

2008-08-28

Direct Electrochemistry of Hemoglobin on the Electrode Modified with DDAB and SWCNT

Wen-jing HOU

Lin ZHOU

Xia-qin WU

Hong-xia ZHANG

Wen XIE

Liu YANG

Zhong-qing LU

Recommended Citation

Wen-jing HOU, Lin ZHOU, Xia-qin WU, Hong-xia ZHANG, Wen XIE, Liu YANG, Zhong-qing LU. Direct Electrochemistry of Hemoglobin on the Electrode Modified with DDAB and SWCNT[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2008 , 14(3): 258-262.

DOI: 10.61558/2993-074X.1902

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol14/iss3/6>

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.

血红蛋白在类生物膜修饰电极上的直接电化学

后雯璟, 周琳, 吴霞琴*, 张红霞, 谢文, 杨柳, 陆中庆

(上海师范大学生命与环境科学学院化学系, 上海 200234)

摘要: 使用掺合单壁碳纳米管 (SWCNT) 的不溶性表面活性剂双十二烷基二甲基溴化铵 (DDAB) 修饰玻碳电极, 并将血红蛋白 (Hb) 固定在修饰膜中制得了稳定的固载 Hb 的修饰电极. 循环伏安和交流阻抗测试表明, 固定在电极上的 Hb 是一个受吸附控制的可逆电子传递过程. 该氧化还原过程的 CV 扫描峰电位与溶液 pH 值成良好的线性关系, 斜率 39 mV/pH . 表明在发生 Hb 直接电子传递反应的同时伴随有质子参与反应. 掺合 SWCNT 的类生物膜修饰电极较之不掺合 SWCNT 的修饰电极对氧气的还原具有更好的催化作用. 并以 SWCNT 掺合量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDAB 修饰电极性能最佳.

关键词: 血红蛋白; 碳纳米管; DDAB; 直接电子传递; 循环伏安; 电化学交流阻抗谱

中图分类号: O646

文献标识码: A

血红蛋白 (Hemoglobin, Hb) 分子结构庞大, 活性中心不易暴露, 在电极上容易吸附变性而造成表面的钝化, 因而在常规的固体电极上其电子传递速率很慢^[1]. 许多研究尝试了应用各种电子传递促进剂 (Promoter) 修饰电极, 以改进电子传递的微观环境, 加快电子传递速率^[2-4]. Ulla 等将血红蛋白固定在纳米胶粘土修饰的电极上, 获得了可催化 NO 的电极反应^[5]. 而 Gu 等则先在铂金电极上固定金纳米粒子, 然后利用金硫键作用修饰半胱氨酸, 再借助静电吸引力修饰聚氨基苯磺酸, 从而实现血红蛋白在该修饰电极上的固定化, 并显示很好的生物活性, 可应用于对 H_2O_2 的检测^[6].

碳纳米管 (Carbon nano-tube CNT) 是一种理想的电极材料. 近年来已被广泛地用于修饰电极的制备^[7]. 一般来说, 酸、有机溶剂、表面活性剂等均可用作 CNT 的分散剂. 但相对而言, 以酸和有机溶剂分散的 CNT, 其制作的修饰电极, 充电电流比较大^[8]. 表面活性剂是一种比较好的碳管分散剂. 而且, 如氯化四丁基铵、氯化十四烷基二甲基苄基铵、乳化剂 OP 和 TritonX-100 等还能促进 Hb 在电极上的反应, 其原因可能是: 表面活性剂与 Hb 相互

作用形成复合物, 使得 Hb 的多肽链能伸展开来, 其疏水结构被打开后, 电活性中心暴露, 从而加快了电子转移的速率^[9]. 通常经过羧基化处理可使 CNT 功能化, 从而改善 CNT 的分散性, 还有利于修饰新的功能性基团^[10].

双十二烷基二甲基溴化铵 (Didodecyl dimethyl ammonium bromide, DDAB) 是一种阳离子表面活性剂, 当其借助吸附、涂布、共价键合以及 LB 膜转移等方法引入电极表面, 可形成有序排列的双分子层结构, 这种结构与生物膜的双层结构类似, 因而被称为模拟生物膜^[11]. Rusling 等报道了将 Mb 固定于表面活性剂薄膜修饰的热解石墨 (PG) 电极上, 其电子传递速率显著加快^[12].

本文主要研究在掺合 SWCNT 的 DDAB 膜修饰电极表面, 固定 Hb 的方法, 以及被固定的 Hb 对氧的电催化活性; 优化修饰电极制备条件, 提高 Hb 电子传递速率.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

牛血红蛋白 (上海伯奥生物科技有限公司), 用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液 (pH

=5.0)配成浓度 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液. SWCNT (Single wall carbon nano-tubes 深圳纳米港)按文献 [13]方法作羧基化处理. Nafion, DDAB 购自 Aldrich 公司. 其它试剂均为分析纯. 研究溶液均用超纯水 (Heal Force 超纯水器, 上海康雷分析仪器有限公司)配制.

循环伏安测试使用电化学工作站 (CHI 650, 上海辰华), 电化学交流阻抗谱测试使用计算机软件控制的恒电位仪 (M283, EG & G)和频相分析仪 (M1256, EG & G). 常规三电极体系, 工作电极为玻碳电极 ($\phi = 3 \text{ mm}$), 铂片电极为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极 (以下所指电位均相对于 SCE).

1.2 修饰电极的制备

玻碳电极先经 $6^\#$ 金相砂纸轻轻打磨, 依次用 $1.0, 0.3, 0.05 \mu\text{m}$ 的氧化铝粉末在绒布上抛光至镜面. 然后, 以超纯水和乙醇作介质置于超声波清洗器中清洗. 向电极表面滴加 $3 \mu\text{L}$ 1% 的 Nafion 乙醇溶液, 自然干燥; 用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DDAB 水溶液分散 SWCNT. 然后将该溶液与 Hb 的磷酸缓冲溶液 ($\text{pH} = 5$)按体积比 1:1 混合, 取此混合液 $10 \mu\text{L}$ 滴于电极表面, 干燥后即制得 Hb/DDAB/SWCNT/Nafion/GC 修饰电极.

2 结果与讨论

2.1 羧基化碳管的表征

图 1 是羧基化前 (a) 和羧基化后 (b) SWCNT 的红外光谱图, 图中于 $1590, 1750 \text{ cm}^{-1}$ 处显示的峰乃为羧基存在的特征吸收峰, 确证该 SWCNT 已被氧化并产生了羧基.

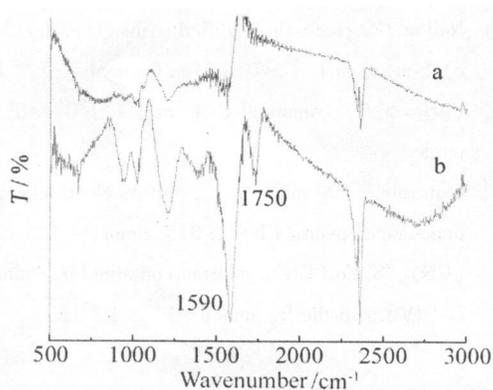


图 1 SWCNT 羧基化前 (a) 后 (b) 的红外光谱图

Fig 1 IR spectra of the SWCNT before (a) and after (b) carboxylation treatment

SEM 测试同时表明, 经混酸处理过的 SWCNT 表面带有大量的羧基和其他亲水性基团, 且 SWCNT 长度变短, 尾端开口, 比表面积增大. 所以经羧基化后的 SWCNT 能更好地吸附蛋白质及过氧化物酶等生物分子, 为生物分子反应提供了必需的微环境.

2.2 不同修饰电极的循环伏安行为

图 2 示出 3 种不同修饰电极在磷酸缓冲溶液中的 CV 图. 如图可见, 未固定 Hb 的 DDAB 修饰电极上不显示任何氧化还原电流峰 (a); 而当 Hb 固定在不含 SWCNT 掺合的 DDAB 膜修饰电极后, 则其 CV 曲线出现一对典型的氧化还原电流峰, 氧化峰电位为 -0.19 V , 还原峰电位为 -0.26 V , ΔE_p 70 mV (b). 又如将 Hb 固定在掺有 SWCNT 的 DDAB 修饰膜电极上 (c), CV 曲线上也同样出现一对可逆的氧化还原峰, 但峰电流明显增大. 较之无 SWCNT 修饰的电极, 其峰电位分别正移了 30 和 40 mV , 即 $E_{pa} = -0.16 \text{ V}$, $E_{pc} = -0.22 \text{ V}$, ΔE_p 为 60 mV , 略有减小. 这一结果表明, 该电极经 SWCNT 修饰后, 可使电活性的 Hb 比例增大, 反应的可逆性也有所改善, 原因即在 SWCNT 具有较大的比表面积和一些特殊的表面特性.

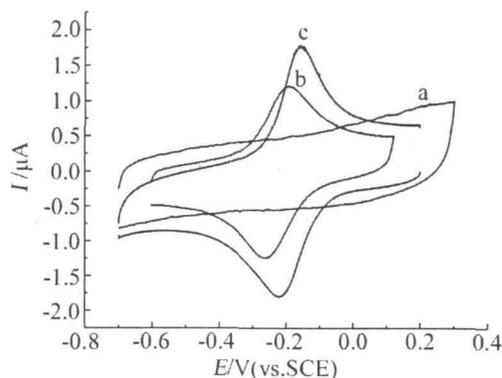


图 2 DDAB/Nafion/GC 修饰电极 (a)、Hb/DDAB/Nafion/GC (b) 和 Hb/DDAB/SWCNT/Nafion/GC (c) 电极在含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH} = 5.0$) 中氮气氛下的循环伏安图 (扫描速率: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$)

Fig 2 CVs of the DDAB/Nafion/GC (a), Hb/DDAB/Nafion/GC (b) and Hb/DDAB/SWCNT/Nafion/GC (c) electrode in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS ($\text{pH} = 5.0$) containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl N_2 purged

图 3 示明 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极在磷酸缓冲溶液中的 CV, 氧化还原峰电流随扫描速率的增大而增大, 峰电流之比接近 1, 但氧化还原峰电位基本不变, 峰电流与扫速呈良好的线性关系, 显然这是一个受吸附控制的可逆电极过程.

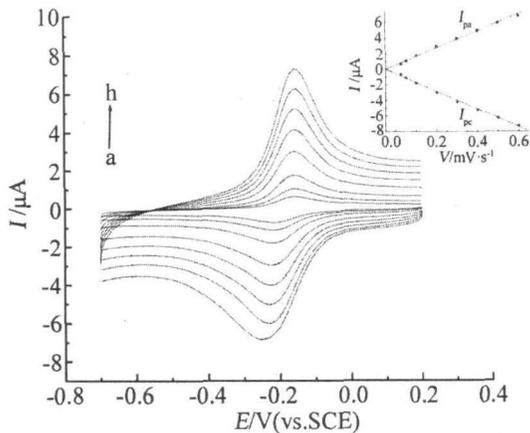


图 3 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极在 50 mmol · L⁻¹ 含有 0.1 mol · L⁻¹ KCl 的磷酸缓冲溶液 (pH=5.0) 中于不同扫速下的循环伏安图 插图为峰电流随扫速变化曲线

Fig 3 CVs of the Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC electrode in 50 mmol · L⁻¹ PBS (pH=5.0) containing 0.1 mol · L⁻¹ KCl N₂ purged scan rate / mV · s⁻¹: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 (a~h), insert figure is the plot of I_p ~ v

2.3 掺合不同量 SWCNT 修饰电极的循环伏安测量

图 4 是由不同 SWCNT 修饰量制备的 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极的 CV 曲线 (A) 及其在铁氰化钾 / 亚铁氰化钾溶液中的交流阻抗谱 (B). 可以看到, 随着 SWCNT 修饰量的增多, 峰电流减小. 这可能是由于修饰层的厚度太大, 不利于电活性的 Hb 在电极上进行直接的电子传递. 又从以铁氰化钾作探针的电化学交流阻抗谱 (图 4B) 也可看到, 随着 SWCNT 掺合浓度的增加, 阻抗谱上的半圆直径同时增大, 即该电子传递反应电阻增大. 这与上述 CV 测试结果相吻合. 实验表明, 以 SWCNT 掺合量为 1 mg · mL⁻¹ 的 DDAB 修饰该电

极, 其伏安扫描峰电流最大, 可逆性也较佳.

2.4 溶液 pH 值对 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极伏安行为的影响

图 5 示出 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极在不同 pH 值的缓冲溶液中测得的 CV 曲线.

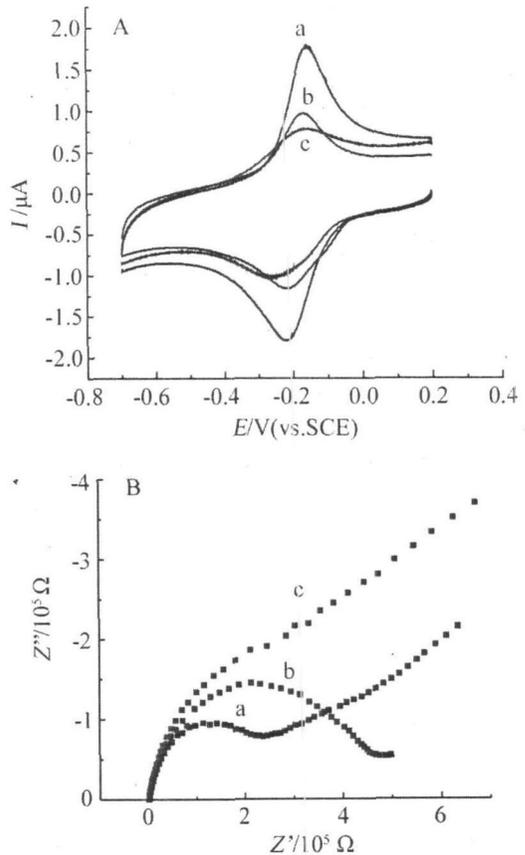


图 4 不同 SWCNT 掺合量的 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 电极的循环伏安图 (A) 和交流阻抗谱图 (B)

Fig 4 Cyclic voltammograms (A) of Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC electrode modified with a) 1, b) 2.5, c) 5 mg · mL⁻¹ SWCNT in 50 mmol · L⁻¹ PBS (pH=5.0) contained 0.1 mol · L⁻¹ KCl N₂ purged scan rate is 100 mV · s⁻¹, and its electrochemical impedance spectra (B) in 0.5 mmol · L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆ solution contained 0.1 mol · L⁻¹ KCl with the frequency 10⁻³ ~ 10⁶ Hz

如图可见, 随着测试溶液 pH 值的增大, 氧化还原峰电位发生负移, 表明该电子传递过程伴有质子参与. 虽其式量电位 E⁰ 与 pH 值成良好的线性

关系, 但斜率仅为 39 mV/pH (见插图), 偏离一电子一质子的可逆反应 (57.6 mV/pH), 据此似可判断该过程发生的是一电子两质子的反应. 此外峰电流随 pH 值增加也有减小的趋势, 这可能与血红蛋白的构型因溶液 pH 的增加而发生一定程度的转变有关.

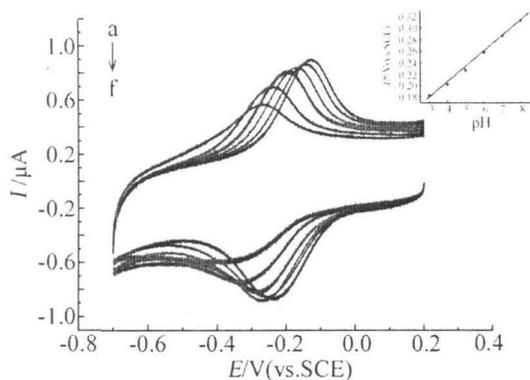


图 5 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 不同 pH 值的磷酸缓冲溶液中的循环伏安图 pH : a) 3.0, b) 4.0, c) 5.0, d) 6.0, e) 7.0, f) 8.0, 扫速 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, 插图为式量电位随 pH 的变化关系

Fig 5 CVs of Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC electrode in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl with different pH , N_2 purged solution pH : a) 3.0, b) 4.0, c) 5.0, d) 6.0, e) 7.0, f) 8.0, scan rate $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, insert is the plot of $E^{0'} \sim \text{pH}$

2.5 掺合 SWCNT 的 DDAB 膜修饰电极对氧气催化的影响

图 6 分别给出未掺合和掺合 SWCNT 的 DDAB 膜修饰电极在氧气饱和的磷酸缓冲溶液中的 CV 曲线. 如图, 二者都出现一个还原电流峰, 但对掺合 SWCNT 的 DDAB 膜修饰电极, 其还原峰电流明显增大, 且峰电位比前者 ($E_{\text{pc}} = -333 \text{ mV}$) 正移了近 30 mV , 表明该电极对氧气的还原有更好的催化作用, 这也可归因于 SWCNT 具有大的比表面积以及它的表面特性.

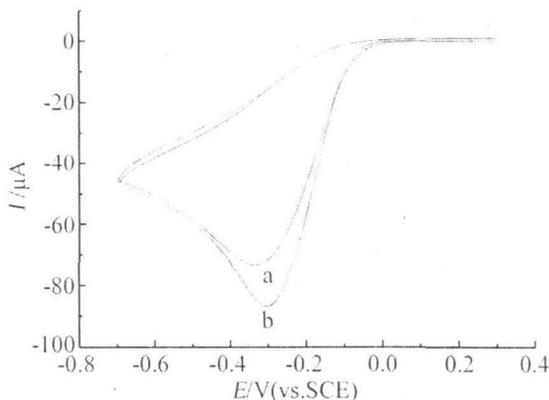


图 6 Hb-DDAB/Nafion/GC (a), Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC (b) 电极在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的磷酸缓冲溶液 ($\text{pH} = 5.0$) 氧气氛下的循环伏安图 扫描速率: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Fig 6 CVs of the Hb-DDAB/Nafion/GC (a), Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC (b) electrode in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS ($\text{pH} = 5.0$) contained $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl O_2 purged scan rate, $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

3 结论

固定在 Hb-DDAB-SWCNT/Nafion/GC 修饰电极上的 Hb 其电子传递反应是一个受吸附控制的氧化还原过程. 其峰电位与溶液 pH 呈良好的线性关系, 斜率 39 mV/pH , 可指认为一电子两质子的反应. 以 SWCNT 掺入量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDAB 修饰电极性能最好, 特别是对氧气的还原反应具有较佳的催化效应.

参考文献 (References):

- [1] Liu HuiHong, Wan YongQing, Zou GuoLin. Direct electrochemistry and electrochemical catalysis of immobilized hemoglobin in an ethanol/water mixture [J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 385 (8): 1470-1476.
- [2] Willner I, Riklin A, Shoham B, et al. Development of novel biosensor enzyme electrodes: glucose oxidase multilayer arrays immobilized onto self-assembled monolayers on electrodes [J]. Adv Mater, 1993, 12 (5): 912-915.
- [3] Patolsky F, Weizmann Y, Willner I. Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors [J]. Angew Chem Int Ed, 2004, 43 (16): 2113-2117.
- [4] Timasovic P, Lay R, et al. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemoglobin complex [J]. Chem

- Biol 1998, 5 (9): 505-517.
- [5] Lei Chenghong Ulla Wollenberger Electron transfer of hemoglobin at electrodes modified with colloidal clay nanoparticles[J]. Anal Biochem. 2002, 372 (6): 235-239.
- [6] Gu Haiying Yu Aimin Chen Hong-Yuan Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid-cysteine modified gold electrode [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry 2001, 516 (1~2): 119-126.
- [7] Zhang Maogen Smith Audrey Gorski Waldemar Carbon nanotube chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes[J]. Anal Chem. 2004, 76 (17): 5045-5050.
- [8] Wang Joseph Mustafa Musameh Lin Yuehe Solubilization of carbon nanotubes by nafion toward the preparation of amperometric biosensors[J]. J Am Chem Soc 2003, 125 (5): 2408-2409.
- [9] Ekaterina V Ivanova Edmond Magner Direct electron transfer of haemoglobin and myoglobin in methanol and ethanol at didodecyl dimethylammonium bromide modified pyrolytic graphite electrodes [J]. Electrochemistry Communications 2005, 7 (4): 323-327.
- [10] Zhang Dengsong(张登松), Dai Kai(代凯), Fang Jianhui(方建慧). Preparation and modification of multiwalled carbon nanotubes [J]. Chemical Researches 2004, 3 (15): 12-15.
- [11] Li Meixian(李美仙), Li Zhen(李铮), Wang Fangfang(王放放). Electrocatalysis of chloroacetic acid and trichloroacetic acid at fullerenes/didodecyl dimethylammonium bromide film modified electrodes [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry 2005, 9 (33): 1211-1214.
- [12] Peterson M Guto, James F Rusling Myoglobin retains iron heme and near-native conformation in DDAB films prepared from pH 5 to 7 dispersions [J]. Electrochemistry Communications 2006, 8 (3): 455-459.
- [13] Zhao Liyun, Liu Hongyun, Hu Naifei Assembly of layer-by-layer films of heme proteins and single-walled carbon nanotubes: electrochemistry and electrocatalysis [J]. Anal Bioanal Chem. 2006, 384 (2), 414-421.

Direct Electrochemistry of Hemoglobin on the Electrode Modified with DDAB and SWCNT

HOU Wen-jing ZHOU Lin WU Xia-qin*, ZHANG Hong-xia
XIE Wen YANG Liu LU Zhong-qing

(Department of Chemistry Shanghai Normal University Shanghai 200234, China)

Abstract: Hemoglobin (Hb) was immobilized onto the surface of glassy carbon electrode with the single-wall carbon nanotubes and surfactant didodecyl dimethylammonium bromide (DDAB) modified previously and its electrochemical behaviors have been investigated by cyclic voltammetry. A pair of well-defined redox peaks has been obtained. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were also used to study on the effect of different concentration of SWCNT in DDAB. The result shows that the 1 mg/mL is the best choice. The dependence of $E^{0'}$ on solution pH with the slope of 39 mV/pH, indicated that redox of the Hb is a one electron reaction with two protons transfer. The results also showed that the immobilized Hb kept its electrocatalytic activity toward the reduction of O_2 .

Key words: hemoglobin (Hb); single-wall carbon nano-tube (SWCNT); didodecyl dimethylammonium bromide (DDAB); direct electron transfer; cyclic voltammetry; electrochemical impedance spectroscopy