

2008-08-28

Direct Electrochemistry of Hemoglobin Immobilized on the Electrode Modified with Ionic Liquid and KGM

Liu YANG

Xia-qin WU

Wen-jing HOU

Lin-fei GU

Rong WANG

Xiao-ming GUO

Zong-rang ZHANG

Recommended Citation

Liu YANG, Xia-qin WU, Wen-jing HOU, Lin-fei GU, Rong WANG, Xiao-ming GUO, Zong-rang ZHANG. Direct Electrochemistry of Hemoglobin Immobilized on the Electrode Modified with Ionic Liquid and KGM[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2008 , 14(3): 304-307.

DOI: 10.61558/2993-074X.1911

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol14/iss3/15>

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.

离子液体和 KGM 修饰电极上的直接电化学

杨 柳¹, 吴霞琴^{1*}, 后雯璟¹, 顾林飞¹, 王 荣¹, 郭晓明², 章宗壤¹

(1 上海师范大学生命与环境科学学院化学系, 上海 200234;

2 上海应用技术学院化工系, 上海 200235)

摘要: 将血红蛋白固定在用室温离子液体和魔芋葡甘聚糖 (KGM) 水凝胶修饰的玻碳电极上, 其循环伏安扫描显示一对可逆的氧化还原电流峰, 克式量电位 (-0.38V , vs SCE) 随溶液 pH 值的增大而负移, 呈良好的线性关系, 斜率为 $51\text{mV}/\text{pH}$, 表明在离子液体和 KGM 共同修饰的电极上包埋在魔芋葡甘聚糖水凝胶中的血红蛋白发生了直接可逆的电子传递反应, 并伴随有一质子的迁移过程. 此外, 还考察了该血红蛋白修饰电极对 O_2 还原反应的电催化性能.

关键词: 离子液体; 魔芋葡甘聚糖; 血红蛋白; 直接电化学; 电催化

中图分类号: O646

文献标识码: A

血红蛋白 (Hemoglobin, Hb) 的空间结构庞大, 活性中心往往被深埋在巨大的肽链结构中, 直接吸附在电极上的 Hb 与其它生物分子相似, 容易发生变性而造成失活等现象. 为了活化其氧化还原中心、改善其在电极上的直接电子传递速率, 科学工作者采用了碳纳米管^[1]和其它纳米材料^[2]、溶胶凝胶^[3]、表面活性剂^[4]等修饰电极实施 Hb 的固定化, 并获得了 Hb 与电极之间的直接电子传递.

另一方面, 离子液体、又称室温熔盐 (Room temperature ionic liquid, RTIL), 具有较高的电导率, 宽的电位窗口等特点^[5], 近年来, 在有机合成、分离分析、化学电源等领域迅速得到应用^[6-7]. 已有的研究表明, 生物分子在离子液体修饰电极上既能保持良好的生物活性, 又可大大加速电子传递反应速率^[8-10]. 然而, 如何防止离子液体的流失即改善修饰电极的稳定性仍是值得关注的问题. 研究表明, 如在电极表面先行修饰一层 Nafion 和溶胶凝胶膜, 则可使电极表面由刚性基底改善成软性基底, 有助于离子液体层更稳定而牢固地将生物酶固定到电极表面^[11]. 然而, 溶胶凝胶膜制备实验条件难以控制, 干燥周期长、并且干燥过程中易发生膜开裂等问题.

本文旨在探索一种更为简便、有效的方法来固

定 Hb 以魔芋葡甘聚糖 (Konjac glucomannan, KGM)^[12]代替容易开裂的硅溶胶, 再将 Hb 固定到与离子液体共同修饰的玻碳电极上, 应用循环伏安法考察修饰膜中 Hb 的电子传递反应及其对氧还原的催化特性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

电化学工作站 (CHI 650, 上海辰华), 常规三电极体系, 工作电极为玻碳电极 ($\varphi=3\text{mm}$), 铂片电极为对电极, 饱和甘汞电极作参比电极.

牛血红蛋白 (上海伯奥生物科技有限公司), 用 10mmol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液 ($\text{pH}=7.0$) 配成浓度为 $1.34\times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的研究溶液. Nafion 购自 Aldrich 公司, 离子液体为 [1-丁基-3-甲基咪唑] [四氟硼酸] (简称 [BMIM][BF₄]), 由本研究室合成.

魔芋葡甘聚糖 (KGM) 溶胶凝胶制备: 称取一定量经过纯化和脱乙酰基反应的魔芋精粉 (武汉清江魔芋制品有限公司, 品名 03-TK, 粒度 120mesh) 溶解于沸水中, 配成 0.4% 的水凝胶.

其他试剂均为分析纯, 研究溶液均用超纯水 (上海康雷分析仪器有限公司) 配制.

1.2 Hb-KGM /RTIL /Nafion 修饰电极制备

玻碳电极依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝抛光,超纯水和乙醇超声清洗,电极吹干后在表面滴加 3 μL 1% 的 Nafion 乙醇溶液,放置约 5 min 待溶剂挥发后,再取 3 μL 10% 的 [BMIM][BF₄] 的乙醇溶液滴在 Nafion 覆盖的电极上,然后将冷却的 0.4% KGM 溶液与 1.34×10^{-4} mol/L 的 Hb 溶液以等体积混合,取混合溶液 3 μL 滴到上述已经离子液体修饰的电极上,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内放置一段时间,即制得可供研究用的工作电极,记作 Hb-KGM /RTIL /Nafion /GC 电极.以 pH=7.0 的磷酸缓冲溶液为底液,分别在氮气或氧气饱和下作循环伏安 (CV) 测试.

2 结果与讨论

2.1 Hb 在修饰电极上的电化学行为

图 1 是固定和未固定 Hb 的修饰电极在磷酸缓冲溶液中的循环伏安图.如图可见,对未固定 Hb 的修饰电极 KGM /RTIL /Nafion /GC,其 CV 曲线 (a) 不出现任何氧化还原电流峰,表明该电极没有发生任何电化学反应;但如 Hb 固定在只有 KGM 而无离子液体修饰的电极上,则仅在 -0.4V 附近显示一个很小的还原电流峰,未见其对应的氧化电流峰 (b);只有当 Hb 固定在离子液体与 KGM 共同修饰的电极上才能观察到一对典型的氧化还原电流峰 (c),其克式量电位为 -0.38 V (vs SCE), ΔE_p 60 mV,氧化还原峰电流之比接近 1:1.

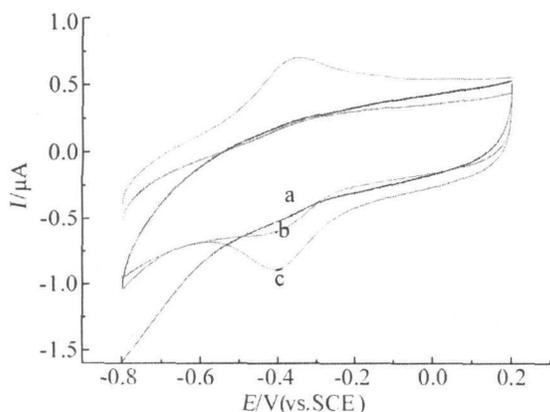


图 1 未固定 Hb 的修饰电极 (a) 和 Hb 固定在有 (c) 无 (b) 离子液体修饰的电极在磷酸缓冲溶液中氮气氛下的循环伏安图

Fig 1 CVs of the KGM /RTIL /Nafion /GC (a), and the Hb-KGM /RTIL /Nafion /GC (c), Hb-KGM /GC (b) in 50 mmol/L PBS containing 0.1 mol/L KCl under N₂ scan rate, 100 mV /s

图 2 示出不同扫速下 Hb-KGM /RTIL /Nafion /GC 修饰电极的 CV 曲线,可以清楚地看到,其氧化还原峰电流随扫速的增加而增大,但峰电位没有出现明显的移动,峰电流与扫速成良好的线性关系.

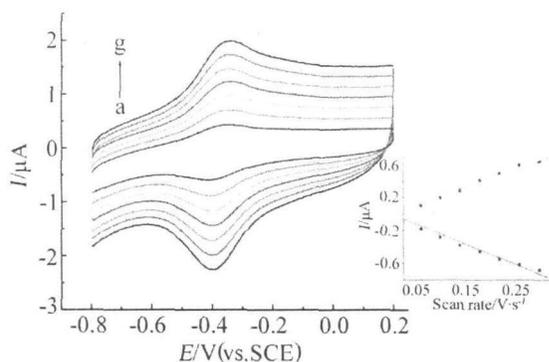


图 2 Hb-KGM /RTIL /Nafion /GC 修饰电极在不同扫速下的循环伏安图 插图:峰电流随扫速变化关系

Fig 2 CVs of Hb-KGM /RTIL /Nafion /GC in 50 mmol/L PBS containing 0.1 mol/L KCl under nitrogen atmosphere scan rate (a~g) /mV · s⁻¹: 60, 100, 140, 180, 220, 260, 300 and insert plot of the peak currents versus scan rates

以上表明, Hb 在离子液体与 KGM 共同修饰的电极上确实发生了准可逆的电子传递反应,并且是一个受表面过程控制的电极反应.这是由于 Hb 不是直接吸附在电极上,而是被固定在 KGM 多糖凝胶膜的网状结构中,可以保持其很好的构型而不失去活性.而且,在单以 KGM 修饰的电极上 (见图 1), Hb 发生的是一个不可逆的反应,只有与离子液体修饰层结合,才能使 Hb 的电子传递活性中心的铁与电极之间发生直接可逆的电子传递,显示离子液体对该电极反应起到了重要的作用.

此外,由于 Hb 非常牢固地固定在凝胶层的网状结构内,离子液体也因凝胶层的存在而不易流失,因而该修饰电极连续经过上百次的循环伏安扫描, CV 图形仍基本不变,可见它具有很好的稳定性.

2.2 pH 影响

图 3 示出 Hb-KGM /RTIL /Nafion /GC 修饰电极在不同 pH 值的缓冲溶液中的 CV 曲线,图中各曲线均呈现一对明显的氧化还原电流峰.克式量电位 E_p^0 随 pH 的增加而负移,并呈良好的线性关系 (图 4),线性方程 $E_p^0 = -0.03295 - 0.05095 \text{ pH}$, $r = 0.9986$.可见溶液的 pH 对 Hb 的氧化还原电位有影响.这是因为, Hb 会与水分子结合并使血红素周

围氨基酸发生质子化,从而导致其电子传递反应也伴随有质子的转移.上述线性方程直线斜率为 50.95 mV/pH,与理论值 59 mV/pH 相近,表明此处 Hb 的氧化还原是一电子和一质子过程.

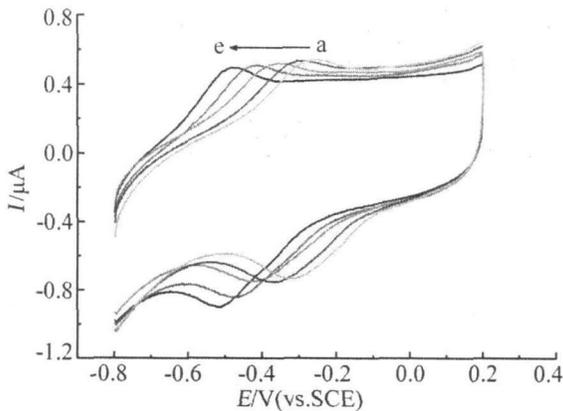


图 3 Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC 电极在不同 pH 的 PBS 溶液中于氮气氛下的循环伏安图

Fig. 3 CVs of the Hb in different pH (a ~ e: 5, 6, 7, 8, 9) phosphate buffer solutions under nitrogen atmosphere scan rate: 100 mV · s⁻¹

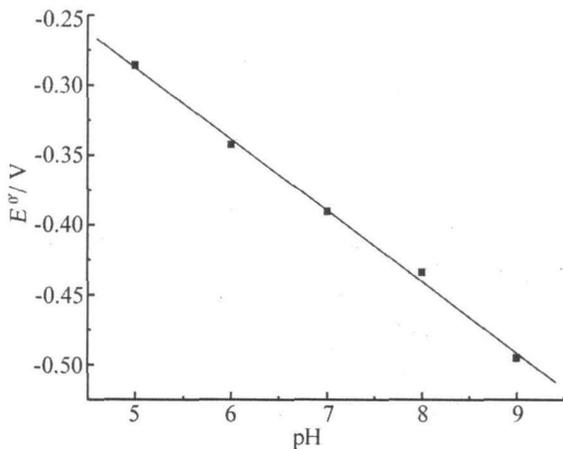


图 4 Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC 电极在 PBS 溶液中克式量电位随 pH 变化关系

Fig. 4 Variation of the formal potential E° with solution pH for the Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC electrode in PBS

2.2 Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC 修饰电极对 O₂ 还原反应的催化

图 5 是 Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC 修饰电极在氮气饱和 (a) 和氧气饱和 (b) 的磷酸缓冲溶液中测得的 CV 曲线. 如图, 曲线 a 出现的一对电流峰可指认为血红素中 Fe³⁺/Fe²⁺ 电对的氧化还原. 通入

氧气后, 还原峰电流明显增大, 但氧化峰电流却显著减小 (b), 这是典型的电催化反应. 原因是: 在还原电位下发生还原反应 $HbFe^{3+} \rightarrow HbFe^{2+}$, 而在有氧气存在的条件下, $HbFe^{2+}$ 与氧气结合生成 $HbFe^{2+} \cdot O$, 之后又还原释放出 H_2O_2 [13].

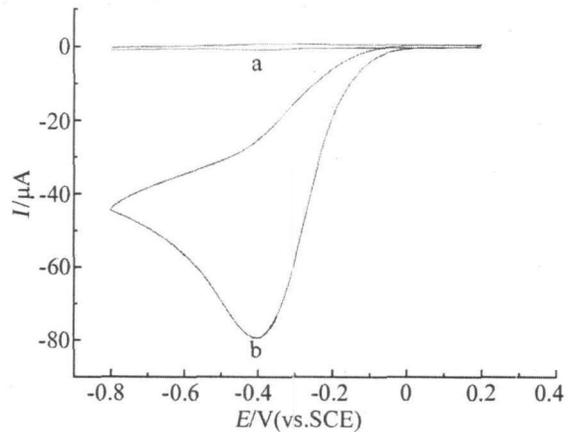


图 5 Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC 电极在氮气饱和 (a) 和氧气饱和 (b) 下的磷酸缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 5 CVs of the Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC in 50 mmol/L PBS containing 0.1 mol/L KCl with N₂ (a) or O₂-saturated (b) scan rate, 100 mV/s

3 结 论

用简单的滴涂法制得稳定的 Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC 修饰电极, 在 KGM 和离子液体的共同作用下, Hb 与电极之间发生了直接的准可逆的电子传递反应, 其氧化还原反应表现为表面控制且伴随有质子迁移反应.

该修饰电极对 O₂ 还原反应显示出良好的电催化性能, 为生物传感器和生物电催化的深入研究提供了简便易行的实验技术和方法.

参考文献 (References):

[1] 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, 84: 414-422.

[2] Qiao Yafen (乔亚芬), Zhang Junsong (张俊松), Lu Tianhong (陆天虹), et al. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of hemoglobin immobilized on CdS nanoparticles [J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry (in Chinese), 2006, 22: 1282-1284.

Wang Quanlin (王全林), Yang Baojun (杨宝军), Lu Gongxuan (吕功煊). Direct electrochemistry of hemo-

- globin immobilized on carbon paste electrode by inorganic film [J]. *Chemistry Journal of Chinese Universities* (in Chinese), 2003, 24: 1561-1566.
- [4] Zhou Yinglin (周颖琳), Hu Yujiao (胡玉娇), Zeng Yonghui (曾泳淮). Electrochemistry and electrocatalysis with hemoglobin at didodecylmethylammonium polyvinyl sulfate ($2C_{12}N^+PVS^-$) multilayer composite film electrodes [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (in Chinese), 2002, 30: 262-266.
- [5] Wang Yi (王毅), Gao Deshu (高德淑), Li Zhaohui (李朝辉). Electrochemical properties of ionic liquid on porous carbon electrode [J]. *Chemical Research* (in Chinese), 2005, 6: 38-41.
- [6] Fadeev A G, Meagher M M. Opportunities for ionic liquids in recovery of biofuels [J]. *Chem Commun* 2001, 3: 295-296.
- [7] Tam W elton. Ionic liquids in catalysis [J]. *Coordination Chemistry Reviews* 2004, 248: 2459-2477.
- [8] Li Jinghong, Shen Yanfei. Room-temperature ionic liquids as a medium to enhance the electrochemical stability of self-assembled monolayers alkanethiols on gold electrodes [J]. *Chem Commun* 2005, 3: 360-362.
- [9] Liu Yang, Li Jinghong. Highly active horseradish peroxidase immobilized in 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate room-temperature ionic liquid based sol-gel host materials [J]. *Chem Commun* 2005, 13: 1778-1780.
- [10] Wang Shengfu, Chen Ting, Pang Daiwen. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins entrapped in agarose hydrogel film in room-temperature ionic liquids [J]. *Langmuir* 2005, 21: 9260-9266.
- [11] Zhao Guangchao, Xu Miaoqing, Ma Juan, et al. Direct electrochemistry of hemoglobin on a room temperature ionic liquid modified electrode and its electrocatalytic activity for the reduction of oxygen [J]. *Electrochem Commun* 2007, 9: 920-924.
- [12] 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: 1470-1476.
- [13] Yuri M Lvov, Zhongqing Lu, John B, et al. Direct electrochemistry of myoglobin and cytochrome P450 can in alternate layer-by-layer films with DNA and other polyions [J]. *J Am Chem Soc* 1998, 120(17): 4073-4080.

Direct Electrochemistry of Hemoglobin Immobilized on the Electrode Modified with Ionic Liquid and KGM

YANG Liu¹, WU Xia-qin^{1*}, HOU Wen-jing¹, GU Lin-fei¹,

WANG Rong¹, GUO Xiao-ming², ZHANG Zong-rang¹

(1. Department of Chemistry, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

2. Dept of Chemistry and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China)

Abstract: Hemoglobin (Hb) has been immobilized on a glassy carbon electrode (GCE) surface with konjac glucamannan (KGM) and room temperature ionic liquid (RTIL). And which electrochemical behaviors have been investigated by cyclic voltammetry. The results shown that the entrapped Hemoglobin undergoes fast direct electron transfer reactions with formal potential of $-0.38V$ (vs SCE) and the E^0 is linearly dependent on solution pH with a slope value of $51 mV/pH$, due to the electron transfer of $HbFe^{3+}/HbFe^{2+}$ redox couple accompanied with a proton transfer. The electrocatalytic reduction of oxygen was also explored at the Hb-KGM/RTIL/Nafion/GC electrode.

Key words: ionic liquid; konjac glucamannan (KGM); hemoglobin; electrocatalysis