

# 基于顺序注射分析法的丝网印刷型生物传感器系统的研究

赵芳<sup>1,2</sup> 蔡强<sup>2,4</sup> 杨笑鹤<sup>3</sup> 陈向强<sup>4</sup> 彭方毅<sup>5</sup> 彭惠民\*<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>(重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016) <sup>2</sup>(浙江清华长三角研究院生态环境研究所, 嘉兴 314006)

<sup>3</sup>(浙江省医疗器械研究所, 杭州 310009) <sup>4</sup>(清华大学, 北京 100084) <sup>5</sup>(重庆理工大学, 重庆 400050)

<sup>6</sup>(重庆医科大学基础医学院实验中心, 重庆 400016)

**摘要** 采用顺序注射分析(SIA)与丝网印刷生物传感器联用法,考察辣根过氧化物酶(HRP)催化邻苯二胺(OPD)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应体系。利用牛血清白蛋白(BSA)和戊二醛形成的交联大分子,将HRP固定于丝网印刷电极表面,制备成HRP电极,通过对缓冲液pH值及浓度、泵流速、样品量进行优化,建立用于检测HRP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与OPD的催化动态响应曲线的SIA与时间电流(*i*<sub>t</sub>)相结合的分析方法。结果表明:在实验反应的最适条件(泵流速153.9 mL/min、样品量100 nL、0.1 mol/L PBS缓冲液(pH 6.5))下,电流响应值随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度增加而增大,HRP酶电极测定H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度线性范围是0.1~1.0 mmol/L,呈现良好的线性关系。该酶电极重现性良好,RSD为3.8%,用于实际水样回收率测定时,回收率大于60%。

**关键词** 顺序注射分析; 生物传感器; 丝网印刷电极; 辣根过氧化物酶

## 1 引言

丝网印刷型电化学生物传感器具有成本低,工艺简单,检测快速,灵敏度高等特点<sup>[1-3]</sup>。在应用分析中通常将样品滴加到这类电极的工作区域或直接把电极放入样品液中。近来出现了流动注射分析(FIA)与丝网印刷生物传感器联用技术。如Ledru等<sup>[1]</sup>采用FIA与电化学丝网印刷电极结合检测HRP-SPCE与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系间电子直接转移,该方法提高了传感器分析的精确度和灵敏度。为了提供多步骤化学反应,简化分析流路操作,在实际应用的在线和过程分析工作中,顺序注射分析(SIA)和电化学生物传感器联用技术得到了关注。如Gomes等<sup>[4]</sup>采用SIA与铂电极电化学生物传感器结合检测L-乳酸; Niculescu等<sup>[5]</sup>采用喷壁式FIA和SIA与石墨棒及丝网印刷脱氢酶电极结合监测酒发酵过程中的乙醇。与FIA相比,SIA检测系统中泵阀到检测器间管道较短,消耗试剂较少<sup>[6]</sup>,可通过注射泵定量抽吸实现多步骤的定量反应与分析<sup>[6-8]</sup>,且不需要因为检测项目变化而改变流路系统。

SIA与丝网印刷型电化学生物传感器联用方法,提供了更有利的在线长期实时检测环境<sup>[5,6]</sup>。目前对该联用方法使用研究还较少。本实验采用此联用方法,以辣根过氧化物酶(HRP)为生物识别分子,探讨丝网印刷电极上HRP酶催化邻苯二胺(OPD)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系<sup>[9-11]</sup>的反应,并优化了检测条件。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

CHI1000 电化学工作站(上海辰华仪器公司); MSP1-C1 工业注射泵(保定兰格恒流泵有限公司); 电解池,丝网印刷电极(自制,图1)。

辣根过氧化物酶(HRP, 250~300 U/mg, Sigma公司); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 邻苯二胺(OPD, 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 牛血清白蛋白(BSA, Sigma公司), 戊二醛(25%, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 甲醇(分析纯, 杭州化学试剂有限公司); 碳浆(423ss, Acheson公司); 绝缘浆(CH-10, 日本JUJO公司); 地表水(pH 7.22, 浊度18.9 NTU, 浙江省嘉兴市工业园区), 磷酸盐缓冲液, 实验用水为超纯水。

2010-08-24收稿; 2010-11-08 接受

本文系国家高技术研究发展计划(No. 2007AA06Z419), 浙江省重点科技计划(No. 2006C23069)及浙江省自然科学基金(No. Y507081)资助项目

\* E-mail: penghuimin6@sohu.com

## 2.2 顺序注射型电化学检测系统

顺序注射型电化学检测系统主要由注射泵、多位阀、流通反应池、电化学检测系统组成,如图 1 所示。系统中采用的注射泵额定行程为 30 mm/3000 步,线速度范围 16.67~25 mm/s,采用多位阀配合完成试样的引入、预处理、反应及检测等。系统采用电化学工作站,检测在流通反应池上电极间电流信号的变化。控制软件在 PC 机上运行,采用 C++ builder 6.0 开发,通过 RS232 接口实现对系统中的注射泵、多位阀的精准控制。采用 1 mL 注射器时,该系统最低流速可达 50 mL/min。

## 2.3 HRP 酶电极的制备

**2.3.1 丝网印刷电极的制备** 采用丝网印刷工艺制备两电极结构的电化学传感器<sup>[12-14]</sup>(图 2)。以碳浆印制碳电极层(图 2A),由于是两条碳糊电极,一条做工作电极,另一条做参比电极。后印刷蓝色油墨作为绝缘层(图 2B)。碳电极印刷完毕后,将电极放入 90 °C 烘箱中 30 min。绝缘层印刷完毕后,将电极放入 90 °C 烘箱 15 min,常温干燥保存。

**2.3.2 HRP 电极的制备** 将电极条放入水中超声清洗 3 min,取出用水清洗,晾干待用。用 PBS(pH 7.0)配制 1 g/L HRP 酶液和 0.3% 戊二醛;用水配制 2 g/L BSA;按照  $V(\text{HRP}):V(\text{戊二醛}):V(\text{BSA})=15:5:3$  将其混匀,取 10 mL 混合液滴加到电极工作区域,置于 37 °C 培养箱中保湿反应 1 h。取出用纯水冲洗,晾干后于 4 °C 冰箱中干燥保存待用。

## 2.4 检测方法

采用时间-电流( $i-t$ )方法检测,极化电位采用 -0.2 V,注射泵的流速为 50~400 mL/min。实验过程中,在  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.1~1.0 mmol/L,OPD 浓度为 0.1~2.0 mmol/L,均为新鲜配制。采用顺序注射方法分析流路完成检测。

实验前,抽取适量的缓冲液将整个循环流路清洗及将管道中的空气排走,消除气泡产生的影响。一个操作循环流程如下:(1)清洗流路 注射泵吸入 200 mL PBS,通过阀位 2 排出,清洗管路中上次残留样品。(2)进样 注射泵和阀位 1 依次各吸入 200 mL PBS,然后转换到阀位 4 吸入 100 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  与 OPD 的混合样品试剂。(3)检测 将多位阀转换到阀位 2,注射泵流速调为 153.9 mL/min,将储液管中试剂注射进检测池中进行检测。在检测过程中储液管的容量要达到混合试剂总量的要求。检测完成后,用纯水将所有管路冲洗干净,以备下次使用。

## 3 结果与讨论

### 3.1 流速的影响

流速对峰值电流、响应时间及噪声有影响。本实验采用 1 mL 注射器,当流速为 187.5 mL/min 时,电流响应的噪声值较小,OPD- $\text{H}_2\text{O}_2$  混合样品液很快经过了酶电极工作区域,使酶促反应未及完全,致使峰电流较小;当流速为 170.5 mL/min 时,电流响应噪声值增加,但酶促反应未达到最佳;当流速为 134.7 和 115.9 mL/min 时,电流噪声值较大,混合样品液扩散的速度缓慢,同样使 HRP 与混合样品液酶促反应不完全,峰电流降低,且在检测同等量的样品液时,测定时间过长,峰值没有达到最佳,具体数据见图 3。在同一个混合样品液浓度下,各流速下的峰电流值  $i_p(153.9 \text{ mL/min}) > i_p(170.5 \text{ mL/min}) > i_p$

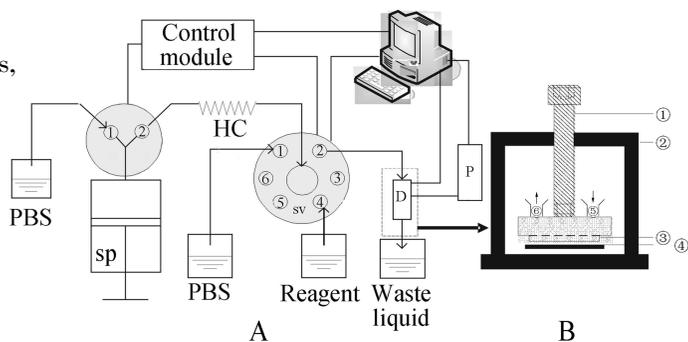


图 1 SIA-电化学生物传感器系统

Fig. 1 SIA- electrochemical biosensor system

A. SP: 注射泵(Syringe pump); HC: 储液管(Holding coil); SV: 多位选择阀(Multiposition valve); P: 恒电位(Potentiostat); D: 检测池(Detector cell); B. ①螺丝(Screws); ②支撑架(Backstop); ③流通式反应池(Flow-through cell); ④酶电极(Enzyme electrode)。

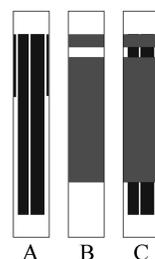


图 2 丝网印刷电极的制备

Fig. 2 Preparation of screen print electrode

A: 碳浆层(Carbon paste layer); B: 绝缘层(Insulation layer); C: 完整电极(Full electrode)。

(187.5 mL/min) >  $i_p$ (134.7 mL/min) >  $i_p$ (115.9 mL/min), 当流速为 153.9 mL/min 时, 电流响应噪声相对较小, 电流响应曲线较好, 峰电流值较大。因此, 本实验选择的最佳流速为 153.9 mL/min。

### 3.2 样品量的影响

样品量影响峰电流值的大小和形状。由于样品量由流速及电化学反应速率决定, 此外样品在抽取后存在于流路中时与缓冲液的界面混合, 造成峰形不清晰, 所以抽取样品量的多少对电流响应曲线存在影响。同一混合样品浓度下, 抽取的样品量小于 100  $\mu\text{L}$  时, 峰电流值小于 20 nA; 样品量大于 100  $\mu\text{L}$  时, 峰电流值大于 20 nA; 当样品量大于 140  $\mu\text{L}$  时, 峰电流值上升趋势减缓, 趋于稳态(图 4)。所以当样品量过少时, 酶促反应较小致使电流响应低, 峰电流值未达最佳值; 样品量过多时, 酶促反应完全, 但峰电流基本不变, 且检测时间过长, 试剂消耗增大。样品量为 100  $\mu\text{L}$  时, 电流峰值为 25 nA, 峰电流形态清晰, 该样品量下电流响应值虽然不是处于稳态, 但能获得较好的电流响应曲线。所以, 实验最适样品量为 100  $\mu\text{L}$ 。

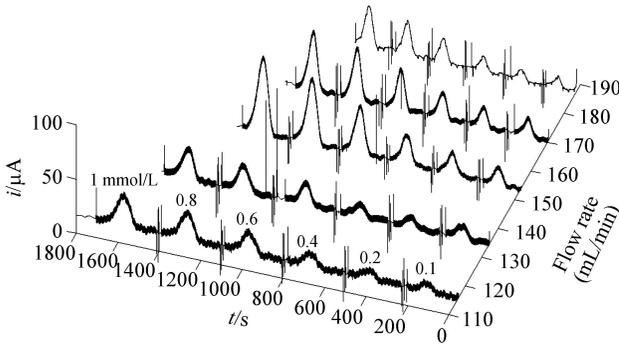


图 3 不同流速对 HRP 酶电极的影响

Fig. 3 Effect of different flow rate on horseradish peroxidase (HRP), electrode

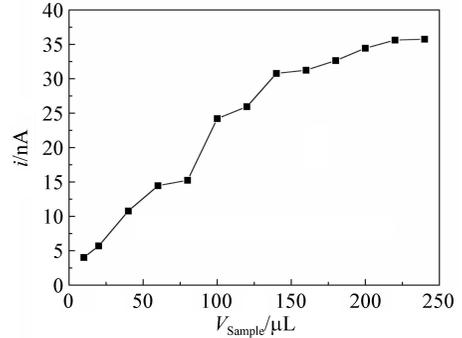


图 4 样品量对传感器电流响应的影响

Fig. 4 Effect of sample volume on HRP electrode response

### 3.3 缓冲液 pH 值对酶传感器的影响

缓冲液的 pH 值会影响峰值电流。在  $\text{pH} \approx 7.0$  时, HRP 活性最佳<sup>[14]</sup>。采用戊二醛与 BSA 交联方法将 HRP 固定于电极, 选取  $\text{pH} 5.5 \sim 8.0$  进行比较(图 5)。当  $\text{pH} < 6.5$  或  $\text{pH} > 6.5$  时, 电流响应值都有所降低, 这是由于 HRP 在过酸性或过碱性环境中, 其酶活性中心有关基团发生改变, 而使酶活降低, 从而酶促反应降低致使电流响应值降低。电流响应最大值出现在  $\text{pH} 6.5$ , 本实验最佳 pH 值选择 6.5。

### 3.4 缓冲液浓度对酶生物传感器的影响

缓冲液的浓度对酶促反应也有影响<sup>[11]</sup>, 在不同浓度的缓冲液下, 酶活性有差异, 致使峰电流值不同。本实验选取 0.05~0.25 mol/L PBS 进行比较, 从图 6 可知, 混合样品液同一浓度下, PBS 浓度为 0.1 mol/L 时, 电流响应值最大, 但随着缓冲液浓度的增加或减小, 峰电流值都随之降低。因为缓冲液浓度过大时, 不仅使酶活降低, 而且阻碍了电子的传递而使电流减小, 抑制了酶促反应, 这有可能是不可逆的反应, 因为同个酶电极重复测定时, 峰电流值都有所降低。缓冲液浓度太小, 无法保证酶促反应具有足够的电子传递而使电流减小。本实验选用 0.1 mol/L PBS。

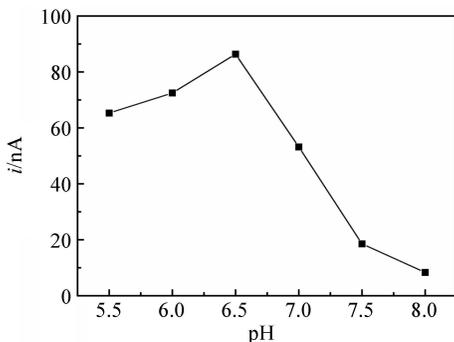


图 5 缓冲液 pH 值对酶电极电流响应的影响

Fig. 5 Effect of pH on HRP electrode response

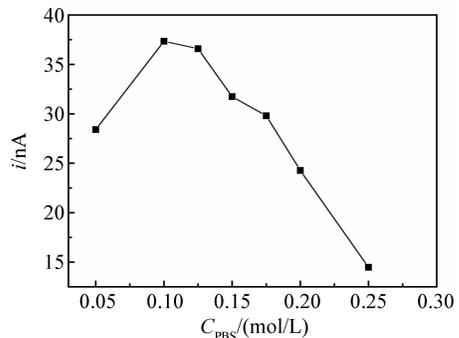


图 6 缓冲液浓度对酶电极电流响应的影响

Fig. 6 Effect of buffer concentration on HRP electrode response

### 3.5 HRP 电极电流响应性能测定

在上述优化条件(0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.5), 流速 153.9 mL/min, 样品量 100  $\mu$ L) 下, 测定不同浓度  $H_2O_2$  与 OPD, HRP 催化 OPD- $H_2O_2$  反应的电流响应值见图 7。电流响应峰值随  $H_2O_2$  浓度增加而增大,  $H_2O_2$  浓度的线性范围是 0.1~1.0 mmol/L, 线性方程为  $y = 14.59 + 114.61x$ ,  $R^2 = 0.9845$ , 电流响应灵敏度为 110.11 mA/(mol/L); 电流响应峰值随 OPD 浓度增加而增大。OPD 浓度线性范围是 0.1~1.0 mmol/L, 线性方程为  $y = 27.595x + 17.925$ ,  $R^2 = 0.9941$ , 电流响应灵敏度为 26.88 mA/(mol/L)。

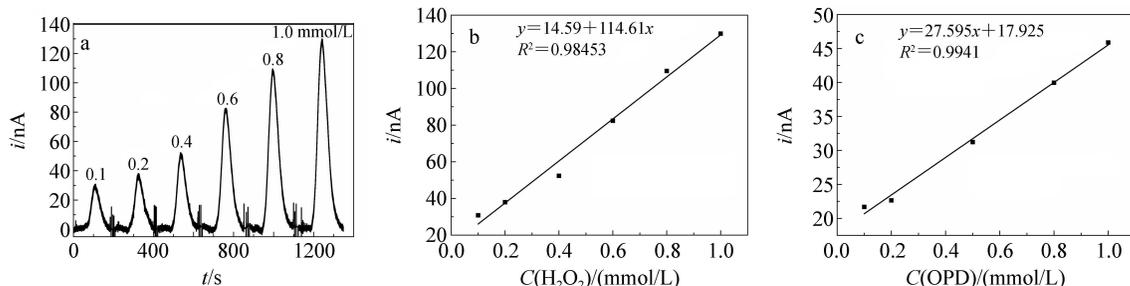


图 7 A: 不同浓度  $H_2O_2$  下 HRP 电极的电流响应; B: HRP 电极的电流响应与  $H_2O_2$  浓度线性关系; C: HRP 电极的电流响应与 OPD 浓度的线性关系

Fig. 7 A: Response of HRP electrode for  $H_2O_2$  different concentrations; B: Relationship between HRP electrode current response and concentration of  $H_2O_2$ ; C: Relationship between HRP electrode current response and concentration of OPD

### 3.6 HRP 电极的重复稳定性

在优化条件下, 采用同一 HRP 电极对 0.4 mmol/L  $H_2O_2$  与 OPD 混合试剂连续平行测定 30 次, 响应电流峰值平均值为 48.8 nA, HRP 酶活性有所降低, 相对标准偏差(RSD)为 3.8%。此 HRP 酶电极具有了较好的检测重复性。

### 3.7 回收率

实际生活中, 苯胺类化合物通常因运输车发生车祸、生产爆炸、工业排污等, 泄漏到地表水体中, 为验证电极的实用性, 采用加入法对地表水样品进行了回收率的测定。实际水样采集于浙江嘉兴工园区内的河水, pH 7.22, 浊度 18.9 NTU。结果如表 1 所示, OPD 浓度在 0.1~1.0 mmol/L 范围内, 回收率大于 60%。考虑到苯胺类化合物在因事故产生泄漏污染的水样中, 其浓度通常较高, 因此该酶电极适用于此类地表水体或化工废水处理过程的阳性初筛。回收率随加入 OPD 浓度增大而减少, 说明水样中可能存在抑制剂, 阻碍了酶促反应, 致使酶促电流降低, 抑制过程尚需进一步研究。

表 1 实际水样加标回收率实验

Table 1 Recoveries of spiked in real sample

样品编号 No.	样品量 Sample (mmol/L)	加入量 Added (mmol/L)	检出量 Found (mmol/L)	回收率 Recovery (%)	样品编号 No.	样品量 Sample (mmol/L)	加入量 Added (mmol/L)	检出量 Found (mmol/L)	回收率 Recovery (%)
1	0	0.1	0.0919	91.9	3	0	0.5	0.3647	72.9
2	0	0.2	0.1538	76.9	4	0	1.0	0.6764	67.6

## References

- Ledru S, Ruille N, Boujita M. *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**, 21(8): 1591~1598
- LIU Bing, YANG Ming Hui, YANG Hai Feng, SHEN Guo Li, YU Rui Qin(刘兵, 阳明辉, 杨海峰, 沈国励, 俞汝勤). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2004**, 25(10): 1820~1824
- WU Lin, CAO Shu Chao, YI De Lian, LIU Juan, QIN Xiao Rong, OU YANG Zhao Hui(伍林, 曹淑超, 易德莲, 刘娟, 秦晓蓉, 欧阳兆辉). *Journal of Transducer Technology(传感器技术)*, **2005**, 24(7): 4~9
- Gomes S P, Odlozilhkova M, Almeida M G, Araujo A N, Couto C M, Montenegro M C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 43(4): 1376~1381
- Niculescu M, Erichsen T, Sukharev V, Kerényi Z, Csöregi E, Schuhmann W. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 463(1): 39~51

- 6 MA Li Ping, MAO Bin, LIU Bin, LI Gong Nong, HAN Gen Liang, LIU Guo Han(马莉萍, 毛斌, 刘斌, 李工农, 韩根亮, 刘国汉). *Transducer and Microsystem Technologies* (传感器与微系统), **2009**, 28(4): 1~4
- 7 Mei Y, Ran L, Ying X, Yuan Z, Xin S. *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22(6): 871~876
- 8 Horstkotte B, Arnau C, Valero F, Elsholz O, Cerda V. *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 42(1): 77~83
- 9 Chang S C, Rawson K, McNeil C J. *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, 17(11/12): 1015~1023
- 10 JIANG Yuan Liang, FENG Chun Liang(姜远良, 冯春梁). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2002**, 22(3): 436~440
- 11 WEI Ran Fei, GAO Xiu Feng, LI Yong Sheng, WANG Heng, FANG Yuan(魏然飞, 高秀峰, 李永生, 王恒, 方圆). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(6): 897~901
- 12 CAI Qiang, SHI Han Chang, HE Miao, GUO Ying, CHEN Xiang Qiang(蔡强, 施汉昌, 何苗, 郭颖, 陈向强). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(1): 65~68
- 13 ZHANG Jun, WANG Yue Ling, YUAN Zhuo Bin(张君, 王月伶, 袁卓斌). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), **2006**, 64(5): 428~434
- 14 CHEN Xiang Qiang, HE Miao, CAI Qiang, SHI Han Chang(陈向强, 何苗, 蔡强, 施汉昌). *J. Tsinghua Univ.* (清华大学学报), **2007**, 47(9): 1473~1476

## Screen-printed Biosensor System Based on Sequential Injection Analysis Method

ZHAO Fang<sup>1,2</sup>, CAI Qiang<sup>2</sup>, YANG Xiao He<sup>3</sup>, CHEN Xiang Qiang<sup>4</sup>, PENG Fang Yi<sup>5</sup>, PENG Hui Min<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>(School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

<sup>2</sup>(Department of Environmental Technology and Ecology,

Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006)

<sup>3</sup>(Zhejiang Institute of Medical Devices, Hangzhou 310009)

<sup>4</sup>(Tsinghua University, Beijing 100084)

<sup>5</sup>(Chongqing University of Technology, Chongqing 400050)

<sup>\*</sup>(The Experimental Teaching Center of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

**Abstract** The reaction system of horseradish peroxidase (HRP) catalyzing  $\sigma$ -phenylenediamine (OPD)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using biosensor coupled with sequential injection analysis (SIA) was studied. The biosensor was screen printed electrode immobilized with bovine serum albumin (BSA) and glutaraldehyde. After HRP sensor on the SIA system, the experiment of sensor's dynamic response for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-OPD was studied, including a series of optimization, such as the buffer pH and concentration, pump flow rate, sample volume. The result showed that under the optimum conditions of the experiment, including flow rate of 153.9 mL/min, sample volume of 100 nL and the buffer of pH 6.5 (0.1 mol/L), the HRP biosensors has a linear response in the range of 0.1–1.0 mmol/L for concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The current response curve increased with the increase of the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In addition, the biosensor had the advantages of repeatability with RSD of 3.8%. The recovery ration for OPD in the real sample was more than 60%.

**Keywords** Sequential injection analysis; Biosensors; Screen printed electrode; Horseradish peroxidase

(Received 24 August 2010; accepted 8 November 2010)