

测定葡萄糖的酶场效应管传感器

韩学海 沙宪政 霍纪文

(中国医科大学生物医学工程教研室, 沈阳)

将葡萄糖氧化酶(GOD)用聚丙烯酰胺包埋法固定化在氢离子敏感场效应管(H⁺-ISFET)栅极绝缘层表面,利用葡萄糖氧化酶催化葡萄糖的特异性就制成了对葡萄糖进行定量测定的酶-葡萄糖传感器。该传感器的测定范围为 $5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4}$ g/ml, 响应时间为 25s(动力学方法), 重复性误差小于 4%, 一个月内未发现传感器输出电压降低。

关键词 酶传感器; 离子敏感场效应管; 葡萄糖的测定; 固定化葡萄糖氧化酶

将酶固定化在高分子薄膜上, 该膜就可以对酶所催化的特定底物具有选择功能, 此种膜为生物传感器的开发奠定了基础。1962年Clark^[1]等首先提出了酶传感器方案, 接着1966年Updike和Hick^[2]报道了将葡萄糖氧化酶在聚丙烯酰胺凝胶中固定化, 并安装在Clark型氧电极上用来检测葡萄糖。其后, 据不同原理的各种酶传感器不断被研制出来。目前在生物传感器研究中, 以离子敏感场效应管和固定化酶技术相结合而成的酶场效应管(简称ENFET)发展较快。酶场效应管最早由Janata^[3]于1977年提出, 1980年制成了青霉素场效应管传感器, 以后陆续制出了测定葡萄糖^[4]、尿素^[5]、乙酰胆碱^[6]以及可同时测定葡萄糖和尿素的复合酶场效应管^[7]。应用离子敏感场效应管作电化学检测器件有很多优点。1. 由于场效应管自身就可实现高阻向低阻的转换, 这就避免了以往离子选择性电极电路因输入阻抗过高而易感应外来噪声的缺点并使测试电路简化。2. 因其制作采用集成电路制作技术, 可以实现传感器的超小型化, 这样既可以实现微量分析又能安装在注射针头中

插入生物体内进行连续观测。3. 可在同一硅片上集成多种传感器, 对样品内的不同成份同时进行定量分析。4. 响应时间短。目前医疗及食品、发酵等工业领域对传感器的要求是小型、灵敏、迅速、准确、可靠、多功能及智能化, 该传感器的研制为此展示了一个广阔前景。

传感器的制作

(一) ISFET的封装及特性测试

我们制作的葡萄糖传感器的电化学基础器件选用沈阳市半导体器件九厂生产的氢离子敏感场效应管芯片, 图1-a为芯片的平面图, 将芯片封装在外径2.5mm壁厚0.3mm的塑料管中, 并用环氧树脂密封, 见图1-b。

对封装后的氢离子敏感场效应管进行了特性测试。图2为该器件对pH的响应曲线, 这是在2ml 0.1mol/L的氢氧化钠溶液中逐渐滴加0.1mol/L的盐酸并用pHS-2型酸度计监测溶液pH变化, 用电压表

本文于1987年4月27日收到。

本研究为国家自然科学基金资助课题。

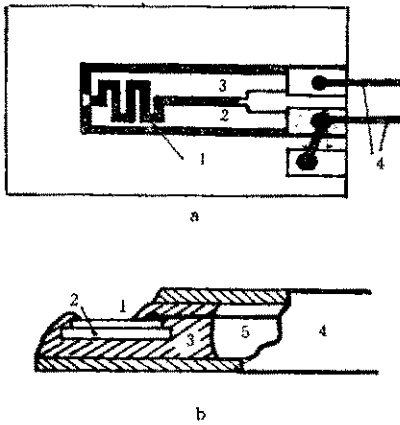


图1 氢离子敏感场效应管
Fig.1 H⁺-ISFET

a. 平面图 Plane figure

1. 栅极Gate 2. 源极Source 3. 漏极Drain
4. 引线Lead wire

b. 封装后的 H⁺-ISFET 剖面图

Section of enveloped H⁺-ISFET

1. ISFET 2. 陶瓷Ceramics 3. 树脂Resin
4. PVC管PVC tube 5. 引线Lead wire

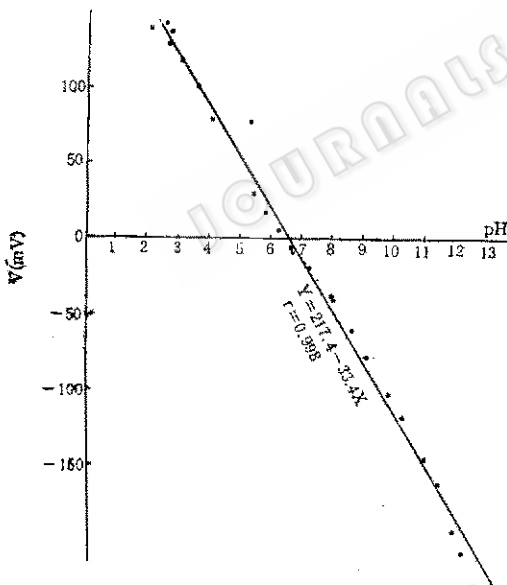


图2 H⁺-ISFET对pH的响应曲线
Fig.2 Response of H⁺-ISFET

测得输出电压变化作出的曲线。器件灵敏度为33.4mV/pH, 输出电压对pH的线性响应范围为3—12。此范围内的线性相关系数为0.998。器件的温漂特性是在0.025 mol/L pH6.86的标准磷酸盐缓冲液中,

通过改变溶液温度情况下测得的, 其中包括因温度改变引起的标准缓冲液pH值及能斯特斜率改变引起的输出电压变化, 但此变化与器件温漂相比很小, 可忽略。该器件温漂为1.1mV/°C。器件对钾、钠离子的选择性系数用固定干扰离子图解法^[8]得出 $K_{H^+/K^+} = 2 \times 10^{-4}$ $K_{H^+/Na^+} = 4 \times 10^{-4}$ 。该器件的响应时间(0—90%)小于1秒, 并且具有良好的重复性及稳定性。

(二) 固定化酶膜的制作

在氢离子敏感场效应管栅极上固定化酶之前, 为防止固定化酶膜从栅极氮化硅表面脱落, 用偶联剂A174(瑞典LKB公司产品)对栅极表面进行化学修饰。固定化酶方法如下, 首先将20mg的葡萄糖氧化酶(美国SIGMA公司产品G-6125来源; 曲霉菌)加到用pH5.6 0.1mol/L的磷酸盐缓冲液配制好的丙烯酰胺单体(MERCK; Art 10784)和N, N'-甲叉双丙烯酰胺(Fluka AG, CH-9470 Buchs)的混合溶液中搅拌均匀, 再加入聚合加速剂四甲基乙二胺(上海前进试剂厂)及催化剂过硫酸铵(分析纯), 迅速混匀并用注射器注到氢离子敏感场效应管栅极表面, 在氮气保护下进行聚合反应10min, 然后用0.1mol/L pH5.6的磷酸盐缓冲液适当冲洗, 并保持在同样的缓冲液中。

原 理

该传感器测量葡萄糖的原理为, 当栅极上有固定化葡萄糖氧化酶的场效应管放入葡萄糖溶液之后, 溶液中的氧分子及葡萄糖分子就不断向凝胶中扩散, 并被凝胶中的葡萄糖氧化酶催化生成葡萄糖酸内酯和过氧化氢, 葡萄糖酸内酯在溶液中可电离出氢离子, 氢离子可使溶液与栅极间的能斯特电位发生改变, 用场效应管即可测出电位的改变, 由此便可得知葡萄糖的

浓度。

测量结果及讨论

(一) 测量装置

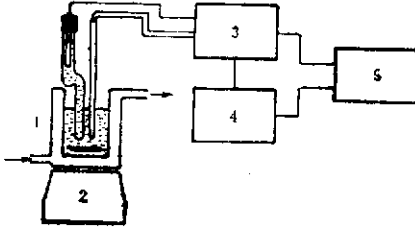


图 3 测量装置示意图

Fig.3 Schematic diagram of the detective arrangement

- 1. 恒温器 Thermostat 2. 磁力搅拌器 Magnetic stirrer 3. 放大器 Amplifier 4. 微分器 Differentiator 5. 记录仪 Recorder

测量时采用图 3 所示的装置。参比电极选用 232 型甘汞电极。将参比电极与葡萄糖氧化酶场效应管一起固定在自制的电极支架上，放入通有 30℃ 恒温水的夹层烧杯中，烧杯中加入 1mmol/L pH7 的磷酸盐缓冲液 2 ml，并用电磁搅拌器进行恒速搅拌。葡萄糖样品为用 1mmol/L pH 7 的磷酸缓冲液配制的 0.5mg/dL 的葡萄糖溶液。测量时用微量进样器每次注入 50μl 样品至烧杯中，用 X-Y 记录仪连续记录其输出电压及微分后的输出。计算葡萄糖浓度的方法有两种：1. 终点法或称平衡法，即等反应达到恒定时测得生成物浓度来推知反应物浓度。此法因需反应达到平衡时才能测出结果，故测量时间较长。2. 动力学方法或称反应速度法，即通过反应初速度计算出反应物浓度，通常是取反应曲线的初始直线部分斜率或是在反应曲线直线范围内相同时间间隔的输出信号变化。我们采用一微分器对输出信号直接进行微分的方法来达到动力学测量的目的，

$$U = K \cdot \frac{dU_o}{dt}$$

- U: 微分输出电压
- U_o: 输出电压
- K: 微分常数

由于反应初始时反应速度最大，所以采用微分的办法可明显缩短响应时间。图 4 是在 4mmol/L pH7 的磷酸盐缓冲液中加入 200μl 的 0.5mg/dL 样品后，用 X-Y 记录仪描记的直接输出波形和微分波形。在响应时间上稳态法需 4min(0—100%)，

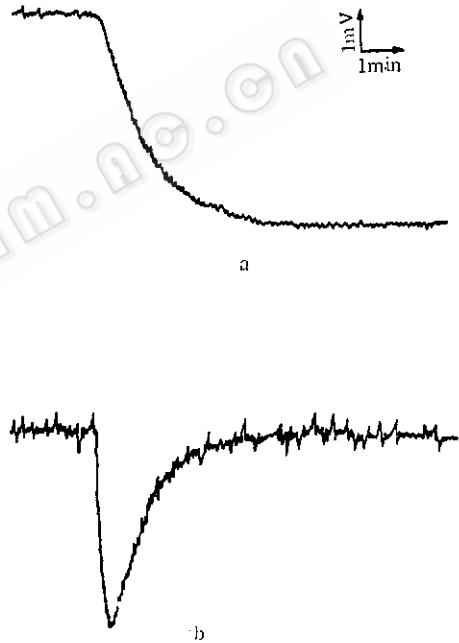


图 4 酶场效应管响应的典型曲线

Fig. 4 Typical response curves of the enzyme-FET
a. 稳态波形 Output curves of steady state
b. 微分波形 Output curves of differentiator

见图 4a，而动力学方法仅 25 s 即可到达峰值，比稳态法缩短响应时间约 10 倍。

(二) 标定曲线

图 5 为根据稳态法绘出的输出电压随葡萄糖浓度改变的标定曲线，该传感器在 0.5—20mg/dL 浓度范围内对葡萄糖具有良好的响应。

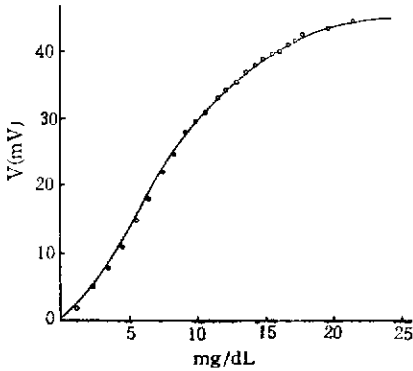


图5 测量葡萄糖浓度的标定曲线
Fig.5 Calibration curves of the enzyme glucose FET

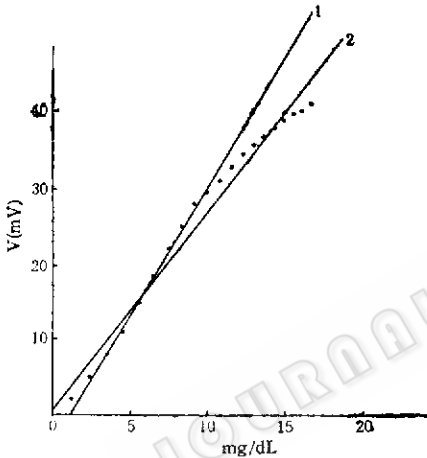


图6 标定曲线的回归分析
Fig.6 The regressive analysis of calibration curves

1. $n = 10, Y = -3.52 + 3.35X, r = 0.998$
2. $n = 20, Y = 0.81 + 2.61X, r = 0.988$

图6为对输出电压和葡萄糖浓度二者进行直线回归的结果,经取在0—17mg/dL浓度范围内的20点进行直线回归,相关系数为0.988,浓度每改变1个单位(1mg/dL)输出电压改变2.61mV。若对2—10mg/dL浓度范围内的10个点进行直线回归,相关系数为0.998,灵敏度为每单位浓度电压改变3.35mV。

(三) 重复性

用该传感器在尽量相同条件下,对同一浓度的葡萄糖(4ml缓冲液中加入200 μ l样品)重复测量10次,其结果分别为5.1、

4.9、5.0、4.8、5.0、5.0、4.8、4.7、4.9、4.9。统计结果为, $\bar{X} = 4.90, CV = 2.5\%, S_x = 0.125$,最大偏差为0.2,最大相对误差为4.1%。由于每一次测量时条件不会控制得绝对一致,所以此葡萄糖传感器的实际重复性将优于上述指标。

对葡萄糖传感器的寿命进行了如下考察,使用该传感器对浓度为22.5mg/dL的葡萄糖溶液每天测量一次,其余时间保存在10mmol/L pH5.6的磷酸盐缓冲液中,贮于冰箱内,温度保持在4 $^{\circ}$ C,在30天内并未发现输出电压的降低。使用过程中也未发现酶膜从栅极表面脱落下来的现象。

(四) 讨论

以上初步介绍了我们制作的酶-葡萄糖场效应管传感器的测量范围、灵敏度、响应时间及稳定性等,下面将初步探讨影响上述指标的各种因素。首先是响应时间,影响该传感器响应时间的主要因素是酶膜厚度。溶液中的分子、离子通过膜扩散到电极表面所需时间随着酶膜厚度的增加而加长,从而使传感器的响应时间加长。其次,搅拌速度对传感器的响应时间也有一定影响,有搅拌的响应时间与不带搅拌时相比明显缩短。因搅拌可使分子扩散速度加快,有利于进入膜内。另外,固定化酶膜活力的大小也会影响响应时间。为了提高传感器的使用寿命,应使酶在每一次测量中活力的损失愈小愈好,这就要求每一次的测量时间愈短愈好,因此动力学测量方法是重要的途径。动力学方法测量时比稳态法更要求温度恒定,因为温度改变直接影响反应速度。

传感器的灵敏度受缓冲液浓度的影响极大,图7是该传感器在两种不同浓度的磷酸盐缓冲液中输出电压随葡萄糖浓度变化的标定曲线。由图可见传感器灵敏度随缓冲液浓度的提高而减小,这是由于缓冲

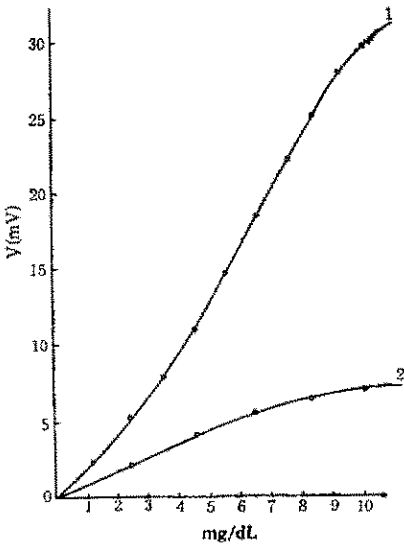


图 7 缓冲液浓度对传感器灵敏度的影响
Fig.7 Effect of buffer concentration on sensibility of sensor

1. 1 mmol/L 2. 5 mmol/L

液的缓冲能力随着浓度的提高而加强，从而使溶液中氢离子浓度的变化减小。反之，缓冲液浓度低，传感器灵敏度就提高。但传感器在缓冲液中的稳定性随缓冲液浓度的降低而变差，缓冲液的恰当选择是非常重要的。

结 语

该酶-葡萄糖场效应管传感器的研制为医学临床检验血液及尿中葡萄糖含量提供了一个新的途径。如正常人血糖值在80—120mg/dL,用我们制作的传感器进行测量时,需将血液用缓冲液稀释到传感器的标定曲线的线性范围内。血液稀释20倍后

的正常葡萄糖浓度范围变为2—6mg/dL。从以下几点看用该传感器进行血糖的测量是可能的。1.该传感器在2—10mg/dL范围内具有较高的线性相关系数；2.较好的测量重复性；3.基础电极（ISFET）良好的选择性；4.葡萄糖氧化酶催化葡萄糖的高度专一性。它与临床上使用的邻甲苯胺法相比具有操作简便、所需样品少、重复性好、测量时间短、不受血液中的非糖还原性物质的干扰等优点。但因血液成分很复杂,其中凡能引起pH改变的成分都将干扰输出结果。改进的办法是采用差动测量系统,即选用两支特性一致的氢离子敏感场效应管,一个在栅极上固定化葡萄糖氧化酶,而另一支无固定化酶,将两支场效应管接至差动放大器,干扰因素将由二传感器之差而被消除,使输出只对葡萄糖响应。

目前,在酶-场效应管的研制过程中需要解决的主要问题是如何在栅极上可控的形成固定化酶膜技术,并可以在微电子工艺中实现,只有这样才能提高传感器的一致性以便批量生产。另一个问题是参比电极,现在使用的参比电极仍然是甘汞电极或银-氯化银电极,这与全固态的小型离子敏感场效应管极不配套,因此小型的利用微电子工艺加工的全固态参比电极的研制已迫在眉睫。总之,要达到酶场效应管传感器的实用还有相当的距离,需要进一步改进且需要半导体技术和其它相关技术的密切配合。

参 考 文 献

- [1] Clark, L.C. and Lyon, C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102: 23, 1962.
- [2] Hicks, G. and Updike, S., *Anal. Chem.*, 38: 728, 1966.
- [3] Caras, S. and Janata, J., *Anal. Chem.*, 52: 1935, 1980.
- [4] Hanatato, Y. et al., *Proc. Int. Meeting on Chme sensor*, p. 513, 1983.
- [5] 宫原裕二, 他, *日本化学会志*, 6: 823, 1983.
- [6] Miyahara, Y. et al., *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 17: 501, 1983.
- [7] Miyahara, Y. et al., *Sensor and Actuators.*, 7: 1—10, 1985.

- [8] 黄德培等, 离子选择性电极, 科学出版社.
[9] Koryta, J., *Med & Biol. Appl of electrochem. Devices*, p.380, John Wiley & Sons, 1980.
[10] Guilbault, G., *Hand book of Enzymatic Analysis*, M. Dekker Inc, N.Y., 1977.

ENZYME FET SENSOR FOR DETECTION OF GLUCOSE

Han Xuehai Sha Xianzheng Huo Jiwen

(*Department of Biomedical Engineering, China University, Shenyang*)

The fabrication and characteristics of the glucose oxidase FET are described. First, the surface of Si_3N_4 is silanized by A-174. Then mixtures of acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide and glucose oxidase solutions were injected in the gate surface of H^+ -ISFET. After immobilization, an insoluble enzyme membrane was formed in the gate surface of H^+ -ISFET.

The detective range of the enzyme glucose FET is 5×10^{-8} — 2×10^{-4} g/ml and the response time is about 25 seconds (the kinetic procedure). The variation coefficient is less than 4%. The lifetime of the present enzyme FET is more 30 days.

Key words

Enzyme FET; glucose detection; immobilization of glucose oxidase