

基于钌配合物荧光猝灭氧二次传感 BOD 检测的研究

林玲¹, 肖来龙¹, 辛玲玲¹, 赵丽¹, 陈曦^{1,2*}

1. 厦门大学化学化工学院分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要 考察了利用溶胶-凝胶基质制备的氧荧光传感膜的光谱性质, 实验结果表明, 溶胶-凝胶基质与 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 配合物的基态之间不存在较强的相互作用, 具有较好的透光性。将氧光化学传感器作为二次传感, 制备了响应良好的光化学 BOD 微生物传感器, 研究结果表明这种传感器对于较低浓度的 BOD 含量有着良好的线性范围, 并且其响应活性保持良好, 具有较长的使用寿命和良好的稳定性。

关键词 溶解氧; BOD 传感; 钌配合物; 光纤光化学

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)01-0015-04

引言

随着经济的发展, 人类的各种活动产生了大量的有机和无机污染物, 这些物质的无序排放加剧了对环境的污染与破坏。氧浓度的检测在环境、医疗、工业和卫生等领域都有着十分重要的意义。随着光纤技术的兴起和发展, 发展光纤光化学氧传感器越来越得到人们的重视^[1]。同传统的安培检测装置相比, 光纤光化学氧传感器基于荧光或磷光猝灭原理构建, 具有响应快、检测过程不耗氧和易微型化等优点, 适合于环境监测和过程控制。1962年, Clark^[2]等人首次制作了酶电极用于测定葡萄糖, 生物传感器因具有高选择性、高灵敏度、较好的稳定性、低成本、能在复杂的体系中进行快速、在线、连续监测等优点, 在环境保护领域有广阔的应用前景。本文研究了以溶胶-凝胶为基质的氧敏感膜的光谱性质, 并将微生物膜固定在光纤探头上, 通过氧敏感膜作为二次传感, 研制了基于氧光导检测的 BOD 微生物传感器。

1 实验部分

1.1 化学试剂及主要仪器

实验所用分析纯硅氧偶联试剂正硅酸甲酯 (TMOS) 购自中国医药(基团)上海试剂化学公司, 二甲基二甲氧基硅烷 (DiMe-DMOS) 购自 Fluka (Switzerland), 4,7-二苯基邻菲咯啉钌 $[\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2]$ 由香港理工大学应用生物与化学科技系合成, 聚乙烯醇购自 Aldrich (USA), 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.2) 用 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (均为分析纯) 配制。BOD 标准溶液: 称取

葡萄糖和谷氨酸(均为分析纯)各 0.075 0 g, 用磷酸缓冲溶液定容至 100 mL (GGA 溶液), 其 BOD 值为 $(1\ 000 \pm 185) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其他试剂均为分析纯。实验用水为石英亚沸蒸馏水。

溶液和 sol-gel 膜内 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 的荧光光谱在 F-4500 荧光光度计 (Hitachi Inc., Japan) 上检测。GD-1 型微光测量仪 (西安瑞科电子设备有限公司), 自制样品池, R928 光电倍增管 (Hamamatsu, Japan), Echrom98 色谱数据处理工作站 (大连依利特科学仪器有限公司), WH-2 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂)。

1.2 实验步骤

敏感膜的制备: 按一定体积量取 TMOS 和 DiMe-DMOS 于 5 mL 平底反应瓶中, 加入饱和的 $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ 的 THF 溶液, 旋涡振荡 1 min 后, 再逐滴振荡加入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 60 °C 下敞口磁力搅拌水浴加热 2 h。取所得凝胶液于经乙醇和硝酸预处理过的玻片上均匀涂布成膜, 烘箱中干燥 18 h 备用^[3]。**微生物膜的制备:** 量取一定体积的 TMOS 与 DiMe-DMOS 于 5 mL 平底反应瓶中, 振荡后加入一定体积 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 水浴磁力搅拌 1 h。取所得凝胶液与 5 wt% PVA 水溶液按一定比例混合, 并加入一定体积的菌液。充分振荡均匀, 在氧传感膜表面均匀涂布成膜, 并于室温通风处干燥。使用前放入 GGA 溶液储存^[4]。

2 结果与讨论

2.1 氧传感膜的光谱性质

当氧传感膜不含 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 荧光探针时, 溶胶-凝胶基质从近紫外至近红外整个光区内呈透明, 其吸收谱图见

收稿日期: 2004-10-16, 修订日期: 2005-03-02

基金项目: 福建省科技计划项目(2004 Y012)资助

作者简介: 林玲, 女, 1980年生, 厦门大学化学化工学院硕士研究生 *通讯联系人

图 1。在 330 ~ 800 nm 波长范围内测得其吸光度都小于 0.03，根据 $A = -\lg T$ ，得到溶胶-凝胶基质的透光率 $T > 93\%$ ，说明在实验条件下制得的氧传感空白膜具有良好的透光度，而通常所用的聚合物基质在近紫外区常有较强的吸收。实验同时比较了 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 包埋于溶胶-凝胶基质中和溶解在四氢呋喃溶液中的吸收光谱，如图 2 所示，虽然荧光探针被包埋于溶胶-凝胶基质中，但其吸收光谱同在溶液状态下并无多大差别，这表明溶胶-凝胶基质与 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 配合物的基态之间不存在较强的相互作用。

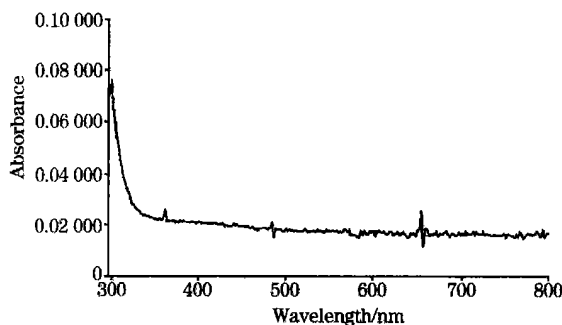


Fig. 1 The absorption spectrum of ormosil matrix without $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ complex

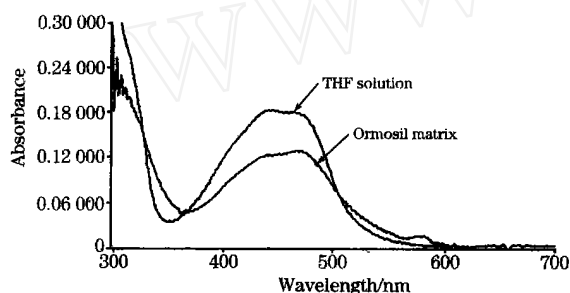


Fig. 2 Comparison of absorption spectra of $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ immobilized in the ormosil matrix and that dissolved in THF solution

图 3 显示了氧传感膜中 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 配合物的荧光激发光谱和发射光谱，并与其在四氢呋喃中的荧光谱图进行比较的结果可以看出： $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 在溶胶-凝胶基质中与四氢呋喃溶液中荧光激发光谱基本无差别，这一点由上面两者的吸收光谱相一致可以得到解释。钌配合物的最大激发波长为 467 nm，但在 400 ~ 500 nm 之间的激发光都能产生良好的发射， $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 配合物的这种宽激发光波长的特点，为寻找合适的光化学氧传感器的激发光源带来了方便，已商品化的蓝色发光二极管 ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$) 能满足要求。其次，与在四氢呋喃溶液中的相比，溶胶-凝胶基质中 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 配合物的荧光发射波长从 607 移到 592 nm，蓝移了 15 nm，这主要是由于溶胶-凝胶基质具有较强的刚性，避免了 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 指示剂分子的转动和周围基质的相互作用，从而降低了非辐射去活化过程。最后 $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ 配合物的激发和发射波长都落于可见光区，因此，以

此为荧光指示剂制备的光化学氧传感器适用于生物系统中氧浓度的监测，避免紫外线杀灭其中的活性细胞。

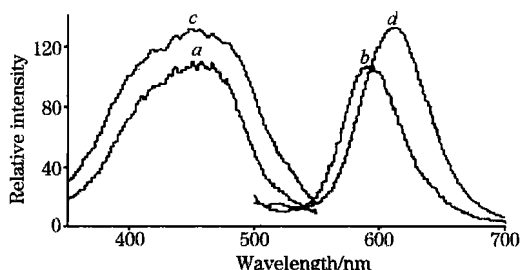


Fig. 3 Comparison of fluorescence spectra of $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ within the ormosil matrix (a, b) and that dissolved in THF solution (c, d)

2.2 BOD 传感响应

2.2.1 响应情况比较

利用了实验室培养的 3 种海水菌种：直接从海水中分离出来的海水筛选菌种；在海水环境中反复驯化的淡水菌驯化芽孢杆菌；将海底淤泥活化并从中提取的活性淤泥提取菌种。研究利用这些不同的海水菌种获得的 BOD 微生物传感膜固定于溶解氧敏感膜上，考察了在不同盐度和 pH 环境中的性能。在相同的实验条件（温度 35 °C，pH 7.2）下，实验对 3 种不同的微生物传感膜对 BOD 为 200 mg L^{-1} 的 GGA 溶液的响应时间进行了比较。实验结果表明：从加入 GGA 溶液到响应进入平缓状态，海水筛选菌种所需时间为 10 ~ 15 min，驯化芽孢杆菌为 10 ~ 13 min，活性淤泥提取菌种为 20 ~ 25 min。响应曲线经一阶求导后，荧光强度变化速率 (I_F/t) 最大值出现的时间分别为 6 ~ 10 min，4 ~ 5 min 及 9 ~ 14 min 左右。图 4，图 5，图 6 显示了海水筛选菌种和驯化芽孢杆菌在 0 ~ 30 mg L^{-1} 的 BOD 浓度范围内均有较好的线性响应，其中海水筛选菌种的线性相关系数 (r^2) 为 0.975 0，驯化芽孢杆菌的线性相关系数为 0.958 4，而曲线斜率则分别为 3.968 1 和 0.240 2。一般标准曲线的斜率越大，对浓度 BOD 值的响应值也越大，传感膜的灵敏度越高。海水筛选菌种膜的曲线斜率是驯化芽孢杆菌膜曲线斜率的 16.5 倍，这说明了海水筛选菌种膜远比驯化芽孢杆菌膜灵

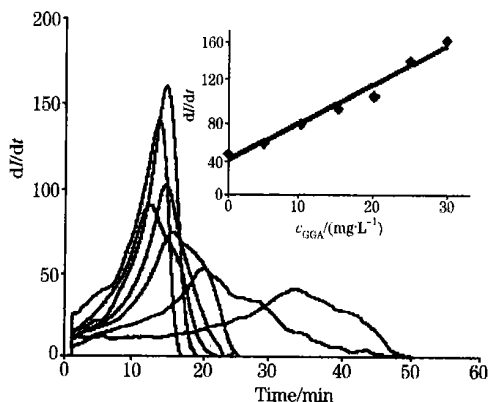


Fig. 4 Response linearity of seawater sieved bacteria BOD sensing film

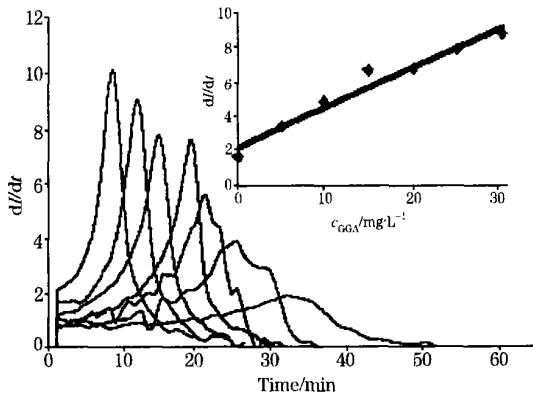


Fig. 5 Response linearity of domestic bacillus BOD sensing film

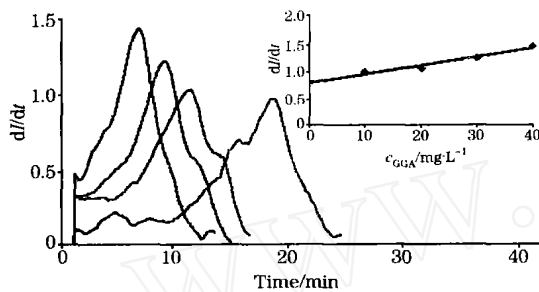


Fig. 6 Response linearity of activated sludge distilled bacteria BOD sensing film

Conditions: T , 35 ; pH , 7.2; NaCl %, 3.2 %

敏,更适合于低浓度 BOD 值的测定。活性淤泥提取菌种膜对 BOD 值的响应下限只能到 10 mg L^{-1} ,线性相关系数为 0.966 6,曲线斜率为 0.017 9,仅为海水筛选菌种曲线斜率的 $1/222$,其响应灵敏度和检测下限均劣于前两种 BOD 微生物传感膜。

2.2.2 重现性

实验比较了海水筛选菌种、驯化芽孢杆菌和活性淤泥提取菌种 3 种菌膜微生物传感器在恒温 35 和 pH 值为 7.2 条件下连续 4 次测定相同 BOD 值的 GGA 溶液的重现性,研究结果表明其荧光强度变化速率最大值的相对平均偏差分别为: 1.2 %, 1.7 %, 1.5 %, 其响应时间的相对平均偏差则分别为: 3.2 %, 1.9 % 和 17.9 %,前两种微生物传感器具有较好的响应时间和响应信号的重现性,可满足 BOD 分析的精度要求,而利用活性淤泥提取菌种铺制的微生物传感器响应时间的重现性较差。

2.2.3 温度的影响

在恒定盐度和 pH 值的条件下,实验考察了 20~50 的温度变动范围内 3 种传感膜对固定 BOD 值的 GGA 溶液的响应情况。实验结果表明活性淤泥提取菌种膜对温度过于

敏感,不利于实际样品的在线检测;海水筛选菌种膜和驯化芽孢杆菌膜对温度的敏感程度则要小,驯化芽孢杆菌膜有一段恒定温度区为 30~40。可见,温度变化对生物传感器活性影响较大,为了保持微生物传感膜响应的重现性和准确度,保持测定状态的恒温非常的重要。一般选择 35 为实验工作温度,这也是 3 种海水菌种的培养温度。

2.2.4 pH 的影响

一般海水的 pH 在 7~8 之间,实验利用 5~10 之间的磷酸盐缓冲溶液,考察了 pH 对 3 种微生物传感膜响应情况的影响。研究结果表明 3 种微生物传感膜的最佳响应均在 pH 7~8 之间,其中海水筛选菌种膜和驯化芽孢杆菌膜均为 pH 7.4,活性淤泥提取菌种膜则在 pH 8 达到最佳,且在 pH 7~9 之间受 pH 变化的影响相对较小。响应时间也有类似的变化。考虑到不同菌株的来源与环境特性,对不同海域的 BOD 检测最好能够使用从该海域获取的菌种。

2.2.5 无机盐的影响

海水菌一般在海水中生活,长期的高盐度环境使其逐渐的适应了高浓度无机盐的存在,甚至导致高盐度会刺激细菌的活性。恒定温度(35)和恒定 pH (7.2)的条件下,在固定 BOD 值的 GGA 溶液中加入 NaCl 进行盐度影响实验。研究结果表明海水筛选菌种膜的最佳 NaCl 百分含量约为 1 %,驯化芽孢杆菌膜的约为 3 %,活性淤泥提取菌种膜的为 1 %。海水驯化菌驯化芽孢杆菌是由淡水菌驯化而来,培养液/基及保存液均由海水配制,菌种已产生了一定的变异,对海水的盐度(3.2 %)有很好的适应能力,适合的盐度不仅不会抑制它的活性,还会使它的活性达到最佳,因此比较适用于海水样品的检测。而直接由海水/海底淤泥中提取的海水菌、海水筛选菌种和活性淤泥提取菌种虽然是天然海水菌,但实验室培养时的培养基/液和保存液均为磷酸盐缓冲溶液,因此菌种的抗盐度能力有一定程度的削弱,下降到约 1 %。将实验用的培养液/基和保存液均用海水配制,就能避免这个问题。从抗盐度方面而言,3 种海水菌均适合海水样品的测定,其中又以驯化芽孢杆菌为最佳。

3 结论

使用 Ru 配合物制备的有机改性溶胶-凝胶氧敏感膜具有良好的光学特性,将其作为二次传感,利用海水菌种作为同化菌种、有机改性溶胶凝胶-PVA 方法为包埋方法进行微生物传感膜的铺制。实验考察了传感膜的响应情况和影响因素 pH 、无机盐和温度对膜响应的影响。结果表明:海水筛选菌种膜和驯化芽孢杆菌膜受温度的影响相对较小,适用于海水环境的测定,响应时间较短,低浓度范围线性较好,用于实际标准样品和海水样品的测定当中,精密度较高,对低 BOD 值有较好的响应特性。这些研究结果为今后 BOD 微生物海洋传感器的研制提供一定的基础。

参 考 文 献

- [1] FAN Shi-fu, CHEN Li, XIAO Song-shan, et al (范世福, 陈 莉, 肖松山, 等). *Optical Instruments*(光学仪器), 1999, 21(1): 37.
- [2] Clark L C, Lyons C, Aon N Y. *Acad. Sci.*, 1962, 102: 29.
- [3] CHEN Xi, LI Zhen, JIANG Ya-qi, ZHONG Zhen-ming, WANG Xiaoru, WONG Kwokyin (陈 曦, 李 真, 蒋亚琪, 钟振明, 王小如, WONG Kwokyin). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2002, 22(5): 796.
- [4] DAI Yuarr-jing, ZHONG Zhen-ming, CHEN Xi, et al (戴媛静, 钟振明, 陈 曦, 等). *Acta Scientiae Circumstantiae*(环境科学学报), 2003, 23(5): 683.

Fluorescence Characterization of Oxygen Sensing Film for BOD Determination

LIN Ling¹, XIAO Lai-long¹, XIN Ling-ling¹, ZHAO Li¹, CHEN Xi^{1,2*}

1. Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE and Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China
2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract The film doped with tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium ($[Ru(dpp)_3]^{2+}$) as an oxygen quenching indicator exhibited a good linear relationship, fast response time, long-term stability, and enhanced sensitivity to dissolved oxygen after optimizing the sol-gel processing parameters. Fiber-optical microbial sensors for the determination of biochemical oxygen demand (BOD) were described. The sensing films consist of two layers of an oxygen-sensitive fluorescent material, and three different kinds of seawater microorganisms immobilized in poly(vinyl alcohol) sol-gel matrix. The fluorescent properties and the response behaviors of the film were investigated. The effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on the sensing films were studied as well. For low biochemical oxygen demand, the film of sieved bacteria from seawater was superior in respect of sensitivity and is expected for further development.

Keywords Dissolved oxygen; BOD sensor; Ruthenium complex; Fiber optical chemical sensor

(Received Oct. 16, 2004; accepted Mar. 2, 2005)

*Corresponding author