

# 辣根过氧化物酶的电化学固定化及其对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的生物电催化还原作用\*

杨防祖 许书楷 吴辉煌 周绍民

(厦门大学物理化学研究所, 化学系, 厦门, 361005)

**摘要** 利用电化学固定化方法制备了聚吡咯/辣根过氧化物酶(PP/HRP)膜电极, 并研究了其电化学行为. 在除氧的磷酸盐缓冲液介质中, PP/HRP 电极加速  $\text{H}_2\text{O}_2$  的还原, 归因于酶加成物的直接电子传递. 探索 HRP 与电子传递体  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  在聚吡咯(PP)膜中的同时固定化条件及其膜电极的电化学行为. 实验证实,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  在酶膜中的存在使得  $\text{H}_2\text{O}_2$  的还原电位强烈正移, 在  $-0.05\text{ V}$  的工作电位下能对  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行检测, 相应的电极过程可用间接氧化还原催化机理解释.

**关键词** 辣根过氧化物酶, 酶电极, 电化学固定化, 生物电催化还原

过氧化物酶是多酚类化合物氧化和  $\text{H}_2\text{O}_2$  还原的生物催化剂, 它不仅可单独用于构成检测特定底物的酶电极, 而且可同其它酶一起构成高性能的生物传感器. 有关辣根过氧化物酶(HRP)电极上  $\text{H}_2\text{O}_2$  的生物电催化研究已有报道<sup>[1~3]</sup>, 但所用的酶电极大多是用吸附法将酶修饰在电极上. 酶的电化学固定化是新近发展起来的固定化技术, 已用于葡萄糖氧化酶电极的制备<sup>[4~6]</sup>. 本文利用该法制备聚吡咯/辣根过氧化物酶(PP/HRP)膜电极, 探索不同条件对固定化的影响并研究膜电极对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化还原作用.

## 1 实验条件与方法

### 1.1 试剂与仪器装置

辣根过氧化物酶(E. C. 1.11.1.7; 250 u/mg; R. Z~3.0)为上海生物化学研究所产品, 其它试剂均为国产分析纯试剂. 吡咯在使用前经蒸馏, 取 128~132℃馏分. 所有溶液用三次蒸馏水配制, pH 值用 pH S-2 型酸度计测定. 溶液用高纯氮除氧.

电化学实验在三室电解池中进行, 温度为 30℃, 铂片和饱和甘汞电极分别为辅助电极和参比电极. Pine 公司的 RDE4 双恒电位仪用于电聚合和电极行为的研究, 3033 型函数记录仪用于记录实验结果. HRP 的浓度用岛津 UV 240 型紫外可见分光光度计测定.

### 1.2 电极的制备

玻碳(直径 0.8 cm, 表观面积 0.503  $\text{cm}^2$ )为研究电极的基体, 使用前用 6# 金相砂纸抛光, 经超声波处理, 然后于 pH=6.8 的除氧缓冲液(0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0.05 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0.1 mol/L  $\text{KNO}_3$ )中进行多次电位扫描循环直至稳定. 扫描电位控制在 +0.20~ -0.80 V 之间. 在上述缓冲液中加入 0.1 mol/L 吡咯或 0.1 mol/L 吡咯 + 4 mg/mL HRP,

收稿日期: 1993-07-09. 修改稿收到日期: 1994-04-09. 联系人及第一作者: 杨防祖, 男, 32 岁, 助理研究员.

\* 国家自然科学基金资助课题.

电聚合后可分别制得聚吡咯(PP)膜电极和 PP/HRP 膜电极. 聚合电位为  $+0.7 \text{ V (vs. SCE)}$ . 制备聚吡咯/亚铁氰化钾电极(PP/FeCN)和聚吡咯/(亚铁氰化钾+HRP)电极[PP/(FeCN+HRP)]时, 聚合用的溶液分别为不含或含有  $4 \text{ mg/mL}$  HRP 的  $0.1 \text{ mol/L}$  吡咯  $+0.1 \text{ mol/L}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . 聚合电位为  $+0.80 \text{ V (vs. SCE)}$ .

## 2 结果与讨论

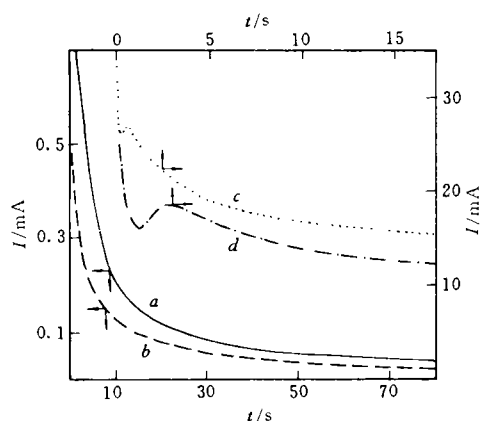
### 2.1 HRP 的电化学固定化

酶的电化学固定化的基本原理: 在吡咯单体电化学聚合的同时将酶包埋在聚合物基质中. 为了使固定化后的酶保持生物活性, 电聚合条件与纯粹制备聚吡咯膜的条件明显不同, 通常采用中性缓冲溶液作为聚合溶液的介质. 由于中性缓冲溶液中吡咯的电聚合速度很慢, 并依赖于电极基体和支持电解质的本质<sup>[7]</sup>, 故本工作采用  $\text{pH}=6.8$  的磷酸盐缓冲液为聚合溶液的介质. 实验证实, 在此介质中可实现 HRP 的固定化且使它保持活性, 不过电聚合速度很小. 若在聚合溶液中加入  $0.1 \text{ mol/L}$   $\text{KNO}_3$ , 可以提高酶膜的形成速度, 缩短电极的制备时间, 对防止酶的变性有利. 聚合电位对所得聚合物膜的外观影响甚大, 但该电位与聚合所用溶液的组成有关. 在含酶和  $0.1 \text{ mol/L}$   $\text{KNO}_3$  的吡咯溶液中, 聚合电位控制在  $+0.7 \text{ V (vs. SCE)}$  可获得较为平整均匀的 PP/HRP 膜. 图 1 曲线 *a* 和 *b* 分别是溶液不含或含有 HRP 时控电位聚合过程的  $i \sim t$  曲线. 可以看出, HRP 的存在使聚合速度略为下降. 文献<sup>[8]</sup>曾经指出, 聚吡咯膜厚度增加  $1 \mu\text{m}$ , 所耗电量约为  $400 \text{ mC/cm}^2$ . 电聚合  $i \sim t$  曲线为酶膜厚度的控制提供了依据.

图 1 曲线 *c* 和 *d* 分别表示在以  $0.1 \text{ mol/L}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  为支持电解质的不含酶和含酶的吡咯溶液中进行电聚合的  $i \sim t$  曲线, HRP 的存在同样使聚合速度下降. 曲线 *c* 和 *d* 上的电流峰体现了电极上新相形成的成核-生长特征, 它们与曲线 *a* 和 *b* 的差别再次反映了溶液组成对电聚合的影响. 实验发现, 由于改变溶液的组成, 控电位聚合的工作电位为  $+0.8 \text{ V (vs. SCE)}$  较为合适.

一般认为<sup>[9,10]</sup>, 在吡咯电聚合的同时伴有  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  的电氧化, 因此形成厚度  $1 \mu\text{m}$  聚吡咯膜所需耗费的表现电量较大, 约为  $600 \text{ mC/cm}^2$ . 比较曲线 *c* 和 *a* 的聚合电量不难估算出当以  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  为支持电解质时, 大约在  $40 \text{ s}$  内可制得  $2 \mu\text{m}$  的 PP 膜, 而在曲线 *a* 的条件下只能获得约  $0.01 \mu\text{m}$  的厚度. 必须指出, 以  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  为支持电解质还有一个潜在的优点, 即它会在吡咯电聚合期间嵌入聚合物基质中, 因而可望实现与酶的同时固定化. 由此制得的 PP(HRP+FeCN)膜电极具有独特性能.

酶的电化学固定化不仅易于控制酶膜厚度, 而且可以控制酶的含量, 然而迄今的有关工作较少. 为了估算酶膜中的



**Fig. 1** The  $i-t$  curves during the electropolymerization  $E = +0.70 \text{ V (vs. SCE)}$ . *a*.  $0.1 \text{ mol/L}$   $\text{KNO}_3 + 0.1 \text{ mol/L}$  pyrrole  $+ \text{pH } 6.8$  phosphate; *b*. *a*  $+ 4 \text{ mg/mL}$  HRP; *c*.  $0.1 \text{ mol/L}$  pyrrole  $+ 0.1 \text{ mol/L}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; *d*. *c*  $+ 4 \text{ mg/mL}$  HRP.

HRP 含量, 我们测定了电聚合前后溶液的吸收光谱. HRP 在 402 nm 处呈现出其铁卟啉辅基的 Soret 特征峰<sup>[11]</sup>, 且吸光值  $A$  与 HRP 浓度成线性关系. 当采用光程为 1.0 mm 的比色槽, 1 mL 聚合液中 HRP 含量每增加 1 mg, 其吸光度值增加 0.17. 图 2 曲线  $a$  和  $b$  分别是电聚合前后溶液的吸收光谱, 由吸光度的变化可估算出 HRP 的嵌入量为 1.5 mg, 而聚合时通过的电量为 8.5 mC.

### 2.2 PP/HRP 电极上 $H_2O_2$ 的催化还原

图 3 示出除氧缓冲介质中  $H_2O_2$  在玻碳(图 3a)、PP 膜(图 3b)和 PP/HRP 膜(图 3c)电极上还原的循环伏安曲线. 随着电极电位的负移, 还原电流逐渐增大, 还原过程是不可逆的. 为了比较不同电极上的还原速度, 图 4 示出循环伏安曲线上  $-0.7$  V 处的还原电流值与  $H_2O_2$  浓度的关系. 不难看出, 在所述浓度范围内不同电极上的还原电流大致与  $H_2O_2$  浓度成正比, 但玻碳(GC)电极(图 4a)的斜率最小, PP 膜(图 4b)的次之, 而 PP/HRP 膜(图 4c)的最大. 当  $H_2O_2$  浓度为 2.0 mmol/L 时, PP/HRP 膜电极对  $H_2O_2$  的响应电流值分别是 PP 膜和玻碳电极的 1.2 倍和 1.5 倍. 值得注意的是, 在电位循环扫描的条件下 PP 膜的存在不仅没有抑制  $H_2O_2$  的还原, 反而加速  $H_2O_2$  的还原, 这可能与 PP 膜本身具有导电性质有关. 此时整个膜层可能成为  $H_2O_2$  还原的场所.

在天然酶反应中 HRP 和  $H_2O_2$  反应产生加合物(即所谓的“化合物 I”), 后者需与作为电子给体的另一底物作用方能使酶恢复至原有状态, 从而使酶反应持续地进行. 鉴于图 4 所述的 PP/HRP 电极和试验溶液不含其它底物, 可以推测 HRP 对  $H_2O_2$  还原的催化作用是通过 HRP 与  $H_2O_2$  生成“化合物 I”与 PP 电极发生直接电子传递而进行的. HRP 的光谱电化学研

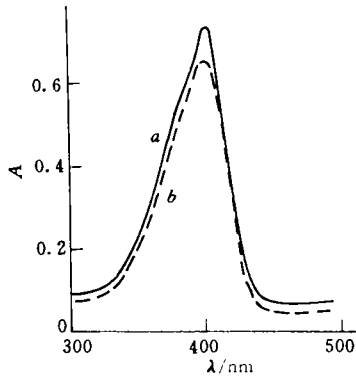


Fig. 2 Absorption spectra of HRP before (a) and after (b) electropolymerization

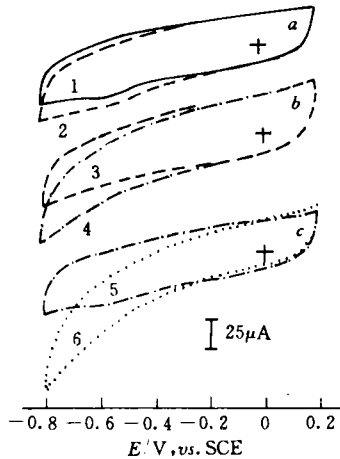


Fig. 3 Voltammograms of GC (a), PP (b, 10.0 mC) and PP/HRP (c, 8.5 mC) electrodes in the phosphate buffer Without (curves 1, 3, 5) and with 2 mmol/L  $H_2O_2$  (curves 2, 4, 6). Scan rate: 50 mV/s.

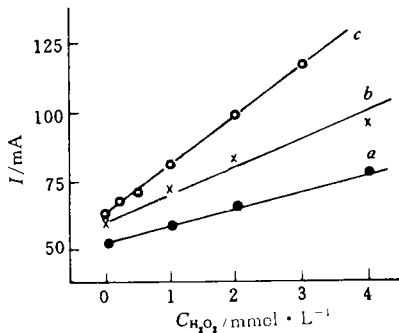


Fig. 4 Reduction currents of  $H_2O_2$  on GC (a), PP (b) and PP/HRP electrodes (c) at  $-0.7$  V

究发现<sup>[11]</sup>,“化合物 I”可在电极上还原,最终转变为正常的 HRP.

### 2.3 PP/(HRP+FeCN)酶电极的电化学行为

图 5 示出 PP/FeCN 膜电极(图 5a、b)以及 PP/(HRP+FeCN)膜电极(图 5c)在 pH=6.8 空白缓冲液中的循环伏安曲线,图中出现一对电流峰,HRP 的存在与否难于从伏安图上反映出来,但膜厚度对电流峰的影响则很明显.由图 5 可知,随着聚合电量的增大,阴极峰峰电位略有负移,阳极峰峰电位略有正移,而峰电流均增大.上述峰电位随成膜电量而移动,可认为是由多孔电极中导电和传质阻力引起的极化随电极多孔层厚度增大而增大所致.为了便于比较,图 5d 示出玻碳电极在 0.01 mol/L  $K_4Fe(CN)_6$  溶液中的循环伏安曲线,其氧化还原峰的位置与图 5a~c 上的偏离 0.1 V 以上.这是因为  $Fe(CN)_6^{4-}$  在溶液中与在膜中的热力学状态不同,况且图 5a~c 上的电流峰主要依赖于 PP 氧化态的改变,与此同时伴随着离子在聚合膜中的嵌入与脱出过程.

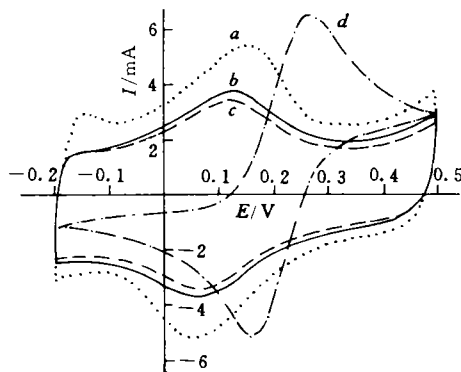


Fig. 5 Cyclic voltammograms of PP/FeCN (a, b), PP/(HRP+FeCN) in pH 6.8 buffer solution (c) and GC in 0.10 mol/L  $K_4Fe(CN)_6$  (d) electrodes

Charge quantity for polymerization (mC): a. 821; b. 645; c. 610. Scan rate: 50 mV/s.

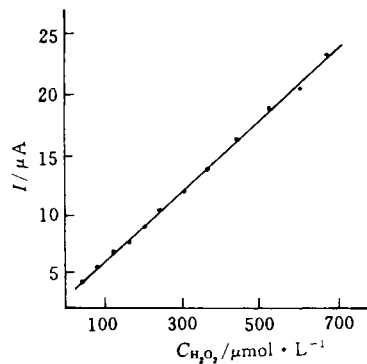
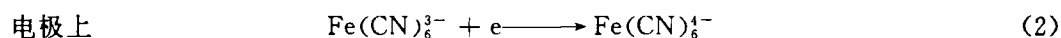


Fig. 6 Response of PP/(HRP + FeCN) electrode (613 mC) to  $H_2O_2$  concentration

$E = -0.05$  V.

PP/(HRP+FeCN)与 PP/HRP 膜电极的最大差别之一是:前者在  $-0.05$  V (vs. SCE) 下便可对  $H_2O_2$  进行响应,图 6 示出在该工作电位下响应电流值与  $H_2O_2$  浓度的关系.显然,PP/(HRP+FeCN)膜电极可用于较低浓度下  $H_2O_2$  的检测.含有  $Fe(CN)_6^{4-}$  的 HRP 酶电极能使  $H_2O_2$  还原电位大幅度正移,这必将有利于提高酶电极的抗干扰能力.工作电位的正移暗示酶电极工作原理的改变.由于  $Fe(CN)_6^{4-}$  可作为 HRP 的氧化性加成物(“化合物 I”)的电子供体,我们认为在所述情况下电极反应不是酶的直接电子传递,而是间接的氧化还原催化:



酶电极的工作电位将由反应(2)的氧化还原电位决定.

以上实验事实表明,电化学固定化方法是制备 HRP 酶电极的可行方法,尤其是 HRP 与  $Fe(CN)_6^{4-}$  的同时固定化可为  $H_2O_2$  的检测提供新型的传感器.与 PP/(HRP+FeCN)膜电极相比,PP/HRP 膜电极用于  $H_2O_2$  的测定似乎显得逊色,但后者在多酚化合物的检测中也许

是有用的.

### 参 考 文 献

- 1 Wollenberger U., Bogdanovskaya V., Bobrin S. *et al.*; Analytical Letters, 1990, **23**: 1795
- 2 Gorton L., Bremle G., Csoregi E. *et al.*; Analytica Chimica Acta, 1991, **249**: 43
- 3 Kulys J. *et al.*; J. of Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem., 1991, **321**: 277
- 4 Be' langer D. *et al.*; J. Electroanal. Chem., 1989, **274**: 143
- 5 ZHENG Zhi-Min(郑智敏), WU Hui-Huang(吴辉煌), ZHOU Shao-Min(周绍民); Acta Physico-Chimica Sinica(物理化学学报), 1991, **7**: 163
- 6 XUE Huai-Guo(薛怀国), MU Shao-Lin(穆绍林); Chem. J. Chinese Univ. (高等学校化学学报), 1993, **14**: 138
- 7 Qibing Pei, Renyuan Qian; J. Electroanal. Chem., 1992, **322**: 153
- 8 Diaz A. F. *et al.*; J. Electroanal. Chem., 1981, **129**: 115
- 9 Guohua Lian, Shao-jun Dong; J. Electroanal. Chem., 1989, **260**: 127
- 10 Breen W., Cassidy J. F.; J. Electroanal. Chem., 1991, **297**: 445
- 11 WU Bao-Zhang(吴宝璋), WU Hui-Huang(吴辉煌), ZHOU Shao-Min(周绍民); Chem. J. Chinese Univ. (高等学校化学学报), 1992, **13**: 227

## Electrochemical Immobilization of Horse-Radish Peroxidase and Its Bioelectrocatalysis in $\text{H}_2\text{O}_2$ Reduction

YANG Fang-Zu\*, XU Shu-Kai, WU Hui-Huang, Zhou Shao-Min

(*Institute of Physical Chemistry, Department of Chemistry,*

*Xiamen University, Xiamen, 361005*)

**Abstract** With electropolymerization of pyrrole, horse-radish peroxidase (HRP) was immobilized in the polypyrrole matrix to construct PP/HRP enzyme electrode, and its electrochemical behaviour was studied. In the deoxygenated phosphate buffer, the PP/HRP electrode showed an accelerated  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction, which was attributed to the direct electron transfer of the adduct of HRP with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The simultaneous immobilization of HRP and  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  into the polypyrrole (PP) polymer and the electrochemical behaviour of as-formed enzyme electrodes were investigated. It was confirmed that, the existence of  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  in the polymer enabled the reduction potential of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to strongly shift to positive so that  $\text{H}_2\text{O}_2$  could be detected at  $-0.05$  V. The related process was explained in terms of indirect redox catalysis.

**Keywords** Horse-radish peroxidase, Enzyme electrode, Electrochemical immobilization, Bioelectrocatalytic reduction

(Ed.: B, X)