

聚硫堇修饰微带金电极的性质及对 NADH 的催化氧化*

蔡称心 鞠焜先 陈洪渊

(南京大学化学系, 南京, 210093)

摘要 报道了硫堇在微带金电极上的电化学聚合过程, 用红外光谱对聚硫堇进行了表征; 研究了聚硫堇的电化学性质, 发现聚硫堇在 $+0.5 \sim -0.7$ V (vs. SCE) 电位范围内有两对氧化还原峰, 峰电位分别为: $E_{pa}^1 = -0.03$ V、 $E_{pc}^1 = 0.05$ V、 $E_{pa}^2 = -0.24$ V、 $E_{pc}^2 = -0.17$ V (vs. SCE). 它们的式量电位 E^0 随 pH 而变化, 在弱酸性溶液中, $\partial E^0 / \partial pH$ 为 -29 mV/pH (25°C); 而在弱碱性溶液中则为 -56 mV/pH. 聚硫堇修饰微带金电极对 NADH 的氧化具有催化作用, 文中对电催化过程进行了探讨.

关键词 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 硫堇, 化学修饰电极, 微带金电极, 电催化

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 是目前已知 300 多种脱氢酶的辅酶, 由于 $NAD^+ / NADH$ 氧化还原电对在生物氧化还原电子传递链中的重要性, 人们对其电化学性质进行了许多研究^[1, 2]. 但因 NADH 的氧化产物在电极表面易发生吸附而引起电极钝化^[3] 以及它在固体电极上的电子传递速率缓慢而表现出相当高的氧化过电位^[3b, 4], 使 NADH 的直接电化学测量十分困难. 为此, 近年来人们提出了以醌类^[5]、氧化还原染料^[6~8]、金属络合物^[9] 以及有机导体盐类^[10] 等化合物作为电子传递媒体的修饰电极或将电子传递媒体以聚合物^[11~13] 的方式固定在电极表面来加速 NADH 在电极上的电化学氧化, 但这些研究都是在常规电极上进行的. 硫堇修饰常规电极用于 NADH 的测定已见报道, 但文献中是用交联剂的方式. 本文用电化学的方法直接将硫堇聚合在纳米级的微带金电极上, 对聚硫堇的电化学性质和它对 NADH 氧化的催化作用进行了研究, 这对发展微型的生物电化学传感器具有重要意义.

1 实验部分

1.1 仪器、材料和试剂

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); 170SX-FTIR 光谱仪 (Nicolet 公司, 美国), 501 型超级恒温槽 (上海实验仪器厂). EPON 812 型环氧树脂 (New York, 美国), NADH (>90%, 上海生物化学研究所) 及硫堇 (B. D. H. 进口分装) 使用前未经进一步提纯. 其它试剂均为 A. R. 级, 实验用水为二次亚沸蒸馏水.

1.2 实验方法

电化学实验均采用三电极体系在自制的电解槽中进行. 自制微带金电极 (宽度为 88 nm) 为工作电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极, 铂丝电极为对电极. 实验时将电解槽置于法

收稿日期: 1994-04-07. 修改稿收到日期: 1994-07-15. 联系人: 陈洪渊. 第一作者: 蔡称心, 男, 28 岁, 博士研究生.

* 国家自然科学基金资助课题.

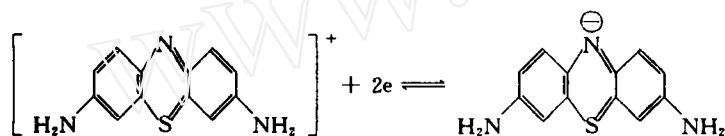
拉第屏蔽箱中以消除外界的干扰。底液为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0), 硫堇的 electrochemical 聚合在乙腈溶液中进行。将测试液通 N₂ 除氧 20 min 后, 在 N₂ 气氛下进行实验(温度控制在 25±0.1℃)。实验前将微带金电极抛光清洗后, 再经电化学方法清洗(即在 pH 7.0 的缓冲溶液中于 -0.3~+1.5 V(vs. SCE)之间以 20 mV/s 的扫速循环扫描直到其循环伏安图稳定为止)。硫堇的 electrochemical 聚合采用电位扫描的方法, 在含 0.1 mol/L 高氯酸四丁基铵和 5×10⁻³ mol/L 硫堇的乙腈溶液中, 以 50 mV/s 的扫描速度在 0~+1.40 V(vs. SCE)的电位范围内循环扫描一段时间, 取出, 先用乙腈冲洗, 再用乙腈和水的混合溶液冲洗, 接着用 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液冲洗, 并在此溶液中进行电化学实验。用一块金片(约 1.0 cm×1.5 cm)电极代替微带电极进行红外光谱实验。

2 结果与讨论

2.1 硫堇在微带金电极上的 electrochemical 聚合

硫堇在 0.05 mol/L H₂SO₄ 酸性溶液及有机溶液中均能发生 electrochemical 聚合形成聚硫堇。Gorton^[7] 等的实验结果表明, 当溶液的 pH>4.0 时, 在水溶液中形成的聚硫堇很容易从电极表面脱落, 而在有机溶剂中形成的聚硫堇则较稳定。我们的实验结果也证明了这一点。为了能将制备的修饰电极应用于 pH>4.0 的溶液, 在下面的研究中, 聚硫堇均是在乙腈溶液中制备的。

乙腈溶液中硫堇在微带金电极上的循环伏安曲线如图 1(a) 所示。在 0.0~+0.6 V(vs. SCE) 的电位范围内出现阶梯形的循环伏安图, 它的形状不随扫描时间的改变而变化, 对应的电极反应为:



当扫描电位的上限达到 1.40 V 且进行多次循环扫描时, 其循环伏安图在 0.0~+0.6 V 电位之间出现一对氧化还原峰, 其峰电流随着扫描次数的增加而变大, 这表明硫堇在金电极上发

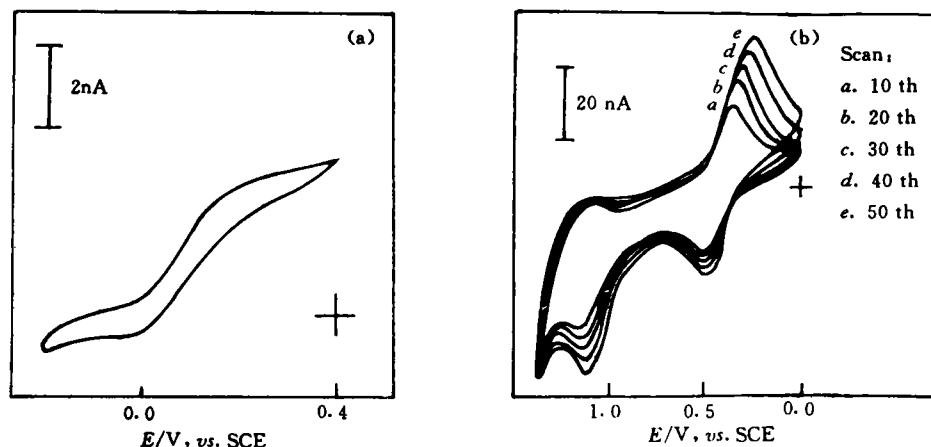


Fig. 1 The cyclic voltammogram of 5×10⁻³ mol/L thionine in acetonitrile solution containing 0.1 mol/L NBu₄ClO₄ as supported electrolyte at microband gold electrode
Scan rate: (a) 20 mV/s; (b) 50 mV/s.

生了电化学聚合而形成聚硫堇, 随着聚合时间的增加, 还原过程峰电位慢慢负移(图 1(b)). 实验中发现, 扫描电位的上限对形成聚硫堇的影响很大, 当扫描电位上限低于 +1.40 V 时, 硫堇不能发生电化学聚合, 这可能由于硫堇的聚合是通过其分子中的一NH₂ 阳离子自由基而进行的^[14], -NH₂ 的氧化峰在 +1.1 V 处, 与图 1(b)一致. 另外, 向乙腈溶液中加入少量酸如 CF₃COOH 能加快硫堇的聚合速率, 表明聚合过程有 H⁺ 参加.

2.2 聚硫堇的红外光谱表征

图 2 是聚硫堇的红外光谱图. 其中 3298 和 3126 cm⁻¹ 对应于 N—H 的伸缩振动, 1419 cm⁻¹ 对应于 N—H 的弯曲振动, 1601 cm⁻¹ 对应于 C=C 的伸缩振动, 1396 cm⁻¹ 对应于硫堇结构单元的环振动, 1314 和 1229 cm⁻¹ 对应于 Ar—H 的伸缩振动, 903 和 840 cm⁻¹ 对应于 C—S 的弯曲振动.

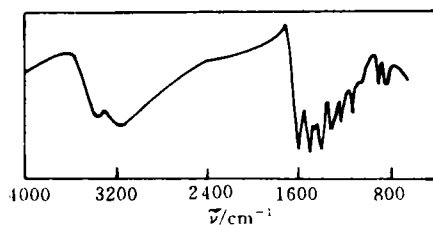


Fig. 2 IR spectrum of poly-thionine film prepared by electrochemical polymerization at gold electrode in acetonitrile solution

2.3 硫堇的电化学性质

图 3 是聚硫堇修饰微带金电极在 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液中于不同扫描速率时的循环伏安图. 在 -0.7 ~ +0.5 V 电位区有两对氧化还原峰, 扫描速率增加, 它们的峰电位几乎不发生移动, 其氧化还原峰电位分别为: 峰 I $E_{pc} = -0.03$ V, $E_{pa} = 0.05$ V; 峰 II $E_{pc} = -0.24$ V, $E_{pa} = -0.17$ V. 且它们的峰电流与扫描速率 V 之间有线形关系. Ohsaka^[15] 等研究硫堇在热解石墨电极上的聚合时, 发现聚硫堇只有一对氧化还原峰, 其峰电位在 0 V 附近, 相当于图 4 中的峰 I. Kayakin^[16] 等在研究亚甲蓝在玻碳电极上的聚合时, 发现亚甲蓝聚合物也有两对氧化还原峰. 认为其中电位较正的一对是亚甲蓝聚合物发生电化学反应表现出的氧化还原峰; 另一对则是由聚合物链中亚甲蓝单体共轭结构的氧化还原峰. 我们的实验结果表明, 聚硫堇具有和亚甲蓝聚合物相似的分子结构和电化学性质, 因而峰 I 是由聚硫堇发生电化学反应所引起的氧化还原峰, 峰 II 则是聚硫堇链中存在的硫堇单体共轭结构产生的氧化还原峰. 实验中过分的超声清洗会导致整个聚合物从电极表面脱落.

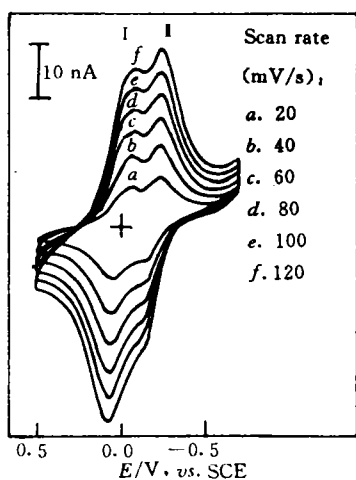


Fig. 3 Cyclic voltammograms of micro-band gold electrode modified with poly-thionine films in 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH 7.0)

有机化合物的电极反应通常伴随着质子的得失, 因此溶液的 pH 值对其氧化还原反应有很大的影响. 随着缓冲介质 pH 值的增大, 所得聚硫堇修饰金电极的循环伏安图上的氧化还原峰电位均向负方向移动, 表明其氧化过程伴随着质子的失去, 而其还原过程则结合质子, 并且底液的 pH 值低于 5 和高于 9 时, 均不能得到聚硫堇完整的循环伏安图. 若将低扫描速率 (20 mV/s) 下测得的氧化和还原峰电位的平均值作为式量电位 E^0 , 并将求得的 E^0 对底液的 pH 作图, 发现聚硫堇的 E^0 (以峰 II 为例) 在弱酸性和弱碱性溶液中随 pH 值的变化有不同的变化规律 (如图 4). $\partial E^0 / \partial \text{pH}$ 在弱酸性介质中为 -29 mV/pH (25 °C), 而在弱碱性溶液中则为 -56 mV/pH (25 °C), 因而聚硫堇在

酸性和碱性溶液中参与电化学反应的质子数分别是 1 和 2.

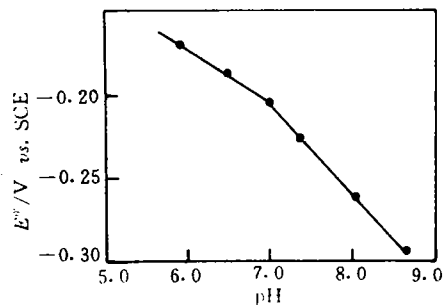


Fig. 4 Dependence of E° of poly-thionine (peak I) on pH

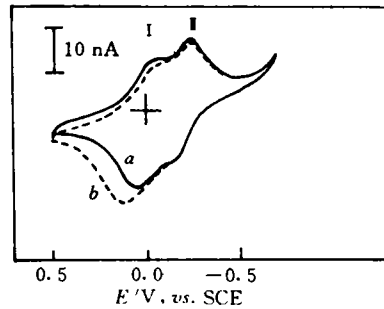


Fig. 5 Cyclic voltammograms of poly-thionine modified electrode in the absence (a) and in the presence (b) of 1×10^{-3} mol/L NADH ($v = 50$ mV/s)

2.4 聚硫堇对 NADH 的催化氧化

聚硫堇修饰微电极在 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 中的循环伏安如图 5 曲线 a 所示. 当该溶液中含有 1×10^{-3} mol/L 的 NADH 时, 聚硫堇峰 I 的氧化峰电流增大, 并且氧化峰电流随 NADH 浓度的增加而变大, 而峰 I 的还原电流则变小 (图 5 曲线 b), 表明修饰电极对 NADH 的氧化有明显的电催化效应. 在 NADH 加入后, 峰 I 的氧化还原峰电流都没有变化 (曲线 b), 这说明只有峰 I 对 NADH 的氧化具有催化作用. 图 5 还表明, 聚硫堇催化 NADH 氧化时, 氧化峰电流 (峰 I) 增大的同时, 其氧化峰电位向正方向移动了近 80 mV. 这说明聚硫堇催化 NADH 氧化的电极过程中包含聚硫堇膜内的电子自交换过程^[7]. 峰电位的移动正是由于膜内氧化态与还原态聚硫堇之间电子自交换的速率发生变化而引起的. 因此, 整个电极反应过程可描述为: 还原态的 NADH 从溶液本体扩散达到聚硫堇/溶液界面, 并被氧化态的聚硫堇氧化生成 NAD^+ , 而聚硫堇则由氧化态变成还原态; 还原态的聚硫堇则通过聚合物膜内的电子传递而在电极上氧化. 因此, 聚硫堇的氧化电流变大, 而还原电流变小. 聚硫堇修饰电极和 NADH 之间的电子转移过程可通过图 6 来描述. 进一步实验表明,

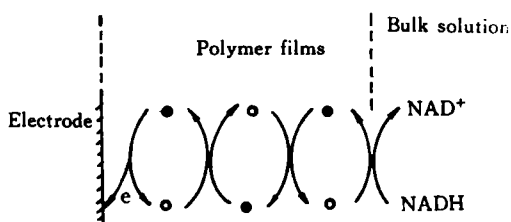


Fig. 6 Schematic illustration of the electron transfer between the electroactive site inside of poly-thionine films and NADH

●: Reduced form; ○: Oxidized form.

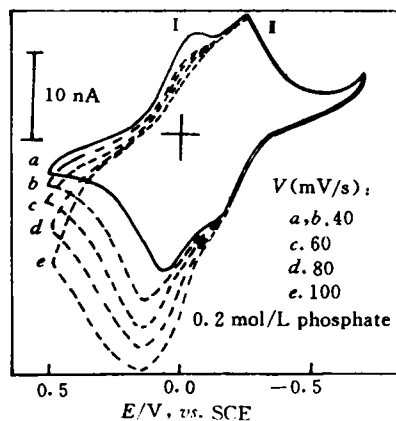


Fig. 7 Cyclic voltammograms poly-thionine modified gold electrode in the absence (solid line) and in the presence (dashed line) of 1×10^{-3} mol/L NADH (pH=7.0)

氧化峰电流 i_p 与扫描速率的平方根之间有线性关系, 而峰电位与扫描速度无关(图 7), 因而聚硫堇膜内的电子自交换过程及聚硫堇与电极的电子交换过程的速度较快, 电极过程受溶液中 NADH 的扩散所控制.

参 考 文 献

- 1 Tang H. T., Hajizadeh K., Halsall H. B., Heineman W. R.; *Anal. Biochem.*, 1991, **192**: 243
- 2 Hitani A., So Y. H., Miller L. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**: 7636
- 3 Moiroux J., Elving P. J.; *Anal. Chem.*, a. 1979, **51**: 346; b. 1978, **50**: 1056
- 4 Jaegfeldt H.; *J. Electroanal. Chem.*, 1980, **110**: 295
- 5 Fukui M., Kitani A., Degrand C., Miller L. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**: 28
- 6 Ravichandran K., Baldwin R. P.; *Anal. Chem.*, 1983, **55**: 1586
- 7 Torstensson A., Gorton L.; *J. Electroanal. Chem.*, 1981, **130**: 199
- 8* Persson B., Gorton L.; *J. Electroanal. Chem.*, a. 1990, **292**: 115; b. 1990, **287**: 61
- 9 Yon H. B. F., Lowe C. R.; *Anal. Chem.*, 1987, **59**: 2111
- 10 Albery W. J., Bartlett P. N.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984: 234
- 11 Atta N. F., Galal A., Karagozler A. E., Zimmer H. *et al.*; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990: 1347
- 12 Arai G., Matsushita M., Yasumori I.; *Nippon Kagaku Kaishi*, 1985, **5**: 894
- 13 Hajizadeh K., Tang H. T., Halsall B., Heineman E. R.; *Anal. Lett.*, 1991, **24**: 1453
- 14 Bauldreay J. M., Archer M. D.; *Electrochim. Acta*, 1983, **28**: 1515
- 15 Ohsaka T., Tanaka K., Tokuda K.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993: 222
- 16 Karyakin A. A., Strakhova A. K., Karyakina E. E. *et al.*; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1993, **32**: 350
- 17 JIN Li-Tong(金利通) *et al.*; *Chemically Modified Electrode(化学修饰电极)*, Shanghai: East China Normal University Publishing House, 1992, Chap. 4: 177

Electrocatalysis of Poly-thionine Modified Microband Gold Electrode for Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide

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

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

Abstract The electrocatalytic oxidation of NADH in phosphate buffer solution (pH=7.0) by poly-thionine modified microband gold electrode was investigated. The electrochemical polymerization of thionine in acetonitrile solution and the properties of the resulting films were studied. It was found that the addition of acids such as CF_3COOH to the medium markedly facilitates the film formation. The poly-thionine film was characterized by IR spectra. Two redox couple of poly-thionine in the potential range of -0.7 — $+0.5$ V(*vs.* SCE) were observed, one of them possesses the monomer-type activity. The peak potentials are $E_{pc}^1 = -0.03$ V, $E_{pa}^1 = 0.05$ V; $E_{pc}^2 = -0.24$ V and $E_{pa}^2 = -0.17$ V(*vs.* SCE, 25°C). A slope of -29 mV/pH for the plot of E^0 *vs.* pH was observed in acidic solution, whereas in alkaline solution the slope was -56 mV/pH.

Keywords Nicotinamide adenine dinucleotide, Thionine, Chemically modified electrode, Microband gold electrode, Electrocatalysis (Ed.; Z, A)