

辅酶 I 在 β -萘醌磺酸根修饰金带电极上的电化学还原*

鞠焜先 马 威 蔡称心 陈洪渊

(南京大学化学系, 南京, 210093)

摘要 研制了聚吡咯/NQS 修饰金带电极, 讨论了 NQS/PPy 的电聚合过程及实验条件对金电极上吡咯聚合物膜性质的影响; 用成核及生长理论解释了阴离子 NQS 对电聚合过程计时电流曲线的影响, 优化了 NQS/PPy/Au 电极的制备条件. 该修饰电极稳定性好, 对辅酶 I 在金电极上的还原有催化作用. 在 pH=7.0 时催化电流在 $4.0 \times 10^{-5} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内与 NAD^+ 浓度有线性关系, 探讨了电催化作用的机制.

关键词 修饰电极, 聚吡咯, 金带电极, β -萘醌磺酸钠, 辅酶 I

近年来, 生物传感器已成为电化学研究的一个重要领域, 怎样将酶或媒体固定在电极表面是制作电化学生物传感器的关键. 电化学聚合嵌入中间体或酶是一种常用的制备技术, 聚吡咯(PPy)则是报道最多的方法之一^[1]. 有关吡咯在 Pt 及玻碳电极上的聚合及电解质嵌入的研究已有许多报道^[1~3]; 虽然金电极作为基础电极早已用于电化学研究, 但吡咯在金电极, 特别是金带电极上的聚合却不多见. Janda 等^[4]曾用 PPy 将葡萄糖氧化酶固定在金电极表面并利用对苯醌作媒体制备了葡萄糖传感器. β -萘醌磺酸根(NQS)是醌类化合物, 它可以用作电子传递媒体^[5], 有关它在水溶液中的电学性质已有报道^[6,7]. Zinger^[8]及 Kajiya 等^[9,10]分别用 PPy 将 NQS 固定在 Pt 或玻碳电极上研究了它对抗坏血酸的电催化氧化及用于葡萄糖的测定.

本文研究了吡咯在金带电极上的电化学聚合及阴离子 NQS 的嵌入, 制备了 NQS/PPy 修饰金带电极. 该电极对 NAD^+ 在电极上的还原有电催化作用, 可用于 NAD^+ 的直接电化学测定. 已知, NADH 和它的氧化态 NAD^+ 是 250 多种脱氢酶的辅酶, 研究辅酶对生物传感器的发展起很重要的作用. 因此, NADH 及 NAD^+ 的电化学研究已引起人们很大的兴趣. 但是, 近年来的工作主要还集中在 NADH 在 Pt 和碳电极上的电催化氧化和测定^[5,11~13], 而 NAD^+ 在修饰电极上的电催化还原和测定并未见报道. 该项研究工作提供了 NAD^+ 的电化学测定方法, 为进一步开展其有关脱氢酶生物传感器的研究打下了基础.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

M270 电化学分析系统及 M273 恒电位仪(美国 PAR 公司); Epson FX-850 打印机和 HP M7440 绘图仪. 吡咯(光谱纯, 德国 Fluka 公司); NQS(A.R., 德国 Merck 公司); NAD^+

收稿日期: 1994-12-31. 修改稿收到日期: 1995-04-19. 联系人及第一作者: 鞠焜先, 男, 31 岁, 博士, 副教授.

* 国家自然科学基金资助课题.

(美国 Sigma 公司)。

所用其它试剂均为 A.R. 级。磷酸盐缓冲溶液由 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 配成 0.1 mol/L, 实验用水为石英亚沸二次蒸馏水。

1.2 实验方法

以金带电极 ($0.1 \times 2.0 \text{ cm}^2$) 为工作电极、SCE 为参比电极、Pt 电极为对电极, 用 5 mL 试验溶液, 通氮气 10 min 后, 在 N_2 气氛下进行电化学实验。工作电极在使用前首先分别用 500 和 1200 # C 的金相砂纸及 $0.25 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$ 乳液液抛光并用二次水清洗, 然后在 $\text{pH}=7.0$ 的 PBS 中、在 $-1.0 \sim +0.8 \text{ V}$ 以 50 mV/s 的扫描速率循环扫描至恒定的背景电流。用二茂铁 ($0.5 \text{ mmol/L} + 0.1 \text{ mol/L NBU}_4\text{ClO}_4$) 乙腈溶液表征后, 进行电化学实验。电化学聚合是在 $+0.85 \text{ V (vs. SCE)}$ 恒电位下、在 0.1 mol/L 吡咯 + 0.1 mmol/L NQS 和 0.1 mmol/L NaCl 的溶液中进行。

2 结果与讨论

2.1 溶液中 NQS 在金带电极上的循环伏安性质

在 $\text{pH}=5 \sim 10$ 的体系中, $\text{NQS}(1.0 \text{ mol/L})$ 在金带电极上的循环伏安图有一对氧化还原峰, 其标准式量电位 $E^{0'} (= (E_{p,c} + E_{p,a})/2)$ 与溶液 pH 值有线性关系。直线的斜率约为 -56 mV/pH , 在 $\text{pH}=7.0$ 时 $E^{0'} = -0.143 \text{ V}$, $\Delta E_p = 115 \text{ mV}$, $E^{0'}$ 值与文献^[14]在汞电极上所得数值 (-0.126 V) 相近。已知电极反应的电子得失数为 $2^{[7]}$, 因而电极过程有 2 个 H^+ 参与。氧化及还原峰电流都与 $v^{1/2}$ 成正比, 并且随着 v 的增加, 阴极峰电位负移而阳极峰电位正移, 表明 NQS 的电极过程是受扩散和电极反应同时控制的准可逆过程。 ΔE_p 随着 pH 值的降低而增加, 说明反应可逆性变差; 这是因为 NQS 分子的负电性随着 pH 值的降低而减少, 从而更难接近金电极表面。将在 NQS 中浸泡或循环扫描过的电极放到相应 pH 值的缓冲溶液中, 在同样扫描范围内未发现 NQS 的氧化还原峰出现, 表明 NQS 在金带电极上没有吸附或聚合作用。

2.2 吡咯的电化学聚合及 NQS 在金带电极上的固定

实验分别用恒电位 ($E = +0.85 \text{ V}$) 及循环伏安 ($v = 100 \text{ mV/s}$, 扫描范围为 $-1.0 \text{ V} \sim +1.0 \text{ V}$) 进行电化学聚合吡咯。结果表明, 吡咯浓度及溶液 pH 值对聚合过程有影响, 吡咯浓度越高或 pH 值越低, 循环伏安聚合过程的电流增加越快, 聚合越容易。但由于聚合速度过快使聚合膜稳定性较差, pH 值太低对阴离子 NQS 的嵌入也极为不利, 因而选择 Py 聚合时 pH 值为 7.0、Py 浓度为 0.1 mol/L 。由金带电极上聚吡咯膜用循环伏安扫描至稳定后的循环伏安图 (图 1) 可见, 聚吡咯膜本身有一对氧化还原峰, 峰电位为 $+0.150$ 和 -0.380 V ($\text{pH}=7.0$)。恒电位法聚合也得到相同的结果, 由于此法更易通过控制电解过程所消耗的电量来控制吡咯膜的厚度, 因而实验过程采用恒电位法制备。

由于吡咯在聚合过程中有 H^+ 析出^[15], 电极表面附近的 pH 值会显著降低, 因而通常生物活性物质的固定宜在缓冲体系中进行。但对 NQS 的固定则要考虑带负电荷的 NQS 及通常缓冲溶液中的 PO_4^{3-} 等阴离子竞争掺入带正电荷的吡咯膜中的情况。图 2 是在磷酸盐缓冲溶液及仅含少量 NaCl 作支持电解质的体系中 NQS 在吡咯中的掺入情况。与图 1 相比, 在前一体系中, 并未出现 NQS 的峰; 而后一情况明显地有另一对峰出现, 峰电位为 -0.111 V 和 -0.180 V , $E^{0'} = -0.145 \text{ V}$ 。这正是聚吡咯中 NQS 在电极上发生氧化还原反应所致。由于在 PBS 体系中, 三价 PO_4^{3-} 与吡咯膜正离子的作用力比一价负离子的 NQS 更大, 使其更易

渗入吡咯膜中,因而 NQS 未渗入膜中. 而仅含少量 Cl^- 时,对 NQS 渗入吡咯膜的影响则较小. 不同的 Cl^- 浓度对 NQS/PPy 的生成也有影响, Cl^- 增加, 所得 NQS/PPy 电极的循环伏安峰形变差, 但 Cl^- 过低会因阻抗增加, 使吡咯聚合减少而不利于 NQS 在电极表面的固定, 因而实验中选择 NaCl 浓度为 0.1 mol/L.

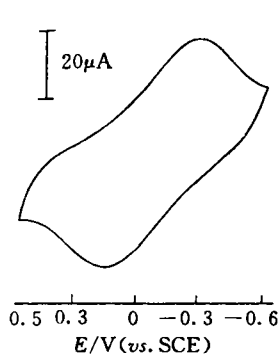


Fig. 1 CV curve of PPy/Au electrode
 $v=100 \text{ mV/s}$, $\text{pH}=7.0$.

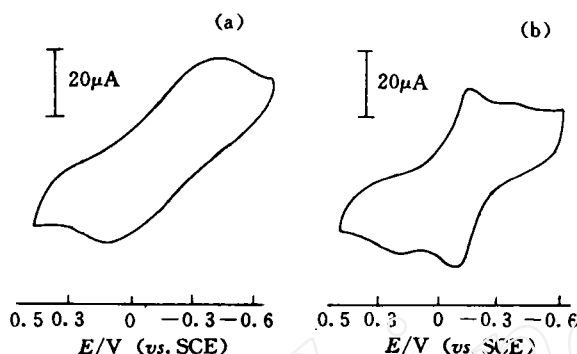


Fig. 2 CV curves of NQS/PPy/Au electrode obtained in pH 7.0 PBS (a) and in $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ NaCl solution at 100 mV/s and $\text{pH}=7.0$ (b)

图 3 是吡咯在含不同浓度 NQS 体系中恒电位 ($E=+0.85 \text{ V}$) 聚合的计时电流曲线. 从图中可以看出, 加上电位以后, 电流很快下降, 然后电流开始呈上升趋势, 这表明吡咯的聚合经历着“成核”和“膜生长”的动力学过程^[16]. 开始时 PPy 核及膜均未形成, 电极表面扩散层厚度随时间而增加, 电流下降; 随着电解继续进行, 在电极表面有 PPy 核形成, 电流与 $t^{3/2}$ 成正比; 而后, PPy 核不断增加并长大, 逐渐有 PPy 膜形成, 膜的生长使电流与 $t^{1/2}$ 成正比, 因而电流增长速率变慢. NQS 浓度增加, 有更多的 NQS 进入吡咯膜中和吡咯的正电荷, 使聚吡咯的“成核”和“膜生长”过程均变快, 因而电流增长速度增加. NQS 浓度太高时, 会因 NQS 的太多掺入使 NQS/PPy 稳定性降低, 实验表明 1.0 mmol/L NQS 较为合适. 聚合时间增加, 吡咯膜变厚, 聚合后在 PBS 中循环伏安图的峰电流也大些. 膜也较稳定; 但是时间太长, 会因吡咯的峰太高将 NQS 的氧化还原峰盖住, 使修饰电极的性能变差, 实验聚合时间为 1 min.

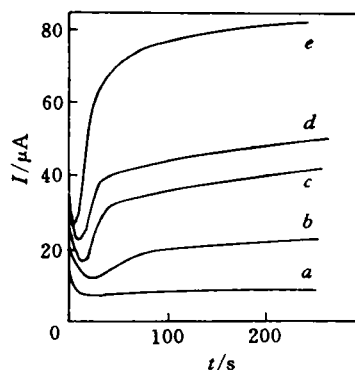


Fig. 3 Chronoamperometric curves for the electropolymerization of NQS/PPy
NQS (10^{-3} mol/L): a. 0; b. 0.2; c. 0.5; d. 1.0 and e. 2.0.

2.3 NQS/PPy/Au 电极的稳定性

NQS/PPy/Au 电极在 $\text{pH}=7.0$ 的缓冲溶液中连续循环伏安扫描, 当扫描区间为 $+0.9 \sim -0.9 \text{ V}$ 时, 峰电流持续下降[图 4(a)], 电极稳定性较差. 改变扫描区间为 $+0.9 \sim -0.6 \text{ V}$ 时, 电极仍然不稳定[图 4(b)]. 当扫描上限从 $+0.9 \text{ V}$ 改为 $+0.6 \text{ V}$ 时, 随着扫描次数的增加, 开始时峰电流有所下降, 但 NQS 本身的循环伏安峰形变好(这与 NQS 在 PPy 膜中的重新分配有关), 并且从第二圈起连续扫描 5 h, 峰电流基本不变[图 4(c)], 表明修饰电极具有很好的稳定性. 因此, 电极不稳定的原因是在校正时, 吡咯膜被氧化从电极表面脱落, 导致

NQS 也随之离开电极表面的缘故。

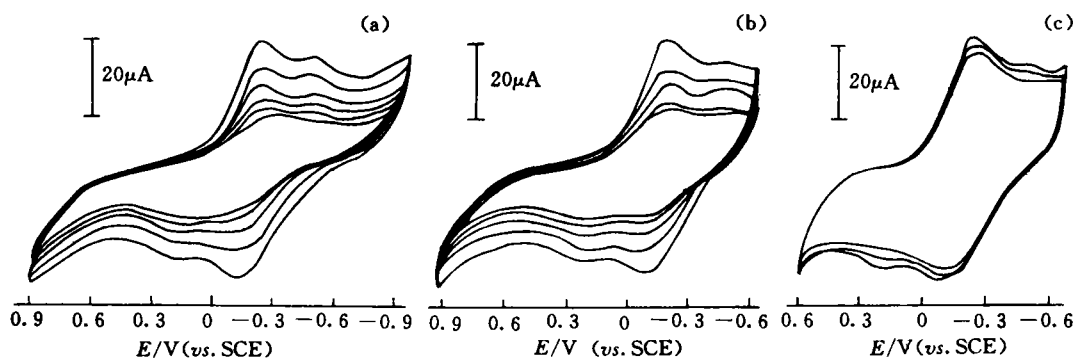


Fig. 4 The effect of sweep range on the stability of modified electrode

$v=100 \text{ mV/s}$, $\text{pH}=7.0$.

2.4 NQS/PPy/Au 电极对 NAD^+ 的电催化还原

NQS/PPy/Au 电极在 $\text{pH}=7.0$ 溶液中扫描后, 再放入同样 pH 值的含 1.0 mmol/L NAD^+ 的溶液中进行扫描. 发现 NAD^+ 的存在使 NQS 的还原峰电流增加, 氧化峰减小(图 5), 可见该电极对 NAD^+ 的还原有电催化作用. pH 值对电极的催化作用有明显的影响, pH 值较低时, NQS 的电极反应速率减慢, 电催化反应不明显; pH 值太高, 伴随 H^+ 参加的 NAD^+ 的还原速率也减小, 从而使催化电流减小(图 6). 实验结果表明, 当 $\text{pH}=6.8\sim 7.8$ 时, 催化效果最佳.

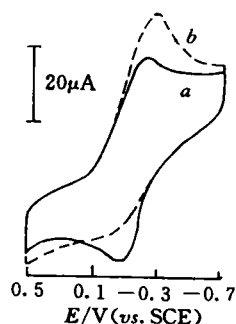


Fig. 5 CV curves of NQS/PPy/Au electrode in $\text{pH}=7.0$ PBS(a) and $a+1.0 \text{ mmol/L}$ NAD^+ (b) at 100 mV/s

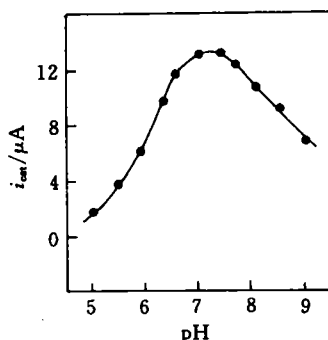


Fig. 6 The effect of pH on the catalytic peak current at 100 mV/s
[NAD^+]= 1.0 mmol/L .

在 $\text{pH}=7.0$ 的体系中, NAD^+ 的催化峰电流在浓度为 $4.0 \times 10^{-5} \sim 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围与浓度成正比, 检测下限为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 其灵敏度与文献^[5]测定 NADH 相当, 但比文献^[13]用阳离子染料催化 NADH 氧化的灵敏度($1.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)稍差. 因为 NQS 本身电极反应的可逆性不如文献^[13]中的甲苯胺蓝. 6 次测定 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ NAD^+ 时峰电流的变异系数为 3.0% . 将 NQS/PPy/Au 电极在 PBS 中浸泡两周, 由于 PO_4^{3-} 的作用使峰电流下降为 72% , 而它在蒸馏水中浸泡两周或在上述体系中连续使用 5 h , 其催化性能没有改变, 因而 NQS/PPy/Au 电极用于 NAD^+ 的测定具有较好的性能.

催化峰电流与 $\ln v$ 有线性关系, 在扫描速率低于 100 mV/s 时, 直线斜率为 1.04 , 而当

$v > 100$ mV/s 时, 其斜率为 0.56, 表明在低扫速下电极过程受表面控制; 而高扫速下, 单位时间生成的还原型 NQS 较多, 电极过程受 NAD^+ 还原过程及 NAD^+ 在溶液中的扩散控制^[17,18], 由于峰电位也随扫速增加负移, 因而相当于 NAD^+ 直接在电极上还原的准可逆过程。

参 考 文 献

- 1 Bartlett P. N., Cooper J. M., J. Electroanal. Chem., 1993, 362, 1
- 2 Panero S., Prospero P., Scrosati B., Electrochim. Acta, 1992, 37, 419
- 3 Pei Q., Qian R., J. Electroanal. Chem., 1992, 322, 153
- 4 Janda P., Weber J., J. Electroanal. Chem., 1991, 300, 119
- 5 Tse D., Kuwana T., Anal. Chem., 1978, 50, 1315
- 6 Buffle J., Martell A., Inorganic Chem., 1977, 16, 2221
- 7 Bailey S. I., Ritchie I. M., Electrochim. Acta, 1985, 30, 3
- 8 Zinger B., Synth. Met., 1989, 30, 209
- 9 Kajiya Y., Matsumoto H., Yoneyama H., J. Electroanal. Chem., 1991, 319, 185
- 10 Kajiya Y., Yoneyama H., J. Electroanal. Chem., 1992, 328, 259
- 11 Xu F., Li H., Cross S. J., Guarr T. F., J. Electroanal. Chem., 1994, 368, 221
- 12 Murthy A. S. N., Bioelectrochem. & Bioenerg., 1994, 33, 71
- 13 Person B., J. Electroanal. Chem., 1990, 257, 61
- 14 Clark W. M., Oxidation-Reduction Potential of Organic Systems, London: William & Wilkins, 1960, 375
- 15 Genies E. M., Bidan G., J. Electroanal. Chem., 1983, 149, 191
- 16 Miller L. L., Zinger B., Zhou Q. X., J. Am. Chem. Soc., 1987, 109, 2267
- 17 Aoki K., Tokuda K., Matsuda H., J. Electroanal. Chem., 1984, 199, 69
- 18 JU Huang-Xian(鞠焯先), XUN Yi-Gang(荀以刚), CHEN Hong-Yuan(陈洪渊), Chem. J. Chinese Univ. (高等学校化学学报), 1994, 15(6): 827

The Electrochemistry of Nicotinamide-adenine Dinucleotide at a β -Naphthochinonsulfonic Modified Gold Band Electrode

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

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210093)

Abstract The preparation of β -naphthochinonsulfonic(NQS) modified gold band electrode was studied. The electropolymerization process of NQS/PPy and the effects of experimental conditions on the behaviour of polymer membrane were discussed. The effect of anionic NQS on chronoamperometric curves in electropolymerization process was explained with the nucleation and growth theory. The modified electrode can catalyze the electrochemical reduction of NAD^+ at a gold electrode. At pH 7.0, the catalytic peak current is proportional to the concentration of NAD^+ in the range of 4.0×10^{-3} to 1.5×10^{-3} mol/L. The electrocatalytic mechanism was also discussed.

Keywords Modified electrode, Polypyrrole, Gold band electrode, β -naphthochinonsulfonic, Nicotinamide-adenine dinucleotide

(Ed.: Z, A)