

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

HRP 在大孔笼状介孔分子筛 FDU-12 上的固定及直接电化学

马国仙^{1,*} 钟庆东¹ 鲁雄刚¹ 陆天虹²¹上海大学材料科学与工程学院, 上海 200072; ²南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097

摘要: 用吸附的方法将辣根过氧化物酶(HRP)固定到三维笼状介孔分子筛 FDU-12 中, 傅立叶变换红外光谱(FTIR)和电化学交流阻抗谱结果表明, 固定后的 HRP 没有变性, 并表现出良好的直接电化学性质, 其式量电位(E^0)为 -0.325 V, 在 $40\text{--}300$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 范围内, 它不随扫描速率变化而变化. 电化学反应速率常数(k_s)为 1.200 s^{-1} . 固定后的 HRP 对 H_2O_2 有稳定的电催化活性, 该固定酶的方法具有简单、易操作和电极稳定性良好等优点, 可用于获得其他酶或氧化还原蛋白质的直接电子转移以及第三代生物传感器电极的制备.

关键词: 辣根过氧化物酶; FDU-12; 直接电化学; 过氧化氢; 生物传感器

中图分类号: O646

Immobilization and Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase on Large Cage-Like Mesoporous Silica FDU-12

MA Guo-Xian^{1,*} ZHONG Qing-Dong¹ LU Xiong-Gang¹ LU Tian-Hong²¹School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, P. R. China;²College of Chemistry and Environment Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China)

Abstract: We report on a direct electron transfer and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase (HRP) immobilized in mesoporous silica FDU-12 with three-dimensional (3D) large cages and entrances. UV-Vis spectroscopy, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, and impedance spectroscopy were used to prove the interaction between HRP and FDU-12. Results from cyclic voltammetry show that immobilized HRP can undergo a direct quasi-reversible electrochemical reaction. Its formal potential, E^0 , is -0.325 V in a phosphate buffer solution (PBS, pH 6.9) and this is almost independent of the scan rate from 40 to 300 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. The experimental results also demonstrate that the immobilized HRP retains its bioelectrocatalytic activity for the reduction of H_2O_2 . Furthermore, the electrode can be stored at 4 °C for several weeks without any loss of enzyme activity. Thus, FDU-12 is a novel matrix for realizing a direct electron transfer of various proteins and enzymes and the preparation of electrodes for the third biosensors.

Key Words: Horseradish peroxidase; FDU-12; Direct electrochemisrty; Hydrogen peroxide; Biosensor

近年来, 氧化还原蛋白质和酶在电极上的直接电化学研究受到了越来越多研究者的关注, 这些研究不仅可以获得酶或氧化还原蛋白质的热力学和动力学性质等方面的重要信息, 而且对于生物大分子的结构和各种物理化学性质, 探索酶或氧化还原蛋白质等生物大分子在生命体内的生理作用及机制, 研发制作简单、重现性好、响应快且廉价的生物传感器和高效的直接型生物燃料电池酶催化剂均具有重

要的理论指导意义^[1,2]. 然而由于氧化还原蛋白质和酶的电活性中心被深深的包埋庞大的蛋白质结构中从而阻碍了电子的直接转移, 此外, 氧化还原蛋白质和酶在裸电极上的变性也是影响氧化还原蛋白质和酶直接电子转移的不利因素^[3]. 因此, 探索能够促进氧化还原蛋白质和酶的直接电子转移的固定载体和适合的固定方法具有非常重要的意义.

辣根过氧化物酶(HRP), 相对分子量约为 $3.98\times$

Received: May 11, 2009; Revised: July 3, 2009; Published on Web: September 10, 2009.

*Corresponding author. Email: maguoxian@shu.edu.cn; Tel: +86-21-56331346

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

10^4 – 4.05×10^4 , 是商品化较早、应用最为广泛的酶制剂。其活性中心含有血红素, 分子直径是 3.5 nm, 等电点是 8.9. HRP 的重要的生理功能之一是参与活性氧的代谢。

早在 1845 年, HRP 就被用来测定过氧化氢的含量。由于来源方便、提纯容易和结构已知, HRP 经常作为典型代表用于研究过氧化物酶分子的结构、动力学和热力学性质以及直接电化学性质^[4,5]。为了有效实现 HRP 分子与电极表面的直接电子转移, 表面活性剂^[6]、聚合物^[7]、溶胶-凝胶^[8]、无机介孔材料^[9]常常被用来作为实现 HRP 直接电化学的载体。自 Kresge 等^[10-12]在 1992 年首次合成介孔分子筛以来, 硅基介孔分子筛如 MCM-41、SBA-15、HMS 等由于具有开放的孔道结构、均一的孔径分布和较大的孔容等优点一跃成为蛋白质和酶固定的新型载体^[13-19]。有文献报道^[20-22], 介孔材料的孔径大小是影响酶分子与介孔材料相互作用的主要因素, 合适的孔径尺寸更有利于蛋白质和酶分子的嵌入和负载, 材料的孔径太小或太大都不利于酶分子的固定。如果孔径太小, 酶分子不能有效地进入孔道内, 只能吸附在外表面, 这将直接影响酶电极的稳定性; 而孔径太大, 酶分子容易从孔道内泄漏出来, 这也会影响酶电极的稳定性。因此, 硅基介孔材料的孔径必须与酶分子相匹配, 让酶分子十分容易地进入到介观限制空间。

笼状介孔分子筛 FDU-12 是具有面心立方结构的纯硅氧介孔材料, 其大的介孔笼通过小的窗口相互连接成三维贯通的介观空间。相对于一维或二维的硅基分子筛, FDU-12 的三维开放孔道在传质上更具有优势。本文中我们合成出其窗口尺寸与 HRP 大小(分子直径 3.5 nm)相匹配的 FDU-12 介孔分子筛, 并用吸附的方法将 HRP 固定到 FDU-12 上, 再用 Nafion 加固。对固定后的 HRP 进行了表征。

1 实验

1.1 试剂和仪器

HRP(EC 1.11.1.7, RZ>3, 300 U·mg⁻¹, Sigma 公司), Nafion 溶液(质量分数为 5%, Aldrich), H₂O₂(30%, 上海国药集团), 其它试剂均为分析纯, 都未进一步纯化或预处理而直接使用。0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(PBS)由 NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ 按不同比例配制而成。所有溶液均用去离子水配制。

循环伏安实验在 CHI660A 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上进行。所有实验均采用三电极

体系, 以修饰玻碳(GC)电极为工作电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, 本文所用的电极电位都是相对于 SCE 的, 铂丝电极为对电极。电化学测试在室温下进行。在每次实验前, 向电解液中通入高纯氮气 30 min 以除去溶解在电解液中的氧, 在实验过程中仍维持在电解液上方通氮。透射电镜(TEM)实验采用 Jeol JEM-2010 透镜(日本电器公司); 傅立叶变换红外(FTIR)光谱测量在 Nicolet 360 FTIR 红外光谱仪(美国尼高力公司)上进行; 紫外-可见吸收光谱实验在 UV-Vis spectrophotometer 8500 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦有限公司)上进行; BET 测试在 Micromeritics Tristar 3000(美国麦克仪器公司)上进行。

介孔二氧化硅分子筛 FDU-12 是以非离子三嵌段共聚高分子(EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆, F127)为结构导向剂, 同时添加无机盐 KCl 和有机分子 1,3,5-三甲苯(TMB)作为共表面活性剂在酸性条件下合成, 具体合成过程参见文献[21]。

1.2 工作电极制备

将 GC 电极(直径为 3 mm)分别用 6 号砂纸、0.3 和 0.05 μm Al₂O₃ 抛光至镜面, 先后在水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗各 1 min 后晾干备用。称取 2 mg FDU-12 超声分散于 1 mL 去离子水中, 配制成 2 mg·mL⁻¹ 的 FDU-12 溶液。用微量取样器取 10 μL FDU-12 溶液与 10 μL 10 mg·mL⁻¹ HRP 溶液(在 0.1 mol·L⁻¹, pH 6.9 的 PBS 中配制)混合, 搅拌数小时。然后取 5 μL 混合物均匀地覆盖在 GC 电极表面, 室温下待溶剂挥发后, 再将 1 μL Nafion 溶液滴在电极表面, 溶剂挥发后得到的电极为 HRP-FDU-12/GC 电极, 该电极晾干后用去离子水洗涤 2 到 3 次并置于 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 6.9)中以除去松散吸附的 HRP 分子。电极不用时保存于 4 °C 冰箱中。如果不加 HRP, 用同样的方法制得 FDU-12/GC 电极。

2 结果和讨论

2.1 笼状介孔分子筛 FDU-12 的表征

图 1 为笼状介孔分子筛 FDU-12 的 TEM 图。从图中可以看出样品具有高度有序的孔道结构, 它们是由许多球状的介孔笼通过窗口相互连接排列而成的。从样品的边缘可以直接观察到 FDU-12 的介孔笼。图 2(A)为其相应的 N₂ 吸附等温线, 可以看出图中有典型的 IV 型等温线并伴随有一个较明显的滞后环, 表明 FDU-12 具有介孔结构。使用 BET(Brunauer-

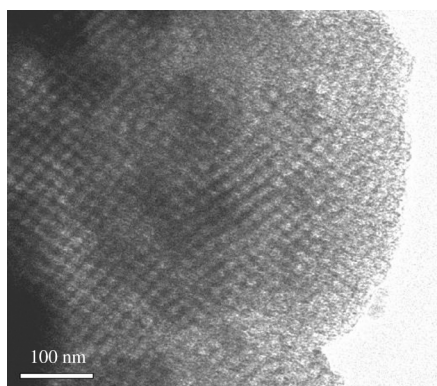


图1 FDU-12 的透射电镜(TEM)照片
Fig.1 Transmission electron microscopy (TEM) image of FDU-12

Emmett-Teller)和 BJH(Barret-Joyner-Halenda)方法对样品进行了孔结构表征,测试结果见表1.图2(B)为合成样品 FDU-12 的孔径分布曲线.从曲线可以看出 FDU-12 的孔径大约为 15 nm,其窗口大小则可根据合成过程中的水热温度推测出来,约为 5–6 nm^[21].由于 HRP 的分子直径约为 3.5 nm,因此,通过对 FDU-12 孔径及窗口尺寸的考察,笼状介孔分子筛 FDU-12 可以作为 HRP 的良好固定载体.

2.2 HRP 和 FDU-12 的相互作用

为了考察固载于 FDU-12 中的 HRP 的天然构象是否改变,对天然的 HRP 和 HRP-FDU-12 复合膜进行了傅立叶红外光谱测试.在蛋白质的傅立叶红外光谱中,酰胺 I 和酰胺 II 是蛋白质肽链二级结构的特征吸收.酰胺 I 是蛋白质肽链骨架上 C=O 伸缩振动引起的.酰胺 II 则是 N—H 面内弯曲和 C—N 伸缩振动共同引起的.根据酰胺 I 和酰胺 II 的峰位置的变化可以判断蛋白质是否变性^[23].图3显示了 HRP 和 HRP-FDU-12 复合膜的 FTIR 光谱.在天

表1 介孔分子筛 FDU-12 的表面物理化学性质
Table 1 Physicochemical properties of mesoporous silica FDU-12

Sample	$\frac{S_{\text{BET}}}{(\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})}$	Pore volume ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Pore size (nm)	Entrance size (nm)
FDU-12	636	0.67	15.1	5–6

然 HRP 的 FTIR 光谱(图3曲线 a)中,出现在 1653 和 1559 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应于酰胺 I 和酰胺 II 的特征吸收.在 HRP-FDU-12 复合膜的 FTIR 光谱中观察到的 1652 和 1558 cm^{-1} 处的吸收峰对应于固定后的 HRP 的酰胺 I 和酰胺 II 吸收峰(图3曲线 b),与天然的 HRP 的红外吸收相比没有明显的位移,这说明吸附于 FDU-12 中的 HRP 没有变性,保持了原来的构象.曲线 b 中波数 1100 cm^{-1} 附近的强吸收峰是 FDU-12 中硅基团的吸收峰.

图4显示了以 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl+10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 为探针的 FDU-12/GC 电极和 HRP-FDU-12/GC 电极的交流阻抗图谱,在高频区的半圆对应于电子传递控制过程,在低频区的线形部分对应于扩散控制过程.当没有吸附 HRP 时,由于 FDU-12 属于硅基材料,导电性相对差一些,对探针分子形成一定的电子传递阻抗,在电极表面形成了介电层,阻碍了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 在电极表面的电子传递过程(图4曲线 a).而吸附了 HRP 后,对探针分子形成的电子传递阻抗进一步增大,所以相应的半圆直径也增大(图4曲线 b),这表明 HRP 已经吸附在 FDU-12 介孔笼中.

2.3 HRP-FDU-12/GC 电极的直接电化学

图5为 FDU-12/GC 和 HRP-FDU-12/GC 电极在除氧条件下,扫速为 100 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS(pH 6.9)缓冲液中的循环伏安图.从图中可以看出,FDU-12/GC 电极在所扫描范围内没有观察到任

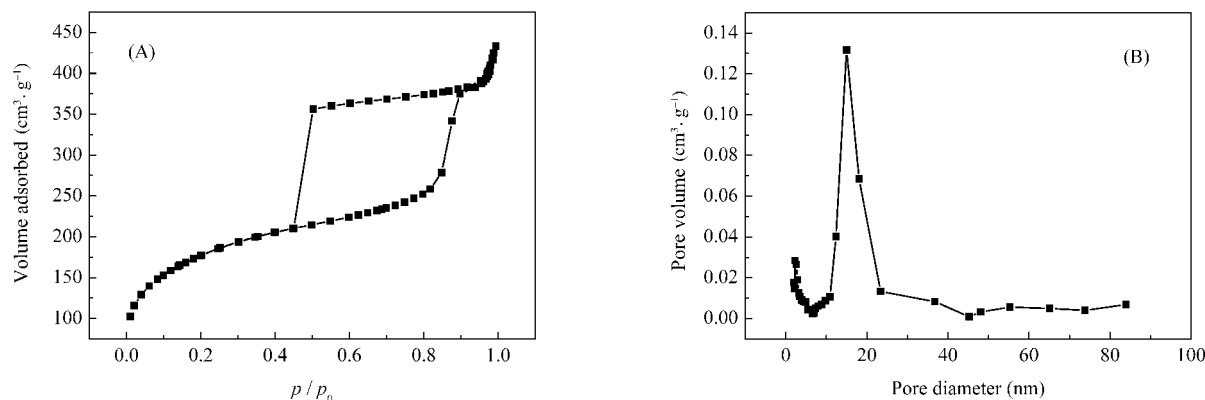


图2 FDU-12 的氮气吸附-脱附等温线(A)及其孔径分布图(B)
Fig.2 N_2 adsorption-desorption isotherm (A) and pore size distribution curve (B) for FDU-12

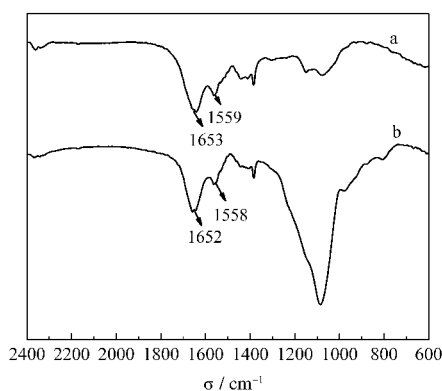


图3 HRP (a)和 HRP-FDU-12 复合膜(b)的 FTIR 光谱
Fig.3 FTIR spectra of HRP (a) and HRP-FDU-12 (b) composite film

何的氧化还原峰,说明 FDU-12 在该电位范围内是非电活性物质(图 5 曲线 a). 而对于图 5 中曲线 b 的 HRP-FDU-12/GC 电极,观察到一对稳定的氧化还原峰,它是对应于 HRP 中血红素辅基中 Fe(III)/Fe(II) 电对的氧化还原峰,是由 HRP 与电极间的直接电子传输引起的. 从图 5 曲线 b 可知,当扫速为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, HRP 直接电子转移反应的氧化还原峰电位分别为 $E_{pa} = -0.300 \text{ V}$, $E_{pc} = -0.350 \text{ V}$, 式量电位 $E^{\circ} = -0.325 \text{ V}$, 峰电位差 ΔE_p 为 50 mV . 氧化峰和还原峰电流基本相同,即 I_{pa}/I_{pc} 的值接近 1, 显示了 HRP 在电极表面快的电子传递和良好的可逆性,表明 FDU-12 能够促进 HRP 在电极上的直接电化学反应. 这可能是由于笼状介孔分子筛 FDU-12 特殊的笼状结构为

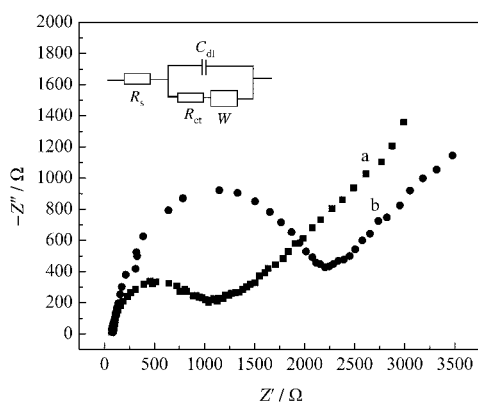


图4 FDU-12/GC 电极(a)和 HRP-FDU-12/GC 电极(b)的交流阻抗图谱

Fig.4 Nyquist plots for the electrochemical impedance measurements of FDU-12/GC (a) and HRP-FDU-12/GC (b) electrodes

solution: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl} + 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$;

R_s : solution resistance, R_{ct} : charge transfer resistance;

C_{dl} : double-layer capacitance; W : diffusion resistance

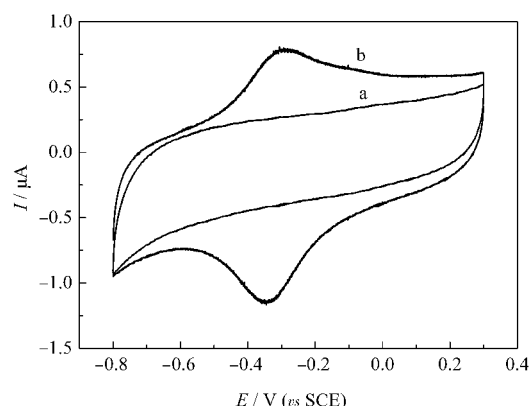


图5 FDU-12/GC (a)和 HRP-FDU-12/GC (b)电极的循环伏安曲线

Fig.5 CV curves of FDU-12/GC (a) and HRP-FDU-12/GC (b) electrodes

solution: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PBS}$, $\text{pH}=6.9$, scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

HRP 构筑了良好的微环境,使 HRP 在电极上获得了合适的取向,从而促进了 HRP 在电极表面的直接电子转移.

不同扫描速率下 HRP-FDU-12/GC 电极在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{PBS}(\text{pH}=6.9)$ 缓冲液中的氧化还原峰电流和扫速的关系如图 6(A)所示. 随着扫速的增加,氧化还原峰电流也在不断地增加. 氧化峰电位正向移动,还原峰电位负向移动,电位差 ΔE_p 随之增大, E° 几乎不随扫速而发生变化. 当扫描速率在 $40\text{--}300 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内时,氧化还原峰电流均与扫描速率呈线性关系,如图 6(B)所示,说明在该扫描速率范围内,电极反应为表面控制过程^[24,25]. 根据峰电位差随扫速变化关系,参照 Laviron^[26]电极表面反应异相动力学常数计算方法,可得 HRP 直接电子转移反应的表现速率常数 k_s 为 1.200 s^{-1} , 显示了较快的电子传递过程. 可能归因于 FDU-12 的三维介观孔道有利于酶分子以及生成物的传输和扩散,而且对循环伏安图还原或氧化峰进行积分,可以得到电极上电活性物质在电极表面发生还原或氧化反应时所消耗的电量(Q). 由公式 $Q=nFA\Gamma$ ^[24], 可得到电极表面电活性 HRP 的表现浓度(Γ)为 $5.44 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$. 其中 Q 是直接电化学反应的氧化峰或还原峰的积分电量, n 为每个分子的电子转移数, F 为 Faraday 常数, A 为电极的面积. 这个 Γ 值比 HRP 在电极表面的最大理论单层覆盖浓度($2.00 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$)高出 1 倍多,说明在电极表面有多层的 HRP 参与了直接电子转移,这可能与介孔分子筛 FDU-12 大的比表面和笼状结构所提供的多层固载有关.

图 7(A)为 HRP-FDU-12/GC 电极在不同 pH 值

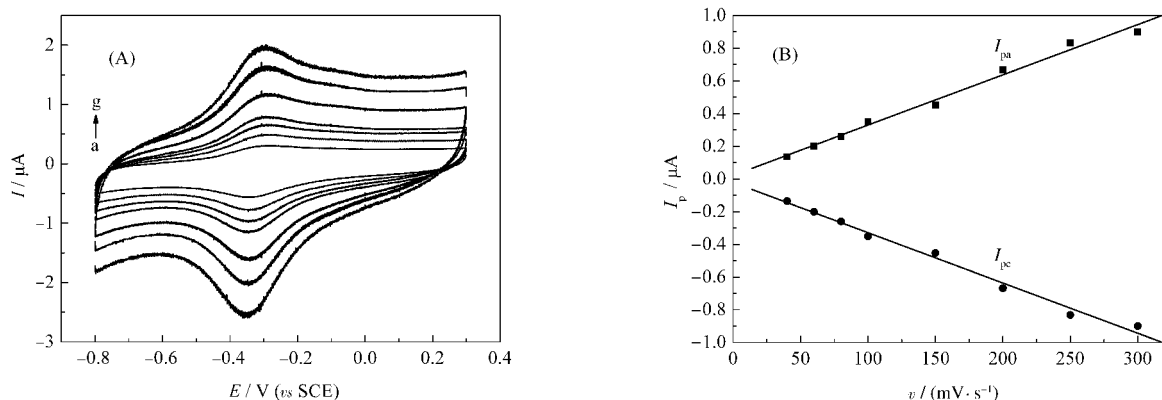


图 6 (A) HRP-FDU-12/GC 电极在不同扫描速率下的循环伏安曲线; (B) 由图 6(A)得到的氧化还原峰电流与扫描速率的关系曲线

Fig.6 (A) Cyclic voltammograms of the HRP-FDU-12/GC electrodes at different scan rates; (B) Plots of the redox peak currents vs scan rate obtained from Fig.6(A)

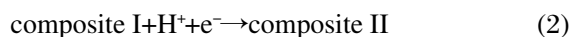
solution: 0.1 mol·L⁻¹ PBS, pH=6.9; scan rate (mV·s⁻¹): (a) 40, (b) 60, (c) 80, (d) 100, (e) 150, (f) 200, (g) 250

的 0.1 mol·L⁻¹ PBS 中的循环伏安曲线. 由图可见, 随着 PBS 的 pH 值从 4.2 增加到 9.2, HRP 的氧化还原峰电位向负方向移动, $E^{0'}$ 与 pH 值呈线性关系 (图 7(B)), 其斜率为 -44.0 mV/pH, 小于单电子和单质子的可逆电极反应的理论值 -57.6 mV/pH(18 °C)^[27], 这可能是 HRP 血红素附近的氨基酸质子化或与血红素铁配位的水分子质子化引起的^[28,29].

2.4 HRP-FDU-12/GC 电极对 H₂O₂ 的电催化氧化

图 8(A)是 HRP-FDU-12/GC 电极对 H₂O₂ 电催化的循环伏安图. 在除氧条件下, 当在缓冲溶液中加入 H₂O₂ 后, 相对于未加 H₂O₂(图 8(A)曲线 a), 循环伏安图发生明显的变化, 可以观察到在 -0.350 V 处的还原峰电流增大. 氧化峰电流则减小, 显示一个典型的电催化还原 H₂O₂ 过程, 并且随着 H₂O₂ 浓度的

增大, 还原峰电流变大(图 8(A)曲线 b, c). 说明在 HRP-FDU-12/GC 电极上, HRP 不仅能够实现快速的电子转移, 而且对 H₂O₂ 的还原具有良好的催化活性. 电催化机理可表示如下^[30-32]:



复合物 I 和复合物 II 是 HRP 的两种氧化中间态. 复合物 I 由 H₂O₂ 氧化 HRP[Fe(III)] 而产生, 其中卟啉环中的铁是五价, 复合物 II 为复合物 I 经单电子还原而得到, 其中卟啉环中的铁是四价, 再经过一个单电子还原反应, 则得到含三价铁的铁卟啉环.

图 8(B)是 HRP-FDU-12/GC 电极的电催化还原电流与 H₂O₂ 的浓度作图得到的关系曲线. 如图所

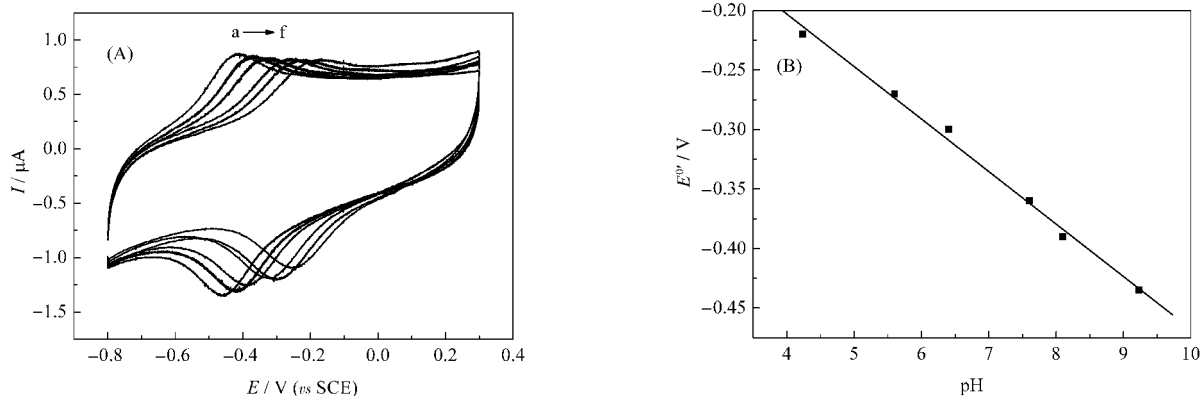


图 7 (A) HRP-FDU-12/GC 电极在不同 pH 值的循环伏安曲线; (B)由图 7(A)得到的 $E^{0'}$ 与溶液 pH 值关系曲线

Fig.7 (A) Cyclic voltammograms of HRP-FDU-12/GC electrode at various pH values; (B) Plot of $E^{0'}$ of HRP vs pH value of the solution from Fig.7(A)

solution: 0.1 mol·L⁻¹ PBS; pH value: (a) 9.2, (b) 8.1, (c) 7.6, (d) 6.4, (e) 5.6, (f) 4.2; scan rate: 100 mV·s⁻¹

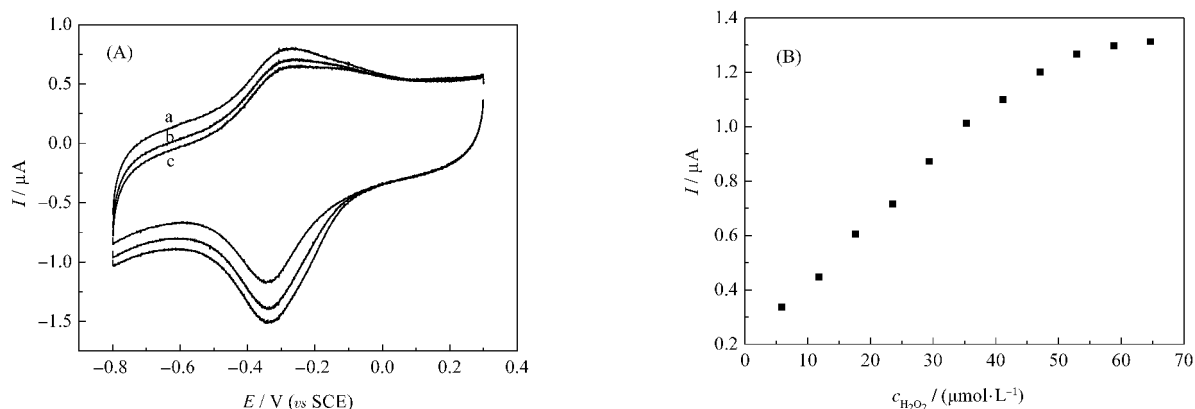


图 8 (A) HRP-FDU-12/GC 电极对 H_2O_2 电催化的循环伏安图; (B) 由图 8(A)得到的电催化还原电流与 H_2O_2 的浓度关系曲线

Fig.8 (A) Cyclic voltammograms of H_2O_2 at the HRP-FDU-12/GC electrode; (B) Relationship between the CV catalytic reduction peak current and H_2O_2 concentration in pH 6.9 buffers from Fig.8 (A)

solution: (a) 0, (b) 14 and (c) 21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 in 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 6.9); scan rate: 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

示, H_2O_2 的浓度在 $0.5\text{--}46.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内与电催化还原电流呈线性关系, 当 H_2O_2 的浓度高于 $46.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 电催化还原电流和 H_2O_2 浓度之间的线性关系表现为一个平台, 这符合酶的 Michaelis-Menten 反应过程的特征. 酶电极的表观米氏常数是酶-底物反应动力学的重要指标, 反映了酶的亲和力, 通常用来评价固定酶的生物活性. 表观米氏常数 K_M^{app} 可以通过 Lineweaver-Burk 方程的电化学表达式计算^[33]:

$$\frac{1}{I_{\text{ss}}} = \frac{1}{I_{\text{max}}} + \frac{K_M^{\text{app}}}{I_{\text{max}}c}$$

式中 I_{ss} 是加入底物的稳态电流, c 是底物的摩尔浓度, I_{max} 是最大稳态电流. K_M^{app} 可通过 $1/I_{\text{ss}}$ 对 $1/c$ 做图所得到的斜率和截距计算得到. HRP-FDU-12/GC 电极的 K_M^{app} 值为 $54.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 这个值要比以前文献报道的值^[32,34]小得多. 该电极具有小的米氏常数, 说明固定在 FDU-12 中的 HRP 对 H_2O_2 的高催化活性以及更高的亲和力. 这可能是由于笼状介孔分子筛 FDU-12 具有良好的生物相容性, 为 HRP 的直接电子转移构筑了良好的微环境.

为了考察 HRP-FDU-12/GC 电极的稳定性, 将电极在 $100 \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 扫速下连续扫描 20 圈, 发现氧化还原峰电流并没有下降. 同时考察了存储时间对电极稳定性的影响. 将 HRP-FDU-12/GC 电极在 4°C 置入 PBS (pH 6.9) 溶液中存储两周后, 再次测定其对 H_2O_2 的电催化活性, 对比储存前后两次测定的伏安曲线, 发现电催化电流并没有明显的改变. 这说明 HRP-FDU-12/GC 电极具有很好的稳定性.

3 结论

使用大孔笼状介孔分子筛 FDU-12 为 HRP 的固定载体, 并用简单的吸附方法构建了酶电极. 傅立叶红外吸收光谱、紫外-可见光谱以及电化学交流阻抗实验表明, 固定后的 HRP 保持了原有二级结构构象, 电化学循环伏安测试表明笼状介孔分子筛 FDU-12 有效地促进了电极表面的 HRP 与电极之间的直接电子转移, 酶电极对 H_2O_2 的还原表现出良好的电催化活性. 其式量电位 $E^{\circ'}$ 为 -0.325V , 电子转移速率常数为 1.200s^{-1} , 显示了较快的电子传递速率, 其吸附量为 $5.44 \times 10^{-11} \text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, 这个值比 HRP 在电极表面的最大理论单层覆盖浓度 ($2.00 \times 10^{-11} \text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) 高出 1 倍多. 此外 HRP-FDU-12/GC 电极的稳定性较好. 上述结果表明三维笼状介孔分子筛 FDU-12 以及所使用的吸附方法为探索研制简单、重现性好, 响应快的第三代生物传感器提供了新的思路.

References

- Xu, Q.; Mao, C.; Liu, N. N.; Zhu, J. J.; Sheng, J. *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, *22*: 768
- Ferapontova, E. E. *Electroanalysis*, **2004**, *16*: 1101
- Zhang, W. J.; Li, G. X. *Anal. Sci.*, **2004**, *20*: 603
- Popescu, I. C.; Gorton, G.; Zetterberg, L. *Biosens. Bioelectron.*, **1995**, *10*: 443
- Zhuo, Y.; Yuan, R.; Chai, Y. Q.; Sun, A. L.; Zhang, Y.; Yang, J. Z. *Biomaterials*, **2006**, *27*: 5420
- Chattopadhyay, K.; Mazumdar, S. *Bioelectrochemistry*, **2000**, *53*: 17

- 7 Kong, Y. T.; Boopathi, M.; Shim, Y. B. *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, **19**: 227
- 8 Yu, J. H.; Ju, H. X. *Anal. Chem.*, **2002**, **74**: 3579
- 9 Dai, Z. H.; Ju, H. X.; Chen, H. Y. *Electroanalysis*, **2005**, **17**: 862
- 10 Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature*, **1992**, **359**: 710
- 11 Vartuli, J. C.; Schmitt, K. D.; Kresge, C. T.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; McCullen, S. B.; Hellring, S. D.; Beck, J. S.; Schlenker, J. L.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W. *Chem. Mat.*, **1994**, **6**: 2317
- 12 Vartuli, J. C.; Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Chu, A. S.; McCullen, S. B.; Johnsen, I. D.; Beck, J. S.; Sheppard, E. W. *Chem. Mat.*, **1994**, **6**: 2070
- 13 Krisler, J.; Dahler, M. A.; Stevens, G. W.; O'Connor, A. J. *Microporous Mesoporous Mat.*, **2001**, **44-45**: 769
- 14 Takahashi, H. B.; Sasaki, L.; Miyazaki, T.; Kajino, C.; Inagaki, T. *S. Microporous Mesoporous Mat.*, **2001**, **44-45**: 755
- 15 Washmonn-Kriel, L.; Jimenez, V. L.; Balkus, K. J. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2000**, **10**: 453
- 16 Liu, H. P.; Wright, P. A.; Botting, N. R. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2001**, **15**: 81
- 17 Fan, J.; Yu, C. Z.; Wang, L. M.; Tu, B.; Zhao, D. Y. *Chem. Commun.*, **2003**: 2140
- 18 Gao, B.; Zhu, G. S.; Fu, X. Q.; Xin, M.; Qiu, S. L. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2003**, **24**: 1100 [高波, 朱广山, 傅学奇, 辛明, 裘式纶. 高等学校化学学报, **2003**, **24**: 1100]
- 19 Xue, P.; Lu, G. Z.; Guo, Y. L. *Chemistry*, **2003**, (10): 681 [薛屏, 卢冠忠, 郭杨龙. 化学通报, **2003**, (10): 681]
- 20 Deere, J.; Magner, E.; Wall, J. G.; Hodnett, B. K. *Chem. Commun.*, **2001**: 465
- 21 Fan, J.; Yu, C. Z.; Gao, T.; Lei, J.; Tian, B. Z.; Wang, L. M.; Luo, Q.; Tu, B.; Zhou, W. Z.; Zhao, D. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, **42**: 3146
- 22 Han, Y. J.; Stucky, G. D.; Bultler, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, **121**: 9897
- 23 Kauppinen, J. K.; Mofate, D. J.; Mantsch, H. H.; Lameron, D. G. *Appl. Spectrosc.*, **1981**, **35**: 271
- 24 Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical methods, fundamental and applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001: 594
- 25 Murray, R. W. In: Bard, A. J. Ed. *Electroanalytic chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1984, 13: 205
- 26 Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.*, **1979**, **101**: 19
- 27 Bond, A. M. *Modern polarographic methods in analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1980: 27
- 28 Yamazaki, I.; Araiso, T.; Hayashi, Y.; Yamada, H.; Makino, R. *Adv. Biophys.*, **1978**, **11**: 249
- 29 Liu, H. H.; Tian, Z. Q.; Lu, Z. X.; Zhang, Z. L.; Zhang, M.; Pang, D. W. *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, **20**: 294
- 30 Gorton, L.; Jonsson-Petersson, G.; Csoregi, E.; Johansson, K.; Dominguez, E.; Marko-Varga, G. *Analyst*, **1992**, **117**: 1235
- 31 Ruzgas, T.; Csoregi, E.; Emneus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. *Anal. Chim. Acta*, **1996**, **330**: 123
- 32 Jia, N. Q.; Zhou, Q.; Liu, L.; Yan, M. M.; Jiang, Z. Y. *J. Electroanal. Chem.*, **2005**, **580**: 213
- 33 Kamin, R. A.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.*, **1980**, **52**: 1198
- 34 Liu, S. Q.; Ju, H. X. *Anal. Biochem.*, **2002**, **307**: 110