

聚邻苯二胺固定葡萄糖氧化酶 在微带金电极上的性质

汪云

(无锡轻工大学化学工程系, 无锡 214036)

周东美 陈洪渊

(南京大学化学化工学院, 南京 210093)

摘要 用电化学方法在纳米级微带金电极上聚合邻苯二胺 (PPD)的同时实现了葡萄糖氧化酶 (GOD)的固定。制得的 GOD-PPD-Au酶电极呈现典型的酶催化反应动力学特征,具有抗干扰、响应速度快、稳定性好的优点,固定化葡萄糖氧化酶的表现米氏常数为 5.4 mmol/L 。

关键词 电化学传感器;微带金电极;聚邻苯二胺;葡萄糖氧化酶

中图分类号 O657.1

0 前言

酶的固定是生物传感器制作中的重要环节,酶的固定方法有许多种,如物理包埋法^[1],化学交联法^[2],电聚高分子膜固定法^[3]等。而用电化学聚合高分子膜固定酶制备生物传感器是近年来发展起来的一种新方法,它具有制作简单、重现性好、响应快等优点,因而越来越受到人们的重视。目前用于制备这类传感器的电聚合高分子主要是聚吡咯及其衍生物^[4]、聚苯胺^[5]等导电高分子,而用聚邻苯二胺^[6]、聚苯酚^[7]等非导电性高分子制备的传感器,更具有响应快、灵敏度高、抗干扰能力强等特点,颇具研究和应用价值。电聚高分子膜固定化酶传感器大多基于铂电极或玻碳电极等常规电极,微电极上的研究还较少^[8],为了实现生物电化学传感器的微型化,最终达到分析的目的,有必要研究微电极及超微电极上酶的固定及其酶电极的电化学行为。本文中报道了在纳米级微带金电极上电聚合邻苯二胺同时固定葡萄糖氧化酶,并研究了酶电极的性质及对葡萄糖的电化学响应。

1 实验

1.1 仪器

M 273恒电位仪及 M 270电化学分析系统 (EG& G, PAR Co, USA); FX-850打印机 (EPSON Co, USA); HP绘图仪 (HP Co, USA); 501型超级恒温槽 (上海实验仪器厂)

收稿日期: 1997-06-17

第一作者: 汪云,女,1964年1月生,工学硕士,讲师

1.2 试剂和材料

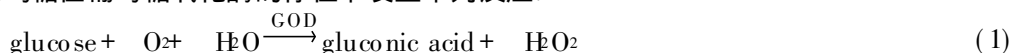
葡萄糖氧化酶 (GOD, EC1.1.3.4, Type I, 23 800 u/g, *Aspergillus niger*)及 β -葡萄糖均为 Sigma 公司产品;邻苯二胺 (化学纯)为上海试剂厂产品; Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 均为分析纯,缓冲溶液的总浓度为 0.10 mol/L;实验用水为二次石英亚沸蒸馏水

1.3 实验方法

电化学实验采用三电极体系,在自制的电解池中进行,纳米级微带金电极 ($88\text{ nm} \times 0.5\text{ cm}$)为工作电极^[9],铂丝为对电极,饱和甘汞电极为参比电极。控制实验温度为 $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$,并将电解槽置于屏蔽箱中以抗干扰。微带金电极首先用 1200 目的砂纸打磨,再超声洗净,然后置于磷酸缓冲溶液中,在 $0 \sim +1.0\text{ V}$ (vs SCE)的电位范围内以 100 mV/s 的扫描速率循环扫描直至得到一稳定的背景电流曲线。邻苯二胺的电化学聚合及葡萄糖氧化酶的同时固定,在含 5 mmol/L 邻苯二胺和 500 u/ml 葡萄糖氧化酶的醋酸盐缓冲溶液中 ($\text{pH}=5.2$)于 $+0.65\text{ V}$ 的电位下恒电位电解进行。制得的酶电极在缓冲溶液中漂洗数分钟,再浸入 $\text{pH}=7$ 的磷酸盐缓冲溶液,置于 4°C 的冰箱中保存备用。葡萄糖的储备液在使用前 24 h 配制,以使其两种旋光异构体能够平衡。

1.4 响应电流的测定

葡萄糖在葡萄糖氧化酶的存在下发生下列反应:



这里 GOD 是葡萄糖氧化酶,酶电极上形成的 H_2O_2 在恒电位下发生氧化:



氧化时产生的电信号用电流计检测

测定响应电流的电池由 GOD-PPD-Au 电极、铂丝对电极、SCE 参比电极的三电极体系组成,电流-时间上的稳态电流值为酶电极的响应电流的测定值

2 结果与讨论

2.1 邻苯二胺 (PD) 在微带金电极上的电聚合及聚合膜的特性

图 1 是 PD 在微带金电极上电化学聚合的多次扫描循环伏安曲线。由图可见,PD 的电氧化是完全不可逆的。第一次扫描的氧化电流很大,从第二次扫描起电流便迅速降低,直至一个很小的稳定值,这表明电极表面形成了非电活性膜^[5],非电活性膜的形成阻止了 PD 在电极表面继续氧化,因而 PD 的氧化电流迅速减小。PD 几乎可以在所有的 pH 值范围中形成一层聚邻苯二胺高分子膜。文献 [10] 中运用旋转圆盘电极通过测定氢离子在膜内的还原,然后根据 I/k^{-1} 对 $k^{-1/2}$ 的斜率获得膜的厚度为 10 nm 。一般来说,微电极因其快速的传递速率难于在电极表面生成膜,实验中发现,通过增加扫描电位范围能够在微带金电极上得到一层较好的聚合物膜。

电聚邻苯二胺 (PPD) 膜具有很好的选择性透过某些物质的功能。图 2 是 4 mmol/L 抗坏血酸在裸露的微带金电极和 PPD 修饰膜电极上的响应情况,抗坏血酸在裸电极上 0.2 V 时就有电流响应,而且几乎形成一个平台,说明抗坏血酸在裸电极上是一个比较快的电化学过程。当电极被 PPD 修饰以后,抗坏血酸在该电极上的响应显著下降,可见这种修饰电极可以很好地消除抗坏血酸的干扰。对于聚吡咯修饰电极,因为膜带正电荷,带负电荷的抗坏血酸

在电极表面静电吸引而对电极响应产生干扰。实验中还发现 PPD膜能够阻止尿酸、多巴胺在电极上氧化, 而让 H_2O_2 透过, 这对制备传感器是非常有利的。

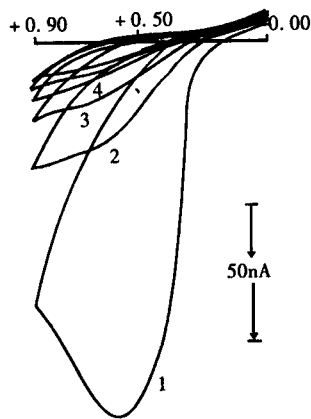


图 1 PPD 在金电极聚合的 CV 图
 $C_{\text{PPD}} 5 \text{ mmol L}^{-1}$ 扫速: 50 mV s^{-1}
介质: $\text{pH} 7$ 的磷酸缓冲液

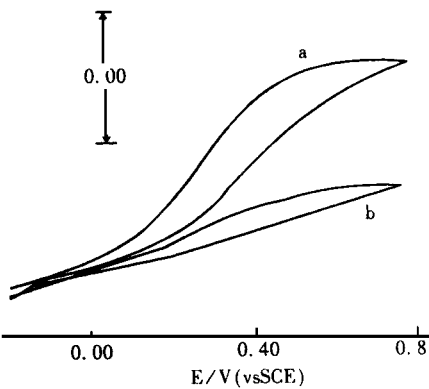


图 2 抗坏血酸在 Au 电极 (a) 和 PPD-Au 电极 (b) 上的 CV 图
 $C_{\text{Vc}} 4 \text{ mmol L}^{-1}$ 扫速: 50 mV s^{-1}
介质: $\text{pH} 7$ 的磷酸缓冲液

2.2 在微带金电极上聚邻苯二胺和葡萄糖氧化酶的同时固定

Yoshihito 等报道了在铂电极上电沉积铂黑的同时固定葡萄糖氧化酶, 且运用恒电位方法研究了在加入葡萄糖氧化酶前后的电流对时间的响应曲线, 在加入葡萄糖氧化酶后其电流因为有葡萄糖氧化酶的吸附而使铂的还原电流减少。陈洪渊^[8]等研究了聚吡咯过程中葡萄糖氧化酶的存在对于吡咯膜生长的影响。实验中发现, 随葡萄糖氧化酶的加入而减慢其“成核”和“膜生长”的速度。

作者在实验中发现, 在邻苯二胺的聚合过程中葡萄糖氧化酶的加入对电流—时间响应曲线也有影响。在加入葡萄糖氧化酶以后其电流响应增加。这一特征刚好与文献 [8] 相反。这是由于随着葡萄糖氧化酶的加入, 使不导电的邻苯二胺聚合膜因掺杂而暴露出电极表面的活性点, 从而使电流增加, 成膜速度也加快。这说明, 导电聚合膜在葡萄糖氧化酶存在时, 其生长过程因葡萄糖氧化酶的吸附而阻碍膜的生长, 非导电聚合膜则由于葡萄糖氧化酶的掺杂而使电流增加。

分别用恒电位法和循环伏安法两种固定方式考察传感器的性能, 发现循环伏安固定制备传感器的重现性不如恒电位固定的好。故本实验中邻苯二胺的电化学聚合和葡萄糖氧化酶的同时固定, 是在含 5 mmol/L 邻苯二胺和 500 u/ml GOD 的醋酸盐缓冲溶液中 ($\text{pH} 5.2$), 于 0.65 V 恒电位通氮除氧电解 10 min 后得到的。

2.3 PPD-GOD-Au 酶电极对葡萄糖的电流响应

图 3 是酶电极在含葡萄糖的缓冲溶液中电位从 0.0 V 阶跃到 $+0.6 \text{ V}$ 时电流对时间的响应曲线, 由于 $t_{1/2} = 0.1 d^2 / D$ (d 为膜厚, D 为扩散系数, $t_{1/2}$ 为达到稳态电流所需时间的一半), 而聚邻苯二胺的膜厚较小, 所以稳态电流可以很快地获得, 稳态电流 I 与葡萄糖浓度 c 的关系见图 4, 当浓度较小时, I 随 c 线性增加; 当浓度较大时, I 与 c 基本无关, 电流到达一极限值, 表现出明显的酶催化反应动力学特征, 则表观米氏 (Michaelis-Menten) 常数可按 Shu 和 Wilson 提议的电流法求得, $K = 5.4 \text{ mmol/L}$ 。

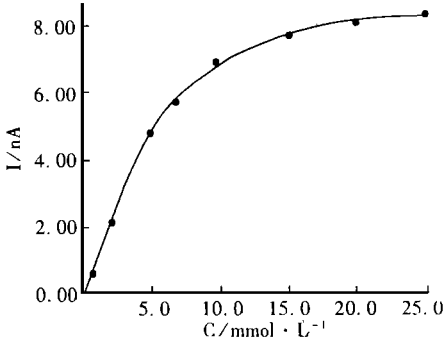
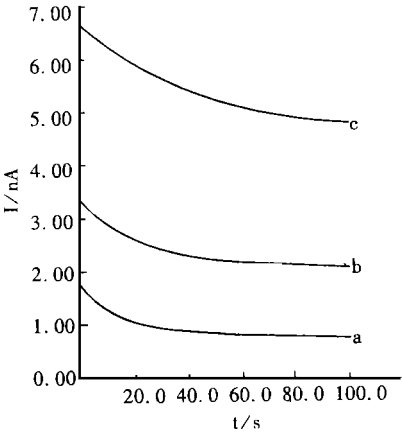


图 3 酶电极的响应电流随时间的变化

电位: + 0.60 V, PH 7.0

葡萄糖浓度 (mmol/L): a- 1, b- 2, c- 5

图 4 酶电极的响应电流与葡萄糖

浓度之间的关系

电位: + 0.60V, PH 7.0

2.4 影响酶电极响应电流的因素

2.4.1 电位对酶电极响应电流的影响 前述反应 (2)是一个电化学反应,因而它的反应速率与电位有关,在+ 0.40~ + 0.8 V 范围内,酶电极的响应电流随电位的变化见图 5,被测的缓冲液中含葡萄糖 5 mmol/L, pH= 7,从反应 (2)可看出,反应速率应随电位升高而加快,这与图 3 的实验结果是一致的。但当电位高于+ 0.65 V 时,基底电流会增加,同时过高的电极电位会使酶电极本身的活性下降而不利测量。所以本文中 choice + 0.6 V(vs SCE)对葡萄糖进行电流测定。

2.4.2 pH值对酶电极活性的影响 pH值对酶催化反应速率及酶活性影响较大 过酸、过碱均会使酶分子结构破坏而变性失活,所以作者试验考察了在葡萄糖浓度为 5 mmol/L 的磷酸缓冲溶液中酶电极的响应电流随 pH值变化的情况,结果见图 6 从图中可以看出, pH 值在 6~ 7.5 范围内,曲线较为平坦,说明酶电极在此 pH 值范围内电化学活性较大。因而选择 pH= 7.0 作为酶电极的操作条件。

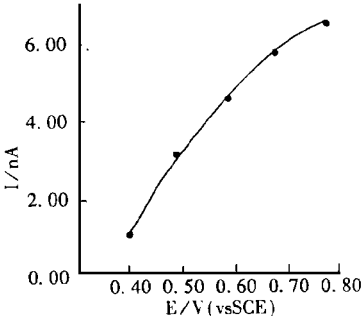


图 5 酶电极的响应电流随电位的变化

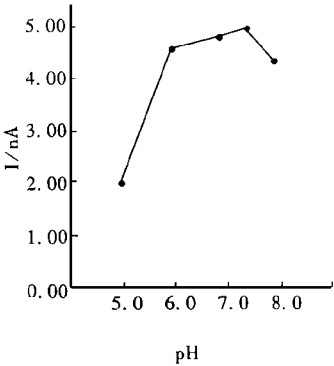


图 6 酶电极的响应电流与溶液 PH 值之间的关系

2.5 酶电极的稳定性

GOD-PPD-Au 电极的稳定性, 是根据 5 mmol/L 葡萄糖在酶电极上响应电流随时间的变化来考察的。存放在磷酸盐缓冲溶液中于 4℃ 冰箱中保存备用的酶电极在一星期后测得的电流基本不变, 而在两星期后电流响应则约下降为原来的 86%。可见, 此酶电极具有较好的稳定性。

参 考 文 献

- 1 Ruth Tor, Amihay Freeman. New Enzyme Membrane for Enzyme Electrodes. Anal chem, 1986, 58 1042
- 2 Narasimhan K, Wingard, L B. Immobilization of hydroquinone on electrode surfaces. Anal Chem, 1986, 58 2984
- 3 Degani Y, Heller A. Direct Electrical Communication Between Chemically modified enzymes and Metal Electrodes. J Am Chem Soc. 1988, 110 2615
- 4 Bartlett P N, Whitaker R C. Electrochemical Immobilization of Enzymes. J Electroanal Chem, 1987, 224 37
- 5 Lu S-Y, Li C-F. Electron Transfer on An Electrode of Glucose Oxidase Immobilized in Polyaniline. J Electroanal Chem, 1994, 364 121
- 6 Maltesta C, Palmisano F. Glucose Fast-response Amperometric Sensor Based on Glucose Oxidase Immobilized in an Electropolymerized Poly (O-Phenylenediamine) film. Anal Chem, 1990, 62 2735
- 7 Bartlett P N, Tebbutt P. Electrochemical Immobilization of Enzymes. Anal Chem, 1992, 64 138
- 8 蔡称心, 陈洪渊. 纳米级微带金电极上葡萄糖氧化酶的固定性质及其应用. 化学学报, 1995, 53 281
- 9 蔡称心, 陈洪渊. 纳米级金膜微电极的制作, 表征级异相催化反应. 分析化学, 1995, 23(1): 20
- 10 Tamamushi R. The Electrochemical peltier effect Observed with Electrode Reactions of Fe(II) /Fe(III) Redox Couples at A Gold Electrode. J Electroanal Chem Interfacial Electrochem, 1975, 65 265

Characteristics and Application of Glucose Oxidase Immobilized by Poly(O-Phenylenediamide) Film at Nanometer-Sized Microband Gold Electrode

Wang Yun

(Dept. of Chem. Eng, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Zhou Dongmei Chen Hongyuan

(Department of chemistry, Nanjing university, Nanjing 210093)

Abstract Glucose oxidase was simultaneously immobilized in polymer film at a nanometer-sized microband gold electrode by means of electrochemical polymerization of o-phenylenediamide. The response to glucose shows kinetic characteristics of the typical enzyme-catalyzed reaction at GOD-PPD-Au. Moreover, it possesses many virtues such as resistance, rapid electrochemical response and good stability. The apparent Michealis Constant is 5.4mmol/L.

Key words electrochemical sensor; microband gold electrode; poly(o-phenylenediamide); glucose oxidase

(责任编辑: 秦和平)