

基于纳米银-聚苯胺-石墨烯复合界面的葡萄糖生物传感器的构建

石瑞丽¹ 譙顺彬¹ 田 辉¹ 陶 菡²

(1.贵州工业职业技术学院,贵阳 551400;
2.贵州大学发酵工程与生物制药省重点实验室,贵阳 550025)

摘 要 采用石墨烯纳米材料,并结合葡萄糖氧化酶、聚苯胺和纳米银修饰玻碳电极研制了新型的生物传感器。考察了修饰电极的电化学行为,讨论了 3 种不同影响因素对电极响应的作用。结果表明:传感器对葡萄糖表现出良好的电催化性能。在最佳条件下,该传感器对葡萄糖的线性检测范围为 $5 \times 10^{-6} \sim 3.2 \times 10^{-4}$ mol/L,检测限为 6.65×10^{-6} mol/L(S/N=3)。

关键词 石墨烯,聚苯胺,纳米银,葡萄糖氧化酶

中图分类号 TQ15

文献标识码 A

文章编号 1006-3536(2020)07-0089-04

DOI:10.19817/j.cnki.issn 1006-3536.2020.07.021

Glucose biosensor based on glassy carbon electrode modified with Ag nanoparticle, grapheme and PANI

Shi Ruili¹ Qiao Shunbin¹ Tian Hui¹ Tao Han²

(1.Guizhou Industry Polytechnic College,Guiyang 551400;2.Province Key Lab of Fermentation Engineering and Biopharmacy,College of Chemistry and Chemical Engineering,Guizhou University, Guiyang 550025)

Abstract A new glucose biosensor based on Ag nanoparticles, graphene, polyaniline (PANI) and glucose oxidase(GOD) modified electrode was prepared.The electrochemical behavior of the biosensor was investigated by UV-Vis spectra,electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry method.The performances of the biosensor were observed by the applied potential,pH value and concentration of GOD.The results indicated that the biosensor possessed high catalytic activity. Under the optimal experimental conditions, the current was linear with the concentration of glucose in the range from 5×10^{-6} to 3.2×10^{-4} mol/L, with a detection limit of 6.65×10^{-6} mol/L (S/N=3) and a correlation coefficient of 0.998.

Key words graphene, polyaniline, Ag nanoparticle, glucose oxidase

近年来,石墨烯由于电导率高及具有特殊的电子结构等特点,为被检对象的吸附和电化学反应提供了充足的空间,并且加速电子转移,实现了直接电化学和生物传感,因此在电化学领域备受研究者的青睐^[1-3]。银纳米颗粒作为导电性较好的金属之一,能够在传感器中充当反应中心和电极之间的导线,同时它极强的物理吸附能力,使其能够吸附包括葡萄糖氧化酶在内的具有生物活性的蛋白质大分子;另外,银纳米颗粒对葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖后产生的副产物过氧化氢具有优良的催化能力^[4-6]。

本研究从当前电化学生物传感技术和纳米技术

中提出最新研究热点出发,将新型的复合纳米技术渗透融合到电化学生物传感技术中,构建纳米银-聚苯胺-石墨烯复合纳米界面固载葡萄糖氧化酶的电化学生物传感器,进而来提高传感器的灵敏度,建立新的生物分析方法,并为进一步的应用研究提供有价值的理论和实验数据支持。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葡萄糖氧化酶(GOD)、石墨粉(光谱纯)、苯胺单体(AI)、硝酸银、壳聚糖(CHIT),国药集团化学

基金项目 贵州省科技合作计划项目(黔科合 LH 字【2015】7176)

作者简介 石瑞丽(1985-),女,硕士,副教授,主要从事电化学生物传感器的研究。

试剂有限公司;所用试剂均为分析纯;实验用水均为超纯水。

电化学工作站(CHI600A 型),上海辰华仪器有限公司;超声清洗仪(SB-80PS 型),宁波新芝生物科技股份有限公司;酸度计(pHS-25B 型),上海大普仪器有限公司;电子天平(AG135 型),瑞士 Mettler Toledo 公司;磁力加热搅拌器(85-2 型),上海浦东物理光学仪器厂;紫外-可见分光光度计(UV-Vis, UV1801 型),北分瑞利公司。

1.2 氧化石墨烯(GO)及 GO/聚苯胺(GO/PANI)复合物的制备

GO 的制备采用 Hummers 和 Offeman 方法并加以优化^[7-8]。首先,将 3.0g 石墨粉和 1.5g NaNO_3 (99.5%) 加入到 150mL 浓硫酸中,并以 100r/min 的转速在冰水浴中搅拌 1h;然后停止搅拌,缓慢加入 8.0g KMnO_4 , 25℃下维持 2h;接着加入 90mL 超纯水,升温到 95℃以 100r/min 搅拌 12h。然后,缓慢加入 30mL H_2O_2 (30%),混合均匀,通过聚酯纤维膜进行过滤,将滤液在 6000r/min 转速下离心 15min;接着将离心后的滤渣分别用 200mL 超纯水、100mL HCl (30%) 和 100mL 乙醇(30%)连续冲洗 3 遍,将冲洗后的滤渣真空干燥,即得到黄棕色 GO 粉末。

GO/PANI 复合物的制备参考胡晓炜^[9]的方法并加以优化。称取 20mg GO 溶解于 50mL 1mol/L 硫酸溶液,超声 1h,获得 GO 的硫酸溶液,向上述溶液滴加 0.3mL 苯胺单体,超声 2h,继续加入 0.2281g 过硫酸铵,20℃下反应 3h 后终止反应。经离心将所得复合物用超纯水通过 Waterman 滤纸(NO.4)冲洗至 pH 为 7.0,60℃真空干燥 12h,即得 GO/PANI 复合物。

1.3 纳米银/石墨烯/聚苯胺(Ag/G/PANI)复合物的制备^[8]

将 1.02mL 苯胺单体加入到 8.98mL 1mol/L H_2SO_4 中搅拌 5min,得到苯胺溶液。然后将 0.16g AgNO_3 和 1.00g GO 加入到苯胺溶液中超声处理 15min,在 25℃室温下搅拌过夜,直至混合物颜色变为黑绿色,即得到 Ag/G/PANI 复合物。最后,将所得合成物用超纯水通过 Waterman 滤纸(NO.4)冲洗至 pH 为 7.0,使其得以净化;在 60℃下真空干燥 12h,即得到粉末状的 Ag/G/PANI 复合物。

1.4 葡萄糖生物传感器的制备

玻碳电极用 0.05 μm Al_2O_3 粉末进行抛光,抛

光后所得电极依次用水、乙醇、水超声清洗 3min。随后把电极置于 0.1mol/L 磷酸缓冲盐(PBS)溶液中循环伏安扫描至电极稳定,用水冲洗,自然晾干。

先将 Ag/G/PANI 复合物粉末在丙酮溶液中超声分散,然后将分散液滴涂到玻碳电极上,室温晾干后再滴加 5 μL 10.0mg/mL 葡萄糖氧化酶,放置 24h 使溶剂挥发形成修饰膜,最后涂布 1%壳聚糖。电极未使用时于冰箱(4℃)中保存。

同理分别制得涂覆有 GO、G/PANI 的玻碳电极。将实验所得的 3 种玻碳电极分别记作 GO 玻碳电极、G/PANI 玻碳电极和 Ag/G/PANI 玻碳电极。

1.5 检测方法^[10]

采用三电极检测装置,其中 Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,修饰电极为工作电极。电化学分析实验均在 10mL 电解池中进行,测试底液为 0.1mol/L PBS 缓冲溶液(pH=6.0)。采用循环伏安法(CV),扫描速率为 100mV/S,扫描范围为 -0.9~0.6V。测试前向溶液中通氮气 10min,以除去溶液中的溶解氧。修饰电极不使用时,保存于 4℃冰箱中。电化学阻抗谱图(EIS)和计时电流响应(CA)也由电化学工作站完成。

2 结果与讨论

2.1 UV-Vis 分析

GO、GO/PANI 和 Ag/G/PANI 复合物的 UV-Vis 谱图见图 1。由图可见,GO 中 $\text{C}=\text{C}$ 的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁和 $\text{C}=\text{O}$ 的 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁产生了两个不同的吸收峰,分别为 228nm 处强吸收峰和 298nm 处小肩峰;GO/PANI 复合物的紫外吸收峰与 PANI 的吸收峰位置基本一致^[9];Ag/G/PANI 复合物在 278nm 处有一强吸收峰,表明 3 种纳米材料形成了一种新的复合物。

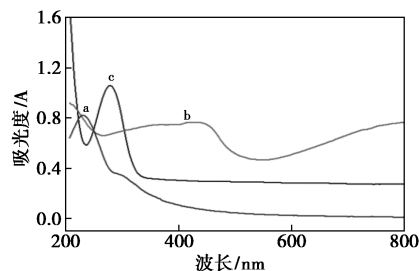


图 1 GO(a)、GO/PANI(b)和 Ag/G/PANI 复合物(c)的 UV-Vis 谱图

2.2 EIS 分析

图 2 为玻碳电极、GO 玻碳电极、GO/PANI 玻

碳电极和 Ag/G/PANI 玻碳电极的 EIS 谱图。由图可见,不同的修饰电极,其电极的电子转移阻碍常数(R_{et})具有明显的差异。裸玻碳电极 EIS 谱图的半圆部分相对来说几乎不可见,这说明裸玻碳电极对氧化还原探针有着非常小的电子转移阻抗^[11]。GO/PANI 玻碳电极和 Ag/G/PANI 玻碳电极的 EIS 谱图中都有一个明显的半圆弧,这表明石墨烯和聚苯胺修饰到了电极表面,从而增加了电极表面电子传递的阻力。修饰葡萄糖氧化酶后的电极(曲线 d)电子传递阻抗继续增加,这是由于作为生物大分子的 GOD 大大地阻碍了分子探针的电子转移,表明 GOD 已经吸附到了修饰电极上面。

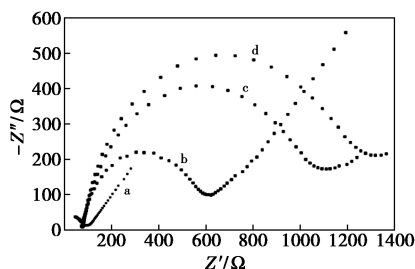


图2 玻碳电极(a)、GO 玻碳电极(b)、GO/PANI 玻碳电极(c)和 Ag/G/PANI 玻碳电极(d)的 EIS 谱图

2.3 修饰电极应用条件

分别对电极的各个工作参数进行优化,以达到最佳的电化学响应。

2.3.1 工作电位对酶电极响应的影响

在 pH=6.0 的 PBS 缓冲溶液中,采用时间-电流曲线法测定了不同工作电位下酶修饰电极对 0.5 mmol/L 葡萄糖的响应电流变化情况,结果见图 3。由图可见,在 -0.4~0.1 V 电位范围内,随着工作电位向正方向移动,催化电流显著增大,至 -0.1 V 之后催化电流又呈减小趋势。工作电位为 -0.1 V 时,催化电流最高,且相对稳定,故本实验选择 -0.1 V 作为葡萄糖生物传感器的工作电位。

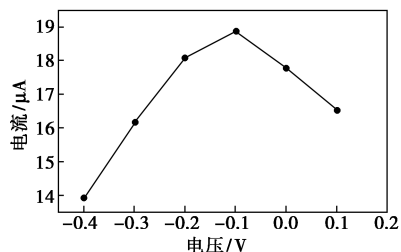


图3 工作电位对酶电极响应的影响

2.3.2 pH 对葡萄糖生物传感器的影响

由于蛋白质/酶的催化反应速率和活性受环境

酸碱度的影响,葡萄糖氧化酶在一定的 pH 范围内才能表现出催化活性,所以考察测试溶液的 pH 具有重要的意义。本实验考察了 pH=4.0~8.0 时,不同缓冲液对修饰电极直接电化学响应电流的变化情况,结果见图 4。由图可见,当 pH 从 4.0 增加到 6.0 时,修饰电极的还原电流逐渐升高,并且在 pH=6.0 时,达到最大值,但是如果继续增加缓冲液的 pH,催化电流又随之逐渐下降。因此,本实验选择 pH=6.0 的 PBS 缓冲液作为测试溶液。

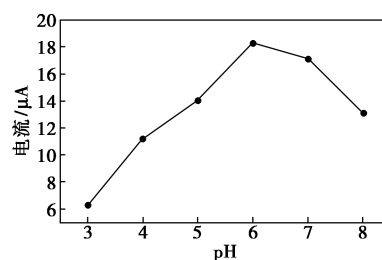


图4 pH 对葡萄糖生物传感器的影响

2.3.3 GOD 浓度对葡萄糖生物传感器的影响

本实验考察了不同 GOD 浓度溶液修饰电极对直接电化学响应变化的影响,结果见图 5。由图可见,随着 GOD 浓度从 3.00 mg/mL 增至 9.0 mg/mL,葡萄糖的峰电流明显增大;当 GOD 浓度继续增加时,响应电流变化不大。因此,本实验选择最佳 GOD 浓度为 9.0 mg/mL。

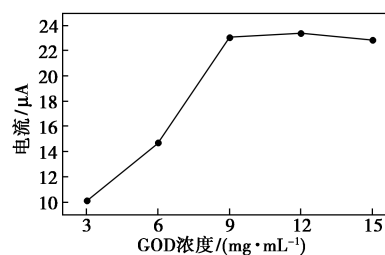


图5 GOD 浓度对葡萄糖生物传感器的影响

2.4 葡萄糖生物传感器的电化学响应

本实验采用 CV 考察了在优化实验条件下,每隔 30 s 连续向 0.1 mol/L PBS 溶液(pH=6.0)中加入 0.5×10^{-6} mol/L、 1×10^{-5} mol/L、 1.5×10^{-5} mol/L、 2×10^{-5} mol/L、 2.5×10^{-5} mol/L 的葡萄糖,考察该生物传感器对葡萄糖的电流响应,结果见图 6。由图可见,随着葡萄糖溶液浓度的增加,该传感器还原峰电流迅速增加,对葡萄糖响应迅速。另外,葡萄糖在 $5 \times 10^{-6} \sim 3.2 \times 10^{-4}$ mol/L 浓度范围内与该生物传感器的响应电流呈现良好的线性关系,相关系数 $r=0.998$,检测限为 6.65×10^{-6} mol/L。

(S/N=3)。

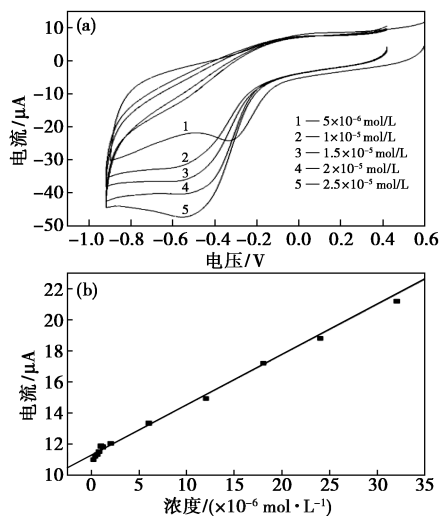


图6 生物传感器对葡萄糖的电流响应变化趋势图(a)和生物传感器检测葡萄糖的线性关系图(b)

2.5 传感器的重现性和稳定性分析

电极重现性和稳定性的高低决定了传感器的优劣。因此本实验对 0.1 mmol/L 葡萄糖溶液反复进行了 8 次实验,考察电极的重现性,相对标准偏差为 1.6%,电极的重现性良好。每隔 3 天对该传感器进行测定,结果显示,测定的前 12 天传感器的响应略下降约 4.5%,21 天后,下降约 15%,这表明该生物传感器展现出了良好的重现性和稳定性。

3 结论

成功制备了一种基于纳米银/石墨烯/聚苯胺复合材料固载葡萄糖氧化酶修饰电极的生物传感器。纳米银/石墨烯/聚苯胺复合材料的形成,使电极的导电性和生物相容性得以大大提高,也为固载葡萄糖氧化酶提供了较好的环境,并且制得的葡萄糖生

物传感器具有高灵敏度和低检测限等特点,为后续的应用研究提供了有力的理论支持。

参考文献

- [1] Tang L H, Feng H B, Cheng J S, et al. Uniform and rich-wrinkled electrophoretic deposited graphene film: a robust electrochemical platform for TNT sensing[J]. Chem Commun, 2010, 46(32): 5882-5884.
- [2] 宋英攀, 冯苗, 詹红兵. 石墨烯纳米复合材料在电化学生物传感器中的应用[J]. 化学进展, 2012, 24(9): 1665-1673.
- [3] 蔡志雄, 王翊如, 陈曦. 石墨烯-贵金属纳米复合材料在小分子电分析及电催化中的应用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2014, 53(5): 631-639.
- [4] Wen X, Xie Y T, Mak W C, et al. Dendritic nanostructures of silver: facile synthesis, structural characterizations, and sensing applications[J]. Langmuir, 2006, 22: 4836-4842.
- [5] 石文韬, 邸静, 马占芳. 电化学葡萄糖传感器[J]. 化学进展, 2012, 24(4): 568-576.
- [6] Ren X L, Meng X, Chen D, et al. Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2005, 21: 433-437.
- [7] Hummers William S, Offeman Richard E. Preparation of graphitic oxide[J]. Journal of the American Chemical Society, 1958, 80(6): 1339-1339.
- [8] Sawangphruk M, Suksomboon M, Kongsupornsak K, et al. High-performance supercapacitors based on silver nanoparticle-polyaniline-graphene nanocomposites coated on flexible carbon fiber paper[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2013, 1(34): 9630-9636.
- [9] 胡晓炜. 基于氧化石墨烯/聚苯胺的生物传感器[D]. 合肥: 安徽大学, 2013.
- [10] 石瑞丽, 陶茜, 张义明, 等. 血红蛋白在碳纳米管/离子液体/纳米金修饰电极上的电化学特性及对过氧化氢的电催化分析[J]. 化工新型材料, 2011, 39(10): 91-94.
- [11] 邹小智. 纳米材料/血红蛋白修饰电极的电化学行为及其应用研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2007.

收稿日期: 2019-11-28

修回日期: 2020-05-04

(上接第 88 页)

3 结论

(1) 在烧结温度 500~800℃ 范围内, 随着烧结温度的增加, 用 3 种铜粉制备的铜导电浆料融化程度逐步提高, 导电铜膜电阻逐渐减小。

(2) 在烧结温度相同条件下, 用 3 种铜粉制备的导电铜膜电阻不同, 形貌有差异, 烧结温度为 600℃ 时 3 种铜粉融化效果均较差。

(3) 在铜粉中添加银粉, 银颗粒在铜粉之间起到了桥接的作用, 填充了铜粉之间的空隙, 改善了铜粉的烧结活性, 用 3 种铜粉制备的导电铜膜其电阻都

有不同程度的降低。与添加银粉相比, 银包铜粉在铜导电浆料中的均匀性和连结性更好。

参考文献

- [1] 霍建华. 烧成气氛对氧化锌压敏电阻器电性能的影响[J]. 陶瓷避雷器, 2000(1): 35-38.
- [2] 曾铭衡. 氧化锌压敏电阻器的交流特性[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [3] 柯玉. ZnO 压敏电阻的低温烧结及晶界电性能研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [4] 张凯. 铜电子浆料的制备及其在钛酸钡压敏电阻器上的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.

收稿日期: 2019-03-01

修回日期: 2020-03-12