

基于硼酸修饰的多壁碳纳米管的 QCM 血糖传感器的研究

张振晓¹ 窦倩² 王娇娜^{1*} 李从举¹ 戴庆^{2*}

1北京服装学院材料科学与工程学院北京市服装材料研究开发与评价重点实验室,北京 100029

2国家纳米科学中心,北京 100190

摘 要 糖尿病是一种严重威胁人体健康且无法治愈的疾病。然而,目前缺乏稳定性好、成本低的血糖检测方法,设计并制备了一种新型的基于石英晶体微天平(QCM)的血糖检测技术,选择氨基苯硼酸作为葡萄糖的识别单元,将氨基苯硼酸与氧化多壁碳纳米管(MWCNTs)结合,然后再涂覆至金电极上。利用QCM检测薄膜与葡萄糖的结合特性。结果表明:该薄膜能够检测生理条件下(pH=7.0~7.5)的葡萄糖浓度变化,整个检测范围为1.1~33.3mmol/L,且具有良好的可再生性,并对其他干扰糖(果糖、麦芽糖、核糖、乳糖、木糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖)有较好的选择性。这项工作为检测血糖提供了一种新方法。

关键词 苯硼酸,多壁碳纳米管,葡萄糖, QCM 传感器

Study on QCM blood sugar sensor based on boric acid modified multi-walled carbon

Zhang Zhenxiao¹ Dou Qian² Wang Jiaona¹ Li Congju¹ Dai Qing²

(1. College of Material Science and Engineering, Beijing Institute of Fashion Technology, Beijing Key Laboratory of Clothing Materials R&D and Assessment, Beijing 100029;

2. National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190)

Abstract Diabetes is a serious threat to human health, and cannot be cured. However, there is a lack of stable and low cost blood glucose detection system. A new QCM blood glucose detection system was designed and prepared. Aminophenyl boronic acid was chosen as recognition unit for detecting glucose. Then aminophenyl boronic acid was combined with the oxidized multi-walled carbon tube and finally coated on the quartz crystal plate. Then QCM was used to detect the binding properties of membrane to glucose. The results showed that the film could detect the change of glucose concentration under physiological conditions (pH=7.0~7.5). The whole detection range was from 1.1~33.3 mmol/L. It also had good reproducibility and excellent selectivity to other interfering sugars (fructose, maltose, ribose, lactose, xylose, sucrose, galactose and mannose). This work provided a new method for continuous measurement of blood glucose.

Keywords phenylboronic acid, multi-walled carbon tube, glucose, QCM sensor

糖尿病严重威胁着人类健康,已被世界卫生组织列为两大疑难病之一^[1],是继心脑血管疾病、肿瘤及呼吸系统疾病之后的第四大杀手^[2,3]。据2014年国际糖尿病联盟(IDF)统计,全球糖尿病患者人数为3.82亿,预计2035年将达4.71亿。2013年,

我国已经确诊的糖尿病患者人数高达9840万人,到2035年中国的糖尿病患者人数将达到1.43亿,仍然居于全球首位^[4]。糖尿病的主要危害在于高血糖带来的全身多系统损害,导致患者继发心血管疾病、血脂异常、失明、卒中、肾功能衰竭和截肢等严重并

基金项目 国家自然科学基金(61503006)北京市科技北京百名领军人才工程(216110049000)北京市教育委员会科技计划一般项目(SQNM201710012004)

作者简介 张振晓(1990)女,硕士研究生,主要研究方向为纳米材料研究。

联系人 王娇娜(1985)女,讲师,主要研究方向为纳米技术与纤维材料。

戴庆(1985)男,研究员,博士研究生导师,主要研究方向为纳米材料检测系统的研发。

发病,降低人们的生活质量^[6]。糖尿病无法治愈,患者需要终身监测血液中葡萄糖的浓度,并根据血糖浓度给予必要的治疗方案^[7]。因此研究新型的葡萄糖检测方法非常有意义,同时也具有极高的应用价值。

目前对葡萄糖的检测研究焦点主要集中在葡萄糖氧化酶^[69]、凝集素^[10]和硼酸^[113]体系这三大类。

其中,前两者属于生物大分子,虽然对葡萄糖有较高的选择性,但成本高、通用性差、易变性,与前两者相比硼酸因能够作为分子识别单元与 **1,2** 或 **1,3** 二糖化合物选择性可逆结合、成本低、稳定性好而广泛应用于葡萄糖的检测^[62]。碳纳米管由石墨层片卷曲成纳米级的中空管状结构,这种独特结构使其具有很大的表面积,且尤其是多壁碳纳米管 (MWNTs) 表面易氧化或表面负载,即在表面可产生大量的吸附活性位点^[64]。石英晶体微天平 (QCM) 是通过检测物质在金电极表面上吸附前后电极共振频率变化的原理来检测物质浓度的一类质量敏感传感器^[65]。因其灵敏度高、响应时间快、易操作等优点,被广泛地应用于生物、化学传感器以及微量物质在表面的吸附过程研究^[66-67]。

基于以上叙述,本研究选择氨基苯硼酸作为葡萄糖的识别单元,将氨基苯硼酸与氧化 MWCNTs 结合,然后再涂覆至金电极上,利用 QCM 检测涂覆层薄膜与葡萄糖的结合特性。考察了生理条件下薄膜与葡萄糖的结合情况。实验表明该方法能够有效地检测葡萄糖浓度的变化,同时具有良好的可逆性和抗干扰能力。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

氨基苯硼酸 (纯度 $\geq 98\%$)、Alfa Aesar 公司 ; 葡萄糖 (纯度 $\geq 99\%$)、西陇化工股份有限公司果糖 (纯度 $\geq 99\%$)、麦芽糖 (纯度 $\geq 92\%$)、核糖 (纯度 $\geq 99\%$)、乳糖 (纯度 $\geq 99\%$)、木糖 (纯度 $\geq 99\%$)、蔗糖 (纯度 $\geq 99\%$)、甘露糖 (纯度 $\geq 98\%$)、半乳糖 (纯度 $\geq 98\%$)、上海金穗生物科技有限公司浓硝酸 (纯度 $65\% \sim 68\%$)、浓硫酸 (纯度 $95\% \sim 98\%$)、双氧水 (60%)、乙醇 (纯度 99.7%)、丙酮 (纯度 99.5%)、北京化工厂。

石英晶体微天平 (GCM,SPS200型)北京金先
锋光电科技有限公司;匀胶仪 (KW-4B 型)北京赛
的凯斯电子有限公司;数控超声波 (KQ3200DE
型)昆山市超声仪器有限公司;红外光谱仪

(FTIR, Nicolet N10 型), Thermo Fisher 公司; 扫描电镜 (SEM, S4800 型), 日本日立公司。

1.2 葡萄糖选择性电极的制备

QCM 金电极的预处理:将金电极依次放在 10mL 的乙醇、丙酮、体积比 $V(H_2SO_4):V(H_2O_2)=7:3$ 的食人鱼溶液中分别超声 5min。取出后用超纯水冲洗,吹干备用。

MWCNTs的氧化 将MWCNTs加入浓硝酸中,加热回流 6h 冷却。蒸馏水多次洗涤到中性,干燥。

电极制备:将 150mg 氧化 MWCNTs 分散在 150mL 乙醇中。用旋涂的方法将氧化后的 MWCNTs 旋涂在经过前处理的金电极上,转速 3000r/min,自然干燥 12h,然后放入 45℃ 真空烘箱中 12h,将上述金电极浸入 5mL 氨基苯硼酸的乙醇溶液,并加入 5mmol/L 1,6-二甲氨基丙基 2,3-乙基碳二亚胺盐酸盐作为缩合剂,室温下组装 24h 后取出,乙醇清洗数次,置于 30℃ 真空烘箱 24h 之后分别用乙醇和超纯水清洗, N₂ 吹干。

利用硼酸基团与葡萄糖能够可逆结合的特性,氧化后的 **MWCNTs** 表面上具有大量的羧基基团,并以非共价键的方式涂覆在预处理后的金电极上,此时金电极表面具有非常大的比表面积,有利于后续大量硼酸基团的引入。然后利用羧基与氨基苯硼酸上的氨基反应,硼酸基团以共价键的方式固定在 **MWCNTs** 上。金电极上的硼酸基团可以可逆识别葡萄糖分子。

1.3 实验方法

将镀好膜的金电极用乙醇和二次蒸馏水反复洗涤,干燥后放入流通池中,室温下,每秒钟取1个数据点进行实时检测。待在空气中基线平衡(10min以内)后,注入对应的0.1mol/L磷酸缓冲盐溶液(PBS)走基线,采用流动进样的方式,待基线频率稳定(10min以内)后,进行实验。每隔10min注入3mL不同浓度的葡萄糖溶液,使先前的待测液体完全排出,从而保证每次测试时,测试腔内的待测液体浓度不受前一次测试的影响。记录前后频率的差值 ΔF , 用频率信号来评价葡萄糖与薄膜的结合特性。检测了薄膜对不同浓度葡萄糖的响应特性,配制葡萄糖溶液的浓度分别为0.1.1mmol/L、3.9mmol/L、6.1mmol/L、9.4mmol/L、11.1mmol/L、14mmol/L、18mmol/L、22mmol/L、26mmol/L 和33.3mmol/L。不同浓度的葡萄糖是根据人体血糖浓度而定的,比如11和33.3

分别是血糖的最低值和最高值,如血糖浓度大于 1.1mmol/L ,则可诊断为糖尿病^[18];基于人体组织液 pH 的范围是 $7.0\sim 7.5$,本实验对此范围内 ($\text{pH}=7.07, 37.5^\circ\text{C}$) 薄膜与葡萄糖的结合特性均进行了测试。重复测试浓度为 0 和 333mmol/L 的葡萄糖溶液,对薄膜的可再生性能进行了评价。最后检测了人体生理条件下,组织液中其他干扰糖类糖、麦芽糖、核糖、乳糖、木糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖对葡萄糖测试的干扰情况。

2 结果与讨论

2.1 表征

2.1.1 FT-IR 分析

氧化前后 MWCNT 和苯硼酸修饰后的 MWCNTs 的 FTIR 谱图见图 1。由图可知,未经氧化的 MWCNTs 在 1090cm^{-1} 附近的峰为 $\text{C}-\text{C}$ 的吸收峰。经硝酸氧化后, MWCNTs 在 2907 和 1277cm^{-1} 附近的峰为 $-\text{C}-\text{H}$ 的吸收峰, 1746cm^{-1} 为 $-\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰, 1277cm^{-1} 处为 $-\text{C}-\text{O}$ 的吸收峰,说明样品中有 $-\text{COOH}$ 存在。经苯硼酸修饰后, MWCNTs 在 1351cm^{-1} 处为 $-\text{B}-\text{O}-$ 的吸收峰, 1002cm^{-1} 处为 $-\text{C}-\text{N}$ 的吸收峰,说明氨基苯硼酸已经成功修饰到 MWCNTs 上。

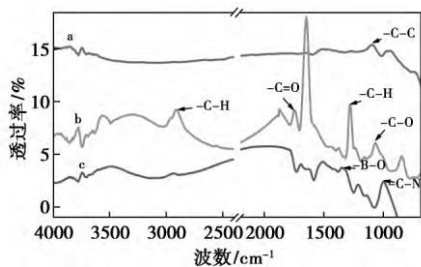


图1 MWCNT (a)、硝酸氧化后的 MWCNTs (b) 和苯硼酸修饰后 MWCNTs (c) 的 FT-IR 谱图

2.1.2 SEM 分析

经苯硼酸修饰后 MWCNTs 的 TEM 图见图 2。由图可知,经苯硼酸修饰后的 MWCNTs 涂覆在金电极上,金电极的表面上出现了由 MWCNTs 堆叠而成的涂覆层,且分布较为均匀。MWCNTs 的引

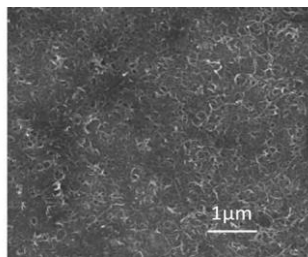


图2 经苯硼酸修饰后 MWCNTs 的 TEM 图

入有利于增加金电极的比表面积,从而增加硼酸基团的含量,有利于葡萄糖的结合。

2.2 各因素对苯硼酸功能化 QCM 电极性能的影响

2.2.1 葡萄糖浓度

把注入被检测葡萄糖溶液后到 QCM 响应趋于稳定时,两个 QCM 间频率差的变化值记为 F 。那么定义此传感器的响应时间为接触葡萄糖后,频率下降 (或上升) 了 F 的 90% 所需的时间。这样即可计算出该传感器的响应时间。利用 QCM 来检测薄膜对葡萄糖的敏感性,结果见图 3。由图可知,薄膜对每个浓度葡萄糖溶液的响应速度都非常快,约为 120s 。另外,薄膜对 $1.1\sim 333\text{mmol/L}$ 之间的葡萄糖浓度均有响应。当葡萄糖浓度从 $0\sim 333\text{mmol/L}$ 逐渐增加时,镀膜 QCM 晶片的共振频率迅速下降,这是由于薄膜上的硼酸基团与葡萄糖分子快速结合的原因,随着反应时间的增加,频率下降趋于稳定,当葡萄糖溶液浓度继续增加直至最大浓度 333mmol/L 时,共振频率下降至最大。可以看出薄膜对这些葡萄糖浓度点均可以快速响应。

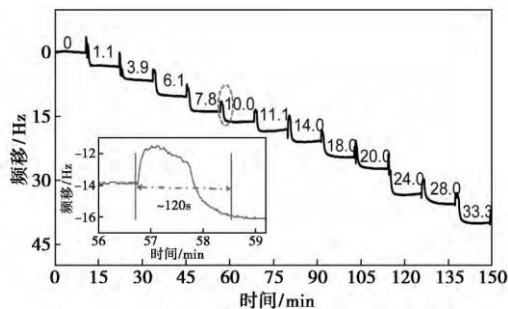


图3 葡萄糖浓度对苯硼酸功能化 QCM 电极性能的影响
(插图为图中圆圈处的放大,响应时间为 $\sim 120\text{s}$)

2.2.2 pH

硼酸基团与葡萄糖的结合具有 pH 可控性,而人体组织液的 pH 范围是 $7.0\sim 7.5$,为了考察此薄膜能否在此 pH 范围都可应用,本实验对不同 pH 下葡萄糖溶液进行测试,结果见图 4(a)。由图可知,在 $\text{pH}=7.0\sim 7.5$,薄膜对葡萄糖均具有较好的响应性。同一浓度下,随着溶液 pH 的增加,相应的响应频率绝对值也增加,这是因为 pH 升高有利于硼酸与葡萄糖分子的结合。由于葡萄糖含有两套顺式二醇,它可以与苯硼酸以两种方式结合,当葡萄糖浓度较低时结合方式为 $2:1$,随着葡萄糖浓度增加 (大于 7.5mmol/L 时) 结合方式逐渐变为 $1:1$ ^[19-20],因此可以将线性关系分为两个部分 $0\sim 78\text{mmol/L}$ 和 $7.8\sim 333\text{mmol/L}$,线性关系见图 4(b),线性方程及拟合度见表 1。

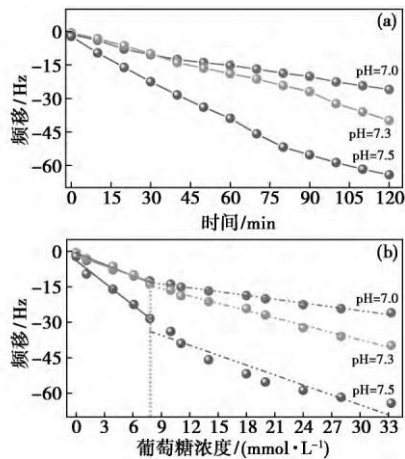


图4 不同pH下,葡萄糖浓度对苯硼酸功能化 QCM 电极性能的影响和线性关系图

表1 不同pH条件下的线性方程及拟合度

pH	0~7.8mmol·L ⁻¹		7.8~33.3mmol·L ⁻¹	
	线性关系	拟合度	线性关系	拟合度
7.0	$Y_1 = -1.60X - 0.72$	$R^2 = 0.98$	$Y_2 = -0.54X - 8.93$	$R^2 = 0.98$
7.3	$Y_3 = -1.40X - 1.89$	$R^2 = 0.98$	$Y_4 = -1.03X - 6.50$	$R^2 = 0.99$
7.5	$Y_5 = -3.13X - 3.90$	$R^2 = 0.97$	$Y_6 = -1.39X - 22.9$	$R^2 = 0.90$

2.3 回复性分析

对涂覆层薄膜检测葡萄糖的可逆性和可再生性进行了测试。实验发现,当注入 33.3mmol/L 葡萄糖溶液时,频率下降,当重新注入葡萄糖浓度为 0 的 PBS 时,频率上升,可见薄膜对葡萄糖具有良好的结合与释放功能,如此反复 5 次,频率无较大偏差,显示了 QCM 传感器对葡萄糖具有一个较完整的可逆和可再生反应。

2.4 选择性分析

血液中葡萄糖占主要部分,但同时也含有一些其他的糖类,例如果糖,蔗糖等。虽然他们的含量较低(都在 0.1mmol/L 以内)^[2],但这些干扰糖也可能对硼酸吸附葡萄糖有一定的影响。分别配制了

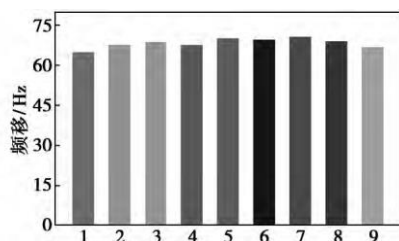


图5 8 种干扰糖对薄膜吸附葡萄糖的影响

(葡萄糖 2葡萄糖+果糖 3葡萄糖+麦芽糖;
4:葡萄糖+核糖 5葡萄糖+乳糖 6葡萄糖+木糖;
7:葡萄糖+蔗糖 8葡萄糖+半乳糖 9葡萄糖+甘露糖)

9 种不同的溶液,其中包括 33.3mmol/L 葡萄糖溶液和 33.3mmol/L 葡萄糖混入 0.1mmol/L 干扰糖,如果糖、麦芽糖、核糖、乳糖、木糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖等含不同糖类的 8 种溶液,考察这些干扰糖对该薄膜吸附葡萄糖的影响,结果见图 5。由图可知,该薄膜对其他干扰糖的响应频率很小,这说明 QCM 的传感器可以在其他干扰糖存在的情况下在误差范围内检测相关的葡萄糖浓度。

3 结论

合成了基于氧化 MWCNTs 的葡萄糖敏感的硼酸薄膜,该薄膜可实现对人体生理条件下 (pH = 7.0~7.5, 血糖范围 1.1~33.3mmol/L) 葡萄糖的快速、准确、连续性检测,薄膜对葡萄糖检测具有较好的可再生性,对其他糖类例如果糖、麦芽糖、核糖、乳糖、木糖、蔗糖和半乳糖等糖类的选择性良好。为实现血糖的连续监测提供了一个新的方法。

参考文献

- [1] Chen J, Mangalind S, Adams A. Natural boronic acid functionalized carbon nanotubes for glucose detection and its applications [J]. Natural Product Communications, 2015, 10(1): 187-200.
- [2] El-Arab A E, Fuly A, Mahmoud H. Effect of blood glucose fluctuation on some trace elements and blood glucose among type II diabetic patients with metabolic syndrome [J]. Arab J Sci, 2014, 4(4): 201-216.
- [3] Kaini S, Jafari A A. Comparison of type II diabetic patients with healthy people regarding lifestyle, diet and age and its effect on quality of life [J]. International Journal of High Risk Behavior & Addiction, 2016, 5(1): 24-31.
- [4] Gariga L G. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2014, 13(2): 137-149.
- [5] Gostin T L, Thapa D, Holben A. A functional analysis of subcutaneous microdialysis in type 2 diabetic human heart [J]. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology, 2014, 307(1): 1-14.
- [6] Trento M, Passa P A. 5-year ambulatory continuous study of long-term self-management of type 2 diabetes in people with type 2 diabetes managed by group care [J]. Diabetes Care, 2014, 27(6): 670-675.
- [7] Li J, N. E. Active summary of the state of the art in diabetes [J]. Diabetes Care, 2010, 33(11): S4-S10.
- [8] Mari V, Davis B, Chen S M. Direct electrochemical detection of glucose at a boronic acid-modified reduced graphene oxide multilayered carbon nanotube hybrid material modified electrode for glucose biosensor [J]. Biosensors & Electronics, 2013, 41(6): 309-315.

- [9] Li M, Liu R, Chen W. Graphene wrapped ZnO nanorods: a novel electrochemical sensor for the detection of glucose [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2013, 750: 1-7.

- coated hydrogen peroxide with enhanced stability [J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*. 2013; 45: 206-212.
- [10] Ye C, Zhong X, Dai Y. Simple glucose-based on its affinity for graphene-A novel hydrogen peroxide modified with a C₆₀-fullerene composite [J]. *Microchimica Acta*. 2015; 182 (13-14): 1-7.
- [11] Wang W, Kong L, Zhu D. Preparation of flexible composite containing boronic acid derivative for nonenzymatic glucose detection [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017; 498: 1-8.
- [12] Qu Z, B, Zhou X, Gu L. Boronic acid functionalized graphene quantum dots as a fluorescent probe for selective sensitive glucose determination in microdialysis [J]. *Chemical Communications*. 2013; 49 (84): 9830-9832.
- [13] Basirirad SK, Swain SK. Phenyboronic acid functionalized reduced graphene oxide based fluorescent sensor for glucose sensing [J]. *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*. 2016; 58: 108-109.
- [14] Etemadi A, Daraei H. Carbon nanotubes properties, synthesis, purification and medical applications [J]. *Nanoscale Research Letters*. 2014; 9 (1): 393.
- [15] Jia X, Tan L. Quartz crystal microbalance and electrochromic glucose sensing on a chitosan/multiwalled carbon nanotubes/Au electrode [J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*. 2008; 134 (1): 273-280.
- [16] Saito R, E, Cooper M. A survey of the 200 quartz crystal microbalance lecture [J]. *Journal of Microelectronic Packaging*. 2005; 27 (2): 451-473.
- [17] Yao C, Zhu T. Development of a quartz crystal microbalance biosensor with aptamer as a biorecognition element [J]. *Sensors*. 2010; 10 (6): 5559-5571.
- [18] Kerner W, Brudel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus [J]. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2014; 122 (7): 394-396.
- [19] Wu X. Selective sensing of saccharides using simple boronic acid and their aggregates [J]. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42: 8032-8048.
- [20] Zhang C, Lozano M D, Braun P V. Hydrogel-based glucose sensors: effects of phenylboronic acid chemical structure on response [J]. *Chemistry of Materials*. 2013; 25 (5): 323-325.
- [21] Jamali F, Farang M, Wood L. G. et al. A colorimetric assay for the detection of glucose and sucrose in blood lipid levels and system information [J]. *Lipids in Health and Disease*. 2014; 13 (1): 195.