

以二茂铁为中间介质的葡萄糖电极的研制

喻 歌

李友荣

(辽宁大学生物系, 沈阳) (华东化工学院生化工程系, 上海)

摘要 以二茂铁为中间介质的葡萄糖电极是由葡萄糖氧化酶、含有二茂铁的电极糊和铂金电极构成的。由于用二茂铁代替氧作为电子受体, 故此电极的响应只取决于葡萄糖浓度, 而与氧分压无关。该电极的稳态响应时间为 40—120s, 线性范围为 0.6—16mmol/l。本文还讨论了各种因素 (pH、温度、搅拌速度和一些基质) 对电极的影响。用此电极对牛血清和发酵液中的葡萄糖含量进行测定并与酶法比较, 结果令人十分满意。

关键词 电极; 葡萄糖氧化酶; 二茂铁

葡萄糖含量是医学临床和发酵工业上的一个重要测定指标。测定葡萄糖含量的方法很多, 但最简单、快速且成本又低的方法莫过于使用葡萄糖电极。早在 60 年代初 Clark 就研制了由葡萄糖氧化酶和 Clark 氧电极构成的葡萄糖电极^[1], 用它测定氧的消耗来间接地反映样品中的葡萄糖含量; 后来, 又有人研制了通过测定生成的过氧化氢量间接反应样品中的葡萄糖含量的电极^[2]。但是, 上述两类电极都有缺点——其响应不仅取决于葡萄糖的浓度, 而且还与氧分压有关。近年来人们开始研制用其他电子受体(或中间介质)取代氧的电极。中间介质的种类很多^[3-6], 而二茂铁及其衍生物因具有疏水性和传递电子速度快的特性, 深受各国科学工作者的青睐, 1984 年 Cass 等首先发表了以 1,1'-二甲基二茂铁为中间介质的葡萄糖电极^[7], 效果较好。我们研制的以二茂铁为中间介质的葡萄糖电极, 电极的线性和重演性较好, 响应时间为 40—120s, 每支电极可测定样品 2000 余个, 已可同国外同类电极相媲美。

材料与 方法

(一) 药品与仪器

葡萄糖氧化酶, 23u/mg (Sigma 化学药品公司); 二茂铁(中科院有机所); 石墨粉, 光谱纯(上海碳素厂); 液体石蜡, CP(上海化学试

剂总厂); 葡萄糖, AR(重庆北碚化学试剂厂); 半透膜, 截留分子量 10000; 铂金, 99.9% (上海化学试剂采购供应站试剂厂)。501 型超级恒温槽, 重庆实验设备厂生产; 81-2 型恒温磁力搅拌器, 上海县曹行无线电元件厂生产; SV-1 溶出伏安分析仪, 复旦大学科教仪器厂生产; XWC100 型电子电位差自动记录仪, 上海自动化仪器三厂生产。

(二) 电极的构成

在一个直径为 6mm 的铂金片(厚 0.1mm)一面连接上一根铜导线, 然后用环氧树脂将此铂金片固定在一根直径为 6mm 的玻璃管内, 在铂金片与管底构成的空间内填充由二茂铁、石墨粉和液体石蜡配成的电极糊, 在电极糊上

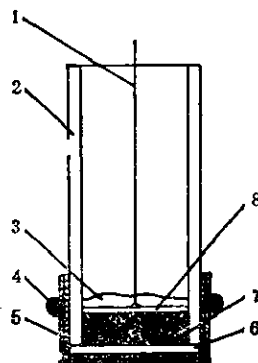


图 1 电极结构示意图

1. 导线; 2. 玻璃管; 3. 环氧树脂; 4. O-型环;
5. 半透膜; 6. 酶; 7. 电极糊; 8. 铂金片

放上一定量的葡萄糖氧化酶,再覆盖上一层半透膜,最后用 O-型环将半透膜固定。

(三) 测定过程

先打开溶出分析仪开关,设置电极电位为 200mV,开启超级恒温槽和记录仪,在反应器内加入一定量的缓冲溶液,插入电极,待得到稳定的基线后,用微量注射器加入样品,待重新得到稳定电流值为止。两次稳定电流值之差在一定范围内与葡萄糖浓度成正比。

结果与讨论

(一) pH 对电极的影响

pH 的变化会导致酶对底物亲和力的变化,从而改变酶的活力。对于同一种酶来说,电子受体不同,酶的最适 pH 也不同。我们考查了在其它条件均相同只改变 pH 时电极响应值的变化,从图 2 中可看出, pH 在 7.7—9.0 之间响

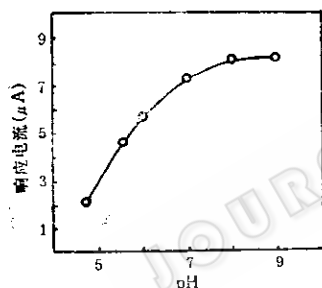


图 2 pH 与响应电流的关系
磷酸盐浓度 0.1m mol/L, 温度 30℃,
葡萄糖浓度 2m mol/L

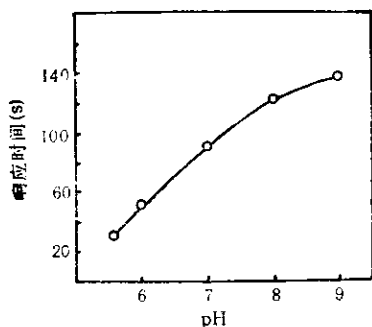


图 3 pH 与响应时间的关系
磷酸盐浓度 0.1m mol/L, 温度 30℃,
葡萄糖浓度 2m mol/L

应值最大,电极在 pH7.0—9.0 之间响应值基本不变。又从图 3 可见,电极的响应时间随 pH 的增大而增加。综合以上试验结果可知, pH7.0 为最佳测定的 pH。

(二) 温度对电极的影响

温度升高可以加快酶反应速度,从而使电极的响应时间缩短;但是温度过高会引起酶失活。图 4 是电极响应值随温度变化的曲线以及温度-响应时间曲线。

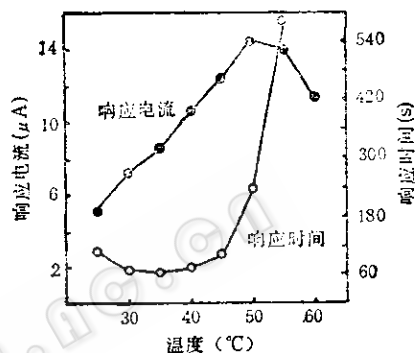


图 4 温度-ΔI、温度-响应时间图
pH7.0, 磷酸盐浓度 0.1m mol/L, 葡萄糖浓度 2m mol/L

由图 4 可看出,电极的响应值在 50℃ 以下随温度的升高而增大,超过 50℃ 后响应值开始减小,从图 4 中还可看出,温度在 30℃ 以下响应时间随温度升高而减少,在 30—40℃ 之间响应时间几乎不变,而温度超过 40℃ 响应时间随温度升高而急剧增加。考虑到电极的使用寿命,故选择 30℃ 为最佳测定温度。

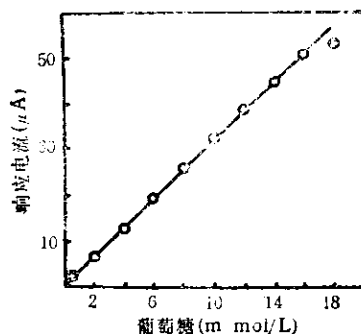


图 5 电极的线性关系
pH7.0, 磷酸盐浓度 0.1m mol/L, 葡萄糖浓度 2m mol/L

所以该电极的响应与氧分压无关,这一点为发酵过程中葡萄糖浓度的在线测定提供了先决条件;第二,二茂铁离子和还原型的葡萄糖氧化酶的反应速度很快,故该电极的响应时间较短为 40—120s (国外同类电极的响应时间为 60—90s)。用此电极测定一个样品最多只需 4 分钟,而用酶法测定一个样品约需 30 分钟,而且操作也比酶法简单;第三,该电极在较宽的 pH 范围内具有良好的线性关系,以在 pH7.0 时线性范围最宽为 0.6—16mmol/l;第四,多数发酵液成分对电极无干扰,因此用该电极进行测定时所得结果准确;第五,由于该电极为固体电极,故无加电解质溶液的麻烦,而且制作简单,又易

小型化,但目前该电极的寿命为十天,还需通过改进酶和中介介质的固定化方法来延长。

参 考 文 献

1. Clark LC and C Lyons: *Ann. Ny. Acad. Sci.*, **102**: 29—45, 1982.
2. Thevenet DR et al.: *Bioelectrochem. Bioeng.*, **5**: 548, 1978.
3. Blacdel WJ and RA Jenkins: *Anal. Chem.*, **47**: 1337, 1975.
4. Jaegfelds TK and G Johansson: *J. Am. Chem. Soc.*, **105**: 1805, 1983.
5. Cenas N et al.: *Liet. TSR Moksl. Akad. Darb. Ser. B* **3**: 13, 1983.
6. Turner APF et al.: *Anal. Chem.*, **163**: 161, 1984.
7. Cass AEG et al.: *Anal. Chem.*, **56**: 667—671, 1984.