

1998-05-28

Molecular Inclusion of Cyclodextrin Polymer and Its Application to Enzyme Electrodes

Huihuang Wu

Baozhang WU

Recommended Citation

Huihuang Wu, Baozhang WU. Molecular Inclusion of Cyclodextrin Polymer and Its Application to Enzyme Electrodes[J]. *Journal of Electrochemistry*, 1998 , 4(2): Article 15.

DOI: 10.61558/2993-074X.2695

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol4/iss2/15>

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.

环糊精聚合物的分子包合作用 及在酶电极中的应用

吴辉煌* 吴宝璋

摘要 伏安法用于研究环糊精预聚合物的分子包合作用. 红外光谱实验表明环糊精预聚合物与戊二醛缩聚生成的聚合物带有悬挂的羰基, 后者能使葡萄糖氧化酶共价固定化. 由于分子包合作用, 电子受体可存储在含酶的环糊精聚合物膜中, 从而提高了酶膜中电子受体的浓度又减少了电子受体的用量. 用 TTF 等作电子受体, 可实现酶和电子受体在环糊精聚合物中的同时固定化. 环糊精聚合物膜中的组成和膜厚度可以控制, 为酶电极的基础研究工作提供了方便.

关键词 分子包合作用, 超分子电化学, 聚环糊精, 非生理性电子受体, 酶电极

利用非生理性氧化还原物质作为酶的电子受体, 并将它与酶同时作为传感器固有组成的电流式酶电极迄今有不同的设计方案^[1~7], 虽然它们各具特色, 但仍有待改进. 例如, (1) 用含有苯醌或二茂铁等的碳糊电极或石墨环氧树脂电极作为基体的酶电极^[1,2], 需要的电子传递体用量较大, 而且酶电极不易微型化; (2) 若将酶包埋在含有氧化还原基团的聚合物内^[3~6], 因酶与该氧化还原基团的电荷传递受聚合物分子链运动的限制, 电子交换速度一般较慢, 响应特性较不理想; (3) 用含氧化还原功能基的分子链链接电极基体与酶活性中心的方法^[7]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. 为此, 我们提出用环糊精聚合物作为酶固定化基质的新方法, 不仅可使酶以共价键合的方式固定在聚合物分子链上, 而且由于分子包合作用电子受体可存放在环糊精单体的腔穴中, 从而保证酶膜中有较大的电子受体浓度又能减少其用量. 本文以葡萄糖氧化酶/ β -环糊精聚合物/(GOD/PCD)膜电极为例说明这种新型酶电极的特有性能.

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, 18 500 u/g)、-D 葡萄糖和 1,4-苯醌购自 Sigma 公司. β -环糊精预聚合物(简称 CD, 平均分子量 4000)为 Budapest 环糊精研究开发实验室产品, 戊二醛(简称 GD) Fluka 公司产品, 四硫代富瓦烯(简称 TTF) Aldrich 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

本文 1998-01-03 收到; 国家自然科学基金资助项目; 第九次全国电化学会议(1997)优秀论文

* 通讯联系人

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. Nicolet 740 FTIR 光谱仪用于红外光谱测定, CsI 压片.

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由环糊精预聚合物和戊二醛缩聚而得^[8],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 μL 2% CD、20 μL 0.1 mol/L GD 和 13 μL 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,待水分在室温下蒸发,最终在电极表面上形成不溶性的聚合物(PCD)膜.

2) 在溶液 A 中加入适量的 GOD,按 1) 所述步骤可制得以玻碳为基体但酶含量不同的 GOD/PCD 膜电极,后者保存在 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(4.0)中备用.

3) 在溶液 A 中加入适量的 BQ(苯醌)或 TTF,按上述方法可制得含相应电子传递体的聚合物膜电极. 类似地,在溶液 A 中加入适量酶和电子传递体,可制得同时含相应酶种和电子传递体的聚合物膜电极.

2 结果和讨论

2.1 环糊精聚合物分子包合作用的电化学表征

曾指出^[9],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络合物的性能,但有关主客络合作用在电化学上的表现较少研究. 为了了解氧化还原客体与环糊精主体的主客络合作用,现用 BQ 与 α -环糊精预聚合物(CD)作为模型体系进行研究. BQ 是黄素酶常用的电子受体,其分子尺寸与 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. 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的 CD 时,伏安曲线上的电流峰位置没有明显改变,但氧化还原电流随着 CD 浓度的增大而降低,如曲线 b 至 d 所示. 这种现象可解释为 BQ 与 CD 形成了分子包合物,从而减小了溶液中自由态 BQ 的浓度,况且包合物不能直接在电极上反应. 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. 既然图 1 伏安曲线上的还原电流是由自由态 BQ 还原引起的,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、而苯醌浓度为 $[\text{BQ}]_0$ 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. 显然,根据式(3)、(4)和(5),由峰电流值以及 $[\text{CD}]_0$ 和 $[\text{BQ}]_0$ 值可

求式(2)中各相关物种的浓度,进而可估算主客络合常数.图2示出依照以上公式和图1数据得到的 $[BQ-CD]/[CD]$ 与 $[BQ]$ 的关系曲线.可以看出,当 $n=1$ 时呈直线关系,据此求出 K 值为 $2.6 \times 10^2 \text{ L/mol}$. n 为1以外的其它值均得不到线性关系,图2中用虚线示出 $n=2$ 时的情形.本实验用的环糊精预聚合物的平均分子量为4000,相当于每个分子可提供4个与BQ分子结合的位置.由于所用的CD浓度较大,BQ趋于分散地与各个CD结合,因而 $n=1$ 是合理的.Yamada等^[10]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络合物并求得 K 值为 $2.1 \times 10^2 \text{ L/mol}$.图2提供的 K 值与其相近,由以上方法得到的络合常数对了解主客体系的性质有一定帮助.

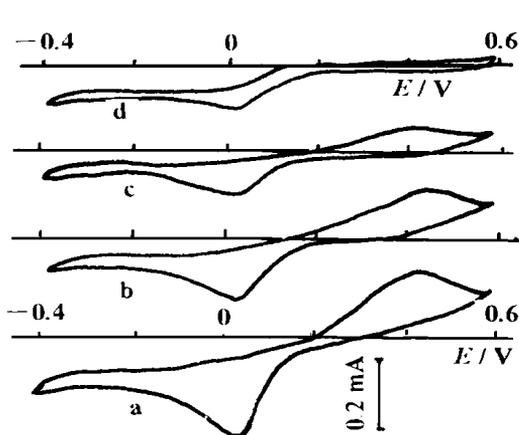


图1 铂电极在含2 mmol/L BQ的pH 7.0磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of Pt electrode in phosphate buffer solution (pH 7.0) with 2 mmol/L BQ, scan rate 50 mV/s, concentration of CD (mmol/L): curve (a) 0, (b) 2, (c) 4, (d) 6

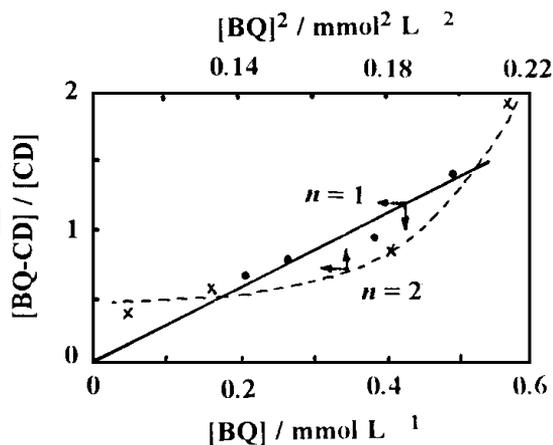


图2 $[BQ-CD]/[CD]$ 值与 $[BQ]$ 值的关系曲线

Fig. 2 Relation of $[BQ-CD]/[CD]$ to $[BQ]$ on the basis of Eq(2) with $n=1$ (Solid) and $n=2$ (dotted)

2.2 GOD 在环糊精聚合物中的共价固定化

红外光谱实验证明,由CD和GD缩聚而成的环糊精聚合物(PCD)链上带有悬挂的羰基,它们可与酶中的氨基作用,从而使酶共价键合在聚合物链上.如图3a所示,与缩聚前的CD光谱比较,PCD谱图的主要特征是在 1725 cm^{-1} 附近出现吸收峰,表明羰基的存在.为了防止聚合物中混有未反应的GD,测定前将PCD碾成粉末,并用蒸馏水反复洗涤.图3b是含GOD的PCD的红外谱图,图中的 1680 cm^{-1} 吸收峰是图3a和GOD红外谱图(见图3c)所没有的.况且,GOD谱上的 1600 cm^{-1} 吸收峰(酶中N-H平面伸缩振动^[11])在图3b中明显减弱了.上述的红外光谱变化说明GOD不是简单地包埋在PCD中,而是具有共价键合的特征, 1680 cm^{-1} 吸收峰可归因于聚合物链上的羰基与酶的氨基形成 $-C=N-$ 键.共价键合的固定化酶通常具有较好的稳定性.

2.3 环糊精分子包合作用对GOD/PCD酶膜电极性能的影响

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

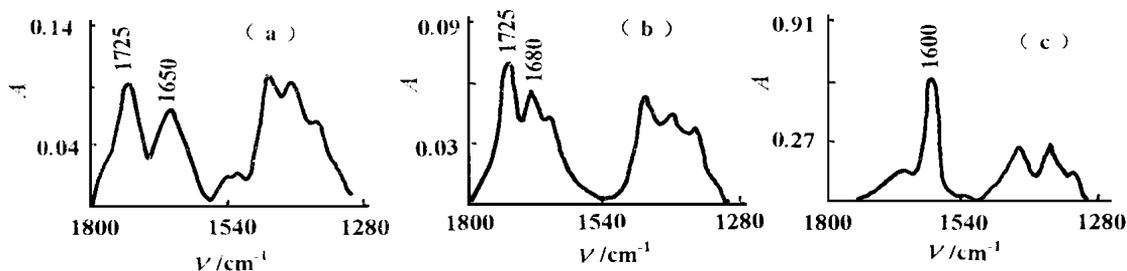


图 3 PCD(a)、GOD/PCD(b)和 GOD(c)的红外光谱

Fig. 3 IR spectra of PCD(a), GOD/PCD(b) and GOD(c)

酶反应中 BQ 的 Michealis 常数为 3.5 mmol/L ^[12], 因此 GOD 酶电极工作时所用的 BQ 浓度一般为 $5 \sim 10 \text{ mmol/L}$ ^[13]. GOD/PCD 酶膜电极的优点之一是: 使用很低的 BQ 浓度便能得到相当灵敏的响应电流. 图 4 是 GOD/PCD 酶膜电极在 $-0.1 \sim +0.6 \text{ V}$ 电位区的伏安曲线, BQ 的体相浓度仅为 0.44 mmol/L , 约为常规用量的 $1/10$, 但响应电流可达 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 的数量级. 为了说明 GOD/PCD 体系的这一性质, 测定了在该固定化酶作用下的 BQ 表观 Michealis 常数. 图 5 表示在 50 mmol/L 葡萄糖溶液中工作电位为 0.6 V 时酶膜电极 (含 18 u GOD) 的响应电流 (即电流测定值与背景电流值之差) 的倒数与 BQ 浓度倒数的关系 (即 Lineweaver-Burk 图), 由图中的直线求出 BQ 的表观 Michealis 常数为 0.3 mmol/L . 显然, 图 4 所示实验中用的 BQ 浓度虽仅为 0.44 mmol/L , 但已大于 Michealis 常数, 因而可以取得较灵敏的测量结果. 事实上 PCD 的分子包合作用使酶膜中 BQ 的实际浓度大于溶液相中的浓度.

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不甚理想. 然而 TTF 在水中的溶解度较小, 它不仅是还原态 GOD 的良好电子受体, 而且可作为环糊精的客体, 因此可望作为更合适的酶电极组成. 图 6 是含 TTF 的 GOD/PCD 酶膜电极对葡萄糖的响应电流曲线, 不仅可在 $+0.3 \text{ V}$ 电位下工作, 而且稳定性相当好.

2.4 GOD/PCD 酶膜电极中酶含量控制

PCD 酶膜是用成膜溶液固化而成的, 通过改变成膜溶液的配方和成膜溶液的用量可以控制酶膜的组成和厚度, 这有利于酶电极理论研究中分离不同变量的影响. 图 7 示出 GOD 含量不同的三根酶膜电极在 0.6 V 时的电流响应曲线, 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.

GOD/PCD 酶膜可直接粘附在不同材质的基体电极, 但用铂、金和破碳三种电极进行比较, 发现与破碳的结合力最好. 以破碳为基体的 GOD/PCD 酶膜电极保存在 4°C 下, 在 3 个月内仍能照常工作.

GOD/PCD 酶膜电极上动力学过程较为复杂, 除包括酶膜中的传质和生物催化反应、酶膜/溶液界面上的分配平衡和溶液中的传质、以及基体电极上的电化学反应外, 尚需考虑主络合反应. 因此, 动力学的完整描述有待进一步研究.

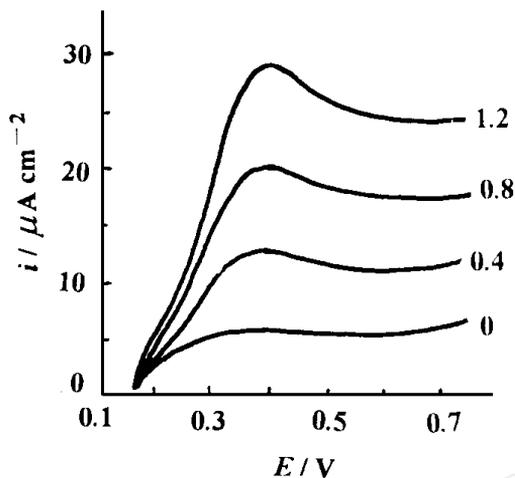


图 4 在含 0.44 mmol/L BQ 溶液中 GOD/PCD 膜电极对葡萄糖的电流响应曲线

Fig. 4 Current responses of GOD/PCD electrode to glucose in the solution with 0.44 mmol/L BQ scan rate 20 mV/s, the figures at curves indicating concentration of glucose (mmol/L)

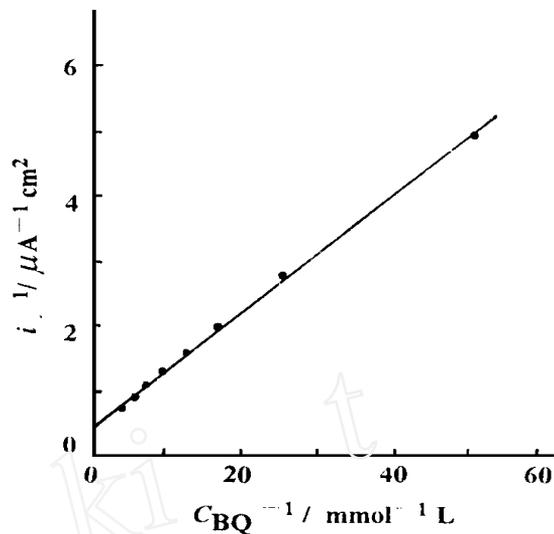


图 5 50mmol/L 葡萄糖溶液中工作电位 0.6 V 时 GOD/PCD 膜电极(含 18 u GOD)响应电流对苯醌浓度的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 5 Lineveaver-Burk plot of response currents of GOD/PCD electrode (containing 18 u GOD) at 0.6 V to benzoquinone concentrations in the solution with 50 mmol/L glucose

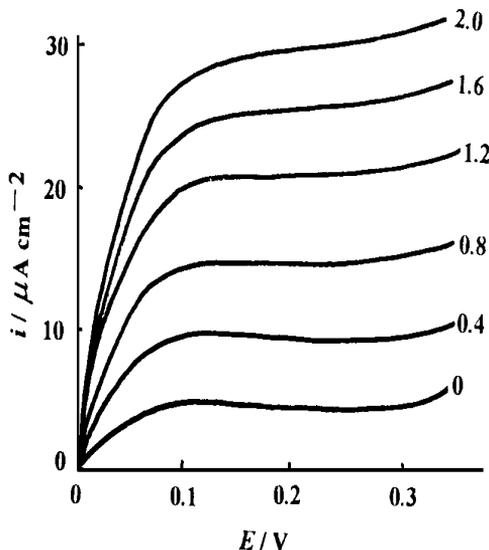


图 6 含 TTF 的 GOD/PCD 膜电极对葡萄糖的电流响应曲线

Fig. 6 Current responses of TTF-GOD/PCD electrode to glucose scan rate 20 mV/s, the figures at curves indicating concentration of glucose (mmol/L)

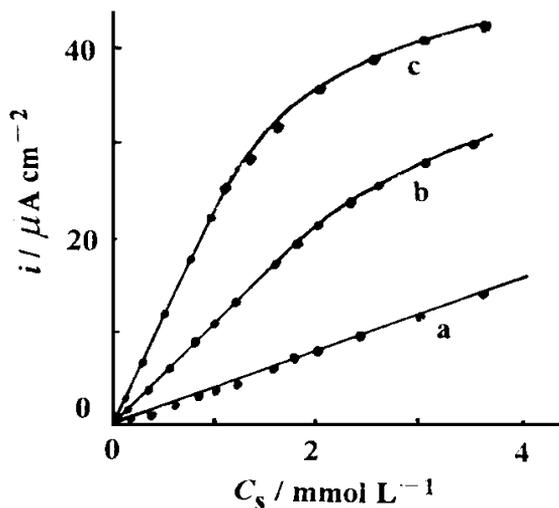


图 7 工作电位 0.6 V, BQ 浓度为 0.44 mmol/L 时的 GOD/PCD 膜电极的催化电流与 GOD 含量的关系

Fig. 7 Dependence of catalytic currents on enzyme loading of GOD/PCD electrodes at 0.6 V in the solution with 0.44 mmol/L BQ enzyme loadings: curve(a) 9 u, (b) 18 u, (c) 36 u

Molecular Inclusion of Cyclodextrin Polymer and Its Application to Enzyme Electrodes

Wu Huihuang* WU Baozhang

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

Abstract The inclusion complexation of α -cyclodextrin prepolymer host with benzoquinone guest was studied by voltametry. The spectroscopic measurements show that the polycondensation of CD with glutaric dialdehyde forms the polymer (PCD) with pending carbonyl, the latter brings about covalent immobilisation of glucose oxidase (GOD) to polymer chains. Owing to the inclusion complexation of CD, the benzoquinone (BQ) as mediator of GOD can be collected in the enzyme-containing PCD membrane, resulting in high concentration of BQ in the membrane while decreasing its amount in solution. TTF was tested to prepare the immobilised enzyme together with mediator in PCD. The enzyme loading in PCD membrane and the membrane thickness can be controlled easily, which will facilitate to fundamental research of enzyme electrodes.

Key words Inclusion complexation, Supramolecular electrochemistry, Poly(α -cyclodextrin), Nonphysiological mediators, Enzyme electrodes

References

- 1 Grundig B, Krabich C. Electron mediator modified electrodes for the determination of glucose in fermentation media. *Anal. Chim. Acta*, 1989, 222: 75~81
- 2 Sakura S, Buck R P. Amperometric processes with GOD embedded in the electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1992, 28: 387~400
- 3 Foulds N C, Lowe C R. Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers. *Anal. Chem.*, 1988, 60: 2 473~2 478
- 4 吴辉煌, 郑智敏, 周绍民. 生物功能电极(I), *化学学报*, 1991, 49: 689~693
- 5 Tabakovic R, Tabakovic I, Davidovic A. Glucose oxidase immobilized in a polycationic polymer containing ferrocene on a platinum electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 1992, 332: 297~301
- 6 Willner I, Kasher R, Zahavy E, Lapidot N. Mediated electron transfer in glutathione reductase organized in self-assembled monolayers on Au electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114: 10 965~10 966

- 7 Heller A. Electrical wiring of redox enzymes. *Acc. Chem. Res.* , 1990 , 23 , 128~134
- 8 Kutner W , Stock W , Doblhoffner K. Preparation and properties of insoluble films of cyclodextrin condensation polymers. *J. Incl. Phenom.* , 1992 , 13 : 257~265
- 9 Szejtli J. *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*. Budapest : Akademiai Kiado , 1982
- 10 Yamada K , Kohmoto S , Iida H. The inclusion effects of cyclodextrins on photolysis of pbenzoquinone in aqueous solution. *Bull. Chem. Soc , Jpn.* , 1976 , 49 : 1 171~1 172
- 11 Morton R A. *Biochemical Spectroscopy*. New York : Wiley , 1975 : 207
- 12 Bourdillon C , Hervagault C , Thomas D. Increase in operational stability of immobilized glucose oxidase by the use of artificial cosubstrates. *Biotech. Bioeng.* , 1985 , 27 : 1 619~1 622
- 13 Marchesiello M , Genies E M. Glucose sensor : polypyrrole-glucose oxidase electrode in the presence of p-benzoquinone. *Electrochim. Acta* , 1992 , 37 : 1 987~1 992

www.cnki.net