

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00389

基于多壁碳纳米管的三电极血乙醇生物传感器的研究

甄生航¹ 郑军¹ 邹超世¹ 王艳¹ 朱洋² 邓世雄² 谢国明^{*1} 王箭¹

¹(重庆医科大学医学检验系, 重庆 400016) ²(重庆医科大学基础医学院法医研究所, 重庆 400016)

摘 要 采用丝网印刷技术在 PVC 基板上印制三电极, 将多壁碳纳米管、麦尔多拉蓝、乙醇脱氢酶(ADH) 以及氧化型辅酶 I (NAD^+) 依次修饰在工作电极表面, 然后在该三电极表面贴一层亲水膜, 形成一个 $5\ \mu\text{L}$ 反应池, 制成血乙醇检测新型生物传感器检测条。结果表明, 此生物传感器具有良好的准确性和稳定性; 检测线性范围为 $0.5 \sim 20\ \text{mmol/L}$, $r = 0.99493$; 检出限为 $0.22\ \text{mmol/L}$; 电流达到 95% 稳态时间小于 15 s。考察了 pH 值、温度及干扰物对生物传感器的影响。用此生物传感器和顶空气相色谱法对 10 份全血标本乙醇浓度平行测试, 两者相关性良好 $r = 0.97583$ 。利用虹吸现象吸取微量全血直接定量测定乙醇浓度是此生物传感器的特点。

关键词 血乙醇; 丝网印刷技术; 多壁碳纳米管; 生物传感器

1 引言

血乙醇浓度定量检测结果是判断驾驶人员是否饮酒的重要依据。近年来, 用生物传感器检测血乙醇浓度的研究取得了进展。血乙醇生物传感器主要包括乙醇氧化酶(AOX) [1,2] 和乙醇脱氢酶(ADH) [3,4] 两种类型。基于 ADH 的乙醇生物传感器的特异性和稳定性都优于 AOX 型, 但是直接氧化还原型辅酶 I (NADH) 需要高的超电势, 并且氧化产物的堆积会产生钝化作用 [5], 导致电极检测性能下降。上述方法都是在大体体系电解池中进行检测, 线性范围不够宽, 实际样品采血量较大, 样品需预处理。

麦尔多拉蓝(MB) 作为电子介体能在低电位下氧化 NADH [6,7], 减少钝化作用及其它电活性物质的干扰, 提高传感器检测乙醇的特异性和稳定性。多壁碳纳米管(MWCNT) 作为一种纳米碳材料, 因具有大的比表面积、好的生物相容性, 且可加快电子传递、增加电流响应、提高检测灵敏度和线性范围、降低氧化 NADH 的过电势, 而被广泛用于生物传感器的研究中 [8,9~10]。本研究采用丝网印刷技术在 PVC 基板上印制三电极, 将多壁碳纳米管(MWCNT)、麦尔多拉蓝(MB)、乙醇脱氢酶(ADH) 以及氧化型辅酶 I (NAD^+) 依次修饰在工作电极表面, 然后在该三电极表面贴上一层亲水膜, 形成一个 $5\ \mu\text{L}$ 反应池, 制成血乙醇检测新型生物传感器检测条。结果表明, 此生物传感器明显增大了检测线性范围, 可对驾驶人员全血直接分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

$\mu\text{AUTOLAB III}$ 电化学工作站(荷兰 Ecochemie 公司), SC-2000 顶空气相色谱仪(重庆川仪九厂), YKP-2008 $\times 1400$ 手动丝网印刷机(顺德盛江印刷机械厂)。乙醇脱氢酶(ADH, 批号: A3263-15KU)、氧化型辅酶 I (NAD^+)、5% (m/V) Nafion117 溶液、麦尔多拉蓝(MB) 均购于 Sigma-Aldrich 公司, 牛血清白蛋白(BSA, 罗氏诊断试剂公司), 羧基化多壁碳纳米管(MWCNT, 纯度 $> 95\%$, 成都有机化学研究所), 银浆 427SS、AgCl、碳浆 423SS(分析纯, Acheson 公司), 实验用水均为超纯水, 磷酸盐缓冲液(PBS, $0.1\ \text{mol/L}$, pH 8.0), $5\ \text{mmol/L}$ 乙醇底物溶液(PBS 配制), 全血乙醇样品取自重庆医科大学法医验伤所。

2.2 丝网印刷三电极的制备

在 PVC 基板上印刷 3 根导电银轨道, 然后对应各轨道依次印刷碳工作电极、碳对电极和 Ag/AgCl 参比电极, 工作电极为圆盘状, 直径 3 mm。最后在导电银条上印刷 PVC 绝缘油墨, 并留出长 0.6 cm 的接线端。图 1 为丝网印刷电极扫描图。

2009-07-02 收稿; 2009-11-07 接受

本文系重庆市科技攻关项目(No. CSTC 2009AC5145) 资助项目

* E-mail: guomingxie@cqmu.edu.cn

2.3 三电极血乙醇生物传感器的制备

取 5% (m/V) Nafion117 溶液、无水乙醇, 配制 0.5% (m/V) Nafion-乙醇溶液, 加入 MWCNT 后超声 1 h, 得 1 g/L Nafion-乙醇-MWCNT 混合液。取此混合液 3 μL 滴加到工作电极表面, 室温干燥后形成一层 Nafion-MWCNT 膜。然后把此电极放入 1 mmol/L MB 的 PBS 中浸泡 10 min, 使 MB 固定到 Nafion-MWCNT 膜中。将 2 mg ADH, 2 mg NAD^+ , 6 mg BSA 溶于 200 μL PBS 中, 取配制好的酶液 3 μL 滴加到 Nafion-MWCNT-MB 修饰的工作电极表面, 4 $^{\circ}\text{C}$ 干燥后, 在电极工作区的远端和近端分别贴上双面胶层, 在其上再复合一层中心有直径 1 mm 小孔的亲水膜, 形成了 5 μL 的反应池, 制成三电极血乙醇生物传感器检测条。



图 1 丝网印刷电极扫描图
Fig. 1 Scanogram of the screen-printed electrodes

3 结果与讨论

3.1 丝网印刷三电极的电化学特性

3.1.1 Nafion 分散 MWCNT 的特性 图 2 为 Nafion 分散 MWCNT 的扫描电镜图。MWCNT 在 0.5% Nafion-乙醇溶液中分散良好 (ϕ 20 nm)。

3.1.2 Nafion-MWCNT-MB 修饰丝网印刷三电极的电化学特性 图 3 为修饰电极在不同扫描速度下的 CV 图。在不同扫描速度下, 得到的 CV 图对称, 随着扫描速度的增加, 氧化峰电流 i_{pa} 和还原峰电流 i_{pc} 都不断增加, 表明固定在 Nafion-MWCNT 膜中的

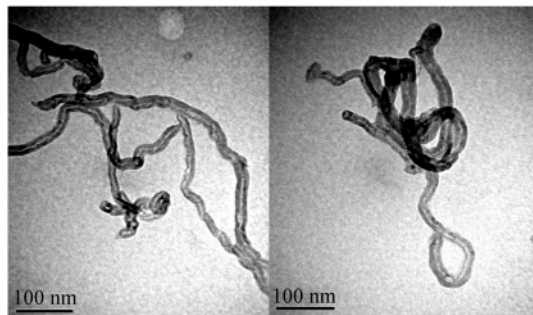


图 2 多壁碳纳米管的透射电镜图

Fig. 2 TEM image of MWCNT

MB 可逆性好, 氧化峰出现在 -0.34 V, 还原峰出现在 -0.47 V, 与文献 [7] 中的报道有所差别, 这可能与采用丝网印刷三电极系统以及 MWCNT 中的羧基解离导致负电荷增加有关。由图 3 可见, i_{pa} 和 i_{pc} 与扫描速度平方根成正比, $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}} \approx 1$, 具有明显的扩散电流特征。

3.1.3 不同修饰电极在磷酸盐缓冲液中的循环伏安图 图 4 为不同修饰电极在 PBS 中的 CV 图。曲线 a 为在 SPE 工作电极上修饰 Nafion, 曲线 b 为修饰 Nafion-MWCNT 混合液, 电流值较曲线 a 增大。曲线 c 为修饰 Nafion 后吸附 MB, 曲线 d 为修饰 Nafion-MWCNT 后吸附 MB, 两曲线氧化还原峰都比较对称, 峰位置相同, 说明 MB 在两种修饰膜中均能有效地传递电子; 曲线 d 的峰电流明显比曲线 c 大, 表明 MWCNT 能增加电子传递的有效面积, 起到放大电流信号的作用。图 5 为传感器在空白 (a) 和底物 (b) 溶液中的 CV 图。在空白溶液中, 有一对对称的氧化还原峰; 当加入乙醇后, 由于 ADH 的催化作用, 氧化峰电流增加, 且电位基本不变, 表明该传感器对乙醇有较灵敏度的响应。

3.2 pH 值和温度对生物传感器的影响

在 pH 6.5 ~ 9.0 范围内考察了对催化性能的影响。pH 6.5 ~ 8.0 时, 传感器电流响应逐渐增大; pH > 8.0 时, 响应电流逐渐减小, 故实验中缓冲液 pH = 8.0。随着温度升高, 传感器电流响应逐渐增大, 但超过 30 $^{\circ}\text{C}$ 后电流响应逐渐减小, 这是因为温度太高, 酶活性降低。因此, 本实验温度选择为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 生物传感器的检测范围、检测限和响应时间

在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下, 采用循环伏安法和计时安培法检测。通过虹吸现象吸取 5 μL 乙醇标准液, 如图 5 所示,

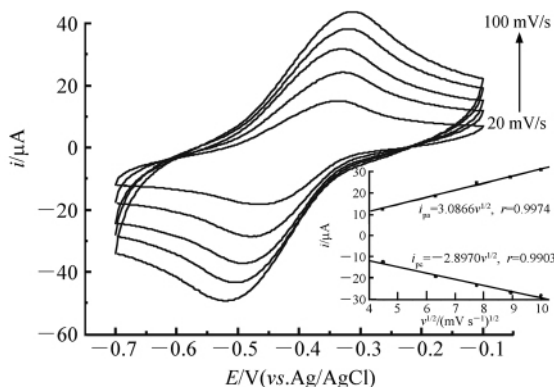


图 3 修饰电极循环伏安曲线 (插图: i_{pa} 和 i_{pc} 与扫描速度平方根的关系)

Fig. 3 Cyclic voltammetric curves of modified electrode (Inset: i_{pa} and i_{pc} dependence on the square root of scan rates)
扫描速度依箭头方向 (Scan rates according to the direction of arrow): 20, 40, 60, 80, 100 mV/s. 0.1 mol/L PBS (pH 8.0)。

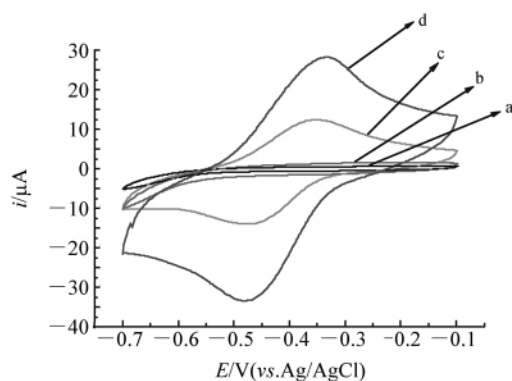


图4 不同修饰电极在 PBS 中的循环伏安图

Fig. 4 Cyclic voltammetric curves of different modified electrodes in PBS

a. SPE/Nafion; b. SPE/Nafion-MWCNT; c. SPE/Nafion/Mel-dola's (MB); d. SPE/Nafion-MWCNT/MB. 0.1 mol/L PBS (pH 8.0). v : 50 mV/s.

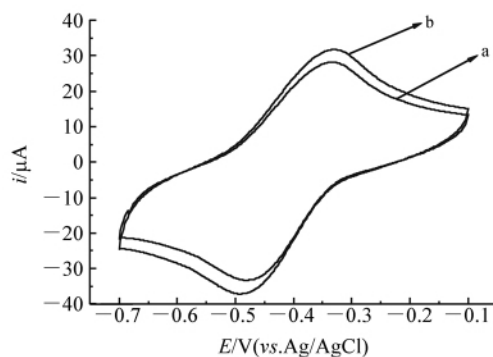


图5 三电极传感器对乙醇检测的循环伏安响应图

Fig. 5 Cyclic voltammetric curves of modified three electrodes biosensor to alcohol

a. 未加入乙醇(Without alcohol); b. 加入 5 mmol/L 乙醇(Add in 5 mmol/L alcohol). v : 50 mV/s.

在 -0.34 V 处 i_{pa} 最大,故工作电位定为 -0.34 V。图 6 为生物传感器对不同浓度乙醇响应的计时电流图。可见,此生物传感器响应速度快,电流达到 95% 稳态时间小于 15 s。插图为不同浓度乙醇响应电流的拟合曲线,在 $0.5 \sim 20$ mmol/L 内呈线性关系,电流值 Δi (μA) 与乙醇浓度 C (mmol/L) 符合以下关系式 Δi (μA) = $0.00696 + 0.12428C$, $r = 0.99493$,检出限为 0.22 mmol/L。

根据 Lineweaver-Burk 方程: $I/I_{ss} = I/I_{max} + K_m/I_{max}C$, 式中 I_{ss} 为加入底物后的电流强度, C 为底物浓度, I_{max} 为固定底物浓度后的最大电流, K_m 为米氏常数。根据此公式求得传感器修饰 ADH 的米氏常数为 6.572 mmol/L。

3.4 干扰实验

在底物溶液中,分别测量加入 1 mmol/L 甲醇、乙醛、丙酮、异丙醇、异丁醇、多巴胺、尿酸、乳酸、葡萄糖、维生素 C 等干扰物前后的电流值,干扰率 $RF(\%) = 100 \times (i_b - i_a) / i_a$ (i_a : 加入干扰物前电流值, i_b : 加入干扰物后电流值)。各干扰物质的干扰率分别为甲醇 2.44% 、乙醛 -1.57% 、丙酮 -2.15% 、异丙醇 2.83% 、异丁醇 2.69% 、多巴胺 1.66% 、尿酸 -1.82% 、乳酸 -1.58% 、葡萄糖 1.49% 、维生素 C 1.31% ,各干扰物对电流响应干扰可忽略。

3.5 生物传感器的重复性与稳定性

在同一批次印制的丝网印刷三电极中,随机抽取 10 根,制成生物传感器,每根对底物溶液重复测 3 次,取其平均值,计算批内 RSD 为 3.8% 。在 4 个批次的印制电极中,每批次随机抽取 3 根,制成生物传感器,分别对底物溶液重复测 3 次,取其平均值,批间 RSD 为 4.5% 。将此生物传感器于 $4^\circ C$ 保存,20 d 后对相同底物溶液检测,电流响应值为初始的 96.2% ; 存放 30 d 后,电流响应值为初始的 94.7% 。以上结果表明,此传感器具有较好的重复性和稳定性。

3.6 样品检测

从重庆医科大学法医验伤所取酒后驾车人员全血样品 10 份,分别吸取 $5 \mu L$,以此生物传感器检测条直接检测;同时,用 SC-2000 气相色谱仪进行平行测定。结果如表 1 所示,此传感器检测结果与气相

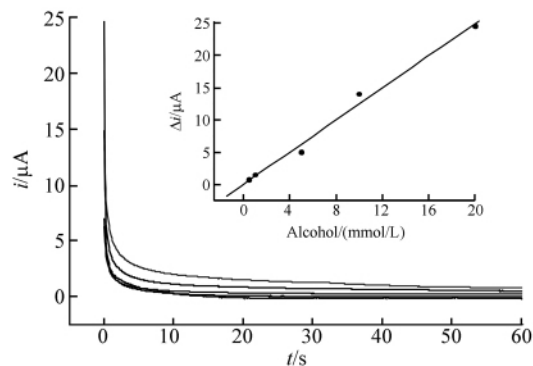


图6 生物传感器对乙醇响应的计时电流图

Fig. 6 Chronoamperometric response of biosensor for alcohol

乙醇浓度从下到上(Alcohol concentration from bottom to top): 0, 1, 5, 10, 20 mmol/L。插图(Inset): 生物传感器检测不同浓度乙醇的拟合曲线(Fitting curve of the biosensor various concentration of alcohol)。

色谱法具有良好的相关性， $r = 0.9758$ 。

表 1 全血样品乙醇浓度测定

Table 1 Determination results of alcohol concentration in whole blood samples

	血样编号 Blood sample number									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血乙醇生物传感器 Blood alcohol biosensor (mmol/L)	0.65	4.56	8.03	8.89	12.58	13.89	16.93	18.02	19.75	21.27
SC-2000 气相色谱仪 Gas chromatographs (mmol/L)	3.04	6.08	6.95	9.77	11.50	14.98	16.06	19.32	22.36	24.74

致 谢 感谢上海斯堪生物传感器技术有限公司胡军提供的技术帮助。

References

1 LI Sha(李 莎) , WANG Yan-Yan(王艳艳) , ZHAO Zi-Xia(赵紫霞) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008**, 36(2) : 227 ~ 230

2 H Gulee, A Gce, M Kavanoz, H Coskun, A Yildiz. *Biosens. Bioelectron.* , **2002**, 17(6) : 517 ~ 521

3 Tsai Yu-Chen, Huang Jing-Dae, Chiu Chian-Cheng. *Biosens. Bioelectron.* , **2007**, 22(12) : 3051 ~ 3056

4 Zhou M, Shang L, Li B L, Huang L J, Dong S J. *Biosens. Bioelectron.* , **2008**, 24(3) : 442 ~ 447

5 Deore B A, Freund M S . *Chem. Mater.* , **2005**, 17(11) : 2918 ~ 2923

6 Zhu L D, Zhai J L, Yang R L, Tian C Y, Guo L P. *Biosens. Bioelectron.* , **2007**, 22(11) : 2768 ~ 2773

7 LUO Peng(罗 鹏) , XIE Guo-Ming(谢国明) , SONG Fang-Zhou(宋方洲) , DENG Shi-Xiong(邓世雄) , XU Hua-Jian(徐华健) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2007**, 35(12) : 1801 ~ 1804

8 Arribas A S, Bermejo E, Chicharro M, Zapardiel A. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 596(2) : 183 ~ 194

9 GAO Zuo-Ning(高作宁) , SUN Yu-Qin(孙玉琴) , YOU Wei(犹 卫) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2009**, 37(4) : 553 ~ 557

10 Santos A S, Pereira A C, Duran N, Kubota L T. *Electrochim. Acta*, **2006**, 52(1) : 215 ~ 220

Three Electrodes Biosensor for Alcohol in Whole Blood
Based on Multi-wall Carbon-nanotube

ZHEN Sheng-Hang¹, ZHENG Jun¹, ZOU Chao-Shi¹, WANG Yan¹, ZHU Yang²,
DENG Shi-Xiong², XIE Guo-Ming^{* 1}, WANG Jian¹

¹(Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

²(Chongqing Research Institute of Forensic Medicine, College of Basic Medicine,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Abstract A novel disposable three electrodes blood alcohol biosensor strip was fabricated by a screen printing technique. Multi-wall carbon nanotube(MWCNT) , Meldola’s(MB) , alcohol dehydrogenase(ADH) and nicotinamide adenine dinucleotide cofactor (NAD⁺) were modified on the surface of the carbon working electrode. Then hydrophilic membrane was stuck in the outermost of the three electrodes to make a reaction camera of 5 μL. Experimental results indicated that the biosensor possessed good accuracy and stability, the linear response range was 0. 5 – 20 mmol/L with correlation coefficient of 0. 9949, detection limit was 0. 22 mmol/L, and the response time was less than 15 s. Some influencing factors to the biosensor were investigated, such as the pH, temperature and interferences. Correlation analysis showed that there was a significant correlation between the methods of biosensor and the headspace vapor phase chromatography in 10 whole blood samples($r = 0.97583$) . Small volume whole blood sucked using siphonage to detect blood alcohol directly and quantitatively was the obvious character of the biosensor.

Keywords Blood alcohol; Screen printing technique; Multi-wall carbon nanotube; Biosensor

(Received 2 July 2009; accepted 7 November 2009)