

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00800

磁性纳米粒子固定葡萄糖氧化酶修饰电极 电致化学发光葡萄糖传感器

熊志刚¹ 李建平^{*1} 唐丽² 陈志强¹

(桂林理工大学化学与生物工程学院¹, 附属医院², 桂林 541004)

摘要 通过交联剂将葡萄糖氧化酶 (GOD) 固定在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子上, 在磁力作用下将该磁性复合粒子修饰在石蜡碳糊电极 (SPCE) 表面, 制成易更新酶电极。GOD 催化氧化葡萄糖生成过氧化氢, 并使鲁米诺产生电致化学发光 (ECL), 据此首次构建了易更新型电致化学发光葡萄糖传感器。其电致发光强度与葡萄糖浓度在 $1 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L 范围内呈线性关系, 线性回归方程 $I = 65.4374C + 23.9017$ ($r = 0.9987$); 检出限为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 。此传感器响应快, 稳定性高, 表面易更新, 已用于测定人血清中葡萄糖的含量。

关键词 电致化学发光; 磁性纳米粒子; 葡萄糖氧化酶; 鲁米诺; 化学修饰电极

1 引言

电致化学发光 (ECL) 是在化学发光的基础上, 结合电极反应发展起来的一种化学发光法^[1-3]。利用葡萄糖氧化酶 (GOD) 催化氧化葡萄糖生成 H_2O_2 可以构建葡萄糖 ECL 传感器。在 ECL 葡萄糖传感器研究中, GOD 的固定方法是一个重要课题。常用的酶固定化方法有吸附法^[4]、包埋法^[5]、共价键合法及交联法^[6,7], 电化学聚合法^[8]。这些方法制备 ECL 酶传感器过程烦琐、复杂, 电极表面敏感膜不易更新。

在酶传感器中采用纳米材料为载体, 不仅可以增加酶的固定量和稳定性, 而且还可以提高酶的催化活性, 进而提高酶电极的响应灵敏度^[9]。 Fe_3O_4 磁性纳米粒子具有纳米粒子的诸多优点, 又具有非常好的生物相容性, 在外加磁力的作用下能非常方便地实现电极敏感膜的更新, 故在酶传感器研究中得到了广泛应用^[10-17]。但是在 ECL 葡萄糖传感器中, 使用 Fe_3O_4 磁性纳米粒子固定 GOD 还未见报道。本研究通过交联剂将 GOD 共价固定在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面, 再通过磁力将此固载酶的磁性纳米粒子修饰在 SPCE 表面, 从而制成了易更新的酶传感器, 并用于葡萄糖的 ECL 分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

MPFE 型电致化学发光分析系统 (西安瑞迈分析仪器有限公司); M1703 型红外光谱仪 (Perkin-Elmer 公司); 三电极系统: 工作电极为自制的磁性纳米粒子固定酶修饰电极 (GOD/ Fe_3O_4 /SPCE/CME), 参比电极为 Ag/AgCl 饱和 KCl 电极, 铂丝为对电极; Branson 200 超声清洗仪 (德国 Branson Ultrasonic 公司); pH S-2C 型精密酸度计 (上海雷磁精密仪器有限公司)。

3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS, 98%, Alfa Aesar 公司); 葡萄糖氧化酶 (GOD, 120 U/mg, Sigma 公司); 标准葡萄糖储备液, 放置过夜后使用, 保存于 4°C 冰箱中。鲁米诺 (>98%, Fluka 公司); 戊二醛 (25%, 上海化学试剂厂); 其它试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水 ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

2.2 酶传感器的制作

2.2.1 固体石蜡碳糊电极的制作 参考文献 [13], 取 3 cm 长的铁棒 (外径 2.55 mm) 和 2 cm 长的玻璃管 (3.0 mm i.d.), 磨平铁棒和玻璃管的两端, 用水洗净。按一定比例混合固体石蜡和碳粉, 加热熔化石蜡, 均匀搅拌, 制得石蜡碳糊。把铁棒插入玻璃管中距底部约 0.5 mm, 形成一个凹坑, 趁热将石蜡碳糊封装进此凹坑, 填平, 冷却, 除去玻璃壁外的沾粘的碳糊, 并在光滑打印纸抛光电极表面。然后分别用

2009-11-09 收稿; 2010-02-04 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20665003)、教育部科学研究重点项目 (No. 207087) 和广西自然科学基金 (No. 0728214) 资助项目

* E-mail: likianping@263.net

HNO_3 (1:1, V/V)、无水乙醇和二次蒸馏水清洗电极。在 $1.0 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 溶液中采用循环伏安 (CV) 法活化作为工作电极的 SPCE, 扫描范围 $1.2 \sim -1.2 \text{ V}$ 。再于 $5 \text{ mmol/L K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中循环扫描, 扫描范围改为 $0.5 \sim -0.2 \text{ V}$ 。重复上述步骤直至得到峰形良好的一对可逆氧化还原峰。

2.2.2 磁性纳米粒子的制备、氨基化和葡萄糖氧化酶修饰 按照 $n(\text{Fe}^{2+}) : n(\text{Fe}^{3+}) = 1 : 1.75$ 称取适量 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 溶于水中。搅拌下快速加入适量 2.0 mol/L NaOH 溶液, 调 pH 值至 11.0, 室温下搅拌 0.5 h, 迅速升温到 75°C , 熟化 0.5 h, 整个过程都在氮气的保护下进行, 得黑色悬浮液。超声 15 min, 磁铁分离不溶物, 用水洗涤至溶液呈中性。在 75°C 下真空干燥, 得粉末, 4°C 下密闭保存在。

取 20 mL 乙醇, 加入 50 mg Fe_3O_4 纳米粒子粉末, 超声分散, 之后加入 0.2 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (98%), 在氮气的保护下, 25°C 搅拌 12 h 制得氨基化的磁性纳米粒子, 用无水乙醇、水超声清洗后定容至 20 mL 备用。

取 2.0 mL 上述溶液于 5 mL 试管中, 晾干, 再于试管中加入 2.0 mL 0.25% 戊二醛, 混旋 30 s 后, 放入 4°C 冰箱冷藏 1 h, 之后水洗并晾干, 再加 20 g/L GOD 溶液 2.0 mL, 于 4°C 冰箱中保存 12 h, 制得 GOD 修饰的磁性粒子溶液 (GOD/ Fe_3O_4)。图 1 为磁性纳米粒子固定葡萄糖氧化酶的示意图。

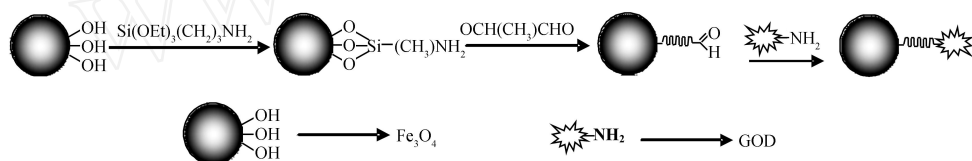


图 1 磁性纳米粒子固定葡萄糖氧化酶示意图

Fig 1 Scheme of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles

2.2.3 自组装磁性纳米复合粒子修饰电极 SPCE 电极面朝上, 用磁铁吸住电极上端铁芯, 滴加 $15 \mu\text{L}$ GOD/ Fe_3O_4 粒子在电极表面, 制得酶修饰电极 (GOD/ Fe_3O_4 /SPCE/CME)。测定时将电极面对准光电倍增管检测方向。每次更新电极时, 移去磁铁, 水洗去磁性复合粒子, 之后重复上述过程以更新电极。

2.3 ECL 传感器原理和实验方法

ECL 传感器的原理如图 2。GOD/ Fe_3O_4 复合磁性纳米粒子通过外加磁场而修饰在 SPCE 电极表面。此时, 溶液中的葡萄糖与溶解氧发生 GOD 酶促反应, 生成 H_2O_2 。同时, 溶液中的鲁米诺在修饰电极表面发生氧化, 鲁米诺氧化物与 H_2O_2 发生 ECL 反应。GOD/ Fe_3O_4 复合磁性纳米粒子的存在促进了鲁米诺的氧化和 H_2O_2 生成。在本实验中, 室温下, 将 10 mL 含一定浓度的葡萄糖的 0.5 mmol/L 鲁米诺 - 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲溶液 ($\text{pH} = 8.0$) 转至石英烧杯中, 然后采用三电极系统进行测试, 并测定 ECL 的强度。扫描范围为 $0.2 \sim 1.4 \text{ V}$ (vs SCE), 扫速为 50 mV/s 。光电倍增管高压 600 V , 采样速率 10 T/S , 放大倍数 3, 测量时间 60 s 。SPCE 不用时置于冰箱中 4°C 下保存。

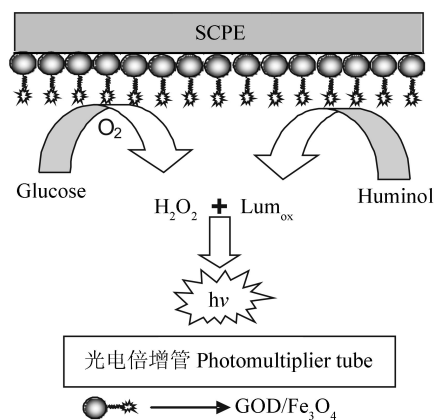


图 2 ECL 传感器原理图

Fig 2 Principle of ECL biosensor

3 结果与讨论

3.1 Fe_3O_4 纳米粒子的表征

3.1.1 Fe_3O_4 纳米粒子粒度分析 用激光散射仪 (英国 Malvern 公司) 测定 Fe_3O_4 纳米粒子粒径。从图 3 可见, 本实验所制备的 Fe_3O_4 磁性粒子粒径主要分布在 $12 \sim 22 \text{ nm}$ 之间。说明磁性纳米粒子已经达到纳米级, 且粒径分布较为集中, 因此, 可用于后续实验。

3.1.2 Fe_3O_4 纳米粒子的氨基功能化表征 用红外光谱表征 Fe_3O_4 粒子表面氨基化修饰前后的变化。由图 4 可见, 在 Fe_3O_4 粒子表面功能化修饰了氨基基团, Fe_3O_4 粒子与氨基化 Fe_3O_4 粒子都具有 Fe_3O_4

粒子特征峰 (583.235 cm^{-1}); 氨基化 Fe_3O_4 粒子具有 Si-O 的伸缩振动特征峰 (1409.675 cm^{-1}) 和氨基弯曲振动特征峰 (1638.335 cm^{-1})。

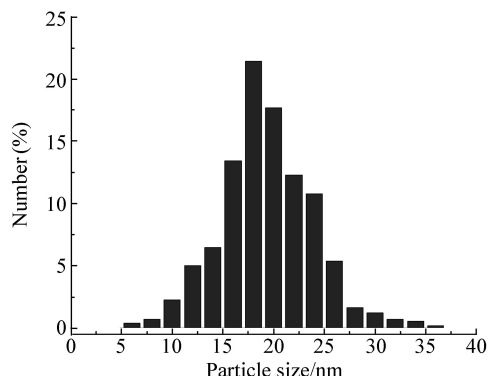


图 3 Fe_3O_4 纳米粒子的粒径分布图

Fig 3 Particle size distribution image of Fe_3O_4

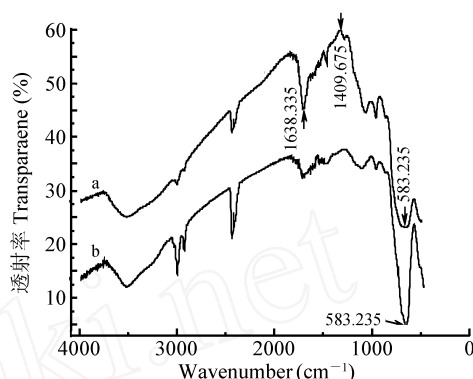


图 4 Fe_3O_4 (a) 和 Fe_3O_4 氨基化 (b) 的红外光谱图

Fig 4 FT-R spectra of Fe_3O_4 (a) and aminated Fe_3O_4 (b)

3.1.3 酶复合磁性粒子的磁力测定 用振动样品磁强计 (PAR115 型) 对移去磁铁而洗脱获得的酶复合磁性粒子进行磁力测量。复合粒子矫顽力较低, 同时未见明显的剩磁和磁滞现象, 其比饱和磁化强度仅为 42.1 emu/g (图 5)。由此可见, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOD}$ 复合粒子具有较强超顺磁性即在外磁场存在下有磁性, 外撤除磁场则磁性消失, 故可用于磁性分离。

3.2 酶电极的 ECL 行为

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOD}$ (a) 和 Fe_3O_4 (b) 粒子分别修饰的 SPCE, 在 10 mL 含 0.1 mmol/L 鲁米诺和 1.0 mmol/L 葡萄糖 + 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲溶液 ($\text{pH} = 8.0$) 中进行 CV 实验所得 ECL 图 (见图 6)。实验条件: 电位扫速为 50 mV/s , 扫描范围为 $0.2 \sim 1.4\text{ V}$, 采样速率 10 T/S , 放大倍数 3。由图 6 可见, 修饰在电极表面的 Fe_3O_4 粒子表面成功地共价固定了 GOD, 从而催化氧化葡萄糖生成鲁米诺 ECL 所需的 H_2O_2 。

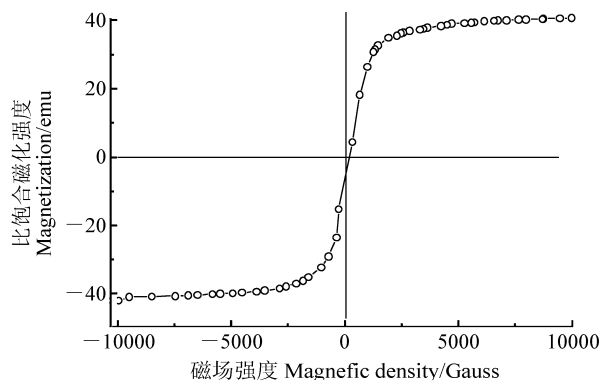


图 5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOD}$ 复合粒子的磁滞回线

Fig 5 Hysteresis curves of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOD}$ (glucose oxidase) particles

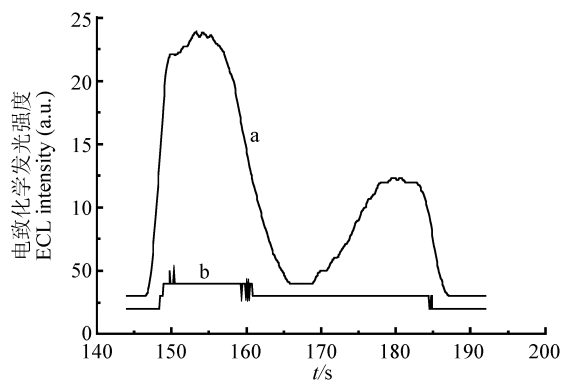


图 6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOD}$ (a) 和 Fe_3O_4 (b) 修饰电极的电致发光曲线

Fig 6 Electrochemiluminescence curves of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOD}$ (a) and Fe_3O_4 (b) modified electrode

3.3 缓冲液种类、pH 值和温度的影响

研究了 3 种缓冲液: 0.1 mol/L 硼酸钠、 0.1 mol/L HAc-NaAc 和 PBS ($\text{pH} = 8.0$) 作为支持电解质的影响。结果表明, 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲溶液中 ECL 响应最高。

鲁米诺的 ECL 反应需在弱碱性条件下进行, 考虑到葡萄糖氧化酶的生物活性受 pH 值影响较大, 本研究考察了 pH 在 $7.0 \sim 9.5$ 时 ECL 强度的变化。其中鲁米诺浓度为 0.1 mmol/L , 葡萄糖浓度为 1.0 mmol/L 。当 $\text{pH} = 8.0$ 时, 鲁米诺的 ECL 强度最大, 本实验选取 $\text{pH} = 8.0$ 。

酶的催化活性受温度影响较大。本实验用集热式恒温加热磁力搅拌器控制水浴温度, 考察了 $20 \sim 60$ 范围内酶电极的电流响应。当温度达到 40 时, 响应最大。综合考虑温度对葡萄糖氧化酶电极

寿命的影响,本实验均在室温 25 ℃ 下进行。

3.4 鲁米诺浓度的影响

本实验考察了鲁米诺的浓度在 0.01 ~ 1.2 mmol/L 范围内对 ECL 强度的影响 (图 7)。由图 7 可知,随着鲁米诺的浓度由 0.01 mmol/L 增大到 0.5 mmol/L 时,溶液的 ECL 强度快速增大,之后趋于平稳饱和。因此,实验中鲁米诺的浓度为 0.5 mmol/L。

3.5 葡萄糖的分析

取 10 mL 石英小烧杯,加入含一系列不同浓度的葡萄糖 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲溶液 (pH = 8.0) 10 mL,此时鲁米诺浓度为 0.5 mmol/L,按上述方法测定 ECL 的强度 (图 8)。葡萄糖在 $1 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L 浓度范围内与 ECL 强度呈良好的线性关系: $I = 65.4374C + 23.9017$, $r = 0.9987$; 检出限为 1 μ mol/L; 酶电极的响应时间约为 10 s。

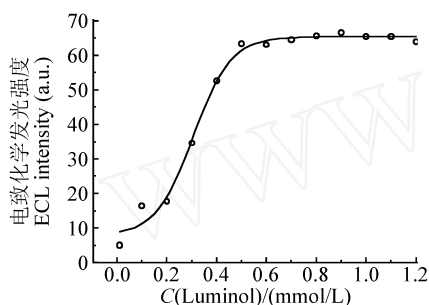


图 7 鲁米诺浓度对 ECL 强度的影响

Fig 7 Effect of luminol concentration on ECL intensity for 1 mmol/L glucose

3.6 葡萄糖传感器的重现性、稳定性和选择性

通过移除 ECL 葡萄糖传感器上方的磁铁,用水冲 SPCE 电极表面,在 0.5 mol/L HCl 中清洗 0.5 min,从而去除磁性复合粒子。重复 2.2.2 节的修饰过程,可实现磁性复合粒子的更新。每次电极更新后对 1.0 mmol/L 的葡萄糖进行测定,其 $RSD = 3.9\%$ ($n = 5$)。而对于 5 批次相同条件下制得的传感器,其 $RSD = 4.5\%$ 。考察一个月内组装有磁性复合粒子的工作电极对葡萄糖响应情况 (不使用时,电极放置在 4 ℃ 冰箱中保存)。结果表明,7 天内电极响应基本不变,CV 和 ECL 曲线形状也基本不变;14 天后 ECL 强度约为原来的 95%;1 月后 ECL 强度下降 85%。显然,用本实验方法固定 GOD 在 Fe_3O_4 纳米粒子表面,能在微环境下保持生物蛋白的活性,从而获得较好的稳定性。

考察了一些常见干扰物质对测定 5.0×10^{-5} mol/L 葡萄糖的影响。结果表明,10 倍的尿酸和抗坏血酸对葡萄糖的检测的影响均 $< 5\%$,说明本方法选择性好,这归功于酶促反应特异性和 ECL 的高灵敏度。

3.7 临床血清样品测试分析

按照实验方法对人血清样品 (桂林理工大学附属医院提供) 中葡萄糖的含量进行测定,结果见表 1。结果表明,本方法测定结果与医院提供的临床分析结果相吻合。采用标准加入法测定了样品的回收率。

表 1 人血清中葡萄糖的测定及回收率实验结果

Table 1 Determination results of glucose in human serum and the recovery test

样品 Samples	测量值 Found (mmol/L)	RSD (%, $n = 5$)	参考值 Reference values (mmol/L)	标准加入量 Standard added (mmol/L)	总测量值 Total found (mmol/L)	回收率 Recoveries (%)
1	5.78	3.41	5.73	0.5	6.30	104.0
2	4.26	3.10	4.35	1.0	5.22	96.2
3	6.00	2.53	5.92	1.5	7.46	97.1
4	7.80	3.34	7.78	2.0	9.84	102.0
5	8.87	2.76	8.95	3.0	11.72	95.2

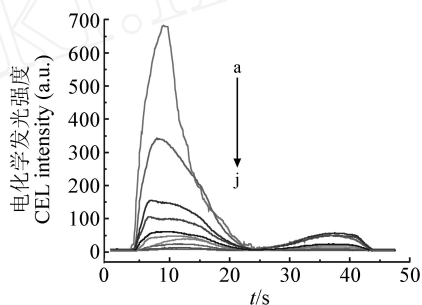


图 8 酶修饰电极测定不同浓度葡萄糖的 ECL 曲线

Fig 8 ECL curves of enzyme modified electrode in different concentration glucose

葡萄糖 (Glucose): (a ~ j): 10.0, 5.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.005, 0.002 及 0.001 mmol/L; 0.5 mol/L Luminol, 0.1 mol/L Borate buffer (pH = 8.0), v : 50 mV/s, 扫描范围 (Scan range) 0.2 ~ 1.4 V, 光电倍增管 (Photomultiplier): 600 V, 测量时间 (Measurement time): 48 s

从表 1 可见,测定结果与参考值基本吻合,回收率在 95.2% ~ 104% 之间。说明本方法可用于临床样品的测定。

References

- 1 XU Guo-Bao (徐国宝), DONG Shao-Jun (董绍俊). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001**, 29(1): 103 ~ 108
- 2 Richter M M. *Chem. Rev.*, **2004**, 104(6): 3003 ~ 3036
- 3 Zhu L, Li Y, Zhu G. *Sens. Actuators B: Chem.*, **2002**, 86(2 ~ 3): 209 ~ 214
- 4 Dai H, Wu X, Xu H, Wang Y, Chi Y, Chen G. *Electrochim. Acta*, **2009**, 54(19): 4582 ~ 4586
- 5 Qiu B, Lin Z, Wang J, Chen Z, Chen J, Chen G. *Talanta*, **2009**, 78(1): 76 ~ 80
- 6 Lin Z, Chen J, Chen G. *Electrochim. Acta*, **2008**, 53(5): 2396 ~ 2401
- 7 Guo Z, Xue Y, Zheng X. *J. Electroanal. Chem.*, **2009**, 625(1): 47 ~ 52
- 8 LU Meng-Qin (刘梦琴), JIANG Jian-Hui (蒋健晖), FENG Yong-Lan (冯咏兰), SHEN Guo-Li (沈国励), YU Ru-Qin (俞汝勤). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(10): 1435 ~ 1438
- 9 Bertonecello P, Forster R J. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(11): 3191 ~ 3200
- 10 Liu X, Niu W, Li H, Han S, Hu L, Xu G. *Electrochim. Commun.*, **2008**, 10(9): 1250 ~ 1253
- 11 LI Jian-Ping (李建平), CHEN Xu-Zhou (陈绪胄). *Acta Chim. Sinica* (化学学报), **2008**, 66(1): 84 ~ 90
- 12 LI Jian-Ping (李建平), GAO Hui-Ling (高会玲), XIONG Zhi-Gang (熊志刚). *Chem. J. Chinese Univ.* (高等学校化学学报), **2008**, 29(11): 2149 ~ 2154
- 13 Li J, Wei X, Yuan Y. *Sensors and Actuators B.*, **2009**, 140(2): 663 ~ 669
- 14 GAO Hui-Ling (高会玲), LI Jian-Ping (李建平). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(12): 1614 ~ 1618
- 15 CHENG Gui-Fang (程圭芳), HUANG Cui-Hua (黄翠华), ZHAO Jie (赵洁), TAN Xue-Lian (谭雪莲), HE Pin-Gang (何品刚), FANG Yu-Zhi (方禹之). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(2): 169 ~ 173

A Novel Electrochemiluminescence Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized on Magnetic Nanoparticles

XIONG Zhi-Gang¹, LI Jian-Ping^{*1}, TANG Li², CHENG Zhi-Qiang¹

¹ (College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004)

² (The Attached Hospital of Guilin University of Technology, Guilin 541004)

Abstract A novel Nano-Fe₃O₄ particles biosensor for glucose based on luminol electrochemiluminescence (ECL) is presented. Glucose oxidase (GOD) was covalently cross-linked to the surface of synthesized magnetic nano-Fe₃O₄ particles. Then the composite particles Fe₃O₄/GOD was adhered to solid paraffin carbon paste electrode by magnetic force to fabricate a working electrode. Hydrogen peroxide was produced by enzymatic reaction of GOD and ECL could be obtained by the reaction between luminol and hydrogen peroxide to construct the renewable glucose biosensor. There was a linear relationship between ECL and glucose concentration in the ranges of 1×10^{-5} - 1.0×10^{-2} mol/L with a regression equation of $I = 65.4374C + 23.9017$ ($r = 0.9987$), and the detection limit is 1 μ mol/L. The ECL biosensor has showed short response time and high stability, and the electrode surface was renewable easily. The proposed biosensor has been applied to the determination of glucose in plasma samples.

Keywords Electrochemiluminescence; Magnetic nanoparticles; Glucose oxidase; Luminol; Chemically modified electrode

(Received 9 November 2009; accepted 4 February 2010)