

H₂O₂ Micro Electrode Biosensor Based on Coimmobilized Nano Pt/ Poly Pyrrole/ HRP for Rapid Determination of H₂O₂ in Human Serum *

GA N Ning^{1,2*}, WANG Feng¹, LI Tian-hua¹, YANG Xin¹, JIANG Qian-li²

1. The State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Ningbo University, Ningbo Zhejiang 315211, China;

2. The School of Basic Medical Sciences of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: One biosensor for H₂O₂ (Pt/HRP-PPy-nano Pt CME) was prepared by polypyrrole (PPy) and horse-radish peroxidase (HRP) coimmobilized on a Pt microelectrode (10 μm) during the polymer growth stage and then electrodeposited by nano Pt. Its electrochemical behavior was studied. In the deoxygenated phosphate buffer (PBS), the electrode showed an accelerated H₂O₂ reduction which is catalyzed by nano Pt particles. The performance of Pt/HRP-PPy-nano Pt CME biosensors were examined by amperometric measurement which gives a linear relationship between response current and H₂O₂ concentration in the range of 0.001 ~ 0.3 mmol/L ($R=0.9972$), with the detection limit of 0.3 μmol/L. Meanwhile, the electrode showed good sensitivity (0.42 mA · cm⁻² · mmol⁻¹ · L in amperometric measurements), rapid response time (7.3 s), and reproducibility for long-term use (the current maintained 95% for at least more than 70 days to 10 μmol/L H₂O₂) in 0.02 mol/L pH = 7.0 PBS. The electrode showed Michaelis-Menten behavior at larger H₂O₂ concentrations. The K_M^{app} values for the sensors was found to be 0.033 mmol/L. The low K_M^{app} values demonstrated that nano Pt and HRP on microplatinum electrode exhibited a high affinity to H₂O₂. The biosensor shows a good consistency to determine H₂O₂ in real human serum samples with standard method, which indicates it can be used in reality.

Key words: poly pyrrole; nano Pt; HRP enzyme; biosensor; microelectrode

EEACC:7230E

纳米 Pt/ 聚吡咯/ HRP 酶共固定微电极传感器及对血清中 H₂O₂ 的快速测定 *

干 宁^{1,2*}, 王 峰¹, 李天华¹, 杨 欣¹, 江千里²

1. 宁波大学材化学院, 新型功能材料及其制备科学国家重点实验室培育基地, 浙江 宁波 315211;

2. 南方医科大学基础医学院, 广州 510515

摘 要: 将聚吡咯 (PPy) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 以电聚合的方式沉积在微 Pt 电极 ($= 10 \mu\text{m}$) 上, 再以电化学沉积法将纳米 Pt 颗粒沉积在电极表面, 由此制备出纳米 Pt/HRP-PPy 共固定微电极传感器 (Pt/HRP-PPy-nano Pt CME), 研究了其电化学行为。在除 O₂ 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 该电极加速了 H₂O₂ 还原反应, 而沉积在 PPy 上的纳米 Pt 显著催化了该反应。以计时电流法定量分析 H₂O₂, 在 30 的 0.02 mol/L pH = 7.0 PBS 中检测 H₂O₂, 在 0.001 ~ 0.3 mmol/L 浓度范围呈现线性响应, 相关系数为 0.9972, 检测下限达 0.3 μmol · L⁻¹ ($S/N=3$)。该传感器对 H₂O₂ 电流响应灵敏度高 (0.42 mA · cm⁻² · mmol⁻¹ · L⁻¹), 迅速 (7.3 s), 稳定性好。此传感器表现出 Michaelis-Menten 行为, K_M^{app} 为 0.033 mmol · L⁻¹。较小的 K_M^{app} 值表明固定在微 Pt 电极表面的纳米 Pt/HRP 对 H₂O₂ 具有较高亲和性。检测了实际人血清样品中 H₂O₂, 结果和对照方法一致, 本电极可用作痕量 H₂O₂ 生医传感器。

关键词: 聚吡咯; 纳米 Pt; HRP 酶; 生物传感器; 微电极

中图分类号: TP212.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2008)09-1493-05

基金项目: 浙江省自然科学基金资助 (Y106725); 浙江省科技攻关项目资助 (2006C31040); 浙江省教育厅基金资助 (20061697); 宁波市自然科学基金资助 (2008A610048, 2008A610072); 宁波大学王宽城幸福基金资助项目

收稿日期: 2008-02-17 修改日期: 2008-04-28

导电聚合物薄膜修饰电极因其具有大量的活性位点近年来被广泛用于电化学生物传感器制备^[1-3]。其中聚吡咯(PPy)易于通过电聚合方法而在电极表面成膜,且膜厚度可控,因而研究较多^[3]。微电极具有电流密度高、响应快、欧姆降低等特点,常被用于痕量物质的现场分析^[4]。 H_2O_2 的测定在临床中具有重要意义,而辣根过氧化物酶(HRP)酶传感器是测定 H_2O_2 较为灵敏的方法。其中酶的固定是制作难点,方法包括:物理包埋法,化学交联法及导电聚合物掺杂法等^[5]。聚合物模板法易于控制酶层厚度和分布、便于酶电极的微型化^[4],已有报道将HRP掺杂到PPy^[2,3,5]中制成 H_2O_2 传感器,灵敏度高且酶活性保持长久。然而,这些研究均是在Pt或玻碳等常规大电极上(直径为mm级)进行,微电极上研究较少。近年来纳米催化电极的应用研究十分活跃^[6]。Pt具有优越的催化特性,通过电沉积方法得到的纳米Pt颗粒可显著降低 H_2O_2 的过电位,增强其与电极之间的电子交换速率^[7-8]。因此为了实现酶传感器的微型化,并通过纳米修饰提高其灵敏度,最终达到在体分析目的,有必要研究基于微电极的纳米修饰酶电极。本研究以PPy为基体将HRP共聚在微Pt电极上,并以电沉积法将Pt颗粒沉积在电极表面,由此制备了纳米Pt/PPy/HRP酶共固定微电极(Pt/HRP-PPy-nano Pt CME),并用于人血中 H_2O_2 检测研究,取得良好效果。

1 仪器与试剂、实验方法

1.1 实验仪器

CHI 660B 电化学工作站(CH公司,美国)。三电极系统:Pt/HRP-PPy-nano Pt CME微电极(采用 $\phi = 10 \mu\text{m}$ 自制微盘Pt电极作为基底电极)为工作电极;柱状Pt丝和饱和Ag/AgCl电极分别作为对电极和参比电极(上海华辰仪器公司)。MicroProf AFM原子力显微镜(FRT公司,德国);Hitachi X-650型扫描电子显微镜(Hitachi公司,日本);FTS-20型FI/IR光谱仪和3200数据系统(Bio-Rad公司,美国)。

1.2 试剂

H_2O_2 、乙腈(CH_3CN) (无锡佳美试剂公司);辣根过氧化物酶(HRP)(ECL 11.1.7, type VI, 250 U/mg)、 $NaClO_4$ (Sigma公司,美国)。光谱纯吡咯(C_5H_5N , Py) (使用前经蒸馏)、 K_2PtCl_6 、 Bu_4NClO_4 (Fluka公司,德国)。所有溶液配制均使用二次蒸馏水。其它所有药品均为A.R,未进一步纯化。

1.3 修饰电极的制备与表征

Pt/HRP-PPy电极:将表面处理后的微Pt电极(方法同文献[12])在0.3 mol/L Py + 3 mg/ml HRP的0.1 mol/L Bu_4NClO_4 乙腈溶液中,控制聚合电压为0.85 V,恒电位电解1 min。Pt/HRP-PPy-nano Pt电极:将Pt/HRP-PPy电极在1.0 mmol/L K_2PtCl_6 -0.02 mol/L PBS (pH 7.0)水溶液中,在-0.4 ~ +0.3 V电位区间内,以50 mV/s循环扫描20圈。各步骤电极制造完成后,存放在pH 7.0的PBS中,于4℃保存。

对修饰微电极作了表征,方法如下:将 $\phi = 10 \mu\text{m}$ 自制微Pt片采用上述修饰方法,依次固定HRP、PPy、nano Pt于其表面,二次蒸馏水洗涤,在干燥器中干燥16 h,取出分别作其SEM、AFM图。从SEM(图1A)图可以看出PPy在电极表面形成具有三维多孔结构的高分子膜。当HRP酶被包埋以后,HRP的聚集体均匀地分布在PPy膜中,形成岛状结构。当纳米Pt在电极表面沉积后出现白色“亮点”,在电极表面均匀分散。根据AFM(图1B)可以计算出粒径约为80~160 nm,电极表面示意图如图2所示。

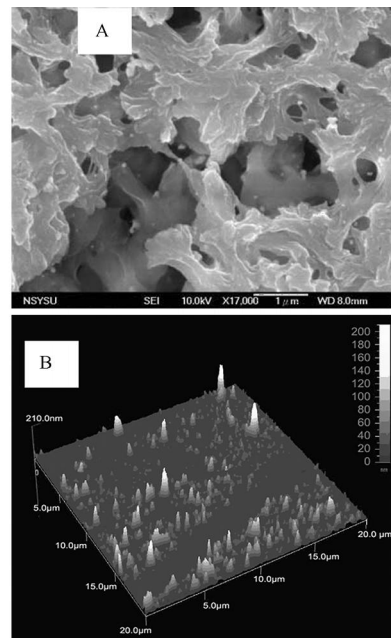


图1 Pt/HRP-PPy-nano Pt修饰电极的(A)SEM和(B)AFM图

2 结果与讨论

2.1 HRP的电化学固定及氧化还原性质

PPy带正电荷,而HRP进入PPy中是以阴离子形式参与的嵌入过程^[3],HRP的等电点为5.5^[9],pH > 5.5时HRP将带负电荷,因此实验选择pH

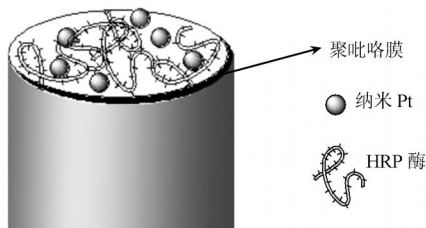


图 2 Pt/ HRP-PPy-nano Pt 修饰电极的电极表面结构图
7.0 磷酸缓冲体系。PPy 的成膜厚度和均匀性受 Py 单体浓度影响^[2]。由于微电极表面积较小,Py 浓度过高膜厚度不均,过低沉积速度慢^[2]。我们采用 SEM 观察 [Py] = 0.3 mol/L 时,电极表面的成膜平整光滑,故选用该浓度作为最佳 Py 单体浓度。

PPy 膜中判断 HRP 存在可用红外光谱来检测。HRP 红外谱图中存在酰胺 I 的 $\nu_{C=O}$ 吸收 1657 cm^{-1} 和酰胺 III 的 ν_{C-N} 吸收 1151 cm^{-1} ,而 PPy 中则没有^[3]。从图 3(I) b 可以看出,当 HRP 修饰在 PPy 膜后,出现了上述酰胺 I 和 III 的特征吸收峰,说明 HRP 已进入了 PPy 膜中。Pt/ PPy 电极在 0.1 mol/L Bu₄NClO₄ 乙腈溶液中的循环伏安曲线 (CV) (图 3(II) a) 与在 PPy 常规电极的 CV 图相似^[3],表明 Py 很容易在微 Pt 电极上发生电化学聚合。图 3(II) b 表明 HRP 进入 PPy 膜后,没有出现新的氧化还原峰,只是使 PPy 的氧化还原峰均向负电位移动,推测是由于带负电荷的 HRP 进入 PPy 膜中后,改变了膜中离子的嵌-脱过程,使 PPy 更易被氧化、更难被还原,因而 PPy 还原峰电流增加而氧化峰电流变化不大。Pt/ HRP-PPy-nano Pt 电极的 CV 曲线如图 3(II) c 所示,氧化还原峰均有所提高,说明纳米 Pt 可以显著提高 HRP-PPy 复合体的电子转移速率^[3]。

2.2 Pt/ HRP-PPy 修饰电极上电沉积纳米 Pt 的条件

探讨了沉积电位、扫描圈数、扫描速度、Pt 电解液浓度等对纳米 Pt 沉积影响。设置不同最低电位 (-0.1 ~ -0.6 V),控制最高电位均为 0.3 V,在 100 mV/s 下扫描 20 圈。当电位在 -0.4 V 下开始扫描,电镜图显示沉积的 Pt 颗粒较其它电位下小且多、且分散均匀,所以取最低扫描电位为 -0.4 V。比较了扫描 5 ~ 30 圈的 Pt 微粒沉积电镜图,扫描圈数越少沉积 Pt 粒径也越小。扫描 20 圈时,Pt 颗粒多且分布均匀,粒径约在 80 ~ 250 nm,扫描圈数再多时,Pt 微粒分散不均匀,且大小不一,故选扫描 20 圈。控制扫速分别为 15 ~ 150 mV/s,结果发现当扫速为 100 mV/s 时,粒径约在 150 ~ 340 nm,分散均匀,故选为最佳沉积扫速为 100 mV/s。试验了在不同 K₂PtCl₆/ PBS 中的电极表面 Pt 微粒沉积情

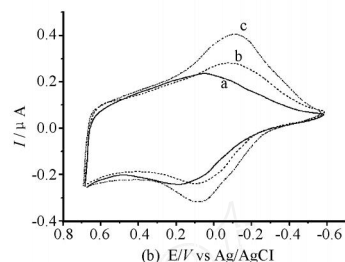
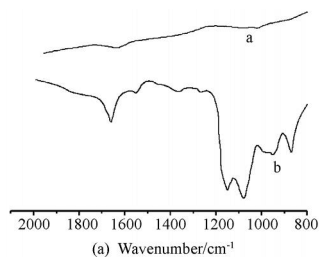


图 3 (I) Pt/ PPy (a), Pt/ HRP-PPy (b) 的红外光谱图; (II) Pt/ PPy (→) (a), Pt/ HRP-PPy (---) (b) 和 Pt/ HRP-PPy-nano Pt (c) 微电极在 0.1 mol/L Bu₄NClO₄ 乙腈中的循环伏安图。扫速:100 mV/s。

况。结果发现镀液浓度越小,所沉积 Pt 微粒粒径也越小。在 $1.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K₂PtCl₆/ PBS 中,粒径约在 75 ~ 180 nm 之间,所沉积的 Pt 微粒分散且大小均匀,为最佳电解液浓度。综上所述,Pt 微粒最佳电化学沉积条件如下:在 $1.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂PtCl₆/ PBS 中,扫描范围从 -0.4 V ~ 0.3 V,扫速为 100 mV/s,扫描 20 圈。

2.3 Pt/ HRP-PPy 和 Pt/ HRP-PPy-nano Pt 修饰电极对 H₂O₂ 的电化学还原催化

分别将微 Pt、Pt/ HRP-PPy 和 Pt/ HRP-PPy-nano Pt 修饰电极插入 pH = 7.0 的除 O₂ 的 PBS 中 (图 4-1, 3, 5),再加入 $20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 后 (图 4-2, 4, 6) 测定各自电极的 CV 曲线。随着电位负移, H₂O₂ 还原电流逐渐增大,还原过程不可逆。在 -0.7 V 处,比较了 H₂O₂ 在各电极上的还原电流,其中 Pt/ HRP-PPy-nano Pt 修饰电极分别是 Pt/ HRP-PPy 和 Pt 电极的 1.1 和 1.5 倍。这说明, PPy 导电膜加速了 HRP 对 H₂O₂ 还原,而纳米 Pt 进一步加快了 HRP 的电子传递速度,催化了该反应。电极催化还原峰电流 (增量 I_p) 随 H₂O₂ 提高而线性增加,可作为定量依据。将 Pt/ HRP-PPy-nano Pt 修饰电极放入 pH 4.0 ~ 8.0 的 PBS 中进行循环扫描,修饰电极的氧化还原峰电势随 pH 的增加线性负移, $\partial E_a / \partial \text{pH} = -34\text{ mV/pH}$; $\partial E_c / \partial \text{pH} = -35\text{ mV/pH}$ 。由于 HRP 在电极反应中的电子得失数为 2^[12],故参与反应的 H⁺ 数是 1,推测是由于 Py 含有 1 个可得失 H⁺ 的杂环氮原子。推测该电极的催化原理如图 5 所示。

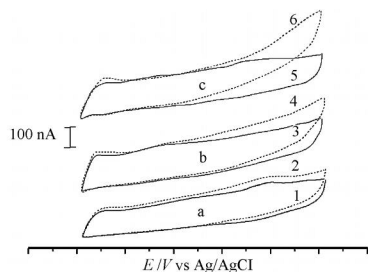


图4 Pt (a)、Pt/HRP-PPy (b)和(c) Pt/HRP-PPy-nano Pt在 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS ($\text{pH} = 7.0$)中的循环伏安图。(曲线1,3,5)中不含有 H_2O_2 , (曲线2,4,6)中含有 0.1 mmol/L H_2O_2 , 扫速: 50 mV/s 。

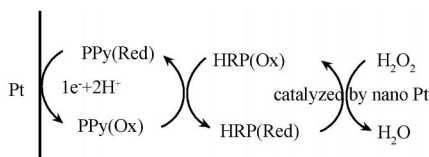


图5 Pt/HRP-PPy-nano Pt修饰电极催化 H_2O_2 还原过程

2.4 Pt/HRP-PPy-nano Pt修饰电极对 H_2O_2 的催化条件优化

2.4.1 PPy膜厚度对电极催化过氧化氢氧化化的影响

Pt/HRP-PPy-nano Pt电极对 H_2O_2 的响应受PPy膜厚度的影响。PPy膜的厚度有一个最佳值,这是因为PPy膜太厚, H_2O_2 在PPy中的扩散阻力增大,使电极对 H_2O_2 的响应电流减小;PPy膜太薄,被固定的HRP量少,响应电流也较小。实验中以 200 mC/cm^2 的电量制备的Pt/HRP-PPy电极响应最好,根据文献[11]报道,PPy膜每增加 $1 \mu\text{m}$,所耗电量约为 400 mC/cm^2 ,故推测此时的膜厚度在 $0.5 \mu\text{m}$ 。

2.4.2 电解电位对Pt/HRP-PPy-nano Pt传感器响应电流影响

考察了电位对 H_2O_2 安培测定的影响。当电位在 -40 mV 附近时,就可以观察到 H_2O_2 在电极表面的还原。随着电位从 -400 负移到 -900 mV ,稳态电流大幅度增大,这是因为,电位越负,对 H_2O_2 还原的驱动力就越大。当电位达到 -700 mV 时,安培响应达到一个平台,因此本文选择此电位作为所制备 H_2O_2 传感器的工作电位。

2.5 Pt/HRP-PPy-nano Pt修饰电极对 H_2O_2 的安培测定

在优化条件下,于 5 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 7.0$ PBS中,控制电位在 -0.7 V ,记录Pt/HRP-PPy-nano Pt电极对 H_2O_2 的电流-时间曲线(图6),每隔 50 s 注入 0.05 mmol/L (最终浓度)的 H_2O_2 共七次,经过 7.3 s 就能出现稳定的电流台阶峰,说明电极均具对 H_2O_2 有较快的响应速度。研究表明催化电流与 H_2O_2 浓度在 $0.001 \sim 0.3$

mmol/L 的范围内成线性关系,相关系数 $R = 0.9972$,检测下限为 $0.3 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。当 H_2O_2 浓度高于 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,出现一个电流平台,说明电极反应具有非常明显的Michaelis-Menten酶催化反应动力学特征。表观米氏常数(K_M^{app})的值为 $0.033 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,低于Karyakin等人[13]用溶胶-凝胶方法固定的HRP酶传感器的 $K_M^{\text{app}} = 0.1 \sim 0.5$,说明此电极对 H_2O_2 具有较高的生物亲和性。

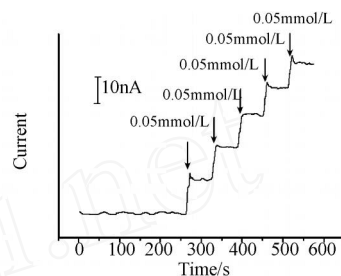


图6 Pt/HRP-PPy-nano Pt修饰电极检测 H_2O_2 的电流应答图,电压 -0.7 V (vs. Ag/AgCl)

2.6 Pt/HRP-PPy-nano Pt电极的灵敏度、重现性和稳定性

实验表明,Pt/HRP-PPy-nano Pt电极对 H_2O_2 的催化电流强度可达 $0.42 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$,明显大于大面积Pt电极(直径为 mm 级)[13]的 $0.272 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。对 $23 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 连续测定10次,变异系数分别为 3.3% 。不使用时在 4°C 恒温保存,保存 70 d 后对 $10 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 的响应为初始响应的 95% 。

2.7 实际样品测定

应用该法测定了2个人血清样本(取自本实验室工作人员)中 H_2O_2 含量。测试前除用 0.1 mol/L $\text{pH} 7.0$ PBS稀释 $1 \sim 20$ 倍外,未经其它处理。采用本法测得 H_2O_2 的浓度平均值(3次)分别为 3.5 和 $2.9 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;利用标准的UV-Vis分光光度法[11]测定结果分别为 3.8 和 $2.5 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,两种方法获得结果具有很好的吻合性。探讨了血液中干扰物的影响,以 $3 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 做为比对标准, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、 $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸(均为正常人体血液中浓度)对于 H_2O_2 的信号几乎不造成任何影响,证明本免疫分析系统应用到真实样品检测的可行性。用同一电极可连续测定40个样品,继续测定会导致少量血清蛋白吸附在电极表面,部分掩盖了HRP修饰层的活性中心而造成电流减小。但可以通过在PBS空白中浸泡 24 h 方法使电极表面再生。

3 结论

本研究成功制备了以 PPy 为基体,共固定 HRP 酶和纳米 Pt 微粒的微电极生物传感器。它对 H_2O_2 有较快的响应速度、较好的重现性和稳定性,且制备简单,非常适合于生物体内痕量 H_2O_2 现场分析。同时该电极制备方法可以运用到其它酶生物传感器制备上。

参考文献:

- [1] Zhang X T, Zhang J, Liu Z F, et al. Inorganic/Organic Mesoporous Structure Directed Synthesis of Wire/Ribbon-Like Polypyrrole Nanostructures [J]. Chemical Communications, 2004, 16: 1852-1853.
- [2] 张国权, 杨凤林. 葱醌/聚吡咯复合膜修饰电极的电化学行为和电催化活性[J]. 催化学报, 2007, 28(6): 504-508.
- [3] 杨防祖, 许书楷, 吴辉煌, 周绍民. 辣根过氧化物酶的电化学固定化及其对 H_2O_2 的生物电催化还原作用[J]. 高等学校化学学报, 1994, 15(7): 1042-1046.
- [4] Borkholder D A. Cell Based Biosensors Using Microelectrodes. Electrical Engineering[M]. USA: Stanford University. Ph.D Thesis, 1998, 75-100.
- [5] 王丽江, 陈松月, 刘清君, 王平. 纳米技术在生物传感器及检测中的应用[J]. 传感技术学报, 2006, 19(3): 581-587.
- [6] Bard A J, Faulker L R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications[M]. 2nd Edn, John Wiley & Sons: New York, 2001.
- [7] Choo H P, Liew K Y, Liu H F, et al. Hydrogenation of palm olein catalyzed by polymer stabilized Pt colloids[J]. Mol Catal A: Chem, 2001, 165: 127-134.
- [8] 陈绪青, 李建平. 辣根过氧化物酶在纳米银修饰玻碳电极上的直接电化学研究[J]. 传感技术学报, 2007, 20(11): 2373-2376.
- [9] Kim J H, Kim B G, Yoon J B, et al. A New monolithic Microbiosensor for Whole Blood Analysis[J]. Sens. Actuators A, 2001, 95: 108.
- [10] Karyakin A A, Puganova E A, Budashov I A, et al. Prussian Blue Based Nanoelectrode arrays for H_2O_2 Detection[J]. Anal. Chem. 2004, 76(2): 474-478.



干宁(1974-),男,副教授,博士后;研究方向为电化学, ganning@nbu.edu.cn