

# 苯醌修饰葡萄糖氧化酶电极

胡 军

(上海市工业微生物研究所, 上海)

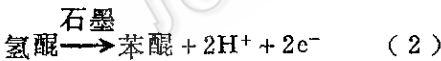
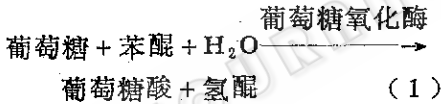
Turner, A. P. F.

(英国鹤田理工学院, 生物工程研究中心)

本文用苯醌作为电子传递介体, 石墨电极为基础电极。葡萄糖氧化酶和苯醌吸附在石墨电极表面, 再用戊二醛交联固定。制成的酶电极以电流法测定底物葡萄糖浓度, 其线性响应范围为(0—15mmol/L)。本工作测定了介体改良酶电极对葡萄糖的响应值, 酶电极的pH 范围, 介体的循环伏安图谱, 以及温度对酶电极的影响。

**关键词** 苯醌; 直流电循环伏安法; 介体; 葡萄糖氧化酶电极

电流型酶传感器是在一定的电压下, 记录反应体系中因氧化还原反应而产生的电流变化并将之放大的一类电化学装置<sup>[1]</sup>。已有很多采用各种介体材料同酶电极配合组成生物传感器的成功例子<sup>[2,3]</sup>。本研究采用苯醌取代自然电子受体——氧, 其反应方程式如下所示:



## 材 料 和 方 法

### (一) 电极的制备

石墨片切成直径为6mm厚1mm的小圆片(Le Carbone, Portslade, Sussex), 用环氧树脂胶(Araldite, Ciba-Geigh, Duxford, Cambs)粘在3cm长的玻璃管上, 置于100℃下硬化20min。将6cm长的金属线联接在玻璃管内石墨片背面上, 用银鋈树脂(RS Components Limitecl, Corb., Northants)粘接, 并置于100℃处理20min。

### (二) 酶电极

100mmol/L 苯醌溶液于丙醇中至透

明, 将已制成的石墨电极浸于该溶液中, 室温保持120min取出后空气干燥30min, 然后将处理过的石墨电极, 转至20mmol/L 磷酸缓冲液中(pH7.0), 该溶液还含葡萄糖氧化酶25mg/ml(15000u/g; Sigma Co.)和1.5%戊二醛, 4℃处理过夜, 取出用缓冲液洗涤若干次, 冰箱保藏备用。

### (三) 测定装置

酶电极同一个四通道生物传感器程序转换器联接, 用BBC, 64K 微电脑分析酶电极的各种性能。系统参考电极为 Ag/AgCl, 反应器是一5ml 玻璃夹套装置, 反应体积为4ml, 温度控制在30±0.5℃。所用缓冲溶液为 pH7.0, 20mmol/L 磷酸缓冲液内含0.1mol/L KCl, 电压设定在0.2V, 并附磁力搅拌。

### (四) 介体的循环伏安测定法

苯醌改良电极在反应体系中的电化学性质, 可用循环伏安法考察<sup>[4]</sup>。该系统中的工作电极为玻璃碳电极, 对电极为铂电极, 参考电极为甘汞电极。相对于饱和甘汞电极, 伏安计设定的工作电压为-300

本文于1989年4月7日收到。

鹤田理工学院生物中心主任John Higgins教授对本工作提供帮助, S.P.Hendry博士对本工作提出许多建议和讨论, 一并致谢。

mV至+500mV范围内。所使用的伏安记录图谱仪为BAS-100电化学分析仪(BAS, West Lafayette, ZN<sup>1</sup>:47906), 扫描速率为每分钟5mV。

## 结果和讨论

### (一) 酶电极的校正曲线

酶电极测定葡萄糖浓度的条件, pH 7.0, 温度为 30℃, 其线性稳定态响应范围为 0—15mmol/L 葡萄糖浓度。超过 15 mmol/L, 曲线趋向非线性并在 50mmol/L 葡萄糖浓度时达到饱和(图 1)。以 1mol/L 葡萄糖为底物, 一次进样量为 20 $\mu$ l。

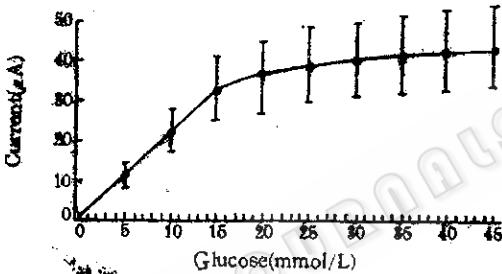


图 1 酶电极对葡萄糖浓度测定之校正曲线, 5支电极重复

Fig. 1 Calibration curve showing the mean steady-state current versus glucose concentration obtained from 5 benzoquinone-modified glucose oxidase electrodes at pH 7.0 and 30℃. The standard deviation error bars ( $n=5$ ) illustrate the enzyme electrodes reproducibility.

葡萄糖加入后, 60—90秒达到响应值的90%, 3min后达到稳定态响应。从 5 支电极平行测定之结果表明, 酶电极制作的重复性良好。

### (二) 酶电极的pH范围

在 pH4.0—9.0 范围, 温度 30℃, 用 50mmol/L 葡萄糖测定了 pH 对酶电极阳电流的影响(图 2)。

数据表明酶电极的最佳 pH 为 7.0。同前述采用人工电子受体的葡萄糖氧化酶电极报道类似<sup>[5-7]</sup>。

而用氧作为电子受体的同类酶电极, 其最适 pH 通常为 5.5—5.7<sup>[8,9]</sup>。这一差别可能是系统中极少有质子参于苯醌离子的还原。过高或过低的 pH, 将导致酶电极的活性下降。

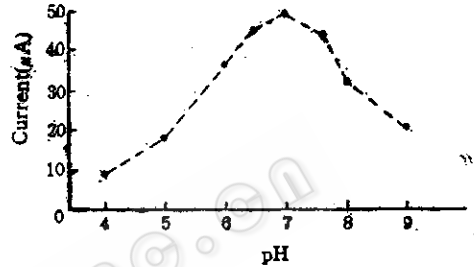


图 2 苯醌改良酶电极在 30℃ 和 50mmol/L 葡萄糖浓度时的 pH 范围

Fig. 2 The pH profile of the benzoquinone-modified glucose oxidase electrode at 30℃ and 50mmol/L glucose, demonstrating optimum activity at pH 7.0.

### (三) 苯醌离子作为葡萄糖氧化酶的氧化剂

考虑苯醌是否能作为葡萄糖化酶氧化葡萄糖时的电子受体, 可以伏安图谱揭示。图 3(a) 标明苯醌在单加葡萄糖时的伏安图谱比较平缓无峰值出现, 而在图 3(b) 中加入葡萄糖氧化酶后伏安图谱在 +50 mV 处开始发生变化, 到 +200mV 时达到峰值, 此时的氧化电流为最大, 这表明苯醌既可以氧化葡萄糖氧化酶而使自己处在还原态, 又可进一步被石墨电极氧化放出电子, 使伏安图谱显示很大的电流变化。

### (四) 温度对酶电极的影响

在 pH7.0 和 50mmol/L 葡萄糖浓度条件下, 于 4—50℃ 范围内考察了温度对酶电极的影响(图 4)。在饱和葡萄糖浓度下, 电极的稳定态电流随温度的增加而增

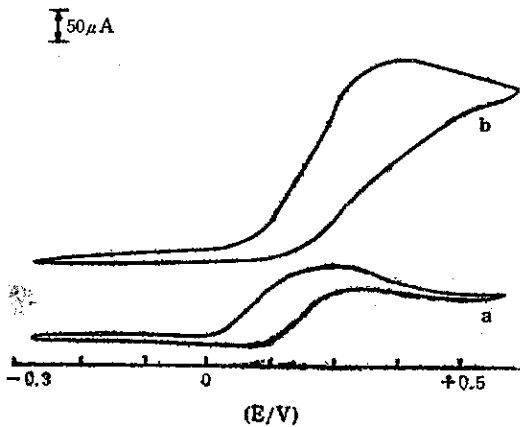


图 3 苯醌改良酶电极的伏安图谱(葡萄糖浓度 50 mmol/L, pH7.0, 温度30℃)

Fig. 3 Cyclic voltammograms measured on a benzoquinone electrode in phosphate buffer containing glucose 50 mmol/L (pH7.0, 30℃) using a SCE reference electrode

- a. 不加酶的伏安图谱  
without glucose oxidase enzyme
- b. 加酶后的伏安图谱  
with glucose oxidase enzyme

加。图示的非线性曲线部分可能是因为酶反应从低温度的底物扩散限制效应转到较高温度时的酶反应限制效应。

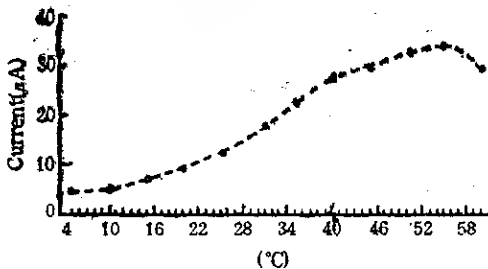


图 4 苯醌改良酶电极的温度范围

Fig. 4 Benzoquinone-modified enzyme electrode to changing temperature at pH 7.0 and 50 mmol/L glucose

**(五) 酶电极的稳定性**

酶电极在 pH7.0和30℃, 于饱和葡萄糖浓度(50mmol/L)时, 其峰值电流为 48.5μA。图5表明在非连续操作下(每天

20—30次), 5天后酶电极仍保持原有活性的76.2%, 20天后仍有原始活力的 9%。这说明在一般工作情况下, 酶电极的活性呈缓慢下降趋势。冰箱保藏25天的酶电极同新制备的酶电极在性能方面差别甚小。

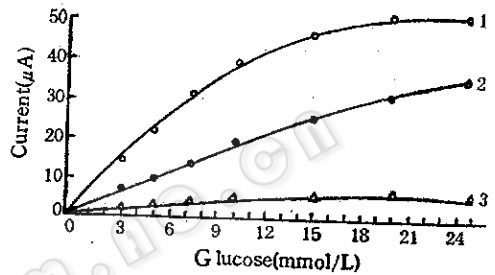


图 5 苯醌改良酶电极的稳定性

Fig. 5 The stability of the enzyme electrodes  
1. 原电极 Original electrode 2. 5天后 5 days old 3. 20天后 20 days old

**结 论**

本研究表明, 采用苯醌改良葡萄糖氧化酶电极是可行且有效的。其优点是氧化剂浓度易于控制, 对底物的测定有较宽的线性范围, 从而有益于无氧条件下的测定。苯醌具有良好的电学性质, 当其溶解在有机溶剂中再被石墨吸附, 显示较好的稳定性, 保证了电子有效地在固定化酶和电极表面的传递活动, 从而使酶电极能快速地重复分析测定底物。苯醌还能有效地避开溶氧的<sup>[9]</sup>。所以苯醌完全能够取代氧作为电子受体, 因而可广泛用于医学血糖分析, 发酵监控和食品等的电化学分析中。

## 参 考 文 献

- [1] Albrey, W.J. et al.: In: *Biotech' 85*, Online Publications, Northwood, p.359, 1985.
- [2] Cardosi, M. F. et al.: In: *Biosensors: Fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1987.
- [3] Cenas, N. K. et al.: *J. Electroanal. Chem.*, 128: 103—113, 1984.
- [4] Davis, G.: In: *Biosensors: Fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1987.
- [5] Inaiello, R. M. et al.: *Anal. Chem.*, 53: 2090—95, 1981.
- [6] Turner, A.P.F.: In: *Biotech' 85*, Online Publication, Northwood, pp.181—192, 1985.
- [7] Racine, P. et al., *Med. Instrument.*, 9:11—14, 1975.
- [8] Turner, A. P. F. et al.: In: *Biosensors: Fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1987.
- [9] Williams, D.L. et al.: *Anal. Chem.*, 42: 118—121, 1970.

## BENZOQUINO MODIFIED GLUCOSE OXIDASE ENZYME ELECTRODE

Hu Jun Turner, A. P. F.\*

(Shanghai Institute of Industrial Microbiology, Shanghai)

\*(Bioelectronics Division, Biotechnology Centre, Cranfield Institute of Technology,  
Cranfield Bedfordshire MK43 0AL, England, U.K.)

Much of research on glucose sensor and some other biosensors have concerned developing systems in which electrons are transferred from the enzyme to some of kind of electrode directly, thereby eliminating the peroxide intermediate step. It is possible to affect this process by direct electrochemistry at chemically modified electrodes or using chemical mediators in solution or retained on or within the electrode. This paper describes an amperometric enzyme electrode for the analysis of glucose. The glucose sensor utilised the mediator benzoquinone to facilitate electron transfer from glucose oxidase to a carbon graphite electrode. A linear response to the glucose concentration over a range (0—15 mmol/L) was observed. Results concerning the electrodes response to glucose, its pH profile, cyclic voltammetry of the mediator and the effect of temperature are presented.

### Key words

Benzoquinone; DC cyclic voltammetry; mediator; glucose sensor