

二茂铁改良葡萄糖氧化酶电极

胡 军

(上海市工业微生物研究所)

S. P. HENDRY

(英国鹤田理工学院生物工程研究中心)

关键词 二茂铁, 石墨电极, 固定化, 酶电极

六十年代末以来, 已有很多有关酶电极用于分析葡萄糖和其他生物样品的报道, 以往大都采用氧电极和过氧化氢电极作为构成酶电极的基础。近年来许多研究则着重于发展如何将电子直接从酶活中心传递到电极表面以降低反应体系中其他生物活性物质对氧化还原反应的干扰^[1,2]。

人们发现如果采用一些小分子有机金属化合物能在氧化还原反应系统中取代氧而作为电子的受体, 并起传递电子的作用^[3]。本研究采用的二茂铁 (Ferrocene) 就是上述小分子有机金属化合物之一。采用这种介体电极的一个很大优点就是工作电压大大低于经典的过氧化氢电极, 可达到提高精度, 减少干扰的目的。

材 料 和 方 法

1. 石墨电极的制备

石墨片 (Le Carbone, Portland, Sussex) 直径 6mm, 厚 1mm 用环氧树脂 (Araldite, Ciba-Geigy Duxford, Cambs) 胶粘在 3cm 长的玻璃管上。树脂在 100℃ 硬化 20min。将 6cm 长的绝缘线联接在玻璃管内石墨片反面上用银焊树脂粘合剂 (RS Components, Ltd, Corby, Northants) 粘合。该粘接过程再在 100℃ 处理 20min, 取出备用^[4]。

2. 酶电极的制备

21.5mg 的二茂铁溶于 1ml 甲苯中至透明, 石墨电极浸入该溶液中, 维持 60min, 取出后室温空气干燥 30min。再转入 pH5.5 的柠檬酸缓冲液 (含 20mg/ml 碳二亚胺交联剂) 约 90min, 取出电极用缓冲液清洗若干次, 再浸入 pH9.5 20mmol/L 的碳酸缓冲液 (含 12.5mg/ml 的葡萄糖氧化酶), 于 20℃ 维持 60min, 取出于 4℃ 保存备用^[5]。

3. 测定装置

酶电极采用 BBC 64K 微电脑分析考察电极的性

能。系统中的参考电极为 Ag/AgCl。反应器为 5ml 夹套恒温玻璃装置。温度设定在 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。反应器内装 4ml 缓冲液 (pH7.0 20mmol/L 磷酸缓冲液, 0.1mol/L KCl)。底物葡萄糖 1mol/L (溶于磷酸缓冲液中, 并于 4℃ 平衡过夜)。工作电压设定在 200mV, 底物一次进样量为 2.5mmol/L^[6]。

4. 介体的循环伏安图谱测定

二茂铁改良电极在酶反应时的电化学性质可用循环伏安法考察^[7]。该系统中的工作电极为玻碳电极, 辅助电极为铂电极, 参考电极为甘汞电极。相对于饱和甘汞电极, 工作电压范围设定在 $-0.3 \sim +0.8\text{V}$, 用伏安图谱仪在该范围内扫描标记, 扫描速率为每分钟 50mV。该测定系统为一双室反应器, 辅助电极与工作电极置于 1 号室内, 参考电极置于 2 号室内, 底物葡萄糖, 二茂铁及酶液均加入 1 号反应室。

结 果 和 讨 论

1. 酶电极的校正曲线

酶电极在 25℃, pH7.3 时, 对底物的线性稳定态响应范围为 0—35mmol/L 葡萄糖 (图 1)。电极对底物葡萄糖的响应快速, 3—5min 达到稳定态加入样品后的 60—90s 即达到响应值的 90%。

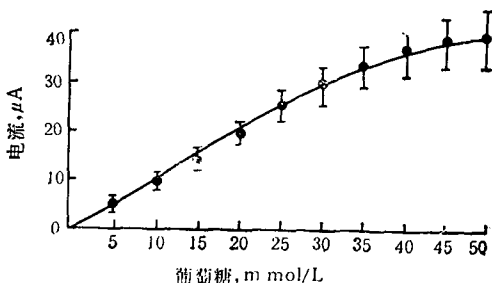


图 1 酶电极的校正曲线

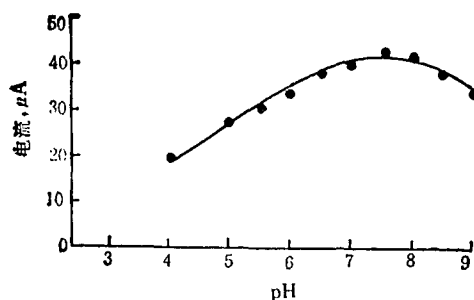


图2 酶电极的 pH 范围

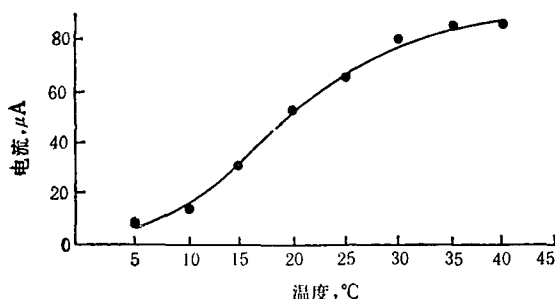


图3 温度对酶电极的影响

2. 酶电极的 pH 范围

在 pH4.0—9.4, 温度 30℃, 用 80mmol/L 葡萄糖测定 pH 对电极阳电流的影响 (图 2)。实验显示 pH7.5 为最适 pH。而用氧作为电子受体的系统一般最适 pH 为 5.5~5.7。pH 的这些变化可解释为, 由于二茂铁代替氧作为电子受体, 使反应体系中的过氧化氢产生量大大减少, 在酶的周围存在着过剩的质子导致酶活中心的微环境趋向酸性, 从而使酶在中性偏碱的情况下才达到其 pH 最适点^[8]。

3. 温度对酶电极的影响

在 pH7.0, 4°—50℃ 范围内, 用饱和葡萄糖考察了酶电极的温度影响范围 (图 3)。在上述条件下, 电极的稳定态电流随温度的升高而增加。图示的非线性部分可能是因为从较低温度的底物扩散限制效应转到较高温度时的酶反应限制所致。

4. 二茂铁离子作为葡萄糖氧化酶的氧化剂

考察二茂铁是否能作为葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖时的电子受体, 通常可采用循环伏安电化方法 (图 4)。图中 a 曲线表示二茂铁在葡萄糖单独存在时的伏安图。b 曲线表示当系统中加入葡萄糖氧化酶后伏安图发生变化, 在接近 +0.2V 处产生较大的氧化电流。这种现象表明二茂铁可以氧化葡萄糖氧化酶, 而使自己

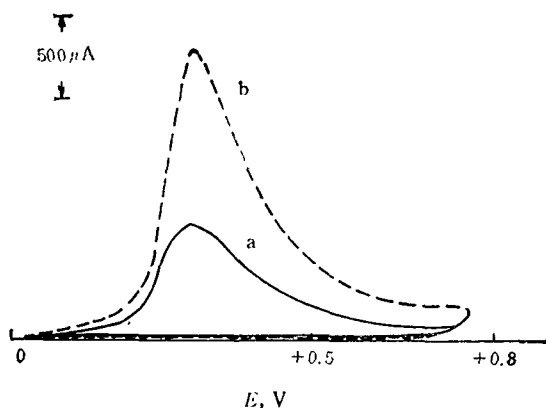


图4 酶电极的循环伏安图

温度 30℃, pH7.0, 80mmol/L 底物葡萄糖

处在还原状态, 然后进一步被电极氧化放出电子, 使伏安图显出电流变化。

本工作表明采用二茂铁改良葡萄糖氧化酶电极是可行的。二茂铁具有良好的电化学性质其溶解在有机溶剂中的稳定性保证了电子有效地在固定化酶和电极表面的传递活动, 从而使酶电极能快速地重复测定分析样品中的葡萄糖。根据以上结果说明二茂铁能够取代氧作为电子受体, 广泛用于医学临床血糖, 发酵监控和食品糖类分析中。

本文作者感谢 John Higgins 教授对本工作的大力帮助。A. P. F. Turner 博士对文章提出建议和讨论。

参 考 文 献

- 1 Albrey W J *et al.* In: *Biotech* 85, Northwood: Online Publications, 1985: 359—381
- 2 Cardosi M F *et al.* In: *Biosensors, fundamental and applications*, Oxford: Oxford University Press, 1987: 257—275
- 3 Cenas N K *et al.* *J Electroanal Chem*, 1984; **128**: 103
- 4 Davis G. *Biosensors, fundamental and applications*. Oxford: Oxford University press, 1987: 247—257
- 5 Inaiello R M *et al.* *Anal Chem*, 1981; **53**: 2090
- 6 Turner A P F. *Biotech* 85, Northwood: Online Publication, 1985: 181—92
- 7 Racine F *et al.* *Med Instrument*, 1975; **9**: 11
- 8 Turner A P F *et al.* *Biosensors, fundamental and Applications*. Oxford: Oxford University Press, 1987: 1—10

[本文于1989年4月14日收到]