

## 修饰微带金电极上细胞色素 C 电极过程的热力学研究\*

蔡称心 鞠焜先 陈洪渊  
(南京大学化学系, 南京, 210008)

**摘要** 研究了细胞色素 C(Cyt. C)在一种新的电子转移促进剂 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶修饰微带金电极(DMMP/Au)上的氧化还原热力学;求得 Cyt. C 在 DMMP/Au 电极上电化学反应的标准电极电位  $E^\circ$ 、熵变  $\Delta S^\circ$ 、焓变  $\Delta H^\circ$  及 Gibbs 自由能的改变  $\Delta G^\circ$  值分别为: 0.272 V(*vs.* NHE)、 $-123.7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 、 $-63.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $-26.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (25°C, pH=7.0);同时,探讨了温度及 pH 值对 Cyt. C 电极反应热力学参数的影响. 实验表明,碱性条件下  $E^\circ$  随温度的变化表现出与中性及弱酸性条件下不同的规律.

**关键词** 微电极, 微带金电极, 细胞色素 C, 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶, 热力学

细胞色素 C(Cyt. C)是金属蛋白质类生物大分子,在体内能发生可逆的氧化还原反应,已成为重要的电子载体.但由于其庞大的结构使其在电极/溶液界面上传递电子很慢,甚至没有电化学响应,使获得 Cyt. C 的电化学数据和深入了解它在体内氧化还原作用十分困难.自从 Kuwana<sup>[1]</sup>发现 Cyt. C 在  $\text{In}_2\text{O}_3$  半导体电极上和 Hill 等<sup>[2]</sup>发现在 4,4'-联吡啶存在时 Cyt. C 在金电极上能发生准可逆的电化学反应以来,人们又发现了许多 Cyt. C 的促进剂如氨基酸<sup>[3]</sup>、嘌呤<sup>[4]</sup>等生物小分子、导电高分子<sup>[5]</sup>以及有机硫化物<sup>[6]</sup>等,在修饰电极、金属氧化物电极及玻碳电极上观察到了 Cyt. C 可逆或准可逆的氧化还原反应.但对 Cyt. C 的电化学反应热力学研究得较少<sup>[7,8]</sup>.本文在研究 4,6-二甲基-2-巯基嘧啶(DMMP)修饰微带金电极电化学反应行为的基础上<sup>[9]</sup>,对 Cyt. C 在 DMMP 修饰金电极上的电极反应热力学进行了研究.同时,研究了 DMMP 在金电极上的吸附,讨论了温度对 Cyt. C 电化学反应的影响;实验求得 Cyt. C 在 DMMP/Au 修饰电极上电极反应的热力学参数以及 pH 值对这些参数的影响.这些结果对研究生物氧化还原过程的机制将产生积极的作用.

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器、材料及试剂

M273 恒电位仪及 M270 电化学分析系统(EG & G, PAR 公司,美国),FX-850 打印机(EPSON 公司,美国);501 型超级恒温槽(上海实验仪器厂);PHS-10A 酸度/离子计(萧山市科学仪器厂).EPON 812 型环氧树脂(New York,美国),马心细胞色素 C(VI 型,98%,SIG-MA 公司,美国),DMMP 由南京大学配位化学研究所提供(经红外光谱及核磁共振谱确定为纯品).其它试剂均为 A. R. 级,实验用水为二次石英亚沸蒸馏水.

收稿日期:1994-01-31. 修改稿收到日期:1994-06-02. 联系人:陈洪渊. 第一作者:蔡称心,男,28岁,博士研究生.

\* 国家自然科学基金、国家教育委员会博士点基金及青年基金资助课题.

## 1.2 实验方法

电化学实验均采用三电极体系在自制的恒温电解池中进行。微带金电极为工作电极(88 nm×1.0 cm),饱和甘汞电极(SCE)为参比电极(标准电极电位  $E^0$  为对 NHE 的电位值),铂丝电极为对电极。实验时将恒温电解池置于法拉第屏蔽箱中以消除外界干扰。底液为磷酸盐缓冲溶液(离子强度为  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),测试液通  $\text{N}_2$  除氧 20 min 后,在  $\text{N}_2$  气氛中进行实验。

实验前将金电极抛光清洗后,再经电化学方法清洗[即在 pH 7.0 的缓冲溶液中于  $-0.3 \sim +1.3 \text{ V}$ (vs. SCE)之间以  $20 \text{ mV/s}$  循环扫描直到其循环伏安图稳定为止]。金电极表面的修饰膜用“膜转移”法制备,将金电极置于  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DMMP 的磷酸盐缓冲溶液中一段时间,取出用缓冲溶液冲洗,再在含  $0.34 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cyt. C 的缓冲溶液中于  $-0.15 \sim +0.3 \text{ V}$  (vs. SCE)电位范围内在不同温度及 pH 值下进行循环伏安实验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DMMP 在金电极上的吸附

电化学方法研究非电活性的化合物在电极表面的吸附,可根据该化合物在电极表面覆盖度  $\theta$  的不同对电活性物质电极反应的影响来进行。金电极表面在  $+1.3 \text{ V}$  处被氧化产生的氧化物的还原发生在  $+0.5 \text{ V}$  (vs. SCE)附近,当溶液中有 DMMP 存在时,由于 DMMP 能吸附在金电极表面,因而电极表面氧化物还原峰降低,氧化物还原消耗的电量也将减少。DMMP 浓度变大,氧化物还原消耗的电量变少。根据  $\theta = 1 - Q/Q_{\theta=0}$  ( $Q_{\theta=0}$  为没有 DMMP 存在时,金电极表面氧化物还原所消耗的电量;  $Q$  为有 DMMP 存在时,电极表面氧化物还原所消耗的电量)<sup>[9]</sup> 求出 DMMP 在金电极表面的覆盖度  $\theta$ 。文献<sup>[9]</sup>指出,有机硫化物在金电极表面的吸附可以用 Frumkin 吸附等温线来描述:  $\lg\{\theta/[C(1-\theta)]\} = 2a\theta/2.3 + \lg K$  ( $a$  为吸附在金电极表面上 DMMP 分子之间的相互作用因子,正值为相互吸引,负值为相互排斥;  $C$  为溶液中 DMMP 的浓度;  $K$  为 DMMP 在金电极表面的吸附平衡常数)。因此,  $\lg\{\theta/[C(1-\theta)]\}$  与  $\theta$  有线性关系,从直线的斜率和截距可计算得  $a$  和  $K$  分别为  $-1.1$  和  $1.05 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。说明 DMMP 在微带金电极表面有很好的吸附性,并且其分子之间是相互排斥的。

### 2.2 温度对 Cyt. C 标准电极电位 $E^0$ 的影响

在 pH 为 7.0 时, Cyt. C 在  $4 \sim 97^\circ\text{C}$  的温度范围内分子结构不发生变化<sup>[11]</sup>,本实验选择的温度范围为  $10 \sim 70^\circ\text{C}$ 。图 1 是 Cyt. C 在 DMMP 修饰 Au 电极上不同温度下 (pH=7.0) 的循环伏安图。随着温度的升高, Cyt. C 的氧化峰电位和还原峰电位均向负电位方向移动,还原峰电位负移的幅度较大,这可能是由于温度对 Cyt. C 氧化态和还原态的分子构象具有不同的影响所造成的。Robinson<sup>[12]</sup> 在研究 Cyt. C( $\text{Fe}^{3+}$ ) 的电化学反应时发现 Cyt. C( $\text{Fe}^{3+}$ ) 的还原伴随着其分子构象的变化。从 Cyt. C 的分子结构可知, Cyt. C( $\text{Fe}^{3+}$ ) 分子中带 +1 电荷的血红素和其周围带正电荷的赖氨酸之间必然有静电排斥作用。这样势必使 Cyt. C( $\text{Fe}^{3+}$ ) 的稳定性降低,分子构象容易发生变化。但 Cyt. C( $\text{Fe}^{3+}$ ) 分子中血红素周围的空穴随温度的升高而变

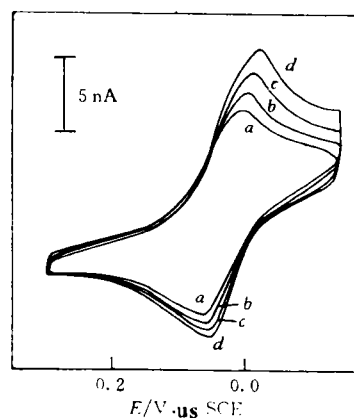
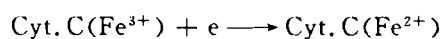


Fig. 1 The cyclic voltammograms of  $0.34 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cyt. C at DMMP/Au electrode  
a.  $10^\circ\text{C}$ ; b.  $30^\circ\text{C}$ ; c.  $50^\circ\text{C}$ ;  
d.  $70^\circ\text{C}$  (pH 7.0).

大,带+1电荷的血红素溶剂化程度增高,Cyt. C(Fe<sup>3+</sup>)分子内正电荷排斥作用减小,稳定性提高;而Cyt. C(Fe<sup>2+</sup>)分子内血红素为中性,分子内正电荷排斥作用不大,因而温度升高对Cyt. C(Fe<sup>2+</sup>)的稳定性提高不大,所以温度升高,Cyt. C(Fe<sup>3+</sup>)更难被还原,因而它的还原峰电位负移较大,致使 $E^0$ 随温度升高而负移(图2b)。

### 2.3 Cyt. C 电化学反应热力学参数测定方法

Cyt. C 在 DMMP/Au 电极上发生的电化学反应可表示如下:



前文<sup>91</sup>求得Cyt. C在DMMP/Au电极上的电

极反应过程电子转移系数 $\alpha=0.5$ ,因此可认为 $E^0=(E_{pc}+E_{pa})/2$ 。 $E^0$ 的温度系数可从 $E^0-T$ 关系中求得,由 $dE^0/dT$ 及 $\Delta S_{rc}^0=F(dE^0/dT)$ 可求得反应的熵变 $\Delta S_{rc}^0$ 。对于电池反应:Cyt. C(Fe<sup>3+</sup>)+(1/2)H<sub>2</sub>→Cyt. C(Fe<sup>2+</sup>)+H<sup>+</sup>的熵变 $\Delta S^0$ 可根据 $\Delta S^0=\Delta S_{rc}^0-65.2\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ 求得<sup>131</sup>。反应的焓变 $\Delta H^0=\Delta G^0+T\Delta S^0$ ( $\Delta G^0=-FE_{25}^0$ , $E_{25}^0$ 为25℃时以NHE作标准的Cyt. C电化学反应的标准电极电位, $E_{25}^0(\text{vs. NHE})=E_{25}^0(\text{vs. SCE})+0.241\text{ V}$ );Cyt. C还原前后的分子体积变化 $\Delta V$ 可从 $\Delta S_{rc}^0/\Delta V=5.0\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$ 关系中求出<sup>71</sup>。

### 2.4 pH对Cyt. C电化学反应热力学参数的影响

在所研究的pH范围内,Cyt. C在DMMP/Au电极上的循环伏安图随温度的变化均与图1相似,但它的 $E^0$ 在不同pH值条件下随温度的变化有所不同(图2)。在弱酸性及中性条件下, $E^0$ 随温度 $T$ 的升高单调下降,但在pH=8.2的碱性溶液中, $E^0$ 随温度升高而下降的斜率在约45℃处发生变化(图2c)。Watt G. D.等<sup>141</sup>在研究溶液pH对Cyt. C在695 nm处的吸光度与温度的关系时也发现了同样的现象,在弱酸性及中性条件下,695 nm处的吸光度随温度的升高而单调下降,而在弱碱性条件下,Cyt. C的吸光度却在温度升高的过程中发生转折。进一步的研究指出<sup>151</sup>,在碱性溶液中Cyt. C分子中第80位处蛋氨酸(Met-80)的Fe(III)-S键因温度的升高而发生了断裂,因而使其吸光度随温度的变化规律发生了改变。因此,在碱性溶液中, $E^0$ 温度系数的变化也是由于Cyt. C分子中Fe(III)-S键在45℃时发生了断裂,而使Cyt. C分子构象发生了改变所致。从 $E^0$ 随温度变化的斜率求得的热力学参数值 $\Delta S_{rc}^0$ 、 $\Delta S^0$ 、 $\Delta H^0$ 、 $\Delta G^0$ 均列在表1中。

Table 1 Thermodynamic parameters for Cyt. C at DMMP/Au electrode in phosphate buffer solution

pH	$E^0$	$\Delta H^0(25^\circ\text{C})$	$\Delta G^0(25^\circ\text{C})$	$\Delta S^0$	$\Delta S_{rc}^0$	$\Delta V$
	/V(vs. NHE)	/kJ·mol <sup>-1</sup>	/kJ·mol <sup>-1</sup>	/J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup>	/J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup>	/(0.1 nm) <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup>
5.9	0.288	-61.9	-27.8	-114.5	-49.3	-16.4
7.0	0.272	-63.1	-26.2	-123.7	-58.5	-19.4
8.2	0.259	-63.0	-25.0	-127.4(<45℃)	-62.2(<45℃)	-20.7
				-175.9(>45℃)	-110.7(>45℃)	-36.8

从表1可以看出,它们与在PySSPy/Au电极上<sup>71</sup>及裸露的玻碳电极<sup>81</sup>上测出的值相近。Cyt. C的还原伴随着熵变的降低,这可能是由于Cyt. C分子中血红素由+1电荷变成中性以

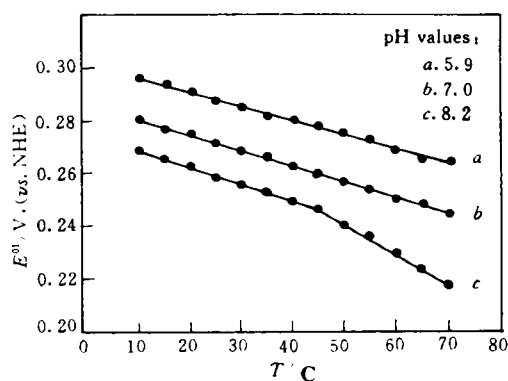


Fig. 2 Dependence of  $E^0$  for Cyt. C at DMMP/Au on temperature in phosphate buffer containing  $0.34\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cyt. C

后, 血红素与周围赖氨酸之间的静电排斥作用降低, Cyt. C 分子的整个结构变得更加紧密(从 Cyt. C 还原后分子体积变小可看出), 因而更加稳定所致.

### 参 考 文 献

- 1 Yeh P., Kuwana T.; Chem. Lett., 1977, 10: 1145
- 2 Eddowes M. J., Hill H. A. O.; J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1977, 21: 771
- 3 Jonathan M. C., Katharine R. G., Calum J. M.; J. Electroanal. Chem., 1993, 347: 267
- 4 Isao T., Masahiro I., Kenji T., Hiroko Y., Kazuo Y.; J. Electroanal. Chem., 1984, 164: 385
- 5 Philip N. B., Jonathan F.; J. Electroanal. Chem., 1989, 261: 471
- 6 Song S., Clark R. A., Bowden E. F., Tarlov M. J.; J. Phys. Chem., 1993, 97: 6564
- 7 Taniguchi I., Funatsu T., Iscki M., Yamaguchi H., Yasukouchi K.; J. Electroanal. Chem., 1985, 193: 295
- 8 Chi Q., Dong S.; J. Electroanal. Chem., 1993, 348: 377
- 9 CAI Chen-Xin(蔡称心), CHEN Hong-Yuan(陈洪渊), JU Huang-Xian(鞠煊先); Acta Chimica Sinica(化学学报), in press
- 10 Uosaki K., Hill H. A. O.; J. Electroanal. Chem., 1981, 122: 321
- 11 Moore G. R., Williams R. J. P.; Eur. J. Biochem., 1980, 103: 513
- 12 Robinson M. N., Boswell A. P., Huang Z. X., Eley C. G. S., Moore G. R.; Biochem. J., 1983, 213: 687
- 13 Taniguchi V. T., Sailasuta-Scott N., Anson F. C., Gray H. B.; Pur. Appl. Chem., 1980, 52: 2275
- 14 Watt G. D., Sturtevan J. M.; Biochemistry, 1969, 8: 4567
- 15 Moore G. R., Williams R. J. P., Chien J. C. W., Dickinson L. C.; J. Inorg. Biochem., 1980, 12: 1

## Studies on the Electrode Process Thermodynamics of Cytochrome C at A Microband Gold Electrode Modified with 4,6-Dimethyl-2-mercaptopyrimidine

CAI Chen-Xin, JU Huang-Xian, CHEN Hong-Yuan\*

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210008)

**Abstract** The redox thermodynamics of cytochrome C at a 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine(DMMP), a new electron transfer promoter of cytochrome C, modified microband gold electrode (DMMP/Au) was investigated by cyclic voltammetry. The thermodynamic parameters of the electron-transfer reaction of cytochrome C at DMMP/Au electrode were estimated. The normal potential  $E^{0'}$ , the changes of entropy, enthalpy and Gibbs free energy,  $\Delta S^0$ ,  $\Delta H^0$  and  $\Delta G^0$ , for cytochrome C at 25°C and pH 7.0 were 0.272 V(*vs.* NHE),  $-123.7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $-63.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  and  $-26.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , respectively. The effects of temperature and pH on the thermodynamic parameters of cytochrome C were discussed. The  $E^{0'}$  *vs.*  $T$  plot shows remarkable biphasic character in an alkaline solution with a turning point at *ca.* 45°C, whereas in an acid or neutral solution the  $E^{0'}$  values changed monotonically with temperature.

**Keywords** Microelectrode, Microband gold electrode, Cytochrome C, 4,6-Dimethyl-2-Mercaptopyrimidine, Thermodynamics (Ed.: H, S)