

文章编号:1671 - 7333(2008)02 - 0085 - 05

葡萄糖氧化酶在金胶修饰碳糊电极上的直接电化学及其应用

郭晓明,王根礼,叶伟林,周祖新,朱 贤

(上海应用技术学院 化学工程系,上海 200235)

摘要: 在制备金胶修饰碳糊电极(Au/CPE)的基础上,将葡萄糖氧化酶(GOD)通过吸附作用固定在Au/CPE表面。固定化的GOD与电极之间能够进行直接的电子传递,纳米金颗粒能增大对GOD的吸附量和吸附强度,同时使GOD的氧化还原中心FAD/FADH₂的还原态FADH₂更趋稳定。对修饰电极检测葡萄糖的机理进行了讨论,并制备了基于检测氧化电流的直接电子传递型葡萄糖传感器。

关键词: 金胶;碳糊电极;直接电子传递;葡萄糖氧化酶;葡萄糖传感器

中图分类号: O 646

文献标识码: A

Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode and Its Application

GUO Xiaoming, WANG Genli, YE Weilin, ZHOU Zuxin, ZHU Xian

(Department of Chemical Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China)

Abstract: Colloidal gold modified carbon paste electrode has been prepared. Glucose oxidase (GOD) is immobilized on the Au/CPE by absorption exhibiting a well-defined behavior of direct electron transfer. The magnitude of adsorbed GOD is increased and the absorbility of GOD improved as the gold nanoparticles are introduced into CPE. Meanwhile, FADH₂ adsorbed on Au/CPE is more stable than that adsorbed on CPE. The detection mechanism of the modified electrode for glucose has been discussed and glucose sensor of direct electron transfer is fabricated based on the principle of detecting the oxidation current.

Key words: colloidal gold; carbon paste electrode; direct electron transfer; glucose oxidase; glucose sensors

基于酶与电极间直接电子传递的电流型生物传感器能够简单直接地获取信号,已成为生物电化学研究最重要的发展方向之一。但由于酶通常具有较大的分子量,其氧化还原活性中心被厚的

蛋白质层包裹,酶的活性中心往往难以与电极发生直接电子转移^[1]。通过对电极进行修饰的方法可改善酶的活性中心与电极的作用,实现电子的直接传递^[2~4]。鞠焯先等^[5]通过检测 GOD 中

收稿日期:2007 - 11 - 22

基金项目:上海市教育委员会科技基金资助项目(06OZ001)

作者简介:郭晓明(1973 -),男,讲师。

的 FAD 在电极表面的还原电流制得了直接电子传递型葡萄糖传感器。本文考察了 GOD 与 Au/CPE 间的直接电子传递行为,探讨了溶解氧及纳米金颗粒对 GOD 直接电子传递行为的影响,并对葡萄糖氧化酶/纳米金颗粒修饰碳糊电极 (GOD/Au/CPE) 检测葡萄糖的机理进行了讨论,制备出了基于检测氧化电流的直接电子传递型葡萄糖传感器。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660 电化学综合测试仪(上海辰华仪器公司);PHS-3D 型酸度计(上海三信仪表厂);葡萄糖氧化酶购自 Sigma 公司(15 500 U/g);石墨粉购自国药集团化学试剂有限公司(光谱纯);所用其他试剂柠檬酸钠、氯金酸、葡萄糖等均为分析纯,实验溶液均用二次蒸馏水配制。

1.2 实验方法

1.2.1 金胶的制备

金胶的制备参照文献[6]。先配制 1% 的柠檬酸钠溶液和 0.01% 的氯金酸溶液,然后移取 0.5 mL 柠檬酸钠溶液滴入到预先煮沸的 50 mL 氯金酸溶液中,保持沸腾 15 min,然后自然冷却。

1.2.2 电极的制备

称取石墨粉 8 g 于研钵中,加入上述制备的金胶 24 mL,搅拌使其混合均匀,在烘箱中用 35 的低温烘干。然后加入 2.88 mL 石蜡油,在研钵中充分研磨,混合均匀。将此混合物填入一内径为 4 mm 的玻璃管中,用玻棒压紧。在描图纸上抛光,一端用铜丝引出,即得 Au/CPE。在 Au/CPE 上滴加一定量的 GOD 溶液,室温干燥 24 h,即得 GOD/Au/CPE。葡萄糖修饰碳糊电极 (GOD/CPE) 的制备方法与 GOD/Au/CPE 相同,只是在制备过程中不加入金胶。

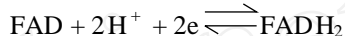
1.2.3 电化学测量

采用三电极体系:修饰电极作工作电极,1 cm²铂片作对电极,饱和甘汞电极作参比电极。除非特别说明,所有测试的底液均通高纯氮气 20 min 除氧,并在整个实验过程中保持氮气气氛。

2 结果与讨论

2.1 GOD/Au/CPE 中 GOD 的直接电子传递行为

图 1 是 CPE、Au/CPE 和 GOD/Au/CPE 在 pH 为 6.5 的磷酸缓冲液 (PBS) 中的循环伏安图。由图可见,未修饰 GOD 的 CPE 和 Au/CPE 循环伏安曲线未出现氧化还原峰,图 1 中的 (a)、(b)。同样条件下,GOD/Au/CPE 的循环伏安曲线上出现了一对氧化还原峰,图 1 中的 (c)。显然,该氧化还原峰是固定在 Au/CPE 上的 GOD 产生的。GOD 的氧化还原活性中心 FAD/FADH₂ 与电极发生了直接电子传递。反应如下:



氧化还原峰电位分别出现在 -0.45 和 -0.52 V,氧化还原峰电流之比接近 1。

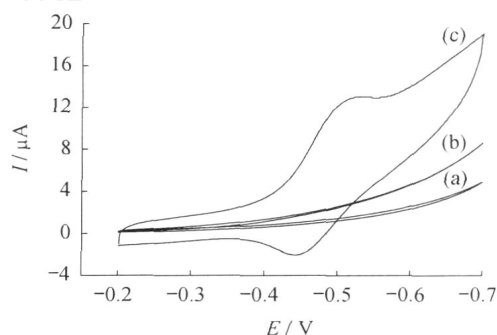


图 1 在 pH=6.5 磷酸盐缓冲液中的循环伏安图(扫描速度为 50 mV/s)

(a) CPE,(b) Au/CPE,(c) GOD/Au/CPE

2.2 底液中的溶解氧对 GOD 直接电子传递行为的影响

底液中的溶解氧对 GOD 的直接电子传递行为有很大的影响。图 2 中的曲线 (a) 是 GOD/Au/CPE 在自然溶氧状态的 PBS 中的循环伏安曲线。由曲线可见,还原峰电流比氧化峰电流大。这是因为电对 O₂/H₂O₂ 的电极电势比电对 FAD/FADH₂ 的电极电势大,空气中的氧气溶解在 PBS 中后,会将 FAD/FADH₂ 电对中的 FADH₂ 氧化成 FAD,使得 FAD/FADH₂ 电对大多以氧化态 FAD 形式存在,因此电极上产生的还原电流比氧化电流大。当 PBS 中通入高浓度氧气后,FADH₂ 浓度进一步减小,FAD 浓度则进一步增大,导致还原峰电流进一步增大,而氧化峰电流进一步减小,见曲线 (b)。曲线 (c) 是在 PBS 中通入高纯氮气达饱和的情况下测得的循环伏安曲线。由于氮气的通入使 PBS 中的溶解氧减少,FAD/FADH₂ 电对中的 FADH₂ 浓度增加,FAD 浓度减少。因而还原峰大为减小,氧化峰增大,氧化还原峰显示

出较好的对称性。

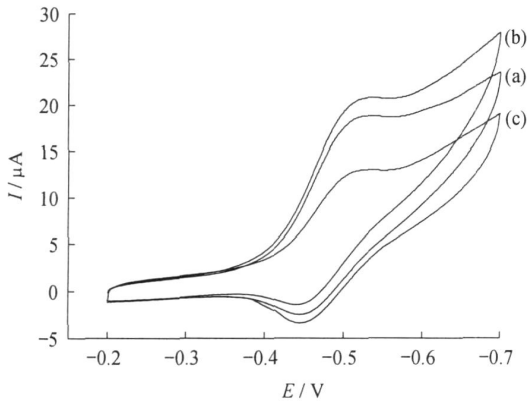


图 2 GOD/Au/CPE 在 pH=6.5 磷酸盐缓冲液中的循环伏安图(扫描速度为 50 mV/s)

(a) 自然溶氧状态,(b) 通氧气饱和,(c) 通氮气饱和

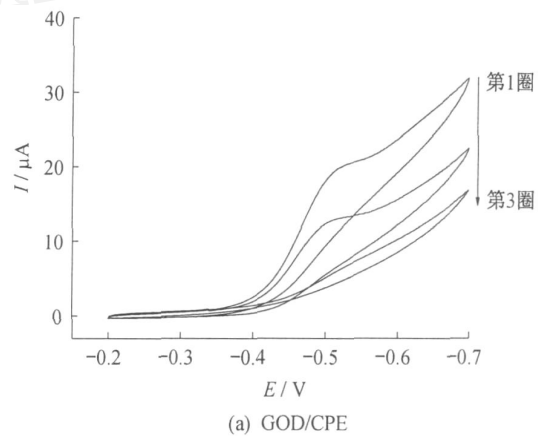
2.3 纳米金颗粒对 GOD 的直接电子传递行为的影响

文献[7-10]报道在生物传感器中加入纳米金颗粒能明显地提高传感器的响应电流和稳定性,但纳米金颗粒与酶及电极之间的相互作用机理还不是非常清楚。本文通过对 GOD/CPE 和 GOD/Au/CPE 伏安行为的比较,考察纳米金颗粒对 GOD 的直接电子传递行为的影响。

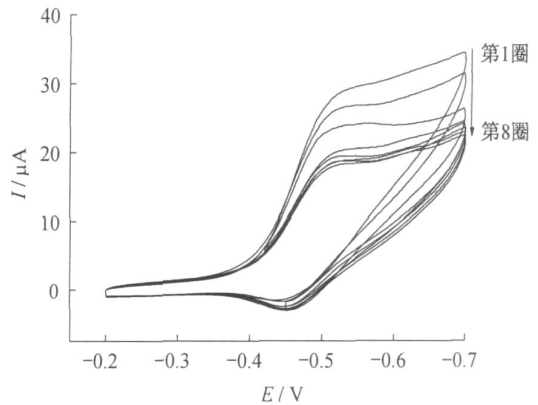
图 3(a)是 GOD/CPE 在 pH 为 6.5 的 PBS 中的循环伏安曲线。图中出现了一个较强的还原峰和一个很弱的氧化峰,这表明 FAD/FADH₂ 与 CPE 直接进行了电子传递。然而,随着扫描次数的增加,电流峰迅速减小,到第三圈时几乎消失。原因在于 GOD 仅通过吸附作用固定在 CPE 上,而这种吸附力非常微弱,当电极浸入溶液时,GOD 在水分子的作用下很快脱附进入溶液。图 3(b)是相同条件下 GOD/Au/CPE 的循环伏安曲线。扫描 4 周后,电流峰基本达到稳定,循环伏安曲线不再变化。这是由于纳米金颗粒具有大的比表面积,同时与 GOD 有很好的亲和性,因而 GOD 在 Au/CPE 上的吸附量大,吸附力强,能够较牢固地固定在电极表面。

比较图 3(a)和(b)还可以看到,GOD/CPE 的还原峰较强,氧化峰则很弱,而稳定后的 GOD/Au/CPE 氧化还原峰近乎相等。在 GOD/CPE 中,GOD 直接吸附在碳糊电极上,极少量的溶解氧(虽然已经通氮气除氧,但溶液中毕竟有微量的溶解氧)就可将 FADH₂ 氧化为 FAD,因此还原峰电流大,氧化峰电流很小。GOD/Au/CPE 中

GOD 主要吸附在纳米金颗粒的表面,纳米金颗粒使 FADH₂ 相对稳定,不易被溶液中极少量的氧气氧化为 FAD,因而有较多的 FADH₂ 在电极表面丢失电子产生较大的氧化电流。作者认为纳米金颗粒稳定 FADH₂ 的可能原因如下:电流对 Au+/Au 的电极电势与金颗粒的大小有关,且随着金颗粒的变小而变小^[11]。当金颗粒小到一定程度时,(Au+/Au) 小于 (FAD/FADH₂),即纳米金颗粒成为比 FADH₂ 更强的电子给体。此时,在金胶修饰碳糊电极上,溶解氧先氧化纳米金颗粒,使 FADH₂ 得到了保护,因此相对稳定。这是纳米金颗粒纳米尺寸效应的一种表现。



(a) GOD/CPE

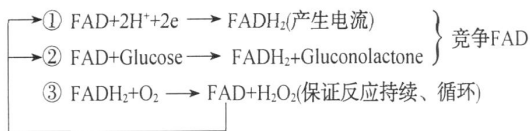


(b) GOD/Au/CPE

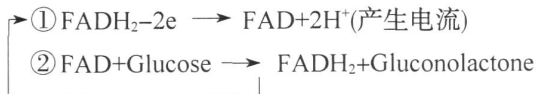
图 3 在 pH=6.5 磷酸盐缓冲液中的循环伏安图(扫描速度为 50 mV/s)

2.4 GOD/Au/CPE 对葡萄糖的响应机理

应用 GOD/Au/CPE 中 GOD 与电极之间的直接电子传递可实现对葡萄糖的检测,制备真正意义上的直接电子传递型生物传感器。GOD/Au/CPE 对葡萄糖的响应机理有两种:一种是通过检测电极上还原电流的变化来达到检测葡萄糖的目的。响应机理如下:



FAD 在电极表面得到电子被还原成 FADH_2 , 产生还原电流。当在底液中加入葡萄糖时, FAD 也会被葡萄糖还原成 FADH_2 。这样导致在电极上可被还原的 FAD 减少, 产生的还原电流也相应减小。在一定的范围内, 加入葡萄糖的量与还原电流的减小值成正比。为了使反应能够持续进行, 必须通入氧气将 FADH_2 氧化为 FAD 以补充消耗掉的 FAD。另一种是通过检测氧化电流的变化来达到检测葡萄糖的目的。响应机理如下:



FADH_2 在电极表面失去电子被氧化成 FAD, 产生氧化电流。当加入葡萄糖时, FAD 被葡萄糖还原成 FADH_2 。这样导致在电极上可被氧化的 FADH_2 增加, 产生的氧化电流也相应增大。在一定的范围内, 加入葡萄糖的量与氧化电流的增加值成正比, 因此通过检测电极上氧化电流的变化可以达到检测葡萄糖的目的。为避免 FADH_2 被底液中的溶解氧所氧化而影响检测, 须通入氮气排氧。

检测氧化电流变化的传感器相对检测还原电流变化的传感器而言, 灵敏度更低。但其检测原理更简单直接, 且可避免反应产生的 H_2O_2 对检测的干扰 (因为在 $-0.4 \sim -0.5 \text{ V}$ 的检测电位下, H_2O_2 也会扩散到电极上发生还原反应产生还原电流), 因此本文制备的传感器选择基于检测氧化电流变化的原理来实现对葡萄糖的检测。

图 4 是 GOD/Au/CPE 在 pH 为 6.5 的 PBS 中测得的对葡萄糖响应的循环伏安图。加入葡萄糖前, GOD/Au/CPE 呈现 FAD/ FADH_2 的一对氧化还原峰, 见曲线 (a)。随着葡萄糖的加入, 还原峰减小, 而氧化峰增大, 见曲线 (b) ~ (e)。

2.5 传感器的性能

传感器在 pH 为 6.5, 工作电位为 -0.43 V , 工作温度为 30°C 的最佳实验条件下得到的工作曲线如图 5 所示。葡萄糖的浓度在 $0.08 \sim 0.8 \text{ mmol/L}$ 的范围内与响应电流呈线性关系, 回归方程为 $I(\mu\text{A}) = 0.035 + 1.58C(\text{mmol/L})$, r

$= 0.991$, 检出限为 0.04 mmol/L ($S/N = 3$)。传感器达到稳定电流的 95% 所需时间小于 10 s 。

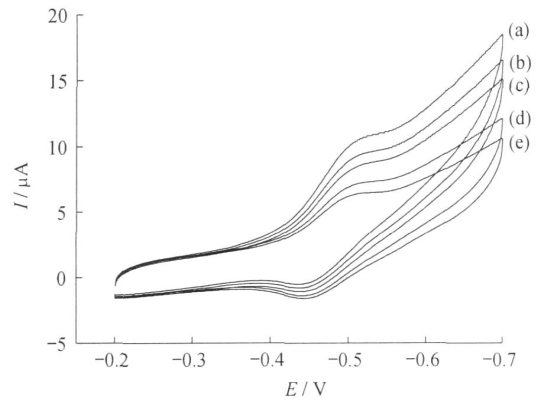


图 4 GOD/Au/CPE 在 pH=6.5 磷酸盐缓冲液中的循环伏安图 (通氮气饱和, 扫描速度为 50 mV/s) 葡萄糖浓度为: (a) 0, (b) 0.2, (c) 0.4, (d) 0.6, (e) 0.8 mmol/L

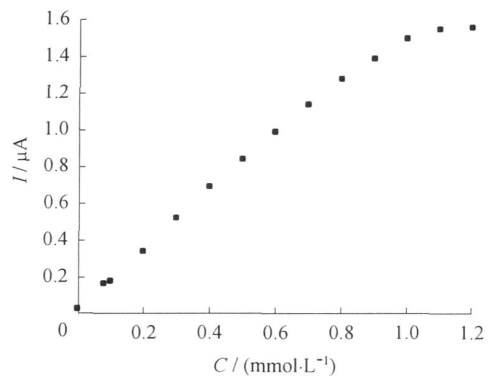


图 5 葡萄糖浓度与电流的线性关系图

在含 0.4 mmol/L 葡萄糖的 PBS 溶液中加入 0.06 mmol/L 抗坏血酸或 0.3 mmol/L 尿酸 (模拟人血成分)^[12], 响应电流几乎不变。这一实验结果表明, 传感器能很好地消除抗坏血酸和尿酸的干扰。

3 结论

通过吸附作用固定在金胶修饰碳糊电极表面的 GOD 能够与电极之间进行直接电子传递。GOD 中的氧化还原中心 FAD/ FADH_2 易受到底液中溶解氧的影响而大多以氧化态 FAD 形式存在, 通入氮气可消除溶解氧的影响。纳米金颗粒对 GOD 的吸附量大, 吸附力强。吸附后 GOD 中的 FADH_2 更趋稳定。利用 FAD/ FADH_2 在电极

表面的氧化反应制备了直接电子传递型的葡萄糖传感器。该传感器的制备方法简单,检测机理直接简洁,具有优良的选择性。

参考文献:

- [1] 鞠焜先. 电分析化学与生物传感技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] K Narasimhan, L B Wingard Jr. Enhanced Direct Electron Transport with Glucose Oxidase Immobilized on (Aminophenyl) Boronic Acid Modified Glassy Carbon Electrode [J]. Analytical Chemistry, 1986, 58: 2984 - 2987.
- [3] D Savitri, C K Mitra. Electrochemistry of Reconstituted Glucose Oxidase on Carbon Paste Electrodes [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998, 47: 67 - 73.
- [4] Z H Dai, J Ni, X H Huang, et al. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Immobilized on A Hexagonal Mesoporous Silica-MCM-41 Matrix [J]. Bioelectrochemistry, 2006, 70(2): 250 - 256.
- [5] S Q Liu, H X Ju. Reagentless Glucose Biosensor Based on Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase Immobilized on Colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, 19: 177 - 183.
- [6] 胡瑞省, 刘善堂, 朱梓华, 等. 金纳米粒子在平整硅基表面上的组装[J]. 物理化学学报, 2000, 16(3): 202 - 206.
- [7] J G Zhao, R W Henkens, J Stonehuermer, et al. Direct Electron Transfer at Horseradish Peroxidase Colloidal Gold Modified Electrodes [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1992, 327(1): 109 - 119.
- [8] 唐琼芳, 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.
- [9] S Y Xu, X Z Han. A Novel Method to Construct A Third-generation Biosensor: Self-assembling Gold Nanoparticles on Thiol-functionalized Poly (Styrene-co-acrylic Acid) Nanospheres [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 19: 1117 - 1120.
- [10] Y Xiao, H X Ju, H Y Chen. Hydrogen Peroxide Sensor Based on Horseradish Peroxidase-labeled Au Colloids Immobilized on Gold Electrode Surface by Cysteamine Monolayer [J]. Anal Chim Acta, 1999, 391: 73 - 82.
- [11] 江龙. 量子化尺寸纳米颗粒及其在生物体系中的作用[J]. 无机化学学报, 2000, 16(2): 185 - 194.
- [12] 吴霞琴, 郭晓明, 王荣, 等. 普鲁士蓝修饰铂盘电极的胆固醇传感器的研制[J]. 分析化学, 2001, 29(11): 1273 - 1275.

《中高档铸铁浴缸搪瓷釉研究》项目通过市教委结题

2008年1月10日,在我校召开上海市教委科技发展基金项目《中高档铸铁浴缸搪瓷釉研究》结题会,结题会由学校科学技术处主持,项目负责人钱蕙春高级工程师代表项目组作项目研究报告。

项目研究中高档铸铁浴缸搪瓷釉集成采用多种碱金属和碱土金属氧化物,产生“双碱和多碱效应”,引入乳浊剂,产生“乳浊效应”,磨加物引入纳米二氧化硅等新方法,解决了铸铁浴缸搪瓷耐酸差、易污染等难题,使釉层减薄,降低材料消耗,搪瓷釉性能通过美国上海科勒有限公司工业化试验。

结题专家组听取了项目研究报告和认真审阅有关结题材料后,一致同意通过结题。