

苯胺的电聚合及其酶固定化条件的研究

吴霞琴 曹大均 蒋慧雯*
(化学系)

提 要 本文探索了适合电化学方法固定葡萄糖氧化酶(GOD)的苯胺电聚合条件. 通过比较不同实验条件下电极上固定的酶活力和测定电化学方法固定 GOD 的聚苯胺膜修饰铂金电极(GOD-PAn/Pt 电极)对葡萄糖浓度的响应特性, 讨论了酶在聚苯胺膜内固定的机理.

关键词 聚苯胺; 电聚合; 葡萄糖氧化酶; 电化学固定; GOD-PAn/Pt 电极

中图法分类号 O646.54

近年来, 生物传感器领域的研究热点之一, 是寻找生物活性酶在电极上的直接固定方法, 实现其在电极上的直接、快速的电子传递过程, 从而使制成的生物传感器的响应更灵敏、更迅速、更趋微型化. 而吡咯及其衍生物和苯胺等一类导电高分子聚合膜在电极上的修饰则是实施酶的电化学固定化的关键. 苯胺在硫酸、高氯酸和盐酸等酸性溶液中易聚合^[1,2], 但此 pH 条件下变性、失活等原因, 显然不适宜于酶的固定化研究. 笔者探索了氯化钾水溶液中, 苯胺在铂金电极上的电化学聚合条件. 实验结果表明, 酶的电化学固定与聚苯胺膜在电极上的生长速度、结构形态密切相关, 也就是与苯胺聚合的介质条件、聚合电位、时间等诸因素有关. 本实验条件下得到的电极对葡萄糖有很好的响应特性. 10mmolL^{-1} 以内呈线性响应, 响应时间小于 20s.

1 实验部分

1.1 仪器

DJS-292型恒电位仪(上海雷磁仪器厂), DCG-1型多功能程序给定器(吉林省龙井电讯器材厂), L23-304型 X-Y 函数记录仪(上海自动化仪器二厂), 75-2C 紫外/可见分光光度计(上海第三分析仪器厂), CQ50型超声波清洗器(上海超声波仪器厂), 840型扫描电子显微镜(日本日立公司).

电化学实验中的研究电极和辅助电极分别是 $7\text{mm} \times 7\text{mm}$ 的铂金片和 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 的铂金片. 饱和甘汞电极用作参比电极, 故实验中所测电位均相对于饱和甘汞电极的电位. 其中, 已经过聚苯胺修饰的研究电极再次使用前, 可按下述操作步骤进行清洗. 先将电极浸入 50% 醋酸溶液中超声清洗, 取出后换用二次蒸馏水超声清洗. 然后, 应用循环伏安技术在 0.3molL^{-1} 硝

本文于1992年10月23日收到.

* 上海师大89级本科毕业生.

酸溶液中,选择 $-0.2-1.2\text{V}$ 的电位范围内,以 100mVs^{-1} 的扫描速度进行电化学处理,即扫至循环伏安曲线重合,取出用二次水冲洗、待用.

1.2 试剂

苯胺(进口分装),使用前蒸馏.葡萄糖氧化酶(GOD, TOYOBO, Co, Ltd, OSAKA, JAPAN).其他试剂均为分析纯,研究溶液用二次水配制.

1.3 实验方法

1.3.1 在苯胺电聚合的同时进行 GOD 的电化学固定(共聚固定) 将预处理后的铂电极与辅助电极、参比电极浸入含有 0.1molL^{-1} 苯胺和 GOD(1mg/ml)的氯化钾(1.0molL^{-1})水溶液中,在 0.8V 电位下聚合 10min .

1.3.2 酶在聚苯胺膜修饰电极上的电化学固定(分步固定) 先将预处理干净的铂研究电极浸入含有苯胺(0.1molL^{-1})的氯化钾(1.0molL^{-1})或盐酸(1.0molL^{-1})水溶液中,在一定的电位下进行苯胺的电聚合,然后将此聚苯胺膜修饰电极在 GOD(1mg/ml)溶液中, 0.8V 电位下氧化 20min ,实施酶的电化学固定.

1.3.3 酶固定化前的还原操作 按分步固定的实验操作,先将聚苯胺膜修饰电极置于 pH5.9 的 HAc-NaAc 缓冲液中,在 -0.5V 电位下还原 20min ,然后再进行 GOD 的固定化操作.

1.3.4 应用多次循环伏安技术,选择 $0-1.4\text{V}$ 电位范围,以 10mVs^{-1} 的扫描速度进行苯胺的电聚合.在 pH5.9 的缓冲溶液中, -0.5V 电位下还原 20min ,最后在 GOD(1mg/ml)溶液中, 0.65V 电位下氧化 20min ,以固定酶.

1.3.5 电极上酶活力的估测 应用分光光度法^[3,4],参照溶液中酶活力的测定原理和方法,依据下式来估测电极上固定的酶活力.

$$\text{GOD 活力}(\text{mol s}^{-1}/\text{mg}) = 7.60 \times 10^{-9} \times \Delta A_{500}$$

式中, ΔA 为电极浸入含一定浓度的葡萄糖和 4-氨基安替吡啉溶液前与后测得的吸光度变化,反应时间为 1min ,反应液体积为 3ml .

1.3.6 对葡萄糖响应特性的测定 将实验中制备的聚苯胺膜修饰 GOD 电极作为工作电极与铂片辅助电极和饱和甘汞电极组成葡萄糖传感器的测量系统.测定在 0.8V 的恒电位下进行.先将三电极插入 20ml pH7 的磷酸缓冲液中,搅拌至电流值稳定.然后,加入一定浓度、一定体积的葡萄糖溶液(已达到旋光异构平衡),搅拌 20s ,记录下电流响应的最大值,由此,以葡萄糖浓度对相应的电流值作图,就得到该电极对葡萄糖的响应曲线.

电化学实验在室温下进行.酶活力测定则在 30C 恒温下进行,测酶活力前,电极(已固定 GOD)冷藏保存.

2 实验结果与讨论

2.1 不同聚苯胺修饰方法对 GOD 固定化的影响

图1是在含苯胺的氯化钾溶液中,应用循环电位扫描技术实施苯胺聚合时记录的伏安曲线.与 pH7 磷酸缓冲液作介质时苯胺电聚合的情况相同,回扫时未出现还原电流峰,表明中性介质条件下苯胺的聚合为一不可逆电极过程.与文献中报道的不同之处,则是在 KCl 介质中可见 3 处氧化电流峰.可以认为,第一处峰是苯胺被氧化为苯胺阳离子,而第二个大峰才是苯胺的氧化聚合峰.此时,在电极上可看到有棕色的苯胺膜生成.当继续循环扫描时,由于聚合膜的生成,相对来说,此时电极上的电子传递过程要比裸露的铂金电极上差得多.因此,第二次循环伏安曲线上的峰电流值急剧降低.尽管随扫描次数的增加,电流值仍有所降低,但从电极上膜

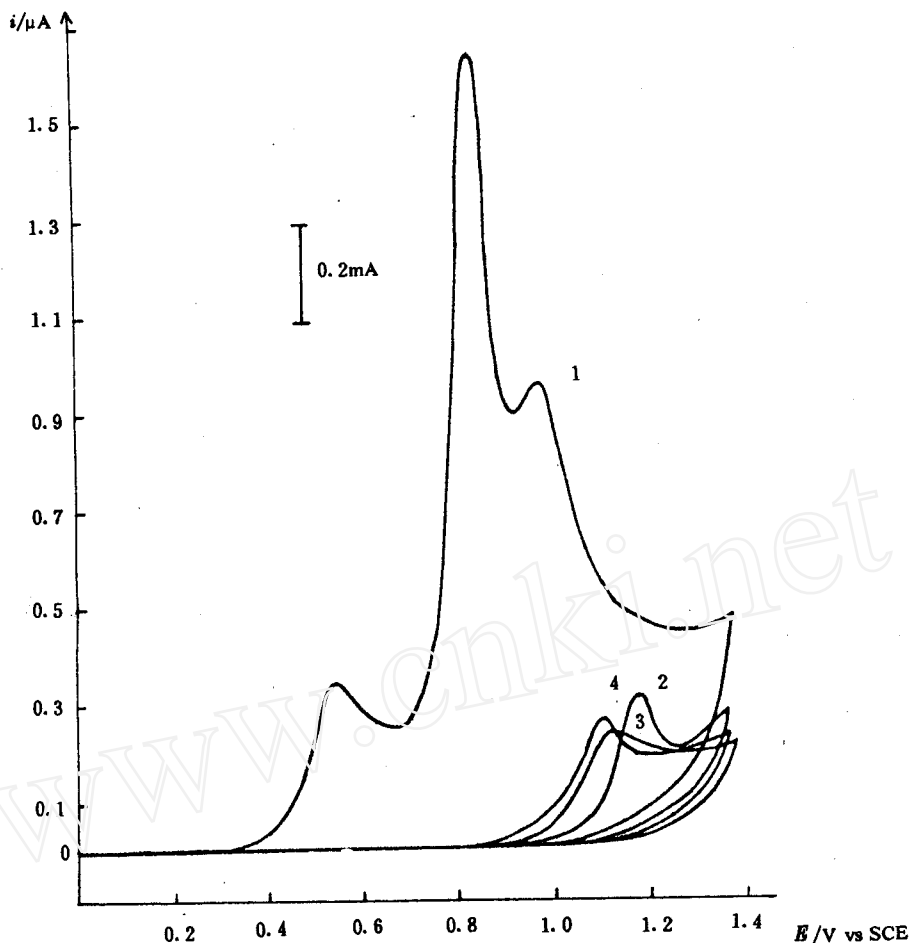


图1 氯化钾(0.1molL⁻¹)介质中苯胺(0.1molL⁻¹)电聚合的伏安曲线
 Fig. 1 Cyclic voltammograms for electropolymerization of aniline in aqueous solution containing 0.1 mol/L KCl at 10 mV/s on Pt electrode
 扫描速度为10mVs⁻¹,1,2,3,4为扫描顺序

颜色的不断加深可以判断仍有苯胺聚合上去. 为了比较膜厚度对酶固定化的影响, 我们分别扫描5, 10和20次后, 按1. 3. 4中描述的实验方法进行酶的固定化. 实验结果表明, 膜层增厚固定的酶活力高, (表1)

表1 扫描次数对酶固定化的影响

Tab. 1 The effect of number of potential cycles on the immobilization of GOD

扫描次数/次	5	10	20
GOD 活力/(mmol s ⁻¹ ·cm ⁻²)	3.88×10 ⁻⁷	5.58×10 ⁻⁷	6.83×10 ⁻⁷

也就是说有利于提高对葡萄糖浓度响应的灵敏度.

为了比较不同的电聚合方法对酶固定化的影响, 同时也便于缩短实验时间, 我们又用定电位方法进行了苯胺的电聚合, 即在0.8V 恒定电位下聚合3min, GOD 固定操作同前. 电极上酶

活力的测定结果表明,此条件下固定的酶活力相当于循环扫描10次得到的聚苯胺修饰电极上固定的量.为此,最后选定恒电位方法进行聚苯胺对铂金电极的修饰.

2.2 不同聚合时间对 GOD 固定的影响

按1.3.2的步骤,在含苯胺(0.1molL^{-1})的 KCl (1.0molL^{-1})溶液中,将电位恒定于 0.8V ,分别聚合3,10min,然后进行 GOD 固定化操作.多次实验结果表明,聚合时间长,聚合膜增厚,并未对酶的固定带来益处.从表2数据来看,聚合10min后固定的酶活力反而低于3min的.

表2 中性介质中不同聚合时间对酶固定化影响

Tab. 2 The effect of electropolymerized times in neutral electrolytic solution on the immobilization of GOD

聚合时间/min	3	10
GOD 活力/ $(\text{mmols}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$	5.58×10^{-7}	4.35×10^{-7}

在酸性介质中,聚合时间对酶固定的影响更显著.当用 $1.0\text{molL}^{-1}\text{HCl}$ 代替相同浓度的 KCl 时,酶活力测试结果表明,聚合3min后固定的酶活力远远高于聚合10min的(表3).

表3 酸性介质中不同聚合时间对酶固定化影响

Tab. 3 The effect of electropolymerized times in acidic electrolytic solution on the immobilization of GOD

聚合时间/min	3	10
GOD 活力/ $(\text{mmols}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$	1.70×10^{-8}	7.92×10^{-7}

比较表2与表3的数据可以得出这样的结论,即酸性介质中得到的聚苯胺电极上有利于酶的固定.但如盐酸这类酸性介质中得到的聚苯胺膜非常疏松,易脱落,难以形成实用的生物传感器.

2.3 苯胺在不同介质中聚合对酶固定的影响

从表2,表3的数据中还可看到,在酸性介质中聚合3min得到的酶活力是相同实验条件下中性介质中的3倍多,说明 GOD 在酸性介质中得到的聚苯胺膜修饰电极上的固定优于中性介质中得到的修饰电极.这是由于聚苯胺的氧化还原过程是 H^+ 的消长过程,因而苯胺在 H^+ 离子浓度较高的酸性条件下聚合比在中性条件下容易.扫描电镜对两种介质条件下得到的聚苯胺膜的结构形态的初步观察也表明,不同介质条件下得到的膜结构不同.一般来说,酸性介质中得到的聚苯胺膜为多孔状,而中性介质中膜结构为不规则的颗粒状,如图2所示.显然,前者较为疏松的结构更有利于 GOD 的嵌入.

将在盐酸或氯化钾两种介质条件下,按1.3.2和1.3.3节中所述实验操作制备的 GOD-PAn/Pt 电极与饱和甘汞电极和铂辅助电极组成传感器.在 0.8V 电位下,测得对葡萄糖浓度的响应曲线示于图3.可看到两种电极对葡萄糖响应的灵敏度无明显差别,但中性的氯化钾中聚合制备的电极的线性范围较宽($0-11\text{mmolL}^{-1}$).两类电极的响应时间均为 $\leq 20\text{s}$,在低于 10mmolL^{-1} 浓度时,几秒钟内即达到稳定的响应电流.从图3还可发现在相同浓度的葡萄糖浓度下,两类电极的响应电流竟相差10倍左右,这是因为盐酸介质中聚苯胺膜导电性较好,即膜电阻小.但在实验操作中观察到,盐酸介质中的聚合膜极易脱落.且由于生物活性酶的变性、失活等问题,不能在进行苯胺聚合的同时固定酶.因此,权衡之下,在氯化钾一类中性介质中制备 GOD-PAn/Pt 电极更具实际意义.

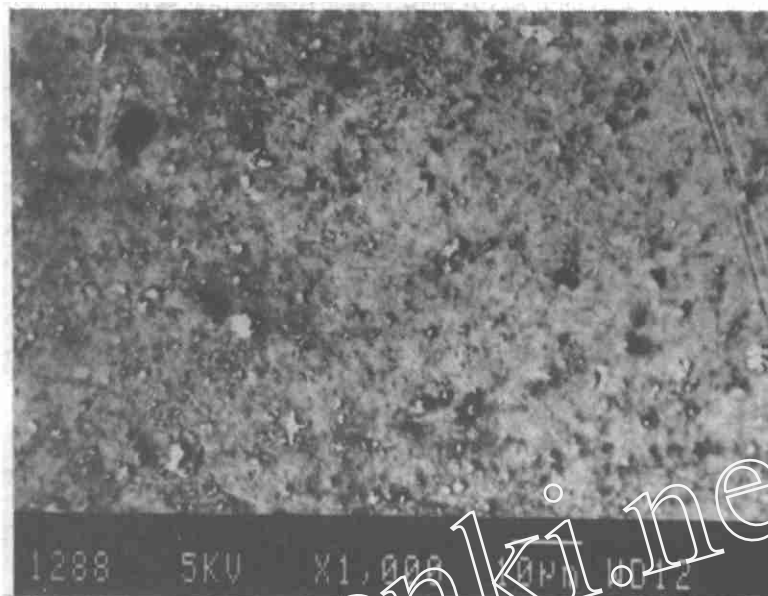


图2 氯化钾($1.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液中电聚合的聚苯胺膜的扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron micrograph of PAN/Pt electrode

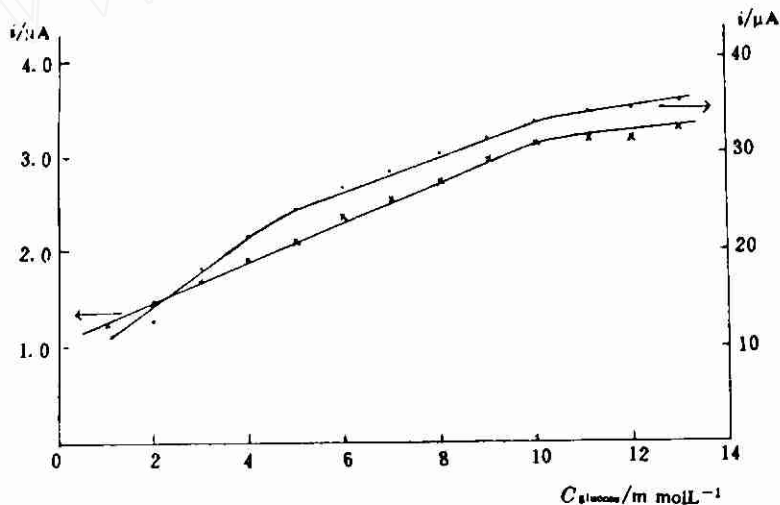


图3 不同介质中聚合的电极对葡萄糖浓度的响应曲线

Fig. 3 Response curves of GOD-PAN/Pt electrode for glucose

×, 为中性介质, ·, 为酸性介质中聚合

2.4 有无还原操作步骤对 GOD 固定的影响

按照文献[1,6]所述,在酸性介质中经苯胺修饰的电极,在一定电位下经还原操作后,可将掺杂形式进入聚苯胺膜内的阴离子除去,此时,在适当的氧化电位下可将荷负电的 GOD 嵌入阴离子除去后留下的空穴内,从而提高酶的固定化效率.我们选择了阴离子为相同的 Cl^- 离子

的氯化钾和盐酸作苯胺聚合的介质,分别作了有无还原操作对酶固定化的影响试验.

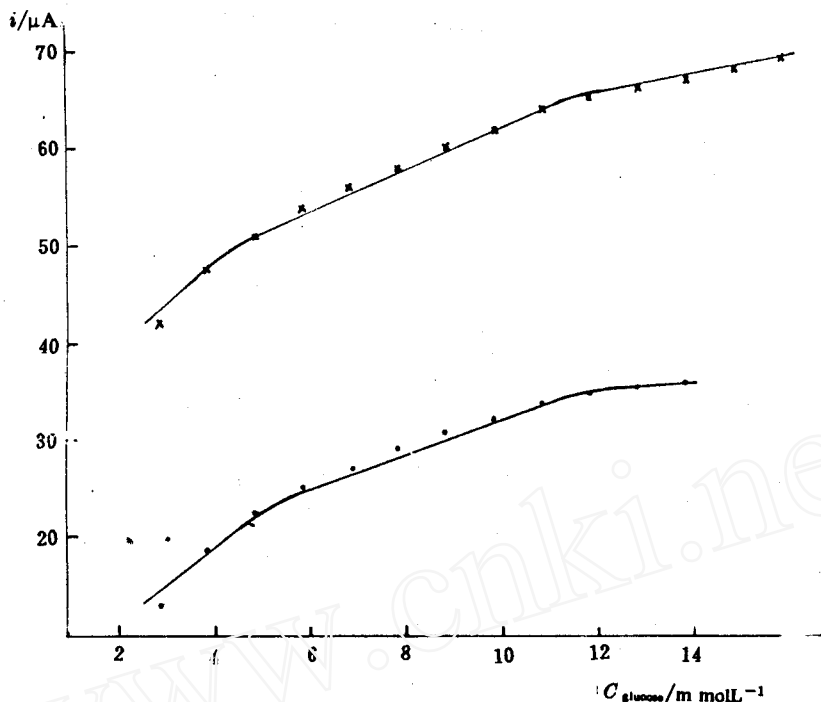


图4 不同固定化操作的 GOD-PAn/Pt 电极对葡萄糖响应曲线(酸性介质中聚合)

Fig. 4 Response curves of GOD-PAn/Pt electrode for glucose

•, 经还原后, ×, 未经还原固定 GOD

表4的数据表明,无论是 KCl 还是 HCl 介质中聚合,均是未经还原操作直接固定酶的电极上酶活力高.而图4所示的对葡萄糖响应曲线则表明,两种操作步骤下制备的电极的响应灵敏度无显著差别,只是未经还原操作的电极响应电流稍大.这是由于经还原操作后固定上去的 GOD 填充了原本导电性较强的阴离子所致.综合以上各种结果可以认为,酶在聚苯胺膜内的固定化机理并非单一的阴离子进入或排出,而可能是一个包括包埋、吸附等综合性的复杂过程.其中,不同阴离子的掺杂效应等将有待于进一步细致的探索.

表4 有无还原操作对酶固定化的影响

Tab. 4 The effect of reduce process on the immobilization of GOD

聚合介质	GOD 活力/(mmols ⁻¹ ·cm ⁻²)	
	有	无
1.0molL ⁻¹ KCl	3.88×10 ⁻⁷	7.45×10 ⁻⁷
1.0molL ⁻¹ HCl	7.92×10 ⁻⁷	1.32×10 ⁻⁶

2.5 不同聚合电位对酶固定化的影响

根据苯胺聚合的循环伏安图(图1),分别选择0.8,1.0和1.4V 3个电位下进行苯胺的定电

位聚合,聚合时间及以后的 GOD 固定化操作步骤均相同,测得的电极上的酶活力列于表5.

表 5 不同聚合电位对酶固定化的影响

Tab. 5 The effect of the potential of electropolymerization on the immobilization of GOD

聚合电位/V	0.8	1.0	1.4
GOD 活力/(mmols ⁻¹ ·cm ⁻²)	7.45×10 ⁻⁷	7.28×10 ⁻⁷	7.28×10 ⁻⁷

表中数据表明,在这3个电位下进行苯胺的电聚合后固定的 GOD 活力几乎无变化.由此可以断定在0.8—1.4V 的电位范围内制得聚苯胺膜修饰电极,并不影响酶的固定.

2.6 不同介质浓度对 GOD 固定化的影响

当苯胺浓度不变(0.1molL⁻¹),而将介质氯化钾分别取1.0molL⁻¹和0.1molL⁻¹两种浓度,同样先在0.8V 下进行苯胺聚合,然后再固定 GOD 得到的结果表明,电极上酶活力随苯胺聚合时的介质浓度增高而增大(表6),且增大幅度较大.

表 6 不同介质浓度对酶固定化的影响

Tab. 6 The effect of the concentrations of KCl on the immobilization of GOD

KCl 介质浓度/molL ⁻¹	0.1	1.0
GOD 活力/(mmols ⁻¹ ·cm ⁻²)	1.87×10 ⁻⁷	5.12×10 ⁻⁷

2.7 GOD 随苯胺电聚合时的固定(共聚固定)和分步固定对电极上酶活力的影响

酶在酸性条件下会发生变性、失活,故本实验只能在中性介质中进行.表7中所列数据是在0.8V 电位下,1.0molL⁻¹KCl 为介质,共聚固定和分步固定的电极上的酶活力.测得数据表明,分步固定方法电极上的酶活力稍大于共聚固定,也就是说分步固定效果较佳,这是由于 GOD 的存在与否会对聚苯胺膜结构产生一定的影响,详细的机理还有待于进一步的研究来证明.

表 7 共聚固定与分步固定对酶固定化的影响

Tab. 7 The effect of the different methods on the immobilization of GOD

实验方法	共聚	分步
GOD 活力/(mmols ⁻¹ ·cm ⁻²)	6.05×10 ⁻⁷	7.45×10 ⁻⁷

综上所述,在中性介质中也可以得到聚苯胺膜修饰电极.在0.8—1.4V 电位范围内,含1.0molL⁻¹KCl 的苯胺溶液中,定电位聚合3min,然后进行酶的固定化操作,可得到对葡萄糖浓度响应较好的 GOD-PAn/Pt 电极.

有关结果讨论中所涉及的机理问题,以及如何进一步提高该葡萄糖传感器的灵敏度、寿命等响应特性,正在进行探讨之中.

参 考 文 献

- [1] G. Zotti S. Cattarin and N. Comisso, *J. Electroanal. Chem.*, 1988, 239; 387
- [2] Akira Kitani, Jinko Izumi, Jun Yano, et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984 57; 2254
- [3] G. G. Guilbault, 缪辉南, 陈石根译, 酶法分析手册, 上海科技出版社, 1983
- [4] 袁中一, 朱天民, 李士云等, 生物工程学报, 1989, 5(2); 165
- [5] Hiroaki Shinohara, Tsuneo Chiba, Masuo Aizawa, *Sensors and Actuators*, 1988 13; 79
- [6] Mu Shaolin, Xue Huaiguo, Qian Bidong, *J. Electroanal. Chem.*, 1991, 304(7)

The Study of the Electrochemical Conditions Used for Polymerization of Aniline and Immobilization of Glucose Oxidase

Wu Xiqin Cao Dajun Jiang Huiwen

(Department of Chemistry)

Abstract

The electrochemical methods of preparing polyaniline film for electrochemical immobilization of glucose oxidase (GOD) are investigated. The activities of GOD which is electrochemically immobilized on a polyaniline-coated platinum electrode are measured and compared with various experimental conditions. The responses of GOD-polyaniline film deposited on platinum plate electrode (GOD-PAN/Pt) to the concentration of glucose are determined. The mechanism of GOD which is immobilized on PAN/Pt electrode is also discussed.

Keywords polyaniline; electrochemical polymerization; glucose oxidase (GOD); electrochemical immobilization; GOD-PAN/Pt electrode