

葡萄糖分子印迹电化学传感器的研制及其应用

付 丛¹, 韦宏伟¹, 杜 娟², 李建平^{*1}

(1. 桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西桂林 541004;

2. 桂林市环境监测中心站, 广西桂林 541002)

摘 要: 本文结合分子印迹技术与电化学检测手段, 制备了高选择性、高灵敏度和价格低廉的分子印迹电化学传感器, 并利用该传感器对食品中的葡萄糖进行定量分析。由于该分子印迹膜为非导电膜, 本实验以铁氰化钾-亚铁氰化钾离子作为底液与电极之间的探针并通过铁氰化钾-亚铁氰化钾氧化还原电流信号的变化来对葡萄糖浓度进行间接测定。实验结果表明, 在 $0.01 \sim 2 \mu\text{mol/L}$ 的范围内, 葡萄糖浓度的变化与铁氰化钾-亚铁氰化钾氧化还原电流信号变化呈线性关系, 检出限为 $7.68 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。该传感器的制备和测量方法简单, 可用于实际样品的检测。

关键词: 葡萄糖; 分子印迹电化学传感器; 门效应

中图分类号: O657.15 文献标志码: A 文章编号: 1006-6144(2014)02-181-05

葡萄糖是自然界中分布最广且最为重要的一种可溶性单糖, 但在样品中多与其它种类糖共同存在。因此, 研究高选择性检测方法对食品中葡萄糖的测定具有重要意义。目前食品中葡萄糖的经典检测方法是菲林氏溶液氧化还原滴定法, 但该方法检测结果也只是近似值且灵敏度较低。此外, 葡萄糖的常规测定方法还有葡萄糖自动分析仪法^[1]、酶比色法及其他比色法等^[2]。作为电化学生物传感器中最重要的研究内容之一, 葡萄糖生物传感器近十年取得了重大的进展^[3], 人们研究开发了多种葡萄糖酶传感器^[4-5]。

分子印迹电化学传感器是将分子印迹技术与电化学检测手段相结合制成的传感器, 它具备高灵敏度、高选择性、自动化、易于微型化和价格低廉等优势^[6]。Cheng 等^[7]研制了电容型分子印迹葡萄糖传感器, 但灵敏度不高。本实验以邻氨基酚为功能单体, 通过电化学聚合制备了一种可用于检测葡萄糖的分子印迹电流型传感器。由于葡萄糖是非电活性物质, 对于非电活性的印迹分子, 可以利用门控制效应进行测定^[8], 即利用模板分子离开膜时留下的孔穴测量探针分子进入孔穴后进行电极反应产生的电流^[9]。实验表明, 该传感器对葡萄糖分子具有很好的响应, 已成功用于实际样品中葡萄糖的定量检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660C 型电化学工作站(上海辰华仪器公司), 三电极体系: 金电极为工作电极, 铂丝电极为对电极, Ag/AgCl 为参比电极; GS28-B 型电子恒速搅拌器(上海安亭电子仪器厂); pH5-2C 型精密酸度计(上海雷磁精密仪器有限公司)。

氯化钾, 葡萄糖, 无水乙醇, 硫酸, 邻氨基酚等均购于广州化学试剂厂; 探针为铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液; 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=5.5), 用 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 溶液配制; 实验所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

收稿日期: 2013-01-04 修回日期: 2013-02-25

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21165007); 广西自然科学基金(No. 2012GXNSFAA053032)

* 通讯作者: 李建平, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事电化学传感器的研究。

1.2 金电极的预处理

将金电极在麂皮上用 $0.05 \mu\text{m}$ 的氧化铝粉进行抛光, 用二次蒸馏水洗净然后用硝酸(1+1)浸泡 5 min, 取出电极后再在无水乙醇中浸泡 5 min, 最后用二次蒸馏水反复冲洗。将冲洗干净的电极置于 0.5 mol/L 的 H_2SO_4 中进行循环伏安法扫描, 直到响应电流值达到稳定为止。

1.3 分子印迹传感器的制备

将处理后的金电极置于含有 $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 邻氨基酚和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 葡萄糖的 PBS 中($\text{pH} = 5.5$), 在 $-0.2 \sim 0.8 \text{ V}$ 之间用循环伏安法扫描 30 圈, 扫速为 50 mV/s 。聚合完成后取出电极, 置于 70% 的乙醇中搅拌洗脱 6 min, 以除去印迹聚合膜中的葡萄糖及膜表面的其他吸附物质, 从而获得具有识别葡萄糖分子功能的印迹传感器。

非分子印迹传感器是在相同的实验条件下进行制作, 其区别仅在于电聚合印迹膜时不加入葡萄糖。

1.4 电化学测量

所有的电化学测量均在 0.1 mol/L 铁氰化钾溶液中进行, 扫描范围为 $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$, 扫速为 0.1 V/s 。

2 结果与讨论

2.1 分子印迹膜的聚合

图 1 是金电极在含有邻氨基酚和葡萄糖的 PBS 中进行电化学聚合印迹膜的循环伏安图。由图可知, 在电化学聚合的过程中, 随着扫描圈数的增加, 电流响应信号强度逐渐降低, 这意味着在电极表面上缓慢形成一层导电性相对较差的葡萄糖分子印迹膜, 且随着电化学聚合的进行而逐渐变厚。

2.2 分子印迹膜的表面特征

本实验在 0.1 mol/L 铁氰化钾溶液中以循环伏安法来验证分子印迹膜对葡萄糖的识别能力。由于该分子印迹膜为非导电膜, 且葡萄糖为非电活性物质, 所以选用铁氰化钾-亚铁氰化钾作为底液和电极之间的探针来表征印迹膜的特性。印迹膜经过洗脱后, 留下的印迹孔穴可为探针离子对提供传质通道, 当电极置于 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 葡萄糖溶液中进行重吸附时, 由于印迹孔穴对葡萄糖分子的特异性识别, 葡萄糖分子又重新回到印迹空穴中, 从而阻碍了底液和金电极表面之间的电子传质过程, 导致电流响应信号发生相应的改变。通过以上变化可以得出铁氰化钾-亚铁氰化钾在传感器上的电流响应信号与葡萄糖浓度之间的关系。如图 2 所示, 图中曲线 a 和曲线 b 分别为金电极和聚膜后的电极在铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液中的循环伏安曲线, 这一变化过程是由于在金电极表面形成了分子印迹膜从而增大了探针离子在电极表面上的氧化还原反应的难度, 因此曲线 a 的峰电流直接降低到曲线 b; c 是电极经洗脱后的曲线, 该过程将模板分子(葡萄糖)从印迹膜上洗脱下来, 所形成的印迹孔穴为探针离子对提供大量的传质通道, 使曲线 c 的峰电流明显大于聚膜后的曲线 b 的峰电流; 曲线 d 是重吸附后的循环伏安曲线, 即洗脱模板分子后的传感器对葡萄糖进行重新吸附的过程, 葡萄糖再次进入分子印迹膜上的印迹孔穴, 堵塞了传质通道使得峰电流降低并接近曲线 b。

从曲线 a、b、c、d 的变化过程可以得出以下结论: 该传感器上的分子印迹膜对葡萄糖具有特异性识别功能。同样, 将非分子印迹传感器进行同样的洗脱、重吸附试验, 由于非分子印迹膜上没有模板分子, 洗脱前后印迹膜没有发生变化, 所以其在铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液

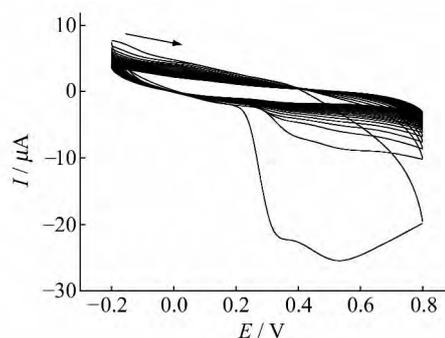


图 1 电聚合分子印迹膜的循环伏安图
Fig. 1 Cyclic voltammograms of the electropolymerization of the molecularly imprinted membrane

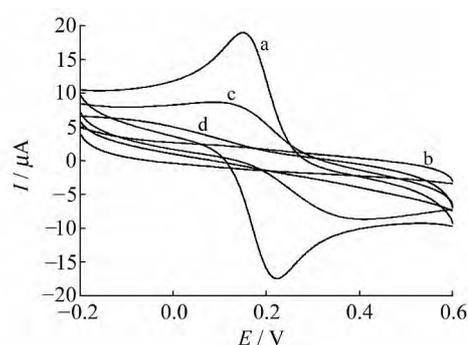


图 2 分子印迹聚合膜在 0.1 mol/L 铁氰化钾溶液中的循环伏安图
Fig. 2 Cyclic voltammograms of molecularly imprinted membrane in 0.1 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution
a. bare gold electrode; b. MIP-electrode; c. MIP-electrode after template removal; d. MIP-electrode after rebinding in $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ glucose solution.

由于非分子印迹膜上没有模板分子, 洗脱前后印迹膜没有发生变化, 所以其在铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液

中的循环伏安曲线几乎不变。

2.3 分子印迹膜形成条件的选择

2.3.1 聚合底液的选择 实验分别研究了在 HAc-NaAc、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 、硼酸-硼砂、Tris-HCl 等缓冲液中进行电聚合时得到的印迹膜的性能。结果发现在这几种缓冲溶液中都能聚合成膜,但是经过多次洗脱和重吸附处理后,发现在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中电聚合得到的分子印迹膜稳定性明显优于其他缓冲液,因此选择 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液作为聚膜底液。

2.3.2 功能单体与模板分子比例及浓度的优化 实验选择葡萄糖模板分子的浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 分别研究了功能单体与模板分子的比例为 10:1、8:1、6:1、5:1、4:1、3:1 时膜的性能。结果表明,当模板分子的浓度较大时,聚合的印迹膜不够稳定,导致分子印迹膜从电极表面上脱落下来,且印迹孔穴容易塌陷。当模板分子的浓度较小时,印迹膜上的印迹孔穴数量也较少,产生的电化学信号较弱,信噪比较高。实验发现,当 $n_{\text{功能单体}}:n_{\text{模板分子}}=4:1$ 时,即聚合液中功能单体的浓度为 $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,得到的分子印迹膜最为理想。

2.4 模板分子洗脱时间及重吸附时间的优化

实验以 70% 的乙醇作为洗脱液,分别研究了不同的洗脱时间对分子印迹传感器的影响。当洗脱时间为 6 min,传感器在铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液中的响应电流值达到最大值且稳定,所以本实验选择 6 min 为洗脱时间。重吸附是将洗脱后留有印迹孔穴的传感器浸入含有模板分子的溶液中进行分子识别。实验中分别以 8、10、12、15、18、20、22、25 min 作为重吸附时间对传感器的吸附性能进行考察,当吸附时间达到 20 min 时,印迹膜对模板分子的重吸附能力趋于饱和。因此选择 20 min 为重吸附时间。

2.5 传感器的稳定性与重现性

传感器的稳定性和重现性是评判传感器优劣的一项重要参数。传感器的稳定性是通过将印迹膜进行多次的洗脱、重吸附后对 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的葡萄糖溶液进行检测来考察的。经过 30 次重复洗脱-吸附后传感器的电化学信号变化如图 3 所示。结果表明,随着洗脱-吸附过程的进行,电化学信号也缓慢降低,相对于初始值,逐次记录的 30 次的 ΔI 变化率均维持在 5% 以内,洗脱-吸附过程达到 40 次后电化学信号约下降了 8%,此时得重新聚合印迹膜。

传感器的重现性是通过用相同方法制备的五支不同传感器对 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的葡萄糖进行检测来研究的。实验发现检测结果的相对标准偏差(RSD)为 4.6%,说明不同的传感器之间具有良好的重现性。

2.6 工作曲线

将分子印迹传感器在不同浓度的葡萄糖溶液中进行重吸附,每一次吸附完全后将电极置于 0.1 mol/L 铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液中进行循环伏安法扫描,并读取循环伏安扫描的氧化峰与还原峰峰电流之差值($\Delta I = I_{\text{pc}} - I_{\text{pa}}$)。如图 4 所示。结果发现在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围内, ΔI 与葡萄糖浓度对数 $\lg c$ 呈线性关系,其线性方程为: $\Delta I = -3.017 \lg c - 6.294$, 相关系数 $r = 0.996$ 。

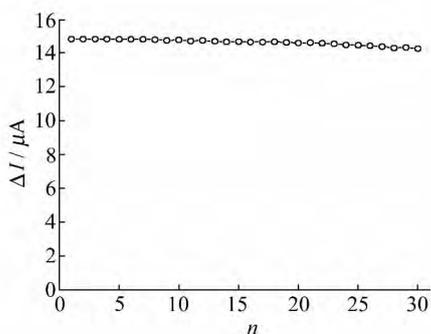


图 3 分子印迹传感器在 10^{-7} mol/L 葡萄糖溶液中经 30 次重复洗脱-重吸附步骤的 ΔI 变化

Fig. 3 The ΔI of the sensor in 10^{-7} mol/L glucose solution after repeating elution-readsorption procedure for 30 times

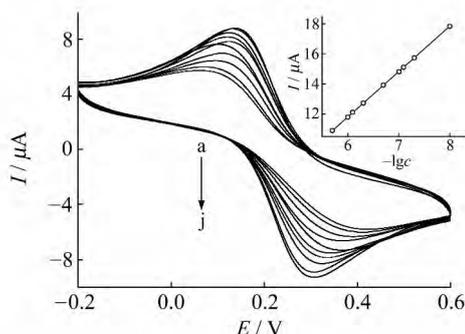


图 4 工作曲线的循环伏安图

Fig. 4 The cyclic voltammograms of working curve

Inset figure is the calibration curve; a → j: 0, 0.01, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$ glucose solution, respectively.

2.7 干扰实验

由于果糖、木糖与葡萄糖有相似的结构,因此选择果糖、木糖为主要干扰物质进行干扰实验。此外,乳糖、鼠李糖、蔗糖以及苏氨酸、脯氨酸等氨基酸类物质也同时被选作干扰物质来进行实验。分别在 1.0×10^{-7} mol/L 的葡萄糖溶液中加入上述干扰物质,干扰组分与葡萄糖的比例为 100:1。结果发现,在给定的 $\pm 5\%$ 误差范围内,这些物质不影响葡萄糖的测定。

3 样品分析

本实验选择苹果和啤酒作为分析样品。取约 10 mL 啤酒于烧杯中,不断搅拌,直至无明显的 CO_2 气体泡沫为止,然后取 1 mL 啤酒定容至 500 mL,摇匀,测定时吸取 2 mL 备用液,其他操作方法如上所述。苹果中含有葡萄糖、果糖等多种糖类,这些小分子糖具有很好的水溶性,因此可以直接用水提取。准确称取 100 g 苹果果肉于研钵中进行研磨,再用 500 mL 的二次蒸馏水将葡萄糖从果肉中提取出来,并将得到的果汁定容至 1 L,然后取 1 mL 该溶液稀释至 250 mL 后,再吸取适量试液按实验方法进行检测。

分别用参考文献方法^[10-11]同时对啤酒样品和苹果样品进行检测,结果如表 1 和表 2。相对于现有葡萄糖检测方法,该方法结果满意。

表 1 啤酒样品中葡萄糖浓度的检测* ($n=5$)

Table 1 The detection of glucose concentrations in beer samples* ($n=5$)

Sample	Determined (mol/L)	Original (mol/L)	RSD (%)	Average (mol/L)	Added (mol/L)	Found (mol/L)	Recovery (%)
1	1.00×10^{-7}	5.01×10^{-5}			1.0×10^{-7}	2.10×10^{-7}	100.96
2	0.93×10^{-7}	4.65×10^{-5}	3.72	4.85×10^{-5}	4.0×10^{-7}	4.88×10^{-7}	98.98
3	0.98×10^{-7}	4.88×10^{-5}			7.0×10^{-7}	8.03×10^{-7}	100.75

*: According to relevant national standards^[12], the concentrations of glucose in beer samples should be no more than 4.8×10^{-4} mol/L.

表 2 苹果实际样品中葡萄糖的检测**

Table 2 The detection of glucose concentrations in apple samples**

Samples	Determined (mol/L)	Original (g/100g)	RSD (%)	Average (g/100g)	Added (mol/L)	Found (mol/L)	Recovery (%)
1	0.77×10^{-7}	3.48			1.0×10^{-7}	1.68×10^{-7}	94.92
2	0.76×10^{-7}	3.43	4.31	3.37	4.0×10^{-7}	4.79×10^{-7}	100.63
3	0.71×10^{-7}	3.21			7.0×10^{-7}	8.18×10^{-7}	106.09

The results of HPLC^[13] and IR^[14] determination shows that the contents of glucose in apples are around 2.5-3.5 g for 100 g apple sample.

4 结论

本文以邻氨基酚为功能单体制作了一种新型的葡萄糖分子印迹传感器,该传感器具有良好的选择性、灵敏度和稳定性,且制作方法简便易行。对实际样品的检测效果令人满意,在食品研究领域有着很好的应用前景。

参考文献:

- [1] FAN Xiao-ping(樊晓萍), ZHANG Huan-sheng(张环生), ZHAO Xiu-feng(赵秀凤), WANG Guo-ping(王国平). Int J Lab Med(国际检验医学杂志)[J], 2006, 27(3): 287.
- [2] CHEN Zhen-mao(陈贞茂), YANG Chun-li(杨春丽), SHI Li-jie(石立杰), HUANG Ping(黄萍), LI Dong-hui(李东辉). J Anal Sci(分析科学学报)[J], 2007, 23: 515.
- [3] SHI Wen-tao(石文韬), DI Jing(邸静), MA Zhan-fang(马占芳). Prog Chem(化学进展)[J], 2012, 24(4): 568.
- [4] XIONG Zhi-gang(熊志刚), LI Jian-ping(李建平), TANG Li(唐丽). Chinese J Anal Chem(分析化学)[J], 2010, 38: 800.
- [5] LIU Su-qin(刘素芹), DAI Gao-peng(戴高鹏). J Anal Sci(分析科学学报)[J], 2012, 28: 91.

- [6] LUAN Chong-lin(栾崇林), LI Ming-jie(李铭杰), LI Zhong-jin(李仲谨). Chem Ind Engin Prog(化工进展)[J], 2011, **30**(2):353.
- [7] Cheng Z, Wang E, Yang X. Biosens Bioelectron[J], 2001, **16**(3):179.
- [8] ZHANG Lian-ming(张连明), LI Jian-ping(李建平), PAN Hong-cheng(潘宏程). Chinese J Anal Chem(分析化学)[J], 2012, **40**(40):1025.
- [9] Kugimiya A, Takeuchi T. Biosens Bioelectron[J], 2001, **16**(9):1059.
- [10] ZHOU Ya-xuan(周雅璇), GUO Xiu-min(果秀敏), ZAI Tong-yu(翟彤宇), YANG Xu-zhe(杨旭哲) SONG Shuang-jv(宋双居). Chinese J Health Lab Tech(中国卫生检验杂志)[J], 2005, **15**:194.
- [11] LIU Yan-de(刘燕德), YING Yi-bin(应义斌), FU Xia-ping(傅霞萍). Spectrosc Spectr Anal(光谱学与光谱分析)[J], 2005, **11**:1793.
- [12] GB/T 5009.7-2008, Determination of Reducing Sugar in Foods(食品中还原糖的测定)[S].
- [13] ZHAO Zun-xing(赵尊行), SUN Yan-hua(孙衍华). J Shandong Agr Univ(Nat Sci)(山东农业大学学报(自然科学版))[J], 1995, (3):355.
- [14] JIN Tong-ming(金同铭). Food Sci(食品科学)[J], 1996, **17**(2):60.

The Fabrication of Glucose Molecular-Imprinted Electrochemical Sensor and Its Application

FU Cong¹, WEI Hong-wei¹, DU Juan², LI Jian-ping^{*1}

(1. College of Chemical & Biological Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004;
2. Guilin Environmental Monitoring Center, Guilin 541002)

Abstract: A highly sensitive, highly selective and low cost sensor for glucose determination was prepared based on the molecular-imprinted technique and electrochemical detection method. The sensor was used in the determination of glucose in beer and apple samples. In the assay, the sensor was characterized by cyclic voltammetry method in $K_3[Fe(CN)_6]$ solution. The glucose concentration can be determined in the range of 0.01–2 $\mu\text{mol/L}$ with a detection limit of 7.68×10^{-9} mol/L by recording the redox currents of $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. The sensor is simple and convenient in the process of fabrication and determination, and shows good reproducibility and recovery in real sample determination.

Keywords: Glucose; Molecular-imprinted electrochemical sensor; Gate-effect