

Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase/Ordered Mesoporous Carbon Composite Material

Yue Tang, Qinghe Wei, Yujia Liang, Yan Ji, Bin Qi*

Faculty of Chemistry, Northeast Normal University, Changchun Jilin
Email: qib219@nenu.edu.cn

Received: Jun. 22nd, 2015; accepted: Jul. 10th, 2015; published: Jul. 16th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Glucose oxidase (GOD) was adsorbed on the surface of OMC modified glassy carbon electrode (GOD/OMC/GCE). Then ferrocene was assembled on the GOD/OMC/GCE platform to construct an amperometric glucose biosensor. The results showed that the Fc/GOD/OMC nanocomposite exhibits a remarkably improved catalytic activity towards the oxidation of glucose. The biosensor exhibited a wide linear response up to 10 mM with a low detection limit of $1.03 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($S/N = 3$). The selectivity and stability of the biosensor were also investigated.

Keywords

Ordered Mesoporous Carbon, GOD, Glucose, Biosensors

基于葡萄糖氧化酶/介孔碳复合材料的葡萄糖生物传感器

唐悦, 魏倾鹤, 梁羽佳, 吉艳, 齐斌*

东北师范大学化学学院, 吉林 长春
Email: qib219@nenu.edu.cn

*通讯作者。

收稿日期：2015年6月22日；录用日期：2015年7月10日；发布日期：2015年7月16日

摘要

我们采用浸渍法将GOD吸附在有序介孔碳修饰的电极表面(GOD/OMC/GCE)，然后又在其表面覆盖了一层二茂铁丙酮溶液，最终成功构建了一种新的电流型葡萄糖生物传感器。结果表明，该修饰电极Fc/GOD/OMC/GCE对葡萄糖有很好的电催化活性，对葡萄糖的检测线性范围为5.00 μM ~10.00 mM；检出限为1.03 \pm 0.15 μM (信噪比为3)。同时对该修饰电极的选择性与稳定性也做了讨论。

关键词

有序介孔碳，葡萄糖氧化酶，葡萄糖，生物传感器

1. 引言

葡萄糖[1]是构成人体最基本的化学物质之一。是为有机体提供能量的原料。基于葡萄糖氧化酶的生物传感器在食品工业、生物医学、生化工业上均有重要的用途。早在1962年，Clark和Lyons [2]就提出了葡萄糖生物传感器的原理：当葡萄糖还原以后，还原态葡萄糖氧化酶的氧化还原活性中心在酶分子内部，受蛋白质的包围，不易直接与常规电极交换电子，因而得不到直接可测量的电信号。因此人们常根据此反应过程中氧气的消耗量或者生成物 H_2O_2 的生成量间接测定葡萄糖的含量。但是，该方法中由于大气中氧分压的变化会导致溶液中溶解氧浓度的变化，从而影响测定的准确性；而在传统的固体电极上， H_2O_2 氧化需要很高的过电位(>0.6 V vs. Ag/AgCl)。在如此高的电位下进行氧化测定，试样中共存的其它电活性物质，如：抗坏血酸和尿酸等，也可以在此电位下氧化而产生氧化电流，给测定带来干扰，因此该方法的灵敏度和选择性相对较差。因此，近年来基于媒介体电极的葡萄糖生物传感器得到广泛的重视[3]-[6]。

二茂铁(Ferrocene，以下简称Fc)及其衍生物[7]-[10]是一类富电子体系，具有氧化还原可逆性、芳香性、低毒性、疏水性等特点，其修饰电极膜中有氧化还原中心，因此在电位扫描过程中能发生氧化或还原反应，促进电子的转移速率。张校刚[10]等人用分子自组装技术在金电极表面形成二茂铁乙烯基吡啶疏醇单分子膜。经过分子自组装法制得的二茂铁及其衍生物修饰电极，表面结构高度有序，稳定性好。李亚卓[11]等人将聚烯丙胺基二茂铁与聚苯乙烯磺酸盐生成的离子配合物用乙醇溶解后掺杂到溶胶-凝胶中，将此溶液滴涂在玻碳电极表面。Koide等人[12]通过羧基二茂铁上的羧基与凝胶聚烯丙胺上的氨基反应制成高分子媒介体，然后以共价键连到葡萄糖氧化酶上，得到介质改良的酶电极。Gass等人[13]通过媒介体吸附的方法制备了二茂铁媒介的葡萄糖氧化酶电极所以它们具有非常好的电化学活性和电催化功能，广泛地应用于电化学和生物传感器的制备。

有序介孔碳自1999年[14]首次被合成出来以来，由于其一系列独特的性质[14]-[16]，如巨大的比表面积、狭窄的孔径分布、维度有序等等，已经引起了科学工作者极大的兴趣。介孔碳能提高电子传递速率，人们利用有序介孔碳修饰电极已经成功地检测了许多生物分子，如：NADH、抗坏血酸、多巴胺、过氧化氢等[17]-[22]。

在本论文中，我们利用有序介孔碳的高比表面积，采用浸渍法将葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase，简称GOD)吸附固定在有序介孔碳修饰电极表面，然后利用Nafion溶液将媒介体二茂铁修饰到介孔碳电极表面，便制得了一种新的电流型葡萄糖生物传感器，并详细研究了它的性能。

2. 实验部分

2.1. 试剂与仪器

葡萄糖氧化酶(GOD, E.C. 1.1.3.4, 151 U/mg, 来源于黑曲霉)购于美国 Sigma 公司。有序介孔碳(OMC)由本实验室提供。 β -D-葡萄糖, 抗坏血酸(AA), 尿酸(UA), 多巴胺(DA)均购于 Sigma 公司。二茂铁购于北京化学试剂厂。 β -D-葡萄糖储备溶液使用前需要在 4 °C 环境中放置 24 小时, 使其达到变旋平衡后再使用。其他试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。整个实验均在室温下进行。有序介孔碳(OMC)由本实验室自己合成[14] [23]。

电化学实验采用 CHI660C 型电化学工作站(上海辰华仪器公司); 标准三电极体系: Fc/GOD/OMC 修饰的玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl (3 M KCl)为参比电极, 铂丝为对电极。X 射线粉末衍射数据在 Siemens D5005 衍射仪上收集。氮气吸附/脱附于液氮温度下(77 K)在美国 ASAP 2010 分析仪上测得。透射电镜(TEM)照片在日本 JEOL JEM2011 型高分辨透射电镜于 200 kV 下获得。拉曼光谱在英国 Renishaw-1000 型拉曼光谱仪上收集。

2.2. 修饰电极的制备

将玻碳电极分别在湿润的金相砂纸和 α -Al₂O₃ 抛光成镜面, 二次蒸馏水超声清洗, 经铁氰化钾溶液校准, 在丙酮和二次水中各超声 3 min 后备用。将一定量有序介孔碳超声分散在 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 制得 0.5 mg/mL 的 OMC 分散液。用微量注射器取 5 μ L 此分散液修饰于处理好的玻碳电极表面, 用红外灯烘干约 15 min, 得到有序介孔碳修饰电极(OMC/GCE)。

制备 10 mg/mL 的 GOD Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 溶液(0.1 M, pH 7.0)。将 OMC/GCE 电极于 4 °C 环境中在上述 GOD 溶液中浸泡约 20 h 后, 取出, 然后在其表面滴加 2 μ L 0.5% Nafion 溶液, 自然晾干, 最后在修饰电极表面滴涂 5 μ L 0.05 mol/L 的二茂铁的丙酮溶液, 利用 Nafion 与二茂铁之间的静电吸附作用将二茂铁修饰到电极上。待电极自然晾干后便得到了包含 GOD 的有序介孔碳修饰电极。本文中我们用 Fc/GOD/OMC/GCE 来表示该修饰电极。

3. 结果与讨论

3.1. 有序介孔碳的表征

我们采用 X 射线粉末衍射法、氮气等温吸附法、拉曼光谱测定法以及透射电镜等手段对合成的有序介孔碳 OMC 进行一系列表征。

如图 1(a)所示为有序介孔碳的 X 射线粉末衍射图。从图中我们可以看到, 在(100)、(110)和(220)面上有三个较强的布拉格衍射峰, 表明有序介孔碳的碳孔道为长程高度有序的六方形介观结构。并且通过与 SBA-15 的 XRD 衍射图相比较, 可知制备的 OMC 仍然保持了类似 SBA-15 的典型六方孔道结构。这是因为在 OMC 的合成过程中, 碳化和去模板以后, 介孔碳结构与原来的 SBA-15 模板是完全对称的, 就好像被复制了一样。这一点与第一章中的理论是相符合的。

图 1(b)所示为 OMC 与 SBA-15 的氮气等温吸附 - 脱附曲线。比表面积 BET 和孔体积 BJH 分别根据 Barrett-Emmett-Tellter 公式和 Barrett-Joyner-Halanda 模型由吸附曲线计算得到。其中 BET 比表面积是由相对压力在 0.04 到 0.3 之间的吸附数据计算得到。而总孔容 V_t 是由相对压力在 0~3 的总吸附量求得。经过计算, OMC 的 BET 面积 900 m²/g, 孔径 4.5 nm, 孔体积 1.29 cm³/g。因而可以预计其含有更多的表面活性位可以吸附蛋白质分子, 有利于提高吸附量。而 SBA-15 的 BET 面积 607 m²/g, 孔径 5.4 nm, 孔体积 0.96 cm³/g。

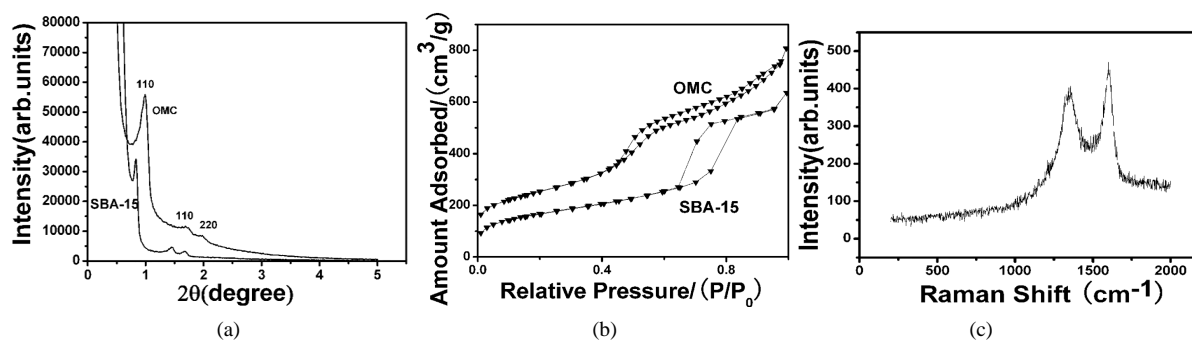


Figure 1. (a) X-ray powder diffraction patterns of CMK-3 and SBA-15; (b) N₂ adsorption-desorption isotherm for CMK-3 and SBA-15; (c) Raman spectra for CMK-3

图 1. (a) CMK-3 和 SBA-15 的 X 射线粉末衍射图; (b) CMK-3 和 SBA-15 的氮气等温吸附图; (c) CMK-3 的拉曼光谱图

图 1(c) 为有序介孔碳的拉曼光谱图。从中我们可以看出它们均具有两峰。位置在 1680 cm^{-1} 左右的是 G 峰，在 1357 cm^{-1} 左右的是 D 峰，D 键与 G 键的相对强度比值 (ID/IG) 与石墨碳层内的缺陷点位的数量成正比[24]。经计算可知 OMC 的拉曼光谱比值约为 0.903。根据文献[25] [26] 可知在 OMC 表面有很多的缺陷。

图 2 是有序介孔碳材料的 TEM 图。从 TEM 照片图中可以看出，有序介孔碳呈现出有序的纳米棒阵列结构。根据图中标尺，可估算其孔径在 5 nm 左右，为典型的有序介孔结构，这与 XRD 测试结果吻合。由第二章扫描电镜 (SEM) 图片显示，在有序介孔碳材料薄膜中有许多裂缝，这使得其孔道开放性提高，可能更加有利于生物分子在薄膜中的扩散和传输。这些结构特征使有序介孔碳材料薄膜可以有效地固定葡萄糖氧化酶等生物分子。

3.2. OMC/GCE 的电化学行为

在本文中采用 5 mmol/L 的铁氰化钾溶液作为氧化还原体系，在 20 mV/s 的扫描速度下分别得到了 OMC/GCE 和裸 GCE 的循环伏安图 (如图 3)。通过 Randles-Sevcik equation 方程可知， $I_p = 2.69 \times 10^{-5} A D_1 / 2n^3/2v_1/2c$ ， n 是氧化还原反应过程中参与的电子数， A 是电活性表面区域的面积 (cm^2)， D 是粒子在溶液中的扩散系数 (cm^2/s)。根据上述方程计算得到，OMC/GC 电极的电活性面积的平均值为 0.108 cm^2 ，而裸 GCE 电极的电活性面积约为 0.076 cm^2 。表面经过有序介孔碳修饰后的电极具有较高的电活性面积，再加上它本身又具有大的比表面积，因此可以有效吸附 GOD 分子。

3.3. Fc/GOD/OMC/GCE 的电化学行为

由于 Nafion 独特的离子交换和生物兼容性，被广泛用作修饰电极和构建电化学传感器的材料[27] [28]。因此我们在葡萄糖氧化酶与二茂铁中间覆盖了一薄层 Nafion 溶液，一方面可以防止葡萄糖氧化酶在电极表面的脱落，另一方面由于 Nafion 分子中含有负电荷的 $-\text{SO}_3$ 基团，是一种含电离基团的全氟化聚合物，根据静电作用原理，会吸引带正电荷的铁离子，因此可以更好地将二茂铁修饰到电极表面上来，并且 Nafion 膜性质稳定。在这里 Nafion 薄层相当于起着“导线”的作用，加速电子的转移。图 4 所示为 Fc/GOD/OMC/GCE 电极在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液 (0.1 M , $\text{pH } 7.0$) 的循环伏安图。

从图 4 上我们可以清楚地观察到两对明显的氧化还原峰。在 -0.45 V 和 -0.54 V 处出现了一对可逆的氧化还原峰，根据文献我们认为这是由 GOD 产生的峰。而 $+0.3\text{ V}$ 左右出现的这对则是二茂铁在修饰电极表面产生的氧化还原峰。图 4 说明葡萄糖氧化酶和二茂铁已经成功地固定在了 OMC/GCE 表面。

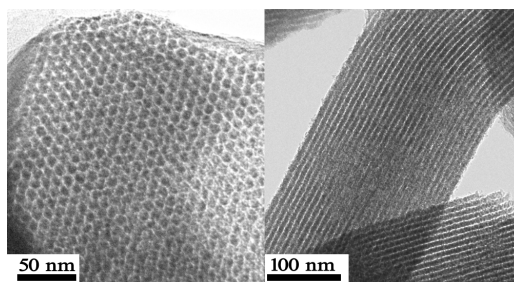


Figure 2. The TEM image of CMK-3
图 2. CMK-3 的透射电镜扫描图

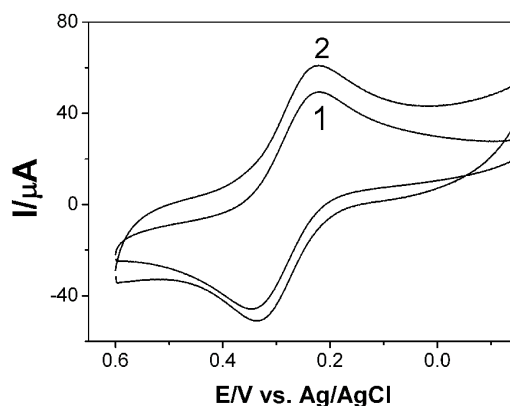


Figure 3. CVs obtained at GCE (1) and OMC/GCE (2) electrodes in 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ /0.1 mol/L KCl solution at a scan rate of 50 mV/s
图 3. GCE (1)和 OMC/GCE (2)在 5 mmol/L 铁氰化钾和 0.1 mol/L 氯化钾的混合溶液中的循环伏安图, 扫速为 50 mV/s

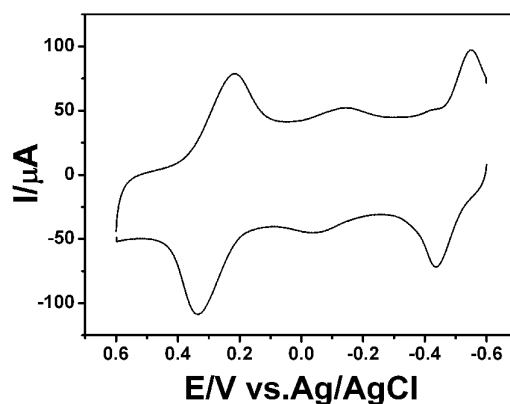


Figure 4. CV of Fc/GOD/OMC/GCE electrode in 0.1 M PBS (pH 7.0). Scan rate: 100 mV/s
图 4. Fc/GOD/OMC/GCE 在 pH = 7.0 的 0.1 M 磷酸缓冲溶液中的循环伏安图, 扫速为 100 mV/s

3.4. 扫速对 Fc/GOD/OMC/GCE 的影响

图 5 是 Fc/GOD/OMC/GCE 电极在磷酸盐缓冲液(0.1 M, pH 7.0)中不同扫速下的循环伏安图。由图 5 可见, 在 10~200 mV/s 扫速范围内, 随着扫描速度的增加, 所有的氧化还原峰电流均增大, 而氧化还原峰电位基本不随扫速的增加而改变, 峰电位之差(ΔE_p)约为 65 mV, 与单电子反应的理论值比较接近。表面该修饰电极具有良好的氧化还原可逆性。另外我们发现, 在 10~200 mV/s 的扫速范围内, GOD 的峰电流与扫速的平方根成正比。如图 6 所示。线性回归方程为 $I_{pa} = -7.02 \times 10^{-6} + 7.67 \times 10^{-6} v^{1/2}$ (I : A, v : mV/s),

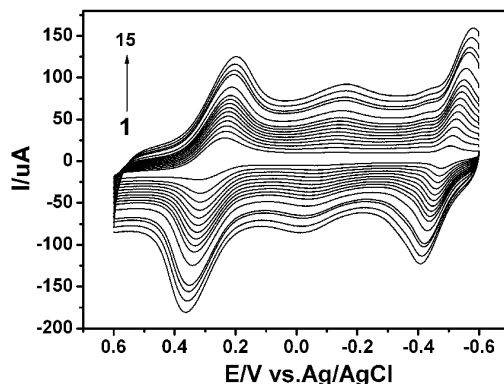


Figure 5. CVs of Fc/GOD/OMC/GCE in pH 7.0 PBS at scan rates of (from 1 to 15): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 160, 180, 200 mV/s

图 5. 在不同扫描速度下, Fc/GOD/OMC/GCE 在 pH = 7.0 的 0.1 M 磷酸缓冲溶液中的循环伏安图, 从里到外扫速分别为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 160, 180, 200 mV/s

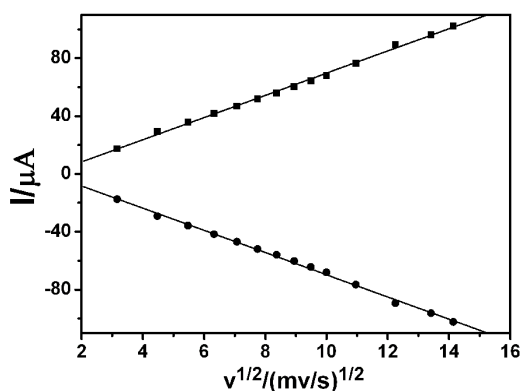


Figure 6. The relationship between the peak currents and the square root of scan rates

图 6. 峰电流与扫速平方根的关系

相关系数为 0.998, $I_{pc} = 6.82 \times 10^{-6} - 7.17 \times 10^{-6} v^{1/2}$ (I : A, v : mV/s), 相关系数为 0.998。表明媒介体在电极上的氧化还原过程受扩散控制, 这是由于修饰在电极表面的膜具有一定的厚度, 媒介体从膜中扩散到电极表面发生氧化还原反应。

3.5. pH 对 Fc/GOD/OMC/GCE 的影响

图 7 为不同 pH 条件下 Fc/GOD/OMC/GCE 在磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图。从图 7 中我们可以发现, 随着溶液 pH 的增大, 所得 Fc/GOD/OMC/GCE 循环伏安图上的氧化还原峰电位均向负方向移动, 表明其氧化还原过程伴随着质子的转移。在 pH 值为 3.0~8.0 范围内, 将式量电位 Formal potential $[(E_{pa} + E_{pc})/2]$ 与 pH 作图(图 8), 我们发现 GOD 的阳极峰电位和 pH 值的关系为: $E_{pa1} = 0.65 - 0.063\text{pH}$, $r = 0.999$, 其斜率为 -63 mV/pH , 该值与等电子等质子传递的理论值 -58 pH/mV 非常接近, 表明 GOD 在修饰电极上质子数与参加反应的电子数相等。根据 Randles-Sevick 公式计算 $n_a = 2$, 所以我们认为 GOD 在修饰电极上反应过程为两步两电子两质子过程[29]。

3.6. Fc/GOD/OMC/GCE 对葡萄糖的催化氧化

称取 0.5 g β -D-葡萄糖, 配制成 0.1 mol/L 的葡萄糖储备溶液, 该溶液于 4 °C 环境中放置 24 小时使其达到变旋平衡后再使用。图 9 为 Fc/GOD/OMC/GCE 中 GOD 部分在不同葡萄糖浓度下的循环伏安曲线。

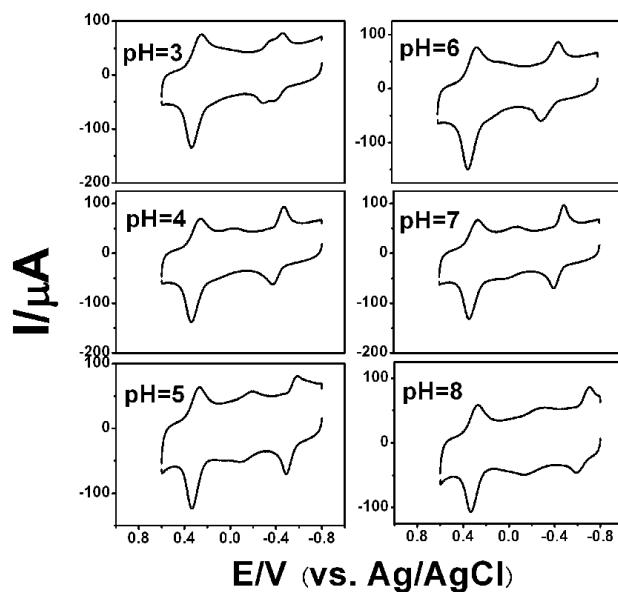


Figure 7. CVs of Fc/GOD/OMC/GCE in 0.1 M PBS with various pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, respectively. Scan rate: 100 mV/s

图 7. Fc/GOD/OMC/GCE 在不同 pH 值的 0.1 M 磷酸缓冲溶液中的循环伏安图, 扫速为 100 mV/s

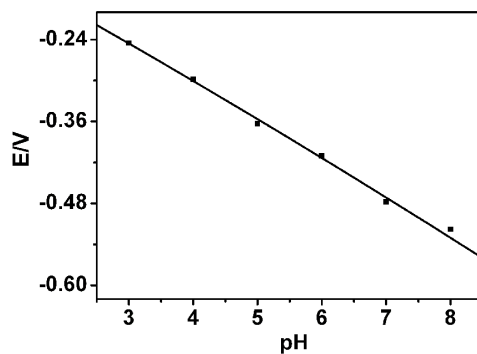


Figure 8. pH dependence of $E_{1/2}$ of Fc/GOD/OMC/GCE

图 8. $E_{1/2}$ 与 pH 的关系

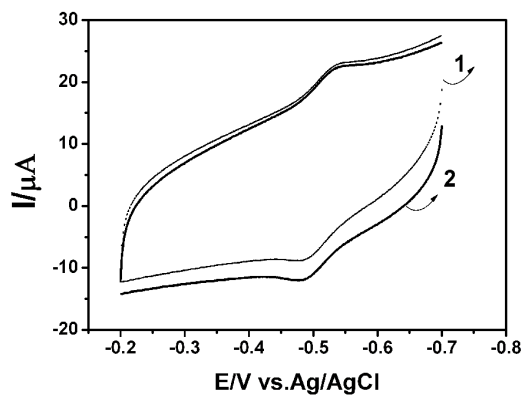


Figure 9. CVs of CVs of Fc/GOD/OMC/GCE in the presence (trace 2) and absence (trace 1) of 0.5 mM glucose in 0.1 M PBS. Scan rate: 100 mV/s

图 9. Fc/GOD/OMC/GCE 在空白溶液(1)和含有 0.5 mM 葡萄糖(2)的 0.1 M 磷酸缓冲溶液中的循环伏安图, 扫速为 100 mV/s

当向溶液中加入 0.5 mmol/L 葡萄糖溶液后，在-0.45 V 左右的氧化峰电流显著增大，还原峰电流减小，表明修饰在电极外表面的二茂铁和基底物质 OMC 共同在 GOD 的氧化还原中心和电极表面起到了电子传递的作用，同时说明该 Fc/GOD/OMC/GCE 电极对葡萄糖具有良好的催化氧化能力。我们认为 Fc/GOD/OMC/GCE 电极对葡萄糖的催化机理如下[30]:

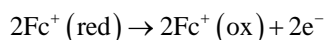
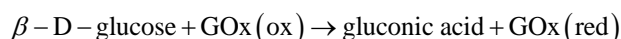


图 10 为 Fc/GOD/OMC/GCE 在-0.45 V 的工作电位下对葡萄糖的计时电流曲线。随着葡萄糖的加入，Fc/GOD/OMC/GCE 在 5 s 内即可达到最大响应电流的 95%，表明该酶电极对葡萄糖的响应时间短，说明该电极响应灵敏。由标准曲线(图 11)可知，Fc/GOD/OMC/GCE 的线性范围为 5.00 M~10.00 mM；检出限为 1.03 ± 0.15 M (S/N = 3)；相关系数为 0.996；灵敏度为 220 ± 10.4 A·mM⁻¹·cm⁻² (由直线部分斜率和电极的几何面积计算得出)。

3.7. Fc/GOD/OMC/GCE 修饰电极的稳定性和选择性

修饰电极的稳定性和选择性是衡量生物传感器性质的一个重要标准。我们采用循环伏安法对该修饰电极的稳定性和重现性进行检测。结果表明，将 Fc/GOD/OMC/GCE 修饰电极置于含 1×10^{-3} mmol/L 葡萄糖的磷酸盐缓冲溶液中进行循环伏安扫描。经过连续扫描 2 小时以后，Fc/GOD/OMC/GCE 修饰电极的峰电流仍然保持原来的 94%。而当把 Fc/GOD/OMC/GCE 修饰电极放在冰箱中保存 4 周后，对葡萄糖的电流响应基本保持不变，这表明 Fc/GOD/OMC/GCE 电极稳定性良好。对 Fc/GOD/OMC/GCE 进行干扰试验(结果如表 1 所示)，待背景电流稳定后分别加入与葡萄糖相同浓度的多巴胺、尿酸和抗坏血酸，尿酸和多巴胺对响应电流几乎没有影响，不足之处是加入抗坏血酸时电流有所下降。说明该电极能很好的消除尿酸和多巴胺的干扰，我们也将对该电极进行进一步改进。

4. 结论

在本工作中，我们用吸附法将葡萄糖氧化酶固定到有序介孔碳修饰电极表面，进而制备出了一种新型的 Fc/GOD/OMC/GCE 修饰电极，这种电极很好地体现了有序介孔碳的优良特性，不仅保持了葡萄糖

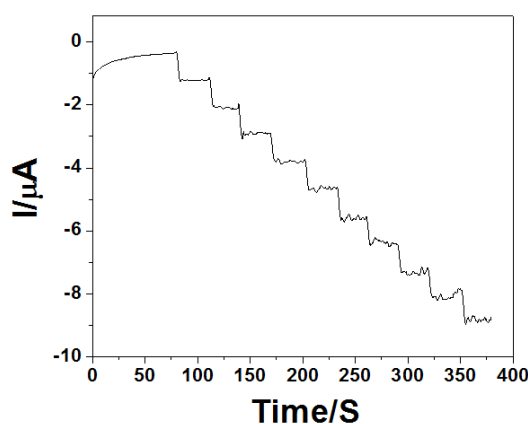


Figure 10. Amperometric responses of the Fc/GOD/OMC/GCE with successive addition of glucose into PBS (0.1 M, pH 7.0) at an operation potential of -0.45 V

图 10. Fc/GOD/OMC/GCE 在连续滴加葡萄糖的磷酸缓冲溶液(0.1 M, pH = 7.0)中的计时电流响应，设置电位为-0.45 V

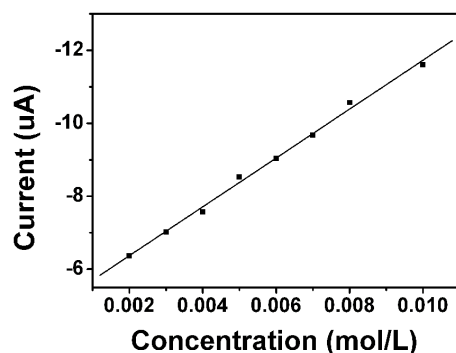


Figure 11. The calibration curve for glucose detection at the Fc/GOD/OMC/GCE at an operation potential of -0.45 V

图 11. 不同浓度的葡萄糖与 Fc/GOD/OMC/GCE 的计时电流响应的线性关系

Table 1. I-t current responses of $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, uric acid, dopamine and ascorbic acid in PBS (0.1 M, pH 7.0)

表 1. $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖、尿酸、多巴胺以及抗坏血酸在 0.1 M, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中的电流 - 时间响应

物质	浓度	目标物(T)/干扰物(I)	稳态电流	是否干扰(Y/N)
葡萄糖	$20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	T	6.88×10^{-6} A	-
尿酸	$20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	I	6.87×10^{-6} A	N
多巴胺	$20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	I	6.89×10^{-6} A	N
抗坏血酸	$20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	I	6.75×10^{-6} A	Y

氧化酶的生物活性, 而且在二茂铁与有序介孔碳的共同作用下, 所制得的 Fc/GOD/OMC/GCE 修饰电极对葡萄糖显示出良好的电催化性能, 对葡萄糖的检测线性范围为 $5.00 \text{ M} \sim 10.00 \text{ mM}$; 检出限为 $1.03 \pm 0.15 \text{ M}$ ($S/N = 3$); 相关系数为 0.996 (信噪比为 3)。并且在检测过程中可以消除多巴胺、尿酸的干扰, 但是对抗坏血酸表现出一定程度的响应。我们希望通过进一步改进, 该葡萄糖氧化酶修饰电极可以在实际样品检测中得到应用。

致 谢

本文获得吉林省科技厅科技发展计划项目(20130102003JC), 国家大学生创新创业训练计划项目资助。

参考文献 (References)

- [1] Fumio, M. and Soichi, Y. (1997) Rapid determination of glucose and sucrose by amperometric glucose—Sensing electrode combined with an invertase/mutarotase—Attached measuring cell. *Biosensors and Bioelectronics*, **12**, 1013-1020. [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00057-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00057-2)
- [2] Clark, L.C. and Lyons, C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **102**, 29-45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- [3] Jun, S.W. and Han, B.Y. (2000) A glucose oxidase electrode based on electropolymerized conducting polymer with polyanion-enzyme conjugated dopant. *Analytical Chemistry*, **72**, 2177-2181. <http://dx.doi.org/10.1021/ac9908041>
- [4] Liang, C. and Waldemar, G. (2001) Bioinorganic composites for enzyme electrodes. *Analytical Chemistry*, **73**, 2862-2868. <http://dx.doi.org/10.1021/ac010009z>
- [5] Hui, Z.H., Hong, C. and Lian, L.S. (2005) Glucose biosensor based on platinum microparticles dispersed in nano-fibrous polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1305-1311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2004.04.024>
- [6] Weaver, M.J. and Li, T.T.T. (1986) Rate-structure dependences for intramolecular electron transfer via organic anchoring groups at metal surfaces. *Journal of Physical Chemistry*, **90**, 3823-3829. <http://dx.doi.org/10.1021/j100407a060>
- [7] 袁耀峰, 叶素明, 张蕴文 (1995) 具有生物(理)活性的二茂铁衍生物. *化学通报*, **5**, 24-31.
- [8] 钱军民, 李旭祥 (2001) 介体型电流式酶传感器中电子媒介体的研究进展. *化工进展*, **6**, 11-15.

- [9] 刘海鹰, 邓家祺 (1995) Nafion-二茂铁-双酶修饰的葡萄糖传感器. *分析化学*, **23**, 154-158.
- [10] 张校刚, 史彦莉, 力虎林 (2003) 一种结构新颖的二茂铁硫醇自组装膜的电化学行为. *电化学*, **9**, 235-239.
- [11] 李亚卓, 张素霞, 李晓芳, 孙长青 (2003) 基于溶胶-凝胶技术的聚烯丙胺基二茂铁化学修饰电极的组装及其对抗坏血酸的电催化氧化. *高等学校化学学报*, **8**, 1373-1376.
- [12] Koide, S. and Yokoyama, K. (1999) Electrochemical characterization of an enzyme electrode based on a ferrocene-containing redox polymer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **468**, 193-201.
- [13] Gass, A.E.G., Gavis, G. and Francis, G.D. (1984) Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*, **56**, 6673-6678.
- [14] Ryoo, R., Joo, S.H. and Jun, S. (1999) Synthesis of highly ordered carbon molecular sieves via template-mediated structural transformation. *The Journal of Physical Chemistry B*, **103**, 7743-7746. <http://dx.doi.org/10.1021/jp991673a>
- [15] Lee, G.J. and Pyun, S.I. (2006) Effect of microcrystallite structures on electrochemical characteristics of mesoporous carbon electrodes for electric double-layer capacitors. *Electrochimica Acta*, **51**, 3029-3038. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2005.08.037>
- [16] Walcarius, A. (2005) Impact of mesoporous silica-based materials on electrochemistry and feedback from electrochemical science to the characterization of these order materials. *Comptes Rendus Chimie*, **8**, 693-712. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2004.10.003>
- [17] Feng, J.J., Xu, J.J. and Chen, H.Y. (2007) Direct electron transfer and electrocatalysis of hemoglobin adsorbed on mesoporous carbon through layer-by-layer assembly. *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 1618-1624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.07.022>
- [18] Jia, N.Q., Wang, Z.Y., Yang, G.F., Shen, H.B. and Zhu, L.Z. (2007) Electrochemical properties of ordered mesoporous carbon and its electroanalytical application for selective determination of dopamine. *Electrochemistry Communications*, **9**, 233-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2006.08.050>
- [19] Zhou, M., Guo, L.P., Lin, F.Y. and Liu, H.X. (2007) Electrochemistry and electrocatalysis of polyoxometalate-ordered mesoporous carbon modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, **587**, 124-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.017>
- [20] Zhou, M., Ding, J., Guo, L.P. and Shang, Q.K. (2007) Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode. *Analytical Chemistry*, **79**, 5328-5335. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0703707>
- [21] Zhou, M., Guo, L.P., Hou, Y. and Peng, X.J. (2008) Immobilization of nafion-ordered mesoporous carbon on a glassy carbon electrode: Application to the detection of epinephrine. *Electrochimica Acta*, **53**, 4176-4184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2007.12.077>
- [22] Ndamaniha, J.C., Guo, L.P. and Wang, G. (2008) Mesoporous carbon functionalized with ferrocenecarboxylic acid and its electrocatalytic properties. *Microporous and Mesoporous Materials*, **113**, 114-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.11.009>
- [23] Liang, C.D. and Dai, S. (2006) Synthesis of mesoporous carbon materials via enhanced hydrogen-bonding interaction. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 5316-5317. <http://dx.doi.org/10.1021/ja060242k>
- [24] Nicholson, R.S. (1965) Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. *Analytical Chemistry*, **37**, 1351-1355. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60230a016>
- [25] Georgakilas, V., Voulgaris, D., Vazquez, E., Prato, M., Guldi, D.M., Kukovecz, A. and Kuzmany, H. (2002) Purification of HiPCO carbon nanotubes via organic functionalization. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 14318-14319. <http://dx.doi.org/10.1021/ja0260869>
- [26] Ferrari, A.C. and Robertson, J. (2000) Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon. *Physical Review B*, **64**, Article ID: 075414.
- [27] Wang, S.F. and Du, D. (2003) Preparation and electrochemical properties of Keggin-type phosphomolybdic anions in electrostatically linked L-cysteine self-assembled monolayers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **94**, 282-289. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00368-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00368-X)
- [28] O'Connell, M.J., Ericson, L.M., Boul, P., Huffman, C., Wang, Y.H., Haroz, E., et al. (2001) Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chemical Physics Letters*, **342**, 265-271. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614\(01\)00490-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614(01)00490-0)
- [29] Britto, P.J., Santhanam, K.S.V. and Ajayan, P.M. (1996) Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **41**, 121-125. [http://dx.doi.org/10.1016/0302-4598\(96\)05078-7](http://dx.doi.org/10.1016/0302-4598(96)05078-7)
- [30] Pazur, J.H., Kleppe, K. and Cepure, A. (1965) A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **111**, 351-357. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90196-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(65)90196-7)