

# 基于功能化核酸和金属离子的荧光传感

王永祥<sup>1,2</sup>, 李继山<sup>2</sup>, 杨荣华<sup>2\*</sup>

(1. 商丘师范学院化学系, 河南商丘 476000)

(2. 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 湖南大学化学化工学院, 湖南长沙 410082)

**摘要:** 荧光传感器能够将微观的分子识别事件转换成宏观可测的荧光信号, 荧光法在灵敏度、选择性和实时原位检测等方面优势突出。该文主要介绍以功能化核酸和金属离子相互作用为基础而设计的荧光传感器的研究进展。

**关键词:** 功能化核酸; 金属离子; 荧光传感器

## Fluorescent probe based on the interaction between functional nucleic acids and metal ions

Wang Yong-xiang<sup>1,2</sup>, Li Ji-shan<sup>2</sup>, Yang Rong-hua<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry Shangqiu Normal, University Shangqiu 476000, China)

(2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** Fluorescent sensor can report the molecular recognition by fluorescence signal with distinct advantages in terms of sensitivity, selectivity, real time and in situ observation. This review gives a birdview of fluorescent sensors based on the interaction between functional nucleic acids and metal ions.

**Key words:** functional nucleic acids; metal ions; fluorescent sensor

### 0 引言

传感器是一种能选择性获取并处理信息的装置<sup>[1-6]</sup>。荧光传感器(fluorescent sensor)由于灵敏度高、选择性好、使用方便、并可以实时原位检测且费用低廉而被广泛应用于阳离子、阴离子和中性分子等目标物的识别检测。随着现代社会和科学技术的进步,为了满足化学和生物物质高灵敏、高选择性地检测的需要,对荧光传感器的性能提出了更高的要求。

近年来,金属离子和功能化核酸之间的相互作用引起了化学生物学研究领域的极大兴趣<sup>[7-11]</sup>。传感器领域的工作者将功能化核酸与金属离子间的特异性识别作用引入到新型传感器

的设计。但由于核酸本身的光、电、磁等信号较弱,无法报告分子识别事件的发生,还要通过合理的信号转导策略、依靠不同的信号检测方法来设计整体性能优良的新型传感器。该文综述了基于功能化核酸和金属离子相互作用而设计的荧光传感器的研究进展。

### 1 金属离子核酸适体

核酸适体(apptamer)是指能与有机化合物或蛋白质等配体专一、高效结合的RNA或DNA片段<sup>[12]</sup>。Pace等于1997年报道了Ca<sup>2+</sup>核酸适体<sup>[13]</sup>。Ellington等于1997年报道了Zn<sup>2+</sup>核酸适体<sup>[14]</sup>。但利用金属离子核酸适体设计新型金属离子荧光传感器的报道较少。

\* 通讯联系人

## 2 基于金属离子稳定 G-四链体设计的荧光传感器

具有特殊序列的单链 DNA (single stranded DNA, ssDNA) 可以在金属离子诱导下折叠成 G-四链体(G-tetraplex)结构<sup>[15-17]</sup>。基于金属离子可以稳定 G-四链体结构的特性, 传感器领域的工作者设计了众多性能优良的新型荧光传感器。Takenaka 等<sup>[18]</sup>在一条富 G 的 K<sup>+</sup>传感寡聚核苷酸(Potassium Sensing Oligonucleotide, PSO)ssDNA 两端分别修饰上四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine, TAMRA)作为能量受体(Acceptor)和荧光素(fluorescein, FAM)作为能量供体(Donor)。没有 K<sup>+</sup>存在时, 受体和供体距离较远, 无法发生荧光共振能量转移, 此时激发荧光素时, 四甲基罗丹明不发射荧光; 而当 K<sup>+</sup>存在时, 由于 K<sup>+</sup>诱导富 G 寡聚核苷酸形成 G-四链体结构, 使受体和供体充分靠近, 此时由于荧光共振能量转移, 激发荧光素时, 四甲基罗丹明发射荧光。随 K<sup>+</sup>浓度的增加, 荧光素的荧光降低而四甲基罗丹明荧光增强。基于这个原理, 该研究小组<sup>[19]</sup>又在该 K<sup>+</sup>传感寡聚核苷酸两端分别修饰上荧光分子芘(Pyrene), 利用芘的单体(monomer)和激基复合物(excimer)荧光性质的差异检测 K<sup>+</sup>。另外, 该研究小组<sup>[20]</sup>还考察了 K<sup>+</sup>传感寡聚核苷酸链标记甲基罗丹明端不同碱基个数(0, 3, 5, 7)对荧光共振能量转移效率的影响。O'Sullivan 等<sup>[21]</sup>利用类似原理检测了水中的 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup> 浓度并计算水的硬度。Chang 等<sup>[22]</sup>利用三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP) 核酸适体和 ssDNA 结合染料(Oli Green, OG)发展了免标记检测 K<sup>+</sup>的方法。OG 在溶液中荧光较弱, 与 ssDNA 结合后荧光强度增加很多。溶液中没有 K<sup>+</sup>时, OG 与 ATP 核酸适体结合发射强荧光, 当 K<sup>+</sup>存在时, 由于 K<sup>+</sup>诱导 ATP 核酸适体折叠成 G-四链体结构, OG 不再和 G-四链体结合, 荧光猝灭。同理, Kong 等<sup>[23-24]</sup>利用结晶紫(crystal violet, CV)与不同结构的 G-四链体和 ssDNA 作用时荧光强度的不同, 而 K<sup>+</sup>存在与否可以导致 G-四链体的构型转换从而检测 K<sup>+</sup>。同样 Ba<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>也可以稳定 G-四链体结构<sup>[25-28]</sup>。Dong 等<sup>[29-30]</sup>利用 K<sup>+</sup>稳定的 G-四链体与血晶素结合后具有酶的催化活性, 设计了 K<sup>+</sup>比色

传感器。Kim 等<sup>[31]</sup>利用 K<sup>+</sup>诱导 ssDNA 形成 G-四链体, 结合聚丁二炔的变色效应设计了 K<sup>+</sup>比色传感器。

金纳米颗粒(AuNP)是直径为 0.8~250 nm 的胶体, 具有纳米表面效应、量子效应、宏观量子隧道效应。Mirkin 等<sup>[32]</sup>发现 DNA 特异性杂交可使金纳米颗粒凝聚变色现象, 开创了基于金纳米颗粒不同颜色的变化用于生物检测的新领域。在 Mirkin 等人工作的基础上, Fan 等<sup>[33]</sup>利用 K<sup>+</sup>稳定的 G-四链体与金纳米颗粒聚集诱导颜色变化的性质, 设计了 K<sup>+</sup>比色传感器。由于该文主要涉及荧光传感器, 所以对于金属离子和 DNA 相互作用构建的比色传感器和电化学传感器等不作深入介绍。

## 3 基于金属离子特异性 DNA 酶设计的新颖荧光传感器

核酶是一类具有催化功能的核酸分子<sup>[34]</sup>。早在 20 世纪 80 年代, 科学家们发现 RNA 分子能催化酶反应, 并将之命名为核酶<sup>[35-36]</sup>。之后, 发现部分 DNA 也有催化功能, 命名为脱氧核酶(deoxyribozyme 或 DNAzyme)<sup>[37-41]</sup>, 其发现是人们对于酶的认识的又一次重大飞跃。脱氧核酶(DNAzyme)是通过体外筛选技术(in vitro selection method) 指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)得到的具有酶活性的 ssDNA, 具有易于合成和修饰、稳定性好及对环境污染小等特点<sup>[42]</sup>, 这使得人们对使用 DNA 来代替蛋白质和 RNA 型生物催化剂产生了极大的兴趣。脱氧核酶的活性与某些金属离子密切相关, 通过体外筛选技术可以得到对一些金属离子 (Pb<sup>2+</sup><sup>[43-44]</sup>, Cu<sup>2+</sup><sup>[45-46]</sup>, Zn<sup>2+</sup><sup>[47-48]</sup>) 有特异性结合的 DNA/RNA 核酸适体或核酶, 这就为利用核酶(ribozyme)构建金属离子荧光传感器提供了可能, 使其在金属离子检测中的应用备受关注。美国伊利诺斯大学厄巴纳香槟分校 (University of Illinois at Urbana-Champaign) 华裔教授陆芝 (Lu Yi) 博士在利用金属离子特异性脱氧核酶设计新型荧光传感器领域做出了重要贡献, 先后设计了多种 Pb<sup>2+</sup>荧光传感器、Cu<sup>2+</sup>荧光传感器及 Hg<sup>2+</sup>荧光传感器。Lu 等<sup>[49-56]</sup>发现运用脱氧核酶球形折叠及其活性对 Pb<sup>2+</sup>的依赖

性并基于该现象设计了新型  $Pb^{2+}$  荧光传感器。Lu 等<sup>[49]</sup> 将脱氧核酶 17E 的 3' 端标记上 4-(4'-(二甲氨基偶氮苯基)苯甲酸(4-((4'-(dimethylamino)phenyl)azo) benzoic acid, DABCYL) 作为荧光猝灭基团,其底物(17DS)的 5' 端标记上荧光基团四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine, TAMRA), 设计了新型催化分子信标(catalytic molecular beacon)。当脱氧核酶 17E 与其底物 17DS 杂交后,使得荧光基团与猝灭基团相互靠近,导致 TAMRA 的荧光被 DABCYL 猝灭,由于没有辅助因子,脱氧核酶 17E 在此状态下为惰性;当加入  $Pb^{2+}$  后,脱氧核酶 17E 被激活将其标记有荧光基团的底物 17DS 切开,释放出荧光标记的片段从而引起荧光增强,但该方法必须在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下操作,否则背景荧光较高,灵敏度较低。为了降低背景荧光,该研究小组<sup>[52-55]</sup> 又在脱氧核酶底物的两端分别标记上 DABCYL 和 FAM 作为猝灭基团和荧光基团,当与 3' 端标记 DABCYL 的脱氧核酶杂交后同时存在分子间和分子内的荧光猝灭作用,显著降低了背景荧光,提高了检测的灵敏度。基于该原理,该研究小组<sup>[56]</sup> 还利用  $UO_2^{2+}$  特异性脱氧核酶和  $Hg^{2+}$  可以特异性地和错配的胸腺嘧啶(thymine, T)碱基对(T-T)特异性结合形成稳定的 T- $Hg^{2+}$ -T 结构设计了高选择性地、高灵敏地检测  $Hg^{2+}$  荧光传感器。在  $UO_2^{2+}$  特异性脱氧核酶的底物 39S 的两端分别标记上 DABCYL 和 FAM,当与 3' 端标记上 DABCYL 的脱氧核酶 39E 杂交后分子间和分子内的荧光猝灭作用同时存在。在  $UO_2^{2+}$  特异性脱氧核酶(39E)的中间修饰上 5 对 T-T,没有  $Hg^{2+}$  存在时,由于 T-T,该脱氧核酶不能折叠成可以结合  $UO_2^{2+}$  活性结构,无法切开其底物;当  $Hg^{2+}$  存在时,由于  $Hg^{2+}$  可以特异性地和 T-T 结合形成稳定的 T- $Hg^{2+}$ -T 结构,该脱氧核酶可以折叠成能够结合  $UO_2^{2+}$  的活性结构,从而可以切开其底物,使 FAM 荧光增强。另外,该研究小组<sup>[57]</sup> 还将这种催化分子信标固定在金表面实现非均相溶液中测定  $Pb^{2+}$ 。此外,该研究小组<sup>[58]</sup> 又利用同样的原理,选择  $Cu^{2+}$  依赖性 DNA 酶设计了  $Cu^{2+}$  荧光传感器。Tan 等<sup>[59]</sup> 也利用  $Pb^{2+}$  依赖性的 DNA 酶设计了  $Pb^{2+}$  荧光传感器。一端修饰上荧光猝灭基团的  $Pb^{2+}$  依赖性的 DNA 酶和与一端标记荧光基团的其部分互补的 DNA 链通过多个胸腺嘧啶

碱基(polyT)连接起来,两端发生分子内部分杂交将荧光基团和猝灭基团距离拉近,由于荧光共振能量转移使荧光基团荧光被猝灭。当  $Pb^{2+}$  存在时, $Pb^{2+}$  激活 DNA 酶的活性将荧光标记的 DNA 链从特定位点切开,而使其远离猝灭基团,造成荧光恢复。Willner 等<sup>[60]</sup> 利用 T- $Hg^{2+}$ -T 和 C- $Ag^{+}$ -C 结合  $Mg^{2+}$  依赖性 DNA 酶设计了离子诱导的酶开关。

Lu 等<sup>[61-62]</sup> 利用金属离子依赖性的 DNA 酶和金纳米颗粒凝聚变色现象将该体系成功扩展到金属离子的检测,先后设计了  $Pb^{2+}$  比色传感器<sup>[63-65]</sup> 和  $UO_2^{2+}$  比色传感器<sup>[66]</sup>。Willner 等<sup>[67-70]</sup> 利用金属离子依赖性 DNA 酶和血晶素稳定的四链体结构的催化活性设计  $Pb^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  和  $UO_2^{2+}$  比色传感器。Tan 等<sup>[71]</sup> 利用  $Cu^{2+}$  依赖性 DNA 酶和血晶素稳定的四链体结构的催化活性设计了  $Cu^{2+}$  比色传感器。Deng<sup>[72]</sup> 和 Wang 等<sup>[73-74]</sup> 利用 T-T 与  $Hg^{2+}$  特异性地结合和血晶素稳定的四链体结构的催化活性设计了  $Hg^{2+}$  比色传感器。Chen 等<sup>[75]</sup> 利用  $Pb^{2+}$  依赖性 DNA 酶设计了  $Pb^{2+}$  电化学发光传感器。

#### 4 基于胸腺嘧啶对 $Hg^{2+}$ 识别作用设计的 $Hg^{2+}$ 荧光传感器

文献<sup>[76-78]</sup> 报道 T-T 能与  $Hg^{2+}$  特异性地结合形成稳定的 T- $Hg^{2+}$ -T 结构。将 T 作为识别基团通过一定的连接体将其与信号转导基团连接起来就可以构建有机小分子  $Hg^{2+}$  荧光传感器。Wang 等<sup>[79]</sup> 在共轭聚合物(conjugated polymer, CP)母体结构上连接 T 设计合成了可逆性的  $Hg^{2+}$  荧光传感器(PTT)。没有  $Hg^{2+}$  存在时,PTT 分子彼此相互分离,共轭聚合物发出强荧光;当  $Hg^{2+}$  存在时,由于 T 与  $Hg^{2+}$  的特异性地作用形成 T- $Hg^{2+}$ -T 结构引起聚合物分子间由于  $\pi$ -堆积聚集而导致传感器荧光猝灭,而且其荧光猝灭程度与  $Hg^{2+}$  浓度在一定范围内呈线性关系,据此测定溶液中的  $Hg^{2+}$  浓度。Zhang 等<sup>[80]</sup> 以 T 为  $Hg^{2+}$  识别受体,利用苾激基复合物荧光作为信号检测方法,设计合成了  $Hg^{2+}$  荧光传感器,之外,该研究小组<sup>[81]</sup> 又利用四苯乙烯(Tetraphenylethylene, TPE)聚焦诱导荧光增强为检测信号,设计了  $Hg^{2+}$  荧光传感器,没有  $Hg^{2+}$  时,游离态的 TPE 发射弱荧光;当  $Hg^{2+}$  存



在时,由于 T 与  $\text{Hg}^{2+}$  的作用引起传感器分子 TPE 发生聚集,从而导致 TPE 分子的荧光增强,而且其荧光增强程度与  $\text{Hg}^{2+}$  浓度在一定范围内呈线性关系,据此测定溶液中的  $\text{Hg}^{2+}$ 。Shangguan 等<sup>[82]</sup>报道了一种金属酞菁为信号转导基团, T 为识别基团的可逆性的  $\text{Hg}^{2+}$  荧光传感器 (4T-ZnPc), 该传感器结合了酞菁的优良的光学性能和 T 对  $\text{Hg}^{2+}$  的特异性地识别作用。没有  $\text{Hg}^{2+}$  时,表现出游离态的 4T-ZnPc 的荧光性质; 当  $\text{Hg}^{2+}$  存在时,由于 T 与  $\text{Hg}^{2+}$  的作用引起传感器分子 4T-ZnPc 发生聚集,从而导致传感器分子的荧光猝灭,而且其荧光猝灭程度与  $\text{Hg}^{2+}$  浓度在一定范围内呈线性关系,据此测定溶液中的  $\text{Hg}^{2+}$ 。Ono 等<sup>[83]</sup>在一条单链寡聚核苷酸 (oligodeoxyribonucleotide, ODN) 的两端分别标记上 DABCYL 和 FAM, 设计了新型  $\text{Hg}^{2+}$  荧光传感器。在没有  $\text{Hg}^{2+}$  存在的时候,由于 ODN 为一线性单链结构,所以 DABCYL 和 FAM 距离较远,无法发生有效的荧光共振能量转移,此时在激发光激发下, FAM 发出强荧光;  $\text{Hg}^{2+}$  存在的时候,由于 T-T 与  $\text{Hg}^{2+}$  的特异性亲和作用形成稳定的 T- $\text{Hg}^{2+}$ -T 结构, ODN 折叠成类似发夹 (hairpin) 结构的杂合体,使 DABCYL 和 FAM 距离靠近,由于荧光共振能量转移,此时 FAM 的荧光被 DABCYL 猝灭,而且 FAM 的荧光猝灭程度与  $\text{Hg}^{2+}$  浓度在一定范围内呈线性关系,据此测定溶液中的  $\text{Hg}^{2+}$ 。该传感器的灵敏度为 40 nmol/L, 其它金属离子对该体系的荧光性质没有影响。Lu 等<sup>[84]</sup>利用 T- $\text{Hg}^{2+}$ -T 的稳定常数大于常规的 A-T 的稳定常数设计了基于“结构开关 DNA (structure-switching DNA)” 的荧光增强法检测  $\text{Hg}^{2+}$  的荧光传感器。在一条长的 ssDNA (33-mer) 的 5'-端标记上 FAM, 在另一条与其 5'-端部分互补的短链 DNA (10-mer DNA) 的 3'-端标记上荧光猝灭基团 Black Hole Quencher-1, 没有  $\text{Hg}^{2+}$  存在时, 两条链杂交使 FAM 和荧光猝灭基团 Black Hole Quencher-1 距离较近, 由于荧光共振能量转移荧光基团 FAM 的荧光被荧光猝灭基团 Black Hole Quencher-1 所猝灭; 当  $\text{Hg}^{2+}$  存在时, 由于形成 T- $\text{Hg}^{2+}$ -T 结构, 使长链 DNA 的 3'-端折叠形成发夹型结构, 这样两条链之间只有 5 个碱基完全互补, 这在室温和 100 mmol/L 盐浓度条件下无法维持其稳定的杂交结构, 短链 DNA 从长

链 DNA 上解离下来, 造成 FAM 和 Black Hole Quencher-1 距离增加, 阻断了荧光共振能量转移, 此时 FAM 发出荧光, 而且其荧光强度与  $\text{Hg}^{2+}$  浓度在一定范围内呈线性关系, 据此测定溶液中的  $\text{Hg}^{2+}$ 。但这两种  $\text{Hg}^{2+}$  荧光传感器都需要对核酸进行荧光标记, 这不仅造成合成及分离困难, 价格较高而且合成过程中可能会损伤 DNA, 使其对  $\text{Hg}^{2+}$  的结合能力减弱, 因此开发不需要荧光标记的、基于功能化核酸的  $\text{Hg}^{2+}$  荧光传感器显得较为必要。

与有机小分子传感器不同, 基于超分子化学的荧光传感器不需要将识别受体与荧光体通过共价键连接, 而是通过分子间弱相互作用构成分子聚集体 (assemble), 通过设计合适的信号转导策略也可以报告分子识别事件的发生。Wang 等<sup>[85]</sup>开发了一种基于荧光共轭聚合物 (conjugated fluorescent polymer) 和寡聚核苷酸的简单的“混合检测 (mix-and-detect)” 型免标记  $\text{Hg}^{2+}$  光化学传感器。该  $\text{Hg}^{2+}$  光化学传感器由水溶性的阳离子荧光共轭聚合物 (PMNT) 和一条非标记的富胸腺嘧啶 (T-rich) 的  $\text{Hg}^{2+}$  特异性寡聚核苷酸 (mercury-specific oligonucleotide, MSO) 构成, PMNT 水溶液呈黄色, 加入  $\text{Hg}^{2+}$  特异性寡聚核苷酸后两者依靠静电作用形成红色的 PMNT-MSO 复合物且此时 PMNT 的荧光被猝灭, 体系中含有  $\text{Hg}^{2+}$  时, 由于  $\text{Hg}^{2+}$  特异性寡聚核苷酸与  $\text{Hg}^{2+}$  的较强的特异性作用形成 T- $\text{Hg}^{2+}$ -T 结构使其折叠成发夹结构, 从而破坏 PMNT-MSO 复合物并使 PMNT 从该复合物解离下来, 溶液颜色变成黄色, 且 PMNT 的荧光恢复。该比色方法用肉眼可以检测到 12.5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Hg}^{2+}$ , 而荧光方法可以检测到 42 nmol/L  $\text{Hg}^{2+}$ 。Chang 等<sup>[86]</sup>利用 T-T 与  $\text{Hg}^{2+}$  的特异性亲和作用形成稳定的 T- $\text{Hg}^{2+}$ -T 结构与 DNA 嵌入剂 TOTO 设计了新型免标记  $\text{Hg}^{2+}$  荧光传感器 (图 1)。TOTO 是一类不对称菁染料, 由单体噻唑橙 (Thiazole orange, TO) 通过一个多亚甲基胺柔性链连接成二聚体<sup>[87]</sup>。TOTO 在溶液中无荧光, 降低了检测过程中的荧光背景干扰。嵌入双链 DNA (double stranded, dsDNA) 后荧光增强约 1 000 倍。没有  $\text{Hg}^{2+}$  时, TOTO 与单链寡聚核苷酸结合荧光较弱, 当  $\text{Hg}^{2+}$  存在时, 该单链寡聚核苷酸与  $\text{Hg}^{2+}$  作用后折叠成类似杂交双链 DNA 的杂合体,

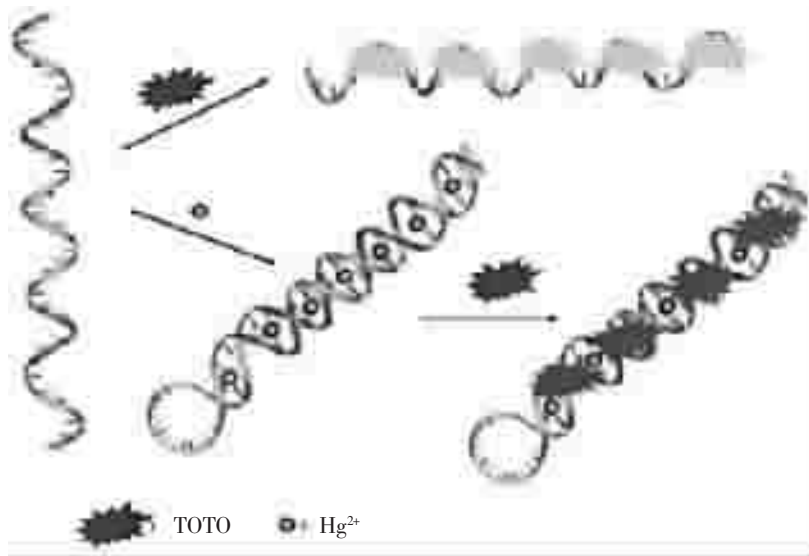


图 1 基于 T-Hg<sup>2+</sup>-T 和 TOTO 的 Hg<sup>2+</sup> 荧光传感器的工作原理

Fig.1 Schematic Representation of the Function of a Hg<sup>2+</sup> Sensor That Operates based on Modulation of the Fluorescence of the Complex Formed between TOTO-3 and T

TOTO 嵌入该杂合体内, 荧光增强。后来又陆续有基于同样原理, 使用不同 DNA 序列或荧光染料设计的 Hg<sup>2+</sup> 荧光传感器<sup>[88~91]</sup>。

金纳米颗粒在 ssDNA 溶液中分散性好, 溶液显红色, 而在 dsDNA 溶液中分散性较差, 发生聚集现象, 溶液呈蓝色<sup>[92~93]</sup>, 文献<sup>[94~99]</sup>等根据这一性质及含 T-T 的 ssDNA (T-rich ssDNA) 对 Hg<sup>2+</sup> 的识别作用设计了 Hg<sup>2+</sup> 比色传感器。同时, 文献<sup>[100~101]</sup> 报道金纳米颗粒是一种猝灭能力较强的荧光猝灭剂, 基于金纳米颗粒对常见荧光物质

的强猝灭作用, Wang 等<sup>[102]</sup> 利用金纳米颗粒对 FAM 的猝灭效应及 T-rich ssDNA 对 Hg<sup>2+</sup> 的识别作用, 使用 FAM 标记的 T-rich ssDNA 比色和荧光增强法检测 Hg<sup>2+</sup> (图 2)。没有 Hg<sup>2+</sup> 存在时, 金纳米颗粒分散性好, 溶液呈红色, 同时由于 FAM 标记的 ssDNA 吸附在金纳米颗粒表面造成 FAM 的荧光被金纳米颗粒猝灭; 当 Hg<sup>2+</sup> 存在的时候, 由于 T-T 与 Hg<sup>2+</sup> 的特异性亲和作用形成稳定的 T-Hg<sup>2+</sup>-T 结构, FAM 标记的 T-rich ssDNA 折叠成类似双链结构的杂合体, 造成金纳米颗粒聚集而使溶液

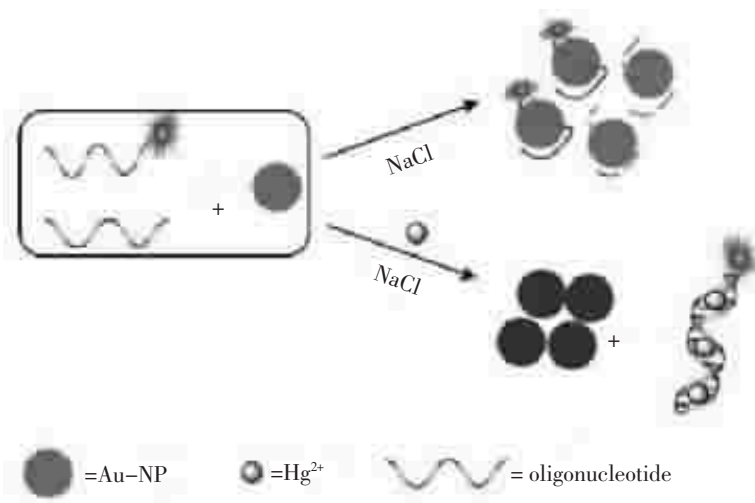


图 2 基于金纳米颗粒的 Hg<sup>2+</sup> 光学传感器的响应机理

Fig.2 Schematic description of colorimetric and fluorescent sensing of Hg<sup>2+</sup> based on the modification-free Au-NPs

呈蓝色,同时由于 dsDNA 不能被吸附,使 FAM 远离金纳米颗粒表面,金纳米颗粒不再猝灭 FAM 的荧光,造成其荧光恢复。Ye 等<sup>[103]</sup>利用 T-T 与  $Hg^{2+}$  特异性地结合及金纳米粒子增强荧光偏振的特性开发了一种利用荧光偏振法检测  $Hg^{2+}$  的方法。Jiang 等<sup>[104-106]</sup>利用 T-T 与  $Hg^{2+}$  特异性地结合及纳米金的信号放大作用发展了一种共振散射法检测的  $Hg^{2+}$  方法。莫志宏等<sup>[107]</sup>利用  $Hg^{2+}$  与含 T-T ssDNA 的高度特异性和纳米金在石英晶体微天平上的信号放大作用,设计了一种简便灵敏的  $Hg^{2+}$  检测方法。同金纳米颗粒聚集诱导颜色变化的性质相似,银纳米颗粒聚集也会诱导颜色变化,文献<sup>[108-109]</sup>等利用核酸与金属离子特异性地结合及银纳米颗粒聚集也会诱导颜色变化设计了  $Hg^{2+}$  比色传感器和利用动态光散射技术检测  $K^+$ 。

ssDNA 和碳纳米管之间有较强的相互作用,可以吸附在碳纳米管的表面,而 dsDNA 和碳纳米管之间的相互作用较弱,不能够吸附在碳纳米管的表面。同时,碳纳米管也是一种猝灭能力较强的荧光猝灭剂,可以猝灭常见的有机荧光体或荧光标记的生物分子的荧光<sup>[110-112]</sup>。Yang 等<sup>[113-114]</sup>基于碳纳米管对 DNA 的猝灭作用及 ssDNA 和 dsDNA 与碳纳米管之间有作用力的差异设计了新型生物传感器。Wang 等<sup>[115]</sup>利用 T-T 能与  $Hg^{2+}$  特异性地结合及 FAM 标记的 ssDNA 和 dsDNA 与碳纳米管之间作用力的差异进一步扩展到  $Hg^{2+}$  的测定。将一条含 T-T 的 ssDNA 一端标记上 FAM,没有  $Hg^{2+}$  存在时,由于 ssDNA 可以吸附在碳纳米管表面,FAM 的荧光被猝灭, $Hg^{2+}$  存在时,由于含 T-T 的 ssDNA 与  $Hg^{2+}$  作用后形成类似正常杂交的 dsDNA 的杂合体,不能吸附在碳纳米管表面,FAM 的荧光恢复。Gao 等<sup>[116]</sup>也基于 ssDNA 和 dsDNA 与碳纳米管之间有作用力的差异,利用 ssDNA 和 dsDNA 圆二色光谱信号的差异发展了一种新的  $Hg^{2+}$  检测方法。Kim 等<sup>[117]</sup>利用 T-T 与  $Hg^{2+}$  特异性地结合聚丁二烯的变色效应设计了  $Hg^{2+}$  比色传感器。同样地,基于 T-T 能与  $Hg^{2+}$  特异性地结合形成稳定的 T- $Hg^{2+}$ -T 结构,传感器领域的科学工作者们也成功开发了多

种  $Hg^{2+}$  电化学传感器<sup>[118-122]</sup>。

## 5 基于胞嘧啶对 $Ag^+$ 识别作用设计的 $Ag^+$ 荧光传感器

Ono 等<sup>[123]</sup>报道错配的胞嘧啶 (Cytosine) 碱基对 (C-C) 可以特异性地和  $Ag^+$  结合,形成稳定的 C- $Ag^+$ -C 结构设计了  $Ag^+$  荧光传感器。在一条富含 C 的 ssDNA 的两端分别标记上 DABCYL 和 FAM,在没有  $Ag^+$  存在时,由于是一条线性的 ssDNA, DABCYL 和 FAM 距离较远 FAM 发出荧光,当  $Ag^+$  存在时,由于 C-C 可以特异性地和  $Ag^+$  结合形成稳定的 C- $Ag^+$ -C 结构,使线性的 ssDNA 折叠成类似 dsDNA 的结构,荧光基团和荧光猝灭基团被拉近,荧光基团将能量转移给猝灭基团而发生荧光猝灭,且荧光强度与溶液中  $Ag^+$  的浓度成正比基于该现象设计了可用于检测  $Ag^+$  的荧光传感器。Tseng 等<sup>[124]</sup>基于利用 C-C 与  $Ag^+$  的特异性作用形成稳定的 C- $Ag^+$ -C 结构并利用 ssDNA 染料 (SYBR Green I, SG) 与 ssDNA 和 dsDNA 结合后荧光性质的差异设计了免标记型的  $Ag^+$  荧光传感器。基于类似原理,He 等<sup>[125]</sup>也设计了一种免标记型的  $Ag^+$  荧光传感器。ssDNA 可以吸附在氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 表面,而 dsDNA 不能够吸附在 GO 表面<sup>[126-127]</sup>,同时,GO 也能猝灭常见的有机荧光体或荧光标记的生物分子的荧光<sup>[128]</sup>,Li 等<sup>[129]</sup>利用 C-C 与  $Ag^+$  的特异性作用和 FAM 标记的 ssDNA 和 dsDNA 和 GO 之间的作用力的差异设计了  $Ag^+$  荧光传感器。Dong 等<sup>[130]</sup>根据金纳米颗粒在 ssDNA 和 dsDNA 溶液中分散性的不同导致溶液颜色的变化和 C-rich ssDNA 对  $Ag^+$  的识别作用设计了  $Ag^+$  比色传感器。

## 6 基于腺嘌呤对 $Ag^+$ 识别作用设计的 $Ag^+$ 荧光传感器

Zhang 等<sup>[81]</sup>以腺嘌呤 (adenine, A) 为  $Ag^+$  的识别受体,以四苯乙烯聚集荧光增强为检测信号设计了新型  $Ag^+$  荧光传感器。Chandrasekhar 等<sup>[131]</sup>以 A 为  $Ag^+$  的识别受体,利用苝的单体和激基复合物为检测信号设计了新型  $Ag^+$  荧光传感器。

## 7 可用于多目标物检测的荧光传感器

发展可以同时检测两个或两个以上目标物的荧光传感器是科学家们追求的另一个目标。Chang 等<sup>[132]</sup>利用核酸与金属离子的相互作用,设计了可以同时检测  $Pb^{2+}$ 和  $Hg^{2+}$ 的荧光传感器。Willner 等<sup>[133]</sup>合成了一种 CdSe/ZnS 量子点。溶液中游离态的  $Hg^{2+}$ 和  $Ag^+$ 不能猝灭量子点的荧光,而被 DNA 富集到量子点表面后则可以猝灭该类量子点的荧光。利用  $Hg^{2+}$ 和  $Ag^+$ 对量子点荧光,设计了可以同时检测  $Hg^{2+}$ 和  $Ag^+$ 的荧光传感器。

## 8 其它应用

Ono 等<sup>[134]</sup>利用  $Hg^{2+}$ 可以 T-T 发生特异性作用,而  $Hg^+$ 则不能与 T-T 发生作用,在含 T-T 的

ssDNA 两端分别标记上 DABCYL 和 FAM,该 DNA 和  $Hg^{2+}$ 作用后,折叠成类似双链结构的杂合体,使 DABCYL 和 FAM 相互靠近发生荧光共振能量转移造成荧光猝灭,在还原性环境中, $Hg^{2+}$ 被还原成  $Hg^+$ 而不再和 T-T 作用,体系荧光恢复。基于该现象设计了还原性环境荧光传感器。Yang<sup>[135~136]</sup>和 Chang 等<sup>[137~138]</sup>利用  $Hg^{2+}$ 可以和 T-T 发生特异性作用形成 T- $Hg^{2+}$ -T 结构作为茎部设计了新型分子信标(图 3)。Mirkin 等<sup>[139]</sup>利用半胱氨酸与  $Hg^{2+}$ 的强相互作用,基于 T-T 与  $Hg^{2+}$ 的特异性亲合作用、及金纳米颗粒在 ssDNA 和 dsDNA 中分散性的不同而使溶液显不同的颜色(红色或蓝色),设计了半胱氨酸比色传感器。Shangguan 等<sup>[140]</sup>通过共聚合以及表面接枝聚合的方法合成了多种 T 修饰的高分子树脂微球,该微

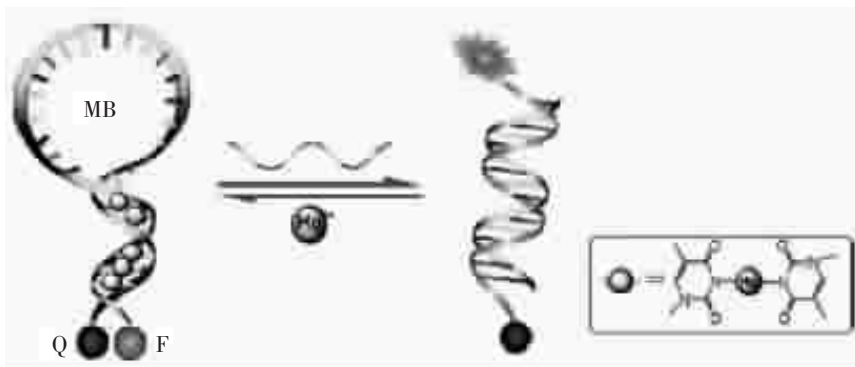


图 3  $Hg^{2+}$ 介导的分子信标的工作原理

Fig.3 Working principle of the T- $Hg^{2+}$ -T-based molecular beacon

球能快速吸附水溶液中的  $Hg^{2+}$ , 并且能够通过稀盐酸水溶液再生,多次使用。Takahashi 等<sup>[141]</sup>利用金属离子和核苷的特异性相互作用,用毛细管电泳(capillary electrophoresis)分离单碱基错配的 DNA。

## 9 结语

综上所述,基于功能化核酸与金属离子相互作用设计新型荧光传感器已经成为传感器领域一个新的研究热点。利用核酸作为金属离子的识别受体,通过设计不同的信号转导方法,可以开发更多的总体性能优良的新型荧光传感器。

## 参考文献

[1] Czarnik A W. Desperately seeking sensors[J]. Chem. Bi-

ol, 1995, 2(7): 423~428.

- [2] Iqbal S S, Mayo M W, Bruno J G, et al. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents [J]. Biosens. Bioelectron, 2000, 15 (11-12): 549~578.
- [3] Liu J W, Cao Z H, Lu Y. Functional nucleic acid sensors [J]. Chem. Rev, 2009, 109 (5): 1 948~1 998.
- [4] Kim S K, Lee D H, Hong J-I, et al. Chemosensors for pyrophosphate[J]. Acc. Chem. Res, 2009: 42 (1), 23~31.
- [5] Nolan E M, Lippard S J. Small-molecule fluorescent sensors for investigating zinc metalloneurochemistry [J]. Acc. Chem. Res, 2009, 42 (1): 193~203.
- [6] Xu Z, Chen X, Kim H N, et al. Sensors for the optical detection of cyanide ion [J]. Chem. Soc. Rev, 2010, 39 (1): 127~137.



- [ 7 ] Clever G H, Kaul C, Carell T. DNA-metal base pairs[J]. *Angew. Chem. Int. Ed*, 2007, 46 (33): 6 226~6 236.
- [ 8 ] Müller J. Metal-ion-mediated base pairs in nucleic acids [J]. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, (24):3 749~3 763.
- [ 9 ] Hannon M J. Nucleic acid-metal ion interactions[J]. *Angew. Chem. Int. Ed*, 2009, 48 (15): 2 636.
- [10] Müller J. Metal complex-DNA interactions [J]. *Angew. Chem. Int. Ed*, 2010, 49 (5): 844~845.
- [11] Bin X, Kraatz H-B. Interaction of metal ions and DNA films on gold surfaces: an electrochemical impedance study[J]. *Analyst*, 2009, 134 (7): 1 309~1 313.
- [12] Famulok M, Hartig J S, Mayer G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy [J]. *Chem. Rev*, 2007, 107 (9): 3 715~3 743.
- [13] Frank D N, Pace N R. In vitro selection for altered divalent metal specificity in the RNase P RNA[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 1997, 94(26): 14 355~14 360.
- [14] Rajendran M, Ellington A D. Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc[J]. *Anal. Bioanal. Chem*, 2008, 390 (4): 1 067~1 075.
- [15] Gilbert D E, Feigon J. Multistranded DNA structures[J]. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 1999, 9 (3): 305~314.
- [16] Guschlbauer W, Chantot J F, Thiele D. Four-stranded nucleic acid structures 25 years later: from guanosine gels to telomer DNA[J]. *J. Biomol. Struct. Dyn*, 1990, 8 (3): 491~511.
- [17] Nikan M, Sherman J C. Cation-complexation behavior of template-assembled synthetic G-quartets [J]. *J. Org. Chem.*, 2009, 74 (15): 5 211~5 218.
- [18] Ueyama H, Takagi M, Takenaka S. A novel potassium sensing with a synthetic oligonucleotide derivative[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2002, 124(48): 14 286~14 287.
- [19] Nagatoishi S, Nojima T, Juskowiak B, et al. A pyrene-labeled G-quadruplex oligonucleotide as a fluorescent probe for potassium ion detection in biological application. *Angew [J]. Chem. Int. Ed*, 2005, 44 (32): 5 067~5 070.
- [20] Nagatoishi S, Nojima T, Galezowska E, et al. Fluorescence energy transfer probes based on the guanine quadruplex formation for the fluorometric detection of potassium ion[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581(1): 125~131.
- [21] Lerga T M, O'Sullivan C K. Rapid determination of total hardness in water using fluorescent molecular aptamer beacon[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 610 (1): 105~111.
- [22] Huang C-C, Chang H-T. Aptamer-based fluorescence sensor for rapid detection of potassium ions in urine[J]. *Chem. Commun*, 2008, (12): 1 461~1 463.
- [23] Kong D M, Guo J H, Yang W, et al. Crystal violet-G-quadruplex complexes as fluorescent sensors for homogeneous detection of potassium ion[J]. *Biosens. Bioelectron*, 2009, 25 (1): 88~93.
- [24] Kong D-M, Ma Y-E, Guo J-H, et al. Fluorescent sensor for monitoring structural changes of G-quadruplexes and detection of potassium ion[J]. *Anal. Chem*, 2009, 81 (7): 2 678~2 684.
- [25] Kotch F W, Fettinger J C, Davis J T. A lead-filled G-quadruplex: insight into the G-quartet's selectivity for Pb<sup>2+</sup> over K<sup>+</sup>[J]. *Org. Lett*, 2000, 2 (21): 3 277~3 280.
- [26] Chen F M. Strontium (2+) facilitates intermolecular G-quadruplex formation of telomeric sequences [J]. *Biochem*, 2002, 31 (15): 3 769~3 776.
- [27] Smirnov I, Shafer R H. Lead is unusually effective in sequence-specific folding of DNA [J]. *J. Mol. Biol*, 2000, 296 (1): 1~5.
- [28] Chantot J-F, Guschlbauer W. Physicochemical properties of nucleosides 3. Gel formation by 8-bromoguanosine[J]. *FEBS Lett*, 1969, 4 (3): 173~176.
- [29] Li T, Wang E, Dong S. G-Quadruplex-based DNAzyme as a sensing platform for ultrasensitive colorimetric potassium detection[J]. *Chem. Commun*, 2009,(5): 580~582.
- [30] Yang X, Li T, Li B, et al. Potassium-sensitive G-quadruplex DNA for sensitive visible potassium detection [J]. *Analyst*, 2010, 135 (1): 71~75.
- [31] Lee J, Kim H-J, Kim J. Polydiacetylene liposome arrays for selective potassium detection [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2008, 130 (15): 5 010~5 011.
- [32] Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. *Nature*, 1996, 382 (6592): 607~609.
- [33] Wang L H, Liu X F, Hu X F, et al. Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers[J]. *Chem. Commun*, 2006,(36): 3 780~3 782.
- [34] Lu Y, Liu J W. Smart nanomaterials inspired by biology: dynamic assembly of error-free nanomaterials in response to multiple chemical and biological stimuli[J]. *Acc. Chem. Res*, 2007, 40 (5): 315~323.
- [35] Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, et al. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena [J]. *Cell*,



- 1982, 31 (1): 147~157.
- [36] Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme[J]. *Cell*, 1983, 35 (3): 849~857.
- [37] Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA[J]. *Chem. Bio*, 1994, 1 (4): 223~229.
- [38] Sen D, Geyer C R. DNA enzymes [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 1998, 2 (6): 680~687.
- [39] Jamieson E R, Lippard S J. Structure, Recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts [J]. *Chem. Rev*, 1999, 99 (9): 2 467~2 498.
- [40] Zorn J A, Wells J A. Turning enzymes ON with small molecules[J]. *Nat. Chem. Biol*, 2010, 6 (3): 179~188.
- [41] Lu Y. New Transition-metal-dependent DNazymes as efficient endonucleases and as selective metal biosensors [J]. *Chem. Eur. J*, 2002, 8 (20): 4 588~4 596.
- [42] Santoro S W, Joyce G F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 1997, 94 (9): 4 262~4 266.
- [43] Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA[J]. *Chem. Biol*, 1994, 1 (4): 223~229.
- [44] Pan T, Uhlenbeck O C. A small metalloribozyme with a two-step mechanism[J]. *Nature*, 1992, 358 (6387): 560~563.
- [45] Cuenoud B, Szostak J W. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity[J]. *Nature*, 1995, 375 (6532): 611~614.
- [46] Carmi N, Shultz L A, Breaker R R. In vitro selection of self-cleaving DNAs[J]. *Chem. Biol*, 1996, 3(12): 1 039~1 046.
- [47] Li J, Zheng W C, Kwon A H, et al. In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn (II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (2): 481~488.
- [48] Santoro S W, Joyce G F, Sakhivel K, et al. RNA cleavage by a DNA enzyme with extended chemical functionality [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2000, 122 (11): 2 433~2 439.
- [49] Kim H-K, Rasnik I, Liu J W, et al. Dissecting metal ion-independent folding and catalysis of a single DNazyme[J]. *Nat. Chem. Biol*, 2007, 3 (12): 763~768.
- [50] Kim H K, Liu J W, Li J, et al. Metal-dependent global folding and activity of the 8-17 DNazyme studied by fluorescence resonance energy transfer [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2007, 129 (21): 6 896~6 902.
- [51] Liu J W, Lu Y. Highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2000, 122 (42): 10 466~10 467.
- [52] Mazumdar D, Nagraj N, Kim H-K, et al. Activity, folding and Z-DNA formation of the 8-17 DNazyme in the presence of monovalent Ions [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2009, 131 (15): 5 506~5 515.
- [53] Chang I-H, Tulock J J, Liu J W, et al. Miniaturized lead sensor based on lead-specific DNazyme in a nanocapillary interconnected microfluidic device[J]. *Environ. Sci. Technol*, 2005, 39 (10): 3 756~3 761.
- [54] Liu J W, Lu Y. Improving fluorescent DNazyme biosensors by combining inter- and intramolecular quenchers [J]. *Anal. Chem*, 2003, 75 (23): 6 666~6 672.
- [55] Xiang Y, Tong A, Lu Y. Abasic site-containing DNazyme and aptamer for label-free fluorescent detection of Pb<sup>2+</sup> and adenosine with high sensitivity, selectivity, and tunable dynamic range [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2009, 131 (42): 15 352~15 357.
- [56] Lan T, Furuya K, Lu Y. A highly selective lead sensor based on a classic lead dnazyme [J]. *Chem. Commun*, 2010, 46 (22): 3 896~3 898.
- [57] Swearingen C B, Wernette D P, Cropek D M, et al. Immobilization of a catalytic DNA molecular beacon on Au for Pb (II) detection [J]. *Anal. Chem*, 2005, 77 (2): 442~448.
- [58] Liu J W, Lu Y. A DNazyme catalytic beacon sensor for paramagnetic Cu<sup>2+</sup> ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2007, 129 (32): 9 838~9 839.
- [59] Wang H, Kim Y, Liu H, et al. Engineering a unimolecular DNA-catalytic probe for single lead ion monitoring[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2009, 131 (23): 8 221~8 226.
- [60] Shimron S, Elbaz J, Henning A, et al. Ion-induced dnazyme switches [J]. *Chem. Commun*, 2010, 46 (19): 3 250~3 252.
- [61] Liu J W, Lu Y. Optimization of a Pb<sup>2+</sup>-directed gold nanoparticle/DNazyme assembly and its application as a colorimetric biosensor for Pb<sup>2+</sup>[J]. *Chem. Mater*, 2004, 16 (17): 3 231~3 238.
- [62] Liu J W, Lu Y. Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNazymes for simple and fast colorimetric Pb<sup>2+</sup> detection [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2004, 126 (39), 12 298~12 305.
- [63] Liu J W, Lu Y. A colorimetric lead biosensor using DNazyme-directed assembly of gold nanoparticles[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2003, 125 (22): 6 642~6 643.
- [64] Liu J W, Lu Y. Stimuli-responsive disassembly of

- nanoparticle aggregates for light-up colorimetric sensing [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (36): 12 677~12 683.
- [65] Wang Z, Lee J H, Lu Y. Label-free colorimetric detection of lead ions with a nanomolar detection limit and tunable dynamic range by using gold nanoparticles and DNzyme[J]. *Adv. Mater.*, 2008, 20 (17): 3 263~3 267.
- [66] Lee J H, Wang Z, Liu J W, et al. Highly sensitive and selective colorimetric sensors for Uranyl ( $\text{UO}_2^{2+}$ ): development and comparison of labeled and label-free DNzyme-gold nanoparticle systems [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (43): 14 217~14 226.
- [67] Elbaz J, Shlyahovsky B, Willner I. A DNzyme cascade for the amplified detection of  $\text{Pb}^{2+}$  ions or L-histidine[J]. *Chem. Commun.*, 2008, (13): 1 569~1 571.
- [68] Elbaz J, Moshe M, Shlyahovsky B, et al. Cooperative multicomponent self-Assembly of nucleic acid structures for the activation of DNzyme cascades: a paradigm for DNA sensors and aptasensors[J]. *Chem. Eur. J.*, 2009, 15 (14): 3 411~3 418.
- [69] Huang S-T, Peng Y-X, Wang K-L. Synthesis of a new long-wavelength latent fluorimetric indicator for analytes determination in the DT-Diaphorase coupling dehydrogenase assay system [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23 (12): 1 793~1 798.
- [70] Moshe M, Elbaz J, Willner I. Sensing of  $\text{UO}_2^{2+}$  and design of logic gates by the application of supramolecular constructs of ion-dependent DNzymes [J]. *Nano Lett.*, 2009, 9 (3): 1 196~1 200.
- [71] Yin B-C, Ye B-C, Tan W, et al. An allosteric dual-DNzyme unimolecular probe for colorimetric detection of copper (II)[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131(41): 14 624~14 625.
- [72] Lu N, Shao C Y, Deng Z X. Colorimetric  $\text{Hg}^{2+}$  detection with a label-free and fully DNA-structured sensor assembly incorporating G-quadruplex halves [J]. *Analyst.*, 2009, 134 (9): 1 822~1 825.
- [73] Li T, Dong S J, Wang E K. Label-free colorimetric detection of aqueous mercury ion ( $\text{Hg}^{2+}$ ) using  $\text{Hg}^{2+}$ -modulated G-quadruplex-based DNzymes[J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81 (6): 2 144~2 149.
- [74] Li T, Li B, Wang E K, et al. G-quadruplex-based DNzyme for sensitive mercury detection with the naked eye[J]. *Chem. Commun.*, 2009,(24): 3 551~3 553.
- [75] Zhu X, Lin Z, Chen L, et al. A sensitive and specific electrochemiluminescent sensor for lead based on DNzyme [J]. *Chem. Commun.*, 2009, (40): 6 050~6 052.
- [76] Yamane T, Davidson N. On the complexing of desoxyribonucleic acid (DNA) by mercuric ion[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83 (12): 2 599~2 607.
- [77] Mansy S, Wood T E, Sprowles J C, et al. Heavy metal-nucleotide interactions. Binding of methylmercury(II) to pyrimidine nucleosides and nucleotides. Studies by Raman difference spectroscopy [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, 96 (6): 1 762~1 770.
- [78] Miyake Y, Togashi H, Tashiro M, et al. MercuryII-mediated formation of thymine-Hg<sup>II</sup>-thymine base pairs in DNA duplexes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128 (7): 2 172~2 173.
- [79] Tang Y L, He F, Yu M H, et al. A reversible and highly selective fluorescent sensor for mercury (II) using poly(thiophene)s that contain thymine moieties[J]. *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, 27 (6): 389~392.
- [80] Wang Z, Zhang D Q, Zhu D B. A sensitive and selective "Turn on" fluorescent chemosensor for  $\text{Hg}(\text{II})$  ion based on a new pyrene-thymine dyad [J]. *Anal. Chim. Acta.*, 2005, 549 (1-2): 10~13.
- [81] Liu L, Zhang G, Xiang J, et al. Fluorescence turn on chemosensors for  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  based on tetraphenylethylene motif featuring adenine and thymine moieties [J]. *Org. Lett.*, 2008, 10 (20): 4 581~4 584.
- [82] Liu X, Qi C, Bing T, et al. Highly selective phthalocyanine-thymine conjugate sensor for  $\text{Hg}^{2+}$  based on target induced aggregation[J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81(9): 3 699~3 704.
- [83] Ono A, Togashi H. Highly selective oligonucleotide-based sensor for mercury (II) in aqueous solutions[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43 (33): 4 300~4 302.
- [84] Wang Z, Lee J H, Lu Y. Highly sensitive 'turn-on' fluorescent sensor for  $\text{Hg}^{2+}$  in aqueous solution based on structure-switching DNA [J]. *Chem. Commun.*, 2008, (45): 6 005~6 007.
- [85] Liu X, Tang Y, Wang L, et al. Optical detection of mercury (II) in aqueous solutions using conjugated polymers and label-free oligonucleotides[J]. *Adv. Mater.*, 2007, 14 (11): 1 471~1 474.
- [86] Chang C-K, Huang C-C, Liu C-W, et al. Oligonucleotide-based fluorescence probe for sensitive and selective detection of mercury (II) in aqueous solution [J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80(10): 3 716~3 721.
- [87] Benson S C, Mathies R A, Glazer A N. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: stability and applications of the DNA complexes [J]. *Nucleic*

- Acids Res, 1993, 21 (24): 5 720~5 726.
- [88] Chan D S-H, Lee H-M, Che C-M, et al. A selective oligonucleotide-based luminescent switch-on probe for the detection of nanomolar mercury ( II ) ion in aqueous solution[J]. Chem. Commun, 2009,(48): 7 479~7 481.
- [89] Wang J, Liu B. Highly sensitive and selective detection of Hg<sup>2+</sup> in aqueous solution with mercury-specific DNA and Sybr Green[J]. Chem. Commun, 2008,(39): 4 759~4 761.
- [90] Liu B. Highly sensitive oligonucleotide-based fluorometric detection of mercury( II ) in aqueous media[J]. Biosens. Bioelectron, 2008, 24 (4):756~760.
- [91] Zhang X, Li Y, Su H, et al. Highly sensitive and selective detection of Hg<sup>2+</sup> using mismatched DNA and a molecular light switch complex in aqueous solution [J]. Biosens. Bioelectron, 2010, 25 (6): 1 338~1 343.
- [92] Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. Science, 1997, 277 (5329): 1 078~1 081.
- [93] Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2004, 101 (39): 14 036~14 039.
- [94] Xu X, Wang J, Jiao K, et al. Colorimetric detection of mercury ion (Hg<sup>2+</sup>) based on DNA oligonucleotides and unmodified gold nanoparticles sensing system with a tunable detection range [J]. Biosens. Bioelectron, 2009, 24 (10): 3 153~3 158.
- [95] Yu C-J, Cheng T-L, Tseng W-L. Effects of Mn<sup>2+</sup> on oligonucleotide-gold nanoparticle hybrids for colorimetric sensing of Hg<sup>2+</sup>: Improving colorimetric sensitivity and accelerating color change[J]. Biosens. Bioelectron, 2009, 25 (1): 204~210.
- [96] Li L, Li B, Qi Y, et al. Label-free aptamer-based colorimetric detection of mercury ions in aqueous media using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probe[J]. Anal. Bioanal. Chem, 2009, 393 (8): 2 051~2 057.
- [97] Wu H, Zhu H, Zhuang J, et al. Water-soluble nanocrystals through dual-interaction ligands [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2008, 47 (20): 3 730~3 734.
- [98] Wang Y, Yang F, Yang X R. Colorimetric biosensing of mercury( II ) ion using unmodified gold nanoparticle probes and thrombin-binding aptamer[J]. Biosens. Bioelectron, 2010, 25 (8): 1 994~1 998.
- [99] 刘兴奋, 武海萍, 李玉兰, 等. 一种高灵敏度、高特异性检测重金属 Hg<sup>2+</sup>的比色生物传感方法 [J]. 核技术, 2007, 30 (5): 467~472.
- [100] Maxwell D J, Taylor J R, Nie S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules [J]. J. Am. Chem. Soc, 2002, 124 (32): 9 606~9 612.
- [101] Dubertret B, Calame M, Libchaber A J. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides[J]. Nat. Biotechnol, 2001, 19 (4): 365~370.
- [102] Wang H, Wang Y X, Jin J Y, et al. Gold Nanoparticle-based colorimetric and turn-on fluorescent probe for mercury( II ) ions in aqueous solution[J]. Anal. Chem, 2008, 80 (23): 9 021~9 028.
- [103] Ye B-C, Yin B-C. Highly sensitive detection of mercury ( II ) ions by fluorescence polarization enhanced by gold nanoparticles[J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2008, 47 (44): 8 386~8 389.
- [104] Jiang Z, Fan Y, Chen M, et al. Resonance scattering spectral detection of trace Hg<sup>2+</sup> using aptamer-modified nanogold as probe and nanocatalyst [J]. Anal. Chem, 2009, 81 (13): 5 439~5 445.
- [105] Jiang Z L, Wen G Q, Fan Y Y, et al. A highly selective nanogold-aptamer catalytic resonance scattering spectral assay for trace Hg<sup>2+</sup> using HAuCl<sub>4</sub>-ascorbic acid as indicator reaction[J]. Talanta, 2010, 80 (3): 1 287~1 291.
- [106] 温桂清, 李建福, 梁爱惠, 等. 鲑鱼精 DNA 修饰纳米金催化 Fehling 反应--共振散射光谱法检测痕量 Hg (2+)[J]. 化学学报, 2010, 68 (1): 83~88.
- [107] 莫志宏, 杨琳玲, 杨小超, 等. 基于胸腺嘧啶-汞离子-胸腺嘧啶结构和纳米金放大传感器检测汞离子[J]. 分析化学, 2009, 37 (7): 1 033~1 036.
- [108] Wang Y, Yang F, Yang X R. Colorimetric detection of mercury ( II ) ion using unmodified silver nanoparticles and mercury-specific oligonucleotides [J]. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2010, 2 (2): 339~342.
- [109] Cai W, Fan Y Y, Jiang Z L, et al. A highly sensitive and selective resonance scattering spectral assay for potassium ion based on aptamer and nanosilver aggregation reactions[J]. Talanta, 2010, 81 (4-5): 1 810~1 815.
- [110] Nakayama-Ratchford N, Bangsaruntip S, Sun X, et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes by fluorescein-polyethylene glycol: supramolecular conjugates with pH-dependent absorbance and fluorescence [J]. J. Am. Chem. Soc, 2007, 129 (9): 2 448~2 449.

- [111] Li H, Zhou B, Lin Y, et al. Selective interactions of porphyrins with semiconducting single-walled carbon nanotubes[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126 (4): 1 014~1 015.
- [112] Boul P J, Cho D-G, Rahman G M A, et al. Sapphyrin-nanotube assemblies [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129 (17): 5 683~5 687.
- [113] Yang R H, Tang Z W, Yan J, et al. Noncovalent assembly of carbon nanotubes and single-stranded DNA: an effective sensing platform for probing biomolecular interactions[J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80 (19): 7 408~7 413.
- [114] Hung C-H, Chang G-F, Kumar A, et al. m-Benziporphodimethene: a new porphyrin analogue fluorescence zinc (II) sensor [J]. *Chem. Commun.*, 2008, (8): 978~980.
- [115] Zhang L, Li T, Li B, et al. Carbon nanotube-DNA hybrid fluorescent sensor for sensitive and selective detection of mercury (II) ion [J]. *Chem. Commun.*, 2010, 46 (9): 1 476~1 478.
- [116] Gao X, Xing G, Yang Y, et al. Detection of trace  $Hg^{2+}$  via induced circular dichroism of DNA wrapped around single-walled carbon nanotubes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (29): 9 190~9 191.
- [117] Lee J, Jun H, Kim J, Polydiacetylene-liposome microarrays for selective and sensitive mercury (II) detection [J]. *Adv. Mater.*, 2009, 21 (36): 3 674~3 677.
- [118] Kong R-M, Zhang X-B, Zhang L-L, et al. An ultrasensitive electrochemical turn-on label-free biosensor for  $Hg^{2+}$  with AuNP-functionalized reporter DNA as a signal amplifier[J]. *Chem. Commun.*, 2009,(37): 5 633~5 635.
- [119] Wu D, Zhang Q, Chu X, et al. Ultrasensitive electrochemical sensor for mercury (II) based on target-induced structure-switching DNA [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25 (5): 1 025~1 031.
- [120] Liu S-J, Nie H-G, Jiang J-H, et al. Electrochemical sensor for mercury(II) based on conformational switch mediated by interstrand cooperative coordination[J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81 (14): 5 724~5 730.
- [121] Han D, Kim Y-R, Oh J-W, et al. A regenerative electrochemical sensor based on oligonucleotide for the selective determination of mercury (II)[J]. *Analyst.*, 2009, 134 (9): 1 857~1 862.
- [122] Zhu Z, Su Y, Li J, et al. Highly sensitive electrochemical sensor for mercury(II) ions by using a mercury-specific oligonucleotide probe and gold nanoparticle-based amplification[J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81 (18): 7 660~7 666.
- [123] Ono A, Cao S, Togashi H, et al. Specific interactions between silver (I) ions and cytosine-cytosine pairs in DNA duplexes [J]. *Chem. Commun.*, 2008,(39): 4 825~4 827.
- [124] Lin Y-H, Tseng W-L. Highly sensitive and selective detection of silver ions and silver nanoparticles in aqueous solution using an oligonucleotide-based fluorogenic probe[J]. *Chem. Commun.*, 2009, (43): 6 619~6 621.
- [125] Xiao Q, Huang S, Ge Y, et al. A novel fluorescent silver ion biosensor based on nucleic acid molecular "light switch"[J]. *J. Fluoresc.*, 2010, 20 (2): 541~549.
- [126] Varghese N, Mogera U, Govindaraj A, et al. Binding of DNA nucleobases and nucleosides with graphene [J]. *ChemPhysChem*, 2009, 10 (1): 206~210.
- [127] Liu Z, Robinson J T, Sun X, et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (33): 10 876~10 877.
- [128] Lu C-H, Yang H-H, Zhu C-L, et al. A graphene platform for sensing biomolecules [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48 (26): 4 785~4 787.
- [129] Wen Y, Xing F, He S, et al. A graphene-based fluorescent nanoprobe for silver (I) ions detection by using graphene oxide and a silver-specific oligonucleotide[J]. *Chem. Commun.*, 2010, 46 (15): 2 596~2 598.
- [130] Li B L, Du Y, Dong S J. DNA based gold nanoparticles colorimetric sensors for sensitive and selective detection of Ag(I) ions[J]. *Anal. Chim. Acta.*, 2009, 644 (1-2): 78~82.
- [131] Pandey M D, Mishra A K, Chandrasekhar V, et al. Silver-guided excimer emission in an adenine-pyrene conjugate: fluorescence lifetime and crystal studies[J]. *Inorg. Chem.*, 2010, 49 (5): 2 020~2 022.
- [132] Liu C-W, Huang C-C, Chang H-T. Highly selective DNA-based sensor for lead (II) and mercury (II) ions [J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81 (6): 2 383~2 387.
- [133] Freeman R, Finder T, Willner I. Multiplexed analysis of  $Hg^{2+}$  and  $Ag^+$  ions by nucleic acid functionalized CdSe/ZnS quantum dots and their use for logic gate operations[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48 (42): 7 818~7 821.
- [134] Miyake Y, Ono A. Fluorescent sensor for redox environment: a redox controlled molecular device based on the reversible mercury mediated folded structure formation



- of oligothymidylate[J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46 (14): 2 441~2 443.
- [135] Yang R H, Jin J Y, Long L P, et al. Reversible molecular switching of molecular beacon: controlling DNA hybridization kinetics and thermodynamics using mercury (II) ions[J]. *Chem. Commun*, 2009, (3): 322~324.
- [136] Wang Y X, Li J S, Jin J Y, et al. Strategy for molecular beacon binding readout: separating molecular recognition element and signal reporter[J]. *Anal. Chem*, 2009, 81(23): 9 703~9 709.
- [137] Lin Y W, Ho H T, Huang C C, et al. Fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms using a universal molecular beacon [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (19): e123.
- [138] Liu C W, Lin Y W, Huang C C, et al. Fluorescence detection of single-nucleotide polymorphisms using a thymidine-based molecular beacon[J]. *Biosens. Bioelectron*, 2009, 24 (8): 2 541~2 546.
- [139] Lee J S, Ulmann P A, Han M S, et al. A DNA-gold nanoparticle-based colorimetric competition assay for the detection of cysteine [J]. *Nano Lett*, 2008, 8 (2): 529~533.
- [140] Liu X, Qi C, Bing T, et al. Specific mercury (II) adsorption by thymine-based sorbent[J]. *Talanta*, 2009, 78 (1): 253~258.
- [141] Takahashi T, Sakurai T, Hirata K, et al. Separation of oligonucleotides with single-base mutation by capillary electrophoresis using specific interaction of metal ion with nucleotide[J]. *Analyst*. 2009, 134(7):1 299~1 301.

# miRNA 检测技术进展

周殿明, 蒋健晖\*

(化学生物传感与计量学国家重点实验室, 湖南大学化学化工学院, 湖南长沙 410082)

**摘要:** miRNA 作为一种非常重要的非编码蛋白的 RNA, 广泛存在于植物、病毒、哺乳动物当中。因其在细胞增殖、细胞死亡、肿瘤发生和哺乳动物细胞生长中重要的调节功能, 其检测技术也受到越来越多的关注, 很多关键的检测技术, 比如印迹技术, 阵列杂交技术, 反转录 PCR 技术等等都在 miRNA 的检测中发挥了巨大的实用价值。该文基于此对 miRNA 近几年的检测技术进行了具体的综述。

**关键词:** 基因调控; miRNA 检测

## Development in the detection of miRNA

Zhou Dian-ming, Jiang Jian-hui\*

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry & Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** As a kind of very important non-protein coding RNA molecular, miRNA has been found in a broad range of plants, viruses, and mammals. Because miRNA plays an important role of regulation in cell proliferation, cell death, tumorigenesis, and mammalian cell development, more and more detection technologies have been developed. Many key detection technologies are quite useful in real detection applications, such as northern blotting, hybridization in microarray surface, and RT-PCR etc. So the paper would review some of the latest methods for miRNA detection.

**Key words:** gene regulation; miRNA detection

## 0 引言

RNA 是除了 DNA 外的基因分子生物学的又一庞大家族, miRNA 就是这个家族中的一个非常重要的成员。1993 年, Lee 等在线虫 (*C.elegans*) 发现了第一个定时调控胚胎后期发育的基因 *lin-4*<sup>[1]</sup>, 也就是第一个 miRNA; 同时发现它不编码任何蛋白质, 但是可以抑制 *Lin-14* 蛋白表达, 然而当时的这个发现并未引起太多的关注。直到 2000 年, Reinhart 等又在线虫 *C.elegans* 中发现第二个 miRNA *-let-7*<sup>[2]</sup>, miRNA 这一非编码基因家族的重要成员才开始在人们的眼前逐渐清晰起来。

miRNA 是一类约 22 个碱基左右的非编码蛋白的 RNA, 通常在 18~25 个碱基之间, 成熟的

miRNA 5' 端有一个磷酸基团, 3' 端是羟基。它主要通过信使 RNA 的直接剪切, 或者间接抑制翻译来实现基因调控作用。miRNA 广泛存在于各种真核生物中, 它在生物体的产生过程如图 1 所示。

首先携带 miRNA 信息的基因通过 RNA 聚合酶 II 转录生成较长的 RNA, 也就是通常所说的 pri-miRNA, 然后 pri-miRNA 会被一种叫做 Droscha 的 RNA 内切酶 III 剪切成 60~70 个碱基的含有茎环结构的 RNA, 即 pre-miRNA。随后, pre-miRNA 被载体蛋白 Exportin-5 从细胞核运输到细胞质中。到了细胞质以后, pre-miRNA 会从载体蛋白中脱落下来, 被一种叫做 Dicer 的 RNA 内切酶 III 最终剪切成成熟的 miRNA。此时的 miRNA 是双链的结构, 其中 5' 端热稳定性较差

\* 通讯联系人, Tel:0731-88821916, E-mail: jianhuijiang@hnu.cn

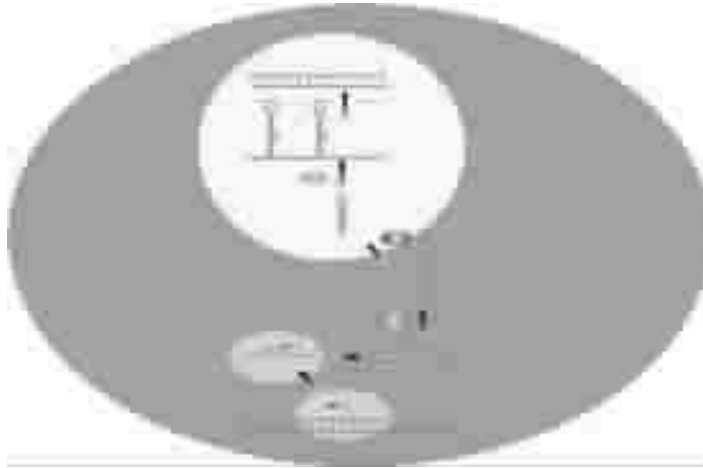


图 1 miRNA 在细胞内的产生过程及调控原理图

Fig.1 Schematic of miRNA production and regulation in cell

的一条链将被特异性地整合到 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)中,再与完全匹配的目标信使 RNA 结合,或者通过诱导 miRNA 的降解,或者通过间接调节翻译,从而实现蛋白质表达的调控功能。

从上面可以看出,miRNA 由于其特殊的调控功能,不仅对生物的生长、发育和凋亡有着重要的影响,而且还与各种疾病比如神经疾病、血管疾病、肿瘤和免疫方面<sup>[3-5]</sup>的疾病有着密切的关系。因此 miRNA 的检测,对于医学、分子生物学都有着非常重要的意义。近年来已有大量的文章涉及了这方面的工作,该文就是基于此对于目前世界上各个研究小组关于 miRNA 检测方法的研究进展做了一个简要的综述。

## 1 基于表面杂交的检测技术

### 1.1 印迹杂交技术

印迹杂交技术(即 northern blotting)是最常用也是最早用于 miRNA 检测的方法<sup>[6-9]</sup>,主要原理是将标记的与目标 miRNA 互补的 DNA 探针杂交到硝酸纤维素膜上,然后显影检测。该方法虽然已成为 miRNA 检测的金标准,但是仍然存在很多问题,比如灵敏度低,费时等。Zolta'n Havelda 小组于 2004 年将通过引入锁核酸(LNA)对该方法进行了改进<sup>[10]</sup>,由于杂交效率得到改善,所以灵敏度提高了大约 10 倍。虽然如此,高灵敏度,高通量,特异性好的检测技术仍然是个挑战。

### 1.2 阵列平台检测技术

miRNA 的阵列检测技术主要是构建含有与目标 miRNA 互补的 DNA 的阵列,然后与目标杂交,再通过各种各样的信号检测方法实现检测目的。最常用的是通过聚合酶延伸的方法产生信号。2004 年,Nelson 等发展了一种名为基于阵列 RNA 引物介导的 Klenow 酶反应(RAKE)的检测技术<sup>[11]</sup>(图 2),该技术将 DNA 探针的 5' 端固定于玻璃表面,探针的 3' 端是与目标 miRNA 互补的序列,紧挨着互补序列的是三个胸腺嘧啶核苷酸残基,因此当目标存在时,将被探针捕获到基底表面,单链的探针可以通过外切酶 I 切除,此时加入生物素化的 dATP 和 Klenow 聚合酶可以延伸出生物素化的腺嘌呤碱基,再与染料标记的亲和素结合产生荧光信号。另外,依赖于 Poly(A)聚合酶的延伸方法也被引入到 miRNA 的检测,Shingara 等<sup>[12]</sup>(图 3)利用 Poly(A)聚合酶以 RNA 为引物延伸出氨基修饰的尿嘧啶核苷酸,再利用染料与氨基修饰的尿嘧啶核苷酸交联,获得荧光检测信号。2006 年,Fang 等<sup>[13]</sup>同样用 Poly(A)聚合酶的延伸方法实现 miRNA 的检测,不同的是延伸出的 Poly(A)通过与 Poly(T)修饰的纳米金粒子结合做为信号获得方式。

Liang 等<sup>[14]</sup>(图 4)采用了对 miRNA 直接修饰的方法实现对其检测,将 miRNA 的 3' 端直接生物素修饰,然后再与亲和素化的量子点结合,从而得到荧光信号。该阵列的检测限可以达到 0.4

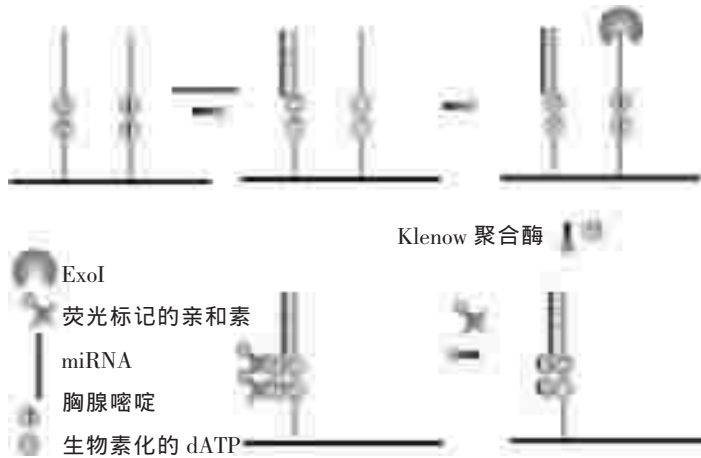


图 2 基于阵列 RNA 引物介导的 Klenow 酶反应(RAKE)的检测技术原理图  
(RNA-primed, array-based Klenow enzyme (RAKE) assay)

Fig.2 Schematic of RNA-primed, array-based Klenow enzyme assay (RAKE)



图 3 基于 Poly(A)聚合酶延伸修饰碱基 U 的 miRNA 阵列检测

Fig.3 Schematic of miRNA microarray detection based on extension modified nucleotides U by Poly(A)



图 4 生物素化的 miRNA 通过量子点进行阵列检测原理图

Fig.4 Schematic of biotin modified miRNA profiling microarray detected with QD

fmol,检测的动力学范围为两个数量级。

DNA/RNA 杂交体的特异性抗体被以一种新的标记方式引入到 miRNA 的检测中来, Hu 等<sup>[15]</sup>构建了一个传感阵列, 直接将未标记的目标 miRNA 与固定的 DNA 探针杂交, 然后加入不依赖于序列信息的抗 DNA/RNA 杂交体的单克隆抗体, 该抗体与染料标记的二抗结合, 或者与生物素标记二抗和染料标记的亲和素反应, 都可以得到检测信号。

除了上述的阵列检测平台以外, 还有很多这

方面的报道, 比如利用生物发光酶标记的 miRNA 与待测 miRNA 竞争杂交到固定化的 DNA 探针上<sup>[16]</sup>, 通过检测生物发光强度实现目标检测的方法等等<sup>[17-20]</sup>。

### 1.3 电化学检测技术

硅纳米线<sup>[21]</sup>(SiNWs)以其优越的性能被广泛应用于化学生物传感器, 将核酸固定在其表面上可以作为检测 miRNA 的探针, 当与检测对象 miRNA 进行杂交时, 将会引起 SiNWs 界面电阻的变化, 其变化值与 miRNA 浓度相关. 该技术无



需标记, 检测 miRNA 浓度的下限可达 1 fmol/L, 具有良好的特异性。Lusi 等<sup>[22]</sup>(图 5)发展了另一种无标记电化学检测技术, 将用次黄嘌呤修饰的不含鸟嘌呤的 DNA 做为固定探针, 目标 miRNA 存在时可以直接检测目标中鸟嘌呤的电化学信号, 实现 miRNA 的检测。此外, Fan 等<sup>[23]</sup>利用目标介导在纳米间隙电极上沉积导电聚合物纳米线的方法进行 miRNA 的检测。该方法首先将肽核酸固定于电极间隙中, 与完全互补的目标链杂交

以后, 由于肽核酸不含电荷, 而目标呈负电性, 可以通过静电作用结合带有正电的苯胺, 在酶催化的条件下, 形成导电的聚苯胺纳米线, 电极的导电性与目标物的含量成比例。该传感装置可以检测低至 5 fmol/L 的 miRNA。除了无标记电化学的检测技术外, 还可以通过目标 miRNA 直接修饰具有电化学催化活性的物质, 比如氧化钨纳米粒子<sup>[24]</sup>和 Ru(PD)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>[25]</sup>, 这些电化学催化物质都可以催化肼的氧化反应, 产生电化学信号, 从而达



图 5 电化学检测次黄嘌呤修饰的捕获探针与目标 miRNA 杂交

Fig.5 Electrochemical detection of the hybridization between the Inosine-modified capture probe and target miRNA

到检测 miRNA 的目的。

## 2 均相 miRNA 检测技术

### 2.1 基于 PCR 信号放大的检测技术

PCR, 即聚合酶链式反应, 是一种 DNA 的指数扩增技术。美国科学家 Mulis 因发明了该技术获得了 1995 年诺贝尔化学奖。PCR 技术通过两个短的称为引物 (primer) 的 DNA 分子, 大约 20 个碱基左右, 在一种耐热的 DNA 聚合酶的作用, 可以在较短的时间内把极少的 DNA 量提高千万倍之多。PCR 技术对分子生物学研究起到了巨大的推动作用, 而且随着 PCR 技术的日趋完善,

PCR 在人类社会生活中的应用也越来越广泛。2005 年, Chen 等<sup>[26]</sup>(图 6)将反转录定量 PCR 技术引入到 miRNA 的检测当中, 建立了名为茎环的反转录定量 PCR 技术 (stem-loop RT-PCR)。他首先设计了一个茎环结构的反转录的探针, 据报道这种结构大大提高了反转录的效率和特异性。当目标 miRNA 存在时, 该探针与其杂交进行反转录产生 cDNA, 再加入正反引物和 Taqman 探针, 进行定量 PCR。该方法可以检测总 RNA 中低至 25 pg 的 miRNA, 实际上, 高的灵敏度和特异性可以使该方法用于单个细胞的 miRNA 检测而不需要核酸纯化。该方法有很强的实用性, 可以用于

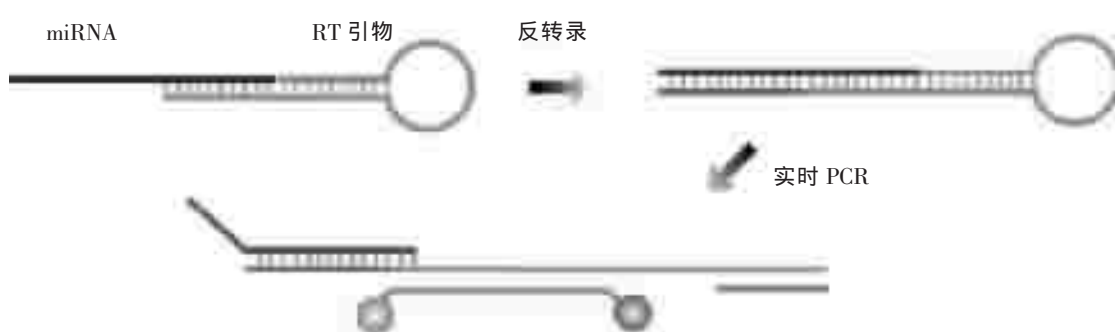


图 6 基于茎环反转录引物的实时定量 PCR 技术 (stem-loop RT-PCR)

Fig.6 Real-time PCR based on stem-loop RT primer

各种 miRNA 检测<sup>[27]</sup>。与此类似的, Raymond 等<sup>[28]</sup>用一个普通的基因特异性线性探针进行杂交反转录,然后利用一个短的序列与被测物相关含有锁核酸的引物,和另一个通用的引物进行 PCR 反应,在一定程度上也可以提高特异性。与上面两种反转录 PCR 技术不同, Soroush 及其研究团队<sup>[29]</sup>首先用一个含有六个碱基和目标互补的探针与 miRNA 杂交,该探针同时含有 5' 端多余的碱基,进行反转录后,产生含有 5' 端突出 cDNA,此时加入同样 5' 端突出的与反转录产生部分序列互补的探针,该探针与反转录产物杂交相互为模板延伸,这样就相当于在 miRNA 的两测引入了通用序列,可以用通用引物扩增。该技术检测的动力学范围可达 6~8 个数量级,下限可达 0.2

fmol/L。不过这些方法都是通过探针与目标 miRNA 直接杂交进行反转录的,由于 miRNA 序列短,所以需要各种办法来提高杂交效率,但是有一种检测技术可以避免这个问题<sup>[30]</sup>,通过 Poly(A)聚合酶延伸 miRNA 产生反转录引物结合序列 Poly(A),进行反转录,然后用同样的两个引物,一个是通用的,一个是 miRNA 特异的进行定量 PCR 扩增。2009 年, Li 等<sup>[31]</sup>(图 7)建立一种不依赖反转录的 PCR 检测技术,该技术设计了两个探针,分别由两部分组成,一部分可以与目标 miRNA 完全互补,另一部分是引物结合序列。这样,两个探针在与 miRNA 互补配对后,由连接酶连接成一条完整的定量 PCR 模板,加入上下游引物,则可以进行定量 PCR 反应。

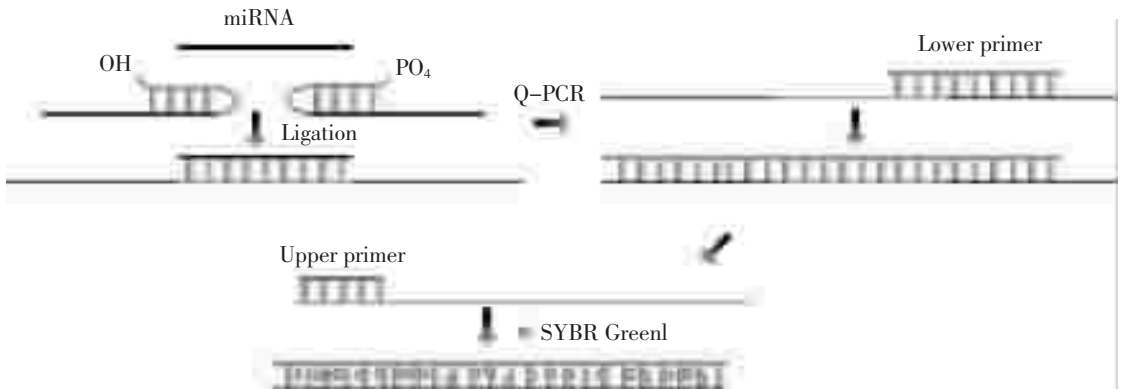


图 7 基于酶连接实时 PCR 用于检测 miRNA

Fig.7 Real-time PCR assay for detection of miRNA based on enzymatic ligation

## 2.2 基于 RCA 的检测技术

滚环扩增技术 (Rolling Circle Amplification) 也叫滚环复制技术,是一种等温扩增方法,它以环状 DNA 为模板,在引物存在时,聚合酶将连续复制出无数个环的互补序列拷贝。该技术已经成为生物分析领域的核心技术,得到了广泛的应用。2006 年, Jonstrup 等<sup>[32]</sup>将 RCA 技术用于 miRNA 的检测, miRNA 首先做为模板将探针连成环,同时做为引物在聚合酶的作用下延伸聚合放大。 Cheng 等<sup>[33]</sup>在此基础上发展了 miRNA 检测的分支滚环扩增技术 (branched rolling-circle amplification)。仍旧以 miRNA 为模板和引物,不同的是,引入了第二个引物,序列与环的一部分相同,可以与滚环产物杂交并延伸扩增,再通过聚合酶的链置换活性不仅可以扩增出环互补序

列的无数个拷贝,还可以在引物 2 的作用下延伸出和环相同序列的无数个拷贝。最后通过染料嵌入实现信号检测。与前两种方法不同的是, Yao 等<sup>[34]</sup>首先将引物与目标杂交进行反转录,反转录后的产物将以另一个桥探针为模板,连成环状分子。再加入引物 1 进行滚环扩增,加入引物 2 进行分支扩增。每次反应体系可以检测  $10^3 \sim 10^{10}$  个拷贝的 miRNA,动力学范围很宽,而且可以区分单碱基错配和区分成熟的 miRNA 及其前体(图 8)。

## 2.3 其它均相检测技术

除了基于 PCR 和 RCA 为基础的检测技术外,还有很多均相检测技术,比如连接酶链式反应<sup>[35]</sup>,阳离子聚合物<sup>[36]</sup>, invader 反应<sup>[37]</sup>,基于核酶的信号放大检测技术<sup>[38]</sup>,同位素标记连接技术<sup>[39]</sup>,和将反转录与转录结合的信号检测技术

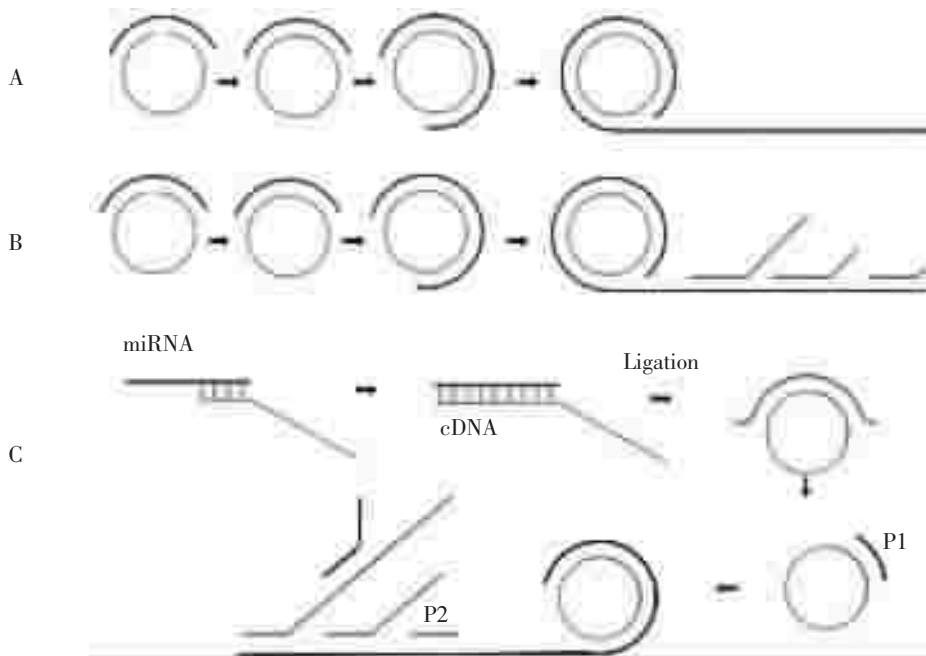


图 8 基于 RCA 的 miRNA 检测技术(A<sup>[32]</sup>, B<sup>[33]</sup>, C<sup>[34]</sup>)

Fig.8 miRNA detection based on RCA

等等<sup>[40]</sup>。

### 3 结论

综上所述,miRNA 做为一种重要的基因表达调控手段,参与各种生物活动,和控制多种疾病的发生发展。其检测手段也越来越受到人们的重视,各种各样的检测技术已被运用到 miRNA 的检测之中,但是无论是界面检测技术还是均相检测技术,存在自身优点的同时都或多或少存在不足,获得高灵敏度,高通量,高选择性,高特异性的检测技术仍然需要生物分析专业研究者的进一步努力。

### 参考文献

- [ 1 ] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75: 843~854.
- [ 2 ] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901~906.
- [ 3 ] Lukiw W J, Zhao Y, Cui J G. An NF- $\kappa$ B-sensitive micro RNA -146a -mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31 315~31 322.
- [ 4 ] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. *Nature*, 2008, 456 (7 224): 980~984.
- [ 5 ] Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles[J]. *Cell*, 2009, 136(1):26~36.
- [ 6 ] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2000, 403 (6 772): 901~906.
- [ 7 ] Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294 (5 543): 862~864.
- [ 8 ] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5 543):853~858.
- [ 9 ] Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(24): 15 524~15 529.
- [ 10 ] Válczei A, Hornyik C, Varga N, et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes[J]. *Nucleic*

- Acids Res, 2004, 32(22): e175.
- [11] Nelson P T, Baldwin D A, Scarce L M, et al. Microarray-based, high-throughput Gene expression profiling of microRNAs[J]. Nat. Methods, 2004, 1: 155~161.
- [12] Shingara J, Keiger K, Shelton J, et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling[J]. RNA, 2005, 11(9): 1461~1470.
- [13] Fang S, Lee H J, Wark A W, et al. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(43): 14044~14046.
- [14] Liang R Q, Li W, Li Y, et al. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(2): e17.
- [15] Hu Z, Zhang A, Storz G, et al. An antibody-based microarray assay for small RNA detection[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(7): e52.
- [16] Cissell K A, Rahimi Y, Shrestha S, et al. Bioluminescence-based detection of MicroRNA, miR21 in breast cancer cells[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80: 2319~2325.
- [17] Baskerville S, Bartel D P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes [J]. RNA, 2005, 11(3): 241~247.
- [18] Wang H, Ach R A, Curry B. Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA[J]. RNA, 2007, 13(1): 151~159.
- [19] Chen J, Lozach J, Garcia E W, et al. Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(14): e87.
- [20] Li J, Schachermeier S, Wang Y, et al. Detection of microRNA by fluorescence amplification based on cation-exchange in nanocrystals[J]. Anal Chem., 2009, 81(23): 9723~9729.
- [21] Zhang G J, Chua J H, Chee R E, et al. Label-free direct detection of miRNAs with silicon nanowire biosensors [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(8): 2504~2508.
- [22] Lusi E A, Passamano M, Guarascio P, et al. Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs[J]. Anal Chem, 2009, 81(7): 2819~2822.
- [23] Fan Y, Chen X, Trigg A D, et al. Detection of MicroRNAs using target-guided formation of conducting polymer nanowires in nanogaps [J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(17): 5437~5443.
- [24] Gao Z, Yang Z. Detection of microRNAs using electrocatalytic nanoparticle tags[J]. Anal Chem, 2006, 78(5): 1470~1477.
- [25] Gao Z, Yu Y H. Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assays[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(6): 933~940.
- [26] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): e179.
- [27] Tang F, Hajkova P, Barton S C, et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(2): e9.
- [28] Raymond C K, Roberts B S, Garrett-Engele P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs [J]. RNA, 2005, 11(11): 1737~1744.
- [29] Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, et al. miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample [J]. BMC Mol Biol, 2008, 9:34.
- [30] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. Biotechniques. 2005, 39(4): 519~525.
- [31] Li J, Yao B, Huang H, et al. Real-time polymerase chain reaction microRNA detection based on enzymatic stem-loop probes ligation[J]. Anal Chem, 2009, 81(13): 5446~5451.
- [32] Jonstrup S P, Koch J, Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification[J]. RNA, 2006, 12(9): 1747~1752.
- [33] Cheng Y, Zhang X, Li Z, et al. Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48(18): 3268~3272.
- [34] Yao B, Li J, Huang H, et al. Quantitative analysis of zeptomole microRNAs based on isothermal ramification amplification[J]. RNA, 2009, 15(9): 1787~1794.
- [35] Yan J, Li Z, Liu C, et al. Simple and sensitive detection of microRNAs with ligase chain reaction [J]. Chem Commun (Camb), 2010, 46(14): 2432~2434.
- [36] Zhang Y, Li Z, Cheng Y, et al. Colorimetric detection of microRNA and RNase H activity in homogeneous solution with cationic polythiophene derivative [J]. Chem Commun (Camb), 2009, (22): 3172~3174.
- [37] Allawi H T, Dahlberg J E, Olson S, et al. Quantitation of



- microRNAs using a modified Invader assay [J]. RNA, 2004, 10(7): 1 153~1 161.
- [38] Hartig J S, Grüne I, Najafi-Shoushtari S H, et al. Sequence-specific detection of MicroRNAs by signal-amplifying ribozymes [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(3): 722~723.
- [39] Maroney P A, Chamnongpol S, Souret F, et al. A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation[J]. RNA, 2007, 13(6):930~936.
- [40] Siva A C, Nelson L J, Fleischer C L, et al. Molecular assays for the detection of microRNAs in prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2009, 8:17.

## 《化学传感器》编辑部声明

凡向本刊所投稿件,视为作者将该论文的复制权、发行权、信息网络传播权、翻译权、汇编权等权利转让给本刊。本刊已加入中国学术期刊网络出版总库、万方数据数字化期刊群,被中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库收录。凡被本刊录用的稿件将同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务。稿件一经刊用,付给作者的稿酬包括印刷版、光盘版和网络版等各种使用方式著作权使用费。

# 纳米金属/金属氧化物在电化学传感器中的应用进展

赵建军\*, 潘勇, 秦墨林, 黄启斌

(防化研究院, 北京 102205)

**摘要:** 纳米金属/金属氧化物广泛应用于化学传感器, 这类纳米材料与功能聚合物、酶等结合, 使电化学传感器的性能得到大幅度提高。综述了金属/金属氧化物纳米材料在电化学传感器的应用进展。

**关键词:** 纳米材料; 金属/金属氧化物; 电化学传感器

## Progress of electrochemical sensors involving nano-metal/metal oxides

Zhao Jian-jun\*, Pan Yong, Qin Mo-lin, Huang Qi-bin

(Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China)

**Abstract:** Nano-metal/metal oxides has been widely used in the chemsensors. Properties of electrochemical sensors can be improved because functional polymer and enzyme were immobilized on the nanomaterials. The paper reviewed progress of electrochemical sensors involving nano-metal/metal oxides.

**Key words:** nanomaterials; metal/metal oxides; electrochemical sensors

### 0 引言

纳米技术是研究 0.1~100 nm 尺度范围的物质组成、运动规律、体系之间的相互作用, 以及在实际应用中的相关技术。纳米材料具有大的比表面积、表面活性、特殊的界面效应、尺寸效应和量子效应, 对外部环境的变化十分敏感, 当物质的组成体系、环境温度、光等条件发生变化时, 会引起纳米材料的表面形态、界面离子价态和电子输出等发生迅速改变。随着纳米技术的发展, 纳米金属/金属氧化物敏感材料在化学传感器方面得到了广泛的应用<sup>[1~4]</sup>。

电化学传感器技术经过多年的研究, 特别是将各种金属/金属氧化物纳米材料应用于电化学传感器, 使得检测对象从无机物、有机物, 扩展到生物分子、DNA 等, 应用领域十分广泛, 取得了令人瞩目的研究成果<sup>[5]</sup>。

### 1 纳米金属/金属氧化物在电化学传感器中的应用研究

#### 1.1 气敏电化学传感器

纳米金属/金属氧化物气敏电化学传感器是根据纳米金属/金属氧化物材料在气体环境中的电导或电阻变化, 实现对目标物的检测。例如用金属氧化物半导体气敏材料 SnO<sub>2</sub>、ZnO、TiO<sub>2</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等制成的传感器。SnO<sub>2</sub> 是应用最早、也是应用最成功的半导体气敏材料; 但 SnO<sub>2</sub> 气敏传感器在使用过程中, 器件需要加热, 因此功耗较高; 另外, SnO<sub>2</sub> 气敏元件在制备过程中, 受烧结等工艺条件限制, 器件的一致性不容易实现。随着 SnO<sub>2</sub> 气敏材料实现纳米化, 以及在 SnO<sub>2</sub> 材料中掺杂其它纳米材料, 使传感器的性能得到显著改善。目前已实用化的气敏传感器主要是由纳米 SnO<sub>2</sub> 膜制成的, 可用于可燃性气体泄漏的监测和湿度检测; 在这些纳米敏感材料中加入贵金属纳

\* 通讯联系人, 北京 1044 信箱 403 号, 102205

米颗粒(Pt和Pd),可增强敏感膜的选择性,提高传感器的灵敏度,并降低工作温度;例如,在纳米 $\text{SnO}_2$ 中掺入0.002% Rh催化剂,可提高对 $\text{CH}_4$ 、 $\text{CO}$ 、 $\text{H}_2$ 、 $\text{C}_4\text{H}_{10}$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 和90#汽油的检测灵敏度,其灵敏度可提高10倍以上;传感器性能的改善程度与加入贵金属纳米颗粒的晶粒尺寸、化学状态及分布有关<sup>[6]</sup>。

除了 $\text{SnO}_2$ 以外, $\text{TiO}_2$ 、 $\text{PtO}/\text{Pt}$ 等纳米材料也是近几年发现的新型气敏材料。Du等<sup>[7]</sup>研制出 $\text{TiO}_2/\text{PtO}-\text{Pt}$ 双层纳米膜敏感材料,制成检测 $\text{H}_2$ 的气敏传感器;其敏感材料的制备方法是:先在玻璃衬底上覆盖上一层由Pt纳米颗粒构成的 $\text{PtO}-\text{Pt}$ 多孔连续膜,其中Pt的纳米颗粒直径大约1.3 nm,膜厚大约100 nm左右;然后在 $\text{PtO}-\text{Pt}$ 膜上覆盖 $\text{TiO}_2$ 膜, $\text{TiO}_2$ 纳米颗粒的直径尺寸3.4~5.4 nm,平均直径4.1 nm;传感器的工作温度在180~200 °C, $\text{PtO}-\text{Pt}$ 多孔膜作为催化剂,使 $\text{TiO}_2$ 纳米膜对 $\text{H}_2$ 产生部分还原作用,从而使传感器在空气中,甚至在 $\text{CO}$ 、 $\text{NH}_3$ 、 $\text{CH}_4$ 等还原性气体存在的条件下,对 $\text{H}_2$ 都表现出很高的灵敏度和选择性,比以往的Ti基传感器对 $\text{H}_2$ 的检测性能有显著的提高。

Mazza等<sup>[8]</sup>通过研究传感器的检测机理,发现 $\text{TiO}_2$ 纳米膜的厚度、晶体尺寸大小等性质对传感器的性能有很大影响,并发展了制备 $\text{TiO}_2$ 纳米膜的控制技术。

Diaz等<sup>[9]</sup>用非电镀金属沉积法在 $\text{SnO}_2$ 纳米颗粒的表面沉积Pt,实验结果表明,这种方法对改善气敏材料的催化剂性能有很大帮助。Pt和Pd作为两种主要的贵金属添加物,它们与衬底有不同的相互作用,Pd倾向于嵌入纳米 $\text{SnO}_2$ 晶粒中,而Pt倾向于形成大的金属颗粒团簇。与传统方法相比,用非电镀沉积法形成的催化剂具有不同化学状态,为研究催化剂对气体检测的机理提供了一种新的方法。

文献[10~11]报道,利用纳米 $\text{SnO}_2$ 制成的气体传感器对有机磷农药如敌百虫、乙酰甲胺磷和乐果进行动态快速检测,获取了大量的信息,同时结合快速傅里叶变换频谱分析方法,较理想地实现对敌百虫、乙酰甲胺磷和乐果的定性和定量检测,大大提高 $\text{SnO}_2$ 气体传感器对农药气体的选择性和稳定性。

Pan等<sup>[12]</sup>通过高温热蒸发块体氧化物材料,并在低温下将其气相沉积到 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 表面,制备Zn、Sn、In、Ge等金属半导体氧化物的纳米带,纳米带单晶结构整齐,无杂质,几乎没有缺陷和断层。纳米带宽为30~300 nm,宽度与厚度比为5~10,长度达几个毫米。研究人员认为,该材料在纳米气敏传感器领域具有广阔的应用前景。

气敏电化学传感器的重要发展方向是阵列化,不仅能够提高传感器的综合性能,而且能够有效降低传感器的功耗。Takeuchi等<sup>[13]</sup>在 $2\times 2$  mm面积上的Au电极表面制备出16个半导体气体传感器阵列,每个传感器覆盖厚度为50 nm的 $\text{SnO}_2$ 薄膜,分别通过掺杂 $\text{ZnO}$ 、 $\text{WO}_3$ 、 $\text{In}_2\text{O}_3$ 、Pt、Pd等修饰传感器的 $\text{SnO}_2$ 敏感膜,该阵列式传感器采用模式识别技术,可对多种物质实施有效检测,能同时检测氯仿( $500\text{ mg}/\text{m}^3$ )、甲醛( $130\text{ mg}/\text{m}^3$ )、苯( $330\text{ mg}/\text{m}^3$ )混合气体,检测下限达到氯仿( $60\text{ mg}/\text{m}^3$ )、甲醛( $15\text{ mg}/\text{m}^3$ )、苯( $40\text{ mg}/\text{m}^3$ )。为了进一步提高传感器性能,半导体气体传感器的阵列已经提高到 $8\times 8$ ,甚至更高(见图1)。

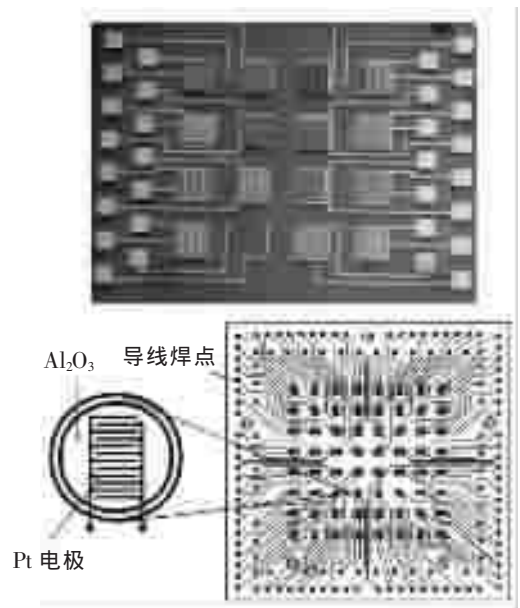


图1 半导体阵列气体传感器

Fig.1 Semiconductor Array Gas Sensors

Frietsch等<sup>[14]</sup>通过改变 $\text{SnO}_2$ 半导体膜和修饰膜厚度,从2~50 nm逐渐变化,同时,器件加热温度采用梯度变化,可大幅度提高传感器的选择性和响应性能,降低功耗(见图2)。

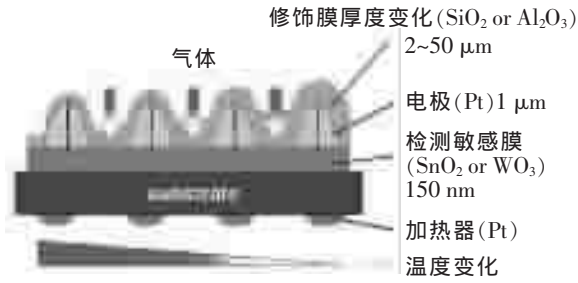


图2 修饰膜厚度变化的半导体气体传感器

Fig.2 Semiconductor Gas Sensors with a gradient thickness membrane

采用纳米金属/金属氧化物敏感材料研制的气敏电化学传感器,传感器的一致性提高、功耗降低,其检测性能比传统的半导体气敏传感器有大幅度提高;传感器阵列化,可同时对多种气体实施检测。随着研究不断深入,以纳米敏感材料为敏感膜,将是气敏电化学传感器的主要发展方向。

## 1.2 纳米金属/金属氧化物修饰电极的液相电化学传感器

纳米金属/金属氧化物修饰电极的液相电化学传感器是在液相环境中,根据工作电极与目标物发生电极反应,通过测量工作电极与对电极之间的电导、电位、电流等电信号变化,实现对目标物的检测。其中工作电极是被测物分子发生电极反应的承载体,通过在工作电极上固定或修饰敏感材料,工作电极可与目标物发生特定的电极反应,产生特征电信号。通过纳米金属/金属氧化物修饰的电极可以使待测物能够进行有效的分离与富积,借助控制电极电位又可以使选择性得到进一步提高,而且电化学测试方法(如脉冲伏安法、溶出伏安法等)能将灵敏度和电极上修饰剂电极反应的选择性结合起来,因此,纳米金属/金属氧化物修饰的电极是将分离、富积和选择性三者结合的理想体系。经过多年的研究,这类电化学传感器已经取得了许多重要的研究成果;采用纳米金属/金属氧化物修饰电极,不仅在电化学理论研究上有重要意义,而且在无机物、有机物、生物活性物质的测定、价态分析等诸多方面也发挥越来越大的作用。

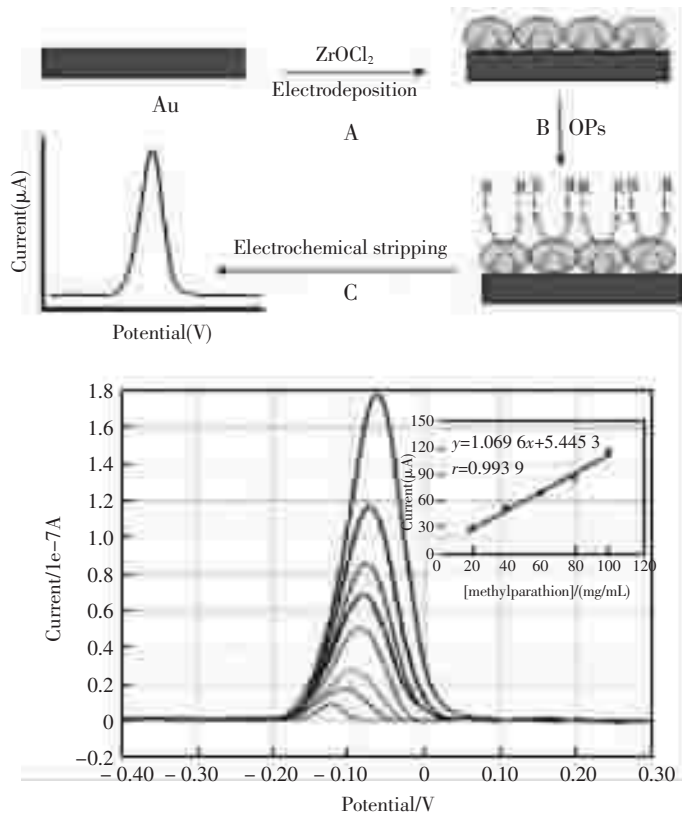
研究发现,纳米  $ZrO_2$  具有热稳定性好、化学惰性性质,对有机磷分子有较强的亲和性,是一种对有机磷分子十分敏感的材料,曾被用于研

制检测有机磷的化学传感器。Liu 等<sup>[15]</sup>采用电化学沉积法在 Au 电极表面制备出  $ZrO_2$  纳米膜,通过电化学溶出伏安法,实现对液相甲基对硫磷的高灵敏、高选择性的检测,检测甲基对硫磷的线性范围为  $5 \sim 100 \text{ ng/mL}$ ,检测限可达  $3 \text{ ng/mL}$ (见图 3)。Du 等<sup>[16]</sup>用壳聚糖分散纳米  $ZrO_2$  粉体,利用滴涂法修饰玻碳电极,该修饰电极可高效富集甲基对硫磷,采用方波伏安法,甲基对硫磷的检测限为  $0.001 \text{ pg/mL}$ 。

将纳米材料与功能聚合物、生物分子等相结合,是目前电化学传感器发展的重要方向。Li 等<sup>[17]</sup>利用  $TiO_2$  纳米膜巨大的表面积及其对有机磷农药良好的亲和性,通过自组装方法,以对特丁基杯-4 芳烃为功能单体制备对硫磷-纳米  $TiO_2$  自组装分子印迹电化学传感器,该传感器可检测液相中的对硫磷,线性范围  $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,检测限达到  $2.0 \text{ μmol/L}$ 。闵红等<sup>[18]</sup>采用液相沉积法,将具有高度催化活性的 Au 纳米颗粒掺杂于  $TiO_2$  纳米粒子中,制备了分散均匀的 Au- $TiO_2$  复合纳米颗粒,以壳聚糖为交联剂,研制出 Au- $TiO_2$  复合纳米粒子修饰的电化学传感器,采用示差脉冲伏安法检测对硫磷,其检测的线性范围  $1.0 \sim 7.0 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ ,检测限达到  $0.5 \text{ ng/mL}$ 。

采用 Au 纳米通道修饰的电极其比表面积比常规电极大很多,形成 Au 纳米通道的纳米 Au 颗粒具有一定的催化活性,可用于研制纳米通道阵列传感器,传感器检测灵敏度很高;通过对纳米 Au 通道进行化学修饰,可以改变表面性质,使其检测对象更具选择性。Au 纳米通道制备简便,可以根据需要,得到单分散、内径可控的纳米通道,同时不容易发生纳米 Au 团聚现象;Au 纳米通道即可以作为电极材料制成阵列电极的电化学传感器,又可以用于物质的分离和分析,有很好的应用前景。Kobayashi 等<sup>[19]</sup>采用两种电化学的方法测定  $Ru(bpy)_3^{2+}$ 、 $MV^{2+}$ 、奎宁、2-萘酚、TPB-及 BCG;一种是采用恒电位法,通过测定加入待测物时跨膜电流的下降来进行分析待测物;另一种是加入待测物后测定它们的膜电位变化;这两种方法对大尺寸和荷电高的分析物均具有较好的检测效果,其检测灵敏度很高;采用恒电位法,检出限达  $10^{-11} \text{ mol/L}$ 。Delvaux 等<sup>[20]</sup>将 Au 纳米通道膜制成检测葡萄糖的传感器,将 3-巯基丙酸和



图3  $ZrO_2$  纳米膜电化学传感器检测有机磷Fig.3 Electrochemical sensing OP compounds of  $ZrO_2$  nano-membrane

2-巯基乙胺自组装到纳米 Au 膜的表面和通道中,再将葡萄糖氧化酶(GOD, glucose oxidase)组装上去,研制出检测葡萄糖的电化学传感器;采用安培法,对葡萄糖进行测定,具有很好的灵敏度。Gyurcsanyi 等<sup>[21]</sup>在  $Ca^{2+}$ 选择电极表面制备 Au 纳米通道,采用生物素对通道内壁进行功能化修饰,制成电化学生物传感器;该传感器通过电位监测  $Ca^{2+}$ 在通道中迁移量,用于生物分子的识别;利用生物素-抗生物素蛋白作为生物识别模型,当通道内修饰生物素时, $Ca^{2+}$ 迁移量降低;当它与抗生物素蛋白结合时, $Ca^{2+}$ 迁移量与抗生物素蛋白浓度( $5.6 \times 10^{-8} \sim 1.12 \times 10^{-5}$  mol/L)的对数值呈线性关系。

将 Au 纳米微粒修饰在电极表面或者掺入电极中,可以显著的增大电极表面积,同时 Au 纳米微粒可保持生物分子的活性,加速电子的转移,能够提高电极的稳定性,减少响应时间,增大催化能力,提高检测的选择性。Crumbly 等<sup>[22]</sup>将纳米 Au 微粒与葡萄糖氧化酶电沉积在铂丝电极上制成葡萄糖氧化酶电化学生物传感器,纳米 Au

微粒能很好地保持酶活性,延长电极的使用寿命。Bharathi 和 Wang 等<sup>[23-24]</sup>采用溶胶凝胶技术将 GOD 固定在 Au 纳米微粒中,制备的葡萄糖氧化酶电极具有好的稳定性和较宽的检测范围。

Chen 的研究小组<sup>[25-26]</sup>通过在 Au 电极表面自组装二巯基化合物膜,然后将 Au 纳米微粒固定在自组装膜表面上,最后将辣根过氧化物酶(HRP)、血红素吸附到 Au 纳米微粒表面,研究发现,HRP、血红素在该修饰电极表面可直接发生氧化还原反应。Crumbly 等<sup>[27]</sup>将 Au 纳米微粒溶液和 HRP 混合后,通过蒸发沉积法,将 HRP 固定在 Au 电极和玻碳电极表面,HRP 与电极之间可发生直接电子转移。Liu 等<sup>[28-29]</sup>将纳米 Au 分别掺杂到包埋酪氨酸酶、葡萄糖氧化酶和肌红蛋白的碳糊电极中,研制出检测酚类、葡萄糖和  $H_2O_2$  电化学生物传感器,并对纳米 Au 改善传感器性能的机理进行了探讨。唐芳琼等<sup>[30]</sup>研究发现,将 Au 纳米微粒和纳米  $SiO_2$  作为固酶材料,可以保持 GOD 的活性和延长酶电极的寿命;将  $SiO_2$  和 Au 纳米微粒组成的复合纳米颗粒用于固载



GOD, 研制出葡萄糖氧化酶生物传感器<sup>[31~32]</sup>, 实验结果表明, SiO<sub>2</sub> 和 Au 组成的复合纳米颗粒对葡萄糖氧化酶电极的响应性能有明显的增强作用。

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子应用于生物探针分子固定具有显著的优点: ①纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 具有特殊的电子构型和化学键合能力, 可增加电极电子传递界面的表面积; ②纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 可加强生物探针分子氧化还原中心与电极表面的导电特性, 从而显著提高传感器的灵敏度; ③纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 粒子具有良好的生物兼容性, 能够与酶的活性基团如-OH、-COOH、-NH<sub>2</sub> 等相互作用, 但不破坏其生物分子活性; 同时, 纳米 Au 即可以固定生物分子, 又可以长期保持生物分子的活性<sup>[33~34]</sup>。干宁等<sup>[35]</sup>采用丝网印刷碳电极(SPCEs)作为工作电极, 在其表面负载 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au 复合纳米颗粒后, 将乙酰胆碱酯酶(AChE)及胆碱氧化酶(ChOx) 吸附在复合纳米颗粒上, 制备出检测农药克百威和敌敌畏残留物的双酶电极传感器, 其线性范围 0.05~1.00 μg/mL, 检出限 0.01 μg/mL。闵红等<sup>[36]</sup>研制出纳米 Au 掺杂 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米颗粒的乙酰胆碱酯酶传感器, 用于检测敌敌畏的研究; 在纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性颗粒中掺杂纳米 Au, 即提高了纳米颗粒的稳定性, 同时, 复合纳米粒子大的比表面积又增加了酶的负载量, 从而提高了传感器的响应电流, 该传感器的检测线性范围  $8.0 \times 10^{-13} \sim 1.0 \times 10^{-10}$  mol/L, 检测限达到  $4.0 \times 10^{-13}$  mol/L。

TiO<sub>2</sub> 纳米材料作为一种化学性质稳定、光催化效率高的半导体催化材料, 多被应用于对有机磷农药的光催化、超声催化降解等研究。PbO<sub>2</sub> 纳米粒子具有电催化活性, 在被施加一定工作电压的条件下, 可以产生氧化能力极强的 HO· 和 HO<sub>2</sub>·。卫银银等<sup>[37]</sup>研制的 AChE/PbO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>/Ti 电化学生物传感器, 利用 PbO<sub>2</sub> 粒子的电催化活性, 将其沉积在 TiO<sub>2</sub> 薄膜表面, TiO<sub>2</sub> 光催化和 PbO<sub>2</sub> 电催化相互促进, 参与胆碱酯酶的氧化反应, 增强氧化电流, 提高了传感器检测有机磷农药敌百虫的灵敏度, 其检测线性范围 0.01~20 μmol/L, 检测限高达 1 nmol/L。

Shulga 等<sup>[38]</sup>采用电化学沉积法在 Au 电极表面沉积一层 Au 纳米粒子, 然后将乙酰胆碱酯酶固定在电极上, 制成有机磷单酶生物传感器; 由

于 Au 纳米颗粒可以大幅度提高固定化酶的催化活性, 使传感器的响应电流增大, 明显提高了检测灵敏度。Li 等<sup>[39]</sup>将普鲁士蓝沉积在纳米 Au-PAMAM 复合物上, 制成电化学传感器; 普鲁士蓝作为电子媒介体, 可降低检测的过电位, 减少检测过程中的干扰; 纳米 Au-PAMAM 复合物的特殊结构和导电性能可提高传感器检测灵敏度。

研究发现, 纳米 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对有机磷分子有较好的氧化还原活性。杨小凤等<sup>[40]</sup>采用滴涂方法, 用纳米 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粒子修饰玻碳电极表面, 研制出检测对硫磷的电化学传感器, 与裸露玻碳电极相比, 明显提高了对硫磷的氧化还原峰电流, 并降低了氧化峰电位, 该传感器的检测线性范围  $2.5 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L, 检测限  $1.0 \times 10^{-9}$  mol/L。

采用纳米金属/金属氧化物修饰电极的电化学传感器属于非消耗或低消耗型, 其检测性能明显好于传统的电化学传感器; 另外, 多种纳米金属/金属氧化物材料组成的复合体, 可以发挥各自的独特性能, 其性能又相互补充, 使电化学传感器的选择性、特异性等性能得到大幅度提高。

### 1.3 纳米金属/金属氧化物与化学毒剂反应机理的研究

研究纳米金属/金属氧化物与化学毒剂的反应机理是电化学传感器研究中的重要内容, 研究人员对此进行了广泛细致的研究和探讨。

Wagner 等<sup>[41~42]</sup>采用 <sup>31</sup>P、<sup>13</sup>C 核磁共振谱研究了化学毒剂分子在纳米 MgO、CaO 材料表面的反应机理; 同时, 又对纳米材料 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对化学毒剂 VX、GB、GD、HD 的反应机理进行了探讨, 并提出化学毒剂在这些纳米材料表面的吸附模型<sup>[43]</sup>(见图 4)。

Kanan 等<sup>[44]</sup>采用红外光谱法研究了有机磷化合物 DMMP、TMP、MDCP 在 WO<sub>3</sub> 表面的吸附机理; Panayotov 等<sup>[45]</sup>采用红外光谱法研究了 HD 在 TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> 表面的光催化机理; Michalkova 等<sup>[46]</sup>研究了 GB 在 MgO 表面的吸附与解吸附的动力学和热力学。

虽然纳米金属/金属氧化物与化学毒剂的反应机理研究还只是定性描述, 在学术领域仍有争议, 但为金属/金属氧化物纳米敏感膜材料电化学传感器检测化学毒剂的应用奠定了重要理论基础。

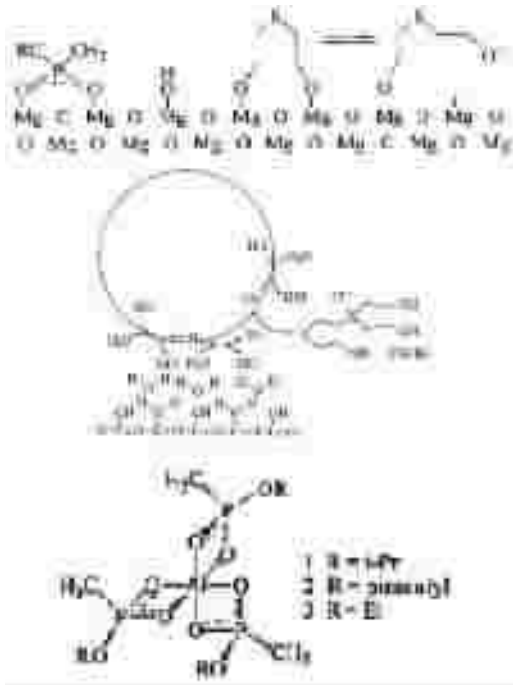


图4 化学毒剂在 MgO、CaO、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳米材料表面的吸附模型

Fig.4 Chemical agents adsorbed on nano-MgO, CaO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface

## 2 展望

纳米材料以其独特的性质在化学传感器上显示出广阔的应用前景,为环境科学、医学、国防等各个领域提供了广阔的发展空间。

目前,电化学传感器中使用单一的纳米材料越来越少,更多的是使用纳米材料的复合体,利用不同纳米材料的优点,或者是将纳米材料与功能聚合物、生物分子等相结合,使电化学传感器的各项检测性能得到大幅度的提高。

## 参考文献

- [1] Love J C, Estroff L A, Kriebel K J. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology[J]. Chem. Rev., 2005, 105: 1 103~1 169.
- [2] Hatchett D W, Josowicz M. Composites of Intrinsically Conducting Polymers as Sensing Nanomaterials [J]. Chem. Rev., 2008, 108: 746~769.
- [3] Potyrailo R A, Mirsky V M. Combinatorial and High-Throughput Development of Sensing Materials: The First 10 Years[J]. Chem. Rev., 2008, 108: 770~813.
- [4] Campo A d, Arzt E. Fabrication Approaches for Generating Complex Micro and Nanopatterns on Polymeric Surfaces[J]. Chem. Rev., 2008, 108: 911~945.
- [5] Eric Bakker. Electrochemical Sensors[J]. Anal. Chem., 2004, 76: 3 285~3 298.
- [6] Potje-Kamloth K. Semiconductor Junction Gas Sensors [J]. Chem. Rev., 2008, 108: 367~399.
- [7] Du X Y, Wang Y, Mu Y Y, et al. A new highly selective H<sub>2</sub> sensor based on TiO<sub>2</sub>/PtO-Pt dual-layer films [J]. Chem. Mater., 2002, 14 (9): 3 953~3 957.
- [8] Mazza T, Barborini E, Kholmanov I N, et al. Libraries of cluster-assembled titania film for chemical sensing[J]. Appl. Phys. Lett., 2005, 87: 103 108~103 114.
- [9] Diaz R, Arbiol J, Sanz F, et al. Electroless addition of platinum to SnO<sub>2</sub> nanopowders[J]. Chem. Mater., 2002, 14(8): 3 277~3 283.
- [10] Huang X J, Liu J H, Shao D L, et al. Rectangular made of operation for detecting pesticide residue by using a single SnO<sub>2</sub>-based gas sensor [J]. Sensors and Actuators B, 2003, 96: 630~635.
- [11] Huang X J, Wang L C, Sun Y F, et al. Quantitative analysis of pesticide residue based on the dynamic response of a single SnO<sub>2</sub> gas sensor [J]. Sensors and Actuators B, 2004, 99: 330~335.
- [12] Pan Z W, Dai Z R, Wang Z L. Nanobelts of semiconductor oxides[J]. Science, 2001, 291(9): 1 947~1 949.
- [13] Aronova M A, Chang K S, Takeuchi I, et al. Combinatorial libraries of semiconductor gas sensors as inorganic electronic nose [J]. Appl. Phys. Lett. 2003, 83: 1 255~1 257.
- [14] Goschnick J, Koroncz I, Frietsch M, et al. Water pollution recognition with the electronic nose KAMina [J]. Sensors. Actuators B, 2005, 106: 182~186.
- [15] Liu G D, Lin Y H. Electrochemical Sensor for Organophosphate Pesticides and Nerve Agents Using Zirconia Nanoparticles as Selective Sorbents [J]. Aanal. Chem., 2005, 77: 5 894~5 901.
- [16] Du D, Ye X P, Zhang J D, et al. Stripping voltammetric analysis of organophosphate pesticides based on solid-phase extraction at zirconia nanoparticles modified electrode[J]. Electrochem. Commun., 2008, 10: 686~690.
- [17] Li C Y, Wang C F, Wang C H, et al. Development of a parathion sensor based on molecularly imprinted nano-TiO<sub>2</sub> self-assembled film electrode[J]. Sensors and Actuators B, 2006, 117: 166~171.
- [18] 闵红, 曲云鹤, 卫银银, 等. Au-TiO<sub>2</sub> 纳米粒子修饰电极用于有机磷农药对硫磷的直接电化学检测的研究 [J]. 化学传感器, 2007, 27(6): 20~25.
- [19] Kobayashi Y, Martin C R. Highly Sensitive Methods for

- Electroanalytical Chemistry Based on Nanotubule Membranes[J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 3 665~3 672.
- [20] Delvaux M, Demoustier-Champagne S. Immobilization of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 18: 943~951.
- [21] Gyurcsanyi R E, Vigassy T, Pretsh E. Biorecognition – modulated ion fluxes through functionalized gold nanotubes as a novel label-free biosensing approach[J]. *Chem. Commun.*, 2003: 2 560~2 561.
- [22] Crumbliss A L, Perine S C, Stonehuerner J, et al. Colloidal Gold as a Biocompatible Immobilization Matrix Suitable for the Fabrication of the Enzyme Electrodes by Electrodeposition[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1992, 40: 483~490.
- [23] Bharathi S, Lev O. Sol-Gel-Derived Nanocrystalline Gold-Silicate Composite Biosensor [J]. *Anal. Commun.*, 1998, 35: 29~31.
- [24] Wang J, Pamidi P V A. Sol-Gel-Derived Gold Composite Electrodes[J]. *Anal. Chem.*, 1997, 69: 4 490~4 494.
- [25] Xiao Y, Ju H X, Chen H Y. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on a Colloid/Cysteamine Modified Gold Electrode [J]. *Anal. Biochem.*, 2000, 278: 22~28.
- [26] Gu H Y, Yu A M, Chen H Y. Direct Electron Transfer and Characterization of Hemoglobin Immobilized on a Au Colloid/Cysteamine Modified Gold Electrode[J]. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 516: 119~126.
- [27] Crumbliss A L, Stonehuemer J G, Henkens R W, et al. A Carrageenan Hydrogel Stabilized Colloidal Gold Multi-Enzyme Biosensor Electrode Utilizing Immobilized Horseradish Peroxidase and Cholesterol Oxidase/Cholesterol Esterase to Detect Cholesterolin Serum and Whole Blood [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1993, 8: 331~337.
- [28] Liu S Q, Yu J H, Ju H X. Renewable Phenol Biosensor Based on a Tyrosinase-Colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode[J]. *J. Electroanal. Chem.*, 2003, 540: 6 1~67.
- [29] Liu S Q, Ju H X. Reagentless Glucose Biosensor Based on Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase immobilized Colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 19: 177~183.
- [30] 唐芳琼, 韦正, 陈东, 等. 亲水金和憎水二氧化硅纳米颗粒对葡萄糖生物传感器响应灵敏度的增强作用 [J]. *高等学校化学学报*, 2000, 21(1): 91~94.
- [31] 唐芳琼, 孟宪伟, 陈东, 等. 纳米颗粒增强的葡萄糖生物传感器[J]. *中国科学(B 辑)*, 2000, 30(2): 119~124.
- [32] 孟宪伟, 唐芳琼, 冉均国, 等. 纳米颗粒复合材料增强的葡萄糖生物传感器 [J]. *化学通报*, 2001, 6: 365~367.
- [33] Zhao G, Xu J J, Chen H Y. Fabrication, Characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Multilayer Film and its Application in Promoting Direct Electron Transfer of Hemoglobin [J]. *Electrochem. Commun.*, 2006, 8(3): 148~154.
- [34] Won J, Kim M, Yi Y, et al. A Magnetic Nanoprobe Technology for Detecting Molecular Interactions in Live Cells [J]. *Science*, 2005, 309 (5731): 121~125.
- [35] 干宁, 王峰, 杨欣. 采用纳米修饰双酶电极生物传感器检测有机磷与氨基甲酸酯类农药 [J]. *农药学学报*, 2008, 10(3): 329~334.
- [36] 闵红, 曲云鹤, 李晓华, 等. Au 掺杂 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子酶传感器应用于有机磷农药检测的研究[J]. *化学学报*, 2007, 65(20): 2 303~2 308.
- [37] 卫银银, 竹俊如, 曲云鹤, 等. 光电协同催化生物传感器用于检测有机磷农药的研究 [J]. *化学传感器*, 2007, 27(4): 21~28.
- [38] Shulga O, Kirchoff J R. An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer[J]. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 935~940.
- [39] Li N B, Park J H, Park K, et al. Characterization and electrocatalytic properties of Prussian blue electrochemically deposited on nano-Au/PAMAM dendrimer-modified gold electrode [J]. *Biosensors and Bioelectronic*, 2008, 23: 1 519~1 526.
- [40] 杨小凤, 林丽, 孙东. 对硫磷在纳米氧化铝薄膜修饰电极上的电化学反应及其测定 [J]. *分析化学*, 2009, 37 (7): 1 057~1 060.
- [41] Wagner G W, Bartram P W, Koper O, et al. Reactions of VX, GD, and HD with Nanosize MgO[J]. *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103: 3 225~3 228.
- [42] Wagner G W, Koper O B, Lucas E, et al. Reactions of VX, GD, and HD with Nanosize CaO: Autocatalytic Dehydrohalogenation of HD [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104: 5 118~5 123.
- [43] Wagner G W, Procell L R, O'Connor R J, et al. Reactions of VX, GB, GD, and HD with Nanosize Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Formation of Alumino-phosphonates[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 1 636~1 644.
- [44] Kanan S M, Lu Z X, Tripp C P. A Comparative Study of the Adsorption of Chloro- and Non-Chloro-Containing Organophosphorus Compounds on WO<sub>3</sub> [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106: 9 576~9 580.

[45] Panayotov D, Kondratyuk P, Yates J T, et al. Photooxidation of a Mustard Gas Simulant over  $\text{TiO}_2$ - $\text{SiO}_2$  Mixed-Oxide Photocatalyst: Site Poisoning by Oxidation Products and Reactivation[J]. *Langmuir*, 2004, 20: 3 674~3 678.

[46] Michalkova A, Ilchenko M, Gorb L, et al. Theoretical Study of the Adsorption and Decomposition of Sarin on Magnesium Oxide [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108: 5 294~5 303.

## 《化学传感器》征订启事

《化学传感器》是经国家科委批准,由中国仪器仪表学会主办的专业科技刊物,1981年创刊,国内外公开发行人,国内统一刊号 CN 32-1406/TP,国际标准刊号 ISSN 1008-2298。本刊的主要任务是交流有关化学传感器的研制、理论研究、在各个领域的应用、仪器及与微机联用技术等方面的学术论文、促进化学传感器在各生产科技部门的普及与推广应用。是冶金、地质、卫生防疫、环境保护、食品检验、生理医学、化工、农业、国防、科研、大专院校等一切从事化学分析、工业过程控制与自动检测的科技工作者的理想工具,得力助手。得到了广大化学分析科技工作者及有关大专院校师生的热情支持和好评。

本刊每年出版四期,每期定价 5.00 元、全年 20.00 元(内含邮费),欢迎单位及个人订阅。本刊各期刊物尚有少量库存,需要者可来函补订。

邮局汇款:225500 江苏省姜堰市八二二信箱《化学传感器》编辑部 收

银行汇款:收款单位:江苏江分电分析仪器有限公司(注明汇款用途)

开户银行:中国银行姜堰市支行 帐号:17417408091001

电话:0523-88819706 传真:0523-88819768

<http://www.jiangfen.com.cn> E-mail:chxj.jy@public.tz.js.cn

本刊已参加“全国非邮报刊联合征订”,并入编《全国非邮发报刊联合征订目录》。联订服务部在国际互联网上的网站现已开通(网址:www.lhzd.com),《联订目录》及本刊均已上网,欢迎上网查阅期刊、下载“电子订单”并订阅期刊。

《化学传感器》编辑部

# 基于乙酰丙酮席夫碱为中性载体的高选择性铝离子电极的研究

邹志芬, 袁若\*, 柴雅琴, 郭俊香

(西南大学化学化工学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:** 该文报道了基于双(2-氨基苯酚)乙酰丙酮为中性载体的一种 PVC 膜离子选择性电极的研制。该电极对  $\text{Al}^{3+}$  具有较好的电位响应性能和选择性, 电极在  $\text{pH}=3.0$  的硝酸盐缓冲体系中对  $\text{Al}^{3+}$  呈近能斯特响应, 线性响应范围为  $5.5 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ , 斜率为  $(19.7 \pm 0.3) \text{ mV/decade}$ , 检测下限为  $2.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。采用紫外分光光度法和膜交流阻抗技术研究了该席夫碱与  $\text{Al}^{3+}$  的响应机理。将其初步应用于电位滴定和废水中  $\text{Al}^{3+}$  回收率的测定, 获得较满意的结果。

**关键词:** 双(2-氨基苯酚)乙酰丙酮; 铝离子电极; PVC 膜

## Study of highly selective aluminum (III) membrane sensor based on acetylacetonato Schiff base as ionophore

Zou Zhi-fen, Yuan Ruo\*, Chai Ya-qin, Guo Jun-xiang

(Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** A poly (vinyl chloride) (PVC) membrane sensor for aluminum ion ( $\text{Al}^{3+}$ ) is prepared by using bis (2-aminophenol) acetylacetonato as ionophore. The electrode exhibits good response and selectivity to aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ), it exhibits a linear range of  $5.5 \times 10^{-6}$  to  $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ , with a Nernstian slope of  $(19.7 \pm 0.3) \text{ mV/decade}$ , and the detection limit of  $2.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  in  $\text{pH}=3.0$ . Furthermore, alternating current (ac) impedance and UV-Visible spectra are used to investigate the  $\text{Al}^{3+}$  response mechanism. It was successfully used as an indicator electrode in the determination of aluminum in potential titration and applied to the recovery of determination with satisfactory results.

**Key words:** bis(2-aminophenol) acetylacetonato; aluminum ion sensor; PVC membrane

## 0 引言

铝离子作为地壳中最丰富的金属元素之一, 约占地壳质量的 8%。随科技发展, 铝制品和含铝化合物被广泛地应用于汽车, 机械, 包装材料, 电子产品, 建筑材料等中<sup>[1]</sup>。然而, 过量的铝会对动植物和人体产生有害的影响, 酸性土壤中铝离子会对作物生长产生毒害作用。医学研究表明, 铝与老年痴呆症有关, 此外骨骼和中枢神经系统中过量的铝会导致骨质疏松, 并改变血脑屏障的功

能, 严重影响人体健康<sup>[2-3]</sup>。对于铝离子的测定, 已有不少报道, 主要采用的分析方法有荧光测定<sup>[4]</sup>、分光光度法<sup>[5]</sup>、电感耦合等离子体质谱法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>, 但这些方法普遍存在价格昂贵, 耗时长和样品预处理复杂等特点。离子选择性电极是一种直接的分析方法, 所需设备简单, 载体易于合成, 测试快速、成本低, 而且不需任何预处理。该文实验室采用一些化合物为载体成功研制了各类离子选择性电极<sup>[9-12]</sup>。在此基础上该文选择了原料易得、合成简便的双(2-氨基苯



酚)乙酰丙酮作为中性载体,制备了一种能在较宽的范围内优先响应铝离子的 PVC 选择性电极,该电极具有检测下线低、响应时间短、稳定性好等优点,连续使用两个月,性能未见明显下降。将该电极作为指示电极用于铝离子的电位滴定,并测定了废水中铝离子的回收率,获得比较满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

电极电位和 pH 值用 MP230 pH 计 (瑞士 Mettler Toledo 公司)及 PHS-3C 型酸度计(上海大中分析仪器厂)测定;采用紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司 Lambda 17)测定 UV-Visible 谱;研究中性载体膜的交流阻抗行为,采用 IM6e 型交流阻抗测试系统 (德国 Zahner Elektrick 公司, D-6450 型),频率范围为:  $10^{-2} \sim 10^6$  Hz (20 °C)。载体双(2-氨基苯酚)乙酰丙酮按文献[13]方法合成,结构如图 1。增塑剂邻硝基苯基辛基醚按文献[14]

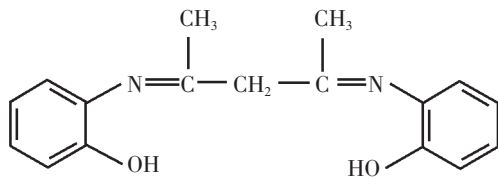


图 1 载体双(2-氨基苯酚)乙酰丙酮的结构

Fig.1 Structure of bis-(2-hydroxyanil) acetylacetonate

方法合成。所有使用试剂均为分析试剂级别,采用二次蒸馏水配置所需溶液。

### 1.2 电极的制备

以电极对  $Al^{3+}$  性能响应范围为优化目标函数,采用正交试验法选择最佳电极膜组成,得  $Al^{3+}$  最佳电极膜组成为:  $w$  (载体) = 2.9%,  $w$  (PVC) = 64.9%,  $w$  (邻硝基苯基辛基醚) = 32.2%。按常规方法制备 PVC 膜,配成 PVC 膜电极<sup>[15]</sup>。电极电位由下列电池测定:

$Ag-AgCl | KNO_3 (1.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}) || \text{PVC 膜} | \text{测试液} | KCl(\text{饱和}), Hg, Hg_2Cl_2$

## 2 结果与讨论

### 2.1 电极的电位响应性能

将各种常见金属离子对应的硝酸盐配制成溶液,用自制的 PVC 膜电极在 pH=3.0 的硝酸盐缓冲体系中测试了不同阳离子的电位响应,如图 2 所示与其它金属离子相比较,电极优先响应  $Al^{3+}$ ,并呈现较好的响应。研究表明,增塑剂的性质和载体含量的不同对离子选择性电极的响应性能有很大的影响,因此,实验中研究了以邻硝基苯基辛基醚 (*o*-NPOE)、癸二酸二正辛酯(DOS)和邻苯二甲酸二正辛酯(DOP)等不同增塑剂,以及不同载体含量制备的电极对  $Al^{3+}$  电位响应性能(表 1)。实验发现,以 *o*-NPOE 为增塑剂的膜电极对铝离子的电位响应明显好于其它几种增塑

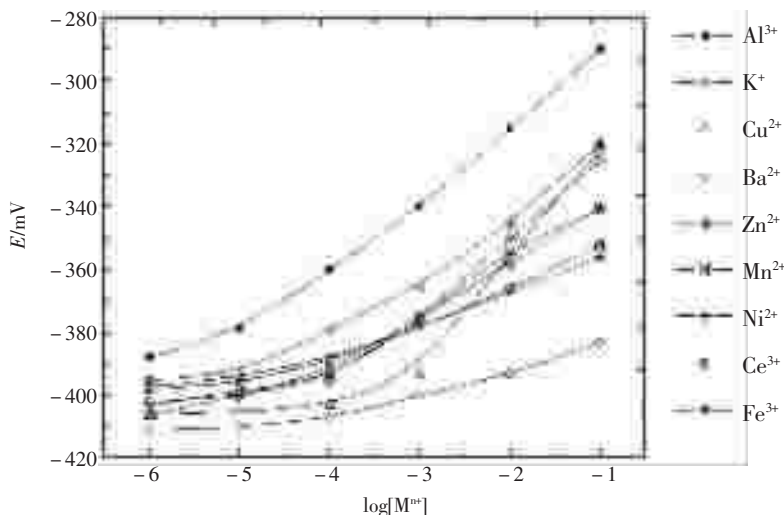


图 2 电极对不同金属离子的响应

Fig.2 Potential responses of different ions with aluminium selective electrode

剂, 后续实验选择 *o*-NPOE 为增塑剂进行测试, 得到电极的最佳膜组成为  $w(\text{载体}) = 2.9\%$ ,  $w(\text{PVC}) = 64.9\%$ ,  $w(\text{邻硝基苯基辛基醚}) = 32.2\%$ 。电极在  $5.5 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1}$  mol/L 线性范围内对

$\text{Al}^{3+}$  呈近能斯特响应, 斜率为  $(19.7 \pm 0.3)$  mV/decade, 检测下限为  $2.6 \times 10^{-6}$  mol/L, 响应时间为 20 s, 电极呈现优良的重现性和稳定性, 在连续使用两个月后, 其响应性能未见明显下降。

表 1 电极膜的组成以及不同电极对  $\text{Al}^{3+}$  的响应性能

Tab.1 Composition of membranes and their potential response characteristics in  $\text{Al}^{3+}$  ion

No.	Composition of membrane/(w)			Slope/(mV/dec)	Linear range/(mol/L)	Detection limit/(mol/L)
	PVC	Plasticizer	Ionophore			
1	32.5	<i>o</i> -NPOE, 65.0	2.5	16.5	$6.2 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$4.3 \times 10^{-5}$
2	31.6	<i>o</i> -NPOE, 65.1	3.3	18.7	$7.9 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$2.6 \times 10^{-5}$
3	31.9	<i>o</i> -NPOE, 64.1	4.0	17.5	$3.3 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$0.9 \times 10^{-5}$
4	32.2	<i>o</i> -NPOE, 64.9	2.9	19.7	$5.5 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$2.6 \times 10^{-6}$
5	32.1	<i>o</i> -NPOE, 63.2	4.7	21.0	$4.1 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$2.4 \times 10^{-6}$
6	31.5	DOS, 62.7	4.8	15.3	$7.9 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$4.5 \times 10^{-5}$
7	32.9	TBP, 64.3	2.8	22.1	$4.2 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-6}$

## 2.2 pH 值对电极性能的影响

溶液的 pH 值对电极的响应性能有很大的影响。以硝酸缓冲体系(用 NaOH 和  $\text{HNO}_3$  调节)配制了不同 pH 值下浓度为  $1.0 \times 10^{-3}$  和  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的  $\text{Al}^{3+}$  溶液, 测试了以双水杨醛缩乙酰丙酮为载体的 PVC 膜电极对  $\text{Al}^{3+}$  的电位响应性能, 如图 3。结果表明: 在溶液 pH 值为 2.0~6.0 范围内电极电势基本稳定。当 pH 值低于 2.0 时, 这可能是由于  $\text{H}^+$  能与载体发生作用, 随着溶液 pH 值降低,  $\text{H}^+$  浓度增加, 这种作用会增强, 使其电位响应变差, 干扰增大。当 pH 值高于 6.0, 随着  $\text{OH}^-$  浓度的增加,  $\text{Al}^{3+}$  发生水解, 导致溶液中  $\text{Al}^{3+}$  浓度

减小, 随着溶液中值升高, 这种作用会增强, 干扰增大。

## 2.3 电极的选择性

离子选择性电极最重要的特性就是它对溶液中某种特定离子的响应, 用离子选择性系数 ( $K_{ij}^{\text{pot}}$ ) 来表示, 它表示被测离子 *i* 与共存干扰离子 *j* 的选择性系数。选择性系数值越小, 则电极对 *i* 离子的选择性越好, 即 *j* 离子的干扰越小。用 pH=3.0 的硝酸溶液将各种阳离子对应的硝酸盐配制成浓度为  $1.0 \times 10^{-1}$  mol/L 的溶液, 采用分别溶液法<sup>[16]</sup>测定了常见阳离子对该  $\text{Al}^{3+}$  电极的选择性系数  $\lg K_{\text{Al}^{3+}, j}^{\text{pot}}$ , 实验结果如表 2。实验发现, 相较于其它阳离子, 该电极对  $\text{Al}^{3+}$  具有高的选择性。

表 2 铝离子电极的选择性系数 ( $\lg K_{\text{Al}, B}^{\text{pot}}$ )

Tab.2 The selectivity coefficients of proposed  $\text{Al}^{3+}$  ion-selective electrode

Interfering ions (B)	$\lg K_{\text{Al}, B}^{\text{pot}}$	Interfering ions (B)	$\lg K_{\text{Al}, B}^{\text{pot}}$
$\text{Zn}^{2+}$	-3.28	$\text{Mn}^{2+}$	-2.50
$\text{Cu}^{2+}$	-2.09	$\text{Ba}^{2+}$	-2.14
$\text{Pb}^{2+}$	-1.83	$\text{Cd}^{2+}$	-2.40
$\text{Sr}^{2+}$	-1.93	$\text{Mg}^{2+}$	-2.55
$\text{Ni}^{2+}$	-2.18	$\text{Ca}^{2+}$	-2.40
$\text{Fe}^{3+}$	-1.86	$\text{Ag}^+$	-3.28
$\text{Co}^{2+}$	-2.76	$\text{Nd}^{3+}$	-1.91
$\text{K}^+$	-4.01	$\text{La}^{3+}$	-2.33

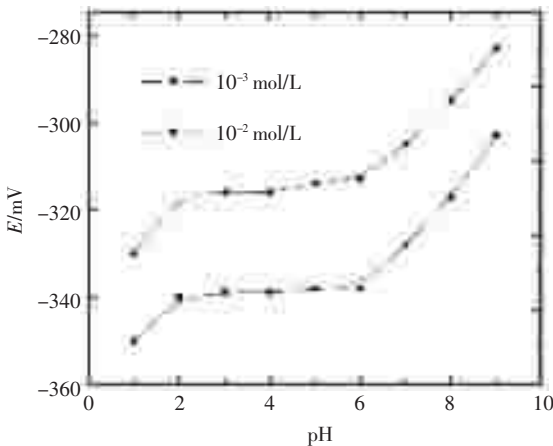


图 3 pH 值对电极响应性能的影响

Fig.3 Effect of pH on potential response at  $1.0 \times 10^{-3}$  and  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Al}^{3+}$  ion solution

## 2.4 电极响应机理的研究

为研究载体乙酰丙酮 Schiff 碱与金属离子

的作用机理,工作中取 20 mL 浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 乙酰丙酮 Schiff 碱的氯仿溶液与 20 mL 浓度为  $1.0 \times 10^{-1}$  mol/L 的  $\text{Al}^{3+}$  溶液萃取交换作用 1 h,静置 3 ~ 4 h,取下层萃取液,以氯仿为空白溶液,测定萃取交换作用前后氯仿溶液的紫外可见光谱,并与乙酰丙酮 Schiff 碱氯仿溶液的紫外可见光谱比较,其结果如图 4。结果表明,萃取前后溶液的紫外可见光谱图有明显的差异,载体与铝离子作用后最大吸收波长相长波方向红移了 10 nm(231 nm ~ 241 nm),吸收峰强度也有了明显的增强,这说明载体与  $\text{Al}^{3+}$  发生了作用。

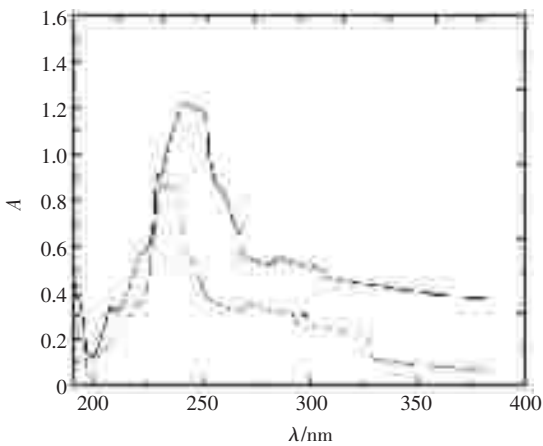


图 4 载体的氯仿溶液与  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  ( $1.0 \times 10^{-1}$  mol/L) 溶液作用前(---)与后(—)的紫外可见吸收光谱

Fig.4 UV-visible absorption spectra of chloroform solution of carrier (---) and carrier treated with  $1.0 \times 10^{-1}$  mol/L  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  (—)

在 20 °C, 频率范围为  $10^{-2} \sim 10^6$  Hz, 激励电压为 25 mV 条件下, 测试了以乙酰丙酮 Schiff 碱为载体的 PVC 膜电极对不同浓度的  $\text{Al}^{3+}$  的交流阻抗行为。图 5 的交流阻抗谱图显示, 在高频区呈现规则的膜本体及表面阻抗半圆, 在低频区可观察到 Warburg 阻抗。膜本体阻抗随着  $\text{Al}^{3+}$  浓度的增加呈下降趋势, 当  $\text{Al}^{3+}$  浓度分别为  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L,  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 和  $1.0 \times 10^{-1}$  mol/L 时, 其对应的膜本体阻抗为:  $1.37 \times 10^5 \Omega$ ,  $1.18 \times 10^5 \Omega$ ,  $9.1 \times 10^4 \Omega$ 。以上实验现象可说明,  $\text{Al}^{3+}$  参与了传输, 载体携带铝离子通过膜相的过程受扩散控制。

## 2.5 电极的初步应用

### 2.5.1 电位滴定

在硝酸盐缓冲介质(pH=3.0)中, 以饱和甘汞电极作为参比电极, 采用以乙酰丙酮 Schiff 碱为

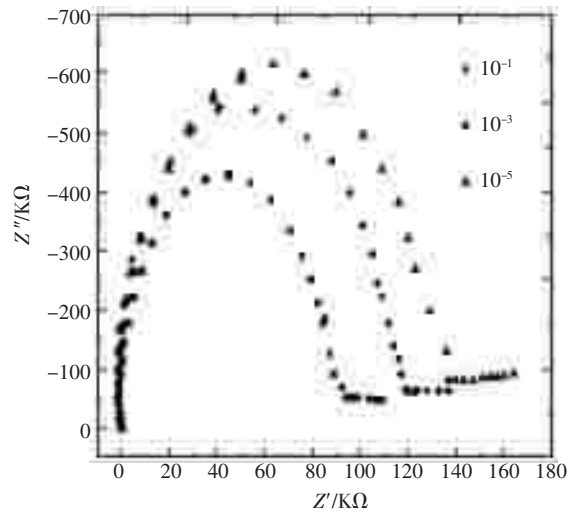


图 5 PVC 膜在不同浓度的  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液中的交流阻抗谱图

Fig.5 Impedance plots of PVC membrane in  $\text{Al}^{3+}$  solutions containing different concentration

载体的 PVC 膜电极作为指示电极, 以  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L EDTA 标准溶液作为滴定剂, 滴定 20.0 mL  $1.0 \times 10^{-1}$  mol/L  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液。结果如图 6 所示, 金属  $\text{Al}^{3+}$  的浓度随着 EDTA 的加入而降低, 电极电位发生变化, 在计量点附近电位产生突跃, 原因是 EDTA 与  $\text{Al}^{3+}$  反应生成了络合物导致电位值的改变。表明该电极可以比较准确地测定溶液中铝离子的含量。

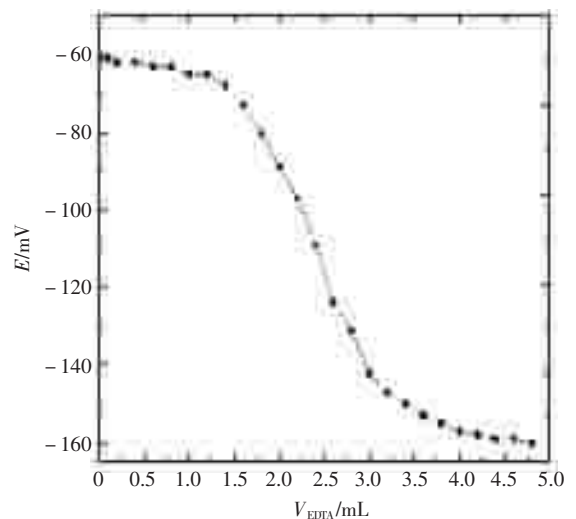


图 6 以 EDTA 标准溶液滴定  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液的电位滴定曲线

Fig.6 Potentiometric titration curve of  $\text{Al}^{3+}$  solution with EDTA

### 2.5.2 回收率实验

以饱和甘汞电极作为参比电极, 乙酰丙酮

Schiff 碱为载体的 PVC 膜电极为指示电极, 以  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液( $\text{pH}=3.0$ )为测试底物, 进行回收率

实验结果如表 3。

表 3  $\text{Al}^{3+}$  的回收率测定结果

Tab.3 Recovery of cetermination of  $\text{Al}^{3+}$

Samples	Aluminium ion			Recovery / %
	Original/( $\mu\text{g/L}$ )	Added/( $\mu\text{g/L}$ )	Found/( $\mu\text{g/L}$ )	
Waster water	35.6	50.0	81.8	92.3
River water	43.1	50.0	94.7	103.4
Tap water	24.7	50.0	72.5	96.1

## 参考文献

- [1] Matthew J S, Haddad P R. The determination of trace metal pollutants in environmental matrices using ion chromatography[J]. *Environ Int*, 2004, 30(3): 403~431.
- [2] Yokel R A, Rhineheimer S S, Brauer R D, et al. Aluminum bioavailability from drinking water is very low and is not appreciably influenced by stomach contents or water hardness[J]. *Toxicology*, 2001, 161(1): 93~101.
- [3] Yokel R A, Lidums V, Ungerstedt U. Aluminium mobilization by desferrioxamine assessed by microdialysis of the blood, liver and brain [J]. *Toxicology*, 1991, 66(3): 313~324.
- [4] Gunduz S B, Kucukkolbasy S, Atakol O. Spectrofluorimetric determination of trace aluminum in diluted hemodialysis solutions [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2005, 61(5): 913~921.
- [5] 马智兰, 钱立荣, 马国荣, 等. 铝试剂分光光度法测定血清铝的研究 [J]. *环境与健康杂志*, 1999, 16 (4): 299~230.
- [6] 陈杭亭, 曹淑琴, 曾宪津. 电感耦合等离子体质谱方法在生物样品分析中的应用[J]. *分析化学*, 2001, 29(5): 592~600.
- [7] Frankowski M, Frankowska A Z, Siepak J. New method for speciation analysis of aluminium fluoride complexes by HPLC-FAAS hyphenated technique [J]. *Talanta*, 2010, 80(5): 2 120~2 126.
- [8] Frankowska A Z, Frankowski M, Siepak J. Development of a new analytical method for online simultaneous qualitative determination of aluminium (free aluminium ion, aluminium-fluoride complexes) by HPLC-FAAS[J]. *Talanta*, 2009, 78(2): 623~630.
- [9] Yuan R, Chai Y Q, Liu D, et al. Schiff base complexes of cobalt (II) as neutral carriers for highly selective iodide electrodes[J]. *Anal Chem*, 1993, 65(19): 2 572~2 575.
- [10] L Xu, R Yuan, Y Z Fu, et al. Potentiometric membrane electrode for salicylate based on an organotin complex with a salicylal Schiff base of amino acid [J]. *Anal Sci*, 2005, 21(3): 287~292.
- [11] Zhou W, Chai Y Q, Yuan R, et al. Organically nanoporous silica gel based on carbon paste electrode for potentiometric detection of trace Cr (III)[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 647(2): 210~214.
- [12] Ma Y H, Yuan R, Chai Y Q, et al. A new aluminum(III)-selective potentiometric sensor based on N,N'-propanediamide bis(2-salicylideneimine) as a neutral carrier[J]. *Mat Sci Eng, C*, 2010, 30(1) 209~213.
- [13] Niasari M S. Ship-in-a-bottle synthesis, characterization and catalytic oxidation of styrene by host (nanopores of zeolite-Y)/guest ([bis(2-hydroxyanil) acetylacetonato manganese (III)]) nanocomposite materials (HGNM)[J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2006, 95(1) 248~256.
- [14] Horning E C. *Organic Syntheses Collect. Vol. III* [M]. New York: Wiley, 1955. 140~146.
- [15] Moody G L, Oke R B, Thomas J D R. As Calcium-Sensitive Electrode Based on a Liquid Ion Exchanger in a Poly (Vinyl Chloride) Matrix [J]. *Analyst*, 1970, 95 (1 136): 910~918.
- [16] Umezawa Y, Umezawa K, Sato H. Recommended methods for reporting  $K_{A,B}^{\text{pot}}$  values Commission on Analytical Nomenclature [M]. *Pure Appl Chem*, 1995, 67(3): 507~518.

# 一种新型的检测阿特拉津的酪氨酸酶传感器的研制

张智慧, 应淑华, 史汶灵, 范小雪, 黄杉生\*  
(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

**摘要:** 采用自组装的方法制备了酪氨酸酶传感器, 运用循环伏安法探讨了该传感器的电化学特性, 研究了阿特拉津在该修饰电极上的电化学行为。实验结果表明, 阿特拉津在该修饰电极上具有良好的电流响应。阿特拉津在  $8.7 \times 10^{-7} \sim 8.2 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内, 电流与浓度有良好的线性关系, 线性方程为  $I_p = -0.328c(\text{Atr}) + 4.414$ , 相关系数为 0.993 4, 检出限为  $5.4 \times 10^{-7}$  mol/L (信噪比为 3)。

**关键词:** 检测; 阿特拉津; 酪氨酸酶; 循环伏安法

## A new tyrosinase biosensor for the determination of atrazine

Zhang Zhi-hui, Ying Shu-hua, Shi Wen-ling, Fan Xiao-xue, Huang Sha-sheng\*  
(Life and Environmental College, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

**Abstract:** A new tyrosinase sensor for the determination of atrazine was prepared. Its electrochemical behaviour was elucidated by cyclic voltammetry (CV). The biosensor can be used for the determination of atrazine in the range of  $8.7 \times 10^{-7} \sim 8.2 \times 10^{-5}$  mol/L with a detection limit of  $5.4 \times 10^{-7}$  mol/L. The linear regression equation is  $I_p = -0.328 c(\text{Art}) + 4.414$  with a correlation coefficient of 0.993 4.

**Key words:** detection; atrazine; tyrosinase; cyclic voltammetry(CV)

### 0 引言

随着农药的大量使用或滥用, 导致农药在食品和环境中的残留量严重超标, 因此农药所带来的生态与环境问题日益严重。由农药中毒引起的事件和在对外农产品贸易中引发的争端时有发生。因此对农药残留量的检测引起了人们越来越多的关注, 发展一种灵敏、快速、实用、可靠的农残检测方法尤为紧迫<sup>[1]</sup>。近年来, 在许多国家及地区的地下水、地表水以及大气沉降物中都检测出了阿特拉津的残留物, 其对生态环境的影响具有全球性, 在土壤中的保留期长且对粮食和食品安全造成潜在威胁, 并影响人体的内分泌系统及生殖系统<sup>[2]</sup>, 因此深入研究阿特拉津的生态风险问题是当务之急。

阿特拉津(简称为 atr, 下同), 又叫莠去津, 化

学名为 2-氯-4-乙氨基-6-异丙氨基-1,3,5-三嗪, 系均三氮苯类农药, 是一种人工合成的化学除草剂。化学结构式如图 1 所示。目前, 阿特拉津检测方法有色谱法、电流分析法和 ELISA 法等<sup>[3~8]</sup>, 但这些方法不适宜现场快速实时检测。近年来, 简单快速的使用免疫快速检测、生物和电化学生物传感器等技术来检测农残含量已经取得较快发展。

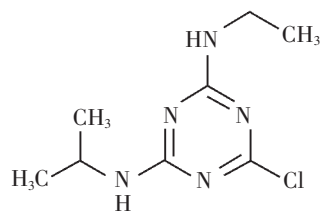


图 1 阿特拉津的分子结构

Fig.1 The molecular structure of ATR



该论文通过层层自组装的方法在电极上固定酪氨酸酶,利用阿特拉津对酪氨酸酶的抑制作用来实现对阿特拉津残留量的检测。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

酪氨酸酶(由蘑菇中取得,5 370 U/mg)购于 Sigma 公司; L-半胱氨酸(L-Cys, 97%)购自 Sigma 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)由 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  配制,并用 0.1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 值。其余试剂均为分析纯,实验用水均为超纯水。

透射电子显微镜 (TEM, JEM-2010, 日本); 循环伏安(CV)和电化学阻抗谱图(EIS)的测量在 CHI 660B 电化学分析仪(上海辰华仪器公司, 中国)上进行,采用三电极体系:修饰电极为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极(SCE); 测试底液为 5 mL 0.1 mol/L PBS (0.5 mol/L NaCl, pH7.0)。所有的实验条件均在室温下进行。

### 1.2 传感器的制备

#### 1.2.1 纳米银的制备

参照文献[9]的方法,在剧烈搅拌的条件下,将一定体积  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的  $\text{AgNO}_3$ , 溶液按体积比 1:3 逐滴加入到  $2.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的  $\text{NaBH}_4$  溶液中,制得的银溶胶呈亮黄色,通过透射电镜观察(图 2),纳米银的平均粒径为 15 nm。纳米银的紫外可见光谱表明,在 470 nm 处出现了吸收峰,是纳米银的特征吸收峰。

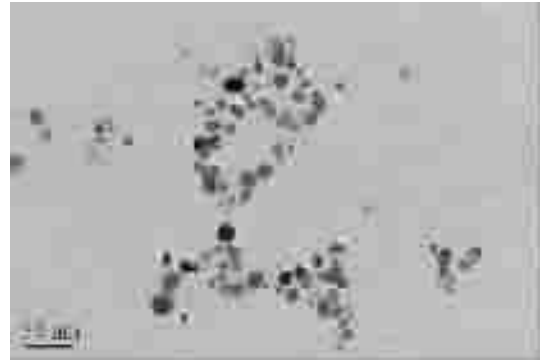


图 2 纳米银的透射电镜图

Fig.2 TEM image of Ag nanoparticles

#### 1.2.2 电极的制备

金电极分别用 1.0、0.3、0.05 mm 的氧化铝粉末抛光,直至产生一个光亮、平滑的表面。电极分别置于硝酸、无水乙醇、超纯水里超声清洗 3 min 后,在 0.5 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中于  $-0.35 \sim 1.70$  V 的电位范围内,以 100 mV/s 的速度循环扫描至电流稳定为止。电极用超纯水彻底清洗后,并用氮气将其表面吹干。将处理好的电极浸泡于 0.1 mol/L 除氧的 L-半胱氨酸水溶液中,置黑暗处 7 h,得到 L-半胱氨酸修饰电极。用超纯水彻底清洗以除去 L-半胱氨酸的物理吸附之后,将电极浸泡于自制的银溶胶 12 h 得到纳米银/L-半胱氨酸修饰的金电极。用 PBS(pH7.0)洗涤修饰电极,并将电极浸于 5 mg/mL 的酪氨酸酶(pH7.0 PBS)溶液中,置于冰箱过夜后取出,最后电极在 25% 的戊二醛溶液中浸泡半个小时,取出后彻底用 PBS 洗涤干净。电极不用时保存在  $4^\circ\text{C}$  下 0.1 mol/L PBS(pH7.0)中。电极表面的修饰过程见图 3。

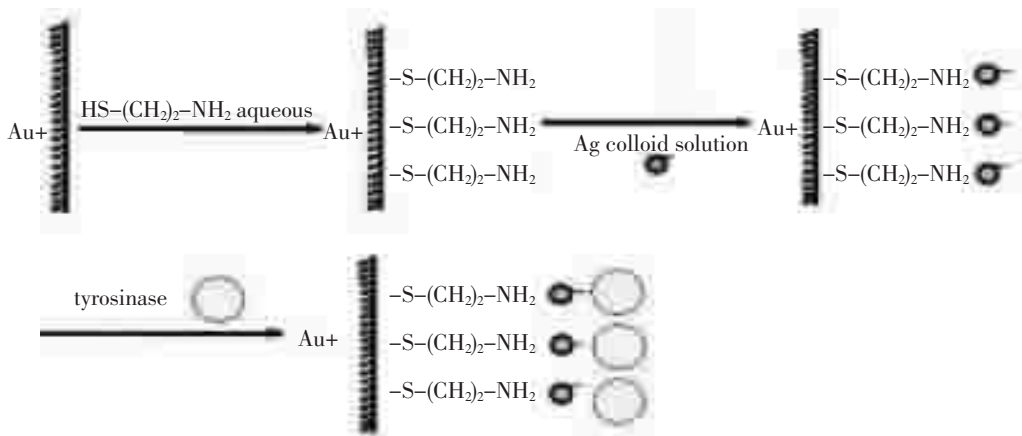


图 3 电极的组装过程

Fig.3 The assembly process of the electrode

## 2 结果与讨论

### 2.1 修饰电极在 PBS 中的电化学行为

图 4 为不同修饰电极进行循环伏安曲线。在  $-0.25 \sim 0.68 \text{ V}$  的电位范围内, 在  $0.1 \text{ mol/L}$  PBS (pH7.0) 中, 裸的 Au (曲线 a)、L-cys /Au (曲线 b) 均没有明显的氧化还原峰; 然而对于纳米银粒子修饰的电极 nano-Ag/ L-cys /Au (曲线 c), 则出现了一对比较对称的氧化还原峰, 但峰电流较小; 当电极上修饰上酪氨酸酶后, tyrosinase / nano-Ag/ L-cys /Au (曲线 d), 则出现了一对峰形对称的氧化还原峰 ( $E_{pa} = 0.285 \text{ V}$ ,  $E_{pc} = 0.054 \text{ V}$ ), 这是由于固定在电极表面的酪氨酸酶的电活性中心发生电子转移所产生, 与文献报道的结果相近<sup>[10]</sup>。

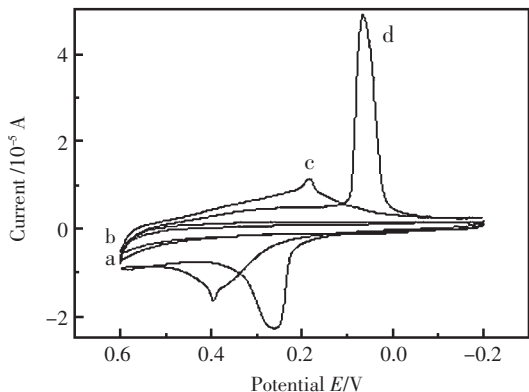


图 4 修饰电极在  $0.1 \text{ mol/L}$  PBS (pH7.0) 中的循环伏安图  
(a) 裸 Au; (b) L-cys /Au; (c) nano-Ag/ L-cys /Au;  
(d) tyrosinase / nano-Ag/ L-cys /Au; 扫描速度:  $100 \text{ mV/s}$   
Fig.4 The cyclic voltammograms of every layer modified electrodes in  $0.1 \text{ mol/L}$  PBS (pH7.0) Scan rate:  $100 \text{ mV/s}$

### 2.2 电极层层自组装过程的电化学阻抗谱图

电化学阻抗谱图 (EIS) 可用来表征电极表面每一步修饰过程中的变化, 图 5 显示了层层修饰的电化学阻抗图谱的 Nyquist 曲线。从图 5 可以看出, 裸金电极的阻抗图 (bare Au, 曲线 a) 是一个直径较大的半圆, 阻抗值约为  $500 \Omega$ 。在金电极上修饰上 L-半胱氨酸后 (L-cys /Au, 曲线 b), 其阻抗急剧下降。当电极上修饰纳米银之后 (nano-Ag/ L-cys /Au 曲线 c) 阻抗值继续减小, 这是由于纳米银促进  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  间的转移。当酪氨酸酶修饰到电极表面上, 可以看到阻抗明显增大 (tyrosinase/nano-Ag/L-cys/Au, 曲线 d), 这是因为电极表面吸附上的酶阻碍了  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  在

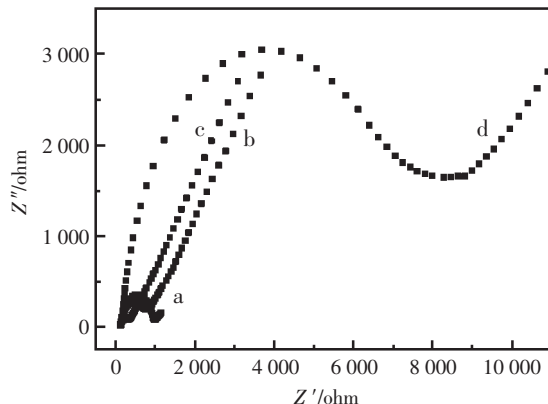


图 5 不同修饰层电极的阻抗谱图  
(a) 裸 Au; (b) L-cys /Au; (c) nano-Ag/ L-cys /Au;  
(d) tyrosinase / nano-Ag/ L-cys /Au

Fig.5 The EIS images of different layers modified electrodes

电极表面的电子传递。修饰电极制备过程中阻抗的变化表明了酪氨酸酶已经被修饰在电极的表面上。

### 2.3 生物传感器响应性能的测定

图 6 显示酶修饰电极在  $0.1 \text{ mol/L}$  PBS (pH7.0) 溶液中与依次加入一定量的阿特拉津的循环伏安图。由图 6 可见, 随着加入的阿特拉津量的增加, 峰电流变小。这是由于阿特拉津对酪氨酸酶的活性有抑制作用。当阿特拉津浓度在  $8.7 \times 10^{-7} \sim 8.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  范围内与其峰电流成良好的线性关系 (图 6 插图), 其线性回归方程为  $I_p = -0.328 c(\text{atrazine}) + 4.414$ , 相关系数为  $-0.9934$ , 其检出限为  $5.4 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  (3 倍信噪比)。

### 2.4 实验最佳条件的选择

#### 2.4.1 pH 的选择

考察了 pH 值对传感器响应电流的影响 (图 7)。当底液中的 pH 小于 7 时, 响应电流随着 pH 的增大而增大; 当 pH=7 时响应电流达到最大值, 此时酪氨酸酶的活性最好; 与文献报道的酪氨酸酶保持最佳活性的 pH 范围基本一致<sup>[11]</sup>。当 pH 大于 7 时, 响应电流随着 pH 的增大反而减小, 这是因为酶的活性逐渐下降。因此实验选择 pH 值为 7.0 的 PBS 作为支持电解质。

#### 2.4.2 温度的选择

温度是影响酶活性的另一个重要因素, 图 8 考察了温度对传感器响应电流的影响。当温度在  $20 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$  范围内酶的活性随温度的升高略有增加, 但变化不大。当超过  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  时响应电流急剧下

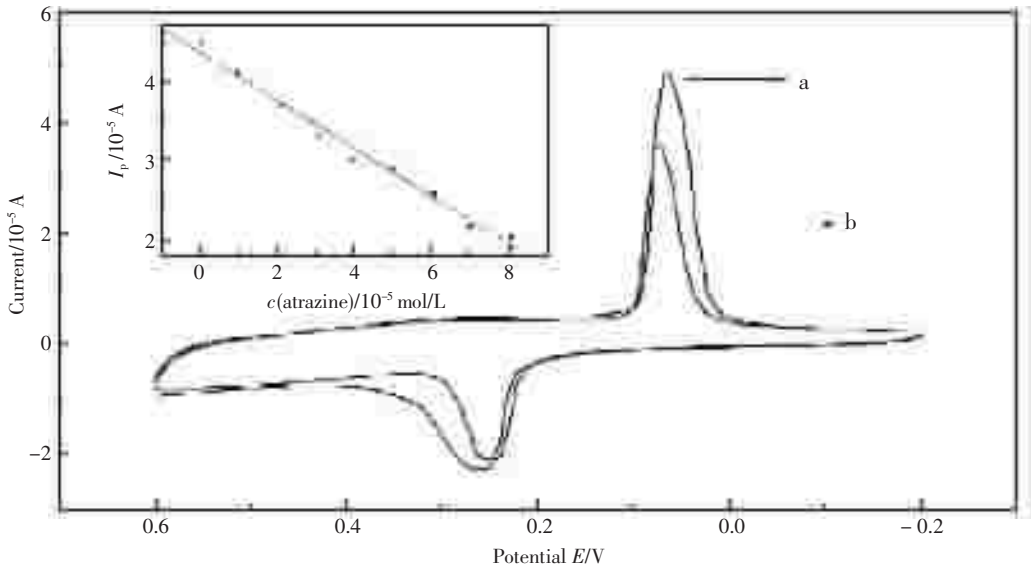


图 6 阿特拉津在 tyrosinase / nano-Ag/ L-cys /Au 修饰电极的响应  
(a)  $1 \times 10^{-6}$  mol/L; (b)  $2.9 \times 10^{-5}$  mol/L; 底液: 0.1 mol/L PBS (pH7.0); 扫速: 100 mV/s;  
插图: 阿特拉津的电流响应校正曲线

Fig.6 Response of atrazine at modified electrodes in 0.1mol/L PBS (pH7.0)  
Inset: Calibration of current response of atrazine at tyrosinase / nano-Ag/ L-cys /Au

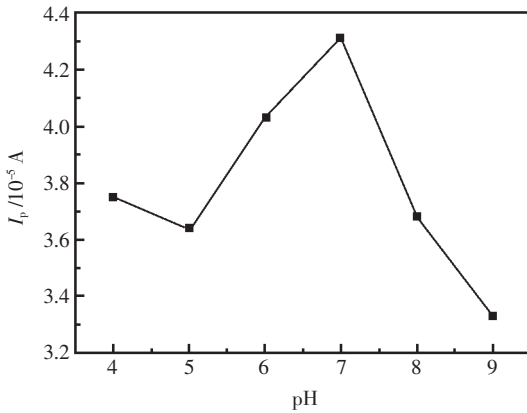


图 7 不同 pH 对传感器响应电流的影响  
Fig.7 Effect of pH on the current response of modified electrodes

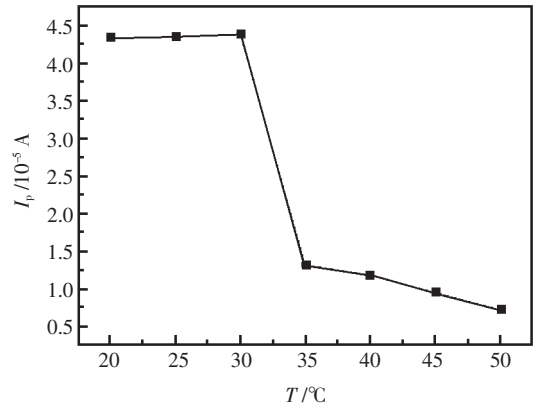


图 8 温度对传感器响应电流的影响  
Fig.8 Effect of temperature on the current response of modified electrodes

降,这是由于温度过高时会导致酶部分失活。与文献报道的酪氨酸酶保持最佳活性的温度范围基本一致<sup>[12]</sup>。因此实验选择 30 °C 作为实验温度。

#### 2.4.3 纳米粒子对传感器的影响

研究了纳米粒子对传感器的影响(图 9)。曲线 a 为加入纳米银粒子传感器的连续电流响应;曲线 b 为无纳米银粒子的情况下传感器的连续电流响应。结果显示纳米银修饰的传感器比较稳定。这不仅是因为纳米银对酪氨酸酶有较强的吸附作用,可以防止酪氨酸酶的脱离;更重要的是

纳米粒子的引入,可以大幅度的提高电流响应的灵敏度<sup>[13~16]</sup>。

#### 2.4.4 电极的重现性、稳定性及干扰实验

在 5 mL 0.1 mol/L PBS (pH=7.0) 的溶液加  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 阿特拉津,连续测定 7 次,得到相对标准偏差(RSD)为 3.9%,说明该传感器有较好的重现性。当该传感器不用时,置于 4 °C 的 PBS (pH=7.0) 溶液中保存。一周后,该传感器活性仍能达到其初始信号的 91.5%。说明此电极具有良好的稳定性。

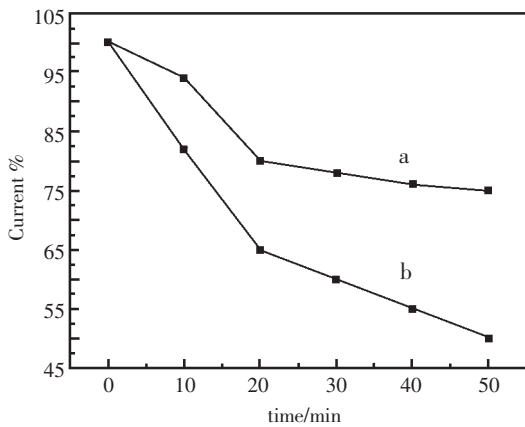


图9 纳米粒子对传感器响应电流的影响

(a)含纳米银颗粒;(b)不含纳米银颗粒(假定初始电流为100%)

Fig.9 Current responses of modified electrodes containing Ag nanoparticles or not

为了考察该酪氨酸酶传感器的抗干扰性,在 $1 \times 10^{-6}$  mol/L 阿特拉津溶液中分别加入一定浓度的2,4-二氯苯酚、敌草隆、L-赖氨酸和尿酸进行测定,以干扰物质造成的误差在5%之内作为干扰指标。结果发现,50倍的L-赖氨酸和尿酸对阿特拉津的测定不产生明显干扰,当2,4-二氯苯酚、敌草隆的浓度超过阿特拉津的25倍时,即产生干扰,可能是这些物质在修饰电极上的电活性电位与阿特拉津相同,这表明酶传感器的抗干扰性较好。

#### 2.4.5 实际样品的测定及回收率

取不同的浓度的未知样品作为待测的实际样品,以上述方法测定阿特拉津浓度,结果见表1。在上述的3份实际样品中分别加入10.0  $\mu$ mol/L 阿特拉津标准溶液,进行回收率测定,结果

表1 样品的检测( $n=3$ )

Tab.1 The determination results of samples ( $n=3$ )

试样 Sample	测定值 Detection /( $\mu$ mol/L)	加入量 Addition /( $\mu$ mol/L)	测定总量 Found / ( $\mu$ mol/L)	回收率 Recovery /%
1	0.8	10.0	11.3	105
2	4.3	10.0	14.8	103
3	2.1	10.0	11.5	95

也列入表1,该方法测定的回收率为95%~105%。说明该方法制备的酪氨酸酶传感器为测定阿特拉津实际含量提供了一种较为精确的方法。

### 3 结论

基于 tyrosinase / nano-Ag / L-cys /Au 的新型酪氨酸酶传感器,有良好的重现性和稳定性。它为浓度范围介于 $8.7 \times 10^{-7} \sim 8.2 \times 10^{-5}$  mol/L 之间阿特拉津的检测提供了一个简单、廉价的方法,最低检测限为 $5.4 \times 10^{-7}$  mol/L (3 倍信噪比)。

#### 参考文献

- [1] 黎其万, 潘灿平. 环境和食品中农药残留快速检测技术研究进展[J]. 西南农业学报, 2002, 17(2): 248~252.
- [2] Nalina S, Elizabeth D. A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer [J]. Critical Reviews in Toxicology, 1997, 27: 599~613.
- [3] 任晋, 蒋可. 阿特拉津及其降解产物对张家口地区饮用水资源的影响[J]. 科学通报, 2002, 47: 758~762.
- [4] Tomkins B A, Ilgner R H. Determination of atrazine and

four organophosphorus pesticides in ground water using solid phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography with selected-ion monitoring [J]. J. Chromatogr. A, 2002, 972: 183~194.

- [5] Ferrer I, Hennion M C, Barceko D. Immunosorbents Coupled On-Line with Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry for the Part per Trillion Level Determination of Pesticides in Sediments and Natural Waters Using Low Preconcentration Volumes [J]. Anal. Chem., 1997, 69 (22), 4 508~4 514.
- [6] Granby K, Andersen J H, Chritensen H B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal. Chim. Acta, 2004, 520(2): 165~176.
- [7] Chicharro M, Zapardiel A, Bermejo E, et al. Determination of 3-amino-1, 2, 4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis [J]. Talanta, 2003, 59(1): 37~45.
- [8] Betran J, Lopez F, Fencada M, et al. Microextraction pro-

- cedures combined with large volume injection in capillary gas chromatography for the determination of pesticide residues in environmental aqueous samples [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 356(2): 125~133.
- [9] 高新义, 黄晓东. 聚天青 A 和纳米银修饰破碳电极的葡萄糖生物传感器 [J]. *Detection & Analysis*, 2007, 10(1):30~32.
- [10] 魏洽, 颜流水, 王承宜, 等. 电聚吡咯固定化酪氨酸酶电极的制备及性能[J]. *江西科学*, 1999, 17(3):168~172.
- [11] Chen X, Cheng G 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(10):1728~1732.
- [12] 胡效亚, 冷宗周. 苯酚在预活化聚酰胺膜酪氨酸酶生物传感器上的响应特性[J]. *环境科学*, 1995, 16(3):1~4.
- [13] Delvaux M, Walcarius A, Demoustier-Champange S. Bi-enzyme HRP-GOx-modified gold nanoelectrodes for the sensitive amperometric detection of glucose at low overpotentials[J]. *Biosens. Bioelectr.*, 2005, 20(8): 1587~1594.
- [14] Crespilho F N, Zucolotto V, Brett C M A, et al. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-Encapsulated gold nanoparticles [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110(35):17478~17483.
- [15] Wu B Y, Hou S H, Yin F, et al. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode [J]. *Biosens. Bioelectr.*, 2007, 22(6):838~844.
- [16] 杜爱铭, 任湘菱, 唐芳琼, 等. 基于金纳米棒-壳聚糖复合膜的葡萄糖生物传感器[J]. *影像科学与光化学*, 2008, 26(4):271~279.



# 基于纳米粒子吸附的甲基对硫磷传感器研究

刘淑娟<sup>1,2\*</sup>, 谭正初<sup>1</sup>, 钟兴刚<sup>1,2</sup>

(1. 湖南省农科院茶叶研究所, 湖南长沙 410125)

(2. 湖南省茶叶检测中心, 湖南长沙 410125)

**摘要:** 将  $ZrO_2$  纳米粒子用于有机磷传感器的构造, 制成了电沉积  $ZrO_2$  粒子层/金电极 ( $ZrO_2/Au$ ) 电流型传感器, 可直接测定茶汤中有机磷农残的含量。以甲基对硫磷为分析目标物, 研究了传感器的主要响应特性、选择性及再生性能, 考察了溶液 pH 值、电化学参数等因素对传感器分析性能的影响。结果表明, 该有机磷传感器在 10~500 ng/mL 浓度范围内对目标分析物有线性响应, 检出限为 2.0 ng/mL。该传感器灵敏度高, 非特异性吸附小, 再生性好, 使用简单, 所用的二氧化锆纳米粒子层制备简单、操作方便, 具有较大的应用潜力。

**关键词:** 二氧化锆纳米粒子; 生物传感器; 有机磷; 甲基对硫磷

## Studies on a novel parathion–methyl biosensor based on nanoparticle absorption

Liu Shu-juan<sup>1,2\*</sup>, Tan Zheng-chu<sup>1</sup>, Zhong Xing-gang<sup>1,2</sup>

(1. Tea Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China)

(2. Hunan Tea Test Center, Changsha 410125, China)

**Abstract:** In this paper, a novel biosensor for detecting organophosphorus has been prepared. Firstly, a zirconia film is electrodeposited onto the cleaned surface of gold electrode. Then organophosphorus can be immobilized on these zirconia nanoparticles by adsorption. Putting the electrode into 0.1 mol/L KCl solution, we can quantitatively determine the organophosphorus concentration according to the electrochemical response intensity of the modified electrode. Taking parathion–methyl as example, the effects of solution pH value and electrochemical parameters on the analytical performance have been investigated, and the response character, reproducibility and interferences of the biosensor are also tested. The proposed biosensor in optimal conditions has a linear range of 10 ~ 500 ng/mL for organophosphorus detection, and its detection limit is 2.0 ng/mL. Moreover, the proposed biosensor has advantages in high sensitivity, low non-specific absorption and advantageous regeneration process. The process for preparation of zirconia nanoparticles is simple and convenient.

**Key words:** zirconia; biosensor; organophosphorus; parathion–methyl

## 0 引言

由于人们在防治病虫害过程中不合理和超剂量使用化学农药, 导致了粮食、蔬菜、茶叶等农产品中的农药残留问题, 不仅影响了农产品的品质, 也危害人类的健康。传统上有机磷农药分析方法主要是利用气相色谱、薄层色谱、高效液相

色谱以及各种光谱联用技术<sup>[1]</sup>。虽然这些方法的选择性、灵敏度和准确度高, 但需要昂贵的仪器设备, 样品的前处理过程繁琐、费时, 并且对分析人员的技术水平要求很高, 不适于现场检测。而且仪器分析法多为检测干物质中的农残含量, 不能准确反映人体实际摄入的农残含量。

与传统分析技术相比, 有机磷传感器快速检

测法具有简单、快速、灵敏、低成本和便于携带等优点<sup>[2-5]</sup>。国内外关于利用胆碱酯酶和有机磷水解酶检测有机磷的文献已有报道,如 Albareda 等<sup>[6]</sup>用乙酰胆碱酯酶直接检测自来水和果汁样品中的对氧磷和敌百威。Josiane 等<sup>[7]</sup>用乙酰胆碱酯酶传感器测定西红柿中的西维因,并与高效液相色谱法比较,取得较好的分析结果。Suprun 等<sup>[8]</sup>用传感器对涕灭威、对氧磷和甲基对硫磷等 3 种农药残留进行检测,检出限分别为 30、10 和 5  $\mu\text{g/mL}$ 。但酶传感技术因其成本高,酶分子易失活、不易再生等缺点,应用起来有一定的局限性。

研究表明,纳米粒子具有特殊的表面效应、体积效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应,以及由此产生的许多光学和电学性质<sup>[9]</sup>。一些纳米材料,例如纳米 Au<sup>[10]</sup>、纳米 Ag<sup>[11]</sup>、纳米 TiO<sub>2</sub><sup>[12]</sup>、纳米 ZrO<sub>2</sub><sup>[13]</sup>、纳米 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>[14]</sup>等具有良好的生物相容性,将其运用到生物传感器中,可提供生物材料适宜的微环境,达到维持生物组分活性、改进生物传感器性能的目的。研究纳米粒子

在生物分子固定中的应用对于开发高性能、具有特殊功能的复合材料具有十分重要的意义。ZrO<sub>2</sub> 是一种无毒性的无机氧化物材料,具有热稳定性、化学惰性和良好的生物相容性<sup>[15-16]</sup>。制备 ZrO<sub>2</sub> 粒子的方法已有报道,ZrO<sub>2</sub> 粒子作为一种多功能的无机材料已得到较为广泛的应用<sup>[17-21]</sup>。

该文将 ZrO<sub>2</sub> 纳米粒子用于有机磷传感器的构造,大大提高了传感器的响应性能。先在金面上电沉积一层 ZrO<sub>2</sub> 纳米粒子,然后将此电极浸入一定浓度的有机磷溶液中进行吸附,根据对应电极的方波溶出伏安法峰电流的大小来实现溶液中有机磷的定量检测(图 1)。实验结果表明,以 ZrO<sub>2</sub> 纳米粒子吸附有机磷制成的甲基对硫磷传感器构造简单,克服了酶传感器不稳定、酶分子易失活等缺点,降低了传感器的构建成本,传感界面对于甲基对硫磷的检出限低,重现性和稳定性好,而且电极检测速度快,操作简便,使用寿命较长,可直接用于茶汤中有机磷农残的快速检测。此外,传感器可以再生反复使用,再生过程简单。

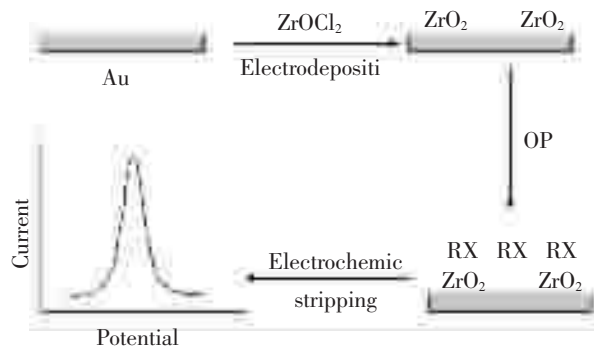


图 1 有机磷传感器构建原理图

Fig.1 Scheme of Ops electrochemical sensor

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

CHI760b 电化学工作站购于中国上海辰华仪器厂,金电极(直径为 3 mm)购于上海辰华仪器厂,电化学反应池为三电极系统,其中修饰电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂电极为对电极。ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O 购于广东省汕头市光华试剂厂;其它试剂均为分析纯,所用水为二次蒸馏水。

### 1.2 传感器的制备

参照文献<sup>[22]</sup>的方法,金电极在使用前分别用 0.3  $\mu\text{m}$  和 0.05  $\mu\text{m}$  的铝粉抛光至镜面,并依次在 6 mol/L HNO<sub>3</sub>、丙酮和二次蒸馏水中各超声洗涤 2 min,水洗并用氮气吹干。实验开始前,把清洗过的电极置于 0.2 mol/L 硫酸中,在 0.5~1.5 V 的电位范围内进行循环伏安扫描至稳定,水洗吹干备用。然后将处理好的金电极放入含 5.0 mmol/L ZrOCl<sub>2</sub> 的 0.1 mol/L KCl 溶液中,在 -1.1~0.7 V 之间以 20 mV/s 的速率扫描十个循环。取出

水洗并用氮气吹干。

### 1.3 样品前处理

取茶叶样品 3 g 用 150 mL 0.1 mol/L KCl (90 °C, pH7.0) 溶液浸泡 10 min 后过滤冷却即可用于测量。

### 1.4 检测方法

将  $ZrO_2/Au$  电极浸入含一定浓度有机磷农药的 0.1 mol/L KCl 溶液中轻微搅拌 2 min, 用去离子水洗涤, 置于含 10 mL 0.1 mol/L KCl 溶液的小烧杯中。在开始测量前, 该 KCl 溶液通氮气 5 min 以除去溶液中的氧。在电压  $-0.4 \sim 0.3$  V 之间进行方波伏安 (SWV) 测量, 电位增量为 4 mV, 频率为 25 Hz。用 CHI660 软件作基线校正。所有试验均在室温下进行。

### 1.5 传感器的再生

将传感器进行多次 SWV 扫描可使吸附的有机磷洗脱, 然后电极用去离子水和缓冲液清洗,

就可进行下一次的测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 电沉积循环伏安图

在文中, 将金电极置于 5.0 mmol/L  $ZrOCl_2$  和 0.5 mol/L KCl 混合溶液中, 通过电化学扫描实现  $ZrO_2$  纳米粒子在金电极上的沉积。图 2 显示了在金电极上  $ZrO_2$  纳米颗粒电沉积的循环伏安图。实验中所用的电压范围是  $-1.1 \sim 0.7$  V, 扫描速率是 20 mV/s, 一共扫描十个循环。阴极和阳极电流在  $-0.6$  到  $-1.1$  V 电压范围内的显著变化反映金面上发生了复杂的氧化还原反应<sup>[17]</sup>。从图中可看出, 从第一轮到第十轮循环, 还原峰逐渐变弱, 峰电流逐渐减小。推测阴极电流的减小是因为金面上  $ZrO_2$  薄层膜的形成阻碍了氧化还原反应的进程引起的。金电极表面  $ZrO_2$  纳米颗粒为有机磷的固定提供了一个较大的有效表面积, 有利于有机

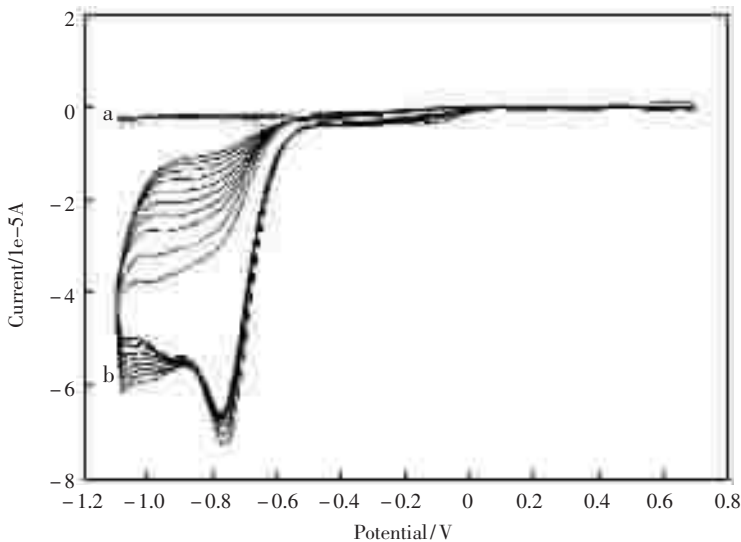


图 2 金电极在 0.5 mol/L KCl 溶液中(a)及金电极在 5.0 mmol/L  $ZrOCl_2$  和 0.5 mol/L KCl 混合溶液中(b)的循环伏安图

Fig.2 The cyclic voltammograms of the cleaned gold electrode in 0.5 mol/L KCl (a) and in 5.0 mmol/L  $ZrOCl_2$  and 0.5 mol/L KCl (b), scan rate 20 mV/s

磷在其表面的吸附, 提高传感器的响应性能。

### 2.2 传感器工作原理

该文采用金电极表面电沉积二氧化锆纳米粒子制成了 OPs/ $ZrO_2$  粒子层/金电极电流型生物传感器。在吸附氨基甲酸酯和有机磷物质后, 该传感器在 0.1 mol/L KCl 溶液中做 SWV 扫描, 在扫描电位 0.093 V 会有一个 SWV 溶出峰, 根据溶出峰电流的大小可实现溶液中有机磷的定量检

测。将组装好的电极浸入一定浓度有机磷溶液进行吸附后, 将 OPs/ $ZrO_2$ /Au 电极在 10 mL 0.1 mol/L KCl 进行溶出伏安扫描, 参考文献[22]用 Sigmaplot 软件对其进行基线校正处理, 得出相应的溶出伏安图 (图 3), 根据溶出峰电流的大小可计算有机磷的浓度。 $ZrO_2$  纳米粒子对磷酸基团有很强的吸附能力, 在电极上电沉积的  $ZrO_2$  纳米粒子层有效地扩大了电极的表面积, 大大增加了电

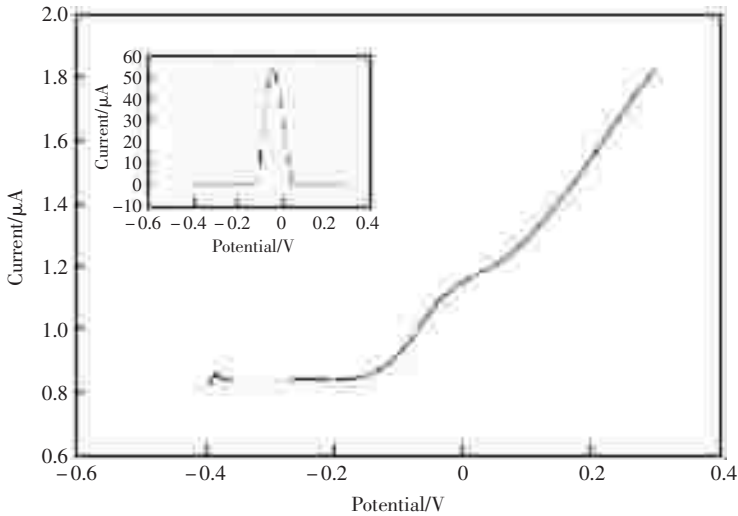


图3 传感器在 0.1 mol/L KCl 溶液中的溶出伏安图,插图为基线校正后的曲线  
Fig.3 Stripping voltammograms of the biosensor in 0.1 mol/L KCl, inset is corresponding calibration curve

极表面有机磷的吸附量(图4)。

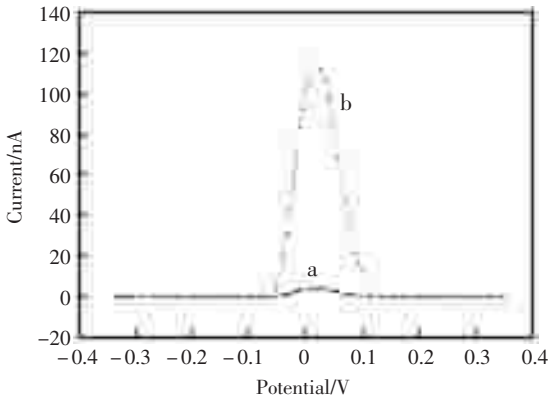


图4 传感器在 500 ng/mL 甲基对硫磷溶液中吸附后的溶出伏安图(a: 裸金电极; b:  $ZrO_2/Au$  电极)

Fig.4 Stripping voltammograms of the biosensor after adsorption in 500 ng/mL parathion-methyl (a: bare gold electrode; b:  $ZrO_2/Au$ )

## 2.3 实验条件的选择

### 2.3.1 缓冲溶液 pH 值的选择

实验用 1.0 mol/L 的 NaOH 和 HCl 对待测有机磷溶液的 pH 值进行调节,考察了溶液 pH 值对响应信号的影响。在其它条件相同的前提下,不同 pH 值对溶出峰电流的影响如图 5 所示。结果表明,在 pH7.0 的 0.1 mol/L KCl 溶液中,传感器的 SWV 响应电流较大。故实验中选择 pH 值为 7.0 的 0.1 mol/L KCl 溶液为支持电解质。

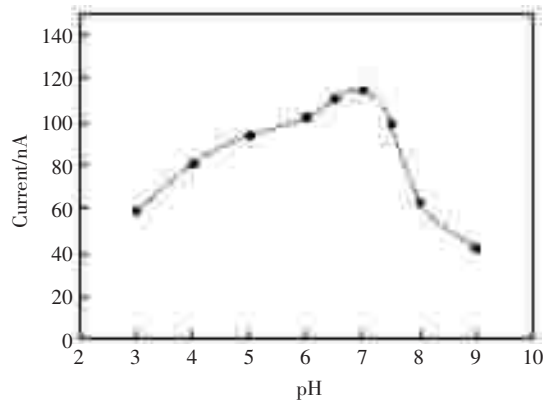


图5 溶液 pH 值对传感器响应性能的影响(甲基对硫磷浓度: 500 ng/mL; 扫描电压:  $-0.4 \sim 0.3$  V; 频率 25 Hz; 电位增量 4 mV)

Fig.5 Effect of pH of adsorption medium on the adsorption of parathion-methyl (the concentration of parathion-methyl: 500 ng/mL; scanning potential range:  $-0.4$  to  $0.3$  V; frequency: 25 Hz; increasing potential: 4 mV)

### 2.3.2 有机磷吸附方法及吸附时间的选择

实验对比了有机磷在电极上的吸附方法,通过在电极表面滴加有机磷溶液和把电极置于有机磷溶液中搅拌两种方法吸附有机磷进行对比,结果表明,把电极浸入有机磷溶液中慢速搅拌 2 min 既能获得较大的 SWV 响应电流,又能使电极保持稳定。

### 2.3.3 电化学参数的选择

进行电化学检测时,不同方波频率的传感器 SWV 响应电流如图 6 所示,首先,随着方波频率

的增大,峰电流变大,当方波频率达到 25 Hz 时, SWV 响应电流最大,之后峰电流随方波频率的增加而逐渐变小。不同电位增量的 SWV 响应电流选择如图 7 所示,当电位增量为 4 mV 时,峰电流最大,且此时峰形较好。电位增量增至 4 mV 以后电流逐渐减小,峰变得不对称,峰形变差。实验表明,以方波频率 25 Hz,电位增量为 4 mV 时的峰电流最大,峰形较好。

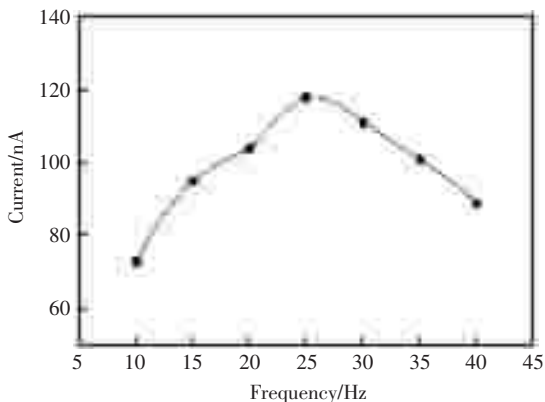


图 6 方波频率对传感器响应性能的影响(甲基对硫磷浓度:500 ng/mL;扫描电压:−0.4~0.3 V;pH:7.0;电位增量:4 mV)

Fig.6 Effect of square wave frequency to the biosensor (the concentration of parathion-methyl: 500 ng/mL; scanning potential range: −0.4 to 0.3 V; pH: 7.0; increasing potential: 4 mV)

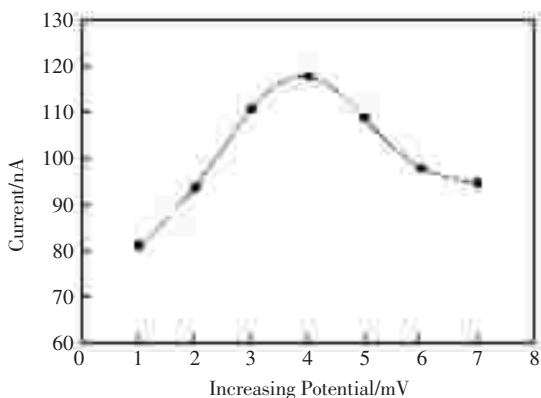


图 7 电位增量对传感器响应性能的影响(甲基对硫磷浓度:500 ng/mL;扫描电压:−0.4~0.3 V;pH:7.0;方波频率:25 Hz)

Fig.7 Effect of increasing potential to the biosensor (the concentration of parathion-methyl: 500 ng/mL; scanning potential range: −0.4 to 0.3 V; pH: 7.0; square wave frequency: 25 Hz)

## 2.4 传感器的工作曲线

图 8 是传感器在上述所选择的最佳工作条件下吸附不同浓度甲基对硫磷后所做得的 SWV 图,由图 8 可知,在一定浓度范围内,随着吸附有机磷浓度的增大,SWV 溶出峰电流也相应增大。以甲基对硫磷浓度为横坐标,对应的方波溶出伏安法峰电流为纵坐标做图,得传感器工作曲线如图 9 所示。由图可知,SWV 与甲基对硫磷浓度在 10~500 ng/mL 范围内成线性关系,其回归方程为: $y=0.2323x+1.202$ ,线性相关系数  $r$  为 0.9953。用同种方法制得的 5 支  $ZrO_2/Au$  电极测定 10 份相同农药样品(200 ng/mL),测得的相对标准偏差为 5.2%。以 3 倍空白值的标准偏差相对应的浓度称为检出限,计算得该甲基对硫磷传感器的检出限为 2.0 ng/mL。

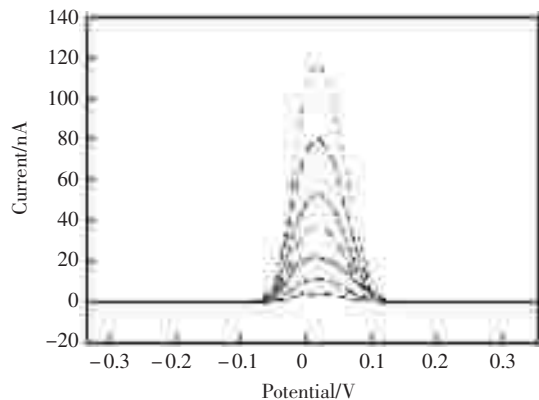


图 8 不同浓度甲基对硫磷的溶出伏安图(扫描电压:−0.4~0.3 V;频率 25 Hz;电位增量 4 mV)

Fig.8 Stripping voltammograms of parathion-methyl concentration (scanning potential range: −0.4 to 0.3 V; frequency: 25 Hz; increasing potential: 4 mV)

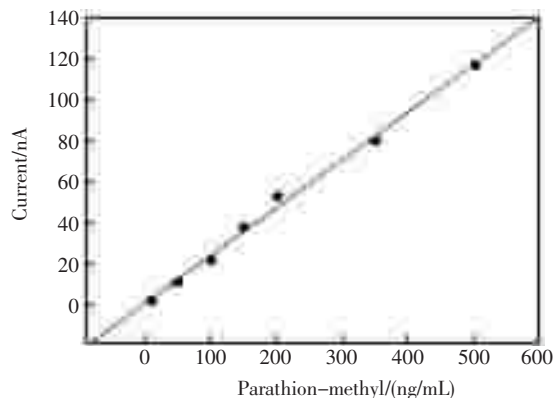


图 9 有机磷传感器的工作曲线

Fig.9 The calibration curve of parathion-methyl



## 2.5 传感器的重现性和稳定性

将制好的甲基对硫磷传感器在相同条件下对甲基对硫磷溶液(浓度为 100 ng/mL)重复测定 10 次,相对标准偏差为 3.9%;将同批次制备的 5 支甲基对硫磷传感器在相同条件下测定,相对标准偏差为 4.2%,说明重现性良好。将制备好的有机磷传感器浸在 pH7.0 的磷酸缓冲液中并置于 4 °C 冰箱中保存,测定传感器放置后对甲基对硫磷的响应性能,结果表明,传感器放置 2 周后传感器对甲基对硫磷的响应没有明显改变,放置一个月后电极仍能保持原有响应的 87%。

## 2.6 传感器的再生

在与工作曲线相同的电化学反应参数下,将 OPs/ZrO<sub>2</sub>/Au 电极进行连续多次 SWV 扫描,随着扫描次数的增加,SWV 溶出峰越来越小,在连续十次扫描后,电极上吸附的 OPs 几乎全部被溶出,电极可继续用于下次测量。

## 2.7 非特异性试验

实验对传感器在磷酸根离子、硫酸根离子及

硝酸根离子等无机离子存在下的 OPs 溶液(100 ng/mL)的电流响应进行了考察,在这类离子存在下,电流响应无明显变化;实验还对氯氰菊酯、六六六、三氯杀螨醇等有机氯和菊酯类农药存在时传感器的电流响应进行了考察,这类农药残留对传感器的电流响应也无明显影响。结果表明传感器的特异性较好,可直接用于茶汤中有机磷农残的检测。

## 2.8 初步应用

### 2.8.1 准确性实验

为了考察实际应用的可能性,用该传感器检测了 5 个不同待测茶叶样品添加甲基对硫磷溶液后的回收率。先对按 2.3 所述处理的茶汤样品进行浓度测定,然后在各样品中加入已知量的甲基对硫磷溶液,再以同样方法对添加后的样品进行测定,得到的检测结果见表 1,在 5 个不同浓度的茶汤样品中添加甲基对硫磷,得到的平均回收率在 94.27%至 107.2%之间,表明试验结果较为准确。

表 1 添加回收率试验

Tab.1 Detection results of samples of parathion-methyl in tea samples

原茶汤浓度 Original concentration (ng/mL)	22.53	16.84	20.05	21.58	18.60
添加浓度 Added concentration (ng/mL)	50	100	200	300	400
添加后检测浓度 Found concentration (ng/mL)	70.71	125.2	213.4	332.5	394.6
回收率 Recovery (%)	97.49	107.2	96.98	103.4	94.27

\* 表中所列数据为三次测量的平均值

\* Each of the results in Table 1 is the average of three parallel experiments

### 2.8.2 传感器工作效率及成本分析

该传感器直接在金电极上组装二氧化锆纳米粒子,直接进行有机磷类农药残留的检测,传感器组装过程所用的无机材料价格低廉,测定过程简单。该传感器的构建过程可在 1 h 内完成,每测一个茶叶样品所用的时间仅需几分钟,传感器的工作效率高。

## 3 结论

针对目前茶叶有机磷分析方法的现状和不足,提出了一种在金电极面上电沉积二氧化锆纳米粒子以吸附有机磷和氨基甲酸酯类农药的电流型传感器,以实现茶汤中有机磷农药残留的定量检测。该传感器制作成本低廉,操作方便,灵敏度高,是一种简单快速测定茶叶中有机磷农残

的新方法。

致谢:部分实验在湖南大学化学化工学院化学生物传感与计量学国家重点实验室完成,得到了沈国励教授、郭慢丽老师等人的热情相助,在此深表谢意

## 参考文献

- [1] Lacorte S, Barcelo D. Validation of an automated pre-column exchange system coupled to liquid chromatography with diode array detection [J]. Anal. Chim. Acta., 1994, 296: 223~234.
- [2] 刘淑娟,谭正初,钟兴刚,等.基于二氧化锆纳米粒子固定乙酰胆碱酯酶的甲基对硫磷传感器[J].传感技术学报,2009,5: 1~5.
- [3] Andreescu S, Marty J L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practi-

- cal applications [J]. *Biomol. Eng.*, 2006, 23: 1~15.
- [4] Jeanty G, Chommidh C H, Vtirty J L. Automated detection of chlorpyrifos and its metabolites by a continuous flow system based enzyme sensor [J]. *Anal. Chim. Acta.*, 2001, 436:119~128.
- [5] 刘鹏, 安裕敏, Sergei V. Dzyadevych, Nicole Jafferzi [J]. *贵州环保科技*, 2006, 12(2): 32~35.
- [6] Albareda Sirvent M, Merkoci A, Alegret S. Automated detection of chlorpyrifos and its metabolites by a continuous flow system based enzyme sensor [J]. *Anal. Chim. Acta.*, 2001, 442: 35~44.
- [7] Josiane C, Sergio A S M. A review of electrolyte and electrode materials for high temperature electrochemical CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> gas sensors [J]. *Sens. Actuators. B*, 2008, 129: 96~97.
- [8] Suprun E, Evtugyn G, Budnikov H, et al. Electrochemical biosensors – principles and applications [J]. *Bioanal. Chem.*, 2005, 383: 597~604.
- [9] 李泉, 曾广斌, 席时权. 纳米粒子 [J]. *化学通报*, 1995, 6: 29~34.
- [10] Bharathi S, Nogami M. A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme [J]. *The Analyst*, 2001, 126(11): 1 919~1 922.
- [11] Chen Z J, Qu X M, Tang F Q. Effect of nanometer particles on the adsorbability and enzymatic activity of glucose oxidase [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1996, 7(3-4): 173~179.
- [12] Yuan S, Hu S. Characterization and electrochemical studies of Nafion/nano-TiO<sub>2</sub> film modified electrodes [J]. *Electrochimica. Acta.*, 2004, 49(25): 4 287~4 293.
- [13] Liu B H, Cao Y, Chen D D, et al. Amperometric biosensor based on a nanoporous ZrO<sub>2</sub> matrix [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 478(1): 59~66.
- [14] Liu Z J, Liu B H, Zhang M, et al. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sol-gel derived amperometric biosensor for glucose [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 392(2-3): 135~141.
- [15] Thomas B C, McBranch D, Li D. Fluorescent self-assembled monolayers of is (salicylaldiminato)zinc (II) Schiff-Base Complexes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 2 950~2 953.
- [16] Fang M, Kaschak D M, Sutorik A C, et al. Electrodisolution of inorganic ions/DNA multilayer film for tunable DNA release [J]. *Am. Chem. Soc.*, 1997, 119: 12 184~12 191.
- [17] Yu H Z, Rowe A W, Waugh D M. Templated electrochemical deposition of zirconia thin films on “recordable CDs” [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 5 742~5 747.
- [18] Gao Y F, Masuda Y, Ohta H, et al. Smart patterning and smart morphology control of metal oxides and colloidal crystals [J]. *Chem. Mater.*, 2004, 16: 2 615~2 622.
- [19] Pang X, Zhitomirsky I. Fabrication of composite films containing 5.0 mmol/L zirconia and cationic polyelectrolytes [J]. *Langmuir*, 2004, 20: 2 921~2 927.
- [20] Schattka J H, Shchukin D G, Jia J G, et al. Sonochemical formation of gold sols [J]. *Chem. Mater.*, 2002, 14: 5 103~5 108.
- [21] Tokuhisa H, Hammond P T. Nonlithographic micro- and nanopatterning of TiO<sub>2</sub> using polymer stamped molecular templates [J]. *Langmuir*, 2004, 20: 1 436~1 441.
- [22] Liu G D, Lin Y H. Electrochemical sensor for organophosphate pesticides and nerve agents using zirconia nanoparticles as selective sorbents [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 5 894~5 901.

# 间苯二酚杯[4]芳炔硫醚衍生物 SAW 分子印迹膜的合成

潘勇<sup>1\*</sup>, 何世堂<sup>2\*</sup>, 林涛<sup>3</sup>, 刘岩<sup>1</sup>, 王文<sup>2</sup>, 吕晖<sup>1</sup>

(1. 防化研究院, 北京 102205)

(2. 中国科学院声学研究所, 北京 100080)

(3. 中国人民解放军驻三九四厂军代室, 北京 102205)

**摘要:** 设计合成了用于检测有机磷类化合物的声表面波(SAW)间苯二酚杯[4]芳炔硫醚衍生物分子印迹敏感膜材料,对产物的化学结构进行了 FTIR、TOF-MS 和 <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR 等多种手段的表征,对表征结果给予了合理的理论解释,证明了产物即为所设计的目标物,并以自组装分子印迹方法制备的 SAW-MIP、SAW-Non-MIP 传感器对 DMMP 进行了检测,证实了分子印迹的效果。

**关键词:** 间苯二酚杯[4]芳炔硫醚衍生物; 化学结构; 表征; 声表面波; 分子印迹

## The synthesis study resorcin[4]arene sulfide derivative(CA) for SAW-MIP coating

Pan Yong<sup>1\*</sup>, He Shi-tang<sup>2\*</sup>, Lin Tao<sup>3</sup>, Liu Yan<sup>1</sup>, Wang Wen<sup>2</sup>, Lv Hui<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China)

(2. Institute of Acoustic, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

(3. The Lab of 394th factory of PLA, Beijing 102205, China)

**Abstract:** The target product resorcin[4]arene sulfide derivative (CA) SAW-MIP coating used for the detection of organophosphates was successfully prepared and proved to be the pre-designed compound by many characterization methods, such as FTIR, MALDI-TOF, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR. DMMP was detected with SAW-MIP and SAW-Non-MIP sensor prepared by self-assembled method, and the MIP effect was proved.

**Key words:** CA; chemical structure; testify; SAW; MIP

## 0 引言

近年来,具有独特空腔的间苯二酚杯[4]芳炔(resorcin[4]arene)获得了广泛的发展,几乎已经涉及到所有化学领域。间苯二酚杯[4]芳炔是在酸催化下,间苯二酚的 4,6 位通过亚甲基桥联与醛生成的环四聚体,结构式如图 1。目前,用于合成间苯二酚杯[4]芳炔的醛的种类大致分为脂肪醛、芳香醛以及带有特殊官能团的复合醛三大类。研究表明,用脂肪醛得到的间苯二酚杯[4]芳

炔溶解性好,能够溶于乙醇等常见极性溶剂,这使得母体具有更大的利用价值。间苯二酚杯[4]芳炔的化学修饰主要有三种途径:间苯二酚杯[4]芳炔的酚羟基、处于两个酚羟基间的 C-2 位以及下缘的桥联亚甲基<sup>[1]</sup>。对下缘的桥联亚甲基的化学修饰由来已久,间苯二酚杯[4]芳炔上缘的化学修饰是在苯酚环上或酚羟基上进行的,而下缘的化学改性是在亚甲基桥联的取代基上,该取代基可以是脂肪链,也可以是芳香环,对一些较长的脂肪链修饰,可以实现对杯芳炔的远程功能化

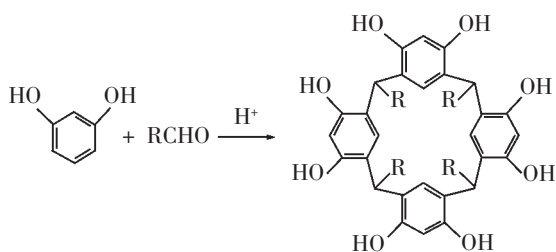


图1 间苯二酚杯[4]芳烃的合成反应

Fig.1 The synthesis method of calixarene

改性。

间苯二酚杯[4]芳烃经过化学修饰,在分子识别研究领域发挥了越来越大的作用,成为一个新的研究热点。下缘引入含硫脂肪链,例如硫醇(RSH)、双硫醚(RSSR')和硫醚(RSR'),可以为间苯二酚杯[4]芳烃在 Au 表面的吸附有序提供帮助。Davis 和 Stirling 等<sup>[2]</sup>发现间苯二酚杯[4]芳烃的含硫衍生物在金表面自组装,酚羟基不被修饰时,可以表现出对多糖、酸类、含羟基化合物的突出吸附能力,并通过反射红外光谱等手段得到证实。Schierbaum 和 Weiss<sup>[3-4]</sup>曾报道将间苯二酚杯[4]芳烃通过衍生后的巯基固定在 Au 电极表面自组装形成膜,其疏水性空腔可以选择性识别分子尺寸适合的四氯乙烯分子。Faulk 等<sup>[5]</sup>合成了两种不同的间苯二酚杯[4]芳烃衍生物,一种下缘的取代基是硫醇(RSH),另一种是硫醚(RSR'),研究了两种自组装单层膜在 Au 表面的成膜结构,分析解释了各自在吸附能力上的特点。

该实验的设计合成的目标产物是间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物,化学结构如图 2 所示<sup>[5-6]</sup>。这种杯芳烃类衍生物具有两个显著特点:第一,端基带有穴状的间苯二酚杯[4]芳烃,能够作为主客体吸附的主体;第二,末端基团(RSR')能够牢固键合 Au 表面,得到超薄有序的自组

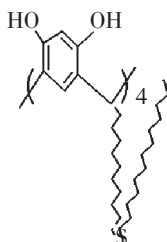


图2 间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物的化学结构

Fig.2 The structure of resorcin[4]arene sulfide derivative

装单分子膜。所合成的目标物作为声表面波(Surface Acoustic Wave, SAW)化学传感器敏感膜材料,将高灵敏的声表面波技术和稳定性好的单分子膜自组装技术有机结合,可以广泛的应用到工业废气和有毒气体的检测等领域。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

美国 Bio-Rad FTS-185 型红外光谱仪;德国 Bruker 公司 BIFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪;德国 Bruker 公司 AV400 型核磁共振仪, TMS 为内标。

间苯二酚(Besorcinol),  $\geq 99.5\%$ , 天津化学试剂一厂; 11-烯醛(undecylenic aldehyde), 97%, 阿法埃莎(天津)化学有限公司; 十二硫醇(n-Dodecanethiol), 98%, 广州市化学试剂玻璃仪器批发部; 9-BBN (9-borabicyclo(3.3.1)nonane), 0.5 mol/L 溶于 THF; 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 合成方法

第一步利用间苯二酚与 11-烯醛进行羟醛缩合反应得到间苯二酚的四聚体;第二步利用长链 11-烯醛上双键的活性与十二硫醇在 9-BBN 催化下加成反应得到硫醚,从而合成出间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物,如图 3 所示。

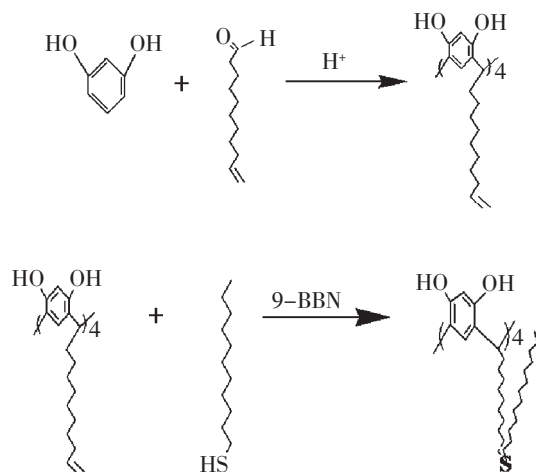


图3 间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物的合成路线

Fig.3 The synthesis of resorcin[4]arene sulfide derivative

## 2 结果与讨论

### 2.1 间苯二酚的四聚体的合成

在 250 mL 的三口烧瓶中加入 11 g (0.1 mol)

的间苯二酚,氮气保护和机械搅拌作用下,在 15 min 内缓慢滴加 95 mL 纯度 95% 的乙醇和 40 mL 浓盐酸的混液;冰浴维持 0 °C 条件下,30 min 内滴加 11-烯醛 21 mL (0.1 mol),反应 0.5 h 后,逐渐升高温度到 60 °C 并且控温连续反应 12 h,溶液逐渐呈褐红色;待反应完毕,300 mL 的去离子水洗涤红褐色反应液,出现大量浅黄色沉淀,抽滤收集沉淀;然后分别用乙醚,环己烷和石油醚多次进行洗涤,真空干燥得到浅黄色固体 6.10 g,产率 23.5%。

## 2.2 间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物的合成

取 5.2 g 中间产品,加入溶剂四氢呋喃(THF) 80 mL, 催化剂 9-BBN 4 mL 和十二硫醇 10 mL,控温于 0 °C 反应 2 h 后,逐渐升温至室温(26~29 °C),磁力搅拌连续反应 16 h;待反应完毕,旋转蒸发除去 THF,得到的粗产品为残余红色油状

物;3 次丙酮重结晶,乙醇和去离子水的多次洗涤,低温真空干燥得到乳白色晶体 3.02 g,产率 32.7%。

## 2.3 膜材料的化学结构表征研究

对最终产物进行傅立叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared FTIR)、质谱(Mass Spectrometry MS)和核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance NMR)等多种手段的化学结构表征。

### 2.3.1 飞行时间质谱(TOF-MS)表征

该实验利用飞行时间质谱对最终产物间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物( $C_{116}H_{200}O_8S_4$ )进行表征,产品理论分子质量  $M=1849.41$ ,实验结果如下:TOF-MS 的  $m/e$ : 1850.38 [ $M^+H$ ], 1872.39 [ $M^+Na$ ], 1888.37 [ $M^+K$ ], 1508.10 [ $M^+-(CH_2)_{10}S(CH_2)_{12}H$ ],这些特征峰值与理论计算一致,可以确定最终产物的有效合成,如图 4

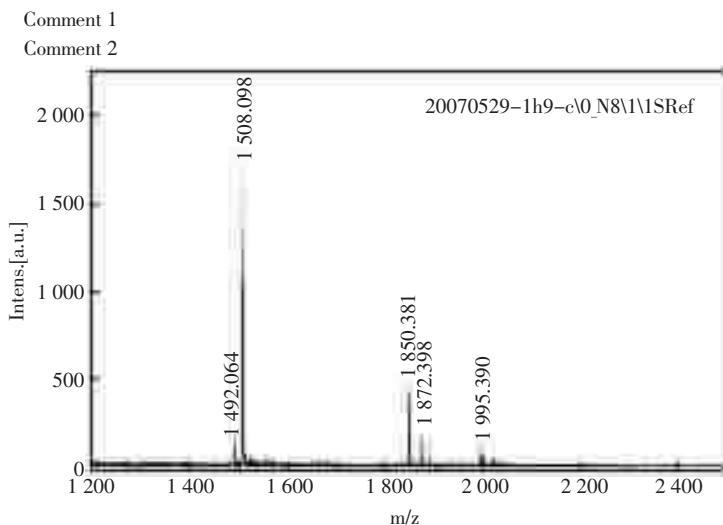


图 4 间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物的飞行时间质谱图谱  
Fig.4 TOF-MS spectra of resorcin[4]arene sulfide derivative(CA)

所示。

### 2.3.2 核磁共振(NMR)表征

对最终产物分别进行  $^{13}C$  和  $^1H$  的核磁共振表征。

$^{13}C$  NMR(溶剂  $CDCl_3$ ): 152.075, 140.546, 126.207, 115.541 为苯环上的四种 C; 41.457 为与苯环相连的 C; 35.457, 35.233, 34.664, 33.670, 33.500, 33.324, 32.266, 31.192, 31.167, 31.067, 31.045, 30.965, 30.753, 30.692, 30.561, 30.459,

30.393, 29.943, 29.785, 29.463, 26.046 为长链  $(CH_2)_9(CH_2)_{11}CH_3$  的 21 种 C, 如图 5 所示。

$^1H$  NMR (溶剂  $CDCl_3$ ): 9.56 和 9.50 (ArOH), 7.27 和 6.13 (ArH), 4.31 ( $RCHAr_2$ ), 2.51 ( $RCH_2SCH_2R'$ ), 2.20 ( $RCH_2CHAr_2$ ), 1.58 ( $RCH_2CH_2SCH_2CH_2R'$ ), 1.38-1.15 (长链  $CH_2$ ), 0.89 ( $RCH_3$ ), 如图 6 所示。

### 2.3.3 傅立叶变换红外光谱(FTIR)表征

该实验对最终产物进行傅立叶变换红外光谱表征,主要基团的特征吸收峰如表 1 所示。



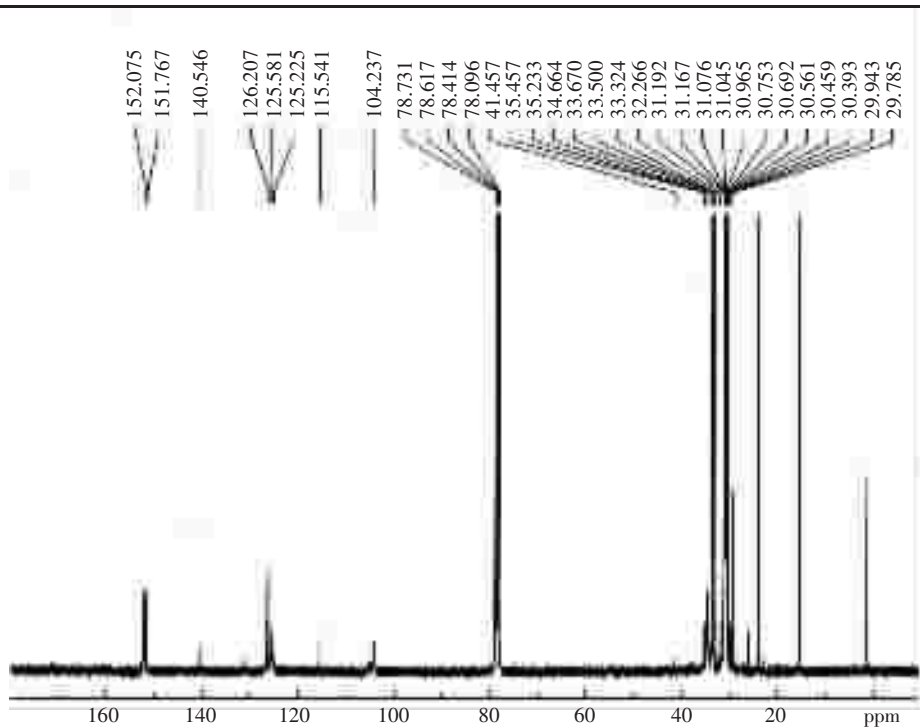
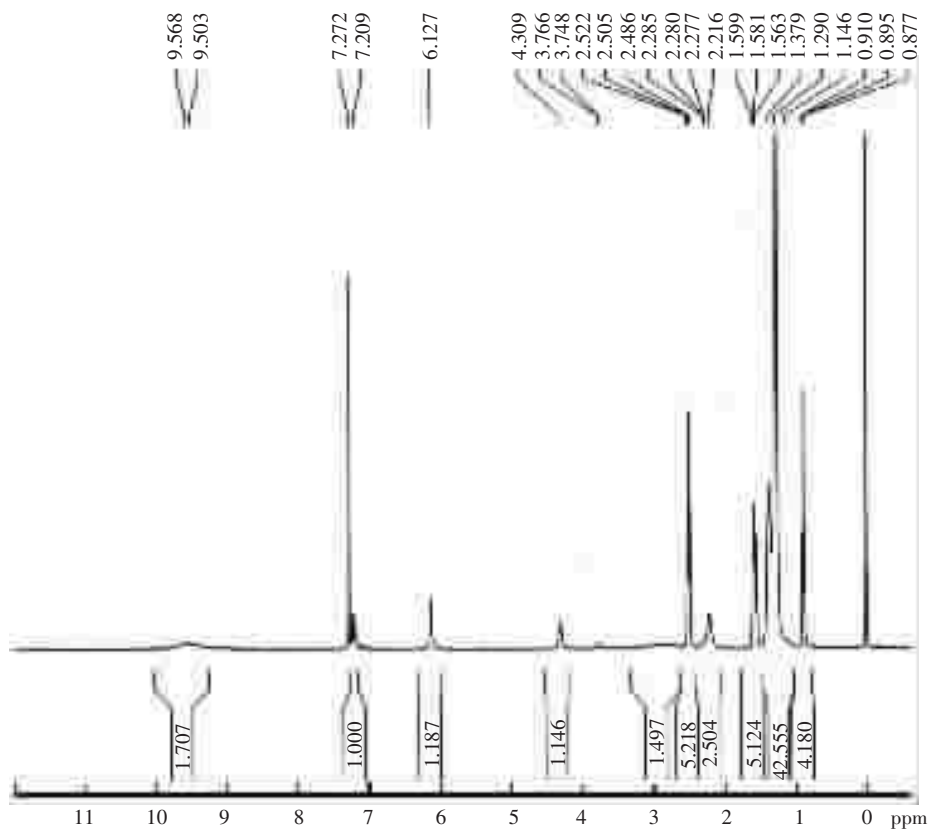
图5 间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物的  $^{13}\text{C}$  核磁共振图谱 ( $^{13}\text{C}$  NMR)Fig.5  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of resorcin[4]arene sulfide derivative(CA)图6 最终产物的  $^1\text{H}$  核磁共振图谱Fig.6  $^1\text{H}$  NMR spectra of resorcin[4]arene sulfide derivative(CA)

表 1 最终产物的主要基团的特征吸收峰及解析

Tab.1 FTIR absorbance frequency of major groups

吸收峰位置( $\text{cm}^{-1}$ )	对应基团的解析
3 249.2	羟基的伸缩振动, 氢键作用向低频移动, 吸收峰宽而强
2 922.4, 2 851.4	亚甲基的反对称和对称伸缩振动, 尖峰
1 617.9, 1 501.3, 1 462.2	苯环骨架振动
1 295.6	羟基的面内弯曲振动
1 171.1, 1 086.2	C-O 伸缩振动
904.1, 838.1	苯环上的孤立氢的伸缩振动
721.6	C-S 的伸缩振动

## 2.4 间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物分子印迹效果的证实

将合成的间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物敏感膜材料以自组装-分子印迹的镀膜方法在 300

MHz 的 SAW 金膜延迟线上分别制备出对有机磷化合物 DMMP 有印迹效果(MIP)和非印迹效果(Non-MIP)的 SAW 传感器,并在相同条件下对 DMMP 进行检测和比较,结果见图 7。

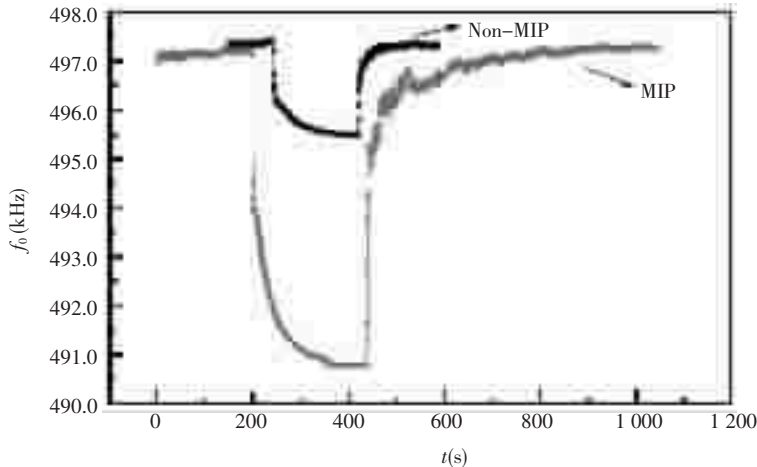


图 7 非印迹(Non-MIP)-印迹(MIP)检测 DMMP 效果比较

Fig.7 The comparison of MIP and non-MIP to DMMP

图 7 可以看出,印迹后的间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物膜对目标分子 DMMP 的响应信号明显大于非印迹膜。以非印迹膜进行检测,间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物(CA)在 Au 表面上自组装成膜,端基是孔穴结构的间苯二酚杯[4]芳烃,并且借助范德华力、疏水作用和少量氢键作用包含目标分子,换句话说,非印迹膜自生具有一定的结合能力,所以检测曲线有所变化;根据分子识别的理论,印迹敏感膜具有几何空间匹配和多位作用点两大特点,这是选择性吸附目标气体的基础。从几何尺寸的角度来说,因为在成膜过程中,孔穴的形状和大小是根据目标分子的体积大小“量身定做”,目标分子可以无需变形即可落入

孔穴,同时由孔穴里的氢键等多位作用点“固定”目标分子,这样主客体之间形成亚稳态的包合物,减少了空间位阻,降低了反应活化能,可以更多的吸附目标分子,所以表现出较大的检测曲线变化,显示出明显的分子印迹效果。

## 3 结论

该实验设计出合成路线,选择优化了实验条件,制备出了目标产物间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物,与文献报道的实验方法相比具有反应条件温和,设备要求简单,产率高等优点;并对最终产物进行了 FTIR、TOF-MS 和  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR 等多种手段的表征,对表征结果进行了相应的理论解

释,证明了最终产物即为预先设计的目标物。通过以间苯二酚杯[4]芳烃硫醚衍生物为敏感膜材料制备的 SAW-MIP、SAW-Non-MIP 传感器对有机磷化合物 DMMP 的检测比较,证实了分子印迹效果,为研制具有高选择性的化学传感器提供了新的借鉴。

### 参考文献

- [ 1 ] MacGillivray L R, Atwood J L. A chiral spherical molecular assembly held together by 60 hydrogen bonds[J]. *Nature*,1997,(389):469~472.
- [ 2 ] Davis F, Stirling C J. Dependence of the rate of an interfacial Diels-Alder reaction on the steric environment of the immobilized dienophile: an example of enthalpy-entropy compensation[J]. *Langmuir*, 1996, (12):5 365~5 374.
- [ 3 ] Schierbaum K D, Weiss T, Thoden van Veizen E U, et al. Molecular recognition by self-assembled monolayers of cavitand receptors[J]. *Science*, 1994, (265): 1 413~1 415.
- [ 4 ] Rickert J, Weiss T, Gopel W. Detection of oligonucleotide sequences with quartz crystal oscillators[J]. *Sensors and Actuators B*, 1996, 31(1-2):45~50.
- [ 5 ] Faull J D, Gupta V K. Impact of host structure on guest-host recognition at self-assembled surfaces of tetrathiol and tetrasulfide derivatives of calix[4]resorcinarene[J]. *Langmuir*, 2002,(18):6 584~6 592.
- [ 6 ] Bart-Hendrik Huisman, Eggo U Thoden van Velzen, David N Reinhoudt, et al. Self-assembled monolayers of calix[4]arene derivatives on gold[J]. *Tetrahedron Letter*,1995, 36(18):3 273~3 276.

# 基于纳米 ZnO-壳聚糖-酪氨酸酶生物传感器 对邻苯二酚的测定

韩瑞霞, 邱岩岩, 艾仕云\*

(山东农业大学化学与材料科学学院, 山东泰安 271018)

**摘要:** 以  $Zn(Ac)_2$  和 N,N-二甲基甲酰胺为原料, 采用水热合成法在 160 °C 下合成出了纳米 ZnO, 并用 X-射线衍射、透射电镜表征了所制备纳米 ZnO 的结构, 同时以制备的纳米 ZnO 固定酪氨酸酶制备了多酚生物传感器, 结果表明高等电点的纳米 ZnO 在很大程度上促进了酪氨酸酶与电极之间的直接电子传递, 能够有效地用于多酚的测定。

**关键词:** 纳米 ZnO; 水热法; 多酚

## Biosensor based on nano-ZnO-chitosan – tyrosinase for the determination of catechol

Han Rui-xia, Qiu Yan-yan, Ai Shi-yun\*

(College of chemistry and material science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:** Using  $Zn(Ac)_2$  and N,N-Dimethylformamide as raw materials, nanometersized ZnO was prepared at 160 °C by hydrothermal reaction method. The X-ray diffraction (XRD) and Transmission electron microscopy (TEM) were used to analyse the structure of nanometersized ZnO. At the same time, the application of nanometersized ZnO using in modifying electrodes to detect the polyphenol was preliminarily studied, the results showed that the high-isoelectric point nano-ZnO promoted the direct electron transfer between the tyrosinase and the electrode to a large extent, could be effectively used for the determination of polyphenol.

**Key words:** nano-ZnO; hydrothermal synthesis; polyphenol

### 0 引言

纳米 ZnO 是一种很有吸引力的半导体材料, 广泛应用于橡胶制品、制陶工艺、涂料工业、医药卫生、传感器中<sup>[1-2]</sup>, 其粒径介于 1~100 nm, 又称为超微细 ZnO。由于颗粒尺寸的细微化, 比表面积急剧增加, 使得纳米 ZnO 产生了其本体块状物料所不具备的表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等<sup>[3]</sup>, 因而, 使得纳米 ZnO 在磁、光、电等方面具有一般 ZnO 产品无法比拟的特殊性能和新用途。如纳米 ZnO 产品活性高, 具有抗红外、紫外和杀菌的功能<sup>[4-5]</sup>。纳米 ZnO 除了具有纳米

材料的特点外, 还是一种很好的光催化剂, 它具有较高的光催化降解有机污染物的性能, 可以以太阳光为光源来降解有机污染物, 这将使得它在环境污染治理方面扮演极其重要的角色。同时由于高等电点的纳米 ZnO ( $pI=9.5$ ) 适合吸附低等电点的蛋白质, 因此可以利用纳米 ZnO 与酪氨酸酶 ( $pI=4.5$ ) 之间的静电作用力将其固定在电极上, 这样不仅可以保持酪氨酸酶的活性, 也促进了酪氨酸酶与电极之间的直接电子转移<sup>[6]</sup>, 利用此对电极进行修饰, 可以有效地对多酚进行检测。

目前, 纳米 ZnO 的制备方法很多, 如: 固相

法、沉淀法、水解法、溶胶-凝胶法、微乳液法以及水热法等。该文以  $Zn(Ac)_2$  和  $N,N$ -二甲基甲酰胺为原料,采用水热合成法制备了纳米 ZnO,并通过 X-射线衍射、透射电镜表征了所制备的纳米 ZnO 的结构,同时以其构建酪氨酸酶生物传感器,对邻苯二酚进行了测定。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

醋酸锌(天津市博迪化工有限公司,分析纯); $N,N$ -二甲基甲酰胺(天津市巴斯夫化工有限公司,分析纯);邻苯二酚(上海展云化工有限公司,化学纯);多壁碳纳米管;壳聚糖(上海伯奥生物科技有限公司,生化试剂);酪氨酸酶(Sigma 公司)。

Philip X'pertPro SuperX 射线衍射仪; JEOL2010 高分辨透射电子显微镜(日本);内衬聚四氟乙烯的高压反应釜;程控式恒温炉;Epsilon 电化学工作站(美国 BAS 公司);三电极系统(玻碳电极或其修饰电极为工作电极,  $Ag/AgCl$  电极为参比电极, Pt 丝为对电极)。

### 1.2 纳米氧化锌的制备

室温下将 1.2 g 醋酸锌溶于 10 mL 的  $N,N$ -二甲基甲酰胺中,再加入 3 mL 过氧化氢和 3 mL 去离子水配成溶液,用磁力搅拌器搅拌 30 min,转入内衬聚四氟乙烯的高压反应釜中,所加溶液为反应釜容积的 80%为宜,160 °C 下置于烘箱

中反应 16 h,将产物分别用水和无水乙醇洗涤几次,烘干,再于程控式炉中在 400 °C 高温分解 4 h。

### 1.3 产物的表征

(1)产物的物相和纯度用 X-射线衍射仪(XRD)进行检测。仪器型号为 Philip X'pertPro Super X-射线粉末衍射仪,X-射线源为石墨单色器滤波的  $Cu K\alpha$  辐射( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ )。

(2)样品的微结构和选区电子衍射用日本 JEOL2010 高分辨透射电子显微镜(HRTEM)表征。高分辨透射电子显微镜的加速电压为 200 kV。

### 1.4 纳米 ZnO 固定酪氨酸酶生物传感器的制备

准确量取 1 mL 0.1%壳聚糖溶液于试管中,加入 50  $\mu\text{L}$  的 10 mg/mL ZnO 溶液,超声 2 h。量取 10  $\mu\text{L}$  上述混合液滴加到已处理好的玻碳电极的表面,置于红外灯下晾干,然后再准确量取 10  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 酪氨酸酶溶液滴加在上述已修饰电极的表面,在室温下晾干,即得到 ZnO/CS/Tyr/GCE。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米 ZnO 的 XRD 物相分析

将水热法制得的纳米 ZnO 进行 X 射线粉末衍射(XRD)分析,结果如图 1 所示。由图 1 可知,所有衍射峰均能被归属为六方相 ZnO,与 JCPDS 卡片 36-1451 一致,证实 ZnO 纳米棒为

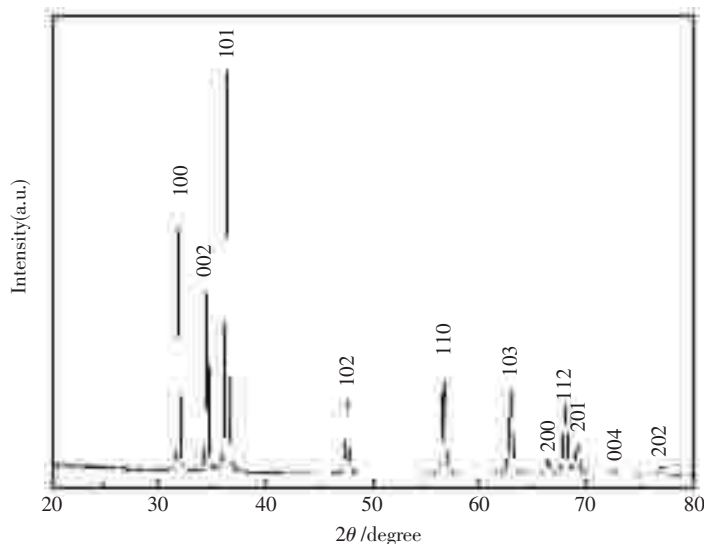


图 1 ZnO 的 X-射线衍射图

Fig.1 XRD photograph of nano-ZnO



六方晶系,其晶胞参数为:  $a=0.325\text{ nm}$ ,  $c=0.52\text{ nm}$ ,图中没有出现其它杂质峰,说明所得产物的纯度较高。

## 2.2 纳米 ZnO 的 TEM 形貌分析

对合成的纳米 ZnO 样品进行 TEM 形貌分析,得到图谱如图 2,从图中可以看到生成的 ZnO 纳米颗粒外貌不存在明显的差别,颗粒尺寸比较

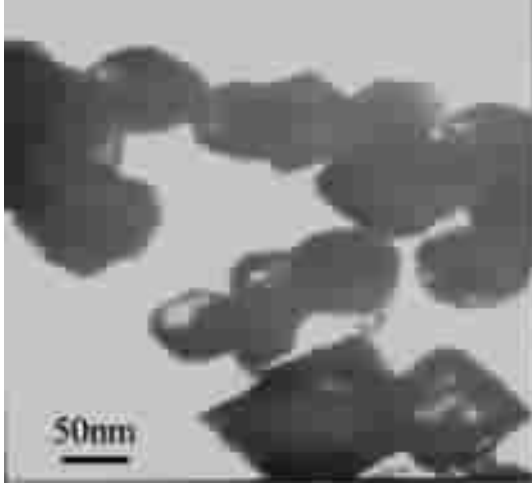


图 2 纳米 ZnO 的 TEM 照片  
Fig.2 TEM photograph of nano-ZnO

均匀,团聚程度较轻,粒径在  $40\sim 60\text{ nm}$ 。

## 2.3 ZnO 固定酪氨酸酶生物传感器的表征

图 3 为以  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  作为氧化还原探针,利用循环伏安法,对修饰电极的电化学行为进行的表征。由图 3 可知裸玻碳电极在  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液中进行循环伏安法扫描时的氧化还原电位 ( $\Delta E_p$ ) 是  $75\text{ mV}$ ;当电极表面被覆盖上一层 Tyr 膜时,峰电流 ( $I_p$ ) 下降,  $\Delta E_p$  明显增大,这是因为 Tyr 是一种生物大分子,它在 GCE 表面的固定,在相当大程度上使电极表面绝缘,从而阻碍了电极同电解液之间的电子传递;当电极表面修饰上一层 ZnO/Tyr 复合膜时,可以看出  $\Delta E_p$  比裸电极时增大,而比仅覆盖了一层 Tyr 时小得多,  $I_p$  则比前两种电极显著增大,这是因为在这个复合膜中,高等电点的纳米 ZnO 在很大程度上促进了酪氨酸酶与电极之间的直接电子传递;当电极表面覆盖上一层 CS/Tyr 膜时,  $\Delta E_p$  减小,  $I_p$  也比电极表面修饰上一层 Tyr 膜时显著减小,这可能是由于壳聚糖覆盖在电极表面,阻碍了电子传递速率;当电极表面覆盖上一层 ZnO/CS/Tyr 复合膜时,  $\Delta E_p$  略有增大,  $I_p$  也有一定

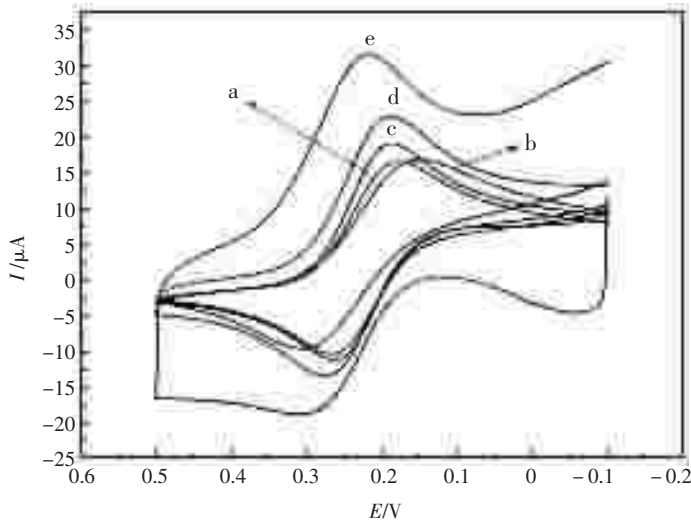


图 3 不同修饰电极在  $2\text{ mmol/L}$  铁氰化钾+ $0.1\text{ mmol/L}$  的 KCl 底液中的循环伏安图,扫描速率: $50\text{ mV/s}$   
Fig.3 Cyclic voltammograms of different modified electrodes in  $2\text{ mmol/L}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  solution containing  $0.1\text{ mmol/L}$  KCl, Scan rate:  $50\text{ mV/s}$ .(a)GCE, (b) Tyr/GCE, (c)CS/Tyr/GCE, (d)ZnO/Tyr/GCE, (e) ZnO/CS/Tyr/GCE

程度的增大;通过对上述不同修饰电极循环伏安法所得  $\Delta E_p$ 、 $I_p$  大小进行比较,实验中选择使用 ZnO/CS/Tyr/GCE 作为测定邻苯二酚含量的工作电极。

## 2.4 酪氨酸酶生物传感器对邻苯二酚的催化作用

图 4 为在修饰电极有或无酶,PBS 中含或不含邻苯二酚的情况下,在  $-0.1\sim 0.5\text{ V}$  范围内的循

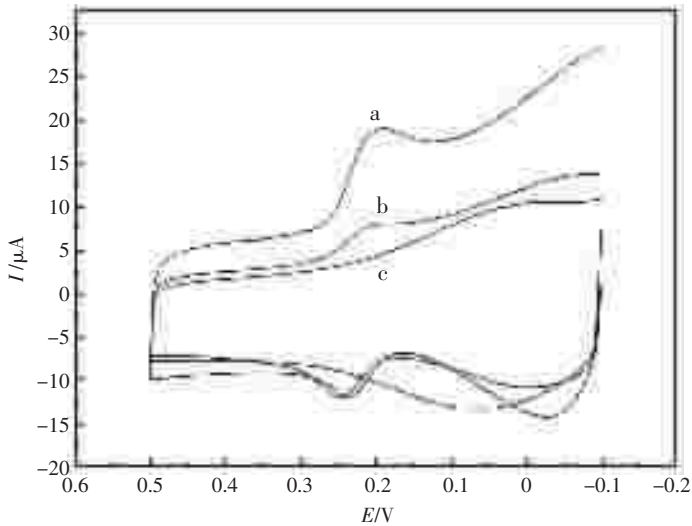
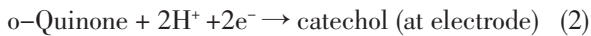
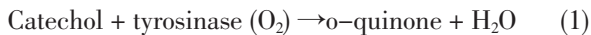


图4 ZnO/CS/Tyr/GCE(a)和ZnO/CS/GCE(b)在0.1 mol/L的PBS(pH=6.2)+0.01 mol/L的邻苯二酚溶液中的循环伏安图,以及ZnO/CS/Tyr/GCE在0.1 mol/L的PBS(pH=6.2)溶液中的循环伏安图(c)。扫描速率:50 mV/s

Fig.4 Cyclic voltammograms of ZnO/CS/Tyr/GCE(a) and ZnO/CS/GCE(b) in 0.1 mol/L PBS(pH=6.2) with 0.01 mol/L catechol and the cyclic voltammograms of ZnO/CS/Tyr/GCE in 0.1 mol/L PBS(pH=6.2) without 0.01 mol/L catechol(line c). Scan rate: 50 mV/s

环伏安图。背景电流(线c)是ZnO/CS/Tyr/GCE在不含有邻苯二酚的PBS中进行循环伏安扫描得到的。当PBS中加入邻苯二酚以后,对分别使用ZnO/CS/Tyr/GCE(线a)和ZnO/CS/GCE(线b)进行循环伏安扫描所得到的两幅图谱进行比较可以看出:无论是否在电极上修饰上酪氨酸酶,进行循环伏安扫描所得到的氧化峰电位几乎不变,但是修饰了酪氨酸酶后的还原峰电流则显著增大。这是由于电极表面的酪氨酸酶催化氧化邻苯二酚,使其生成苯醌,苯醌在电极表面又被还原回邻苯二酚,产生还原电流。电极反应为:



## 2.5 标准曲线的绘制

实验同时对pH值、富集时间、富集电位进行了优化。在最优化条件下,利用示差脉冲溶出伏安法(DPSV)检测邻苯二酚所得到的标准曲线如图5和图6所示。在浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$ 范围内,随着邻苯二酚浓度的增加,还原峰电流呈线性增大。直线回归方程如下: $I(\mu\text{A}) = 4.30384 + 0.11762(\mu\text{mol/L})$  ( $r=0.99431$ ),邻苯二酚检测限为 $3 \times 10^{-6}$  mol/L( $S/N=3$ )。

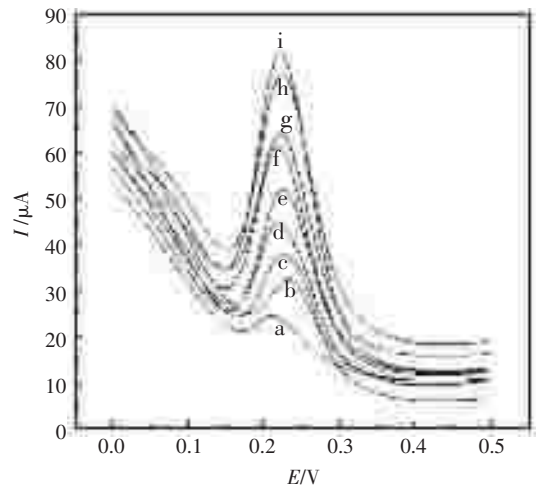


图5 ZnO/CS/Tyr/GCE在不同浓度的邻苯二酚溶液中的示差脉冲溶出伏安图

Fig.5 DPSV obtained at ZnO/CS/Tyr/GCE for solutions of increasing catechol concentration in 0.1 mol/L PBS (pH=6.2). Accumulation time; 200 s; accumulation potential: 150 mV  
(a)50 $\mu\text{mol/L}$  (b) 100 $\mu\text{mol/L}$  (c) 200 $\mu\text{mol/L}$  (d) 300 $\mu\text{mol/L}$   
(e) 400 $\mu\text{mol/L}$  (f) 500 $\mu\text{mol/L}$  (g) 600 $\mu\text{mol/L}$  (h)700 $\mu\text{mol/L}$   
(i)800 $\mu\text{mol/L}$

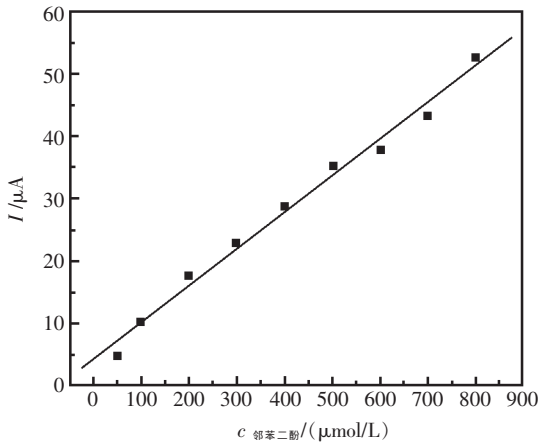


图 6 ZnO/CS/Tyr/GCE 检测邻苯二酚所得的标准曲线  
Fig.6 Calibration curve of ZnO/CS/Tyr/GCE to detect catechol under the optimum conditions

### 3 结论

该文采用水热合成法制备了纳米 ZnO, XRD 和 TEM 实验结果表明, 所准备的纳米 ZnO 为六方晶系, 且纯度较高。同时对纳米 ZnO 在电化学方面的应用进行了初步研究和探讨, 结果表明高等电点的纳米 ZnO 在很大程度上促进了酪氨酸酶与电极之间的直接电子传递, 能够有效地用于

邻苯二酚的测定, 是一种能够应用于电极修饰的很好的半导体材料。

### 参考文献

- [ 1 ] Liu B, Zeng H C. Hydrothermal synthesis of ZnO nanorods in the diameter regime of 50 nm[J]. J. Am. Chem. Soc, 2003, 125: 4 430~4 431.
- [ 2 ] Rodriguez J A, Jirsak T, Dvorak J, et al. Reaction of NO<sub>2</sub> with Zn and ZnO: photoemission, XANES, and density functional studies on the formation of NO<sub>3</sub> [J]. J. Phys. Chem. B, 2000, 104: 319~328.
- [ 3 ] Geonel R G, Patricia S J, Jozsef N, et al. Novel synthesis pathway of ZnO nanoparticles from the spontaneous hydrolysis of zinc carboxylate salts [J]. J. Phys. Chem. B, 2003, 107: 12 597~12 604.
- [ 4 ] 张绍岩, 丁士文, 刘淑娟, 等. 均相沉淀法合成纳米 ZnO 及其光催化性能研究[J]. 化学学报, 2002, 60(7): 1 225~1 229.
- [ 5 ] 艾仕云, 金利通, 周杰, 等. 均一形貌的 ZnO 纳米棒的制备及其光催化性能的研究 [J]. 无机化学学报, 2005, 2: 270~273.
- [ 6 ] Li Yin-Feng, Liu Zhi-Min, Liu Yan-Li, et al. A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles [J]. Analytical Biochemistry, 2006, 349: 33~40.

## 检测尿酸和葡萄糖电极式试纸条的研制

石平<sup>1</sup>, 李建平<sup>2\*</sup>, 方成<sup>2</sup>, 李玉平<sup>2</sup>

(1. 桂林优利特电子集团有限公司, 广西桂林 541001)

(2. 桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西桂林 541004)

**摘要:** 根据双电极系统中铁氰化钾的电子媒介新模式原理研制一种电极式印制型尿酸和葡萄糖试条。试条由完全对等的丝网印制双碳电极组成, 测定范围宽(-0.6~0.6 V), 可根据检测物浓度和干扰情况选择测定电位和灵敏度。用尿酸和葡萄糖试纸条测试 35 例病人血清样品中尿酸和葡萄糖的含量, 并与医院常规分析方法的测试结果对比, 经配对 T 检验, 双侧检验的概率  $P$  分别为 0.427 和 0.079, 测定结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。铁氰化钾作为电子媒介, 其电子媒介作用是通过其转化成亚铁氰化钾来实现的, 任何可导致上述转化发生的物质都可以借助铁氰化钾为电子媒介来测定, 合理使用媒介体可以达到检测高过电位物质或放大检测信号等目的。

**关键词:** 铁氰化钾; 电子媒介; 尿酸; 葡萄糖

## The design of an electrochemical strip for uric acid and glucose assay

Shi Ping<sup>1</sup>, Li Jian-ping<sup>2\*</sup>, Fang Cheng<sup>2</sup>, Li Yu-ping<sup>2</sup>

(1. Guilin medical Electronic Instrument Factory, Guilin 541001, China)

(2. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

**Abstract:** A disposal screen-printable uric acid and glucose electrode strip were fabricated based on the principle of ferricyanide-mediated electron transfer as the electron mediator. in two-electrode system. Both strips exhibit excellent linear responses to detecting substance in a wide measurement potential, -0.6~0.6 V, which be adjusted at will according to concentration of detecting substance and level of interference. Statistical analysis shows the result of detection by strip and conventional method have preferable relativity. Thirty-five artificial samples of glucose or uric acid were taken and the contents of glucose and uric acid were tested using the proposed glucose and uric acid strips and the results were compared with that of routine analysis methods in hospital. It was evident that statistical analysis by Paired-samples T-Test showed the result of detection by the amperometric method gives the result of no significant differences ( $P$  was 0.427 and 0.079). Potassium ferricyanide acts as an electron mediator via the reductive reaction to potassium ferrocyanide. Consequently, the substance which could be oxidized by potassium ferricyanide can be assayed by the amperometric method with potassium ferricyanide mediator. During the process, the analyte with high overpotential could be determined and the current signal could be enhanced.

**Key words:** potassium ferricyanide; electron mediator; uric acid; glucose

## 0 引言

生物传感器技术正被越来越多的应用在临床化学、生物医学的在线监测等<sup>[1-2]</sup>。这种新的检测手段和传统的分析方法相比具有分离和检测

一体、响应快、样品用量少, 成本低等特点。目前商业化的生物试纸条已超过十余种<sup>[3-7]</sup>, 大致可分为光学型和电化学型两大类, 前者可视为传统酶溶液比色法的衍生与移植, 缺点是显色后颜色分布不均并且易受环境光线与温度影响<sup>[8]</sup>, 电化

学型生物试纸条可以视为同类光学型试纸条更新换代产品,基本不受环境光线与温度的影响,并且有更高的灵敏度与准确度<sup>[9-12]</sup>。

铁氰化钾是一种无机电子媒介体,比一般有机电子媒介体稳定,对 pH 的依赖性较小<sup>[13]</sup>,被广泛用于葡萄糖、肌胺酸、乳酸试纸条等商业化的电化学型生物试纸条中<sup>[14]</sup>。电子转移与酶反应同步,媒介体只起到酶与电极之间传递电子的桥梁作用<sup>[15-16]</sup>。基于该原理设计的酶试纸条通常由媒介体修饰的工作电极和固体参比电极(如 Ag/AgCl 电极)组成。这类试纸条的选择性主要通过控制极化电位来实现,因而极易受样品中易发生电极反应的电活性物质的干扰;而且电子传递的效率不高,试纸条的灵敏度不高;电子传递极易达饱和状态,检测浓度范围很窄<sup>[17]</sup>。

该文使用丝网印制双碳电极研究了溶液中铁氰化钾的伏安特性和安培响应特性,设计出了以铁氰化钾为电子媒介体的葡萄糖和尿酸试纸条,并进行临床验证。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

电化学测量在 CHI660B 电化学工作站(上海华辰仪器公司)上进行。碳油墨 ERC1 (Ercon Inc.) 通过丝网印刷在绝缘基底上,碳双电极作为试纸条的工作电极和对电极,表观电极面积  $1.0\text{ mm} \times 2.0\text{ mm}$ 。葡萄糖氧化酶,  $100\text{ U/mg}$ , 上海生工生物工程技术服务有限公司; 铁氰化钾  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、亚铁氰化钾  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  购自上海试剂一厂。

溶液 A:  $0.4\text{ mol/L}$ , 准确称取  $6.5850\text{ g}$   $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  溶于  $50\text{ mL}$  二次蒸馏水, 摇匀过夜; 溶液 B:  $0.4\text{ mol/L}$ , 准确称取  $8.4482\text{ g}$   $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶于  $50\text{ mL}$  二次蒸馏水, 摇匀过夜; 混合液 C: 将放置过夜的溶液 A 和溶液 B 以体积比 1:1 混合摇匀。硼砂缓冲液  $\text{pH}=8.5$ : 配制  $0.05\text{ mol/L}$  硼砂水溶液和  $0.1\text{ mol/L}$  磷酸氢二钾水溶液, 两者体积比 65:35 混合, 摇匀。磷酸盐缓冲液  $\text{pH}=7.0$ : 配制  $0.2\text{ mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $0.2\text{ mmol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  标准溶液; 然后体积比 3:7 混合。尿酸溶液: 称取  $60\text{ mg}$  碳酸锂, 溶于  $15\text{ mL}$  二次蒸馏水中, 室温下溶解至饱和后用定性滤纸过滤, 去渣, 向滤液中加

入  $3.3622\text{ g}$  尿酸,  $50\sim 60\text{ }^\circ\text{C}$  水浴至尿酸完全溶解, 冷却后用硼砂缓冲液稀释至  $100\text{ mL}$ , 得到  $0.2\text{ mol/L}$  的尿酸母液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下保存备用。葡萄糖溶液: 称取  $3.9634\text{ g}$  D-葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $198.17\text{ g/mol}$ ), 分析纯, 广东汕头西陇化工厂, 溶于磷酸盐缓冲液中得  $0.2\text{ mol/L}$  葡萄糖溶液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。其它试剂均为分析纯, 试验用水为二次蒸馏水, 试验温度  $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 铁氰化钾伏安性质

分取  $5\text{ mL}$  溶液 A、溶液 B 和混合液 C 放入 3 支  $10\text{ mL}$  比色管, 各加入  $5\text{ mL}$  磷酸盐缓冲液, 摇匀, 倒入  $10\text{ mL}$  电解杯中, 设置扫描电位  $-0.6\sim 0.6\text{ V}$ , 扫描速度  $100\text{ mV/s}$ , 分别测量溶液的伏安曲线。改变极化电压, 测定不同极化电压下的电流强度。

用磷酸盐缓冲液将溶液 A 和溶液 B 稀释成  $0.2\text{ mol/L}$ , 取  $5\text{ mL}$   $0.2\text{ mol/L}$  铁氰化钾溶液放入  $10\text{ mL}$  电解杯中, 设置极化电压  $0.4\text{ V}$ , 加入  $0.2\text{ mol/L}$  亚铁氰化钾溶液并搅拌均匀, 静置片刻, 记录各次加入后的电流强度。

在保持铁氰化钾和亚铁氰化钾的总浓度不变的情况下, 测定铁氰化钾溶液随亚铁氰化钾浓度变化下的电流强度变化。

#### 1.2.2 尿酸、葡萄糖试条制备

将相关试剂按照一定的配比制成反应液, 用微量取液器在印制电极的各电极片上滴加反应液  $0.5\text{ }\mu\text{L}$ , 室温下干燥后, 加盖微池体, 试纸条结构如图 1。其中葡萄糖试纸条反应液由葡萄糖氧化酶、铁氰化钾和羧甲基纤维素钠组成, 尿酸试纸条反应液由铁氰化钾和羧甲基纤维素钠组成。



图 1 尿酸和葡萄糖试纸条结构

Fig.1 Structure of Uric acid or Glucose strip

- (a) 接头(contact); (b) 工作电极(work electrode);  
(c) 对电极(counter electrode); (d) 试剂斑(reagent spot);  
(e) 微池(micro-pool); (f) 基底(substrate)

#### 1.2.3 尿酸和葡萄糖测定

取  $2.5\text{ mL}$  铁氰化钾溶液 6 份放入  $10\text{ mL}$  比



色管中,分别加入 0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5 mL 尿酸溶液,然后用硼砂缓冲液定容至 5 mL。设置极化电压 0.4 V,测定电流强度曲线。同上取铁氰化钾溶液,各加入 1U 固体粉状葡萄糖氧化酶,分别加入 0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5 mL 葡萄糖溶液,然后用磷酸盐缓冲液定容至 5 mL,测定电流强度。

尿酸或葡萄糖试纸条测试时,取 3  $\mu$ L 尿酸或葡萄糖试液滴加在试纸条的微池中,在工作电

极与对电极之间加 400 mV 电压,测试电极的反应电流强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 铁氰化钾伏安特性

相同浓度下,铁氰化钾、亚铁氰化钾和混合液的伏安曲线如图 2。可以发现三者均有双峰,且曲线关于零点中心对称。任何导电性表面在接触

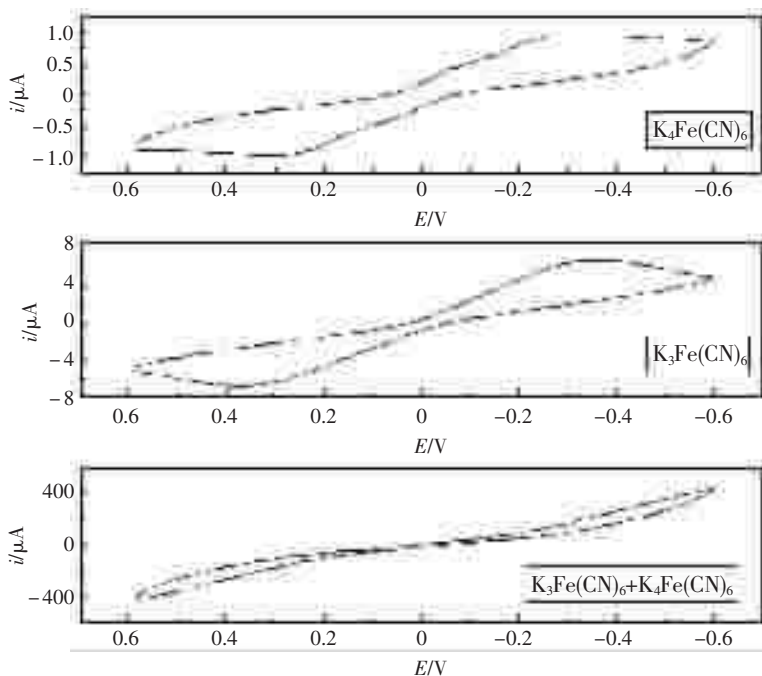


图 2 铁氰化钾和亚铁氰化钾及其混合液的循环伏安曲线

Fig.2 Cyclic voltammetric curves of the solutions of potassium ferricyanide, potassium ferrocyanide and their mixture

含氧化还原性物质的溶液时,导电表面会产生净电荷。溶液中的氧化性和还原性物种均对导电物质充电,从而产生极化电位,其大小由溶液中 Red/Ox 的浓度比决定。又因为两电极性状几乎完全相同,因此两电极的极化电位应该相同,即铁氰化钾的电解电压为 0 V。当在双电极上外加电压时,外加电压应该平均分配在 2 个电极上,如外加电压 0.5 V 时,则一电极升高 0.25 V,而另一电极会下降 0.25 V。对于铁氰化钾溶液来说,[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>总选择在电位降低的电极上被还原,因此 [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>发生还原反应的场所会随外加电压方向改变而改变,导致伏安曲线呈中心对称。

相同浓度下亚铁氰化钾的响应值是铁氰化钾的 1/8 左右,差异源于电极反应速度常数 ( $k_{red}, k_{ox}$ ) 不同。 $k_{red} = k^0 \exp[-\alpha F/RT(E - E^0)]$ ,  $k_{ox} =$

$k^0 \exp[(1 - \alpha)F/RT(E - E^0)]$ 。

式中  $k^0$  表示电对标准反应常数,  $\alpha$  为电子转移系数,  $E^0$  为标准电极电位,  $R$  是摩尔气体常数,  $T$  是绝对温度。因为铁氰化钾和亚铁氰化钾具有相同的  $k^0$ 、 $\alpha$ 、 $E^0$ , 扩散系数  $D$  也近似相同,可见电极反应速度常数随电位差  $|E - E^0|$  增大而增大。

分别测定了 0.2 mol/L 铁氰化钾、亚铁氰化钾和铁氰化钾与亚铁氰化钾的混合液,在不同极化电压下的电流强度。从图 3 可以发现电流强度随极化电压增大而增大,对 0.2 mol/L 铁氰化钾或亚铁氰化钾来说,增速不大,但对 0.2 mol/L 铁氰化钾和亚铁氰化钾的混合液却表现极其明显。从曲线的对称形状可以预见极化电压的大小和正负均不会影响电流强度与浓度的线性关系,电压的大小只改变电流响应灵敏度,因此以铁氰化钾为

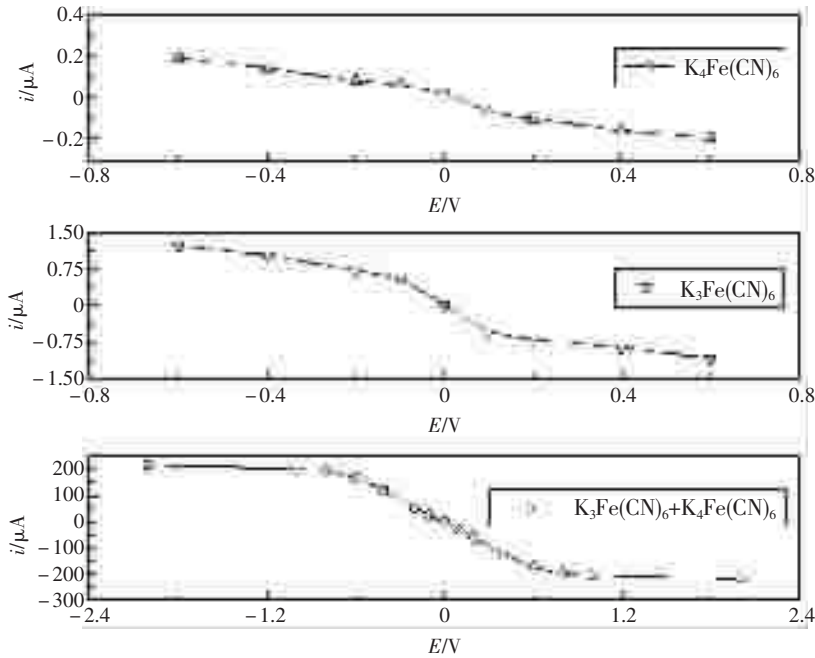


图3 不同电位下的安培响应曲线

Fig.3 Plot of amperometric response vs. measurement potential

电子媒介时, 可根据检测物浓度和干扰情况, 检测电压可以在 $-0.6 \sim 0.6$  V 范围内任意选定。为了便于试验对比和满足一定的灵敏度要求, 试验中统一采用极化电压 0.4 V。

## 2.2 铁氰化钾的电子媒介作用

如图 4 所示, 在曲线的下段呈的线性关系, 即当铁氰化钾转化为亚铁氰化钾的比率 $\leq 25\%$ 时, 电流强度与生成的亚铁氰化钾的量成线性关系。因此可以认为铁氰化钾的电子媒介作用是通过其转化成亚铁氰化钾来实现的, 所以任何可导

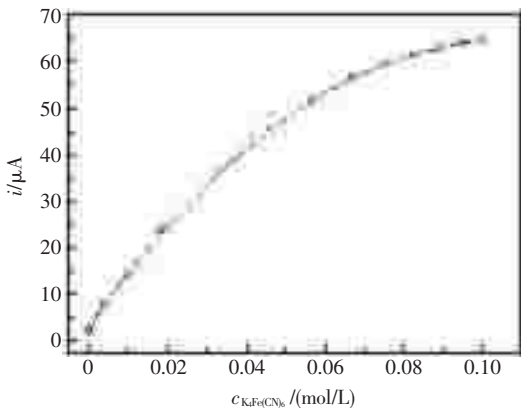
图4 亚铁氰化钾浓度与电流强度变化曲线  
(虚线表示在曲线的下段呈的线性关系)

Fig.4 Plot of amperometric response vs. concentration of potassium ferrocyanide

致上述转化发生的物质都可以借助铁氰化钾为电子媒介来测定。

由于在  $\text{pH}=8.5$  时尿酸能与铁氰化钾反应, 定量生成亚铁氰化钾;  $\text{pH}=7.0$  时葡萄糖在葡萄糖氧化酶催化下与铁氰化钾反应, 定量生成亚铁氰化钾, 电流强度见图 5。与图 4 对比, 发现响应趋势极其相似, 从而印证前面的原理。

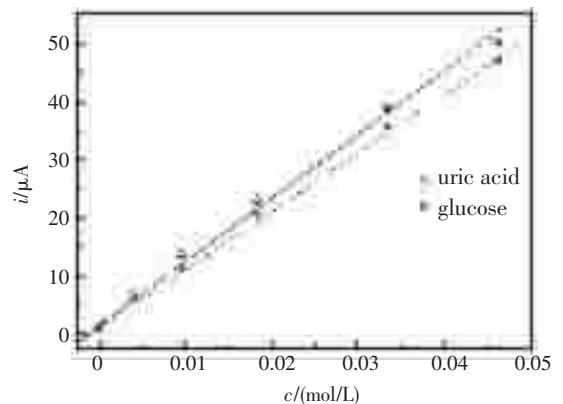


图5 尿酸, 葡萄糖浓度与电流强度值变化曲线

Fig.5 Plot of amperometric response vs. concentration of uric acid or glucose

## 2.3 尿酸和葡萄糖试纸条测试性能

为检测尿酸和葡萄糖试纸条的临床使用效果, 取 35 例病人血液样品, 使用尿酸和葡萄糖试

纸条测试样品中尿酸和葡萄糖的含量,并将测试结果与医院生化分析常规方法的测试结果对比。常规方法中,尿酸测试为磷钨酸还原法,葡萄糖测试为邻甲苯胺法(o-Toluidin,O-TB),样品测定

结果对照见图 6。两种方法间均有较好的相关性( $y=0.995x+2.3175, r=0.9876$ ;  $y=0.981x+0.0327, r=0.9831$ )。

样品测定结果与医院生化分析结果经统计

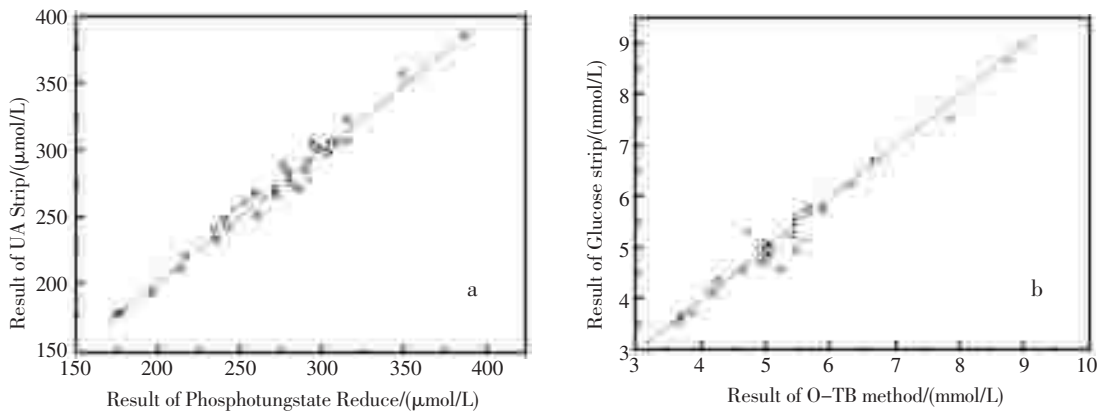


图 6 尿酸(a)和葡萄糖(b)试纸条与常规方法测试结果对比

Fig.6 Result of comparing conventional method with uric acid (a) or glucose strip (b)

分析两组间比较用配对 T 检验,尿酸检验结果  $t$  为  $-0.804$ , 双侧检验的概率  $P$  为  $0.427$ ; 葡萄糖检验结果  $t$  为  $1.814$ , 双侧检验的概率  $P$  为  $0.079$ ; 可见,尿酸和葡萄糖试条检测结果与常规方法测定结果,其差别在统计上无显著性意义。

## 2.4 临床检测

为检测尿酸和葡萄糖试纸条的使用效果,取 35 份临床血清样品,使用尿酸和葡萄糖试纸条测试样品中尿酸和葡萄糖的含量,并将测试结果与医院常规全自动生化分析仪的测试结果(酶反应-光度法)对比。

## 2.5 统计学分析

使用 SPSS 16.0 统计检验软件进行统计分析,将自制试纸条测定结果与常规生化检测方法检测结果进行直线线性相关性分析比较,两组间比较用配对 T 检验(Paired-samples T Test),若  $P > 0.05$ ,则认为没有显著差异。

## 3 结论

该文使用印制双碳电极研究了铁氰化钾电子媒介体的伏安性质,提出了铁氰化钾的电子媒介作用的新模式:铁氰化钾的电子媒介作用可以通过其转化成亚铁氰化钾来实现,任何可导致上述转化发生的物质都可以借助铁氰化钾为电子

媒介来测定,合理使用媒介体可以达到检测非电活性物质或放大检测信号等目的。设计了性能优越的尿酸、葡萄糖试纸条。利用试条对病人血液样品进行检测,测试结果与医院生化分析常规方法的测试结果一致。该试条电子传递的效率高,试条制作过程简单。对于临床血糖和尿酸的临床检验有重要意义。

## 参考文献

- [1] Wang J. Electrochemical glucose biosensors[J]. Chem. Rev., 2008, 108: 814~825.
- [2] Alcock S J. Technology for continuous invasive monitoring of glucose[A]. Proc IEEE Eng. Med. Biol., 18th Ann Int Conf of the IEEE Amsterdam, 1996, 838: 1~3.
- [3] McAleer J F, Scott D, Hall G, et al. Disposable glucose test strips, and methods and compositions for making same[P]. US Patent, 5708247, 1998-01-13.
- [4] Yamamoto T, Yoshioka T, Nankai S. Cholesterol sensor and method for producing the same [P]. US Patent, 6117289, 2000-09-12.
- [5] Schou C, Schulein M, Vollmond T. Cellobiose oxidase, and enzymatic agent and a process for treating paper pulp [P]. US Patent, 5866392, 1999-02-02.
- [6] Anaokar S G, Antonopoulos G L, Cunningham P. Test Strip for determining concentration of triglycerides [P]. US patent, 7214504, 2007-05-08.

- [ 7 ] Nishidate K, Suzuki Y, Inaba S. Method of determining glucose-6-phosphate and composition therefore[P]. US Patent, 5492815,1996-02-20.
- [ 8 ] Brahim S, Narinesingh D, Guiseppi-Elie A. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a Polypyrrole- hydrogel membrane [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 448: 27 ~ 36.
- [ 9 ] Singh A K, Flounders A W, Volponi J V, et al. Development of sensors for direct detection of organo - phosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14: 703 ~ 713.
- [10] Chen Z, Fang C, Qiu G, et al. Non-enzymatic disposable test strip for detecting uric acid in whole blood [J]. *J. Electroanal. Chem.*, 2009, 633: 314 ~ 318.
- [11] Li J P, Wei X P, Yuan Y H. Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase for preparing highly sensitive and selective glucose biosensor[J]. *Sens. Actuatur.: B. Chem.*, 2009, 139: 400 ~ 406.
- [12] Li J P, Liu R, Pan H C, et al. Preparing of hybrid bio-organic-inorganic composite membrane for amperometric mediatorless glucose micro biosensor [J]. *Sensor Lett.*, 2009, 7(4): 557~562.
- [13] Li J P, Zhao J, Wei X P. A sensitive and selective sensor for dopamine determination based on a molecularly imprinted electropolymer of o-aminophenol[J]. *Sens. Actuatur.: B. Chem.*, 2009, 140: 663 ~ 669.
- [14] Taniguchi I, Miyamoto S, Tomimura S, et al. Mediated electron transfer of lactate oxidase and sarcosine oxidase with octacyanotungstate(IV) and octacyanomolybdate(IV) [J]. *J. Electroanal. Chem*, 1988, 240: 333 ~ 339.
- [15] Bartlett P N, Tebbutt P, Whitaker R G. Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry[J]. *Prog. Reaction Kinetics*, 1991, 16: 55 ~ 155.
- [16] Li J P, Yu J G. Fabrication of Prussian Blue modified ultramicroelectrode for GOD imaging using scanning electrochemical microscopy [J]. *Bioelectrochemistry*, 2008, 72(1):102 ~ 106.
- [17] Buck R P, Bowden E F, Umatia M, et al. *Biosensor Technology: Fundamentals and Applications* [M]. Marcel Dekker, New York, 1990, pp3.

# 一种水溶性花系衍生物 pH 荧光探针的合成及表征

马永山<sup>1</sup>, 吴俊森<sup>1</sup>, 常乃丰<sup>1</sup>, 孙韶华<sup>2</sup>

(1. 山东建筑大学市政与环境工程学院, 山东济南 250101)

(2. 济南市给排水监测中心, 山东济南 250033)

**摘要:** 该文主要以花四酸酐为起始物, 通过在酸酐位置引入天冬氨酸, 设计合成了一种水溶性的含有四个羧基的荧光花二酰亚胺衍生物, 研究了其在不同 pH 条件下的荧光光谱, 发现所研究化合物的荧光强度与 pH 值间有着强烈的依赖关系, H<sup>+</sup>能有效地减弱此化合物的荧光, 此化合物可用作测定溶液 pH 值的荧光探针。

**关键词:** 花酰亚胺; 水溶性; 天冬氨酸; 光谱性质

## Synthesis and study of the pH srobe based on one of water soluble perylene derivatives

Ma Yong-shan<sup>1</sup>, Wu Jun-sen<sup>1</sup>, Chang Nai-feng<sup>1</sup>, Sun Shao-hua<sup>2</sup>

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China)

(2. Jinan Water and Wasterwater Monitoring Center, jinan 250033, China)

**Abstract:** One water-soluble fluorescent perylene diimide derivative with four carboxylic groups was synthesized by L-Aspartic acid and 3,4,9,10-perylenetetracarboxy anhydride. Its fluorescence spectra was recorded under different pH conditions and showed that the fluorescence intensity of studied compound depends on the pH value very strongly. The fluorescence of compound was quenched by the addition of H<sup>+</sup>. It means that this kind of compounds can be used as a probe for the determination of pH value of solution.

**Key words:** perylene diimide derivative; water-soluble; L-Aspartic acid; spectral characterization

## 0 引言

荧光 pH 探针是分子探针的一种, 广泛应用于分析化学、生物分析化学、医学(监控血液中的 pH)和细胞生物学(量度细胞内的 pH)等领域<sup>[1]</sup>。根据涉及到的基本过程, 大多数荧光 pH 探针发生作用的机制有两类: 一类是光诱导电子迁移过程(简称 PET), 另一类是光诱导电荷迁移过程(简称 PCT)<sup>[2]</sup>。这两类作用机制都是通过质子化<sup>[3]</sup>、氢键<sup>[4~5]</sup>、以及氢质子与荧光染料的过渡态形成不稳定化学键来实现的<sup>[6]</sup>。带有羧基的花酰亚胺型荧光染料具有显著的优点: 既有亲脂性又有亲水性(花骨架使其具备亲脂性, 羧基的存在又使其兼

具亲水性), 斯托克斯位移大且荧光量子产率高。既有亲脂性又有亲水性使其能渗透到细胞内, 可用于活体组织内 pH 的测定; 斯托克斯位移较大可避免吸收光谱干扰发射光谱, 从而提高测试的灵敏度与准确性。因此将带有胺基的花酰亚胺类荧光染料开发作为 pH 荧光探针具有重要的应用价值和广阔的发展前景。花二酰亚胺衍生物的合成方法早已有报道<sup>[7~8]</sup>, 该文参考有关文献自行设计合成了含有四个羧基亲水性基团的花二酰亚胺衍生物, 并首次研究了它作为 pH 荧光探针的光谱特性, 光谱变化表明: 它随溶液 pH 的减小荧光强度逐渐降低, 可作为 pH 荧光探针。



## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

天冬氨酸、氢氧化钾、二甲基亚砷、浓硫酸、无水乙醇、盐酸、3, 4; 9, 10-花四甲酸二酐均为分析纯试剂。

$^1\text{H-NMR}$  谱用 Varian Inova 400 MHz NMR spectrometer; 布鲁克 TENSOR27 型傅里叶变换红外光谱仪; CARY50 紫外可见分光光度计; 日立 F-4500 型荧光分光光度计; 精密 pH 计 PHS-3C (上海雷磁仪器厂)。

### 1.2 合成(合成路线如图 1 所示)

#### 1.2.1 花二(天冬氨酸)二酐的合成<sup>[7-8]</sup>

准确称取 1.33 g (0.01 mol) 天冬氨酸与 1.12 g (0.02 mol) KOH 的水溶液混合、室温搅拌过夜, 减压旋转蒸除体系水分, 得 2.1 g 天冬氨酸钾盐晶体。将制备的天冬氨酸钾盐超声分散在 40 mL DMSO 溶液中后, 在磁力搅拌下使其回流半小时, 再加入 0.4 g 精制的花酐继续搅拌、回流, 每

隔 30 min 取少量样品在浓硫酸中测可见光谱, 直到在 500 nm、546 nm 左右花酐的特征吸收峰消失, 而在 560 nm、600 nm 左右出现对称花四羧酸二酐亚胺的特征峰, 且两者的相对强度基本不变时停止反应。将反应后体系离心, 沉淀用无水乙醇洗至滤液基本无色, 加水用稀盐酸酸化至 pH=1, 水洗 3 次, 得到化合物 2。

#### 1.2.2 花二(天冬氨酸铵盐)二酐亚胺的合成

将化合物 2 溶解到 20 mL 15% 的氨水里面, 搅拌 5 min, 过滤得滤液, 除掉溶剂得到红棕色的固体, 80 °C 真空干燥得 0.45 g 产物 3, 产率约 70%。  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , TMS, ppm)  $\delta$ : 7.37(d, 4H), 7.00(d, 4H), 5.26(m, 2H), 2.12(s, 4H); FTIR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3 433, 3 164(酰胺 N-H 伸缩振动), 3 052(花环 C-H 伸缩振动), 2 847(饱和 C-H 伸缩振动), 1 689(羧酸 C=O 伸缩振动), 1 592(花环 C=C), 1 361, 1 345 (C-N), 1 273, 1 182, 1 114, 1 021, 951(羧酸中 C-O), 853, 809, 793, 737, 659, 461, 432 (C-H 非平面摇摆);  $m/z = 616[\text{M}]^+$ 。

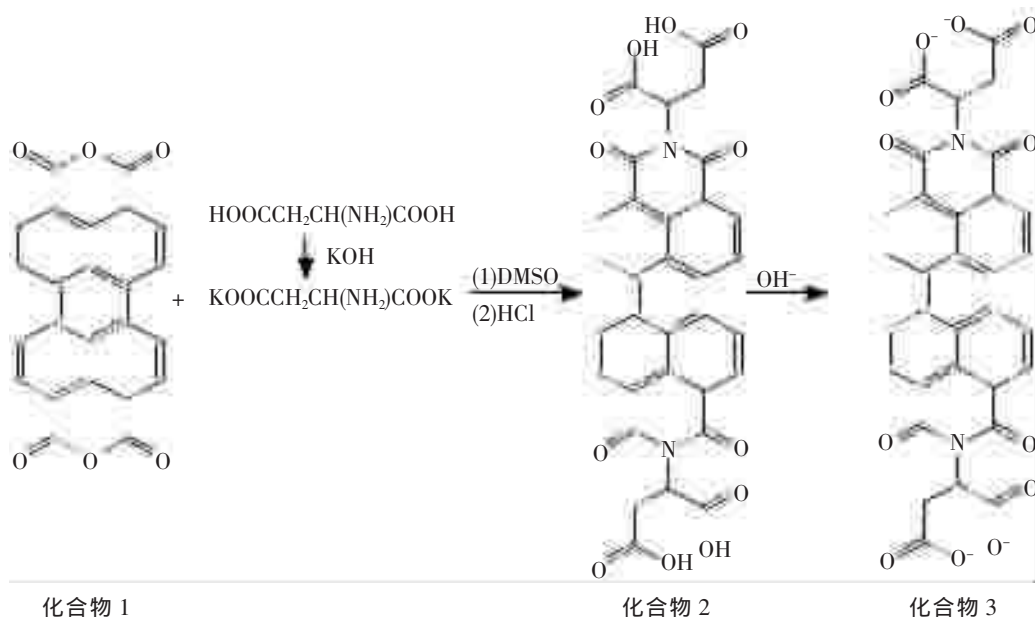


图 1 化合物 3 的合成路线

Fig.1 Synthesis route of compound 3

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱

图 2 为  $10^{-5}$  mol/L 的化合物 3 荧光强度随 pH 变化的曲线图, 右上角内置图为荧光强度随

pH 值变化的改变趋势图。化合物 3 的最大发射波长为  $\lambda_{\text{max}} = 551 \text{ nm}$ , 伴随溶液 pH 值降低, 荧光发射强度逐渐降低。在 pH 值由 10.75 降到 9.66 时, 荧光强度急剧降低, 在碱性溶液中化合物 3 以羧酸根的形式存在, 羧酸根阴离子为富电子特

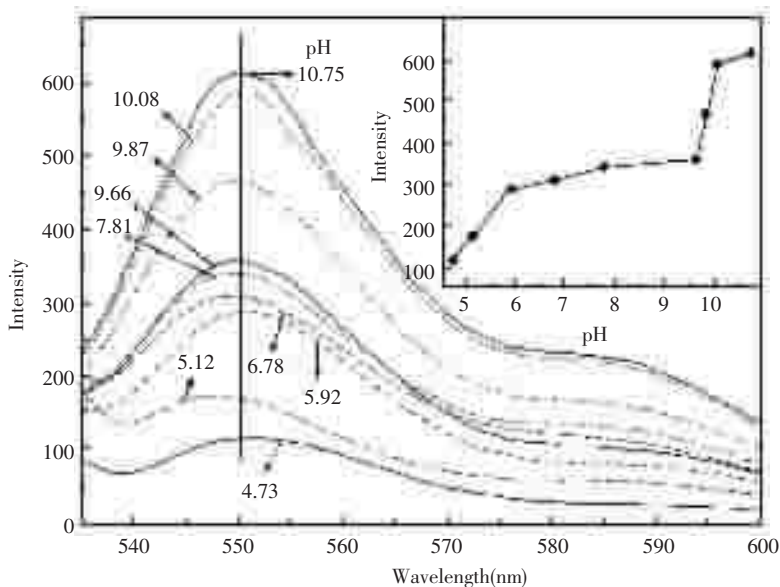


图 2  $10^{-5}$  mol/L 的化合物 3 水溶液的不同 pH 值的荧光图( $\lambda_{\max}=551$  nm)  
( $2 \times 10^{-3}$  mol/L 的磷酸缓冲体系, 内置图为化合物 3 最大荧光强度值与 pH 值的对应图)

Fig.2 The fluorescence spectra of compound 3( $10^{-5}$  mol/L) in water at different pH( $2 \times 10^{-3}$  mol/L phosphate buffer;  
Insert is the relative fluorescence intensity change of compound 3 at different pH)

征, 使整个化合物分子具有较高的电子密度, 花核平面之间存在的斥力阻止了它们的聚集从而获得高的荧光量子产率; 溶液 pH 从 9.66 降到 5.12 时, 荧光强度降低缓慢, 体系为花四羧酸及其盐的缓冲溶液, 发光物种比较稳定, 荧光强度降低幅度不大; 当 pH 值降低到 5.12 以下, 荧光强度迅速降低直至淬灭, 峰形也发生了改变, 在强酸性溶液中, 化合物 3 主要以酸式形式存在, 整个化合物分子负电势减弱, 花分子间发生聚集作用和光诱导电子转移现象使荧光淬灭。这说明化合物 3 的荧光强度与 pH 值间有着强烈的依赖关系, 在强碱性溶液中荧光强度最强, 在较宽的中性区域环境溶液中荧光较弱且稳定, 而在强酸性溶液中荧光被淬灭, 此化合物可用作测定溶液 pH 值的荧光探针。

## 2.2 UV-vis 吸收光谱

化合物 3 的最大吸收波长为 534 nm。伴随 pH 值减小, 吸收峰强度减小。对于花系衍生物来说, 电子振动吸收具有自身的特点,  $v=0 \rightarrow v'=0, 1$  和 2 的跃迁(这里的  $v$  和  $v'$  是基态和激发态的量子振动数) 分别对应着 534 nm、500 nm 和 465 nm 处吸收峰, 当单体开始聚集时,  $0 \rightarrow 1$  和  $0 \rightarrow 2$  跃迁会增加<sup>[9-10]</sup>, 为利于比较  $0 \rightarrow 1$  和  $0 \rightarrow 2$

峰形变化, 在 534 nm 处将峰值做归一化处理(图 3)。从 pH 10.75 到 9.66,  $0 \rightarrow 1$  和  $0 \rightarrow 2$  跃迁吸收有所增加, 说明在这个 pH 范围花四羧酸根单体因发生  $\pi-\pi$  作用而聚集; 从 9.66 到 5.92,  $0 \rightarrow 1$  和  $0 \rightarrow 2$  跃迁吸收有微弱增加, 说明在这个 pH 范围的  $\pi-\pi$  聚集作用的大小变化较弱; 而当 pH 继续降低到 5.12 甚至是更低的时候,  $0 \rightarrow 1$  和  $0 \rightarrow 0$  跃迁吸收的比率明显的增大, 初始的吸收峰发生红移, 最终在整个检测波段内出现吸收, 这是因为伴随 pH 值降低, 化合物 3 的花四羧酸单体发生  $\pi-\pi$  作用而聚集, 从而阻止了光的通过, 化合物 3 的紫外可见吸收光谱印证了荧光强度与 pH 值之间效应的机理。

## 3 结论

合成了一种水溶性的荧光化合物: 对称花二(天冬氨酸铵盐)二酰亚胺化合物。研究了 pH 值变化对荧光光谱的影响, 发现所研究化合物的荧光强度与 pH 值间有着强烈的依赖关系, 在强碱性溶液中荧光强度最强, 在较宽的中性区域环境中荧光较弱, 而在强酸性溶液中荧光被淬灭。这一结果对于深入研究花二酰亚胺衍生物的基础光物理性质和 pH 荧光传感体系的设计具有

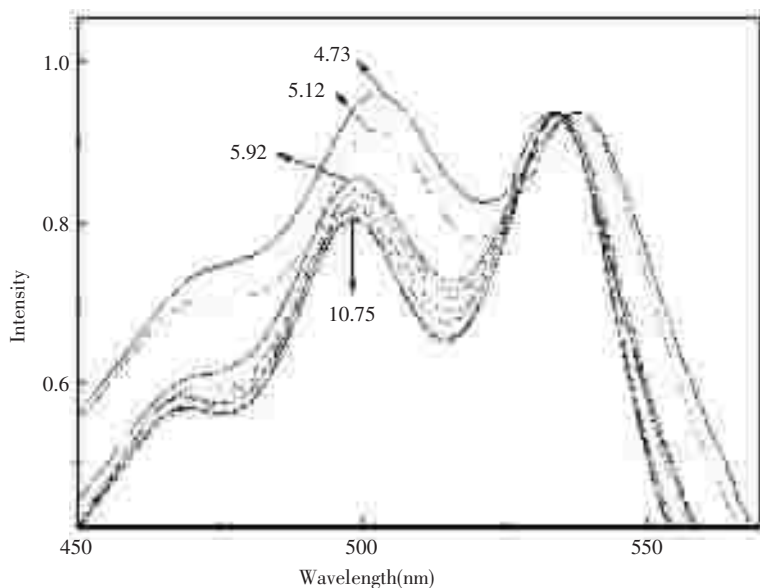


图 3 归一化的  $10^{-5}$  mol/L 化合物 3 的水溶液的吸收光谱与 pH 值的对应图  
(pH:4.73, 5.12, 5.92, 6.78, 7.81, 9.66, 9.87, 10.08, 10.75)

Fig.3 The normalized absorption spectra of compound 3( $10^{-5}$  mol/L) in water at different pH  
(pH:4.73, 5.12, 5.92, 6.78, 7.81, 9.66, 9.87, 10.08, 10.75)

理论和应用意义。

### 参考文献

- [ 1 ] Ronnie M A, Kjell C, Anders L, et al. Characterization of probe binding and comparison of its influence on fluorescence lifetime of two pH-sensitive benzoxanthene dyes using intensity-modulated multiple-wavelength scanning technique[J]. *Anal Biochem*, 2000, 283(1): 104~110.
- [ 2 ] Grabowski Z R, Rotkiewicz K. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures[J]. *Chem Rev*, 2003, 103(10): 3 899~4 032.
- [ 3 ] Wang Z X, Zheng G R, Lu P. 9-(Cycloheptatrienylidene)-fluorene derivative: Remarkable ratiometric pH sensor and computing switch with NOR logic gate[J]. *Org Lett*, 2005, 7(17): 3 669~3 672.
- [ 4 ] Hong S W, Kim K H, Huh J, et al. Design and synthesis of a new pH sensitive polymeric sensor using fluorescence resonance energy transfer [J]. *Chem Mater*, 2005, 17(25): 6 213~6 215.
- [ 5 ] Tanaka K, Kumagai T, Aoki H, et al. Application of 2-(3,5,6-trifluoro-2-hydroxy-4-methoxyphenyl) benzoxazole and benzothiazole to fluorescent probes sensing pH and metal cations[J]. *J Org Chem*, 2001, 66(22): 7 328~7 333.
- [ 6 ] Letard J F, Lapouyade R, Rettig W. Relaxation pathways in photoexcited electron-rich stilbenes(D-D stilbenes) as compared to D-A stilbenes [J]. *Chem Phys Lett*, EN, 1994, 222(3): 209~216.
- [ 7 ] Liu Chong, Zhang Xiangyu, Wang Min. Research on photoelectric properties perylenedimide derivatives[J]. *Journal of Natural Science of Heilongjiang University*, 2007, 24(4): 522~525.
- [ 8 ] Sean M M, Wang Zhiyuan. Synthesis and characterization of poly(aryl ether imide)s containing electroactive perylene diimide and naphthalene diimide units[J]. *Journal of Polymer Science A: Polymerchemistry*, 2000, 38: 3 467~3 475.
- [ 9 ] Langhals H, Ismael R. Cyclophanes as model compounds for permanent, dynamic aggregates - induced chirality with strong CD effects[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 1998, 9: 1 915~1 917.
- [ 10 ] Wang W, Han J J, Wang L Q, et al. Dynamic  $\pi$ - $\pi$  stacked molecular assemblies emit from green to red colors[J]. *Nano Lett.*, 2003, 3: 455~458.