

葡萄糖酶电极测定环糊精聚合物中的环糊精单元^{*}

梁 源 周庆美 曾佑林^{**} 徐满才 谢青季

(湖南师范大学化学化工学院 化学生物学及中药分析教育部重点实验室 长沙 410081)

摘 要 用多巴胺电氧化聚合物膜将葡萄糖氧化酶固定在铅笔电极上, 制得简易的葡萄糖酶电极. 用自制的葡萄糖酶电极对自制环糊精聚合物中环糊精单元进行定量检测. 研究了自制的葡萄糖酶电极的检测范围和稳定性. 结果表明环糊精聚合物中环糊精单元质量与葡萄糖酶电极响应电流间存在很好的线性关系, 且酶电极稳定性好, 可以多次反复使用, 连续使用 30 天, 响应电流只减弱 7%. 与用 Sulfate-Phenol 比色法测得的环糊精聚合物中环糊精单元结果相比, 两者相对偏差在 8% 以内.

关键词 环糊精, 环糊精聚合物, 葡萄糖氧化酶, 酶电极

环糊精 (cyclodextrin, CD) 是一种葡萄糖单元经 α -1, 4 糖苷键结合而成的环状低聚糖, 根据葡萄糖单元数目的不同可分为 α -、 β -和 γ -CD ($\alpha=6$, $\beta=7$, $\gamma=8$), 如图 1. CD 分子有中空圆筒状构造, 环内疏水, 环外亲水, 这种特殊的分子结构使环糊精能与多种疏水性化合物形成包络物, 使得它在超分子研究领域受到了极大的关注^[1,2].

多个环糊精单元存在于高分子链上即构成了环糊精聚合物 (cyclodextrin polymer, CDP). 环糊精聚合物根据合成方法的不同又可以分为交联型与固载型聚合物, 前者是由带有双官能团的环糊精衍生物聚合而成; 后者是将环糊精固载到其它聚合物上而成 (图 2). 环糊精聚合物不但保持了环糊精的包络识别功能, 又兼具有聚合物较好的机

械强度、稳定性和化学可调性, 而且在溶解性上也有一定的改变. 目前环糊精聚合物已经广泛应用于有机化合物的手性分离^[3]、医用高分子吸附剂^[4]和酶类催化有机反应^[5].

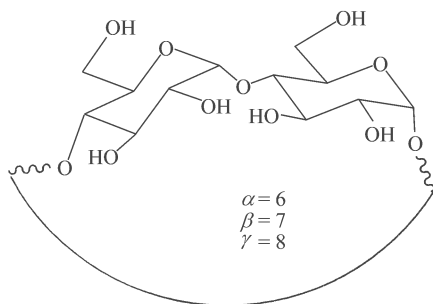


Fig. 1 The structure of cyclodextrin

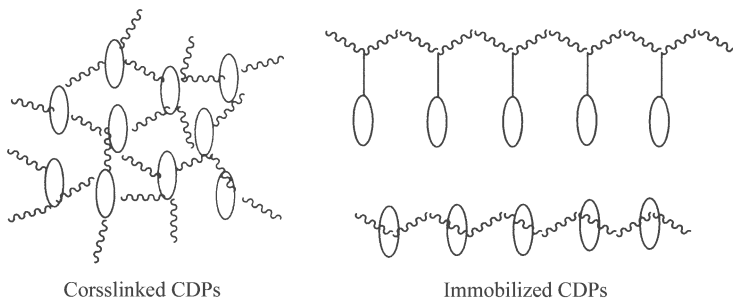


Fig. 2 The structures of cyclodextrin polymers (CDPs)

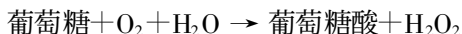
目前测定环糊精本体含量的方法有荧光染料法^[6]、旋光度法^[7]、高效液相色谱法^[8,9]和分光光度法^[10]等. 由于环糊精聚合物在包裹性和溶解性上的改变, 在测定环糊精聚合物中环糊精单元含

量时这些方法都不适用. 多年来测量环糊精聚合物中环糊精单元的方法多是依据 Michel Dubois 在 1956 年提出的 Sulfate-Phenol 比色法^[11,12], 即在酚酞和浓硫酸作用下, 对葡萄糖显色, 从而利用分光

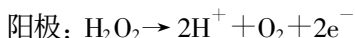
^{*} 2006-12-13 收稿, 2007-01-20 修稿; ^{**} 通讯联系人, E-mail: youlinzengcn@gmail.com

光度计比色测定环糊精单元的含量。

研究发现多巴胺电氧化聚合物膜是一种很好的生物固定基质^[13], 利用该聚合物膜将葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD) 固定在铅笔电极上, 制成简易的葡萄糖传感器。在葡萄糖酶催化作用下, 使葡萄糖发生氧化反应:



生成的 H_2O_2 往膜中扩散达到电极表面发生电化学反应。



在一定浓度范围内, 阳极反应过程中的响应电流与葡萄糖溶液的浓度存在线性关系。因此, 不同浓度 β -CD 标准溶液经水解成葡萄糖溶液后, 用葡萄糖传感器采集阳极反应过程中响应电流的信号, 做电流/ β -CD 标准溶液浓度标准曲线, 根据标准曲线计算出待测 β -CD 聚合物中 β -CD 单元的含量。

本文报道利用自制葡萄糖酶电极对环糊精聚合物中环糊精单元进行测定的新方法, 探讨该方法的测定原理以及应用范围, 在检测环糊精聚合物中环糊精单元含量的手段上提供新的选择。

1 实验部分

1.1 仪器与原料

EG & G M283 型恒电位仪, 三电极系统, 8B 铅笔芯电极(工作电极, 直径 4 mm), 饱和甘汞电极(参比电极), 石墨电极(对电极), 721 分光光度器(上海第一仪器厂), 370FT-IR 红外仪(美国热电公司), 409PC 热重仪(德国耐驰公司)。

葡萄糖氧化酶(GOD, EC 1.1.3.4; 1×10^5 U/g, Sigma 公司), 多巴胺盐酸盐(DA, Fluka), 邻氨基酚(广东台山化工厂), 苯酚, 浓硫酸 95%~98%(湖南师大试剂厂), β -环糊精(AR, 天津大茂试剂有限公司), β -环糊精重结晶两次, 真空干燥(70℃)两天。苯酚重蒸后使用, 单-6-对甲基苯磺酰基- β -环糊精酯(mono-6-OTs- β -CD) 参照文献[14]合成, 聚对氨基苯乙烯参照文献[15]合成。 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 和 K_2SO_4 均为分析纯试剂。实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 酶电极的制备

自制铅笔电极依次在 1:1 硝酸、乙醇和二次蒸馏水中充分浸洗。然后将铅笔电极在 -0.2 V 电位下, 在含 3 mL 2×10^{-3} mol·L⁻¹ H_2PtCl_6 和 0.5

mol·L⁻¹ H_2SO_4 水溶液中镀铂 20 min。将镀铂后的电极转入 3 mL 含有 30 mmol·L⁻¹ DA 和 1 mg·mL⁻¹ GOD 的 20 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH=7.0)中, 在 -0.5~+0.5 V 间以 20 mV·s⁻¹ 的扫描速度循环扫描 30 圈。取出电极用蒸馏水冲洗, 然后置于 3 mL 含 30 mmol·L⁻¹ 邻氨基酚的 20 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液(pH=7.0)中, 在 -0.4~+0.8 V 之间以 20 mV·s⁻¹ 的扫描速度循环扫描 5 圈, 取出电极用二次蒸馏水冲洗备用。

1.3 环糊精聚合物的制备

将 2.0 g 聚对氨基苯乙烯溶于 30 mL 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液中, 加入 mono-6-OTs- β -CD 1.0 g, 搅拌升温至 65℃, 在 N_2 保护下反应 24 h。反应结束后冷却至室温, 过滤, 滤液倾入到 400 mL 无水乙醇中, 出白色沉淀, 过滤。聚合物用 DMF/无水乙醇反复溶解沉淀 2 次提纯, 在 40℃下真空干燥, 得固载型环糊精聚苯乙烯聚合物, 标记为 CDP-1。将 mono-6-OTs- β -CD 的量改为 2.0 g, 在相同条件下反应得环糊精聚合物 CDP-2。

1.4 环糊精以及环糊精聚合物样品的水解

准确称取一定量的环糊精及环糊精聚合物, 加入 25 mL 约 1 mol·L⁻¹ 的 H_2SO_4 , 在 110℃下回流 24 h。待反应完毕后过滤, 将滤液转移至 50 mL 容量瓶中, 调节溶液 pH=7, 定容。

1.5 标准曲线的绘制和样品的测定

1.5.1 酶电极测定环糊精及环糊精聚合物

室温条件下, 以酶电极为工作电极, 20 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液与 0.1 mol·L⁻¹ K_2SO_4 溶液的混合溶液(pH=7.0, 10 mL)为底液, 在 +0.65 V 工作电位下进行测试。搅拌溶液, 待背景电流稳定后加入 100 μL 待测溶液, 记录加入待测溶液前后电流的变化值。

1.5.2 Sulfate-Phenol 比色法测定环糊精及环糊精聚合物 取水解后的环糊精溶液 2 mL, 用二次蒸馏水稀释至 10 mL, 依次加入 1 mL 5% 的苯酚和 5 mL 95% 的浓硫酸, 摇匀, 20~30℃下水浴 30 min 后在 490 nm 处比色测定, 记录吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 环糊精聚合物的表征

图 3 为 6-OTs- β -CD, CDP-1, CDP-2 和 PS-NH₂ 热重分析图, 可见 mono-6-OTs- β -CD 的失重温度主要在 190~210℃, 而 CDP-1 和 CDP-2 的失重温

度在 280 ~ 360 °C, 失重曲线在 mono-6-OTs-β-CD 与 PS-NH₂ 之间. 由红外光谱 (图 4) 可见 CDP-1 与 CDP-2 在 1032 cm⁻¹ 处均有 β-CD 中的 C—OH 的特征吸收峰. 热重和红外表征均说明合成了聚苯乙炔负载型环糊精聚合物.

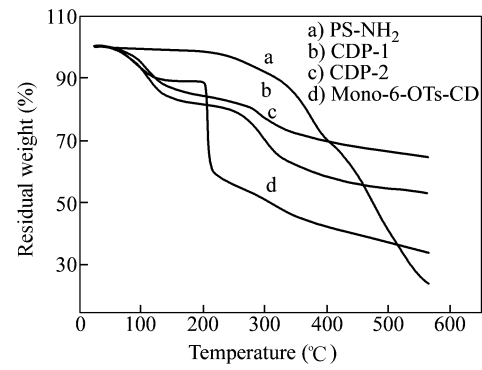


Fig. 3 TGA thermograms for mono-6-OTs-β-CD, CDP-1, CDP-2 and PS-NH₂

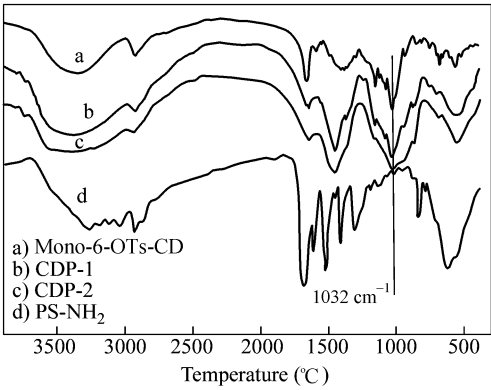


Fig. 4 IR spectra for mono-6-OTs-β-CD, CDP-1, CDP-2 and PS-NH₂

2.2 葡萄糖酶电极的检测范围

配制一系列不同浓度的葡萄糖溶液, 用自制葡萄糖传感器进行检测. 绘制响应电流对葡萄糖溶液中葡萄糖浓度的曲线, 见图 5. 当葡萄糖溶液浓度太低 (< 0.05 mol · L⁻¹) 时响应电流非常微弱, 不利于观察. 而当葡萄糖溶液浓度较高 (> 12 mol · L⁻¹) 时, 响应电流趋于平缓^[6]. 因此葡萄糖传感器的最佳检测范围在 0.05 ~ 12 mol · L⁻¹ 之间.

2.3 酶电极的稳定性

电极在使用过后将其浸泡在缓冲溶液中保护, 但是固定的葡萄糖氧化酶会有一定程度上的失活, 从而影响下一次的检测结果. 对葡萄糖酶电极的稳定性进行相关实验, 在连续测定的条件下, 传感器连续使用 30 天后, 响应电流只减弱 7%

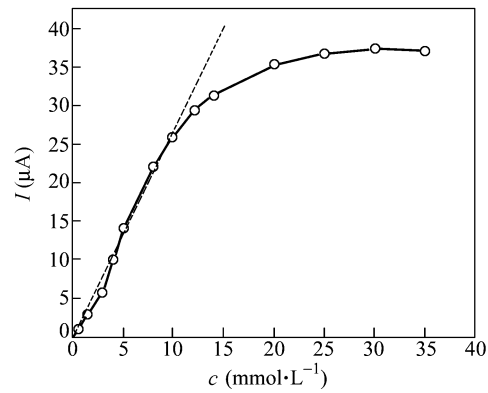


Fig. 5 The relationship between the concentration of glucose and the response current
Data were acquired in 20 mmol · L⁻¹ phosphate buffer containing 0.1 mol · L⁻¹ K₂SO₄ solution (pH 7.0) at an applied potential of 0.65 V versus SCE

(图 6). 说明酶电极在重复使用的过程中仍然保持很高的稳定性. 但在重复使用过程中, 必须通过标准的葡萄糖溶液对电极进行校正.

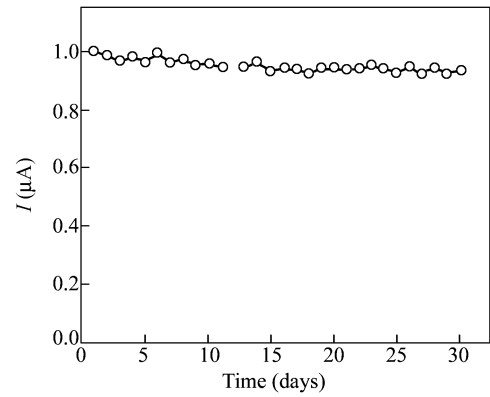


Fig. 6 Stability of the enzyme electrode stored in phosphate buffer (pH 7.0) at 4 °C
Determined by 1.0 mmol · L⁻¹ glucose in 20 mmol · L⁻¹ phosphate buffer containing 0.1 mol · L⁻¹ K₂SO₄ solution (pH 7.0) at an applied potential of 0.65 V versus SCE

2.4 标准工作曲线

综合上述有关葡萄糖酶电极检测葡萄糖含量的影响因素讨论结果, 采用新制葡萄糖酶电极, 对一系列不同浓度环糊精的标准溶液进行了测定. 并以标准溶液环糊精浓度为横坐标, 其相应的响应电流强度为纵坐标绘制标准工作曲线, 见图 7. 可见, 随着环糊精浓度的增加, 响应电流强度也逐渐增长. 通过线性拟合, 得线性方程 $Y = 0.071 + 600X$ (Y 为响应电流强度, X 为环糊精浓度), 发现环糊精浓度与响应电流成很好的线性关系 (线

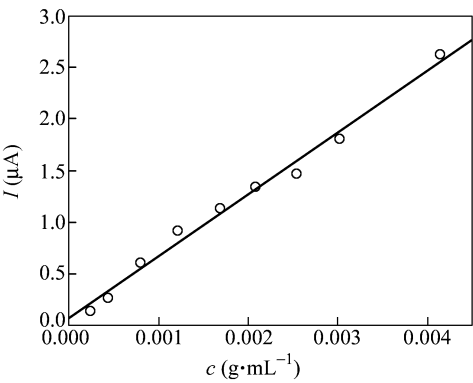


Fig. 7 The standard curve of response current versus cyclodextrin concentration
Determined in 20 mmol·L⁻¹ PB containing 0.1 mol·L⁻¹ K₂SO₄ solution (pH 7.0) at an applied potential of 0.65 V versus SCE

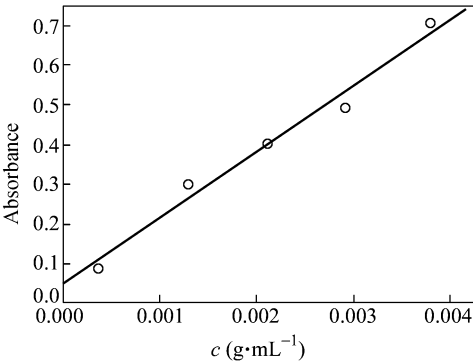


Fig. 8 The standard curve of absorbance versus cyclodextrin concentration

性相关系数为 0.996). 传感器灵敏度高, 可识别浓度差为 0.0001 mol·L⁻¹ 的环糊精溶液.

利用 Sulfate-Phenol 比色法对同一系列标准环糊精进行了测定, 并绘制环糊精浓度与吸光度的工作曲线. 进行线性拟合得到环糊精溶液浓度与吸光度的线性图(图 8) (线性相关系数为 0.991). 拟合线性方程为 $Y=0.048+167X$ (Y 为吸光度, X 为标准环糊精溶液浓度).

对图 7 和图 8 中曲线的线性系数进行比较, 可知在同一检测域内, 酶电极的线性关系略优于 Sulfate-Phenol 比色法. 在 Sulfate-Phenol 比色法中,

苯酚的量决定溶液的颜色强度, 当苯酚的量逐渐增加, 吸光度也随着增加, 最后达到极值, 继续增加苯酚的量吸光度开始下降并趋于平缓^[12], 虽然吸光度的平缓走势对线性关系影响不大, 却仍会有一定的影响. 而葡萄糖酶电极测定法就避免了这一影响, 从而能得到更好的线性关系.

2.5 环糊精聚合物样品的测定结果

分别用葡萄糖酶电极法和比色法对 0.0830 g CDP-1, 0.0801 g CDP-2 中环糊精单元含量进行测定, 测得的吸光度值、响应电流值以及根据它们计算所得环糊精单元质量见表 1.

Table 1 Cyclodextrin units in cyclodextrin polymer quantified by Sulfate-Phenol method and glucose enzymatic sensor

Cyclodextrin polymers	Sulfate-Phenol method		Glucose enzymatic sensor		Relative deviation (m_1-m_2)/ m_1
	Absorbance	Quantity of cyclodextrin	Response current	Quantity of cyclodextrin	
	A	m_1 (g)	I (μA)	m_2 (g)	
CDP-1	0.12	2.16×10^{-2}	0.32	2.07×10^{-2}	4.17%
CDP-2	0.21	4.86×10^{-2}	0.61	4.49×10^{-2}	7.61%

对表 1 中结果进行比较可知, 分别用分光光度法和葡萄糖酶电极在对未知环糊精单元含量的环糊精聚合物进行测定时, 所得到的环糊精单元含量的结果非常接近, 两种方法所得结果的相对偏差在 8% 以内.

综上所述, 通过电化学的方法, 利用葡萄糖传

感器能够准确有效地检测出环糊精聚合物中环糊精单元的含量. 这一检测环糊精聚合物中环糊精单元含量的方法具有葡萄糖酶电极造价便宜, 制作简单, 可实时动态监测, 而且能够长时间存放, 可以多次重复使用等特点. 与传统的比色法比较, 检测结果相差不大, 相对偏差在 8% 以内.

REFERENCES

- 1 Liu Y, Han B H, Qi A D, Chen R T. *Bioorg Chem*, 1997, 25: 155 ~ 162
- 2 Ortega-Caballero F, Rousseau C, Christensen B, Petersen T E, Bols M. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 3238 ~ 3239
- 3 Armstrong D W, Ward T J, Czech A, Czech B P, Bartsch R A. *J Org Chem*, 1985, 50: 5556 ~ 5559
- 4 He Binglin(何炳林), Zhao Xiaobin(赵晓斌). *Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 1992, 11: 1472 ~ 1475
- 5 Harada A, Funte M, Nozakura S I. *Macromolecules*, 1976, 9: 701 ~ 704
- 6 Kondo H, Nakatani H, Hiromi K. *Carbohydr Res*, 1976, 52: 1 ~ 10
- 7 Meier L P, Heule M, Caseri W R, Shelden R A, Suter U W, Wenz G, Keller B. *Macromolecules*, 1996, 29: 718 ~ 723
- 8 Hokse H. *J Chromatogr A*, 1980, 189: 98 ~ 100
- 9 Frijlink H W, Visser J, Drenth B F H. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1987, 415: 325 ~ 333
- 10 Mäkelä M, Korpela T, Laakso S. *J Biochem Biophys Meth*, 1987, 14: 85 ~ 92
- 11 Liu Y Y, Fan X D, Hu H, Tang Z H. *Macromol Biosci*, 2004, 4: 729 ~ 36
- 12 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. *Anal Chem*, 1956, 28: 350 ~ 357
- 13 Li Y L, Liu M L, Xiang C H, Xie Q J, Yao S Z. *Thin Solid Films*, 2006, 497: 270 ~ 278
- 14 Petter R C, Salek J S, Skorski C T, Kumaravel G, Lin F T. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 3860 ~ 3868
- 15 Zhang Jing(张晶), Wang Xiaogong(王晓工). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2002, (2): 180 ~ 187
- 16 Deng C Y, Li M R, Xie Q J, Liu M L, Tan Y M, Xu X H, Yao S Z. *Anal Chim Acta*, 2006, 557: 85 ~ 94

CONTENT DETERMINATION OF CYCLODEXTRINS IN CYCLODEXTRINS POLYMER BY USING GLUCOSE ENZYMATIC ELECTRODE

LIANG Yuan, ZHOU Qingmei, ZENG Youlin, XU Mancai, XIE Qingji

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research,
Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract An amperometric glucose enzymatic electrode was constructed by using dopamine polymer to immobilize glucose oxidase on the pencil lead. It was used to quantify cyclodextrin units in cyclodextrin polymer. The response to the concentrate of cyclodextrin and the stability of glucose enzymatic electrode were investigated. It was found that a good linear relationship exists between the quantity of cyclodextrin and the response current of the enzymatic electrode. It was also found that the enzyme electrode is very robust and can be used repeatedly. The response current only decreased by 7%, and no obvious deterioration in its response performance was found even if the glucose enzymatic electrode was keep using for one month. Compared with the conventional Sulfate-Phenol method, the relative deviation of the determination results from the two methods in within 8%.

Key words Cyclodextrin, Cyclodextrin polymer, Glucose oxidase, Enzymatic electrode