

提高 1, 1'-二甲基二茂铁石墨糊谷氨酸电极寿命的研究

李青山 张嗣良 俞俊棠*

(华东理工大学化工工程研究所 上海 200237)

自从 Cass^[1]1984 年首先报道了二茂铁介体电极以来,已有不少文献报道了这方面的研究工作。还原态的二茂铁不溶于水,而氧化态的二茂铁却溶于水。这样介体电极在使用过程中会因介体的逐渐丢失而失去作用。为了提高介体的稳定性,已报道了多种方法^[2~7]。

提高酶膜的稳定性是生物传感器研制中的一个重要方面。以前一般采用改进固定化方法与选择固定化载体^[8]来提高酶膜的稳定性。本文将报道用 DEAE-葡聚糖提高 DcFe 介体电极稳定性的新方法与应用 DEAE-葡聚糖和乳糖混合物稳定自产的谷氨酸氧化酶的研究结果。

1 实验部分

1.1 试剂

谷氨酸氧化酶: 10u/mg, 自制^[9], DEAE-葡聚糖: Sigma 公司; 1, 1'-二甲基二茂铁: Aldrich 公司; 石墨粉: 光谱纯, 上海碳素总厂; 液体石蜡: 化学纯, 上海天场化工厂; 透析袋: Farco 化学公司; 缓冲液: Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 0.05mol/L (pH7.0) 溶液; 谷氨酸: 上海政翔化学试剂研究室; 其它皆为分析纯试剂。

1.2 实验仪器及设备

溶出伏安仪(电源用): 复旦大学科教仪器厂; 记录仪: 四川仪表四厂; 循环伏安仪: 江苏电分析厂; X-Y 记录仪: 大华仪表厂; 电磁搅拌器: 上海南电讯器材厂。

1.3 电极制备

直径 5mm 铂金片焊接上铂丝后用树脂封到聚四氟管中, 留下 2mm 深的空来填入石墨糊。石墨糊由石墨粉 0.4g, 液体石蜡 0.25ml, DcFe100mg 混合而成。填入石墨糊, 在玻璃片上磨平, 加上谷氨酸氧化酶 20 μl 、牛血清白蛋白与戊二醛的混合物, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中凉干。混合物配比为: 谷氨酸氧化酶 20 μl (含 4mg 蛋白)、牛血清白蛋白 10 μl (含 2mg)、5% 戊二醛 10 μl 。凉干后根据需要滴加 DEAE-葡聚糖与乳糖的混合物, 凉干再覆盖上透析膜即成。

1.4 实验装置

电极在普通的带有三电极检测池的流动注射系统中测定谷氨酸, 循环伏安法同常规实验。

2 结果与讨论

2.1 1, 1'-二甲基二茂铁从石墨糊中丢失现象

DcFe 的介体电极基线总是向下漂移, 图 1 为 DcFe 介体谷氨酸氧化酶电极在流动注射系统中不加谷氨酸时基线随时间漂移的曲线。曲线向下漂移正是氧化态 DcFe 逐渐丢失的结果。现简单分析一下 DcFe 介体电极过程。DcFe 介体电极上加上极化电压之后, 在电极表层, 还原态的 DcFe 失去电子转化为氧化态的 DcFe, 此步产生的电流大小与转化速率成正比。转化产生的氧化态 DcFe 从石墨粉表面解吸进入液体石蜡, 再扩散至电极表面水膜层, 由水膜扩散至缓冲液。在准稳态过程中, 这几步的通量应近

本文于 1994 年 6 月 9 日收到。

* 联系人。

似相等，这就是说产生电流的大小与氧化态的 DcFe 从膜层向缓冲液扩散的速率成正比。根据法拉第定律应有：

$$i_f = nF \cdot K_d \cdot c_{*}^0$$

其中 K_d 为氧化态的 DcFe 从水膜中向缓冲液中扩散的扩散系数。 c_{*}^0 为水膜与石蜡层的表面相接处氧化态 DcFe 的浓度，而 c_{*}^s 为水膜与石蜡层的表面相接处氧化态 DcFe 的浓度。 c_{*}^s 与石墨糊中的介体浓度有关，随着介体的丢失， c_{*}^s 势必下降，这样 i_f 也势必下降。这就是为什么介体电极基线电流总是向下漂移的原因，这一现象也正说明了 DcFe 的确从石墨糊中逐渐丢失。

2.2 DEAE-葡聚糖对介体电极稳定性的改进

加入 DEAE-葡聚糖后，DcFe 电极稳定性提高表现为基线电流变小且下降变慢，详见图 1。图 1 中两条曲线的工作电压均为 0.3V，如果工作电压为 0.2V，加入 DEAE-葡聚糖后，基线电流变得更小，为 0.3V 的 1/38，且基线电流基本上维持不变。为什么 DEAE-葡聚糖能起到稳定与减小基线电流的作用呢？这是由于 DEAE-葡聚糖在 pH=7.0 时带正电荷，而氧化态的 DcFe 也带正电荷，同种电荷相斥，所以氧化态的 DcFe 一方面难以从液体石蜡进入水膜层，另一方面进入水膜层的氧化态 DcFe 一方面也难以穿过 DEAE-葡聚糖溶液层而扩散至透析膜层，进一步扩散到缓冲液主体中。前一方面的效果可以从循环伏安法图上看到，图 12 为加入 DEAE-葡聚糖与没有加的循环伏安图。这里值得一提的是，DEAE-葡聚糖提高了 DcFe 为石墨糊电极稳定性同时，也解决了 DcFe 石墨糊电极基线电流大与基线电流不稳定两个问题，使电极性能得到了进一步的改善。

2.3 DEAE-葡聚糖与乳糖的混合物对游离酶的稳定作用

自产的谷氨酸氧化酶比日本 Yammassa 酱油株式会社生产的谷氨酸氧化酶热稳定性差，后者已被广泛应用于谷氨酸含量的分析与谷氨酸电极的制备。自产的酶在制备过程中，仅冷冻干燥这一步做得不好，酶活力丢失 90%，最成功的也要丢失 20%。如果在酶液中加入 DEAE-葡聚糖与乳糖的混合物，就能显著提高得率。将两组（各 20 只）小称量瓶中均加 0.1ml 酶液（约 10u），一组中加入 2.0% 的 DEAE-葡聚糖 0.05ml 与 5% 的乳糖 0.1ml，另一组不加，在室温下干燥器中用真空泵抽干（约 2h）。测定抽干后残留活力，加与不加 DEAE-葡聚糖与乳糖混合物残留活力分别为原来的 92% 与 41%，在干燥器中，37℃ 保存 2 个月，加与不加的残留活力分别为其抽干后残留活力的 65% 与 13%。说明加 DEAE-葡聚糖与乳糖的混合物对酶有保护作用。

2.4 DEAE-葡聚糖，DcFe 石墨糊谷氨酸氧化酶电极的稳定性

在已经固定上谷氨酸氧化酶膜上滴加 20μl DEAE-葡聚糖（1mg）与乳糖（5mg）的混合液，在室温置干燥器中抽干，覆盖透析膜，放置于干燥器中 37℃ 下保存，每隔 10d 测定一次，一次测 20 样，测完后将电极浸到 5% 的乳糖溶液中几分钟，仍置于 37℃ 的干燥器中，测得结果见图 2a。图 2b 为同样制作的几支电极在不同时间取出测定活力的结果，每支电极只用一次。图 2c 为不加 DEAE-葡聚糖与乳

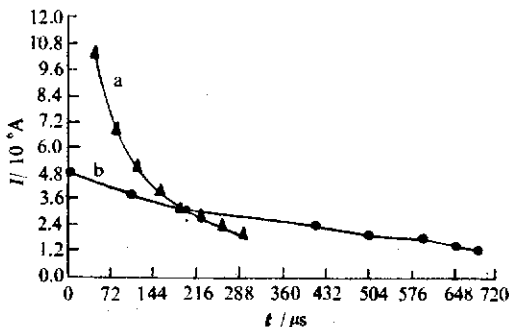


图 1 电极基线电流漂移曲线
a. 不加 DEAE-葡聚糖，b. 加 DEAE-葡聚糖 1mg

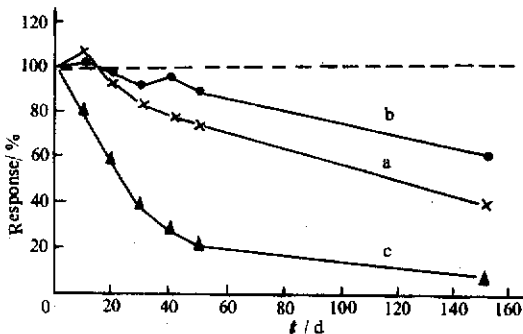


图 2 DEAE-葡聚糖-乳糖对电极保存寿命影响

糖混合物的参照电极在与图 2a 相同的测定条件测得的数据。由此图可以清楚看到 DEAE-葡聚糖与乳糖混合物对电极保存过程的保护作用。另外, 电极在使用与保存之间循环次数越多对电极寿命越不利。如果把电极保存在缓冲液中, 同样的温度, 上述几种情况下其寿命都将缩短。

在电极表面加入带正电荷的大分子物质, 对电极的响应性能会带来一些影响, 如响应时间, 灵敏度等。实验结果表明响应时间略有增加, 灵敏度略有下降。不过, 这些较小改变不影响电极的实际应用。

参 考 文 献

- (1) Cass A E G, Davis G, Francis G D *et al.* *Anal Chem*, 1984, 56, 667.
- (2) Joason G, Gorton L, Petterson L. *Electroanalysis*, 1989, 1: 49.
- (3) Gorton L, Karau H I, Hale P D *et al.* *Anal Chin Acta*, 1990, 28, 23.
- (4) Hale P D, Boguslavsky L I, Inagaki T *et al.* *Anal Chem*, 1991, 63, 667.
- (5) Hale P D, Lan H L, Boguslavsky L I *et al.* *Anal Chin Acta*, 1991, 251, 121.
- (6) Foulds N C *et al.* *Anal Chem*, 1988, 60, 2437.
- (7) Wang J, Varughese K *Anal Chem*, 1990, 62, 318.
- (8) Gibson T D, Hulbert J N, Parker S M *et al.* *Biosensors & Bioelectronics*, 1992, 7, 701.
- (9) 李青山, 王立军, 叶邦策等. 华东理工大学学报, 1994, 5.

Study of Improving the Stability of Dimethyferrocene Mediated L-glutamate Oxidase Carbon Paste Based Electrode

Li Qingshan Zhang Siliang Yu Juntang

(*Research Institute of Biochemical Engineering, East China
University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

Abstract A novel method to improve stability of dimethyferrocene mediated L-glutamate oxidase carbon paste based electrode by entrapping DEAE-dextran between enzyme membrane and dialysis membrane was described. The experimental results indicate based electrode can be prevented by DEAE-dextran and the stability of mediated electrode is improved. The storage stability mixture of DEAE-dextran and lactose.

Key words L-glutamate, enzyme electrode, stability, dimethyferrocene