

1995-05-28

Horseradish Peroxidase/Poly-o-phen ylenediamine Mem brane Electrode:Preparation and Properties

Dong Wei

Huihuang Wu

Recommended Citation

Dong Wei, Huihuang Wu. Horseradish Peroxidase/Poly-o- phen ylenediamine Mem brane Electrode:Preparation and Properties[J]. *Journal of Electrochemistry*, 1995 , 1(2): 186-192.

DOI: 10.61558/2993-074X.1281

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol1/iss2/9>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

辣根过氧化物酶/聚邻苯二胺膜电极的 制备与性能研究^①

魏东 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 辣根过氧化物酶(HRP)/聚邻苯二胺(PPD)膜电极由pH 7.0磷酸盐缓冲溶液介质中邻苯二胺在玻碳电极上的电聚合而制得. 讨论了HRP电化学固定化的过程. 所得酶电极呈现生物催化活性, 可在没有电子传递体存在的情况下催化 H_2O_2 还原. 该反应发生在聚邻苯二胺氧化还原的电位区, 聚合物参与了酶的电子转移过程. 分析了旋转HRP/PPD电极上酶反应的动力学, 讨论了动力学常数的影响因素.

关键词 酶电极, 酶电化学固定化, 辣根过氧化物酶, 过氧化氢还原, 生物电催化

酶的电化学固定化是近年来发展起来的新技术, 其优点及应用已有评述^[1]. 目前人们已成功利用聚吡咯等制备了多种酶电极, 并演示了它们的响应特性^[1,2]. 然而酶的电化学固定化尚有许多问题需要解决, 其中包括作为酶固定化基质的聚合物在酶与电极之间电子传递过程中的作用及相关酶反应动力学的描述. 最近 Wollenberger 等^[3]和 Tatsuma 等^[4]制备了辣根过氧化物酶(HRP)/聚吡咯膜电极, 并对聚吡咯的作用做了不同的解释. Belanger 等^[5]曾指出, 在 H_2O_2 存在下聚吡咯可能发生降解, 因此有必要寻找新的聚合物作为HRP的载体. 本工作利用电合成的聚邻苯二胺(PPD)作为HRP的固定化基质并探讨PPD在所得酶电极上的生物电催化反应中的作用.

1 实验部分

1.1 电化学实验

采用三室电解池, 辅助电极为铂片, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE), 文中所述电位均相对于SCE而言. RDE4恒电位仪用于聚合物膜的制备与电化学表征, 用3033型X-Y记录仪记录伏安曲线. 美国Pine公司制的旋转圆盘电极装置用于动力学测定, 工作电极为玻碳, 面积 0.5 cm^2 . 电解质溶液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0). 所有溶液用二次蒸馏水配制. 实验前电解液用高纯氮除氧.

1.2 原位红外反射光谱实验

电化学原位FTIR反射光谱实验用Nicolet 730 FTIR光谱仪, 光学电解池结构及实验程序

^① 本文1994-11-24收到, 1995-01-24收到修改稿; 国家自然科学基金资助项目

见文献^[6]. 所用方法属SNIFTIRS, 得到的谱图是两个电位下电极表面附近物种的差谱, 即 $\Delta R/R = (R_2 - R_1)/R_1$, 其中 R_1 和 R_2 分别代表电位 E_1 和 E_2 时的单光束反射光谱强度. 在所得差谱中正向谱峰表示 E_1 时的红外吸收比 E_2 时的强, 而负向谱峰表示 E_1 时的红外吸收比 E_2 时的弱.

1.3 HRP/PPD 膜电极的制备

辣根过氧化物酶(HRP, EC. 1. 11. 1. 7)为上海生化所产品, 250 u/mg, R. Z. ~3. 邻苯二胺(PD)购自上海化学试剂站, b. p. 101~104 C. 用于HRP 电化学固定化的溶液为含4 g/L HRP 和 0.05 mol/L PD 的0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0). 玻碳圆盘电极作为电极基体, 经用6 μ 金相砂纸抛磨后清洗干净, 置于上述聚合溶液中, 在+0.65 V 下恒电位聚合, 所得的HRP/PPD 电极经缓冲溶液淋洗后备用. 为了便于比较, 用类似方法制备不含酶的聚邻苯二胺(PPD)膜电极, 此时聚合溶液不含HRP. 聚合物膜的厚度由电量控制.

2 结果与讨论

2.1 中性溶液中邻苯二胺的电聚合和HRP 的固定化

迄今为止利用邻苯二胺(PD)电聚合实现酶固定化的工作尚少. PD 的电聚合虽有不少研究^[7,8], 但大多是在酸性溶液中进行的. 图1 是玻碳电极在含0.05 mol/L PD 的pH 7.0 溶液中的循环伏安图, 可以看出, 随着电位扫描次数的增多, 在较正电位区出现的阳极电流逐次下降. 在酸性介质中也有此现象, 不过在中性介质中聚合电流的下降更为迅速. 这是由于PPD 在较正电位区的电子导电性较差, 以致聚合物覆盖电极表面之后单体聚合反应受到阻碍的缘故. 酶的电化学固定化宜在中性条件下进行以免引起变性, 对酶电极的制备而言, 聚合速度不是最重要的因素. 为了便于控制聚合物膜的厚度, 可在恒电位条件下进行PD 电聚合, 参照图1 结果,

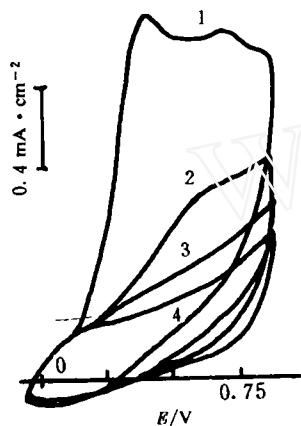


图1 玻碳电极上PD 电聚合的循环伏安曲线
聚合溶液: 0.05 mol/L PD + 0.1 mol/L
磷酸盐缓冲液

Fig. 1 Cyclic voltammograms of PD
electropolymerization on glassy carbon

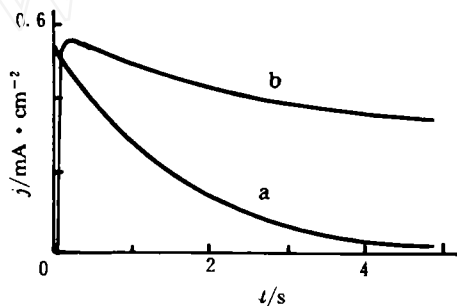


图2 0.65 V 下PD 电聚合的 $j \sim t$ 曲线
a. 0.05 mol/L PD (pH 7.0);
b. 0.05 mol/L PD + 4 g/L HRP (pH 7.0)

Fig. 2 $j \sim t$ curves for PD electropolymerization at 0.65 V

我们选用 0.65 V 作为聚合电位. 图 2 曲线 a 是 PD 恒电位聚合的 $j \sim t$ 曲线, 与图 1 相呼应, 电流 j 随聚合时间 t 的延长而迅速衰减. 当聚合溶液含有 HRP 时, 电聚合 $j \sim t$ 曲线如图中曲线 b 所示, 它与曲线 a 相比, 反映新相形成的电流值明显提高了. Shimidzu 等^[9]曾发现, 阴离子聚电解质的存在使吡咯电聚合的速度提高 1 倍, 这些阴离子在聚合过程中作为带负电荷的抗衡离子进入聚合物基质. 据此, HRP 存在使聚合速度增大可解释为: 在所用介质中 HRP 是带负电的聚电解质, 它起着上述阴离子的作用. 文献^[7]指出, 每通过 100 mC/cm² 的电量可使 PPD 膜增厚 2.5 μm , 由图 2 不难估算出指定聚合时间所能达到的膜厚度. 但是必须注意, 由于溶胀, 聚合物的膜厚度受多种因素的影响, 估算出的膜厚度只供比较时参考.

2.2 HRP/PPD 膜电极的生物催化活性

为了探明 PPD 在酶反应中的可能作用, 有必要研究本工作中合成的 PPD 的氧化还原性能. 图 3 是 pH 7.0 缓冲溶液中玻碳电极 (曲线 a) 和 PPD 电极 (曲线 b) 的循环伏安图, 曲线 b 上出现一对氧化还原峰, 其 E_{pa} 为 -0.42 V, E_{pc} 为 -0.58 V, 在 $E > 0$ V 的电位区观察不到明显的电流变化. 我们曾对在酸性溶液中制备的 PPD 膜电极进行对比实验, 发现其伏安图略为负移. 图 4 是初始电位 $E_1 = 0$ V 而 E_2 分别为 -0.4、-0.6、-0.8、-1.0 V 时的 SNIFTIRS 谱图, 可以看出: 随着 E_2 的负移, 1 330 cm^{-1} 附近的负向谱峰、1 550 cm^{-1} 附近的正向谱峰以及 1 080 cm^{-1} 附近的负向谱峰均增强. Chiba 等^[7]测定过电合成 PPD 固体的非原位红外光谱, 发现 PPD 中的 $\nu(\text{C}-\text{N})$ 为 1 260 cm^{-1} , 而 $\nu(\text{C}=\text{N})$ 为 1 560 cm^{-1} , 因此图 4 中 1 330 和 1 550 cm^{-1} 这两个异向谱峰同时随 E_2 负移而增强可归因于聚合物中有更多的 $\text{C}=\text{N}$ 转变为 $\text{C}-\text{N}$. 1 080 cm^{-1} 负向谱峰是 H_2PO_4^- 的特征峰^[10], 该峰随 E_2 负移而增强表示电极附近 H_2PO_4^- 浓度增大. 这可解释为在较正电位下 PPD 带有部分正电荷, 因此需要 H_2PO_4^- 离子潜入聚合物膜内以便保持电中性. 电位负移时 PPD 链上的电荷减少, 部分 H_2PO_4^- 离子必须向膜外转移, 因而测得较强的吸收峰. 图 4 结果不但证实图 3 曲线 b 的电流峰与 PPD 自身的氧化还原紧密相关, 而且说明了 PPD 链上带有正电荷, 它们可同聚吡咯中的单极子或双极子相比拟.

图 3 同时示出 HRP/PPD 膜电极和不含酶的 PPD 膜电极在 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L H}_2\text{O}_2$ 溶液中 (曲线 c 和 e) 以及在空白溶液中 (曲线 b 和 d) 的伏安图. HRP/PPD 电极在 -0.2 V 开始出现 H_2O_2

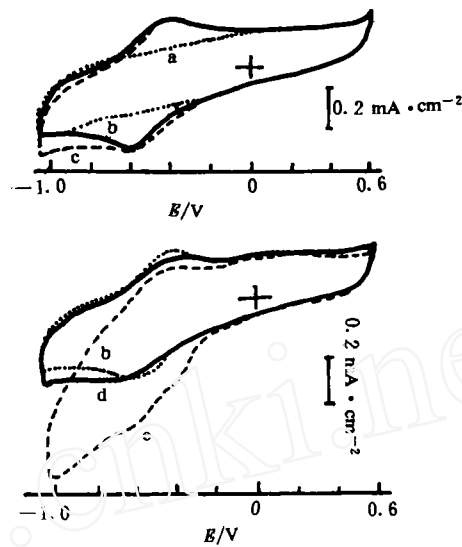


图 3 在不含 (曲线 a, b 和 d) 或含有 (c 和 e) H_2O_2 的溶液中玻碳 (a), PPD (b 和 c) 以及 HRP/PPD (d 和 e) 的伏安图

Fig. 3 Voltammograms of glassy carbon (curve a), PPD (b and c) and HRP/PPD (d and e) electrodes in the solutions without (a, b and d) or with H_2O_2 (c and e)

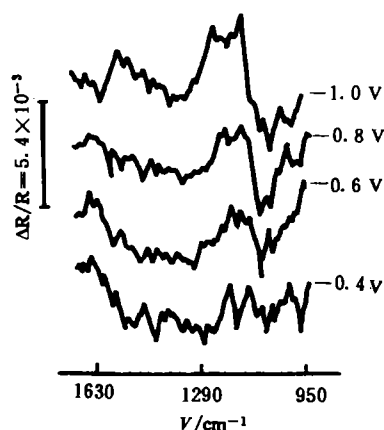


图4 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液中PPD 电极的 SNITFIRS 谱图

Fig. 4 SNITFIRS spectra of PPD electrodes in pH 7.0 phosphate buffer

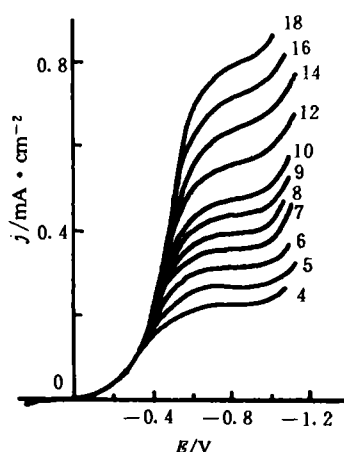


图5 0.1 mmol/L H₂O₂ 溶液中 (pH 7.0) 旋转HRP/PPD 电极的伏安曲线. 曲线上数字表示 ω^{0.5} 值

Fig. 5 Voltammetric curves of rotating HRP/PPD electrode in 0.1 mmol/L H₂O₂ solution The figures at the curves indicating ω^{0.5} values

还原引起的阴极电流,而PPD 电极只当电位比-0.6 V 负时才观察到微小的电流变化.图5 是 H₂O₂ 溶液中HRP/PPD 旋转圆盘电极的伏安曲线,同样在-0.2 V 附近开始出现阴极电流波,当电位负移时还原电流不断增大,提高电极转速也使电流增大.如果将HRP/PPD 电极的工作电位固定在某一足够负的数值(如-0.5 V),测得的还原电流*j* 随 H₂O₂ 浓度*c* 的变化呈现 Michealis-Menten 动力学的特征,即当*c* 较小时*j* 与*c* 成正比,而当*c* 较大时*j* 与*c* 无关.以上事实表明:本文所用的固定化HRP 具有生物催化活性,正是由于PPD 膜中存在HRP 才使H₂O₂ 还原的电位正移和电流增大.有关HRP/PPD 酶电极的电流响应特性将另文报道,这里需指出的是,由于溶液中没有其它电子传递体存在,所述酶电极是一种“无试剂”(reagentless)酶电极.比较图3 中各曲线不难发现HRP/PPD 电极上H₂O₂ 还原的电位区正是PPD 电极的电化学活性区,显然PPD 除了作为酶的载体外,它在酶的电子传递过程中的作用不能不加考虑.已经表明^[11],在天然酶反应中HRP 首先被H₂O₂ 氧化为“化合物 I”(或记为HRP-I):



HRP-I 比HRP 多两个氧化当量,为了使酶反应持续进行,HRP-I 必须还原再生为HRP.在本实验体系中这个过程将通过酶与电极的直接电子传递来实现:



参照导电聚合物电极最新概念^[12,13],聚合物中的单极子或双极子是电荷传递过程的载流子.反应(2)显然与电位有关,下面将进一步讨论电位对酶反应速度的影响.

2.3 酶电极反应动力学分析与电位的影响

图6示出0.1 mmol/L H₂O₂ 溶液中HRP/PPD 电极在不同电位下的电流 j 与电极转速 ω 的 Koutecky-Levich 关系图,根据旋转圆盘电极理论,图中 $j^{-1} \sim \omega^{-0.5}$ 直线的截距为催化反应电流 j_k 的倒数.表1列出由图6求出的不同电位下的 j_k 和 k_c 值,由线性回归法求得.速度常数 k_c 与 j_k 的

表1 HRP/PPD 电极的动力学参数
Tab. 1 Kinetic parameters of HRP/PPD electrode

E/V	$j_k/\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$	$k_c/\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	α	$(k_2 e_2 L / K_M) / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
-0.5	0.728	3.77×10	0.745	0.0597
-0.6	1.44	7.41×10	0.713	0.122
-0.7	2.01	1.04×10	0.701	0.173

关系为 $j_k = nFk_c$,表1反映了 k_c 随着电位的负移而增大.为了说明电位影响的实质,必须对酶电极上的反应动力学进行分析.酶膜电极上的反应动力学不仅要考虑式(1)和(2)所示的酶反应与电化学反应的偶联,而且必须考虑底物在溶液体相中和在聚合物膜中传质的影响.设酶膜厚度为 L ,膜与玻碳之间界面的坐标为 $x=0$,而膜与溶液之间界面的坐标为 $x=L$.用 e 、 e_1 、 s 分别表示酶膜中 x 处 HRP、HRP-1 和底物 H₂O₂ 浓度,根据反应(1)和(2),在一维传质的稳态条件下可列出如下方程:

$$k_1 e s - k_{-1} e_1 - k_2 e_1 = 0 \quad (3)$$

$$D_m (d^2 s / dx^2) - k_1 e s + k_{-1} e_1 = 0 \quad (4)$$

式中 D_m 是底物在膜中的扩散系数,如果酶均匀分布在聚合物中且任一截面上酶的总浓度 $e_2 = e + e_1$,由式(3)可得

$$e_1 = e_2 s / (K_M + s) \quad (5)$$

式中 $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$,即 Michealis 常数,在指定电位下电流密度 j 为

$$j = nF \int_0^L k_2 e_1 dx \quad (6)$$

可见为了求出 j 值必须了解膜中底物的浓度分布.将式(5)代入式(4)后得

$$D_m (d^2 s / dx^2) - k_2 e_2 / (K_M + s) = 0 \quad (7)$$

如果在给定工作电位下底物不会在电极基体 ($x=0$) 上反应,则有

$$D_m (ds / dx)_{x=0} = 0 \quad (8)$$

此外,由于传质的连续性,在 $x=L$ 处底物的溶液相流量必须等于膜相中的流量,即

$$D_m (ds / dx)_{x=L} = (D / \delta) (s_b - s / \epsilon) \quad (9)$$

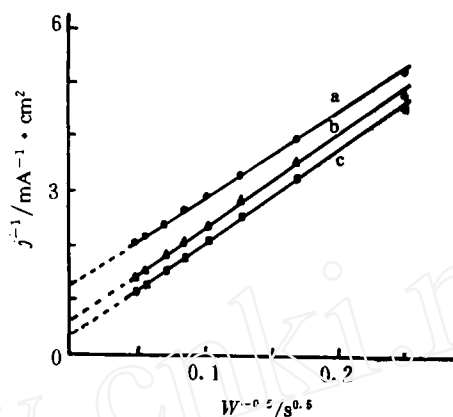


图6 由图5作出的 $j^{-1} \sim \omega^{-0.5}$ 关系图
Fig. 6 $j^{-1} \sim \omega^{-0.5}$ plot according to Fig. 5
curve: a. -0.5 V, b. -0.6 V, c. -0.7 V

式(9)中 s_0 和 D 为溶液相中底物的浓度和扩散系数, δ 为Nernst扩散层厚度, ε 为膜/溶液界面两侧底物的分配系数,由于 s 是界面上膜侧的底物浓度, (s/ε) 项实为界面上溶液侧底物的浓度.利用式(7)至式(9)可解得膜中的 s 值,当 $s \ll K_M$ 时(即当酶反应速度与底物浓度成正比时), s 可表示为

$$s = s_0 \operatorname{ch}(\alpha x / L) / [D_m / D (\delta / L) \alpha \operatorname{sh} \alpha + \operatorname{ch} \alpha / \varepsilon] \quad (10)$$

式中无量纲量 $\alpha = (k_2 e_2 L^2 / D_m K_M)^{1/2}$.将式(10)代入(6)即得

$$j = n F s_0 \alpha^2 / [\alpha (\delta / D) + (L / D_m) (1 / \varepsilon \operatorname{th} \alpha)] \quad (11)$$

式(11)取倒数并将旋转圆盘电极的扩散层厚度 $\delta = 1.61 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{1/2}$ 代入,可得

$$j^{-1} = [n F s_0 (k_2 e_2 L / K_M) \varepsilon \operatorname{th} \alpha]^{-1} + [1.61 D^{-2/3} \nu^{1/6} / n F s_0 \alpha] \omega^{-1/2} \quad (12)$$

因此若将 j^{-1} 对 $\omega^{-0.5}$ 作图可得一直线,当已知 D 、 ν 和 s_0 由斜率和截距可求得 α 和 $(k_2 e_2 L / K_M)$ 值,表1同时列出不同电位下的有关参数.由式(12)还可看出表观速度常数 k_c 是一个复杂函数:

$$k_c = (k_2 e_2 L / K_M) \varepsilon \operatorname{th} \alpha$$

既然 k_2 以及 α 和 K_M 均受电位的影响, k_c 与电位不存在简单函数关系.由于 K_M 随 k_2 同时增大,本文所述酶电极表现出最大响应电流与Michealis常数同时增大的特征,这将在另文中专门讨论.

Horseradish Peroxidase/Poly-o-phenylenediamine Membrane Electrode: Preparation and Properties

Wei Dong Wu Huihuang

(Dept. of Chem., State Key Lab. for Phys. Chem. of the Solid Surfaces, Xiamen Univ., Xiamen, 361005)

Abstract A horseradish peroxidase (HRP)/poly-o-phenylenediamine (PPD) membrane electrode was prepared by electropolymerization of o-phenylenediamine on glassy carbon in pH 7.0 phosphate buffer, the process of the enzyme immobilization was studied. The enzyme electrode obtained exhibits the activity to catalyze the electroreduction of hydrogen peroxide in the absence of any electron transfer mediator. The reduction reaction occurs in the potential range of PPD redox process, it was believed that the polymer participates in electron transfer of the enzyme. The enzyme reaction kinetics at rotating HRP/PPD electrode was analysed, and the factors influencing kinetic parameters were discussed.

Key words Eenzyme electrode, Enzyme electrochemical immobilization, Horseradish peroxidase, Hydrogen-peroxide reduction, Bioelectrocatalysis

References

- 1 Barlett P N, Cooper J M. A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. *J. Electroanal. Chem.*, 1993, 362:1~12
- 2 Contractor A Q, Sureshkumar T N, Narayanan R, Sukeerthi S, Lal R, Srinivasa R S. Conducting polymer-based biosensors. *Electrochim. Acta.*, 1994, 39:1 321~1 324
- 3 Wollenberger U, Bogelannovskaya V, Bobrin S, Scheller F, Tarasevich M. Enzyme electrodes using bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide. *Anal. Lett.*, 1990, 23:1 795~1 808
- 4 Tatsuma T, Gondaira M, Watanabe T. Peroxidase-incorporated polypyrrole membrane electrodes. *Anal. Chem.*, 1992, 64:1 183~1 187
- 5 Belanger D, Nadreau J, Forter G. Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 1989, 274:143~155
- 6 Sun Shigang, Yang Dongfang, Tian Zhaowu. In-situ FTIR spectroscopic studies of electrocatalytic processes —oxidation of n-propanol on Pt electrode. *Progress in Natural Science*, 1991, 1:48~54
- 7 Chiba K, Ohsaka T, Ohhuki Y, Oyama N. Electrochemical preparation of a ladder polymer containing phennazine rings. *J. Electroanal. Chem.*, 1987, 219:117~124
- 8 Levi M D, Pisarevskaya F Yu. Cyclic and steady-state voltammetric studies of the mechanism and kinetics of some solute inorganic redox species reactions at a gold electrode covered with poly-o-phenylenediamine. *Electrochim. Acta*, 1992, 37:635~641
- 9 Shimidzu T, Ohtani A, Iyoda T, Honda K. Charge-controllable polypyrrole/polyelectrolyte membranes. *J. Electroanal. Chem.*, 1987, 224:123~135
- 10 Ye S, Kita H, Aramata A. Hydrogen and anion adsorption at Pt single crystal electrodes in phosphate solutions over a wide range of pH. *J. Electroanal. Chem.*, 1992, 333:299~312
- 11 Dunford H B. Peroxidases. *Adv. Inorg. Chem.* Vol. 4 (Ed. Eichhorn G L et al.), New York: Elsevier Biomedical, 1982:41~68
- 12 Levi M D, Pisarevskaya E Yu. Recent developments in the electrode kinetics of solute redox couple reactions during electrochemical doping of electron-conduction polymers. *Synth. Met.*, 1991, 45:309~322
- 13 Maksymiuk K, Doblhofer K. Kinetics and mechanism of charge-transfer reactions between conducting polymers and redox ions in electrolytes. *Electrochim. Acta*, 1994, 39:217~228