

# s-BLM 修饰电极对组胺电化学传感行为的研究\*

蔡 红<sup>a, c, \*\*</sup>, 张占军<sup>a, b</sup>, 王 斌<sup>a, b</sup>, 李裕辉<sup>b</sup>, 蔡生民<sup>a</sup>

( a. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871 ;

b. 中国科学院研究生院化学系, 北京 100039 c. 宿州师范专科学校化学系, 宿州 234000 )

H. Ti Tien, Angelica Ottova

( 密歇根州立大学生理学系, 美国密歇根州 48824 )

**摘 要:** 研究了以抗组胺剂修饰的固体支撑双层类脂膜 (s-BLM) 分子器件体系对组胺的电化学传感行为. 结果表明, 在 s-BLM 膜中镶嵌抗组胺剂, 体系对组胺的电化学响应强烈, 并随着组胺浓度的增加而加大, 这主要是由于组胺与抗组胺剂的特异性对抗效应引起的. 在接近通常的生理条件下 (pH = 7.5), 响应电流与组胺的浓度在 3.0 ~ 60.0  $\mu\text{g/L}$  呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9878, 表现出较高的灵敏度、选择性及良好的稳定性. 该体系可以在 -200 mV 下用伏安法检测组胺的浓度, 获得高稳定性和低检出限量的电化学生物传感器.

**关键词:** 双层类脂膜; 电化学生物传感器; 组胺; 循环伏安

中图分类号: O657.37 文献标识码: A

## Studies of Electrochemical Sensoral Behavior of Histamine Based on the Solid Supported Bilayer Lipid Membrane\*

Cai Hong<sup>a, c, \*\*</sup>, Zhang Zhanjun<sup>a, b</sup>, Wang Bin<sup>a, b</sup>, Li Yuhui<sup>b</sup>, Cai Shengmin<sup>a</sup>

( a. College of Chemistry & Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871 ;

b. Chemistry Department, Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039 ;

c. Chemistry Department, Suzhou Teacher's College, Suzhou 234000 )

H. Ti Tien, Angelica Ottova

( Department of Physiology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, USA )

**Abstract** The electrochemical biosensor properties of the molecular devices based on solid supported bilayer lipid membranes were investigated. The results showed that the system embedded with antihistaminic agent had strong response for the histamine. The response currents for the histamine will rise following the increasing concentrations of the histamine, as a result of the special opposing effect between histamine and antihistamine. Near the normal physiological condition (pH = 7.5), a good linearity occurred for the current response against histamine concentration ranging from 3.0 to 60.0  $\mu\text{g/L}$ , and the relation coefficient  $R$  is 0.9878. All the experiments mentioned above showed good sensitivity, selectivity and stability. This system can measure the concentration of histamine under -200 mV by voltammetry and be expected to form the electrochemical biosensor with high stability and low detection limit.

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (20343003) and the Fund of President of Graduate School of Chinese Academy of Sciences.

\*\* Corresponding author, E-mail: caihszsz@sina.com Received 25 August 2003; in final form 8 December 2003.

**Keyword** Bilayer lipid membrane , Electrochemical biosensor , Histamine , Cyclic voltammetry

## 1 引 言

双层类脂膜( Bilayer Lipid Membrane ,BLM )在结构上与天然生物膜非常相似,可以模拟生物膜的基本特征.将生物分子或各种功能材料嵌入其中,能保持其生物活性或提高其电特性,因而成为一种理想的传感膜而被广泛用于传感器方面的研究.传统的 BLM 是介于两水溶液之间的磷脂双分子层,主要缺点是稳定性差、寿命短,给研究工作和实际应用带来很多不便.1989 年 Tien 等人在固体表面成功地制备出高性能的 s-BLM<sup>[1]</sup>,即固体支撑的双层类脂膜.这种方法不需要特殊装置,制作简便,可以获得稳定性好及寿命较长的 BLM.

早在 1966 年,Castillo 及其合作者就开创性地运用 BLM 作为转换器电化学检测选择性的生化相互作用(酶/基底、抗体/抗原)<sup>[2,3]</sup>,其基本原理是,任何发生在 BLM 中的选择性相互作用都将改变其电性质,从而进行电化学检测.实验表明,BLM 具有很好的生物相容性和选择性,可在其中选择性地嵌入受体如酶、抗体、蛋白质复合物、化合物或氧化还原系统等,获得接近生物膜的敏感元件,用来识别配体如底物、抗原、激素、离子、电子受体或给体等,从而获得各种类型的电化学生物传感器<sup>[4]</sup>.如将氯醌嵌入 BLM 可制成 pH 传感器<sup>[5]</sup>;将冠醚嵌入 s-BLM 可制成 K<sup>+</sup> 的离子传感器<sup>[6]</sup>;将葡萄糖氧化酶嵌入聚吡咯-卵磷脂获得了酶传感器<sup>[7,8]</sup>;将乙型肝炎表面抗原嵌入 BLM,然后在溶液中加入抗体制成了免疫传感器<sup>[9]</sup>;还有将单链 DNA 嵌入 BLM, DNA 与胍类物质的相互作用造成 BLM 膜电特性的变化,从而可用来检测胍类物质如胍、甲基胍、二甲基胍、苯胍<sup>[10]</sup>.

组胺( Histamine )是生物体内代谢过程中重要的物质,属于中枢感觉神经的递质,它和外围神经的感觉和传递有密切的关系,其含量的变化与某些疾病密切相关,因而是生物分子电化学研究的重要对象之一<sup>[11]</sup>.抗组胺剂可以作为组胺的受体,与组胺结合产生特有的生物学效应——特异性对抗效应<sup>[12]</sup>.本工作首次采用包封聚四氟乙烯的不锈钢针的新鲜切面作为 BLM 的支撑平面,研究了抗组胺剂修饰的固体支撑 BLM 体系对溶液中组胺的循环伏安行为,旨在定量提出固体支撑的 BLM 电化学生物

传感器检测溶液中组胺的新方法.结果表明,可用伏安法检测组胺的浓度,对组胺的响应浓度在 3.0 ~ 60  $\mu\text{g/L}$  符合 Nernst 关系,检测下限达 3.0  $\mu\text{g/L}$ ,可以制成重现性令人满意的电化学生物传感器.

## 2 实 验

### 2.1 仪器与试剂

CHI650 电化学工作站(上海辰华仪器公司生产),D-12 型 pH 酸度计(日本 HORIBA 公司生产),SYZ-A 型石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏金城国胜实验仪器厂生产),KQ118 型超声清洗器(昆山市超声波仪器厂生产),饱和甘汞电极(上海光电器件厂生产),铂电极,包封聚四氟乙烯的不锈钢针(直径为 0.3 mm).

卵磷脂(PC,生化试剂,北京市海淀区微生物培养基制品厂生产),三羟甲基氨基甲烷(北京中科院理化高技术公司生产),组胺(上海丽珠东风生物技术有限公司生产),抗组胺剂(美国密执安州立大学提供),其余试剂均为分析纯,实验用水为高纯水.

### 2.2 s-BLM 的组装

成膜液的制备:配制 2% 的卵磷脂溶液,将抗组胺剂放入溶液,超声使其充分溶解.以 PC 溶液和含抗组胺剂的 PC 溶液为成膜液.

s-BLM 电极的制备:将包封聚四氟乙烯的不锈钢针先后用高纯水和无水乙醇洗涤后切出一个新鲜表面,迅速将此新鲜表面浸入成膜液中,静置 10 min,取出后,浸入含 8 mL Tris-盐酸缓冲溶液的电解池中,静置 30 min, s-BLM 自组装形成.

电解质溶液的配制:按文献[13]配制成 pH 值分别为 7.5、8.5、9.5 含 0.1 mol/L NaCl 的 Tris-盐酸缓冲溶液.

### 2.3 电化学测试

实验采用三电极体系,铂丝为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极,组装有 BLM 的不锈钢针为工作电极,电解质为 0.1 mol/L NaCl 的 Tris-盐酸缓冲溶液.由于工作电极的充放电电流很小,测试体系全部屏蔽,使其不受外界电流的干扰.为了保证测试精度和条件的均一性,全部实验均于(18 ± 1)°C 下在自行设计的多通道电解池中进行.

循环伏安曲线测定:扫描范围:10 ~ 600 mV/s;扫描电势范围控制在 -0.4 ~ 0.4 V.采用浓度阶梯

法 组胺的浓度在 3 ~ 60  $\mu\text{g/L}$  递增,研究 s-BLM 对不同浓度组胺的传感行为。

### 3 结果和讨论

#### 3.1 s-BLM 的形成

s-BLM 的形成机理,主要是基于新鲜的金属表面能和具有双亲性的类脂分子相互作用。在成膜液中,新鲜的金属表面具有高度的亲水性<sup>[14]</sup>,定向吸附类脂分子,使形成单分子类脂层。其中类脂分子极性端与金属表面接触,疏水端则指向有机溶剂,当金属丝被提出溶液时,含有自由碳氢链的吸附脂单层与其它类脂分子发生作用,使金属丝底端吸附一滴脂滴。把吸附类脂滴的金属丝插入 0.1 mmol/L NaCl 的缓冲溶液后,脂滴便在亲水力、亲脂力的共同作用下,逐渐变薄。液滴分子的排列也由无序变为有序,形成稳定的双分子层结构。抗组胺剂或其它电活性物质是疏水性分子,存在于双层膜的疏水部分中。

#### 3.2 s-BLM 体系中加入镶嵌物对体系电特性的影响

纯 PC 的和镶嵌抗组胺剂的 s-BLM 体系在未加组胺的缓冲溶液中的循环伏安曲线如图 1 所示。由图 1 可以看出,镶嵌抗组胺剂的 s-BLM 体系的  $C \sim V$  曲线与未镶嵌抗组胺剂的 s-BLM 体系的  $C \sim V$  曲线相比,发生了逆时针方向的旋转,电流有明显的提高。这说明由于 PC 中没有修饰的电活性物质,形成的 s-BLM 膜对固体金属电极有很好的封闭作用,阻挡了电子在溶液和电极之间的传递<sup>[15]</sup>,而用某种电子传递体对 s-BLM 进行修饰,就能改变 s-BLM 膜的电特性,增强运输电子的能力,从而实现电子的跨膜传递。

#### 3.3 加镶嵌物的 s-BLM 体系对组胺的电化学传感

镶嵌抗组胺剂的 s-BLM 体系在 3.0  $\mu\text{g/L}$  组胺的缓冲溶液中的  $C \sim V$  曲线图见图 2。从图 2 中可以看出,抗组胺剂嵌入后的 s-BLM 体系对组胺有选择性响应,其  $C \sim V$  曲线图也发生了逆时针方向偏转,电流随组胺浓度的不断增加而变大,这是由于抗组胺剂和组胺产生了特异性对抗作用。一般认为嵌入 BLM 的电活性物质起到电子载体的作用<sup>[8]</sup>,考虑到其分子结构和疏水性,可以假设它能够在类脂双层的环境中自由移动。因此,电子的传递可能通过两种机理实现:隧穿和跳跃。隧穿时,电子必须克服分子之间的势垒,而势垒的高度是由分子的电子能级决定的。如果是发生跳跃,则有理由假设电活性物质的

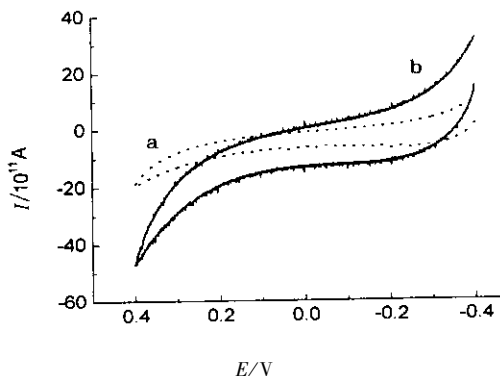


图 1 s-BLM 体系的循环伏安曲线

a. 纯 PC 形成的 s-BLM ;b. 嵌入抗组胺剂的 s-BLM.

Fig. 1 Cyclic voltammograms for the s-BLM

a. s-BLM of PC ;b. s-BLM with antihistaminic agent.

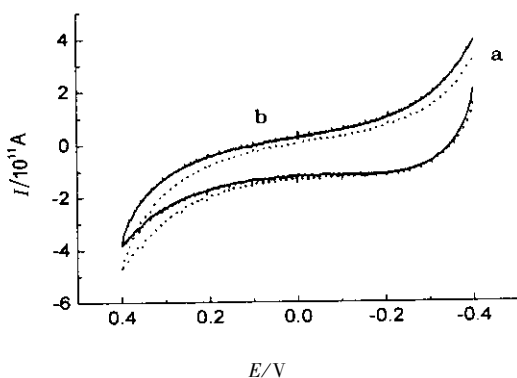


图 2 含抗组胺剂的 s-BLM 体系在不同溶液中的循环伏安曲线

a. 加组胺;b. 无组胺。

Fig. 2 Cyclic voltammograms for the s-BLM containing antihistaminic agent in the buffer solutions

a. With histamine ;b. Without histamine.

分子是横跨类脂双层排列在一起的。这样,电子可以从一个分子跳到另一个上。被修饰的 s-BLM 膜对特定组分的响应,使得 s-BLM 电极在检测电活性组分时有很好的选择性和专一性。

#### 3.4 s-BLM 体系电流响应的灵敏度与溶液的酸度的关系

图 3 是在不同的 pH 时电流随组胺浓度变化 ( $C \sim I$ ) 的拟合直线。从直线的斜率来看, pH = 9.5 时,其电流随浓度的增长最为明显,说明该体系对组胺的响应灵敏度较高;从  $R^2$  显示, pH = 7.5 时,其  $C \sim I$  曲线的线性关系较好,由此可以推断,它的电化学反应最稳定。

溶液酸度对体系电流的影响主要是因为双层类脂膜作为生物膜的基本结构,构成这种双分子层结

构主要靠的是磷脂分子中电离的磷酸头基之间及脂分子之间的氢键作用、静电作用、疏水作用及范德华作用力<sup>[16]</sup>。其中前两者是磷脂双层形成稳定相结构的主要作用力<sup>[17]</sup>。溶液酸度的改变直接影响磷脂分子之间的氢键作用和静电相互作用,从而引起磷脂双分子层的液晶相结构的改变。带有阴离子位点的

磷脂双层的稳定存在是双层类脂膜作为良好导体的主要因素。虽然 pH = 9.5 时电流响应较强,但线性关系较差 ( $R^2 = 0.906$ )。由于组胺保持生物活性的最佳酸度为  $7.4 \pm 0.5$ ,所以, pH = 7.5 时,  $C \sim I$  曲线的线性关系较好,电化学响应较稳定。

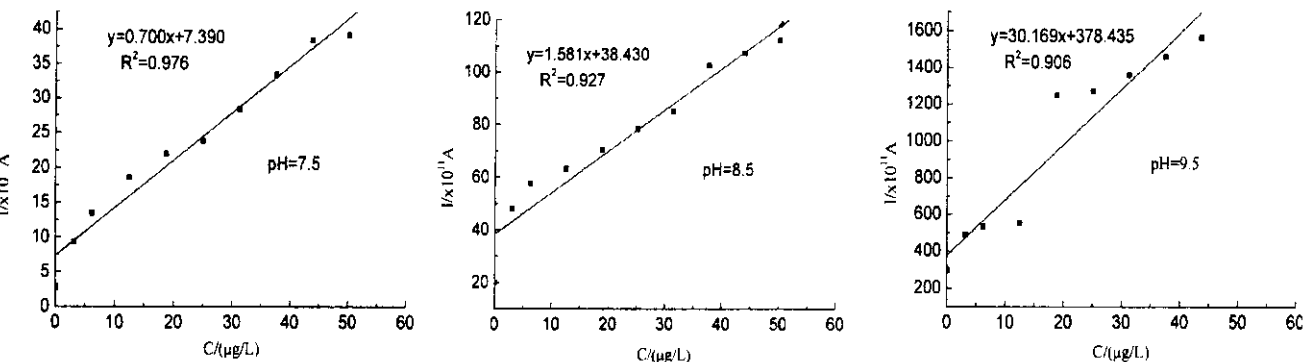


图 3 不同 pH 的 s-BLM 体系电流随组胺浓度变化的响应曲线 ( $E = -0.2V$ )

Fig. 3 Concentration-current curve of s-BLM in the buffer solutions with histamine at different pH ( $E = -0.2V$ )

研究发现,在所研究的电势范围内,在选定条件下 ( $pH = 7.5$ ),当组胺为  $3.0 \sim 60 \mu\text{g/L}$  时, s-BLM 体系的电流对组胺的响应保持良好的线性关系。线性回归方程为:

$$y = 0.700x + 7.390, R = 0.9878$$

最低检测限为  $3.0 \mu\text{g/L}$ 。

### 3.5 s-BLM 电流响应的灵敏度与电势的关系

用同一种方法和条件制备一批 (5 根) s-BLM 电极,分别对不同浓度的组胺溶液进行测定,在不同电位下,做电流强度随  $I^-$  浓度  $C$  变化 ( $C-I$ ) 的曲线,把得到的曲线斜率  $k$  对电压  $E$  作图,具有良好的线性关系,而且在所研究的电势范围内均为负值,如图 4 所示。由此推断,在较负的电势 ( $-200 \text{ mV}$ ) 下,可获得较高的灵敏度,这与实验观测是一致的。

### 3.6 s-BLM 电流响应的重现性和电极的稳定性

研究发现,所有电极实验结果的规律有令人满意的重现性。将修饰后的 s-BLM 电极在电解液中连续扫描 150 次 (未做最高限),或将电极在电解液中放置 24 h,对组胺的响应电流基本不变,说明该电极具有良好的稳定性。

## 4 结 论

制备得到了严格按照自组装固有规律进行修饰

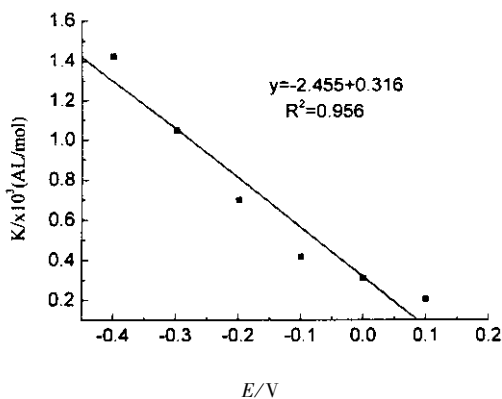


图 4 含抗组胺剂的 s-BLM 的  $k \sim E$  曲线 ( $pH = 7.5$ )

Fig. 4  $k \sim E$  curve for the s-BLM containing antihistaminic agent ( $pH = 7.5$ )

的不锈钢针支撑的 BLM 电极。以镶嵌抗组胺剂的 s-BLM 体系对于组胺电化学传感行为的研究表明,在 s-BLM 膜中镶嵌能与组胺产生特异性对抗的物质-抗组胺剂,将会使 s-BLM 体系对组胺的响应增强,灵敏度提高,可以在  $-200 \text{ mV}$  下用伏安法检测组胺的浓度。通过对镶嵌在 s-BLM 膜中电活性物质的选择,可以获得检测灵敏度更高的电化学传感器,这对分析测试和分子器件的研究及实际应用具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Tien H T , Salamon Z. *Bioelectrochem. Bioenerg.* , 1989 , **22** : 211
- [ 2 ] Castillo J D , Rodriguez A , Roome C A , Sanchez V. *Science* , 1966 , **153** : 185
- [ 3 ] Toro-Goyco E , Rodriguez A , Castillo J D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 1996 , **23** : 341
- [ 4 ] Cai Hong ( 蔡红 ) , Zhang Zhanjun ( 张占军 ) , Wang Bin ( 王斌 ). *Chin. J. Appl. Chem.* ( 应用化学 ) , 2003 , **20** : 307
- [ 5 ] Tine H T , Salamon Z , Guo D L , Ottova-Leitmannova A. *Active Materials and Adaptive Structures Bristol and Philadelphia : IOP Publishing* , 1992 , **27** : 502
- [ 6 ] Tai Z H , Cun L , Yang C Z. *Mol. Eng.* , 1994 , **2** : 215
- [ 7 ] Ottova A , Tien H T. *Bioelectrochem. Bioenerg.* , 1997 , **42** : 141
- [ 8 ] Tien H T , Wurster S H , Ottova A. *Bioelectrochem. Bioenerg.* , 1997 , **42** : 77
- [ 9 ] Wang L G , Li Y H , Tien H T. *Bioelectrochem. Bioenerg.* , 1995 , **36** : 145
- [ 10 ] Siontorou C G , Nikolelis D P , Tarus B , Dumbrava J , Krull U J. *Electroanalysis* , 1998 , **10** : 691
- [ 11 ] Schenk J O , Miller , Adams R N. *J. Chem. Educ.* , 1983 , **60** : 311
- [ 12 ] Zhou Tingchong ( 周廷冲 ). *Practical Encyclopedia of Pharmaceutical Sciences ( 实用药理学辞典 )* , Tianjing ( 天津 ) : Science and Technology Press ( 科学技术出版社 ) , 1992.
- [ 13 ] Zhang Longxiang ( 张龙翔 ) , Zhang Tingfang ( 张庭芳 ) , Li Lingyuan ( 李令媛 ) , *Experimental Method Technology of Biochemistry ( 生化实验方法和技术 )* , Beijing ( 北京 ) : Higher Education Press ( 高等教育出版社 ) , 1998.
- [ 14 ] Krysinski P , Tien H T. *Bioelectrochem. Bioenerg.* , 1988 , **19** : 227
- [ 15 ] Tong Shaoping ( 童少平 ) , Leng Wenhua ( 冷文华 ) , Zhang Zhao ( 张昭 ). *Chin. J. Chem. Phys.* ( 化学物理学报 ) , 2002 , **15** : 65
- [ 16 ] Lin Qiwei ( 林其唯 ). *Structure and Function of Biomembrane ( 生物膜的结构和功能 )* , Beijing ( 北京 ) : Science Press ( 科学出版社 ) , 1982.
- [ 17 ] Boggs J M. *Biochim. Biophys. Acta* , 1987 , **906** : 353