

分析测试

层层自组装法修饰电极检测硫代胆碱的研究

张淑平¹, 赵彦², 马杰¹, 刘晓慧³, 王梦飞³, 刘伟³

(1. 上海理工大学理学院, 上海 200093; 2. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093;

3. 上海理工大学环境与建筑学院, 上海 200093)

摘要:通过层层自组装技术利用多壁碳纳米管(MWNTs)对玻碳电极进行厚度可控的表面修饰。在1.7 V电压下,分散于水中的MWNTs在玻碳电极上电沉积2 h后,分别在质量分数为1%的聚二烯丙基二甲基氯化铵溶液和1 mg/L MWNTs的四硼酸钠分散液(pH 9.18)中交替浸泡15 min,实现层层自组装修饰电极。当自组装层数为5时,得到的修饰电极对硫代胆碱(TCh)的循环伏安法检测结果与裸玻碳电极相比,氧化过电位由0.65 V降低到0.35 V,峰电流提高一倍左右,而且由于碳纳米管和双分子层结构的存在,使得电极抗产物污染能力加强,稳定性和重复性大幅度提升。该修饰电极对硫代胆碱的检测限在0.75 μm以下,在1.50~75.00 μm内呈现良好的线性关系($R=0.9998$),在酶传感器的研制及农药残留的快速检测中有良好的应用前景。

关键词:修饰电极;碳纳米管;电沉积;层层自组装;循环伏安法;硫代胆碱

中图分类号:TP212.2

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2011)01-0088-05

Study on performance of layer-by-layer self-assembled electrode in detection of thiocholine

ZHANG Shu-ping¹, ZHAO Yan², MA Jie¹, LIU Xiao-hui³, WANG Meng-fei³, LIU Wei³

(1. College of Science, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology,

Shanghai 200093, China; 3. School of Environment and Architecture, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The paper describes a controllable layer-by-layer self-assembly modification technique of multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) towards glass carbon electrode (GCE). The bilayer membranes of PDDA and MWNTs, which are fabricated by alternate immersion of GCE in 1 wt% poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) solution and 1 mg/L MWNTs dispersed in pH 9.18 borate buffer solution for 15 min, are self-assembled to GCE after 2 hours' electro-deposition (ED) of MWNTs at the voltage of 1.7 V. The modified GCE with five self-assembled {PDDA/MWNTs}_n bilayers shows good sensitivity, stability and high reproducibility towards the detection of TCh due to the presence of MWNTs bilayers, which reinforces the anti-fouling ability of the modified electrode. In comparison with bare GCE, the oxidative over-potential obtained by modified GCE decreases from 0.65 V to 0.35 V, and the peak value increases by 100 percent. The modified GCE shows a low detection limit of less than 0.75 μm, and an excellent linear range from 1.50 to 75.00 μm. A good prospect of the modified electrode is described in fabrication of enzyme sensor and fast detection of pesticides.

Key words: modified electrode; carbon nanotube; electro-deposition; layer-by-layer self-assembly; cyclic voltammogram; thiocholine

目前有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的检测技术主要有基于生物检测技术的酶抑制法^[1]、免疫分析法^[2]、色谱检测技术^[3-5]及气质液质联用技术^[6]等。硫代胆碱(TCh)是胆碱酯酶(AChE)催化硫代胆碱酯水解的产物,而有机磷和氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶具有明显的抑制作用,导致酶催化能力的下降和丧失,利用此性质可以研制胆碱酯酶生物传感器^[7-10],通过对酶促反应产物硫代胆碱浓度的检测,反映出酶被抑制的程度,从而可以快速得出农药残留量的大小。这种方法与传统检测方法相比,具有方便快捷、适合现场在线检测等优点。

由于其巯基结构的存在,硫代胆碱具有特殊的化学性质^[11],如能和5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸发生显色反应,能在一定的电位下呈现出电化学活性。因此,可用分光光度法和电化学方法等对硫代胆碱的浓度进行灵敏的检测。分光光度法已广泛应用于农药的检测、人血中胆碱酯酶含量的检测等,但是分光光度法由于耗时相对较长,灵敏度较低,且容易受到干扰,仅能适合定性的检测要求。

目前,通过电极表面的化学修饰来降低反应的氧化过电位,提高峰电流,提升电极的稳定性和重复性,已经成为利用电化学传感器对硫代胆碱的检测

收稿日期:2010-11-11

作者简介:张淑平(1965-),女,博士,教授,主要研究方向为生态化工与资源利用、生物医药及化工、纳米生物材料及生物电分析、多糖与胶体化学, zhang_lucy9999@yahoo.com.cn.

的一个研究热点。

碳纳米管自从1991年被发现以来,由于其具有很高的电化学催化性能、较高的电子传递速率和较大的比表面积,在化学传感器和生物传感器的应用中一直受到广泛关注^[12-14]。近几年涉及到电化学领域的研究也充分说明了碳纳米管具有出色的电催化性能以及其他如提高电极抗污染能力、增大电极有效面积、作为生物活性物质载体等提高电极使用性的能力。利用碳纳米管修饰电极对多巴胺、胰岛素、NADH、苯肾上腺素、儿茶酚胺、氨基酸、细胞色素C、亚硝酸盐、氧气等均实现了较为快捷灵敏的检测。

碳纳米管在修饰电极中常用的方法是滴涂法^[15-16],通过挥发分散液溶剂来实现电极的修饰。滴涂法具有方便快捷、修饰用量可以随意调整的优点,但修饰层与电极的连接比较松散,容易脱落,而且常用DMF、丙酮等有机溶剂做MWNTs分散剂,大大限制了酶等生物活性物质的应用。

层层静电自组合法^[17-18]利用2种聚离子之间所带电荷种类的不同,通过静电作用互相吸附而形成相对牢固的修饰层。目前利用该法进行MWNTs修饰大多是首先通过对电极表面进行功能化,使之带上负电荷,然后再进行静电自组装。而笔者通过电沉积过程,将一定量的MWNTs先沉积到电极表面,形成初步的带负电的修饰层后,再进行静电自组装,不但省去了烦琐的电极表面功能化过程,而且电沉积过程中伴随对MWNTs的氧化更提高了修饰电极的性能。笔者采用酸化氧化预处理的MWNTs,先经过电沉积法修饰对玻碳电极进行初步修饰,再采用层层自组合法进一步修饰,得到了性能良好的修饰电极。

(上接第87页)

CO₂ NET项目是欧盟第五框架计划支持的1个CO₂技术知识共享网络,始建于2004年,由来自于欧洲、美国和澳大利亚等30多家研究机构、开发机构和使用者参加,是世界上CCS技术领域的最大网络,提供CCS技术信息和项目的一站式资源与技术门户网站服务。

4 结语

瑞典在CO₂排放方面本身并无太大压力,但是瑞典的查尔莫斯大学、隆德大学和皇家理工学院等大学,以及大瀑布公司和E.ON公司等能源电力企业都在积极开展CCS技术的研发与示范项目。CCS

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

胆碱酯酶(AChE,500U),氯化乙酰硫代胆碱,购于Sigma公司;5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸(DTNB),购于君创生物科技有限公司;谷胱甘肽(GSH),购于上海国药集团;聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA,相对分子质量为100 000~200 000),购于Sigma-Alrich公司;多壁碳纳米管(MWNTs,管径40~60 nm,长1~10 μm,纯度>95%),购于深圳纳米港有限公司;其他试剂均为分析纯。

循环伏安和计时电流检测均在CHI800电化学分析仪(上海辰华仪器公司)上进行,采用三电极系统:玻碳电极为工作电极(有效直径3 mm),饱和甘汞电极为参比电极,铂电极为对电极,所有测得的电位均参比于饱和甘汞电极;电化学实验过程在DF-101S智能集热式恒温加热磁力搅拌器中进行(30℃);CQ-250型超声波清洗器(上海新超超声波仪器有限公司)。

1.2 硫代胆碱的配制

硫代胆碱由于其化学结构中巯基的存在,可与巯基显色剂DTNB反应,生成一种黄色物质,在412 nm处有强吸收。该文中采用AChE催化ATChCl水解的方法制备浓度约为0.05 mol/L的TCh储备液,通高纯氮气除氧后4℃保存,实验前用Ellman法检测硫代胆碱储备液的浓度,然后稀释至所需浓度。

1.3 修饰电极的制备

玻碳电极分别用0.30、0.05 μm Al₂O₃浊液在麂皮上抛光至镜面,用去离子水冲洗后,分别在无水乙醇、丙酮、1:1硝酸(水和硝酸体积比)、去离子水中超声清洗3 min,以得到清洁的玻碳表面。

技术涉及的领域众多,需要由多方参与,因此瑞典参与的CCS项目多是欧盟项目,与英国、德国、丹麦、挪威、法国等国一起开展CCS技术研究和示范项目的建设,中国也参与了其中部分研究项目。

瑞典对CO₂的捕集、运输和封存等各个环节的技术和政策都有研究,捕集技术的实验平台和示范项目多设在瑞典境外的德国、英国等大型火力发电厂,封存地则需要考虑运输、地质条件等因素。从目前结果看,没有确定哪种技术路线更有优势,采用CCS技术会增加约50%的电力成本,但是欧盟较为积极地推进CCS技术的商业化进程,并预计在2020年后,CCS技术可商业化实施,以达到欧盟制定的CO₂在2020年的减排目标。■

0.10 g MWNTs 在 150 mL 浓硝酸中加热回流 24 h, 抽滤并用去离子水洗至中性, 烘干备用。称取处理过的 MWNTs 0.01 g 置于 10 mL 去离子水中, 超声振荡 30 min, 得均一稳定的黑色分散液, 在磁力搅拌的条件下进行 MWNTs 在玻碳电极表面的电沉积过程, 所加电压为 1.7 V, 电沉积时间为 2 h。此时得到的修饰电极为 ED/GCE。电沉积结束后, 将电极浸入 pH 9.18 的四硼酸钠溶液中 15 min, 使其羧基、羟基等功能基团充分带上负电, 然后浸入质量分数 0.1% 的 PDDA 溶液(由 NaCl 调节离子强度至 0.8 mol/L)中 15 min 后, 用去离子水仔细冲洗电极表面, 除去多余的 PDDA, 再浸入 1 mg/L 的 MWNTs 的分散液(分散于 pH 9.18 的四硼酸钠缓冲液)中 15 min 后取出, 用去离子水仔细冲洗电极表面, 至此完成 1 层的自组装, 如此交替浸泡冲洗, 则可以得到任意层数的自组装修饰电极 $\{PDDA/MWNTs\}_n/ED/GCE$ 。

1.4 修饰电极对 1 mmol/L 硫代胆碱溶液的 CV 法和计时电流法检测

取 6.0 mL pH 7.40 的磷酸缓冲液(PBS)置于反应池中, 在 CHI800 电化学工作站上采用三电极系统进行连续 CV 扫描对修饰电极进行活化, 扫描范围为 $-0.3 \sim 1.0$ V, 扫描速率为 100 mV/s, 所有扫描均在 30℃ 恒温磁力搅拌器中进行, 直至得到稳定的 CV 图。

1.4.1 修饰电极对 TCh 的 CV 法检测

将 TCh 储备液稀释至 1 mmol/L 后, 取 6.0 mL 置于 30℃ 恒温反应池中, 通入高纯氮气以维持氮气气氛, 在 CHI800 电化学工作站上采用三电极系统进行 CV 检测, 每次扫描前磁力搅拌 30 s, 扫描范围为 $-0.3 \sim 1.0$ V, 扫描速率为 100 mV/s。

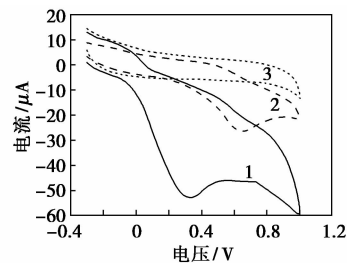
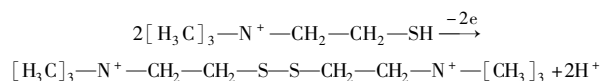
1.4.2 修饰电极对 TCh 的计时电流法检测

取 6.0 mL 所需浓度的 TCh 溶液或者磷酸盐缓冲液置于 30℃ 恒温反应池中, 通入高纯氮气以维持氮气气氛, 磁力搅拌以维持溶液浓度均匀, 在 CHI800 电化学工作站上采用三电极系统进行计时电流法检测。

2 结果及分析

2.1 TCh 在修饰电极表面的电化学行为

TCh 由于其巯基结构的存在, 在一定的电压下可发生如下反应^[19]:



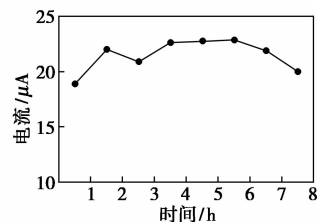
1— $\{PDDA/MWNTs\}_5/ED/GCE$; 2—裸电极;
3—裸玻碳电极背景电流, 支持电解质: 0.10 mol/L
pH 7.40 的磷酸缓冲液, 扫描速率: 100 mV/s

图1 $\{PDDA/MWNTs\}_5/ED/GCE$ 对 5 mmol/L
TCh 循环伏安扫描与裸电极的比较

由图 1 可以看出, TCh 可以在裸电极和修饰电极表面氧化, 形成特定氧化峰, 与裸电极对 5 mmol/L TCh 循环伏安扫描得到的氧化峰 ($E_{pa} = 0.65$ V, $I_{pa} = -27$ μ A) 相比, 修饰电极得到的氧化峰 ($E_{pa} = 0.35$ V, $I_{pa} = -54$ μ A), E_{pa} 负移了 0.37 V, 而峰电流则增大了 27 μ A。表明修饰电极对 TCh 具有良好的电催化性能, 而 MWNTs 的存在使得电极有效表面积增大。

2.2 电沉积条件对峰电流的影响

经过酸化氧化处理的 MWNTs 由于羧基、羟基等官能团的存在而带负电荷, 故在 1.7 V (相对于辅助电极) 电压下能够自发向玻碳电极移动, 形成静电吸附修饰层。图 2 显示了不同电沉积时间的修饰电极对 1 mmol/L TCh 循环伏安扫描所得峰电流的关系。可见, 当电沉积时间达到 2 h 时, 修饰电极对 1 mmol/L TCh 的检测峰电流不再明显增大, 因此, 选择 2 h 为电沉积时间。此时, 在玻碳电极表面形成一层亮紫色的修饰层^[20]。



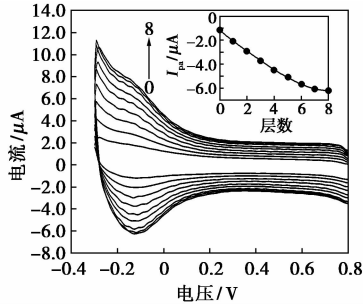
电沉积电压: 1.7 V; CV 扫描速率: 100 mV/s

图2 不同电沉积时间的修饰电极对 1 mmol/L
TCh 循环伏安扫描所得峰电流的关系

2.3 自组装层数与峰电流及电极稳定性的关系

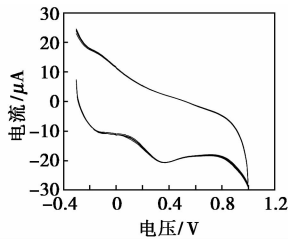
通过电沉积过程吸附在玻碳电极的 MWNTs 通过在 pH 9.18 的四硼酸钠溶液中浸泡 15 min, 其羧基、羟基等功能基团充分带上负电, 更有利于下一步的自组装。图 3 是不同 $\{PDDA/MWNTs\}$ 层数与对

0.10 mol/L pH 7.40 PBS 扫描所得背景电流的关系图,可以看出,随着 PDDA/MWNTs 的增加,修饰电极对 PBS 的 CV 扫描得到的背景电流以及 MWNTs 的特征氧化还原峰也随之增大,当层数超过 5 层时,线性关系开始变差,这可能是由于修饰层的厚度过大,反而阻碍了电子传递的缘故^[21]。



CV 扫描速率:100 mV/s

图 3 不同 {PDDA/MWNTs}_n 层数与对 0.10 mol/L pH 7.40 PBS 扫描所得背景电流的关系



CV 扫描速率:100 mV/s

图 4 {PDDA/MWNTs}₅ED/GCE 对 5 mmol/L TCh 连续 5 次循环伏安扫描的稳定性

由图 3 可见,当自组装层数为 5 时,在对 PBS CV 扫描时背景电流偏大,而碳管的特征峰比较明显。此时,得到的修饰层比较均匀。由图 4 可知,对 5 mmol/L 硫代胆碱溶液连续扫描 5 次 CV,峰电流基本上不变,体现出良好的稳定性和重复性,说明修饰电极的抗污染能力较强。当层数小于 5 时,修饰层太薄,电极连续扫描检测的稳定性相对较差;而当自组装层数超过 5 时,修饰层厚度变大,阻碍了反应物与电极表面的连接,会使得响应信号变差。因此, $n=5$ 时,既能保证 {MWNTs/PDDA}_n 修饰层对 TCh 的氧化具备良好的催化作用,又不至于阻碍反应物和产物的扩散。

2.4 修饰电极对不同浓度 TCh 的计时电流法扫描

图 5 显示了修饰电极对 1 mmol/L TCh 的计时电流法检测采用不同的工作电压得到的相应的电流值,在 0.3 V 处和 0.7 V 处的电流变化都比较大。即在这 2 个电压附近 TCh 会在修饰电极表面被氧

化而产生相对较大的电流。考虑到工作电压为 0.7 V 时会有比较大的背景电流,容易受到其他物质的干扰,因此选定 0.3 V 为工作电压。

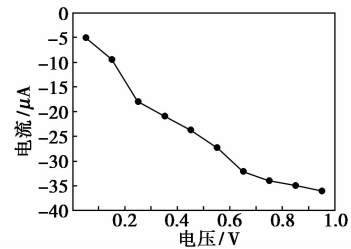


图 5 不同电压下 {PDDA/MWNTs}₅ED/GCE 对 1 mmol/L TCh 检测的电流

2.4.1 线性范围的确定

在 0.3 V 的工作电压下,由图 6、图 7、图 8 可见, {MWNTs/PDDA}₅ 修饰电极对 TCh 的检测线性范围很宽,从 1.50 ~ 75.00 μmol/L 都成良好的线性关系 ($R=0.99984$)。在信噪比等于 3 的情况下,实验测定修饰电极对 TCh 的检测限为 0.75 μmol/L。

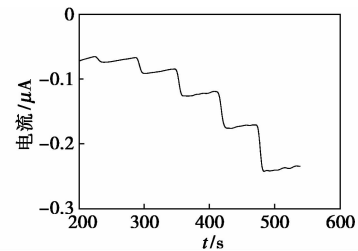


图 6 {PDDA/MWNTs}₅ED/GCE 对 PBS 扫描时分别加 2、4、6、8、10 μL 4.5 mmol/L 的 TCh

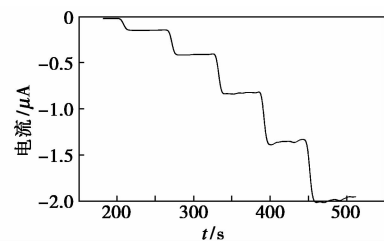


图 7 {PDDA/MWNTs}₅ED/GCE 对 PBS 扫描时分别加 20、40、60、80、100 μL 4.5 mmol/L 的 TCh

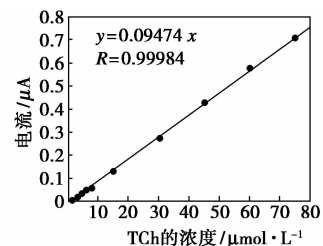


图 8 {PDDA/MWNTs}₅ED/GCE 对不同浓度的 TCh 的电流响应

2.4.2 重复性和稳定性的考察

在 0.3 V 的工作电压下,由图 9 和图 10 可得,连续 7 次加入 5 μL 4.5 mmol/L 的 TCh,得到的电流变化值基本一致 (RSD = 4.0%),表示为 $\Delta_i = 0.50 \pm 0.03$ V (RSD = 4.0%)。而通过连续加入 5、10、5 μL 4.5 mmol/L TCh 各 3 次,得到的电流变化值仍然在 (0.50 \pm 0.03) V 内,说明 {MWNTs/PDDA}₅ 修饰电极在对 TCh 的计时电流法检测中稳定性良好,不存在记忆效应。

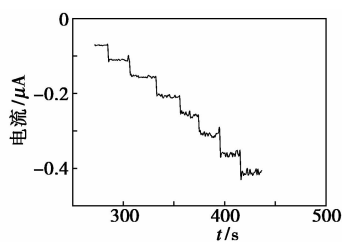


图 9 {MWNTs/PDDA}₅ 修饰电极对连续加入 5 μL 4.5 mmol/L TCh 的计时电流法响应图

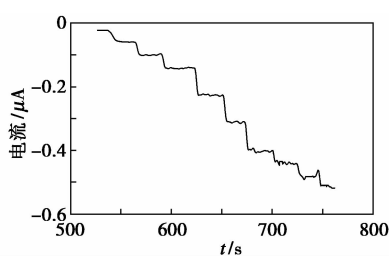


图 10 {MWNTs/PDDA}₅ 修饰电极对连续加入 5、10、5 μL 4.5 mmol/L TCh 各 3 次的计时电流法响应图

3 结论与展望

通过层层自组装技术利用 MWNTs 对玻碳电极进行厚度可控的表面修饰。对玻碳电极进行电沉积过程的预处理,吸附了足量带有负电荷的 MWNTs 后,进行静电自组装步骤。当自组装层数为 5 时,得到的修饰电极对硫代胆碱的循环伏安法检测及计时电流法检测表现出良好的灵敏度、线性响应范围、较低的检测限。由于 MWNTs 和双分子层结构的存在,使得电极抗产物污染能力加强,稳定性和重复性大幅度提升。可以预见,该修饰电极与胆碱酯酶等复合制成酶传感器后,在农药残留的快速检测中有良好的应用前景。

参考文献

[1] 王玉丽,王玉振. 蔬菜农药残留速测法:酶抑制法[J]. 山东蔬菜,2006(3):39-40.

[2] 张也,刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测[J]. 食品科学,2003,24(8):200-204.

[3] 陈霞,张雪梅,杨华梅,等. 凝胶渗透色谱-气相色谱法测定蔬菜中 24 种有机磷和氨基甲酸酯类农药残留[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(1):75-76.

[4] 龚炜,刘惠民,石杰,等. LC-MS-MS 分析烟草中氨基甲酸酯农药残留[J]. 烟草科技,2008(8):44-48.

[5] 周建科,龙望,彭静. 盐析相微萃取/液相色谱法测定水中氨基甲酸酯农药[J]. 中国给水排水,2010(8):98-100,103.

[6] 龚久平,李燕,洪云菊,等. 高效液相色谱法测定蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留方法优化[J]. 西南农业学报,2009,22(5):1332-1335.

[7] Cai Jie, Du Dan. A disposable sensor based on immobilization of acetylcholinesterase to multiwall carbon nanotube modified screen-printed electrode for determination of carbaryl[J]. Appl Electrochem, 2008, 38:1217-1222.

[8] Upadhyay S, Rao G R, Sharma M K, et al. Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold-platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates, and nerve agents[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 25:832-838.

[9] 周华,王辉宪,刘登友,等. 基于碳纳米管修饰的酶生物传感器检测有机磷农药[J]. 传感器世界,2008,14(8):23-27.

[10] 孟范平,唐学玺,李桂芳,等. 利用乙酰胆碱酯酶传感器监测海水久效磷[J]. 海洋环境科学,2003,22(4):63-67.

[11] 韩菊,魏福祥,郝莉莉,等. 乙酰胆碱酯酶催化水解产物的电化学行为[J]. 分析实验室,2005,24(6):62-64.

[12] 李泽全,张怀,张云怀,等. 基于碳纳米管的生物传感器研究进展[J]. 材料导报,2008,22(8):99-102.

[13] 高盐生,彭少华,沈春平. 基于自组装和溶胶-凝胶固定超氧化物歧化酶的直接电化学[J]. 常熟理工学院学报,2007,21(2):49-52.

[14] 毕红梅,张小庆. CNTs 型化学传感器的应用与现状化工[J]. 科技市场,2008,31(4):24-26.

[15] 许春萱,刘丽娟,谢宛珍. 碳纳米管修饰电极测定诺氟沙星的研究[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版,2009,22(1):102-105.

[16] 张伟,张灵芝,陶海升,等. 二茂铁/ β -环糊精/碳纳米管复合修饰电极制备、表征及对尿酸的催化氧化[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版,2006,29(5):458-462.

[17] Zou Yongjin, Xiang Cuili, Sun Lixian, et al. Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique[J]. Electrochimica Acta, 2008, 53:4089-4095.

[18] Hironobu Takahashi, Takuro Niidome, Takahito Kawano, et al. Surface modification of gold nanorods using layer-by-layer technique for cellular uptake[J]. Nanopart Res, 2008, 10:221-228.

[19] Banks C E, Davies T J, Wildgoose G G, et al. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes; Edge-plane sites and tube ends are the reactive sites[J]. Chem Commun, 2005, 7:829-841.

[20] Zhu Y H, Zhang Z L, Zhao W, et al. Voltammetric behavior and determination of phenylephrine at a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes[J]. Sensors and Actuators B, 2006, 119:308-314.

[21] Xu Z A, Gao N, Dong S J. Preparation and layer-by-layer self-assembly of positively charged multiwall carbon nanotubes[J]. Talanta, 2006, 68(3):753-758. ■