

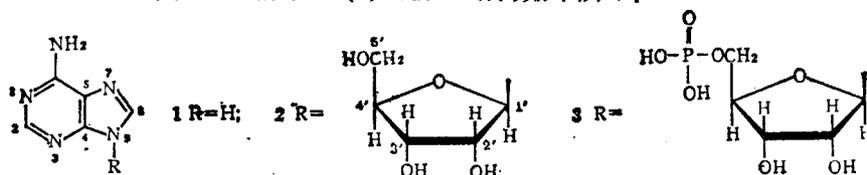
腺嘌呤、腺苷和 5'-腺苷酸电化学氧化行为的比较研究

常湘滨* 周端赐 谢以恒

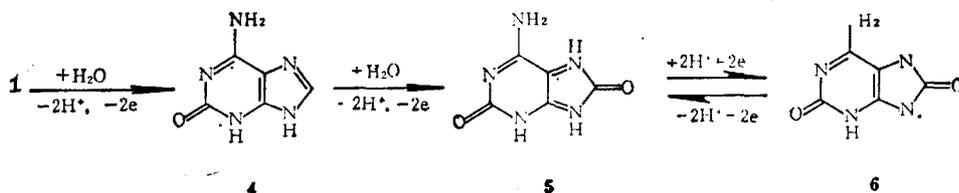
(暨南大学化学系, 广州)

本文对腺嘌呤、腺苷和 5'-腺苷酸在碳糊电极上的氧化行为及结构的关系作比较研究. 应用微分脉冲伏安法考察了三种生物分子的峰电位和峰电流及其与 pH 和浓度的关系, 通过线性扫描伏安法测量了其电极反应速度控制步骤的动力学参数 (β_{nb}), 利用计时电流法测定了三种化合物的扩散系数 (D), 并计算出相应氧化反应的速度常数 (k_b).

腺嘌呤(1)、腺苷(2)和 5'-腺苷酸(3)的分子结构如下所示:



在此分子中, 目前仅对1的电化学氧化有较详细的研究^[1-5]. 其反应机理如下^[1, 3-5]:



其中第一步为反应速度控制步骤. 文献^[6]和实验^[7]说明, 2与3的电化学氧化机理与1一致, 其氧化部位均在第2和第8位碳原子上. 但对于这一系列分子的氧化行为的比较还未报道, 特别对于核糖和磷酸核糖取代基对腺嘌呤环电极氧化行为的影响仍缺乏了解.

本文使用微分脉冲伏安法、循环伏安法、计时电流法和线性扫描伏安法对这三种生物分子在碳糊电极上的氧化行为进行比较研究, 并对其电极反应动力学参数 (β_{nb})、扩散系数 (D) 及反应速度常数 (k_b) 进行测量与比较.

实 验

试剂 1和2为中国科学院上海生物化学研究所产品, 3为Sigma (美国)产品. 样品经 HPLC 纯度检查, 其它试剂均为分析纯. 所用试液均采用离子交换后再经石英蒸馏的水配制, 利用分光光度法测定试液的实际浓度并检查其稳定性. 使用 Britton-Robison 广泛缓冲体系^[8]作大范围 pH 变化研究, 其配制方法见文献[8].

仪器 工作电极为 Metrohm (瑞士) EA267 型碳糊电极 (面积: 48.5 mm²). 使用表面光滑的玻璃纸处理电极表面, 有较好的重现性. 参比电极为 Ag/AgCl. 对电极为铂丝. 整个电解池装置在恒温槽内 ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). 实验发现, 在较低温度下, 三种化合物的伏安波形较好, 有利

于准确地测量峰电位,故本文所有参数的测定均在 10°C 下进行。

使用 Metrohm E 506 型极谱仪作微分脉冲伏安法。用 FA-1 型循环伏安仪(四平)作循环伏安、线性扫描伏安及计时电流法研究。溶液电阻经正反馈校正。用 pH5-3 型 pH 计(上海)测量溶液 pH 值。用 751 型分光光度计(上海)作光吸收检测。用 Radio Shock(美国)TRS-80 型微机作数据处理和计算。所有参数的测定均采用三次平均值。

结果与讨论

电化学氧化行为比较 三种化合物在广泛缓冲液中均有重现性与波形良好的微分脉冲伏安^[9,10]阳极峰(图 1)。但其氧化峰电位(E_p)有明显的区别。其大小顺序为: $1 < 3 < 2$ (后两者较接近)。在其他条件相同情况下, E_p 值的大小反映了分子的相对氧化还原能力(E°)。显然,核糖和磷酸核糖取代基降低了腺嘌呤环的还原能力。 2 与 3 的 E_p 值较接近,表明核糖对腺嘌呤环的反应能力影响较大,而磷酸根的影响较小,显然这是磷酸根与腺嘌呤环相距较远。与核糖基相比,磷酸根的负电荷可能对 2 在阳极上的氧化有一定的促进作用。

三种化合物的 E_p 与 i_p (峰电流,见图 1)均与溶液 pH 有关。 E_p 和 i_p 与 pH 的关系分别如图 2、3 所示。 E_p 与 pH 呈良好的线性关系,其斜率接近 0.059 V/pH ,说明有两个质子参与了速度控制步骤,这与文献中 1 的氧化机理一致,同时也说明三种分子的电极氧化机理相同。由于每种分子都有三个酸解常数^[11],其在水溶液中的存在形式与 pH 有关。从图 3 可以看出,三种化合物的质子化形式与非质子化形式均能参与电极氧化反应。但在 1 的还原反应中仅质子化形式(即在较低 pH 条件下)可被还原^[12]。显然这与腺嘌呤环上的氧化位置(碳 2 和碳 8)与其质子化位置(氮 9 和氮 10)较远有关。图 3 中不包括 2 和 3 分别在 $\text{pH} > 8$ 和 9 下的 i_p 值,因为在上述 pH 值下,这两种溶液的背景信号(发生氧气)很大,掩盖了 2 与 3 的峰信号。

文献[6]曾提出使用线性扫描伏安法测量 1 和 2 的浓度,其检测范围在 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 左右。利用微分脉冲伏安法,可望建立检测限度更低的 1 、 2 和 3 的电化学分析方法。在 B. R. 酸性介质中,三种化合物的 i_p 均与其浓度在 $1-10 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 范围内呈线性关系^[7]。实验中发现, 1 与 2 在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaOAc-HOAc}$ 缓冲液中的峰电流较在 B. R. 体系中高。在此介质($\text{pH}=4.3$)中, 1 在 $1-10 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 浓度范围内亦有重现性较好的 i_p - c 线性关

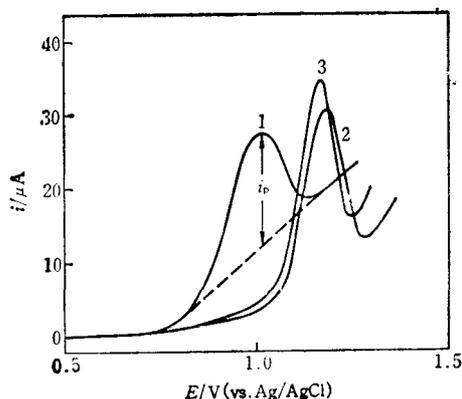


图 1 1、2 和 3 在碳糊电极上的微分脉冲伏安图
实验条件: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\text{pH} 5.4 \text{ B. R.}$ 缓冲液, 25°C ,
 $\nu=10 \text{ mV/s}$, 脉冲幅度 50 mV

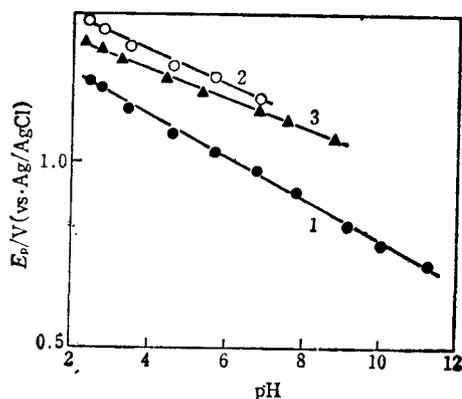


图 2 E_p 与 pH 的关系
曲线与实验条件同图 1

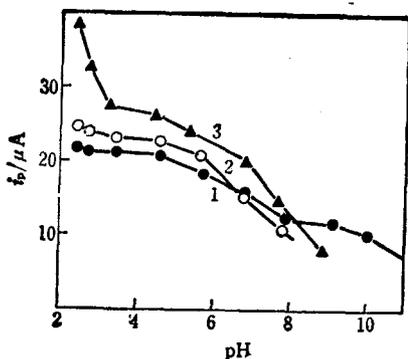


图3 i_p 与 pH 的关系
曲线与实验条件同图 1

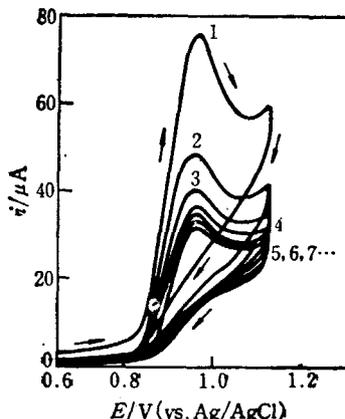


图4 1 的多扫描循环伏安图
实验条件: pH5.4 B.R. 缓冲液, 25°C, $\nu=100$ mV/s. 图中数字代表扫描顺序

系^[7].

图 4 为 1 在碳糊电极上的多扫描循环伏安图. 2 与 3 的相应伏安图与此相似^[7]. 由图 4 的特征说明, 三种分子的电极氧化反应为完全不可逆过程. 其不可逆性不受扫描速度的影响. 在多次连续扫描下, 峰电流逐渐降低, 直至一个稳定值.

动力学参数 (βn_b) 的测定 如果电极反应为扩散控制, 利用线性扫描伏安法可以测量电极反应的动力学参数 βn_b ^[8,9] 但有机分子的电化学反应在一定条件下常为非扩散控制^[9,10]. 在 pH>5 下, 三种分子的线性扫描峰电流明显不与扫描速度 (ν) 及浓度 (c) 成线性^[7], 说明在此条件下, 电极反应不完全由扩散控制^[9,10]. 这与文献 [6, 13] 中的结果一致, 但文献 [6, 13] 等认为这种非线性关系与反应物在电极上的吸附有关. 我们认为, $i_p-\nu$ 与 i_p-c 的非线性关系并不能直接证明有无吸附反应发生. 在 pH≤3.3, i_p 与 ν 及 c 均呈良好的线性关系^[7], 故在此条件下可用上述方法测量电极反应速度控制步骤的 βn_b 值.

对于扩散控制下的完全不可逆电极氧化反应, 其线性扫描峰电位 (E_p) 与半峰电位 ($E_{p/2}$) 的差值 (ΔE) 和其动力学参数 βn_b 之间有如下关系^[9,12] (在 10°C 下):

$$\Delta E = E_p - E_{p/2} = \frac{1.857RT}{\beta n_b F} = \frac{45.30}{\beta n_b} \text{ (mV)} \quad (1)$$

故根据伏安曲线测量 ΔE , 便可用上式计算出 βn_b . 三种化合物在各种扫描速度下的 βn_b 值如表 1 所示. 从测量结果可见, βn_b 值与 ν 几乎无关. 其中 1 的 βn_b 最小, 对应于其伏安峰较宽.

扩散系数 (D) 的测定 电位跃迁下的扩散控制电流符合 Cottrell 方程^[9]:

$$i = \frac{nFD^{1/2}A C_0}{(\pi t)^{1/2}} \quad (2)$$

如将 i 对 $t^{-1/2}$ 作图, 可得一直线, 且

$$D = \pi \left(\frac{\text{tg } \alpha}{nFA C_0} \right)^2 = (9.959 \times 10^{-10}) (\text{tg } \alpha)^2 \quad (3)$$

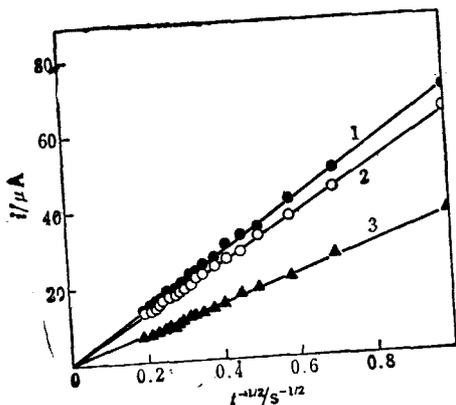


图5 计时电流法的 $i-t^{-1/2}$ 图
1 $E=-1.150$ V; 2 $E=-1.350$ V;
3 $E=-1.450$ V
实验条件: pH3.3 B.R. 缓冲液, 10°C

其中 $\lg \alpha$ 为 $i-t^{-1/2}$ 作图的斜率, $n=6$, $c=0.2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. 用式(3)通过计时电流法^[9,12]测量了三种分子的扩散系数. 图5为 $i-t^{-1/2}$ 作图结果, 其斜率由线性回归方法计算得出 **1** 为 71.1; **2** 为 65.0; **3** 为 40.0, 并计算出扩散系数分别为 5.03×10^{-6} 、 4.21×10^{-6} 、 $1.59 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

由此看出, **1** 和 **2** 的 D 值较接近, 而 **3** 的 D 值明显较前两者为小, 说明与核糖相比, 磷酸根可以更大程度地降低整个分子的扩散传质速度. 这一结果与相应的胞嘧啶系列分子^[14]相似, 故也可以解释为: 在腺苷分子中, 核糖取代基并没有太多地增加整个分子的扩散截面积, 而对于腺苷酸分子, 磷酸根可以较大地增加其截面积.

速度常数(k_b)的计算 对于扩散控制下完全不可逆电极氧化反应的线性扫描伏安法, 有如下公式^[9]:

$$E_p = E^{\circ'} + \frac{RT}{\beta n_b F} \left[0.780 + \ln \left(\frac{D^{1/2}}{k} \right) + \ln \left(\frac{\beta n_b F \nu}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (4)$$

重排上式, 并定义:

$$\begin{aligned} k_b &= k^{\circ} \exp \left[\frac{\beta n_b F}{RT} (E_p - E^{\circ'}) \right] = 2.18 \left(\frac{\beta n_b F D \nu}{RT} \right)^{1/2} \\ &= 13.96 (\beta n_b D \nu)^{1/2} \quad (\text{在 } 10^{\circ}\text{C 下}) \end{aligned} \quad (5)$$

其中 k_b 即为电极反应在 E_p 的异相反应速度常数. 由式(5)可知, k_b 与 $(\beta n_b D \nu)^{1/2}$ 成正比. 以上我们应用相互独立的方法测量了三种化合物的 βn_b 与 D 值, 故由式(5)可计算出相应 k_b 值. 其结果列如表 1.

表 1 **1**、**2** 和 **3** 在碳糊电极上的电化学氧化反应动力学参数 (βn_b) 和速度常数 (k_b)

实验条件: B.R. 缓冲液, pH 3.3 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 10°C

$\nu/\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$		10	20	40	60	80	100	平均值
βn_b	1	.80	.78	.78	.76	.73	.76	.77
	2	.95	.87	.95	.90	.90	.87	.91
	3	.87	.83	.90	.90	.87	.83	.87
k_b	1	2.73	3.86	5.46	6.69	7.72	8.63	
	2	2.73	3.86	5.47	6.70	7.73	8.64	
	3	1.64	2.32	3.28	4.02	4.64	5.19	

由表 1 可见, 在相同扫描速度下, **1** 与 **2** 的 k_b 值十分接近, 而 **3** 的 k_b 值明显较小. 这与三者 D 值的差别相似. 考虑到三者的 βn_b 值差别较小(相对差别小于 0.1, 见表 1), 而 D 值差别较大(相对差别近 3 倍), 所以, 三种化合物的电极氧化速度之间的区别主要由扩散系数决定.

参 考 文 献

- [1] Dryhurst, G., "Electrochemistry of Biological Molecules", Academic Press, New York, 1977.
 [2] 常湘滨, 未发表.
 [3] Dryhurst, G.; Elving, P. J., *J. Electrochem. Soc.*, **1968**, *115*, 1014.
 [4] Janik, P.; Elving, P. J., *Chem. Rev.*, **1968**, *68*, 295.
 [5] Dryhurst, G., *Topics Curr. Chem.*, **1972**, *34*, 41.
 [6] Yao, T.; Wasa, T.; Musha, S., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1977**, *50*, 2917.
 [7] 常湘滨, 硕士论文, 暨南大学, 广州, 1985.
 [8] 常湘滨, 化学通报, **1986**, (9), 54.
 [9] Bard, A. J.; Faulkner, L. R., "Electrochemical Methods—Fundamentals and Applications", John Wiley, New York, 1980.
 [10] Anson, F., "电化学和电分析化学", 北京大学出版社, 北京, 1983.
 [11] Dawson, R. M. C.; Chaplin, R. M. (Ed.), "Data for Biological Research", 2nd Edn., Clarendon Press, Oxford, 1969, p. 170.
 [12] 谢以恒, 硕士论文, 暨南大学, 广州 1983.
 [13] Dryhurst, G., *Talanta*, **1972**, *19*, 773.
 [14] Webb, J. W.; Janik, B.; Elving, P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 991.

A Comparative Study on the Anodic Behaviour of Adenine, Adenosine, and 5'-AMP at Carbon Paste Electrode

Chang Xiang-Bin* Zhou Duan-Ci Xie Yi-Heng

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou)

Abstract

The anodic behaviour of three biologically important molecules, adenine, adenosine, and 5'-AMP, was comparatively investigated at carbon paste electrode. The peak potential and peak current for differential pulse voltammetry were studied as a function of pH and concentration. The kinetic parameters (βn_b) for the rate-determining step of the oxidation reactions under diffusion-control were measured with linear sweep voltammetry at 10°C and pH 3.3, which were 0.77, 0.91, and 0.87, respectively. Chronoamperometry was used to determine the diffusion coefficients (D) of these compounds, which were 5.03, 4.21, and 1.59×10^{-6} cm²/s, respectively. Using the βn_b and D data obtained independently from each other, the heterogeneous rate constants (k_b) for the overall anodic processes were calculated and compared.