

葡萄糖氧化酶在石墨烯-纳米氧化锌修饰玻碳电极上的 直接电化学及对葡萄糖的生物传感

陈慧娟* 朱建君 余 萌

(信阳师范学院 化学化工学院, 信阳 464000)

摘 要 采用滴涂法和电沉积法制备了石墨烯/纳米氧化锌复合膜修饰玻碳电极,再将葡萄糖氧化酶固定在修饰电极表面制成了电化学生物传感器,用于葡萄糖的灵敏测定。用循环伏安法在 $-0.7 \sim -0.1$ V 范围内研究了葡萄糖氧化酶在修饰电极上的直接电化学行为。结果表明,石墨烯/纳米氧化锌复合膜能很好地保持葡萄糖氧化酶的生物活性,并显著促进了其电化学过程。在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)中,固定在修饰电极上的葡萄糖氧化酶呈现出一对近乎可逆的氧化还原峰,并且对葡萄糖的氧化具有良好的催化作用。葡萄糖氧化酶在修饰电极上的电子转移常数 k_s 为 1.42 s^{-1} ,修饰电极对葡萄糖催化的米氏常数 K_m^{app} 为 $14.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。线性范围为 $2.5 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ mol/L,检出限为 2.4×10^{-7} mol/L ($S/N=3$)。此修饰电极具有良好的导电性能、稳定性和重现性,可用于实际样品的分析测定。

关键词 石墨烯; 氧化锌; 葡萄糖氧化酶; 直接电化学; 生物传感器

1 引 言

葡萄糖是生命体的重要物质,其在体液中的含量是反映身体状况的重要指标。尤其是对于糖尿病患者,其血糖浓度的测定是控制病情的重要手段,因此准确、快速地测定血中葡萄糖的含量极为重要^[1]。目前,测定葡萄糖的方法主要有分光光度法^[2]、电化学法^[3]、高效液相色谱法^[4]及毛细管电泳法^[5]等,这些方法大多数分析速度较慢或成本较高。电化学传感器具有灵敏度高、响应时间短、线性范围宽、成本低等优点。近年来,电化学葡萄糖生物传感器已成为研究热点之一^[6]。

目前,葡萄糖传感器多采用在电极表面修饰葡萄糖氧化酶(GOD),以获得高灵敏度和高选择性的电极响应。将 GOD 固定在具有生物相容性的电极表面可发生一个相当快的电子传递反应,利用直接电子传递性质制得的生物传感器不需要向分析液中添加电子传递媒介体而对底物分子进行电化学测定。然而, GOD 与裸露的电极表面直接接触通常会引起蛋白质的结构与功能发生变化,并失去生物活性,使蛋白质在电极上的电子传递受到抑制;而且蛋白质的电活性中心被包埋在双螺旋结构中,不能接近电极表面,因此难以实现蛋白质与电极间的直接电子传递。

石墨烯是由一薄层包裹在蜂巢晶点阵上的碳原子组成,其厚度仅为 0.35 nm ,近年来广受研究者的关注。石墨烯的特殊结构使它具有好的导电性能、机械性能,大的比表面积、合成方法简单、原料价格低以及易于修饰等优点,目前已在化学、电子、信息、能源、材料和生物医药等领域得到广泛应用^[7-8]。纳米氧化锌是一种宽带隙半导体,被广泛应用于太阳能电池、场发射显示器、传感器以及变阻器等领域^[9-11]。本研究将石墨烯和纳米氧化锌结合起来,制备了 GOD/纳米氧化锌/石墨烯修饰玻碳电极(GCE),利用该电极研究了 GOD 的直接电化学,并将传感器应用于葡萄糖的灵敏测定。实验结果表明,此方法具有较高的灵敏度和较宽的线性范围,传感器制备方法简单,重现性好。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司),三电极体系:石墨烯/纳米氧化锌复合膜修饰玻碳电

极为工作电极($d=3\text{ mm}$) ,饱和甘汞电极(SCE) 为参比电极 ,铂丝电极为对电极。pHS-3C 型酸度计(上海精科仪器公司) ;85-2 数显恒温磁力搅拌器(金坛市双捷实验仪器厂) ;KQ2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司) 。

石墨粉、胼(上海试剂厂) ;葡萄糖氧化酶(上海晶纯试剂有限公司) ;磷酸盐缓冲溶液(PBS) 用 $0.1\text{ mol/L NaH}_2\text{PO}_4$ 和 Na_2HPO_4 混合溶液配制 ,然后用 NaOH 及 H_3PO_4 调节至所需 pH 值。其它试剂均为分析纯 ,所用水均为二次蒸馏水。

2.2 修饰电极的制备

石墨烯的合成参照文献[12] :在冰浴条件下 5 g 石墨粉缓慢加到浓 H_2SO_4 (87.5 mL) 和浓 HNO_3 (45 mL) 的混合溶液中 ,然后缓慢加入 55 g KClO_3 到上述混合物中 ,在室温下搅拌 80 h 。将混合物过滤得到氧化石墨。在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥后 0.5 g 氧化石墨在 500 mL 二次水中进行超声剥离 ,然后在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥后即可获得 GO。GO 在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下于用胼还原。产物过滤后 ,分别用水和乙醇进行洗涤 ,真空干燥即可得到石墨烯(Gr) ,其扫描电镜图如图 1a 所示。由图 1 可见 ,石墨烯呈透明的片层结构。

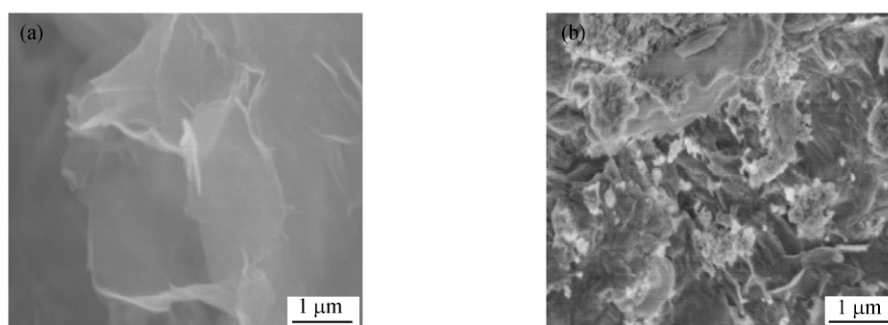


图 1 石墨烯(a)和 ZnO/Gr/GCE(b)的扫描电镜图

Fig. 1 SEM image of graphene (Gr) (a) and ZnO/Gr/GCE (b)

将 1 mg Gr 加入 1 mL N,N -二甲基甲酰胺(DMF) 中 ,超声分散 30 min 直至得到 0.1 g/L Gr 悬浮液。玻碳电极(有效直径 3 mm) 依次用 1.0 、 0.3 和 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ Al_2O_3 粉及麂皮抛光至呈镜面 ,再依次在水、无水乙醇和水中进行超声清洗 ,用氮气吹干备用。用微量进样器取 $8\text{ }\mu\text{L}$ Gr 悬浮液滴加在玻碳电极表面 ,室温下放干 ,制得 Gr 修饰玻碳电极(Gr/GCE) 。配制 $0.01\text{ mol/L Zn(NO}_3)_2$ 溶液 ,并用 HNO_3 调至 pH 5.0 。将 Gr/GCE 置于 $\text{Zn(NO}_3)_2$ 溶液中 ,在 -1.3 V 下沉积 150 s ,用水冲洗干净后晾干 ,即可得到石墨烯/氧化锌修饰玻碳电极(ZnO/Gr/GCE) 。ZnO/Gr/GCE 的扫描电镜图如图 1b 所示。从图 1b 可见 ZnO 颗粒成功地沉积在 Gr 上。

3 结果与讨论

3.1 葡萄糖氧化酶在修饰电极上的直接电化学

用循环伏安法考察了不同修饰电极在 0.1 mol/L 除氧的 PBS 缓冲溶液(pH 7.0) 中的电化学行为(图 2) ,扫速为 50 mV/s ,记录在 $-0.7\sim-0.1\text{ V}$ 范围的循环伏安曲线。从图 2 可见 ,在裸玻碳电极、GOD/GCE 和 GOD/ZnO/GCE 电极上 ,没有出现 GOD 的氧化还原峰。在 GOD/Gr/GCE 上 ,有一对很宽且低的氧化还原峰 ,说明石墨烯可以促进 GOD 的电化学过程 ,这是因为石墨烯具有很好的导电性能 ,可以有效促进电子传递。相比上述电极 ,在 GOD/ZnO/Gr/GCE 上 ,出现一对峰形良好、峰电流显著提高的氧化还原峰 ,势电位为 -0.43 V ,氧化峰和还原峰的电势差为 50 mV ,说明该氧化还原电对为 GOD 在电极上的直接电子传递过程 ,是一个近可逆的电化学过程 ,这是因为 ZnO 对于 GOD 具有好的电催化性能。电极表面 GOD 浓度能通过 $I=n^2F^2vA\Gamma/4RT$ 进行计算 ,其中 n 为电子数 , A 为电极面积 , I 为峰电流 , T 为热力学温度 , v 为扫描速率(V/s) 。根据上述公式可进行电极表面 GOD 浓度 Γ 的计算。GOD 在 GOD/ZnO/Gr/GCE 和 GOD/Gr/GCE 上的表面浓度分别为 $7.04\times10^{-9}\text{ mol/cm}^2$ 和 $5.21\times10^{-9}\text{ mol/cm}^2$, GOD 在 GOD/ZnO/Gr/GCE 上的表面浓度比在 GOD/Gr/GCE 上提高了近 35.2% ,说明纳米氧化锌

和 Gr 的协同作用不仅有效催进了 GOD 在电极上的电子传递,而且显著提高了 GOD 在电极上的负载量。

图3为不同修饰电极的阻抗谱图。阻抗谱图可用于研究在电极的组装过程中电荷在电极上传递的变化。在含有 0.1 mol/L KCl 的 5 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中进行测定阻抗值,频率范围为 0.1 ~ 10^4 Hz。在 GCE 上,阻抗值约为 460 Ω 。当 Gr 修饰到 GCE 上后,其阻抗值显著降低,表现为一条直线,说明 Gr 具有非常好的导电性能。而当纳米 ZnO 进一步电沉积到电极表面时,阻抗值约提高到 180 Ω ,说明纳米 ZnO 已被成功电沉积到 Gr/GCE 表面。当 GOD 修饰到 ZnO/Gr/GCE 上时,阻抗值达到最大(765 Ω)。因为 GOD 是一种蛋白质,固定在电极表面时阻碍了探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 与电极的接触,这也说明 GOD 成功固定在了电极表面。

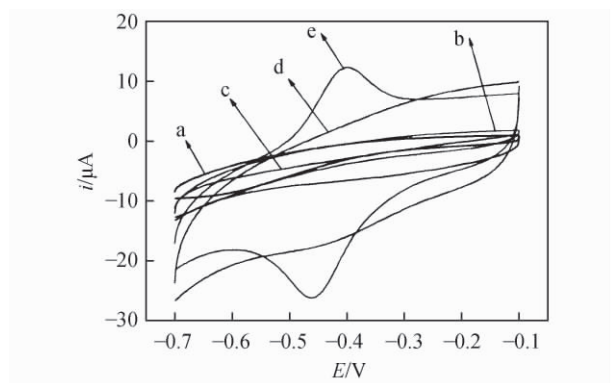


图2 不同修饰电极的循环伏安图

Fig. 2 CVs of GCE (a), GOD/GCE (b), GOD/ZnO/GCE (c), GOD/Gr/GCE (d), GOD/ZnO/Gr/GCE (e) in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0)

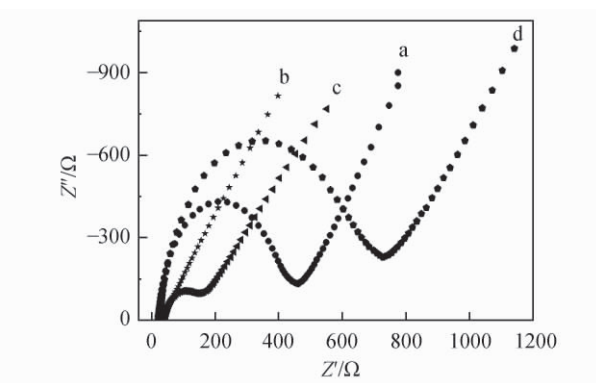


图3 不同修饰电极的阻抗谱图

Fig. 3 EIS spectra of bare GCE (a), Gr/GCE (b), ZnO/Gr/GCE (c), GOD/ZnO/Gr/GCE in 5 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ solution containing 0.1 mol/L KCl

3.2 扫速和 pH 值的影响

图4为 GOD/ZnO/Gr/GCE 在不同扫描速度下的循环伏安曲线。在除氧的 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 溶液中,扫描速度范围为 20 ~ 300 mV/s, GOD 氧化还原峰电流随扫速的增加而增大,与扫速呈良好的线性关系,氧化峰的峰电流 i_{pa} 与扫速之间的线性方程为 $i_{pa} = 4.447 + 6.915 \times 10^{-2}v$,相关系数 $R=0.992$ 。还原峰电流与扫速之间的线性方程为 $i_{pc} = 0.125 - 5.70 \times 10^{-2}v$,相关系数 $R=0.998$,这些说明 GOD 的电化学过程是一个表面控制过程。通过下列公式计算:

$$\log k_s = \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log(RT/nFv) - \alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p/2.3RT \quad (1)$$

电子转移常数 k_s 为 1.42 s^{-1} ,电子转移数为 2。这些说明 ZnO/Gr 基底能很好地促进 GOD 的电子传递。

在 pH 5.0 ~ 10.0 范围内研究了 pH 值对 GOD 在电极上电化学行为的影响。在 pH 5.0 ~ 6.0 范围内,氧化还原峰电流随着 pH 值的增加而增大,在 pH 6.0 ~ 8.0 范围内,氧化还原峰电流基本保持不变,而在 pH 8.0 ~ 10.0 范围内,氧化还原峰电流随着 pH 的增大而减小,因此选择 pH 7.0 为最佳 pH 值。而当 pH > 7.0 后, HQ, CT 和 RS 的氧化峰电流随着 pH 的增大而减小。因此支持电解质的选择 pH 7.0。考察了 pH 值对 GOD 峰电位的影响。结果表明,氧化峰和还原峰的峰电位与 pH 值呈良好的线性关系,线性方程的斜率分别为 -51.2 和 -51.6 mV/pH,接近于文献报道可逆反应的理论

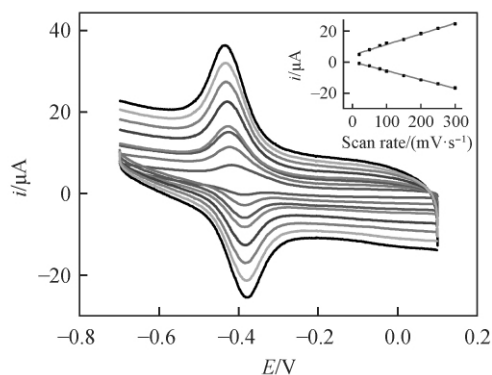


图4 不同扫速的影响

Fig. 4 CVs of GOD/ZnO/Gr/GCE in pH 7.0 PBS at different scan rate of (from in to out): 20, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 mV/s. The inset shows the linear relationship between peak currents and scan rate.

值 -58.6 mV/pH 结合上述结果,说明 GOD 在 GOD/ZnO/Gr/GCE 上是两电子和两质子的电化学过程。

3.3 石墨烯用量及 ZnO 电沉积时间的影响

对于 1 g/L Gr 溶液,在 $0\sim 15\text{ }\mu\text{L}$ 范围内考察了石墨烯用量对 GOD 氧化峰电流的影响。结果表明,在 $0\sim 8\text{ }\mu\text{L}$ 时,峰电流随石墨烯用量增加而增大显著。在 $8\sim 15\text{ }\mu\text{L}$ 峰电流变化不明显。当石墨烯的用量大于 $15\text{ }\mu\text{L}$ 时,则会导致峰电流下降。因此选用 $15\text{ }\mu\text{L}$ 石墨烯悬浮液制备传感器。考察了不同 ZnO 沉积时间对 GOD 峰电流的影响。沉积时间为 $0\sim 150\text{ s}$ 时,峰电流逐渐增大。继续延长沉积时间,峰电流减小。这可能是提高沉积时间使 ZnO 的颗粒过大、过于致密,使电极活性面积下降。因此选择 150 s 为最佳电沉积时间。

3.4 线性范围及检出限

葡萄糖氧化酶对于葡萄糖的氧化具有高效的催化能力。在恒电位 -550 mV 条件下,向 PBS ($\text{pH } 7.0$) 中连续滴加适量 $2.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖时,得到恒定的安培响应。如图 5 所示,随着葡萄糖累计增加,本底电流发生变化,峰电流迅速减小,在 2 s 内可达到最小电流的 95% ,表明电极响应葡萄糖浓度的变化是快速的。图 5 插图 of 稳态电流与葡萄糖浓度的校正曲线图,在最佳实验条件下,催化电流与葡萄糖浓度在 $2.5\times 10^{-6}\sim 1.5\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 范围内呈线性关系,在总浓度 $2.5\sim 72.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ (29 个点) 范围内,催化电流与浓度线性关系为 $i(\text{ }\mu\text{A}) = 24.21 - 0.28C(\text{ }\mu\text{mol/L})$,相关系数为 0.996 ,信噪比 $S/N = 3$ 时,检出限为 $2.4\times 10^{-7}\text{ mol/L}$ 。将此体系下的传感器与其它已报道传感器对葡萄糖的催化性能进行了对比(表 1)。由表 1 可见,GOD/ZnO/Gr/GCE 具有较低的检出限和较好的稳定性,这归于石墨烯与纳米氧化锌对信号的双重放大作用,及其好的生物兼容性。

表观米氏常数 K_m^{app} 是酶与底物反应动力学的重要指标,电化学方法测定米氏常数的方程为:

$$1/i_{ss} = 1/i_{\max} + K_m^{\text{app}}/i_{\max} C \quad (2)$$

其中 C 为底物浓度, i_{ss} 为加入底物后测得的稳态电流, $i_{\max}$ 是加入饱和底物后测得的最大电流。根据米氏方程的倒数形式,以 $1/i_{ss}$ 对 $1/C$ 作图,可得到一条直线,直线在横轴上的截距为 $-1/K_m^{\text{app}}$,据此求得 GOD/ZnO/Gr/GCE 对葡萄糖催化的米氏常数 K_m^{app} 为 $14.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。 K_m 值越大,酶与底物亲和力越小; K_m 值越小,酶与底物亲和力越大。该体系的 K_m^{app} 较小,说明 GOD 在复合膜中有很强的生物活性和催化能力,与葡萄糖有较强的亲和性。

表 1 不同修饰电极的性能

Table 1 Performances of the various types of modified electrodes

修饰电极 Modified electrode	线性范围 Linear range ($\mu\text{mol/L}$)	检出限 LOD ($\mu\text{mol/L}$)	pH	参考文献 Reference
Cu/单壁碳纳米管/nafion/GCE Cu/carbon nanotube/nafion/GCE	$0.25\sim 500$	0.25	12	[13]
GOD/ZnO/金电极 GOD/ZnO/Au electrode	$1\sim 760$	1	7.4	[14]
Ni/溶胶-凝胶陶瓷-石墨电极 Ni/Sol-gel ceramic-graphit electrode	$0.5\sim 5000$	0.1	13	[15]
GOD/金纳米-壳聚糖/GCE GOD/Au nano-chitosan/GCE	$50\sim 1300$	50	7.4	[16]
GOD/壳聚糖/锂皂石/pt 电极 GOD/chitosan/hectorite/Pt electrode	$1\sim 50$	0.3	6.5	[17]
Au 纳米/多孔氧化铝/金电极 Au nano/porous alumina/Au electrode	$1000\sim 42500$	10	7.4	[18]
Cu/ZnO/GCE	$1\sim 2530$	0.2	13	[19]
GOD/ZnO/Gr/GCE	$2.5\sim 1500$	0.24	7.0	This work

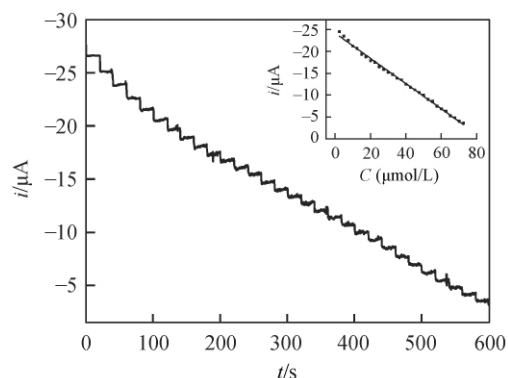


图 5 GOD/ZnO/Gr/GCE 电极对葡萄糖浓度变化的计时电流响应曲线

Fig. 5 Amperometric response of GOD/ZnO/Gr/GCE to successive addition of $2.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ glucose, conditions: -550 mV constant potential, $\text{pH } 7.0$; (inset: the calibration curve of the biosensor).

3.5 传感器的重现性和稳定性

考察了 GOD/ZnO/Gr/GCE 传感器的稳定性。通过将 GOD/ZnO/Gr/GCE 置于 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液中进行循环伏安扫描, 比较氧化峰电流, 考察传感器的稳定性。在开始的前 40 圈, 氧化峰电流逐渐增加, 并在第 40 圈时达到最大, 这时电流值比最初电流增加了约 5%。当继续进行扫描时, 电流逐渐减小, 在第 200 圈时电流值为最初的 103.6%, 这说明固定在复合膜上的 GOD 很难从电极表面脱附下来, 传感器具有很好的稳定性和可重复性。用同样的方法分别制备了 5 根 GOD/ZnO/Gr/GCE, 测定同一份 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液, 电流值的 RSD 为 3.2%, 这表明传感器的制备方法具有较好的重现性。

考察了 GOD/ZnO/Gr/GCE 的使用寿命。将该电极保存在二次蒸馏水中, 并置于 4 °C 下。用该电极每 3 d 测定 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液 1 次, 15、30 和 50 d 后氧化峰电流分别下降到 92.3%, 87.4% 和 85.2%, 表明修饰电极具有良好的稳定性和较长的使用寿命。

3.6 干扰实验

酶一般具有很高的催化选择性, 在大量的碳水化合物存在下, 葡萄糖氧化酶同样对葡萄糖的氧化具有很好的催化选择性。酶传感器的干扰主要来源于电极表面残留的一些电活性物质。在选定的实验条件下, 葡萄糖的浓度为 2.0 μmol/L; 1000 倍的 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Al^{3+} , Mn^{2+} , Cl^- , Br^- , I^- ; 500 倍的 Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} 和 2 倍的抗坏血酸、半胱氨酸、尿酸、多巴胺、蔗糖、果糖和木糖几乎不干扰葡萄糖的测定(氧化峰电流改变 < 5%)。这说明 GOD/ZnO/Gr/GCE 具有很好的选择性。

3.7 样品分析

为了验证方法的实际应用性能, 将 GOD/ZnO/Gr/GCE 应用于人血清中葡萄糖的测定, 结果见表 2。为了验证结果的准确性, 利用血糖分析仪(SBA-40)对同样的血清样品进行了分析, 从表 2 可见, 两种方法的测定结果很接近, 说明所构建的传感器可用于实际样品分析。

表 2 测定血清中的葡萄糖 ($n=4$)

Table 2 Determination results of glucose in human serum ($n=4$)

样品 Sample	GOD/ZnO/Gr/GCE		血糖分析仪 Blood sugar-glucose analyzer	
	测定值 Found (μmol/L)	RSD (%)	测定值 Found (μmol/L)	RSD (%)
1	7.12	2.5	7.05	2.8
2	6.85	3.2	6.80	2.4
3	7.32	4.1	7.36	3.1
4	6.73	3.5	6.80	2.6

4 结 论

将石墨烯和 ZnO 复合膜修饰玻碳电极制成电化学传感器用于葡萄糖的灵敏测定。此修饰电极具有良好的导电性能、催化性能、稳定性和重现性, 这归于石墨烯和 ZnO 大的比表面积、好的导电性能和生物兼容性能, 能很好地保持葡萄糖氧化酶的生物活性。本方法具有高的灵敏度和宽的线性范围, 可用于实际样品的分析测定。

References

- 1 DU Yun-Dong, GAO Xiu-Feng, LI Yong-Sheng. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2008**, 36(7): 991-994
杜运动, 高秀峰, 李永生. *分析化学*, **2008**, 36(7): 991-994
- 2 Vasilarou A M G, Georgiou C A. *J. Chem. Educ.*, **2000**, 77(10): 1327-1329
- 3 GAO Xue-Jin, LIU Guang-Sheng, CHENG Li, GENG Ling-Xiao, XUE Ji-Xing, JIA Zhi-Yang, QI Yong-Sheng, WANG Pu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2008**, 36(11): 1563-1566
高学金, 刘广生, 程丽, 耿凌霄, 薛吉星, 贾之阳, 齐咏生, 王普. *分析化学*, **2008**, 36(11): 1563-1566
- 4 DONG Xiao-Dong, HOU Wan-Ling, SU Shao-Zhe. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2000**, 28(5): 656-658
董晓东, 侯宛玲, 苏绍哲. *分析化学*, **2000**, 28(5): 656-658
- 5 GENG Yue, CUI Hua-Gao, ZHAO Xiang-Xuan. *Shandong Normal Univ.*, **2000**, 15(4): 436-438
耿越, 崔华高, 赵相轩. *山东师范大学学报*, **2000**, 15(4): 436-438
- 6 Yang H, Chuan T D, Kim Y T. *Biosens Bioelectron.*, **2002**, 17(3): 251-259
- 7 Guo S J, Wen D, Zhai Y, Dong S J, Wang E K. *ACS Nano*, **2010**, 4(7): 3959-3968
- 8 Zhou M, Zhai Y M, Dong S J. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(14): 5603-5613

