DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.025
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
1194 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)13-1194-03

聚邻苯二胺嵌合葡萄糖氧化酶电极的研制

蒲晓允[1],邵 方[2],李招权[1],黄 辉[1],邓 均[1],张春雷[1] (第三军医大学:[1]医学检验系临床检验学教研室;[2]基础医学部化学教研室,重庆,400038)

提 要:目的 研制具有消除抗坏血酸干扰的电流型葡萄糖传感器。方法 用电化学法聚合邻苯二胺膜于铂电极上,并将葡萄糖氧化酶嵌合其中,制成电流型葡萄糖传感器。结果 该传感器对葡萄糖有很好的灵敏度、响应性、线形性、稳定性和抗抗坏血酸干扰性,灵敏度为0.39 mA·mmol^{-1}·L^{-1},响应时间5 s,线性范围是3.5~7.5 mmol/L,稳定性为25 d,抗坏血酸浓度低于80 μmol/L时,对葡萄糖的测定结果均无明显影响($P>0.05$)。结论 该传感器可有效地消除抗坏血酸的干扰,为研制实用型血糖检测仪奠定了基础。

关键词:电极;葡萄氧化酶;聚邻苯二胺
中图法分类号:R312;R446.1 文献标识码:A

Manufacture of glucose oxidase electrode immobilized in poly o-phenylenediamine film

PU Xiao-yun[1], SHAO Fang[2], LI Zhao-quan[1], HUANG Hui[1], DENG Jun[1], ZHANG Chun-lei[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, College of Medical Laboratory; [2]Department of Chemistry, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To manufacture the amperometric glucose biosensor which can eliminate the interference of ascorbic acid (Ac). **Methods** Amperometric glucose biosensors were prepared by electropolymerization of glucose oxidase and poly o-phenylenediamine on platinum electrode. **Results** The sensor showed a fine response, linear range, stability, and diminished sensitivity to Ac interference in the determination of glucose. The glucose biosensors were characterized with sensitivity of 0.39 mA·mmol^{-1}·L^{-1}, response time of 5 s, linear range of 3.5 to 7.5 mmol/L of glucose, and stability of 25 d. And the result of glucose detection would not be significantly effected when the concentration of Ac was less than 80 μmol/L ($P>0.05$). **Conclusion** The sensors can eliminate the interference of Ac effectively and lay a basis for the development of practical blood sugar detector.

Key words: electrode; glucose oxidase; pol-phenylenediamine

葡萄糖的检测有多种方法,以电流型葡萄糖电极检测葡萄糖在工业过程控制中已得到了运用,但用该电极检测人体葡萄糖浓度时,抗坏血酸有显著的干扰[1]。对该问题的解决有助于血糖检测方法的多样化,及提高检测的准确性。本研究采用在铂丝上电化聚合邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD),并嵌合入葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, Gox),既达到了勿需添加固定剂即可将Gox固化于电极表面,又大大降低了抗坏血酸(ascorbic acid, Ac)的干扰,提高了电极的稳定性和选择性。

1 材料和方法

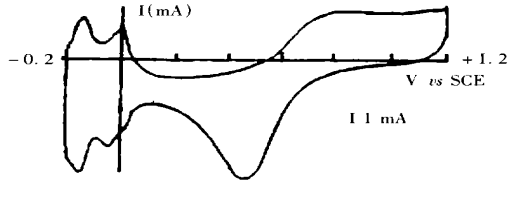
1.1 仪器与试剂

HDV-7C晶体管恒电位仪(福建省三明市无线电二厂),DCD-3D低频、超低频函数发生器,3086X-Y函数记录仪(四川仪表器厂)。

葡萄糖氧化酶为上海新立医疗器械有限公司产品,其余试剂均为分析纯,实验用水为去离子双蒸水。

1.2 方法

1.2.1 修饰电极的制备 将4 mm×4 mm铂片与直径0.5 mm的铂丝一端实现电接触,烧封于玻璃管内,铂丝的另一端与铜丝焊接作为引出线。将此铂电极在丙酮及1∶1的硫酸与硝酸混合液中各浸泡10 min后,用金相砂纸打磨,再置于0.5 mol/L硫酸溶液中,进行循环伏安(CV)预处理,直至得到标准的CV曲线(图1),取出电极,蒸馏水冲洗干净备用。



Scanning range: -0.2 V~+1.2 V *vs* SCE; Scanning speed: 100 mV/s

Scanning range: −0.2 V~+1.2 V *vs* SCE; Scanning speed: 100 mV/s

图1 工作电极循环伏安图

Fig 1 Cycle voltammogram of working electrode

作者简介:蒲晓允(1963-),男,四川省南充市人,博士,副教授,主要从事医学快速检验及造血调控方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68752312

收稿日期:2003-12-02;修回日期:2004-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以上述处理过的铂电极为工作电极, 另一铂片为辅助电极, 接有盐桥的饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。在共聚液(acetate buffer: 0.1 mol/L; OPD: 1 mmol/ml; Gox: 0.125 mmol/ml, pH 7.3)中恒电位聚合(−0.740 V *vs* SCE)15 min, 此聚合条件下, Gox 可聚合适当酶量, 酶活性几乎不受影响[2], 电极表面可见一层浅黄色膜。

1.2.2　修饰电极葡萄糖响应性能测试　　采用三电极系统, 恒电位极化(0.64 V *vs* SCE)测定修饰电极在系列葡萄糖浓度 PBS 溶液的电流响应, 极化 5 s 读数, 可得稳定电流值, 记录。

1.2.3　抗坏血酸干扰性能测试　　将修饰后的电极与裸铂电极(同样尺寸)在 PBS 溶液(PBS: 0.01 mol/L, KCl: 0.1 mol/L, 抗坏血酸: 30 μmol/L)中作循环伏安实验对比。条件: 电位扫描范围: −0.2~0.8 V, 扫描速度: 100 mV/s, 分别记录其 10 周后的 CV 曲线, 并将葡萄糖浓度为 6.5 mmol/L 的溶液制成不同抗坏血酸浓度的溶液, 检测抗坏血酸对葡萄糖测试的影响[3]。

1.2.4　电极稳定性能测试　　将电极放入 4 ℃冰箱, 存放不同时间后测试对葡萄糖的响应。

1.3　统计学方法

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验分析组间差异的显著性。

2　结果

2.1　电极对葡萄糖浓度的响应性

将葡萄糖制成不同浓度的溶液(3.5~7.5 mmol/L), 用 1.2.2 所述检测方法观察其浓度与电流值的关系, 结果见图 2。

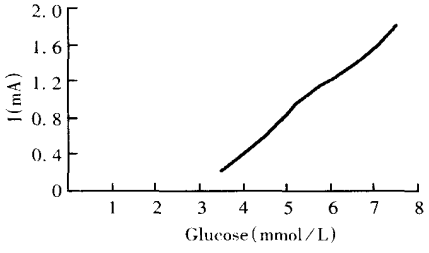


图 2　修饰电极对葡萄糖的检测曲线

Fig 2　Glucose detection curve of modified electrode

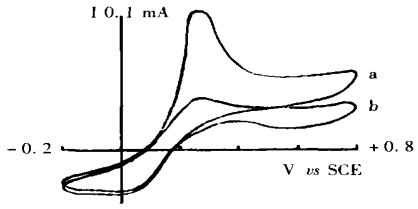
结果显示葡萄糖浓度在该检测范围内均与检测电流值呈线性关系, 经计算斜率即检测灵敏度为 0.39 $mA\cdot mmol^{-1}\cdot L^{-1}$。

2.2　电极对抗坏血酸的抗干扰性能

2.2.1　修饰电极与裸铂电极对抗坏血酸的响应　　由图 3 可知, 修饰电极对抗坏血酸的响应比裸铂电极对抗坏血酸的响应大大降低, 且修饰电极对抗坏血酸基本无响应, 因此修饰电极可消除抗坏血酸对葡萄糖检测的干扰。

2.2.2　不同抗坏血酸浓度对葡萄糖测试结果的影响　　抗坏血酸浓度分别为 0、10、20、40、80 μmol/L, 结果见表 1。

结果显示, 当抗坏血酸浓度达到 80 μmol/L 时, 与无抗坏血酸干扰葡萄糖检测结果比较, 葡萄糖检测电流才有较明显升高($P<0.05$), 而抗坏血酸浓度小于 80 μmol/L 时, 对葡萄糖的测定结果与无抗坏血酸干扰葡萄糖检测结果比较, 均无显著差异, 即当抗坏血酸浓度小于 80 μmol/L 时, 对葡萄糖的测定无明显差异。



a: CV curve of naked electrode; b: CV curve of modified electrode

a: CV curve of naked electrode; b: CV curve of modified electrode

图 3　修饰电极与裸铂电极对抗坏血酸的响应

Fig 3　Response of modified electrode and naked electrode to Ac

表 1　不同抗坏血酸浓度对葡萄糖测定结果的影响($n=5$)

Tab 1　Effects of different Ac concentration on the detection of glucose ($n=5$)

Ac (μmol/L)	I (mA)
0	1.39±0.71
10	1.38±0.20
20	1.40±0.18
40	1.43±0.17
80	1.57±0.09△

△: $P<0.05$, *vs* Ac=0

结果显示存放 25 d 内检测电流值无显著降低, 至 30 d 时, 电流值降低约 10%。

2.3　电极稳定性测试

分别在放入 4℃冰箱后于 1、5、10、15、20、25、30 d 观察电极对葡萄糖浓度为 6.5 mmol/L 的响应, 测试结果见图 4。

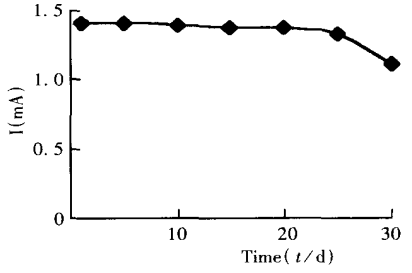


图 4　不同保存时间后修饰电极对 6.5 mmol/L 葡萄糖的检测

Fig 4　Detection of 6.5 mmol/L glucose with modified electrode after different time

3　讨论

抗坏血酸即维生素 C 是人体不可缺少的基本元素之一, 由于其分子量较小, 可以渗通到身体的各组织和器官, 因此体内任何检测标本都含有抗坏血酸, 由于抗坏血酸的分子结构与葡萄糖相似, 二者竞争 Gox, 因此在

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

检测葡萄糖浓度时，抗坏血酸对其有严重干扰[2,4]。

为降低抗坏血酸的干扰，常规的葡萄糖生化检验方法是在检测体系中加入抗坏血酸氧化酶，使抗坏血酸被破坏，然后检测葡萄糖。电流型传感器由于其体积微小，不可能固化太多的生物活性材料，要消除抗血酸的干扰，不能使用这种方法，而多选择在电极上固化一层对葡萄糖有选择性通渗作用的膜，让葡萄糖分子通过，而抗坏血酸被阻隔在外，以消除其干扰[1,5~8]。

本法采用电化学法，将 Gox 和邻苯二胺共聚合于电极表面，形成有选择性的膜，达到了排除抗坏血酸干扰和固化 Gox 的双重目的。从实验结果看该电极的稳定性很好，使用寿命可达 30 d；抗干扰性显著，可有效地消除抗坏血酸的干扰，抗坏血酸浓度在正常范围内对葡萄糖的检测无显著影响。另外，该传感器的灵敏度、检测电流与检测物浓度之间的线性关系、响应性等性能指标都取得较为满意的实验结果，为开发实用型人体葡萄糖检测传感器提供了技术保证。而常规酶电极的使用寿命短，对葡萄糖的响应通常是纳安（nA）级，且酶膜固化不易，存在易脱落、易失活等不足，采用抗干扰物质过多也会影响酶的活力[9,10]。本电流型葡萄糖传感器制作工艺简单，酶活力保存好，响应电流达毫安（mA）级，显示了充分的优越性。

参考文献：

[1] Palmisano F, Zambonin P G. Ascorbic acid interferences in hydrogen peroxide detecting biosensors based on electrochemically immobilized enzymes [J]. Anal Chem, 1993, 65(24): 2690－2692.

[2] Garjonyte R, Malinauskas A. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly o-phenylenediamine layer[J]. Sensors and Actuators B, 1999, 56(1): 85－92.

[3] Xu J J, Chen H Y. Amperometric glucose sensor based on coimmobilization of glucose oxidase and poly(p-phenylenediamine) at a platinum microdisk electrode[J]. Anal Biochem, 2000, 280(2): 221－226.

[4] Rasa G, Albertas M. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized polypyrole and poly o-phenylenediamine films on a prussian blue-modified electrode[J]. Sensors and Actuators B, 2000, 63(1): 122－128.

[5] Hoshi T, Saiki H, Kuwazawa S, *et al*. Selective permeation of hydrogen peroxide through polyelectrolyte multilayer films and its use for amperometric biosensors[J]. Anal Chem, 2001, 73(21): 5310－5315.

[6] Bharathi S, Nogami M. A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme[J]. Analyst, 2001, 126(11): 1919－1922.

[7] Wu Z, Wang B, Dong S, *et al*. Amperometric glucose biosensor based on lipid film[J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(3－4): 143－147.

[8] Cui G, Kim S J, Choi S H, *et al*. A disposable amperometric sensor screen printed on a nitrocellulose strip: a glucose biosensor employing lead oxide as an interference-removing agent[J]. Anal Chem, 2000, 72(8): 1925－1929.

[9] 应大林，王朝瑾，刘海鹰，等. Nafion 膜固定的亚甲基蓝为介体的生物传感器[J]. 生物化学与生物物理进展，1997，24(3)：254－258.

[10] 刘海鹰，李 辉，邓家祺. Nafion-四硫富瓦烯修饰蜡浸石墨电极的葡萄糖传感器[J]. 分析化学，1994，22(9)：882－886.

（编辑 栗 嘉）

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984-02-27 公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27 国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准，全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括：①国际单位制的基本单位，如长度（m）、质量（kg）、时间（s）等；②国际单位制的辅助单位；③国际单位制中具有专门名称的导出单位，如频率（Hz）、压力（Pa）、能量（J）；④国家选定的非国际单位制单位，如时间（min、h、d）、转速（r/min）；⑤由以上单位构成的组合形式单位，如速度（m/s）、浓度（mol/L）；⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位，如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外，均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母，无复数形式，符号后不附加圆点（正常语法名字尾标点符号除外）。来源于人名的单位，例如：Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头，例如：M、G、T 等的首字母大写以外均为小写，“升”的符号可用大写（L）也可用小写（l），一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号（例如：化学元素符号）之间应留半个阿伯数字空隙，词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用，也不能重叠使用（例如：“mμm”应为“nm”）。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net