

# 含硼酸基的自组装膜对糖的电化学识别

刘 斌 孙向英\* 徐金瑞

(华侨大学材料科学与工程学院, 泉州 362021)

**摘 要** 利用巯基乙酸(TGA)和 3-氨基-苯硼酸硫酸盐(PBA)反应,设计合成含有苯硼酸基的硫醇化合物 TGA-PBA。组装 TGA-PBA 于金表面,形成自组装膜 TGA-PBA/Au,并用光电子能谱和循环伏安法实验佐证自组装膜的形成。基于自组装膜与单糖强的结合作用(TGA-PBA/Au 与 D-半乳糖结合常数为  $1.9 \times 10^8$  L/mol),有效阻碍电活性标记离子  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  在电极表面的电子转移,建立单糖的高灵敏度的电化学识别方法。

**关键词** 自组装膜,糖,电化学

## 1 引 言

糖类是人体不可缺少的能源和生理活性物质,它参与重要的生命过程,包括对外部信号的传递和识别。建立灵敏和高选择性的糖分子识别方法在生命科学领域中有着重要意义<sup>1,2</sup>。在以往的研究中,利用酶电极电化学测定糖的报道居多<sup>3,4</sup>,而由于一般的基于酶传感体系的糖传感器,其响应信号与酶有关,而酶在整个测定过程中容易失活,影响了传感器的寿命,限制了传感器的实际应用和推广。因此,发展一类新的糖传感器引起人们广泛的兴趣。

近年来,硼酸受体识别体系被应用于对糖的分子识别研究<sup>5~7</sup>,其检测糖的方法主要有荧光分析<sup>8~10</sup>、圆二色法<sup>11</sup>和吸收光谱法<sup>12</sup>等。利用硼酸受体识别体系可以克服酶法的不足,更重要的是无需酶介体。因此,可望替代酶传感而被人们所关注<sup>13</sup>。但目前所报道的方法灵敏度还不够高,且大多在溶液相进行,无法进行膜表面糖的识别。

自组装膜(SAMs)是新近发展起来的一种超薄膜,其中以有机硫化合物在金表面的自组装膜是目前研究得最多和最为深入的一类膜。由于 SAMs 结合了 LB 膜的分子有序性和化学吸附的稳定性,加之其本身的一些特性(如针孔现象、离子门作用等)及较好的生物兼容性,使之作为传感膜具有独特的优势<sup>14</sup>,在生物化学传感器领域有着广泛的应用前景<sup>15</sup>。

本实验以 TGA 和 PBA 为原料,设计合成含有苯硼酸基的硫醇化合物 TGA-PBA,并将其组装在金表面,形成 TGA-PBA/Au 自组装膜。结果表明:该膜与单糖有强的结合作用,有效阻碍电活性标记离子  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  在电极表面的电子转移,据此建立电化学识别单糖的高灵敏度方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

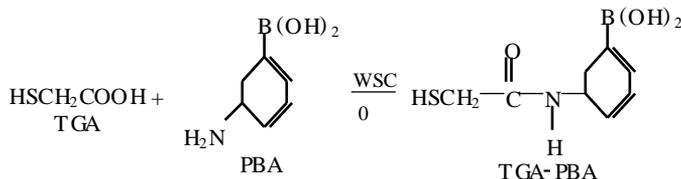
BAS-100 电化学综合分析仪(美国 BAS 公司),PHI Quantum 2000 扫描化学分析电子能谱微探针(美国 PHI 公司)。1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(WSC)(美国 Acros 公司),PBA(日本 Kyoto 公司),TGA。实验用水为 Milli-Q 基础型(美国 Millipore 公司)纯化水系统提供的超纯水。所用试剂均为分析纯以上。

### 2.2 实验方法

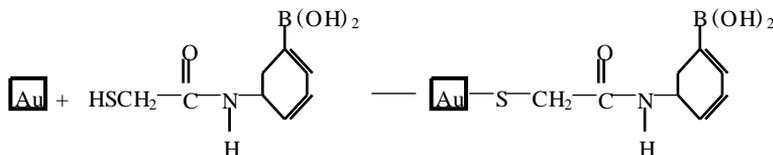
**2.2.1 自组装膜电极 TGA-PBA/Au 的制备** 取一定体积的 TGA,溶解在适量水中,用 0.1mol/L NaOH 调 pH 至 4.8 左右,配成溶液。取一定量 PBA 置于圆底烧瓶里,用水溶解。以 0.1mol/L NaOH 调 pH 至 4.8 左右,加入适量 WSC,在 0℃ 下搅拌 20 min,配成溶液。

将溶液慢慢滴入溶液 中,在冰浴中孵化 1 h,并于 4℃ 下放置过夜。出现灰白色沉淀,将沉淀离

心分离后真空干燥,并用甲醇-水混合溶剂重结晶纯化,即得 TGA-PBA。将样品进行红外光谱分析,主要数据如下:IR (Nexus 470, KBr):  $3389.7\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $3267.75\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1646.69\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ),  $1448.13\text{ cm}^{-1}$  (C-N),  $1607.24\text{ cm}^{-1}$  (C=C),  $705.2\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1586.14\text{ cm}^{-1}$  和  $1500.31\text{ cm}^{-1}$  (C-H, 苯环),  $799.31\text{ cm}^{-1}$  (苯环的间位取代),  $1359.23\text{ cm}^{-1}$  (B-O)。



将金电极依次用  $1.0$ 、 $0.3$  和  $0.05\text{ }\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  粉末抛光成镜面,超声波中清洗后放入  $1\text{ mol/L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液于  $-0.5\sim 1.5\text{ V}$  (vs. SCE,下同) 范围内循环伏安扫描至稳定。将处理好的金电极浸入含有  $10\text{ mmol/L}$  TGA-PBA 的 NaOH 溶液中,室温下浸泡  $12\text{ h}$ ,取出电极,用水冲洗后,氮气吹干,即得 TGA-PBA/Au 自组装膜电极。



**2.2.2 电化学实验** 采用三电极体系,以自组装膜金电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂电极为对电极。利用循环伏安法和微分脉冲伏安法进行电化学实验。实验前用高纯氮气除去溶解氧,实验在氮气保护和室温下进行。

**2.2.3 X射线光电子能谱(XPS)** 对 TGA-PBA/Au 膜进行 XPS 分析。实验时采用单色化 X 射线源,Al 阳极靶,窄扫描时通过能  $46.95\text{ eV}$ ,宽扫描时通过能  $187.85\text{ eV}$ ,样品扫描束斑直径为  $100\text{ }\mu\text{m}$ ,以样品表面污染碳(结合能 B. E. =  $284.8\text{ eV}$ )为荷电位移校正内标。

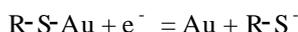
## 3 结果与讨论

### 3.1 TGA-PBA/Au 自组装条件的选择

经选择采用  $0.1\text{ mol/L}$  NaOH 溶解的  $10\text{ mmol/L}$  TGA-PBA 作为组装液。将经过更新的金电极在组装液中分别浸泡  $4$ 、 $8$ 、 $12$  和  $16\text{ h}$  以进行自组装。在  $0.5\text{ mol/L}$  KOH 溶液中进行循环伏安扫描,比较在不同组装时间下,金电极上的硫醇化合物还原脱附峰的大小。结果表明:以浸泡  $12\text{ h}$  的还原峰电流最大,效果较好,但之后再延长浸泡时间则影响不大。因此,本实验采用浸泡时间  $12\text{ h}$ 。

### 3.2 TGA-PBA/Au 自组装膜的电化学特性

在  $0.5\text{ mol/L}$  KOH 底液中,分别以 TGA-PBA/Au 和裸金为工作电极,在  $0\sim -1.2\text{ V}$  范围内进行循环伏安扫描,如图 1 所示。与裸金电极不同的是,TGA-PBA/Au 电极在  $-0.92\text{ V}$  处出现一个明显的还原峰,该峰归属为金电极表面 TGA-PBA 的还原脱附峰,表明 TGA-PBA 已在金表面成功组装。其过程可由下式表示:



由还原峰电流求出 TGA-PBA 在金表面的覆盖度  $= 4.1 \times 10^{-12}\text{ mol/cm}^2$ 。

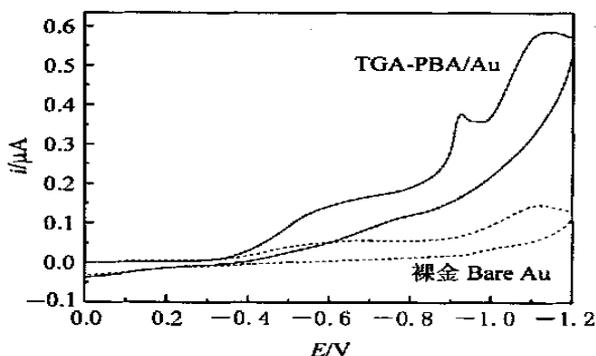


图 1 TGA-PBA/Au 和裸金电极在  $0.5\text{ mol/L}$  KOH 溶液中的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of mercaptoacetic acid-3-aminophenylborate (TGA-PBA)/Au and bare Au electrode in  $0.5\text{ mol/L}$  KOH solution

### 3.3 TGA-PBA/ Au 自组装膜的光电子能谱 XPS

图 2(a)是 TGA-PBA/ Au 膜的光电子能谱。可见,金表面有 C、O、N、S 和 B 元素的存在。由于 B、N、S 含量较低,则能谱信号相对较弱。图 2(b)是 C1s 的能谱图,C1s 在 285.9 eV 峰,比通常 284.5 eV 正移 1.4 eV,可能是 C—N 作用所致;293.5 eV 处的峰,预示着 C=O 双键的存在。TGA-PBA/ Au 膜的 XPS 能谱进一步证实 TGA-PBA 在金表面的组装。

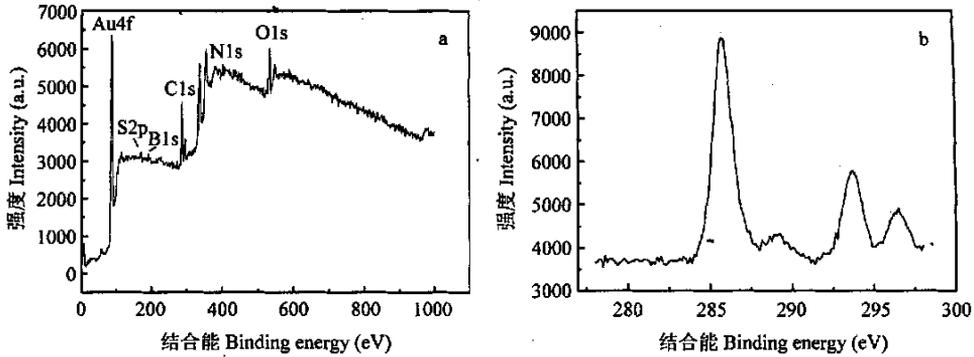


图 2 TGA-PBA/ Au 的 XPS 谱

Fig. 2 X-ray photoelectron spectra of TGA-PBA/ Au

(a) 宽范围(wide view); (b) C1s 能谱(spectrum)。

### 3.4 TGA-PBA/ Au 自组装膜对糖的识别

因  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  具有良好的电化学活性而被用作电活性标记离子。在 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液中, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在裸金电极上呈现可逆性较好的氧化还原峰(氧化还原峰电位差值  $E_p = 67 \text{ mV}$ )。当金表面组装 TGA-PBA 膜后, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在自组装膜 TGA-PBA/ Au 电极上氧化还原的可逆性稍变差( $E_p = 98 \text{ mV}$ )。于此溶液中加入  $6.29 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  D-半乳糖后, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  的电极过程变得不可逆( $E_p = 172 \text{ mV}$ ),峰电流迅速减小(图 3)。

采用微分脉冲伏安法进行分析发现, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  在 TGA-PBA/ Au 电极上的氧化电流绝对值随 D-半乳糖浓度的增加而减小,而  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  在裸金电极上的氧化电流则不随 D-半乳糖的加入而变化。可见, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  的氧化还原电流降低是 D-半乳糖与自组装膜作用所致。随着 D-半乳糖浓度的继续增加, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  的氧化电流变化趋于平缓,如图 4 所示。

对  $i-[D\text{-galactose}]$  曲线按照方程<sup>16</sup> :

$$i = (i_0 + i_{\max} \times K \times [D\text{-galactose}]) / (1 + K \times [D\text{-galactose}])$$

进行非线性拟合,求算 TGA-PBA/ Au 与 D-半乳糖结合常数  $K$ 。方程中  $[D\text{-galactose}]$  表示 D-半乳糖的浓度; $i_0$  表示加入 D-半乳糖前  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  在电极上氧化电流; $i_{\max}$  表示加入最大浓度 D-半乳糖后  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  氧化电流极大值( $|i_{\max}|$  极小)( $i_{\max}$  和  $K$  均为不定值); $i$  表示加入特定浓度 D-半乳糖时  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  的氧化电流。拟合曲线得  $K$  为  $1.94 \times 10^8 \text{ L/mol}$  (相关系数为 0.99),表明采用自组装膜电极可极大提高识别的灵敏度。

进一步实验发现,在含有  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  的  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液中,分别加入 D-果糖、D-葡萄糖及 D-甘露糖, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  氧化电流均降低,但以加入 D-半乳糖引起电流降低的幅度最大。如图 5 所示,随单糖浓度增加, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  氧化电流的降低值( $i_0 - i$ )增大。说明 TGA-PBA/ Au 自组装膜对单糖具有识别作用。而自组装膜对 D-半乳糖较其他糖有更灵敏的电化学响应,可能与 D-半乳糖的空间结构及电荷分布等因素有关。

溶液中常见的离子如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Cl}^-$  等均不干扰 D-半乳糖测定。而超过 D-半乳糖量 50 倍的 D-甘露糖、D-果糖、D-葡萄糖会对 D-半乳糖的测定产生干扰。

### 3.5 TGA-PBA/ Au 自组装膜对糖的识别机理

分析实验结果认为,TGA-PBA 在金电极表面形成自组装膜,该自组装膜具有离子通道性能,其对

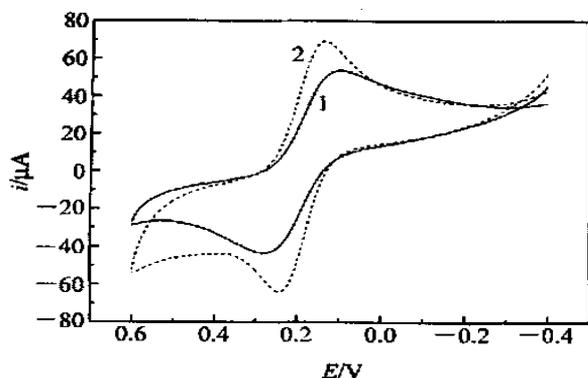


图 3  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在 TGA-PBA/Au 自组装膜电极的循环伏安图

Fig. 3 Cyclic voltammograms of  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  at TGA-PBA/Au electrode

$v: 100 \text{ mV/s}$ .  $C_{\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}} = 10 \text{ mmol/L}$ ,  $D$ -半乳糖 ( $D$ -galactose):  
1.  $0.0 \text{ mol/L}$ , 2.  $6.29 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ .

糖的作用原理如图 6 所示。因 TGA-PBA 脂肪链较短,在金表面此自组装膜允许  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  通过,在金电极表面发生氧化还原反应,即离子通道属开启状态,因而观测到  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  准可逆的氧化还原峰。而加入分析物后, TGA-PBA/Au 膜中硼酸基与糖作用形成硼酸酯阴离子,排斥  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  在电极上电子传递,离子通道受阻甚至关闭。因而电极反应的可逆性变差,且峰电流随糖浓度的增加而下降。因此,以  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  为标记离子,利用 SAMs 中硼酸基与糖的作用,可建立对糖类识别的离子通道传感体系。

## 4 结 论

设计合成含苯硼酸基的硫醇衍生物,并在金表面形成自组装膜。以  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  为标记离子,利用自组装膜中硼酸基与糖的结合作用,实现微量单糖的电化学识别,为单糖的识别提供一高灵敏度的方法。

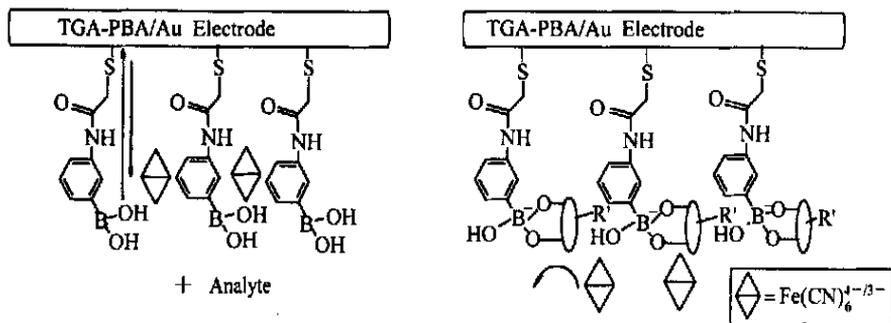


图 6 基于 TGA-PBA/Au 自组装膜的糖类离子通道传感器作用示意图

Fig. 6 Working principle of the ion-channel sensor for saccharides based on TGA-PBA/Au self-assembled monolayers (SAMs)

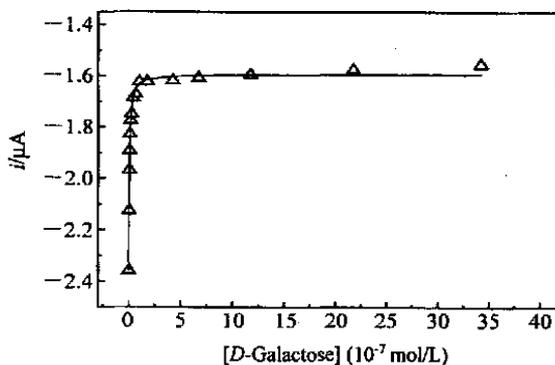


图 4  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  的氧化电流与  $D$ -半乳糖浓度之间的关系曲线

Fig. 4 Profile of oxidation current of  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  versus [ $D$ -galactose]

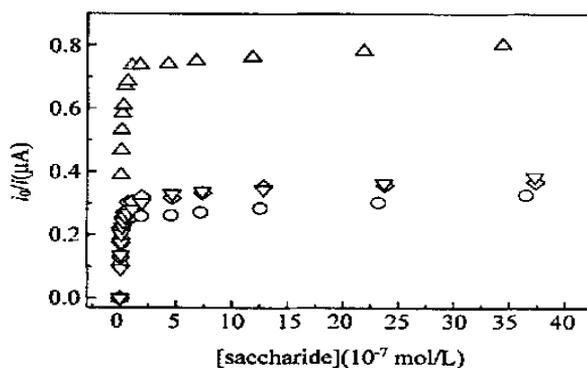


图 5  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  氧化峰电流的降低值与糖浓度之间关系

Fig. 5 Profile of  $I_p$  decreasing value of  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  versus different concentration of saccharide

( $\Delta$ )  $D$ -半乳糖 ( $D$ -galactose), ( $\nabla$ )  $D$ -葡萄糖 ( $D$ -glucose), ( $\circ$ )  $D$ -甘露糖 ( $D$ -mannose), ( $\diamond$ )  $D$ -果糖 ( $D$ -fructose)。

实验还表明,将 TGA-PBA/Au 自组装膜修饰电极浸泡在含有糖链残基的聚合物,如壳聚糖、聚乙烯醇溶液中,随着浸泡时间的增加, $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  在 TGA-PBA/Au 自组装膜表面的氧化还原活性降低,表明大分子中糖链残基亦能与 TGA-PBA/Au 自组装膜中硼酸基发生作用,这为含有糖链残基的生物分子的研究进行了有益的尝试。

## References

- 1 Davis A P, Warehem R S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38:2978 ~ 2996
- 2 Wilson G S, Hu Y. *Chem. Rev.*, **2000**, 100: 2693 ~ 2704
- 3 Gass A E G, Davis G, Francis G D, Hill H A O, Aston W J, Higgins I J, Plotkin E V, Scott L D L, Turner A P F. *Anal. Chem.*, **1984**, 56:667 ~ 671
- 4 Schuhmann W, Lehn C, Schmidt H L. *Sensor Actuat B-Chem.*, **1992**, 7: 393 ~ 398
- 5 James T D, Linnane P, Shinkai S. *Chem. Commun.*, **1996**:281 ~ 287
- 6 James T D, Samankumara K R A S, Shinkai S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, 35: 1910 ~ 1922
- 7 James T D, Shinkai S, Host-Guest Chem. *Topics in Current Chem.*, **2002**, 218: 159 ~ 200
- 8 James T D, Samankumara K R A S, Shinkai S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**: 477 ~ 478
- 9 Bielecki M, Eggert H, Norrild J C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1999**: 449 ~ 455
- 10 Arimori S, Bosch L I, Ward C J. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42: 4553 ~ 4555
- 11 Lorand J P, Edwards J D. *J. Org. Chem.*, **1959**, 24: 769 ~ 774
- 12 Ward C J, Patel P, Ashton P R. *Chem. Commun.*, **2000**: 229 ~ 230
- 13 Eiichi S, Michael S F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124: 12486 ~ 12493
- 14 Ulman A, Kang J F, Shnidman Y, Liao S, Jordan R, Choi G Y, Zaccaro J, Myerson A S, Rafailovich M, Sokolov J, Fleischer C. *Rev. Mol. Biotech.*, **2000**, 74: 175 ~ 188
- 15 Chaki N K, Vijayamohan K. *Biosensors & Bioelectronics*, **2002**, 17:1 ~ 12
- 16 Cooper C R, James T D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2000**: 963 ~ 969

## Electrochemical Recognition for Saccharide by Boronic Acid Carrying Self-Assembled Monolayer

Liu Bin, Sun Xiangying\*, Xu Jinrui

(College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021)

**Abstract** Thiol compound (TGA-PBA) that carried boronic acid groups at its ends was prepared by coupling of 3-amino-phenylboronic acid (PBA) with mercaptoacetic acid (TGA). The compound obtained formed a self-assembled monolayer on gold electrode as proved by X-ray photoelectron spectra (XPS) and cyclic voltammetry (CV). The self-assembled monolayer TGA-PBA/Au showed the strong binding affinity toward saccharide with the binding constant of  $1.94 \times 10^8 \text{ L/mol}$  to D-galactose, and hindered the electron transfer of  $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  marker on the electrode surface. A high sensitive electrochemical sensor for saccharide was developed based on this principle.

**Keywords** Self-assembled monolayer, saccharide, electrochemistry

(Received 30 July 2003; accepted 29 December 2003)