

聚吡咯为基质的脲酶传感器生物电化学响应*

程发良

(东莞理工学院应用化学系 东莞 511700)

莫金垣

(中山大学化学系 广州 510275)

戴晓云

(香港科技大学生化系 香港)

摘 要 用电化学方法在吡咯(Py)聚合的同时,将脲酶掺杂进聚吡咯膜(PPy)中形成以聚吡咯为基质的脲酶电极.将脲酶电极与CO₂气敏电极结合,组成对脲有电位响应的脲酶生物传感器.测试了传感器对脲的生物电化学响应.研究了聚合条件对酶活性的影响,并测定了掺杂于聚吡咯中的脲酶的活化能等动力学参数.在 $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L的浓度范围内,传感器响应的电极电位与脲浓度的对数成正比.

关键词 脲酶,脲,聚吡咯,酶电极,生物传感器,气敏电极

酶电极的制备除了需有合适的指示电极外,还必须制成能保持酶催化活性的水不溶性酶膜.

聚吡咯的高导电性有利于保持酶蛋白的生物催化活性,可以通过PPy氧化=还原态之间的相互转化方便地将酶掺杂进聚吡咯膜中;由于酶是以带负电的粒子形式掺杂在带正电荷的聚吡咯膜中,因此,酶不易从膜中脱落.基于以上优点,已经成功地制备了以聚吡咯为基质的具有生物催化活性的葡萄糖氧化酶^[1]、胆固醇氧化酶^[2]、过氧化氢酶^[3]等酶修饰电极,这些电极都是基于酶促反应的产物的氧化还原反应电流响应进行有关测试的.而对反应产物为非电活性物质的酶促反应,目前很少有制备成聚吡咯修饰酶电极的报道.究其原因,是由于未能发现合适的指示电极.而采用吸附、交联等^[4]方法制成的酶电极或植物组织电极^[5]稳定性、再现性均不够理想.用电化学方法聚合导电高分子聚合物的方法制备的生物传感器有以下优点:(1)方法简单,聚合物聚合和酶的固定化可一步完成并直接固定于电极表面;(2)聚合物膜的厚度和聚合物上修饰酶的量易于控制和调节,从而可能制备重现性良好的传感器;(3)聚合高分子膜严格地在电极的有限表面上形成,因而有利于微电极和阵列电极上酶的固定化;(4)不少高分子膜具有选择性透过某些物质的功能,可以降低干扰.

我们将用电化学方法制备的聚吡咯修饰脲酶(Urease)电极与CO₂气敏电极结合形成脲酶传感器(结构如图1).

传感器中脲酶对脲响应的催化反应如下:

* 1998-04-10 收稿,1998-10-20 修稿

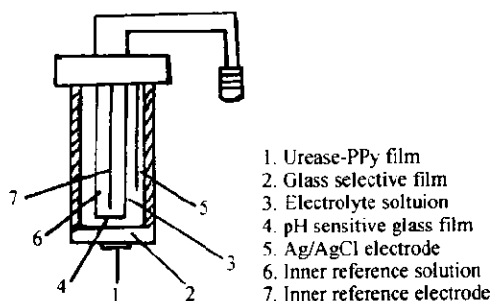
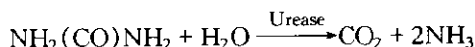


Fig. 1 Structure of PPy-urease sensor

1) Urease-PPy film; 2) Glass selective film; 3) Electrolyte solution; 4) pH sensitive glass film; 5) Ag/AgCl electrode; 6) Inner reference solution; 7) Inner reference electrode



催化反应生成的 CO_2 通过传感器的透气膜与外电解液薄层溶液中的 NaHCO_3 接触, 并通过 NaHCO_3 的电离平衡而影响 pH 玻璃电极中电解质溶液的质子活度, 最后由 pH 玻璃电极在离子计上指示出与 CO_2 量相对应的电极电位的变化. 该传感器显示出良好的生物催化活性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

XJP-821(B) 型新极谱仪 (江苏电分析仪器厂), 3086 型 X-Y 记录仪 (四川仪表四厂), ZD-841 型数字式离子计 (中山大学电子厂), Nicolet 205 型 FT-IR 红外光谱仪 (Nicolet 公司), 502 型复合 CO_2 气敏电极 (江苏电分析仪器厂), 三电极系统, 玻碳电极 (GCE) 为工作电极, 使用前经金相砂纸和 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 抛光成镜面, 并在 $0.1\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 空白溶液中循环扫描数周后, 用双蒸水充分冲洗干净. 对电极为铂柱, 参比电极为饱和甘汞电极 (SCE).

脲酶 (英国 BHD 公司, 从刀豆中提取), 脲 (分析纯, 沈阳试剂一厂), 吡咯在氮气保护下减压蒸馏成无色液体, 氮气气氛中避光保存. KBr 为光谱纯, 其余试剂均为分析纯, 实验用水为石英二次蒸馏水. 所有实验均为通 N_2 除 O_2 后, 在 N_2 气氛下进行.

1.2 实验方法

1.2.1 脲酶电极的制备 三电极系统在 0.1mol/L 吡咯溶液中 (支持电解质为 $0.01\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$) 以 100mV/s 的扫描速度在 $-0.1 \sim 0.7\text{V}$ 之间循环伏安 (CV) 扫描, 玻碳电极上明显可见一层浅紫色的 PPy 膜, 膜的厚度由扫描次数控制. PPy 膜在 $\text{pH} = 4.7$ 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中于 -0.5V 还原 2min , 再浸入含有 1mmol/L 脲酶的 $\text{pH} = 5.3$ 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲溶液中于 0.6V 富集 $30\text{min}^{[5]}$, 即制成了 PPy-脲酶修饰电极.

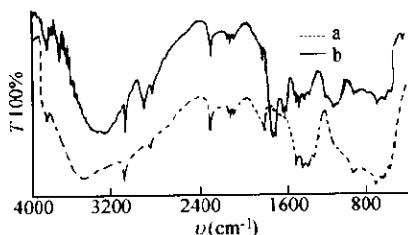


Fig. 2 IR-Spectra of Urease-PPy film absence a) and presence b) of urease

最后将修饰电极在 Py 溶液中 $-0.1 \sim 0.7\text{V}$ 之间循环伏安扫描一周, 在修饰电极表面上覆盖上一层 PPy 保护膜, 以期减少使用过程中脲酶的损失. 酶电极的红外光谱图 (图 2) 显示, 脲酶已掺杂进入 PPy 膜中.

1.2.2 脲酶传感器的制备 将制备好的 PPy-脲酶电极薄膜用刀片小心揭下, 粘贴在 CO_2 气敏电极透气膜的中间位置, 即成聚吡咯脲酶传感器, 在缓冲溶液中活化 24h 后即可使用.

1.2.3 传感器生物催化活性测定方法 以上述聚吡咯修饰的脲酶传感器为复合电极, 用

离子计测定不同浓度脲溶液的电极电位,并计算出有关动力学参数。

2 结果与讨论

2.1 影响传感器响应性能的因素

2.1.1 PPy 膜的厚度 实验表明,PPy 膜过厚,脲酶传感器对脲的响应平衡时间变长.这是由于 PPy 膜中,每 3~4 个 Py 单体才带有一个正电荷^[6],因而,脲酶在 PPy 膜中掺杂的量不可能太多.膜过厚时,底物(脲)与脲酶接触前需在膜中扩散的距离相应增加,因而,响应速度变慢;膜过薄,酶容易从膜中脱落,传感器的稳定性和寿命均下降.在 0.1mol/L 的 Py 单体溶液中以 100mV/s 的扫速循环扫描 10 次所得的 PPy

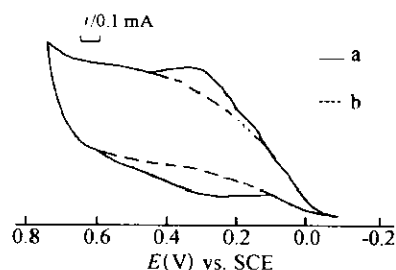


Fig. 3 CV of Urease-PPy modified electrode in buffer solution pH of Urease solution
a) 4.7; b) 5.3

2.1.2 制备过程溶液 pH 值的影响 PPy-Urease 修饰电极制备过程中,脲酶溶液 pH 值<5 时,脲酶不能掺杂进 PPy 膜中,反映在制备好的修饰电极在空白缓冲溶液中循环伏安扫描时,CV 图上(图 3a)只有 PPy 的氧化还原电流,而没有典型的阴离子掺杂=释放峰;同时,在修饰电极膜的红外光谱图上只有 PPy 的特征吸收峰,没有脲酶的特征吸收峰.这是由于脲酶的等电点(pI)=5.15,溶液酸度高于脲酶的等电点时,脲酶以带正电荷的粒子形式存在于溶液中,无法掺杂到带正电荷的氧化态 PPy 膜中;在 pH=5.3 的缓冲溶液中制备的 Urease-PPy 修饰电极 CV 图上(图 3b),氧化还原电流明显下降,其 IR 光谱图上有脲酶的特征吸收峰;这是由于绝缘体的脲酶掺杂进聚吡咯膜中,使其导电率下降.但酸度过低,PPy 膜的结构将发生某种变化,并导致 PPy 膜的导电性能下降^[7].因此,选择在 pH=5.3 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲溶液中制备 PPy-Urease 修饰电极。

2.2 PPy-Urease 传感器的生物催化活性

2.2.1 响应时间 传感器在 1.0×10^{-4} mol/L 脲溶液中电极电位达到平衡(电极电位变化幅度: ± 0.5 mV/min.)平均所需时间为 5min,与 CO_2 气敏电极本身响应时间相当,说明传感器响应速度的控制步骤是 CO_2 气敏电极对 CO_2 的响应.而传感器中脲酶催化脲的反应为快反应。

2.2.2 脲溶液酸度对传感器响应的影响 测定传感器对不同酸度的 1.0×10^{-4} mol/L 脲溶液的电位响应(图 4),pH<5 时,响应非常微弱,在 pH=5.5~6.5 之间,电极电位基本保持稳定,当 pH>8.5 时,电位响应消失.PPy-Urease 传感器对脲的催化反应取决于酶的活性和 PPy 膜的导电性.高酸度溶液中,PPy 导电性好,但脲酶的生物活性下降,甚至消失(溶解态的脲酶最适 pH 值为 8.0);酶度降低有利于脲酶生物活力的提高,但低酸度溶液中,由于 PPy 膜的去质子化而导致其导电性能下降^[8],同时,酸度过低也使气敏电极对 CO_2 响应的灵敏度降低.因此,电极电位的测定选择在 pH=6.0 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲溶液中进行。

2.2.3 温度的影响 与溶解态的酶不同的是^[9],传感器中的脲酶并不表现出最佳温度

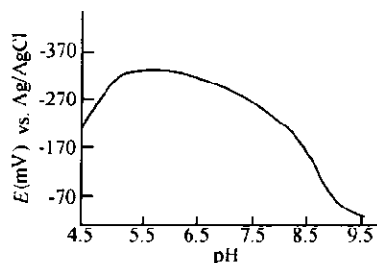


Fig. 4 Potential response of the sensor in solution of different pH Solution
 10^{-4} mol/L Urea

(20 ~ 35℃ 之间), 而是随着温度升高, 酶活力亦升高. 穆绍林^[5]认为, 这是由于酶与聚吡咯链之间的某种结合方式对酶起到保护作用.

根据 Arrhenius 速度常数公式:

$$\ln K = -E_a/(RT) + \ln A \quad (1)$$

电极电位

$$E = E^0 + RT \ln C / (nF) \Rightarrow \ln C = nF \Delta E / (RT) \quad (2)$$

当底物浓度一定时, 用 CO_2 浓度(电位值)代替反应速率常数, 则有:

$$\ln C = -E_a/(RT) + \ln A = nF \Delta E / (RT) \quad (3)$$

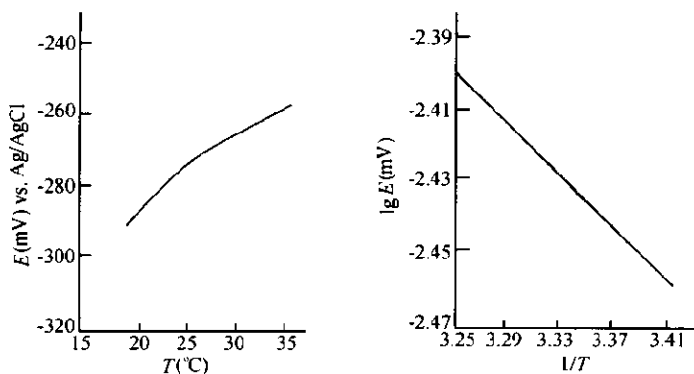


Fig. 5 Effect of temperature on activity of the sensor Solution
 10^{-4} mol/L Urea, pH = 6.0

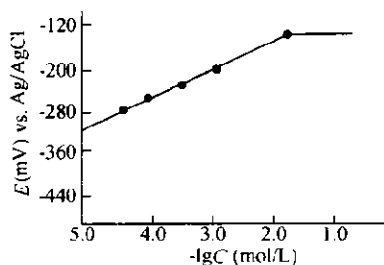


Fig. 6 Potential response of the sensor to urea of different con.
 pH = 6.0

以 ΔE 对 $-1/T$ 作图(图 5), 根据曲线的斜率可以求得 PPy-Urease 传感器中脲酶催化反应的活化能为 47.77 kJ/mol.

2.2.4 脲酶以不同浓度脲的电位响应 25℃ 下, $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L 范围内, 传感器响应的电位值与脲浓度的对数成直线关系, 浓度大于 1.0×10^{-2} mol/L 时, 浓度升高, 电位保持恒定, 表现出酶催化反应典型的一级反应向零级反应转化

2.2.5 传感器的寿命和稳定性 在 1.0×10^{-4} mol/L 脲溶液中平行测定 5 次, 相对标准偏差为

2.3%; 传感器在 4℃、氮气气氛下避光保存 15 天后酶活力下降 6.4%.

文献报道, PPy 膜可以制成气体敏感膜^[10], 电活性离子可以穿透 PPy 膜电极^[11], 交

流阻抗谱表明 PPy 修饰的酶电极为多孔电极^[12]。因而, PPy-Urease 修饰电极有望直接制成对脲响应的传感器, 而无需借助透气膜。但我们制备的 PPy 膜的机械性能尚不能满足加工需要。

REFERENCES

- 1 Schuhmann E, Kittsteiner R. *Biosensors and Bioelectronics*, 1991, 6:263 ~ 269
- 2 Kajiya Y, Tsuda R, Yoneyama H. *J Electroanal Chem*, 1991, 301:155 ~ 161
- 3 Tatsuma T, Gondaira M, Watanabe T. *Anal Chem*, 1992, 64:1183 ~ 1192
- 4 He S W, Xu Y J. *J Hunan University*, 1994, 21(1):28 ~ 34
- 5 Mo S L, Gan J Q. *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 1993, 5:632 ~ 638
- 6 Baker C K, Reynolds J R. *J Electroanal Chem*, 1988, 251:307 ~ 313
- 7 Lourse L D, Poster S T. *Synth Met*, 1989, (28):761 ~ 767
- 8 Genies E M, Syed A A. *Synth Met*, 1984, 10:21 ~ 28
- 9 Nie J C, Wu G L, Zhang Y S. *Brief Induction of Bio-Chemistry*, Beijing:High Education Press, 1988. 97 ~ 98
- 10 Miasik J J, Hooper A, Tofield B C. *J Chem Soc faraday Trans*, 1986, 82:1117 ~ 1127
- 11 Wang J, Hutchins L D. *Anal Chem*, 1992, 64:635 ~ 643
- 12 Zheng Z M, Wu H H, Zhou S M. *Acta Physical Chimica Sinica*(物理化学学报), 1991, (7):163 ~ 169

BIOELECTROCHEMICAL RESPONSE OF POLYPYRROLE MODIFIED UREASE BIOSENSOR

CHENG Faliang

(*Department of Applied Chemistry, DongGuan Institute of Technology, Dongguan 511700*)

MO Jingyuan

(*Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275*)

DAI Xiaoyun

(*Department of Bio-chemistry, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong*)

Abstract Urease was doped into polypyrrole (PPy) film when pyrrole (Py) was polymerized by cyclic voltammogram. By Combination of PPy modified urease electrode and CO₂ gas-sensitive electrode a bioelectrochemical sensor was formed, which responses to urea. Factors affecting the activity of urease in PPy film were studied and activation energy of the ferment was determined. It was found that electrode potential is in direct proportion to the logarithm of the concentration of urea within the concentration range of $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L.

Key words Urea, Urease, Polypyrrole, Biosensor