

固载葡萄糖氧化酶的壳聚糖/二氧化硅杂化膜的制备及表征^{*}

谭学才, 王健伟, 徐健君, 黄婷婷, 邹小勇, 蔡沛祥

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 利用生物相容性良好的天然高分子聚合物壳聚糖(CS)与甲基三甲氧基硅烷(MTOS)通过原位溶胶-凝胶法制备壳聚糖/二氧化硅有机无机杂化复合膜, 用此膜对葡萄糖氧化酶进行固定, 用红外光谱法、扫描电镜法对膜进行了表征。以电沉积普鲁士蓝的玻碳电极和固定化酶膜构建葡萄糖生物传感器, 用循环伏安法和计时电流法对固定化酶的效果进行了评价, 结果表明, 用于研制固定化酶生物传感器时, 杂化膜比单纯的壳聚糖膜对底物的响应时间快并能很好地保持酶的活性。

关键词: 壳聚糖/二氧化硅杂化膜; 制备; 表征; 葡萄糖氧化酶电极; 固定化

中图分类号: O657.14 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2004)04-0050-04

酶的固定化在生物工程技术、医学、食品、环保^[1]及酶生物传感器^[2]等领域具有重要的作用。固定化的目的是既要保持酶的活性同时又要具有易操作性。在酶生物传感器的研制中, 酶的固定化是影响其分析性能的关键步骤。传统的酶的固定化技术主要包括高分子材料包埋法、吸附法、夹心法及共价交链法。近年来, 无机溶胶-凝胶技术已用于生物分子的固定和传感器的研究中^[3-5], 尽管该技术有许多优点如物理刚性、化学稳定性、多孔性和非溶胀性等, 但其也有缺陷也就是易脆性和较差的生物分子相容性。有机/无机杂化复合功能材料是当今材料科学研究及应用的热点之一, 这种材料的主要优点是其兼具有机物的柔性及易修饰性和无机物的刚性及稳定性等^[6], 将其用于生物传感器的研究已有报道^[7]。壳聚糖(chitosan, CS)是自然界惟一碱性多糖, 分子中含有丰富的亲水性的氨基和羟基, 具有易成膜性和生物相容性, 已在食品、医药、化妆、环保等领域得到开发和应用^[8], 其在化学修饰电极和生物传感器中的研究近年来也引起了重视^[9]。为充分利用杂化复合材料的优点, 克服单独使用壳聚糖(溶胀性)或无机材料(易脆性)的缺点, 本文通过原位溶胶-凝胶(Sol-Gel)技术利用CS和甲基三甲氧基硅烷(MTOS)制备了CS/SiO₂有机无机杂化膜, 用于对葡萄糖氧化酶(GOD)进行固定, 结果表明, 用于研制固定化酶

生物传感器时, 杂化膜比单纯的壳聚糖膜具有更多分析优点。因此, 探索性能优良的杂化膜新体系, 将对生物传感器的发展具有实际意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

EQUINOX-55型傅立叶变换红外光谱仪(Bruker, Germany)。S-520型扫描电子显微镜(Hitachi, Japan)。CHI660电化学工作站(CH Instruments, Inc. USA), 以玻碳(GC)($\varphi=3\text{ mm}$)修饰电极为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝为对电极。

葡萄糖氧化酶(EC1.1.3.4, 195 u/mg, Sigma), 甲基三甲氧基硅烷(MTOS, Aldrich), 壳聚糖(脱乙酰度99%, 上海伯奥生物科技有限公司), D-葡萄糖(广州化学试剂厂), 三氯化铁(广州化学试剂厂), 铁氰化钾(广州化学试剂厂), 磷酸氢二钾(广州化学试剂厂), 磷酸二氢钾(广州化学试剂厂), 所有化学试剂均为AR, 实验用水为一次离子交换二次石英蒸馏水。

1.2 原位溶胶-凝胶法制备壳聚糖与二氧化硅混合溶胶

称取0.5 g壳聚糖溶于100 mL $\varphi=1.0\%$ 的醋酸溶液中, 超声振荡30 min得 $\rho=0.5\%$ 壳聚糖溶液。

^{*} 收稿日期: 2004-04-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(011105-031577); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(0141037, 0342018)

作者简介: 谭学才(1964年生), 男, 博士研究生, 副教授, 工作单位为广西民族学院化学与生态工程学院;

通讯联系人: 蔡沛祥; E-mail: caipx@21cn.com

移取 14 μL MTOS 于 2 mL PVC 管中，再加入甲醇 30 μL ，混合均匀。移取 $\rho=0.5\%$ 亮聚糖 1.2 mL 于上述管中，摇匀，再超声振荡 1 h，得透明的混合溶胶，为使 MTOS 充分水解，此溶胶室温放置 3 h 后再使用，使用时用 0.1 mol/L NaOH 调节其 pH 值为 6~7。

1.3 GC/PB 电极的制备

GC 电极先在 1 200 号金相砂纸上打磨，然后分别用 1、0.3、0.05 μm $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 在专用抛光绒毛垫上抛光，每一步均用二次水洗净。再将抛光洁净的电极分别在体积比为 1:1 HNO_3 、无水乙醇及二次水中超声清洗各 5 min。处理后的电极室温晾干备用。参照文献[10]制备 GC/PB 电极。

1.4 GC/PB/GOD-CS-SiO₂ 电极的制备

称取 5.2 mg GOD 于 0.5 mL 0.02 mol/L PBS (pH 7.0) 中得到 2 000 u/mL GOD 储备液，此液不用时置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。分别移取 150 μL CS-SiO₂ 溶胶和 50 μL 上述 GOD 于 0.5 mL PVC 管中混合，超声振荡 30 s，再移取此混合液 20 μL 于 GC/PB 电极表面，此电极于置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，让膜充分干燥和凝胶 24 h 后再使用，得 GC/PB/GOD-CS-SiO₂ 电极。

1.5 实验方法

扫描电镜实验和红外光谱实验所用的膜分别在粘在铜台上的盖玻片和载玻片上同上述方法制备（载玻片上的膜用不锈钢刀片小心刮下再做红外实验）。电化学定性表征实验用循环伏安法，电极在插入溶液 30 s 后于 +0.4~-0.1 V 间记录循环伏安图。计时安培法实验时溶液施加电磁搅拌，工作电位为 -0.05 V。

2 结果与讨论

2.1 膜的 IR 及 SEM 表征

实验发现在杂化复合膜中的 CS 和 SiO₂ 的质量比例为 1:1 时，得到的膜均匀透明，符合杂化材料的特征。图 1 为 CS、CS-SiO₂、CS-SiO₂-GOD 的 IR 光谱图，图 1 中在 3 300 cm^{-1} 和 2 900 cm^{-1} 处的吸收带变化不大，前者是分子中 -NH₂ ($\nu_{\text{N-H}}$) 和 -OH ($\nu_{\text{O-H}}$) 伸缩振动吸收峰，后者是 -CH₂ 和 -CH₃ ($\nu_{\text{C-H}}$) 伸缩振动吸收峰。a 中的酰胺 I 带 (1 650 cm^{-1} 左右) 不明显，说明 CS 的脱乙酰度较高。1 153 cm^{-1} 和 897 cm^{-1} 是 CS 分子中 β (1-4) 糖苷键的特征吸收峰，1 079 cm^{-1} 和 1 036 cm^{-1} 处的强吸收峰是分子中伯仲-OH 与其相邻碳的伸缩振动吸收峰 ($\nu_{\text{C-O}}$)。1 562 cm^{-1} 是变形振动吸收峰

($\delta_{\text{N-H}}$)。1 415 cm^{-1} 是 -CH₂ 的变形振动吸收峰 ($\delta_{\text{C-H}}$)。b 与 a 的明显区别在于：一是 1 080 cm^{-1} 处的强吸收峰较宽，这是膜中形成的 Si-O-Si (1 080 cm^{-1} 左右) 和 Si-O-C (1 040 cm^{-1} 左右) 的强吸收峰 ($\nu_{\text{Si-O}}$) 与 CS 分子中的强吸收峰 ($\nu_{\text{C-O}}$) 合并重叠产生的；二是增加了 1 274 cm^{-1} 和 780 cm^{-1} 2 个强而尖的吸收峰，它们是 CH₃-Si 基团的特征吸收峰，前者是 -CH₃ 的弯曲振动 ($\delta_{\text{C-H}}$)，后者是 C-Si 间的伸缩振动 ($\nu_{\text{C-Si}}$)^[11]。说明通过原位溶胶-凝胶法形成了 CS 与 SiO₂ 之间的杂化膜。图中 c 与 b 的主要区别在于出现了 1 650 cm^{-1} 的吸收带，这是蛋白质 GOD 分子中的酰胺 I 带 ($\nu_{\text{C=O}}$)，表明生物分子已被固定在杂化膜中。

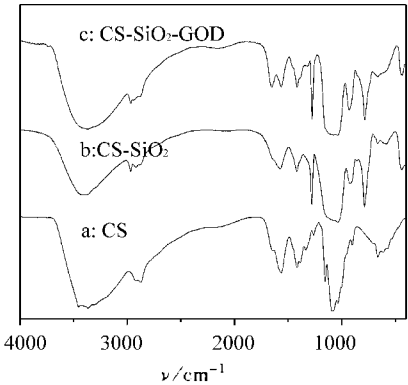


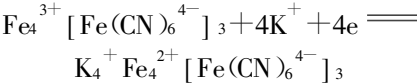
图 1 膜的红外光谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of membranes

图 2 是 3 种膜的 SEM 图，CS 膜的结构非常致密 (Fig. 2(a))，当其与 MTOS 交联形成杂化膜后显示了明显的增大了的网络结构 (Fig. 2(b))，这与 IR 的分析结果是一致的；当 GOD 固定于杂化膜中后，可观察到 GOD 均匀分布于网络结构中 (Fig. 2(c))，这非常有利于底物葡萄糖分子的接触，从而有利于酶促催化反应。通过以上的 IR 和 SEM 分析，我们认为可能的交联反应和 GOD 在杂化膜中的固定过程可用图 3 表示。

2.2 循环伏安法对固定化酶膜电极的表征

扫描速度对固定化酶电极的影响见图 4 所示。图 4 中的一对可逆氧化还原峰 (图 4(a)) 是玻碳电极表面电沉积的普鲁士蓝氧化和还原所致。其电极反应可表示为：



由图可见，随着扫描速度的增加，阴极峰电流和阳极峰电流均与扫描速度的平方根成线性关系地增加 (图 4 (b))，阴极峰电位和阳极峰电位则分

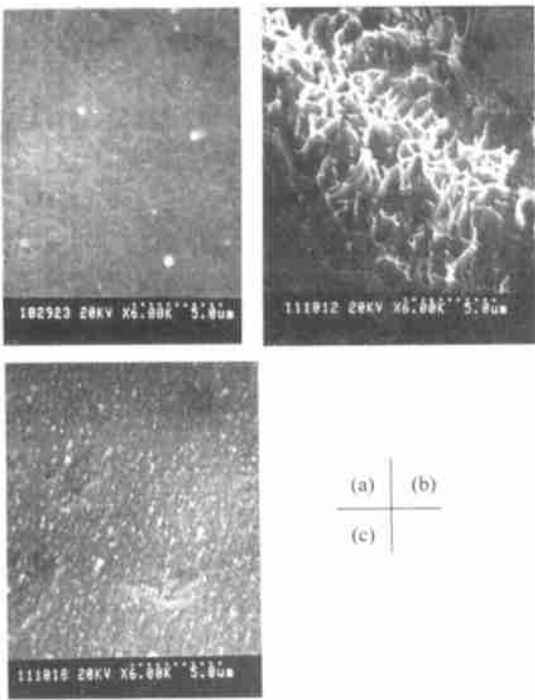


图 2 膜的扫描电镜
Fig. 2 SEM micrographs of (a) CS film,
(b) hybrid film of CS with MTOS, and
(c) hybrid film containing GOD

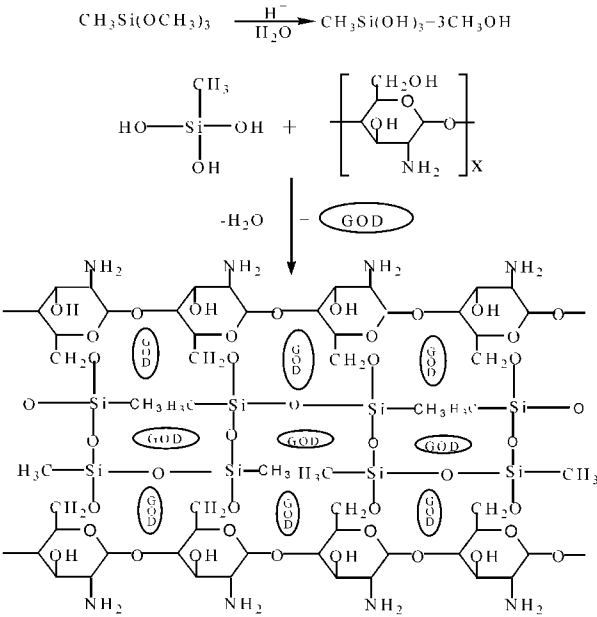


图 3 杂化膜的形成及酶的固定化示意图

Fig. 3 Scheme of cross-linking reaction of CS and MTOS
and immobilization of GOD in the hybrid film

别稍负移和稍正移（图 4（a）），可逆性变差。这种行为符合典型的薄层电化学特征^[2]。

图 5 是裸电极（a, b）和酶电极（c, d）对在底液和底物葡萄糖中响应的循环伏安图。可见，裸电极在底液（a）和底物（b）中无氧化还原峰出现。而酶电极

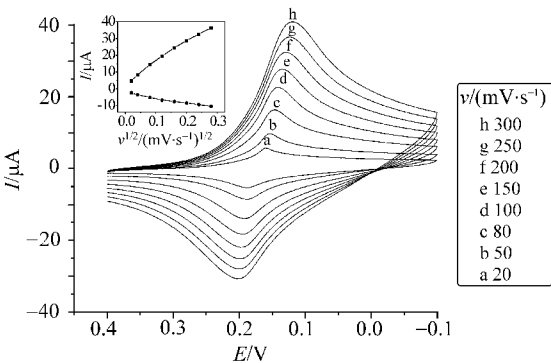


图 4 扫描速度对酶电极的影响
Fig. 4 Effect of scanning rate on the enzyme electrode
0.02 mol/L PBS (pH 7.0) + 0.1 mol/L KCl

在底液中（c）呈现一对普鲁士蓝的可逆氧化还原峰，当在溶液中加入葡萄糖时（d），阴极峰电流增加，同时阳极峰电流降低。其原因是葡萄糖在 GOD 的催化作用下产生 H_2O_2 ， H_2O_2 再在 PB 的催化作用下产生催化还原电流。这说明普鲁士蓝能在膜中的 GOD 和电极表面之间加速电子传递，其本质是普鲁士蓝作为“人工过氧化酶”在较低的电位下催化了 H_2O_2 的还原；据此可用酶电极对底物葡萄糖进行测定。

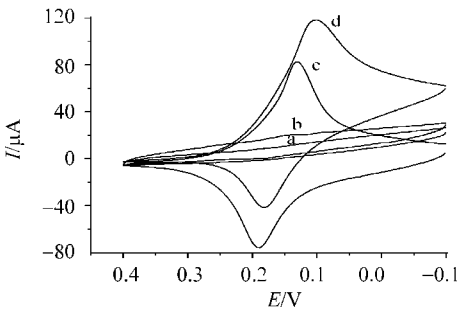


图 5 裸电极和酶电极的循环伏安图
Fig. 5 Cyclic voltammograms of bare
electrode and the enzyme electrode
(a) 裸电极; (b) (a) + 1.0×10^{-3} mol/L 葡萄糖;
(c) GC/PB/CS-SiO₂-GOD 电极;
(d) (c) + 1.0×10^{-3} mol/L 葡萄糖;
支持电解质: 0.02 mol/L PBS (pH 7.0) + 0.1 mol/L KCl;
扫描速度为 50 mV/s

2.3 酶电极的计时安培响应

图 6 为在底液中连续加入葡萄糖时酶电极的计时安培动力学响应曲线。由图可知，单独的壳聚糖酶膜达到 95% 的响应需要 30 s（图 6（a）），而当壳聚糖与硅酸酯形成网络杂化膜固定化酶时，达到 95% 的响应小于 10 s（图 6（b））。这说明网络杂化膜的形成和孔径的增大不仅能加快底物的传质扩散，而且

能较好地保持酶的活性, 这对传感器的研究和应用是极为有利的。

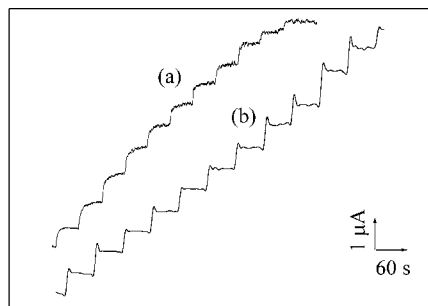


图6 酶电极的计时安培响应曲线

Fig. 6 Chronoamperometric curves of

$i-t$ of enzyme electrode

(a) GC/PB/CS-GOD 电极;

(b) GC/PB/CS-SiO₂-GOD 电极;

0.02 mol/L PBS (pH 7.0) + 0.1 mol/L KCl;

1.0×10^{-3} mol/L 葡萄糖;

工作电位为-50 mV

参考文献:

- [1] 蒋中华, 张津辉. 生物分子固定化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 215.
- [2] 董绍俊, 车广礼, 谢远武. 化学修饰电极[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 501; 143.

- [3] COLLINS M M, HOWELS A R. Sol-Gel and electrochemistry[J]. Anal Chem, 2000, 72: 702A-909A.
- [4] 梁汝萍, 邱建丁, 邹小勇, 等. 溶胶-凝胶-HbsAb 膜免疫传感器的研制与应用[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(5): 793-797.
- [5] 梁汝萍, 邱建丁, 李红, 等. 氨基化溶胶-凝胶免疫电极检测乳腺癌抗原[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(5): 127-128.
- [6] KROS A, GERRISEN M, SPRAKEL V S L, et al. Silica-based hybrid material as biocompatible coatings for glucose sensor[J]. Sens Actuators B, 2001, 81: 68-75.
- [7] JIA J B, WANG B Q, WU A G, et al. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional Sol-Gel network[J]. Anal Chem, 2002, 74: 2217-2223.
- [8] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 160-224.
- [9] LEI C X, HU S Q, SHEN G L, et al. Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide[J]. Talanta, 2003, 59: 981-988.
- [10] HARYAHIN A A, KARYAKINA E E, GORTON L. Amperometric biosensor for glutamate using Prussian blue-based "Artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide[J]. Anal Chem, 2000: 1720-1723.
- [11] 荆煦瑛, 陈式棣, 么恩云. 红外光谱适用指南[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 351-356.

Preparation and Characterization of Chitosan/Silica Hybrid Film and Its Application in Immobilization of Glucose Oxidase

TAN Xue-cai, WANG Jian-wei, XU Jian-jun, HUANG Ting-ting,

ZOU Xiao-yong, CAI Pei-xiang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A new type of organic-inorganic hybrid film based on sol-gel chitosan/silica was prepared with chitosan (CS) and methytrimethoxysilane (MTOS). The hybrid film was used to immobilize glucose oxidase (GOD) on the surface of Prussian Blue (PB)-modified glass carbon electrode to construct glucose biosensor. The film was studied by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscope (SEM). Effect of GOD immobilized in film was investigated by cyclic voltammetry and chronoamperometry. The results show that the enzyme electrode fabricated by hybrid film has a fast response time than the enzyme immobilized in pure chitosan film.

Key words: chitosan/silica hybrid composite film; preparation; characterization; glucose oxidase electrode; immobilization