

## 研究简报

## 胆红素 LB 膜的电化学行为研究

白 燕<sup>\*1</sup> 李继革<sup>1,2</sup> 欧阳健明<sup>1</sup> 郭书好<sup>1</sup> 黄素兰<sup>1</sup> 薛 萍<sup>1</sup><sup>(1)</sup>暨南大学化学系, 生物矿化工程与结石防治中心, 广州 510632)<sup>(2)</sup>宁波市卫生防疫站, 宁波 315010)

关键词: 胆红素 LB 膜 微分脉冲伏安法

分类号: O614.81 O648 O657.15

胆红素 (BR) 是存在于动物体内的一种重要生物物质, 也是人和绝大多数哺乳动物体内血红蛋白等含铁卟啉化合物分解代谢的产物和代谢中间体。它是一种内源性抗氧化剂, 对肝细胞的再生具有积极的作用, BR 常以线状四吡咯或类卟啉结构的形式存在。胆红素及其金属配合物在水溶液<sup>[1-6]</sup>与有机介质 (如 DMF 和 DMSO)<sup>[7-9]</sup>中的电化学行为, 文献上已有较多报道。前文<sup>[10-12]</sup>我们报道了胆红素可在不同亚相 (酸性、中性及部分金属离子) 表面形成 Langmuir-Blodgett (LB 膜); 在有磷脂存在时, 其成膜性能更佳<sup>[13]</sup>。由于 LB 膜同生物体内的生物膜非常接近, 且生物分子与电极之间的电子转移在某种程度上类似于生物分子之间的转移, 因而, 将胆红素的 LB 膜转移到电极表面, 开展胆红素的电化学行为的研究, 将有助于了解胆红素在生物体内的转化机理、生物体内细胞膜之间的电子传递及能量转换, 对于揭示胆红素结构和功能的关系具有重要意义。为此, 我们在  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4) 缓冲溶液中研究了胆红素 LB 膜在玻碳电极上的电化学行为, 并与其在溶液中的行为进行了比较。

## 1 实验部分

## 1.1 主要仪器和试剂

拉膜仪为东南大学设计的微机控制双向压缩 WM-II 型 LB 膜槽自动控制系统。电化学实验使用

BAS-100B 型电化学分析仪 (BAS 公司, 美国)。实验使用三电极体系: Ag/AgCl 为参比电极, 铂丝为对电极, 胆红素 LB 膜修饰玻碳电极为工作电极。

胆红素 (BR)、脑磷脂 (DPPE) 和二氯二甲基硅烷为 Sigma 公司产品。其它试剂均为分析纯。高纯  $\text{N}_2$  (广州气体厂)。丙酮和四氯化碳重蒸后使用。实验用水均为二次蒸馏水, 所有实验均在室温下进行。

## 1.2 胆红素 LB 膜玻碳电极的制备

玻碳电极在使用前先用甲醇和二次蒸馏水洗净表面, 再用  $\text{Al}_2\text{O}_3$  在 Microcloth 上抛光成镜面, 超声波清洗后, 依次以氯仿、乙醇清洗, 再于体积比为 1:15 的二氯二甲基硅烷四氯化碳液中疏水处理, 最后以重蒸过的丙酮清洗后干燥待用。

将一定体积的  $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胆红素和脑磷脂 (2:1) 的  $\text{CHCl}_3$  混合溶液缓慢均匀滴入拉膜仪槽内的亚相 (pH = 5.7) 表面, 待溶剂在表面扩散并挥发约 20min 后, 压缩单分子层膜至一定表面压 (一般为  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) 并保持约 30min, 采用垂直提拉法将膜转移到电极表面。每提完一层膜, 停留 2min 后再提下一层。该工作在一个无尘箱内完成, 温度为  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。制备好的胆红素 LB 膜修饰电极置于干燥器中保存待用。

## 1.3 胆红素 LB 膜的电化学研究方法

将 20.00mL  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4) 缓冲溶液通氮气除氧 15min, 在氮气氛中于  $0 \sim +700 \text{ mV}$  范围进行循环伏安扫描, 或在扫描

收稿日期: 2002-02-07。收修改稿日期: 2002-05-08。

国家自然科学基金、基金重点资助课题 (No. 20031010)。

\* 通讯联系人。E-mail: baiyemail@163.net

第一作者: 白 燕, 女, 41 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 生物电化学和生物电分析化学。

速度  $5\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 、脉冲振幅为  $50\text{mV}$  时, 进行微分脉冲伏安 (DPV) 扫描, 记录其循环伏安曲线和微分脉冲伏安曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胆红素 LB 膜的电化学活性

#### 2.1.1 胆红素 LB 膜的伏安特性

图 1 为 8 层胆红素 LB 膜修饰玻碳电极在  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4) 缓冲溶液中, 扫描速度  $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$  时的循环伏安曲线。曲线在  $+453\text{mV}$  时有一个氧化峰, 没有还原峰的存在, 随扫描速度的增加氧化峰电位正移, 峰电流增大且峰电流与扫描速度近似成正比关系, 搅拌溶液对其伏安特性无明显影响, 说明胆红素 LB 膜呈现不可逆表面波的伏安特性。

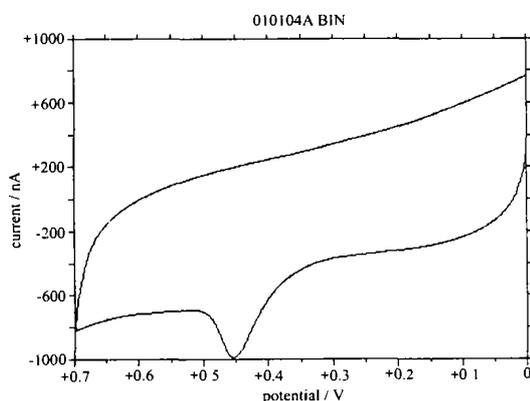


图 1 胆红素 LB 膜的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammogram of GC electrode modified by 8-layer LB film of bilirubin in the electrolyte solution of  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4) at  $50\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$

前人的研究表明: 在水溶液中胆红素氧化是一个伴有多个中间步骤的过程, 且存在一步或几步慢反应, 这一氧化过程会使电极钝化<sup>[8]</sup>。对胆红素 LB 膜循环伏安实验表明, 无论是先阳极扫描 ( $0\text{mV} \rightarrow 700\text{mV}$ ) 还是阴极扫描 ( $700\text{mV} \rightarrow 0\text{mV}$ ) 均不出现还原峰, 但是其氧化峰电流前者大于后者。采用微分脉冲伏安法考查不同电位下静置 10 min 对峰电流的影响, 在 0.10, 0.30, 0.40V 处静置后, 对峰电流信号几乎无影响; 在 0.45V 处静置后, 峰电流明显降低; 在 0.50, 0.60V 处静置后, 没有胆红素氧化峰的出现。此时, 即使向溶液中加入胆红素也不会产生胆红素氧化峰。由此说明, 在一定的电压 ( $\geq 0.45\text{V}$ ) 下, 胆红素膜开始氧化, 其产物或中间物使

电极表面钝化。无论是水溶液中的胆红素, 还是电极表面上 (LB 膜) 的胆红素被氧化后, 其产物或中间物质的吸附或聚合作用改变了电极表面状态使得电极钝化。

#### 2.1.2 电解质溶液及 pH 值对电化学信号的影响

分别以  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH,  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KOH,  $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl-HCl}$  作支持电解质, 比较研究了胆红素及其 LB 膜的微分脉冲伏安信号。结果表明: 胆红素及其 LB 膜在上述电解质溶液中均有电化学响应, 并且质子参与电化学过程, 但二者伏安特性有较大差异。例如: 在  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH 中胆红素 LB 膜在  $410\text{mV}$  左右出现一个氧化峰, 而胆红素溶液在  $310\text{mV}$  和  $410\text{mV}$  左右出现两个氧化峰。胆红素 LB 膜在 pH = 4.6 ~ 5.4 的  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH 中的重现性好, 故以下实验中均选用  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4) 缓冲溶液作为底液。

### 2.2 胆红素 LB 膜性能对电化学信号的影响

#### 2.2.1 胆红素 LB 膜层数的影响

LB 膜随转移方式的不同, 可得到三种不同的结构, 即 X 型、Y 型和 Z 型<sup>[14]</sup>。我们所得到的 LB 膜为 Y 型 LB 膜。控制 LB 膜层数, 可以得亲水基朝外或疏水基朝外的胆红素 LB 膜。实验表明: 最外层是亲水基或疏水基时 (奇数层或偶数层) 胆红素 LB 膜的伏安特性相同, DPV 的峰电流和峰电位的变化规律相同。

在沉积压  $\pi = 25\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 、提膜速度  $v = 3\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ , DPPE 与 BR 摩尔比  $r_{\text{BR}} = 0.67$  时, 胆红素 LB 膜层数对氧化峰峰电流 ( $i_p$ )、峰电位 ( $E_p$ ) 的影响如图 2 所示。实验结果表明: 随 LB 膜层数增加, 胆红素的氧化峰正移, 10 层以后渐渐趋于稳定。在  $N_{\text{LB}} < 10$  时, 随 LB 膜层数的增加, 峰电流  $i_p$  明显增大; 当  $N_{\text{LB}} > 12$  层时, 随 LB 膜层数的增加其峰电流下降。由此说明 LB 膜对电子传递有一定的屏蔽效应, 所以随层数增加氧化峰正移。随层数增加电极表面胆红素的量增加, 因而峰电流增大, 但当 LB 膜过厚 ( $N_{\text{LB}} > 12$ ) 屏蔽效应起主导作用时, 峰电流  $i_p$  明显下降。因为胆红素的氧化是膜网电子传递, 在氧化过

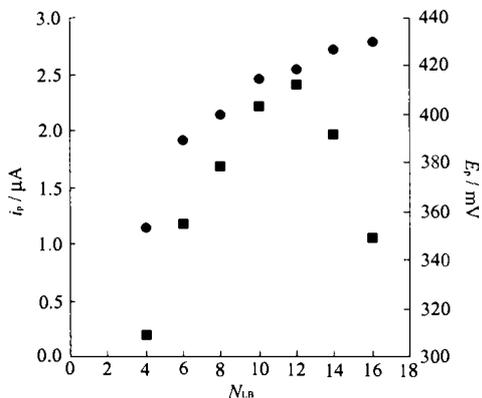


图 2 峰电流和峰电位与胆红素 LB 膜层数的关系

Fig. 2 Relationship between  $N_{LB}$  and  $i_p$ ,  $E_p$

●:  $E_p$ , ■:  $i_p$

程中为了保持膜的电中性, 溶液中将有阴离子渗进 LB 膜, 在膜层大于 12 后, 阴离子的渗透被阻碍而使峰电流下降。

### 2.2.2 LB 膜中胆红素摩尔比的影响

固定其它条件当  $N_{LB} = 8$  层时, 峰电流、峰电位与胆红素和脑磷脂摩尔比 ( $r_{BR}$ ) 的关系如表 1 所示, 当  $r_{BR} = 0.67$  ( $n_{BR}: n_{DPP} = 2:1$ ) 时, 其峰电流最高; 当  $r_{BR} = 0$  ( $n_{BR}: n_{DPP} = 0:1$ ), 即只有磷脂而没有胆红素时, 无氧化峰的存在, 说明单一磷脂在  $0 \sim +650$  mV 范围内没有电化学信号; 而当  $r_{BR} = 1.0$  即只有胆红素时, 其峰电流明显比含有磷脂 (除  $r_{BR} = 0.33$ ) 的峰电流的低, 且磷脂-胆红素混合 LB 膜的 DPV 峰形对称性好, 峰电位均负移。由此可知, 当向胆红素掺入成膜性好的脑磷脂时, 可改善胆红素的成膜能力、而且混合 LB 膜在电极基体上的附着能力大为增加<sup>[13, 14]</sup>, 使得 LB 膜的电化学信号增强。

表 1 LB 膜中胆红素和磷脂的摩尔比对峰电流和峰电位的影响

Table 1 Relationship between Molar Ratio of Bilirubin and  $E_p$ ,  $i_p$

$r_{BR}$ *	0	0.33	0.5	0.67	0.75	0.8	1.0
( $n_{BR}: n_{DPP}$ )	0:1	0.5:1	1:1	2:1	3:1	4:1	1:0
$E_p/mV$	—	412	389	423	420	443	462
$i_p/\mu A$	No peak	0.289	0.673	1.691	1.437	1.024	0.389

\*:  $r_{BR} = n_{BR} / (n_{DPP} + n_{BR})$

### 2.2.3 沉积压 $\pi$ 的影响

在  $r_{BR} = 0.67$ ,  $N_{LB} = 8$ ,  $v = 3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 峰电流  $i_p$ 、峰电位  $E_p$  与沉积压  $\pi$  的关系如表 2 所示, 可见,  $\pi$  越高, 峰电流越大。这是因为随着沉积压的增高, 胆红素的有序性大大增加, 膜的堆积密度增大, 从而

使转移到电极表面的胆红素量增多。在实验过程中, 峰电流  $i_p$  是主要的测量参数, 当  $\pi = 25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  时, 其测量的灵敏度和精密性已可满足我们实验的要求, 故选  $\pi = 25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

表 2 沉积压  $\pi$  与峰电流和峰电位的关系

Table 2 Relationship between  $\pi$  and  $E_p$ ,  $i_p$

$\pi / (\text{mN} \cdot \text{m}^{-1})$	15	18	20	22	25	30
$E_p/mV$	—	402	405	410	417	413
$i_p/\mu A$	No peak	0.456	0.838	1.178	1.691	2.231

### 2.2.4 提膜速度的影响

提膜速度对沉积在电极表面上的 LB 膜的均匀性有影响。采用垂直提拉法提膜时, 亚相表面的单分子层会产生非均匀性流动, 因此容易引起变形。提膜速度过快, 非均匀流动性增强, 导致膜层质量劣化。为此, 考查了提膜速度对峰电流的影响。在  $r_{BR} = 0.67$ ,  $N_{LB} = 8$ ,  $\pi = 25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  时, 峰电流  $i_p$  和提膜速度  $v$  的关系如图 3 所示。当  $v$  大于  $4 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 峰电流  $i_p$  开始下降。在我们的实验过程中, 选  $v = 3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

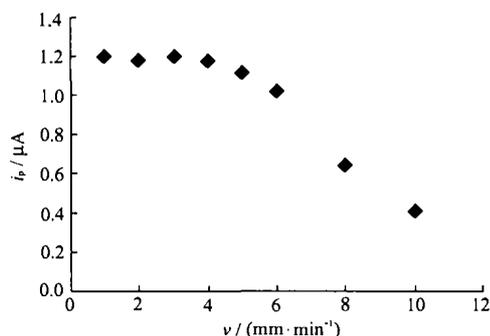


图 3 峰电流  $i_p$  和提膜速度  $v$  的关系

Fig. 3 Relationship between deposition rate  $v$  and  $i_p$

综上所述, 向胆红素中掺入一定量的脑磷脂制备的混合 LB 膜具有良好的电化学活性。由于胆红素分子有序的紧密排列在电极表面, 活性中心密度较大, 所以胆红素 LB 膜修饰电极的电信号较强, 但是增加膜的层数同时会增加电子传递的阻力。因此, 胆红素 LB 膜修饰玻碳电极的最佳制备条件为: 沉积压  $\pi = 25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , LB 膜的层数  $N_{LB} = 8$ , 胆红素与脑磷脂的摩尔比  $r_{BR} = 0.67$  ( $n_{DPP}: n_{BR} = 1:2$ ), 提膜速度  $v = 3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

### 2.3 胆红素 LB 膜修饰电极的电化学稳定性

我们考察了胆红素 LB 膜修饰电极放置时间对其电化学活性的影响。实验结果如表 3 所示, 新制备

表 3 胆红素 LB 膜修饰电极的稳定性

Table 3 Stability of the Electrode Modified by LB Films of Bilirubin\*

storage time/day	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	average
$E_p/mV$	410	415	410	413	420	416	415	412	418	410	412	$414 \pm 2.8$
$i_p/\mu A$	1.635	1.629	1.637	1.620	1.640	1.666	1.621	1.652	1.645	1.626	1.645	$1.638 \pm 0.011$

Experimental conditions:  $N_t = 8$  layers,  $\pi = 25mN \cdot m^{-1}$ ,  $v = 3mm \cdot min^{-1}$ ,  $0.2mol \cdot L^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4)

\*Results given in the table were the measure average of three times

的电极和制备后存放 20 天内的电极均有良好的电化学活性, 而且重现性较好, 表明该 LB 膜电极的稳定性很好。

#### 2.4 胆红素 LB 膜、铸膜和在溶液中电化学信号的比较研究

在  $0.2mol \cdot L^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.4) 中, 胆红素在溶液中、用滴涂法滴涂于电极表面得到胆红素 BR 铸膜修饰电极和胆红素 LB 膜转移于电极表面制得胆红素 LB 膜修饰电极的微分脉冲伏安曲线如图 4 所示。可见, 胆红素在溶液中的伏安性质与其以 LB 膜或铸膜形式修饰于电极表面上有明显不同。如图 4A 所示, 溶液中的胆红素有两个氧化峰, 即 +305mV (峰 II)、+400mV (峰 I), 与 W. R. Jin 等<sup>[1]</sup>在  $0.2mol \cdot L^{-1}$  HAc-NaAc-50% EtOH (pH = 5.0) 的溶液中得到的结果一致。胆红素铸膜修饰电极和胆红素 LB 膜修饰电极的伏安性质 (图 4. B 和图 4. C) 基本相同, 只是峰电位稍有不同, 分别为 +400mV 和 +420mV。上述结果与其他可形成 LB 膜的电活性物质的伏安性质一致<sup>[15]</sup>。

以上研究表明, 电极表面上的胆红素处于有序状态 (LB 膜) 和无序状态 (铸膜) 其电化学特性相同, 同时胆红素 LB 膜的取向即最外层分子是亲水基或疏水基对其电化学特性无显著影响, 说明胆红素氧化过程即胆红素中两个吡咯环之间的中心甲基桥氧化成次甲基成为胆绿素<sup>[8]</sup>, 与其分子的取向及排列是否有序无关。但是胆红素膜的厚度如胆红素 LB 膜的层数对其电化学性质有影响, 随着层数增加, 一方面胆红素分子活性中心密度增大, 电化学信号增大; 另一方面胆红素膜分子的高度致密排列具有较强的屏蔽效应, 导致氧化峰电位正移, 并且达到一定层数后峰电流下降。相对于胆红素溶液而言, LB 膜修饰于电极表面其电子传输更容易进行, 胆红素 LB 膜修饰电极具有更灵敏的电化学响应, 同时, LB 膜中的胆红素分子参加电极反应, 没有扩散因素的影响, 所以氧化过程与其在溶液中有明显的差异, 如氧化峰的个数及峰电位不同, 说明胆红素的氧化过程

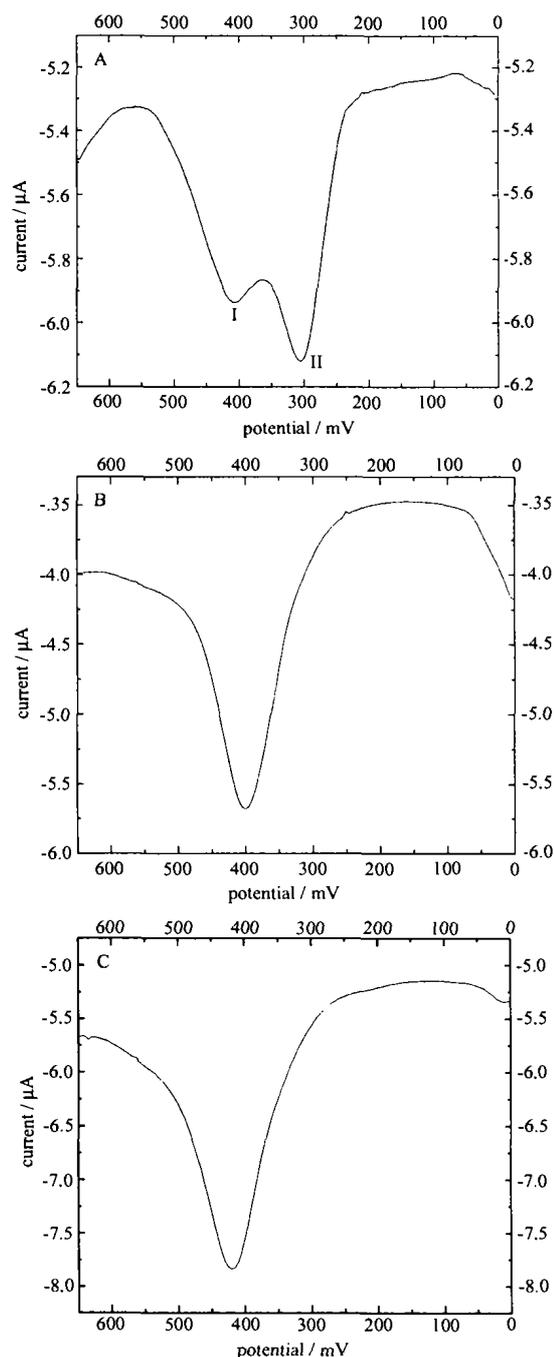


图 4 胆红素在溶液中、胆红素 BR 铸膜修饰电极和胆红素 LB 膜修饰电极的微分脉冲伏安曲线

Fig. 4 Differential pulse voltammetry of bilirubin (A): solution (B): cast film and (C): LB film

主要取决于电子或物质传输过程。

### 参 考 文 献

- [1] Jin W. R., Zhao X., Ding Ch. et al *Anal. Lett.*, **1992**, **25** (8), 1411.
- [2] Jin W. R., Zhao X., Chen D. et al *Anal. Chim. Acta*, **1992**, **268**, 185.
- [3] Wang J., Luo D. B., Farias P. A. M. *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, **185**, 61.
- [4] ZENG Bai-Zhao(曾百肇), ZHOU Xing-Yao(周性尧) *Fenxi Kexue Xuebao(J. Analytical Science)*, **1994**, **10**(1), 37.
- [5] Thomas R. K., Akingbe O. O. *Clin. Chem.*, **1981**, **27**(7), 1295.
- [6] ZENG Bai-Zhao(曾百肇), DING Jun(丁 军), ZHOU Xing-Yao(周性尧) *Fenxi Huaxue(Chinese J. of Analytical Chemistry)*, **1993**, **21**(6), 621.
- [7] Paolo L., Paolo M., Diego M. et al *Electrochimica Acta*, **1981**, **26**(4), 541.
- [8] NIU Jian-Jun(牛建军), DONG Shao-Jun(董绍俊) *Zhongguo Kexue B(Science in China, Series B)*, **1994**, **24**(3), 251.
- [9] Van Norman J. D. *Anal. Chem.*, **1973**, **45**, 173.
- [10] Ouyang Jianming, Li Chuan, Li Yiqun et al *Thin Solid Films*, **1999**, **348**, 242.
- [11] Ouyang Jianming, Li Chuan, Ling Weihai et al *J. Chem. Research (S)*, **1999**, Issue **1**, 276.
- [12] OUYANG Jian-Ming(欧阳健明), LI Chuan(李 串), LIN Wei-Han(林伟汉) *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorganic Chemistry)*, **1999**, **15**(4), 487.
- [13] Ouyang J. M., Li Chuan, Ling Weihai et al *Mol. Cryst. Liq. Cryst*, **1999**, **337**, 129.
- [14] DONG Shao-Jun(董绍俊), CHE Guang-Li(车广礼), XIE Yuan-Wu(谢远武) *Chemically Modified Electrodes(化学修饰电极)*, Beijing: Science Press, **1995**, p18.
- [15] YE Shu-Yu(叶淑玉), GUO Du(郭 渡), LU Tian-Hong(陆天虹), DONG Shao-Jun(董绍俊) *Fenxi Huaxue(Chinese J. Analytical Chemistry)*, **1991**, **19**(5), 612.

## Investigation on Electrochemical Behavior of the Langmuir-Blodgett film of Bilirubin

BAI Yan<sup>\*·1</sup> LI Ji-Ge<sup>1,2</sup> OUYANG Jian-Ming<sup>1</sup> GUO Shu-Hao<sup>1</sup> HUANG Su-Lan<sup>1</sup> XUE Ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Chemistry, Center of Biomineralization Engineering and Calculi Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

(<sup>2</sup> Sanitary and Anti-epidemic station of Ningbo, Ningbo 315010)

The electrochemical behavior of mixed Langmuir-Blodgett (LB) film of bilirubin and phosphatidyl ethanolamine on glassy carbon electrode were investigated with cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. The results prove that bilirubin Langmuir-Blodgett film has a cathodic peak of +420mV in 0.2mol · L<sup>-1</sup> HAc-NaAc-50% EtOH(pH = 5.4) solution. The peak current increases with the layer number of bilirubin LB film in the range of 1 to 12 layers. The result of the electrochemical behavior of bilirubin in ordered LB film was also compared with that in cast film and in aqueous solution at glassy carbon electrode. We found that bilirubin has the similar electrochemical behavior in LB film to in cast film, but different from that in aqueous solution.

**Keywords:** bilirubin langmuir-Blodgett differential-pulse voltammetry