

基于三维有序大孔金电极的过氧化氢无酶传感器

宣 婕 姜立萍* 朱俊杰

(南京大学化学化工学院, 生命分析化学教育部重点实验室, 南京 210093)

摘 要 采用反相胶体-晶体模板技术以及电化学沉积法制得了三维有序大孔金膜修饰电极, 并对修饰电极进行了表征, 在此基础上构建了新型的 H_2O_2 无酶传感器。研究表明, 此传感器在 $1 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $8 \times 10^{-5} \sim 1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内对 H_2O_2 还原峰电流有良好的线性响应; 检出限为 $3.3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ($S/N=3$), 具有良好的稳定性和重现性。

关键词 无酶传感器; 过氧化氢; 三维有序大孔金膜; 反相胶体-晶体模板技术; 电化学沉积

1 引 言

过氧化氢(H_2O_2) 在食品工业^[1]、临床应用^[2]、环境分析^[3]等领域有着广泛的应用。同时, 它也是包括葡萄糖氧化酶、尿酸酶、胆固醇氧化酶、醇氧化酶、肌氨酸氧化酶、半乳糖氧化酶以及 L-氨基酸氧化酶等在内的一系列酶促反应的重要副产物。因此, 发展可靠、灵敏、快速、低成本的 H_2O_2 检测方法具有重要意义。目前, H_2O_2 检测方法包括滴定法^[4]、光谱法^[5]、荧光法^[6]、化学发光法^[7]、色谱法^[8]及电化学法^[9~15]。其中, 电化学法, 尤其是基于各种过氧化物酶^[11~13]和血红蛋白^[14, 15]的电流型生物传感器研究最为广泛, 因为它们具有操作简便、高效、高灵敏度和高选择性等优点。然而, 酶所固有的稳定性不佳、易失活的特点在一定程度上限制了该类传感器的应用。因此, 基于无酶传感器的 H_2O_2 检测逐渐引起人们的兴趣。目前, 普鲁士蓝^[16]、硫堇^[17]以及铂^[18]、银^[10, 19]、氧化铜^[20]、氧化钴^[21]等金属、金属氧化物纳米材料都已被成功应用于 H_2O_2 无酶传感器的构建。以反相晶体模板技术制备的三维有序多孔结构材料具有开阔的、相互连接的周期性结构, 有利于反应物与其表面活性位点的接触, 因而具有更高的活性比表面, 有利于进行无酶传感器的研究^[22, 23]。

本研究以垂直沉积法制备的三维有序排列的硅球为牺牲模板, 利用电化学沉积法构建了三维有序大孔金膜修饰电极, 并将其应用于 H_2O_2 无酶传感的研究, 线性范围为 $1 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $8 \times 10^{-5} \sim 1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 检出限为 $3.3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。此传感器具有良好的稳定性和重现性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI 660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司)。三电极系统: 工作电极为三维有序大孔(3DOM)金膜修饰电极(3DOM/Au/CME); 对电极在电化学沉积金过程中为铂片电极, 其它过程为铂丝电极; 参比电极为饱和甘汞电极(SCE)。所有的电位均相对于 SCE 而言。工作电极的几何面积(0.07 cm^2)通过一张打孔的覆盖在三维有序排列 SiO_2 球层上的绝缘胶带控制。单分散 SiO_2 球(直径 500 nm, Alfa Aesar 公司); 氯金酸($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 上海化学试剂有限公司); HClO_4 , H_2SO_4 和 HF (南京化学试剂有限公司); H_2O_2 (30%, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸盐缓冲液(PBS, 100 mmol/L, 由 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 配制)。所用试剂均为分析纯, 实验用水为 Millipore 纯水系统制备的超纯水(电导率 $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$)。

2.2 修饰电极的制备

电极的制备参考文献[24]。首先, 将石英基底的金片电极依次浸于乙醇、丙酮及水中, 超声清洗

2009-08-28 收稿; 2009-11-24 接受

本文系国家自然科学基金青年基金(No. 20605011)和创新研究群体项目(No. 20821063)资助

* E-mail: jianglp@nju.edu.cn

15 min, 再将其垂直悬挂于一定浓度的 SiO_2 悬浮液(0.35 g SiO_2 纳米球超声分散于 60 mL 水-乙醇混合溶液(1:9, V/V)中)中, 整个体系保持在 35 °C 直至溶剂完全挥发, 再在氮气保护下于 250 °C 煅烧 2 h, 从而得到三维有序排列的 SiO_2 胶体晶体模板。将电极浸入由 0.1% (w/w) HAuCl_4 和 0.1 mol/L HClO_4 组成的电解液中, 于氮气氛围下在 0.5 V 进行恒电位沉积, 电量控制为 0.06 C。最后, 用 5% HF 溶解 SiO_2 胶体模板, 从而得到三维有序大孔金膜修饰电极。将此电极置于 0.5 mol/L H_2SO_4 中, 用 CV 法(0 ~ 1.6 V)活化 30 min, 直至获得稳定的 CV 曲线。

3 结果与讨论

3.1 三维有序大孔金膜修饰电极的电化学表征

在 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中对修饰电极进行了电化学表征, 如图 1 所示。3DOM/Au/CME 具有典型的金电极的 CV 行为特征, 起始于 1.1 V 附近的两个氧化峰均为金的氧化峰; 起始于 0.9 V 附近的还原峰为金氧化物的还原峰^[24]。根据其电化学还原过程的电量可以计算得到此修饰电极的有效面积为 0.65 cm^2 , 与之相应的表面粗糙因子为 9.3, 即相对于普通的平面金片电极, 3DOM 结构具有更大的活性比表面, 可以用于电化学传感器的构建。

3.2 修饰电极对 H_2O_2 的安培响应

采用 CV 法研究了此修饰电极对 H_2O_2 的电化学催化行为, 如图 2 所示。在空白的缓冲溶液中, 修饰电极的 CV 曲线近似为平坦的直线(曲线 a); 而当在底液中加入 0.1 mmol/L H_2O_2 后, 其阴极电流明显增大(曲线 b)。由此可见, 阴极电流的变化是修饰电极电催化还原 H_2O_2 的结果。

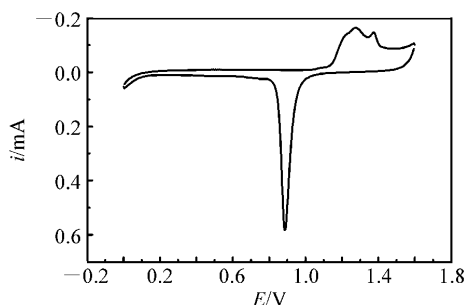


图 1 三维有序大孔金膜修饰电极的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammogram of three-dimensional ordered macroporous(3DOM) gold film modified electrode

0.5 mol/L H_2SO_4 ; v : 100 mV/s.

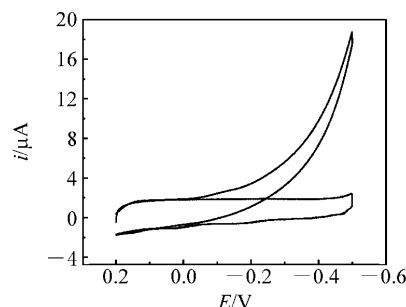


图 2 三维有序大孔金膜修饰电极的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of 3DOM gold film modified electrode

a. 0.1 mol/L PBS (pH 7.0); b. a + 0.1 mmol/L H_2O_2 ; 氮气饱和和(N_2 saturated); v : 100 mV/s.

3.3 实验条件的优化

从修饰电极对 H_2O_2 响应的 CV 实验可见, 修饰电极所产生的还原电流与检测电位密切相关。为确定对 H_2O_2 进行安培检测的最佳工作电位, 在 PBS(pH 7.0)中研究了工作电位对修饰电极电流响应的影响, 如图 3 所示。修饰电极对 H_2O_2 的电催化还原电流起始于 -0.1 V, 随着工作电位的负移, 电流响应逐渐增大。这是由于电位的负移促进了 H_2O_2 还原^[25]。本实验最终选择 -0.4 V 作为安培检测实验的工作电位, 既保证了背景电流和噪音足够小, 也减少了溶液中其它电活性物质对于 H_2O_2 检测的干扰。

考察了溶液 pH 值对传感器响应的影响, 如图 4 所示。当缓冲溶液的 pH = 7.0 时, 修饰电极对 H_2O_2 的还原电流达到最大。因此, 选择 pH 7.0 的 PBS 作为安培检测实验的底液。

3.4 H_2O_2 的检测

在 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)中, 在工作电位为 -0.4 V 时, 采用计时电流法研究了修饰电极的电流响应与溶液中 H_2O_2 浓度之间的关系, 结果如图 5 所示。在一直保持氮气氛围的搅拌的底液中, 每隔 1 min 加入一定浓度(10 或 20 $\mu\text{mol/L}$)的 H_2O_2 , 修饰电极所产生的稳态电流随 H_2O_2 的加入呈台阶状增加, 电流响应迅速, 在 8 s 内达到稳定响应。

图 6 是传感器对 H_2O_2 响应的线性关系。由图 6 可见, 当 H_2O_2 浓度在 $1 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-5}$ mol/L

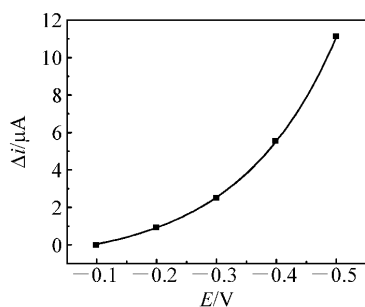
图3 工作电位对修饰电极上 H_2O_2 还原电流的影响

Fig. 3 Effect of applied potential on steady-state response current of 3DOM gold film modified electrode

0.1 mol/L PBS (pH 7.0); 0.05 mmol/L H_2O_2 ; 氮气饱和(N_2 saturated)。

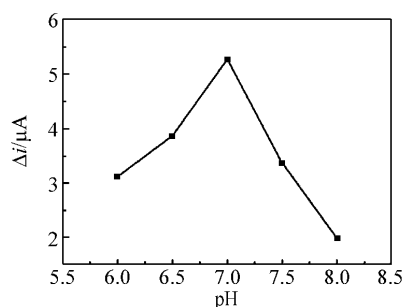


图4 pH 值对修饰电极电流响应的影响

Fig. 4 Effect of pH value on steady-state response current of 3DOM gold film modified electrode

工作电位 (Working voltage) -0.4 V , 其它条件同图 3 (Other conditions are same as Fig. 3)。

和 $8 \times 10^{-5} \sim 1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内时, 其 H_2O_2 还原电流随着 H_2O_2 浓度的增加呈线性关系, 其线性回归方程分别为 $y_1 = 0.1230x + 0.1096$, $y_2 = 0.08859x + 2.3736$, $r_1 = r_2 = 0.9999$ 。此传感器的检出限为 $3.3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ($S/N=3$)。以上结果优于文献 [26, 27] 的报道。对 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ H_2O_2 连续测定 8 次的 RSD 为 5.7%。

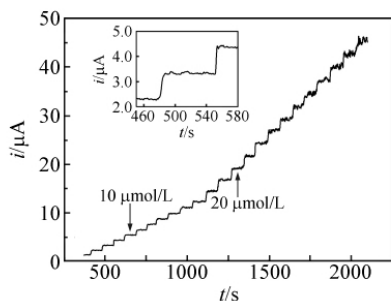


图5 修饰电极的稳态电流-时间曲线

Fig. 5 Stead-state current-time response of 3DOM gold film modified electrode

在轻微搅拌条件下连续加入 H_2O_2 (Successive addition of H_2O_2 into gently stirred solution), 其它条件同图 4 (Other conditions are same as Fig. 4)。

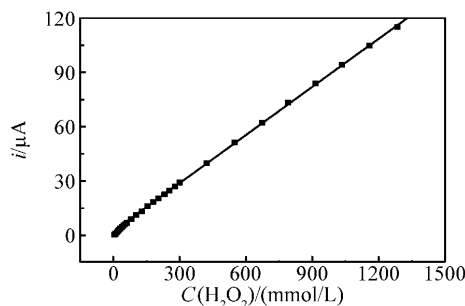
图6 H_2O_2 还原电流响应与其浓度关系曲线

Fig. 6 Plot of steady-state response current vs. H_2O_2 concentration

其它条件同图 5 (Other conditions are same as Fig. 5)。

进一步的研究表明, 该传感器具有较好的稳定性。将其室温放置 14 d, 每隔 4 d 以 0.5 mol/L H_2SO_4 活化 30 min 后, 再对 H_2O_2 进行检测, 其还原电流没有发生明显变化。由此可见, 所制备的 3DOM/Au/CME 能够较好地应用于 H_2O_2 的测定。

3.5 实际样品分析

对某双氧隐形眼镜护理液中 H_2O_2 的含量进行测定。采用传统的高锰酸钾滴定法测得其中 H_2O_2 含量为 0.992 mol/L。利用本实验构建的传感器, 在最佳实验条件下采用计时电流法测定 5 次, 均值为 0.967 mol/L, RSD 为 4.3%。

References

- 1 Kriz K, Anderlund M, Kriz D. *Biosensors and Bioelectronics*, **2001**, 16(6): 363 ~ 369
- 2 DENG Zi-Feng (邓子峰), ZHANG Hong-Wei (张洪伟), JIAO Yu-Zhu (焦玉珠). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(4): 613 ~ 616
- 3 Matos R C, Pedrotti J J, Angnes L. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 441(1): 73 ~ 79
- 4 Klassen N V, Marchington D, McGowan H C E. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(18): 2921 ~ 2925

- 5 Lobnik A , Cajlakovic M. *Sensors and Actuators B* , **2001** , 74(1-3) : 194 ~ 199
- 6 Zhang L S , Wong G T F. *Talanta* , **1999** , 48(5) : 1031 ~ 1038
- 7 Hanaoka S , Lin J M , Yamada M. *Anal. Chim. Acta* , **2001** , 426(1) : 57 ~ 64
- 8 Effkemann S , Pinkernell U , Karst U. *Anal. Chim. Acta* , **1998** , 363(1) : 97 ~ 103
- 9 Alina L , Patricia L , Andrea V , Pascal C , François R. *Sensors and Actuators B* , **2009** , 137(1) : 56 ~ 61
- 10 Guascito M R , Filippo E , Malitesta C , Manno D , Serra A , Turco A. *Biosensors and Bioelectronics* , **2008** , 24(4) : 1057 ~ 1063
- 11 Jia J B , Wang B Q , Wu A G , Cheng G J , Li Z , Dong S J. *Anal. Chem.* , **2002** , 74(9) : 2217 ~ 2223
- 12 Zhang L , Zhang Q , Lu X B , Li J H. *Biosensors and Bioelectronics* , **2007** , 23(1) : 102 ~ 106
- 13 Zhao X J , Mai Z B , Kang X H , Zou X Y. *Biosensors and Bioelectronics* , **2008** , 23(7) : 1032 ~ 1038
- 14 Zheng W , Li J , Zheng Y F. *Biosensors and Bioelectronics* , **2008** , 23(10) : 1562 ~ 1566
- 15 Zheng W , Zheng Y F , Jin K W , Wang N. *Talanta* , **2008** , 74(5) : 1414 ~ 1419
- 16 Karyakin A A , Karyakina E E , Gorton L. *J. Electroanal. Chem.* , **1998** , 456(1-2) : 97 ~ 104
- 17 Thenmozhi K , Narayanan S S. *Sensors and Actuators B* , **2007** , 125(1) : 195 ~ 201
- 18 You T Y , Niwa O , Tomita M , Hirono S. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(9) : 2080 ~ 2085
- 19 Welch C M , Banks C E , Simm A O , Compton R G. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2005** , 382(1) : 12 ~ 21
- 20 Miao X M , Yuan R , Chai Y Q , Shi Y T , Yuan Y Y. *J. Electroanal. Chem.* , **2008** , 612(2) : 157 ~ 163
- 21 Jia W Z , Guo M , Zheng Z , Yu T , Rodriguez E G , Wang Y , Lei Y. *J. Electroanal. Chem.* , **2009** , 625(1) : 27 ~ 32
- 22 Song Y Y , Zhang D , Gao W , Xia X H. *Chemistry – A European Journal* , **2005** , 11(7) : 2177 ~ 2182
- 23 Bai Y , Yang W W , Sun Y , Sun C Q. *Sensors and Actuators B* , **2008** , 134(2) : 471 ~ 476
- 24 Chen X J , Wang Y Y , Zhou J J , Yan W , Li X H , Zhu J J. *Anal. Chem.* , **2008** , 80(6) : 2133 ~ 2140
- 25 Wang L , Wang E K. *Electrochemistry Communications* , **2004** , 6(2) : 225 ~ 229
- 26 Yang Y F , Mu S L. *Biosensors and Bioelectronics* , **2005** , 21(1) : 74 ~ 78
- 27 Jeykumari D R S , Ramaprabhu S , Narayanan S S. *Carbon* , **2007** , 45(6) : 1340 ~ 1353

Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor Based on Three-dimensional Ordered Macroporous Gold Film Modified Electrode

XUAN Jie , JIANG Li-Ping* , ZHU Jun-Jie

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science , Ministry of Education of China ,
School of Chemistry and Chemical Engineering , Nanjing University , Nanjing 210093)

Abstract An enzyme-free electrochemical sensor for the detection of hydrogen peroxide was developed using a three-dimensional ordered macroporous (3DOM) gold film modified electrode , which was obtained via the inverted colloidal-crystal template technique and electrochemical deposition method. The modified electrode was characterized by cyclic voltammetry (CV). Under the optimized conditions , the sensor showed a wide dynamic range for the detection of hydrogen peroxide , whose catalytic current was linear with hydrogen peroxide concentration ranging from 1×10^{-6} to 5.5×10^{-5} mol/L and 8×10^{-5} to 1.3×10^{-3} mol/L with a detection limit of 3.3×10^{-7} mol/L (signal-to-noise ratio of 3). In addition , the sensor exhibited good reproducibility and stability and might have potential applications in the fabrication of nonenzymatic sensor.

Keywords Nonenzymatic sensor; Hydrogen peroxide; Three-dimensional ordered macroporous gold film; Inverted colloidal-crystal template technique; Electrochemical deposition

(Received 28 August 2009; accepted 24 November 2009)