

2000-11-28

A study of the Adsorption Behaviors on the Surface of Gold electrode by In-situ Electrochemical Raman Spectroscopy

Xia qin WU

Xiao wei CAO

Zhe su WANG

Xiao-yun MENG

Zong-rang ZHANG

Recommended Citation

Xia qin WU, Xiao wei CAO, Zhe su WANG, Xiao-yun MENG, Zong-rang ZHANG. A study of the Adsorption Behaviors on the Surface of Gold electrode by In-situ Electrochemical Raman Spectroscopy[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2000 , 6(4): 421-427.

DOI: 10.61558/2993-074X.1403

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol6/iss4/5>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号: 1006-3471(2000)04-0421-07

电化学原位拉曼光谱技术对金电极 表面生物分子吸附行为研究

吴霞琴*, 曹晓卫, 王浙苏, 孟晓云, 章宗穰

(上海师范大学化学系, 上海 200234)

摘要: 报道腺嘌呤在裸金电极及其修饰的金电极上的电化学原位拉曼光谱图,着重分析了不同电位下腺嘌呤和超氧化物歧化酶在金电极上的吸附及其相互作用,初步讨论了腺嘌呤对促进超氧化物歧化酶电子传递过程的作用机制.

关键词: 电化学原位拉曼光谱技术;超氧化物歧化酶;腺嘌呤

中图分类号: O 646;O 647.3

文献标识码: A

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是生物体内最重要的抗氧化酶之一,它通过清除体内的超氧阴离子自由基 O_2^- 使机体免受损伤,因而在抵御疾病,抗衰老等方面起到了很重要的作用^[1]. 医学研究表明, SOD 在人体内的水平与肿瘤也有一定的关系^[2]. 自 1969 年它被首次从牛红细胞中分离出来,人们对其结构、生物活性和生理功能、药物的开发和临床应用等方面的研究给予了广泛关注,并取得很大的成绩^[3]. 为了进一步拓展其应用领域,近年来关于 SOD 与其它生物分子和稀土离子、金属离子的相互作用等基础研究也引起了广泛兴趣^[4~10]. 但由于 SOD 在金属电极上的电子传递速度缓慢,很难开展较为深入的电化学行为方面研究. 笔者应用循环伏安法探索到了 L-半胱氨酸、组氨酸和腺嘌呤等生物分子能促进 SOD 在金电极上的电子传递^[11~13],并结合原位电化学石英晶体微天平的测量结果,初步讨论了其作用机制^[14]. EQCM 实验中观察到, L-半胱氨酸和腺嘌呤存在下 SOD 能在金晶振电极上 (Au-QCM) 发生可逆的电化学反应,同时,还伴随有明显的质量的吸脱附变化. 然而,单凭 EQCM 的测量很难确定究竟是何种物质、以何种方吸附在电极上. Raman 谱图上每个信号峰都反映了分子中某一基团的特征光谱信息,这有助于探明生物分子之间,以及生物分子与金电极之间的相互作用. 本文主要应用电化学原位拉曼光谱技术对腺嘌呤在金电极上、以及腺嘌呤修饰后的金电极上的吸附行为进行研究,获得了丰富的信息,为进一步探讨生物小分子作 SOD 电子传递促进剂的作用机制积累了实验依据.

收稿日期:1999-06-26;修订日期:1999-07-28

* 通讯联系人

基金项目:上海市科委自然科学基金(97ZA14004)资助项目

1 实验部分

1.1 试剂

实验用的腺嘌呤为上海丽珠东风生物技术有限公司产品. 牛红细胞超氧化物歧化酶为上海华东理工大学生产的精制品 (8 000 U/mg). 其他均为分析纯, 研究溶液均用二次蒸馏水配制. 其中, 生物样品以含 0.1 mol/L 高氯酸钠的磷酸盐 (0.05 mol/L) 缓冲溶液 (PH = 7) 配制而成.

1.2 实验仪器及实验方法

电化学原位 Raman 光谱实验装置由共焦显微激光拉曼光谱仪 (法国 Dilor 公司) 和 M604 电化学测量系统 (美国 CHI 公司) 组成. 其中, 电化学测量池为三电极系统. 金盘电极 (\varnothing 2 mm) 为研究电极, 其清洗步骤见文献 [13]. 为了得到表面增强拉曼散射 (SERS) 效应, 金电极需先进行粗糙化处理. 即将预处理好的金电极置于 0.1 mol/L KCl 溶液中, 在 -0.3 ~ 1.2 V 的电位范围内进行连续的循环伏安扫描, 一般以 25 圈左右效果较佳. 粗糙化处理时还根据需要设置不同的正反扫描速度以及上下限电位处的停留时间.

激光拉曼光谱仪的激发光波长为 632.8 nm, 测试时采用 50 倍长工作距离物镜. 激光功率控制在 3 mW 左右, 以避免生物活性样品的分解或变性. 电化学原位拉曼光谱的测试方法是在进行恒电位极化或循环伏安扫描的同时记录拉曼光谱的测试方法是在进行恒电位极化或循环伏安扫描的同时记录拉曼光谱图. 循环伏安扫描速率为 50 mV/min, 拉曼光谱也以时间扫描的方式采集信号, 其扫描时间参数为 $60 \times t$ ($t = 0, 1, 2, 3, \dots, 24$), 即每 60 s 的时间单元有 55 s 用于光谱信号的采集, 因而文中所示的原位测量拉曼光谱图为对应于这一时间段内 (相当于扫描了约 50 mV 的电位范围) 的平均拉曼谱图.

实验在经纯化过的饱和氮气氛中进行.

2 结果和讨论

2.1 腺嘌呤固体的 Raman 光谱测试

图 1 为腺嘌呤固体样品的 Raman 光谱图. 据文献报道, 腺嘌呤在固体和中性溶液中可在 $714 \pm 11 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 313 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 338 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 456 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ 处观察到 Raman 振动峰 [15]. 据此可从图 1 中确定 719 cm^{-1} 、 $1\ 303 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 329 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 458 \text{ cm}^{-1}$ 等处的强峰是表征腺嘌呤分子中嘌呤环呼吸振动的特征谱峰.

2.2 腺嘌呤溶液中电化学原位拉曼光谱测试

图 2 是经过粗糙化处理的金电极在腺嘌呤溶液中测得的拉曼光谱图. 图 2a、b 分别是低频区域和相应的中频范围内的拉曼光谱. 对

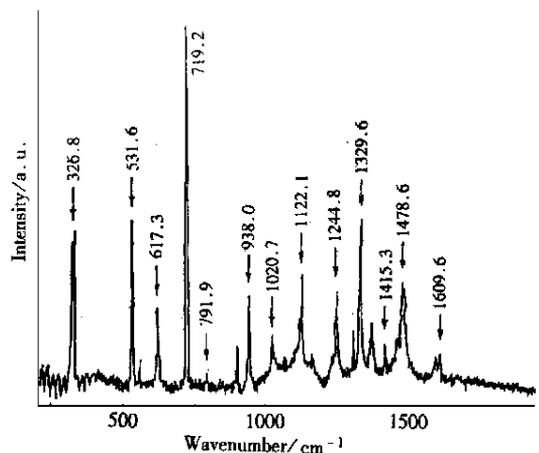


图 1 固体腺嘌呤的拉曼光谱图

Fig. 1 The Raman Spectrum of solid adenine

照图1可以看出,表征嘌呤环呼吸振动的特征谱峰已从 719 cm^{-1} 处移至 732 cm^{-1} 左右,且固体拉曼光谱中相当清晰的 327 cm^{-1} 强峰也依然存在,但却偏移至 322 cm^{-1} . 此外,发现在 355 cm^{-1} 出现了一个强度比 735 cm^{-1} 处还大的新峰,此峰在腺嘌呤固体样品和溶液的拉曼光谱测试初期都未曾观察到.

另一现象是,如将该金电极从腺嘌呤溶液中取出,进行彻底的清洗后再进行测试,发现此峰依然存在. 这一实验结果表明, 355 cm^{-1} 处新峰的出现当与腺嘌呤与金电极间较强的相互作用有关.

另者,图2a 563 cm^{-1} 处的谱峰当对应于图1 556 cm^{-1} 处表征嘌呤环扭曲振动的谱峰. 图2b 明显地示出:文献上所报道的表征中性溶液腺嘌呤环的特征振动,即 1391 cm^{-1} 处的峰乃出现在一不对称的宽峰之中,同时,而从固体腺嘌呤测得的 1593 cm^{-1} 处表征嘌呤环伸缩振动的特征谱峰也依然存在. 但表征 $-\text{NH}_2$ 剪式振动的谱峰则从 1690 cm^{-1} 移至 1623 cm^{-1} . 以上证明,腺嘌呤分子在金电极表面发生了较强的吸附. 由于此实验过程还对应包括了电化学方法对腺嘌呤在金电极上的修饰,所以也进一步证实了 EQCM 测量得出的结论,即腺嘌呤分子是通过在电极上的吸附对 SOD 的电子传递过程起促进作用的^[14].

图3是在进行循环伏安扫描的同时测得的拉曼光谱图. 从图中可以看到,在 735 cm^{-1} 处有一明显的表征嘌呤环的谱峰. 当从 -0.2 V 向 0.4 V 作正向扫描时, 735 cm^{-1} 处的峰强度随电位的正移而逐渐减弱,至 0.4 V (氧化电位) 处已几乎看不到该峰的存在;反向扫描过程中则出现了与正扫过程相反的渐增强的趋势,回扫至 -0.2 , 即伏安扫描一圈结束时, 735 cm^{-1} 处的峰强度又恢复到扫描初始时的强度. 这一实验现象与 EQCM 的测量结果(即一圈扫描后频率值回到起始值)相吻合. 表明腺嘌呤在金电极表面存在吸附,且随着循环伏安扫描的进行出现可逆的脱附.

图4是金电极在腺嘌呤溶液中多次循环伏安扫描后测得的拉曼光谱图. 对照图2a, 其与表征腺嘌呤在金电极上吸附的拉曼光谱没有明显差别. 这一实验现象也表明,腺嘌呤在金电极

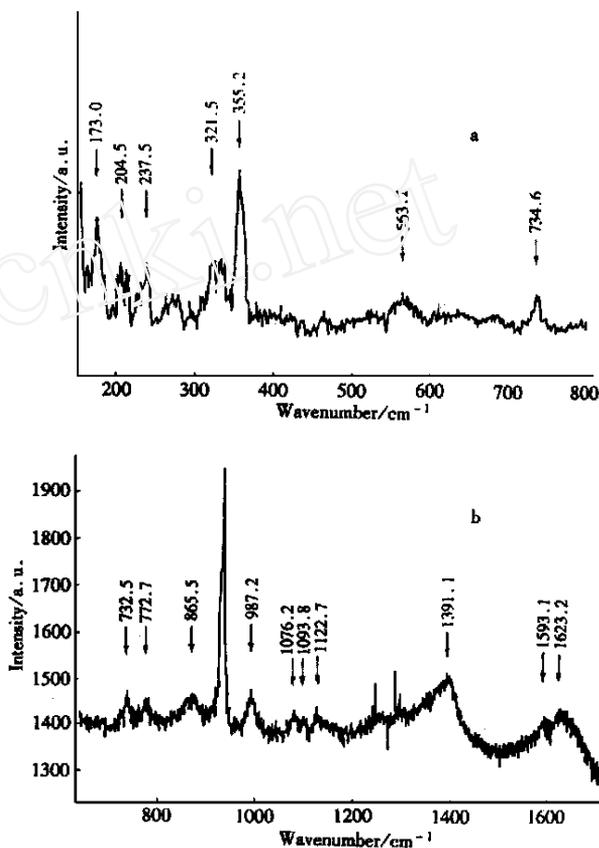


图2 腺嘌呤溶液在金电极上低频(a)和中频范围(b)的拉曼光谱

Fig. 2 The SERS spectra of adenine solution on the surface gold electrode at low frequency (a) and medium frequency (b), respectively

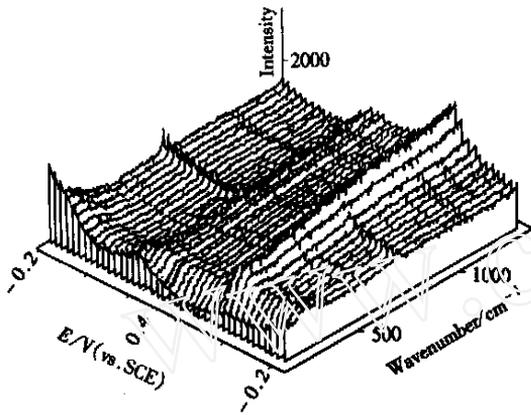


图 3 腺嘌呤在金电极上循环伏安电化学扫描过程中的原位拉曼光谱图

Fig. 3 The in-situ raman spectra of gold electrode cyclic voltammetry scan in adenine solution
Scan range: - 0.2 V ~ 0.4 V

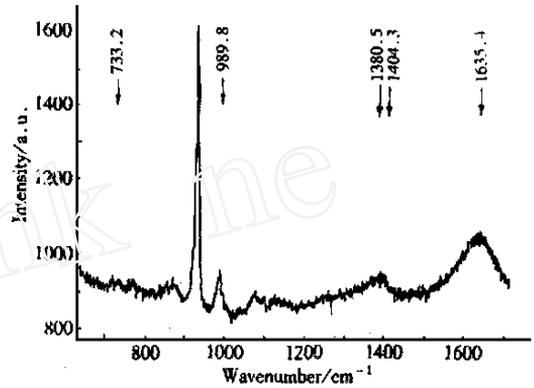


图 4 金电极在腺嘌呤溶液中循环伏安扫描多次后测得的拉曼光谱图

Fig. 4 The Raman spectrum of gold electrode surface after many scan cycles on adenine solution

上的吸附应是比较强的. 无论采用浸泡电极或者通过多次循环伏安扫描都可以很容易地将腺嘌呤修饰到电极上.

2.3 金电极在腺嘌呤和 SOD 混合溶液中的电化学原位拉曼光谱

金电极在 SOD 溶液中原位测得的拉曼光谱图出现了 247 cm^{-1} 、 387 cm^{-1} 、 875 cm^{-1} 及 980 cm^{-1} 等谱峰, 可指认为 SOD 的特征峰.

图 5 是开路电位下 SOD 与腺嘌呤混合溶液中测得的金电极表面的拉曼光谱图. 图中既显示表征腺嘌呤谱的特征峰 (735 cm^{-1} 、 931 cm^{-1} 、 1111 cm^{-1}), 也出现表征 SOD 的特征谱峰 (873 cm^{-1} 、 989 cm^{-1}), 表明金电极表面存在 SOD 与腺嘌呤的共吸附. 同时, 在 679 cm^{-1} 、 957 cm^{-1} 处出了两个新谱峰, 可认为这是与 SOD 以及腺嘌呤和金电极之间的相互作用有关.

另于恒电位下测量了金电极在混合溶液中的原位拉曼光谱图. 实验中将电位恒定于 55 mV (接近于 SOD 在金电极上的还原峰电位), 观察拉曼谱随着极化时间的延长而出现的变化.

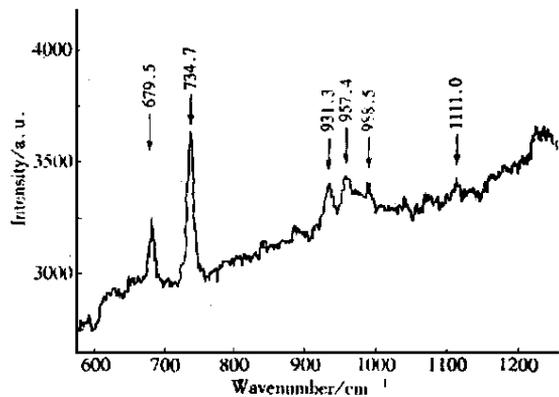


图 5 金电极在 SOD 和腺嘌呤混合溶液中的电化学原位拉曼光谱图

Fig. 5 The in situ electrochemical Raman spectrum on the gold electrode surface in Adenine and SOD mixture solution

此际,拉曼光谱仪同样以时间扫描的方式采集信号,仍按每 60 s 为一时间单元,其中 55 s 用于采集信号.图 6a 是电位恒定于 55 mV 下开始第一时间段内(0~50 秒)采得的拉曼光谱.如图所见,此时表征腺嘌呤的特征振动峰(732 cm^{-1} 和 $1\ 073\text{ cm}^{-1}$)和表征 SOD 的特征峰(873 cm^{-1} 和 989 cm^{-1})两者都存在,证明实验伊始电极表面就存在两种物质的共吸附.随后的在约 250 s 时间段内,所记录的拉曼光谱则没有显著的变化,表明电极表面的结构也与起始状态相差不大.但当时间推移到 300~355 s 段内,测得的拉曼光谱则发生了显著的变化(见图 6b),也就是在 447 cm^{-1} 和 612 cm^{-1} 处同时出现两个新强峰.据文献报道,金属蛋白质中 Cu-N 键的拉曼伸缩振动特征频率的大致范围为 $350\sim 470\text{ cm}^{-1}$,而 610 cm^{-1} 附近的则是蛋白质中组氨酸的特征振动频率范围^[16~17].从 SOD 的

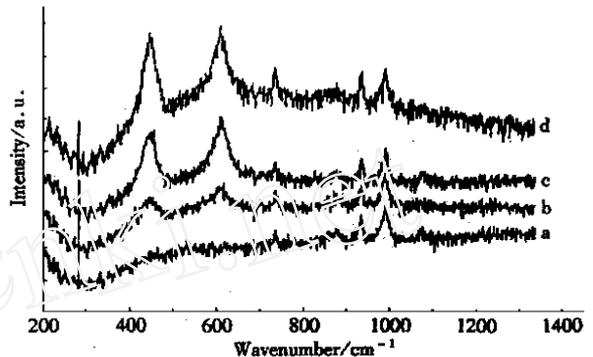


图 6 恒电位(0.055V)下 SOD 与腺嘌呤混合溶液中的拉曼光谱图

Fig. 6 The Raman spectra on gold electrode surface in Adenine and SOD mixture solution at 0.055V Potential (vs. SEC) lution
Sampling time/s: a) 0~55, b) 300~355, c) 360~415, d) 1040~1095

结构来看,其活性中心的 Cu 是与来自四个组氨酸残基的咪唑氮原子相配位的.循环伏安和 E-QCM 的研究结果已经证明,SOD 电子传递反应的可逆性因腺嘌呤存在而得以改善.由此可以推测 447 cm^{-1} 和 612 cm^{-1} 处两个新峰是 SOD 活性中心的 Cu-N 键和组氨酸残基表现出来的特征谱峰.根据这两处峰的从无到有可进一步说明,在腺嘌呤和电场的作用下,SOD 的活性中心能更有效地接近电极表面进行快速的电子传递反应.

又从 360~415 s 的时间段内采集的图谱表明,上述两个谱峰的强度又有明显的增强(见图 6c).然而,后测的谱图即使时间延长至近 20 min,其强度也不再变化(见图 6c).通过对恒电位下测得的一系列时间段内拉曼光谱图进行比较后可知,除了上述特征谱峰的经时变化之外,表征腺嘌呤和 SOD 共吸附的其它谱峰无明显变化.

综上所述,电极表面发生腺嘌呤和 SOD 共吸附的同时,随着极化时间的延长在腺嘌呤的作用下会使 SOD 中的 Cu 活性中心更接近金电极表面,从而更有利于其在电极表面的电子传递.

3 结 论

从电化学原位拉曼光谱测试结果的分析可知,在一定条件下会发生 SOD 与腺嘌呤在金电极上的共吸附,在腺嘌呤和电场的作用下能使 SOD 的活性中心更有效地接近金电极表面并进行电子传递,这就是目前关于 SOD 在腺嘌呤修饰的金电极上电子传递速度加快的最可靠的实验依据.

A study of the Adsorption Behaviors on the Surface of Gold electrode by In-situ Electrochemical Raman Spectroscopy

WU Xia-qin , CAO Xiao-wei , WANG Zhe-su , MENG Xiao-yun , ZHANG Zong-rang^{*}
(Dept. of Chem. , Shanghai Teachers Univ. , Shanghai 200234 China)

Abstract : The results of in-situ measurements with Raman spectroelectrochemical technique on bare gold electrode and adenine modified gold electrode were reported. The adsorption behaviors of adenine and superoxide dismutase (SOD) and their interactions with gold electrode were analysed. The mechanism of promoted electron transfer process of SOD in the presence of adenine at gold electrode surface is discussed.

Key words : In-situ Raman spectroelectrochemistry , Superoxide dismutase , Adenine

References

- [1] Li Wen-jie. The application of superoxide dismutase in the aging-resistance and the remedy of disease induced by superoxide radical[J]. J. Chinese Pharmaceutic(Chinese). 1989, 24(7):397. (李文杰. 超氧化物歧化酶在治疗超氧阴离子自由基所引起的疾病及抗衰老上的应用[J]. 中国药理学杂志, 1989, 24(7):397-401)
- [2] Ni Xing-Zhong. Clinical biochemical enzyme reagent method[M]. East of China Normal University (Chinese), 1993. (倪星忠, 临床生化酶试剂方法[M]. 华东师范大学出版社, 1993:113)
- [3] Yuan Qin-Sheng. The aspects and prospective of superoxide dismutase[J]. J. Chinese Pharmaceutic(Chinese). 1991, 26(8)456-459(袁勤生. 超氧化物歧化酶的研究现状及应用前景[J]. 中国药理学杂志, 1991, 26(8)456-459)
- [4] Han Ji-Lin, Chen Hiong Yuan, Qian Wen, et al. Investigation on electrochemical behavior of Cu-Zn superoxide Dismutase[J]. Chemical J. Chinese Univ., (Chinese). (朝吉林, 陈洪渊, 钱雯等, 天然铜-锌超氧化物歧化酶的电化学行为研究[J]. 高等学校化学学报, 1994, 15(12):1778)
- [5] Rai N. Iyer, William E. Schmidt. Observation on the direct electrochemistry of bovine copper-zinc superoxide dismutase[J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1992, 27:393-404
- [6] Wu Xiaqin, Liu Qian, Zhang Zong-rang, et al. Electrochemical behavior of superoxide dismutase on gold minigrid with thin-layer cell[J]. Electrochemistry (chinese), 1997, 3(2):136(吴霞琴, 刘倩, 许兵, 章宗穰[J]. SOD在金微网栅电极上的电化学行为[J]. 电化学, 1997, 3(2):136-138)
- [7] Hu Jie-Han, Shu Zhan Yong. The intrations of Cu-Zn superoxide dismutase and histidine[J]. Science in China(Seris B) (Chinese), 1993, 23(8):793-797. (胡皆汉, 舒占永. 铜锌超氧化物歧化酶活性中心铜与组氨酸的相互作用[J]. 中国科学(B辑), 1993, 23(8):793-797).
- [8] Wang Jin-Dui, Zhao Ying, Shu Xin. Correlation of SOD with LDH in gastric juice and their relationship with membrane system[J]. 1992, (3):95-98(Chinese). (王今堆, 赵荧, 苏昕等. 胃液中超氧化物歧化酶与乳酸脱氢酶的相关性及其与膜系的关系[J]. 吉林大学自然科学学报, 1992, (3):95)

- [9] Borsari. M. , Azab. H. A. Voltammetric behaviour of bovine erythrocyte superoxide dismutase[J]. Bioelectrochem and Bioenerg,1992 ,27 :229 ~ 233
- [10] Wu Xia-Qin , Xv Bin , Zhang Zong-Rang et al. The cyclic voltammetric behavior of superoxide dismutase [J]. J. of Shanghai Teachers Univ. (Natural science) (Chinese) ,1997 ,26(4) :43 ~ 48. (吴霞琴、许兵、章宗穰等,超氧化物歧化酶的循环伏安行为,上海师范大学学报,1997,26(4):43)
- [11] Wu Xiaqin , Meng Xiaoyun , Zhang Zongrang. Study on the ET process of SOD at cysteine-modified gold electrode. Chem. Lett. , 1999 ,12:1 271.
- [12] Xiaqin Wu ,Xiaoyun Meng , Zhesu Wang , Zongrang Zhang. Study on direct electrochemical reaction of superoxide dismutase[J]. Biochem. and Bioenerg. ,1999 , 48(1) :27
- [13] Wu Xiaqin , Meng Xiaoyun , Zhang Zongrang et al. The electrochemical behaviors of superoxide dismutase at promoter-modified gold electrode[J]. Electrochemistry(Chinese) , 1999 ,5(4) :383) (吴霞琴、孟晓云、章宗穰等,超氧化物歧化酶在促进剂修饰的金电极上的电化学行为,电化学,1999,5(4):383)
- [14] Wu Xiaqin , Wang Zhesu , Meng Xiaoyun , et al. Electrochemical quartz crystal microbalance study on the promoted electron transfer process at gold electrode[J]. Electrochemistry ,2000 ,6(2) :163 (Chinese) . (吴霞琴、王浙苏、章宗穰等,超氧化物歧化酶在金电极上电子传递过程的EQCM研究,[J]. 电化学,2000,6(2):163)
- [15] John Thornton , Ken Force. Surface-Enhanced Raman spectroscopy of nucleic acid compounds and their mixtures[J]. Applied spectroscopy ,1991 ,45(9) :1522
- [16] William H. Woodruff , Kenneth A. Norton. Resonance Raman spectroscopy of plastocyanin , azurin , and stellacyanin. A reevaluation of the identity of the resonance-enhanced modes[J]. J. Am. Chem. Soc. 1983 , 105 :657
- [17] H. Takeuchi , Y. Kimura , I. Koitabashi , et al. Raman band of N-deuterated histidinium as markers of conformation and hydrogen bonding[J]. J. Raman spectroscopy ,1991 ,22 :233