

# 纳米级微带金电极上葡萄糖氧化酶的固定、性质及应用

蔡称心 鞠焜先 陈洪渊\*

(南京大学化学系 南京 210093)

**摘要** 实现了葡萄糖氧化酶以及葡萄糖氧化酶和电子传递媒体  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  同时在纳米级金膜微带电极上的固定. 用红外光谱和循环伏安对 GOD/PPy 微电极进行了表征, 研究了微带金电极上聚吡咯恒电位形成过程的动力学及葡萄糖氧化酶对其动力学过程的影响. 探讨了微酶电极 GOD/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /PPy 对葡萄糖氧化的催化作用. 考察了 PPy 膜厚度和溶液中氧的存在对 GOD/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /PPy 微电极测定葡萄糖的影响.

**关键词** 微电极, 金膜微带电极, 葡萄糖氧化酶, 生物传感器

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<sup>[1]</sup>, 化学交联法<sup>[2,3]</sup>, 导电聚合物掺杂法等<sup>[4]</sup>. 导电聚合物掺杂法是新近发展起来的酶固定化技术, 与其它酶的固定化方法相比, 它具有易于控制酶层厚度和酶的分布、易制成含不同酶的多层结构以及便于酶电极的微型化等优点, 而且它可以同时实现导电聚合物的形成和酶的固定. 已见文献报道用这一方法将葡萄糖氧化酶 (GOD) 掺杂到聚吡咯<sup>[5,6]</sup>, 聚 *N*-甲基吡咯<sup>[7]</sup>, 含有电子传递媒体的聚吡咯<sup>[8]</sup>和聚吡啶<sup>[9]</sup>等导电聚合物的膜中制成葡萄糖传感器. 然而, 这些研究均是在铂或玻碳等常规大电极上进行的, 微电极上的研究还较少. 为了实现生物电化学传感器的微型化, 最终达到在体分析的目的, 有必要研究在微电极及超微电极上酶的固定及其电化学性质. 本文报道纳米级微带金电极上葡萄糖氧化酶的固定, 固定过程的动力学以及酶电极的电化学行为, 这对研究微型的生物传感器, 实现生物传感器的在体分析具有重要意义.

## 1 实验

### 1.1 仪器、材料和试剂

M273 恒电位仪及 M270 电化学分析系统 (EG&G, PAR 公司, 美国), FX-850 打印机 (EPSON 公司, 美国), HP 绘图仪 (HP 公司, 美国), EIKO IB-3 离子溅射仪, 170SX-FTIR 光谱仪 (Nicolet 公司, 美国), 501 型超级恒温槽 (上海实验仪器厂), EPON 812 型环氧树脂 (美国), 葡萄糖氧化酶 (GOD, EC 1.1.3.4, Type II, 23800U/g, *Aspergillus niger*) 及  $\beta$ -D-葡萄糖均为 Sigma 公司产品, 光谱纯吡咯为德国 Fluka 公司产品 (使用前经蒸馏), 其他试剂均为分析纯试剂, 水为二次蒸馏水.

### 1.2 超微带金电极的制作

将硝酸浸泡过的薄玻璃片 (1.8cm×1.8cm) 用水冲洗, 晾干. 置于溅射仪的靶下, 抽真

1993年12月13日收到. 修改稿于1994年3月21日收到. 国家自然科学基金及青年基金资助课题.

空,先在玻璃片上喷镀一层很薄的 Cr 作为衬底,然后将玻璃片置于金靶下,控制溅射速度和时间,在玻璃片上沉积一层金膜(用电化学方法测得表观厚度为  $88\text{nm}^{[10]}$ ).将喷镀好金膜的玻璃片按所需尺寸裁开,用银导电胶将导线和金膜连通,采用 EPON 812 环氧树脂(邻苯二胺作固化剂)固定在载玻片上,放置过夜,在  $100^\circ\text{C}$  下加热固化 1h.然后分别用 320mesh, 1200mesh 砂纸将侧面磨光,露出金膜的侧面成为金带,最后用  $0.5\mu\text{m Al}_2\text{O}_3$  抛光成镜面.用超声波清洗数分钟以除去表面的残留物,保存备用.

### 1.3 实验方法

电化学实验均采用三电极系统在自制的电解槽中进行.自制纳米级微带金电极 ( $88\text{nm}\times 1.0\text{cm}$ ) 为工作电极,饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极,铂丝为对电极.实验时将电解槽置于法拉第屏蔽箱中以消除外界干扰.底液为  $0.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0),温度控制在  $25\pm 0.1^\circ\text{C}$ .实验前底液通  $\text{N}_2$  除氧 10min,实验时保留  $\text{N}_2$  气氛.吡咯的聚合及 GOD 的固定均在  $0.85\text{V}$  (vs. SCE) 的恒电位下进行,介质是  $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  吡咯,  $200\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  GOD 的磷酸盐缓冲溶液,在制备含电子传递媒体的酶膜时,介质还含有  $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的铁氰化钾,制得的酶电极置于  $0^\circ\text{C}$  以下保存备用.用计时电流法考察酶电极对葡萄糖的响应时,先加  $+0.3\text{V}$  的恒电位,待电流平稳后用微量注射器加入一定量的葡萄糖溶液,搅拌 30s,记录静止溶液中的稳态电流.葡萄糖贮备液在使用前 24h 内配制.

## 2 结果和讨论

### 2.1 GOD 在微带金电极上的固定

由于吡咯在聚合过程中有质子析出,电极表面附近 pH 值会显著降低,因而为了防止 GOD 的变性,维持其生物催化活性, GOD 的固定反应宜在缓冲体系中进行.聚吡咯是带正电荷的,而 GOD 进入聚吡咯中是以阴离子形式参与的嵌入过程,因此选择的缓冲体系 pH 必须要保证 GOD 是以阴离子形式存在. GOD 的等电点为 4.2,  $\text{pH}>5.5$  时 GOD 带负电荷.本文选择的缓冲体系为 pH 7.0 的磷酸盐缓冲体系,这样 GOD 带负电荷能与带正电荷的聚吡咯相互作用进入聚吡咯膜中.聚吡咯膜中是否有 GOD 存在除直接进行酶活性测定外,还可以用红外光谱来检测.聚吡咯膜含 GOD 与否的红外光谱图在  $900\text{cm}^{-1}\sim 2000\text{cm}^{-1}$  范围内有明显差别(见图 1),其中  $1585$ ,  $1360$  和  $1060\text{cm}^{-1}$  对应于 GOD 分子中异咯嗪环的红

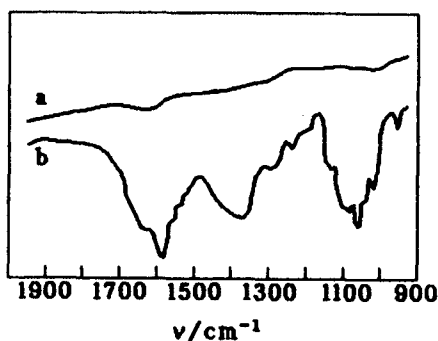


图 1 PPY (a) 和 GOD / PPY (b) 膜的红外光谱图

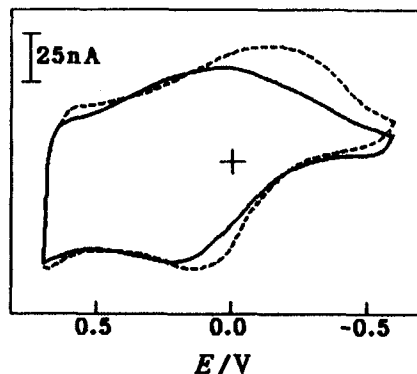


图 2 微电极在  $0.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图

扫描速度:  $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; —: PPY / Au 微电极;  
- - -: GOD / PPY / Au 微电极

外吸收, 而 PPy 中则没有, 且曲线 (b) 与纯 GOD 的红外光谱图极为相似. 从红外光谱图的对比可知, GOD 已进入了聚吡咯的膜中, GOD/PPy 电极的循环伏安曲线如图 2 所示. 图 2 表明 GOD 进入聚吡咯的膜中后, 在实验的电位区间内没有出现新的氧化还原峰, 只是使聚吡咯的氧化还原峰均向负方向移动, 这可能是由于带负电荷的 GOD 进入 PPy 膜中后, 改变了 PPy 膜中离子的嵌-脱机理, 使 PPy 更易被氧化和更难被还原, 因而 PPy 氧化峰电流增加而还原峰电流变化不大.

## 2.2 GOD 对吡咯聚合过程的影响

在纳米级微带金电极上能容易地用恒电位法、恒电流法和循环伏安法形成聚吡咯<sup>[10]</sup>. Miller 等<sup>[11]</sup>认为恒电位法形成聚吡咯时的电流-时间曲线关系能反映吡咯聚合的动力学过程. 图 3 是吡咯在微带金电极上恒电位 [ $E = 0.85 \text{ V (vs. SCE)}$ ] 聚合时电流随时间的变化曲线. 从图中可以看出, 加上电位以后, 电流很快地下降, 然后电流呈上升趋势, 经过一段时间又缓慢下降. 它表明吡咯的聚合经历着“成核”和“膜生长”的动力学过程. 加上电位以后, 电流随  $t^{-1/2}$  下降, 这对应于吡咯单体的氧化过程, 在这一阶段, 聚吡咯膜还没有形成, 由于吡咯单体被氧化, 电极表面扩散层厚度随时间而增加, 使氧化电流下降. 电流的上升过程对应于聚吡咯的成核及膜生长, 由于膜不断生长, 电流呈上升趋势. 根据电沉积的成核理论<sup>[12]</sup>, 我们采用二元回归的方法求得这一阶段的电流随时间的变化关系为:  $i(t) = 0.0302t^{1/2} + 0.00660t^{3/2} - 0.1080$  (其中  $t^{1/2}$  和  $t^{3/2}$  项分别为“膜生长”过程和“新核的形成”过程对总电流的贡献). 当聚吡咯膜生长一段时间以后, 由于聚吡咯膜与溶液本体吡咯单体之间扩散层厚度增大, 电流又随  $t^{-1/2}$  下降. 溶液中加入 GOD 后, 聚吡咯的“成核”和“膜生长”过程的电流随时间的变化关系为:  $i(t) = 0.0155t^{1/2} + 0.00413t^{3/2} - 0.0350$ , 对比两者的电流随时间的变化关系可知, 加入 GOD 以后, 使聚吡咯的“成核”和“膜生长”过程均变慢.

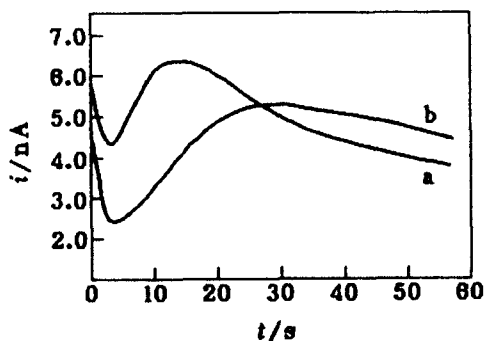


图 3 GOD 对吡咯恒电位聚合过程的影响  
[ $E = 0.85 \text{ V (vs. SCE)}$ ]

a 溶液中不含 GOD 时吡咯聚合过程的电流-时间曲线;  
b 溶液中含 GOD 时吡咯聚合过程的电流-时间曲线

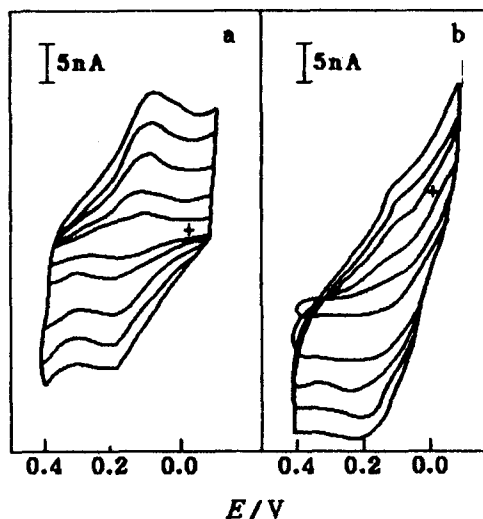


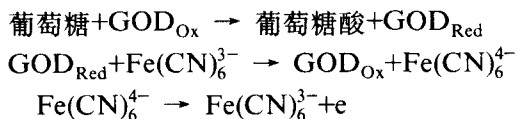
图 4 GOD/Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>/PPy 电极在 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图

a: 溶液中不含葡萄糖; b: 溶液中含葡萄糖 (0.02 mol·L<sup>-1</sup>);  
扫描速度 (mV·s<sup>-1</sup>) 分别为: 10, 25, 50, 75, 100

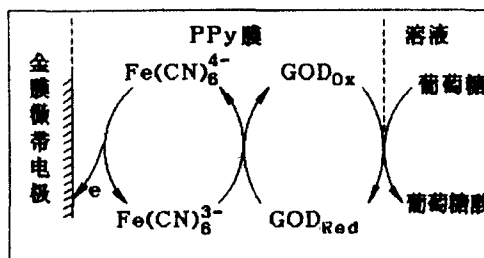
## 2.3 GOD 与电子传递媒体 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> 同时固定

GOD 在催化底物葡萄糖的氧化过程中自身被还原, 为了使酶反应持续下去, 必须让还原态的 GOD 迅速转化为氧化态的 GOD. 在自然的酶反应中还原态的 GOD 是依靠分子氧使之转化为氧化态的 GOD, 但依据这一转化反应制成的传感器, 工作电位较高[一般为

0.7V (vs. SCE)], 且要求氧浓度恒定. 为了改善葡萄糖生物传感器的工作条件, 使它能在无氧条件下进行葡萄糖的测定, 可以在 GOD 固定的同时固定一种能使 GOD 从氧化态转化为还原态的电子传递媒体. 我们选择了  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  作为电子传递媒体, 将它与 GOD 同时固定在 PPy 修饰微带金电极上, 它的循环伏安图如图 4(a) 所示 (图中已用 M270 所建议的方法扣除了 PPy 很大的充电电流). 在溶液中加入葡萄糖以后, 电极的循环伏安图如图 4(b) 所示, 其氧化电流明显变大, 而还原电流则变小直至消失, 显示了明显的电催化效应, 其反应过程可表示如下:



由于超微电极具有很高的传质速率, 因此用超微电极检测溶液中速率常数较小的电催化反应一般较困难<sup>[13]</sup>, 而以上的实验表明, 如将 GOD 和  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  同时固定在电极表面, 可发生明显的电催化效应, 这也为用超微电极研究电催化体系提供了一条有用途径.



## 2.4 酶电极对葡萄糖的响应

2.4.1 GOD / PPy 和 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应 图 5(a) 和图 5(b) 分别是 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 和 GOD / PPy 电极对葡萄糖的响应电流曲线. 不含电子传递媒体  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  的电极在加入葡萄糖 10min 后才能达到稳态, 而含  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  的电极则在加入葡萄糖 2min 后即可达到稳态, 响应速度提高很多. 稳态电流  $i$  与葡萄糖浓度  $c$  的关系如图 6 所示. 当  $c$  较小时,  $i$  随  $c$  线性变大; 当  $c$  较大时,  $i$  与  $c$  基本无关. 表现出 Michealis-Menten 动力学特征.

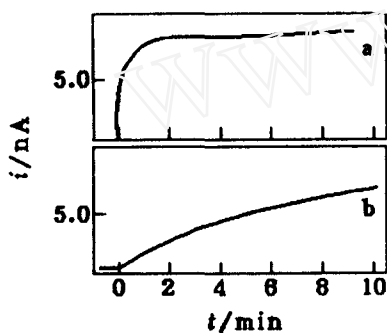


图 5 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy (a) 和 GOD / PPy (b) 电极对葡萄糖 ( $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的响应曲线

2.4.2 PPy 膜厚度对电极催化葡萄糖氧化的影响 结果表明, GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应受聚吡咯膜厚度的影响 (如图 6). 聚吡咯膜的厚度有一个最佳值, 太厚的膜使 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应降低, 实验中以  $200\text{mC} / \text{cm}^2$  的电量制备的 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应最好. 制备酶电极时消耗的电量愈多, 意味着被固定在电极表面的 GOD 也愈多, 但由于 GOD 是大分子, 在 PPy 膜中不能扩散, 而 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极催化葡萄糖的氧化是在电极 / 溶液界面上发生的, 而  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  的氧化是在电极 / PPy 界面上发生的, 聚吡咯膜厚了以后,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  和  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  在聚吡咯中的扩散时间变长, 阻力增大, 使 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应电流减小; 聚吡咯膜太薄, 被固定的 GOD 和  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  的量少, 响应电流也较小.

2.4.3 溶液中溶解氧对电极响应葡萄糖的影响 图 7 表明 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应还受溶液中氧的影响, 溶液中氧的存在使 GOD /  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  / PPy 电极对葡萄糖的响应增大, 这是由于在测定葡萄糖时, 使用的恒电位为 +0.3V (vs. SCE), 这一电位已能氧化电极上产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 使其响应电流变大.

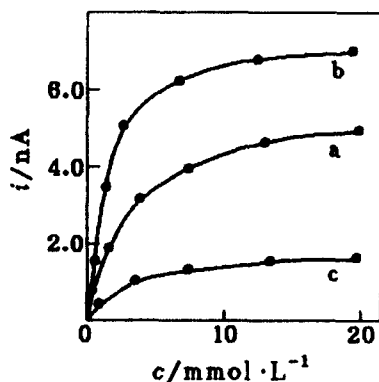


图6 PPy膜厚度对 GOD / Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> / PPy 电极响应葡萄糖的影响  
制备电极时消耗的电量 (mC·cm<sup>-2</sup>) 分别为:  
a 100; b 200; c 400

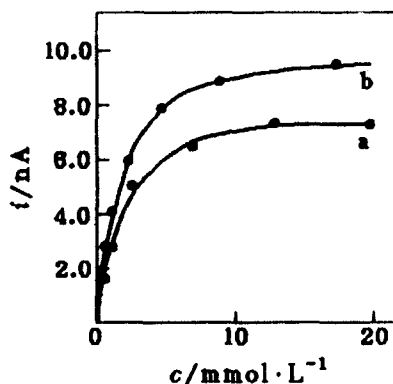


图7 溶液中氧对 GOD / Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> / PPy 电极响应葡萄糖的影响  
a 溶液通 N<sub>2</sub> 除氧, b 溶液用氧饱和

### 参考文献

- 1 Wollenberger, U.; Kuhn, M.; Scheller, F., *Bioelectrochem., Bioenerg.*, **1983**, *11*, 307.
- 2 Narasimhan, K.; Wingard, L.B., *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2984.
- 3 Oyama, N.; Ikeda, S.; Suzuki, M.; Obsaka, T., *Electroanalysis*, **1991**, *3*, 665.
- 4 Degani, Y.; Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 2615.
- 5 Fould, N.C.; Lowe, C.R., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, **1986**, *82*, 1259.
- 6 Umana, M.; Waller, J., *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2979.
- 7 Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G., *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, *224*, 37.
- 8 郑智敏, 吴辉煌, 周绍民, *物理化学学报*, **1991**, *7*(2), 163.
- 9 Pandey, P.C., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, **1988**, *84*, 2259.
- 10 蔡称心, 鞠焯先, 陈洪渊, *高等学校化学学报*, 待发表.
- 11 Miller, L.L.; Zinger, B.; Zhou, Q.X., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 2267.
- 12 鞠焯先, 陈洪渊, *化学学报*, **1991**, *49*, 694.
- 13 Hill, H.A.O.; Klein, N.A.; Psalti, I.S.M.; Walton, N.J., *Anal. Chem.*, **1989**, *61*, 2200.

## Electrochemical Behavior, Application and Immobilization of Glucose Oxidase at Nanometer-Sized Ultramicroband Gold Electrode

Cai, Chen-Xin    Ju, Huang-Xian    Chen, Hong-Yuan \*

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210093)

**Abstract** The immobilization of glucose oxidase, as well as simultaneous immobilization of glucose oxidase and Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> as an electron mediator in polypyrrole film was successfully accomplished at a nanometer-sized ultramicroband gold electrode to provide a simple biosensor for detecting glucose without mediator in solution. The GOD / PPy electrode was characterized by IR spectrum and cyclic voltammetry. The electropolymerization process of pyrrole and the effects of glucose oxidase on the electropolymerization pyrrole were also studied with chronoamperometry. The effects of polypyrrole thickness and oxygen in solution on the determination of glucose at GOD / Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> / PPy microelectrode were discussed.