

技术与方法

Nafion 膜固定的亚甲基蓝为介体的生物传感器*

应太林 王朝瑾 刘海鹰 孙 康

(上海大学化学化工系, 上海 200072)

邓家祺

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 制成了以亚甲基蓝为介体的电流型过氧化氢生物传感器, 通过离子交换牢固地固定在 Nafion 膜中的亚甲基蓝, 能有效地在辣根过氧化物酶和玻碳电极之间传递电子. 探讨了 pH 值、温度、工作电位和抗坏血酸等物质对此传感器生物电催化还原 H_2O_2 的影响. 此生物传感器选择性好、灵敏度高, 对 H_2O_2 线性响应范围为 $5.0 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 响应时间少于 30 s.

关键词 生物传感器, 亚甲基蓝, Nafion, 过氧化物酶, 过氧化氢

过氧化氢的检测在环境监测、生物、医疗等方面有重要的作用, 其检测方法也多种多样. 较为理想的方法是, 在电子传递介体如二茂铁及其衍生物^[1]、四硫富瓦烯^[2]、邻苯二胺^[3]等的作用下, 用过氧化物酶对过氧化氢进行生物电催化还原测定, 这种方法选择性好、灵敏度高. 但是, 许多介体的使用都是放在样品溶液中进行的, 这样使得测试过程繁琐, 且试剂浪费大.

Nafion 膜修饰电极由于有突出的化学和热力学稳定性, 引起了广泛的兴趣^[4~6]. 许多染料如: 亚甲基绿、劳氏紫、麦尔多蓝等固定在 Nafion 膜修饰银电极上的电化学行为已有报道^[6~8]. 本文第一次用 Nafion 修饰玻碳电极固定亚甲基蓝, 初步探讨了 Nafion-亚甲基蓝修饰电极的电化学行为, 并把亚甲基蓝作为过氧化物酶和电极间的电子传递介体, 成功地制成了过氧化氢传感器.

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

PAR270 电分析仪 (美国 EG&G 仪器公司), 三电极系统: 玻碳电极为工作电极, 参比电极和对电极分别为 Ag/AgCl 和铂电极,

501 型超级恒温器 (上海第二五金厂).

辣根过氧化物酶 (Sigma 公司), 亚甲基蓝和 Nafion 溶液 (Adrich 公司), 牛血清白蛋白 (上海化学试剂公司), 戊二醛 (E. Merck 公司), pH 值 6.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液, 其余试剂均为分析纯, 试验用水均为二次蒸馏水.

1.2 玻碳电极的预处理

玻碳电极先用 Al_2O_3 粉抛光, 使成镜面, 用蒸馏水洗净. 然后在 0.2 mol/L 硫酸溶液中进行循环伏安法扫描处理, 扫描速度为 50 mV/s, 电压范围为 -0.5 ~ +1.5 V, 持续扫描 10 min 左右, 得到稳定的循环伏安图之后, 取出用二次蒸馏水洗净.

1.3 Nafion-亚甲基蓝修饰电极的制备

在通过预处理的玻碳电极上滴上 3 μL 0.1% 的 Nafion 甲醇溶液, 室温下放置约 5 min, 待溶剂全部蒸发, 在电极表面形成了一层 Nafion 膜, 然后把 Nafion 膜修饰电极放到浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的亚甲基蓝溶液中浸泡 10 min, 通过离子交换, 使亚甲基蓝固定

* 国家自然科学基金及中国科学院长春应用化学研究所开放实验室资助课题.

收稿日期: 1996-04-20, 修回日期: 1996-10-27

到电极上.

1.4 酶电极的制备

采用牛血清白蛋白-戊二醛交联方法固定酶. 用二次蒸馏水配制成含辣根过氧化物酶 40~ 50 g/L, 牛血清白蛋白 60 g/L, 戊二醛 1%~ 2% 的溶液, 吸取 10 μl 此溶液滴加到制好的 Nafion- 亚甲基蓝修饰电极上, 在室温下放置约 2 h, 水蒸发后, 形成过氧化物酶膜. 酶电极制成后在 4 ℃ 条件下保存.

1.5 实验方法

定性分析用循环伏安法, 生物传感器对 H₂O₂ 电流响应的定量测试用计时电流法, 除特别说明, 试验均在 25 ℃ 下进行.

2 结果和讨论

2.1 Nafion- 亚甲基蓝修饰电极的电化学性质

Nafion 膜由于含有 -SO₃⁻ 离子束形成的亲液相, 它能够以离子交换的形式结合带正电

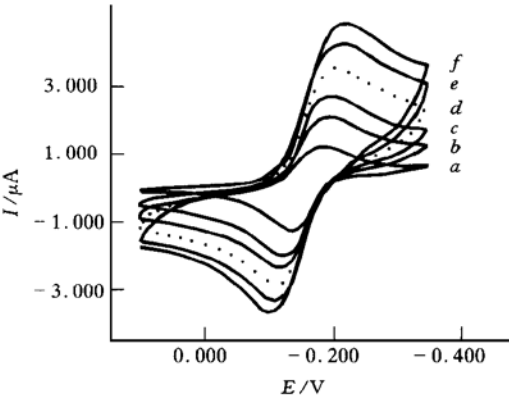


图 1 Nafion- 亚甲基蓝修饰玻碳电极的循环伏安图
溶液 pH 6.0, 扫描速度分别为: a: 5 mV/s; b: 30 mV / s; c: 50 mV / s; d: 80 mV / s; e: 100 mV/s; f: 1210 mV/s.

的酚噻类等染料^[6], 亚甲基蓝在溶液中带一个单位的正电荷, 能牢固地固定在 Nafion 膜中, 并在膜中表现出良好的电化学行为. 实验表明, Nafion- 亚甲基蓝修饰玻碳电极在酸性溶液中有很好的可逆性, 当 pH = 2 时, 其循环伏安图的还原峰电位为 $E_{p\text{c}} = + 100 \text{ mV}$,

氧化峰电位为 $E_{p\text{a}} = + 132 \text{ mV}$, 氧化峰和还原峰电位之差 $\Delta E_p = 32 \text{ mV}$ (扫描速度为 5 mV/s), 为典型的两电子反应. 随着 pH 值的增加, 峰电位向负方向移动, 氧化还原电对的可逆性有所下降, ΔE_p 值也略有增加, 在 pH = 6.0 时, 其氧化峰和还原峰电位分别为 - 185 mV 和 - 140 mV, $\Delta E_p = 45 \text{ mV}$ (扫描速度为 5 mV/s), 虽然电对可逆性有所下降, 但属于准可逆反应. 图 1 为 Nafion- 亚甲基蓝修饰的玻碳电极在不同扫描速度下的循环伏安图 (pH 6.0), 从图 1 可知, 其峰电流与扫描速度成正比.

2.2 生物传感器对 H₂O₂ 的催化还原

亚甲基蓝 (MB) 能够有效地在辣根过氧化物酶 (HRP) 和玻碳电极之间传递电子, MB_{ox}/MB_{red} 电对有较好的氧化还原可逆性, 图 2 为加入 H₂O₂ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 前后的循环伏安图 (扫描速度为 5 mV/s), 在加入 H₂O₂ 之前, 表现出可逆性较好的氧化峰和还原峰, 加入 H₂O₂ 后, 还原峰大大增加, 而氧化峰基本消失, 且还原峰峰电位由 - 185 mV 变为 - 200 mV, 说明亚甲基蓝对氧化态过氧化物酶有很好的还原作用.

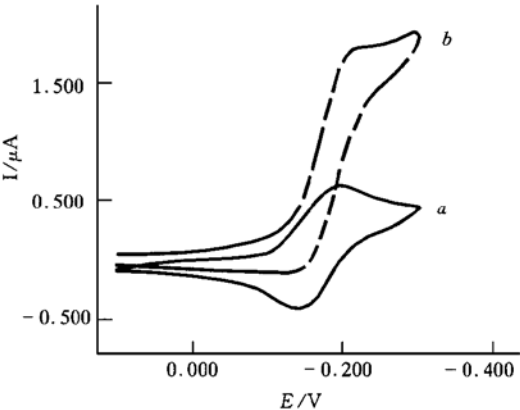


图 2 生物传感器在加入 H₂O₂ 前后的循环伏安图
溶液 pH 6.0, 扫描速度为 5 mV/s, a: 加入 H₂O₂ 前;
b: 加入 H₂O₂($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 后.

生物传感器对 H₂O₂ 的催化还原反应机理用图 3 表示:

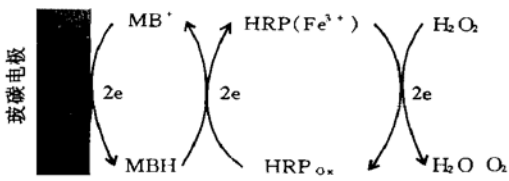


图 3 生物传感器对 H_2O_2 催化还原机理的循环示意图

图 4 是生物传感器在加入 H_2O_2 ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 后在不同扫描速度下的循环伏安图, 当扫描速度为 5 mV/s 时, 氧化峰基本消失, 在 Nafion 膜中亚甲基蓝主要以氧化态形式存在, 在电极上还原产生的还原态能及时与氧化态过氧化物酶反应. 随着扫描速度的增加, 氧化峰变得越来越明显, 这是由于随着电极反应速度加快, 在电极上还原产生的还原态亚甲基蓝来不及与氧化态酶反应, 直接在电极上被氧化, 产生氧化峰.

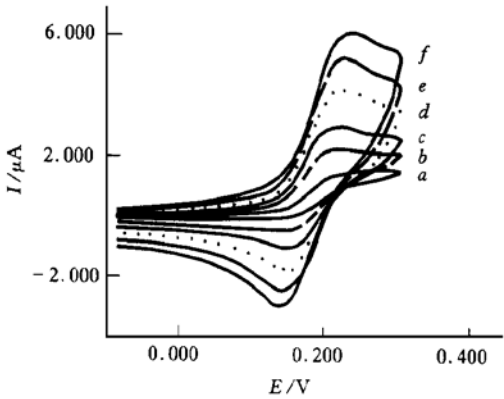


图 4 生物传感器加入 H_2O_2 后在不同扫描速度下的循环伏安图

溶液 $\text{pH } 6.0$, H_2O_2 浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 扫描速度分别为: $a: 5 \text{ mV/s}$; $b: 30 \text{ mV/s}$; $c: 50 \text{ mV/s}$; $d: 80 \text{ mV/s}$; $e: 100 \text{ mV/s}$; $f: 120 \text{ mV/s}$.

2.3 生物传感器对 H_2O_2 的电流响应

图 5 是生物传感器对 H_2O_2 催化还原的电流与电位的关系图, 电位为 -100 mV 时, 催化电流很小, 随着电位向负方向移动, 催化电流迅速增加, 当电位达到 -210 mV 后, 催化电流基本上达到稳定, 选择此电位对 H_2O_2 测定, 可以较好地避免电位波动对测定带来

的影响.

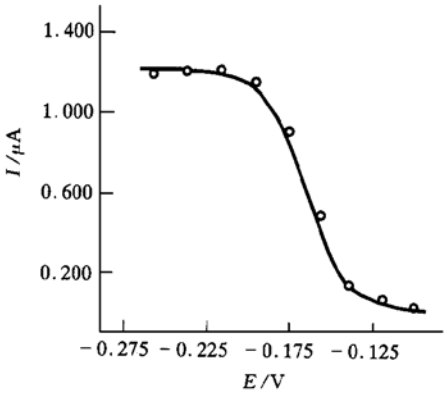


图 5 催化电流和电位的关系
溶液 $\text{pH } 6.0$, H_2O_2 浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

对 H_2O_2 测定采用计时电流法, 电位恒定在 -210 mV . 图 6 是生物传感器对不同浓度

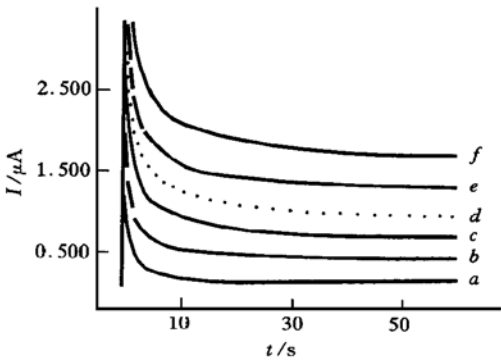
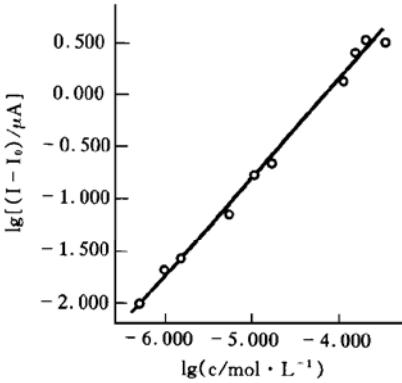


图 6 生物传感器对不同浓度 H_2O_2 响应的计时电流图
溶液 $\text{pH } 6.0$, 工作电位为 -200 mV , 浓度 (mol/L) 分别为: $a: 0$; $b: 3 \times 10^{-5}$; $c: 6 \times 10^{-5}$; $d: 9 \times 10^{-5}$; $e: 1.2 \times 10^{-4}$; $f: 1.6 \times 10^{-4}$.



7 生物传感器对 H_2O_2 电流响应的校正曲线

H₂O₂ 响应的计时电流图, 从图 6 可知, 生物传感器对 H₂O₂ 响应速度快, 对 H₂O₂ 达到 95% 的稳态流时所用时间少于 30 s. 传感器灵敏度高, 在 $5 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-4}$ mol/L 浓度范围内有很好的线性响应 (图 7).

2.4 pH 值和温度对传感器的影响

pH 值对传感器响应有影响, 当 pH 值较小时, 溶液酸性较强, 酶的活性受到影响, 而当溶液 pH 值较大时, 正如前面所述, 亚甲基蓝的峰电位也较负, 在较负电位下测定, H₂O₂ 可能会直接在电极上还原, 并且, 随着 pH 值的增加, MB_{Ox}/MB_{Red} 电对氧化还原反应的可逆性下降, 这又不利于亚甲基蓝对酶的还原. 实验表明, 在 pH= 5.5~ 6.5 范围内传感器对 H₂O₂ 有较好的响应, 在 pH= 6.0 时传感器效果最好.

温度从 10~ 60 ℃ 的试验表明, 随着温度的升高, 催化电流增大, 当温度达到 50 ℃ 时, 催化电流达到最大值, 继续升高温度, 由于酶的变性导致催化电流下降. 经试验, 在 45 ℃ 下持续使用 2 h 后酶的活性降低 50%. 在 25 ℃ 下持续使用 5 h 后酶的活性只降低 5%.

2.5 干扰物质的影响

我们研究了抗坏血酸和氨基酸对电极的影响, 由于测定是在负电位下进行的, 从理论上讲抗坏血酸等还原性物质不可能在电极被直接氧化, 但加入 10 倍于 H₂O₂ 的抗坏血酸, 存在 5% 的干扰, 这主要是由于抗坏血酸能与过氧化氢发生部分反应, 使过氧化氢浓度降低, 导致催化电流降低. 氨基酸无明显干扰.

2.6 生物传感器的重现性和稳定性

此生物传感器的重现性好, 对 1×10^{-4} mol/L H₂O₂ 的电流响应进行试验, 重复测定 10 次, 相对标准偏差为 1.5%. 当不使用时, 把此传感器以干燥状态保存在冰箱里 (4 ℃), 传感器稳定性好, 可长期使用, 经试验, 放置一个月后, 传感器对 H₂O₂ 的电流响应只降低 7%.

以 Nafion 膜固定的亚甲基蓝为介体的过氧化氢生物传感器, 具有选择性好、灵敏度

高、稳定性好、抗干扰力强、寿命长等优点. 传感器制作简单, 克服了把介体放在溶液中的缺点, 传感器使用方便. 如果在 Nafion 亚甲基蓝修饰电极上固定双酶, 如: 过氧化物酶-葡萄糖氧化酶、过氧化物酶-胆固醇氧化酶等, 可以制成葡萄糖传感器, 胆固醇传感器.

参 考 文 献

- 1 Frew J E, Harmer M A, Hill H A O. A method for estimation of hydrogen peroxide based on mediated electron transfer reactions of peroxidases at electrodes. *J Electroanal Chem*, 1986, **201**: 1~ 10
- 2 Bifulco L, Cammaroto C, Newman J D. TTF-modified biosensor for hydrogen peroxide. *Anal Lett*, 1994, **27** (8): 1443~ 1452
- 3 Deng Q, Dong S. Mediatorless hydrogen peroxide electrode based on horseradish peroxidase entrapped in poly (α -phenylenediamine). *J Electroanal Chem*, 1994, **337**: 191~ 195
- 4 Liu K E, Abruna H D. Electroanalysis of aromatic aldehydes with modified carbon paste electrode. *Anal Chem*, 1989, **61**: 2599~ 2602
- 5 Hurrell H, Abruna H D. Polymer-modified microelectrodes for metal ion determination and the development of a calcium amperometric probe based on surface-immobilized. *Anal Chem*, 1988, **60**: 254~ 258
- 6 Swamidoss A John, Ramasamy Ramaraj. Influence of polymer structure on the electrochemistry of phenothiazine dyes incorporated into Nafion film. *Chem Soc Faraday Trans*, 1994, **90** (9): 1241~ 1244
- 7 Guadalupe A R, Liu K E, Abruna H D. Transport properties of cationic dyes in Nafion film: unusually high diffusion coefficients and aggregation effects. *Electrochimica Acta*, 1991, **36**: 881~ 887
- 8 Kuwabata S, Nakamura J, Yoneyama H. Dimerization kinetics of methylene blue incorporated in a Nafion film. *J Electroanal Chem*, 1989, **261**: 363~ 373

Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Methylene Blue Incorporated into Nafion Membrane as Electron Transfer Mediator. YING Tailin, WANG Zhaojin, LIU Haiying, SUN Kang (Department of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, China); DENG Jiaqi (Department of

chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract A new amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on methylene blue incorporated into Nafion membrane as electron transfer mediator was fabricated. It was found that methylene blue incorporated into Nafion membrane by ion-exchanging could effectively transfer electrons between horseradish peroxidase and glassy carbon electrode. Bio-electrocatalytic

reduction of hydrogen peroxide at the biosensor was evaluated with respect to solution pH, temperature, operating potential and influences of ascorbic acid etc. The biosensor response exhibited fine selectivity, high sensitivity and a linear dependence on the analytic concentration range $5 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-4}$ mol/L. Response time was less than 30 s.

Key words biosensor, methylene blue, nafion, horseradish peroxidase, hydrogen peroxide

同步辐射小角散射实验站探测系统的改进

生文君 杨恒林 张志杰 董宝中

(中国科学院高能物理研究所, 北京 100039)

摘要 同步辐射小角 X 射线散射 (SAXS) 实验站所用的探测器由原来的 NaI 闪烁计数器改为位置灵敏探测器, 其位置分辨好于 100 μm , 有效探测面积为 50 mm $\times$ 10 mm, 得到了较以往更高质量的 SAXS 谱, 并成功地对液体样品的 SAXS 谱进行了测试.

关键词 小角散射, 位置灵敏探测器, 同步辐射

小角散射实验是一种研究物质微颗粒结构的手段^[1], 主要应用于分子生物学、材料学、物理学、化学等研究领域. 由于同步辐射光源具有常规 X 光源无法比拟的优点 (如光源尺寸小、准直性好、亮度高等), 给研究散射信号弱的物质结构以及物质动态结构变化提供了方便. 目前世界上各同步辐射实验室均建有小角散射实验站, 我国的同步辐射小角散射实验站于 1990 年建成^[2]. 本文主要介绍建站后对探测系统的改进.

1 探测系统的改进

原有的同步辐射小角 X 射线散射 (SAXS) 相机 (包括探测器) 由 PDP11/53 型计算机控制工作. 探测器采用 NaI 闪烁计数器, 由 PDP 软件控制自动对 SAXS 谱进行逐点扫描, 数据通过 3610 计数器、3922CAMAC

机箱控制器存入 PDP. 该装置已具有较高的自动化操作功能和使用者易学等优点, 但也有明显的不足之处. 首先由于采用逐点扫描方式, 为减小统计误差, 各角度采集数据的时间要求足够长, 使得整个实验时间比较长, 但同步辐射光寿命有限, 其光强随时间下降比较快, 要求测量时间尽量缩短, 两者产生矛盾. 利用该探测系统虽然获得了液体样品的 SAXS 谱, 但统计误差较大. 其次, 由 PDP 采集的数据文件不能直接用于 PC 机, 而用户多采用 PC 机, 必须经过一定的转换, 给数据处理带来了不便.

改进后的实验装置如图 1 所示. 对于实验平台、探测器的位置、狭缝调整以及入射光束的监测仍由 PDP 控制, 探测器改用由德国

收稿日期: 1996-04-28, 修回日期: 1996-09-16