

基于花状 ZnO-CHIT 复合材料的 安培型过氧化氢生物传感器

张天芳¹, 李利淼², 王太宏²

(1. 湖南大学 生命科学与技术研究院, 湖南 长沙 4120082; 2. 湖南大学 微纳技术中心, 湖南 长沙 4120082)

摘要: 将水热法制备的纳米花状结构 ZnO 分散在壳聚糖中构成 ZnO-壳聚糖复合膜来固定辣根过氧化物酶(HRP)构建安培型过氧化氢生物传感器。结果表明, 在相同过氧化氢浓度下, 加入纳米颗粒的电极的电流响应值比未加颗粒的高约 40 倍。ZnO-壳聚糖修饰电极对过氧化氢具有明显的增敏效应, 线性范围为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ mol/L, 关系数为 0.9977; 检测下限为 1.0×10^{-7} mol/L(信噪比 $S/N=3$)。

关键词: 水热法; ZnO-壳聚糖复合膜; 辣根过氧化物酶; 生物传感器

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)03-0050-03

An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on flower-shape ZnO and chitosan hybrid material

ZHANG Tian-fang¹, LI Li-miao², WANG Tai-hong²

(1. Institute of Life Science and Biotechnology, Hunan University, Changsha 410082, China;

2. Micro-Nano Technology Research Center, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The nanometric flower-shape ZnO synthesized by a simple hydrothermal method is dispersed in chitosan for immobilizing HRP to construct hydrogen peroxide biosensors. The experimental results firmly show that HRP can be immobilized on the surface of electrode, and the current response can be 40 times larger than that without ZnO nanoparticles. The electrode has an obvious go-up in sensitivity to hydrogen peroxide, and the linear range is from 1.0×10^{-6} to 5.0×10^{-3} mol/L of hydrogen peroxide with a correlation coefficient of 0.9977. The detection limit of the biosensor can be 1.0×10^{-7} mol/L based on a signal-to-noise ratio of 3.

Key words: hydrothermal method; ZnO-CHIT composite film; HRP; biosensor

不少文献报道了将纳米 ZnO 修饰到电极表面, 用于化学以及生物传感器的制备, 如酶传感器^[1-2]、免疫传感器^[3]。ZnO 巨大的比表面积有利于酶的固定, 自身的亲和基团有利于蛋白质等生物分子的结合^[4], 但 ZnO 的脆性限制了应用^[5]。一些有机材料如具有很好成膜能力的壳聚糖(CHIT)与纳米 ZnO 形成有机-无机复合材料, 能结合 ZnO 对生物材料的吸附能力以及壳聚糖很好的成膜能力来提高传感器的性能。笔者通过把水热法制备的纳米花状 ZnO 均匀分散在壳聚糖中构成 ZnO-CHIT 复合膜, 将辣根过氧化物酶(HRP)稳定、高活性地固定到基体电极表面, 构成传感器的敏感识别部分, 以对苯二酚作电子媒介、在 HRP 催化下过氧化氢氧化对苯二酚成对苯醌, 而对苯醌迅速从电极得到 2 个电子被还原, 产生电流响应。利用纳米 ZnO 代替贵重金属纳米

粒子固定 HRP 制作酶电极, 不仅保持了纳米粒子对酶的强吸附和酶的活性, 而且能大大降低电极的成本。

1 实验方法

1.1 主要试剂和仪器

辣根过氧化物酶(E.C.1.11.1.7), RZ > 3.0(RZ 值是 HRP 在 403 nm 的 OD 值与 275 nm 的 OD 值之比, RZ 为 Reinheits Zahl 之缩写), 活力 > 250 U/mg; 壳聚糖, 相对分子质量约 1×10^6 , 脱乙酰度 75% ~ 85%。以上二者购自 Sigma 公司。 H_2O_2 和其他化学试剂均为分析纯。0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)由 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 按不同比例用二次蒸馏水配制。实验用水为双蒸水。

Rigaku D/max-2400 X 射线衍射仪; Jeol J840A

收稿日期: 2007-12-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2007CB310500)项目

作者简介: 张天芳(1983-), 女, 硕士生; 王太宏(1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事以单电子器件为核心的纳米器件的研究, 通讯联系人, 0731-8823407, thwang@aphy.iphy.ac.cn。

扫描电镜;电化学反应池为三电极体系,CHI660B 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司),其中固定 HRP 的玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对电极。

1.2 制备步骤

以 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 NaOH 为原料,采用水热法在 180°C 下保温 20 h,得到直径约 150 nm 的花状纳米 ZnO^[6]。

直径为 3 mm 的玻碳电极基体分别用金相砂纸和 Al_2O_3 粉抛光至镜面,用 1:1 硝酸超声洗涤 5 min,然后用二次水冲洗干净后干燥备用。

取适量花状纳米 ZnO 超声分散于 0.5% 壳聚糖中,形成 62.5 mg/mL ZnO-CHIT 稳定悬浮液。将 10 μL ZnO-CHIT 悬浮液与 10 μL HRP 混合,最后取上述溶液 6 μL 滴加于电极表面,放入 4°C 冰箱中过夜,即形成了 ZnO-CHIT/HRP 电极。电极不用时放入 4°C 冰箱中保存。

2 结果与讨论

2.1 花状纳米 ZnO 的表征及对电极响应的影响

图 1 为制备 ZnO 材料的 SEM 图,ZnO 晶体形貌呈花状,由直径约 150 nm 的纳米棒组成。图 2 显示了 ZnO-CHIT/HRP、CHIT/HRP 及空白电极在含有 1 mL 对苯二酚的 PBS(pH 7.0)中的电流响应,工作电位为 -150 mV 。结果表明,相同 H_2O_2 浓度下加入纳米颗粒的电极其电流响应值比未加纳米颗粒的高约 40 倍,空白电极几乎没有响应。电流响应值显著提高的原因有:纳米 ZnO 比表面积大、表面自由能高,因而 HRP 可以在纳米颗粒表面得到强有力的固定;ZnO 由于自身的亲和基团有利于与酶等生物分子的结合^[4];纳米颗粒的吸附场能引起酶的整齐排列,这样吸附在纳米颗粒上的 HRP 就具有定向作

用,分子在定向之后,其功能会有所改善,使酶的电流响应增加^[7];纳米 ZnO 是宽带隙半导体,可以降低电子在电极和固定化酶间的迁移阻力,提高电子迁移率^[8-9],进而提高了电流响应值。

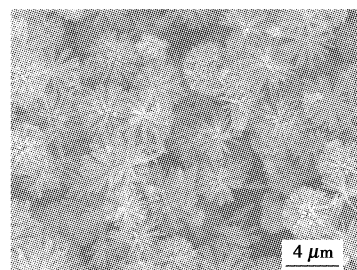
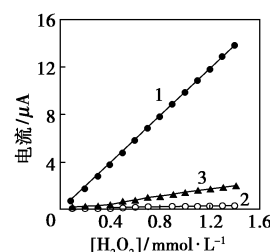


图 1 ZnO 的扫描电镜图



1—GC 电极;2—CHIT/HRP 电极;3—ZnO-CHIT/HRP 电极

图 2 纳米 ZnO 对 HRP 酶电极电流响应的影响

2.2 实验条件的优化

2.2.1 酶和对苯二酚的浓度对电流响应的影响

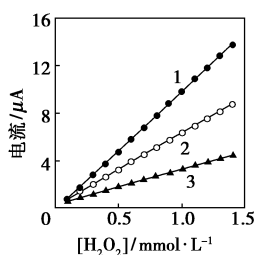
图 3(a)显示了固定不同酶浓度的 ZnO-CHIT/HRP 电极在含有 1 mL 对苯二酚的 PBS(pH 7.0)中对 H_2O_2 的电流响应图,工作电位为 -150 mV (vs. SCE)。可见固定酶的活性随固定酶量的增加而减小。当酶的量增加到 20.0 mg/mL 时,电极几乎没有响应。当酶用量过大会导致传感器阻抗的增加,且酶的一部分活性中心被多余的酶所隐藏,导致酶无法有效的催化反应^[10],使得响应电流反而减小。可以认为 HRP 质量浓度 5.0 mg/mL 为最佳。

(上接第 49 页)

- [5] Qu L H, Peng X G. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth[J]. J Am Chem Soc, 2002, 124: 2049 - 2055.
- [6] Weller H. Colloidal semiconductor Q-particles: Chemistry in the transition region between solid state and molecules[J]. Angew Chem, 1993, 32: 41 - 53.
- [7] Murray C B, Norris D B, Bawendi M G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115: 8706 - 8715.
- [8] Trindade T, O'Brien P, Pickett N L. Nanocrystalline semiconductors: Synthesis, properties, and perspectives[J]. Chem Mater, 2001, 13: 3843 - 3858.
- [9] Sutherland A J. Quantum dots as luminescent probes in biological sys-

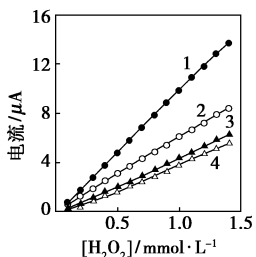
tems[J]. Curr Opin Solid State Mater Sci, 2002, 6: 365 - 370.

- [10] Zhang H, Cui Z, Wang Y, et al. From water-soluble CdTe nanocrystals to fluorescent nanocrystal-polymer transparent composites using polymerizable surfactants[J]. Adv Mater, 2003, 15: 777 - 780.
- [11] Zhang H, Wang L, Xiong H, et al. Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe nanocrystals[J]. Adv Mater, 2003, 15: 1712 - 1715.
- [12] Hao E C, Sun H P, Zhou Z, et al. Synthesis and Optical Properties of CdSe and CdSe/CdS Nanoparticles[J]. Chem Mater, 1999, 11: 3096 - 3102.
- [13] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14: 303 - 308.
- [14] Merkoci A, Aldavert M, Marin S, et al. New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling[J]. Trends Anal Chem, 2005, 24(4): 341 - 349. ■



酶质量浓度, mg/mL: 1—5.0; 2—10.0; 3—20.0

(a) 酶质量浓度的影响



对苯二酚浓度, mmol/L: 1—1.0; 2—0.70; 3—0.40; 4—0.10

(b) 对苯二酚浓度的影响

图3 酶和对苯二酚浓度对 HRP 酶电极电流响应的影响

电子媒介对苯二酚对酶电极响应的影响如图 3(b)所示, 对苯二酚在 0.1 到 1.0 mmol/L 的范围内, 酶电极对 H_2O_2 测定的响应电流随着对苯二酚浓度的增大而增大, 当对苯二酚浓度达到 1.0 mmol/L 时, 酶电极的响应电流达到最大。如果电子媒介浓度过低, 电流响应会受酶-电子媒介动力学的限制。因此选用 1.0 mmol/L 的对苯二酚, 以获得最高的灵敏度。

2.2.2 工作电位对 HRP 酶电极电流响应的影响

介体传感器的工作电位一般选择在介体的峰电位附近, 同时考虑排除干扰信号及提高灵敏度。分别考察在不同工作电位下传感器的响应电流和背景电流的影响(表 1)。随着工作电位的负移, 响应与背景电流均增大, 在 -150 mV 时, 响应与背景电流比值达到最大。当工作电位低于 -150 mV 时, 响应电流增大, 但同时背景电流也增大, 且过低的工作电位易使电活性组分在电极上还原, 所以工作电位选定为 -150 mV。

表1 工作电位对 HRP 酶电极电流响应的影响

电势/mV	-50	-100	-150	-200	-250	-300
响应电流/ μA	0.985	3.206	5.454	7.041	7.407	7.564
背景电流/ μA	0.120	0.350	0.720	1.956	2.295	2.510

注: H_2O_2 浓度 0.50 mmol/L。

2.3 ZnO-CHIT/HRP 电极的电化学行为

图 4 为 HRP 电极在含有 1.0 mmol/L 的对苯二

酚的 PBS (pH 7.0) 中, 加入或不加入 H_2O_2 的伏安图。未加 H_2O_2 时呈现一对准可逆的氧化还原峰, 代表对苯二酚在电极上的氧化还原过程。但当加入 5.0 mmol/L H_2O_2 后, 对苯二酚在电极上阴极峰电流显著增加, 阳极峰电流则相应显著减少, 这些现象充分说明通过电极表面 ZnO-CHIT 复合膜固定的 HRP 对 H_2O_2 的还原具有显著的电催化活性, 对苯二酚可以有效地在电极和固定在膜内的 HRP 氧化还原中心之间传递电子。

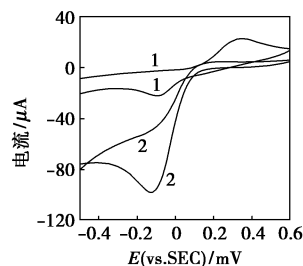
1—无 H_2O_2 ; 2—加入 5.0 mmol/L H_2O_2

图4 ZnO-CHIT/HRP 电极的伏安图

图 4 为在 -150 mV 工作电位下传感器对连续加入 0.1 mmol/L H_2O_2 的计时电流图。随着等量的 H_2O_2 的加入, 传感器在 5 s 内即可获得 95% 的稳态电流。检测线性范围为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ mol/L, 相关系数为 0.9977; 检测下限为 1.0×10^{-7} mol/L (信噪比为 3)。同时根据 Lineweaver-Burk 方程^[11], 利用双倒数法求得米氏常数为 1.9 mmol/L, 说明在该浓度范围内, 传感器的反应属于一级反应动力学过程。

2.4 电极连续测量稳定性

在酶的固定过程中, 联合利用纳米 ZnO 和 CHIT, 既综合了 2 种材料的优点, 又相互抵消了各自的不足之处, 使得酶很好地固定在电极表面。在确定的条件下, 使用同一电极对浓度为 0.1 mmol/L H_2O_2 溶液进行连续 40 次测量的电流响应, 最后的结果为初始电流响应的 80%, 说明电极有良好的测量稳定性。

3 结语

利用 ZnO-CHIT 包埋 HRP 制作了以对苯二酚为电子媒介的 H_2O_2 的生物传感器, 在较低电位下对 H_2O_2 具有良好的电催化性能, 线性范围为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ mol/L, 相关系数为 0.9977, 检测下限为 1.0×10^{-7} mol/L (信噪比 3)。固定酶时引入

(下转第 54 页)

体充分析出后过滤,得类白色固体粗产品,用95%乙醇重结晶,得到产物3。

1.3 产物的结构表征

油状的环氧化中间体经丙酮重结晶用于结构测定。气相色谱测定表明重结晶后的化合物3纯度达98.6%。它们的结构经质谱(MS)、红外光谱(IR)、核磁共振谱(^1H -NMR和 ^{13}C -NMR)检测。

环氧化中间体(4 ξ ,5 ξ -环氧-17 β -羟基-雄甾-3-酮,2)是4 α ,5 α -和4 β ,5 β -环氧化中间体混合物,白色晶体,熔点135~148℃。MS, $m/z/\%$:304 [M^+]。

化合物3(4-氯-17 β -羟基-雄甾-4-烯-3-酮),白色晶体,熔点187~189℃^[6]。MS, $m/z/\%$:322 [M^+]。IR, ν/cm^{-1} :3449(—OH),1666(C=O),1586(C=C)。 ^{13}C -NMR, δ :189.8(C3),126.3(C4),162.6(C5),81.3(C17),34.8,29.5,23.8,30.1,35.7,50.3,34.2,22.7,32.9,45.9,52.4,23.0,30.5,16.4,21.4。 ^1H -NMR, δ :3.68(O—H,1H),3.18/3.20/3.24(C₁₇—H,1H)。

2 结果与讨论

2.1 H₂O₂的用量对环氧化反应的影响

环氧化反应是合成4-氯-睾酮(3)的关键环节,笔者考察了H₂O₂的用量对环氧化反应的影响。体系为睾酮60 g(0.21 mol)、甲醇1500 mL、0.26 mol

NaOH的饱和水溶液,控制反应温度在-2~2℃,反应18 h,结果显示:随着H₂O₂用量的增加,2的收率升高;当 $n(\text{H}_2\text{O}_2):n(\text{睾酮})=5:1$ 时,2的收率达到了84.8%;当H₂O₂和睾酮的摩尔比大于5:1时,随着H₂O₂用量的增加收率逐渐下降。这可能是因为大量的溶剂降低了氢氧负离子的浓度,从而影响了反应速率,为了提高反应速率,H₂O₂必须过量。而当H₂O₂和睾酮的摩尔比大于5:1时,TLC跟踪显示反应中有副产物点出现,过分过量的氧化剂也不利于提高收率。所以H₂O₂和睾酮的较佳摩尔比为5:1。

2.2 NaOH的用量对环氧化反应的影响

当H₂O₂和睾酮的摩尔比为5:1时,其他反应条件与2.1相同,考察了NaOH用量对环氧化反应的影响。当 $n(\text{NaOH}):n(\text{睾酮})=1.24:1$ 时,2的收率达到最大值,其值为85.1%。当NaOH和睾酮的摩尔比小于1.24:1时,2的收率随着NaOH用量的增加而明显升高,可能是因为过氧化氢负离子的量随着NaOH增加而增加,负离子浓度的增加有利于反应向右进行;当NaOH和睾酮的摩尔比大于1.24:1时,过量的NaOH降低了2的收率。所以NaOH和睾酮的较佳摩尔比为1.24:1。

2.3 反应温度对环氧化反应的影响

环氧化反应一般在较低温度下进行,当NaOH和睾酮的摩尔比为1.24:1时(其他条件与2.2相同),

(上接第52页)

ZnO纳米颗粒能够增加酶的有效固定量,提高电极的响应电流值,与一般的CHIT包埋HRP传感器相比具有明显的增敏效应。用这种方法制作的传感器具有良好的稳定性及重现性。

参考文献

- [1] Liu Bao-Hong, Cao Yong, Chen Dan-Dan, *et al.* Amperometric biosensor based on a nanoporous ZrO₂ matrix[J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 478: 59–66.
- [2] Chen X G, Cheng J, Dong S J. Amperometric tyrosinase biosensor based on a sol-gel-derived titanium oxide-copolymer composite matrix for detection of phenolic compounds[J]. *Analyst*, 2001, 126: 1728–1732.
- [3] Huang He, Hu Nai-Fei, Zeng Yong-Huai, *et al.* Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films[J]. *Anal Biochem*, 2002, 308: 141–151.
- [4] Topoglidis E, Cass A E G, O'Regan B. Immobilisation and bioelectrochemistry of proteins on nanoporous TiO₂ and ZnO films[J]. *J Electroanal Chem*, 2001, 517: 20–27.
- [5] Gill I, Ballesteros A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(34): 8587–8598.
- [6] Feng Ping, Wan Qing, Wang Tai-Hong. Contact-controlled sensing properties of flowerlike ZnO nanostructures[J]. *Appl Phys Lett*, 2005, 87: 213111.
- [7] Cohen I A. The dimeric nature of heme hydroxides[J]. *J Am Chem Soc*, 1969, 91(8): 1980–1983.
- [8] Gorton L, Lindgren A, Larsson T. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors[J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 400: 91–108.
- [9] Jia J, Wong B, Wu A, *et al.* A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network[J]. *Anal Chem*, 2002, 74: 2217–2223.
- [10] Jiang De-Sheng, Long Sheng-Ya, Huang Jun. Immobilization of pycnopus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres[J]. *Biochem Eng J*, 2005, 25: 15–23.
- [11] Dunbar R A, Jordan J D, Bright F V. Development of chemical sensing platforms based on sol-gel-derived thin films: Origin of film age vs performance trade-offs[J]. *Anal Chem*, 1996, 68: 604–610. ■