

# 反胶束法制备纳米氧化锌及其在葡萄糖生物传感器中的应用

郭伟玲<sup>1,2</sup>, 任湘菱<sup>2</sup>, 唐芳琼<sup>2</sup>, 陈东<sup>2</sup>, 张琳<sup>2</sup>, 刘奉岭<sup>1</sup>

(1. 山东师范大学化学化工与材料科学学院, 山东 济南 250014; 2. 中国科学院理化技术研究所, 北京 100080)

**摘要:** 采用琥珀酸-2-乙基己基磺酸钠/环己烷反胶束体系制备纳米 ZnO, 并以此 ZnO 为载体固定葡萄糖氧化酶, 用戊二醛交联制作成葡萄糖氧化酶电极. 实验结果表明, 此酶电极表现出对葡萄糖溶液浓度的优良响应, 线性范围在  $1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-3}$  mol/L, 响应灵敏度约为  $6 \mu\text{A}/(\text{cm}^2 \cdot \text{mmol/L})$ , 表观米氏常数为 2.57 mmol/L. 还研究了温度和溶液 pH 值对电极电流响应的影响.

**关键词:** 反胶束; 纳米 ZnO; 葡萄糖生物传感器; 酶固定

**中图分类号:** O646.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)03-0531-05

## 1 前言

糖尿病严重威胁人类健康, 是导致人类死亡和残疾的主要疾病之一<sup>[1]</sup>. 简单、迅速地检测和诊断血液中葡萄糖含量对糖尿病的预防和治疗有着重要的意义. 在各种检测手段中, 葡萄糖生物传感器扮演着重要的角色, 它的工作原理是基于对固定在特定载体上的葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase, GOD)催化氧化葡萄糖时产生的过氧化氢电流的检测<sup>[2]</sup>. 因此, 酶的固定化是传感器制备过程中最关键的步骤.

近几年, 研究者把固定酶材料的选择瞄准在纳米材料. 利用纳米颗粒如 Au<sup>[3,4]</sup>, Ag<sup>[5,6]</sup>, Pt<sup>[6,7]</sup>, SiO<sub>2</sub><sup>[6]</sup>和碳纳米管<sup>[8]</sup>及其复合材料<sup>[9,10]</sup>的比表面积大、表面活性中心多、表面反应活性高、催化效率高、吸附能力强等优异性质, 可有效地提高传感器的响应灵敏度. 但由于所用的多为贵金属材料, 价格较为昂贵. 纳米氧化锌是一种宽带隙半导体, 具有良好的生物相容性和高的电子传递特性, 同时具有纳米颗粒的特殊性质, 且合成技术成熟、价格低廉, 引起国内外研究者的极大兴趣. 目前, 研究者大多将以水溶液方法或气相蒸发沉积法制备的纳米 ZnO 用于传感器的研究中, 如 Sun 等<sup>[11,12]</sup>将 ZnO 纳米棒和纳米梳子引入到葡萄糖传感器中, Yu 等<sup>[13]</sup>用 ZnO 溶胶凝胶提高酪氨酸酶传感器的灵敏度, Jin 等<sup>[14]</sup>也利用 ZnO 纳米棒改进尿酸传感器的性能.

本研究首次提出用反胶束法制备的 ZnO 纳米颗粒固定酶. 酶在反胶束中的催化活性高于其在水体系中的催化活性<sup>[15]</sup>, 因此, 这种 ZnO 颗粒可以综合利用纳米材料的优异性能和反胶束的微环境. 实验结果表明, 把这种 ZnO 颗粒作为载体来固定 GOD, 能够显著提高酶

电极的电流响应, 且稳定性好, 线性范围广( $10^{-5} \sim 10^{-3}$  mol/L), 响应灵敏度高 [ $6 \mu\text{A}/(\text{cm}^2 \cdot \text{mmol/L})$ ]. 同时由于 ZnO 纳米颗粒制备成本价廉, 可大大降低传感器的制作成本, 为传感器的微型化和工业化提供参考依据.

## 2 实验

### 2.1 试剂与仪器

葡萄糖氧化酶(GOD, 130 U/mg from *Aspergillus niger*, Sigma),  $\beta$ -D 葡萄糖(Sigma Chem. Co.), 混合磷酸盐(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 北京化学试剂二厂), 琥珀酸-2-乙基己基磺酸钠(AOT, C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>SNa, 日本 Nacalai Tesque, Inc., Kyoto), 聚乙烯醇缩丁醛(PVB, 中国医药进出口公司进口分装), 戊二醛(Sigma Chem. Co.), 乙酸锌[Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 分析纯, 北京化工厂], 氢氧化锂(LiOH·H<sub>2</sub>O, 分析纯, 北京新华化学试剂厂), 其他试剂均为分析纯, 配制溶液的水均为二次蒸馏水.

Ag/AgCl 电极(自制); V-570 型紫外分光光度计, 日本 Jasco 公司; Thurlby 1905-a 型数字多用仪, 英国 Thurlby Electronics Ltd.

### 2.2 纳米颗粒的制备及表征

用 0.2 mol/L 的 AOT/环己烷反胶束体系制备纳米 ZnO. 反胶束有一个重要的参数水合半径  $R$ ,  $R$  与体系的 H<sub>2</sub>O 和表面活性剂的浓度有关. 取  $R_w = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{表面活性剂}]$ ,  $R_e = [\text{电解质}]/[\text{表面活性剂}]$ , 则在一定范围内,  $R$  随  $R_w$  的增大而增大. 设定  $R_e = 0.02$  为定值, 分别配制了  $R_w = 4, 6, 8$  的 Zn(AC)<sub>2</sub> 和 LiOH 反胶束溶液, 然后将两反胶束溶液混合, 胶束之间进行碰撞, 生成纳米 ZnO 颗粒. 所得产物用紫外光谱仪进行分析与检测.

### 2.3 酶电极的制备

收稿日期: 2006-07-24, 修回日期: 2006-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 60372009; 20301015; 90406024)

作者简介: 郭伟玲(1980-), 女, 山西省大同市人, 硕士研究生, 研究方向为纳米材料在生物传感器中的应用; 唐芳琼, 通讯联系人, Tel: 010-82543521, E-mail: tangfq@mail.ipc.ac.cn

直径为 1 mm 的铂丝用金相砂纸抛光,然后用 1:1( $\phi$ ) 的硝酸煮沸 5 min,用二次蒸馏水冲洗干净后在二次水中煮沸.待铂丝冷却后用滤纸擦干,最后分别在丙酮、二次水中超声洗涤,用滤纸擦干待用.

如图 1 所示,取 12 U 的 GOD 溶液依次与等量不同  $R_w$  值制备的反胶束纳米 ZnO (约  $1 \times 10^{-4}$  mol/L) 混合,充

分搅拌使 GOD 很好地增溶进胶束中,加入一定量的 2% PVB 凝胶液,最后加入一定量 1% 戊二醛,混合均匀后将铂丝浸涂一定时间,使 GOD 与纳米 ZnO 进行自组装. PVB 凝胶液在电极上成膜,并将 GOD 和 ZnO 纳米颗粒包埋在电极上,戊二醛作为交联剂使酶膜更致密,防止酶漏失.取出膜晾干,在 4 °C 的冰箱中保存 24 h 后测量.

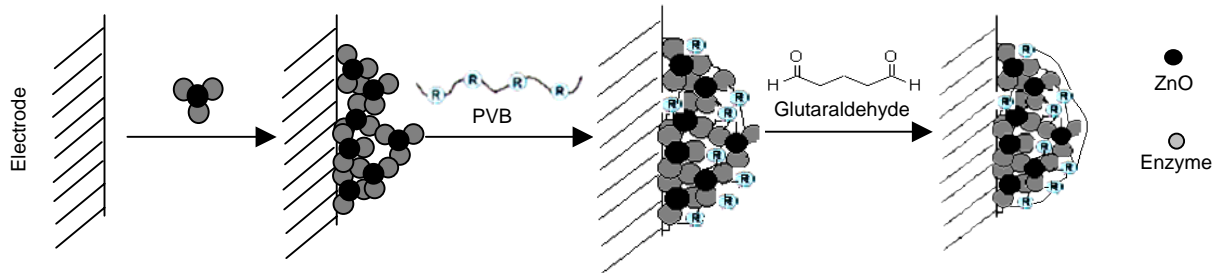


图 1 电极结构示意图

Fig.1 Scheme of the electrode construction

## 2.4 酶电极的测量

电极测量采用二电极体系, Ag/AgCl 电极为参比电极,酶电极为工作电极,底液为含 0.1 mol/L KCl 的磷酸盐缓冲溶液(pH=6.8),测量过程中维持一恒定的温度.测量过程如下:先将双电极置于缓冲溶液中,加 0.4 V 电压于工作电极,当背景电流下降至一恒定值时将电极放至被测溶液(不同浓度的葡萄糖/0.1 mol/L KCl 磷酸盐缓冲溶液)中,分别记录稳定时的电流响应值,扣除初始背景电流值即为相应葡萄糖浓度的电流响应值.

## 3 结果和讨论

### 3.1 反胶束纳米 ZnO 的紫外光谱表征

利用 AOT/环己烷反胶束体系制备纳米 ZnO,其中 AOT 是阴离子表面活性剂,分子式如图 2 所示.形成反胶束之后,反胶束内部是亲水基,带有负电荷,不影响电子的传递.

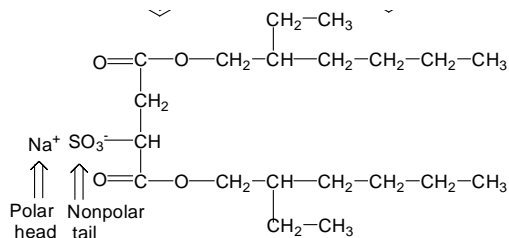


图 2 AOT 分子式

Fig.2 Scheme of molecular formula of AOT

反胶束法制备的纳米 ZnO 的紫外吸收曲线如图 3 所示.由图可以看出,吸收峰与文献<sup>[16]</sup>比较有明显的蓝移,说明制备的 ZnO 颗粒粒径较小,同时可以观察到

吸收峰比较窄,表明 ZnO 颗粒较为均匀.

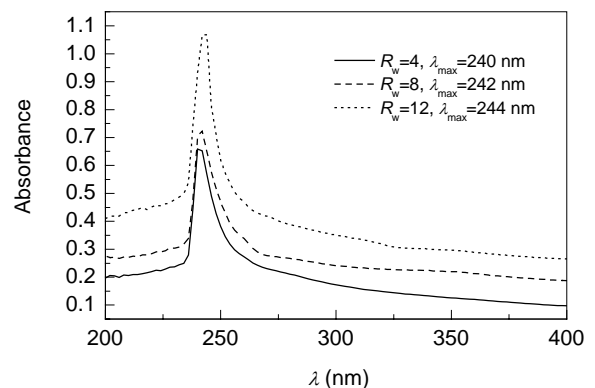


图 3 反胶束 ZnO 的紫外吸收曲线

Fig.3 UV absorption spectra of ZnO in reverse micelles

### 3.2 纳米 ZnO 的引入对电极电流响应的影响

图 4 给出了以不同  $R_w$  值制备的纳米 ZnO 颗粒为载体的酶电极电流响应曲线.由图可以看出,纳米 ZnO 的加入大大提高了酶电极的电流响应,以  $R_w=4$  的酶电极为例,葡萄糖浓度为 11.1 mmol/L 时电流响应为 54900 nA/cm<sup>2</sup> 左右,约为未加纳米颗粒电极电流响应(1569 nA/cm<sup>2</sup>)的 35 倍,比加入金属颗粒<sup>[5,17]</sup>的增强效果更显著.这可能有三方面的因素在起作用.首先, ZnO 颗粒是宽带隙半导体,具有优良的生物相容性和高的电子传递特性,非常适合固定低等电点的葡萄糖氧化酶<sup>[18]</sup>(等电点为 4.2);其次, ZnO 颗粒在反胶束中形成,反胶束为保持酶的活性提供了良好的微环境.反胶束是指表面活性剂溶解在有机溶剂中,当其浓度超过临界胶团浓度(CMC)后,形成亲水极性头朝内、疏水链朝外的液体颗

粒结构. 葡萄糖氧化酶(GOD)可以被截留于反胶束内部的水腔中, 这个近似本体水溶液的微环境有利于酶长时间保持较高的催化活性<sup>[19]</sup>和稳定性. 同时当 GOD 水溶液增溶进 AOT 反胶束溶液中时, AOT 在 GOD 部分表面形成屏障, 使 GOD 不会直接与溶解 PVB 的极性溶剂接触, 保持其水化层, 使酶的构象稳定<sup>[20]</sup>, 从而保持酶的催化活性; 最后, 在反胶束体系下形成的 ZnO 纳米颗粒, 其疏水基与 GOD 的疏水部分相互交叉、相互作用, 而 ZnO 与 GOD 内部的 FAD 亲水基团发生作用, 从而引起 GOD 构型的变化, 使 GOD 的活性中心 FAD 暴露出来, 有利于电子在酶和电极之间传递, 提高酶的催化活性<sup>[21]</sup>.

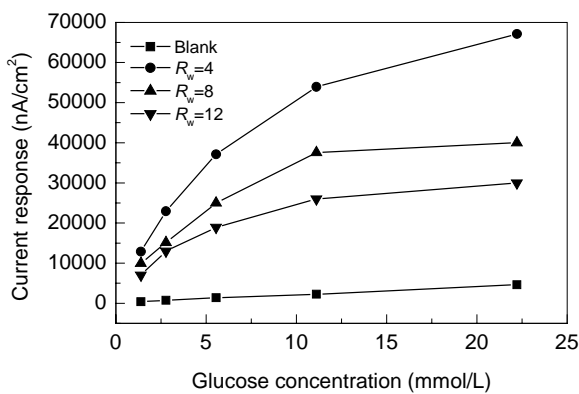


图 4 不同  $R_w$  值 ZnO 酶电极电流响应曲线  
Fig.4 Calibration curves of the electrodes added with and without ZnO nanoparticles under different  $R_w$

### 3.3 温度对酶电极电流响应的影响

酶的催化活性的发挥对体系温度有相当强的依赖性, 图 5 给出了体系温度的变化对电极电流响应的影响曲线. 实验表明, 低温时由于酶不活泼, 催化活性小, 导致电流响应较小; 随着温度的升高, 响应电流增大, 在 50℃ 左右酶的催化活性达到最大, 这说明用纳米颗粒固定的酶分子能在较高的温度下保持催化活性; 当温度

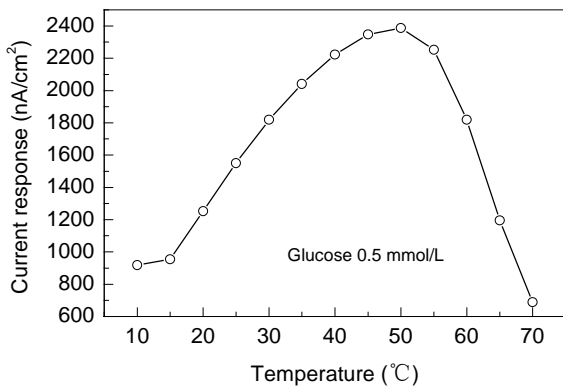


图 5 测量温度对电极电流响应的影响  
Fig.5 Effect of temperature on the behavior of enzyme electrode

进一步升高, 酶逐渐失活, 因而响应电流降低. 而且温度高于 40℃ 时, 电极稳定时间逐渐增长, 背景电流也逐渐增大, 所以选择与人的体温相近的 35℃ 作为实验的操作温度.

### 3.4 溶液 pH 值对酶电极电流响应的影响

pH 值对传感器的影响非常重要, 因为固定的 GOD 的活性很大程度上依赖于溶液 pH 值的变化. 本研究测量了溶液 pH 值范围为 3~9 时, 酶电极对浓度为 2 mmol/L 的葡萄糖浓度的电流响应, 结果如图 6 所示. 当  $pH < 6.8$  时, 响应电流随 pH 增大而迅速增大; 当  $pH > 6.8$  时, 响应电流随 pH 增大而略微减小. 这与游离葡萄糖氧化酶的最具活性且最稳定的 pH 值(5.5~7.0)以及侯宪全等<sup>[22]</sup>的研究结果基本吻合.

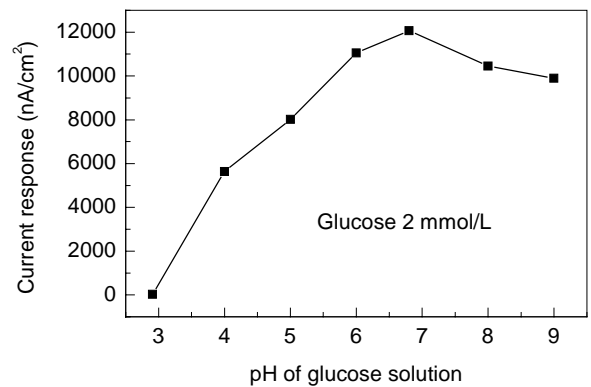


图 6 葡萄糖溶液 pH 值对酶电极电流的影响  
Fig.6 Effect of the pH value in glucose solution on the response of enzyme electrode

### 3.5 酶电极的线性、灵敏度

图 7 给出了在最佳实验条件下测得的  $I$ (响应电流)- $C$ (葡萄糖浓度)曲线. 在葡萄糖浓度为  $1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-3}$  mol/L 范围内曲线具有良好线性, 相关系数  $R=0.997$ , 响应灵敏度约为  $6 \mu A/(cm^2 \cdot mmol/L)$ . 利用 Michaelis-Menten 公式  $i = i_{max} - Ki/C$  评价酶电极的灵敏度和酶的生物活性情况, 其中,  $i$  为稳态催化电流,  $i_{max}$  为最大催化电流,  $K$  为表观米氏常数. 由计算得出  $K=2.57$  mmol/L, 这表明整个体系是受酶的催化动力学所控制<sup>[23]</sup>.

### 3.6 酶电极的稳定性

采用包埋-交联法固定 GOD, 使酶很好地固定在电极的表面. 使用同一电极对浓度为 5.6 mmol/L 的葡萄糖溶液进行连续测量, 在连续测量 25 次后, 电流响应仍为初始电流响应的 70% 以上, 如图 8 所示. 电极放置 20 d 后再进行测试, 电流响应仍保持初始电流响应的 80%. 电极有良好的测量稳定性和寿命<sup>[11,13,14]</sup>, 说明纳米氧化锌有利于酶活性的保持.

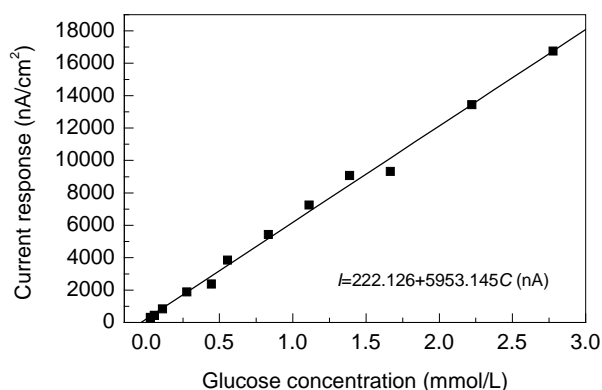


图7 酶电极的线性标准曲线

Fig.7 The linear calibration curve of enzyme electrode

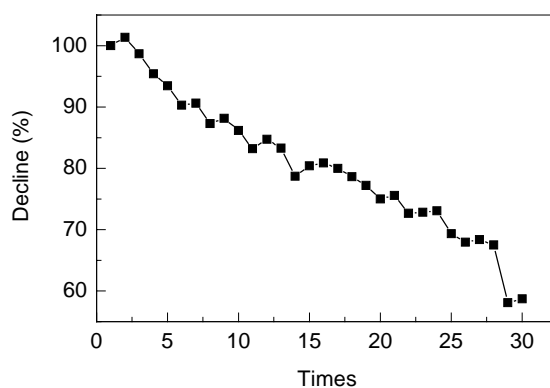


图8 酶电极的稳定性曲线

Fig.8 The stabilization curve of enzyme electrode

## 4 结论

本工作以反胶束法制备的纳米 ZnO 为载体固定葡萄糖氧化酶, 以戊二醛为交联剂制作葡萄糖生物传感器, 此传感器电流响应高, 响应时间短(20 s 以内), 葡萄糖溶液浓度线性范围在  $1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-3}$  mol/L, 电极灵敏度可达约  $6 \mu\text{A}/(\text{cm}^2 \cdot \text{mmol/L})$ , 表观米氏常数为  $2.57 \text{ mmol/L}$ , 而且操作稳定性好, 连续使用 25 次电流响应值仍保持初始电流响应的 70% 以上. 纳米 ZnO 的加入不仅显著增强了传感器的电流响应, 而且使酶电极制作成本大大降低, 符合生物传感器小型化、工业化的发展趋势. 此外, 还考察了温度和溶液 pH 值对电极电流响应的影响, 当温度为  $50^\circ\text{C}$ , pH 为 7 左右时电极电流响应达到最大值. 由于此酶电极制作方法简单易行且价廉, 有望进一步在临床分析上应用.

### 参考文献:

- [1] Wang J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges [J]. *Electroanalysis*, 2001, 13(12): 983–988.
- [2] Jung S K, Wilson G S. Polymeric Mercaptosilane-modified Platinum Electrode for Elimination of Interferants in Glucose Biosensor [J]. *Anal. Chem.*, 1996, 68: 591–596.
- [3] Zayats M, Baron R, Popov I, et al. Biocatalytic Growth of Au Nanoparticles: From Mechanistic Aspects to Biosensors Design [J]. *Nano Lett.*, 2005, 5(1): 21–25.
- [4] 江丽萍, 吴霞琴, 朱柳菊, 等. 基于金纳米的第三代平面型葡萄糖传感器的研究 [J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 32(1): 48–52.
- [5] 唐芳琼, 沈继锋, 张金芳, 等. 超细 Ag 颗粒对葡萄糖氧化酶生物传感器响应灵敏度的增强效应 [J]. *高等学校化学学报*, 1999, 20(4): 634–636.
- [6] Ren X L, Meng X W, Chen D, et al. Using Silver Nanoparticle to Enhance Current Response of Biosensor [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21: 433–437.
- [7] Gooding J J, Praig V G, Hall E A H. Platinum-catalyzed Enzyme Electrodes Immobilized on Gold Using Self-assembled Layers [J]. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 2396–2402.
- [8] Joshi P P, Merchant S A, Wang Y D, et al. Amperometric Biosensors Based on Redox Polymer–Carbon Nanotube–Enzyme Composites [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 3183–3188.
- [9] Hrapovic S, Liu Y L, Male K B, et al. Electrochemical Biosensing Platforms Using Platinum Nanoparticles and Carbon Nanotubes [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 1083–1088.
- [10] 任湘菱, 唐芳琼, 超细银–金复合颗粒增强酶生物传感器的研究 [J]. *化学学报*, 2002, 60(3): 393–397.
- [11] Sun X W, Wei A, Wang J X, et al. Enzymatic Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorod Array Grown by Hydrothermal Decomposition [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2006, 89: 123902-1–3.
- [12] Wang J X, Sun X W, Wei A, et al. Zinc Oxide Nanocomb Biosensor for Glucose Detection [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2006, 88: 233106-1–3.
- [13] Yu R Q, Liu Z M, Liu Y L, et al. A Mediator-free Tyrosinase Biosensor Based on ZnO Sol–Gel Matrix [J]. *Electroanalysis*, 2005, 17(12): 1065–1070.
- [14] Jin L T, Zhang F F, Wang X L, et al. Immobilization of Uricase on ZnO Nanorods for a Reagentless Uric Acid Biosensor [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 519: 155–160.
- [15] De Gomez-Puyou M T, Gomez-Puyou A. Enzymes in Low Water Systems [J]. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1998, 33(1): 53–89.
- [16] 井力强, 孙晓君, 郑大方, 等. ZnO 超微粒子的量子尺寸效应和光催化性能 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2001, 33(3): 344–348.
- [17] 唐芳琼, 孟宪伟, 陈东, 等. 纳米颗粒增强的葡萄糖生物传感器 [J]. *中国科学(B 辑)*, 2000, 30(2): 119–124.
- [18] Topoglidis E, Cass A E G, O'Regan B, et al. Immobilisation and Bioelectrochemistry of Proteins on Nanoporous  $\text{TiO}_2$  and ZnO Films [J]. *Electroanal. Chem.*, 2001, 517: 20–27.
- [19] 朱浩, 施翮, 范映辛, 等. 反相胶束体系中的酶学研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(3): 204–210.
- [20] 唐芳琼, 江龙. 传感器与反胶束和酶敏感膜 [J]. *中国科学(B 辑)*, 1999, 29(6): 514–518.
- [21] Chen Z J, Ou X M, Tang F Q, et al. Effect of Nanometer Particles on the Adsorbability and Enzymatic Activity of Glucose Oxidase [J]. *Colloids Surf., B: Biointerf.*, 1996, 7: 173–179.
- [22] 侯完全, 任湘菱, 唐芳琼, 等. 纳米 ZnO 增强葡萄糖生物传感器的制备和应用 [J]. *分析化学*, 2006, 34(3): 303–306.
- [23] Ralph A K, Wilson G S. Rotating Ring-disk Enzyme Electrode for Biocatalysis Kinetic Studies and Characterization of the Immobilized Enzyme Layer [J]. *Anal. Chem.*, 1980, 52: 1198–1205.

## Preparation of ZnO Nanoparticles in a Reverse Micellar System and Their Application in Glucose Biosensor

GUO Wei-ling<sup>1,2</sup>, REN Xiang-ling<sup>2</sup>, TANG Fang-qiong<sup>2</sup>, CHEN Dong<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>2</sup>, LIU Feng-ling<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China;  
2. Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** ZnO nanoparticles are produced in sodium-bis-(2-ethylhexyl ) sulfosuccinate (AOT)/cyclohexane reverse micelle system and then used to immobilize glucose oxidase (GOD) to prepare enzyme electrode of biosensor. The experimental results show that ZnO nanoparticles can significantly enhance the catalytic activity of the immobilization enzyme, and the electrode has a very good response to the concentration of glucose solution. The linear range for glucose determination is from  $1 \times 10^{-5}$  to  $3 \times 10^{-3}$  mol/L, with a high sensitivity [ $6 \mu\text{A}/(\text{cm}^2 \cdot \text{mmol/L})$ ] and the apparent Michaelis–Menten constant of 2.57 mmol/L. In addition, the effects of pH value and temperature of glucose solution on the amperometric response of the electrode are also investigated.

**Key words:** reverse micelles; ZnO nanoparticles; glucose biosensor; immobilization enzyme