

环糊精聚合物与苯醌的分子包合作用 及其在酶电极中的应用

吴宝璋 吴辉煌*

(厦门大学化学系 固体表面物理化学国家重点实验室 厦门 361005)

摘要 研究了水溶性环糊精预聚合物的存在对苯醌/氢醌体系在铂电极上氧化还原行为的影响,根据伏安曲线讨论了该预聚合物与苯醌的分子包合作用. 环糊精预聚合物与戊二醛缩聚反应而形成的不溶性聚合物膜用于葡萄糖氧化酶的固定化,以制得新型的第二代葡萄糖电极. 由于分子包合作用,作为电子受体的苯醌在含酶的环糊精聚合物膜中具有较高的浓度,从而加速了固定化酶的电子传递. 测定了酶电极上 BQ 反应的动力学参数.

关键词 分子包合作用, 超分子电化学, 聚环糊精主体, 苯醌客体, 葡萄糖氧化酶电极

环糊精聚合后仍保留其单体作为主体跟客体分子形成非共价配合物的性能^[1,2], 因此不溶性环糊精已被用于发展选择性传感器^[3]和其它技术^[2]. 在本工作中我们用 α -环糊精聚合物(PCD)将葡萄糖氧化酶(GOD)固定化以制得 GOD/PCD 膜电极, 并讨论聚环糊精与具氧化还原性能的客体的分子包合作用及其对所得酶电极性能的影响. 苯醌(BQ)常用作 GOD 的电子受体, 它能快速地与还原态 GOD 进行电子交换而使酶氧化再生^[4~6], 而且 BQ 的分子尺寸与 α -环糊精分子中由 6 个葡萄糖单元构成的内腔大小较为匹配^[1], 因此本工作以 BQ 和 α -CD 聚合物为模型体系进行研究.

1 实验条件和方法

1.1 试剂与溶液

葡萄糖氧化酶(E. C. 1.1.3.4, 简称 GOD, 来源于黑曲霉, 18500 u/g)、 β -D-葡萄糖和 1,4-苯醌均购自 Sigma 公司. α -环糊精预聚合物(简写 CD, 平均分子量 4000, Budapest 环糊精研究开发实验室产品), 戊二醛(简称 GD, Fluka 公司产品). 其它试剂为国产分析纯试剂. 所有溶液用二次蒸馏水配制, 支持电解质溶液为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0, 用高纯氮除氧.

1.2 仪器

电化学测定用 XHD-1 恒电位仪和 LM-15 记录仪. 采用三室电解池, 铂片为辅助电极, 饱和甘汞电极为参比电极.

* 男, 54 岁, 博士生导师

收稿日期: 1996-12-03, 国家自然科学基金资助课题(29233080)

1.3 不溶性环糊精聚合物的合成和 GOD/PCD 酶电极的制备

不溶性环糊精聚合物可由环糊精预聚合物和戊二醛缩合反应而得^[7],但根据本工作的实际需要,经多种方案比较,选择了如下的具体步骤:

(1)将 10 μ L 2% CD, 20 μ L 0.1 mol/L GD 和 13 μ L 0.1 mol/L HCl 的水溶液混合,制得溶液 A. 用微量注射器将指定量的溶液 A 移放在固体电极表面上,随即置于充氮的干燥器中,室温下待水分蒸发,最终在电极表面上形成不溶性的聚合物(PCD)膜. 膜的厚度由置于基体电极表面上的制膜溶液的用量加以控制. 用铂、金和玻碳三种电极进行比较实验,发现所得聚合物膜与玻碳的结合力最好,长时间浸泡在水溶液中不易脱落. 因此,我们用玻碳作为酶电极的基体,而以铂为基体的 PCD 膜电极只用于一般性能实验.

(2)在溶液 A 中加入适量的 GOD,并按上述制作聚合物膜电极的相同步骤制得以玻碳为基体的、酶含量不同的 GOD/PCD 膜电极,后者保存于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(4 $^{\circ}$ C)中备用.

(3)在溶液 A 中加入适量的 BQ,用上述方法制得含 BQ 的聚合物膜电极.

2 结果和讨论

2.1 环糊精预聚合物的存在对 BQ 伏安行为的影响

图 1 曲线 a 是 2 mmol/L BQ 溶液中铂电极的循环伏安图,当试验溶液含可溶性环糊精预聚合物 CD 时,伏安曲线发生了曲线 b~d 所示的变化:随着 CD 浓度的增大,电流峰的位置没有明显改变,但氧化还原电流减小. 这种现象可解释为 BQ 与 CD 形成了分子包合物,从而减小了自由态 BQ 的浓度,况且包合物中的 BQ 不能直接地在电极上反应. 从图 1 尚可看出,当 CD 浓度足够大时氧化电流几乎完全消失,说明苯醌的还原产物氢醌也能与 CD 形成包合物,但客体分子的结构差异将导致主客配位作用的强弱不同. 显然,伏安图的变化可用于超分子化合物及主客作用的研究,但目前这方面的工作尚少. 限于本文的目的,这里仅就环糊精预聚合物与苯醌的配位常数进行估算. 包合作用可表示为



BQ-CD 代表包合物, n 值是每个环糊精预聚合物所能结合的客体分子数目. 若上式达到平衡,则存在如下关系:

$$[\text{BQ-CD}]/[\text{CD}] = K[\text{BQ}]^n \quad (2)$$

式中方括号表示各相关物种的浓度, K 为平衡常数. 假如图 1 伏安曲线上的还原电流只由自由态 BQ 的还原所引起,则不同 CD 浓度下的自由态 BQ 浓度与峰电流 I 的关系为

$$I/I_0 = [\text{BQ}]/[\text{BQ}]_0 \quad (3)$$

I_0 是试验溶液不含 CD、苯醌浓度为 $[\text{BQ}]_0$ 时的峰电流值. 由化学计量关系不难得到

$$[\text{BQ-CD}] = [\text{BQ}]_0(1 - I/I_0)/n \quad (4)$$

$$[\text{CD}] = [\text{CD}]_0 - [\text{BQ}]_0(1 - I/I_0)/n \quad (5)$$

$[\text{CD}]_0$ 是 CD 的初始浓度. 若已知 n 值,根据式(3),(4)和(5),由峰电流值以及 $[\text{CD}]_0$ 和 $[\text{BQ}]_0$ 值可求得式(2)中各相关物种的浓度. 由尝试法可知:当 $n=1$ 时,将图 1 伏安曲线上的还原峰电流值代入式(3),(4)和(5)求出各物种的浓度,然后将 $[\text{BQ-CD}]/[\text{CD}]$ 值对相应的 $[\text{BQ}]$ 值作图,可得较好的直线关系(见图 2),据此求出 K 值为 2.6×10^2 L/mol. 为了比较,图 2 中用虚

线示出 $n=2$ 时的关系曲线. Yamada 等^[8]曾利用分光光度法研究 α -环糊精与 1,4-苯醌的包合作用,认为二者形成 1:1 配合物并求得 K 值为 $2.1 \times 10^2 \text{ L/mol}$. 图 2 提供的结果与其相近. 本实验用的环糊精预聚合物的平均分子量为 4000, 相当于每个分子最多可跟 4 个 BQ 分子结合, 不过所用的 CD 浓度较大, BQ 趋于分散地与各 CD 分子结合, 而不是集中地与少数几个 CD 分子结合, 因此 $n=1$ 是合理的. 以上 K 值的估算对了解体系的性质有一定帮助.

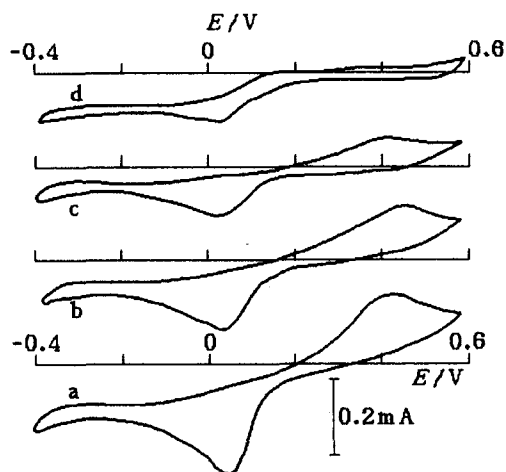


图 1 铂电极在含 2mmol/L BQ 的 pH7.0 磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图
扫描速度 50mV/s, CD 浓度 (mmol/L):
曲线 (a) 0, (b) 2, (c) 4, (d) 6

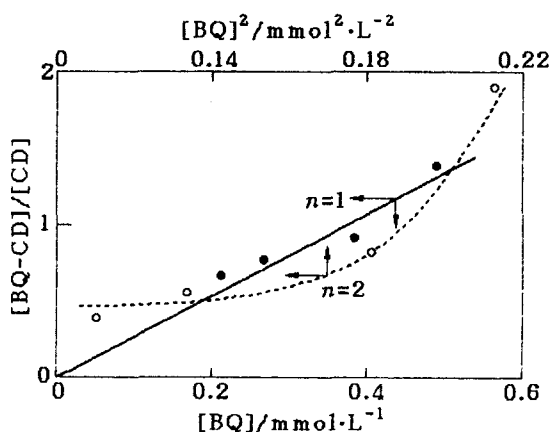


图 2 $[\text{BQ-CD}]/[\text{CD}]$ 值对相应的 $[\text{BQ}]$ 值的关线曲线

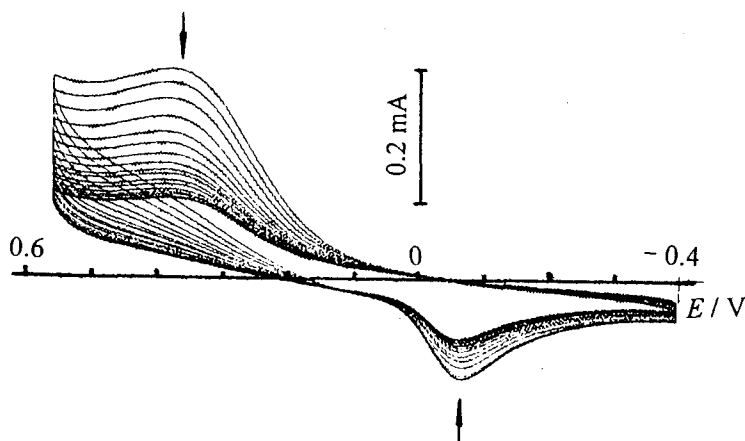


图 3 新制备的含酞 PCD 膜电极在 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图
扫描速度 50mV/s

图 3 示出新制备的含酞 PCD 膜电极在空白试验溶液中进行多次连续电位循环扫描所得的伏安曲线, 随着电位扫描次数的增加, 峰电流不断降低, 最后达到稳定值, 表明 PCD 膜具有良好的通透性能, 预先包藏于聚合物基质中的 BQ 及其生成的还原态物种 HQ 会在电位循环扫描过程中逐渐分散到溶液中. 显然, 只有那些可在聚合物膜中自由扩散的 BQ 分子才能有效地与酶的氧化还原中心进行电子交换. 本实验用的膜电极只含 0.4mg BQ, 当所有的 BQ 分子

完全分散在空白试验溶液(10mL)中,其浓度仅为 0.44mmol/L. 按此浓度估算还原峰电流理应为图1曲线a的1/5至1/4,然而图3所示的稳定氧化还原电流值竟超过图1曲线a的1/2. 由此可以推测,PCD膜中BQ的有效浓度比溶液体相中的大得多. PCD膜对BQ的富集作用以及膜的良好通透性能将有利于 GOD/PCD酶膜电极上生物电催化反应的进行.

2.2 GOD/PCD 酶膜电极上葡萄糖的生物电催化氧化

图4是 GOD/PCD酶膜电极在 $-0.1 \sim +0.6$ V 电位区的伏安曲线, BQ 的体相浓度仅为 0.44 mmol/L. 由溶液不含葡萄糖的曲线可知,在所述电位区内酶膜电极的背景电流相对较低. 一旦在溶液中加入葡萄糖,氧化电流随即增大,而且葡萄糖浓度越高,氧化电流越大,表现出膜电极对葡萄糖氧化的生物催化活性. 在酶反应中 BQ 还原为氢醌(HQ),伏安曲线上的电流是还原产物 HQ 的氧化电流. 若将扩散控制电位区内某一指定电位下的电流值对葡萄糖浓度作图,可得酶反应的表现 Michealis-Menten 动力学关系式. 有人指出^[5],当 BQ 作为还原态 GOD 的电子受体时,葡萄糖氧化的酶促反应遵从乒乓机理,并测得溶液相酶反应中 BQ 的 Michealis 常数为 3.5 mmol/L,因此通常的 GOD 电极工作时试验溶液中的 BQ 浓度一般选用 5~10 mmol/L^[6]. 在本实验中 BQ 的体相浓度如此之低却能得到非常灵敏的响应电流,正是所述 GOD/PCD 酶膜电极的优点之一.

改变酶膜中的 GOD 含量,催化电流将随着变化. 图5表示工作电位为 0.6 V 时酶膜电极中 GOD 含量对催化电流的影响,酶含量增大使催化电流增大,在较低的葡萄糖浓度下催化电流基本上随酶含量的增大而线性地增大,但酶含量足够大时催化电流在较低的葡萄糖浓度下便达到饱和.

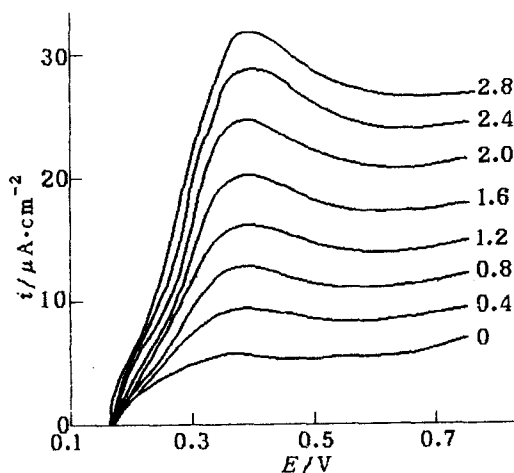


图4 GOD/PCD膜电极的电流响应
随葡萄糖浓度的变化

BQ 浓度 0.44mmol/L, 扫描速度 20mV/s,
曲线上数字为葡萄糖浓度 (mmol/L)

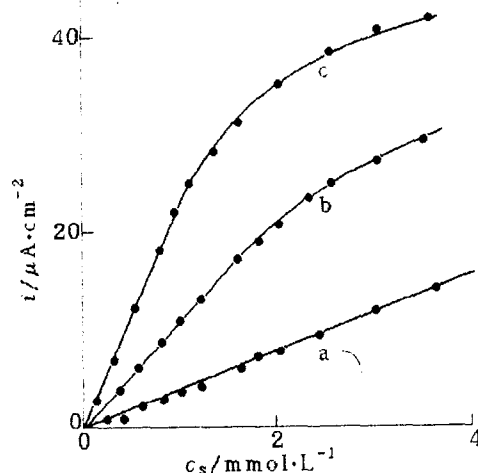
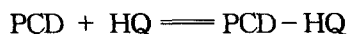
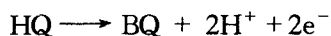
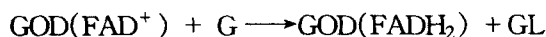
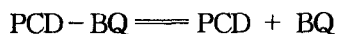


图5 工作电位 0.6 V 时酶电极的催化电流
与酶膜中 GOD 含量的关系

GOD 含量: 曲线(a)9 u, (b)18 u, (c)36 u

GOD/PCD 酶膜电极上葡萄糖氧化的一般模式较为复杂,整个过程包括:底物分子葡萄糖在膜/溶液界面上的分配,随后通过扩散到达酶的活性位置并被氧化态酶 GOD(FAD^+)氧化为葡萄糖酸;生成的还原态酶 GOD(FADH_2) 被电子传递体 BQ 氧化再生,而由此生成的还原态电子传递体 HQ 在电极基体表面上氧化;BQ 和 HQ 在膜中进行主客配位反应并在膜中扩散

传输;而酶反应产物最终扩散离开膜而进入溶液.主要反应步骤可表示为:



显然,酶电极上反应动力学的完整描述必须计及主客配位反应的速度,后者有待研究.

2.3 固定化酶作用下 BQ 反应的动力学参数

前面已经指出,PCD 的包合作用使酶膜中的 BQ 浓度比溶液体相中的大,因此酶电极工作时溶液中实际需要的 BQ 浓度可以减小.为了进一步确定 BQ 的合适用量,研究了在 GOD/PCD 固定化酶作用下 BQ 反应的动力学参数.图 6 示出含 18u GOD 的酶电极在 50 mmol/L 葡萄糖溶液中的伏安曲线随溶液中 BQ 浓度的变化,氧化电流在宽广的电位区内呈扩散电流的特征.若将指定电位下(如 0.6V)的响应电流(即电流测定值与背景电流值之差)的倒数对 BQ 浓度的倒数作图,可得图 7 所示的直线关系,表明符合 Michealis - Menten 动力学关系式.由图 7 求出的 Michealis 常数为 0.3 mmol/L,此值仅为溶液相酶反应中 BQ 的米氏常数的 1/10,再次证明利用 GOD/PCD 固定化酶体系可使苯醌用量大为减少.上述实验中 BQ 浓度为 0.44 mmol/L,已大于 Michealis 常数值,因此可以取得较好的测量效果.

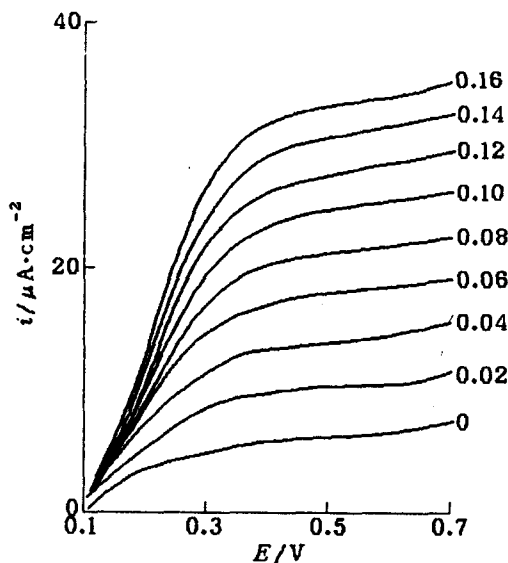


图 6 溶液体相中苯醌浓度对酶电极
电流响应的影响

酶膜中 GOD 含量 18 u, 葡萄糖浓度 50 mmol/L,
扫描速度 20 mV/s, 曲线上数字为 BQ 浓度 (mmol/L)

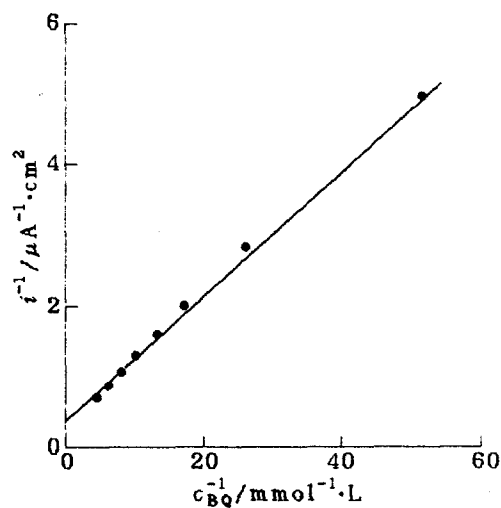


图 7 GOD/PCD 膜电极对苯醌响应的
Lineweaver - Burk 图

3 结论

在利用非生理性氧化还原电对作为氧化还原酶的电子受体的第二代电流式葡萄糖电极的设计中,已提出同时将酶与电子受体作为酶电极的固有组成部分的不同方案^[9~15],虽然各具特色,但均存在不足之处.例如,(1)用混有苯醌或二茂铁等电子传递体的碳粉制成碳糊电极(或石墨环氧树脂电极)然后覆盖上酶层的方法^[9,10],需要使用较大量的电子传递体,而且电极不易微型化;(2)将酶包埋在含有可作为电子受体的氧化还原基团的聚合物内^[11~14],这时酶的电荷传递因受到聚合物分子链运动的限制,电子交换速度一般较慢.(3)将氧化还原物种通过分子链连接到酶的活性中心^[15],此法虽有重要理论意义,但酶的活性损失严重,实用上有一定困难.为了加速生物氧化还原作用,要求电极表面附近的电荷传递体必须具有较大的浓度并且能够自由地扩散到酶的活性中心,本文根据主客配位原理而采用的方法提供了这种可能性.苯醌在水溶液中的溶解度较大,作为水溶液介质中酶膜电极的固有组成尚不理想,但TTF,二茂铁等化合物都是还原态GOD的良好电子受体,它们在水中的溶解度较小,而且环糊精有不同品种,因此可望通过进一步研究找出更为合适的电极组成.

References

- 1 J. Szejtli, "Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes", Akademiai Kiado, Budapest, 1982.
- 2 O. Huber, J. Szejtli, "Proc. 4th Int. Symp. Cyclodextrins", Kluwer, 1988.
- 3 M. Komiyama, *Angew. Makromol. Chem.*, **1988**, 163, 205.
- 4 J. J. Kulys, N. K. Cenas, *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, 744, 57.
- 5 C. Bourdillon, C. Hervagault, D. Thomas, *Biotechnol. Bioeng.*, **1985**, 27, 1619.
- 6 M. Marchesiello, E. M. Genies, *Electrochim. Acta*, **1992**, 37, 1987.
- 7 W. Kutner, W. Stock, K. Doblhoff, *J. Incl. Phenom.*, **1992**, 13, 257.
- 8 K. Yamada, S. Kohmoto, H. Iida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1976**, 49, 1171.
- 9 T. Ikeda, H. Hamada, M. Senda, *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, 50, 883.
- 10 B. Grundig, C. Krabisch, *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 222, 75.
- 11 N. C. Foulds, C. R. Lowe, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2473.
- 12 ZHEN Zhi-Ming, WU Hui-Huang, ZHOU Shao-Min, *Acta Physico-Chimica Sinica*, **1991**, 7, 163(in Chinese).
- 13 R. Tabakovic, I. Tabakovic, A. Davidovic, *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, 332, 297.
- 14 I. Willner, R. Kasher, E. Zahavy, N. Lapidot, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10969.
- 15 A. Heller, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23, 128.

Inclusion Complexation of Cyclodextrin Polymer with Benzoquinone and Its Application to Enzyme Electrodes

WU Bao-Zhang WU Hui-Huang*

*(Department of Chemistry, State Key Laboratory for Physical Chemistry of
the Solid Surfaces, Xiamen University, Xiamen, 361005)*

Abstract The effect of soluble α -cyclodextrin prepolymer (CD) on the redox behavior of benzoquinone/hydroquinone (BQ/HQ) system at a platinum electrode was studied and according to the voltammetric curves the inclusion complexation of the poly(α -cyclodextrin) host with benzoquinone guest was discussed. The insoluble polymer (PCD) membrane, prepared from polycondensation of CD with glutaric dialdehyde, was used for the immobilization of glucose oxidase (GOD) so that a new second-generation glucose electrode was obtained. Owing to the inclusion complexation, the benzoquinone as the electron acceptor of reduced GOD in the enzyme-containing polymer membrane has higher concentration, thereby facilitating the electron transfer of the immobilized enzyme. The kinetics of BQ reaction in the immobilized enzyme PCD/GOD matrix was determined.

Keywords inclusion complexation, supermolecular electrochemistry, poly(α -cyclodextrin) host, benzoquinone guest, glucose oxidase electrodes