修饰酶电极的响应特性

戴洪礼 吕鸣祥*

(天津大学应用化学系, 天津 300072)

摘要 在考虑电极电位、浓度极化等影响因素的情况下, 提出了介体型酶电极响应的数学表达式, 并对吸附法制备的修饰酶电极进行了初步的实验验证和模拟计算, 其实验结果与理论推导是一致的。

关键词: 酶电极 介体 葡萄糖氧化酶

通过吸附或共价结合的方法将酶偶联到电极表面上, 可以得到单分子层或准单分子层的酶电极^[1,2]。这种修饰酶电极制备简单, 响应快速, 灵敏度高。以往对修饰酶电极的研究, 大多从实用出发, 很少考虑电极电位、浓度极化等电化学因素对酶催化动力学的影响。本文针对这一问题进行了研究, 给出了修饰酶电极响应的数学表达式, 并加以实验验证和模拟计算。

1 理论部分

修饰酶电极酶层厚为1个酶分子, 约8~9nm^[3], 与介体扩散层厚度相比较, 可以忽略。给出如下假设: a. 酶层无限薄, 且酶分布均匀; b. 忽略底物的浓度极化; c. 介体具有稳定的扩散层; d. 介体的氧化态和还原态的扩散系数相等。($D_O = D_R = D$)

酶电极按如下反应模式进行

E_{ox} 和 E_{red} 分别为酶的氧化态和还原态, O 和 R 分别为介体的氧化态和还原态, S 为底物, P 为产物。

当 $t=0$ 时, $c_R(x,0) = c_R^0$, $c_O(x,0) = c_O^0$

达到稳态后,

$$c_R(0, \infty) = c_R^s, \quad c_O(0, \infty) = c_O^s \\ c_R(l, \infty) = c_R^0, \quad c_O(l, \infty) = c_O^0$$

图1 修饰酶电极浓度分布示意图

Fig.1 Schematic illustration of the concentration profile of the modified enzyme electrode (layer should be layer, carbon should be carbon)

式中 c_O, c_R 为介体氧化态和还原态的浓度; c_O^0, c_R^0 为介体氧化态和还原态的初始浓度; c_O^s, c_R^s 为介体氧化态和还原态的表面浓度; l 为介体扩散层的厚度, 并假定电极表面为 $x=0$ 。修饰酶电极浓度分布示意图如图1所示。

由物流平衡得

$$D_O \left(\frac{\partial c_O}{\partial x} \right)_{x=0} = -D_R \left(\frac{\partial c_R}{\partial x} \right)_{x=0}$$

D_O, D_R 为介体氧化态和还原态的扩散系数。

当电极反应达到稳态后, R 的生成速率 V_R 等于底物的反应速率 v 。

根据 Michaelis-Menten 方程式^[4]

$$v = \frac{V_{\max} c_S}{1 + \frac{k_S}{c_S} + \frac{k_O}{c_O^s}}$$

式中 k_S, k_O 分别为底物和介体的米氏常数, $V_{\max}$ 为最大反应速率。

$$V_R = \frac{i_1}{nFA} - D_R \left(\frac{dc_R}{dx} \right)_{x=0}$$

$$i_1 = i + i'$$

i_1 为电极响应的总电流; i 为体系中加入底物与未加入底物时电极响应电流之差; i' 为体系中未加入底物时电极的响应电流值; A 为电极面积。

所以

$$\frac{i}{nFA} + \frac{i'}{nFA} - D_R \left(\frac{dc_R}{dx} \right)_{x=0} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k}{c_S} + \frac{k_O}{c_O^s}} \quad (1)$$

(1) 当介体的电极反应可逆时, 由 Nernst 方程可以得到

$$c_O^s = \frac{c^0}{1 + \theta}, \quad c_R^s = \frac{c^0 \theta}{1 + \theta}$$

式中

$$\theta = \exp \left(\frac{nF}{RT} \Delta E \right)$$

$$\Delta E = E - E^{0'} \quad (E^{0'} \text{ 为式量标准电极电位})$$

$$c^0 = c_O^0 + c_R^0 \quad (c^0 \text{ 为介体的初始浓度})$$

则

$$\frac{i'}{nFA} = -\frac{D_R}{l} \cdot \frac{\theta c_O^0 - c_R^0}{1 + \theta}$$

$$-D_R\left(\frac{dc_R}{dx}\right)_{x=0} = \frac{D_R}{l}(c_O^0 - c_O^S) = \frac{D_R}{l} \cdot \frac{\theta c_O^0 - c_R^0}{1+\theta}$$

所以方程式(1)变为

$$\frac{i}{nFA} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k_S}{c_S} + \frac{k_O}{c^0}(1+\theta)} \quad (2)$$

当 $\theta \rightarrow 0$, 即 $E \gg E^0'$ 时, 方程式(2)转化为

$$\frac{i}{nFA} = V_{\max} / \left(1 + \frac{k_S}{c_S} + \frac{k_O}{c^0}\right) \quad (3)$$

(2) 当介体的电极反应不可逆时

$$i' = nFAkc_R^{S'}$$

$$k = k' \exp\left[(1-a)\frac{nF}{RT}\eta\right]$$

式中 k' 为指前因子, $c_R^{S'}$ 为体系中未加入底物时介体还原态的表面浓度。

$$c_R^{S'} = \frac{D_R c_R^0}{D_R + kl}$$

所以

$$\frac{i'}{nFA} = k \frac{D_R c_R^0}{D_R + kl} \quad (4)$$

当体系中加入底物后

$$i_1 = nFAkc_R^S$$

$$c_R^S = \frac{i + i'}{nFAk} \quad (5)$$

$$-D_R\left(\frac{dc_R}{dx}\right)_{x=0} = \frac{D_R}{l}(c_R^S - c_R^0) = \frac{D_R}{l}\left(\frac{i + i'}{nFAk} - c_R^0\right) \quad (6)$$

将(4)式中 i' 值代入(6)式得

$$-D_R\left(\frac{dc_R}{dx}\right)_{x=0} = \frac{D_R}{l}\left(\frac{i}{nFAk} + \frac{D_R c_R^0}{D_R + kl} - c_R^0\right) \quad (7)$$

将(4),(5),(7)式代入(1)式, 经简化得不可逆条件下电极响应的表达式为

$$\frac{i}{nFA}\left(1 + \frac{D_R}{kl}\right) = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k_S}{c_S} + \frac{k_O}{c^0 - \frac{i}{nFAk} - \frac{D_R c_R^0}{kl + D_R}}} \quad (8)$$

① 当 $k \rightarrow \infty$ (即 $\eta \rightarrow \infty$) 时, (8) 式变为(3)式的形式。也就是说, 当电极极化至较高电位时, 电极响应的表达式与可逆条件下一致, 酶催化反应的动力学符合 Michaelis-Menten 方程式。

② 当 $c_R^0 \gg c_O^0$ 时, $i \ll i'$, (8) 式变为

$$\frac{i}{nFA} \left(1 + \frac{D_R}{kl} \right) = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k_S}{c_S} + \frac{k_O}{c_O^0} \left(1 + \frac{D_R}{kl} \right)} \quad (9)$$

由于 $c_R^0 \gg c_O^0$, $i_1 \approx i'$, i 对 c_R^0 的影响很小。因此, 体系中加入与不加入底物, c_R^0 变化不大, R 向溶液中的扩散作用相互抵消, 酶促反应速率与电流响应呈正比, $1/i \sim 1/c_S$ 仍呈线性关系。由此也可看出, D_R/kl 是表征扩散作用与电化学作用相对大小的一个物理量。

(3) 当介体的电极反应准可逆时

由 Butler-Volmer 公式可得

$$i = i_0 \left\{ \frac{c_R^0}{c_O^0} \exp \left[(1-\alpha) \frac{nF}{RT} \eta \right] - \frac{c_O^0}{c_R^0} \exp \left(-\frac{\alpha nF}{RT} \eta \right) \right\} \quad (10)$$

与介体电极反应不可逆的推导过程相类似, 可以得到准可逆条件下电极响应的表达式为

$$\begin{aligned} \frac{i}{nFA} \left\{ 1 + \frac{nFAD_R}{i_0 l} \cdot \frac{c_O^0 c_R^0 \exp \left[\frac{-(1-\alpha)nF}{RT} \eta \right]}{c_O^0 + c_R^0 \exp \left(\frac{-\alpha nF}{RT} \eta \right)} \right\} \\ = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k_S}{c_S} + \frac{k_O [c_O^0 + c_R^0 \exp(-nF\eta/RT)]}{c_O^0 + \frac{i+i'}{i_0} c_O^0 c_R^0 \exp \left[\frac{-(1-\alpha)nF}{RT} \eta \right]}} \end{aligned} \quad (11)$$

当 $i_0 \rightarrow \infty$ 或 $\eta \rightarrow \infty$ 时, 方程式(11)可分别转化为表达式(2)和(3)的形式。

从电极响应的表达式(2), (8), (11)式可以发现, 当电极电位较低时, 只有在介体的电极反应可逆的条件下, $1/i \sim 1/c_S$ 才遵循 Michaelis 规律; 而对于介体反应准可逆和不可逆的情况, $1/i \sim 1/c_S$ 就不再符合 Michaelis 方程规律。当电极电位较高时, 无论介体的电极反应可逆、不可逆、还是准可逆, $1/i \sim 1/c_S$ 的关系, 均符合 Michaelis 方程的规律。因此, 为了得到真实的动力学参数, 必须使电极极化到一定的电位值。

我们以吸附法制得之葡萄糖氧化酶 (GOD) 电极进行了初步的实验验证, 并对介体反应可逆条件下的电极响应进行了模拟计算。

2 实验部分

将直径5mm的玻璃碳棒嵌入聚四氟乙烯管内, 并以银胶粘接一引线。玻璃碳电极由金相砂纸打磨, 抛光至镜面, 用酒精擦洗后再用二次蒸馏水冲洗。处理好的电极浸入含 GOD $5\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 pH 5.64 的醋酸盐缓冲溶液中, 室温下放置 30 分钟。GOD 为 Sigma 公司产品, 其比活性为 $23800\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。所有试剂均为分析纯。

电化学测试采用三电极体系, 辅助电极为 Pt 片, 参比电极为饱和甘汞电极, 电解液以高纯氮除氧, 实验在恒温 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下进行。模拟计算采用 Macintosh 微计算机, 配合通用绘图软件。

3 结果与讨论

以苯醌为介体, 葡萄糖为底物的葡萄糖氧化酶电极, 维持电极电位分别为 200、300、400,

500、600mV (相对于 SCE),测得电极的稳态响应曲线如图 2 所示。从图可见,随电极电位的增高,响应电流增大,而且响应曲线逐渐趋向于重合,即当电极电位增高至一定数值后,响应电流不再随电极电位改变,这与前面的推论是一致的。

以 $1/i \sim 1/c_S$ 绘制 Lineweaver-Burke 图,如图 3 所示。显然,当电极电位较低时,响应电

图 2 不同电极电位下稳态电流响应与葡萄糖浓度的关系
Fig. 2 Plot of steady current responses i against glucose concentrations c_S at various electrode potentials
Benzoquinone concentration, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1) 200mV, 2) 300mV, 3) 400mV, 4) 500mV, 5) 600mV

图 3 酶电极稳态响应的 Lineweaver-Burke 图
Fig. 3 Lineweaver-Burke plots of the steady-state response of enzyme electrode
Benzoquinone concentration, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1) 200mV, 2) 300mV, 3) 400mV, 4) 500mV, 5) 600mV

流与底物葡萄糖浓度之间的关系,已不再遵从 Michaelis-Menten 方程式的规律。只有当电极电位增高至一定数值后, $1/i \sim 1/c_S$ 才能获得理想的线性关系,而且直线逐渐趋于重合。正如理论部分所述,除介体反应可逆的情况外,电极响应不再符合 Michaelis 方程的规律。同时也说明,实验所采用的体系并非完全可逆的体系,循环伏安实验也证实了这一点。

显然,在低电极电位下测定的 Michaelis 常数 k_S 和最大反应速度 $V_{\max}$ 值,偏离了酶催化反应动力学的真实值。当然,这其中也可能包含有电场使得酶活性降低的因素。Bourdillon 等^[6]研究指出,当电极电位高于 1.1V (相对 SCE) 时,酶的活性急剧下降。从理论分析出发,将电场对酶的失活作用从中分离出来,也是一条有益的途径。

对于上述的酶电极体系,取苯醌的式量标准电极电位 $E^{\circ'} = 0.1\text{V}$ (相对 SCE), $D_R = 10^{-5}$

图 4 可逆体系的酶电极稳态电流响应的模拟曲线
Fig. 4 Simulated curves of steady current responses of enzyme electrode for reversible system, $E^{\circ'} = 100\text{mV}$
a) Mediator = $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ curves: 1) 120mV, 2) 200mV
b) Mediator = $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ curves: 1) 120mV, 2) 140mV, 3) 200mV

$6\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_0 = 3\text{ mmol}$, $k_8 = 70\text{ mmol}$, $i_{\text{max}} = 5 \times 10^{-6}\text{ A}$ [5], 对可逆条件下的响应进行模拟计算, 结果如图 4 所示。当苯醌的浓度 c^0 减小时, 酶电极的响应减小, 而电极电位对电极响应的影响增大。这些结果由方程式(2)不难理解。

总之, 对于单分子层或准单分子层的修饰酶电极来说, 电极电位的大小, 体系搅拌的强弱, 都对动力学参数的测定有着重要的影响。

参 考 文 献

- 1 Bianco P, Halajian J, Bourdillon C. *J. Electroanal.Chem.*, 1990,293,151
- 2 Tokuji I Isao K, Masugu K, Mitsugi S. *Agric. Biol. Chem.*, 1984,48(8),1969
- 3 Bourdillon C, Laval J M, Thomas D. *J.Electrochem. Soc.*, 1986,133(4),706
- 4 Dixon M, Webb E C. *Enzymes*, 3th Ed., London,Longmann Press, 1979,47
- 5 Bourdillon C, Bourgeois J P, Thomas D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980,102(12),4231

CHARACTERISTICS OF THE RESPONSE OF ENZYME MODIFIED ELECTRODE

Dai Hongli Lü Mingxiang*

(Department of Applied Chemistry, Tianjin University, Tianjin 300072)

ABSTRACT

In this paper, a mathematical expression of the response of mediator-type enzyme electrode is presented by considering the influence of effective factors such as the electrode potential, concentration polarization, etc. Primary test of the modified electrode with glucose oxidase and mathematical simulation have been performed, the experimental result is in agreement with the theoretical conclusion.

Keywords: Enzyme electrode, Mediator, Glucose oxidase