

基于 Sol-gel 膜和多壁碳纳米管/铂纳米颗粒增效的 电流型 *L*-乳酸生物传感器

贺晓蕊¹ 于京华¹ 葛慎光¹ 张秀明¹ 林青¹
朱晗² 封烁³ 袁靓³ 黄加栋^{* 3}

(济南大学化学化工学院¹, 泉城学院², 医学与生命科学学院³, 济南 250022)

摘 要 构建了基于多壁碳纳米管 (Multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) 和铂纳米颗粒 (Pt-nano) 的电流型 *L*-乳酸生物传感器。将 Sol-gel 膜覆盖在 *L*-乳酸氧化酶 (*L*-lactate oxidase, LOD) 和 MWCNTs/Pt-nano 修饰的电极表面。实验结果表明:传感器的最佳工作条件为:检测电压 0.5 V;缓冲液 pH 6.4;检测温度 25 °C。此传感器的响应时间为 5 s,灵敏度是 6.36 $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$ 。连续检测 4 星期其活性仍保持 90%,线性范围为 0.2 ~ 2.0 mmol/L,且抗干扰能力强。在实际血样的检测中,此传感器与传统的分光光度法具有很好的一致性。

关键词 生物传感器; *L*-乳酸; 溶胶-凝胶; 铂纳米颗粒; 多壁碳纳米管

1 引 言

临床医学、牛奶工业、葡萄酒工业、生物技术和运动医学等领域都需要灵敏、快速的 *L*-乳酸检测方法。特别是血乳酸水平能够反映人体的多种病理状态。传统的 *L*-乳酸的检测主要采用分光光度计法^[1]。但这种方法过程复杂、成本高。生物传感器因其选择性高、响应快和重复性好等优点被认为是最适合的生化分析仪器之一。目前,关于检测乳酸含量的电化学传感器已有报道^[2,3]。但简便、便宜和选择性高的 *L*-乳酸传感器依然是目前研究的热点。

碳纳米管 (Carbon nanotubes, CNTs) 拥有许多特殊性质,如高电导性、高化学稳定性,以及非常高的机械强度和系数^[4,5]。CNTs 包括单壁碳纳米管 (Single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) 和多壁碳纳米管 (Multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)。当被用作电化学反应的电极材料时,SWCNTs 和 MWCNTs 都有提高电子转移反应的能力。研究表明:MWCNTs 可增强电极表面的电催化活性和增大其表面积^[6]。文献[7~9]表明:CNTs 修饰的电极能够显著增强儿茶酚胺神经传递素、细胞色素 C、抗坏血酸、NADH 和脍复合物的电化学性能。CNTs 能够提高 NADH 和 H_2O_2 的电子转移反应,这表明它在基于脱氢酶和氧化酶的电流型生物传感器方面有广阔的应用前景^[10]。铂纳米颗粒 (Platinum nanoparticles, Pt-nano) 是一种有效的酶传感器的构建材料。它具有很好的生物相容性、大的表面积及对 H_2O_2 的催化能力强^[11]。

本研究构建了基于 MWCNTs 和 Pt-nano 的电流型 *L*-乳酸生物传感器。为阻止电极表面上的酶分子的丢失和提高传感器的抗干扰能力,采用 Sol-gel 膜^[12,13]覆盖 LOD/MWCNTs/Pt-nano 电极表面。对构建的生物传感器的检测范围、响应时间、敏感性和稳定性进行了研究。考察了 pH 值、电位、温度和电活性干扰物对传感器电流的影响,并将此传感器应用于全血分析。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

L-乳酸氧化酶 (LOD, E. C. 1.1.3.2, 34 units/mg, from *Pediococcus* species)、二甲基亚砜 (DMSO)、正硅酸四乙酯 (TEOS 99%)、Triton X 100 均购自 Sigma 公司;*L*-乳酸、*L*-乳酸锂购自 Fluka 公司;多壁碳纳米管 (MWCNTs, 直径约 15 nm, 纯度 95%, 中科院成都有机化学研究所);氧化铝粉末 (Merck 公司);

2009-03-31 收稿;2009-08-10 接受

本文系国家自然科学基金 (Nos. 30700535, 30972056)、国家 863 计划 (No. 2007AA10Z430)、中韩 (NSFC-NRF) 联合资助合作与交流项目 (No. 30911140278) 资助

* E-mail: chm_huangjd@ujn.edu.cn

$\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (天津市第二化学试剂有限公司); 磷酸盐缓冲液 ($0.05 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4$, $0.05 \text{ mol/L K}_2\text{HPO}_4$, 0.1 mol/L KCl) 作为支持电解质。其它试剂均为分析纯, 无需纯化直接使用。实验用水为去离子水。电化学测试在 283 电化学工作站 (EG & G, USA) 上进行, 使用 270 软件。采用传统的三电极体系: Sol-gel/LOD/MWCNTs/Pt-nano 修饰的玻璃碳电极 (Glass carbon electrode, GCE, $\Phi = 3 \text{ mm}$) 作为工作电极, 铂片作为对电极, Ag/AgCl 作为参比电极。电流的测定是在搅拌的条件下进行的。

2.2 Sol-gel 标准溶液、纳米铂溶液和 MWCNTs 标准溶液的配制

在烧杯中按照一定的比例加入 TEOS, H_2O 和 0.1 mol/L HCl , 不停地搅拌该混合溶液直到溶液变清澈, 即得 Sol-gel 储备溶液。此储备溶液被应用于整个实验中, 并可根据需要对其进行稀释。

根据文献 [14] 制备 Pt-nano 溶液。将 $4 \text{ mL } 5\% \text{ H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液加入到 340 mL 蒸馏水中, 在 80°C 下边搅拌边加热。加入 $60 \text{ mL } 1\%$ 柠檬酸钠溶液后, 在 $(80 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 保温 4 h 。此过程通过吸附光谱记录。当 PtCl_6^{2-} 的吸附带消失的时候, 表明反应结束。

将 2 mg MWCNTs 加入到 1 mL 二甲基亚砷溶液中, 超声搅拌, 制备成黑色悬浊液状的 MWCNTs 溶液。

2.3 制备 Sol-gel/LOD/MWCNTs/Pt-nano 修饰的酶电极

用 $0.05 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$ 粉打磨玻碳电极, 超声清洗, 再分别用 1 mol/L HNO_3 和 1 mol/L NaOH 清洗, 然后用双蒸水彻底清洗。 $20 \mu\text{L}$ MWCNTs 和 $20 \mu\text{L}$ 铂纳米颗粒混合制成贮备溶液, 超声 40 min , 得到均匀分散的 MWCNTs 和 Pt-nano 溶液。

将 $10 \mu\text{L}$ MWCNTs 和 Pt-nano 溶液滴加到玻璃碳电极的表面, 使之均匀分布在电极的整个表面上, 然后将电极在室温下干燥 30 min 。再用 $2 \mu\text{L}$ LOD 溶液覆盖 MWCNTs 和 Pt-nano 复合膜修饰的电极表面。在室温下干燥 20 min 后, 加 $6 \mu\text{L}$ Sol-gel 储备溶液到酶层的表面, 然后在室温下干燥。最后, 将酶电极浸入到 $\text{pH } 6.8$ 的缓冲液中, 保存在 4°C 的冰箱中过夜, 以便除去电极表面过量的 L-乳酸氧化酶。用去离子水彻底清洗电极, 即得 Sol-gel/LOD/MWCNTs/Pt-nano 修饰的电极。

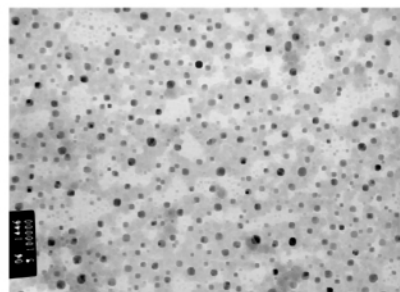


图 1 Pt-nano 的 TEM 图 (放大倍数 100000)

Fig.1 Transmission electron micrograph of platinum nanoparticles (Pt-nano) ($\times 100000$)

3 结果与讨论

3.1 Sol-gel/LOD/MWCNTs/Pt-nano 修饰电极的电化学特性

研究了 MWCNTs/Pt-nano 和 MWCNTs 修饰的电极对 L-乳酸的电催化行为。由图 2 可见, MWCNTs/Pt-nano 和 MWCNTs 都能增加传感器的电流响应。但是 MWCNTs/Pt-nano 修饰的电极显示出比 MWCNTs 修饰的电极有更好的电流增效作用。由图 2 中曲线 b 和 c 可见, MWCNTs/Pt-nano 修饰的电极对 L-乳酸的电催化活性比 MWCNTs 修饰的电极强。因为 MWCNTs/Pt-nano 修饰电极的电化学性能得到了提高, 电子能够更容易快速地在酶和 MWCNTs/Pt-nano 层之间传递。

3.2 pH 值对传感器响应的影响

研究了 pH 值在 $5.6 \sim 8.0$ 范围内变化对传感器电流响应的影响 (图 3)。不同 pH 值的 L-乳酸标准溶液的浓度均为 1 mmol/L 。实验表明: $\text{pH} < 6.4$ 时, 传感器的响应电流随着 pH 值的增大而显著增大; $\text{pH} = 6.4$ 时, 传感器的响应电流达到最大; $\text{pH} > 6.4$ 时, 传感器的响应电流下降。本实验选择 $\text{pH } 6.4$ 的缓冲液作为检测 L-乳酸的缓冲液。

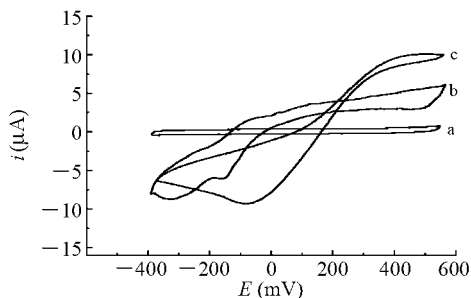


图 2 裸电极 (a)、MWCNTs 修饰的电极 (b)、MWCNTs/Pt-nano 修饰的电极 (c) 的 CV 图

Fig.2 Cyclic voltammograms of L-lactate on bare GCE (a), MWCNTs modified electrode (b), MWCNTs/Pt-nano modified electrode (c)

1 mmol/L L-乳酸 (L-lactate) 扫描速率 (Scanning rate) 50 mV/s 0.1 mol/L PBS 电压 (Potential) 5 V $\text{pH } 6.4$ 。

3.3 温度对传感器响应的影响

在 pH 6.4 的缓冲液中,研究了 5 ~ 50 ℃ 范围内温度对传感器响应电流的影响(图 4)。在 5 ~ 25 ℃ 范围内,随着温度的提高,传感器的响应电流逐渐增大;在 25 ℃ 条件下,反应达到最大值;然后随着温度的提高,传感器的响应电流快速下降,这可能是因为高温使酶变性造成的。在较高的温度下,蛋白质的三维结构被破坏,酶分子的构象被打开,从而失去了活性^[15]。

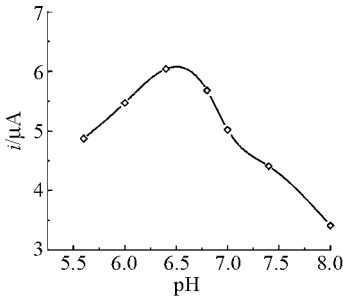


图 3 缓冲液 pH 值对传感器响应的影响
Fig.3 Effect of pH of buffer solution on response of bio-sensor
1 mmol/L L-乳酸(L-lactate); 0.1 mol/L PBS; 0.5 V。

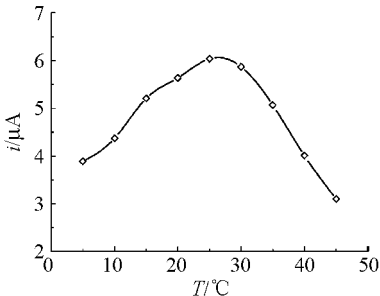


图 4 温度对传感器响应的影响
Fig.4 Effect of temperature on response of biosensor
1 mmol/L L-乳酸(L-lactate); 0.1 mol/L PBS; pH 6.4; 0.5 V。

3.4 电流反应和工作曲线

在上述优化条件下,探讨生物传感器对 L-乳酸的响应。实验在搅拌的 0.1 mol/L pH 6.4 的缓冲液中进行。图 5a 和图 5b 分别为在未加入 Pt-nano(A) 和加入 Pt-nano(B) 的情况下酶电极的电流响应的标定曲线。实验结果表明:修饰有 MWCNTs/Pt-nano 的电极的电流响应高于只修饰有 MWCNTs 的电极。修饰有 MWCNTs 的电极达到 95% 信号的响应时间小于 15 s。传感器反应的线性范围是 0.25 ~ 2.0 mmol/L;灵敏度是 3.99 $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$;相关系数为 0.989;检出限为 0.01 mmol/L($S/N=3$)。修饰有 MWCNTs/Pt-nano 的电极达到 95% 信号的响应时间小于 5 s。传感器反应的线性范围是 0.2 ~ 2.0 mmol/L;灵敏度是 6.36 $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$;相关系数是 0.999;检出限是 0.3 $\mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$)。上述结果表明:Pt-nano 能显著提高传感器的性能。

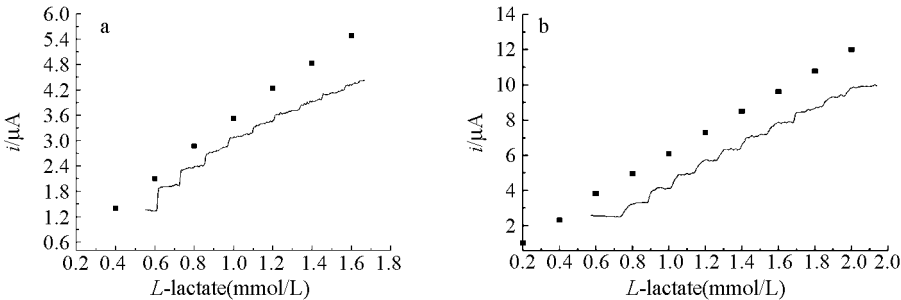


图 5 MWCNTs/Ptnano/GCE(a)和 MWCNTs/GCE(b) 修饰的传感器的电流随葡萄糖浓度的工作曲线及其线性相关点
Fig. 5 Linear correlation points of Calibration plots and I - c curves for the MWCNTs/Ptnano/GCE (a) and MWCNTs/GCE(b)
0.1 mol/L PBS (pH 6.4) at 0.5 V vs. Ag/AgCl.

与其它基于 Sol-gel 的方法构建的 L-乳酸传感器^[16~18]相对比,结果表明:本研究构建的 L-乳酸传感器具有较大的响应电流、较低的检出限,表明 Pt-nano 结合 MWCNTs 提高了传感器的电化学性能。

3.5 抗干扰性

在干扰物各自生理浓度水平上考察了其对 L-乳酸响应的干扰。在 0.5 mmol/L L-乳酸溶液中,对其含有的对乙酰氨基酚(0.13 mmol/L)、葡萄糖(5.45 mmol/L)、尿酸(0.35 mmol/L)、抗坏血酸(0.055 mmol/L)、半胱氨酸(0.015 mmol/L)进行检测(见表 1)。结果显示:对乙酰氨基酚、葡萄糖、尿

酸、抗坏血酸、半胱氨酸对 *L*-乳酸的测定几乎没有影响。说明此传感器具有很好的抗干扰能力。原因是 MWCNTs/Sol-gel 修饰的玻璃碳电极降低了 H₂O₂ 氧化还原过电位。

表 1 *L*-乳酸检测中可能的其它底物的干扰 (0.1 mol/L PBS pH 6.4)
Table 1 Possible interferences from other substrates for *L*-lactate determination (0.1 mol/L phosphate buffer at pH 6.4)

干扰物 Interferent	电流比率 Current ratio	干扰物 Interferent	电流比率 Current ratio
半胱氨酸 Cysteine (0.015 mmol/L)	1.00	对乙酰氨基酚 Paracetamol(0.13 mmol/L)	1.00
抗坏血酸 Ascorbic acid(0.055 mmol/L)	1.01	尿酸 Uric acid(0.35 mmol/L)	1.01
葡萄糖 Glucose(5.45 mmol/L)	1.00		

电流比率 (Current ratio) = I_{L+1}/I_L 。其中 I_{L+1} 和 I_L 分别为干扰物存在和无干扰物的情况下 *L*-乳酸的响应电流 (I_{L+1} is the response current of *L*-lactate in the presence of interference. I_L is the response current of *L*-lactate)。0.5 mmol/L *L*-乳酸 (*L*-lactate)。

3.6 传感器的重复性和稳定性

用同一传感器对 0.5 mmol/L *L*-乳酸溶液连续检测 5 次, 相对标准差是 0.4%; 用 5 个传感器对 0.5 mmol/L *L*-乳酸溶液进行检测, 相对标准差是 2.0%。以上结果表明, 构建的传感器具有很好的重复性。

每隔 5 d 测定一次传感器对 0.5 mmol/L 乳酸溶液的响应值。当传感器不用时, 储存在 0.1 mol/L PBS 溶液 (pH 6.8) 中, 室温放置。连续检测 4 星期以后, 传感器的响应值仍保持在最大响应值的 90%, 表明此传感器具有很好的稳定性。

3.7 人血样中 *L*-乳酸的临床检测

在最适条件下, 应用此传感器检测人血样中 *L*-乳酸, 对其实际应用性能进行评估, 并将其与分光光度法进行对比, 结果见表 2。

表 2 两种方法对血样中 *L*-乳酸的检测
Table 2 Determination results of *L*-lactate in real serum using two methods

样品编号 No.	分光光度计法 Spectrophotometry (mmol/L)	生物传感器法 Biosensor method (mmol/L)	样品编号 No.	分光光度计法 Spectrophotometry (mmol/L)	生物传感器法 Biosensor method (mmol/L)
1	0.22	0.24	7	1.32	1.34
2	0.44	0.46	8	1.44	1.46
3	0.63	0.64	9	1.63	1.64
4	0.85	0.87	10	1.75	1.77
5	1.06	1.09	11	1.86	1.89
6	1.16	1.19	12	1.96	1.99

对结果进行 *t* 校验: $t = 0.09288$; $t_{0.05}(11) = 1.7959$; $t < t_{0.05}(11)$, $p > 0.05$ 。

由以上结果可以看出, 两种方法测定结果无显著差异。本传感器对样品的测定结果与分光光度法具有很好的一致性。

References

1 Kurita R , Hayashi K , Fan X , Yamamoto K , Kato T , Niwa O. *Sensors and Acturators B* , **2002** , 87(2) : 296 ~ 303

2 Shkotova L V , Goriushkina T B , Tran-Minh C , Chovelon J M , Soldatkin A P , Dzyadevych S V. *Materials Science and Engineering C* , **2008** , 28(5-6) : 943 ~ 948

3 Rahman M M , Shiddiky M , Lad J A , Aminur Rahman M , Shim Y B. *Analytical Biochemistry* , **2009** , 384(1) : 159 ~ 165

4 Li J M. *Nature* , **1991** , 354(6348) : 56 ~ 58

5 QIN Xia(秦霞) , WANG Yan-Yan(王艳艳) , ZHAO Zi-Xia(赵紫霞) , WANG Xin-Sheng(王新胜) , LI Sha(李莎) , YU Min(于敏) , HUANG Nan(黄楠) , MIAO Zhi-Ying(苗智颖) , CHEN Qiang(陈强). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008** , 36(6) : 827 ~ 830

6 ZHANG Xu-Zhi(张旭志) , ZHAO Chang-Zhi(赵常志) , JIAO Kui(焦奎) , LI Shuang-De(李双德). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008** , 36(2) : 197 ~ 200

7 Chen R J , Choi H C , Bangsaruntip S , Yenilmez E , Tang X , Nakayama N J. *Am. Chem. Soc.* , **2004** , 126(6) : 1563 ~ 1568

- 8 Wang J , Li M , Shi Z , Li N , Gu Z. *Anal. Chem.* , **2002** , 74(9) : 1993 ~ 1997
- 9 Wang J , Musameh M. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(9) : 2075 ~ 2079
- 10 Wang J , Musameh M , Lin Y H. *J. Am. Chem. Soc.* , **2003** , 125(9) : 2408 ~ 2409
- 11 Sotiropoulou S , Gavalas V , Vamvakaki V , Chaniotakis N A. *Biosens. Bioelectron* , **2003** , 18(2-3) : 211 ~ 215
- 12 Jin W , Brennan J D. *Anal. Chim. Acta* , **2002** , 461(1) : 31 ~ 36
- 13 Elzanowska H , Abu Irhayem E , Skrzynecka B , Viola I. *Birss. Electroanalysis* , **2004** , 16(6) : 478 ~ 490
- 14 JIANG Li-Ying(姜利英) , CAI Xin-Xia(蔡新霞) , LIU Hong-Min(刘红敏) , LIU Chun-Xiu(刘春秀) , GUO Zong-Hui(郭宗慧). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008** , 36(11) : 1563 ~ 1566
- 15 Johnson K A. *J. Chem. Edu.* , **2002** , 79: 74 ~ 76
- 16 Garjonyte R , Yigzaw Y , Meskys R , Malinauskas A , Gorton L. *Sensors and Actuators B* , **2001** , 79: 33 ~ 38
- 17 Li C I , Lin Y H , Shih C L , Tsaur J P , Chau L K. *Biosens. Bioelectron* , **2002** , 17: 323 ~ 330
- 18 Patel N G. , Erlenkotter A , Cammol L K , Chemnitus G C. *Sensors and Actuators B* , **2000** , 67: 134 ~ 141

Amperometric L-lactate Biosensor Based on Sol-Gel Film and Multi-walled Carbon Nanotubes/Platinum Nanoparticles Enhancement

HE Xiao-Rui¹ , YU Jing-Hua¹ , GE Shen-Guang¹ , ZHANG Xiu-Ming¹ , LIN Qing¹ ,

ZHU Han² , FENG Shuo³ , YUAN Liang³ , HUANG Jia-Dong^{* 3}

(College of Chemistry and Chemical Engineering¹ , College of Quan-cheng² , College of Medicine and Life Science³ ,
University of Jinan , Jinan 250022)

Abstract An electrochemical L-lactate biosensor was fabricated by combining Platinum nanoparticles (Pt-nano) with multi-walled carbon nanotubes(MWCNTs). L-lactate oxidase(LOD) was immobilized on the surface of the glassy carbon electrode(GCE) modified with MWCNTs and Pt-nano. The surface of resulting LOD/MWCNTs/Pt-nano electrode was covered by a thin layer of sol-gel to avoid the loss of LOD and to improve the anti-interference ability. The cyclic voltammetric results indicated that MWCNTs/Pt-nano catalyst displayed a higher performance than MWCNTs. Under the optimized conditions , i. e. , applied potential of 0.5 V , pH 6.4 , 25 °C , the proposed biosensor's determination range was 0.2 ~ 2.0 mmol/L , response time was within 5 s , and the sensitivity was 6.36 $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$. It still kept 90% activity after 4 weeks. The fabricated biosensor had practically good selectivity against interferences. The results for whole blood samples analyzed by the present biosensor showed a good agreement with those analyzed by spectrophotometric method.

Keywords Biosensor; L-lactate; Sol-gel; Platinum nanoparticles; Multi-walled carbon nanotubes

(Received 31 March 2009; accepted 10 August 2009)

《液相色谱质谱联用技术在食品和药品分析中的应用》

随着现代仪器分析的发展,液相色谱质谱联用技术(LC/MS)日趋成熟,并在科研与生产中发挥了重要作用。该书由三部分组成:第一部分基础理论,介绍了液相色谱和质谱的工作原理、仪器结构及工作条件、LC/MS接口、质谱信息解析;第二部分食品功能成分分析,介绍了LC/MS方法分析食品中的蛋白质和肽、低聚糖、皂苷、核苷、黄酮、维生素、甾醇等功能成分及有害残留物;第三部分药品分析,介绍了采用LC/MS技术对化学合成药物、抗生素、中药、天然药物等进行成分和杂质分析,及其药物代谢研究中的应用。在食品和药物分析部分,通过具体的实例,详述了样品处理、分析条件、结构鉴定等完整的分析过程,具有很高的参考价值。该书可供从事食品和药品生产和检测人员及相关监管部门工作人员阅读,使用,也可供仪器分析、有机合成、药品和食品研究人员参考。

该书由盛龙生、汤坚编著,化学工业出版社出版,定价39.00元。