

SiO₂球腔微电极阵列过氧化氢传感器制备及应用

李建鑫^{1,2}, 尹凡^{2,*}, 吴向阳¹, 吴静萍^{2,3}, 徐玉兰²

(1. 江苏大学化学与化工学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省新型功能材料重点建设实验室, 江苏 常熟 215500;

3. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 将微过氧化物酶-11(MP-11)直接固定于二氧化硅球腔微电极阵列, 制备一种新型电化学过氧化氢(H₂O₂)生物传感器。采用Langmuir-Blodgett技术在氧化铟锡(ITO)电极表面制备聚苯乙烯(PS)微球阵列, 并以此阵列为模板采用溶胶-凝胶法在ITO电极上制备二氧化硅(SiO₂)球腔阵列, 最后将微过氧化物酶-11作为氧化还原模型蛋白直接吸附于球腔内, 制得MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极。该电极对H₂O₂响应快速灵敏, 可作为电流型H₂O₂电化学生物传感器, 其线性范围为 $7.06 \times 10^{-6} \sim 4.02 \times 10^{-2}$ mol/L, 检出限为 3.0×10^{-7} mol/L, 米氏常数为0.916 mmol/L。将该法用于食品样品中的H₂O₂的检测, 回收率在94%~97%之间, 效果良好, 可为食品中残存的H₂O₂检测提供一种方法。

关键词: 过氧化氢; 溶胶-凝胶法; 二氧化硅球腔; 微电极阵列; 微过氧化物酶-11; 生物传感器

Preparation and Application of Hydrogen Dioxide Biosensor Based on Microelectrode Array of SiO₂ Cavity

LI Jian-xin¹, YIN Fan^{2,*}, WU Xiang-yang¹, WU Jing-ping^{2,3}, XU Yu-lan²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Jiangsu Laboratory of Advanced Functional Materials, Changshu 215500, China;

3. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: A new biosensor for the detection of H₂O₂ was prepared by immobilizing microperoxidase-11 (MP-11) onto silicon dioxide (SiO₂) cavity array directly. Polystyrene (PS) particle array was constructed on indium-tin oxide (ITO) electrode surface by Langmuir-Blodgett technique. The silicon dioxide cavity array was prepared by Langmuir-Blodgett technique using PS particle array as the template. Using MP-11 as a model protein, MP-11/SiO₂ cavity array-ITO electrode was prepared by adsorbing MP-11 into SiO₂ cavity. The fast response of the biosensor against H₂O₂ was observed. A linear relationship between current response and H₂O₂ concentration ranging from 7.06×10^{-6} to 4.02×10^{-2} mol/L was achieved with a detection limit of 3.0×10^{-7} mol/L. The apparent Michaelis-Menten constant was 0.916 mmol/L. This established method is satisfactory for the determination of hydrogen peroxide in food samples with a recovery rate varying from 94% to 97%.

Key words: hydrogen peroxide; sol-gel technique; silicon dioxide cavity; microelectrode array; microperoxidase-11; biosensor

中图分类号: TS207.3; O657.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0014-05

过氧化氢(俗称双氧水)是一种优良的氧化剂, 具有消毒、杀菌的功能, 广泛应用于食品加工的过程中^[1-2]。如果加工过程中残存的过氧化氢随食品进入人体内, 可能会导致消化道发生癌变, 因此对食品中残存的过氧化氢的检测具有重要的意义^[3]。通常过氧化氢的检测方法有: 化学滴定法^[4]、分光光度法^[5]、化学发光法^[6]、荧光光度法^[7]、色谱法^[8]、共振光散射法^[9]、电化学分析法^[10]等。化学滴定法和分光光度法灵敏度低, 不适用于微量过氧化氢的分析; 化学发光法和荧光光度法所需的发光体系少, 应用范围较窄; 色谱法和共振光散射法所需的实验

仪器昂贵, 普通实验室难以实现。与其他方法相比, 电化学方法具有选择性好, 分析速度快, 简便廉价, 易于实现自动化等优点, 受到人们普遍关注。电化学分析方法中的电流型传感器更有实验过程简便、灵敏度高的特点, 已成为电化学分析过氧化氢的研究方向^[11]。

通常电化学生物传感器通常采用常规电极, 在检测过程中常规电极的检出限受待测物质传质速率和电极表面双电层充放电电流的限制, 对痕量物质难以给出响应, 限制了其在痕量分析中的应用。工作电极微型化是改善传感器检出限的有效手段之一^[12]。随着电极尺寸的

收稿日期: 2011-11-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(20975073); 江苏省自然科学基金项目(BK2008147)

作者简介: 李建鑫(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为电化学。E-mail: lijianxin822@163.com

*通信作者: 尹凡(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为分析化学。E-mail: jscsyf@msn.com

减小,物质从本体溶液到电极表面的扩散可由平面扩散变为径向扩散,改善了待测物质的传质,电极面积的减小也有效地降低电极表面双电层充放电电流,提高了测定讯号的信噪比。但是单支微电极存在着响应信号微弱的缺点。将多支微电极组成微电极阵列不仅能有效放大响应电流,还可保留单支微电极电化学特性,从而可在常规电化学仪器上获得满意的结果^[13]。

过氧化氢生物传感器常采用辣根过氧化酶为氧化还原蛋白,然而辣根过氧化酶的氧化还原中心处于蛋白质内部,难以和电极表面达成有效的电子转移,且易于失活^[14]。微过氧化酶-11(MP-11)是由1个亚铁血红素和1个含11个氨基酸残基的多肽链组成,小的肽链使电极和酶的电活性中心间能够进行直接有效的电子转移^[15],其对双氧水的电化学催化效果更为明显,使人们越来越重视MP-11在过氧化氢传感器方面的潜在应用^[16]。

本实验将MP-11直接固定于二氧化硅(SiO_2)球腔微电极阵列表面,构建过氧化氢生物传感器。利用溶胶-凝胶法在氧化铟锡(ITO)电极表面制备规则有序、结构完整的 SiO_2 球腔阵列,该阵列的电化学行为类似于微电极阵列。固定在 SiO_2 球腔阵列内部的MP-11能保持良好的电化学活性,该传感器对过氧化氢的响应明显、快速灵敏,有望应用于生物传感器的设计。

1 材料与方法

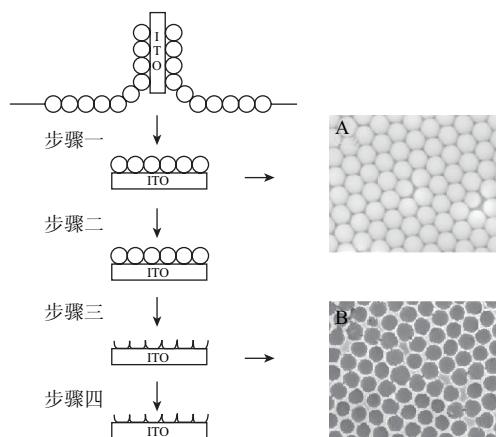
1.1 试剂与仪器

MP-11(相对分子质量1881,使用前未进一步纯化)美国Sigma公司;无水乙醇、丙酮、正硅酸乙酯、30% H_2O_2 、NaOH(均为分析纯)上海国药集团化学试剂有限公司;PBS缓冲溶液为自制溶液(pH7.0,浓度0.1mol/L);ITO玻璃(电阻小于100 Ω)苏州板硝子电子有限公司;实验所用水均为二次蒸馏水。

612D型Langmuir槽 英国Nima公司;RST5200电化学工作站 苏州瑞思特仪器有限公司;2xz-2型旋片式真空泵 上海仪表集团供销公司。

1.2 酶电极的制备

MP-11/ SiO_2 球腔阵列/ITO电极的制备过程示意图见图1^[17]。首先采用LB技术将PS微球转移到ITO电极表面,保留导电面的PS微球(步骤一),得到有序性良好的PS微球阵列(图1A);然后将微球模板放在 SiO_2 溶胶液中,在真空干燥器中抽真空10min(抽气速率2L/S,真空度<1.33Pa),使微球与模板空隙中的空气排出,当体系恢复到常压时,溶胶即填充到微球的空隙中,并在其中转化为凝胶(步骤二);将PS微球用乙酸乙酯除去,即得 SiO_2 球腔阵列(步骤三),该球腔阵列中球腔的尺寸与微球相当(图1插图B);最后取10 μL 3g/L的MP-11溶液滴涂于 SiO_2 球腔阵列表面,即得MP-11/ SiO_2 球腔阵列/ITO电极(步骤四)。



A. PS微球的SEM图; B. SiO_2 球腔阵列的SEM图。

图1 MP-11/ SiO_2 球腔阵列/ITO电极制备过程示意图

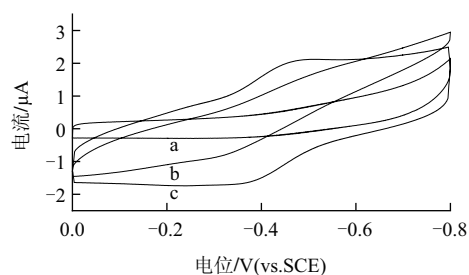
Fig.1 Schematic diagram of MP-11/ SiO_2 cavity array-ITO electrode

1.3 电化学测试方法

电化学测试采用三电极体系:饱和甘汞电极为参比电极,铂片(2 \times 7mm)为辅助电极,修饰MP-11的 SiO_2 球腔阵列/ITO电极为工作电极。采用循环伏安(CV)法测试MP-11酶电极的直接电化学性质,电位选择-0.80~0V;采用恒电位电流(IT)法检测双氧水的含量。电解液为pH7.0的0.1mol/L的PBS缓冲溶液,测试前通入30min的纯氮去除溶液中的氧气,并在实验过程中保持 N_2 氛围,于室温下测试。

2 结果与分析

2.1 MP-11/ SiO_2 球腔阵列/ITO电极的直接电化学



a. SiO_2 球腔阵列/ITO电极; b. MP-11/ITO电极; c. MP-11/ SiO_2 球腔阵列/ITO电极。

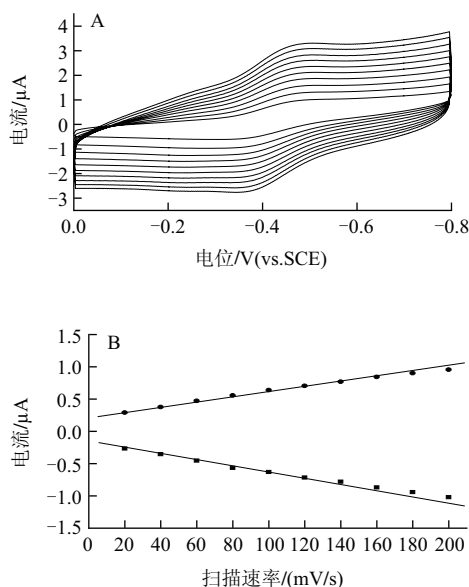
图2 不同电极的CV图

Fig.2 Cyclic voltammograms of different electrodes

由图2可见,未修饰MP-11的 SiO_2 球腔微电极阵列观察不到氧化还原峰(图2曲线a),表明无电化学活性物质存在。直接吸附MP-11的ITO电极虽也能观察到MP-11的电子转移现象,但其氧化还原峰并不明显(图2曲线b)。可能原因:酶在裸的ITO电极表面固定的不够牢固或发生了变性,电化学活性降低,电化学活性中心和电极表面的电子转移困难。而吸附有MP-11的 SiO_2 球腔微电极阵列

在 -0.40V 左右可见一对明显的氧化还原峰(图2曲线c),该氧化还原峰是MP-11中血红素辅基 Fe(III)/Fe(II) 电对得失电子所致。这个现象可以解释为 SiO_2 球腔亲水性微环境有利于蛋白质保持其天然构型,而 SiO_2 球腔底部微纳米反应区对MP-11的直接电子转移起到了促进作用。氧化峰电位(E_{pc})为 -0.352V ,还原峰电位(E_{pa})为 -0.451V , ΔE_{p} 为 0.099V ,氧化峰电流与还原峰电流之比为 0.989 ,接近于 1 ,说明该电极反应是准可逆的。氧化还原式电位(E^0)为 -0.402V ,与王凤斌等^[18]报道的金电极表面聚赖氨酸固定微过氧化物酶MP-11的电化学研究的电位接近。上述这些结果表明MP-11被固定在电极表面,另外经过多次循环伏安测量,也说明MP-11比较牢固的固定在电极表面。

2.2 扫描速率对MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极的直接电化学影响



扫描速率由内而外依次为20、40、60、80、100、120、140、160、180、200 mV/s; 0.1 mol/L PBS, pH 7.0。

图3 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极不同扫描速率CV图

Fig.3 Cyclic voltammograms of MP-11/SiO₂ cavity array-ITO electrode at different scanning rates

图3为不同扫描速率MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极CV图,随着扫描速度的增加,氧化还原峰电流也随之增加,峰电位略有移动,在20~200 mV/s范围内,峰电流与扫速呈正比,其线性方程分别为 $I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = -0.20373 - 0.00416v$ ($R = -0.9901$); $I_{\text{pc}}/\mu\text{A} = 0.24247 + 0.0037v$ ($R = 0.9965$),表明电极反应为表面控制^[19]。根据Laviron模型^[20]由 $K_s = mFv/RT$ (m 是与峰电位差值有关的常数),求得直接电子转移速率常数为 0.98s^{-1} 。

2.3 支持电解质溶液的pH对MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极的电化学行为影响

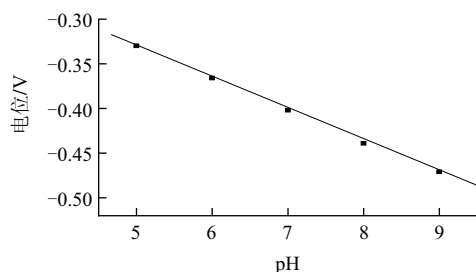
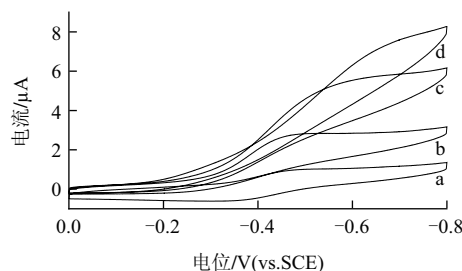


图4 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极的式量电位与pH值线性关系图

Fig.4 The linear relationship between formal potential of MP-11/SiO₂ cavity array-ITO electrode and pH

由图4可知,随着pH值由5.0逐渐增大到9.0,MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极上的MP-11的氧化还原电位均发生一定程度的负移,表示修饰电极上MP-11的直接电化学反应伴随着质子的传递过程。测得MP-11的 E^0 对pH值线性关系的斜率为 -32.5mV/pH ,接近理论值 -59.0mV/pH 的一半,说明MP-11在该修饰电极上的氧化还原反应过程伴随着两个电子和一个质子的转移,这是因为其形成了二聚体^[21]。考虑到蛋白质在近中性条件下能更好保持活性,在后续研究中选择研究体系pH值为7.0。

2.4 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极对H₂O₂的电催化分析



a. 无H₂O₂; b. 1 mmol/L H₂O₂; c. 2 mmol/L H₂O₂; d. 3 mmol/L H₂O₂。

图5 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极对H₂O₂的电催化

Fig.5 Electrochemical response of MP-11/SiO₂ cavity array-ITO electrode for H₂O₂

由图5曲线a可知,当溶液中无H₂O₂时,MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极展现出一对可逆的氧化还原峰,实现了酶MP-11在修饰电极上的直接电化学反应。由曲线b、c、d可知,当溶液中含有浓度分别为1、2、3 mmol/L的H₂O₂时,MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极阳极峰电流逐渐消失,阴极峰电流随着H₂O₂浓度的增加而增加,表明修饰在SiO₂球腔微电极阵列上的MP-11对H₂O₂的还原具有明显的电催化作用。

2.5 电位对MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极的影响

由图6可知,随着工作电位由 0.2V 减小到 -0.5V 时,电流响应快速增大,当电位小于 -0.5V 后,电流增加趋势变缓。考虑到选择的电势越负,可能存在的干扰越多,后续实验选择MP-11的还原电位为 -0.45V 为工作电位。

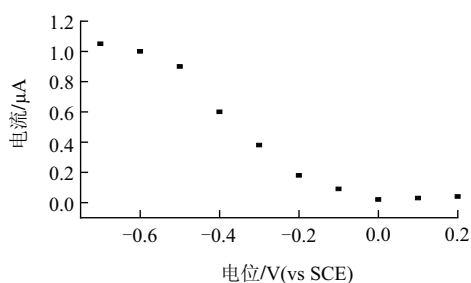
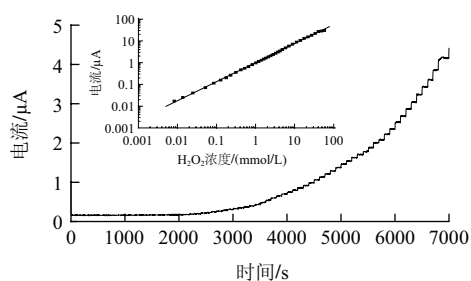


图6 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极在不同工作电位下对H₂O₂的电流响应

Fig.6 Effect of applied potential on current response of MP-11/SiO₂ cavity array-ITO electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) containing 0.1 mmol/L H₂O₂

2.6 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极对H₂O₂的*I*-*T*曲线



角图: 电流与H₂O₂浓度的校正曲线。

图7 连续加入H₂O₂后生物传感器的电流-时间响应曲线

Fig.7 Typical current-time curve of the biosensor with successive addition of H₂O₂

图7是MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极在0.1mol/L PBS(pH7.0)溶液中,连续加入一定量的H₂O₂测得的计时电流响应曲线。由图7可见,加入H₂O₂后响应电流随即增大,约在6s内达到平衡,说明该电极对加入的H₂O₂响应快速。峰电流与其浓度在 $7.06 \times 10^{-6} \sim 4.02 \times 10^{-2}$ mol/L内呈现线性关系,线性方程为 $I_{pa}/\mu A = 0.15784 + 0.77089C$ ($R = 0.9999$) (图7角图),检出限为 3.0×10^{-7} mol/L ($R_{SN}=3$)。求得MP-11对H₂O₂催化的米氏常数为0.916mmol/L,表明MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极对测定H₂O₂有较高的灵敏度。

2.7 MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极的重现性、稳定性和选择性

将MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极浸入除氧后的0.1mol/L PBS(pH7.0)缓冲溶液中,在扫速为100mV/s的条件下连续扫描100圈,CV还原峰电流相对标准偏差为1.92%。在H₂O₂浓度为3mmol/L时,平行测定10次,CV还原峰电流相对标准偏差为3.9%。所制备的传感器在4℃的冰箱中保存30d后测定,能保持原来响应电流的82%。在 1.0×10^{-6} mol/L H₂O₂浓度下,分别加入10倍抗坏血酸、葡萄糖、多巴胺、Cl⁻、NH₄⁺、Na⁺,测定电流无明显干扰。实验结果表明MP-11/SiO₂球腔阵列/ITO电极具有良好的重现性、稳定性和选择性。

2.8 样品分析

取10.0g市售粉丝,加入100mL PBS缓冲溶液充分浸泡溶胀捣碎,离心分离,取上清液10mL作为电解液,按上述确定的条件测定传感器在提取液中的电流值,根据响应电流与双氧水的关系测定过氧化氢含量。另取10.0g市售粉丝,加入一定量的标准过氧化氢溶液后,按照上述方法提取并测定,计算加标回收率。结果见表1。

表1 样品中过氧化氢的测定结果

Table 1 Determination of hydrogen peroxide in samples

样品编号	测定值/(mg/L)	相对标准偏差/%	标准加入量/(mg/L)	测得值/(mg/L)	回收率/%
1	0.086	2.1	0.10	0.184	95
2	0.092	3.0	0.10	0.189	97
3	0.082	2.4	0.10	0.176	94

由表1可见,采用该方法测得加入的过氧化氢回收率均为90%以上,说明该检测方法具有较好的准确性。对市售的粉丝测定结果表明,其中含有微量过氧化氢残留,这可能是加工作坊在生产过程中利用双氧水漂白粉丝后的残留。

3 结论

本研究获得一种制备过程相对简单、易控的球腔微电极阵列制备方法,可通过滴涂法将蛋白质直接吸附在球腔内,制备成电化学生物传感器。本研究所制备的MP-11修饰二氧化硅球腔阵列电极对过氧化氢反应敏感,应用于过氧化氢生物传感器,其响应的峰电流与浓度在 $7.06 \times 10^{-6} \sim 4.02 \times 10^{-2}$ mol/L内呈现线性关系,检出限为 3.0×10^{-7} mol/L ($R_{SN}=3$)。对实际样品进行回收实验,回收率在94%~97%,为过氧化氢的检测提供了一种可行的方法。微电极阵列单个电极达到微纳米级别,如何在控制单个电极的尺寸大小和厚度方面进行进一步完善,将是今后研究的方向。

参考文献:

- [1] 刘海峰. 快速检测食品中过氧化氢残留的生物传感方法的建立[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [2] 林倩, 张菊, 王晓芳, 等. 食品级过氧化氢的应用及其净化技术[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 626-649.
- [3] 文静, 张西, 陈曦, 等. 体内羟自由基的检测方法[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 351-356.
- [4] 朱玲. 工业过氧化氢含量测试方法的探讨[J]. 安徽化工, 2002, 120(6): 45-46.
- [5] 张国芳, 陈洪渊. 流动注射胶束电化学发光测定过氧化氢的研究[J]. 分析科学学报, 2001, 17(1): 1-5.
- [6] JANASEK D, SPOHN U. The analysis of hydrogen peroxide in aqueous solution[J]. Sensor and Actuators B, 1998, 51(1): 107-113.
- [7] 戴春霞. 基于硫胺素荧光增强的可更新液滴荧光法用于痕量过氧化氢的测定[J]. 精细化工中间体, 2005, 35(6): 51-55.
- [8] 许利君, 王凯雄, KANG J W, 等. 过氧化氢测定方法研究及水处理

- 过程中过氧化氢自动连续检测系统的设计构思[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2003, 30(3): 303-309.
- [9] LIANG Aihui, ZHOU Sumei, JIANG Zhiliang. A simple and sensitive resonance scattering spectral method for determination of hydroxyl radical in Fenton system using rhodamine S and its application to screening the antioxidant[J]. Talanta, 2006, 70(2): 444-448.
- [10] LIAN Wenping, WANG Li, SONG Yonghai, et al. A hydrogen peroxide sensor based on electrochemically roughened silver electrodes[J]. Electrochimica Acta, 2009, 54(18): 4334-4339.
- [11] 白红艳, 宋利. 过氧化氢电流型传感器检测方法的研究进展[J]. 广西轻工业, 2011, 4(4): 86-87.
- [12] 邓培红, 张军, 黎拒难. 多壁碳纳米管修饰炭黑微电极同时测定多巴胺和抗坏血酸[J]. 分析实验室, 2009, 28(1): 92-95.
- [13] 孙康, 王知彩, 李仲辉. $\text{SiO}_2/\text{Nafion}$ 杂化膜固定酶的过氧化氢生物传感器[J]. 分析测试学报, 2011, 29(11): 1185-1189.
- [14] 王刊, 王菊芳. 辣根过氧化物酶在亲水性离子液体中的活性与稳定性研究[J]. 分子催化, 2009, 23(1): 73-77.
- [15] RAZUMAS V, KAZLAUSKAITE J, RUZGAS T, et al. Bioelectrochemistry of microperoxidases[J]. Bioelectrochem Bioenerg, 1992, 28(12): 159-176.
- [16] JIANG Huijun, MERCIER P, WANG S C, et al. Direct electrochemistry and electrocatalytic activity of microperoxidase-11 immobilized on chitosan wrapped single-walled carbon nanotubes[J]. Journal of Functional Materials and Devices, 2009, 15(2): 132-142.
- [17] 周丽娟. 二氧化硅球腔微电极阵列以及复合磁性纳米氧化铁的制备与应用[D]. 苏州: 苏州大学, 2011.
- [18] 王凤彬, 郑军伟, 李晓伟. 金电极表面聚赖氨酸固定微过氧化物酶-11的电化学研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(12): 2268-2270.
- [19] BARD A J, FAULKNER L R. Electrochemical methods, fundamental and applications[M]. 2nd ed. New York: John Wiley Sons, 2001: 594.
- [20] 王全林, 杨宝军, 吕功煊. 碳糊电极上无机膜固载血红蛋白的直接电化学[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(9): 1561-1566.
- [21] LIU Ying, WANG Mingkui, ZHAO Feng, et al. Direct electron transfer and electrocatalysis of microperoxidase immobilized on nanohybrid film[J]. Electroanalytical Chemistry, 2005, 81(1): 1-10.