

## The Study of Phenol Pollution Water Detection Based on Nanostructure ZnO\*

GU Baoxiang<sup>1\*</sup>, WANG Xiyong<sup>2</sup>, QIAO Mingxiao<sup>3</sup>, XU Chunxiang<sup>4\*</sup>, ZHANG Jiwei<sup>1</sup>, CAO Zhilin<sup>1</sup>

(1. Resources and Environment Institute, Henan Institute of Engineering, Zhengzhou 451191, China;

2. Library of Henan Institute of Engineering, Zhengzhou 451191, China;

3. Zhengzhou Technical College, Zhengzhou 450121, China; 4. State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210018, China)

**Abstract:** In present work, ZnO nanorods with uniform size were fabricated through vapor transport method. Based on the biocompatibility of ZnO nano-material, a electrochemistry biosensor for phenol pollution detection is constructed through modification of the tyrosinase on ZnO nanorods surface. The fabricated condition for ZnO nanorods and the influence factor of biosensor in detection is discussed. The response of biosensor for phenol and catechol detection is quickly and sensitive. The linearity range of detection for phenol and catechol is respectively 0.02 mmol/L ~ 0.12 mmol/L and 0.01 mmol/L ~ 0.4 mmol/L, sensitivity is respectively 0.83  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$  and 2.14  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$ , detection limit is respectively 15.57  $\mu\text{mol/L}$  and 4  $\mu\text{mol/L}$ . That performed a wider prospect for the development and application of ZnO nanostructure biosensor.

**Key words:** biosensor; detection for phenolic compounds pollution; electrochemistry; ZnO nanostructure

EEACC: 7230J; 7230L

doi: 10.3969/j.issn.1004-1699.2014.04.001

## 基于纳米结构氧化锌的水体酚类污染监测研究\*

谷保祥<sup>1\*</sup>, 王喜英<sup>2</sup>, 乔明晓<sup>3</sup>, 徐春祥<sup>4\*</sup>, 张继伟<sup>1</sup>, 曹志林<sup>1</sup>

(1. 河南工程学院资源与环境学院, 郑州 451191; 2. 河南工程学院图书馆, 郑州 451191;

3. 郑州职业技术学院, 郑州 450121; 4. 东南大学生物电子国家重点实验室, 南京 210018)

**摘要:** 利用气相传输法制备了形貌均一、尺寸适当的纳米 ZnO 棒, 并利用其良好的生物相容性在其表面组装了酪氨酸酶进行酚类物质水体污染的电化学检测传感研究。讨论了 ZnO 纳米结构制备的条件优化和用于传感的响应结果与影响因素。该传感器对邻苯二酚和苯酚具有快速的安培响应。线性范围分别为 0.02 mmol/L ~ 0.12 mmol/L 和 0.01 mmol/L ~ 0.4 mmol/L, 灵敏度分别为 0.83  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$  和 2.14  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$ , 检测限分别为 15.57  $\mu\text{mol/L}$  和 4  $\mu\text{mol/L}$ , 为纳米结构 ZnO 在生物化学传感方面的应用展示了广阔的应用前景。

**关键词:** 生物传感器; 苯酚污染监测; 电化学; 纳米 ZnO

中图分类号: X502

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2014)04-0421-05

ZnO 是一种 II B-VI A 族直接宽带隙(带隙 3.37 eV)半导体材料, 由于奇特的光电性能和表面性能, 近年来得到了广泛的研究<sup>[1]</sup>, 广泛用于光电器件<sup>[2-3]</sup>、生物化学传感器<sup>[4-5]</sup>、太阳能电池方面<sup>[6]</sup>。同时, ZnO 纳米材料特具有非常大的比表面积、良好的电子传导能力、无毒、良好的生物相容性、环境友好等特性, 这更使其在生物传感器上的应用具有了得天独厚的优势<sup>[7]</sup>。

目前合成 ZnO 纳米材料的方法很多, 包括气相

传输法<sup>[8]</sup>、金属有机气相外延生长<sup>[9]</sup>、水热合成法<sup>[10]</sup>和磁控溅射法<sup>[11]</sup>等等。其中气相传输法和水热法是两种广泛使用的方法, 气相传输法在不同条件下可合成多种形貌的纳米结构氧化锌。

酚类属于高毒物质<sup>[12]</sup>, 随着工业的发展和环境问题的日益突出, 酚类物质的污染也逐渐成为水源污染的主要危害和特征指标。目前, 测定挥发酚的标准方法为 4-氨基安替比林分光光度法。但方法繁杂, 需要蒸馏, 分析速度慢, 且产生二次污染<sup>[13]</sup>。

**项目来源:** 河南省教育厅科技攻关重点项目(112102310554); 河南工程学院博士基金项目(D2012001); 河南工程学院创新团队建设计划项目(CXTD2014005); 河南省高校煤矿环境地质灾害防治工程技术研究中心项目(1205)

**收稿日期:** 2013-10-15 **修改日期:** 2014-03-21

因此,人们开始重点关注利用电化学方法测定酚类化合物,使用电流型酪氨酸酶(Tyr)电极来测水中酚类污染物<sup>[14]</sup>,主要是基于 Tyr 可催化氧化苯酚为邻苯二醌,邻苯二醌在电极表面还原,产生还原电流可被用于检测的原理<sup>[15]</sup>。此法检测苯酚具有灵敏、准确、快速的特点。对于其他酚类物质如邻苯二酚、对氯苯酚、邻甲酚等都有良好的响应。

本文将氧化锌纳米棒(ZnO-NR)和 Tyr 在电化学传感器领域中的特点结合起来,利用 ZnO-NR 的等电点与 Tyr 等电点的差异,将 Tyr 通过简单的静电吸附的原理组装在 ZnO-NR 表面,利用 Tyr 对苯酚催化的特性构建电流型的生物化学传感器对苯酚进行检测,实现了苯酚检测的简单、快速、准确的目标。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

锌粉(上海申井化工有限公司,分析纯),Tyr (Tyrosinase, EC. 1.14.18.1,活性 $\geq 1000$  unit/mg,冻干粉(Catalog No. T.3824),Nafion 溶液(10% (w/v))购自 Sigmaaldrich 公司,使用前未经进一步纯化。苯酚, pH 5.0 ~ pH 9.0 磷酸盐缓冲溶液由 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  储备液混合而成。实验用水均为二次石英亚沸蒸馏水。

电化学测量采用上海辰华仪器公司出品的电化学工作站:CHI660C。实验过程中采用自制的 5 mL 电解池,应用传统的三电极系统,以表面组装了 Tyr 的 ZnO-NR 修饰电极、饱和甘汞电极(SCE)和铂丝电极分别作为工作电极、参比电极和辅助电极。纳米 Tyr/ZnO 修饰电极对底物的电催化响应采用计时安培法进行测量,实验控制电位在  $-0.2$  V (vs. SCE),于 5 mL 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 缓冲溶液中,在磁力搅拌下,连续加入 20  $\mu\text{L}$  0.01 mmol/L 的苯酚溶液,记录响应电流-时间曲线。

纳米 ZnO 修饰膜及 ZnO/Tyr 修饰膜的扫描电镜图是在 JSM-5610LV 型扫描电子显微镜(JEOL, 日本)上得到的,加速电压为 15 kV。

### 1.2 ZnO-NR 的制备

采用气相传输法在硅片上制备 ZnO-NR<sup>[16]</sup>。取长 30 cm 直径 4 cm 一端封闭的石英管,将盛有 0.1 g Zn 粉的小石英舟置于石英管封闭端,在石英管开口端放置一片 1 cm $\times$ 10 cm 的硅片。将石英管伸进管式炉中,使封闭端处在管式炉的高温区,开口端在低温区,按 150/10 的氮氧比通入载气,抽真空,使管式炉高温区加热到 750  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 30 min。停止加热,打开真空阀,使炉内压力恢复至常压,冷却至室温,

取出石英管中的硅片,硅片上即附着一层白色的 ZnO-NR。反应示意图如图 1 所示。

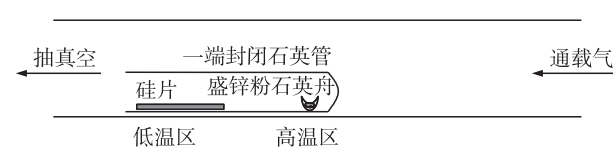


图 1 气相传输法制备 ZnO-NR 的示意图

### 1.3 Tyr/ZnO 修饰电极的制备

将玻碳电极分别在撒有 1.0  $\mu\text{m}$  和 0.3  $\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  浆的麂皮上抛光成镜面,并依次用水和丙酮超声清洗,用氮气吹干待用。

将用气相传输法合成的 ZnO-NR 从硅片上刮下后,用二次蒸馏水超声清洗,然后加入一定量的二次蒸馏水至浓度约为 2 mg/mL,该悬浮液作为 ZnO-NR 储备液,放置干燥器中待用。准确称取一定量 Tyr 溶于蒸馏水制成 2 mg/mL 储备液置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

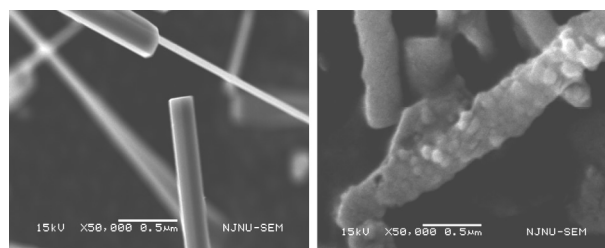
将上述 ZnO-NR 悬浮液与 Tyr 溶液等体积混合,充分搅拌后放入冰箱中静置 10 h。制备纳米 Tyr/ZnO 电极(ZnO/Tyr/GCE)时,将上述 Tyr 与 ZnO-NR 混合液充分悬浮后取 10  $\mu\text{L}$  悬浊液滴至已抛光好的玻碳电极表面。控制实验取 10  $\mu\text{L}$  ZnO-NR 悬浮液或 Tyr 溶液滴在已抛光好的玻碳电极表面,分别制成 ZnO-NR 修饰电极(ZnO/GCE)和 Tyr 修饰电极(Tyr/GCE)。将制得的 ZnO/Tyr/GCE、ZnO/GCE 和 Tyr/GCE 电极置于干燥器内,在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中干燥 10 h。当修饰层完全干燥后,再在电极表面上滴加 10  $\mu\text{L}$  2.5% 的 Nafion 溶液,静置并待完全干燥后用水清洗并进行电化学测量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Tyr/ZnO-NR 修饰电极的制备与表征

ZnO-NR 等电点为 9.5,在中性 pH 溶液中带正电,而 Tyr 的等电点为 4.7 ~ 5.0<sup>[17]</sup>,中性溶液中带负电。因此,由于静电吸引作用,Tyr 会自发的吸附在纳米 ZnO 表面,吸附 Tyr 前后的 ZnO-NRSEM 照片如图 2 所示。

从图 2 中可以看出,未修饰过的 ZnO-NR 表



(a)ZnO-NR (b)吸附了Tyr的ZnO-NR

图 2 组装 Tyr 前后的 ZnO-NR 形貌照片

面光滑平整,而吸附有 Tyr 的 ZnO-NR 表面出现了一些胞点,说明 Tyr 成功组装到了 ZnO-NR 上,间接证明了低等电点的 Tyr 能够被高等电点的 ZnO-NR 吸附。

## 2.2 Tyr/ZnONR 的电催化性质

### 2.2.1 循环伏安方法

当 Tyr 吸附在 ZnO-NR 上构成 Tyr/ZnO 修饰电极时,因 ZnO-NR 良好的生物相容性,所以吸附态的 Tyr 能很好地保持其生物活性,因此对酚类化合物的氧化具有很高的电催化活性。图 3 是 Tyr/ZnO 修饰电极在含有溶解氧气的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图。

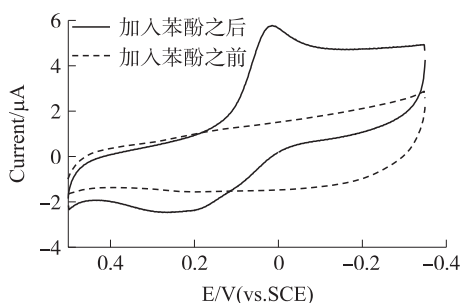


图 3 Tyr/ZnO-NR 修饰电极在 PBS 缓冲溶液中的循环伏安图

图 3 中可以看出,向缓冲溶液中加入苯酚时,从 0.2V 起还原电流急剧增加。这是由于苯酚在电极上吸附的 Tyr 催化作用下与缓冲溶液中的溶解氧反应生成邻苯二酚并进一步氧化生成邻苯二醌,导致还原峰电流增加<sup>[18]</sup>。由于二苯醌不稳定,在溶液中很容易发生聚合或其他反应被除去。电极上的反应过程示意如图 4 所示。

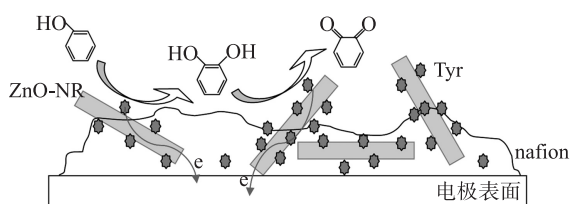
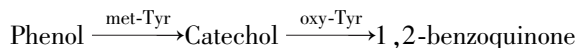


图 4 电极表面反应示意图

在图 4 中,苯酚在溶液中和电极上的 Tyr 作用,被催化为苯二酚,苯二酚继续与 Tyr 反应,被催化为苯二醌,过程中电子由 Tyr 传递给 ZnO-NR,由于 ZnO-NR 优良的导电性能,把电子传递给电极,产生了电流效应。反应的过程如下所示:



### 2.2.2 安培方法(时间电流响应曲线方法)

还原电流和苯酚浓度之间的关系由安培实验进行验证,安培实验是在不断搅拌情况下,应用电位为

-0.2 V,在 5 mL pH7.0 的 PBS 溶液中,连续加入 10  $\mu\text{L}$  苯酚,记录电流时间曲线见图 5(a) curve1。用邻苯二酚代替苯酚,亦可观察到该电极对邻苯二酚的安培响应,并具有比苯酚更快速的响应和更大的响应电流(图 5(a) curve2)。该传感器对两种酚的电化学响应,分别在 300 s 和 200 s 达到 95% 的稳态电流。

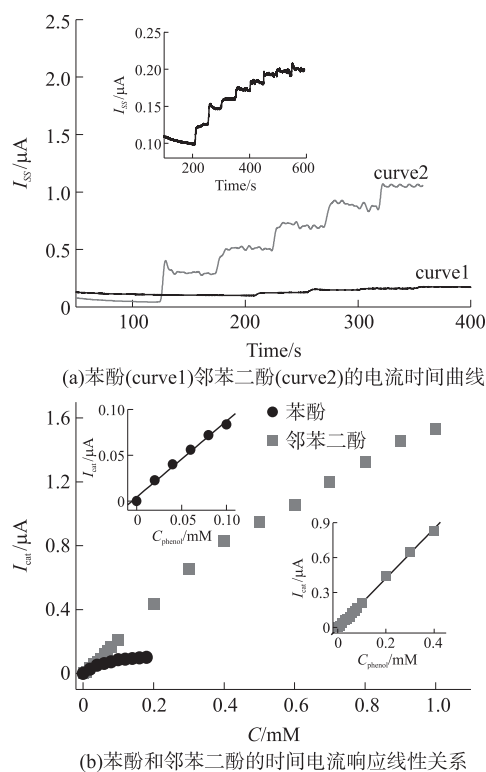


图 5

从图 5(b) 可看出,在 0.02 mmol/L ~ 0.18 mmol/L 和 0.01 mmol/L ~ 1 mmol/L 浓度范围内,该传感器对邻苯二酚和苯酚具有快速的安培响应。如图 5(b)。线性范围分别为 0.02 mmol/L ~ 0.12 mmol/L 和 0.01 mmol/L ~ 0.4 mmol/L,灵敏度分别为 0.83  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$  和 2.14  $\mu\text{A}/(\text{mmol/L})$ ,检测限分别为 15.57  $\mu\text{mol/L}$  和 4  $\mu\text{mol/L}$  (检测限是指三倍噪音的浓度)。其中对苯酚检测的线性范围大于 Adriana Faria Azevedo 等在 2011 年用方波伏安法对苯酚的检测线性范围<sup>[19]</sup> 40  $\mu\text{mol/L}$  ~ 250  $\mu\text{mol/L}$ ,而灵敏度相当,说明这种方法对苯酚的检测时响应灵敏,适应范围宽,耐浓度变化的冲击。

当浓度分别大于 0.12 mmol/L 和 4 mmol/L 时,曲线趋于水平,说明由于催化作用而产生的电流信号趋于饱和,这与酶促反应的米氏性质一致。与酶的亲和性有关的米氏常数 ( $K_{\text{app}}^{\text{M}}$ ),可根据 Lineweaver-Burk<sup>[20]</sup> 方程求出,对苯酚和邻苯二酚其  $K_{\text{app}}^{\text{M}}$  分别为 0.24 mmol/L 和 1.75 mmol/L。该数值

与由自组装技术构建的电流型 Tyr 传感器 ( $K_{app}^M = 0.13 \text{ mmol/L}$ )<sup>[21]</sup> 以及聚乙烯膜修饰 Tyr 传感器 ( $K_{app}^M = 0.11 \text{ mmol/L}$ )<sup>[22]</sup> 数值相近,说明 Tyr 在该修饰电极上对底物有极大的亲和性。

### 2.2.3 实际水样测试

为了验证本传感器对苯酚浓度的检测效果,研究人员分别取了郑州市某化工有限公司酚醛树脂车间废水水样和出厂废水水样(废水中含有苯酚),进行苯酚浓度传感检测,检测结果如图6所示。

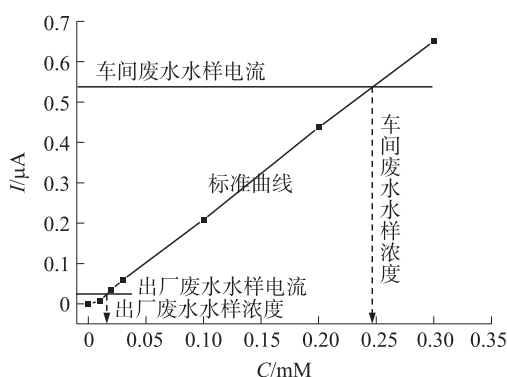


图6 实际水样检测结果

图6中,黑色方形结点拆线为用本传感器测试苯酚标准溶液所得的标准曲线,绿色水平线为检测车间废水水样所得电流响应信号强度,垂直绿色虚线箭头指向横轴的一点即是车间废水水样的苯酚浓度,由图可知约为  $0.24 \text{ mmol/L}$ ,或  $22.5 \text{ mg/L}$ 。同样,红色水平线为出厂废水水样检测时所得电流响应信号强度,其对应的苯酚浓度约为  $0.015 \text{ mmol/L}$  或  $1.4 \text{ mg/L}$ 。

### 2.2.4 干扰实验

干扰实验分别用苯和乙醇进行,实验中发现无论用苯和乙醇,都不能使传感器产生明显响应,其电流响应曲线近似水平直线。由酪氨酸酶催化的底物要求可知,此传感器对酚类物质的传感响应是有着特异性的。

### 2.2.5 修饰电极的稳定性和重复性

该传感器不用时可保存在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  PBS 溶液中或干燥器中。一星期后可保留 87.3% 的原始催化活性。连续使用两天(各 8 h),可保持 81.2% 的催化活性,由此可见该传感器有很好的稳定性。采用同种方法分别制备三支电极,在  $0.1 \text{ mmol/L}$  的苯酚溶液中稳态电流响应误差为 91.8%,表现出很好的制备重复性。

## 3 结论

ZnO-NR 能吸附负电性的 Tyr,在 Nafion 形成的

稳定均一分布的多孔性网状膜固定在电极表面时,表现出比纯 ZnO-NR 层更优异的电子传递性质。吸附在 ZnO-NR 上的 Tyr 能有效保持其生物活性,对酚类化合物具有优异的催化性能并反应为电化学响应,实验条件下对苯酚和邻苯二酚检测的线性范围分别为  $0.02 \text{ mmol/L} \sim 0.12 \text{ mmol/L}$  和  $0.01 \text{ mmol/L} \sim 0.4 \text{ mmol/L}$ ,灵敏度分别为  $0.83 \text{ } \mu\text{A}/(\text{mmol/L})$  和  $2.14 \text{ } \mu\text{A}/(\text{mmol/L})$ ,检测限分别为  $15.57 \text{ } \mu\text{mol/L}$  和  $4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (检测限是指三倍噪音的浓度)。为酚类化合物的测定和纳米生物传感器的构建提供了新的途径。

### 参考文献:

- [1] Saleem G R, Huang L, Wahyu Setyawan, et al. Large-Scale Assembly of Carbon Nanotubes[J]. Nature,2003,425:36-37.
- [2] Xu X Y, Xu C X, Dai J, et al. Evolutions of Defects and Blue-Green Emissions in ZnO Microwhiskers Fabricated by Vapor-Phase Transport[J]. Journal of Physics and Chemistry of Solids,2012,73(7):858-862.
- [3] 吴跃波,杨启耀,雷声.退火对 ZnO 薄膜特性的影响与紫外探测器的研制[J].传感技术学报,2012,25(5):585-588.
- [4] Lei Yang; Liu Xi; Yan Xiaoqin. Multicenter Uric Acid Biosensor Based on Tetrapod-Shaped ZnO Nanostructures [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology,2012,12(1):513-518.
- [5] 周小岩,王文新,张晶.氧化锌纳米棒/单晶硅的酒精传感器研究[J].传感技术学报.2010,23(10):1390-1393.
- [6] Wang P, Wang L D, Li B, et al. Improved Voltage and Fill Factor by Using Zinc Oxide Thin Film as a Barrier Layer in Dye-Sensitized Solar Cells[J]. Chin Phys Lett,2005,22:2708-2711.
- [7] Gu B X, Xu C X, Yang C, et al. ZnO Quantum Dot Labeled Immunosensor for Carbohydrate Antigen 19-9[J]. Biosens Bioelectron, 2011,26(5):2720-2723.
- [8] Xu C X, Sun X W, Chen B J, et al. Aligned ZnO Nanofibre Array Prepared by Vapor Transport in Air[J]. Chin Phys Lett,2003,20:1319-1322.
- [9] Li J Y, Chen X L, Wei Z F, et al. Morphologies of ZnO Nanorods [J]. Chin Phys Lett,2001,18:1527-1531.
- [10] Wen J G, Lao J Y, Wang D Z, et al. Self-Assembly of Semiconducting Oxide Nanowires, Nanorods, and Nanoribbons [J]. Chem Phys Lett,2003,372:717-722.
- [11] 陈颖慧,高杨,席仕伟.硅基底和金刚石基底上沉积 ZnO 薄膜工艺研究[J].传感技术学报,2012,25(1):25-28.
- [12] Rogers K R, Becker J Y, Wang J, et al. Determination of Phenols in Environmentally Relevant Matrices with the Use of Liquid Chromatography with an Enzyme Electrode Detector[J]. Field Anal Chem Technol,1999(3):161-169.
- [13] 何亚明,张维成,王志茹.测酚用的酪氨酸酶媒体玻碳电极的研制[J].分析测试学报,1999,18:76-78.
- [14] Nistor C, Emnéus J, Gorton L, et al. Improved Stability and Altered Selectivity of Tyrosinase Based Graphite Electrodes for Detection of Phenolic Compounds[J]. Anal Chim Acta,1999,387:309-326.

- [15] Rajesh, Kaneto K. A New Tyrosinase Biosensor Based on Covalent Immobilization of Enzyme on N-(3-aminopropyl) Pyrrole Polymer Film[J]. *Curr Appl Phys*, 2005(5):178-183.
- [16] Xu C X, Sun X W, Chen B J, et al. Nanostructural Zinc Oxide and Its Electrical and Optical Properties[J]. *J Appl Phys*, 2004, 95: 661-666.
- [17] Albuquerque Y D T, Ferreira L F, Amperometric Biosensing of Carbamate and Organophosphate Pesticides Utilizing Screen-Printed Tyrosinase-Modified Electrodes [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 596:210-221.
- [18] Liu S Q, Yu J H, Ju H X. Renewable Phenol Biosensor Based on a Tyrosinase-Colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode[J]. *J Electroanal Chem*, 2003, 540:61-67.
- [19] Adriana Faria Azevedo F, Souza A, Hammer P. The Influence of Hydrogen Plasma Pre-Treatment on the Structure of BDND Electrode Surface Applied for Phenol Detection [J]. *J Nanopart Res*, 2011, 13:6133-6139.
- [20] Kamin R A, Willson G S. Rotating Ring-Disk Enzyme Electrode for Biocatalysis Kinetic Studies and Characterization of the Immobilized Enzyme Layer [J]. *Anal Chem*, 1980, 52: 1198 - 1205.
- [21] Dempsey E, Diamond D, Collier A. Development of a Biosensor for Endocrine Disrupting Compounds Based on Tyrosinase Entrapped within a Poly(Thionine) Film[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20:367-377.
- [22] Wang B Q, Zhang J Z, Cheng G J, et al. Amperometric Biosensor for Inert Organic Solvents Based on a Sol-Gel Hybrid Material[J]. *Chem Commun*, 2000, 2123-2124.



谷保祥(1971-),男,河南尉氏人,博士,讲师,主要研究方向为纳米材料生物化学与免疫传感器原理与应用研究,gbxokey@126.com;



徐春祥(1965-),男,江苏扬州人,教授,博士生导师,主要从事光电功能材料与器件研究,xcxseu@seu.edu.cn。