

辅酶 I 电化学配位反应机理的紫外光谱电化学研究

马永钧 李根喜[✓] 龙亿涛 朱世民*

(南京大学化学系, 南京 210093)

Q552.02

O614.122

用薄层池原位紫外光谱电化学法研究了辅酶 I (NAD) 在银电极上的电化学配位反应机理。实验结果表明: NAD 能与溶出的银离子生成配合物, 该配合物的配位反应是一种可逆过程, 用光谱电化学的 Nernst 图解分析获得银离子与 NAD 配合物的主要存在形式是 $[\text{Ag}(\text{NAD})_2]^+$, 银离子是与 NAD 分子的腺嘌呤基团形成配合物的。配合物的银离子与银电极表面发生异相电子交换反应, 该电化学反应是受吸附控制的准可逆电极过程。

~~辅酶 I~~

辅酶 I

NAD

电化学

关键词: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 银电极 光谱电化学 配位反应

辅酶 I 化学名为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD), 其结构式如图 1, 它是一种广泛存在于生物体内参与生物化学电子转移过程的重要化合物^[1]。因此, 对 NAD 的电化学反应研究是一个活跃的课题^[2~4]。众所周知, 由于生物分子结构的复杂性以及易吸附于电极表面等原因, 对生物分子电化学反应机理的研究是一个有待发展的领域, 用银电极研究生物分子的电化学反应以及用表面增强拉曼光谱研

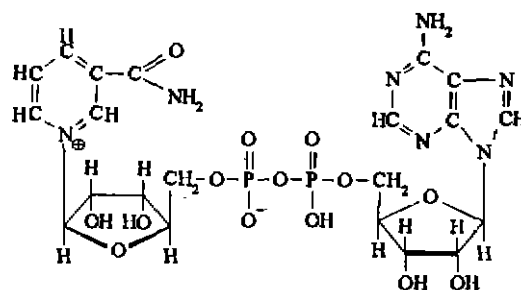


图 1 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的结构

Fig. 1 Structure of nicotinamide adenine dinucleotide

究银电极与生物分子间的相互作用已有一些报道^[5~7]。本文采用薄层池原位紫外光谱电化学法研究银电极上 NAD 的电化学反应机理, 得到了存在 $\text{Ag}^+ - \text{NAD}$ 配合物的实验结果。这对于了解银电极表面生物分子的电化学反应途径有重要意义。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

NAD 为生化试剂 (中国科学院上海生物化学研究所), 其他试剂均为分析纯。用石英亚沸重蒸馏水配制溶液。NAD 溶液是将一定量的 NAD 溶于 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HAc-NaAc 缓冲溶液 (pH=6.2) 中配制的。

BAS-100B 型电化学分析仪 (美国 BAS 公司) 用于循环伏安 (CV) 试验; MF-1A 型多功能

收稿日期: 1996-08-13。 收修改稿日期: 1996-12-24。

国家自然科学基金资助课题。

* 通讯联系人。

第一作者: 马永钧, 男, 33 岁, 硕士, 现为西北师范大学讲师。研究方向: 光谱电化学。

伏安仪(江苏电分析仪器厂)用于光谱电化学(SEC)实验中控制工作电极的电位;UV-240 型分光光度计(日本岛津公司)用于记录 SEC 实验的吸收光谱。薄层 SEC 池用于薄层 CV 和薄层 SEC 实验,它是由 Necolet 5DX FT-IR 分光光度计(美国 Necolet 公司)的池夹件、石英窗片($\Phi = 30 \text{ mm}$)、硅橡胶垫圈、银网栅工作电极、银/氯化银片参比电极、铂片对电极和聚四氟乙烯隔膜等组装而成的(池厚 0.2 mm 、池容量 0.12 ml 、光透率 65%)。

1.2 实验方法

CV 实验:用银微盘工作电极($\Phi = 0.5 \text{ mm}$)、饱和甘汞电极(SCE)和铂丝对电极电化学池。实验前银微盘电极先用细砂纸(1200 目)抛光处理,再经 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀硝酸浸泡和重蒸馏水淋洗,实验时将三电极插入新配制的 NAD 溶液中,通氮除氧 5 min 后,使液面维持氮气,在选定的电位区间和扫描速度下记录 CV 图。

薄层 CV 实验:使用前述薄层 SEC 池,实验前银网工作电极经低温火焰灼烧 1 min、在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀硝酸中浸泡 20 min 和用重蒸馏水淋洗后装入薄层 SEC 池,将经过通氮除氧的新制 NAD 溶液用注射器注入薄层池,在选定的电位区间和扫描速度下记录薄层 CV 图。

SEC 实验:薄层 SEC 池的测试溶液的制备和灌装同薄层 CV 实验。用 MF-1A 型多功能伏安仪控制所施加的电位,在每次施加电位后等待 2 min,使达电位平衡,先用不放溶液和电极的空吸收池为参比,在起始波长处校零后,再记录以空池为参比的紫外光谱。

2 结果与讨论

2.1 NAD 在银微盘电极上的电化学响应

使用银微盘工作电极的普通电解池,NAD 的 CV 曲线显示一对氧化还原峰。还原峰电流(i_{pc} 或氧化峰电流(i_{pa})随电位扫描速度(v)的增大而呈线性增长, $i_{pc} \sim v$ 和 $i_{pa} \sim v$ 关系线的斜率分别为: $S_c = 0.93$ 和 $S_a = 0.81$ 。在低扫速($v = 10 \text{ mV/s}$)时, $E_{pc} = 0.112 \text{ V}$ (vs. SCE) 和 $E_{pa} = 0.265 \text{ V}$ (vs. SCE); E_{pc} 和 E_{pa} 随 v 的增大而略有正移。 $i_p \sim v$ 关系线的斜率和 ΔE_p 值表明:在银微盘电极上发生的电化学反应是受吸附控制的准可逆电极过程^[8]。据文献[2,4]报道,NAD/NADH 电对在固体电极上有较大的过电位,本实验的一对峰的电位与 NAD/NADH 电极的电位相差甚大,因此不是 NAD 分子直接氧化及还原呈现的电流峰,可能是它与银离子形成的配合物产生的氧化还原峰。

2.2 NAD 在银网工作电极薄层池中的电化学响应

使用银网工作电极薄层池,NAD 的 CV 曲线如图 2。与使用银微盘电极的 CV 曲线相似, I_A 和 I_B 是一对与 NAD 有关的伏安响应峰,改变 v 这一对峰的伏安响应情况与银微盘电极的情况相同,只是由于使用了薄层池和 Ag/AgCl 参比电极峰电位发生了负移。由图 2 可见在较正的电位区间还存在一对

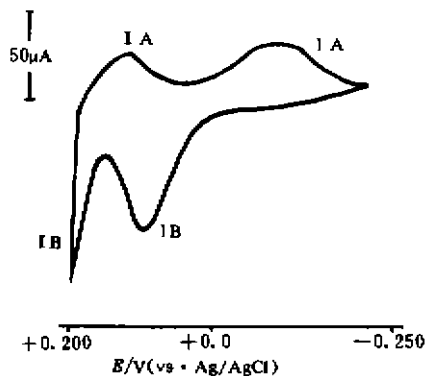


图 2 在银网栅工作电极薄层光谱电化学池中的 NAD 的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltamperogram of NAD in reticulated silver working electrode thin layer SEC cell
solution, $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD in $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc-NaAc buffer
scan rate, 2 mV/s

峰 I_A 和 I_B , 经与空白试液 CV 曲线对照, 表明 I_A 和 I_B 分别是由 Ag^+ 的还原和 Ag 的氧化造成的。

2.3 NAD 的原位紫外光谱电化学响应

在原位紫外光谱电化学实验中, 当工作电极的电位控制在 I_A 峰电位值时, 薄层池中 NAD 溶液的紫外吸收光谱与未加电位时样品溶液的紫外吸收光谱完全一样, 这个结果表明: 在 I_A 峰电位值时, NAD 是不会直接发生电化学反应的, 当控制的电位逐渐向正移动到 Ag^+ 溶出的电位区间时, 得原位 SEC 吸收光谱如图 3(A), 可见在 315 nm 区逐渐出现一个新吸收峰, 同时在 257 nm 处 NAD 的吸收峰逐渐下降, 在 274 nm 和 244 nm 处形成二个等吸收点。当将电位再作逆向移动时得图 3(B)。此时 315 nm 区间的吸收逐渐下降并最后消失, 而 257 nm 处的吸收峰又逐渐回升至原有值。这个实验结果表明, 电解溶出的 Ag^+ 与 NAD 形成了配合物, 该配合物在 315 nm 处有吸收, 正向移动电位和负向移动电位的吸收光谱变化说明 Ag^+ 与 NAD 的配位反应是一可逆过程。当在样品溶液中加入微量硝酸银溶液时, 测得的紫外吸收光谱与薄层池施加 Ag^+ 溶出电位时测得的光谱一致。这证明了 Ag^+ -NAD 配合物的存在。结合在银网工作电极薄层池中 NAD 的电化学响应特性, 可以判明, NAD 在银电极上的电化学反应是先由电解氧化溶出的 Ag^+ 与 NAD 形成配合物并吸附于电极表面, 然后再在电极表面发生异相电子交换反应的。

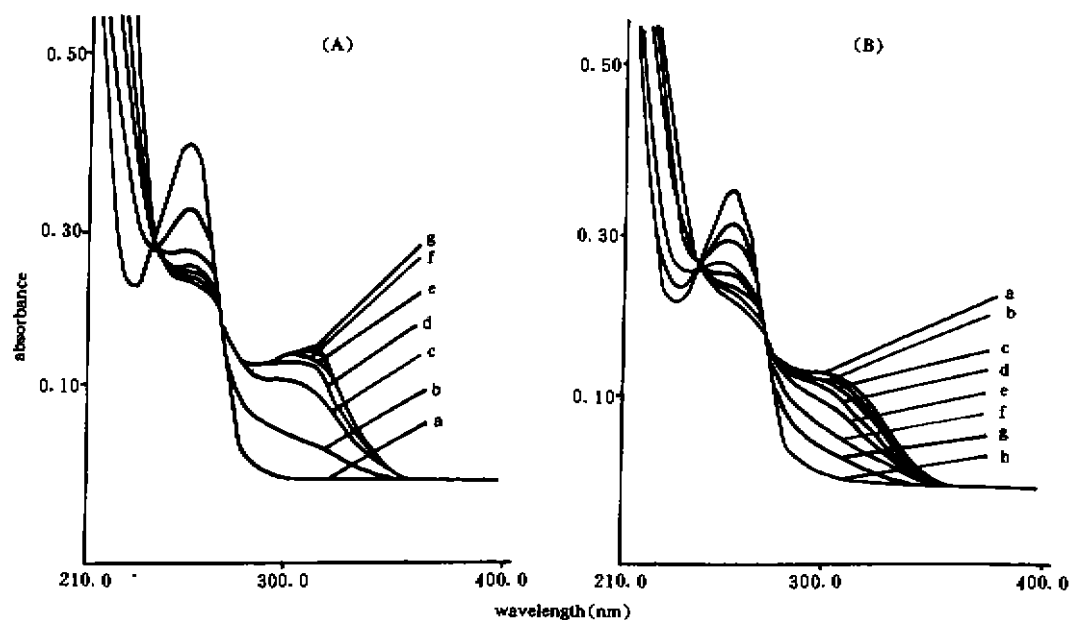


图3 NAD 的紫外光谱电化学吸收光谱

Fig. 3 UV-SEC spectra of NAD

solution; $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD in $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc-NaAc buffer

controlled potential; (A) a. 0.10, b. 0.15, c. 0.20, d. 0.25, e. 0.30, f. 0.35, g. 0.40 V(vs. Ag/AgCl); (B) a. 0.30, b. 0.25, c. 0.20, d. 0.15, e. 0.10, f. 0.05, g. 0.0, h. -0.05 V(vs. Ag/AgCl), waiting 2 min for each controlled potential, then recorded spectra

2.4 现场 UV-SEC 数据的能斯特图解析

图3中257 nm和315 nm处的吸收值与所加电位值下 Ag^+ 的浓度有关。薄层池的电解为有限体积的耗竭性电解,所以相应电位值下溶出的 Ag^+ 浓度是一定的。由于 Ag^+ 浓度低,配位反应可以进行得比较彻底,即在 NAD 过剩时配合物应以最大配位数形式为主。

设315 nm处的最大吸光度值为 A_∞ ,最小吸光度值为 A_0 ,中间某一控制电位值时的吸光度值为 A 。薄层腔内未加电位前的 NAD 总浓度为 C 。根据配位平衡原理有

$$C = [\text{NAD}] + \beta_1[\text{Ag}^+][\text{NAD}] + \beta_2[\text{Ag}^+][\text{NAD}]^2 + \cdots + \beta_n[\text{Ag}^+][\text{NAD}]^n$$

式中 $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ 为所设配合物的逐级生成常数。

$$[\text{Ag}^+] = \frac{C - [\text{NAD}]}{\beta_1[\text{NAD}] + \beta_2[\text{NAD}]^2 + \cdots + \beta_n[\text{NAD}]^n} \quad (1)$$

银离子的最高配位数为4,它与 NAD 可能形成1:1和1:2两种形式的配合物^[4]。假定生成的主要为某单一配比的配合物,则 Nernst 方程式可表述为^[9]:

$$E = E^\circ + 0.059 \lg \frac{[\text{Ag}][\text{NAD}]^n}{[\text{NAD}]^n} \quad (n=1,2) \quad (2)$$

因为吸光度与相应离子的浓度成正比,用吸光度代替浓度,则 Nernst 方程式为^[10]:

$$E = E^\circ + 0.059 \lg [\epsilon b]^{n-1} n^* + 0.059 \lg \frac{A - A_0}{(A_\infty - A)^n} \quad (n=1,2) \quad (3)$$

式中 ϵ 为配合物在315 nm处的摩尔吸收系数, b 为吸收池厚。如果配位数 n 合适, E 与 $\lg \frac{A - A_0}{(A_\infty - A)^n}$ 项应呈简单线性关系,否则就不呈直线。

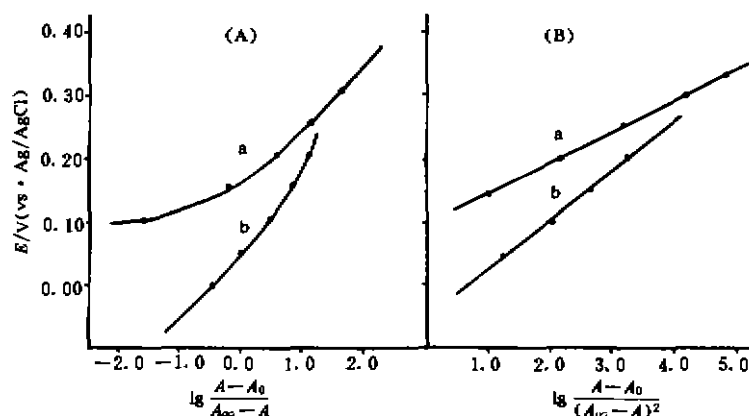


图4 在315 nm处吸光度与电位值的 UV-SEC 的能斯特图

Fig. 4 Nernst figure of the data of UV-SEC at 315 nm

conditions is the same as figure 3. (A) relationship of E with $\lg \frac{A - A_0}{A_\infty - A}$; a, oxidation process, b, reduction process;

(B) relationship of E with $\lg \frac{A - A_0}{(A_\infty - A)^2}$; a, oxidation process, b, reduction process

315 nm 处的吸光度与电位的 Nernst 关系如图4。图4(A)所示 $E \sim \lg \frac{A - A_0}{A_\infty - A}$ 关系线为曲线,而图4(B)所示 $E \sim \lg \frac{A - A_0}{(A_\infty - A)^2}$ 关系线为直线。图4(B)上对应于还原和氧化过程的两条直线的截距和斜率分别为: $b_c = -0.50$ V 和 $b_a = +0.098$ V; $s_c = 0.073$ 和 $s_a = 0.050$ 。 s_c 和 s_a

与理论值 0.059 颇接近,截距值与图 2 中 I_A 和 I_B 峰电位值相接近。由此可知, Ag^+ 与 NAD 的配合物主要为 1:2 形式。这一结果与假设的(2)式相符。

对 257 nm 处电位与吸光度关系作光谱电化学的 Nernst 图解分析,可以得出同样的结果。

2.5 结 论

NAD 分子的电活性基团为烟酰胺环^[1], Ag^+ 的配位作用常发生于腺嘌呤基团上^[6]。根据本文 Nernst 图解分析,可以推测 Ag^+ 与 NAD 配合物可能的结构如图 5,可知 NAD 在

银电极上的电化学反应机理是:银电极电解氧化溶出 Ag^+ ,与 NAD 分子的腺嘌呤基团发生配位反应,生成以 $[Ag(NAD)_2]^+$ 为主要形式的配合物并吸附于电极表面,然后通过该配合物配合态的银离子与银电极发生异相电荷转移反应。

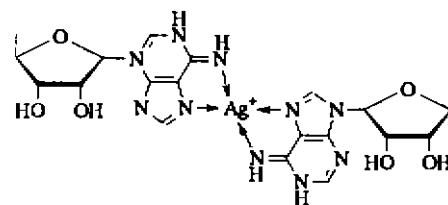


图 5 $[Ag(NAD)_2]^+$ 的结构

Fig. 5 Structure of $[Ag(NAD)_2]^+$

参 考 文 献

- [1] Harper, H. A.; Rodwell, V. W.; Mayes, P. A. 著,王明运译,生物化学评论,北京:科学出版社,1985,198 页
- [2] Druyhurst, G. *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press, New York, 1977, p. 473.
- [3] Ohsaka, T.; Tanakka, K.; Toduda, K. *J. Chem. Soc. Chemical Communication*, 1993, 3, 222.
- [4] Bresnahan, W. T.; Elving, P. T. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2379.
- [5] Li, Genxi; Liao, Xingmin; Fan, Huiqun; Chen, Hongyan *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 369, 267.
- [6] Siiman, O.; Rivellini, R.; Patel, R. *Inorg. Chem.*, 1988, 27, 3940.
- [7] Taniguchi, I.; Umekiya, K.; Yaoukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.*, 1986, 202, 315.
- [8] Brad, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons, 1980, pp. 519—523.
- [9] Briggmac Jr, P. T.; Mo, C. *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1465.
- [10] Piljac, I.; Tkadec, M.; Grabaric, B. *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1369.

ELECTROCHEMICAL COORDINATE REACTION MECHANISM OF NICOTINAMIDE ADEMINE DINUCLEOTIDE ON SILVER ELECTRODE BY ULTRA-VIOLET SPECTROELECTROCHEMISTRY

Ma Yongjun Li Genxi Long Yitao Zhu Shimin

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

The electrochemical coordinate reaction mechanism of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) on silver electrode has been studied by in situ ultra-violet spectroelectrochemistry. The results of experiment showed that NAD could formed coordination compound with silver ion which came from the electrolysis oxidation of silver electrode. The coordination reaction was a reversible process. The coordination ratio of silver ion with NAD was analyzed by spectroelectrochemical Nernst figures. The main complex of silver ion with NAD was $[\text{Ag}(\text{NAD})_2]^+$. The coordination reaction formed by silver ion with adenine function of NAD. The electrochemical reaction mechanism of the complex on silver electrode was discussed. It is clear that the electrochemical reaction of the complex is a quasi-reversible and adsorptive process, The heterogeneous electron exchange reaction happened on the surface of silver electrode with nicotinamide function of NAD.

Keywords: nicotinamide adenine dinucleotide silver electrode spectroelectrochemistry
coordinate reaction