

[Note]

www.whxb.pku.edu.cn

## 纳米聚苯胺修饰石墨电极的葡萄糖双酶传感器

郭小丽 郭敏 王新东\*

(北京科技大学理化系, 北京 100083)

**摘要:** 用循环伏安法在石墨电极上制得纳米纤维聚苯胺, 并在其上固定葡萄糖氧化酶(GOD)和辣根过氧化物酶(HRP)制备葡萄糖双酶传感器. 用交流阻抗、SEM 等技术对其进行表征; 考察了各种因素对双酶电极响应电流的影响以及双酶电极的稳定性. 该传感器对葡萄糖响应电流的测定在 0.05 V(*vs* SCE)下进行, 有效避免了电活性物质的影响, 线性响应范围为 0.05–2.0 mmol·L<sup>-1</sup>.

**关键词:** 纳米纤维聚苯胺; 双酶; 葡萄糖传感器

**中图分类号:** O646

## Bienzymatic Glucose Biosensor Based on Graphite Electrode Modified with Nanofibrous Polyaniline

GUO Xiao-Li GUO Min WANG Xin-Dong\*

(Department of Physical Chemistry, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, P. R. China)

**Abstract:** Nanofibrous polyaniline (PANI) was electropolymerized on graphite electrode by cyclic voltammetry (CV), and a glucose bienzyme sensor based on glucose oxidase (GOD) and horseradish peroxidase (HRP) immobilized on the modified electrode was fabricated. The bienzymatic sensor was characterized by ac impedance spectrometry and SEM. The stability and the factors affected the response of the bienzymatic sensor to glucose were studied. The detection of glucose was carried out at 0.05 V (*vs* SCE) to minimize the electroactive interferences. The linear response range of the as-prepared bienzyme sensor for glucose was between 0.05 mmol·L<sup>-1</sup> and 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>.

**Key Words:** Nanofibrous PANI; Bienzyme; Glucose biosensor

随着导电高聚物的出现, 用导电高聚物固定酶构成生物传感器引起人们的广泛重视. 其主要原因是导电聚合物膜含有大量的活性中心, 十分有利于电催化的进行. 而且导电聚合物膜制备方法简单, 大量的聚合物可按已知的方法合成. 用导电高聚物固定酶制备的酶传感器有快速的响应能力, 很好的操作稳定性, 比较长的保存时间以及较低的成本<sup>[1]</sup>. 在已有的导电聚合物固定葡萄糖氧化酶(GOD)构成的葡萄糖传感器的报道中, 对聚苯胺葡萄糖单酶传感器已有大量的研究<sup>[2–4]</sup>, Eftekhari<sup>[2]</sup>报道的聚苯胺葡萄糖单酶传感器主要是通过检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化电流来表示葡萄糖的浓度, 但是由于对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化需要在

高电位下进行, 因此很难消除电活性物质对葡萄糖传感器响应的干扰.

将辣根过氧化物酶(HRP)与葡萄糖氧化酶结合制成双酶电极, 通过过氧化物酶对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生物电催化还原进行测定, 进而间接测定葡萄糖的含量<sup>[1,5]</sup>. 这种体系一般在较低的电位下进行, 避免了其它电活性物质的干扰, 提高了生物传感器的灵敏度和选择性, 但双酶体系的稳定性较差.

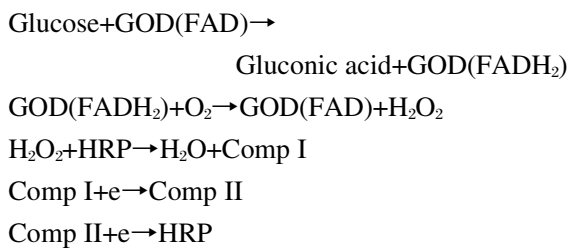
采用聚合物修饰电极来固定酶可以消除双酶体系稳定性差的缺点. 纳米纤维有很高的比表面积与活性, 可以显著地提高催化效率, 在电化学反应中作为电子传递媒介有独特的优势. 因此, 纳米纤维聚苯

Received: September 26, 2006; Revised: November 8, 2006; Published on Web: March 6, 2007.

\*Corresponding author. Email: echem@ustb.edu.cn; Tel: +8610-62332651.

胺修饰的双酶葡萄糖传感器与其它尺寸导电聚合物相比会具有更好的应用前景。

葡萄糖双酶传感器反应机理如下<sup>[9]</sup>: 葡萄糖在葡萄糖氧化酶的催化下首先与溶液中的溶解氧反应产生  $H_2O_2$ , 然后  $H_2O_2$  在辣根过氧化物酶的催化下被还原为水, 同时辣根过氧化物酶被氧化, 其氧化形式用 Comp I 表示, Comp I 经两电子转移步骤被还原为辣根过氧化物酶完成一个循环. 其具体的反应方程式如下:



(Comp I, oxidation state of HRP; Comp II, intermediate between HRP and Comp I)

目前国内外对双酶-聚合物体系报道比较少<sup>[5-8]</sup>, 在已有的报道中, 较多的是聚吡咯体系<sup>[7,8]</sup>, 还未见有关基于聚苯胺的双酶体系的报道, 本文在制备的纳米纤维状聚苯胺的基础上固定双酶, 提出基于纳米纤维聚苯胺(PANI)的双酶葡萄糖传感器体系。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

葡萄糖氧化酶(GOD,  $112 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , Amersco), 辣根过氧化物酶(HRP,  $250 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 北京拜尔迪生物技术公司),  $\beta$ -D(+)-葡萄糖(Sigma),  $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲溶液(PBS)由  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  按不同比例配制而成( $\text{pH}=6.86$ ). 其它试剂均为分析纯. 葡萄糖溶液在使用前至少放置 24 h 以使不同异构体之间达到平衡。

扫描电子显微镜(SEM)(Zeiss Supra-55), 恒温磁力搅拌器(天津欧诺 EMS-8A). 电化学实验均采用三电极体系, 测试仪器为 PARSTAT 2273, 工作电极为环氧树脂封装的光谱纯圆柱形石墨棒( $d=8 \text{ mm}$ ), 用其截面为工作面. 每次实验前, 工作电极依次用 800# 和 2000# 的水砂纸打磨光滑, 经二次去离子水、无水乙醇超声清洗后用去离子水冲洗干净后使用. 辅助电极为石墨电极, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE), 本文中的电位值如不特别指明均相对于 SCE. 所有实验均在室温( $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ )下进行。

### 1.2 纳米聚苯胺的制备

把清洗好的石墨电极置于  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸溶液中进行循环伏安扫描, 电位范围  $-0.3 - 1 \text{ V}$ , 扫描速率为  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , 扫描 10 次, 用以增加电极的反应活性点。

把活化后的电极浸入苯胺溶液( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  苯胺溶于  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸)中, 采用循环伏安法聚合. 具体实验条件为, 扫描电位为  $-0.2 - 0.85 \text{ V}$ , 扫描速率为  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , 控制一定的聚合电量。

### 1.3 酶电极的制作

HRP 和 GOD 的固定化是通过电位控制进行的. 首先加一定的还原电位, 使 PANI 薄膜完全处于还原状态, 在氧化过程中, 加入 HRP 和 GOD, 利用蛋白质分子带负电的特性(HRP 和 GOD 的等电点分别为 5.5 和 4.2, 在  $\text{pH} 6.86$  的 PBS 缓冲液中带负电), 用静电吸附的方法固定酶. 由于外部施加正电位, 吸附效率高于自发吸附。

将 PANI 修饰石墨电极置于  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  中, 在恒电位  $-0.2 \text{ V}$  下还原 30 min, 用超纯水漂洗数次后, 浸入含有 HRP 和 GOD 酶的 PBS 中, 在恒电位  $0.6 \text{ V}$  下氧化 30 min。

### 1.4 样品测试

取 50 mL PBS 溶液, 在搅拌的情况下, 施加一定电位待背景电流稳定后, 加入待测底物, 记录加入底物前后电流的变化量。

### 1.5 电极结构表征

用扫描电子显微镜(工作电压 10 kV)和交流阻抗图表征电极固定酶前后的电极结构变化。

## 2 实验结果

### 2.1 电极结构表征

#### 2.1.1 交流阻抗测试

为了比较纳米聚苯胺修饰石墨电极固定酶前后的区别, 参照文献[9]方法分别测定了酶固定前后电极的交流阻抗谱, 测量的频率范围为  $100 \text{ mHz}$  到  $100 \text{ kHz}$ , 在开路电压下进行测定. 图 1 给出了酶固定前后的电极的交流阻抗的 Nyquist 图, 从图 1 中能看出电极固定上酶后, 由于酶不导电, 固定上酶后电极的电阻从约  $10^3 \Omega$  增加到约  $10^4 \Omega$ , 电阻明显增大, 证明酶已固定上。

#### 2.1.2 SEM 测试

图 2 为酶固定前后纳米聚苯胺修饰石墨电极表面的 SEM 图. 由图 2a 可以看出制得的 PANI 呈纳米纤维状, 直径约  $100 \text{ nm}$ . 这种纳米结构使得酶能

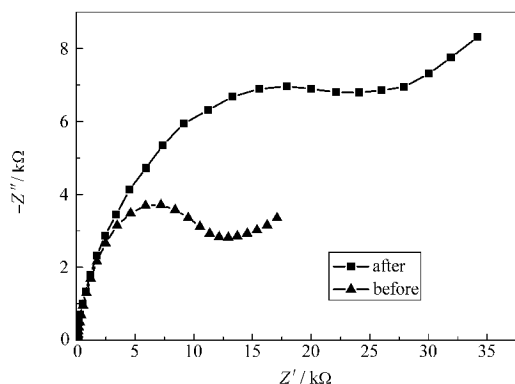


图1 酶固定前后的石墨修饰电极的 Nyquist 图  
Fig.1 Nyquist plots of graphite electrode modified with nanopolyaniline before and after immobilization of bienzyme

均匀而且牢固地吸附在纳米纤维状的 PANI 上, 酶不易脱落, 从而使传感器的寿命延长, 增加了传感器的稳定性. 从图 2b 中能清晰地看到酶固定上之后, 在 PANI 上出现了很多绒状的物质, 这表示酶已经很均匀地附着在 PANI 上. 这一点与上面交流阻抗得到的实验结果相吻合.

2.2 葡萄糖的电流响应

图 3 给出了 HRP, GOD/PANI/C 电极在 PBS 中对一系列葡萄糖浓度在 0.05 V 下的电流响应. 从图 3 可看出在 0.05–5 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖的 PBS 缓冲液

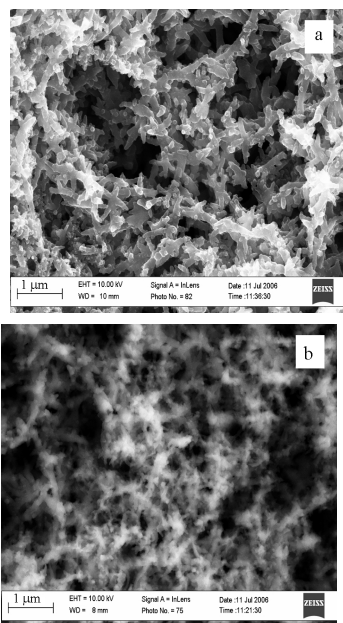


图 2 纳米聚苯胺修饰石墨电极表面酶固定前后的 SEM 图  
Fig.2 SEM images of the surface of graphite electrode modified with nanopolyaniline before (a) and after (b) immobilization of bienzyme

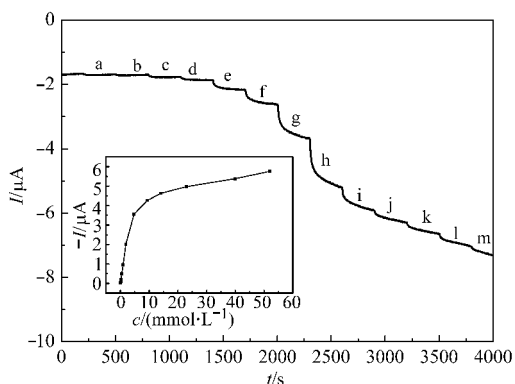


图 3 双酶电极对葡萄糖的响应曲线  
Fig.3 The response of bienzymatic sensor to glucose  
The insert is the response of electrode towards the concentration of glucose. The concentrations of glucose from a to m are 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 25, 45, 60 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively.

中, 响应电流随葡萄糖浓度的增大先迅速增大, 然后响应电流随葡萄糖浓度的增大缓慢增大并趋于稳定. 电极的响应时间小于 30 s.

图 4 给出了在 PBS 溶液中, 电位为 0.05 V 时, 电极响应电流与底物浓度的关系图. 从中可知, 由葡萄糖氧化酶和过氧化物酶构成的双酶电极测得的电流响应与葡萄糖的溶液浓度在 0.05–2.0 mmol·L<sup>-1</sup> 之间呈线性关系, 葡萄糖的浓度与电流值成正比, 其线性方程为,  $-I=1.0884c-0.0847$ ,  $R^2=0.9972$ .

根据文献[3,10]的方法, 以线性响应部分的葡萄糖浓度的倒数为横坐标, 稳态电流的倒数为纵坐标作图, 得一直线(图5), 即Lineweave-Burk图, 从图中求得斜率与截距, 根据式(1)计算 Michaelis-Mehten 常数  $K_m^{[1]}$ ,  $K_m$  为与酶浓度无关的酶促反应特征常数, 可以表征酶与底物之间亲合力的大小.  $K_m$  值越小, 酶与底物之间亲合力越大.

$$-1/I_{ss}=(K_m/I_{max})\times(1/c)+1/I_{max} \tag{1}$$

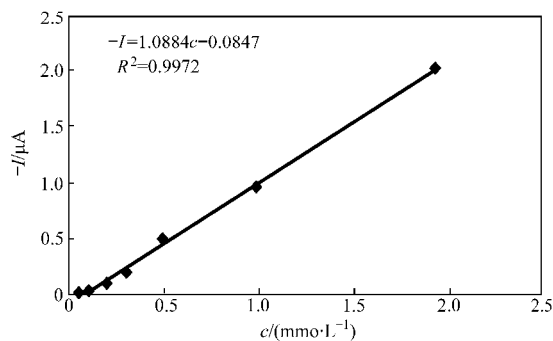


图 4 双酶传感器对葡萄糖的线性响应曲线  
Fig.4 The linear response of bienzymatic sensor to glucose

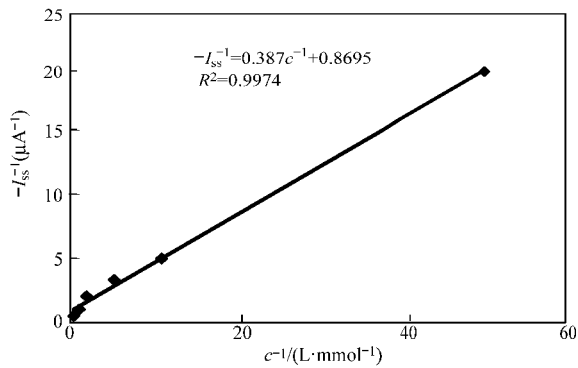


图5 Lineweave-Burk 图  
Fig.5 Lineweave-Burk plot

其中,  $I_{ss}$  为稳态电流. 线性回归方程为  $-1/I_{ss}=0.387(1/c)+0.8695$ ,  $R^2=0.9974$ , 求得表观米氏常数  $K_m=0.445 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与文献[7]中报道的聚吡咯双酶体系的表观米氏常数  $K_m=0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  接近, 表明两种体系中酶与葡萄糖的亲合力相近.

### 2.3 聚苯胺沉积电量对葡萄糖双酶传感器响应电流的影响

双酶生物传感器的响应受到聚苯胺薄膜的厚度及其包埋酶的量(或者双酶之间的比例)的极大影响. 可以通过控制溶液中苯胺和酶的浓度以及电聚合过程中通过的电量等实验参数达到优化薄膜制备的目的. 在本实验中, 电聚合聚苯胺的实验是在含有  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  苯胺和  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸中进行, 酶的固定在  $1.12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  GOD,  $2.45 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  HRP 的磷酸盐缓冲溶液中进行. 研究了通过电量与所得双酶生物传感器对  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖响应电流之间的关系. 图 6 给出了不同的聚苯胺沉积电量对电流响应值的影响. 从图 6 中能看出沉积电量为  $378 \text{ mC}$  时有最大的电流响应, 当沉积电量继续增大时, 电极表面聚苯胺膜逐渐增厚, 但电极的电阻保持在  $10^4 \Omega$  同一数量级上, 从而可认为聚合物膜持续增厚抑制被分析物的扩散是造成电流响应降低的主要原因. 因此实验中我们用循环伏安法制备聚苯胺时控制聚合电量为  $(380 \pm 10) \text{ mC}$ .

### 2.4 操作电位对葡萄糖双酶传感器响应电流的影响

图 7 给出了不同操作电位对响应电流的影响(选取葡萄糖浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的响应电流). 实验结果表明, 在施加电位从  $0.1 \text{ V}$  逐渐降低到  $-0.1 \text{ V}$  的过程中, 传感器对葡萄糖的灵敏度逐渐增大后又降低, 双酶生物传感器对葡萄糖的检测灵敏度随着施加电位的降低而增大, 然而当施加电位继续降低

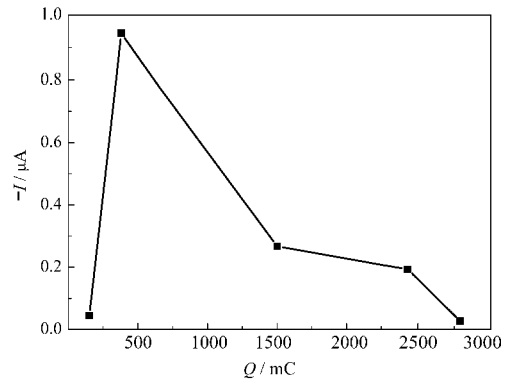


图6 聚苯胺不同的沉积电量对葡萄糖响应电流的影响  
Fig.6 Effect of passing charge during electropolymerization on the response of bienzymatic sensor

The concentration of glucose was  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

时, 传感器灵敏度反而降低. 操作电位在  $-0.05 \text{ V}$  到  $0.05 \text{ V}$  电流响应值较大而且比较稳定, 结合背景电流的影响, 因此我们选择了背景电流较小的  $0.05 \text{ V}$  作为测试双酶电极对葡萄糖的响应实验中的最佳工作电位.

### 2.5 抗干扰性

尽管生物酶与底物的生物化学反应具有很高的专一性, 但以测定  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化电流为基础的葡萄糖单酶传感器由于使用了较高的氧化电位 ( $>0.6 \text{ V}$ ), 使一些共存的还原物质能够同时在电极上被氧化, 产生的氧化电流干扰了  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化电流测定. 使用制备的双酶传感器, 由于采用较低的操作电位 ( $0.05 \text{ V}$ ), 从而避免了一些共存的还原物质的影响. 实验中测定了尿酸、 $\alpha$ -乳酸还原物质对葡萄糖响应的影 响, 结果显示这些还原物质对葡萄糖的测定不产生干扰, 表明双酶电极有较好的抗干扰性.

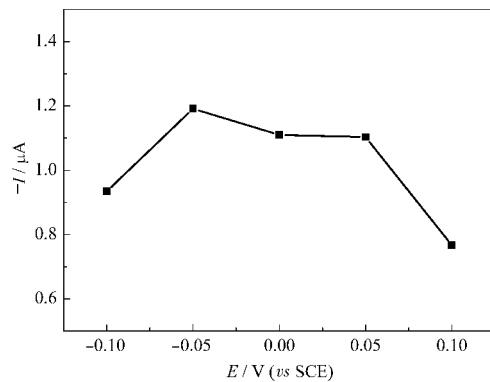


图7 不同操作电位对双酶传感器响应电流的影响  
Fig.7 Effect of applied potential on the response of bienzymatic sensor

The concentration of glucose was  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

## 2.6 重现性及稳定性

为表征电极的重现性, 在同样的条件下制作 5 支电极, 每支电极对  $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的葡萄糖进行测定, 测定结果的相对标准偏差分别为 3.3% 和 1.7%. 同一支电极对  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的葡萄糖平行测定 7 次, 测定结果的相对标准偏差为 1.9%. 说明该法制备的传感器重现性较好, 可实际应用.

生物传感器的稳定性除与生物酶的稳定性、传感器的制备方法有关外, 还与保存方法有关. 用电化学聚合高分子膜固定酶制备的传感器由于酶的固定牢固, 不易流失, 酶不易失活, 因而稳定性较好. 传感器通常是在冰箱中于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下在 PBS 中保存, 保存时应注意选择少量的 PBS 溶液, 能将电极浸没即可, 否则会因酶在溶液中流失而使传感器的寿命缩短. 保存过程中定期测量酶电极对葡萄糖的响应, 结果表明电极随存储时间的延长响应逐渐减小. 在放置 23 天后保持 90% 的响应, 40 天后下降到 10%.

## 3 结 论

以石墨为基底材料, 采用循环伏安法沉积聚苯胺, 制得了直径约为 100 nm 的纳米聚苯胺纤维, 利用静电吸附的原理固定上葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶, 制得了 GOD, HRP/PANI/C 双酶电极. 实验过程中对影响双酶传感器的各种参数进行了优化, 并对双酶电极对葡萄糖的响应实验中影响传感器电流响应的实验参数(如施加电位)实行了最佳化. 实

验结果表明, 制备出的酶电极对葡萄糖具有优异的生物电化学响应特性, 在  $0.05 - 2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围内与电流响应呈线性关系. 电极表观米氏常数  $K_m=0.445 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 电极同时显示出较好的抗干扰性、重现性和稳定性.

## References

- 1 Dong, S. J.; Che, G. L.; Xie, Y. W. Chemically modified electrode. Beijing: Science Press, 2003: 304-362 [董绍俊, 车广礼, 谢远武. 化学修饰电极. 北京: 科学出版社, 2003: 304-362]
- 2 Eftekhari, A. *Synthetic Metals*, **2004**, **145**: 211
- 3 Xian, H. P.; Jin, Q. K.; Li, M. Y. *Sensors and Actuators B*, **2004**, **102**: 325
- 4 Yu, X. J.; Sun, L. X.; Zhou, D. *Journal of Harbin Institute of Technology*, **2003**, **35**(6): 691 [于秀娟, 孙丽欣, 周定. 哈尔滨工业大学学报, **2003**, **35**(6): 691]
- 5 Zhang, Z. E.; Huang, Z. Y.; Zhang, L. J. *J. Suzhou Institute of Urban Construction and Environmental Protection*, **2000**, **13**(3): 18 [张占恩, 黄智勇, 张丽君. 苏州城建环保学院学报, **2000**, **13**(3): 18]
- 6 Ferri, T.; Maida, S.; Poscia, A.; Santucci, R. *Electroanalysis*, **2001**, **13**(14): 1198
- 7 Tian, F. M.; Zhu, G. Y. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, **451**: 251
- 8 de Benedetto, G. E.; Palmisano, F.; Zambonin, P. G. *Biosens & Bioelectron*, **1996**, **11**: 1001
- 9 Fernando, P.; Maya, Z.; Eugenii, K.; Itamar, W. *Anal. Chem.*, **1999**, **71**: 3171
- 10 Yang, Z. Y.; Li, J. P.; Fang, C. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **2005**, **33**(4): 538 [杨志宇, 李建平, 方成. 分析化学, **2005**, **33**(4): 538]
- 11 Shu, F. R.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.*, **1976**, **48**: 1679