

文章编号: 1006-3471 (2006) 03-0319-005

氧化铅掺杂碳纳米管糊预氧化电流型 葡萄糖生物传感器的研究

漆红兰, 张成孝*

(陕西师范大学化学与材料科学学院 陕西 西安 710062)

摘要: 以掺杂预氧化物(二氧化铅)、电子介体(二茂铁羧酸)和碳纳米管作电极材料, 研制预氧化电流型葡萄糖生物传感器。碳纳米管糊中掺入二氧化铅可消除抗坏血酸、尿酸等还原性物质对葡萄糖测定的干扰, 该传感器在 +0.40 V (vs SCE) 的工作电位下仍保持良好的抗干扰能力 (对含有 1.0 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖溶液, 1.8 mmol·L⁻¹ 的抗坏血酸和 2.2 mmol·L⁻¹ 的尿酸均不产生干扰) 和较快的响应速率 (10 s), 响应电流与葡萄糖浓度在 0.50 ~ 20 mmol·L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9987。此传感器用于人体血清中葡萄糖的测定, 结果满意。

关键词: 生物传感器; 预氧化; 二氧化铅; 碳纳米管; 葡萄糖

中图分类号: O 657.1

文献标识码: A

葡萄糖生物传感器对血液、发酵液以及食品中葡萄糖的检测有着良好的应用前景和广泛的商业市场^[1-3]。但是, 不论是检测过氧化氢氧化电流的第一代葡萄糖生物传感器或者是以检测人工电子介体氧化电流的第二代葡萄糖生物传感器, 其于样品的检测常须施加较高的电位 (> +0.6 V vs SCE), 从而难免受到来自溶液中抗坏血酸以及尿酸等还原性物质的干扰。关于生物传感器消除干扰的研究, 已有很多报道, 如使用低氧化还原电位的电子介体 (如: 二茂铁) 以降低测量电位^[4-5]; 或者使用预选择性膜 (如: 乙酸纤维素等), 借助静电排斥作用以消除干扰^[6-10]。Cui 等利用二氧化铅和硝化纤维设计了一种新型的可消除还原性物质干扰的第一代葡萄糖传感器^[9]。但是由于样品在毛细作用下通过硝化纤维的移动非常缓慢, 到达电极表面需要经历 3.5 min, 且须两次注样才能满足检测要求。以碳纳米管制作的碳纳米管糊电极不仅具有普通碳糊电极再现性好、应用范围广、制作简便等特点, 而且还具有碳纳米管导电性好、比表面积大等优点, 越来越受到电分析工作者青睐^[10-13]。本文

继续先前的研究^[14], 进一步以碳纳米管、二氧化铅和电子介体 (二茂铁羧酸) 作电极材料, 研制预氧化电流型葡萄糖生物传感器。文中比较了普通碳糊电极和碳纳米管糊电极的电化学性能, 考察了预氧化物质的抗干扰能力和传感器的分析特性。结果表明, 此项设计可提高测定葡萄糖的选择性和灵敏度。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

葡萄糖氧化酶 (GOD, 145 units/mg, Toyobo Co. Ltd. Osaka, Japan), 二茂铁羧酸 (Aldrich), 抗坏血酸、葡萄糖、尿酸及二氧化铅 (西安试剂厂), 多壁碳纳米管 (MWNT) (深圳纳米港)。以上试剂均为分析纯。实验用水均为二次蒸馏水。

BAS 100 B/W 电化学工作站 (Bioanalytical System, NC, USA), 超声波清洗仪 KS-300D (宁波科生)。

1.2 预氧化电流型葡萄糖生物传感器的制备与处理

MWNT先经浓硝酸和高氯酸(体积比为7:3)混合溶液超声清洗5h,然后二次蒸馏水洗至中性,再用丙酮洗涤,60℃干燥^[13].

碳纳米管糊电极的制备:将150μL液体石蜡油和400mg酸化处理的碳纳米管放在玻璃研钵中充分研磨得到颗粒细小、均匀的碳纳米管糊,填入带铜导线的玻璃管中制成碳纳米管糊电极(Φ=2.4mm).用滤纸将电极表面研磨平整.每次实验前碳纳米管糊电极均在0.10mol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.4)中以100mV·s⁻¹的扫速于0~1.2V电位区间循环扫描10min,直至得到稳定的循环伏安曲线为止.

预氧化电流型葡萄糖生物传感器的制备:将一定量的电子介体、酶、二氧化铅与碳纳米管混合,研磨均匀,然后加入一定量的液体石蜡油,充分研磨得到颗粒细小、均匀的碳纳米管糊,再填入带铜导线的玻璃管中制成预氧化电流型葡萄糖生物传感器.该传感器预处理方式同前.

1.3 电化学测量

电化学测量使用BAS 100 B/W电化学工作站,三电极系统为工作电极为碳纳米管糊电极或预氧化电流型葡萄糖生物传感器,参比电极为饱和甘汞电极,对电极为铂丝电极,并以0.10mol·L⁻¹ PBS(pH=7.4)作支持电解质.室温下(25±1℃)实验.

1.4 样品分析

取1.0mL经血样离心分离的血清样品(陕西师范大学医院提供),用1.0mL 0.10mol·L⁻¹ PBS(pH=7.4)稀释.使用BAS 100 B/W电化学工作站,预氧化电流型葡萄糖生物传感器为工作电极,施加+0.40V恒电位,读取稳态电流,使用标准加入法作人体血清样品葡萄糖含量的测定.

2 结果与讨论

2.1 碳纳米管糊电极上二茂铁羧酸的电化学行为

用碳纳米管制得的糊电极,因其特殊的微结构,制作的电极面积必大于普通碳糊制得的电极面积.实验给出,在10.0mmol·L⁻¹铁氰化钾溶液中,根据Controll方程,利用扫速与电流的关系曲

线,求算(Φ=2.4mm)普通碳糊和碳纳米管糊电极(Φ=2.4mm)面积分别为0.065cm²,0.098cm².

鉴于二茂铁羧酸对葡萄糖氧化酶氧化具有很高的二级均相速率常数($K_{med} = 2.01 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$),其半波电位为+0.275V(vs SCE)^[15-16].本文选择二茂铁羧酸作为电子介体,用于葡萄糖测定.图1示出二茂铁羧酸在普通碳糊和碳纳米管糊两种电极上的电流~电位曲线.如图,对普通碳糊电极(a),二茂铁羧酸在0.25V(vs SCE)开始氧化,0.40V电流达到最大;而在碳纳米管糊电极(b)上,二茂铁羧酸则于0.20V下发生氧化,0.35V电流达到最大;并且其响应电流(b)比普通碳糊电极的(a)大;说明碳纳米管可作为良好的电极材料,因此本文选择碳纳米管糊作为电极材料.

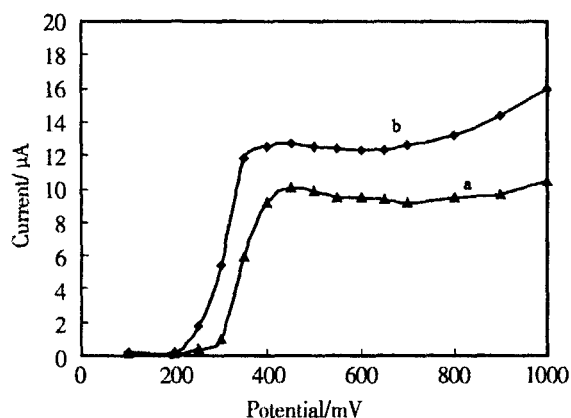


图1 二茂铁羧酸在普通碳糊(a)和碳纳米管糊(b)电极上的电流~电位曲线

Fig 1 Variation of current with potential for the ferrocenemonocarboxylic acid at carbon paste electrode (a) and at MWNT paste electrode (b) in 0.10mol·L⁻¹ PBS(pH=7.4) containing 1.0×10⁻⁵g·mL⁻¹ ferrocenemonocarboxylic acid

2.2 条件的选择

1) 二氧化铅含量的选择

实验表明,电极中预氧化物二氧化铅的含量不仅决定着生物传感器的抗干扰能力,同时也会影响传感器的导电性.图2示出,在1.0mmol·L⁻¹的抗坏血酸溶液中,碳纳米管糊电极中二氧化铅含量对抗坏血酸响应电流的影响.如图,该电极不存在二氧化铅时,抗坏血酸的氧化电流最大,说明碳

纳米管糊电极对抗坏血酸有较大的响应.随着二氧化铅含量逐渐增加,抗坏血酸在电极上的氧化电流响应逐渐减小,但当二氧化铅含量达到 $0.23 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,抗坏血酸已经不能在电极上产生氧化电流.含量超过 $0.35 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,则其导电性变差,背景电流降低.综合考虑传感器的导电性和消除干扰能力两方面因素,本文选择适宜的二氧化铅含量为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

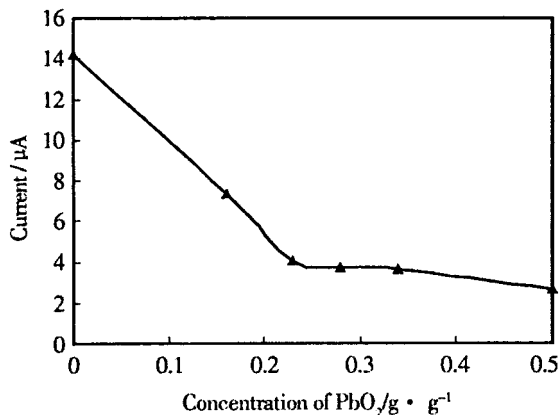


图 2 碳纳米管糊电极二氧化铅含量对抗坏血酸响应电流的影响

Fig 2 Dependence of ascorbic acid response on the amount of PbO_2 in MWNT paste electrode in $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH = 7.4) containing $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ascorbic acid applied potential: 0.40 V

2) 电子介体和酶含量及测量电位的选择

电极中二茂铁羧酸及酶的含量也是影响传感器对葡萄糖响应的因素^[14-16].实验表明,当二茂铁羧酸含量为 $0.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,葡萄糖氧化酶含量为 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,背景电流较小,催化电流较大.因此本文选择二茂铁羧酸和葡萄糖氧化酶在碳纳米管糊中的含量分别为 $0.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.测量电位对葡萄糖响应电流也有影响,根据实验,测量电位为 0.35 V 时,该传感器对葡萄糖的响应达到最大值,继续增大测量电位,电流趋于稳定.综合考虑灵敏度和稳定性两方面因素,本文选择测量电位为 0.40 V .

2.3 传感器的响应

按上述优化条件,分别制成含有 $0.25 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 二氧化铅预氧化物质的葡萄糖传感器(A)和不含二氧化铅的葡萄糖传感器(B),并依次测定二者在 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 +

$1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸溶液中的电流响应曲线,结果如图 3 所示.图 3 中,曲线 a、b 及 f,曲线 c、d、e 及 g 分别代表上述 A、B 两葡萄糖传感器的电流响应曲线.可以看出,在 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) (g 和 f) 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液 (b 和 d) 中,两传感器的响应曲线基本重合,说明预氧化物质 PbO_2 的存在与否对葡萄糖氧化酶的活性和溶液中葡萄糖的测定都没有影响.但如比较曲线 a 和 e,则显然在本实验条件下,抗坏血酸 ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 于传感器 A 上不产生氧化电流,表明 PbO_2 能够有效地除去抗坏血酸.再据曲线 b 和 c、d 三者重合,可知 PbO_2 在氧化抗坏血酸的过程中不会降低葡萄糖氧化酶的活性和传感器对葡萄糖的响应,并且于 10 s 之后即可形成稳态电流 (曲线 c).

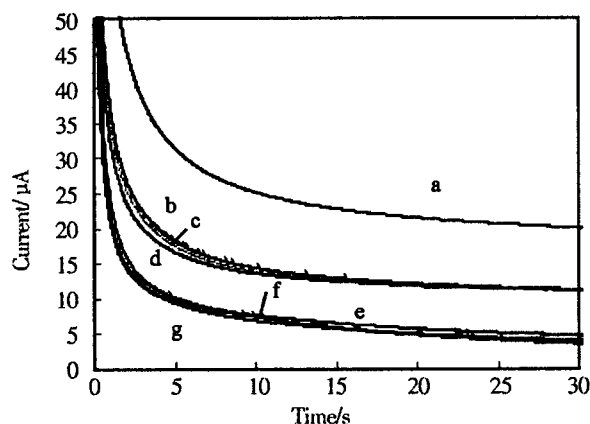


图 3 不同条件下预氧化电流型葡萄糖传感器(A)和葡萄糖传感器(B)的电流响应曲线

Fig 3 Amperometric response profiles of the pre-oxidation glucose biosensor containing $0.25 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ PbO_2 (type A) and the glucose biosensor without PbO_2 (type B) under various experimental conditions

a) type B/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ascorbic acid, b) type A/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ascorbic acid + $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose type, c) type A/ $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, d), type B/ $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, e) type A/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ascorbic acid B/, f) type B/ PBS, g) type A/ PBS applied potential: 0.40 V

图 4 示出上述预氧化电流型葡萄糖传感器对葡萄糖的响应曲线.如图,葡萄糖浓度在 $0.50 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 $I \sim C$ 呈线性关系.回归方程为 $I (\mu\text{A}) = 0.28 + 0.13C (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$,相关

表 1 血清中葡萄糖含量的测定

Tab 1 Statistical analysis results for the determination of glucose in human serum

Sample No	Concentration of glucose in serum SD^* / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Glucose added / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Glucose found [*] / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Recovery /%
1	1.56 \pm 0.06	1.50	1.44	96
2	3.47 \pm 0.12	3.50	3.66	104

* Average of five determinations, using the pre-oxidation glucose biosensor applied a constant potential of 0.40 V.

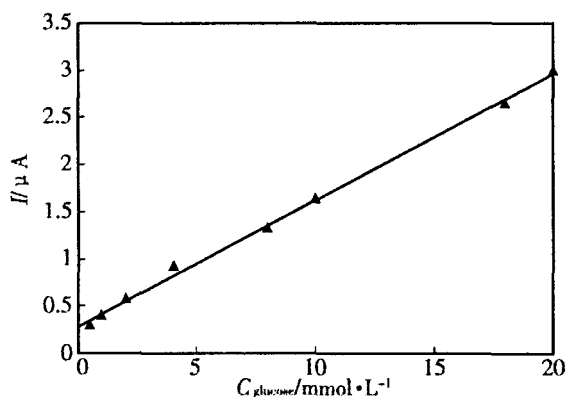


图 4 预氧化电流型传感器稳态电流随葡萄糖浓度变化曲线

Fig 4 Variation of stable current with glucose concentration profile for the pre-oxidation glucose biosensor applied potential: 0.40 V

系数 0.9987. 葡萄糖的检出限为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 使用该传感器 (A) 对含 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖连续测定 50 次, 响应电流降低小于 5%, 相对标准偏差为 3.3% ($n=7$), 在 4 下储存 30 d 响应电流降低也不大于 5%. 可见此电极具有良好的重复性, 并且比较稳定.

新制备的预氧化电流型葡萄糖传感器分别对血液中可能存在的干扰物质如抗坏血酸和尿酸溶液进行检测. 结果表明, 在保持相对测量误差在 $\pm 5\%$ 范围内, $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸和 $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿酸, 不干扰 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的测定. 可满足临床测定要求.

2.4 样品测定

使用预氧化电流型葡萄糖传感器 (A) 测定人体血清的葡萄糖含量. 血清样品由陕西师范大学附属医院提供. 取 1.0 mL 经血样离心分离的血清, 用 1.0 mL $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS ($\text{pH} = 7.4$) 稀释, 采用标准加入法测定, 加入不同量的葡萄糖作回收测定, 回收率在 96% ~ 104% 之间. 结果列于表 1.

3 结 论

以预氧化物 (PbO₂、电子介体 (二茂铁羧酸) 和碳纳米管制作的预氧化电流型葡萄糖生物传感器, 具有良好的抗干扰能力和较高的灵敏度, 对葡萄糖响应迅速.

参考文献 (References):

- [1] Ricci F, Paleschi G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21: 389.
- [2] Xue H G, Shen Z Q, Li C M. Improved selectivity and stability of glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline polyacrylonitrile composite film[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(11): 2330.
- [3] Zhang Z E, Liu H Y, Deng J Q. A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized *o*-aminophenol film on platinumized glassy carbon electrode[J]. *Anal Chem.*, 1996, 68(9): 1632.
- [4] Saby C, Mizutani F, Yabuki S. Glucose sensor based on carbon paste electrode incorporating poly(ethylene glycol)-modified glucose oxidase and various mediators[J]. *Anal Chim. Acta*, 1995, 304(1): 33.
- [5] Ghica M E, Brett C M A. A glucose biosensor using methyl viologen redox mediator on carbon film electrodes[J]. *Anal Chim. Acta*, 2005, 532(2): 145.
- [6] Poyard S, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, et al. Optimization of an inorganic/bio-organic matrix for the development of new glucose biosensor membranes[J]. *Anal Chim. Acta*, 1998, 364(1-3): 165.
- [7] Jung S K, Wilson G S. Polymeric mercaptosilane-modified platinum electrodes for elimination of interferents in glucose biosensors[J]. *Anal Chem.*, 1996, 68(4): 591.
- [8] Zhang S X, Yang W W, Niu Y M, et al. Multilayered construction of glucose oxidase on gold electrodes based

- on layer-by-layer covalent attachment[J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 523(2): 209.
- [9] Cui G, Kim S J, Choi S H, et al A disposable amperometric sensor screen printed on a nitrocellulose strip: A glucose biosensor employing lead oxide as an interference-removing agent[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(8): 1925.
- [10] Tang H, Chen J, Yao S, et al Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode [J]. *Anal Biochem*, 2004, 331(1): 89.
- [11] Hrapovic S, Liu Y, Male K B, et al Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(4): 1083.
- [12] Lim S H, Wei J, Lin J, et al A glucose biosensor based on electrodeposition of palladium nanoparticles and glucose oxidase onto nafion-solubilized carbon nanotube electrode [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20(11): 2341.
- [13] Wu F H, Zhao G C, Wei X W. Electrocatalytic oxidation of nitric oxide at multi-walled carbon nanotubes modified electrode [J]. *Electrochem Commun*, 2002, 4: 690.
- [14] Zhang C X, Wang K An amperometric glucose biosensor incorporating a permeable pre-oxidation layer[J]. *Anal Lett*, 2002, 35(5): 869.
- [15] Cass A E G, Davis G, Francis G D, et al Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose [J]. *Anal Chem*, 1984, 56(4): 667.
- [16] JN Li-tong (金利通), MAO Yi-ping (毛翼萍), FANG Yu-zhi (方禹之). Ferrocenemonocarboxylic acid-mediated glucose biosensor[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 1995, 2: 59.

Pre-oxidative Amperometric Glucose Biosensor Incorporated with Carbon Nanotube and PbO₂

Q I Hong-lan, ZHANG Cheng-xiao*

(School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China)

Abstract: A pre-oxidative amperometric glucose biosensor incorporated with carbon nanotube, ferrocenemonocarboxylic acid and PbO₂ was designed. The interferences coming from reduced substances, such as ascorbic acid and uric acid were eliminated by PbO₂. The oxidative current is linear at the potential of +0.40 V (vs SCE) to the concentration of glucose in the range from 0.50 to 20 mmol · L⁻¹, and the detection limit of glucose is 0.1 mol · L⁻¹. The relative standard deviation is 3.3% for seven successive assays at 5.0 mmol · L⁻¹ glucose. This biosensors have been applied to determination of the glucose in serum with satisfying results.

Key words: Biosensor, Pre-oxidation, PbO₂, Carbon nanotube, Glucose