

杂多酸 $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ 对硫醇-磷脂 杂化双层膜通透性的影响

王建国^{a,b} 滕人瑞^b 汪尔康^{a*}

(^a 中国科学院长春应用化学研究所 电分析化学国家重点实验室 长春 130022)

(^b 中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

摘要 利用涂抹冷冻法制备了硫醇-磷脂杂化双层膜, 采用循环伏安和交流阻抗方法, 研究了硫醇-磷脂杂化双层膜与杂多酸 $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ 作用前后通透性的变化. 发现该种杂多酸能够诱导硫醇-磷脂杂化双层膜产生一些孔洞, 降低了膜电阻, 增加了膜电容, 也增加了探针 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 与电极的电子传递. 同时对产生该现象的机理进行了初步的探讨.

关键词 杂化双层膜, 杂多酸, 循环伏安, 交流阻抗

Influence of a Kind of Polyanion to Hybrid Bilayer Membranes

WANG Jian - Guo^{a,b} TENG Ren - Rui^b WANG Er - Kang^{a*}

(^a State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun, 130022)

(^b Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, 73000)

Abstract Hybrid bilayer membrane consisting of self-assembled alkanethiol and lipid monolayer on gold electrode was fabricated by the paint-free method. The interaction of a kind of polyanion, $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ with such bilayer membrane was investigated by cyclic voltammetry and ac impedance. The hybrid bilayer membrane on the gold electrode showed remarkable insulating property, however, the property was lessened to some extent after interaction with the polyanion. It was found the process was irreversible. It is presumed that the interaction between the polyanion and lipid is an interaction of $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ with the polar head group of PC, which lessens the interaction among PC polar head groups. The resulting molecular arrangement becomes looser, even some pores are produced.

Keywords hybrid bilayer membranes, polyanions, cyclic voltammetry, ac impedance

由于杂多酸在催化、材料、医药等领域具有广泛的应用前景^[1~5], 近年来许多科学家对杂多酸进行了深入的研究. 用杂多酸治疗疾病是一个活跃课题.

Yamase^[6]发现 $[NH_3Pr^i]_6[Mo_7O_{24}]\cdot 3H_2O$ 是一种有效的抗癌物质, 它能够抑制小白鼠体内癌细胞的生长. $[Sb_9W_{21}O_{86}]^{-19}$ 能够阻止爱滋病的发展^[6], 有一定的

* E-mail: ekwang@ns.ciac.jl.cn

收稿日期: 2001-04-29, 定稿日期: 2001-08-30, 国家自然科学基金(29835120)资助项目

(Received April 29, 2001. Accepted August 30, 2001)

抗爱滋病作用.我国科学工作者^[7]也发现一些杂多酸具有抗癌效果.

细胞膜在生物的新陈代谢中起着重要的作用,研究细胞膜上物质传输和信息传递是当今生物领域最活跃的课题之一.自1962年发明制备非支撑双层膜的方法之后^[8],有关生物膜的研究更加活跃和广泛.近年来人们又发明了制备杂化双层膜(Hybrid bilayer membrane,简称HBM)的方法^[9-13].该方法是首先在金、银、铂等金属表面通过自组装,形成硫醇单层,再利用此膜的疏水性,在其上自组装一层磷脂单层膜,即形成杂化双层膜.这种膜具有稳定性高,重现性好,操作简单等优点.杂化双层膜可以用作细胞膜的模型来研究蛋白质、抗体、DNA等物质在膜内的行为.

杂多酸与生物膜相互作用的研究是认识杂多酸的药理机制的一种手段,尚未见报道.我们采用涂抹冷冻法制备了硫醇-磷脂杂化双层膜,以 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 为探针,利用循环伏安、交流阻抗方法研究HBM与 $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ 作用通透性的变化,发现该杂多酸能引起HBM的通透性发生改变,这种变化是不可逆的.与此同时我们对产生该现象的机理进行了探讨.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

电化学实验采用三电极体系,工作电极为金电极(直径0.8 mm),参比电极为饱和 $Ag/AgCl$ 电极,辅助电极为铂片电极.循环伏安和交流阻抗在Autolab PGSTA30(Eco Chemie B.V. Utrecht, 荷兰)上进行,利用该仪器所带软件FRA(Frequency Response Analysis system software)进行阻抗分析.阻抗测定条件为:交流电压的幅度为5 mV,测量频率范围0.01~100 000 Hz,工作电压为体系的开路电位(260 mV),所用溶液为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [Fe(CN)_6]^{3-/4-}$,支持电解质为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} KCl$.

正十二烷基硫醇 1-dodecanethiol(DDM)98%,磷脂酰胆碱 phosphatidylcholine(PC)99%,均购于美国Sigma公司.正癸烷 *n*-decane 99.5%,购于上海试剂一厂.杂多酸 $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ 由本实验室按文献^[14]合成.其它试剂均为分析纯,实验用水是经全石英蒸馏器蒸馏后,再经Millipore Q水处理系统(美国Millipore公司)处理而得($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$).

1.2 实验步骤

在抛光布上分别用直径为 $1.0 \mu\text{m}$, $0.3 \mu\text{m}$ 和 $0.05 \mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 粉将金电极仔细抛光,在去离子水中超声1 min,然后在 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2SO_4$ 溶液进行循环伏安扫描,得到标准的金电极图(图1.a).将金电极分别用水和乙醇淋洗,迅速放入 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的正十二烷基硫醇的乙醇溶液中浸泡24 h.取出金电极分别用水和乙醇淋洗,用氩气吹干.放入 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2SO_4$ 溶液进行循环伏安扫描,得到图1.b,以计算电极的覆盖率.在相同条件下,覆盖有DDM单层的金电极的循环伏安曲线与裸金电极的相比,差别很大,它的氧化溶出峰急剧降低.根据Sabatini和Rubinstein的理论^[13],自组单层的表面针孔的分数可由图1中氧化溶出峰的峰面积之比来粗略估计,曲线b与曲线a的比值约为0.027.考虑到薄的DDM单层电容的残余电流的干扰,实际覆盖率要高于97.3%.再将金电极放入 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 溶液中测量其交流阻抗,以进一步证实致密的硫醇单层已经形成.

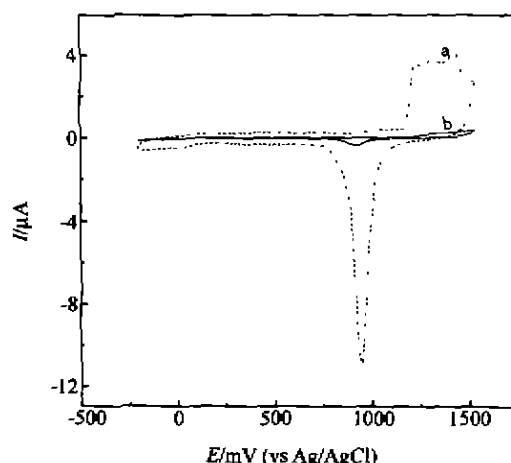


图1 金电极在硫酸溶液中的循环伏安曲线
 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2SO_4$ 溶液,扫描速度: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

(a) 裸金电极; (b) 修饰DDM单层膜的金电极

Fig.1 Cyclic voltammograms of the gold electrode in $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2SO_4$ solution with scan rate of $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$
(a) bare gold electrode; (b) DDM monolayer on gold electrode

采用涂抹-冷冻法制备杂化双层膜.先将已自组装硫醇单层膜的金电极用水和乙醇淋洗,氩气吹干,放入2%的磷脂癸烷溶液中,浸泡10 min,取出,用水冲洗,置于 -10°C 的冰箱内冷冻10 min.将此金电极用水冲洗后,放入 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 溶液中做循环伏安扫描(电位窗口 $-200 \sim 600 \text{ mV}$, 扫描速度 $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$),伏安曲线逐渐稳定,即杂化双层膜已经形成.

本文中所有电化学实验均在室温条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 杂化双层膜的电化学性质

图2是裸金电极, DDM 和 HBM 在探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中的循环伏安曲线, 从图中可以看出, 在裸金电极上峰电流很大, 从裸金电极的交流阻抗图谱(未给出)可以得到此过程是由扩散控制的结论, 从伏安曲线上峰电位差我们可以推断在低扫速时, 此过程是可逆的. 金电极表面形成硫醇单层之后, 峰电流降低很多, 阳极和阴极峰很不明显, 这说明硫醇单层比较致密, 对探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的阻碍作用很大. 形成杂化双层膜之后, 可以看到电流进一步减小, 主要是充电电流. 这与文献[10, 15]观察到的结果是一致的.

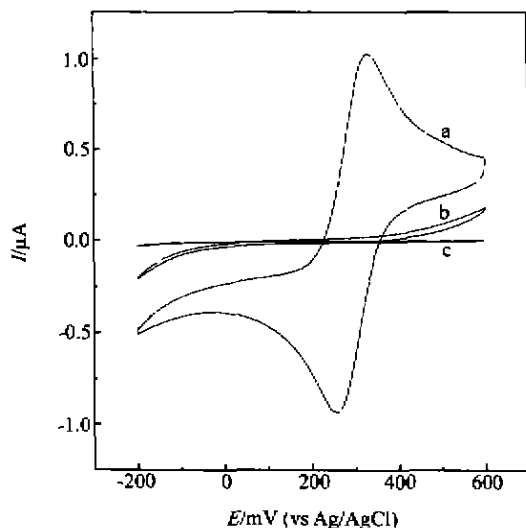


图2 金电极成膜前后的循环伏安曲线
1.0 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]和 K₄[Fe(CN)₆]
于 0.1 mol·L⁻¹ KCl 支持电解质中, 20 mV·s⁻¹;
(a) 裸金电极; (b) 修饰 DDM 单层膜的金电极;
(c) 修饰杂化双层的金电极

Fig. 2 Cyclic voltammograms of the gold electrode in 0.1 mol·L⁻¹ KCl solution with 1.0 mmol·L⁻¹ K₃(CN)₆/K₄(CN)₆ at 20 mV·s⁻¹
(a) bare gold electrode; (b) DDM monolayer on gold electrode; (c) HBM on gold electrode

交流阻抗技术是一种敏感的检测手段, 适用于电极表面自组装膜的表征. 图3是阻抗谱 Niquist 图形表示方式. Z_{re} 和 Z_{im} 分别代表阻抗谱的实部和虚部. 从图中可以看到, 随着组装单层硫醇、磷脂, 半圆的直径逐渐增大, 几乎完全由动力学控制. 表明膜层

对电子传递的阻碍作用增强, 探针分子 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 难以通过膜层的孔隙电极到达表面. 这是因为十二烷基硫醇组装金电极表面, 硫与金的特性吸附使硫醇组装得很致密, 且电极表面是疏水的, 水溶性的离子探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 很难通过孔隙到达电极表面, 所以相应的氧化还原电流也减小很多. 再组装一层磷脂之后, 表面的孔隙进一步减少. 磷脂是一种两亲性物质, 利用硫醇单层表面的疏水性与磷脂的疏水碳链相结合, 形成杂化双层膜, 增加了疏水层的厚度. 这进一步阻碍探针分子 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 与电极之间的电子传递. 所以我们观察到在 Niquist 图中 HBM 的半圆直径进一步扩大.

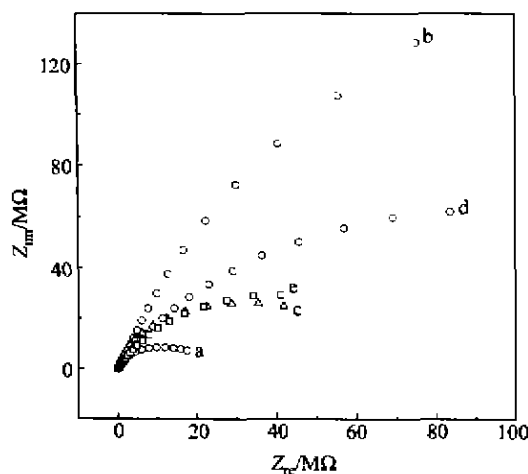


图3 组装有单层膜和双层膜的金电极交流阻抗谱的 Niquist 图形

0.1 mol·L⁻¹ KCl 溶液含 1.0 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] 和 K₄[Fe(CN)₆], 交流电压的幅度为 5 mV, 测量频率范围 0.01 ~ 100 000 Hz, 工作电压为体系的开路电位(260 mV);
(a) DDM 单层膜; (b) HBM 膜; (c), (d), (e) 分别为 0.2 mg·ml⁻¹ K₇Fe³⁺P₂W₁₇O₆₂H₂ 与杂多酸作用 60 min, 2 min, 30 min 后的 HBM 膜

Fig. 3 Niquist impedance plots for monolayer and hybrid bilayer in 0.1 mol·L⁻¹ KCl solution with 1.0 mmol·L⁻¹ K₃(CN)₆/K₄(CN)₆
dc potential; open circuit potential E^0 ; ac amplitude: 5 mV; frequency range: 0.01 ~ 100 000 Hz; (a) DDM monolayer on gold electrode; (b) HBM on gold electrode; (c), (d), (e) representing 60 min, 2 min, 30 min period of HBM on gold electrode after interaction with 0.2 mg·ml⁻¹ K₇Fe³⁺P₂W₁₇O₆₂H₂, respectively

2.2 杂多酸与 HBM 的相互作用

将形成 HBM 膜的金电极浸入含 K₇Fe³⁺P₂W₁₇O₆₂H₂ 的溶液中 60 min, 取出放入 1.0 mmol·L⁻¹ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中作循环伏安扫描. 从图4我们可

以看到,同 HBM 相比电流明显增加,这说明该膜对探针分子 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 的阻碍作用降低了.通过交流阻抗实验(图 3c)也证实了这一点,Niquist 图中的半圆直径减少了许多.电荷传递电阻减少意味着电子在电极和探针之间传递作用更加显著.与杂化膜作用的杂多酸由 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加到 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,循环伏安扫描的电流明显增加,但是进一步增加杂多酸的浓度,交流阻抗图谱基本没有变化,循环伏安曲线也没有变化.这是由于磷脂与杂多酸相互作用,使磷脂单层产生孔隙,而硫醇的碳氢链不与杂多酸作用,即对硫醇单层的影响很小.硫醇单层仍然对探针分子起着一定程度的阻碍作用.所以增加杂多酸的浓度也未能进一步影响交流阻抗谱和循环伏安曲线.这与我们在铂支撑的磷脂双层膜上所观察到的结果有所不同^[16].将与杂多酸作用后的电极放入不含杂多酸的溶液中浸泡,其交流阻抗和循环伏安曲线基本没有发生变化,这说明杂多酸与磷脂间的作用是不可逆的.从图 3 可以观察到杂多酸与杂化膜的作用时间对膜的阻抗影响很大,特别是在作用前 5 min 杂化膜的阻抗迅速变化,然后渐渐平缓,30 min 后就基本达到平衡.

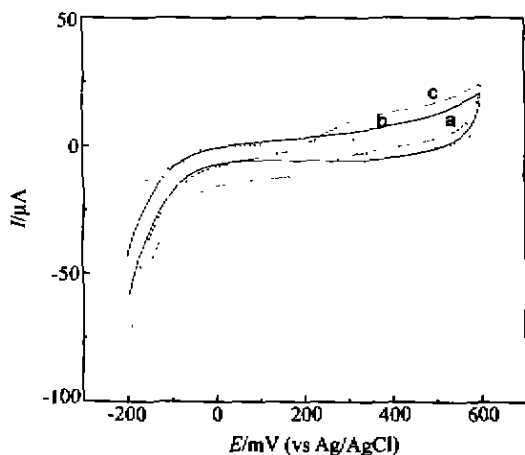


图 4 修饰杂化双层膜金电极的循环伏安曲线

$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液含 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} K_3[Fe(CN)_6]$

和 $K_4[Fe(CN)_6]$, 扫描速度: $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$;

(a) HBM 膜; (b) $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} K_7Fe^3^+P_2W_{17}O_{62}H_2$

与杂多酸作用后的 HBM 膜; (c) $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} K_7Fe^3^+P_2W_{17}O_{62}H_2$

与杂多酸作用后的 HBM 膜

Fig. 4 Cyclic voltammogram of HBM on gold electrode in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl solution with $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

$K_3(CN)_6/K_4(CN)_6$ at $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

(a) HBM on gold electrode; (b) HBM on gold electrode

after interaction with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

$K_7Fe^3^+P_2W_{17}O_{62}H_2$; (c) HBM on gold

electrode after interaction with $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} K_7Fe^3^+P_2W_{17}O_{62}H_2$

以上实验结果证实杂多酸 $K_7Fe^3^+P_2W_{17}O_{62}H_2$ 与磷脂发生较强的相互作用.我们可以推断:由于 $K_7Fe^3^+P_2W_{17}O_{62}H_2$ 是一种水溶杂多酸,很难象膜蛋白那样嵌入杂化膜的疏水层.它首先应该是吸附到磷脂单层表面,与磷脂的极性基团发生作用,改变了磷脂单层的结构,一些磷脂结合到杂多酸周围,减小了磷脂极性头之间的相互作用,可能导致磷脂分子间排列变得较松散.这样在磷脂单层上会产生一些孔洞,通过磷脂的碳链对硫醇单层的影响不大,但磷脂和硫醇单层间的疏水作用会有所减少.根据杂多酸与磷脂间的作用是不可逆的结果,我们可以进一步推测杂多酸作用于磷脂表面,可能造成部分磷脂结合杂多酸后脱离杂化膜,在磷脂单层上形成不可逆转的孔洞.探针 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 通过这些孔洞接近电极,在一定程度上减小了电荷传递电阻. Suwalaky 等^[17,18]研究了 Cu^{2+} 和三乙酰乙酸钠(aluminum acetylacetonate)与细胞膜和仿生膜间的相互作用.他们发现 Cu^{2+} 和三乙酰乙酸钠与细胞膜的磷脂极性头作用,改变膜的结构,影响膜蛋白特别是通道蛋白的活性.进而改变细胞膜的生物物理性质和生理活性.如果将这种杂多酸引入生物体内,我们可以推测杂多酸与细胞膜的磷脂的相互作用:(a)将影响组成细胞膜的膜蛋白的周围环境,使膜蛋白的三级、四级结构发生改变,膜蛋白的功能必然要发生变化,即细胞膜的生理活性变化.(b)就像 α 溶血素作用于红细胞的细胞膜,产生内径很大的通道,导致胞液外流,最后红细胞溶解一样^[19,20],细胞膜的结构变得松散,乃至出现孔洞,导致膜内成分溢出,最终导致细胞死亡.这可能是杂多酸产生药效的一种途径.开展杂多酸与仿生膜间相互作用的研究,对于将杂多酸用于医药领域是很有意义的.我们的工作刚刚开始,深入、细致的研究必能揭开更多杂多酸的奥秘,服务于人类.

References

- 1 Kloster, G. M.; Anson, F. C. *Electrochim. Acta*, 1999, 44, 2271.
- 2 Li, L. - D.; Li, W. - J.; Sun, C. - Q. *Chem. J. Chin. Univ.*, 2000, 21, 865 (in Chinese).
- 3 Barth, M.; Lapkowski, M.; Lefrant, S. *Electrochim. Acta*, 1999, 44, 2117.
- 4 Song, W. - B.; Liu, Y.; Lu, N.; Xu, H. - D.; Sun, C. - Q. *Electrochim. Acta*, 2000, 45, 1639.
- 5 Tess, M. E.; Cox, J. A. *Electroanalysis*, 1998, 10, 1237.
- 6 Yamase, T. *Inorg. Chim. Acta*, 1988, 151, 15.

- 7 Wang, X. - H.; Sun, Z. - G.; Liu, J. - F. *Chin. J. Chem.*, **1999**, *17*, 526.
- 8 Muller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. *Nature*, **1962**, *194*, 979.
- 9 Stelzle, M.; Sackmann, E. *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 2974.
- 10 Ding, L.; Li, J.; Dong, S.; Wang, E. *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, *416*, 105.
- 11 Terrettaz, S.; Stora, T.; Duschl, C.; Vogel, H. *Langmuir*, **1993**, *9*, 1361.
- 12 Plant, A. L. *Langmuir*, **1993**, *9*, 2764.
- 13 Sabatini, E.; Rubinstein, I. *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 6663.
- 14 Lyon, D. K.; Miller, W. K.; Novet, T.; Domaille, P. J.; Eritt, E.; Johnson, D. C.; Finke, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7209.
- 15 Gao, H.; Luo, G. - A.; Feng, J.; Ottova, A. L.; Tien, H. T. *Acta Chim. Sinica*, **2001**, *59*, 220 (in Chinese).
- 16 Wang, J. G.; Liu, S. Q.; Han, X. J.; Teng, R. R.; Wang, E. K.; Dong, S. J. *J. Electroanal. Chem.*, Revised.
- 17 Suwalaky, M.; Ungerer, B.; Quevedo, L.; Aguilar, F.; Sotomayor, C. P. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, *70*, 233.
- 18 Suwalaky, M.; Ungerer, B.; Villena, F.; Norris, B.; Cardenas, H.; Zatta, P. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, *75*, 263.
- 19 Song, L. - Z.; Hobough, M. R.; Shustak, C.; Chekey, S.; Bayley, H.; Goux, J. E. *Science*, **1996**, *274*, 1859.
- 20 Bayley, H. *Sci. Am.*, **1997**, *277*, 62.

(PAN Bing - Feng)

(DONG Hua - Zhen)