

A glucose Biosensor Based on Au NPs-CeO₂@PANI Nanocomposites Immobilized Enzyme*

MA Liping, ZUO Xianwei, WANG Yanfeng, LI Yunxia, ZHANG biao, HAN Genliang*

(Institute of Sensor Technology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The core-shell nanocomposites comprising of covalently linked Au Nanoparticles (Au NPs), cerium oxide (CeO₂) and polyaniline (PANI) were prepared (Au NPs-CeO₂@PANI). Chitosan (Chit) and Au NPs-CeO₂@PANI are used to form a composite matrix film (Chit/Au-CeO₂-PANI) on the surface of Pt electrode to immobilize glucose oxidase (GOD). The Au NPs-CeO₂@PANI nanocomposites was characterized by transmission electron microscope (TEM) and X-ray diffraction (XRD). Electrochemical studies revealed that the presence of Au NPs-CeO₂@PANI nanocomposites resulted in increasing electroactive surface area for GOD loading and enhancing electron transport between GOD and electrode. The Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD modified electrode showed superior performances over the individual components and their binary combinations, in terms of useful linear range (6.2×10^{-6} mol/L to 2.8×10^{-3} mol/L) with a correlation coefficient of 0.9968, rapid response time (5 s) and low detection limit (1.0×10^{-6} mol/L).

Key words: biosensor; Au NPs-CeO₂@PANI nanocomposites; immobilization enzyme; electrochemical detection; GOD

EEACC: 7230J

doi: 10.3969/j.issn.1004-1699.2013.05.003

基于 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料固定化酶的葡萄糖生物传感器*

马莉萍, 左显维, 王艳凤, 李云霞, 张彪, 韩根亮*

(甘肃省科学院传感技术研究所, 兰州 730000)

摘要: 制备了一种基于金纳米粒子 (Au NPs)、氧化铈纳米颗粒 (CeO₂) 和导电聚苯胺 (PANI) 的具有核壳结构的纳米复合材料 (Au NPs-CeO₂@PANI), 利用该纳米复合材料和壳聚糖形成的复合膜成功实现了对葡萄糖氧化酶 (GOD) 的固定。采用透射电镜和 X 射线衍射对 Au NPs-CeO₂@PANI 材料进行了表征。电化学方法研究了传感器性能, 结果表明基于 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料修饰的葡萄糖生物传感器线性范围为 6.2×10^{-6} mol/L ~ 2.8×10^{-3} mol/L, 响应时间为 5 s, 检测下限为 1.0×10^{-6} mol/L; 相同条件下 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料修饰的电极也显示出了比单一或二者复合的纳米材料修饰电极更优越的性能。

关键词: 生物传感器; Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料; 固定化酶; 电化学检测; 葡萄糖氧化酶

中图分类号: TP212.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2013)05-0606-05

葡萄糖生物传感器在临床检验、发酵控制及食品分析等方面发挥着重要的作用, 目前绝大多数葡萄糖生物传感器均采用在电极表面修饰葡萄糖氧化酶 (GOD) 的方法来制备。但是, GOD 的氧化还原活性中心位于分子中心, 使酶与电极间电子传递很难实现。近年来, 将纳米材料引入生物传感器以提高生物酶与基体电极之间的电子传导能力成为研究热点, 众多的纳米材料如: Au^[1-2]、Ag^[3]、Pt^[4] 等贵金属以及碳纳米管^[5]、导电聚合物薄膜^[6] 等均已被成功地用于固定生物酶。最近又有研究发现新型的稀

土元素纳米氧化物 CeO₂ 有助于电子在电极表面的传递^[7-8], 从而使其成为在生物传感器领域极具应用前景的一类材料。

一些研究表明, 采用纳米材料复合物^[9-11] 固定生物酶时, 组成复合物的各种单元组分在纳米尺度上复合, 能产生较强的协同效应, 同时又具有纳米粒子的特性。其中, 无机纳米材料与有机高分子材料形成的复合物由于集纳米粒子与功能性高分子的特性于一身, 在生物传感器中极具应用前景。在众多有机高分子材料中, 聚苯胺因合成条件简单, 具有优

项目来源: 甘肃省科学院青年科技创新基金项目 (2012QN-08); 甘肃省科技支撑计划项目 (0708GKCA062)

收稿日期: 2012-12-31 修改日期: 2013-05-06

良的导电性,已成为研究热点^[12-14]。将导电聚苯胺与无机纳米材料复合,所形成的复合材料不仅具有优良的电化学性能,而且可以使导电聚苯胺在中性环境下有效的进行氧化还原反应,拓展其在生物传感器领域的应用^[15-17]。

故本文合成了基于金纳米粒子、氧化铈纳米颗粒和导电聚苯胺的纳米复合材料(Au NPs-CeO₂@PANI),以其固定 GOD,实现对葡萄糖浓度的测定。研究表明,本文合成的 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料同时兼具了三种单一材料各自的优点,该纳米材料实现了酶与电极间的直接电子转移,有效地提高了传感器的电流响应、灵敏度和使用寿命,在葡萄糖电化学生物传感器中具有较好的应用前景。

1 实验部分

1.1 试剂

苯胺(An):分析纯(使用前减压蒸馏);硝酸铈(Ce(NO₃)₃·6H₂O),氯金酸(HAuCl₄),柠檬酸三钠(C₆H₅O₇Na₃·2H₂O),过硫酸铵((NH₄)₂S₂O₈, APS),盐酸(HCl),硝酸(HNO₃),乙醇(C₂H₆O)均为化学纯;以上试剂均购于上海化学试剂厂。葡萄糖氧化酶(GOD),壳聚糖(Chit,脱乙酰度 85%),均购于美国 Sigma 公司。

1.2 仪器

复合材料表征:JEM-100SX 型电子透射显微镜(日本电子公司);D/MAX-3C 型 X 射线衍射仪(日本 Rigaku 公司);FTS3000FX 型的傅立叶变换红外光谱仪(美国 DIGILAB 公司),KBr 压片;PE-PYRIS Diamond TG/DTA 热重分析仪。

电化学实验:AUTOLAB PGSTAT 128N 模块式电化学综合测试系统(瑞士万通公司),电化学测量采用三电极体系:酶电极为工作电极,铂片电极作辅助电极,饱和甘汞(SCE)电极为参比电极。所有电化学实验均在室温下进行。

1.3 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料的合成

参照已报道的文献^[18-19],首先制备出氧化铈纳米颗粒和金溶胶。然后,按以下步骤合成 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料:①将一定量的 CeO₂ 纳米颗粒超声分散在 20 mL 1 mol/L HCl 溶液中,再加入 1 mL 苯胺单体,超声分散 30 min,形成悬浮液 A;②将 2.49 g (NH₄)₂S₂O₈ 溶解在 5 mL 1 mol/L 盐酸溶液中,形成溶液 B。③用滴液漏斗将 B 缓慢滴加到 A 中,在磁力搅拌下反应 12 h。反应结束后离心分离,分别用 0.1 mol/L 盐酸溶液、乙醇和

二次水洗涤产物至离心液为无色,60 °C 真空干燥 24 h,得到 CeO₂@PANI 纳米复合材料。④将经①②③步所得的具有核-壳结构的 CeO₂@PANI 纳米复合材料在浓度为 1.0 mg/mL 金溶胶中搅拌 12 h 后,离心分离,并将产物真空干燥,既得 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料。

采用上述类似方法制备了掺杂态 PANI、CeO₂@PANI 纳米复合材料及 Au NPs-PANI 纳米复合材料。

1.4 Chit/Au NPs-CeO₂@PANI/GOD 修饰电极的制备

直径为 2 mm 的铂盘电极用 0.3 及 0.5 μm 的 Al₂O₃ 抛光粉打磨,依次用去离子水、无水乙醇及丙酮超声清洗 3 min。然后在 0.5% H₂SO₄ 中进行电化学预处理,以增加电极表面电活性点的浓度,将电极在 -0.4 V ~ +1.0 V 下以 50 mV/s 扫速循环伏安扫描 30 圈至稳定。

将制备好的 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料在去离子水中超声分散 2 h,使溶液浓度为 1.0 mg/mL;取 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料、1 mg/μL 葡萄糖氧化酶及质量分数为 1.0% 壳聚糖,按体积比为 3:3:1 充分混匀后滴于电极表面,4 °C 放置晾干,作为工作电极。对照组各修饰电极的制备同上。

1.5 测量方法

电化学测量采用三电极系统:铂盘电极(直径 3 mm)为工作电极,饱和甘汞(SEC)电极为参比电极,铂片为对电极;以 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)为支持电解质,室温条件下,加入不同浓度葡萄糖,在 0.8 V ~ 0.2 V 范围内进行循环伏安扫描,记录循环伏安扫描曲线。电流时间曲线测定时,工作电位为 -0.55 V(vs. SCE),搅拌时测定。测试时体系通 N₂ 除 O₂。

2 结果与讨论

2.1 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料的结构表征

图 1(a)为 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料的透射电镜(TEM)图,从图中可看出颜色较深的无机物 CeO₂ 纳米颗粒被完全包埋在颜色较浅的无定形的有机物聚苯胺中,形成了核-壳结构;壳层聚苯胺的厚度大约有 25 nm,而被包埋的 CeO₂ 核平均粒径在 10 nm 左右。TEM 图中像蓖麻一样的小黑点为金纳米颗粒,这些金纳米颗粒均被牢牢地吸附在聚苯胺的表面。在图中没有观察到有机相与无机相两相的分离现象,这说明无机物 CeO₂、Au 与有机物 PANI 之间很好的复合在了一起。

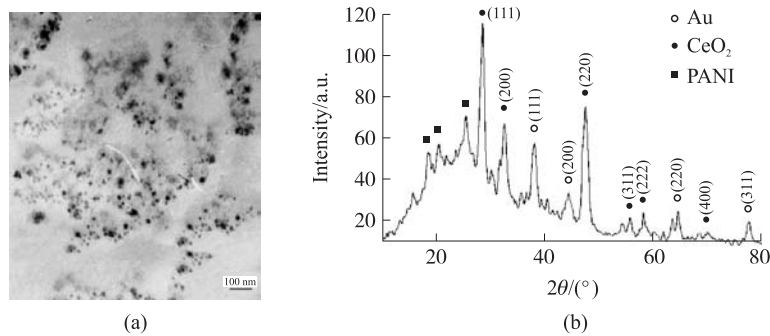


图1 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料的 TEM 图(a)和 XRD 谱图(b)

图1(b)为 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料 X 射线衍射谱(XRD),在 $2\theta = 15.48^\circ$ 、 20.30° 和 25.10° 处出现了宽的衍射峰为结晶态聚苯胺的特征衍射峰^[14];在 $2\theta = 28.4^\circ$ 、 32.3° 、 46.7° 、 55.9° 、 58.1° 和 67.5° 处出现的衍射峰与立方晶系 CeO₂ 的标准谱图(JCPDS 卡号 No. 34-0394)一致;而另外在 $2\theta = 37.1^\circ$ 、 44.2° 、 63.4° 和 77.8° 的四处衍射峰与立方晶系 Au 的标准谱图(JCPDS 卡号 No. 01-1172)一致,这表明该样品是由聚苯胺、CeO₂ 和组成 Au 的。根据 Scherrer 公式 $D = k / \beta \cos \theta$ (k 取 0.89, β 为 0.154 nm),由 $2\theta = 28.4^\circ$ 处半峰宽计算出样品中 CeO₂ 粒子的粒径为 10.5 nm ,这与 TEM 结果基本一致。

2.2 修饰电极的电化学特性

图2为不同修饰电极在 0.2 mol/L PBS ($\text{pH} = 7.0$) 中的循环伏安扫描图扫速为 50 mV/s 。由图中可看出, GOD 修饰的电极没有氧化还原峰(图2(a)),表明酶与电极间的电子转移无法实现; Chit/CeO₂-PANI/GOD 及 Chit/Au-PANI/GOD 修饰的电极氧化还原峰不明显(图2(b)、(c)),表明这些材料修饰的电极表面酶与电极间的电子转移较难实现;而 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极出现了较为对称的氧化还原峰(图2(d)),峰电势分别为在 0.55 和 0.03 ,说明该修饰电极使酶与电极间的电子转移容易实现,并且葡萄糖氧化酶在电极上保持了良好的生物活性。

Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料在中性条件下有良好的氧化还原活性,且有效的实现了酶与电极之间的直接电子转移,主要是因为:①CeO₂ 具有较高的等电点(IEP)(9.0),它适合吸附具有低 IEP(4.2)的 GOD,对带负电性的 GOD 提供友好的微环境,能在很大程度上促进 GOD 和电极之间的电子传递;②PANI 能很好的催化 GOD,同时,纳米结构的 PANI 负载酶时,其巨大的比表面积增加了载酶量;③纳米 Au 的优良导电性能。本文合成的 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料同时兼具了三种单一材

料各自的优点,而且复合材料比单一纳米颗粒更易于形成连续势场,可降低电子在电极和固定化酶间的迁移阻力,能有效加速 GOD 的再生过程,显著增强了传感器的电流响应。

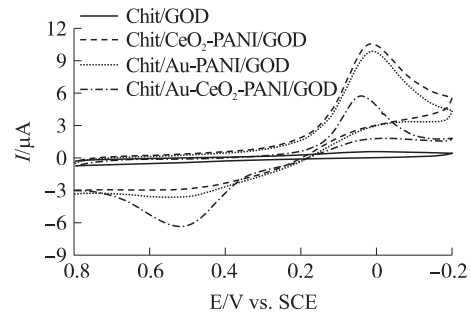


图2 不同修饰电极在 0.2 mol/L PBS ($\text{pH} 7.0$) 中的循环伏安扫描图,扫速为 50 mV/s

图3为 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极在 10 mmol/L 葡萄糖溶液中不同扫速下的循环伏安图,从图中可看到,随着扫速从 10 mV/s 增加到 100 mV/s , GOD 氧化还原峰电流随扫描速率的增加而增大,这是因为随着扫描速度加快,单位时间通过电极表面的电子增多使电流变大;而图3中峰电势差为 0.52 V ,峰电势差不随扫速的变化而变化,表明电极反应是准可逆过程。插图为峰电流与扫速的平方根的关系图,经计算阳极和阴极的峰电流 I_p 与扫描速率的平方根成线性关系(见图3插图),表明修饰电

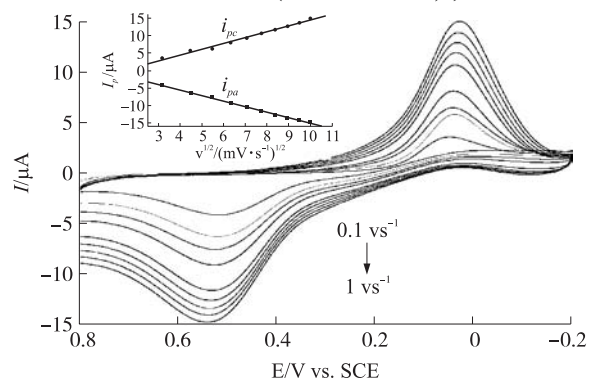


图3 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极在不同扫速下的循环伏安图(插图:峰电流与扫速的平方根的关系图)

极上的电化学反应主要是受扩散控制。此外,在连续的扫描过程中 C-V 图基本保持不变,说明 GOD 的活性在 Chit/Au-CeO₂-PANI 复合膜中是稳定的。

2.3 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极对葡萄糖催化的电化学生行

图 4 是 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极在 PBS(pH=7.0) 溶液中及 1 mmol/L 葡萄糖溶液中的循环伏安曲线比较图。由图可知,当加入葡萄糖之后(图 4b),氧化峰电流明显增大,显示了明显的 GOD 对葡萄糖的催化氧化能力。

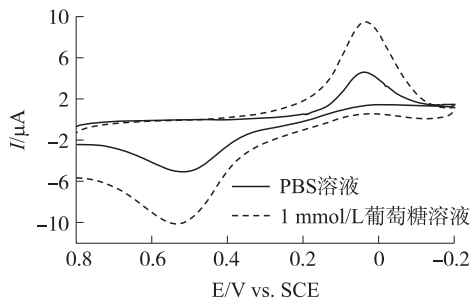


图 4 修饰电极的 CV 图

2.4 电流时间曲线及线性检测

图 5 为在 0.55 V 电位下 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极对葡萄糖的电流响应随葡萄糖浓度变化的计时安培动力学曲线。由图可见,氧化峰电流随着葡萄糖浓度的增加呈台阶式上升,电极电流响应时间为 5 s,表明 Chit/Au-CeO₂-PANI 复合膜吸附固定的 GOD 对葡萄糖具有优良的催化氧化能力,可在电极表面迅速建立氧化还原平衡反应。在 6.2×10^{-6} mol/L ~ 2.8×10^{-3} mol/L 范围内,电极电流响应与葡萄糖浓度呈线性关系(图 5 插图),检测下限为 1.0×10^{-6} mol/L,线性方程: $I(\mu A) = 0.118 + 5.065 C$ (mmol/L),相关系数为 0.996 8。随着葡萄糖浓度的进一步增加,电流到达平台期,遵从 Michaelis-Menten kinetics 动力学方程的特性。

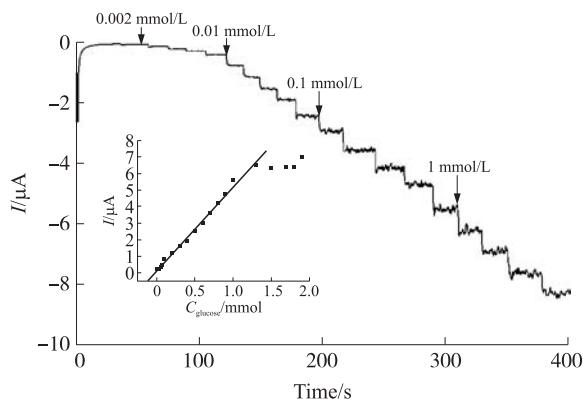


图 5 传感器对葡萄糖响应的电流-时间曲线
(插图:电极电流响应与葡萄糖浓度的线性关系图)

相同条件下,Au 修饰电极检测葡萄糖线性线性范围为 4.0×10^{-5} mol/L ~ 1.0×10^{-3} mol/L,响应时间 10 s;CeO₂-PANI 修饰电极检测葡萄糖线性线性范围为 9.0×10^{-4} mol/L ~ 1.0×10^{-2} mol/L,响应时间 15 s,Au-PANI 检测葡萄糖线性线性范围为 1.0×10^{-5} mol/L ~ 1.0×10^{-3} mol/L,响应时间 8 s。说明 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料修饰的电极显示出了比单一或二者复合的纳米材料修饰电极更优越的性能。

2.5 传感器的稳定性检测

图 6 为 Chit/Au-CeO₂-PANI/GOD 修饰电极的稳定性检测。电极不用时保存于 4 ℃。该电极在保存 5 天后,酶活下降约 4%,三周后,电极对葡萄糖的响应仍能保持原来的 80%(如图 6 所示),可见该传感器有较好的稳定性。表明 Chit/Au-CeO₂-PANI 复合膜能很好地固定 GOD,使用纳米材料能最大限度的保持酶的活力。

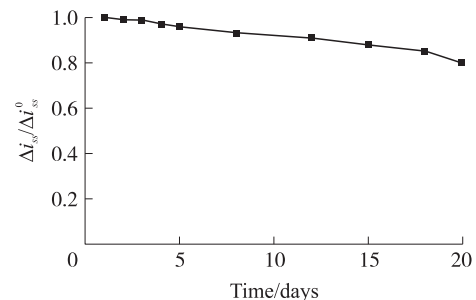


图 6 传感器的稳定性检测

3 结论

本文首先成功合成了 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料,对其进行了表征。然后,将该纳米复合材料应用于葡萄糖生物传感器中,并对传感器进行了电化学性能测试。研究结果表明,该 Au NPs-CeO₂@PANI 纳米复合材料修饰的电极比单一或任意二者复合材料修饰电极具有更好的电催化活性,显示了优越的性能,如:高灵敏度、低检测限、高稳定性等,提高了电极与生物酶之间的电子转移。该生物传感器检测葡萄糖的线性范围为 6.2×10^{-6} mol/L ~ 2.8×10^{-3} mol/L,响应时间为 5 s,检测下限为 1.0×10^{-6} mol/L。

参考文献:

- [1] 马莉萍,刘斌,宋玉哲等.不同形貌纳米金修饰铂电极的葡萄糖生物传感器.功能材料,2009,40(S):530-533.
- [2] 陈朱丽,郭希山,朱松明.基于纳米金修饰丝网印刷电极的乙醇生物传感器[J].传感技术学报,2009,22(12):1529-1532.
- [3] 陈续胃,李建平.辣根过氧化物酶在纳米银修饰玻碳电极上的直接电化学研究[J].传感技术学报,2007,20(11):2371

- 2376.
- [4] 范增杰,马莉萍,李云霞等. 基于静电沉积壳聚糖铂纳米颗粒复合物膜构建葡萄糖生物传感器. 传感技术学报,2010,23(6):1-4.
- [5] Li W J, Yuan R, Chai Y Q, et al. Study of the Biosensor Based on Platinum Nanoparticles Supported on Carbon Nanotubes and Sugar-lectin Biospecific Interactions for the Determination of Glucose [J]. *Electrochimica Acta*,2011,56(11),4203-4208.
- [6] Chen X J, Chen Z X, Tian R, et al. Glucose Biosensor Based on Three Dimensional Ordered Macroporous Self-doped Polyaniline/Prussian Blue Bicomponent Film Original Research Article [J]. *Analytica Chimica Acta*,2012,723,94-100.
- [7] 孙海宜. 基于氧化铈纳米复合材料的制备及在电化学生物传感器中的应用[D]. 山东:曲阜师范大学,2012.
- [8] Saha S, Arya S K, Singh S P, et al. Nanoporous Cerium Oxide Thin Film for Glucose Biosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009,24(7),2040-2045.
- [9] Yu Y Y, Liu X Q, Jiang D W, et al. [C3(OH)2mim][BF4]-Au/Pt Biosensor for Glutamate sensing *in vivo* Integrated with on-line Microdialysis System [J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2011,26(7):3227-3232.
- [10] Njagi J, Ispas C, Andreescu S, et al. Mixed Ceria-Based Metal Oxides Biosensor for Operation in Oxygen Restrictive Environments [J]. *Analytical Chemistry*. 2008,80(19),7266-7274.
- [11] Peng H P, Liang R P, Qiu J D. Facile Synthesis of Fe₃O₄@Al₂O₃ Core-shell Nanoparticles and Their Application to the Highly Specific Capture of Heme Proteins for Direct Electrochemistry [J]. *Biosensors and Bioelectronics*. ,2011,26(6),3005-3011.
- [12] Minkstimiene A K, Mazeiko V, Ramanaviciene A, et al. Enzymatically Synthesized Polyaniline Layer for Extension of Linear Detection Region of Amperometric Glucose Biosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2010,26(2),790-797.
- [13] Minkstimiene A K, Mazeiko V, Ramanaviciene A, et al. Enzymatically Synthesized Polyaniline Layer for Extension of Linear Detection Region of Amperometric Glucose Biosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2010,26(2),790-797.
- [14] Doron A, Katz E, Willner I. Organization of Au Colloids as Monolayer Films onto ITO Glass Surfaces: Application of the Metal Colloid Films as Base Interfaces To Construct Redox-Active Monolayers [J]. *Langmuir*,1995,11(4),1313-1317.
- [15] Oleg A, Raitman E K, et al. Integration of Polyaniline/Poly(acrylic acid) Films and Redox Enzymes on Electrode Supports: An *in Situ* Electrochemical/Surface Plasmon Resonance Study of the Biocatalyzed Oxidation of Glucose or Lactate in the Integrated Biocatalytic Systems [J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2002,124(22),6487-6496.
- [16] Yan W, Feng X M, Chen X J, et al. A Super Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Au Nanoparticles-AgCl @ Polyaniline Hybrid Material [J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2008,23(7),925-931.
- [17] Forzani E S, Zhang H Q, Nagahara L A, et al. A Conducting Polymer Nanojunction Sensor for Glucose Detection [J]. *Nano Lett.* 2004,4(9),1785-1788.
- [18] Zhu N N, Chang Z, He P G, et al. Electrochemically Fabricated Polyaniline Nanowire-modified Electrode for Voltammetric Detection of DNA Hybridization [J]. *Electrochim. Acta* 2006,18(51),3758-3762.
- [19] Chang H, Yuan Y, Shi N, et al. Electrochemical DNA Biosensor Based on Conducting Polyaniline Nanotube Array [J]. *Anal. Chem.* 2007,79(13),5111-5115.



马莉萍(1973-),女,硕士,助理研究员,主要从事生物传感器的研究, malip219@sina.com;



韩根亮(1964-),男,高级工程师,本文通信作者,现任甘肃省科学院传感技术研究所所长,主要从事传感技术与测控技术, genlhan@vip.sina.com。