

Ferrocene-Nafion 修饰厚膜碳糊 电极的葡萄糖传感器研究*

贾能勤 高林 孙翠珏 章宗稷

提 要 以基于丝网印刷技术制作的厚膜碳糊电极为基底电极,用二茂铁为介体、Nafion 修饰厚膜碳糊电极制备了葡萄糖传感器. Nafion 涂于电极表面上形成的膜具有强的附着力,防止了二茂铁及酶的流失,电极稳定性提高. 并且由于低的工作电位(+0.25V vs SCE)和 Nafion 膜的阳离子交换作用,基本上消除了电活性物质(抗坏血酸、尿酸)的干扰,具有防污能力. 该酶传感器的检测上限可达18mmol/L,响应时间小于60s.

关键词 厚膜碳糊电极; 二茂铁; Nafion; 葡萄糖; 生物传感器

中图分类号 O11-0

0 引 言

葡萄糖传感器在生物和医学上有着极其重要的应用价值. 近年来,介体型生物传感器发展十分迅速. 由于介体代替了氧的作用,克服了背景电流大,易受环境中氧浓度的影响等缺点. 二茂铁及其衍生物作为葡萄糖传感器介体的研究有一些报道^[1-4]. 但目前这类酶电极还存在二茂铁易流失的缺点,而且二茂铁对尿酸、抗坏血酸均有电催化作用,因此造成样品测定误差增大. 尤其这类酶电极所用的基底电极为玻碳电极等常规大电极,不能保证电极的一致性、稳定性,且很难大批量生产. 本文采用丝网印刷技术制作厚膜碳糊电极,具有能大批量生产、价廉、重现性好等特点. 介体和酶固定则采用先在厚膜电极上修饰一层 Nafion 膜,把二茂铁固定在 Nafion 膜内,然后用戊二醛交联法把 GOD 固定在修饰电极上,最后再修饰一层 Nafion 膜. 这样制作的 Nafion-二茂铁葡萄糖传感器,由于 Nafion 膜强的附着力和阳离子交换特性,减少了二茂铁的流失,大大降低了尿酸、抗坏血酸等电活性物质的干扰. 该酶传感器具有制作方法简单,重现性较好,抗干扰能力强,检测上限较大等特点.

* 上海市教委发展基金资助项目

收稿日期: 1998-06-12

第一作者贾能勤,男,讲师,上海师范大学生命与环境科学学院,上海,200234

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

电化学测试均以三电极方式在 ZF-3 恒电位仪, ZF-4 电位扫描发生器(上海防腐蚀专业公司)上进行,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极.

葡萄糖氧化酶(78U/mg, Sigma Chem Co), Nafion(5%)甲醇溶液(Fluka),牛血清蛋白(中科院上海生物化学研究所),二茂铁,戊二醛,葡萄糖及其他试剂均为分析纯.不同 pH 值的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液,实验用二次蒸馏水.

1.2 厚膜碳糊电极的制备

本实验所用的厚膜电极是通过丝网印刷技术制作而成.其制作过程如下:首先根据所设计的电极图样制作丝网模板,然后用自动丝网印刷机将碳糊油墨印制在 PVC 基板上,在 650°C 温度下干燥即制得厚膜碳糊电极及引线.

1.3 酶电极的制备

厚膜电极首先用二次水冲洗数次,晾干后,在其表面滴加 $4\mu\text{L}$ 0.1% Nafion 甲醇溶液,室温下自然干燥,然后再滴加 $4\mu\text{L}$ 0.1mol/L 二茂铁丙酮溶液于电极上,晾干.称取 GOD 3mg, BSA 3mg,加入 0.03mL 1/15mol/L (pH=7.0)磷酸缓冲液中,搅拌溶解,再加入 $10\mu\text{L}$ 5% 戊二醛溶液,搅匀.取此溶液 $8\mu\text{L}$ 滴于修饰电极表面,自然干燥.最后浸入 0.5% Nafion 水溶液中,取出后自然晾干.置于冰箱中保存(4°C).

2 结果与讨论

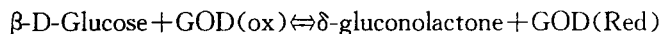
2.1 二茂铁-Nafion 修饰葡萄糖传感器的电化学特性

图1是不同扫描速度下二茂铁-Nafion 修饰电极的循环伏安图.从图1观察到未加入葡萄糖时,在 Nafion 聚合物中二茂铁的电化学行为.随着扫描速度的不断增加,峰电流也不断增加.将峰电流对扫描速度的平方根作图可得一直线,表明膜内的电子传递是由二茂铁不同氧化态的电子的自交换完成的,过程受扩散控制,呈现 $i_p \propto v^{1/2}$ 的关系.从图1还可看出,氧化峰与还原峰的电位差小于 55mV,且氧化电流与还原电流之比约为 1,表明电极呈现快速、可逆的电子传递.

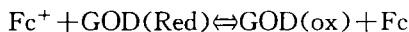
2.1 酶电极对葡萄糖的催化

二茂铁-Nafion 修饰葡萄糖传感器是以测量二茂铁的循环伏安图中的还原峰的降低或氧化峰的升高来定量测定葡萄糖,其原理如下:

β -D 葡萄糖从溶液中扩散到电极表面,被固定在电极表面的 GOD 氧化



二茂铁正离子(Fc^+)将 GOD(Red)氧化为 GOD(ox)



二茂铁又在电极上被氧化,形成二茂铁正离子,这样循环起到电子介体的作用.

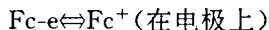


图2是 Nafion-二茂铁修饰酶电极测定磷酸缓冲液中加入不同浓度葡萄糖的循环伏安

图. 从图2可看出, 随着葡萄糖的增加, 二茂铁的还原峰电流降低, 而氧化峰电流升高. 当加入 8mmol/L 葡萄糖时, 还原峰已完全消失, 催化作用十分明显. 且从 CV 图还可知, 电位在 +0.18V~+0.25V 之间即出现催化极限氧化峰, 大大降低了工作电位. 用恒电位法测试电极响应时间, 电位设置在 $E = +0.25V$ (vs SCE).

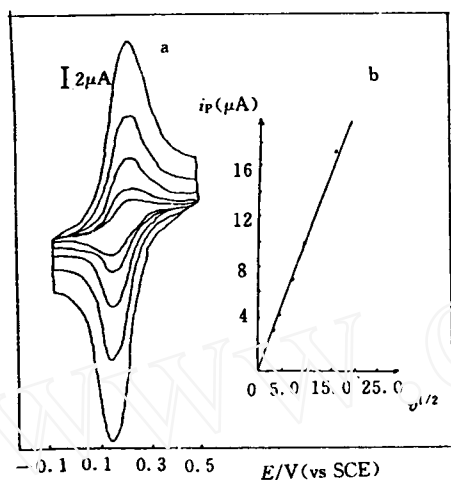


图1 不同扫描速度下二茂铁-Nafion 修饰酶电极的循环伏安图(a)及峰电流与 $v^{1/2}$ 的关系图(b)

底液: 磷酸缓冲液 (pH=7.0); v (mV/s): 10, 20, 50, 100, 200

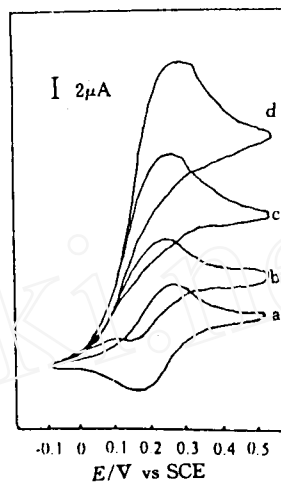


图2 二茂铁-Nafion 修饰酶电极的循环伏安图

底液: 磷酸缓冲液 (pH=7.0); a. 没有葡萄糖存在; b, c, d 为分别加入 4.0, 8.0, 12.0mmol/L 葡萄糖; v : 20mV/s

2.3 酶电极的工作曲线和响应时间

图3是加入葡萄糖后二茂铁氧化峰电流与未加入葡萄糖氧化峰电流的差值 ΔI 随葡萄糖浓度变化的曲线. 由图可看出, ΔI 与葡萄糖浓度在 $2 \times 10^{-3} \text{mol/L} \sim 1.8 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 这样很宽的范围呈良好的线性关系, 线性相关系数为 0.998. 在 10mmol/L 葡萄糖磷酸缓冲溶液中, 用单电位阶跃法 ($E \rightarrow +0.25V$) 来测量响应时间. 从测得的电流-时间曲线看出响应时间小于 60s.

2.4 pH、温度对酶电极性能的影响

pH 对酶的催化反应速度及酶活性都有一定的影响. 从图4可知, 酶电极最适 pH 为 7.0, 在生理 pH 范围 6.5~8.0 之间, 酶电极的活性基本不变.

酶的活性还与温度有关, 实验结果表明, 随着温度的升高, 响应电流的增大. 在温度达到 50℃ 左右时, 响应电流值最大. 当温度超过 50℃, 因酶开始部分失活, 而使响应电流值降低.

2.5 干扰实验

在葡萄糖浓度为 10mmol/L 时, 用循环伏安法分别测定加入不同电活性物质 (0.2mmol/L) 的电流响应值. 结果表明: 抗坏血酸使电流增大 4.5%, 尿酸使电流增加 5.0%, 半乳糖则无影响. 这是由于用二茂铁作电子介体使工作电位大大降低 (+0.25V vs SCE),

加之 Nafion 的阳离子交换特性,所以可消除上述电活性物质的干扰. 作者还在氧饱和的磷酸缓冲液和氮气饱和的磷酸缓冲液下用酶电极进行葡萄糖的测定,结果显示溶解氧的干扰非常小.

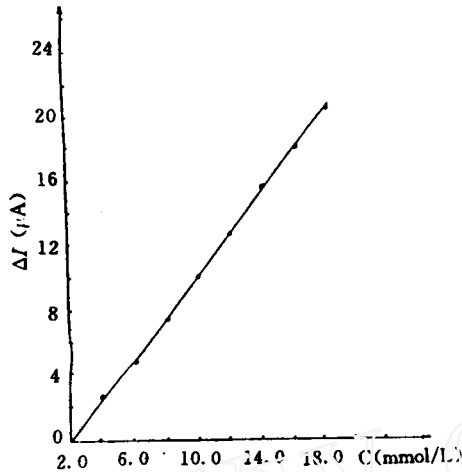


图3 葡萄糖浓度与酶电极响应电流关系曲线
底液:磷酸缓冲液(pH=7.0); $v=20\text{mV/s}$

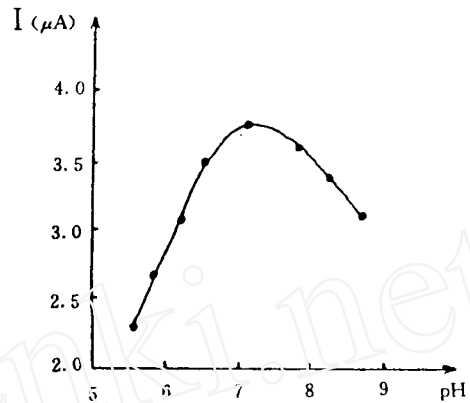


图4 二茂铁-Nafion 修饰酶电极响应电流与 pH 的关系
底液:磷酸缓冲液(pH=7.0); 葡萄糖浓度:10mmol/L.

2.6 重复性和稳定性

用酶电极对葡萄糖浓度为10mmol/L 的溶液重复测定8次,相对标准偏差为2.34%. 该酶电极在4℃下保存时,在一个月內测定同一浓度葡萄糖的响应电流基本不变.

2.7 回收率试验

用标准曲线法对样品进行回收率试验,结果列于表1,其回收率在100.0%~103.7%之间.

表1 在 pH 为7.0磷酸缓冲溶液中的回收率实验

编号	葡萄糖加入量(mmol/L)	测得量(mmol/L)	回收率(%)
1	4.0	4.1	102.5
2	6.0	6.2	103.3
3	8.0	8.3	103.7
4	12.0	12.0	100.0

感谢上海工业微生物研究所胡军高级工程师为本实验提供了厚膜碳糊电极.

参 考 文 献

- 1 Christian B, Christophe D, Jacques M, et al. New Insights into the Enzymatic Catalysis of the Oxidation of Glucose by Native and Recombinant Glucose Oxidase Mediated by Electrochemically Generated One-Electron Redox Cosubstrates. *J Am Chem Soc*, 1993, 115:2
- 2 Janet K Harkness, Oliver J Murphy, Duncan Hitchens G. Enzyme electrodes based on ionomer films coated on electrodes. *J Electroanal Chem*, 1993, 357: 261~272
- 3 Stephen Brown R, John H T Luong. A Regenerable pseudo-reagentless glucose biosensor based on Nafion polymer and 1',1-dimethylferrocinium mediator. *Anal Chim Acta*, 1995, 310:419
- 4 张国雄, 柴欣生. 二茂铁修饰碳电极的葡萄糖传感器的研究. *化学传感器*, 1991, 11(4):21

Amperometric Glucose Sensor Based on Ferrocene-Nafion Chemically Modified Screen-printed Carbon Paste Electrode

Jia Nengqin Gao Lin Shun Cuijue Zhang Zongrang

(College of life and Environment Science)

Abstract Amperometric mediated glucose biosensor has been developed by immobilizing GOD on Nafion-Fc chemically modified screen-printed carbon electrode. It is further coated by Nafion film. Ferrocene as a redox mediator can catalyze the oxidation of enzymatic generated H_2O_2 at a favorable lower working potential (ca 0.25V vs SCE). The modified Nafion film can be used to avoid the leakage of ferrocene and GOD from biosensor. The interference of electroactive species, such as ascorbic acid and uric acid, can be also decreased. The upper detection limit of designed glucose sensor is 18.0mmol/L, and the response time is less than 60s. This enzyme electrode exhibits a good stability and reproducibility.

Key words Screen-printed carbon paste electrode; Ferrocene; Nafion; glucose; biosensor