

纳米 Au 修饰煤基活性炭固载葡萄糖氧化酶生物传感器的研究

何原子¹, 丁春华^{1*}, 肖宇², 姜宏¹, 张松¹

(1. 海南大学南海海洋资源利用国家重点实验室, 海口 570228;
2. 云南祥鹏航空有限责任公司, 云南昆明 650000)

摘要:采用置换法将电沉积在煤基活性炭上的 Co 粒子全部置换为 40~100 nm 之间的纳米 Au, 并物理吸附葡萄糖氧化酶 (GOx) 用作生物传感器。利用 SEM、EDS、UV-Vis 对 Au 修饰的活性炭表面形貌及其上活力 100 units/mg 的 GOx 固载效果进行了表征, 利用计时安培法和循环伏安法测试了电极的电化学性能。结果表明, 纳米 Au 对 GOx 的吸附提高了 GOx 在载体上的稳定性, 同时提高了 GOx 活性位点和电极之间的电子传输速率。该传感器对葡萄糖选择性能好, 0.05 mol/L 的尿酸和抗坏血酸干扰因素未引起显著的电流反应。

关键词: 纳米 Au; 煤基活性炭; 葡萄糖氧化酶; 生物传感器

中图分类号: S951.4+2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2020)01-0129-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.01.028

Construction of glucose oxidase biosensors immobilized by Au-modified coal-based activated carbon

HE Yuan-zi¹, DING Chun-hua^{1*}, XIAO Yu², JIANG Hong¹, ZHANG Song¹

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Yunnan Lucky Air Co., Ltd., Kunming 650000, China)

Abstract: Co particles electrodeposited onto coal based activated carbon are all replaced into Au nano-particles with a size of 40-100 nm. Through physical absorption method, glucose oxidase (GOx) is immobilized stably onto the coal-based activated carbon electrode modified with Au nano-particles, which is used as biosensor. The surface topography of Au-modified activated carbon electrode and GOx immobilization effect with a vitality of 100 units·mg⁻¹ are characterized by means of SEM, EDS and UV-Vis. Electrochemical performance of the electrode is tested by chronoamperometry and cyclic voltammetry method. It is shown that the adsorption of GOx by nano-Au enhances the stability of GOx and increases electron transfer rate between the active centers of GOx and electrodes. This biosensor exhibits a good selectivity to glucose, while 0.05 mol·L⁻¹ uric acid and ascorbic acid do not cause its significant current response.

Key words: activated carbon; Au nanoparticles; glucose oxidase; biosensor

葡萄糖是自然界中分布最广且最重要的一种单糖^[1]。在现代生活中, 糖尿病变得越来越普遍。快捷、精确、方便地检测人体内葡萄糖浓度非常重要。

葡萄糖传感器是利用葡萄糖氧化酶催化转化葡萄糖反应快、选择性高的特点, 在工作电极上将产生的化学信号转化为可被检测到的电信号, 从而检测出底液中葡萄糖的含量。目前, 酶固定化的方法主要有包埋法^[2]、化学交联法^[3]、共价结合法^[4]和吸附法^[5]。包埋法制备条件温和, 不适合分子较大酶类的固定。交联法和共价结合法固载的酶和载体之间结合紧密, 但制备过程复杂, 酶活性损失很大。吸附法是一种成本低、易操作的酶固定化方法, 通过简单的物理吸附可将酶固定在载体表面。载体选择范围广, 操作过程温和, 对酶的活性损害小, 是一种理

想的固定方法。但由于酶在载体上的固定仅仅依靠两者之间的范德华力维持, 酶容易从载体上脱落。因此解决吸附法中酶易从载体上脱落的问题, 对制备酶生物传感器具有重要的意义。

为解决这一问题, 国内外学者进行了许多尝试。其中使用最多同时效果最好的是在载体上引入纳米粒子, 借助纳米粒子对 GOx 的吸附力提高酶的固载效果。目前修饰的载体大多是玻碳电极、Pt、Au 或制备的各种导电玻璃, 这些载体虽然导电性佳, 但酶的固载量不大。既能保持较高的固载量, 又具有一定导电性的载体并不多。而活性炭具有一定的导电性适合用作电极材料, 丰富的孔隙结构可以容纳更多的葡萄糖氧化酶, 良好的吸附特性使得酶的固载效果较好。纳米 Au 化学性质稳定、催化能力强, 与

收稿日期: 2019-03-12; 修回日期: 2019-11-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFC0700804); 国家自然科学基金 (51562008)

作者简介: 何原子 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为电化学, 1090418303@qq.com; 丁春华 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为工业催化, 通讯联系人, ding-chh@163.com。

活性炭结合还可以提高活性炭作为电极的导电性。目前针对活性炭为载体的研究并不多,在煤基活性炭上修饰纳米 Au 物理吸附 GOx 的研究也未有报道。笔者通过选用活性位点多的煤基活性炭作为工作电极,在电极表面固载纳米 Au 提高电极灵敏度,通过吸附法将 GOx 固定在 Au 修饰的电极表面。成功制备出酶固载量大、线性范围广、抗干扰性强的葡萄糖生物传感器。

1 实验

1.1 试剂与仪器

煤基活性炭、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、葡萄糖、乙酸钴($\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)、氯金酸(HAuCl_4)、硫酸钠(Na_2SO_4),上海阿拉丁试剂有限公司生产;GOx(EC 1.1.3.4),Sigma 试剂公司生产,活度为 100 units/mg;抗坏血酸、尿酸,国药集团化学试剂有限公司生产。电热鼓风干燥箱,DHJ-900 型;HJ-6A 多头数显恒温磁力搅拌器;真空抽滤泵,GM-0.33 II 型。

1.2 Au 纳米修饰的工作电极的制备

纳米金修饰煤基活性炭棒的技术路线见图 1。

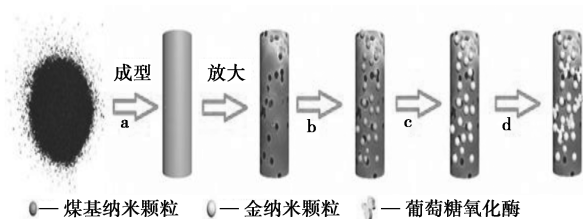


图 1 纳米金修饰煤基活性炭棒的技术路线

取 4 g 直径 3 mm、长度 2.2 mm 的圆柱体煤基活性炭在蒸馏水中煮沸 30 min,过滤,重复 3 次,置于烘箱中于 110℃ 下干燥 12 h。以此活性炭用作工作电极,SCE 和 Pt 电极作为参考电极和计数电极,在 0.1 mol/L Na_2SO_4 和 10 mmol/L 乙酸钴溶液中电沉积纳米钴(图 1b)。扫描速度为 50 mV/s,扫描电压为 -0.9~0.5 V,扫描周期为 20。将以上活性炭放置在 25 mmol/L 的四氯金酸溶液中浸渍 20 min,重复 3 次,得到 Au 纳米颗粒改性的活性炭电极(图 1c)^[7]。

将 0.6 g 金纳米修饰的活性炭置于装有 100 mL 蒸馏水的锥形瓶中,加入 30 mg 葡萄糖氧化酶,冰浴搅拌 24 h,过滤,用蒸馏水反复冲洗,获得工作电极(图 1d),放置在 4℃ 冰箱中保存。将滤液和冲洗液收集,在 595 nm 处测定其吸光度。酶的固载量的计算式为^[14]:

$$\theta = (C_0V_0 - C_1V_1)/W$$

其中: θ 为固载酶量,mg/g; C_0 为固载前溶液的酶质量浓度,mg/mL; C_1 为固载后滤液的酶质量浓度,mg/mL; V_0 为固载前酶溶液体积,mL; V_1 为固载后酶溶液体积,mL; W 为 GOx/Au/AC 的质量,g。

2 结果与讨论

2.1 电沉积纳米 Co

钴纳米颗粒成功电沉积在煤基活性炭上的 SEM 图如图 2(a) 所示,纳米钴颗粒大小约 40 nm,纳米钴具有磁性,一定程度上影响了 SEM 图的清晰度。在活性炭上分别电沉积和吸附 Co 的 EDS 和置换 Au 的 EDS 图如图 3 所示。由图 3(a) 中可知,

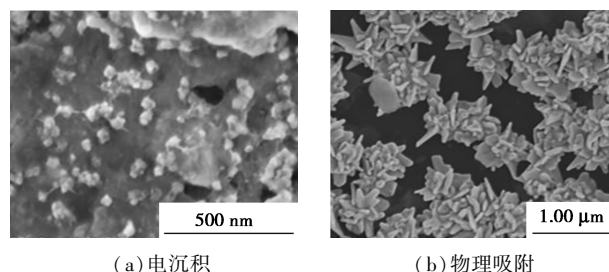
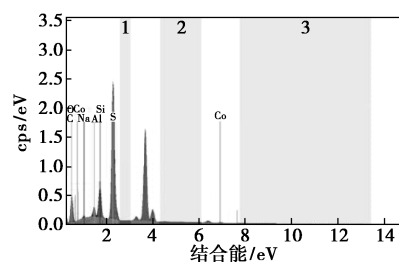
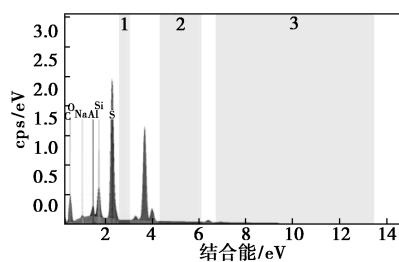


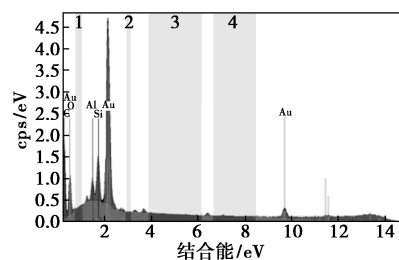
图 2 在活性炭上电沉积和吸附 Co 的 SEM 像



(a) 电沉积法制备 Co 的 EDS



(b) 物理吸附法制备 Co 的 EDS



(c) 置换法制备 Au 的 EDS

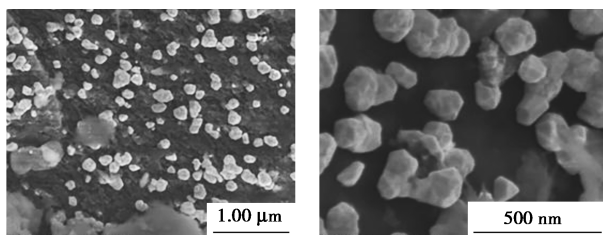
图 3 在活性炭上分别电沉积和吸附 Co 的 EDS 和置换 Au 的 EDS

该颗粒为纳米钴颗粒。

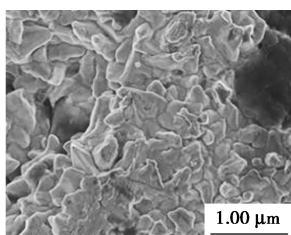
为了排除活性炭物理吸附纳米钴的可能性,采用对比的方法在同样条件下将圆柱形活性炭直接浸入电解质中吸附Co,如图2(b)所示。由图2(b)中可以看出,样品表面形成的是尖锐状的发射体晶体,并未沉积出纳米颗粒。图3(b)的EDS中也没有显示Co纳米粒子的存在。因此Co纳米粒子无法通过吸附固载在载体上,预期产物纳米钴只能通过电沉积获得。

2.2 纳米金电极的表征

图4(a)和图4(b)分别是将Co/AC浸入氯金酸溶液中获得放大30 000倍的和放大100 000倍的SEM图。从图4(a)中可以看出,颗粒均匀分布,尺寸均匀,颗粒大小在40~100 nm之间,EDS显示颗粒为纳米Au[如图3(c)所示]。活性炭载体自带的微量Al被Au取代,在EDS中不再显示。为了对比,在煤基活性炭上直接电沉积Au,如图4(c)所示,载体上生成的是堆叠状的Au,因此只能通过取代电沉积的Co纳米获得纳米Au修饰的活性炭电极。



(a) 置换法制备 Au($\times 30\ 000$) (b) 置换法制备 Au($\times 100\ 000$)



(c) 电沉积法制备 Au

图4 置换和直接电沉积的Au的SEM图

2.3 葡萄糖氧化酶的固载活性

电极的GOx标准曲线如图5所示,经计算,GOx

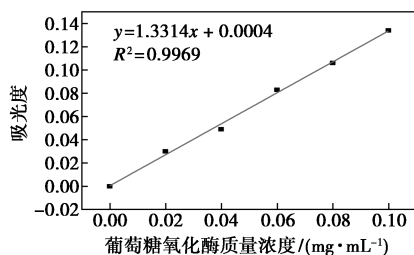


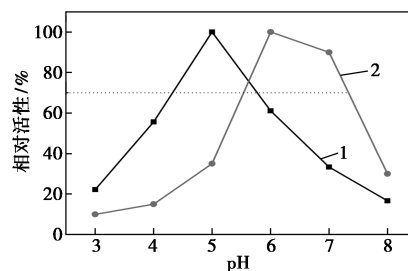
图5 葡萄糖氧化酶标准曲线

的固载量为82 mg(GOx)/g。

酶需要合适的生存生长环境,pH是重要的环境因素之一。pH直接影响酶分子活性部位上的基团和底物的解离。

在38℃下,取1、2、3、4、5#5个锥形瓶,在各锥形瓶中加入20 mL 10 mmol/L pH为3、4、5、6、7、8的葡萄糖溶液,水浴恒温加热30 min,加入20 mL 0.1 mol/L NaOH溶液终止酶解反应,用0.1 mol/L的盐酸滴定。酶的相对活力为实验值与最高值的比值。

pH对固载葡萄糖氧化酶的相对活性的影响如图6所示。由图6中可以看出,与游离酶相比,Au修饰的煤基活性炭固载葡萄糖氧化酶的最适pH由5移至6,这是由于煤基活性炭在之前的处理中引入了酸性基团使最适pH向碱性方向移动。当选取相对活性70%以上为适宜pH范围时,固载酶的适宜范围大于游离酶。通过在PBS(pH=6)中物理吸附,GOx固定在了孔径约为4 nm的活性炭上。



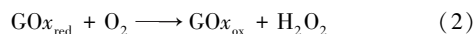
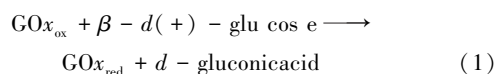
1—游离酶;2—煤基活性炭固载酶

图6 pH对酶相对活性的影响

2.4 纳米Au修饰活性炭酶电极的电化学表征

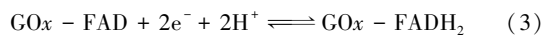
2.4.1 循环伏安法

在0.1 mol/L、pH为6的PBS溶液中用循环伏安法对电极的氧化还原过程进行表征。扫描电压为-0.3~0.7 V,速率为50 mV/s。使用1 cm \times 1 cm的Pt对电极、饱和甘汞参比电极以及0.6 g的GOx/Au/AC工作电极。在葡萄糖氧化酶的催化作用下,葡萄糖与氧气反应生成H₂O₂。在需氧的情况下,葡萄糖和GOx之间的反应方程式分别为:

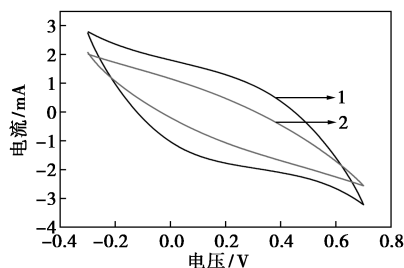


GOx/Au/AC电极和Au/AC电极在含有葡萄糖的0.1 mol/L、pH=6的PBS溶液中的循环伏安曲线如图7所示。从Au/AC电极的CV曲线中没有观察到明显的氧化还原峰,表明Au/AC电极未与溶液

中的葡萄糖发生电化学反应。相比之下,GOx/Au/AC 电极则在缓冲溶液中具有良好的电流响应。该曲线证明葡萄糖氧化酶已经吸附在 Au/AC 电极上,并且催化性能良好。GOx 辅酶发生氧化还原过程反应的方程式为:



GOx/Au/AC 电极的 CV 曲线中出现了 1 对可逆的氧化还原峰,在 0.27 V 和 0.06 V 上分别出现氧化峰和还原峰($\Delta E_p = 210 \text{ mV}$),曲线对称性高说明电极可逆性良好。煤基活性炭上的 Au 纳米粒子为 GOx 提供了良好的微观环境。由于纳米材料的宏观隧道效应,纳米 Au 既可在载体和 GOx 之间起到导线的作用,提高 GOx 的催化活性和传感器电流响应的灵敏度,还可以加快电极与溶液之间电子传递的效率,同时还可有效地提高 GOx 氧化还原的可逆性。



1—GOx/Au/AC 电极;2—Au/AC 电极

图 7 纳米金修饰活性炭电极的循环伏安曲线图

2.4.2 电流-时间法

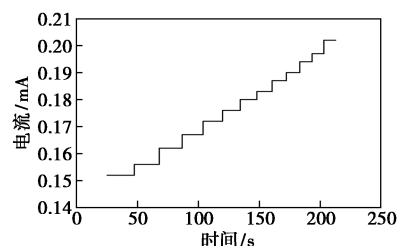
每隔 15 s 将 1 mL 0.05 mol/L 葡萄糖溶液滴入 19 mL、pH=6 的缓冲溶液中,并用计时电流法模块在电化学工作站记录不同葡萄糖质量浓度下的电流响应值。

基于 GOx/Au/AC 的葡萄糖生物传感器在 pH=6 的不同浓度葡萄糖缓冲溶液的典型电流-时间阶梯曲线图 8(a) 所示。由图 8(a) 中可以看出,阶梯电流波动较小,说明此传感器的信噪比较大。图 8(a) 中葡萄糖质量浓度与响应电流平均值的校准曲线如图 8(b) 所示。拟合后得到回归方程为:

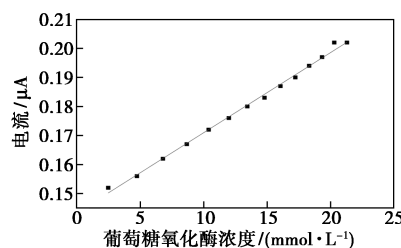
$$I = 0.0028C + 0.1433(2.5 - 20.31 \text{ mmol/L}), \quad R = 0.992 \quad (4)$$

葡萄糖传感器的线性范围为 2.50 ~ 20.31 mmol/L(相关系数 $R = 0.992$),广于大部分实验结果^[19-20],检测限为 0.18 mmol/L($S/N = 3$)。对响应电流值和葡萄糖质量浓度取倒数,得到 Lineweaver-Burk 散点图,进行拟合求得 Michaelis-Menten 常数

为 0.93 mmol/L,低于文献[19]中的值。酶对葡萄糖的亲和力较好,催化活性较高。这是因为活性炭表面结构多孔,活性位点多,在和纳米 Au 的共同作用下,煤基活性炭固载 GOx 的效果优于普通电极。与共价结合等方法相比,物理吸附法较为温和,不易破坏酶的活性中心,小尺寸效应使得纳米 Au 的催化效率高。



(a) GOx/Au/C 电极的电流-时间阶梯曲线



(b) 葡萄糖质量浓度与响应电流平均值的校准曲线

图 8 GOx/Au/AC 葡萄糖传感器的性能曲线

酶传感器受到的干扰主要是由被测溶液中扩散到传感器表面的电活性物质引起。在最佳条件下,研究了血液中存在的尿酸(UA)、抗坏血酸(AA)对 GOx/Au/AC 电极检测葡萄糖的影响。每 15 s 将 1 mL 0.1 mol/L 尿酸、抗坏血酸和葡萄糖溶液分别滴入 20 mL、pH 为 6 的缓冲溶液中测试电极的抗干扰能力,并在电化学工作中记录相应的电流响应值,如图 9 所示。由图 9 可以看出,同样浓度条件下,抗坏血酸和尿酸的添加没有引起明显的电流响应,而加入葡萄糖后氧化峰电流达 0.23 mA。实验表明,制备的葡萄糖传感器具有较好的抗干扰能力。将工作电极保存在 4℃ 的冰箱中,在最初的 5 d,工作电

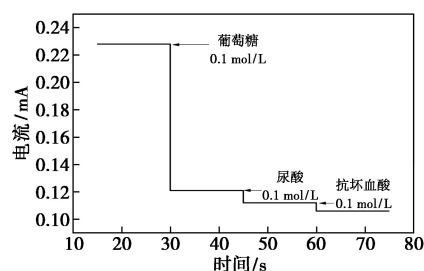


图 9 工作电极的抗干扰性能

极的灵敏度保持在 95% 以上, 1 个月后, 电极的灵敏度保持在 90%, 表明该传感器稳定性较好。工作电极的稳定性见图 10。

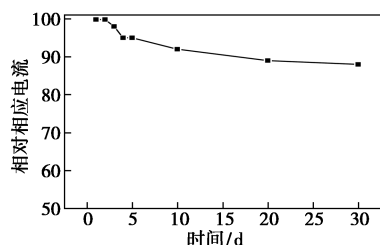


图 10 工作电极的稳定性

3 结论

通过置换电沉积在煤基活性炭上的 Co 粒子, 在煤基活性炭载体上固定纳米 Au, 物理吸附葡萄糖氧化酶制作 GOx/Au/AC 电极。结合电化学检测手段, 制备了一种简单、酶固载量大的葡萄糖传感器。葡萄糖的线性范围在 2.50~20.31 mmol/L 之间, 检出限为 0.18 mmol/L, 米氏常数为 0.93 mmol/L。对葡萄糖具有良好的检测性、重现性和稳定性。

参考文献

- [1] 常艳兵, 冯亚娟, 何琼. 合金纳米材料修饰的葡萄糖传感器的研究进展[J]. 曲靖师范学院学报, 2014, 33(3): 41-46.
- [2] 杨江伟, 梁新义, 张坤生, 等. 基于 PtRu 合金纳米晶修饰的葡萄糖传感器研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 19-22.
- [3] 牛首飞, 杨文玲, 张桂宾. 凝胶-化学交联法制备聚乙烯醇多孔载体材料[J]. 塑料, 2015, 44(3): 10-13, 86.
- [4] 郎伟超, 张丽. 共价结合法固定化酶活性载体的研究进展[J]. 生物技术世界, 2013(10): 1-1.
- [5] 肖宇, 丁春华, 汪国庆, 等. 煤基活性炭共价固载葡萄糖氧化酶及其在生物传感器中的直接电化学性能[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2015, 52(3): 625-630.
- [6] Li Y, Yuan Y, Gong D, et al. A SPR glucose sensor based on immobilized glucose oxidases and silica mesocellular foams[J]. IEEE Sensors Journal, 2018, 18(6): 2229-2235.
- [7] Qiu C, Wang X, Liu X, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nanostructured gold thin films and its application to bioelectrochemical glucose sensor[J]. Electrochimica Acta, 2012, 67: 140-146.
- [8] Chaichi M J, Ehsani M. A novel glucose sensor based on immobilization of glucose oxidase on the chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and the luminol-H₂O₂-gold nanoparticle chemiluminescence detection system[J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2016, 223: 713-722.
- [9] Fang L, Liu B, Liu L, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on Au nanoparticles-functionalized 3D hierarchically ZnO nanostructures and its application to bioelectrochemical glucose sensor[J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2016, 222: 1096-1102.
- [10] Manjusha Mathew, N. Sandhyarani. A highly sensitive electrochemical glucose sensor structuring with nickel hydroxide and enzyme glucose oxidase[J]. Electrochimica Acta, 2013, 108: 274-280.
- [11] Baysal Z, Bulut Y, Yavuz M, et al. Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: Determination of equilibrium, kinetics, and thermodynamic parameters[J]. Starch-Stärke, 2014, 66(5-6): 484-490.
- [12] Byeong-Cheol Kang, Ban-Suk Park, Tae-Jun Ha. Highly sensitive wearable glucose sensor systems based on functionalized single-wall carbon nanotubes with glucose oxidase-nafion composites[J]. Applied Surface Science, 2019, 470: 13-18.
- [13] Zou B, Song C, Xu X, et al. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials[J]. Applied Surface Science, 2014, 311: 62-67.
- [14] 刘红梅, 汪沙, 熊迪等. 椰壳活性炭共价固载木瓜蛋白酶的研究[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2012, 51(5): 553-558.
- [15] 孙冬梅, 蔡称心, 邢巍等. 葡萄糖氧化酶在活性炭上的固定及直接电化学[J]. 无机化学学报, 2005, 21(3): 405-408.
- [16] 童亮. 基于金属氧化物复合纳米结构的葡萄糖生物传感器的制备及性能研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.
- [17] 陈建龙, 祁建成, 曹仪植. 固定化酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2006(1): 7-9.
- [18] Gomez S V, Acedo R M, Lopez P A J, et al. Oxidation of activated carbon by hydrogen peroxide. Study of surface functional groups by FTIR[J]. Fuel, 1994, 73: 387-395.
- [19] 景蔚萱, 齐含, 成妍妍等. Au 微球阵列跨尺度葡萄糖传感器的制备[J]. 稀有金属材料与工程, 2015, 44(11): 2918-2922.
- [20] 景蔚萱, 周帆, 陈路加, 等. 基于 ZnO 纳米线的螺旋线形跨尺度葡萄糖传感器[J]. 高等学校化学学报, 2014, (3): 493-498. ■

欢迎订阅《现代化工》杂志, 邮发代号 82—67。