

2014-02-25

Design and Development of a Novel Glucose Biosensor Based on the Ferrocene-Functionalized Fe₃O₄ Nanoparticles/Carbon Nanotubes/Chitosan Nanocomposite Film Modified Electrode

Hua-ping PENG

Dai-Jun ZHA

Wei CHEN

Ai-lin LIU

Xin-hua LIN

Recommended Citation

Hua-ping PENG, Dai-Jun ZHA, Wei CHEN, Ai-lin LIU, Xin-hua LIN. Design and Development of a Novel Glucose Biosensor Based on the Ferrocene-Functionalized Fe₃O₄ Nanoparticles/Carbon Nanotubes/Chitosan Nanocomposite Film Modified Electrode[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2014 , 20(1): 121108.
DOI: 10.13208/j.electrochem.121108
Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol20/iss1/15>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

DOI: 10.13208/j.electrochem.121108

Artical ID:1006-3471(2014)01-0033-06

Cite this: *J. Electrochem.* 2014, 20(1): 33-38

Http://electrochem.xmu.edu.cn

二茂铁功能化 Fe_3O_4 /碳纳米管/壳聚糖复合膜 葡萄糖生物传感电极的研究

彭花萍¹, 查代君², 黄郑隽¹, 陈伟¹, 刘爱林^{1*}, 林新华^{1*}

(1. 福建医科大学药学院药物分析系, 福建 福州 350004; 2. 南昌大学高等研究院, 江西 南昌 330031)

摘要: 采用交联法制备了羧基二茂铁功能化 Fe_3O_4 纳米粒子(FMC-AFNPs)复合材料,并将该复合纳米材料与多壁碳纳米管(MWNTs)、壳聚糖(CS)及葡萄糖氧化酶(GOD)混合修饰于自制的磁性玻碳基底(MGC)表面,制备了 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合膜生物传感器电极。实验结果表明,FMC-AFNPs 复合材料有效地克服了二茂铁在电极表面的泄漏,且 FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合膜良好的生物相容性较大地改善了固定化 GOD 的生物活性。MWNTs 具有良好的导电性和大比表面积,在修饰膜内可作为电子传递“导线”,极大地促进电极的电子传递速率,提高电极的电催化活性和灵敏度。该电极的葡萄糖检测的线性范围为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $3.2 \times 10^{-6} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$),表观米氏常数为 $5.03 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,且有较好的稳定性和重现性。

关键词: 二茂铁修饰 Fe_3O_4 ; 碳纳米管; 壳聚糖; 葡萄糖氧化酶; 生物传感器

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

将氧化酶固定于电极表面可构建氧化酶安培型生物传感器,但因酶的活性位点常深埋于绝缘蛋白内部使得生物传感器中酶的电子传递效率较低。研究表明,若将电子媒介体共同固定于电极表面可显著提高传感器的检测灵敏度^[1-3]。尽管如此,大多电子媒介体均属小分子,将其直接固定于电极表面会导致电子介体的泄漏,使所制备的修饰电极的稳定性差。但如通过共价键合等方法将电子媒介体连接到高分子聚合物、生物分子,或纳米材料上可有效解决以上难题^[4-5]。将纳米材料引入生物传感器,不仅能够增强酶的催化活性,还能提高对底物的检测灵敏度^[6-8]。碳纳米管具有高导电性、高机械强度、良好的吸附能力和较优的生物相容性,在生物学的应用方面备受关注,尤其是其良好的导电性可作为生物分子的纳米导线促进电子传递效率以及构建电化学传感器^[9-11]。壳聚糖(Chitosan, CS)是一种富含氨基和羟基的线性聚阳离子多糖,对蛋白质有极高的亲和性,且具有良好的生物相容性、成膜性、无毒和可生物降解等特点,有利于保持生物分子的生

物活性,因此广泛用于生物物质的固定化^[12-14]。

本文采用交联法将羧基二茂铁(FMC)键合于氨基功能化 Fe_3O_4 纳米粒子(AFNPs)表面,制备了 FMC-AFNPs 复合纳米材料。并将该功能磁性纳米粒子与多壁碳纳米管(MWNTs)、壳聚糖(CS)及葡萄糖氧化酶(GOD)混合修饰于自制的磁性玻碳基底(MGC)表面,构建了 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合膜电极,用于对葡萄糖的高灵敏检测。

1 实验

1.1 试剂与仪器

葡萄糖氧化酶(GOD, EC 1.1.3.4, 15000 U·g⁻¹)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羧基琥珀亚酰胺、羧基二茂铁(FMC)、壳聚糖(CS)和 3-氨基乙氧基硅烷均购自 Sigma。永磁铁购于日本大阪。其它所用化学品均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

复合材料的表征使用透射电子显微镜(TEM, HITACHI H-600),傅立叶红外光谱仪(Nicolet 5700 FTIR),Autolab PGSTAT30 电化学工作站 (Eco

收稿日期: 2012-11-08, 修订日期: 2013-01-25 * 通讯作者, Tel: (86-591)22862016, E-mail: xhl1963@sina.com; ailinliu@mail.fjmu.edu.cn

国家 863 计划资助项目(No. 2012AA022604)、国家自然科学基金(No. 20975021, No. 21275028)、福建省高校产学研科技重点项目(No. 2010Y4003)、福建省自然科学基金资助项目(No. 2010J06011)和福建医科大学博士启动基金(No. 2011BS005)资助

Chemie). 并使用 Rigaku/Max-3A 射线衍射仪表征产物的粉末 X 射线衍射(XRD), X 射线单色 $\text{Cu K}\alpha$ 辐射线($\lambda=0.15418 \text{ nm}$). 电化学测量用三电极体系由 Ag/AgCl 参比电极 ($3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}$)、铂丝对电极、自制磁性玻碳(MGCE)或其修饰电极作为工作电极组成, 支持电解质为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液(PBS, pH 7.4).

1.2 羧基二茂铁功能化 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

采用 Massart 的方法制备了磁性 Fe_3O_4 纳米粒子^[15]. 向上述 Fe_3O_4 悬浮液($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)中逐滴加入 $50 \mu\text{L}$ 3-氨基乙氧基硅烷, 室温下搅拌 12 h 后, 将该产物用磁铁分离, 并用乙醇和水超声洗涤数次, 50°C 真空干燥过夜, 即得氨基功能化 Fe_3O_4 纳米粒子(AFNPs). 然后, 称取 15.5 mg 羧基二茂铁(FMC)溶于 4.0 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 再加入 63.2 mg N-羟基琥珀亚酰胺和 86.1 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 搅拌 1 h 后再逐滴加入 1.5 mL AFNPs 溶液($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 室温下搅拌 24 h. 反应完成后分离清洗数次. 最后, 将该复合物在 pH 7.4 的 PBS 中透析 24 h 除去未反应的 FMC.

1.3 壳聚糖溶液的制备

75 mg CS 加入 30 mL $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸中, 加热搅拌溶解, 冷却后抽滤得到澄清的 CS 溶液, 用 NaOH 溶液调节其 pH 值至 5.0 左右, 4°C 保存备

用(0.25%).

1.4 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 酶复合物膜电极的制备

根据文献报道的方法制备磁性玻碳电极(MGCE)^[16]. 将 $100 \mu\text{L}$ FMC-AFNPs($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)与 $15 \mu\text{L}$ MWNTs($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)及 $20 \mu\text{L}$ 0.25% 的 CS 溶液, 超声 5 min 混合均匀. 将 $5 \mu\text{L}$ 该混合物滴于玻碳基底, 室温晾干, 即可制得 FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合物膜电极. 在上述 FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合溶液中加入不同量的 GOD, 混合均匀后取 $5 \mu\text{L}$ 该混合物滴于玻碳基底, 4°C 下干燥, 即得 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 酶复合物膜电极. 该修饰电极制备过程如图 1 所示.

2 结果与讨论

2.1 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的表征

图 2A 为 Fe_3O_4 纳米粒子的 TEM 照片. 从图中可以看出, Fe_3O_4 纳米粒子具有很好的球状结构, 粒径分布均匀, 且分散性好, 其粒径为 $5 \sim 10 \text{ nm}$. 图 2B 是 Fe_3O_4 纳米粒子的 XRD 谱图. 由图可知, 所合成的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的 XRD 衍射峰与标准的反尖晶石型铁磁矿的特征衍射峰(ICDD 数据库)相对应, 证明所生成的粒子属反尖晶石型的 Fe_3O_4 晶体^[17].

2.2 FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极的电化学行为

图 3A 为不同修饰电极在 PBS 中的循环伏安

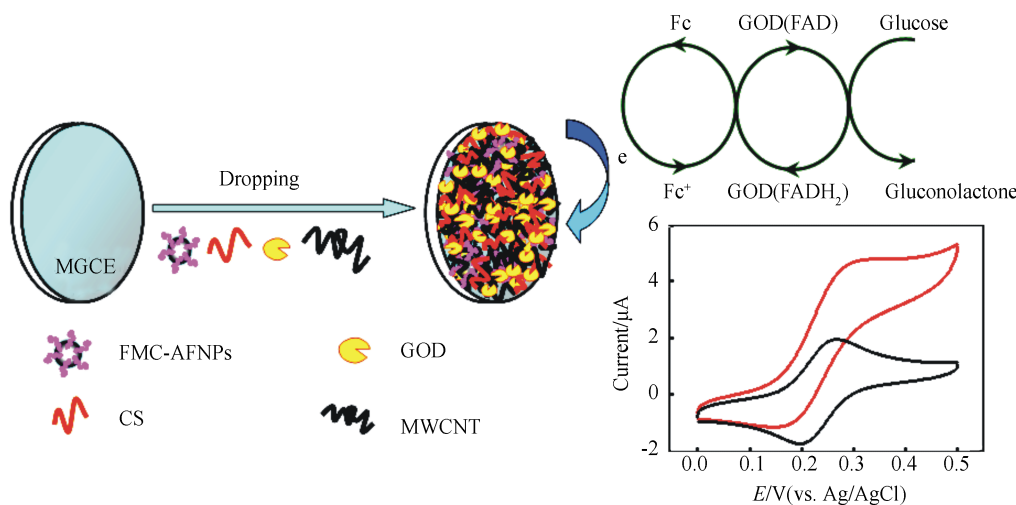
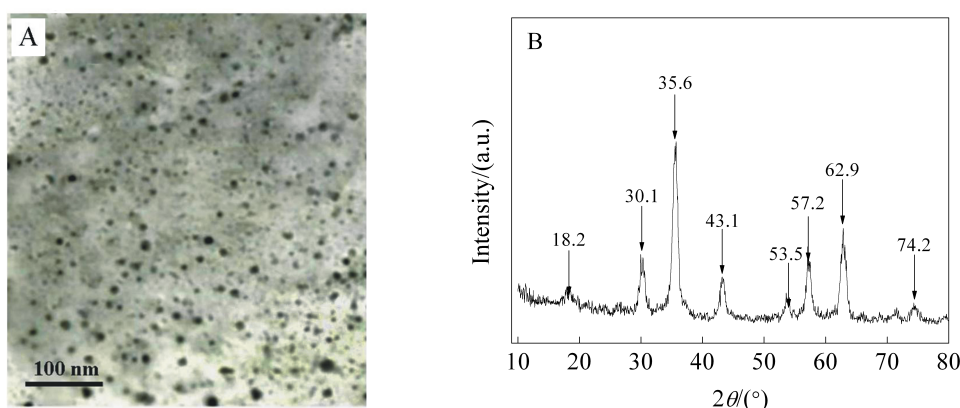
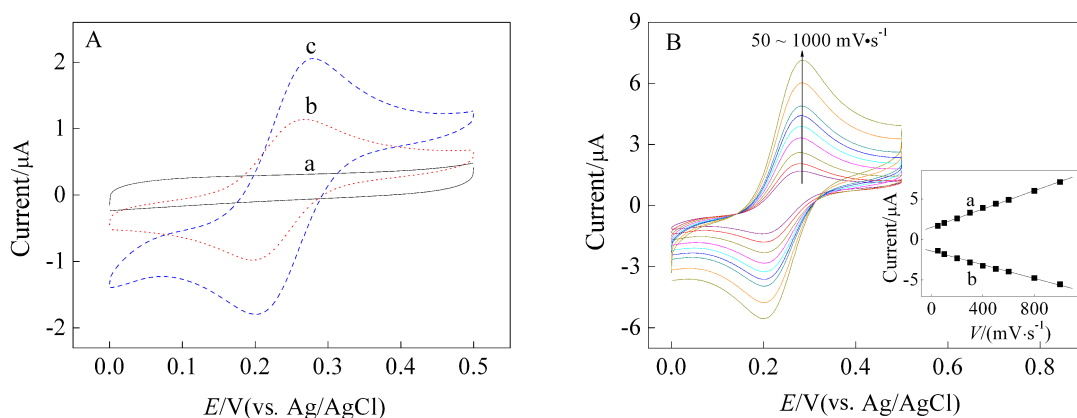


图 1 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 修饰电极示意图及葡萄糖氧化机理示意图

Fig. 1 Schematic representation of the GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS modified electrode and the mechanism of oxidation of glucose

图2 Fe_3O_4 纳米粒子的 TEM 照片(A)和 XRD 谱图(B)Fig. 2 TEM image (A) and XRD pattern (B) of the synthesized Fe_3O_4 nanoparticles图3 A. CS (a), FMC-AFNPs/CS (b)和 FMC-AFNPs/MWNT/CS (c)电极在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS 溶液, $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速率的循环伏安曲线; B. FMC-AFNPs/CS 电极在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 溶液的氧化还原峰电流与扫描速率关系曲线(扫描速率由内到外分别为 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 和 $1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, 插图: 峰电流与扫描速率的关系曲线)Fig. 3 Cyclic voltammograms of CS (a), FMC-AFNPs/CS (b) and FMC-AFNPs/MWNT/CS (c) modified MGCE at $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (A) and FMC-AFNPs/CS modified MCPE at 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, and $1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (from internal to external) in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) (inset: plot of cathodic peak current (a) and anodic peak current (b) vs. scan rate)

曲线. 从图中可以看出, CS 修饰电极无明显的氧化还原峰(曲线 a), 而 FMC-AFNPs/CS 电极上呈现了一对可逆的氧化还原峰, 峰电位分别为 202 mV 和 267 mV (曲线 b), 这对氧化还原峰对应于 FMC-AFNPs 复合物中二茂铁(Fc)的氧化还原过程, 表明 FMC 已成功地固定于电极表面. 此外, FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极上也呈现了一对 Fc 的氧化还原峰, 且峰电流明显增大(曲线 c). 这是由于 MWNTs 的存在明显地增强了电极表面的导电性, 有效地作为“分子导线”或者电子传递通道加速了 Fc 和电极间的电子传递. 该电极连续循环扫

描 100 周后, 其峰电流仍然为原始电流的 95%, 表明 FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极电化学性能十分稳定, FMC-AFNPs 复合物中 Fe_3O_4 磁性性能可使其在外磁场作用下有效地固定在电极表面, 且进一步被 CS 多孔网状物紧紧地固定. 因此, FMC-AFNPs/MWNTs/CS 修饰的 MGC 基底可有效解决 FMC 在电极表面的泄漏问题. 图 3B 为 FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合物电极在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4) 缓冲溶液中不同扫描速率下的循环伏安曲线. 随着扫描速率的增加, 其氧化还原峰电流不断增大, 表明膜内电子转移速率较快, 结合于

FMC-AFNPs 复合物中的 Fc 保持了良好的电化学活性. 在 $50 \sim 1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内其峰电流与扫描速率成正比(图 3B 内插图), 表明电极反应过程为表面控制过程^[5].

2.3 不同修饰电极的葡萄糖电催化

图 4 为不同修饰电极的葡萄糖电催化氧化循环伏安曲线. 为考察 MWNTs 在 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 生物传感界面的响应灵敏度, 比较了 GOD/FMC-AFNPs/CS 和 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 复合物膜电极的电化学行为. 由图 4 可见, GOD/FMC-AFNPs/CS 电极(曲线 a)和 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极(曲线 b)均出现了一对可逆的 Fc 的氧化还原峰, 但含 MWNTs 的修饰电极上的 Fc 氧化还原峰电流明显增强; 当向 PBS 中加入葡萄糖后, GOD/FMC-AFNPs/CS 和 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极均呈现氧化峰增大还原峰减小的趋势, 表明这两种修饰电极对葡萄糖都有良好的电催化性能. 然而, GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极(曲线 a')的葡萄糖电催化响应电流显著大于 GOD/FMC-AFNPs/CS 电极(曲线 b'). 这是因为复合膜中 MWNTs 的存在, 不仅增大了电极表面的粗糙度, 为酶的有效固定提供了更多位点, 同时也改善了复合膜的导电性能, 作为“分子导线”或者电子传递通道, 加速了 Fc 和葡萄糖氧化酶分子间的电

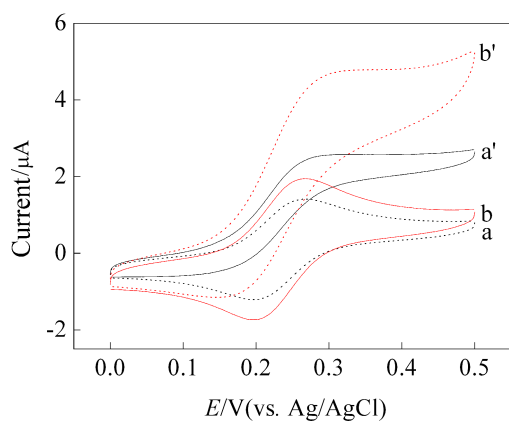


图 4 GOD/FMC-AFNPs/CS 和 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极分别在 PBS 中(a,b)和含 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的 PBS(a',b')中的循环伏安图, 扫描速率为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Fig. 4 Cyclic voltammograms of the GOD/FMC-AFNPs/CS and GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS composite film in the absence(a, b) and presence(a', b') of $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose in PBS at $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

子传递, 从而提高了电极的电催化性能^[18].

2.4 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极的葡萄糖响应特性

图 5 为 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极的葡萄糖响应曲线. 由图可见, 当在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.4) PBS 中加入葡萄糖, 其电催化响应电流急剧增大, 10 s 内即可达到最大稳态电流(95%), 表明该电极对葡萄糖的催化响应速率非常迅速. 该电极的快速响应主要归功于 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极的三维结构更利于葡萄糖向电极内部快速扩散; 再则连续分布的 MWNTs 在修饰膜内起着电子导线的作用, 即加速电子从 GOD 活性中心经中介体向电极表面传递. 从图 5 内插图的校准曲线上可以看出, 葡萄糖浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与生物传感器的电流响应呈良好的线性关系, 相关系数为 0.999, 检测限为 $3.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极的葡萄糖电催化符合米氏动力学特征, 表观米氏常数可由 Lineweaver-Burk 方程^[19-20]计算:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{K_M^{\text{app}}}{I_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{I_{\text{max}}}$$

式中, I_{ss} 为加入底物后稳态电流的大小, C 为溶液中加入底物的浓度, I_{max} 为当底物达到饱和状态的电流. 本实验所制得的电极的 GOD 的 K_M^{app} 为 $5.03 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该值较文献报道的 $14.9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[21]、 $6.87 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]和 $6.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[1]低, 表明该

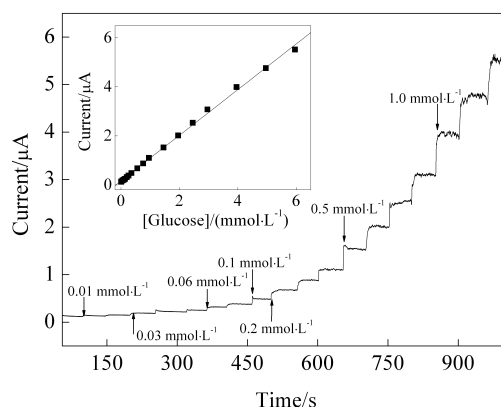


图 5 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极在 0.3 V 的葡萄糖安培响应曲线(插图: 校准曲线)

Fig. 5 Typical amperometric response of the GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS modified electrode at 0.3 V Inset: Calibration curve

复合膜中 GOD 对葡萄糖有强生物亲和力和高酶催化活性。

2.5 重现性、稳定性和抗干扰性

GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 电极搁置(4 °C 的冰箱)两星期,其响应电流仍保持 90%,表明该电极具有良好的稳定性. 将其放置于 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖 PBS 电解液 5 次平行测定,其相对标准偏差(RSD)为 2.8%. 同批 5 支酶电极在相同电解液平行检测的 RSD 为 3.9%,表明其重现性良好. 在 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 PBS 电解液加入 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸和 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿酸,结果表明,在恒电位 0.3 V 电位下检测,上述两种物质的存在不影响该电极的葡萄糖响应,其抗干扰性良好.

3 结 论

本文提出了一种基于 GOD/FMC-AFNPs/MWNTs/CS 膜修饰磁性玻碳基底用于葡萄糖高灵敏检测的新方法. 该复合物膜不仅为保持固定化酶的活性提供了生物微环境,且有效防止了媒介体 FMC 在电极表面的流失. 均匀分布于修饰层中的 MWNTs 可有效改善和提高修饰膜的导电性和有效比表面积,极大地提高了电极的检测灵敏度. 该电极的葡萄糖检测的线性范围为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $3.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,有望用于生物传感器和电子器件.

参考文献(References):

- [1] Kandimalla V B, Tripathi V S, Ju H X. A conductive ormosil encapsulated with ferrocene conjugate and multi-walled carbon nanotubes for biosensing application[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(7): 1167-1174.
- [2] Chen L, Gorski W. Bioinorganic composites for enzyme electrodes[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(13): 2862-2868.
- [3] Pandey P C, Upadhyay S, Tiwari I, et al. A novel ferrocene-encapsulated palladium-linked ormosil-based electrocatalytic biosensor. The role of the reactive functional group[J]. *Electroanalysis*, 2001, 13(18): 1519-1527.
- [4] Tsiafoulis C G, Florou A B, Trikalitis P N, et al. Electrochemical study of ferrocene intercalated vanadium pentoxide xerogel/polyvinyl alcohol composite films: Application in the development of amperometric biosensors[J]. *Electrochemistry Communications*, 2005, 7(7): 781-788.
- [5] Liang R P, Fan L X, Huang D M, et al. A Label-free amperometric immunosensor based on redox-active ferrocene-branched chitosan/multiwalled carbon nanotubes conductive composite and gold nanoparticles[J]. *Electroanalysis*, 2011, 23(3): 719-727.
- [6] Liu X Q, Shi L H, Niu W X, et al. Amperometric glucose biosensor based on single-walled carbon nanohorns [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23(12), 1887-1890.
- [7] Hu L Z, Han S, Liu Z Y, et al. A versatile strategy for electrochemical detection of hydrogen peroxide as well as related enzymes and substrates based on selective hydrogen peroxide-mediated boronate deprotection[J]. *Electrochemistry Communications*, 2011, 13(12): 1536-1538.
- [8] Lei J P, Ju H X. Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(6): 2122-2134.
- [9] Dumitrescu I, Unwin P R, Macpherson J V. Electrochemistry at carbon nanotubes: Perspectives and issues[J]. *Chemical Communications*, 2009, 46(45): 6886-6901.
- [10] Jacobs C B, Peairs M J, Venton B J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 662(2): 105-127.
- [11] Huang Y, Zhao S L, Liu Y M, et al. An amplified single-walled carbon nanotube-mediated chemiluminescence turn-on sensing platform for ultrasensitive DNA detection[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(75): 9400-9402.
- [12] Cruz J, Kawasaki M, Gorski W. Electrode coatings based on chitosan scaffolds[J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(4): 680-686.
- [13] Benesch J, Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(12): 2561-2568.
- [14] Liang R P, Fan L X, Wang R, et al. One-step electrochemically deposited nanocomposite film of CS-Fc/MWNTs/GOD for glucose biosensor application[J]. *Electroanalysis*, 2009, 21(15): 1685-1691.
- [15] Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media[J]. *IEEE Transactions on Magnetics*, 1981, 17(2): 1247-1248.
- [16] Peng H P, Qiu J D, Liang R P. Facile synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{Al}_2\text{O}_3$ core-shell nanoparticles and their application to the highly specific capture of heme proteins for direct electrochemistry[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(6): 3005-3011.
- [17] Yang C Q, Wang, G, Lu Z Y, et al. Effect of ultrasonic treatment on dispersibility of Fe_3O_4 nanoparticles and synthesis of multi-core $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ core/shell nanoparticles[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2005, 15(39): 781-788.

- 4252-4257.
- [18] Li J, Wang Y B, Qiu J D. Biocomposites of covalently linked glucose oxidase on carbon nanotubes for glucose biosensor[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 383(6): 918-922.
- [19] Kamin R A, Wilson G S. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer[J]. *Analytical Chemistry*, 1980, 52(8): 1198-1205.
- [20] Qiu J D, Peng H P, Liang R P, et al. Facile preparation of magnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanoparticle/myoglobin biofilm for direct electrochemistry[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(6): 1447-1453.
- [21] Wu B Y, Hou S H, Yin F, et al. Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(12): 2854-2860.

Design and Development of A Novel Glucose Biosensor Based on the Ferrocene-Functionalized Fe_3O_4 Nanoparticles/Carbon Nanotubes/Chitosan Nanocomposite Film Modified Electrode

PENG Hua-ping¹, ZHA Dai-jun², HUANG Zheng-jun, CHEN Wei¹, LIU Ai-lin^{1*}, LIN Xin-hua^{1*}

(1. *Department of Pharmaceutical Analysis of the Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China*; 2. *Institute for Advanced Study of Nanchang University, Nanchang 330031, China*)

Abstract: A novel platform for the fabrication of glucose biosensor was successfully constructed by entrapping glucose oxidase (GOD) in a ferrocene monocarboxylic acid-aminated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles conjugate (FMC-AFNPs)/chitosan (CS)/multiwall carbon nanotubes (MWNTs) nanocomposite. The formation of FMC-AFNPs could effectively prevent the leakage of ferrocene and retain its electrochemical activity. This GOD/FMC-AFNPs/CS/MWNTs matrix provided a biocompatible microenvironment for retaining the native activity of the immobilized GOD. Moreover, the presence of MWNTs enhanced the charge-transport properties of the composite and facilitated electron transfer between the GOD and the electrode for the electrocatalysis of glucose. Under the optimal conditions the designed biosensor to glucose exhibited a wide and useful linear range of 1.0×10^{-5} to $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with a low detection limit of $3.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$). The value of K_M^{app} was $5.03 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, indicating that the biosensor possesses higher biological affinity to glucose. Furthermore, the biosensor possesses satisfactory stability and good reproducibility.

Key words: ferrocene-modified Fe_3O_4 nanoparticles; carbon nanotubes; chitosan; glucose oxidase; biosensor