

基于 Nafion/碳纳米粒子修饰的葡萄糖传感器

汪美芳^{1,2} 张伟¹ 方宾^{*1}

¹(安徽师范大学化学与材料科学学院, 芜湖 241000) ²(皖南医学院化学教研室, 芜湖 241000)

摘 要 采用滴涂法制备了 Nafion/碳纳米粒子复合物修饰玻碳电极, 该电极对 H_2O_2 具有良好的电催化氧化性能。还利用滴涂法制备了 Nafion/碳纳米粒子复合物包裹的葡萄糖酶电学生物传感器, 该生物传感器对葡萄糖有着良好的电催化作用。应用该传感器对葡萄糖进行了检测, 检测线性范围为 $2.0 \times 10^{-6} \sim 6.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 检出限为 $1.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($S/N=3$), 实验结果表明该传感器具有良好的稳定性、重现性和抗干扰能力。对小鼠血清样品中的葡萄糖进行检测, 结果令人满意。

关键词 碳纳米粒子; 过氧化氢; 葡萄糖; 电化学传感器

1 引言

在生物传感器领域, 酶电极占有重要地位^[1]。但由于酶通常具有较大的分子量, 其氧化还原活性中心被厚的蛋白质层包裹, 酶的活性中心往往难以与电极发生直接电子转移^[2]。通过对电极进行修饰的方法可改善酶的活性中心与电极的作用, 实现电子的直接传递^[3~5]。在酶传感器中使用纳米材料, 不仅可以增加酶的吸附量和稳定性, 而且可以提高酶的催化活性, 显著提高酶电极的电流响应灵敏度^[6,7]。碳基纳米材料, 由于其独特的纳米结构, 既具有良好的导电性, 又能保持蛋白酶的生物活性, 使其在生物传感器及生物反应系统中具有极大的应用潜力^[8,9]。

碳纳米粒子 (CNP) 是一种新型的纳米材料, 可明显促进生物分子的电子传递作用和生物活性的催化作用。文献 [10,11] 采用 Nafion 分散碳纳米材料, 由于 Nafion 上富含大量的亲水性磺酸基团, 具有较好的水溶性, 而且 Nafion 膜也具有较好的阳离子选择性和生物相容性^[12], 因此常被用于电极表面的修饰和安培型传感器的构建, 选用 Nafion 分散碳纳米材料, 可有效提高碳纳米材料的分散性, 并简化传感器的制作并改善传感器的响应性能。参考文献 [13] 制备了 Nafion/碳纳米粒子复合物, 并将酶电极技术与纳米技术相结合, 研制出 Nafion/碳纳米粒子修饰的葡萄糖生物传感器。此传感器测量范围、重复性和测量速度等性能都比以往方法有明显优势。碳纳米粒子的这些特性对于提高生物检测的灵敏度和稳定性具有重要意义^[14]。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI660B 电化学工作站 (上海辰华仪器公司); JL-480 型超声波清洗机 (上海杰理科技有限公司); 电化学测量采用三电极系统: 玻碳电极 ($\Phi = 3 \text{ mm}$) 或修饰电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为对电极。葡萄糖 (中国医药集团上海化学试剂公司), H_2O_2 (上海化学试剂公司), 葡萄糖氧化酶 (GOD, Sigma 公司); 其它试剂均为分析纯; 不同 pH 值磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 25 mmol/L); 实验用水为二次石英蒸馏水; 实验在室温下进行。

2.2 电极的处理

将玻碳电极 ($\Phi = 3 \text{ mm}$) 在金相砂纸上打磨, 再依次在 $1.0, 0.3$ 和 $0.05 \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浊液上抛光成镜面, 再在无水乙醇和二次蒸馏水中分别超声洗涤 5 min , 用氮气吹干, 待用。

2.3 修饰玻碳电极制备

参照文献 [13] 的方法制备 Nafion/碳纳米粒子复合物, 操作如下: 将洁净玻璃板置于燃烧蜡烛的上

2009-04-25 收稿; 2009-07-13 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20675001) 资助课题

* E-mail: binfang_47@yahoo.com.cn

方,收集玻板上的蜡烛烟尘,将 0.1 mg 烟尘溶解于 10 mL 1% Nafion 乙醇溶液中,超声 90 min 后,即得到 Nafion/碳纳米粒子复合物。以 5000 r/min 离心 10 min,除去粒径较大的产物。将 10 μ L Nafion/碳纳米粒子复合物滴涂于处理好的玻碳电极上,待溶剂挥发至干,即制得 Nafion/碳纳米粒子复合物修饰的玻碳电极。

将葡萄糖氧化酶加入 Nafion/碳纳米粒子复合物中,葡萄糖氧化酶的含量为 5 g/L,向处理好的玻碳电极上滴涂 10 μ L Nafion/碳纳米粒子/葡萄糖氧化酶复合物,自然干燥后,用 PBS 缓冲液冲洗,制备的酶电极放在 4 $^{\circ}$ C 的冰箱内保存备用。

2.4 测试方法

电化学实验均在 10 mL 25 mmol/L PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 中进行。实验时,加入适量 H_2O_2 或葡萄糖溶液,采用循环伏安法和计时电流法进行测试。循环伏安实验在静止的电解质溶液中进行;计时安培实验在电磁搅拌下进行。待加上操作电压,背景电流达到稳定值后,迅速加入一定浓度的 H_2O_2 或葡萄糖溶液到测量池中,相应的电流变化值作为响应信号。电化学测量均在室温条件下进行。除非特别说明,所有测试的底液均通高纯氮气 20 min 除氧,并在整个实验过程中保持氮气气氛。

3 结果与讨论

3.1 碳纳米粒子的 TEM, SEM 表征

图 1A 为制备的碳纳米粒子 TEM 图像。由图 1 可见,碳纳米粒子表面包裹着一层 Nafion 膜,制备的碳纳米粒子有良好的分散性,基本没有发生团聚现象,直径在 20 ~ 100 nm 范围内。在 4 $^{\circ}$ C 条件下,将 Nafion/碳纳米粒子复合物静置 10 d 仍无团聚现象出现,表明碳纳米粒子在 Nafion 乙醇溶液中很稳定。

将 Nafion/碳纳米粒子复合物用乙醇冲洗离心后所得纯净碳纳米粒子进行 SEM 表征 (图 1B),净化后的碳纳米粒子呈球状,直径为 20 ~ 100 nm 范围内,与 TEM 观察的结果相符。

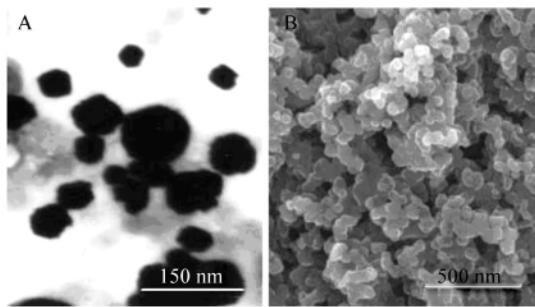


图 1 Nafion/碳纳米粒子复合物的透射电镜图 (A) 和碳纳米粒子的扫描电镜图 (B)

Fig. 1 TEM images of resulting Nafion/carbon nanoparticles (CNPs) (A) and SEM images of resulting CNPs (B)

3.2 Nafion/碳纳米粒子复合物修饰玻碳电极对 H_2O_2 的响应

碳纳米粒子具有独特的生物相容性和电化学催化性能。图 2 为 10 mmol/L H_2O_2 在不同电极上的循环伏安图。实验表明,Nafion/碳纳米粒子修饰玻碳电极对 H_2O_2 的循环伏安响应明显增强,还原峰电流显著增高,过电位明显降低,在裸玻碳电极上的 H_2O_2 还原电位从 -0.35 V 开始,Nafion/碳纳米粒子修饰玻碳电极 H_2O_2 还原电位从 -0.05 V 开始,过电位降低 300 mV。

实验发现,Nafion/碳纳米粒子膜的厚度与 H_2O_2 的修饰量直接相关,因此考察了滴涂不同体积的 Nafion/碳纳米粒子对电极性能的影响。结果显示,当 Nafion/碳纳米粒子体积小于 10 μ L 时,电极对 H_2O_2 的响应电流会随修饰体积的增大而增大;而当修饰体积在 10 ~ 15 μ L 时,电极对 H_2O_2 的响应电流相差不大;修饰体积大于 15 μ L 时,电极对 H_2O_2 的响应电流反而减小。这可能是修饰膜较厚,从而使响应电流反而减小。因此 Nafion/碳纳米粒子体积选用 10 μ L。

在优化条件下进行计时安培测定,图 3 为 Nafion/碳纳米粒子修饰电极在 -0.1 V 电位下对 0.5 mmol/L H_2O_2 的响应曲线。由图 3 可见,Nafion/碳纳米粒子修饰电极对加入 H_2O_2 产生相当灵敏、快速和稳定的电流反应,电极对 H_2O_2 的响应时间小于 5 s,表明 Nafion/碳纳米粒子修饰电极对 H_2O_2 具有优良的催化还原能力。测定 H_2O_2 的线性范围为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ mol/L,传感器检出限为 1.0×10^{-6} mol/L。经过 21 d 后,传感器仍能保持约 90.6% 的初始响应电流值。

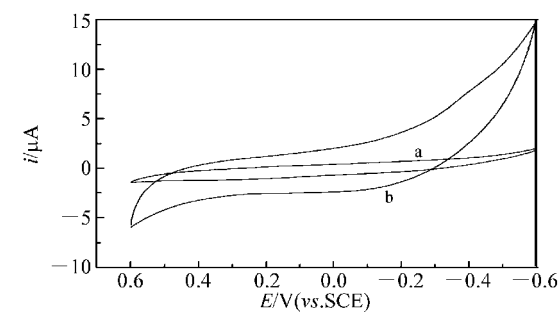


图 2 10 mmol/L H_2O_2 在裸玻碳电极 (a) 及 Nafion/碳纳米粒子复合物修饰玻碳电极 (b) 上的循环伏安图

Fig.2 CVs of bare (a) and nafion/CNPs modified (b) GC electrode in 25 mmol/L PBS solution at pH 7.4 with 10 mmol/L H_2O_2 vs saturated calomel electrode (SCE)

通氮气饱和 (Saturated with N_2), 扫描速度 (Scan rate) 50 mV/ s。

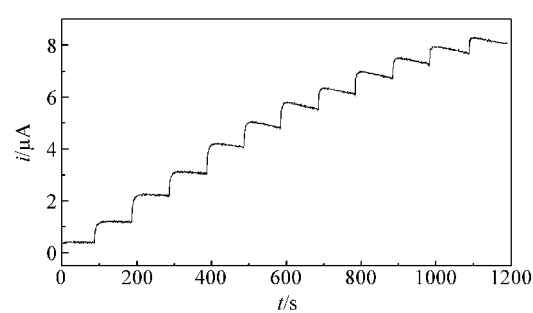


图 3 Nafion/碳纳米粒子复合物修饰玻碳电极在 PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 中的 H_2O_2 的电位响应曲线

Fig.3 Successive amperometric response of Nafion/CNPs film modified electrode to H_2O_2 in 25 mmol/L PBS (pH 7.4) 通氮气饱和 (Saturated with N_2); 工作电位 (Potential): -0.1 V 。每次加入 0.5 mmol/L H_2O_2 (The H_2O_2 addition each time is 0.5 mmol/L as indicated)。

3.3 传感器对葡萄糖的计时电流响应

在最优实验条件下,用计时电流法测定传感器对葡萄糖的响应电流 (图 4)。制得的传感器对葡萄糖具有较快的响应时间,在 4 s 内达到稳态电流 95%。在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 6.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内,响应电流与葡萄糖浓度呈线性关系,相关系数为 0.9786;检出限为 $1.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($S/N=3$)。

3.4 传感器的选择性

图 5 是在底液中分别加入 0.1 mmol/L 葡萄糖,0.2 mmol/L 抗坏血酸,0.2 mmol/L 尿酸,0.2 mmol/L L-半胱氨酸和 0.01 mmol/L 葡萄糖的计时电流响应图。可以看到,当加入葡萄糖之后,响应电流迅速增加,并在短时间内达到平衡。而加入大浓度抗坏血酸、尿酸以及 L-半胱氨酸后,响应电流值几乎没有发生改变。这是因为 GOD 对葡萄糖的专一性催化以及 Nafion 膜的选择性,使制得的传感器对葡萄糖具有良好的选择性。

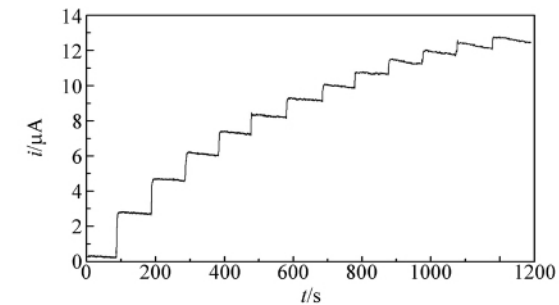


图 4 传感器在 25 mmol/L PBS (pH 7.4) 含葡萄糖浓度 $5.0 \times 10^{-4} \sim 6.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的计时电流响应曲线

Fig.4 Amperometric response of biosensor in 25 mmol/L PBS (pH 7.4) containing glucose from 5.0×10^{-4} to $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

通氮气饱和 (Saturated with N_2); 工作电位 (Potential): -0.1 V 。

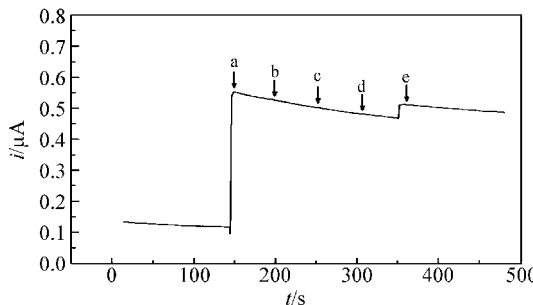


图 5 几种干扰物质对葡萄糖测定的影响

Fig.5 Effect of possible interferents in glucose biosensors

a. 0.1 mmol/L 葡萄糖 (Glucose); b. 0.2 mmol/L 抗坏血酸 (Ascorbic acid); c. 0.2 mmol/L 尿酸 (Uric acid); d. 0.2 mmol/L L-半胱氨酸 (L-cysteine); e. 0.01 mmol/L 葡萄糖 (Glucose)。

3.5 传感器的重现性和稳定性

在葡萄糖溶液浓度为 0.1 mmol/L 时,重复测定 10 次,相对标准偏差为 2.8%。实验后将传感器于 4℃ 下悬于 PBS 溶液中保存,每隔 7 d 进行检测,28 d 后其响应信号为初始信号的 84.6%,表明此传感器具有较好的稳定性。这主要是因为碳纳米粒子具有良好的生物相容性,所制得的 Nafion/碳纳米粒子复合膜能将 GOD 牢固地固定在电极表面,并保持其良好的生物活性。

3.6 实际样品测试

用传感器对小鼠血清中的葡萄糖进行检测(见表 1),回收率在 98.6% ~ 103.4% 之间。结果表明,此葡萄糖传感器的线性范围和灵敏度令人满意,且传感器具有响应速度快、稳定性好、制作简单的优点。可望用于新型葡萄糖生物传感器的制备。

表 1 生物传感器对小鼠血液中葡萄糖浓度测试结果
Table 1 Analytic results of glucose concentration in rat serum using biosensor

样品号 Sample	测量值 Found (<i>n</i> = 4, mmol/L)	RSD (%)	加入量 Added (mmol/L)	回收率 Recovery (%)
1	5.02	2.03	0.1	102.3
2	5.35	3.03	0.1	98.6
3	5.40	3.19	0.1	103.4

References

1 Gooding J J, Praig V G, Hall E A H. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(11): 2396 ~ 2402
2 Schuhmann W, Ohara T J, Schmidt H L, Heller A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113(4): 1394 ~ 1397
3 Narasimhan K, Wingard L B. *Anal. Chem.*, **1986**, 58(14): 2984 ~ 2987
4 Savitri D, Mitra C K. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1998**, 47(1): 67 ~ 73
5 Dai Z H, Ni J, Huang X H, Lu G F, Bao J C. *Bioelectrochemistry*, **2006**, 70(2): 250 ~ 256
6 HOU Xian-Quan(侯完全), REN Xiang-Ling(任湘菱), TANG Fang-Qiong(唐芳琼), CHEN Dong(陈东), WANG Zheng-Ping(王正平). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 35(3): 303 ~ 306
7 TANG Fang-Qiong(唐芳琼), SHEN Ji-Feng(沈继锋), ZHANG Jin-Fang(张金芳), ZHANG Gai-Lian(张改莲). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **1999**, 20(4): 634 ~ 636
8 REN Xiang-Ling(任湘菱), TANG Fang-Qiong(唐芳琼). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), **2002**, 60(3): 393 ~ 397
9 YIN Feng(尹峰), ZHAO Zi-Xia(赵紫霞), WU Bao-Yan(吴宝艳), WANG Xin-Sheng(王新胜), WANG Yan-Yan(王艳艳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(7): 1021 ~ 1024
10 Wang J, Musameh M, Lin Y H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(9): 2408 ~ 2409
11 Fan Z, Harrison D J. *Anal. Chem.*, **1992**, 64(11): 1304 ~ 1311
12 XU Yin-Yu(许银玉), WU Zhao-Yang(吴朝阳), CHEN Li-Guo(陈利国), WU Zheng-Ming(吴争鸣), SHEN Guo-Li(沈国励), YU Ru-Qin(俞汝勤). *Chemical Sensors*(化学传感器), **2006**, 26(2): 48 ~ 53
13 Zhang W, Wang G F, Zhang N, Zhang C H, Fang B. *Chemistry Letters*, **2009**, 38(1): 28 ~ 29
14 WANG Yue-Rong(王月荣), HU Ping(胡坪), LIANG Qiong-Lin(梁琼麟), LUO Guo-An(罗国安), WANG Yi-Ming(王义明). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(8): 1011 ~ 1016

Amperometric Glucose Biosensor Based on Carbon Nanoparticles

WANG Mei-Fang^{1,2}, ZHANG Wei¹, FANG Bin^{* 1}

¹(College of Chemistry and Materials, Anhui Normal University, Wuhu 241000)

²(Department of Chemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241000)

Abstract The nafion/carbon nanoparticles(CNPs) composite film modified glassy carbon electrode was prepared by dropwise method, and the electrocatalyst of H₂O₂ at Nafion/CNPs modified electrode was investigated. The results show that electrocataytic activitie for detection of H₂O₂ at the modified electrode is very good. The biosensing application of CNPs was demonstrated through fabrication of an electrochemical biosensor. The biosensor was constructed by encapsulating glucose oxidase in the Nafion/CNPs composite film. The biosensor had good electrocatalytic activity toward oxidation of glucose. The glucose biosensor shows a linear range from 2.0 × 10⁻⁶ to 6.0 × 10⁻³ mol/L with a detection limit of 1.6 × 10⁻⁶ mol/L. The biosensor shows high stability, good reproducibility and can avoid the commonly coexisted interference. In addition, real rat serum samples were analyzed by this biosensor with satisfactory results.

Keywords Carbon nanoparticles; Hydrogen peroxide peroxide; Glucose; Electrochemical biosensor

(Received 25 April 2009; accepted 13 July 2009)