痕量样品的检测。基于五氯酚的电化学氧化而建立的电化学分析方法, 由于其高氧化电位(700~900 mV), 使得其测定受到环境样品中电活性杂质的

基金项目: 国家 973 项目支持

* 通讯联系人, E-mail: qycal0001@hnu.cn

干扰^[4-5]。基于酶的传感分析可用于五氯酚的现场快速检测,但是酶传感器的检测限不能令人满意^[6]。免疫分析法可以用于大量样品的筛查,对杀虫剂的检测限可达到 $1 \mu\text{g/L}$ 水平。荧光分析具有很高的灵敏度。但对于惰性的五氯酚,必须进行荧光标记才能测定。

荧光素在蓝光或紫外线照射下,发出绿色荧光。溶液的 pH 值不仅影响荧光素的吸收光谱,同时更显著地影响其激发光谱和发射光谱^[7],在不同的酸度下,荧光素具有不同的最大吸收波长、不同的最大激发波长和荧光发射波长。

该文基于荧光素的荧光光谱对 pH 的敏感性,提出了一种间接荧光法检测五氯酚的方法。无需对五氯酚进行荧光标记,简化了检测过程。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂:荧光素和五氯酚,购于 J&K 化学试剂有限公司(北京,中国);苯酚、一氯酚和二氯酚,购于美国 Aldrich-Sigma 公司;磷酸二氢钾,磷酸氢二钠,氢氧化钠和盐酸购于杰辉生物科技有限公司(长沙,中国)。实验中先配置浓度为 0.001 mol/L 五氯酚和 0.001 mol/L 的荧光素的 DMF 溶液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境中储存备用,在实验过程中用超纯水稀释至所需浓度。整个实验过程中所用水由 Millipore 公司 Synergy UV 纯水系统制备,电阻率值为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。实验中所有试剂均为分析纯。

仪器:Delta 320 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器,上海有限公司);超声仪(上海科导超声仪器有限公司);汞灯(500 W)用来提供紫外光,采用红外滤光片滤去红外光,以免温度上升。光照计(Ophir, Israel)用于测量照射在反应容器上的紫外光的光强;荧光分光光度计(Perkin Elmer, LS 45)。

1.2 荧光检测五氯酚

在体积为 4 mL 的透明石英小容器中,加入 1 mL 一定浓度的五氯酚的水溶液(由五氯酚的 DMF 溶液加入到水中稀释而成),盖上盖子,防止受光照射而造成溶液挥发损失。光照前,充氮气 15 min 以除去溶液中的溶解氧,防止氧与五氯酚发生副反应,干扰检测。同时开启汞灯预热 0.5 h ,以得到稳定的光照。将反应容器与汞灯放在同一水平线上,通过调整汞灯和盛有样品的容器的

距离,获得不同强度的光照,光照强度由光照计测量。在汞灯和样品间,紧靠汞灯处放置一块红外光滤光片。在光强为 50 mW/cm^2 UV 的汞灯下照射 2.5 h 后,向反应液中加入一定浓度的荧光素(由荧光素的 DMF 加入到水中稀释而成),搅拌均匀。在 400 nm 激发下,测定 460 nm 到 580 nm 间的荧光光谱。狭缝宽度 10 nm 。以 510 nm 处的发射峰作为定量的标准峰。所有的试验均在室温下进行。

2 结果与讨论

2.1 测定条件优化

在紫外光光照下,五氯酚会被转化为一些低毒性物质,如 CO_2 , H^+ , Cl^- 等物质^[8],致使溶液的 pH 值降低。而荧光素是一种对溶液的 pH 值变化敏感的荧光试剂。当溶液 pH 值改变时,荧光素的荧光强度以及发射光谱都会发生改变。所以通过监测荧光素的荧光强度的变化,可以间接测定五氯酚。图 1 为荧光素的荧光强度随溶液 pH 值的变化。在 $\text{pH} < 6$ 的酸性溶液里,荧光素的荧光强度对 pH 变化十分敏感。荧光素的荧光强度在中性和弱碱性时达到最大值,对 pH 的敏感性较低。

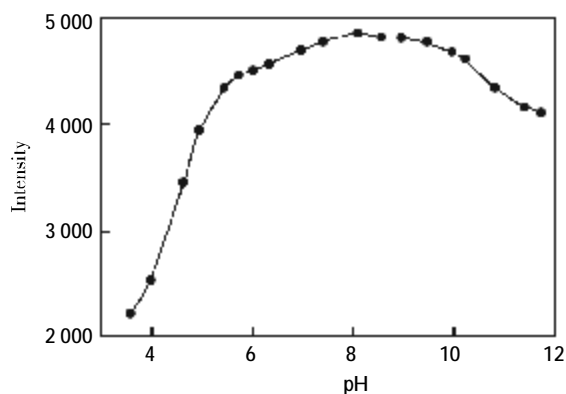


图 1 pH 对荧光素荧光强度的影响

Fig.1 The effect of pH on the fluorescence intensity of fluorescein

可见测试溶液为酸性时,可获得高灵敏度。而溶液的最终 pH 是在初始 pH 的基础上取决于五氯酚的降解,即决定于溶液的初始 pH 和五氯酚的浓度。保持五氯酚的浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,在溶液初始 pH 值为 $2 \sim 12$ 的范围里,在 50 mW/cm^2 的汞灯下照射 2.5 h 后,测定了加入 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的荧光素后荧光强度随 pH 的变化(图 2)。

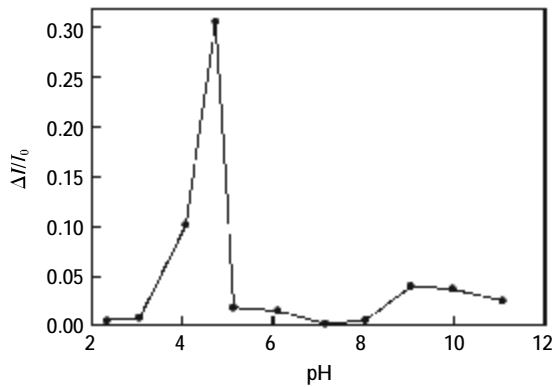


图2 溶液的初始 pH 对荧光素检测响应的影响
Fig.2 The influence of initial pH of the solution on the fluorescence intensity. The fluorescence spectra was collected after exposing a 5.0×10^{-6} mol/L PCP solution with different pH to 50 mW/cm^2 UV for 2.5 h, then adding 1.0×10^{-5} mol/L fluorescein

可见荧光强度的相对变化即 $\Delta I/I_0$ ($\Delta I = I_0 - I$, I_0 和 I 分别是溶液为光照前和光照后溶液的荧光强度) 受溶液初始 pH 值影响很大, 在 pH4.75 时, 得到最大响应。初始 pH 值不仅决定最终反应液的 pH, 从而影响荧光素的荧光强度, 而且影响五氯酚的光解效率。五氯酚是一种弱酸^[9], $\text{p}K_a$ 为 4.7, 在碱性溶液中溶解度比酸性溶液中大, 光解效率也相对要大些。两厢作用的结果, 在 pH4.75 时响应灵敏度最大。

在固定溶液的初始 pH 后, 溶液的最终 pH 取决于五氯酚的降解, 即受光照时间和光强的影响。图 3 显示了荧光强度的相对变化 ($\Delta I/I_0$) 随光

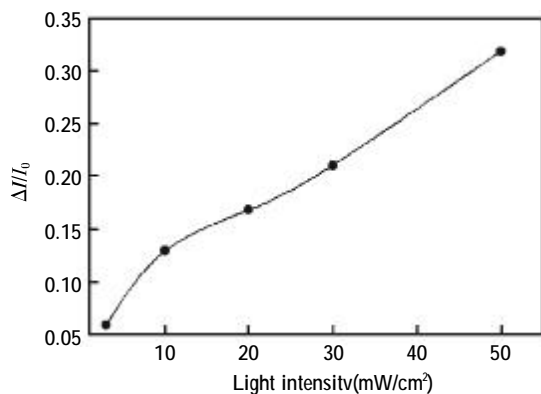


图3 光照强度对响应的影响
Fig.3 The influence of light intensity on the fluorescence intensity. The fluorescence spectra was collected after exposing a pH4.75 solution containing 5.0×10^{-6} mol/L PCP to UV with different intensity for 2.5 h, then adding 1.0×10^{-5} mol/L fluorescein

强的增加而增大。当光强从 0 增加到 50 mW/cm^2 时, $\Delta I/I_0$ 从 5% 增加到 32%。由于 500 W 的汞灯能提供的最大光强为 50 mW/cm^2 , 在实验中选择了 500 W 汞灯的最大光强 50 mW/cm^2 。图 4 显示了荧光强度的相对变化 ($\Delta I/I_0$) 随光照时间的变化。在光照时间为 0.5 到 2.5 h 的范围内, $\Delta I/I_0$ 随光照时间的增加而显著增加, 而在光照时间为 2.5 到 3.0 h 的范围内, 随着时间的增加, $\Delta I/I_0$ 增加放缓了。为节省测定时间, 选择了 2.5 h 的光照时间。

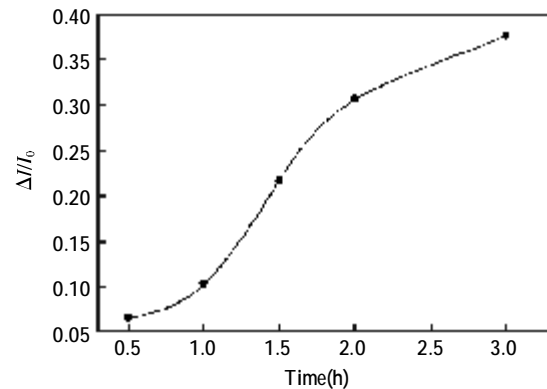


图4 光照时间对响应的影响
Fig.4 The influence of illumination time on the fluorescence intensity. The fluorescence spectra was collected after exposing a pH4.75 solution containing 5.0×10^{-6} mol/L PCP to 50 mW/cm^2 UV for different time, then adding 1.0×10^{-5} mol/L fluorescein

荧光素浓度也是影响荧光强度的一个因素。图 5 显示了荧光素的浓度对荧光强度的影响。当荧光素的浓度从 1.0×10^{-7} 增加到 1.0×10^{-5} mol/L, 荧光强度的相对变化即 $\Delta I/I_0$ 相应地从 5.26% 增加到 16.09%。这说明荧光素的浓度越大, 同等条件下其响应就越大。由于受荧光素在水中溶解性的限制, 选择了荧光素在水中的最大溶解度 1.0×10^{-5} mol/L。

2.2 五氯酚测定

在以上所优化的条件下, 测定了荧光强度随五氯酚浓度的变化。如图 6 所示, 随着五氯酚浓度的增加, 荧光素的荧光强度减小。荧光强度的相对变化 $\Delta I/I_0$ 与五氯酚浓度的对数在 5.0×10^{-4} ~ 5.0×10^{-9} mol/L 范围成线性关系, 相关系数为 0.99。按三倍噪音计算所得的检测限为 2.0×10^{-9} mol/L。所得到的检测限低于或与已见报道的数值相当。比如: Codognoto 等^[5]采用钻石电极电化学

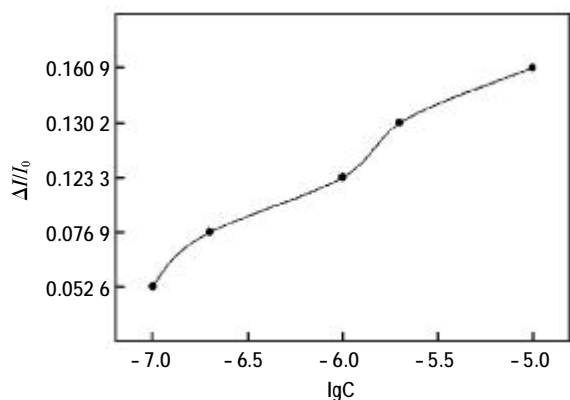


图 5 荧光素浓度对响应的影响

Fig.5 The influence of fluorescein concentration on the fluorescence intensity. The fluorescence spectra was collected after exposing a pH4.75 solution containing 5.0×10^{-6} mol/L PCP to 50 mW/cm^2 UV for 2.5 h, then adding different concentrations of fluorescein

检测五氯酚,检测限为 $5.5 \mu\text{g/L}$ (3.0×10^{-8} mol/L); Wu 等^[10] 采用基于纳米 TiO_2 /十六烷基磷酸盐的电化学传感器检测五氯酚,检测限为 1.0×10^{-8} mol/L; Patricia Noguera 等^[11] 采用酶联免疫法检测五氯酚,检测限为 0.1 ng/mL (5.6×10^{-11} mol/L)。

对该方法的重复性进行了考察。浓度为 5.0×10^{-7} mol/L 的五氯酚溶液,初始 pH 值 4.75,置于光强为 50 mW/cm^2 的汞灯下照射 2.5 h。光照后,往溶液中加入浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 的荧光素,记录荧光素的荧光强度的变化。相同的测试每天进行一次,一共进行 10 d。对十次的测试结果进行分析,得到相对标准偏差为 5.3%。由此可知,该方法的稳定性和重复性较好。

2.3 干扰检测

为了考察该方法对五氯酚检测的选择性,选

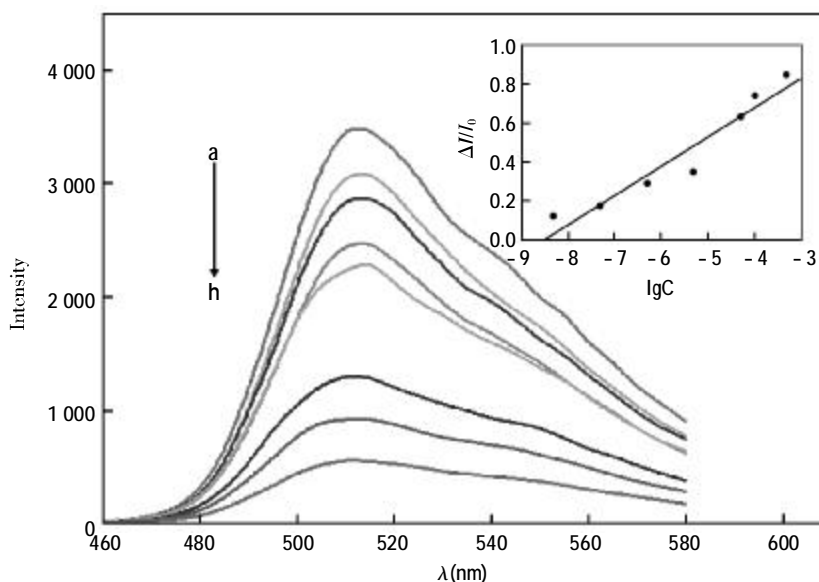


图 6 荧光强度与五氯酚浓度的关系

五氯酚浓度分别为 (mol/L): (a) 0, (b) 5×10^{-9} , (c) 5×10^{-8} , (d) 5×10^{-7} , (e) 5×10^{-6} , (f) 5×10^{-5} , (g) 1.0×10^{-4} , (h) 5×10^{-4} ; 插图为五氯酚的校正曲线

Fig.6 Relationship between PCP concentration and fluorescence intensity. The PCP concentrations (mol/L) are:

(a) 0; (b) 5×10^{-9} ; (c) 5×10^{-8} ; (d) 5×10^{-7} ; (e) 5×10^{-6} ; (f) 5×10^{-5} ; (g) 1.0×10^{-4} ; (h) 5×10^{-4} .

The insert is the calibration curve for PCP detection

择了五氯酚的类似物苯酚、一氯酚和二氯酚进行了干扰分析。浓度为 5.0×10^{-7} mol/L 的苯酚、一氯酚和二氯酚的磷酸盐缓冲溶液 (pH 为 4.75),分别在 50 mW/cm^2 汞灯光照 2.5 h 后,加入浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 的荧光素,记录荧光素的荧光变化。结果如表 1 所示,响应分别为苯酚:2.76%,一氯酚:7.79%,二氯酚:9.13%,五氯酚:35.84%。响

应随苯环上氯取代数目增加而增加。对五氯酚有选择性的响应。主要原因是五氯酚本身比较容易光解,光解导致的 pH 值改变与氯的数目有关。氯数目越多,pH 下降越大。苯酚最不易光解,响应最小。结果表明:只有那些在光照过程中会改变溶液 pH 值的物质,才会对检测产生干扰。

表 1 间接荧光法检测五氯酚的干扰分析

Tab.1 The interferences to the indirect fluorescence analysis of PCP

物质	浓度(mol/L)	$\Delta I/I$
苯酚	5.0×10^{-7}	2.76%
一氯酚	5.0×10^{-7}	7.79%
二氯酚	5.0×10^{-7}	9.13%
五氯酚	5.0×10^{-7}	35.84%

2.4 水样分析

最后考察了该方法对实际水样分析的可行性。分别采集了自来水、岳麓山上的泉水和湘江的江水,用孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的纤维素膜过滤后,取 50 mL 水样加热蒸发浓缩到 1 mL ,没有检出五氯酚。然后在上述水样中加入浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的五氯酚,测得回收率分别为: 94.0% (自来水), 89.8% (泉水),和 119.5% (江水)。

3 小结

基于五氯酚紫外光照降解导致溶液 pH 改变的特点,通过指示剂荧光素的荧光变化来指示溶液 pH 值的变化,建立了对五氯酚的间接荧光分析法。该法的线性范围 $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$,检测限为 $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ ($S/N=3$)。该方法非常简单,亦无需复杂的荧光标记反应,检测的灵敏度也得到了进一步的提高。

参考文献

- [1] Sarrion M N, Santos F J, Galceran M T. Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 947(2): 155 ~ 165.
- [2] Cai Y Q, Cai Y E, Mou S F, et al. Multi-walled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of chlorophenols in environmental water samples[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1081(2): 245 ~ 247.
- [3] Muna G W, Quaiserova' -Mocko V, Swain G M. Chlorinated Phenol Analysis Using Off-Line Solid-Phase Extraction and Capillary Electrophoresis Coupled with Amperometric Detection and a Boron-Doped Diamond Microelectrode[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77 (22-23): 6 542 ~ 6 548.
- [4] Anandhakumar S, handrasekaran M, Noel M. Anodic oxidation of chlorophenols in micelles and microemulsions on glassy carbon electrode: the medium effect on electroanalysis and electrochemical detoxification [J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2010, 40: 303 ~ 310.
- [5] Codognoto L, Machado S A S, Avaca L A. Electrochemical Determination and Removal of Pentachlorophenol at Diamond Electrodes[J]. Portugaliae Electrochimica Acta, 2005, 23: 225 ~ 246.
- [6] Saby C, Male K B, Luong J H T. A Combined Chemical and Electrochemical Approach Using Bis (trifluoroacetoxy)iodobenzene and Glucose Oxidase for the Detection of Chlorinated Phenols [J]. Analytical Chemistry, 1997, 69(21): 4 324 ~ 4 330.
- [7] Wu M M, Llopis J, Adams S, et al. Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin[J]. Chemistry and Biology, 2000, 7(3): 197 ~ 209.
- [8] Barbeni M, Morello M, Pramauro E, et al. Sunlight photodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxy-acetic acid and 2, 4, 5, trichlorophenol on TiO_2 Identification of intermediates and degradation pathway[J]. Chemosphere, 1987, 16(6): 1 165 ~ 1 179.
- [9] Pecchi G, Reyes P, Sanhueza P, et al. Photocatalytic degradation of pentachlorophenol on TiO_2 sol-gel catalysts[J]. Chemosphere, 2001, 43(2): 141 ~ 146.
- [10] Wu Y H. Nano- TiO_2 /dihexadecylphosphate based electrochemical sensor for sensitive determination of pentachlorophenol [J]. Sensors and Actuators B, 2009, 137(1): 180 ~ 184.
- [11] Noguera P, Maquieira Á, Puchades R, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for pentachlorophenol [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 460(2): 279 ~ 288.

基于 Au-Ni 复合材料的新型葡萄糖传感器的研究

姚天明, 杨卉彦, 齐骏飞, 王炜祺, 黄杉生*
(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 利用新型 Au-Ni 复合材料, 通过壳聚糖将 Au-Ni 复合材料修饰到电极表面, 制备了一种新型的用于葡萄糖检测的电化学传感器。以 XRD 表征了 Au-Ni 材料, 以循环伏安法, 交流阻抗法, 计时电流等电化学方法研究了此传感器的电化学特性。研制的电极对葡萄糖检测的线性范围为 $2.5 \times 10^{-5} \sim 9.5 \times 10^{-4}$ mol/L, 检测限为 1×10^{-5} mol/L。常见的尿酸和抗坏血酸对葡萄糖检测不干扰。

关键词: Au-Ni; 传感器; 检测葡萄糖

A novel glucose sensor based on Au-Ni as composite matrix

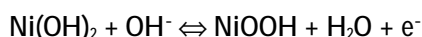
Yao Tian-ming, Yang Hui-yan, Qi Jun-fei, Wang Wei-qi, Huang Sha-sheng*
(Life and Environmental College, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: A novel sensor for the determination of glucose was prepared by immobilizing Chitosan and Au-Ni composite matrix on the surface of glassy carbon electrode. The preparation of Au-Ni was characterized by XRD, and the electrochemical characteristics of the sensor was investigated by cyclic voltammetry, ac impedance method and amperometric *i-t* curve. The method showed good linearity for $2.5 \times 10^{-5} \sim 9.5 \times 10^{-4}$ mol/L glucose with a detection limit of 1×10^{-5} mol/L. The correlation coefficient was 0.995 0. Some common organic acids such as uric acid and ascorbic acid did not interfere with the detection of glucose.

Key words: Au-Ni; sensor; determination of glucose

0 引言

磁性纳米粒子在力学、光学、电学和磁学等方面赋予材料许多优异的特性, 它们所具有的独特物理化学性能使其成为研究的热点^[1-4]。Ni 纳米粒子作为最常被研究的磁性纳米粒子, 由于其在恒电位下对碳水化合物有一定的催化氧化作用^[5-7], 常用于制备无酶传感器以检测葡萄糖^[8]。葡萄糖氧化成葡萄糖内酯是由 $\text{Ni}(\text{OH})_2/\text{NiOOH}$ 氧化还原催化的, 反应式如下^[9]:



合金以及复合材料因有着比单一金属或材料更为出色的性能被大量的制备和研究^[10-13]。以

Ni 合金及其与其他材料, 如聚苯胺、碳纳米管混合制备的化学传感器可用于葡萄糖的检测^[14-17]。金纳米粒子由于具有出色的电子传递性, 良好的生物相容性, 较大的比表面积, 因而常被用来作为电极上的电子导线。近年来金纳米粒子一直被广泛研究^[18-19]。该文制备了一种金和镍的核壳复合材料, 将其修饰在电极表面, 利用上所述 Ni 对于葡萄糖的催化原理, 结合合金的出色电子传递性来加强信号, 借助各种电化学方法实现对葡萄糖快速、方便、精确的检测。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

壳聚糖(Chitss)、氯金酸(HAuCl_4)购于上海化

基金项目: 上海市科委项目(08520510400)

* 通讯联系人

学试剂有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVP, 40000), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 购于上海国药; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 溶液由定量的铁氰化钾, 亚铁氰化钾和氯化钾配制; 其他使用试剂均为分析纯。实验用水为 2 次水 ($>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

电化学实验均在 CHI 760 C 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上进行, 三电极体系: 修饰电极为工作电极, 铂丝电极为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极(SCE)。紫外-可见(UV-VIS)光谱实验采用 UV-2020 型紫外-可见分光光度计(上海优尼科仪器有限公司); 其他仪器为实验室 pH 计; 超声仪; 真空干燥箱。XRD 测试采用 Rigacu 公司 D2000 型 X 射线衍射仪, 对样品进行物相分析。

1.2 传感器的制备

1.2.1 Au-Ni 复合材料的制备

在室温 20°C 下, 分别称取 0.2 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP, 40000), 0.034 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 溶于 200 mL 去离子水中, 超声溶解并用氮气净化各 15 min , 迅速将新鲜配置的 80 mL NaBH_4 (0.04 g) 逐滴滴加入上述溶液并搅拌, 全部滴加完毕后, 在保持搅拌情况下, 迅速逐滴滴加 $1; 2; 4; 8 \text{ mL}$ HAuCl_4 (4.8 mmol/L) 水溶液, 不断搅拌 30 min 后离心, 再用乙醇和水分别洗涤 3 次, 得到镍金复合材料, 用 Au-Ni 表示。图 1 为该文制备的 Au-Ni 复合材料的 XRD 谱图, 曲线 1 到 4 分别为加入不同浓度 Au 的谱图, 与标准谱图卡比较, 随着加入 HAuCl_4 的量的不断增加, Au 的衍射峰越发

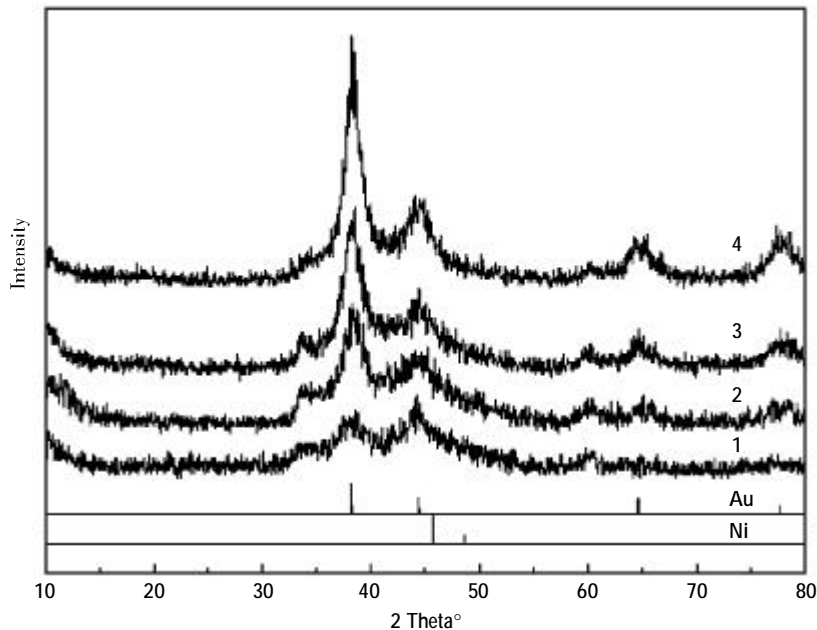


图 1 不同 Au 含量的 Au-Ni 材料的 XRD 谱图

Fig.1 XRD image of Au-Ni with different content of Au

明显, Ni 的衍射峰只在曲线 1 中可以看出, XRD 的结果显示材料是外层 Au 包裹 Ni 的结构。

纳米 Au 和纳米 Ni 的制备分别按文献所述制备^[19-20]。

1.2.2 电极的制备

玻碳电极分别用 $1.0, 0.3, 0.05 \text{ mm}$ 的氧化铝粉末打磨抛光, 直至产生一个光亮、平滑的表面。电极再依次用超纯水, 无水乙醇, 超纯水超声清洗 3 min 后, 用氮气将其表面吹干。

(1) 将 $5 \mu\text{L}$ $w=0.5\%$ 的壳聚糖溶液滴加到处理好的电极表面, 放入干燥器中, 形成一层壳聚糖薄膜 Chitss/GCE。然后将修饰电极浸泡到不断搅拌着的 Au-Ni 水溶液 (2 mg/mL) 中 12 h , 得到 Au-Ni/Chitss/GCE, 用超纯水彻底冲洗, 以除去吸附不牢的 Au-Ni, 用同样的方法也可得到 Au/Chitss/GCE, Ni/Chitss/GCE, 电极放入干燥器备用。

(2) 将事先混合了的含有 2 mg/mL Au-Ni,

Ni, Au 的壳聚糖溶液 ($w=0.5\%$) $5\ \mu\text{L}$ 直接滴加到处理好的电极表面, 为了区别于上述依吸附法得到的电极, 按滴涂混合溶液得到的电极加上大括弧, 以示区别: $\{\text{Au-Ni/Chitss}\}/\text{GCE}$, $\{\text{Ni/Chitss}\}/\text{GCE}$, $\{\text{Au/Chitss}\}/\text{GCE}$, 制好的电极放入干燥器备用。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极的循环伏安表征

图 2 为不同修饰电极在 $0.6\ \text{V}$ 到 $-0.2\ \text{V}$ 的电位范围内, 在含有 $0.1\ \text{mol/L}$ KCl 的 $1\ \text{mmol/L}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 溶液中的循环伏安曲线。混合法修饰得到的 $\{\text{Au-Ni/Chits}\}/\text{GCE}$ (d) 所产生氧化还原峰明显强于用吸附法所修饰的 Au-Ni/Chits/GCE (f) (为突出比较这两根循环伏安曲线, 将其放在了图 2 中的左上插图)。虽然 Au 作为一个良好的电子媒介体可以起增强电信号的作用, 但吸附修饰会因为 Au 本身带负电, 屏蔽了壳聚糖表面氨基所带的正电荷, 所以阻碍了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 之间的

电子转移^[9,21], 使得信号变小。吸附法几乎无法将 Ni 修饰于电极表面, 所以 Ni/Chits/GCE (c) 的响应电流比较接近裸玻碳电极 (a)。

2.2 电极修饰过程的电化学交流阻抗表征

EIS 可用来表征电极在每一步修饰过程中的阻抗变化, 图 3 谱图所示半圆的直径表示电子迁移阻抗, 而阻抗的大小控制 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 在电极表面迁移的动力学^[22]。裸 GCE (a) 在低频区是一个小半径的半圆, 在高频区几乎是一条直线, Chits/GCE (b) 低频区的半圆变小, 因为壳聚糖表面有大量带正电荷的氨基, 促进 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 之间的电子转移。而 $\{\text{Au-Ni/Chits}\}/\text{GCE}$ (c) 阻抗变大是由于 Au 的存在部分阻碍了电子的转移, Au/Chits/GCE (d) 的阻抗则相对较大。左上内插图中外围的高频区 2 个大半径阻抗分别对应的是吸附法制备的 Au-Ni 修饰电极和 Ni 修饰电极。所有的阻抗图与 CV 图中的表征结论相一致。通过 CV 和 EIS 结果发现混合法修饰了 Au-Ni 材料的电极有着

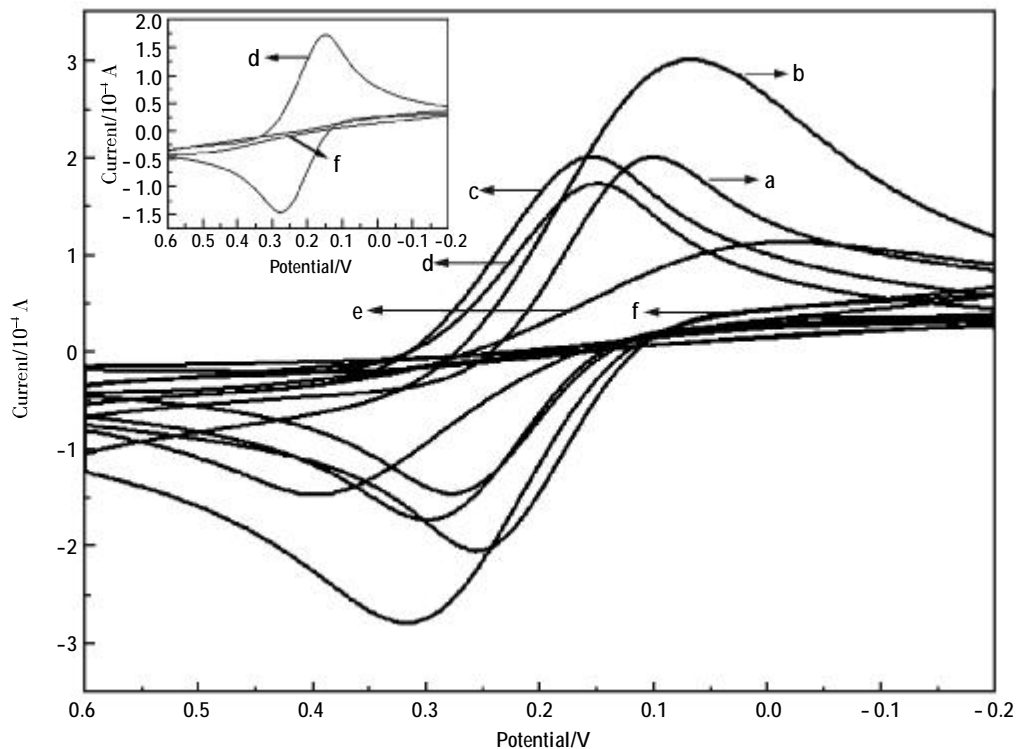


图 2 不同修饰电极在含有 $0.1\ \text{mol/L}$ KCl $1\ \text{mmol/L}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 溶液中的循环伏安图
(a) GCE; (b) Chits/GCE; (c) Ni/Chits/GCE; (d) $\{\text{Au-Ni/Chits}\}/\text{GCE}$; (e) Au/Chits/GCE. 左上插图为曲线 (d) 和曲线 (f) 的对比

Fig.2 The CV images of different modified electrodes in $1\ \text{mmol/L}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ containing $0.1\ \text{mol/L}$ KCl
The illustration in the upper left corner is the comparison of curve (a) and curve (f)

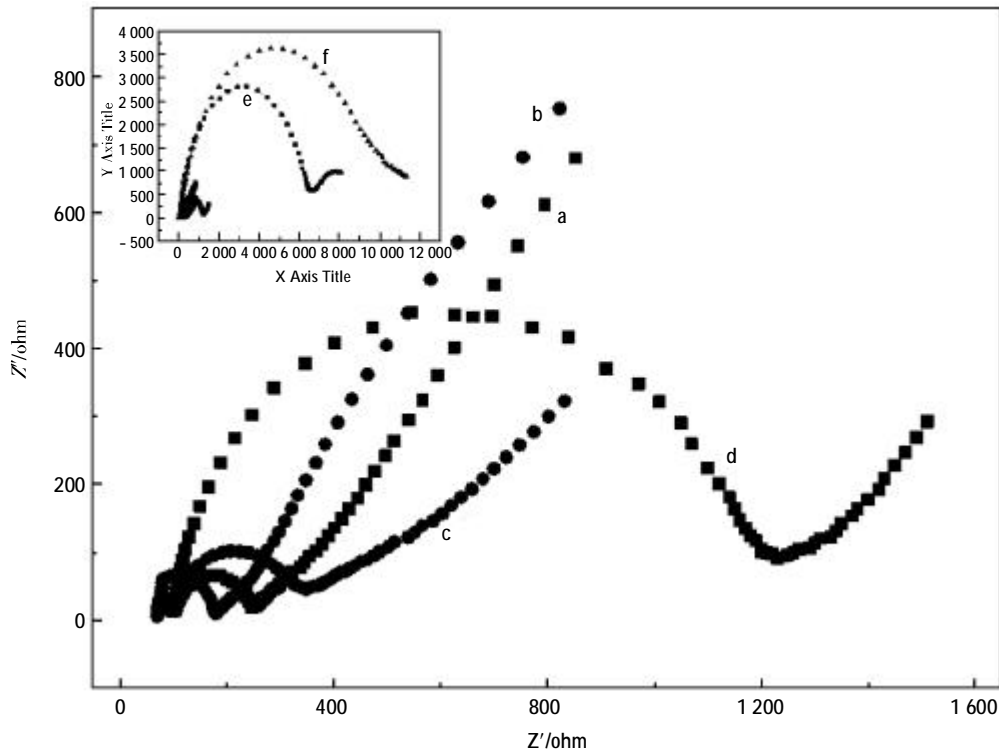


图 3 不同修饰电极在 $10 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-3-}$ (含有 0.1 mol/L KCl) 中的交流阻抗图, (a)GCE, (b)Chits/GCE, (c){Au-Ni/Chits}/GCE, (d) Au/Chits/GCE, (e) Au-Ni/Chits/GCE, (f){Ni/Chits}/GCE

Fig.3 The EIS images of different layers modified electrodes, (a)GCE, (b)Chits/GCE, (c){Au-Ni/Chits}/GCE, (d) Au/Chits/GCE, (e) Au-Ni/Chits/GCE, (f){Ni/Chits}/GCE

比较好的电化学响应。

2.3 修饰电极的性能测定

不同修饰电极在含有 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 葡萄糖的 0.2 mol/L NaOH 溶液中的循环伏安图(图 4)。图 4 中内插图为葡萄糖在裸玻碳电极以及以吸附法制备的修饰电极上的电化学响应, 由图可见, 它们几乎没有电流响应。而葡萄糖在{Au-Ni/Chits}/GCE 有明显的响应信号。

图 5 为葡萄糖(0.2 mol/L NaOH 溶液)在{Au-Ni/Chits}/GCE 电化学响应。随着葡萄糖的量的增加, 电极的响应电流增加, 且氧化峰没有发生峰位移^[23], 说明复合材料中的 Au, Ni 的协同作用不仅可以稍微降低对于葡萄糖氧化的电位, 同时 Au 的存在更有利于电子的传递。

考察了不同扫数下电极在含有 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 葡萄糖的 0.2 mol/L NaOH 溶液中循环伏安曲线, 由图 6 可见, 氧化峰的峰电流随着扫速的增加而变大, 而氧化峰电流与扫描速度的平方根呈线性关系, 表明这是一个受扩散控制的反应过程。

2.4 修饰电极响应条件的优化

2.4.1 Au-Ni 材料对电极响应的影响

考察了修饰不同 Au-Ni 材料中 Au 的含量对传感器的电流响应的影响。在 Au-Ni 材料中分别加入 1; 2; 4; 8 mL HAuCl_4 (HAuCl_4 浓度为 4.8 mmol/L), Au-Ni 对应的电流响应。结果表明加入了 2 mL HAuCl_4 的 Au-Ni 制备的电极有着相对较好的电流响应。

2.4.2 NaOH 溶液浓度的选择

使用 Ni 修饰电极测定葡萄糖时选用碱性介质 pH 值一般为 13 或稍高^[24-25], 因此选择接近 0.1 mol/L 浓度 NaOH 溶液进行测定。分别维持底液中 NaOH 浓度为 $0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1.0 \text{ mol/L}$, 考察了葡萄糖在电极上的电化学响应。过高 NaOH 浓度下, 葡萄糖容易被其它的氧化介质氧化或解离。会对测定结果产生一定的误差。实验选择 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液作为测试底液。

2.4.3 工作电位的选择

从循环伏安曲线中可以得到修饰电极对葡

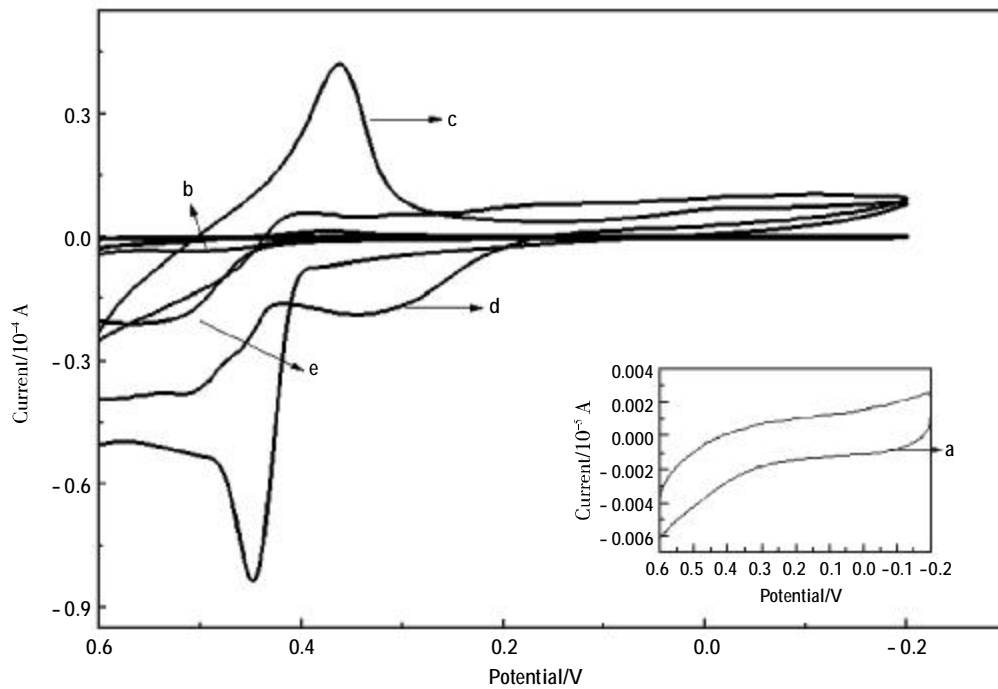


图 4 不同修饰电极在含有 2×10^{-4} mol/L 葡萄糖的 0.2 mol/L NaOH 溶液中的循环伏安图
 (a)GCE; (b)Au/Chits/GCE; (c){Ni-Au/Chits}/GCE; (d){Ni/Chits}/GCE; (e)Ni-Au/Chits/GCE
 Fig.4 The CV images of different modified electrodes in 0.2 mol/L NaOH containing 2×10^{-4} mol/L glucose
 (a)GCE; (b)Au/Chits/GCE; (c){Ni-Au/Chits}/GCE; (d){Ni/Chits}/GCE; (e)Ni-Au/Chits/GCE

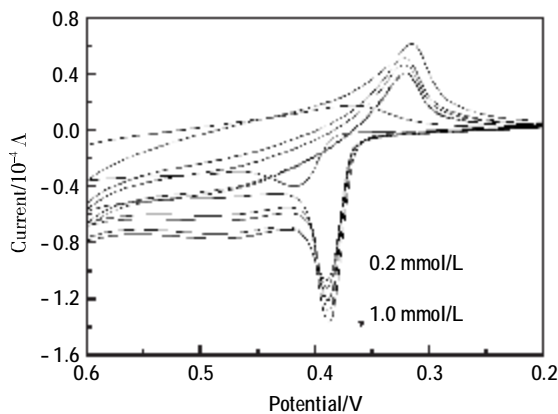


图 5 修饰电极对葡萄糖的响应,从上到下为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L 葡萄糖的 0.2 mol/L NaOH
 Fig.5 The cyclic voltammograms of the modifies electrode in 0.2 mol/L NaOH containing different concentration of glucose

葡萄糖的氧化峰在 0.4 V 左右,选择 0.3 V 到 0.5 V 这一电位区间对葡萄糖进行计时电流测定,发现 0.4 V 电位条件下得到最佳的响应。

综上所述,最终选择加入 2 mL 4.8 mmol/L HAuCl_4 制备的 Au-Ni 壳聚糖(2 mg/mL)修饰电极,在 0.4 V 的工作电位下,在 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液中进行测定。

2.5 修饰电极的计时电流响应,抗干扰实验,稳定性及重现性

修饰电极在 0.4 V 的工作电位下,向 0.2 mol/L NaOH 溶液中连续加入葡萄糖,得到电极的计时电流响应曲线(图 7)。响应电流随每次葡萄糖的加入而增加并快速达到 90% 以上的稳态电流。右上内插图为该传感器在不同的葡萄糖浓度下对催化电流的线性校正关系,对葡萄糖的检测浓度范围为 $2.5 \times 10^{-5} \sim 9.5 \times 10^{-4}$ mol/L,线性相关系数 $r = 0.9950$ ($n=27$),检测限为 1×10^{-5} mol/L。

维持底液中葡萄糖浓度为 2.5×10^{-5} mol/L,考察了尿酸和抗坏血酸对测定葡萄糖的干扰情况(图 8)。由图 8 可见,尿酸及抗坏血酸对葡萄糖的检测几乎没有干扰。

以相同方法制备的 5 支电极对同一浓度的葡萄糖进行检测,得到相对标准偏差(RSD)仅为 1.15%,说明有很好的重现性。因为无酶传感器没有酶失活之类不利因素的存在,所以在保存上无需特殊处理。修饰电极对同一浓度葡萄糖(0.2 mmol/L)连续测定 50 圈后的电流响应值仍保持原来的 85% 以上,电极有着很好的稳定性。

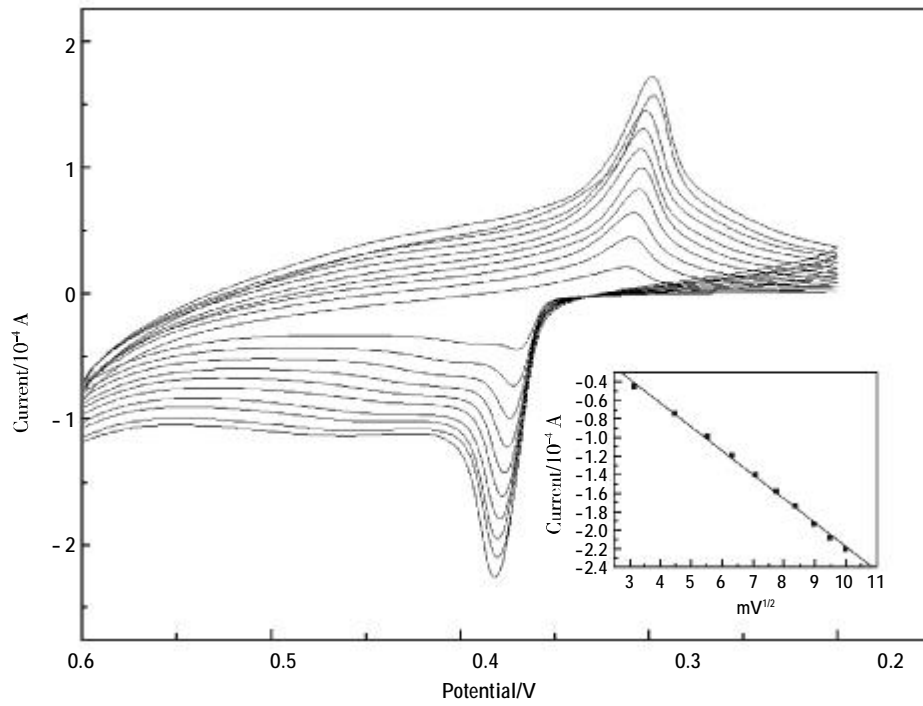


图 6 修饰电极在不同扫速的循环伏安曲线
扫描速度: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV/s (从内至外)
内插图: 峰电流与扫速平方根的线性关系

Fig.6 Effect of scan rate on the cyclic voltammogram of the modified electrode Inset: Calibration curve of the current and the square root of scan rates

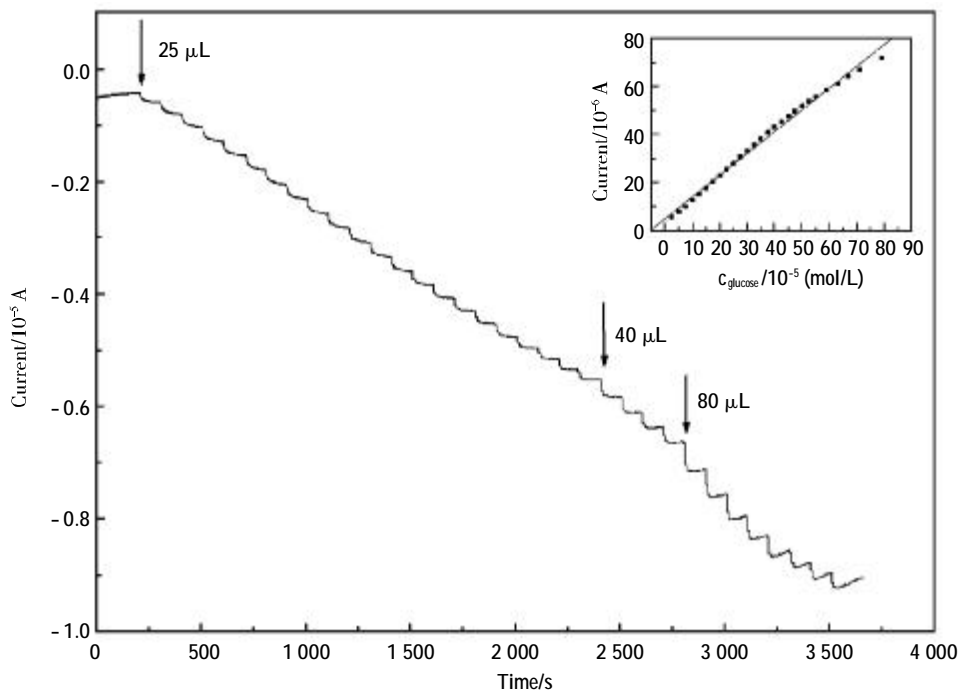


图 7 修饰电极在 0.2 mol/L NaOH 溶液中连续加入不同量的 10 mmol/L 葡萄糖的计时电流响应;内插图为浓度和电流的校正曲线

Fig.7 Amperometric i-t curve of the modifies electrodes to the different concentration of glucose in 0.2 mol/L NaOH; inset: Calibration curve of the current and the concentration of glucose

2.6 回收率实验

取含未知浓度的葡萄糖水样进行检测, 以上述方法进行测定, 结果列入表 1。同时在样品中分

别加入 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 的葡糖糖溶液, 测试回收率, 结果也列在表 1 中, 该方法测定得到的回收率在 98.8%~105.1%, 说明为检测葡萄糖提供了一个

表 1 回收率测定

Tab.1 Determination of recovery

样品 Sample	测定值 Detection/ $(\mu\text{mol/L})$	加入量 Added/ $(\mu\text{mol/L})$	测定总值 Founded/ $(\mu\text{mol/L})$	回收 Recovery/%
1	46.9	50.0	98.5	101.7
2	57.3	50.0	106.0	98.8
3	39.8	50.0	94.4	105.1

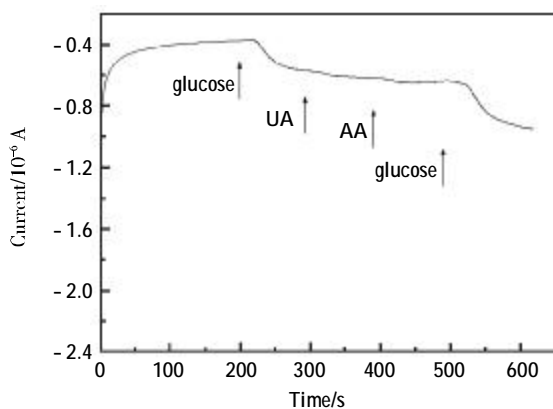


图 8 修饰电极在 0.2 mol/L NaOH 中依次加入 2.5×10^{-5} mol/L 的葡萄糖, 尿酸, 抗坏血酸, 葡萄糖的计时电流曲线
Fig.8 Amperometric *i-t* curve of the modifies electrodes with injection of 2.5×10^{-5} mol/L glucose, UA, AA, glucose

准确, 方便可行的方法。

3 结论

借助壳聚糖粘合作用修饰了玻碳电极, 利用 Ni 对葡萄糖的催化作用和金所具有的优越的电子传递性能, 实现了对葡萄糖的检测。制备的 {Au-Ni/Chits}/GCE 传感器能对葡萄糖高灵敏的快速响应, 检测浓度范围为 2.5×10^{-5} ~ 9.5×10^{-4} mol/L, 线性相关系数为 0.995 0, 检测限可达到 1×10^{-5} mol/L。

参考文献

[1] Chen H M, He J H, Zhang C B, et al. Self-assembly of novel mesoporous manganese oxide nanostructures and their application in oxidative decomposition of formaldehyde [J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111 (49): 18 033 ~ 18 038.
[2] Cheng F Y, Zhao J Z, Song W, et al. Facile controlled

synthesis of MnO_2 nanostructures of novel shapes and their application in batteries [J]. *Inorganic Chemistry*, 2006, 45(5): 2 038 ~ 2 044.

[3] Murakami T, Jima K, Miyawaki J, et al. Drug-loaded carbon nanohorns: adsorption and release of dexamethason in vitro [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2004, 1 (6): 399 ~ 405.

[4] Diandra L, Leslie P. Magnetic Properties of nanostructured Materials [J]. *Chem. Mater.*, 1996, 8(8): 1770 ~ 1783.

[5] Zhao C, Shao C, Li M, et al. Flow-injection analysis of glucose without enzyme based on electrocatalytic oxidation of glucose at a Nickel electrode [J]. *Talanta*, 2007, 71(4): 1 769 ~ 1 773.

[6] Morita M, Niwa O, Tou S, et al. Nickel content dependence of electrochemical behavior of carbohydrates on a titanium-Nickel alloy electrode and its application to a liquid chromatography detector [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 8379(2): 17 ~ 24.

[7] Fleischmann M, Orinek K, Pletcher D. The oxidation of organic compounds at a Nickel anode in alkaline solution [J]. *J. Electroanal. Chem.*, 1971, 31(1): 39 ~ 49.

[8] Danaee I, Jafariana M, Forouzandeha F, et al. Impedance spectroscopy analysis of glucose electro-oxidation on Ni-modified glassy carbon electrode [J]. *Electrochimica Acta*, 2008, 53(5): 6 602 ~ 6 609.

[9] Lu L M, Zhang L, Qu F L, et al. A nano-Ni based ultrasensitive nonenzymatic electrochemical sensor for glucose: Enhancing sensitivity through a nanowire array strategy [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25(1): 218 ~ 223.

[10] Reis A, Houbaert Y, Xu Z, et al. Modeling of Shrinkage defects during Solidification of Long and Short Freezing Materials [J]. *Journal of Materials Processing Technology*, 2008, 202(2): 428 ~ 434.

[11] Vijayaram T R, Sulaiman S, Hamouda A M S. Numeri-

- calSimulation of Casting Solidification Inpermanent MetallicMolds [J]. *Journal of Materials Processing Technology*, 2006, 178(4): 29 ~ 33.
- [12] Masyuki S. Invar alloys [J]. *Curr. Opin. Solid.State Mater.Sci.*, 1996, 1(3): 340 ~ 348.
- [13] Sridharan K, Worzala F J, Dodd R A. Heat treatmentand microstructure of an Fe -Ni -Co invar alloystrengthened by intermetallic precipitation [J]. *Mater. Charact.*, 1992, 29(3): 321 ~ 327.
- [14] Guadagnini L, Mignani A, Scavetta E, et al. Ni(OH)₂ versus Ni/Al layered double hydroxides as matrices to immobilize glucose oxidase [J]. *Electrochimica Acta*, 2010, 55(2): 1 217 ~ 1 220.
- [15] Lua L M, Zhang L, Li F, et al. A nano-Ni based ultrasensitive nonenzymatic electrochemical sensor for glucose: Enhancing sensitivity through a nanowire array strategy [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25(6): 218 ~ 223.
- [16] Yang J, Jiang L C, Zhang W D, et al. A highly sensitive non -enzymatic glucose sensor based on a simple two -step electrodeposition of cupric oxide (CuO) nanoparticles onto multi -walled carbon nanotube arrays [J]. *Talanta*, 2010, 82(1): 25 ~ 33.
- [17] Zheng L, Zhang J Q, Song J F. Ni (II)-quercetin complex modified multiwall carbon nanotube ion liquid paste electrode and its electrocatalytic activity toward the oxidation of glucose [J]. *Electrochimica Acta*, 2009, 54 (19): 4 559 ~ 4 565.
- [18] Wang L, Wang E K. Direct electron transfer between cytochrome c and a gold nanoparticles modified electrode [J]. *Electrochem. Commun.*, 2004, 6(1): 49 ~ 54.
- [19] Moeremans M, Daneels G, Mey J D. Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on Nitro-cellulose membranes [J]. *Anal. Biochem.*, 1985, 145 (2): 315 ~ 321.
- [20] Meng S H, Tan Z C, Song Y J, et al. Characterization and thermodynamic study of ultra -fine nanoparticle of Ni₃B amorphous alloy [J]. *Thermochimica Acta*, 1999, 333 (1): 179 ~ 181.
- [21] Katz E, Willner I, Wang J. Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles [J]. *Electroanalysis*, 2004, 16(1): 19 ~ 23.
- [22] Cheng Z L, Wang E K, Yang X R. Capacitive detection of glucose using molecularly imprinted polymers [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16(2): 179 ~ 185.
- [23] Guo R X, Chen W W, Hu X Y. Glucose sensor basing nafion/Ni-WCNTs modified GCE[J]. *Chemical Sensors*, 2007, 27(1): 28 ~ 35.
- [24] Quintino M S M, WinNiscofer H, Nakamura M, et al. Amperometric sensor for glucose based on electrochemically polymerized tetraruthenated Nickel porphyrin [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 539 (1): 215 ~ 222.
- [25] Salimi A, Roushani M. Non-enzymatic glucose detection free of ascorbic acid interference using Nickel powder and nafion sol-gel dispersed renewable carbon ceramic-electrode [J]. *Electrochem. Commun.*, 2005, 7(9): 879 ~ 887.

多壁碳纳米管-离子液体修饰电极同位镀铋膜 测定铅离子

张英*, 任旺, 李敏娇

(四川理工学院化学与制药工程学院, 四川自贡 643000)

摘要: 采用涂覆法制备多壁碳纳米管(MWCNT)-离子液体([BMIM]PF₆)修饰电极,然后在其表面同位镀铋膜,研究 Pb²⁺在该修饰电极上的阳极溶出伏安行为。实验结果表明,Pb²⁺在修饰电极上于-0.5 V产生灵敏的溶出峰,Pb²⁺在 3.0×10⁻⁷~2.0×10⁻⁵ mol/L 浓度范围内与其溶出峰电流呈良好的线性关系,检出限为 6.0×10⁻⁸ mol/L。该修饰电极制备简单,稳定性好,完全做到无汞化操作,用于血铅含量的测定,效果良好。

关键词: 多壁碳纳米管; 离子液体; 修饰电极; 同位镀铋膜; Pb(II)

Detection of lead ion using synchronous plating bismuth film on multi-walled carbon nanotube-ionic liquid modified electrode

Zhang Ying*, Ren Wang, Li Min-jiao

(College of Chemical & Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The novel construction method for the detection of Pb(II) has been developed using synchronous plating bismuth film on the multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-ionic liquid ([BMIM]PF₆) modified electrode surface. The sensitive anodic stripping peak of Pb²⁺ was obtained at the proposed sensor. Under the optimum conditions, stripping peak current of Pb²⁺ has good linearity with concentration in the range of 3.0×10⁻⁷~2.0×10⁻⁵ mol/L, and the detection limit is 6.0×10⁻⁸ mol/L. The resulting sensor is easy to prepare with good repeatability and can be used for determination of Pb(II) ion in blood samples.

Key words: multi-walled carbon nanotube; ionic liquid; modified electrode; synchronous plating bismuth film; Pb(II)

0 引言

铅是一种具有神经毒性的重金属元素,在人体内目前未发现任何生理功能,理想的血铅浓度为零。然而,由于环境中铅的普遍存在,绝大多数人体中均存在一定量的铅,铅在体内的量超过一定水平就会引起机体神经系统,血液系统,消化系统的一系列异常表现,影响人体的正常机能^[1]。90%的铅在骨骼系统,其它存在于血液中。目前,

测定铅含量的方法主要有二硫脲分光光度法^[2]、原子吸收法^[3]、等离子体质谱法^[4]以及电化学方法^[5]等。电分析方法测定铅常用各种汞或汞膜电极^[6],但汞本身对人类有危害并可造成环境的再次污染。该文采用多壁碳纳米管-离子液体修饰电极同位镀铋膜方法测定铅,完全做到无汞化操作,实现了对血铅含量的测定。该方法简单可靠,稳定性好。

基金项目: 四川省教育厅基金项目(10ZB102)资助;四川理工学院科技项目(2009xjkyL001)资助

* 通讯联系人, E-mail: zhyrw@163.com

1 实验部分

1.1 仪器设备与药品

CHI440A 型电化学工作站(上海辰华仪器公司), UP3200H 超声波清洗器, pHs-3D 型酸度计, 三电极系统: 多壁碳纳米管(MWCNT)-离子液体([BMIM]PF₆)修饰玻碳工作电极, 铂丝对电极, Ag/AgCl 参比电极。硝酸铅(天津大茂化学试剂厂), 硝酸铋(成都金山化学试剂有限公司), 高纯硝酸(润丰源化工贸易有限公司)。所有试剂均为分析纯, 实验用水为双蒸水。

1.2 修饰电极的制备

将多壁碳纳米管和离子液体按一定比例混合均匀, 得到的糊状物即为修饰物, 然后取少量放在洁净的平板玻璃上。

将玻碳电极($\phi = 2 \text{ mm}$)分别用 0.1 和 $0.05 \mu\text{m}$ Al₂O₃ 粉末在麈皮上打磨成镜面, 用蒸馏水冲洗干净, 然后分别用体积比为1:1的硝酸溶液、无水乙醇和蒸馏水超声清洗 1 min。待电极上的水晾干后, 将电极在粘有 MWCNT-[BMIM]PF₆ 的玻璃板上轻轻磨几圈, 即得到多壁碳纳米管(MWCNT)-离子液体([BMIM]PF₆)修饰电极, 将电极静置晾干待用。

1.3 实验方法

取一定量的 Pb(NO₃)₂ 标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 再加入 1.0 mL 1.0 mmol/L 的硝酸铋溶液和 1 mL 0.5 mol/L HNO₃ 溶液, 用双蒸水稀至刻度, 摇匀, 转移至电解池中。将三电极体系置于电解池中, 以 -0.7 V 为沉积电位沉积 200 s, 记录 $-1.0 \sim +0.5 \text{ V}$ 电位范围内铅的阳极溶出伏安曲线, 测量 -0.5 V 处 Pb²⁺ 的溶出峰电流。每次测定后, 电极在空白底液中循环扫描至不出现氧化峰, 即可更新电极, 恢复其催化活性。

2 结果与讨论

2.1 Pb²⁺在修饰电极上的电化学反应

图 1 为 Pb²⁺和 Bi³⁺在裸玻碳电极上(曲线 a)和 MWCNT-[BMIM]PF₆ 修饰电极上(曲线 b)同电位沉积后的溶出伏安曲线。从图可知, Pb²⁺在修饰电极上的溶出峰约是裸电极上溶出峰峰高的 10 倍, 表明 MWCNT-[BMIM]PF₆ 修饰电极同位镀铋膜对铅的溶出有较强的增敏作用, 有效提高了

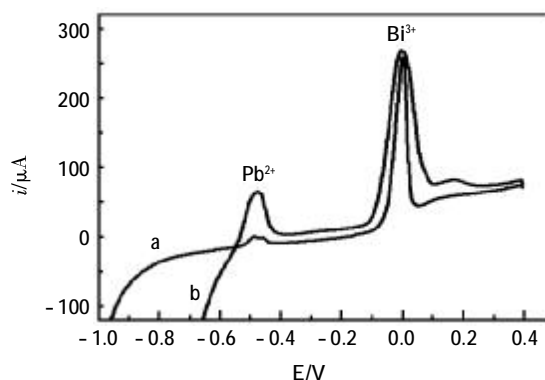


图 1 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L Pb}^{2+}$ 与 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L Bi}^{3+}$ 在裸电极 (a) 和修饰电极 (b) 上的溶出曲线

Fig.1 Stripping curves of the bare GC electrode (a) and the modified electrode (b) in 0.05 mol/L HNO_3 with $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L Pb}^{2+}$ and $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L Bi}^{3+}$

Pb²⁺测定的灵敏度。

2.2 底液选择

考察了 Pb²⁺在各种浓度的酸(醋酸、盐酸、硝酸)中的电化学响应。结果表明, 铅的溶出峰电流在硝酸溶液中最大, 在醋酸溶液中峰电流较小。另外, 铅的溶出峰电流基本不随硝酸浓度变化而改变, 故选择硝酸做测定 Pb²⁺的底液。

2.3 Pb²⁺沉积电位与沉积时间的选择

考察了不同沉积电位下 Pb²⁺ ($3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 的溶出伏安行为。结果表明, 在 $-0.5 \sim -1.2 \text{ V}$ 的沉积电位内, Pb²⁺的溶出峰电流随沉积电位负移先增加后减小, 沉积电位为 -0.9 V 时 Pb²⁺溶出峰电流最大(图 2A)。但沉积电位太负易发生析氢反应, 实验选择沉积电位为 -0.7 V 。

在 -0.7 V 沉积电位下, 考察了沉积时间对铅溶出峰电流的影响。从图 2B 可知, 铅溶出峰电流随沉积时间(90 s~220 s)增加而升高, 沉积 200 s 后铅溶出峰电流增加缓慢。为缩短分析时间, 实验选择 200 s 为 Pb²⁺ 的沉积时间。

2.4 工作曲线

如图 3 所示, 在 0.05 mol/L 的 HNO₃ 和 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的硝酸铋溶液中, Pb²⁺在该修饰电极上的溶出峰电流与其浓度在 $3.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的范围内有良好的线性关系, 工作曲线回归方程为: $i_{pa}(\text{A}) = 7.4705 c(\mu\text{mol/L}) + 9.1955$, 相关系数为 0.9943, 检出限为 $6.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

2.5 干扰物质

实验结果表明, 相对误差在 $\pm 5\%$ 范围内, 下

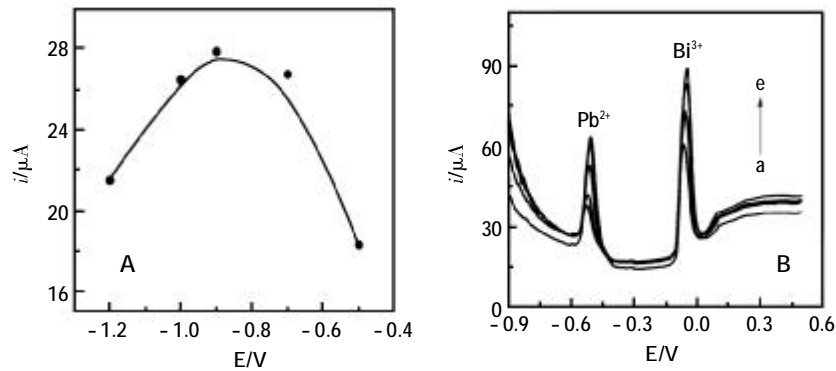


图 2 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L Pb}^{2+}$ 溶出峰电流随沉积电位(A)与沉积时间(B)变化的曲线图
Fig.2 Effect of deposited potential (A) and deposited time (B) on anodic stripping peak of Pb^{2+}
 t_{d} (from a to e): 90, 120, 180, 200, 220 s

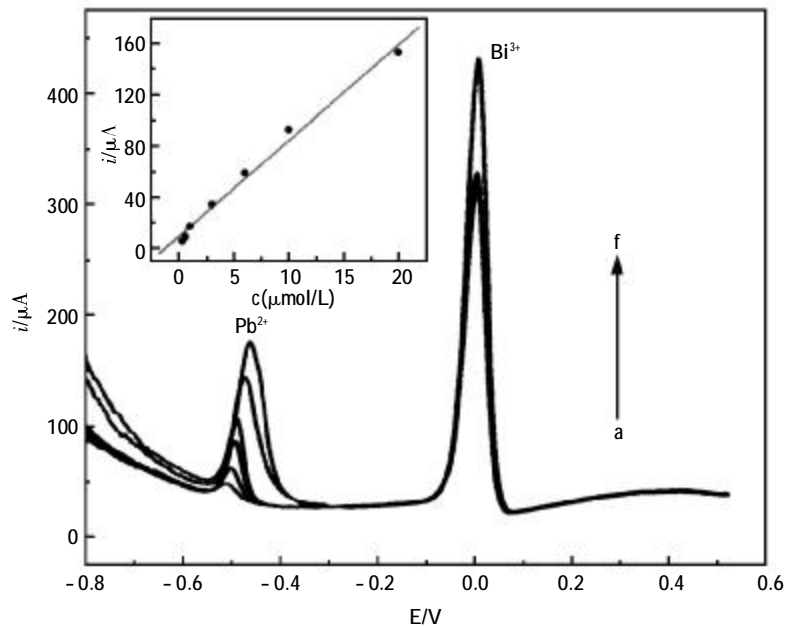


图 3 不同浓度 Pb^{2+} 在修饰电极上的溶出伏安曲线(内插图: 铅溶出峰电流与其浓度关系图)
Fig.3 Stripping curves of modified electrode in 0.05 mol/L HNO_3 and $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L Bi}^{3+}$ containing Pb^{2+} with
different concentrations ($c_{\text{Pb}^{2+}}$ (a-f): 0.3, 0.6, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol/L}$)

列物质对 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L Pb}^{2+}$ 的测定无干扰; 500 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} ; 100 倍的 Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 。

2.6 电极的稳定性

新制备的 MWCNT-[BMIM]PF_6 修饰电极对 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L Pb}^{2+}$ 平行测定 10 次, 铅离子溶出峰电流响应 RSD 为 1.9%; 电极放置一周后对 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L Pb}^{2+}$ 进行测定, 峰电流为原来的 96.7%, 说明修饰电极有良好的重现性和稳定性。

2.7 样品分析

用该方法测定血铅 (自贡市第一人民医院提供) 含量, 采用加标法做回收率实验, 结果见表 1。血样前处理: 用高纯硝酸为消解试剂, 采用微波消解法处理样品。消解后样品用硝酸溶解, 离心分离后取上层清液分析。

3 结论

MWCNT-[BMIM]PF_6 修饰电极制备简单, 实

表 1 血铅的加标回收测定结果(n=6)

Tab.1 Determination of Pb²⁺ in blood samples with modified electrode

编号	血铅检测浓度 μmol/L	加入铅标样浓度 μmol/L	检测铅总浓度 μmol/L	回收率 %
1	0.60	0.60	1.22	103.3
2	0.97	1.00	1.94	97.0
3	1.45	1.50	3.02	104.7

现了在无汞化条件下检测铅离子。该方法灵敏度高,稳定性好,若进一步完善,有望在重金属离子传感器方面得到实际应用。

参考文献

- [1] Chuanwatanakul S, Dungchai W, Chailapakul O, et al. Determination of Trace Heavy Metals by Sequential Injection-Anodic Stripping Voltammetry Using Bismuth Film Screen-printed Carbon Electrode[J]. Analytical Sciences, 2008, 24(5): 589~594.
- [2] 李明. 双硫脲分光光度法测定尿铅的方法改进[J]. 公共卫生与预防医学, 2010, 21(1): 98~99.
- [3] 刘俊妮. 石墨炉原子吸收法测定水中痕量铅[J]. 微量元素与健康研究, 2004, 21(6): 48~49.
- [4] 王琛, 赵永刚, 王同兴, 等. 同位素稀释多接收电感耦合等离子体质谱法测定血铅[J]. 质谱学报, 2008, 29(2): 84~87.
- [5] Guell R, Aragay G, Fontas C, et al. Sensitive and Stable Monitoring of Lead and Cadmium in Seawater Using Screen-Printed Electrode and Electrochemical Stripping Analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 627(2): 219~224.
- [6] 沈辉. 电位溶出法同时测定面粉中的铅和镉[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(20): 3 654~3 655.

《可植入神经修复器件》两卷集简介

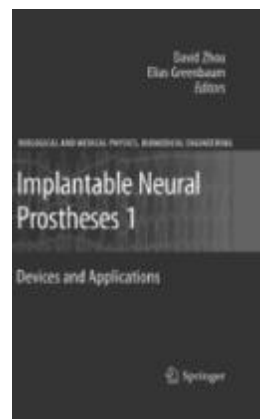
章宗穰

(上海师范大学化学系, 上海 200234)

Book Review: 《Implantable Neural Prostheses》

Zhang Zong-rang

(Chemistry Department, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)



2010 年秋,我接到在美国洛杉矶工作的旅美华裔学者周道民(David Zhou)博士来信,谈起他参与研究开发的帮助盲人恢复视力的 Argus™ II 型植入式视觉修复微芯片系统经美国食品药品监督管理局(FDA)批准,正在进行人体试验,进展顺利。并告知, Springer 出版社约请他和美国橡树岭国家实验室 Greenbaum 博士共同主编的《可植入神经修复器件》(Implantable Neural Prostheses)两卷集已出版。周道民博士是我在上世纪 80 年代初的学生,后来又和我共事数年。80 年代末去英国深造,研究生物传感新技术。得到博士学位并在英国进行博士后研究之后转赴美国洛杉矶工作。一直在当地的 Second-Sight 公司从事听觉和视觉神经修复的植入式微芯片系统的研究开发。植入耳蜗的听觉修复微芯片系统(人工耳蜗)已在美国、欧洲和亚洲市场销售,惠及不少听觉障碍患者。前几年他回国时,曾向我们作过介绍。相对人工耳蜗而言,人工视觉的研发难度极大。世界各国的研究团队从视觉通路的不同部位着手开发人工视觉系统。目前进展最快的是基于刺激视网膜的人工视觉系统。植入视网膜表面的由 60 个微电极组成的 Argus™ II 型视觉修复微芯片系统在进行了多年动物试验的基础上,经 FDA 批准于 2007 年开始为期 3 年的人体试验。已有 32 位来自美国、欧洲和墨西哥的志愿者接受了植入试验。研究工作得到了美国国立卫生研究院(NIH)、能源部(DOE)和自然科学基金会(NSF)的支持。他们在这方面的工作进展在国际上受到关注和高度评价。目前,该系统已获准在欧洲上市销售,成为世界上首例产品化的人工视觉系

统。在美国上市的申请正在顺利进行中。

上世纪 90 年代以来,这一涉及多个科技和工程前沿的新兴领域引起了有志于帮助残障人士部分恢复感官功能的各国学者和工程技术人员及企业界的关注和参与,在基础研究和工程技术方面都取得了巨大进展,其市场前景也未可限量。Springer 出版社有鉴于此,特地约请在基础研究和工程技术开发方面都有所建树的周道民博士和 Greenbaum 博士共同主编了《Implantable Neural Prostheses I - Devices and Applications》和《Implantable Neural Prostheses II - Techniques and Engineering Approaches》两卷集,以推进该领域的科学家和工程技术人员之间的学术交流。该书的第一卷着重于微芯片器件和系统的设计、制作和应用,第二卷则着重于加工制作的材料、工艺和工程方面的探索。2011 年春节,周道民博士回国探亲,期间曾与我会面,并惠赠他的两卷集专著,还介绍了这一前沿领域的研究开发近况。前些时候,我浏览了这两卷内容丰富的书籍,得知世界各国学者、医生和工程技术人员所报道的各自研究开发工作中的成果和心得。第一卷中还有一篇介绍美国及欧洲在制订植入式医学器件标准及临床试验规程方面情况的文章也值得参考。本文拟对这一颇有参考价值的专著作一简略介绍,以飨诸位读者。

在神经科学家、电化学家和微电子、材料及生物医学工程领域科技人员的多年合作努力下,目前已开发的植入式神经修复微芯片系统包括听觉和视觉神经修复、肢体神经修复、脊髓神经修复和脑部深层植入等领域。开发过程中涉及诸

多基础科学研究和工程技术问题,诸如:微电子器件和植入部位生物组织界面的兼容和电信号传递,器件及材料的选择及其生物兼容性和稳定性,器件封装材料以及封装工艺的密封性,器件和封装材料在体液环境中的腐蚀和防腐,神经刺激的电化学技术及表征,微电极阵列系统的现场电化学测试以及数据记录、解析及无线传输等。微型传感器及微型生物传感器在植入式微芯片系统中的应用也是具有实际意义的研究课题。以视觉神经修复微芯片系统的工作原理为例,外部图像经安装于特制眼镜上的微型摄像机转换为数字电信号,经电磁场射频无线传输到植入于视网膜表面或其后部的光学神经的微芯片系统。相应的电刺激信号经电极/组织界面作用于视网膜或光学神经,再传输到相应的脑部视觉皮层,最终转换成患者所接收的外部图像。这一复杂而精细过程的每一步都极为精细和缜密。从提高视觉修复的图像分辨率来考虑,必须提高每平方毫米的像素数量。理想的设计需将面积为 5×5 毫米的微芯片上的电极数量从目前的 60 支至少提高到 1 000 支以上。目前正计划进行包含 200 支电极或更高密度微电极阵列的设计制作。如此高密度的微电极阵列不但要解决微型电极阵列的设计和加工问题,如何克服由于电极间隙的缩小所导致的电极之间的电信号交联,更是一个极为复杂的理论和工艺问题。由于植入式医疗器件是在与体液直接接触的特殊环境中工作,而不是像多数集成电路器件那样在空气中工作,器件封装稍有差池,便会涉及诸多电化学反应,如此高密度的电极间的电信号交联现象的出现变得更为常见,这些都是研究人员所面临的严重挑战。两卷集专著所刊载的一些论文分别就上述论题进行了探讨。

各类患者对植入式神经修复微芯片系统的需求推动着研究工作的快速进展。以视觉修复器件为例。据美国相关机构统计,美国国内的 15 岁以上人群中,约有 800 万人有视觉缺陷,其中有 180 万人无法辨认文字。因视网膜病变而造成视觉障碍者在其中占了相当比例。新生儿中有视网膜病变者的比例约为四千万分之一。每年的经济损失约在 40 亿美元以上。患者的个人痛苦则更不待言。植入式视觉修复微芯片系统有望为

其中的一部分患者改善症状,解除痛苦和提高生活质量。

我国科技人员对这一快速发展的新领域也极为关注,积极参与。两卷集中也报道了上海交通大学生物医学工程系、中科院声学研究所及北京大学附属人民医院眼科的科研人员和临床医生的合作研究进展。

如同读者近年来已熟知的生物芯片及微流控芯片那样,植入式神经修复微芯片系统与微型传感器的研究开发及电化学技术有着相当密切的关联。期望有更多关注这一领域的本刊读者阅读该书,以了解这一前沿领域的最新进展,并与神经科学家、电化学家及微电子、材料和生物医学工程领域的科技人员以及临床医生合作,参与研究开发工作。也期望有志于植入式医疗器件开发的企业投身这一新兴领域,积极推动研究开发的协作。

应中国化学会《电化学》杂志之约,周道民博士撰写了神经修复微芯片系统研究开发进展的评述,近期将在该刊上刊出。敬请读者关注。

本书的主编、书名和国际标准书号如下:

Editors: David Zhou and Elias Greenbaum
《Implantable Neural Prostheses I - Devices and Applications》

ISBN 978-0-387-77260-8 Springer 2009

《Implantable Neural Prostheses II - Techniques and Engineering Approaches》

ISBN 978-0-387-98119-2 Springer 2010

有兴趣的读者可访问 Springer 出版社的如下网页,获取更多信息及免费阅览部分章节以及在刊物上发表的相关论文信息。

<http://www.springerlink.com/content/978-0-387-77260-8/>

以下为本书目录的译文,供各位读者参考。

第一卷

1. 视觉修复的微电子器件
2. 基于刺激光学神经的视觉修复
3. 人工耳蜗植入器件
4. 基于深层脑部刺激的新型听觉修复-开发和进展
5. 脊髓刺激:应对临床和生理学挑战的工程
技术进展

6. 用于深层脑部刺激的微电极
7. 植入式心脏电刺激器件
8. Bion[®] 微刺激器及其临床应用
9. 用于人工肢体的脑部控制和传感
10. 神经组织的磁信号刺激:技术和系统设计
11. 美国和欧洲关于植入式医学器件的认证

和批准程序

第二卷

1. 新型心血管材料和器件的生物兼容性和生物稳定性
2. 植入式医学器件密封封装的技术进展和挑战
3. 用于可植入生物学器件密封包埋涂层的生物惰性薄膜的科学和技术

4. 电极/组织界面上电荷注入的电化学
5. 用于神经电刺激的微电极阵列现场表征:基于 Argus II 型人工视网膜植入器件的理想化结构研究
6. 用于生物医学的薄膜微电极阵列
7. 刺激电极的材料及其电化学测试方法
8. 用于神经电刺激的导电高聚物
9. 用于神经修复领域的记录、刺激和无线传输微电子器件
10. 用于植入式神经刺激器的微芯片式电容器
11. 植入式医学器件成功开发的有效技术设计途径