

功能化多壁碳纳米管修饰的葡萄糖传感器的研究

郭晓芸, 郑亚男, 杜霞, 罗鸣, 于文肖

(河北师范大学 汇华学院, 河北 石家庄 050091)

摘要:在室温下利用化学掺杂法合成了 K 掺杂多壁碳纳米管 KMWNTs, 通过固定葡萄糖氧化酶 (GOx) 在 KMWNTs 修饰的玻碳电极表面, 并利用葡萄糖氧化酶 (GOx) 的直接电化学, 构建了一种新型葡萄糖传感器。利用扫描电镜对 MWNTs 和 KMWNTs 的形貌进行表征发现, K 掺杂后没有破坏 MWNTs 的管状结构; 采用电化学系统对传感器的性质进行了研究, 结果表明, 与单一的 MWNTs 相比, KMWNTs 显示了更为有效的电催化活性。在此基础上, 以 KMWNTs 膜为基底构建了抗干扰能力强、稳定性好、灵敏度高、响应快的葡萄糖传感器, 在 -0.52 V 的检测电位下, 该传感器对葡萄糖响应的线性范围为 $0.1 \sim 3.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R=0.998$), 检测限为 $0.02\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$), 常见干扰物质如抗坏血酸和尿酸的存在不影响测定。

关键词:多壁碳纳米管; 钾; 葡萄糖氧化酶; 电化学

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-5322(2015)04-0051-05

酶传感器是生物传感器的重要组成部分。自从 1962 年 Clark^[1] 制成第一只酶传感器以来, 酶传感器便迅速发展成为新的分析装置。它兼备酶法和电化学方法的优点, 测定迅速而准确。特别是葡萄糖氧化酶传感器, 由于它可为糖尿病患者的临床诊断提供非常重要的信息, 因此它的研究已引起人们的高度重视^[2]。但是这种方法的催化活性和稳定性不高, 并且受温度、湿度以及 pH 值的变化影响较大。因此, 寻找新材料、新方法制备电流响应值高的新型葡萄糖传感器非常必要。

碳纳米管 (CNTs) 构成了新的碳体系, 其中化学掺杂在很大程度上修饰了它的物理性质, 并加强了它的催化活性^[3-5]。最近, 各种元素如钾^[4]、铯^[6]、硼^[7]、氮^[8]、磷^[9]和氯^[10]等应用于 CNTs 表面掺杂以调整它们的场效应、电子、机械和导电性能, 拓宽了 CNTs 的应用领域。Chun 等^[11] 室温下制备了掺杂 K 的多壁碳纳米管, 并证实了它们在乙醇中的分散性能。尽管科学家们已进行了各种各样的研究, 但是仍然没有文献报道关于掺杂的 CNTs 在葡萄糖传感器方面的应用。

本文在室温下利用化学掺杂法合成的 KMWNTs, 展现了良好的膜稳定性、优越的生物兼容

性和高的导电性。然后, 以固定葡萄糖氧化酶 (GOx) 作模型酶, 固定于 KMWNTs 修饰的玻碳电极 (GCE) 上, 进一步研究了 GOx 的直接电化学, 探索 KMWNTs 在葡萄糖传感器方面的应用。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

多壁碳纳米管 (>95%, 直径为 20~30 nm), 深圳纳米科技有限公司生产; 葡萄糖氧化酶 (GOx), 美国 Amresco 公司生产; 钾 (K)、菲 (98%)、二甲氧基乙烷 (99.5%, 1,2-DME)、 β -D-葡萄糖、抗坏血酸 (AA)、尿酸 (UA) 均由美国 Sigma-Aldrich 公司生产; 其它试剂均为分析纯。

扫描电镜图 (SEM) 来自于 JEOL JSM-6700F 场发射扫描电镜仪; 循环伏安曲线 (CV) 在电化学工作站 660C (上海辰华仪器设备有限公司, 中国) 上完成; 电化学交流阻抗 (EIS) 测试在 Autolab 电化学分析仪 (Eco Chemie, 荷兰) 上完成, 其电解质溶液为含有 $5.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ KCl}$ 溶液, 交流电压为 5 mV, 记录频率为 $10^{-2} \sim 10^5\text{ Hz}$; 本实验中所

有的电化学测试均在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 中进行,室温为 $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$,使用三电极系统,其中玻碳电极(GCE)为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。

1.2 KMWNTs 的合成

室温下利用化学掺杂方法合成 KMWNTs,制备步骤如下^[12]: MWNTs 由体积比为 3:1 的浓硫酸和浓硝酸处理 4 h,离心,清洗至中性, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥;其后,在 20 mL 的 1,2-DME(99.5%)溶液中,通过 K(40 mg)和菲($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)反应制备菲/K 络合物溶液;然后,在上述络合物溶液中加入 20 mg MWNTs,磁力搅拌($500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),室温下反应 48 h,所得产物用乙醇清洗,沉淀物于 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥得 KMWNTs,再将其置于乙醇中超声分散得到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 KMWNTs 悬浮液。

1.3 GOx/KMWNTs/GCE 的制备

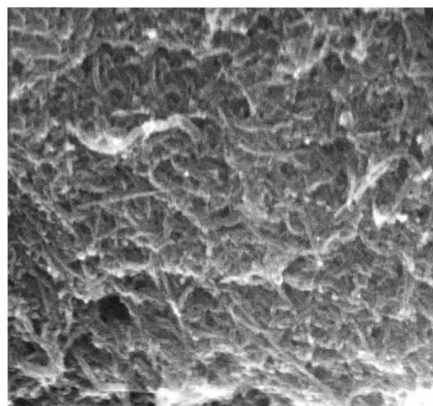
玻碳电极 GCEs ($d=3 \text{ mm}$, ca. 0.07 cm^2) 在 SiC 砂纸上打磨,在粒径为 $1.0 \text{ }\mu\text{m}$ 和 $0.3 \text{ }\mu\text{m}$ 的

Al_2O_3 上抛光至镜面,分别在水和乙醇中超声 2 min,室温下干燥。GOx/KMWNTs/GCE 制备如下:先将 $5 \text{ }\mu\text{L}$ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 KMWNTs 悬浮液滴涂于打磨好的电极上,室温下干燥,即得到 KMWNTs 修饰的 GCE,记作 KMWNTs/GCE;然后,将 KMWNTs/GCE 浸入含有 $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ GOx 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 中,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 10 h。

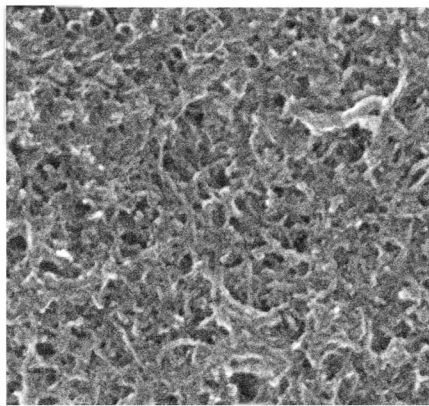
2 结果与讨论

2.1 MWNTs 和 KMWNTs 形貌的表征

MWNTs 和 KMWNTs 微观形态如图 1 所示。图 1a 中大量缠绕的 MWNTs 交错在一起,形成三维均一的结构。K 掺杂后(图 1b),与 MWNTs 相比,KMWNTs 的管束没有发现明显的破损和断裂,管束的直径有少许变大,整体结构变得松散;比表面积增大,吸附酶的能力增强。KMWNTs 这种松散结构在电催化活性和蛋白质固定等方面起到了重要的作用。



a



b

图 1 MWNTs(a) 和 KMWNTs(b) 的 SEM 照片

Fig. 1 The SEM images of MWNTs(a) 和 KMWNTs(b)

2.2 交流阻抗图谱

电化学中常采用 EIS 阻抗谱的变化来表征电极表面的修饰过程,EIS 的半圆直径代表电极表面电子转移阻抗(R_{et})的相对大小。图 2 显示了裸 GCE, MWNTs/GCE 和 KMWNTs/GCE 的交流阻抗波谱图。以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 作为电化学活性探针,裸 GCE 和 MWNTs/GCE 的奈奎斯特图分别显示了约 850 ohm 和 600 ohm 的电子传递阻抗,比 KMWNTs/GCE 的电子传递阻抗(300 ohm)要大许多,表明 KMWNTs 能在氧化还原探针和电极之间形成一个优良电子传递界面。

2.3 GOx/KMWNTs/GCE 电极的直接电化学

基于在 KMWNTs 修饰电极上 GOx 的固定,我们在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氮气饱和的 PBS (pH 7.4) 中研究了 GOx 的直接电化学(图 3)。图 3A 中在没有 GOx 的存在下,各电极的循环伏安图上均无特征峰出现;图 3B 中 GOx/KMWNTs/GCE 出现了一对明显且峰形对称的氧化还原峰,其峰电流大于 GOx/MWNTs/GCE,而 GOx/GCE 无任何氧化还原峰,其电位分别在 -0.501 V 和 -0.478 V ,显示了在无电子转移媒介体的情况下酶分子的氧化还原活性中心和电极之间良好的电子传递过程。

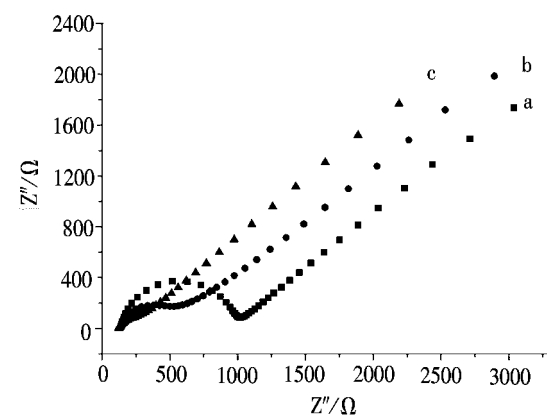


图 2 裸 GCE(a) ,MWNTs/GCE(b) ,KMWNTs/GCE(c) 在 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 底液中的交流阻抗图

Fig.2 Electrochemical impedance spectra of bare(a) , MWNTs(b) and KMWNTs(c) modified GCEs in $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ solution containing $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

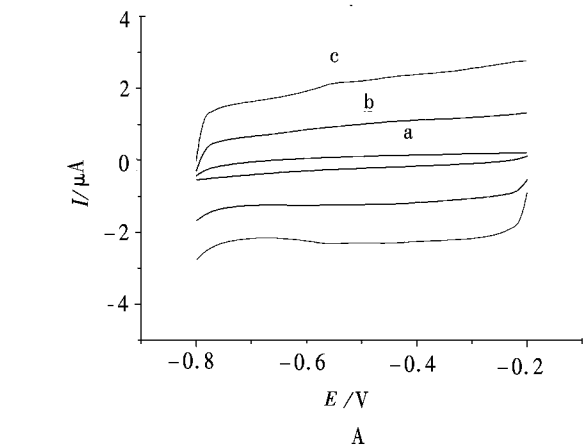


图 3 在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氮气饱和的 PBS(pH7.4) 溶液中 (A) 裸 GCE(a) ,MWNTs/GCE(b) ,KMWNTs/GCE (c) ; (B) GOx /GCE(a) ,GOx/MWNTs/GCE (b) ,GOx/KMWNTs/GCE (c) 的循环伏安曲线 扫速: $30\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Fig.3 Cyclic voltammograms of different electrodes in $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrogen – saturated PBS (pH 7.4). (A) Bare GCE (a) ,MWNTs/GCE (b) ,KMWNTs/GCE (c) ; (B) GOx /GCE(a) ,GOx/MWNTs/GCE (b) ,GOx/KMWNTs/GCE (c) ; Scan rate: $30\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

$0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿酸(UA)以及抗坏血酸(AA)进行实验,如图 5 所示,结果表明加入的 AA 与 UA 对葡萄糖的测定无明显的干扰。对这 2 种干扰物质具有良好的抗干扰能力,说明该传感器具有较好的选择性。为了评价传感器的重现性,分别制备 5 根 GOx/KMWNTs/GCE 测定 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液,其相对标准偏差(RSD)分别是 4.1% ,

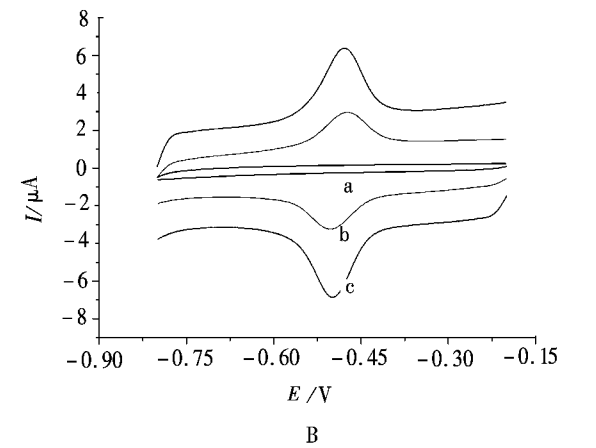
与图 3A 的循环伏安图(无 GOx)相比较,我们可以断定该氧化还原峰应归属于 GOx。结果表明:KMWNTs 比 MWNTs 更有利于 GOx 的直接电化学。

2.4 GOx/KMWNTs/GCE 的线性关系和检出限

图 4A 显示了 GOx/KMWNTs/GCE 在氮气饱和的 PBS 中响应电流随葡萄糖浓度变化的差分脉冲伏安曲线。如图 4A 可知,在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氮气饱和的 PBS(pH7.4) 中,葡萄糖的浓度从 0, 0.1,0.2,0.6,1.0,1.4,1.8,2.2,2.6,3.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 依次变化时,随着葡萄糖浓度的增加,还原峰电流逐渐降低。而且,还原峰电流的降低量与葡萄糖浓度之间存在良好的线性关系(图 4B),相关系数 $R=0.998$,传感器的线性范围为 $0.1\sim3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,检出限($S/N=3$)为 $0.02\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,该传感器对葡萄糖的检测灵敏度较高^[13]。

2.5 GOx/KMWNTs/GCE 抗干扰能力测试

为了评价传感器的抗干扰能力,向含有 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液中分别加入浓度为



4.4% ,4.7% 和 5.1%。此外,用同一根 GOx/KMWNTs/GCE 5 次测定 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液,其 RSD 是 1.9%。当传感器不用时,4℃ 保存,定期测试,结果如图 6 所示,第 8 天其响应电流约为最初响应的 97%;一个月以后,其响应电流约为最初响应的 77%。表明该传感器具有较好的稳定性。

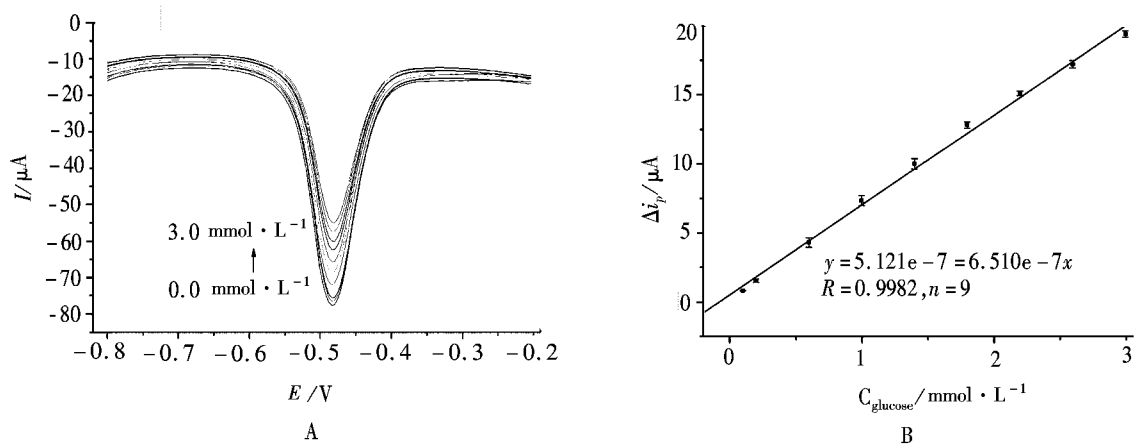


图 4 (A) GOx/KMWNTs/GCE 在氮气饱和的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH7.4) 中响应电流随葡萄糖浓度变化的差脉冲伏安曲线; (B) 峰电流与葡萄糖浓度关系曲线

Fig. 4 (A) Differential pulse voltammograms of the GOx/KMWNTs/GCE in nitrogen – saturated $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS with different glucose concentrations; 0.0, 0.1, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6, 3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; (B) Calibration curves of the GOx/KMWNTs/GCE for glucose

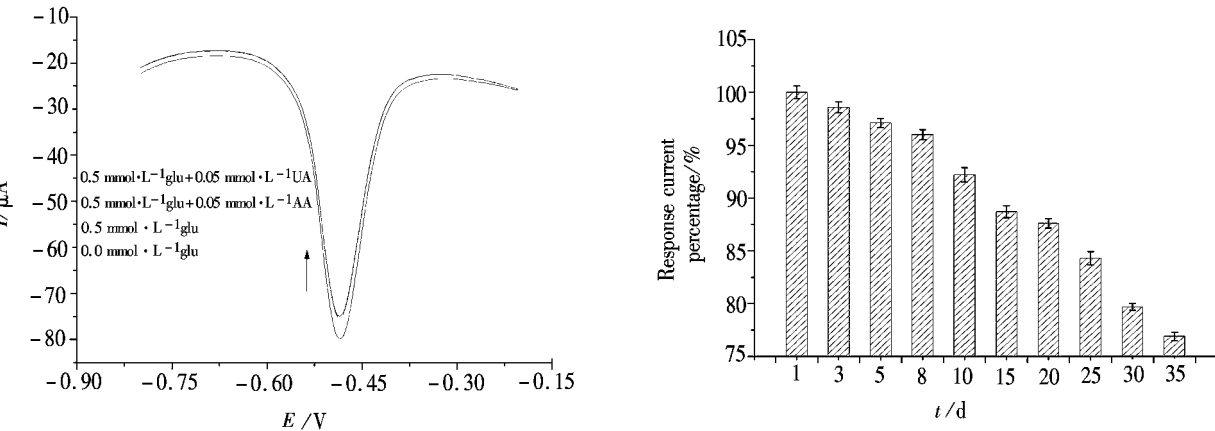


图 5 抗干扰物质存在下 GOx/KMWNTs/GCE 的相应电流

Fig. 5 Amperometric responses of the GOx/KMWNTs/GCE in the absence and presence of interferent

图 6 时间对 GOx/KMWNTs/GCE 稳定性的影响

Fig. 6 Effect of duration on the response of the biosensor to $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose in 0.1 mol L^{-1} PBS (pH 7.4)

3 小结

通过固定 GOx 在 KMWNTs 修饰的玻碳电极表面,并利用 GOx 的直接电化学,构建了一种新型的葡萄糖传感器。实验结果发现 K 掺杂后不仅没有破坏 MWNTs 的管状结构,而且还有良好的膜稳定性、优越的生物兼容性和高的导电性,可以用来增强电化学响应,并提供显著增加的有效

面积以利于蛋白质的负载,加速了酶活性区和电极表面之间的电子传递。采用电化学系统对传感器的性质进行了研究,GOx/KMWNTs/GCE 展示了良好的重现性和稳定性,以及高的灵敏性和无干扰性,因此,KMWNTs 能作为一种优异的材料用于氧化还原活性酶的直接电化学,并构建相关的酶生物传感器。

参考文献:

- [1] Clark L C Jr, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring Cardiovascular surgery[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962, 102(1): 29–45.
- [2] 景蔚萱, 周帆, 成妍妍, 等. 表面形貌对螺旋线形跨尺度电化学葡萄糖传感器性能的影响[J]. 分析化学, 2014, 42(8): 1 077–1 082.
- [3] 汪维维, 裘宇, 张少鹏, 等. 聚乙烯亚胺功能化碳纳米管负载铂@金核壳纳米粒子的过氧化氢传感器[J]. 分析化学, 2014, 42(6): 835–841.
- [4] Lee R S, Kim H J, Fischer J E, et al. Conductivity enhancement in single-walled carbon nanotube bundles doped with K and Br[J]. Nature International Weekly Journal of Science, 1997, 388(6639): 255–257.
- [5] Wiggins-Camacho J D, Stevenson K J. Effect of Nitrogen Concentration on Capacitance, Density of States, Electronic Conductivity, and Morphology of N-doped Carbon Nanotube Electrodes[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2009, 113(44): 19 082–19 090.
- [6] Barberio M, Barone P, Bonanno A, et al. Transport properties of alkali-doped single-wall carbon nanotube mats[J]. Superlattices and Microstructures, 2009, 46(1): 369–373.
- [7] Peng S, Cho K. Ab initio study of doped carbon nanotube sensors[J]. Nano Letters, 2003, 3(4): 513–517.
- [8] Ayala P, Arenal R, Rummeli M H, et al. The doping of carbon nanotubes with nitrogen and their potential applications[J]. Carbon, 2010, 48(3): 575–586.
- [9] 张娟, 陈阿青, 邵庆益. 硼/磷掺杂单壁碳纳米管电子结构的第一性原理计算[J]. 山西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 22(1): 50–55.
- [10] 高建生, 徐学诚. 氯掺杂提高多壁碳纳米管的电导率[J]. 化学学报, 2011, 69(12): 1 403–1 407.
- [11] Chun K Y, Lee C J. Potassium Doping in the Double-walled Carbon Nanotubes at Room Temperature[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112(12): 4 492–4 497.
- [12] Chun K Y, Choi S K, Kang H J, et al. Highly dispersed multi-walled carbon nanotubes in ethanol using potassium doping e[J]. Carbon, 2006, 44(8): 1 491–1 495.
- [13] 李俊华, 邝代治, 冯泳兰, 等. 基于二氧化钛/碳纳米管/壳聚糖纳米复合薄膜制备葡萄糖生物传感器[J]. 无机化学学报, 2011, 27(11): 2 172–2 178.

Glucose Sensor Based on Potassium-doped Multi-walled Carbon Nanotubes

GUO Xiaoyun, ZHENG Yanan, DU Xia, LUO Ming, YU Wenxiao

(Huihua College of Hebei Normal University, Shijiazhuang Hebei 050091, China)

Abstract: The potassium-doped multi-walled carbon nanotubes (KMWNTs) were synthesized according to the chemical K doping at room temperature. We demonstrate herein a newly developed amperometric glucose biosensor by using the direct electron transfer of glucose oxidase (GOx), which is based on the immobilization of GOx on KMWNTs modified electrodes. The structures of the MWNTs and KMWNTs were characterized by scanning electron microscopy (SEM). After K-doping, no disruption of MWNTs morphology is observed. As a new platform in glucose analysis, the resulting electrode (GOx/KMWNTs/GCE) exhibits a sensitive response to glucose, with a linear range from 0.1 to 3.0 mmol · L⁻¹ ($R=0.998$) and a detection limit of 0.02 mmol · L⁻¹ ($S/N=3$). At an applied potential of -0.52 V, the resulting biosensor performs a sensitive and selective electrochemical response to glucose in the presence of common interferences, such as ascorbic acid (AA) and uric acid (UA). These results indicated that the GOx/KMWNTs modified glassy carbon electrode presents stable, high sensitivity and also exhibits fast amperometric response to the detection of glucose, which is promising for the development of glucose sensor.

Keywords: multi-walled carbon nanotubes; potassium; glucose oxidase; electrochemistry