

有机介质中辅酶NADH的电化学氧化^①

杨防祖 吴辉煌 许书楷 周绍民

(厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室, 化学系, 厦门, 361005)

摘要 用伏安法分别研究N,N'-二甲基甲酰胺和1,4-二氧六环介质中还原态烟酰胺辅酶NADH在玻碳电极上的电化学氧化行为并测定某些动力学参数. NADH的电氧化表现为完全不可逆过程, 实验证明其过程伴有快速化学步骤. 与在1,4-二氧六环介质中的相比, NADH在N,N'-二甲基甲酰胺介质中的电氧化速度和扩散系数较小, 但电流响应较为稳定. 根据溶剂效应讨论了上述实验结果.

关键词 NADH, 电化学氧化, 有机相酶学, 生物电化学

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)是一种重要的辅酶, 迄今已知的250多种脱氢酶用它提供氧化还原功能. NAD⁺在酶反应中自身转变为还原态的NADH, 利用电化学方法将它氧化再生对发展生物技术和电化学生物传感器具有重要意义. 目前有关水溶液中NADH电化学氧化的研究已取得较大进展^[1,2], 但非水介质中的工作仍较少见^[1,3]. 近年来, 有机相中酶催化的研究越来越受人们关注^[4,5], 探讨NADH在有机相中的电氧化直接关系到脱氢酶应用范围的拓展. 本文以N,N'-二甲基甲酰胺和1,4-二氧六环两种溶剂为介质, 研究NADH的电氧化行为并测定某些特征参数, 为寻找电氧化再生的合适条件打下基础.

1 实验条件

1.1 试剂与溶液

NADH(>85%), 购自上海生化研究所, 未经进一步提纯. 溶剂N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)和1,4-二氧六环(dioxane)经过蒸馏后使用. 许多脱氢酶在弱碱性介质中呈最佳活性, 实验中溶液的酸碱度控制在pH8.0, 以三羟甲基氨基甲烷(THAM)和丁二酸的混合水溶液作缓冲体系. 以四丁基铵高氯酸为支持电解质, 分别配制两种不同介质的溶液, 即(1)溶液A由a和b两种溶液按1:9的体积比组成, a液为0.20 mol/L THAM+0.066 mol/L 丁二酸的水溶液, b液为0.056 mol/L (C₄H₉)₄NClO₄的N,N'-二甲基甲酰胺溶液; (2)溶液B由c液和d液按1:9体积比组成, c液为1.0 mol/L THAM+0.33 mol/L 丁二酸的水溶液, d液为0.056 mol/L (C₄H₉)₄NClO₄的1,4-二氧六环溶液. NADH分别加入上述A和B溶液中配制成所需的浓度.

1.2 仪器

伏安法实验用Pine仪器公司的RDE4恒电位仪和四川仪表厂的3033型X-Y函数记录仪. 采用三室电解池, 以紧固于聚四氟乙烯中的玻碳为研究电极(工作面积为0.50 cm²), 测定前经

① 本文1995-02-16收到, 1995-04-24收到修改稿; 国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助课题

6[#]金相砂纸磨光并超声波清洗5 min. 辅助电极为Pt片, 参比电极为饱和甘汞电极, 文中电位值均相对于此电极. 电解池在30 ℃的水浴中恒温.

2 结果与讨论

2.1 NADH 电氧化的伏安行为

图1a和b分别示出二甲基甲酰胺和二氧六环两种介质中NADH在玻碳电极上电化学氧化的伏安图. 可以看出NADH在两种介质中的氧化过程均呈不可逆的特征. NADH在+0.4 V附近开始氧化, 随后出现一个氧化峰. 提高NADH浓度, 该氧化峰电流增大, 峰电位略有正移. 在一定浓度范围内, 氧化峰电流与NADH浓度成线性关系(图2). 在DMF介质中, 线性浓度范围可达到1.6 mmol/L, 而在1,4-二氧六环中则达到1.0 mmol/L.

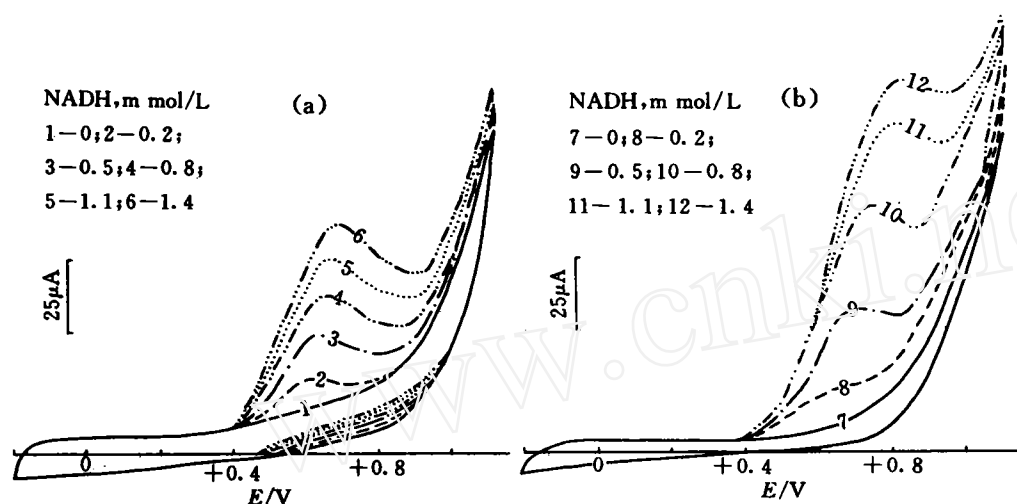
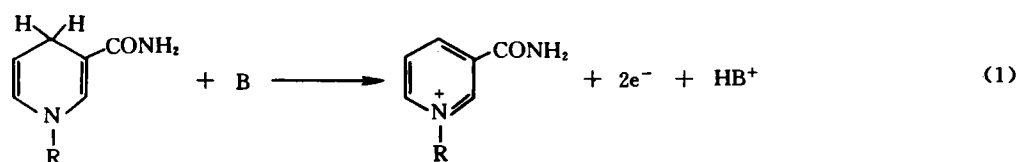


图1 有机介质中NADH在玻璃碳电极上的循环伏安图. 扫描速度 50 mV/s

Fig. 1 Cyclic voltammograms of NADH on glassy carbon electrode in organic media. (a) in DMF, (b) in dioxane. scan rate: 50 mV/s

Bleadel 等^[3]对乙腈介质中NADH模型物(如1-N-甲基-1,4-二氢烟酰胺等)的电氧化进行研究, 发现在非缓冲的乙腈中有3个阳极峰, 但关于这些阳极峰所代表的过程尚无明确解释. 在缓冲的碱性乙腈溶液中只有一个阳极峰, 这些作者根据库仑测定, 认为该过程是一个二电子过程:



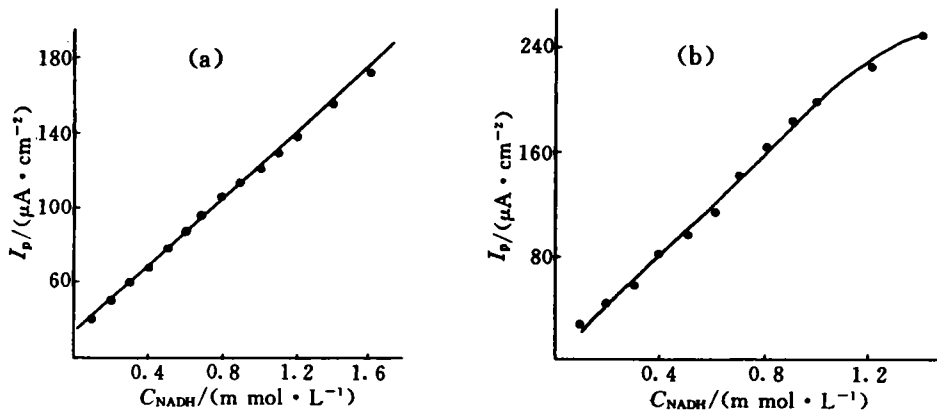


图2 NADH 氧化峰电流与浓度关系
Fig. 2 Relationship of $I_p \sim C_{\text{NADH}}$. (a) in DMF (b) in dioxane

NADH 的氧化是一个包括电子交换和去质子的过程,在单一步骤中完成整个反应是困难的.为了判断过程的性质,我们观察了扫描速度对峰电流和峰电位的影响.图3示出电流函数 $I_p/v^{1/2}$ 与 $\lg v$ 的关系,显然,随着 v 的增大 $I_p/v^{1/2}$ 减小了,表明存在后续的化学反应步骤.根据图1 伏安曲线没有反向峰的特征,可认为这是一个伴有快速后续反应的不可逆过程.

图4 表示NADH 在玻碳电极上电化学的峰电位 E_p (图a)和峰电流 I_p (图b)与扫描速度的关系,在两种介质中 E_p 与 $\lg v$ 以及 $\lg I_p$ 与 $\lg v$ 均呈线性关系,表1 给出某些特征参数.可以看到 I_p 大约与扫描速度的平方根成正比.根据扫描速度增大10 倍,相应的完全不可逆过程的 E_p 移动 $(30/ \alpha n)$ mV 的规则^[6],可推知 α, n 分别为0.44(在DMF 介质中)和0.32(在二氧六环介质中).对完全不可逆过程,其峰电流 I_p 可表示为^[6]

$$I_p = - (2.99 \times 10^{-5}) n (\alpha_n n_a)^{1/2} A C_0^{\infty} D^{1/2} v^{1/2} \quad (2)$$

由此可求出两种介质中NADH 的扩散系数(见表1).此外若假定 $n=1$,则由 α, n 值可知在DMF 介质中的 α 值比在二氧六环中的更接近于0.5.总之,上述实验结果表明,在所用的两种介质中NADH 的氧化过程可表示为反应步骤的电化学过程:

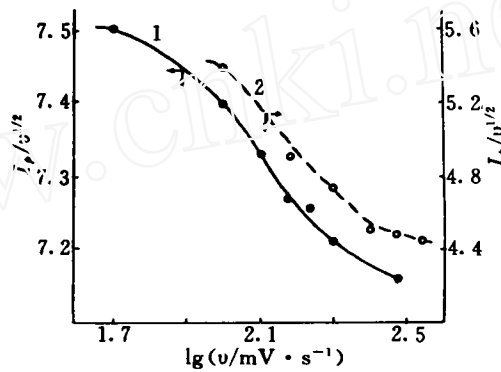


图3 NADH 氧化的 $I_p/v^{1/2} \sim \lg v$ 关系
Fig. 3 Relationship between $(I_p/v^{1/2})$ and $\lg v$ for NADH oxidation. 1. in DMF, 2. in dioxane

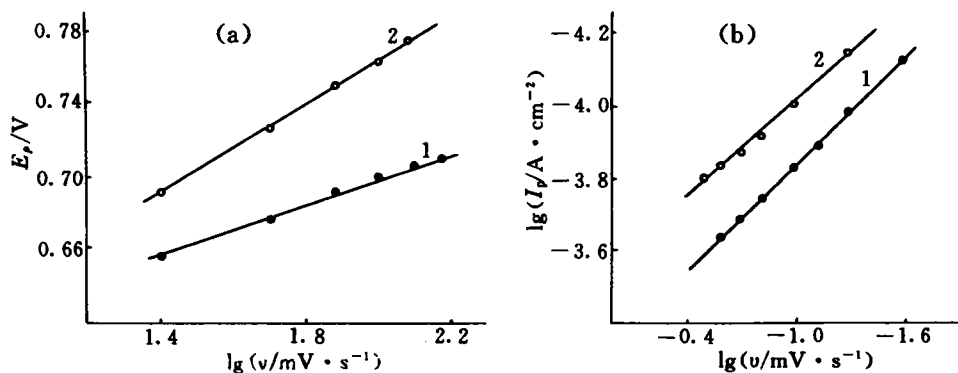


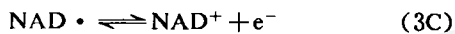
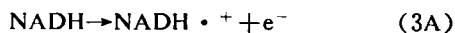
图4 NADH 电氧化的峰电位(a)和峰电流(b)与扫描速度的关系

Fig. 4 Relationships of peak potentials (a) and peak currents (b) to scan rates for NADH electro-oxidation

1. in DMF, 2. in dioxane

表1 NADH 电氧化的某些特征参数

Tab. 1 Characteristic parameters of NADH oxidation



| | $\partial E_p / \partial \lg v$ | $\partial \lg I_p / \partial \lg v$ | αn | $D, cm^2/s$ |
|-----|---------------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------|
| DMF | 0.071 | 0.49 | 0.44 | 1.1×10^{-6} |
| DOD | 0.117 | 0.44 | 0.32 | 3.7×10^{-6} |

其中步骤(3A)为速度决定步骤。

2.2 NADH 氧化电流的稳定性

NADH 电氧化遇到的问题之一是反应物种在电极上的沾染,从而使电流信号迅速降低,这种现象当NADH 浓度较大时尤为严重.为了探明所用二种体系中的电极沾染情况,检验了玻碳电极在0.8 mmol/L NADH 溶液中的存放时间对电氧化峰电流的影响.结果表明,在DMF 介质中工作电极的电流响应稳定性比在dioxane 介质中的好得多.在DMF 介质中存放21 h, NADH 的氧化电流仍高达原来的85%,而在二氧六环介质中存放3 h 便降至原来的52%.由于这一原因,在DMF 介质中NADH 电氧化实验的重复性也远比其在dioxane 介质中的好.

2.3 溶剂对NADH 氧化的影响

N,N'-二甲基甲酰胺和1,4-二氧六环是性质明显不同的两种溶剂,前者的偶极矩 $\mu = 12.88$ c/m,介电常数 $\epsilon = 37.0$,后者 $\mu = 1.50$ c/m, $\epsilon = 2.21^{[7]}$.在此两种介质中,NADH 反应动力学参数的差别可定性地由溶剂效应解释.由电荷传递的静电理论可知,反应物种在发生电荷转移之前必改变周围溶剂化层的结构.NADH 是偶极分子,其产物带正电荷,调整其溶剂化层所需的能量将随着溶剂的 ϵ 值增大而增大,因而电荷传递反应速度将随溶剂的 ϵ 值增大而减小.正如图1所示,在反应物浓度和电极电位保持不变的条件下,NADH 在二氧六环介质的氧化速度比在DMF 中的大.另一方面,从溶剂分子和反应物分子的相互作用可以预计,极性较强

的DMF与NADH的作用也较强些,可能由于形成分子间的缔合物,因此NADH在DMF中的表观扩散系数比在二氧六环中的小.虽然NADH在DMF介质中的氧化速度较小,但是响应电流的稳定性较好,显然较适于检测目的.溶剂的选择是有机相酶学中的一个重要问题,仍有必要作更多的比较研究.

A Study on Electrochemical Oxidation of Reduced Nicotinamide Coenzyme NADH in Organic Media

Yang Fangzu Wu Huihuang Xu Shukai Zhou Shaomin

(Dept. of Chem., State Key Laboratory for Physical

Chemistry of Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The behaviour of electrochemical oxidation of the reduced nicotinamide coenzyme NADH on glassy carbon was studied and some kinetic parameters were measured by means of voltammometry in the N-dimethylformamide (DMF) and 1,4-dioxane media respectively. The electrochemical oxidation of NADH shows completely irreversible both in the two solvents, and the diagnostic experiments support that the process involves a fast chemical step. The oxidation rate and the diffusion coefficient of NADH in DMF are smaller than those in 1,4-dioxane, but the response current is more stable in DMF. The experimental results are discussed by solvent effects.

Key words NADH, Electrochemical oxidation, Organic phase enzymology, bioelectrochemistry

References

- 1 Dryhurst G. *Electrochemistry of Biological Molecules*. New York: Academic Press, 1977:544
- 2 Bartlett P N, Tebbutt and Whitaker R G. Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry. *Progress in Reaction Kinetics*, 1991, 16:55~155
- 3 Blaedel W J and Haas R G. Electrochemical Oxidation of NADH Analogs. *Anal. Chem.*, 1970, 42(8):918~927
- 4 Dordick J S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 1989, 11:194~211
- 5 Saini S, Hall G F, Downs M E A, Turner A T P. Organic phase enzyme electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 249: 1~15
- 6 Southampton Electrochemistry Group. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. New York: Halsted Press, 1985:178~228
- 7 Reichardt C. *Solvent Effects in Organic Chemistry*. Weinheim: Verlag Chemie, 1979:263~270