# 用于水质自动分析的电化学生物传感器 系统的研究与开发<sup>\*</sup>

蔡 强<sup>1,2</sup>,何 苗<sup>1</sup>,施汉昌<sup>1</sup>,陈向强<sup>1</sup>,岳 兰<sup>2</sup>,张理兵<sup>2</sup>,黄 琦<sup>2</sup>
(1清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084;
2浙江清华长三角研究院生态环境研究所 嘉兴 314050)

## Research and development of electrochem ical biosensor system for automatic waterborne pollutant analysis

Cai Qiang<sup>1,2</sup>, He Miao<sup>1</sup>, Shi Hanchang<sup>1</sup>, Chen Xiangqiang<sup>1</sup>, Yue Lan<sup>2</sup>, Zhang Libing<sup>2</sup>, Huang Q<sup>2</sup>

(1 Environmental Simulation and Pollution Control National Joint Key Laboratory, Tsinghua University, Beijing 100084, China;
2 Institute of Ecology and Environment, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314050, China)

Abstract: Biosensor is an important technology for monitoring and controlling waterborne toxical pollutants W ith the maturity of transduction mechanism and biological recognition, it is urgent for development and application of environmental biosensor In this paper the integrated electrochemistry biosensor system is developed to detect toxicity, which includes electrochemical flow cell, flow analysis device, weak signal sampling and processing Based on the design and optimization of the hardware, software and experiment system, the key factor-the sensitivity of biosensor is discussed At last, this system was applied to the detection of  $H_2O_2$ . The results reveal that the system reaches high detection sensitivity and automation level, which could be used for automatic water quality monitoring Key words: biosensor; electrochemistry; instrumentation; environmental monitoring

## 1 引 言

近年来,全球范围内环境污染对水环境安全和人类 健康的危害日益引起广泛关注。尤其在我国,有毒有害 污染物大量增加,污染事故频频发生,严重危及我国的可 持续发展。为了能够有效控制有毒有害污染物(尤其是 持久性有毒污染物),急需有效的监测技术和监测仪器。 但是现在使用的常规分析测试方法(如高效液相色谱 HPLC),需要采集水样后,从现场返回实验室进行分析, 检测步骤也比较繁琐。更为重要的是,由于水样容易变 化,保存和运输过程都会对检测结果产生重要影响。

为了解决现场检测的问题,各国研究团体相继开展 针对有毒污染物快速检测技术的研究。在这些研究中,

收稿日期: 2006-11 Received Date: 2006-11

\*基金项目:国家高新技术发展计划(2005AA641040)、浙江省科技项目(2006C23069)、嘉兴市科技项目(2006AY2059)资助

环境生物传感器技术表现出广阔的应用前景。随着这种 分析器件的核心技术(传感原理和识别机制)日益成熟, 各国都纷纷进行相关的生物传感器集成分析系统的研究 与开发,一方面可以结合现场监测实验进一步完善环境 生物传感器技术,另一方面也能推动环境监测仪器的 发展<sup>111</sup>。

由于生物传感技术种类繁多,因此相应的集成分析 系统也有较大差异。尽管如此,结合水环境监测的实际 需求来看,生物传感器系统的发展目标有一定的共性,如 鲁棒性好,可以在现场工作,能适应各种环境;操作简单, 自动化程度高,便于一般技术人员操作;小型化或微型 化,成本较低,能够快速部署和检测大量样本<sup>[2-3]</sup>。在这 样的需求下,近年来出现一些生物传感器系统。如德国 T übingen大学研制了自动化水质分析计算机支持系统 (automated water analyzer computer supported system, AWACSS)<sup>[4]</sup>,并将其用于莱茵河的水质监测研究;又如 日本东芝公司采用电化学生物传感器原理研制了现代环 境监测系统(advanced environmental monitoring system), 用于地下水有毒污染物的预警试验研究等。这些研究表 明,在生物传感器核心器件研究的基础上,需要进一步对 集成系统进行开发,以推动了环境生物传感器的发展。

在这样的背景下,研究组自 2002年以来开展了厚膜 型电化学生物传感器的研究工作,并研制了相应的酶传 感器和免疫传感器<sup>[56]</sup>。为了建立基于电化学生物传感 器的水质监测和预警技术,开展示范性监测研究,研究组 进一步研制电化学生物传感器系统,建立自动分析技术。

## 2 电化学生物传感器系统设计

本文研制的电化学生物传感器系统 (biosensor reader)是采用生物传感器原理的水质自动分析设备。主要 原理是利用电化学传感器表面的生物识别分子进行酶分 析和免疫分析,检测过程采用流动注射分析技术实现水 中污染物的定量分析。根据这一原理,该系统包括 4个 部分:传感器,流动控制模块,恒电位仪,数据采集、处理 与自动控制模块。

## 2.1 丝网印刷电极与流过式电化学池

电化学生物传感器包括电极和流动池 2个部分。其 中电极采用丝网印刷工艺,这种厚膜工艺能批量生产传 感器,降低传感器成本<sup>[7]</sup>。本文采用的工艺设备是是半 自动丝网印刷机 UT - 100 (台湾明太公司)。电极结构和 制备过程如图 1 (a)所示。首先在 0.2 mm厚的 PET薄膜 (200 μm,保定乐凯公司)上印刷银浆 (Acheson公司 427SS),形成导电轨道;经过 100 烘干后,在此基片上 印刷碳浆 (日本 Jujo Ch01),形成碳工作电极和对电极, 其中直径 2 mm 的圆盘为工作电极,而圆环为对电极。 再次烘干后,印刷绝缘油墨,由于绝缘层的镂空图案,在 工作电极左下侧暴露出基片上的银轨,形成直径 2 mm 的伪参比电极。生物传感器是在丝网印刷电极上通过微 量点样生物识别分子形成的。检测时,需要把这种传感 器放置在流过式电化学池上。其中电化学池的结构图 1 (b)所示。电化学池整体材料为有机玻璃。溶液从电极 上方的薄层空腔中流过,流经电极表面,然后流出电化学 池。为了减小紊流对测量的影响以及减少响应时间,检 测腔采用薄层结构,设计厚度为 0.4 mm,直径 10 mm,理 论容积为 31.4 μL。检测腔四周辅以 O形橡胶圈防止渗 露。电极另外一端采用电极引线采用 0.8 mm U型 SM 卡卡座,通过四角的螺母固定上盖、电极和底座。





(b)电化学流动池结构示意图

(b) Sketch diagram of electrochemical flowcell

图 1 丝网印刷电极与流过式电化学池结构示意图

Fig 1 Schematic illustration of screen printed electrode and electrochemical flow cell

## 2.2 流动控制模块

流动控制模块整个系统中为了实现自动进样和生化 反应控制而设计的,基本原理是流动注射分析技术。流 动控制模块的主要结构如图 2所示,主要包括恒流泵驱 动器(BT00-100M,兰格公司),多通道泵头(DG-6,兰格 公司),6通阀(C22-3186EH, Valco公司)8位阀(C25-3188EMH, Valco公司),泵管内径 0.5 mm,外径 0.8 mm, 定量环 100 μL,系统中的管路采用 PTFE 管,外径 1.6 mm,内径 0.50 mm。设计流速为 0.05~2 mL/min。 其中动作部件在外围电路的控制下,完成恒流泵的开启、 转速的控制、阀的切换等功能。



图 2 流动注射分析的结构图

Fig 2 Structure diagram of flow injection Analysis

#### 2.3 检测器:恒电位仪

在检测过程中,需要对生物传感器的伪参比电极施加一定的极化电位,从工作电极把极化电流转换为电压信号。本系统中的恒电位仪采用的基于加法控制放大器的三运放结构,以保证伪参比电极上没有测量电流。由于生物传感器尺寸小,电流信号弱,系统容易受到杂散分流电容影响。为了抑噪抗干扰,电流放大器与数模转换和模数转换在同一电路板上,并且通过极低压差稳压器提供电源。恒电位仪的结构如图 3所示,其中微控制器为 C8051F,模数转换采用 AD7714,数模转换采用 DAC8531。整个系统的设计精度为 0.1 nA 的电流。使用方式是上位机通过 RS232协议控制恒电位仪的极化电位和极化电流的采集。

继电器 8051	
三电极系统 ADC	极低压
DAC FLASH	- 差稳压 模块

#### 图 3 恒电位仪结构图

Fig 3 Block diagram of constant potential device

#### 2.4 控制系统

2

电化学生物传感器系统采用 PC104系统构建,硬件 结构见图 4,图 5 是整机照片,图 6 是软件结构。其中 A/D芯片为 24位 AD7714,D/A芯片为 16位 DAC8031, 生物传感器系统采用 Windows98作为操作系统,分析测 试软件用 C++Builder6.0开发。软件主要功能模块包 括在主程序窗口的控制下设定系统参数(包括端口参数、 端口启停控制等)和检测流程(包括泵、阀、恒电位仪等 部件的动作)。一个检测流程最多可以包含 32个检测步 骤。设定好的控制参数数据通过命令解释器自动生成控 制命令,经 TComm32和 WinD 接口库发送给接口硬件。 其中对于不同检测电极和电化学池,均包含不同的检测 参数(如电位校准、电流补偿、标定系数)。采集的数据 通过 TComm32返回到信号预处理单元,经过滤波等处理 后传输给实时显示模块和数据管理模块。



## 图 4 电化学生物传感器系统结构图

Fig 4 Block diagram of biosensor reader



图 5 电化学生物传感器系统实例图 Fig 5 Photograph of biosensor reader



图 6 软件结构示意图 Fig 6 Software of Biosensor

## 3 检测体系优化

由于生物传感器的工作电极面积小,典型传感器响 应信号在 0~1000 nA 范围内,响应电流相对较弱,容易 受到噪声和干扰的影响。这种影响除了外界电磁场的干 扰外,主要来源于体系中的杂散电流,可以用杂散分布电 容来表示。为了抑制噪声和消除干扰,除了进行良好屏 蔽之外,还采用 3种方式进行处理:

(1)采用光耦隔离模拟电路与数字电路,采用了极 低压差稳压器 SP6201,以提供稳定的工作电压。对本系 统采用两电极工作方式,也就是参比电极与对电极短路, 在工作电极与参比电极之间接上 1 ×10<sup>6</sup> 的电阻,检测 100 mV 电位下的电流,系统噪声水平低于 0.1 nA,电流 检测精度为 0.3 nA。

(2)检测体系:这里主要考虑伪参比电极的稳定性。 当三电极体系中的银/氯化银参比电极实际上伪参比电 极,是银电极通过溶液中氯离子的自然卤化形成,电位不 容易稳定,容易受到外界干扰等因素导致电位抖动,并进 一步产生噪声。因此,检测时溶液需要含有适量的氯离 子,以保障参比电极的稳定性。为考察伪参比电极对系 统响应信号的影响,分别试验不同氯离子浓度时的信噪 比。其中极化电位是 100 mV,信号 *S*为电流强度,噪声 *N*为电流噪声,而信噪比为 10 log(*S /N*)。结果如图 7 所 示,可以看出,检测溶液中需要添加 3 ×10<sup>4</sup> mol/L以上的 氯离子,保证系统具有良好的信噪比。



图 7 氯离子浓度对检测体系的信噪比的影响

Fig 7 Influence of the concentration of C1 on SNR

(3)数字信号处理:考虑到 PC104的运算能力较强, 因此采用数字信号处理进一步抑制噪声。用 MATLAB 分析采样信号的功率谱,结果显示噪声功率连续均匀分 布在全频段。根据功率谱图,设计的滤波器包括:5阶 Butterworth低通滤波器(截止频率 10 Hz)和 1阶 7点 Soglay平滑,电流噪声水平可以控制在 0.1 nA以下。

## 4 电化学生物传感器系统检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的实验

本文研制的电化学生物传感器系统是采用生物化学 反应的原理进行自动水质分析,系统中包含的流动控制 模块,实现多步骤生物化学实验的自动化。通过构建不 同的流路和控制策略,检测不同极化电位下的响应电流, 可以建立基于酶分析、微生物分析、免疫分析等生物传感 器。以下就 HRP酶传感器为例子,进行检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的实 验。采用 HRP酶作为生物敏感物质的原因,是因为 HRP 酶是酶免疫分析中的重要标记酶。HRP酶传感器的制 备方法采用凝胶包埋法。包埋材料为 3.7 mg/mL 锇聚乙 烯基咪唑吡啶 ([Os(bipy)<sub>2</sub>(PVP)<sub>10</sub>]Cl<sub>2</sub>,合成方法如文 献所述)和 HRP酶 (华美生物技术公司),定容后 HRP为 1 mg/mL,聚合物为 0.37 mg/mL,混溶体系中乙醇与去离 子水的比例为 1 9。取 3 µL滴加到到电极上,风干后安 装于电化学流动池。按照表 1设置分析步骤,启动检测流 程,其中极化电位是 - 300 mV,检测体系中的载流为 PBS 缓冲液,底物溶液增加 0.3 mol/L NaCl。检测结果如图 8 和图 9所示。其中图 8是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 2 ×10<sup>-3</sup> mol/L 的 响应曲线,而图 9是 HRP酶传感器检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的标准曲线。

表 1 HRP酶传感器检测流程

## Table 1 Test protocol for HRP enzyme biosensor

	冲洗	基线	检测	冲洗
多位阀	1	1	1	1
电磁阀	关闭	开启	关闭	关闭
六通阀	采样	采样	注射	采样
恒流泵 /(r・min <sup>-1</sup> )	10	10	10	10
检测器	关闭	开启	开启	关闭
持续时间 /s	60	60	120	60



图 8 HRP酶传感器检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的系统响应图 Fig 8 Screen shot for detecting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using HRP enzyme biosensor





## 5 结 论

#### 电化学生物传感器系统是程序控制下进行水中污染

物自动检测的分析仪器。本文通过核心传感器件、仪器 系统集成设计和检测体系的优化,电流检测精度可以达 到 0.3 nA,可用于生物传感器实验。本文试验了 HRP酶 传感器检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,类似可以针对不同反应机理,在丝网 印刷电极上固定不同的生物敏感物质,结合相应的反应 试剂,建立自动分析模式。在这种思想下,可以应用本系 统建立酶分析、免疫分析和 DNA 分析的模式,并进一步 建立水中微量污染物的检测技术。在此基础上,可以采 用这一技术针对水中有毒污染物进行现场水质监测和评 估的示范性研究。

## 参考文献

2162

- [1] SARA RODR IGUEZ-MOZAZ, MAR A J. LÓPEZ de AL-DAA, et al Biosensors for environmental monitoring: A global perspective [J]. Talanta, 2005, 65: 291-297.
- [2] KWAKYE S, GORAL V N, ANTJE J B. Electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid detection with integrated minipotentiostat [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21: 2217-2223.
- [3] SARA RODR IGUEZ-MOZAZI, MAR A-PLAR MARCO2, MAR A J. LÓPEZ de ALDA, et al Biosensors for environmental applications Future development trends [J]. Pure Appl Chem, 2004, 76(4): 723-752
- [4] TSCHMELAKA J, PROLLA G Automated water analyser computer supported system (AWACSS) Part I Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design and networking [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20: 1499-1508
- [5] CAIQ, SHIH CH, HEM, et al Amperometric enzyme immunosensor based on screen printing technique [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34 (1): 65-68.
- [6] CAIQ, YU R ZH, HEM, et al Determination of 2, 4-D using disposable amperometric immunosensor[J]. Environmental Science, 2005, 26 (9): 66-69.
- [7] M QUEL ALBAREDA-S RVENT, ARBEN MERKO I, SAL-VADOR ALECRET Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensor A review [J]. Sensors & Actuators B, 2000, 69 (1-2): 153-163
- [8] BUCKNGHAM D A, DW YER F P, GOODW N H A, et al Mono- and bis-(2, 2-bipyridine) and (1, 10-phenan-throline) chelates of ruthenium and osmium: N. B is chelates of bivalent and tervalent osmium [J]. Australian Journal of Chemistry, 1964, 17: 325-336

[9] FORSTER R J, VOS J G Synthesis, characterization, and properties of a series of osm ium- and ruthenium-containing metallopolymers[J]. Macromolecules, 1990, 23: 4372-4377.

## 作者简介



蔡强,男,1972年 8月出生,分别于 1996、1999和 2002年在浙江大学获得学 士、硕士和博士学位。现为清华大学浙江 清华长三角研究院生态环境研究所副研 究员,主要研究方向生物传感器、环境监 测仪器仪表。

地址:浙江省嘉兴市中环南路华东石油大

## 厦浙江清华长三角研究院, 314050

E-mail: caiq@ tsinghua edu cn

**Cai Qing**, male, was born in Aug 1972, received his B. S, M. S and PhD in biomedical engineering all from Zhejiang University in 1996, 1999 and 2002 respectively. He is currently an associate research fellow in Yangtze Delta Region Research Institute of Tsinghua University. His research interests include biosensor and novel instrument for environmental

Address: Yangtze Delta Region Research Institute of Tsinghua University, East China Petroleum Building, Middle Ring South Road, Jiaxing 314050, Zhejiang, China

E-mail: caiq@tsinghua edu cn



何苗, 女, 1967年 1月出生, 1995年 于清华大学获得博士学位, 现为清华大 学环境科学与工程系环境模拟与污染控 制国家重点实验室副研究员, 主要研究 方向为环境生物检测、废水生物处理 技术。

地址:北京市清华大学环境科学与工程

## 系,100086

E-mail: hem iao@tsinghua edu cn

He M iao, female, was bom in Jan 1967, received her PhD in environmental science from Tsinghua University in 1995. Now she is an associate professor in Environmental Science and Engineering Department, Tsinghua University. Her main research fields are novel bio-analysis technology for environmental application, wastewater treatment

Address: Environmental Science and Engineering Department, Tsinghua University, Beijing 100086, China E-mail: hem iao@tsinghua edu cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net