基于聚吡咯的胆固醇电化学生物传感器的制备及性能研究

张秀花[1]，万凯[2]，梁振兴[2]，金峰[1]，朴金花[1]
（1.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2.华南理工大学化学与化工学院，广东广州 510640）

摘要：本文以胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶为催化剂，通过电化学聚合吡咯单体，制备了电流型胆固醇传感器。实验中采用电化学聚合方法制备了聚吡咯膜(PPY)，用扫描电子显微镜(SEM)对聚吡咯膜进行微观结构表征，采用循环伏安(CV)法研究了传感器的电化学特性及其抗干扰能力。结果表明，聚合圈数为 300 圈时得到的聚吡咯膜制备的传感器性能最佳，传感器最佳工作 pH 值为 8.0，胆固醇氧化酶浓度为 30 mg/mL，辣根过氧化物酶浓度为 20 mg/mL，制备的胆固醇传感器，具有良好的检测性能，线性范围为 2.0×10^{-6}~1.6×10^{-4} mol/L，表观米氏常数 K_m^{app} 为 5.6×10^{-6}mol/L，葡萄糖、抗坏血酸、尿酸等组分对传感器响应电流的影响分别为 8.1%、8.5%、10.8%，抗干扰效果较好。该传感器对胆固醇具有良好的选择性响应，可以用于胆固醇含量的测定。

关键词：生物传感器；聚吡咯；胆固醇氧化酶；辣根过氧化物酶；循环伏安法
文章篇号：1673-9078(2015)4-170-174 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.027

Development and Properties of a Polypyrrole-based Electrochemical Biosensor for Cholesterol Detection

ZHANG Xiu-hua[1], WAN Kai[2], LIANG Zhen-xing[2], JIN Feng[1], PIAO Jin-hua[1]
(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A novel, current-based cholesterol biosensor was produced by electrochemical polymerization of pyrrole monomers, using cholesterol oxidase (ChOx) and horseradish peroxidase (HRP) as catalysts. Polypyrrole (PPY) was prepared by electrochemical polymerization and the microstructure of the PPY film was characterized by scanning electron microscopy (SEM). The electrochemical characteristics and anti-interference capacity of the biosensor were evaluated by cyclic voltammetry (CV). The results of this analysis revealed that the PPY film obtained after 300 polymerization circles had optimum sensor performance. The biosensor displayed optimal operation at a pH of 8.0 and showed good detection performance at cholesterol oxidase and horseradish peroxidase concentrations of 30 and 20 mg/mL, respectively. The biosensor displayed a linear range of 2.0×10^{-6} to 1.6×10^{-4} mol/L and an apparent Michaelis-Menten constant (K_m^{app}) of 5.6×10^{-6}mol/L. The biosensor also exhibited excellent anti-interference activity after the addition of glucose, ascorbic acid (AA), and uric acid (UA), which affected the current by 8.1%, 8.5%, and 10.8%, respectively. The cholesterol biosensor exhibited good selective response to cholesterol, and can, therefore, be used in the determination of cholesterol content.

Key words: biosensor; polypyrrole; cholesterol oxidase; horseradish peroxidase; cyclic voltammetry

在人体中，胆固醇主要集中分布在脑及神经组织、肝、胆、脾、肾和皮肤中，是维持人类正常新陈代谢不可缺少的重要物质，它除了参与形成细胞膜，还是合成胆汁酸、维生素 D 和肾上腺皮质激素的重要原料[1]。但是人体中胆固醇含量过高会引起高血脂、高血压、粥状动脉硬化和冠心病等一系列心血管疾病。人体内胆固醇的一个重要来源就是从食品中摄取的，因此，胆固醇含量的检测就显得极为重要[2]。

在临床医学、食品工厂生产等方面，测量胆固醇含量的传统方法包括比色法、酶法、气相色谱法和高效液相色谱法。这些方法可获得较为精确可靠的结果，但是测试需要大量的样品试剂、精密昂贵的仪器、专业的技术操作人员、测试速度较慢[1]。因此，研发一种廉价简便、测试速度快、测试灵敏度高的胆固醇生

收稿日期：2014-08-03
基金项目：中国博士后科学基金特别资助项目（200801250）；中央高校基本科研业务费项目（SCUT，2009ZM0142）；广东省科技计划项目（2013B010405005）
通讯作者：朴金花(1970-)，副研究员，研究方向：电化学食品分析，食品安全检测，生物电化学相关方向

物传感器成为市场所迫切需要。电化学法测定胆固醇含量具有灵敏度高，测试迅速、简便、成本低等优点，越来越受到重视。

电化学方法测定胆固醇的主要机理是：用胆固醇氧化酶和辣根过氧化物制备酶修饰电极，胆固醇氧化酶专一性的催化氧化溶液中的胆固醇，并产生 H_2O_2 产物，而生成的 H_2O_2 在辣根过氧化物酶的作用下被氧化，释放出氧化电流，电流的大小与样品中胆固醇浓度成正比，其基本反应原理如下所示[2]：

$$\text{胆固醇}+O_2 \xrightarrow{\text{胆固醇氧化酶}} \Delta^4\text{—胆甾烯酮}+H_2O_2$$

$$H_2O_2 \rightarrow O_2+2H^++2e^-$$

近年来，关于胆固醇酶生物传感器的研究日趋完善，结合新材料的使用，新技术的发展，胆固醇生物传感器的性能显著提高。在电化学式胆固醇生物传感器方面：有研究团队以二茂铁和聚乙烯为载体，将胆固醇氧化酶通过静电吸附技术固定化，制成测定游离胆固醇含量的生物传感器[3]；还有人以 ZnO 纳米颗粒和壳聚糖的复合膜为载体，将胆固醇氧化酶固定化，制成胆固醇生物传感器[4]。时巧翠等[5]用溶胶-凝胶法将胆固醇氧化酶固定在碳纳米管负载铂修饰的浸蜡石墨电极表面，构建了新型的胆固醇传感器。然而，胆固醇生物传感器的商业化生产和利用水平还很低，胆固醇生物传感器的发展趋势将向着性能卓越稳定、方便实用、廉价简单的方向迈进[6~7]。

导电聚合物又称导电高分子，它的最重要的性质是导电性，聚合物具有多样的性质，包括亲水性和疏水性、荷电性等，这些性质均可用于生物分子的吸附。某些聚合物中含有大量的带电基团，如胺基、羧基等，这为聚合物静电吸附生物分子提供了有利条件[8]。Singh S.等将胆固醇氧化酶、胆固醇酯酶、辣根过氧化物酶以戊二醛交联共固定在聚苯胺膜修饰氧化铟锡包被的玻璃板上得到胆固醇传感器[8~9]。Solanki P.R.等[10]用物理吸附法和包埋法将胆固醇氧化酶固定在聚-N-甲基吡咯-P-甲苯磺酸薄膜修饰的氧化铟锡导电玻片上制得胆固醇传感器，并对不同酶固定化方法的结果进行了考察[11~12]。

构建传感器的一个关键环节为传感信号的放大，生物传感器构建过程中，有效固定生物识别分子式最为关键的环节之一[13~16]，由于聚吡咯是导电聚合物，具有更好的稳定性、更快的响应和更高的灵敏度，所以本文以聚吡咯为修饰材料，制备胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶修饰电极，并用其测定胆固醇含量。

1 材料与方法

1.1 材料

胆固醇氧化酶（ChOx，20.2 U/mg，广州市齐云生物技术公司)，辣根过氧化物酶（HRP，RZ~3.0，250 U/mg，MW~40000，广州市齐云生物技术公司），胆固醇（粉末，>95.0%，日本 TCI），壳聚糖(CS)（脱乙酰度为 90.09%，上海伯奥生物科技有限公司），吡咯（单体，含量>99.0%，Adamas，瑞士进口），高氯酸锂（Adamas，瑞士进口），其他常规试剂均来自天津市科密欧化学试剂公司，均为分析纯，实验用水为去离子水。

1.2 主要仪器设备

实验中采用扫描电子显微镜（德国，Zeiss SUPRA40）对制备的聚吡咯膜进行微观结构表征，用电化学工作站（CHI660）进行电化学性能测试，采用三电极体系，酶修饰的玻碳电极（Ø：3 mm）为工作电极，Ag/AgCl 电极为参比电极，铂片电极为辅助电极。电解液是 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液（PBS），实验室温为（25±1 ℃）。

1.3 实验过程

1.3.1 聚吡咯膜的制备

取活化后的电极，采用循环伏安法在电极表面聚合聚吡咯膜，聚合参数为：电势范围从-0.40 V 到 0.20 V，扫描圈数根据实验现象分析确定。聚合完成后，取出电极，待其晾干，即可在电极表面聚合上一层聚吡咯薄膜。

聚合液配制：（吡咯单体 0.05 M，高氯酸锂 0.08 M，pH 8.0，10 mL）：在 10 mL 小烧杯中，加入 35 μL 吡咯单体，85.6 mg 高氯酸锂，用 pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液配成 10 mL 的聚合液，聚合前向聚合液通氮气 10 min。

1.3.2 修饰电极的制备

（1）玻碳电极处理：按文献[11]的方法对玻碳电极进行预处理。

（2）修饰电极制备：将清洗过的玻碳电极置于聚合液中，采用循环伏安法分别聚合 100 圈、200 圈、300 圈、400 圈、500 圈，制备不同厚度聚吡咯膜的电极；配制 2%的壳聚糖乙酸溶液，与 30 mg/mL 的胆固醇氧化酶溶液、20 mg/mL 的辣根过氧化物酶溶液等体积混合，取 5 μL 混合液滴于不同厚度聚吡咯的玻碳电极表面，制成 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 电极。

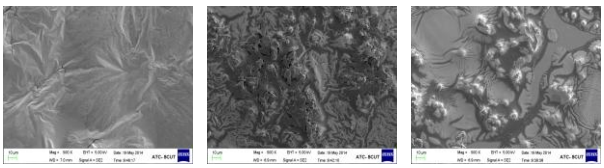
1.3.3 电化学测试

采用三电极体系，循环伏安法进行测试，评价所制备的胆固醇生物传感器的性能。

2 结果与讨论

2.1 聚吡咯膜的制备

采用循环伏安法制备聚吡咯膜，图 1 为聚合 100 圈（a）、300 圈(b)、500 圈(c)条件下制成的聚吡咯膜的扫描电镜照片。从照片上可以看到 500 圈聚合成的膜表面最为平整、光滑，形成致密的薄膜；300 圈聚合成的膜次之；100 圈聚合成的膜表面最为粗糙、不平滑致密。可见随着扫描圈数的增加，在电极表面聚合得到的聚吡咯量增加，制成的膜更为平整、光滑、致密，且三个条件下均可制成完整的聚吡咯膜，但是膜的光滑程度随着聚合圈数的增加而增加。



（a） (b) (c)

图 1 聚吡咯膜的 SEM 照片

Fig.1 SEM images of the PPY membrane

注：(a)100 圈；(b)300 圈；(c)500 圈。

2.2 修饰电极电化学行为

2.2.1 聚吡咯膜厚度对聚吡咯膜负载酶电极的影响

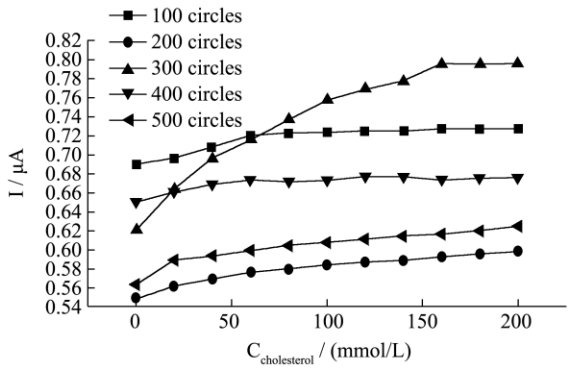


图 2 修饰不同厚度的聚吡咯膜电极对不同胆固醇浓度催化的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms displaying the catalysis of different concentrations of cholesterol by the PPY membrane electrodes modified to various thicknesses

注：扫描速率：50mV/s，pH=8.0。

图 2 是用不同圈数聚合的聚吡咯膜制备的酶修饰电极对胆固醇的响应曲线，从图中可以看出，通过控制循环伏安法聚合的扫描圈数分别为 100 圈，200 圈，300 圈、400 圈、500 圈，将不同厚度的聚吡咯膜负载酶后进行胆固醇测试时，在相同的测试条件下（扫速 0.05 V/Sec，pH 8.0，测试电位-0.40 V 到 0.20 V），采用循环伏安法扫描 300 圈聚合的聚吡咯膜负载酶后制备的修饰电极对胆固醇的检测范围较宽，数据线性较好，之后的实验均采用循环伏安法扫描 300 圈聚合聚吡咯膜。

2.2.2 扫描速率的影响

图 3 是在 pH8.0 的 PBS 溶液中，PPY-CS-ChOx-HRP/GC 电极在不同扫描速率下的循环伏安曲线和氧化峰电流和还原峰电流随扫描速率变化的曲线，从图中还可以看出，氧化还原峰电流均随扫速的增大而增大，峰电流与扫速 v 之间呈线性关系(图 3(b))：回归方程分别为：

$$Ipc(\mu A) = 0.00413\,v(V/s) + 0.29704$$

相关系数为 0.99746;

$$Ipa(\mu A) = -0.00354\,v(V/s) - 0.19656$$

相关系数为 0.99184，说明该电极的测定胆固醇含量过程中发生的电化学反应是电化学过程为控制步骤，而非扩散控制过程。

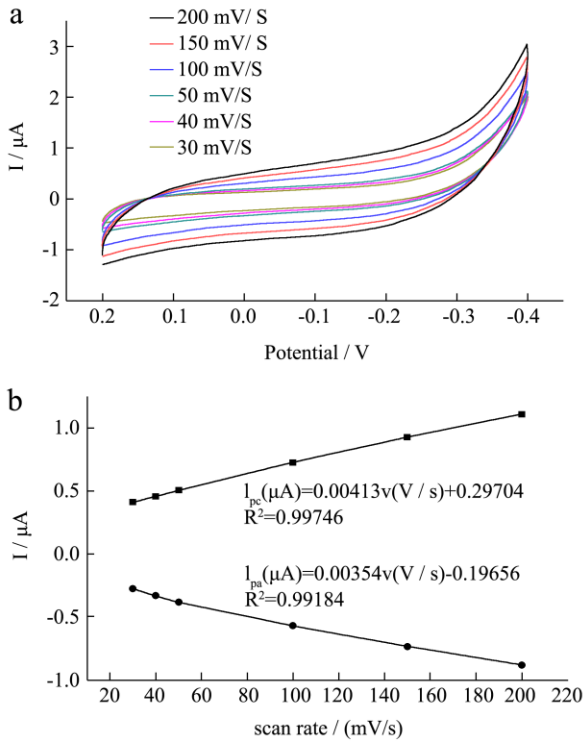


图 3 不同扫描速率下 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 电极在 0.2mol/L 的 PBS 缓冲溶液中的循环伏安曲线图

Fig.3 Cyclic voltammograms of the PPY-CS-ChOx-HRP/GC electrode at different scan rates in a 0.2 mol/L PBS solution

2.2.3 pH 的影响

胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶，其本质是蛋白质，对聚合液和测试条件的 pH 有较高的要求，若 pH

太酸或太碱，均会抑制酶的催化活性，甚至导致酶失活失效，从而影响生物传感器的电流响应。为探究胆固醇生物传感器的最适 pH 值，测试了酶修饰电极在不同 pH 条件下的电流响应值。

测量结果折线图 4 所示，在 pH 值变化从 7.0 到 8.8 的全过程中，电极响应电流从 pH 7.0 开始逐渐增加，至 pH 8.0 时达到最大值，然后随着 pH 值的增加而逐渐降低。由此可知，电极在 pH 8.0 时有最佳响应，pH 8.0 为最适 pH。这与胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶的理论最适合 pH 值范围 7.0~8.0 相吻合。所以本论文的实验，聚合液和测试液 pH 均调整为 8.0。

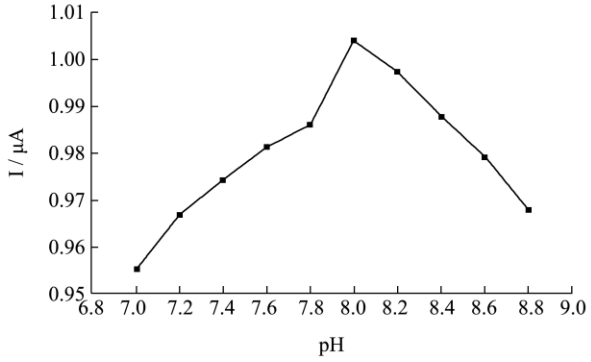


图 4 pH 对 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 电极催化胆固醇性能的影响，

Fig.4 The effect of pH on the catalytic performance of the PPY-CS-ChOx-HRP/GC electrode for cholesterol detection

注：扫描速率：50mV/s。

2.2.4 胆固醇浓度对 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 修饰电极催化性能的影响

利用循环伏安法研究了 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 修饰电极对胆固醇的催化性能，图 5 为在 pH8.0，扫描速率为 50 mV/s 时测定的 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 修饰电极对不同浓度胆固醇检测的浓度与响应电流关系图，从图中可以看出电流与胆固醇的浓度呈良好的线性关系，线性方程为

$$i(\mu A) = 0.6436 + 1.02583\,C(mmol/L)$$

相关系数为 0.94504，线性范围为 2.0×10^{-6}~1.6×10^{-4} mol/L，基于信噪比（S/N）等于 3，得检测限为 1.7×10^{-7} mol/L。在胆固醇浓度达到 0.16 mmol/L 后，电流值不再增大，这是由于酶-底物动力学或酶反应动力学达到饱和，导致电极响应达到饱和。

Michaelis-Menten 常数 K_m^{app} 是酶促反应的的特征常数，表征酶反应动力学的重要参数，是酶与底物之间亲和力大小的统计标准。K_m^{app} 越小，表明酶与底物亲和力越大，酶的抑制程度越小。可根据图 5 的线性曲线，通过 Lineweaver-Burk 方程[11]：

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{K_m^{app}}{I_{\max}} \cdot \frac{1}{c} \qquad (1)$$

注：I_{ss} 为与一定底物浓度对应的传感器的稳态电流；$I_{\max}$ 为底物饱和条件下测得的最大稳态电流；c 为底物浓度。本实验中依据图 5 中底物浓度与响应电流间关系，得出 K_m^{app} 为 5.6×10^{-6} mol/L。

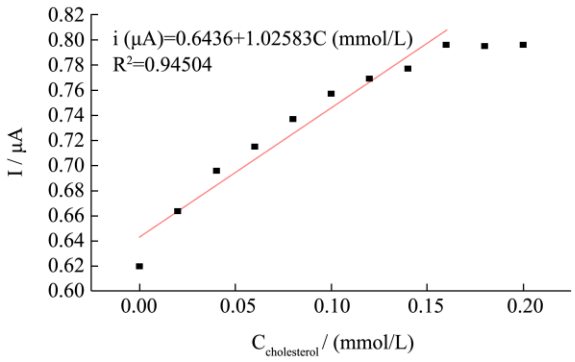


图 5 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 电极对胆固醇浓度与电流关系曲线，

Fig.5 Correlation curve between cholesterol concentration and currents of the PPY-CS-ChOx-HRP/GC electrode

注：扫描速率：50mV/s。

2.2.5 抗干扰实验

为了评价酶电极的选择性和灵敏度，对样品分析中可能存在的部分干扰物质进行了实验，利用循环伏安法考察了葡萄糖、抗坏血酸、尿酸等的影响。如图 6 所示，实验结果表明：在含有 2×10^{-4} mol/L 胆固醇溶液中，加入 5×10^{-3} mol/L 葡萄糖，1×10^{-4} mol/L 抗坏血酸和 2×10^{-4} mol/L 尿酸，分别产生 8.1%、8.5%、10.8%，抗干扰效果较好。该电极对这些干扰物质具有较高的选择性，原因可能是因为 PPY 膜的空间和电荷选择效应对这些大分子进入膜内进行电极反应起了明显的阻碍作用。

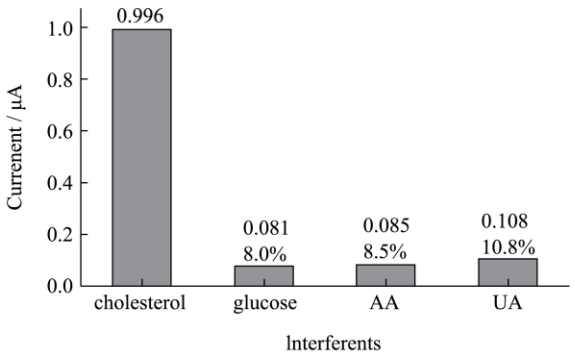


图 6 PPY-CS-ChOx-HRP/GC 电极在含 200 μM 的胆固醇 pH 8.0 的缓冲溶液的加入 5 mM glucose，0.1 mM AA 和 0.1 mM UA 的干扰实验

Fig.6 Selective response of the PPY-CS-ChOx-HRP/GC electrode to 200 μM cholesterol in a 0.2 M phosphate buffer solution (pH 8.0) after the addition of 5 mM glucose, 0.1 mM AA, or 0.1 mM UA

注：扫描速率：50 mV/s。

3 结论

聚吡咯在空气中性质稳定，是一种常见的导电聚合物[13]。因导电聚吡咯具有良好的性能，电化学家对其不断深入研究。聚吡咯具有众多优点:电化学响应信号大，制备方法简单，安全无毒，电化学性质稳定，具有较强的抗干扰能力等，在光电化学电池的修饰电极、蓄电池的电极材料、超电容及防静电材料等多个领域具有广阔的应用前景。本文通过循环伏安法在电极上聚合了吡咯，与胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶有良好的协同作用,提高了修饰电极的电子转移速率，也有效地抑制了干扰物质的干扰作用，提高了传感器的选择性。该传感器对胆固醇具有良好的催化活性，检测的线性范围为 2.0×10^{-6}~1.6×10^{-4} mol/L，检测线为 1.7×10^{-7} mol/L 表观米氏常数为 5.6×10^{-6} mol/L，可用于胆固醇含量的检测。

参考文献

[1] Hui F, Chunyi L, Honghong S. Effect of calcination temperature of kaolin microspheres on the in situ synthesis of ZSM-5 [J]. Catal. Lett., 2009, 129(1-2): 71-78

[2] Saniye Soylemez, Fulya Ekiz Kanik, Ayda Goy çek Nurioglu, et al. A novel conducting copolymer: Investigation of its matrix properties for cholesterol biosensor applications [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 182: 322-329.

[3] McAllister J M, Li J L, Adamson D H, et al. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite [J]. Chem. Mater., 2007, 19(18): 4396-4404

[4] 邓春艳,阳明辉.基于硫堇/碳纳米管修饰电极的新型过氧化氢电化学传感器[J].分析测试学报,2012,31(7):828-832
DENG Chun-yan, YANG Ming-hui, A novel amperometric hydrogen peroxide biosensor basedon thionine-carbon nanotube modified glassycarbon electrode [J]. J. Instrument Analysis, 2012, 31(7): 828-832

[5] 时巧翠,彭图治,陈金媛,等.碳纳米管负载铂修饰电极结合溶胶-凝胶技术制备胆固醇传感器[J].分析化学,2005,33(3):329-332
SHI Qiao-cui, PENG Tu-zhi, CHENG Jin-yuan, et al. A cholesterol biosensor based on cholesterol oxidase immobilized in a sol-gel on a platinum-decorated carbon nanotubes modifiedelectrode [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(3): 329-332

[6] Sasidharan S J A, Tessy T B, Thevasahayam A, et al. A cholesterol biosensor based on gold nanoparticles decorated functionalized graphene nanoplatelets [J]. Thin Solid Films, 2011, 519: 5667-5672

[7] Stankovich S, Piner R D, Chen X Q. Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly (sodium4-styrenesulfonate) [J]. Mater. Chem., 2006, 16: 155-158

[8] Singh S, Solanki PR, Pandey MK, et a1. Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor [J]. Anal. Chim. Acta., 2006, 568(1-2): 126-132.

[9] Singh S, Chaubey A, Malhotra B D, et a1. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 502(2): 229-234

[10] Solanki P R, Arya S K, Singh S P, et al. Application of electroehemacally prepared poly-N-methylpyrrole-p-toluene sulphonate film to cholesterol biosensor [J]. Sensor and Actuators B: Chemical, 2007, 123(2): 829-839

[11] 陈贤光,钱莹,张素娟,等.基于纳米金和硫堇固定酶的过氧化氢生物传感器[J].化学学报,2007,65(4):337-343
CHEN Xian-guang, QIAN Ying, ZHANG Su-juan. Hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing enzyme by gold nanoparticles and thionine [J]. Acta Chimi Sinica, 2007, 65(4): 337-343

[12] 李建龙,潘道东,朱浩嘉,等.碳纳米管-壳聚糖复合物免疫传感器检测牛奶中的青霉素[J].现代食品科技,2013,29(9):2294-2299
LI Jian-long, PAN Dao-dong, ZHU Hao-jia, et al. Determination of penicillin in milk by the nanocomposite immunosensor [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2294-2299

[13] 孙颖恩,张秀花,谭允冰,等.基于石墨烯-辣根过氧化物酶修饰电极的过氧化氢传感器[J].现代食品科技,2013,29(12):3046-3052
SUN Ying-en, ZHANG Xiu-hua, TAN Yun-bing, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on graphene modified horseradish peroxidase electrode [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 3046-3052

[14] Wei-Hung Chiang, Po-Yen Chen, Po-Chin Nien, et al. Amperometric detection of cholesterol using an indirect electrochemical oxidation method [J]. Steroids, 2011, 76: 1535-1540

[15] Matthew R, Hartings Igor V Kurnikov, et a1. Electron tunneling through sensitizer wires bound to proteins [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2010, 254: 248-253

[16] 马力辉,孙辉,齐明君,等.酶电极法测定发酵酒中尿素的含量[J].现代食品科技,2013,29(9):2258-2261
MA Li-hui, SUN Hui, QI Ming-jun, et al. Detection of urea content in fermented wine by the enzyme electrode [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2258-2261

现代食品科技