

2008-11-28

Direct Electrochemistry of Chloroperoxidase at GC Electrode Modified with SWNTs

Hong-xia ZHANG

Xia-qin WU

Wen-jing HOU

Wen XIE

Zhong-qing LU

Rong WANG

He-xing LI

Recommended Citation

Hong-xia ZHANG, Xia-qin WU, Wen-jing HOU, Wen XIE, Zhong-qing LU, Rong WANG, He-xing LI. Direct Electrochemistry of Chloroperoxidase at GC Electrode Modified with SWNTs[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2008 , 14(4): 383-387.

DOI: 10.61558/2993-074X.1926

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol14/iss4/7>

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.

氯过氧化物酶在碳纳米管修饰电极上的 直接电化学研究

张红霞, 吴霞琴*, 后雯璟, 谢文, 陆中庆, 王荣, 李和兴
(上海师范大学化学系, 上海 200234)

摘要: 将氯过氧化物酶固定到单壁碳纳米管修饰玻碳电极, 其循环伏安曲线出现一对准可逆氧化还原峰, 说明碳纳米管能够很好地促进氯过氧化物酶在电极表面的直接电子传递. 该过程与溶液 pH 值有关, 可指认氯过氧化物酶在电极表面发生的是一电子-一质子传递反应. 该修饰电极制作简单, 性能稳定, 且对氧还原具有很好的电催化效应.

关键词: 氯过氧化物酶; 碳纳米管; 直接电化学; 修饰电极; 氧还原; 电催化

中图分类号: O646

文献标识码: A

氯过氧化物酶 (Chloroperoxidase CPO) 是从海洋真菌分离得到的一种非常特殊的过氧化物酶^[1], 其诸多光谱和化学特性都与细胞色素 P-450 相同. CPO 可以催化烷基、芳基、二烷基及杂环硫化物的氧化, 并具有很高的立体选择性, 对药物研发显示广泛的应用前景^[2]. 但 CPO 试剂昂贵, 与其它大分子生物酶一样, 在裸电极上难以测试出其直接的电子传递反应^[3]. 如何进一步利用、开发酶的应用, 很有必要开展相关电化学基础研究.

碳纳米管 (Carbon Nano-tube CNT) 与其它纳米材料相似, 具有特殊的表面效应、体积效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应, 尤其经羧基化的碳纳米管因含有大量的亲水性羧基基团而有利于酶活性的保存, 并为生物体提供反应的微环境. 碳纳米管具有良好的力学和独特的电学性能. 近来, 在生物电化学和生物传感器领域中的应用报道逐渐增多^[4-7].

本文尝试用碳纳米管修饰电极实现 CPO 的固定, 以获得 CPO 与电极间的直接电子传递信息, 同时证明, 该 CPO 仍可保持良好的生物活性及其对氧还原的电催化活性.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

CPO (Sigma 公司); 单壁碳纳米管 (Single wall Carbon Nanotubes SWNTs, 直径 < 10 nm, 长度 $1 \sim 2$ μ m, 纯度 $\geq 95\%$, 深圳碳纳米港). 取一定量的 SWNTs 于浓硫酸和浓硝酸的混合酸中 (体积比为 3:1), 经常温下超声进行羧基化处理 8 h 处理前后的碳纳米管形态由透射电镜 (TEM) (JEM-2100, JEOL) 表征.

Nafion 乙醇溶液 (Aldrich) 经乙醇稀释至浓度为 0.5% (by volume); 其他试剂皆为分析纯, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) 用高纯水 (Heal Force 超纯水器, 上海康雷分析仪器公司) 配置, 调至 pH = 5.0, 加入 0.1 mol/L KCl 作支持电解质.

循环伏安测试使用计算机软件控制的 CHI 604 电化学工作站 (上海辰华公司). 常规三电极体系. 工作电极为玻碳电极和修饰玻碳电极, 铂片电极作对电极, 饱和甘汞电极作参比电极 (文中所示电位均相对于 SCE). 实验前先通氮气除氧, 并于

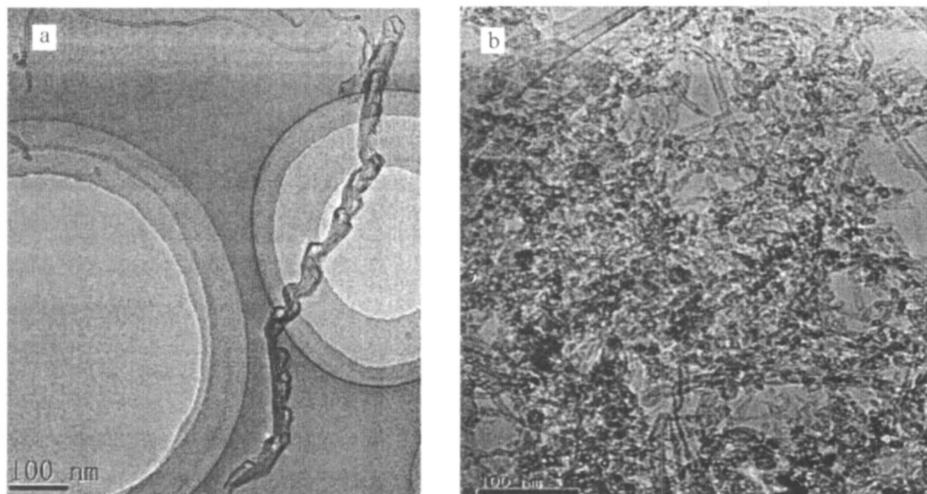


图 1 混合酸处理前 (a)后 (b)的碳纳米管 TEM 照片

Fig 1 TEM images of the SWNTs without (a) and with pre-treatment by HNO₃-H₂SO₄ (b)

氮气氛下测量. 如测定氧还原反应的电催化效应, 则维持氧气饱和.

1.2 修饰电极制备

玻碳电极 ($\varnothing=3\text{ mm}$) 经 6# 金相砂纸打磨后, 在麂皮上依次用 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的氧化铝粉末抛光至镜面, 再分别用无水乙醇和纯水超声清洗, 氮气吹干.

用 0.5% 的 Nafion 乙醇溶液分散羧基化的 SWNTs 使浓度等于 1 mg/mL 以此溶液滴在玻碳电极表面, 室温干燥, 制得的修饰电极记作 SWNTs-Nafion/GC; 另取 2 μL 上述分散 SWNTs 的 Nafion 悬浮液与 1 μL CPO ($2 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$) 溶液混合, 滴在玻碳电极表面, 室温干燥, 制得的修饰电极记作 CPO-SWNTs-Nafion/GC.

2 结果讨论

2.1 羧基化处理前后碳纳米管表征

图 1 给出经羧基化处理和未经处理的碳纳米管的 TEM 形貌照片. 由图可见, 混合酸处理过的碳纳米管表面确实有大量羧基和其他亲水性基团, 且碳纳米管长度变短, 尾端开口, 证实比表面显著增大^[5]. 这有利于该碳纳米管能更好地吸附蛋白质及过氧化物酶等生物分子, 且为其提供生物分子反应所需的微环境^[8].

2.2 修饰电极的循环伏安行为

图 2 是有、无固定 CPO 的修饰电极在 PBS 溶液中测得的 CV 曲线. 如图, 裸玻碳电极在 CPO 溶

液中没有显示任何氧化还原电流峰 (a), 没有固定 CPO 的 SWNTs 修饰玻碳电极在 PBS 中无氧化还原电流峰 (b), 只有固定了 CPO 的 SWNTs 修饰玻碳电极呈现了一对典型的氧化还原电流峰 (c), 可以确定, 这是该修饰电极上的 CPO 发生了直接的电子传递反应.

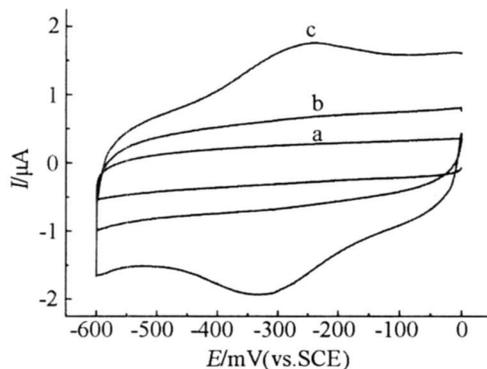


图 2 裸玻碳电极在 CPO 溶液 (a) 和 SWNTs-Nafion/GC (b) 及 CPO-SWNTs-Nafion/GC (c) 电极在 pH=5.0 的磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线 (扫描速率: 100 mV/s)

Fig 2 Cyclic voltammograms of the bare GC (a) in CPO solution and the SWNTs-Nafion/GC (b) and CPO-SWNTs-Nafion/GC (c) electrode in PBS solution scan rate, 100 mV/s

图 3 是不同扫描速率下测得的固定有 CPO 的修饰电极的循环伏安曲线. 图中, 氧化还原峰电流

随扫速的增加而加大,但在 $5 \sim 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫速范围内峰电位无明显变化,氧化峰电位 (-0.2546 V)与还原峰电位 (-0.3446 V)差 $\Delta E_p = 90 \text{ mV}$,氧化峰/还原峰电流之比接近 1,表明该电极固定的 CPO 发生了准可逆的电子传递反应.但峰电流与扫速成线性关系(见图 3 插图),可见该电子传递反应是受吸附过程控制的.

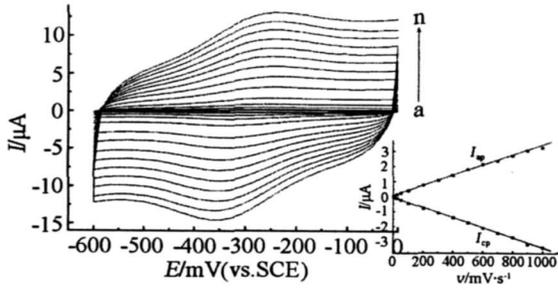


图 3 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极在磷酸缓冲溶液 ($\text{pH}=5.0$) 中于不同扫描速率下的循环伏安曲线插图是峰电流扫速曲线

Fig 3 Cyclic voltammograms of the CPO-SWNTs-Nafion/GC electrode in PBS solution with different scan rate (a~n) $/\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$: 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000, the insert is a plot of peak currents versus scan rate

图 4 是 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极在 $\text{pH}=5.0$ 的磷酸缓冲溶液中连续扫描 200 次的 CV 曲线,扫速 100 mV/s 如图,经数次扫描后, CV 曲线就基本重合.实验同时表明,该 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极经搁置一周后,其 CV 曲线的氧

化还原峰电流、峰电位均无明显的变化(图略),表明固定在碳纳米管修饰电极上的 CPO 的电化学行为非常稳定.

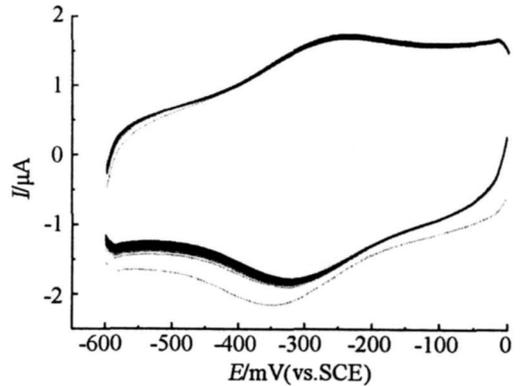


图 4 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极在 $\text{pH}=5.0$ 磷酸缓冲溶液中 200 次连续扫描的循环伏安曲线

Fig 4 Successive 200 cyclic voltammograms of the CPO-SWNTs-Nafion/GC electrode in $\text{pH}=5.0$ PBS solution scan rate, 100 mV/s

2.3 pH 值对 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极表面电子传递反应的影响

图 5 是 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极在不同 pH 缓冲溶液中测得的 CV 曲线.由图可见,氧化峰电位和还原峰电位均随溶液 pH 增加而负移,式量电位 E^0 同时负移.以 E^0 对 pH 作图可得一线性良好的直线,斜率为 49.2 mV/pH ,该值与一电子-质子传递反应的理论值 -57.6 mV/pH (18°C) 较为接近^[5-9],电极反应: $\text{CPO-Fe(III)} + e + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CPO-Fe(II)}$.

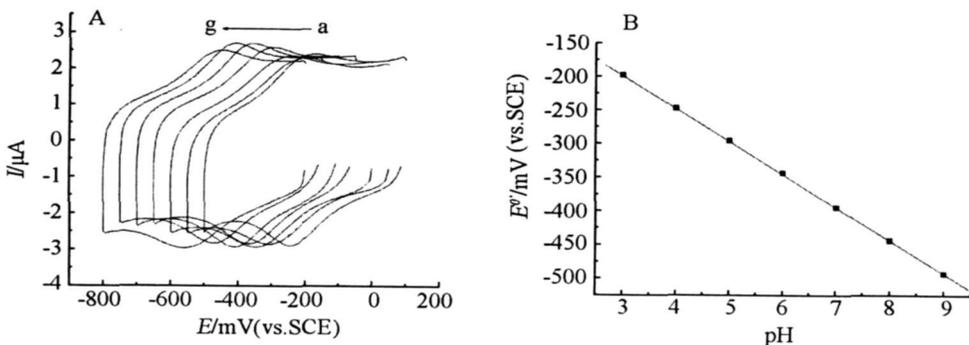


图 5 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极在不同 pH 值,磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线 (A) (溶液 $\text{pH a} \sim \text{g}=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ 扫描速率: 100 mV/s) 及式量电位与 pH 关系图 (B).

Fig 5 Cyclic voltammogram (A) of CPO-SWNTs-Nafion/GC electrode in different pH PBS solutions $\text{pH a} \sim \text{g}=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ (scan rate, 100 mV/s) the B is a plot of formal potential E^0 versus pH

2.4 CPO-SWNTs/Nafion/GC修饰电极 对氧气还原的电催化作用

图6是裸玻碳电极和未固定及固定有CPO的碳纳米管修饰电极在氧气饱和气氛下测得的CV曲线。可以看出,裸电极上不显示氧还原峰(a),而碳纳米管修饰电极上在 -0.488 V 处出现了氧还原的电流峰(b),表明碳纳米管对氧还原有一定的电催化作用;但对固定了CPO的修饰电极则其氧还原峰电流又明显增加,峰电位正移至 -0.384 V (c),说明CPO对氧气的还原具有显著的催化作用。

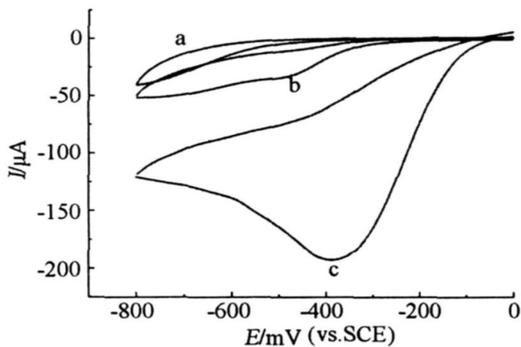


图6 裸玻碳电极(a)、SWNTs/Nafion/GC(b)和CPO-SWNTs/Nafion/GC(c)电极在氧气饱和和 $\text{pH}=5.0$ 磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线(扫描速率: 100 mV/s)

Fig 6 Cyclic voltammograms of the bare GC (a), SWNTs-Nafion/GC (b) and CPO-SWNTs/Nafion/GC (c) electrodes in O_2 -saturated $\text{pH}=5.0$ PBS solution scan rate: 100 mV/s

3 结 论

将CPO固定到碳纳米管修饰的玻碳电极上,碳纳米管能促进CPO的直接电子传递反应,该过程系受表面吸附控制的准可逆电极反应,且与溶液 pH 值有关,表现为一电子-一质子电极反应。固定CPO修饰电极对氧气还原也具有明显的电催化作用。

参考文献 (References):

- [1] Lowell P Hager, David R Morris, Frederick S Brown, et al. Chloroperoxidase II Utilization of halogen anions [J]. *Biological Chem.* 1966, 241(8): 1769-1777.
- [2] Fang Wei-shuo (方唯硕), Cheng Ke-di (程克棣). Application of peroxidase in asymmetric oxidation and the reaction mechanism [J]. *Organic Chemistry (in Chinese)*, 2002, 22(10): 710-717.
- [3] Lu Zhong-qing, Hou Wen-jing, Wu Xia-qin, et al. Electrochemistry of self-assembled ultra-thin films composed of chloroperoxidase and polyions [J]. *Chem Lett* 2007, 36(4): 564-565.
- [4] Kalayil M Manesh, Santhosh P, Anantha I Gopalan, et al. Electrocatalytic dioxygen reduction at glassy carbon electrode modified with polyaniline grafted multiwall carbon nanotube film [J]. *Electroanalysis* 2006, 18(16): 1564-1571.
- [5] Zhao Li-yun, Liu Hong-yun, Hu Nai-fei. Assembly of layer-by-layer films of heme proteins and single-walled carbon nanotubes electrochemistry and electrocatalysis [J]. *Anal Bioanal Chem.* 2006, 384: 414-422.
- [6] Lü Ya-fen, Yin Ya-jing, Wu Ping, et al. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of myoglobin at a carbon nanotube modified electrode [J]. *Acta Phys-Chim Sin.* 2007, 23(1): 5-11.
- [7] Gong Kuan-ping, Yu Dong, Xiong Shao-xiang, et al. Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes [J]. *Biosensors and Bioelectronics* 2004, 20: 253-259.
- [8] Mai Zhi-bin (麦智彬), Tan Xue-cai (谭学才), Zou Xiao-yong (邹小勇). Progresses of the chemical modified electrodes and electrochemical biosensors based on carbon nanotubes [J]. *Journal of Instrumental Analysis (in Chinese)*, 2006, 25(3): 120-125.
- [9] Huang He, Hu Nai-fei, Zeng Yong-huai, et al. Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films [J]. *Analytical Biochemistry* 2002, 308(1): 141-151.

Direct Electrochemistry of Chloroperoxidase at GC Electrode Modified with SWNTs

ZHANG Hong-xia, WU Xia-qin^{*}, HOU Wen-jing, XIE Wen, LU Zhong-qing,
WANG Rong, LI He-xing

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

Abstract: The chloroperoxidase (CPO) was immobilized on to the surface of SWNTs modified electrodes. The electrochemical behaviors of modified electrode have been investigated by cyclic voltammetry. The appearance of a pair of well-defined redox peaks in the CV curve indicated that SWNTs can promote the electron transfer reaction of CPO. The results of cyclic voltammetry in PBS of different pH, from 3~9, showed that the reaction of CPO on the modified electrode was with equal numbers of electron and proton. This readily prepared SWNTs modified electrode showed excellent stability and good catalysis to O₂.

Key words: chloroperoxidase; carbon nanotubes; direct electrochemistry; modified electrode; oxygen reduction; electrocatalysis