

选择性测量 H_2O_2 浓度的光纤倏逝波生物传感器彭飞¹, 刘志成², 余秋会¹, 薛正大¹, 钟年丙^{1,2*}, 赵明富¹¹重庆理工大学光纤传感与光电检测重庆市重点实验室、智能光纤感知技术重庆市高校工程研究中心, 重庆 400054;²重庆理工大学两江国际学院, 重庆 401135

摘要 为了实现对 H_2O_2 浓度选择性、准确的检测, 研制了一种基于辣根过氧化物酶(HRP)的光纤倏逝波生物传感器。首先采用氢氧化钠溶液对去除部分纤芯的抗紫外石英光纤进行羟基化, 接着利用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷进行硅烷化, 其次将光纤浸入戊二醛溶液中进行醛基交联, 再次将光纤移入对 H_2O_2 具有选择催化性的 HRP 溶液中进行 HRP 分子固定, 最后将固定有 HRP 的光纤在室温下晾干, 即可获得 HRP 固定化光纤生物传感器。实验研究了戊二醛、HRP 的浓度和固定时间、 H_2O_2 溶液的温度对传感器灵敏度的影响, 测试了传感器的响应时间、选择敏感性 & 检测下限, 建立了传感器的理论模型。研究表明, 传感器对 H_2O_2 有高选择敏感性, 在 $4 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 浓度范围内传感器的输出信号与浓度间具有线性关系, 灵敏度达到 $-8.164 \times 10^{-4} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 相对误差为 7.59%, 检测下限达到 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词 光纤光学; 过氧化氢浓度; 辣根过氧化物酶; 倏逝波; 光纤传感器; 选择性; 灵敏度

中图分类号 TN253

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS202242.1006001

Fiber-Optic Evanescent Wave Biosensor for Selective Detection of H_2O_2 ConcentrationPeng Fei¹, Liu Zhicheng², Yu Qiu-hui¹, Xue Zheng-da¹, Zhong Nian-bing^{1,2*}, Zhao Ming-fu¹¹Chongqing Key Laboratory of Optical Fiber Sensor and Photoelectric Detection, Chongqing Engineering Research Center of Intelligent Optical Fiber Sensing Technology, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;²Liangjiang International College, Chongqing University of Technology, Chongqing 401135, China

Abstract In order to realize the selective and accurate detection of H_2O_2 concentration, a fiber-optic evanescent wave biosensor based on horseradish peroxidase (HRP) is developed. First, the ultraviolet resistant quartz fiber with partial core removal is hydroxylated with sodium hydroxide solution and silanized with 3-aminopropyl triethoxysilane, then the fiber is immersed in glutaraldehyde solution for aldehyde cross-linked, and the fiber is moved into HRP solution with selective catalysis for H_2O_2 to fix HRP molecules. Finally, the fiber with HRP is dried at room temperature. The optical fiber biosensor immobilized on HRP can be obtained. The effects of the concentration and fixed time of glutaraldehyde and HRP and the temperature of H_2O_2 solution on the sensitivity of the sensor are studied experimentally. The response time, selection sensitivity, and detection limit of the sensor are tested, and the theoretical model of the sensor is established. The results show that the sensor has a high selective sensitivity to H_2O_2 , and the output signal of the sensor has a linear relationship with the concentration of H_2O_2 in the range of $4 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the sensitivity is $-8.164 \times 10^{-4} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, the relative error is 7.59%, and the detection limit is $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words fiber optics; hydrogen peroxide concentration; horseradish peroxidase; evanescent wave; fiber-optic sensor; selectivity; sensitivity

收稿日期: 2021-10-08; 修回日期: 2021-11-14; 录用日期: 2021-12-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51876018, 52176178)、重庆市高校创新研究群体项目(CXQT21035)、重庆市科委技术创新与应用发展专项(cstc2020jscx-msxmX0097)

通信作者: *zhongnianbing@163.com

1 引言

过氧化氢是一种常见的小分子化合物,化学式为 H_2O_2 ,其中氧原子在 sp^3 杂化轨道上成键,氧分子为极性分子,所以其是一种强氧化剂。 H_2O_2 具有双面性:一方面在生物机体中 H_2O_2 作为二级信使起着关键作用,用来调节重要而复杂的生物途径,即细胞生长、细胞分化、凋亡、血管重塑、免疫激活、气孔运动和根生长^[1],然而当体内 H_2O_2 含量过高时会导致各种疾病的发生,例如帕金森病、糖尿病、心血管疾病、癌症和阿尔茨海默病等^[2];另外一方面,在食品、制药、临床、废水处理、金属表面处理和环境分析中 H_2O_2 发挥着重要的积极作用^[3],如在环境领域 H_2O_2 可以快速处理工业污染源所产生的废水、废气以及固体废弃物,而且不会造成二次污染。因此,对 H_2O_2 浓度进行在线准确的检测将有助于精准地调控生化反应过程中 H_2O_2 的含量,从而为有效保障人类健康和保护环境提供重要支撑。

当前, H_2O_2 浓度的检测方法主要有离线和在线两种。离线检测法主要包括滴定法、分光光度法和高效液相色谱法^[4]。滴定法的干扰因素多,灵敏度低;分光光度法的测量准确性和灵敏度低;高效液相色谱法的精度高,但仪器成本高、样品的预处理步骤多且耗时。在线检测方法主要包括电化学法^[5]、光纤荧光法^[6]和光纤表面等离子体共振法^[7]。电化学方法具有较高的灵敏度和高选择性,但该方法存在稳定性差、成本高和传感器几何尺寸大等缺点。光纤传感器具有微结构、成本低^[8]、抗电磁干扰^[9]、可重复使用和分布式测量等优点,故其成为物-化-生参数在线检测最有前途的设备之一^[10-11],其中光纤荧光法是将发光试剂固定在光纤表面,通过测量荧光强弱或寿命来实现对 H_2O_2 浓度的测量。虽然光纤荧光 H_2O_2 浓度传感器具有检测浓度范围广和检出限低的优点,但荧光寿命短且不稳定^[12],测量过程易受环境光的干扰,这会导致传感器测量结果的稳定性、准确性和重复性低^[13]。光纤表面等离子体共振传感器采用表面涂覆金属薄膜的光纤来检测 H_2O_2 浓度,然而金属薄膜易被 H_2O_2 腐蚀且不能恢复^[7],同时传感器的稳定性和可重复性低。因此,如何在现有光纤传感器的基础上研制一种微结构、低成本、高选择性和准确检测 H_2O_2 浓度的光纤传感器十分必要。

为了实现对 H_2O_2 浓度选择性、准确的检测,本文提出了一种基于辣根过氧化物酶(HRP)的光纤

倏逝波生物传感器,其由抗紫外石英光纤和对 H_2O_2 具有选择性催化敏感的 HRP 生物酶构成。为了将 HRP 固定在光纤表面,首先将光纤传感区羟基化,然后用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷对光纤进行硅烷化,接着用戊二醛的两个醛基交联 3-氨基丙基三乙氧基硅烷和 HRP 的氨基将 HRP 固定在光纤上。采用扫描电子显微镜(SEM)和元素能谱仪(EDS)对光纤样品的表面形貌及表面元素进行表征。实验研究戊二醛的浓度和交联时间、HRP 的浓度和固定时间以及 H_2O_2 溶液的温度对传感器响应特性的影响,并建立传感器测量 H_2O_2 浓度的理论模型。

2 H_2O_2 浓度选择性测量原理

光纤倏逝波传感器感知外界环境物质(测量对象)浓度变化的机理:测量对象会对光纤表面的倏逝波产生吸收,从而引起光纤内部传输的光能量发生损失,通过测量光纤输出端光能量的变化量来实现对物质浓度的测量^[14]。本文假定波长为 λ 的光经过光纤,且外界环境会对光纤表面的倏逝波产生吸收。由朗伯-比尔定律可知,光纤输入端的入射光强 I_{in} 与光纤输出端的出射光强 I_{out} 满足的函数关系^[14]为

$$I_{\text{out}} = I_{\text{in}} \exp(-\gamma L), \quad (1)$$

式中: L 为传感器敏感区长度; γ 为倏逝波的衰减系数,可表示为

$$\gamma = NT, \quad (2)$$

式中: N 为单位长度光纤内光的全反射次数; T 为无损耗纤芯、有吸收损耗包层(测量对象)的非涅耳透射系数。当纤芯半径为 R 、入射光与其界面法线间的角度为 θ 时, N 和 T 可分别表示^[15]为

$$N = \frac{\cot \theta}{2R}, \quad (3)$$

$$T = \frac{\alpha \lambda n_2 \cos \theta}{\pi(n_1^2 - n_2^2)(\sin^2 \theta - n_2^2/n_1^2)^{1/2}}, \quad (4)$$

式中: α 为测量对象的容积吸收系数; n_1 为纤芯的折射率; n_2 为传感器表面的折射率。将式(3)和式(4)代入式(2)可得倏逝波的衰减系数 γ ,表达式为

$$\gamma = \frac{\alpha \lambda n_2 \cos^2 \theta}{2\pi R(n_1^2 - n_2^2) \sin \theta (\sin^2 \theta - n_2^2/n_1^2)^{1/2}}. \quad (5)$$

将式(5)代入式(1)可得传感器的输出光强,表达式为

$$I_{\text{out}} = I_{\text{in}} \exp \left[-\frac{\alpha \lambda L \cos^2 \theta}{2\pi R(n_1^2 - n_2^2) \sin \theta (\sin^2 \theta - n_2^2/n_1^2)^{1/2}} \right]. \quad (6)$$

由式(6)可知,当传感器敏感区长度 L 、光波入射角 θ 、纤芯折射率 n_1 、纤芯半径 R 和入射光波长 λ 一定时,传感器输出的光强只与传感器敏感区表面的折射率 n_2 有关。此外,Wang 等^[16] 研究表明 HRP 对 H_2O_2 有选择催化的作用,且 H_2O_2 在 HRP 的催化下可将氧化 4-氯-1-萘酚变成苯并-4-氯环己二烯酮沉淀物^[17],其反应方程式如图 1 所示。

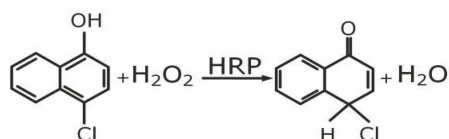


图 1 H_2O_2 在 HRP 的催化下反应的方程式

Fig. 1 Equation of H_2O_2 reaction catalyzed by HRP

当苯并-4-氯环己二烯酮沉淀物覆盖在传感器敏感区表面上时, n_2 会改变,而 H_2O_2 的浓度越高,苯并-4-氯环己二烯酮沉淀量越多, n_2 的改变量越大,从而引起光纤内部传输的光能量变化量越大,因此可通过测量光纤传感器输出光能量的变化量来实

现对 H_2O_2 浓度的测量。

3 实验

3.1 实验材料

所用试剂包括 H_2O_2 (质量分数为 30%)、二水合磷酸二氢钠(分析纯)、十二水合磷酸氢二钠(分析纯)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES,质量分数为 99%)、戊二醛(质量分数为 50%)、HRP(酶的质量分数为 3.0,冻干粉,活性 >300 unit/mg)、无水乙醇(质量分数 $\geq 99.8\%$)、氢氧化钠(质量分数为 97%)和 4-氯-1-萘酚(质量分数为 99%)。抗紫外石英光纤的纤芯(纯石英)直径为 $600 \mu\text{m}$,包层(硅橡胶)直径为 $630 \mu\text{m}$,最小弯曲半径为 60 mm ,数值孔径为 0.37 ± 0.02 。实验用水为去离子水。

3.2 传感器的制备

传感器的制备过程包括光纤腐蚀、光纤羟基化、光纤硅烷化、戊二醛交联和 HRP 的固定,制备流程如图 2 所示。

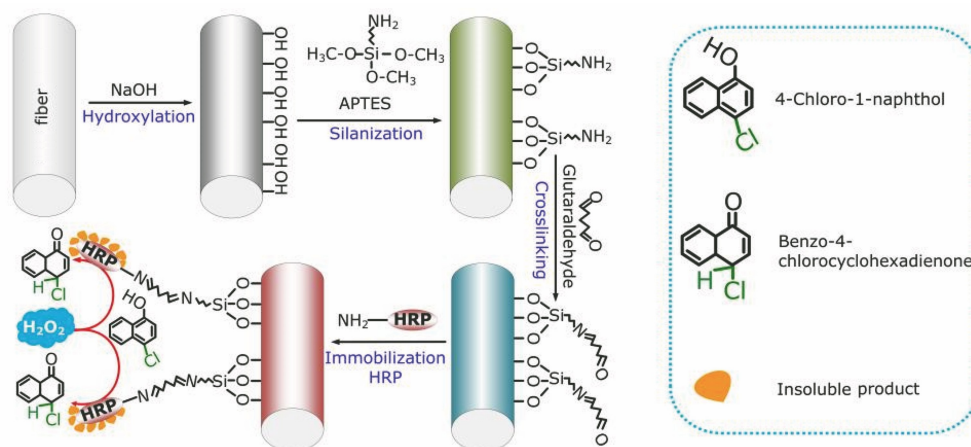


图 2 传感器的制备原理及流程图

Fig. 2 Preparation principle and flowchart of sensor

1) 光纤腐蚀:取 20 cm 长的石英光纤,首先用浓硫酸将光纤中心区域长度为 2 cm 的光纤表面的硅橡胶去除,再用质量分数为 40% 的氢氟酸在室温下将其直径腐蚀至 $500 \mu\text{m}$ 。

2) 光纤羟基化:配制浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液,将光纤传感区浸没在溶液中 30 min(室温),取出后用去离子水冲洗并晾干。

3) 光纤硅烷化:首先将 APTES 溶解在无水乙醇中,配制成含有体积分数为 10% 的乙醇的 APTES 溶液;接着将羟基化的光纤浸没在该溶液中 1 h(室温),取出光纤用乙醇清洗后再用去离子水清洗, 90°C 真空干燥 10 min 后备用。

4) 戊二醛交联:首先用磷酸二氢钠溶液和磷酸

氢二钠溶液配制磷酸缓冲液(pH 为 7.0,浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);接着将戊二醛溶解在磷酸缓冲液中,配制成体积分数为 2% 的戊二醛溶液;然后将硅烷化的光纤浸没在戊二醛溶液中 30 min(室温),取出后用磷酸缓冲液清洗并晾干,备用。

5) HRP 的固定:首先将 HRP 溶解在磷酸缓冲液中(pH 为 7.0,浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的 HRP 溶液;然后将戊二醛交联后的光纤浸没在该溶液中 3 h(室温),取出后用磷酸缓冲液清洗并晾干,即可获得用于测量 H_2O_2 浓度的光纤倏逝波生物传感器。

3.3 分析液的配制

配制不同浓度的 H_2O_2 溶液:首先采用磷酸二

氢钠溶液和磷酸氢二钠溶液配制浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.4); 然后将 4-氯-1-萘酚溶解在乙醇中, 并用磷酸缓冲液将浓度稀释至 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 其次采用去离子水将 H_2O_2 的浓度稀释至 $40 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 最后分别将相同体积、不同浓度的 H_2O_2 与浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-氯-1-萘酚溶液混合, 即可获得 H_2O_2 的浓度范围为 $20 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分析液^[18]。此外, 为了表征传感器对 H_2O_2 有选择性识别的能力, 采用去离子水将一定质量的氯化钠 (NaCl)、尿素 (Urea) 和葡萄糖 (Glucose) 溶解, 然后分别与浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-氯-1-萘酚溶液混合, 配制出浓度均为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠、尿素和葡萄糖混合溶液。

3.4 传感器测量系统及测量步骤

传感器测量系统主要由 H_2O_2 光纤倏逝波生物传感器、Z 形通道聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 样品池

(Z 形通道的长为 40 mm, 宽为 1 mm, 高为 1 mm)、注射泵 (Pump, 流速为 $10 \text{ mL}/\text{min}$)、宽带光源 (DH-2000, 光谱范围为 $215 \sim 2500 \text{ nm}$)、光谱仪 (QE65 Pro, 光谱探测范围为 $185 \sim 1100 \text{ nm}$, 光谱分辨率为 $0.14 \sim 7.70 \text{ nm}$)、光功率计 (HS211, 光谱探测范围为 $200 \sim 1100 \text{ nm}$, 检测下限为 100 pW) 和光纤跳线等构成, 如图 3 所示。

实验过程中首先采用注射泵向 Z 形通道中注入去离子水以清洗传感器 5 min, 此时记录传感器输出的光谱及光强; 然后将 Z 形通道中的去离子水排净, 并用注射泵注入分析液 (浓度为 $20 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液), 分析液填满整个 Z 形通道后记录不同时间下传感器输出的光谱和光强; 随后将分析液排净, 并用去离子水清洗光纤传感器 5 min, 用于其他浓度分析物的测量。

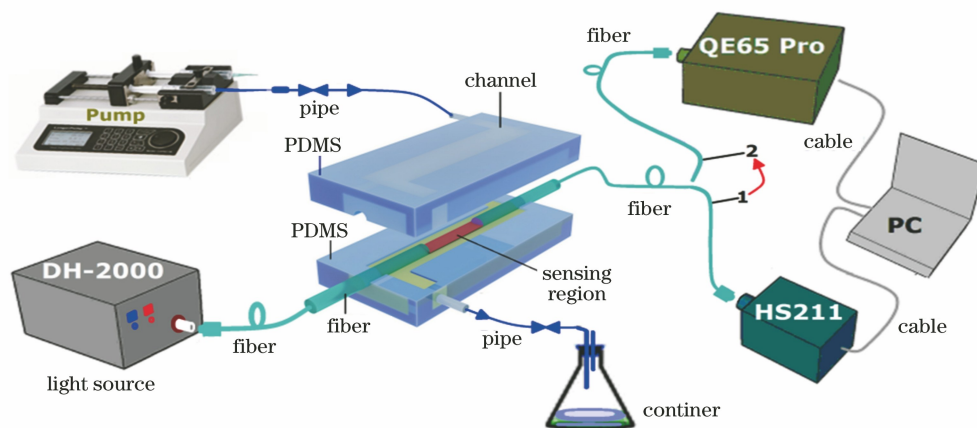


图 3 传感器测量系统的示意图

Fig. 3 Schematic of sensor measurement system

3.5 数据处理方法

为了准确表征传感器测量 H_2O_2 浓度的能力, 采用传感器输出光强相对变化量 (RCTLI) 来表征^[19], $x_{\text{RCTLI}} = (I_c - I_0) / I_0$, 其中 I_0 为传感器在测量去离子水时的输出光强, I_c 为传感器在测量 H_2O_2 和 4-氯-1-萘酚混合溶液时的输出光强。实验数据来自 5 组传感器对每组实验重复测量三次的结果。

4 分析与讨论

4.1 传感器的表征

为了证明 HRP 被成功固定在光纤传感器敏感区表面, 分别对在各阶段制作的光纤进行 SEM 及 EDS 表征, 实验结果如图 4、图 5 和表 1 所示。

如图 4 所示: 裸光纤表面光滑无杂质; 经过硅烷化后, 光纤被 APTES 层均匀覆盖; 经过醛交联后,

光纤表面出现一些褶皱, 变得粗糙; 将酶固定在光纤上, 光纤表面出现的褶皱更多, 粗糙程度更明显, 表明 HRP 被固定在光纤表面上。如表 1 所示: 硅烷化后的光纤表面中出现了 N 元素; 醛交联后的光纤表面中 C 元素含量增加, 其原因在于戊二醛含碳; 当光纤浸入到 HRP 后, 光纤表面中出现了 Fe 元素, 这进一步证实在光纤表面成功固定了 HRP 分子。

4.2 戊二醛浓度对传感器性能的影响

为了研究不同体积分数的戊二醛对传感器灵敏度及光谱传输性能的影响, 采用不同体积分数的戊二醛制备传感器 (醛交联时间为 15 min, HRP 的质量浓度为 $0.05 \text{ mg}/\text{mL}$, HRP 固定化时间为 2 h), 实验结果如图 6 所示, 其中 H_2O_2 溶液的测试温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

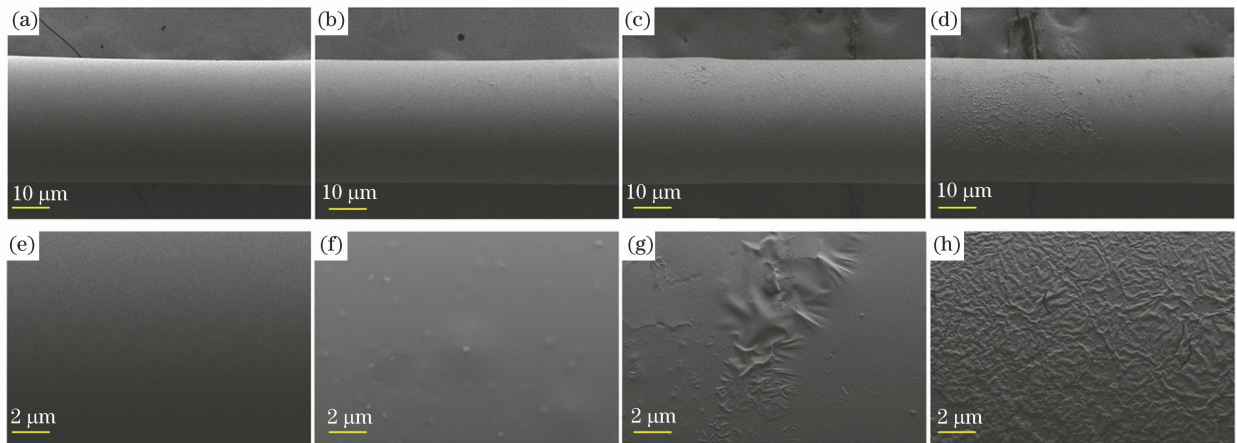


图 4 光纤的表面形貌及其放大图。(a)(e)裸光纤;(b)(f)硅烷化光纤;(c)(g)醛交联光纤;(d)(h) HRP 固定化光纤

Fig. 4 Surface topography of fiber and its enlarged view. (a)(e) Bare fiber; (b)(f) silanized fiber;

(c)(g) aldehyde cross-linked fiber; (d)(h) HRP immobilized fiber

表 1 不同阶段下光纤表面中元素的质量分数

Table 1 Mass fraction of elements in fiber surface at different stages

Fiber type	C	N	O	Si	Fe
Bare fiber	0	0	56.98	43.02	0
Silanized fiber	32.44	5.55	28.45	33.56	0
Aldehyde cross-linked fiber	40.94	3.43	27.09	28.54	0
Enzyme immobilized fiber	56.86	5.63	28.94	8.42	0.15

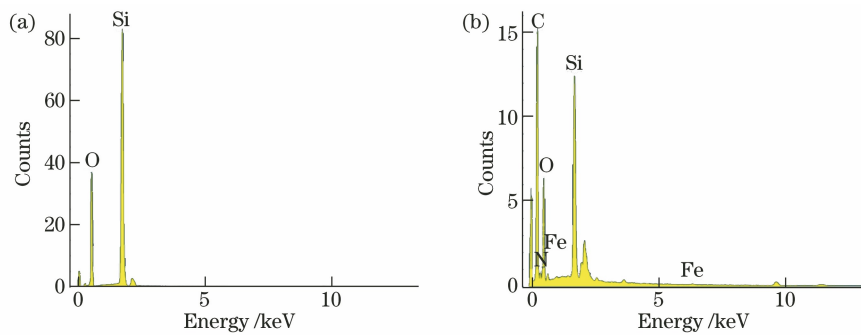


图 5 不同光纤的 EDS 图。(a)裸光纤;(b) HRP 固定化光纤

Fig. 5 EDS diagrams of different fibers. (a) Bare fiber; (b) HRP immobilized fiber

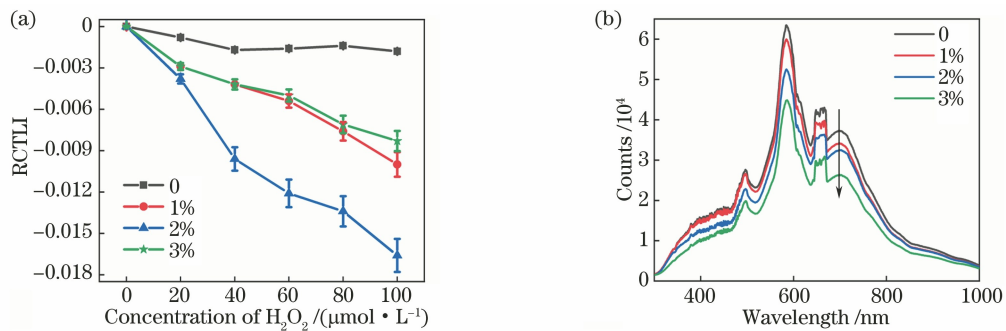
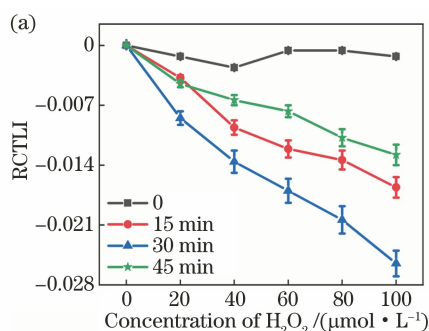


图 6 不同体积分数的戊二醛下传感器的性能曲线。(a)灵敏度;(b)传输光谱

Fig. 6 Performance curves of sensors with different volume fractions of glutaraldehyde. (a) Sensitivity;

(b) transmission spectra

由图 6(a)可知:传输器的灵敏度随着戊二醛体积分数的增加呈先增加后减小的趋势;当戊二醛的体积分数为 2% 时,传感器的灵敏度最大,由此表明戊二醛的最佳体积分数为 2%。原因在于当戊二醛的体积分数较低时,这会导致戊二醛与硅烷化光纤表面氨基的结合不足,造成醛基较少,固定化 HRP 较少,进一步导致 HRP 催化 H_2O_2 氧化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀物较少,所以 n_2 的改变量较小,从而导致传感器的灵敏度较低;然而当戊二醛的体积分较高时,高体积分数的戊二醛会影响蛋白质的高级结构,导致蛋白质变性和失活,因此 HRP 的活性随着戊二醛体积分数的增加而降低^[20],故酶催化产生的沉淀物也较少,从而使传感器的灵敏度降低。



如图 6(a)所示,在 H_2O_2 浓度为 $0 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,传感器测量结果的最大相对误差小于 8.91%,由此表明传感器具有较高的重复性。如图 6(b)所示,随着醛体积分数的增加,传输光强逐渐减小,原因是随着醛体积分数的增加,与氨基结合的戊二醛会增加,这会导致对光纤表面产生倏逝波的本征吸收增加,因此传感器输出光谱的质量降低。

4.3 醛交联时间对传感器性能的影响

为了研究不同醛交联时间对传感器灵敏度及光谱传输性能的影响,采用不同醛交联时间制备传感器(戊二醛的体积分数为 2%,HRP 酶的质量浓度为 0.05 mg/mL,HRP 固定化时间为 2 h),实验结果如图 7 所示,其中 H_2O_2 溶液的测试温度为 25°C 。

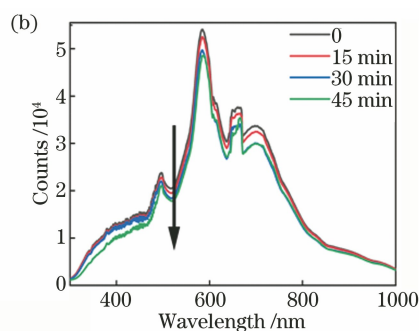


图 7 不同醛交联时间下传感器的性能曲线。(a)灵敏度;(b)传输光谱

Fig. 7 Performance curves of sensor at different aldehyde cross-linked times. (a) Sensitivity; (b) transmission spectra

从图 7 可以看到:灵敏度随着交联时间的增加呈先增大后减小的趋势;当戊二醛的交联时间为 30 min 时,传感器的灵敏度最大。原因在于随着醛交联时间的增加,所交联的戊二醛的量也增加,这会引入固定化 HRP 的量增加,使酶催化 H_2O_2 氧化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀物较多,所以 n_2 的改变量较大,从而导致传感器的灵敏度增加。然而交联时间过长,过量的戊二醛会使酶活性降低^[20],导致酶催化产生的沉淀物减少,造成传感器的灵敏度降低。如图 7(b)所示,随着醛交联时间的增加,传输光强逐渐减小,原因是随着醛交联时间的增加,所交联的戊二醛的量也增加,这会导致对光纤表面产生倏逝波的本征吸收增加,因此传感器输出光谱的质量降低。

4.4 酶质量浓度对传感器性能的影响

为了研究不同质量浓度的 HRP 对传感器性能的影响,采用不同质量浓度的 HRP 制备传感器(戊二醛的体积分数为 2%,戊二醛交联时间为 30 min,HRP 固定化时间为 2 h),实验结果如图 8 所示,其

中 H_2O_2 溶液的测试温度为 25°C 。

从图 8(a)可以看到:传感器的灵敏度随着 HRP 浓度的增加呈先增大后减小的趋势;当酶的质量浓度为 0.10 mg/mL 时,传感器的灵敏度最大。原因在于随着 HRP 质量浓度($0 \sim 0.10 \text{ mg/mL}$)的增加,固定化 HRP 的量也增加,这会导致 HRP 催化 H_2O_2 氧化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀量增多,所以 n_2 的改变量增大,传感器的灵敏度增加。随着 HRP 质量浓度的进一步增加,戊二醛提供给 HRP 的活性位点数量有限,使 HRP 与光纤表面的结合达到了饱和。同时,HRP 质量浓度的进一步增加会对酶活性造成空间位阻。此外,过量的 HRP 可能会在传感器表面形成酶促聚集,从而阻断酶的活性位点,使酶活性降低^[21],导致酶催化产生的沉淀物减少,所以传感器的灵敏度降低。从图 8(b)可以看到,随着酶质量浓度的增加,传感器传输光谱的质量降低,原因在于随着 HRP 质量浓度的增加,光纤表面附着酶的量增加,这会导致光纤表面倏逝波的衰减量增大,因此光纤传输光谱的质量降低。

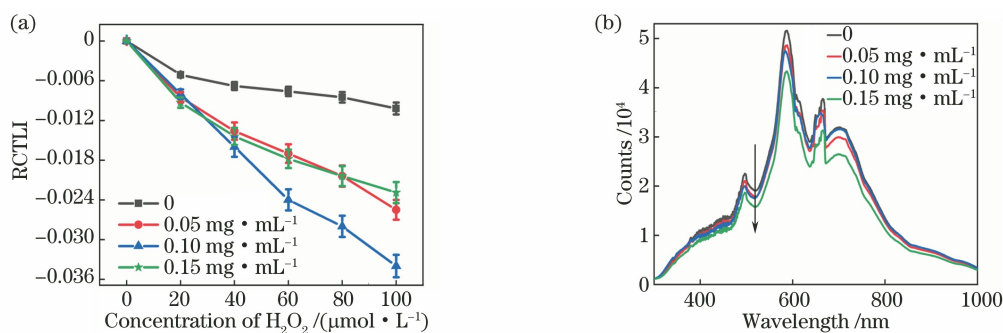


图 8 不同质量浓度下传感器的性能曲线。(a)灵敏度;(b)传输光谱

Fig. 8 Performance curves of sensors at different mass concentrations.

(a) Sensitivity; (b) transmission spectra

4.5 酶固定时间对传感器性能的影响

为了研究不同固定时间的 HRP 对传感器性能的影响,采用不同固定时间的 HRP 制备传感器(戊二醛的体积分数为 2%,戊二醛交联时间为 30 min, HRP 的质量浓度为 0.10 mg/mL),实验结果如图 9 所示,其中 H₂O₂ 溶液的测试温度为 25 °C。

如图 9(a)所示,在酶的固定时间为 0~3 h 时,传感器的灵敏度随着固定时间的增加而增加,而在固定时间为 4 h 时,传感器的灵敏度降低。原因是在初始阶段,HRP 酶与戊二醛的结合较少,随着固定时间的增加,酶和戊二醛的结合越来越多,使酶催化 H₂O₂ 氧化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀物也越来越多,所以 n_2 的改变量增大,故传感器的灵敏度增加。然而当酶与戊二醛的结合时间过长时,它们的交联度太高,由于酶的一定空间结构,在固定过程中空间抗性的形成影响了酶的结合和活性位点,从而导致

酶活性随着固定时间的增加而降低^[20],进而导致酶催化产生的沉淀物较少,即传感器的灵敏度降低。此外,从图 9(a)还可以看出,传感器的灵敏度在 H₂O₂ 浓度为 0~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时表现出了非线性(固定时间为 3 h),其原因在于受到光纤表面附着 HRP 量的限制,过多的 H₂O₂ 分子不能被光纤表面上有限的 HRP 催化氧化 4-氯-1-萘酚生成苯并-4-氯环己二烯酮沉淀物,进而改变光纤表面的折射率 n_2 ,即传感器表面折射率 n_2 的增量与 H₂O₂ 浓度 (0~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的增量不具有线性关系,因此在 H₂O₂ 浓度为 0~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,尤其是当浓度高于 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,传感器的灵敏度降低。由图 9(b)可知,随着固定时间的增加,传感器输出光谱的质量降低,原因是随着固定时间的增加,光纤表面附着酶的量会增加,导致倏逝波衰减量的增加,因此光纤内部光谱传输能量减弱。

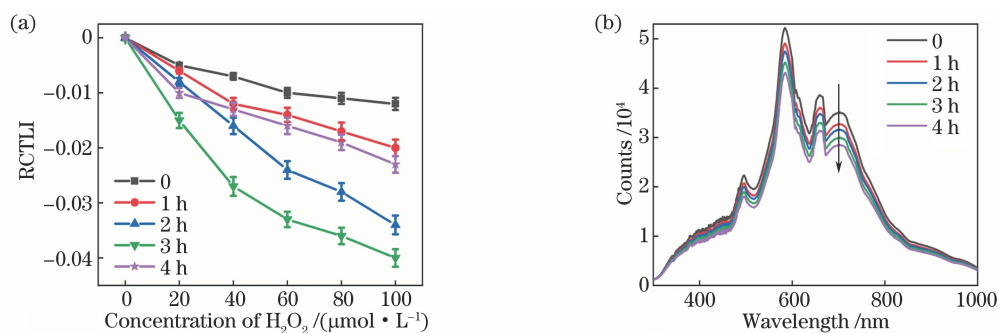


图 9 不同固定时间下传感器的性能曲线。(a)灵敏度;(b)传输光谱

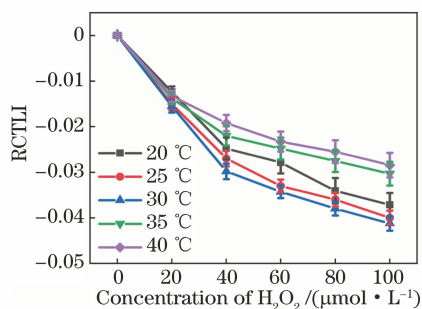
Fig. 9 Performance curves of sensors at different fixed times. (a) Sensitivity; (b) transmission spectra

4.6 测量温度对传感器性能的影响

为了研究 H₂O₂ 溶液的温度对传感器性能的影响,实验测试了 H₂O₂ 溶液在不同温度下传感器的响应性能(戊二醛的体积分数为 2%,戊二醛交联时间为 30 min, HRP 的质量浓度为 0.10 mg/mL, HRP 固定化时间为 3 h),实验结果

如图 10 所示。

如图 10 所示:传感器的灵敏度随着 H₂O₂ 溶液温度的升高呈先增大后减小的趋势,当温度为 30 °C 时,传感器的灵敏度达到最大 ($-4.0 \times 10^{-4} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),原因在于 HRP 的活性在小于 30 °C 时随着温度的升高而提升,使酶催化 H₂O₂ 氧

图 10 H_2O_2 溶液的温度对传感器灵敏度的影响Fig. 10 Influence of temperature of H_2O_2 solution on sensor sensitivity

化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀物增多,所以 n_2 的改变量增大,故传感器的灵敏度增加;HRP 是一种蛋白质,当温度超过 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 时,在高温下蛋白质结构将会

发生变化,并导致 HRP 的活性降低^[20],使 HRP 催化 H_2O_2 氧化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀物较少,所以 n_2 的改变量减少,故传感器的灵敏度降低。

4.7 传感器的响应时间、重复性、选择性及检测限

传感器的响应时间、重复性、选择性及检测限是评价其性能的重要指标参数,在传感器采用最佳参数(戊二醛的体积分数为 2%,戊二醛交联时间为 30 min,HRP 的质量浓度为 0.10 mg/mL ,HRP 固定化时间为 3 h)制备时,实验测试了传感器对浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 的响应时间及重复性,传感器对浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 、NaCl、Urea、Glucose 的响应特性,以及传感器对低浓度 H_2O_2 的响应特性,实验结果如图 11 所示,其中 H_2O_2 溶液的测试温度为 $30\text{ }^\circ\text{C}$, c 为 H_2O_2 的浓度。

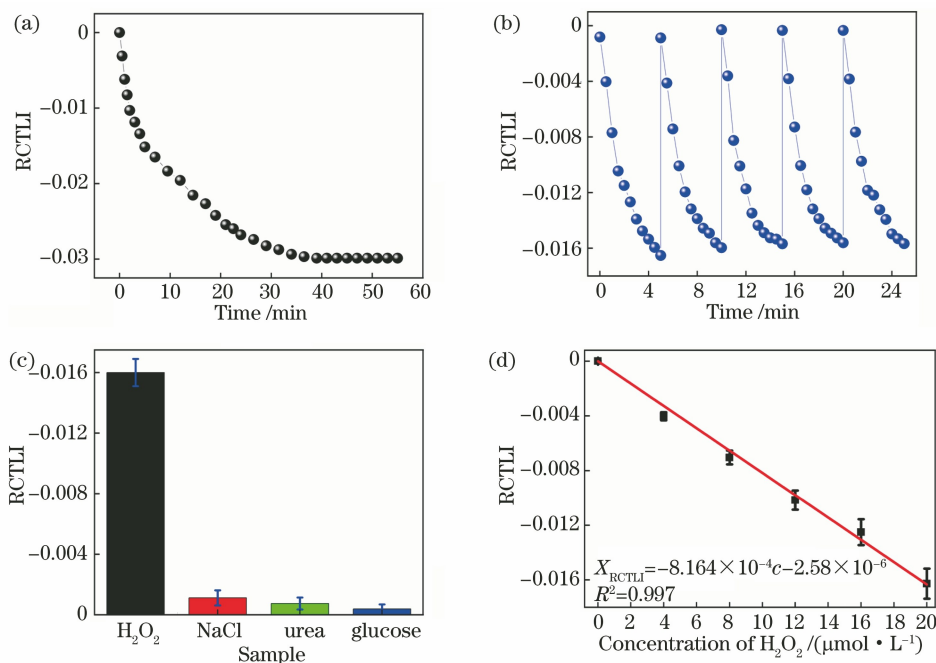


图 11 传感器的不同指标结果。(a)时间响应;(b)重复性;(c)选择性;(d)检测下限

Fig. 11 Results of different indicators of sensors. (a) Time response; (b) repeatability; (c) selectivity; (d) lower limit of detection

如图 11(a)所示:随着测量时间的延长,传感器的灵敏度呈先迅速增加后趋于稳定的趋势,原因在于初始阶段,HRP 催化过氧化氢氧化 4-氯-1-萘酚产生的沉淀物增加较多,所以传感器会对外界环境的变化快速响应;然而随着时间的延长,产生的沉淀物越来越多,这阻碍了酶对过氧化氢的催化,最终导致灵敏度增加缓慢。此外,从图 11(a)进一步可以看出,当传感器的响应时间为 300 s(5 min)时,传感器的灵敏度在最佳灵敏度的 50% 以上。为了节约测量时间,在实际测量过程中样品的采样时间设定

为 300 s。

如图 11(b)所示,对于浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 ,传感器的测量结果几乎完全重合(最大相对误差为 5.93%),表明传感器具有较高的重复性。如图 11(c)所示:传感器对浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl、Urea、Glucose 几乎不响应,原因在于 HRP 对 H_2O_2 有选择催化敏感性^[16];HRP 对 NaCl、Urea、Glucose 无催化性,即不会将 4-氯-1-萘酚氧化并产生沉淀物,为此光纤表面的折射率 n_2 保持恒定,所以传感器的输出光强恒定,RCTLI 变化较小。综上

可知,本文构建的传感器对 H_2O_2 有良好的选择敏感性。

如图 11 (d) 所示:传感器能对浓度为 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 进行准确识别,表明传感器的检测下限达到 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;此外,当 H_2O_2 浓度在 $4\sim 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间时,传感器的输出信号与 H_2O_2 浓度呈线性关系,表达式为 $x_{\text{RCTLI}} = -8.164 \times 10^{-4}c - 2.58 \times 10^{-6}$ (相关系数 $R^2 = 0.997$),即传感器的灵敏度达到 $-8.164 \times 10^{-4} \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$,最大相对误差为 7.59%。

5 结 论

本文提出了一种新的光纤倏逝波生物传感器的制作方法,基于 HRP 选择性催化 H_2O_2 以促使 4-氯-1-萘酚产生沉淀物,使光纤表面的折射率发生变化,从而引起倏逝波的衰减量发生变化,进而实现对 H_2O_2 浓度的选择性、准确测量,其中传感器采用抗紫外石英光纤作为感知信息和传输光信息的载体。为了将 HRP 固定在光纤表面,首先采用氢氧化钠溶液对抗紫外石英光纤进行羟基化,接着利用 3-氨基丙基三乙氧基进行硅烷化,然后进行醛基交联,最后通过戊二醛上的醛基与 HRP 上的氨基相连来实现对 HRP 的高效固定。此外,为了提升传感器的性能,实验探究了戊二醛的浓度和交联时间、HRP 的浓度和固定时间、 H_2O_2 溶液的测试温度对传感器灵敏度及光谱传输性能的影响,并建立了传感器选择性测量 H_2O_2 的理论模型。实验结果表明:当戊二醛的体积分数为 2%、醛交联时间为 30 min、HRP 的质量浓度为 0.10 mg/mL、HRP 固定时间为 3 h、 H_2O_2 溶液的测试温度为 30 $^\circ\text{C}$ 时,传感器的灵敏度达到最大;传感器的最低检测下限达到 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,在 $4\sim 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内,传感器对过氧化氢有良好的线性响应特性,灵敏度达到 $-8.164 \times 10^{-4} \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$,相对误差为 7.59%;同时传感器对 H_2O_2 有良好的重复性和选择性。本文的研究成果有助于推动智能光纤感知技术及 H_2O_2 在线检测技术的发展与工程应用。

参 考 文 献

- [1] Elias H, Vayssié S. Reactive peroxo compounds generated *in situ* from hydrogen peroxide: kinetics and catalytic application in oxidation processes[M]// Adam W. Peroxide chemistry: mechanistic and preparative aspects of oxygen transfer. New York: John Wiley & Sons Inc, 2000: 128-138.
- [2] Cui Y, Chen F, Yin X B. A ratiometric fluorescence platform based on boric-acid-functional Eu-MOF for sensitive detection of H_2O_2 and glucose [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 135: 208-215.
- [3] Salazar P, Fernández I, Rodríguez M C, et al. One-step green synthesis of silver nanoparticle-modified reduced graphene oxide nanocomposite for H_2O_2 sensing applications [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2019, 855: 113638.
- [4] Ivanova A S, Merkuleva A D, Andreev S V, et al. Method for determination of hydrogen peroxide in adulterated milk using high performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2019, 283: 431-436.
- [5] Li J N, Li X Y, Zhao Q D, et al. Polydopamine-assisted decoration of TiO_2 nanotube arrays with enzyme to construct a novel photoelectrochemical sensing platform [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 133-139.
- [6] Collaudin A B, Blum L J. Enhanced luminescent response of a fibre-optic sensor for H_2O_2 by a high-salt-concentration medium [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1997, 39(1/2/3): 189-194.
- [7] Bhatia P, Yadav P, Gupta B D. Surface plasmon resonance based fiber optic hydrogen peroxide sensor using polymer embedded nanoparticles [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 182: 330-335.
- [8] 郝晋青, 韩丙辰. 基于游标效应的高灵敏度光纤耦合器折射率传感器 [J]. 光学学报, 2020, 40(2): 0206002.
Hao J Q, Han B C. Ultrasensitive refractive index sensor based on optical fiber couplers assisted with vernier effect [J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(2): 0206002.
- [9] 章昌凤, 谢飞扬, 黄小琦, 等. 基于荧光光纤的临近空间飞行器局部放电故障的地面模拟实验研究 [J]. 光学学报, 2021, 41(15): 1506003.
Zhang C F, Xie F Y, Huang X Q, et al. Ground simulation experiment of partial discharge fault in near-space vehicle using fluorescent fiber [J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(15): 1506003.
- [10] 魏莉, 刘壮, 李恒春, 等. 基于“土”字形梁增敏结构的光纤光栅振动传感器 [J]. 光学学报, 2019, 39(11): 1106004.
Wei L, Liu Z, Li H C, et al. Fiber Bragg grating vibration sensor based on sensitive structure for “土”-shaped beam [J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(11): 1106004.
- [11] 辛鑫, 吴永武, 刘慧敏, 等. 一种新的光纤 Bragg 光栅氢气传感器制作方法 [J]. 光学学报, 2021, 41

- (4): 0406002.
- Xin X, Wu Y W, Liu H M, et al. A new fabrication method of fiber Bragg grating hydrogen sensor [J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(4): 0406002.
- [12] 王丹, 胡仁志, 谢品华, 等. 基于腔衰荡光谱技术测量夜间大气中五氧化二氮 [J]. *光学学报*, 2017, 37(9): 0901001.
- Wang D, Hu R Z, Xie P H, et al. Measurement of nitrogen pentoxide in nocturnal atmospheric based on cavity ring-down spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(9): 0901001.
- [13] Zhang H, Ye J T, Wang X L, et al. Highly reliable all-fiber temperature sensor based on the fluorescence intensity ratio (FIR) technique in $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ co-doped NaYF_4 phosphors [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2019, 7(48): 15269-15275.
- [14] Zhong N B, Chen M, Chang H X, et al. Optic fiber with $\text{Er}^{3+} : \text{YAlO}_3/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ coating and polymer membrane for selective detection of phenol in water [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 273: 1744-1753.
- [15] Armin A, Soltanolkotabi M, Feizollah P. On the pH and concentration response of an evanescent field absorption sensor using a coiled-shape plastic optical fiber [J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2011, 165(2): 181-184.
- [16] Wang Y L, Wang Z C, Rui Y P, et al. Horseradish peroxidase immobilization on carbon nanodots/CoFe layered double hydroxides: direct electrochemistry and hydrogen peroxide sensing [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 57-62.
- [17] Toma K, Oishi K, Kato M, et al. Precipitate-enhanced SAW immunosensor for sensitive monitoring of mite allergens [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 296: 126579.
- [18] Halliwell B, Clement M V, Long L H. Hydrogen peroxide in the human body [J]. *FEBS Letters*, 2000, 486(1): 10-13.
- [19] Zhong N B, Wang Z K, Chen M, et al. Three-layer-structure polymer optical fiber with a rough inter-layer surface as a highly sensitive evanescent wave sensor [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 254: 133-142.
- [20] Zhang C, Cai X L. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe_3O_4 /nanotubes composites for biocatalysis-degradation of phenol [J]. *Composite Interfaces*, 2019, 26(5): 379-396.
- [21] Yu B, Cheng H, Zhuang W, et al. Stability and repeatability improvement of horseradish peroxidase by immobilization on amino-functionalized bacterial cellulose [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 79: 40-48.