

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510134717.6

[51] Int. Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12N 11/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100359324C

[22] 申请日 2005.12.19

[21] 申请号 200510134717.6

[73] 专利权人 北京化工大学

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路 15
号

[72] 发明人 杨文胜 吴金玲 张 熊 段 雪

[56] 参考文献

EP0374915A2 1990.6.27

EP0603154A2 1994.6.22

CN1587067A 2005.3.2

US6214493B1 2001.4.10

Glucose Microbiosensor Based on MnO₂ and GlucoseOxidase Modified Carbon Fiber Microelectrode. Samo B. Hocevar et al. Electroanalysis, Vol. 16 No. 20. 2004

Low – potential amperometric determination of hydrogenperoxide with a caebon paste electrode modifiedwithnanostructured cryptomelane – type manganese oxides. Yuehe Lin et al. Electrochemistry Communication, Vol. 7 No. 2. 2005

氧化锰型固态 pH 电极的研制. 舒友琴,
袁道强. 分析测试技术与仪器, 第 6 卷第 2 期.
2000

审查员 陈永晖

[74] 专利代理机构 北京思海天达知识产权代理有限公司

代理人 何俊玲

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称

含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜
及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种含剥层二氧化锰的电化学生物传感器酶功能敏感膜及其制备方法。该敏感膜是由氧化酶、固定酶的高分子物质及剥层二氧化锰组成。利用剥层二氧化锰比表面积大、表面活性中心多、带有负电荷及具有良好导电性等特性，可以提高生物传感器的灵敏度、稳定性及抗干扰能力，从而提高生物传感器的综合性能指标。该敏感膜的制备方法是：将剥层二氧化锰的溶胶与氧化酶混合均匀，然后滴涂在洁净的玻碳电极表面，在室温下干燥后将其浸入到高分子凝胶中固定，室温下挥发掉溶剂，即在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的酶功能敏感膜。

1. 含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜，是由氧化酶、固定酶的高分子物质及剥层二氧化锰组成，其中氧化酶的含量是 $0.42\sim7.0\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ，剥层二氧化锰的含量 $0.14\sim14.2\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ，其余为固定酶的高分子物质；

所述氧化酶为辣根过氧化酶、细胞色素 C 中的任意一种；所述固定酶的高分子物质为聚乙烯醇缩丁醛、聚乙二醇、壳聚糖中的任意一种；剥层二氧化锰具有二维的片层结构，厚度为 $1\sim4\text{ nm}$ ，层板带有负电荷。

2. 含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜的制备方法：具体步骤如下：

A 剥层二氧化锰溶胶的制备

A-1. 按 OH^- 与 Mn^{2+} 摩尔比为 $3:1\sim4:1$ ， H_2O_2 与 Mn^{2+} 摩尔比为 $6:1\sim8:1$ ，将含有 $0.6\sim0.8\text{ mol/L}$ NaOH 和 $1.0\sim1.5\text{ mol/L}$ H_2O_2 的混和溶液快速加入到 $0.3\sim0.4\text{ mol/L}$ $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 的溶液中，剧烈搅拌反应 $20\sim30$ 分钟，过滤，将滤饼转移至聚四氟乙烯容器中，按 OH^- 与 MnO_2 摩尔比为 $2:1\sim4:1$ 且装满度 $\leq80\%$ 加入浓度为 $2\sim3\text{ mol/L}$ 的 NaOH 溶液，搅拌呈糊状，将聚四氟乙烯容器密封于水热釜中，在 $150\sim160\text{ }^\circ\text{C}$ 水热处理 $15\sim20$ 小时，将水热釜自然冷却至室温，开釜抽滤，用去离子水洗滤饼至滤液 pH 值为 $8\sim9$ ，将滤饼在 $70\sim80\text{ }^\circ\text{C}$ 空气气氛中干燥 $6\sim9$ 小时，得到层状二氧化锰；

A-2. 按照 H^+ 与层状二氧化锰摩尔比为 $10:1\sim15:1$ ，将上述层状二氧化锰固体粉末加入浓度为 $1.0\sim1.5\text{ mol/L}$ 的 HNO_3 溶液中，室温搅拌反应 3 天，其间每隔 24 小时更换一次新的 $1.0\sim1.5\text{ mol/L}$ HNO_3 溶液，将混合液抽滤，用去离子水洗涤至滤液 pH 值为 $6\sim7$ ，将滤饼在 $70\sim80\text{ }^\circ\text{C}$ 空气气氛中干燥 $6\sim9$ 小时，得到氢交换的二氧化锰；

A-3. 按四甲基氢氧化铵与二氧化锰摩尔比为 $2:1\sim4:1$ ，将上述氢交换的二氧化锰加入到质量分数为 $1.5\%\sim2.0\%$ 的四甲基氢氧化铵水溶液中，室温下搅拌反应 $7\sim10$ 天，将混合液在 $10000\sim12000$ 转数/分钟的转速下离心 $5\sim10$ 分钟上层溶胶即为剥层二氧化锰溶胶，调整浓度在 $0.1\sim2.0\text{ mg/mL}$ 范围备用；

B. 含剥层二氧化锰的酶功能敏感膜的制备

将浓度为 0.1~2.0 mg/mL 剥层二氧化锰溶胶与浓度为 1~10mg/mL 的氧化酶的二次蒸馏水溶液按体积比 1:1~2:1 的比例混合，然后置于 25 ± 1 °C 恒温摇床中，以 150~180 转数/分钟的速率混合 5~10 分钟直至混合均匀，将该混合液滴涂在洁净的玻碳电极表面，在室温下干燥后将其浸入到浓度为 0.5~5%(m/v)的高分子凝胶中保持 2~20 分钟，用二次蒸馏水冲洗掉固定不牢固的酶，室温放置 10~20 小时使溶剂全部挥发，在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的酶功能敏感膜；

步骤 B 所述氧化酶为辣根过氧化酶、细胞色素 C 中的一种，高分子凝胶分别是聚乙烯醇缩丁醛凝胶、聚乙二醇凝胶或壳聚糖凝胶。

3. 根据权利要求 2 所述的含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜的制备方法，其特征是辣根过氧化酶的活性为 100~330 U/mg；聚乙烯醇缩丁醛凝胶、聚乙二醇凝胶的溶剂为无水乙醇，壳聚糖凝胶的溶剂为含质量分数为 1% 的醋酸二次蒸馏水溶液。

含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜及其制备方法

技术领域：

本发明属于电化学生物传感器及其制备技术领域，特别是涉及一种含剥层二氧化锰的电化学生物传感器酶功能敏感膜及其制备方法。

背景技术：

电化学生物传感器具有性能稳定、选择性高、价格低廉、操作简便、易微型化等特点，已在临床诊断、工业控制、食品检测、药物分析、环境分析、生物芯片和军事领域等诸多方面得到广泛应用。其中利用生物活性物质与电极间的直接电化学行为（即直接电子传递）进行检测的第三代无试剂电化学生物传感器更是备受人们关注，是当前电化学生物传感器研究领域的热点。

但无试剂电化学生物传感器的灵敏度和应用范围尚存在一定的局限性，这主要是因为：(1) 缺少简便高效的方法对生物活性物质进行固定；(2) 大部分生物活性物质（如酶、细胞等）的活性中心在一定程度上被蛋白质所掩蔽，生物活性中心与电极之间的直接电子传递比较困难。

为了解决上述问题，人们将纳米材料引入电化学生物传感器生物敏感膜体系，利用纳米材料的比表面积大、表面活性中心多、吸附能力强等优异性质，提高生物敏感膜的响应灵敏度、稳定性及抗干扰能力等性能指标。到目前为止，被用于生物敏感膜的纳米材料包括纳米金属颗粒（Au、Ag、Cu 等）、纳米金属氧化物颗粒（ SiO_2 、 TiO_2 、 MnO_2 等）及纳米层状材料（蒙脱土、层状双羟基复合金属氧化物等）等。

在文献(1) *Analytical Biochemistry*, 2002, 307:110 中，Song-Qin Liu 等人研究了通过纳米金胶将辣根过氧化酶固定在碳糊电极上的生物电化学传感器，结果表明纳米金使生物活性中心与电极间更易发生电子转移，从而实现了辣根过氧化酶的直接电化学行为，增强了传感器的灵敏度、稳定性和再生性能。该传感器对 H_2O_2 的响应范围为 0~0.3 mmol/L，线性范围为 0.48~50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，当信噪比为 3 时，检测限为 0.21 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

在文献(2) *Electrochimica Acta*, 2004, 49:1981 中，Yan Zhang 等人研究了将辣根过氧化酶通过纳米 TiO_2 固定在热解石墨电极上的生物传感器，结果表明纳米

TiO₂ 固定的辣根过氧化酶在电极上有效地实现了直接电化学行为，增强了传感器的稳定性。该传感器对 H₂O₂ 的线性响应范围为 $7.5 \times 10^{-6} \sim 1.23 \times 10^{-4}$ mol/L, 信噪比为 3 时，检出限为 2.5 μM。

在文献(3) Electrochemistry Communications, 2004, 6:1169 中, Jing-Juan Xu 等人将纳米二氧化锰颗粒引入到壳聚糖修饰的葡萄糖传感器中, 研究发现纳米二氧化锰颗粒能够在壳聚糖膜中稳定存在, 并且能够消除抗坏血酸对葡萄糖传感器检测的干扰。当抗坏血酸与葡萄糖的浓度比为 1:10 时, 抗坏血酸的干扰误差小于 9%, 当抗坏血酸与葡萄糖的浓度比为 1:50 时, 抗坏血酸的干扰误差小于 3%。

发明内容:

本发明的目的在于将一种新型剥层二氧化锰纳米材料引入到生物传感器敏感膜中, 提供一种含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜及其制备方法。利用剥层二氧化锰比表面积大、表面活性中心多、带有负电荷及具有良好导电性等特性, 提高生物传感器的灵敏度、稳定性、抗干扰能力等, 从而提高生物传感器的综合性能指标。

本发明提供的含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜, 是由氧化酶、固定酶的高分子物质及剥层二氧化锰组成, 其中氧化酶的含量是 0.42~7.0 μg/mm², 剥层二氧化锰的含量 0.14~14.2 μg/mm², 其余为固定酶的高分子物质。上述氧化酶为辣根过氧化酶、细胞色素 C 中的任意一种; 固定酶的高分子物质为聚乙烯醇缩丁醛、聚乙二醇、壳聚糖中的任意一种; 剥层二氧化锰具有二维的片层结构, 厚度约为 1~4 nm, 层板带有负电荷。

本发明含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜的制备方法是:

A 剥层二氧化锰溶胶的制备

A-1. 按 OH⁻与 Mn²⁺摩尔比为 3:1~4:1, H₂O₂ 与 Mn²⁺摩尔比为 6:1~8:1, 将含有 0.6~0.8 mol/L NaOH 和 1.0~1.5 mol/L H₂O₂ 的混和溶液快速加入到 0.3~0.4 mol/L Mn(NO₃)₂ 的溶液中, 剧烈搅拌反应 20~30 分钟, 过滤, 将滤饼转移至聚四氟乙烯容器中, 按 OH⁻与 MnO₂ 摩尔比为 2:1~4:1 且装满度≤80% 加入浓度为 2~3 mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌呈糊状, 将聚四氟乙烯容器密封于水热釜中, 在 150~160 °C 水热处理 15~20 小时。将水热釜自然冷却至室温, 开釜

抽滤，用去离子水洗滤饼至滤液 pH 值为 8~9。将滤饼在 70~80 °C 空气气氛中干燥 6~9 小时，得到层状二氧化锰。

A-2. 按照 H⁺与层状二氧化锰摩尔比为 10:1~15:1，将上述层状二氧化锰固体粉末加入浓度为 1.0~1.5 mol/L 的 HNO₃ 溶液中，室温搅拌反应 3 天，其间每隔 24 小时更换一次新的 1.0~1.5 mol/L HNO₃ 溶液。将混合液抽滤，用去离子水洗涤至滤液 pH 值为 6~7，将滤饼在 70~80 °C 空气气氛中干燥 6~9 小时，得到氢交换的二氧化锰。

A-3. 按四甲基氢氧化铵与二氧化锰摩尔比为 2:1~4:1，将上述氢交换的二氧化锰加入到质量分数为 1.5%~2.0% 的四甲基氢氧化铵水溶液中，室温下搅拌反应 7~10 天，将混合液在 10000~12000 转数/分钟的转速下离心 5~10 分钟，上层溶胶即为剥层二氧化锰溶胶，调整浓度在 0.1~2.0 mg/mL 范围备用。

B. 含剥层二氧化锰的酶功能敏感膜的制备

将浓度为 0.1~2.0 mg/mL 剥层二氧化锰溶胶与浓度为 1~10 mg/mL 的氧化酶的二次蒸馏水溶液按体积比 1:1~2:1 的比例混合，然后置于 25 ± 1 °C 恒温摇床中，以 150~180 转数/分钟的速率混合 5~10 分钟直至混合均匀，将该混合液滴涂在洁净的玻碳电极表面，在室温下干燥后将其浸入到浓度为 0.5~5% (m/v) 的高分子凝胶中保持 2~20 分钟，用二次蒸馏水冲洗掉固定不牢固的酶，室温放置 10~20 小时使溶剂全部挥发，在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的酶功能敏感膜。

上述氧化酶为辣根过氧化酶、细胞色素 C 中的一种，其中辣根过氧化酶的活性为 100~330 U/mg；高分子凝胶分别是聚乙烯醇缩丁醛凝胶、聚乙二醇凝胶或壳聚糖凝胶，其中聚乙烯醇缩丁醛凝胶、聚乙二醇凝胶的溶剂为无水乙醇，壳聚糖凝胶的溶剂为含质量分数为 1% 的醋酸二次蒸馏水溶液。

采用日本日立 H-800 透射电镜(TEM)对水热反应方法制备的二氧化锰及剥层后的二氧化锰进行表征（如图 1 所示）。水热反应方法制备的二氧化锰为颗粒状，剥层后的二氧化锰为二维片层状，厚度约为 1~4 nm。

本发明的效果可以从用本发明含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜制作的生物传感器电极看出。将含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜修饰的玻碳电极作为工作电极，铂丝电极为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极，组成辣根过氧化酶生物传感器。将辣根过氧化酶生物传感器的三电极体系置于 pH 值

为 6~7.5 的磷酸盐缓冲，采用 CHI660B 电化学工作站对含剥层二氧化锰的生物传感器酶功能敏感膜修饰电极进行了电化学循环伏安表征（如图 2 所示），结果表明剥层二氧化锰的引入，有效地增强了辣根过氧化酶在电极上的直接电化学行为，为制备无试剂生物传感器奠定了基础。采用 i-t 法测试电极对 H₂O₂ 响应电流，由图 3 可以看出，含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜对过氧化氢的响应灵敏度较不含有剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜提高 2 倍以上，响应时间小于 5 秒，当信噪比为 3 时，检出限为 0.16 μmol/L；由图 4 可以看出，含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜对 H₂O₂ 的响应范围较宽，为 0~5 mmol/L，线性范围为 5×10⁻⁷~4.3×10⁻⁴ mol/L。

采用不同纳米材料固定辣根过氧化酶制备的敏感膜的式量电位 E^{0'}、检出限及线性范围等主要性能的对照见下表：

表 1. 不同纳米材料固定辣根过氧化酶制备的敏感膜的性能比较

酶膜	式量电位 E ^{0'} vs.Ag/AgCl (V)	检出限(μmol/L)	线性范围(M)
文献 1	-0.356	0.21	4.8×10 ⁻⁷ ~5.0×10 ⁻⁵
文献 2	-0.365	2.5	7.5×10 ⁻⁶ ~1.23×10 ⁻⁴
实施例 1	-0.32	0.16	5×10 ⁻⁷ ~4.3×10 ⁻⁴

由表 1 可以看出，采用本发明方法制备的含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜得到的辣根过氧化酶的式量电位更接近自由酶的式量电位，这说明剥层二氧化锰给酶提供了更加有利的微环境。在性能上，采用本发明方法制备的含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜，可以获得和引入纳米金胶所制备的敏感膜相当的性能，但本发明采用的剥层二氧化锰更加廉价，制备工艺简单。另外，剥层二氧化锰层板带有负电荷，与带正电荷的氧化酶之间有较强的静电作用力，可以提高酶功能敏感膜的稳定性，剥层二氧化锰的存在还可以大幅度减小抗坏血酸等底物的干扰，抗干扰性能也明显提高（参见实施例 1）。

附图说明：

图 1. 水热法合成二氧化锰和剥层二氧化锰的透射电镜(TEM)图

图 1A—水热法合成的层状二氧化锰的 TEM 图

图 1B—剥层二氧化锰的 TEM 图

图 2. 辣根过氧化酶在含剥层二氧化锰的敏感膜修饰的玻碳电极上的直接电化学行为 CV 图

横坐标—电压 E (单位: V, 参比电极为 Ag/AgCl)

纵坐标—电流 i (单位: μ A)

图 2a—剥层二氧化锰 + 辣根过氧化酶修饰电极的 CV 曲线

图 2b—辣根过氧化酶修饰电极的 CV 曲线

图 2c—剥层二氧化锰修饰电极的 CV 曲线

图 3. 含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜修饰电极和不含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜修饰电极的 i-t 曲线

横坐标—时间 t (单位: 秒)

纵坐标—响应电流 i (单位: μ A)

图 3a—剥层二氧化锰 + 辣根过氧化酶修饰电极对 10^{-5} mol/L H_2O_2 的 i-t 响应

图 3b—辣根过氧化酶修饰电极对 10^{-5} mol/L H_2O_2 的 i-t 响应

图 4. H_2O_2 浓度与含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜修饰电极响应电流的关系曲线

横坐标—过氧化氢的浓度 c (单位: mol/L)

纵坐标—响应电流 i (单位: μ A)

具体实施方式:

实施例 1

A 制备剥层二氧化锰溶胶

A-1. 将 200 mL 含有 0.6 mol/L NaOH 和 1.2 mol/L H_2O_2 的混和溶液快速加到 100 mL 含有 0.3 mol/L $Mn(NO_3)_2$ 的溶液中, 剧烈搅拌反应 20 分钟, 过滤, 将滤饼转移至聚四氟乙烯杯中, 加入 30mL 浓度为 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌呈浆糊状, 将聚四氟乙烯杯密封于水热釜中, 在 150°C 水热处理 20 小时。将水热釜自然冷却至室温, 开釜抽滤, 用去离子水洗滤饼至滤液 pH 值为 8。将滤饼在 70 °C 空气气氛中干燥 9 小时, 得到层状二氧化锰。

A-2. 将 2.6 g 上述层状二氧化锰固体粉末加入到 300 mL 浓度为 1 mol/L 的 HNO_3 溶液中, 室温搅拌反应 3 天, 其间每隔 24 小时更换一次新的 1 mol/L HNO_3

溶液。将混合液抽滤，用去离子水洗涤至滤液 pH 值为 6，将滤饼在 70 °C 空气气氛中干燥 9 小时，得到氢交换二氧化锰。

A-3. 量取 12 mL 质量分数为 25% 的四甲基氢氧化铵，溶解于 200 mL 去离子水中，称取 1.4 g 氢交换二氧化锰分散在上述四甲基氢氧化铵水溶液中，室温下搅拌反应 7 天。将混合液在 10000 转数/分钟的转速下离心 10 分钟，上层溶胶即为剥层二氧化锰溶胶，调整浓度在 0.15 mg/mL 备用。

B 制备含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜

将浓度为 0.15 mg/mL 剥层二氧化锰溶胶 10 μL 与浓度为 10 mg/mL 活性为 250 U/mg 的辣根过氧化酶 10 μL 混合，将混合液置于 25±1 °C 恒温摇床中，以 180 转数/分钟速率分散 5 分钟，得到混合均匀的混合液。分散好的混合液滴加在表面洁净的玻碳电极表面。待其在室温下自然晾干后，再将电极置于浓度为 2 % (m/v) 的聚乙烯醇缩丁醛无水乙醇溶液中 5 分钟。取出用二次蒸馏水冲洗掉固定不牢固的酶，室温放置 10 小时挥发掉溶剂，在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜，然后将修饰好的电极保存在 4 °C 下磷酸缓冲液中备用。

以修饰玻碳电极为工作电极，铂丝为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极，实验温度为 30±1 °C，测试体系为 pH = 6.5 的磷酸缓冲液。用循环伏安法表征，发现剥层二氧化锰有效地提高了辣根过氧化酶在电极上的直接电化学行为（见图 2 所示）；i-t 法检测电极对底物 H₂O₂ 的响应，该生物传感器的平衡时间在 6 分钟以内，响应时间小于 5 秒，响应灵敏度提高 2 倍以上（如图 3 所示），线形范围为 5×10⁻⁷ ~ 4.3×10⁻⁴ mol/L（如图 4 所示），当信噪比为 3 时，检出限为 0.16 μmol/L；该电极稳定性保持 1 个月以上；当过氧化氢与抗坏血酸的浓度比为 1:1 时，干扰误差小于 9%。

实施例 2

A 制备剥层二氧化锰溶胶

A-1. 将 200 mL 含有 0.8 mol/L NaOH 和 1.2 mol/L H₂O₂ 的混和溶液快速加到 100 mL 含有 0.4 mol/L Mn(NO₃)₂ 的溶液中，剧烈搅拌反应 30 分钟，过滤，将滤饼转移至聚四氟乙烯杯中，加入 50 mL 浓度为 3 mol/L 的 NaOH 溶液，搅拌呈浆糊状，将聚四氟乙烯杯密封于水热釜中，在 160 °C 水热处理 15 小时。将水

热釜自然冷却至室温，开釜抽滤，用去离子水洗滤饼至滤液 pH 值为 9。将滤饼在 80 °C 空气气氛中干燥 6 小时，得到层状二氧化锰。

A-2. 将 2.5 g 上述层状二氧化锰固体粉末加入到 280 mL 浓度为 1.5 mol/L 的 HNO₃ 溶液中，室温搅拌反应 4 天，其间每隔 24 小时更换一次新的 1.5 mol/L HNO₃ 溶液。将混合液抽滤，用去离子水洗涤至滤液 pH 值为 7，将滤饼在 80 °C 空气气氛中干燥 6 小时，得到氢交换二氧化锰。

A-3. 量取 18 mL 质量分数为 25% 的四甲基氢氧化铵，溶解于 200 mL 去离子水中，称取 1.1 g 氢交换二氧化锰分散在上述四甲基氢氧化铵水溶液中，室温下搅拌反应 10 天。将混合液在 12000 转数/分钟的转速下离心 5 分钟，上层溶胶即为剥层二氧化锰溶胶，调整浓度为 2.0 mg/mL 备用。

B 制备含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜

将浓度为 2.0 mg/mL 的剥层二氧化锰溶胶 50 μL 与浓度为 5 mg/mL 活性为 330 U/mg 的辣根过氧化酶 40 μL 混合，将混合液置于 25±1 °C 恒温摇床中，以 150 转数/分钟速率分散 10 分钟，得到混合均匀的混合液。分散好的混合液滴加在表面洁净的玻碳电极表面。待其在室温下自然晾干后，再将电极置于浓度为 1 % (m/v) 壳聚糖水溶液中 10 分钟。取出用二次蒸馏水冲洗掉固定不牢固的酶，室温放置 20 小时挥发掉溶剂，在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜，然后将修饰好的电极保存在 4 °C 下磷酸缓冲液中备用。

以修饰玻碳电极为工作电极，铂丝为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极，实验温度为 30±1 °C，测试体系为 pH = 7.5 的磷酸缓冲液。用 i-t 法检测电极对底物 H₂O₂ 的响应电流，该生物传感器的平衡时间在 6 分钟以内，响应时间小于 5 秒，线性范围为 6.5×10^{-6} ~ 3.3×10^{-4} mol/L，当信噪比为 3 时，检出限为 0.8 μmol/L；稳定性保持 2 个月以上；当过氧化氢与抗坏血酸的浓度比为 10:1 时，干扰误差小于 5%。

实施例 3

A 制备剥层二氧化锰溶胶

A-1. 将 200 mL 含有 0.6 mol/L NaOH 和 1.5 mol/L H₂O₂ 的混和溶液快速加到 100 mL 含有 0.4 mol/L Mn(NO₃)₂ 的溶液中，剧烈搅拌反应 30 分钟，过滤，将滤饼转移至聚四氟乙烯杯中，加入 40 mL 浓度为 3 mol/L 的 NaOH 溶液，搅拌

呈浆糊状，将聚四氟乙烯杯密封于水热釜中，在160 °C水热处理18小时。将水热釜自然冷却至室温，开釜抽滤，用去离子水洗滤饼至滤液pH值为8。将滤饼在80 °C空气气氛中干燥8小时，得到层状二氧化锰。

A-2. 将2.5 g上述层状二氧化锰固体粉末加入到300 mL浓度为1.2 mol/L的HNO₃溶液中，室温搅拌反应4天，其间每隔24小时更换一次新的1.2 mol/L HNO₃溶液。将混合液抽滤，用去离子水洗涤至滤液pH值为6，将滤饼在70 °C空气气氛中干燥7小时，得到氢交换二氧化锰。

A-3. 量取16 mL质量分数为25%的四甲基氢氧化铵，溶解于200 mL去离子水中，称取1.2 g氢交换二氧化锰分散在上述四甲基氢氧化铵水溶液中，室温下搅拌反应9天。将混合液在12000转数/分钟的转速下离心6分钟，上层溶胶即为剥层二氧化锰溶胶，调整浓度为0.5 mg/mL备用。

B. 制备含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜

将浓度为0.5 mg/mL剥层二氧化锰胶100 μL与浓度为10 mg/mL活性为100 U/mg的辣根过氧化酶50 μL混合，将混合液置于25±1 °C恒温摇床中，以180转数/分钟速率分散10分钟，得到混合均匀的混合液。将分散好的混合液滴加在表面洁净的玻碳电极表面。待其在室温下自然晾干后，再将电极置于浓度为5 % (m/v)聚乙二醇无水乙醇溶液中15分钟，用二次蒸馏水冲洗掉固定不牢固的酶，室温放置15小时挥发掉溶剂，在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的辣根过氧化酶敏感膜，然后将修饰好的电极保存在4 °C下磷酸缓冲液中备用。

以修饰玻碳电极为工作电极，铂丝为对电极，Ag/AgCl电极作为参比电极，实验温度为30±1 °C，测试体系为pH=6.0的磷酸缓冲液。i-t法检测电极对底物H₂O₂的响应，该生物传感器的平衡时间在6分钟以内，响应时间小于5秒，线性范围为8.5×10⁻⁷~4×10⁻⁴ mol/L；当信噪比为3时，检出限为0.42 μmol/L，该电极稳定性保持1个月以上；当过氧化氢与抗坏血酸的浓度比为1:1时，干扰误差小于9%。

实施例4

A 制备剥层二氧化锰溶胶

A-1. 将200 mL含有0.6 mol/L NaOH和1.0 mol/L H₂O₂的混和溶液快速加到100 mL含有0.3 mol/L Mn(NO₃)₂的溶液中，剧烈搅拌反应20分钟，过滤，将

滤饼转移至聚四氟乙烯杯中，加入 40 mL 浓度为 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液，搅拌呈浆糊状，将聚四氟乙烯杯密封于水热釜中，在 150 °C 水热处理 16 小时。将水热釜自然冷却至室温，开釜抽滤，用去离子水洗滤饼至滤液 pH 值为 9。将滤饼在 80 °C 空气气氛中干燥 7 小时，得到层状二氧化锰。

A-2. 将 2.5 g 上述层状二氧化锰固体粉末加入到 200 mL 浓度为 1.5 mol/L 的 HNO₃ 溶液中，室温搅拌反应 3 天，其间每隔 24 小时更换一次新的 1.5 mol/L HNO₃ 溶液。将混合液抽滤，用去离子水洗涤至滤液 pH 值为 6，将滤饼在 80 °C 空气气氛中干燥 8 小时，得到氢交换二氧化锰。

A-3. 量取 20 mL 质量分数为 25% 的四甲基氢氧化铵，溶解于 250 mL 去离子水中，称取 2.0 g 氢交换二氧化锰分散在上述四甲基氢氧化铵水溶液中，室温下搅拌反应 8 天。将混合液在 11000 转数/分钟的转速下离心 8 分钟，上层溶胶即为剥层二氧化锰溶胶，调整浓度为 0.8 mg/mL 备用。

B 制备含剥层二氧化锰的细胞色素 C 敏感膜

将浓度为 0.8 mg/mL 的剥层二氧化锰溶胶 60 μL 与浓度为 1 mg/mL 的细胞色素 C 40 μL 混合，将混合液置于 25±1 °C 恒温摇床中，以 180 转数/分钟分散 6 分钟，得到混合均匀的混合液。将分散好的混合液滴加在表面洁净的玻碳电极表面。待其在室温下自然晾干后，再将电极置于浓度为 1% (m/v) 的壳聚糖水溶液中 20 分钟，用二次蒸馏水冲洗掉固定不牢固的细胞色素 C，室温放置 15 小时挥发掉溶剂，在玻碳电极表面形成一层含剥层二氧化锰的细胞色素 C 敏感膜，然后将修饰好的电极在 4 °C 下干态保存备用。

以修饰玻碳电极为工作电极，铂丝为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极，实验温度为 30±1 °C，测试体系为 pH = 7.0 的磷酸缓冲液。用 i-t 法检测工作电极对底物 H₂O₂ 的响应电流，该生物传感器的平衡时间在 6 分钟以内，响应时间小 5 秒，稳定性保持 2 个月以上。

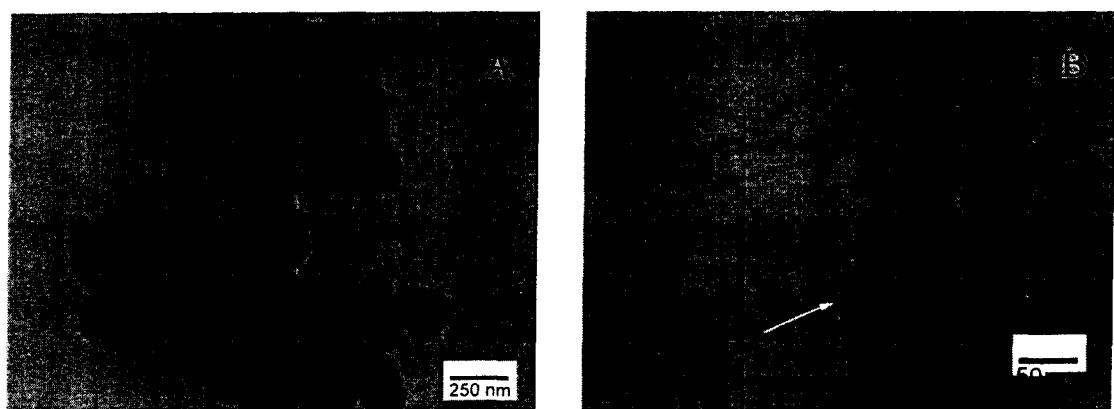


图 1

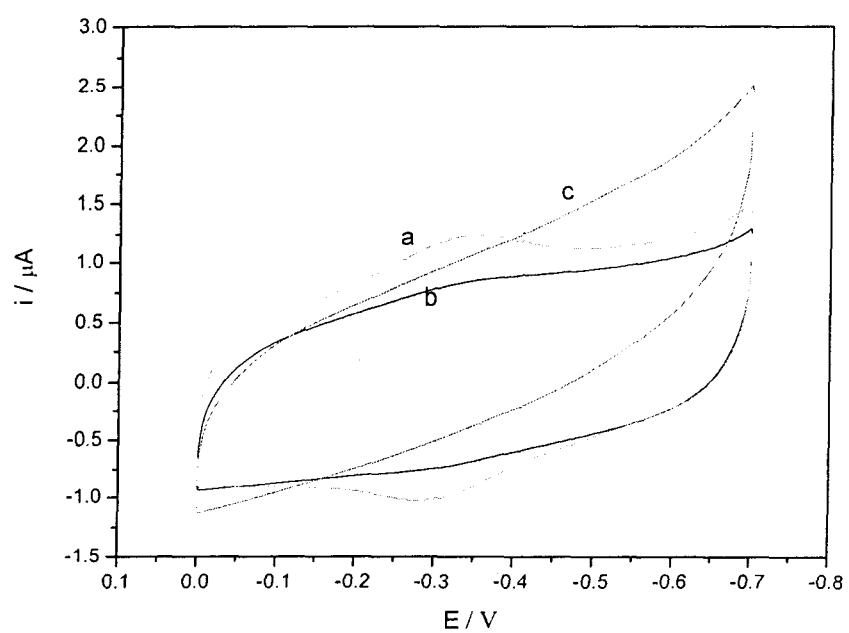


图 2

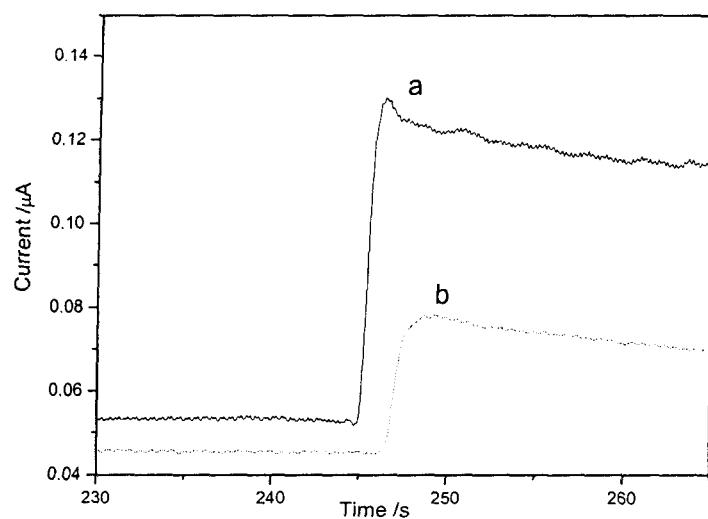


图 3

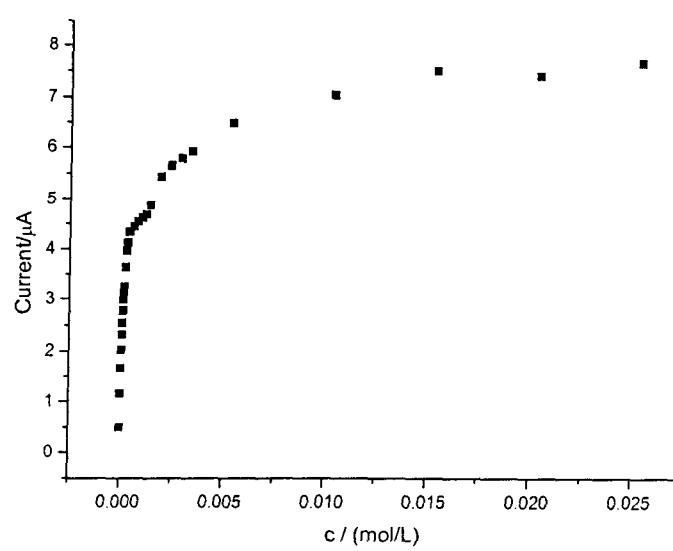


图 4