

铬(VI)与谷胱甘肽作用及其中间态配合物形成的电化学表征

杨培慧^{*1,2} 张文豪¹ 赵秋香¹ 蔡继业¹

(¹暨南大学化学系, 广州 510632)

(²中国科学院安徽光学精密机械研究所, 合肥 230026)

摘要: 本文采用电化学方法, 对谷胱甘肽(GSH)与重铬酸钾的相互作用及其中间态配合物的形成过程进行研究。结果表明: 在 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中, GSH 浓度为 Cr(VI)浓度 5 倍以上时, Cr(VI)与 GSH 作用完全并形成一新的中间态配合物, 该中间态配合物于 +0.21 V 和 +0.36 V(vs SCE)处产生一对新的氧化还原峰, UV-Vis 的吸收光谱进一步证明了中间态配合物的形成。该配合物不稳定, 在一定时间内缓慢分解, 其电化学与 UV-Vis 光谱动力学信息同步。进一步探讨了 GSH 与 Cr(VI)作用的电极反应机理。当 Zn(II)存在于该体系时, Zn(II)对中间态配合物的生成和分解过程起着双向催化作用。

关键词: 重铬酸钾; 谷胱甘肽; 电化学分析; 中间态配合物

中图分类号: O614.61⁺1; O646

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)04-0495-05

Electrochemical Characterization on the Formation of Chromium(VI) and Glutathione Intermediates

YANG Pei-Hui^{*1,2} ZHANG Wen-Hao¹ ZHAO Qiu-Xiang¹ CAI Ji-Ye¹

(¹Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632)

(²Anhui Institute of Precision Optics and fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230026)

Abstract: The interaction between chromium(VI) and Glutathione (GSH) and the formation of their intermediate complexes were studied by electrochemical method. The results showed that a new pair of redox peaks were obtained at +0.21 V and +0.36 V (vs SCE) in acetate buffer solution (pH 5.6) when the concentration of GSH was five times more than that of Cr(VI). The electrochemical dynamics revealed that the peaks of +0.21 V and +0.36 V were the redox peaks of the intermediate complex, the conclusion was further confirmed by UV-Vis absorption spectra. The intermediate complex was unstable and decomposed gradually in a certain period of time. When zinc ion was added to the above solution, both the current of redox peaks and the intensity of the UV-Vis absorbance were enhanced. Therefore, the zinc ion could catalyze the formation and decomposition of the Cr(VI)-GSH intermediate complex. The mechanism of the electrode reaction was also discussed.

Key words: potassium dichromate; glutathione; electrochemical analysis; intermediate complex

0 引言

人类很早就认识到铬化合物是强致癌物质^[1]。近代工业中含铬化合物的广泛应用, 对人体健康造成了极大的危害, 与之相关的铬化合物诱导人体癌变的机制引起了广泛关注。研究表明^[2]: 在铬的各种价态中, Cr(VI)对人体的危害最大。低浓度的 Cr(VI)单

独存在时并不与 DNA 作用, 但是有微量还原剂的存在下, 微量的 Cr(VI)将引起 DNA 构象变化。谷胱甘肽(GSH)在人体中的含量较高(毫摩尔级), 能和进入人体的 Cr(VI)作用诱导 DNA 损伤, Levina 等^[3]确证了 Cr(VI)和 GSH 作用形成一种导致 DNA 构象变化的中间态配合物 $[\text{Cr}^{\text{V}}\text{O}(\text{LH}_2)_2]^{3-}$ ($\text{LH}_2=\text{GSH}$), 该配合物在 Cr(VI)致癌过程中起主要作用, 成为研究 Cr(VI)致癌机

收稿日期: 2004-10-20。收修改稿日期: 2004-12-27。

广东省自然科学基金(No.021190)和广州市科技项目(No.2003Z3-D2041)资助。

*通讯联系人。E-mail: typh@jnu.edu.cn

第一作者: 杨培慧, 女, 39 岁, 副教授; 研究方向: 生物无机与生物分析化学。

制的焦点。目前对中间态配合物的研究主要采用较昂贵的仪器^[3-5],如:核磁共振(NMR)、电子顺磁共振(EPR)、电喷雾质谱(ESMS)、X射线吸收谱(XAS)、X射线吸收精细结构能谱(XAFS)以及X射线吸收近边结构谱(XANES)等。而利用简便、快速的电化学分析方法对配合物进行表征未见报导。本文运用电化学分析方法,同时以UV-Vis辅助表征,对Cr(VI)和GSH的相互作用及配合物的形成过程进行研究,这对进一步阐明铬化合物的致癌机制具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660A 电化学工作站 (CH Instruments Co., USA); TU-1901 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司产品); 电化学实验采用三电极体系:金电极(直径 2 mm)为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂柱电极为辅助电极。谷胱甘肽(Y-Glu-Cys-Gly, Sigma 产品);重铬酸钾(G.R.);其他试剂均为优级纯试剂。

1.2 储备液的制备

$1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GSH 溶液 (通 N_2 除 O_2 15 min, 4°C 冰箱中保存,1 周重新配 1 次); $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的溶液,棕色试剂瓶保存; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc-NaAc (pH=5.6) 缓冲溶液。实验用水均为石英亚沸二次蒸馏水。

1.3 实验方法

金电极经金相砂纸抛光后,超声波清洗。将含有 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液转入电解池中,插入处理好的 3 个电极,通氮除氧 10 min,加入不同浓度的 GSH 溶液,在 +0.8 ~ -0.2 V 电位范围内,以 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速度进行循环伏安(CV)扫描;记录 CV 曲线。

将不同浓度的 GSH 加入到含有 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的 pH=5.6 HAc-NaAc 缓冲溶液中,于 200~600 nm 的波长范围内进行可见紫外吸收(UV-Vis)光谱扫描;记录吸收光谱曲线。

2 结果与讨论

2.1 Cr(VI)与 GSH 作用及中间态配合物形成的电化学和光谱行为

图 1 是 GSH、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、GSH+ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液的 CV 曲线。在 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中,Cr(VI)在

金电极上的电化学行为为一不可逆过程,于 +0.10 V 处产生一还原峰(如图 1(2)),当往溶液中加入在金电极上不具有电活性的 GSH(如图 1(1))时,+0.10 V 处的 Cr(VI)的还原峰消失,于 +0.21 V 和 +0.36 V 处出现一对新的氧化还原峰(如图 1(3))。由于氧化性的 Cr(VI)与还原剂 GSH 发生反应,溶液中的 Cr(VI)反应完全后,+0.10 V 的峰信号消失,新出现的一对氧化还原峰可能是反应中间态配合物的峰信号;这可从 UV-Vis 吸收光谱初步得到证实(见图 2);Cr(VI)在 361 nm 和 242 nm 处有两个特征吸收峰(图 2(3)),当往溶

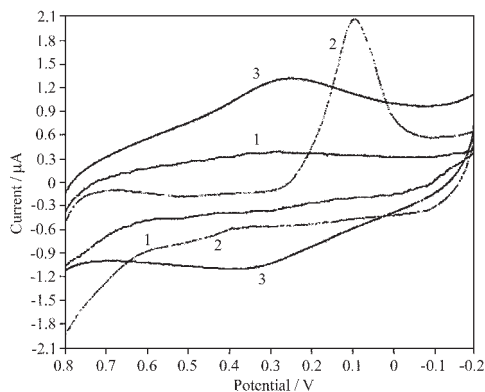


图 1 GSH 与 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 相互作用的循环伏安图

Fig.1 Cyclic voltammograms of the interaction between Cr(VI) and GSH

1: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH
2: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
3: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH + $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

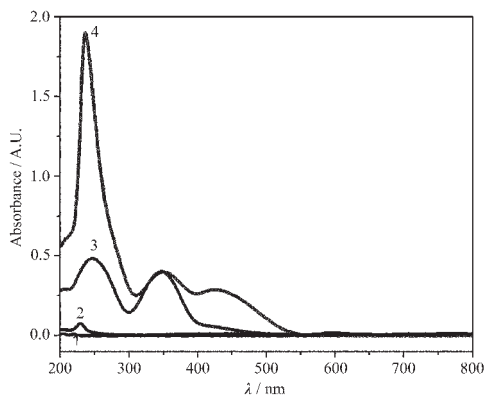


图 2 GSH 与 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 相互作用的 UV-Vis 吸收光谱

Fig.2 UV-Vis absorption spectra of Cr(VI), Cr(III) and Cr(VI)-GSH complex

1: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH
2: $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$
3: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
4: $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH + $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

液中加入不具有 UV-Vis 吸收的 GSH 溶液 (图 2(1)) 时, 361 nm 处的吸收峰逐渐减弱, 直至消失, 而 242 nm 处的峰迅速增高, 同时, 在可见光区 431 nm 处出现一新的吸收峰 (图 2(4)), 该吸收峰不稳定, 约 30 min 后基本消失, 可以判断 431 nm 处的新峰为中间态配合物的吸收峰。在这个反应过程中, Cr(VI) 很快被 GSH 还原而消耗, 其 361 nm 处 Cr(VI) 的特征吸收峰下降, 同时反应产物 Cr(III) 的吸收峰明显升高, 且由

236 nm 红移至 242 nm, 由于反应生成的 Cr(III) 与 GSH 作用形成了配合物^[3], 从而导致了 Cr(III) 吸收峰显著升高 (图 2(4))。

2.2 GSH 与 $K_2Cr_2O_7$ 的相互作用浓度比的确定

在 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $K_2Cr_2O_7$ 溶液中加入不同浓度的 GSH, 进行 CV 扫描, Cr(VI) 在 +0.10 V 处的还原峰电流与 GSH 的浓度之间的关系见表 1。

表 1 不同浓度的 GSH 与 $K_2Cr_2O_7$ 的相互作用

Table 1 Effect of GSH concentrations on the peak current of chromium(VI)

CGSH / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	1.0×10^{-8}	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-4}	3.0×10^{-4}	5.0×10^{-4}	7.0×10^{-4}	1.0×10^{-3}
$I_p / \mu\text{A}$	3.98	3.22	2.83	2.62	0.98	0.72	0.48	0.00	0.00	0.00

Scan range: +0.8~-0.6 V, scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $C_{K_2Cr_2O_7} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

从表 1 可以看出: 随着 GSH 溶液浓度的增加, Cr(VI) 的还原峰电流强度下降, 当溶液中 $C_{\text{GSH}}:C_{K_2Cr_2O_7} \geq 5$ 时, 还原峰消失, 这时溶液中的 Cr(VI) 与 GSH 反应完全。因此, 本实验选择 GSH 与 $K_2Cr_2O_7$ 反应的物质的量比为 5:1, 以确保 Cr(VI) 与 GSH 反应完全并形成中间态配合物。

2.3 扫描速度对峰电流的影响

考察扫描速度对 +0.21 V 处还原峰电流的影响, 见图 3。记录 CV 曲线。该还原峰峰电流随扫描速度 V 的增加而线性增大 (图 3a), 扫描速度与峰电流之间存在一线性关系, 这表明 Cr(VI) 与 GSH 作用所形成的配合物在金电极表面上的电化学过程受吸附控制; 而 Cr(VI) 在金电极上峰电流与扫描速度之间不成线性关系 (图 3b), 但与 $V^{1/2}$ 成线性关系 (图 3c),

所以 Cr(VI) 在金电极上的电化学过程受扩散控制, 这进一步说明 +0.21 V 的峰信号为 Cr(VI) 与 GSH 反应形成的配合物的还原峰。

2.4 Cr(VI) 与 GSH 作用及其中间态配合物形成的电化学和光谱动力学

在 pH=5.6 HAc-NaAc 缓冲溶液中, 将 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH + $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $K_2Cr_2O_7$ 体系进行电化学时间扫描, 结果见图 4。从图 4(A) 可见: 在反应 4 min 内, 体系的还原峰电位为 +0.24 V, 并且峰电流随时间增加而增加; 当反应到 6 min 的时候, +0.24 V 的还原峰负移至 +0.21 V (见图 4(B)); 在反应时间 20 min 内, +0.21 V 的峰电流随着时间增加而增加, 当反应时间达到 30 min 时, +0.21 V 的峰电流开始下降, 随着时间的延长该还原峰几乎消失 (见图 4(C))。

实验过程中, 体系的氧化峰电位没有移动, 而且峰电流也基本不变。电化学的时间动力学实验进一步说明了 Cr(VI) 与 GSH 相互作用形成不稳定的中间态配合物, 该中间态配合物的还原峰位于 +0.21 V, 对应于 UV-Vis 光谱中 431 nm 处的吸收峰。

在 pH=5.6 HAc-NaAc 缓冲溶液中, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH + $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $K_2Cr_2O_7$ 体系在 431 nm 处新峰的吸光度随时间变化如图 5 所示。431 nm 吸收峰的吸光度随着时间的推进逐渐下降, 因此, 光谱动力学进一步证明: 反应过程中有中间态配合物的生成而且该配合物不稳定, 在 30 min 内中间态配合物发生分解使体系吸光度明显下降, 这和配合物在金电极上的电化学时间动力学行为基本相吻合。

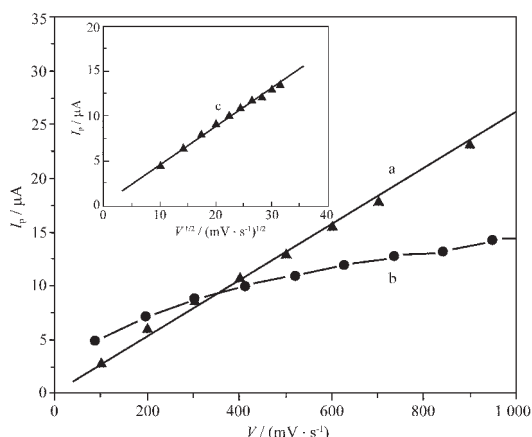


图 3 扫描速度对 Cr(VI) 及其与 GSH 配合物还原峰流的影响

Fig.3 Influence of scan rate on peak current of Cr(VI) and Cr(VI)-GSH complex

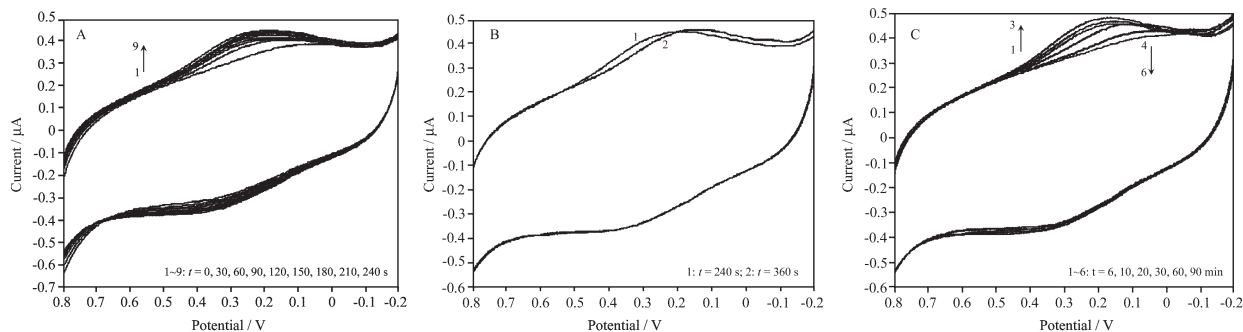


图 4 Cr(VI)-GSH 体系在不同反应时间时的循环伏安图

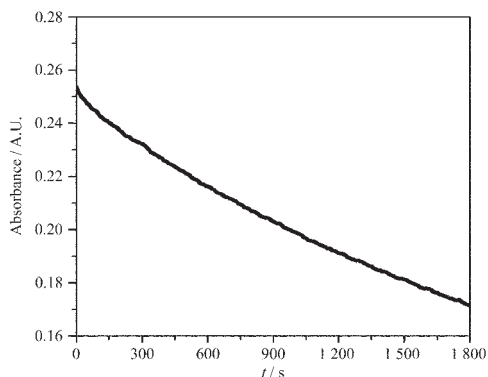
Fig.4 Cyclic voltammograms of Cr(VI)-GSH system in different reaction time in acetate buffer solution (pH=5.6) with scan rate of $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 

图 5 Cr(VI)-GSH 体系在 431 nm 吸收峰的光谱动力学曲线

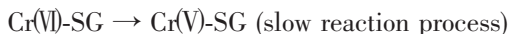
Fig.5 Dynamics of UV-Vis spectra of Cr(VI)-GSH system at 431 nm

根据文献^[6]报道,具有氧化性的 Cr(VI)与还原性的 GSH 相互作用生成 Cr(VI)硫醇酯(Cr(VI)-thiolate ester),该步反应为快速反应过程;紧接着 Cr(VI)硫醇酯在 GSH 作用下进一步还原成 Cr(V)的中间态配合物,该步反应是一个慢反应过程。因此从电化学的时间动力学图中,我们可以观察到在反应 4 min 内+0.24 V 的还原峰电流随着时间而上升,这对应于 Cr(VI)与 GSH 的快速反应及中间态配合物的形成过程;当反应到 6 min 时,+0.24 V 的还原峰负移至+0.21 V,而且峰电流随着时间的推移先上升后下降,这对应于 Cr(V)中间态配合物的生成、消耗及分解过程。

综合文献及实验结果可以推断出该体系的反应机理及电极反应过程如下:



(rapid reaction process)



(electrode reaction process)

2.5 微量 Zn(II)对中间态配合物形成的催化作用的表征

锌是人体的必需微量元素,Zn(II)的存在对中间态配合物的形成具有一定的催化作用^[7]。本实验采用 CV 法更方便快速地表征了 Zn(II)对 Cr(VI)-GSH 体系的催化作用,如图 6 所示。当往 Cr(VI)-GSH 体系中加入 Zn(II)时,+0.21V 和+0.36V 处中间态配合物的氧化还原峰都明显增强,峰电位不变;峰电流信号的增强说明了相应的中间态配合物浓度的增加。可见,Zn(II)在中间态配合物的形成过程中起到了一定的催化作用。

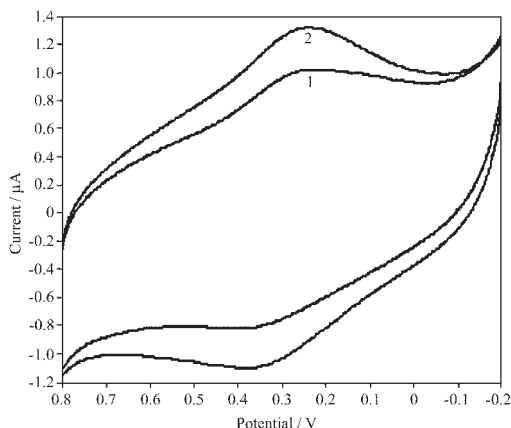


图 6 Zn(II)对 Cr(VI)-GSH 配合物的催化作用

Fig.6 Catalytic effect of Zn(II) on Cr(VI)-GSH complexes

1: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GSH}$

2: $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GSH} + 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Zn}(\text{Ac})_2$

图 7 为 Cr(VI)-GSH 体系在 431 nm UV-Vis 光谱动力学。Cr(VI)-GSH 体系在 431 nm 处的吸收峰强度随时间的推移而减小,在 30 min 内,吸光度从 0.253 下降到 0.171,下降率为 33%。当溶液中加入 Zn(II)

时, 431 nm 处吸收峰的吸光度从 0.253 增加到 0.301。Zn(II) 的加入使中间态配合物的浓度增加; 随着时间推移峰强度下降的趋势增大, 在 30 min 内, 吸光度从 0.301 下降到 0.170, 下降率为 44%, 比没有添加 Zn(II) 时增加了 11%, Zn(II) 的加入同时加快了中间态配合物的分解速度。由此可见, Zn(II) 对中间态配合物的形成和分解同时起到双向催化作用。

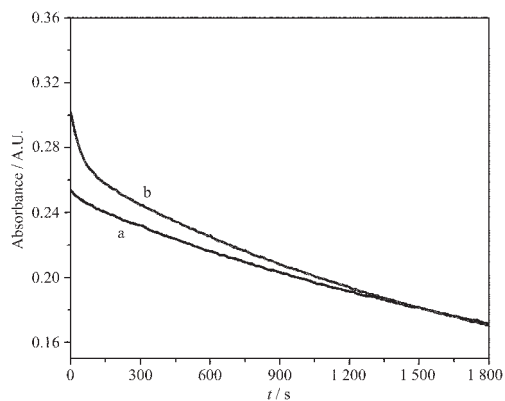


图7 Cr(VI)-GSH 体系在 Zn(II) 存在下的 UV-Vis 光谱动力学

Fig.7 Dynamics of UV-Vis spectra of Cr(VI)-GSH system in the absence and presence of Zn(II)

(a): $C_{\text{Zn}^{2+}}=0$; (b): $C_{\text{Zn}^{2+}}=2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 结 论

本文借助电化学分析手段, 探讨追踪 Cr(VI) 与

GSH 相互作用及其中间态配合物的形成过程, 电化学分析方法获得的结果与 UV-Vis 光谱法在时间动力学上基本同步, 并推断电极反应机理。在 Zn(II) 存在时, 用电化学和光谱法同时表征了 Zn(II) 对中间态配合物的生成和分解过程的双向催化作用。该简便快速的研究方法可应用于 Cr(VI)-GSH 中间态配合物诱导 DNA 损伤的研究, 这方面的工作我们将另行报导。

参考文献:

- [1] De Flora S, Bagnasco M, Serra D, et al. *Mutat. Res.*, **1990**, **238**:99~172
- [2] Brauer S L, Wetterhahn K E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, **113**: 3001~3010
- [3] Levina A, Zhang L B, Lay P A. *Inorg. Chem.*, **2003**, **42**:767~784
- [4] Moghaddas S, Gelerinter E, Bose R N. *Journal of Inorganic Biochemistry.*, **1995**, **57**:135~146
- [5] Liu K J, Shi X, Dalal N S. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **1997**, **235**:54~58
- [6] Codd R, Dillon C T, Levina A, et al. *Coordination Chemistry Reviews.*, **2001**, **216**:537~582
- [7] Joaquin F, Perez B, Natividad S, et al. *Journal of Molecular Catalysis A*, **1998**, **135**:1~10