

苏丹 II 与血红蛋白相互作用的电化学研究

魏南南, 毛 慧, 吴 丽, 陆天虹, 赵 波, 杜江燕

(江苏省生物功能材料重点实验室, 南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 用循环伏安法研究了苏丹 II 与牛血红蛋白 (BHb) 在碳纳米管 (CNTs) 修饰玻碳 (GC) 电极上的电化学行为, 发现苏丹 II 在 CNTs 修饰的 GC (CNTs/GC) 电极上能进行准可逆的电化学反应, 式量电位 E^0 为 55 mV. 而在 BHb/CNTs/GC 电极上, 苏丹 II 电化学反应也是准可逆的, 但 E^0 为 70 mV, 正移了 15 mV, 表明苏丹 II 与 BHb 发生了相互作用. 苏丹 II 与 BHb 的相互作用还与溶液 pH 有关, 在 pH 为 4.5 时, 它们的相互作用最强.

[关键词] 血红蛋白, 苏丹 II, 碳纳米管, 电化学反应

[中图分类号] O646 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)01-0063-05

Electrochemical Study on Interaction of SudanII and Hemoglobin

WeiNannan, Mao Hui, Wu Li, Lu Tianhong, Zhao Bo, Du Jiangyan

(Jiangsu Key Laboratory of Biofunctional Materials, School of Chemistry and Environmental Science,
Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract The electrochemical behavior of SudanII with BHb was investigated at the CNTs modified GC electrode using the cyclic voltammetry. It was found SudanII can undergo a quasi-reversible electrochemical reaction at the CNTs/GC electrode. The formal potential E^0 is 55 mV. At the BHb/CNTs/GC electrode, the electrochemical reaction of SudanII is also quasi-reversible. However, E^0 is 70 mV. It is positively shifted 15 mV, comparing with that at the CNTs/GC electrode. This demonstrated that SudanII has interacted with BHb. The interaction between SudanII and BHb is also related to the pH of the solution. When the pH of the solution is 4.5, their interaction is the strongest.

Key words hemoglobin, sudanII, carbon nanotubes, electrochemical reaction

苏丹染料主要包括苏丹 I、苏丹 II、苏丹 III 和苏丹 IV, 广泛地用在化学工业、纺织品、皮革和木材工业. 但是实验已经证明苏丹染料对人体有害, 这是由于苏丹染料含有偶氮苯基团 (图 1), 当偶氮苯被降解后, 会产生一种具有中等毒性的致癌物质苯胺而引发癌症^[1]. 过量的苯胺被吸入人体, 可能造成组织缺氧、呼吸不畅、中枢神经系统、心血管系统受损. 如果短期内大量食用, 则会直接引起死亡^[2].

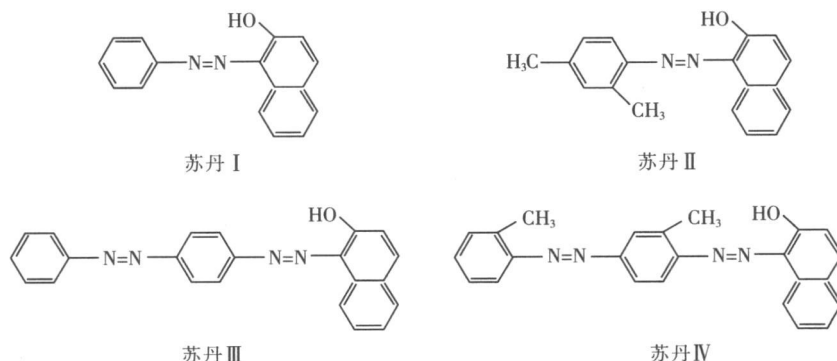


图 1 苏丹染料结构式

Fig. 1 The structure scheme of Sudan dyes

收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 自然科学基金委重点基金 (20833006).

通讯联系人: 杜江燕, 博士, 教授, 研究方向: 生物电化学. E-mail: dujiangyan@njnu.edu.cn

为了研究苏丹对人类的危害,首先要对苏丹染料进行检测.目前广泛使用的检测方法有高效液相色谱法^[3-5]、高效液相色谱法-质谱法^[6-7]和酶联免疫吸附分析法^[8].与上述方法相比较,电化学方法是一种高效廉价的分析方法.例如, Du 等研究了苏丹染料在玻碳电极表面的电化学反应^[9]; Lin 等研究了苏丹染料在脱土钙修饰的碳糊电极上的电化学反应^[10]; 常凤滨等研究了苏丹 II 对小鼠血液的影响^[11].其次,在研究一种物质对人体的危害时,一般选用一种蛋白质或酶作为代表性的生物分子,研究这种物质对该种蛋白质或酶的结构和性质的影响,从而推测这种物质对人体危害的机理.血红蛋白起运输氧气的作用,它也帮助直接或间接地运输二氧化碳和控制血液的 pH 值,是一种重要的蛋白质.因此,本文选用牛血红蛋白(BHb)作为一种代表性的蛋白质,苏丹 II 为代表性的苏丹染料,用电化学方法研究了 BHb 对苏丹 II 电化学性质的影响.到目前为止,对苏丹 I 的电化学性质已有一些报道,而对苏丹 II 的研究报道则很少,还没有人研究过 BHb 对苏丹 II 电化学性质的影响.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BHb(Signa 公司),苏丹 II(国药试剂化学有限公司),CNTs(深圳纳米港有限公司),直径 10 nm,管长 5~500 μm .其它试剂均为分析纯试剂,所有溶液都用三次蒸馏水配置.

M 273 型恒电位仪(美国 EG&G 公司, USA),超声波清洗器(KQ 220Q 上海声源超声波仪器设备有限公司),酸度计(PHS-3C,上海大分析仪器厂).

1.2 实验方法

1.2.1 材料准备

取适量 BHb 溶于 0.2 mol/L pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,制成 10^{-5} mol/L BHb 溶液.将苏丹 II 溶于乙醇中,制成 10^{-4} mol/L 苏丹 II 溶液.

CNTs 使用前在 65% 的浓硝酸中煮沸、回流 4~5 h 再用三次蒸馏水浸泡、洗涤、过滤、烘干.然后将处理过的 1.0 mg CNTs 分散在 2.0 mL N,N-二甲基甲酰胺中,得到 0.5 g/L CNTs 悬浊液.

1.2.2 电极制备

GC 电极依次用 03# 砂纸、0.3 和 0.05 μm Al_2O_3 粉末抛光至呈镜面,超声清洗、晾干后,得到 GC 电极.将 4.0 μL CNTs 悬浊液滴于 GC 电极表面,室温下待溶剂挥发后,即得 CNTs/GC 电极.

取 4 μL 10^{-4} mol/L 苏丹 II 的乙醇溶液,分别滴到 GC 和 CNTs/GC 电极表面,室温下晾干,分别得到苏丹 II/GC 和苏丹 II/CNTs/GC 电极.

取不同体积 10^{-5} mol/L BHb 的醋酸-醋酸钠缓冲液,滴到 CNTs/GC 电极表面,室温下晾干,即得 BHb/CNTs/GC 电极.

取 4 μL 10^{-4} mol/L 苏丹 II 的乙醇溶液,滴至 BHb/CNTs/GC 电极表面,室温下晾干,得到苏丹 II/BHb/CNTs/GC 电极.

1.2.3 电化学测量

电化学测量用恒电位仪和常规的三电极电化学池进行.对电极为 Pt 丝电极,参比电极为饱和甘汞电极(SCE),本文引用的电位都是相对于 SCE 的,工作电极为修饰 GC 电极.电解液为 0.2 mol/L pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液.在电化学测试前,溶液通高纯氮气 10 min 以除去溶解的 O_2 ,测量时在溶液上方通氮气保护.实验在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 下进行,进行循环伏安测量时,电位扫描速率一般为 0.10 V/s.

2 结果与讨论

图 2 为苏丹 II/GC 和苏丹 II/CNTs/GC 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线.由图 2 插图可知,在苏丹 II/GC 电极上,苏丹 II 的氧化还原峰峰电流很小,而在苏丹 II/CNTs/GC 电极上,苏丹 II 的氧化还原峰峰电流很大,峰电位分别位于 66 和 45 mV (图 2 曲线 b),峰电位差为 21 mV,氧化还原峰峰电流基本相等,表明吸附在 CNTs/GC 电极上苏丹 II 的电化学反应是准可逆的,式量电位 $E^0 = 55 \text{ mV}$,说明 CNTs/GC 电极对苏丹 II 的电化学反应有很好的促进作用.

图 3 为不同扫速时苏丹 II/CNTs/GC 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线.由图

可见, 随着扫描速度的增加, 还原峰电位负移, 氧化峰电位正移, 但 E^0 基本不变. 当扫描速度在 20~ 300 mV /s 范围内, 还原峰电流与扫描速度呈线性关系 (图 3 插图), 线性方程 $i_{pc} = -8.992 - 0.473 0v$ ($R = 0.998$), 说明苏丹 II 在 CNTs/GC 电极上的电化学反应过程是受表面控制的, 苏丹 II 的确吸附在 CNTs/GC 电极表面.

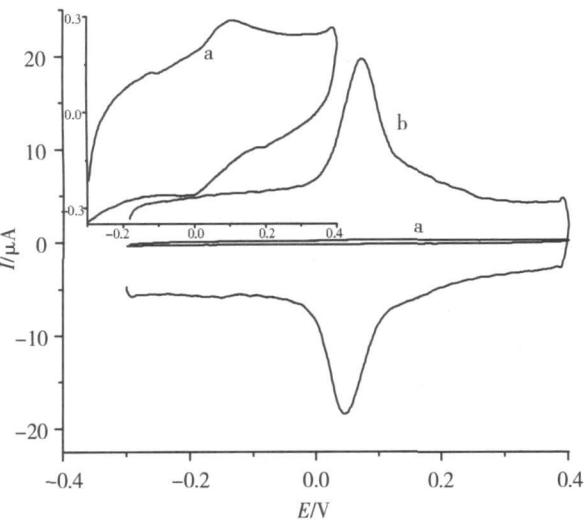


图 2 苏丹 II/GC(a) 和苏丹 II/CNTs/GC; (b) 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线,插图:苏丹 II/GC (a) 的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of (a) Sudan II/GC and; (b) Sudan II/CNTs/GC electrodes in 0.2 mol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.5). Inset: enlarged cyclic voltammogram of Sudan II/GC electrode

根据描述准可逆薄层电化学过程的 Laviran 理论^[12]和图 3, 可得到阴极峰峰电位 E_{pc} 与 $\lg v$ 的斜率为 $-2.3RT/\alpha nF$, 阳极峰峰电位 E_{pa} 与 $\lg v$ 的斜率为 $2.3RT/(1-\alpha)nF$, 可得到电子转移数 $n=2$ 电子传递系数 $\alpha=0.49$ 接近理论值 0.5 说明苏丹 II 在 CNTs/GC 电极上的电化学反应的确是符合准可逆过程特征. 电极反应速率常数 k_s 可根据公式

$$\lg k_s = \alpha \lg (1-\alpha) + (1-\alpha) \lg \alpha - \lg (RT/nFv) - \alpha (1-\alpha)nF \Delta E_p / 2.3RT,$$

计算得出 $k_{s1} = 2.244 \text{ s}^{-1}$.

图 4 为苏丹 II /CNTs/GC (图 4 曲线 a) 和苏丹 II /BHb/CNTs/GC (图 4 曲线 b) 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线. 由图可见, 在苏丹 II /BHb/CNTs/GC 电极的循环伏安曲线中, 有一对苏丹 II 的氧化还原峰 (图 4, 曲线 b), 氧化还原峰峰电位分别在 82 和 57 mV, 峰电位差为 25 mV, 氧化还原峰峰电流基本相同, 表明苏丹 II 在 BHb/CNTs/GC 电极上的电化学反应也是准可逆的, $E^0 = 70 \text{ mV}$. 与在 CNTs/GC 电极上相比, 苏丹 II 在 BHb/CNTs/GC 电极上的氧化峰和还原峰电位均向正方向移动, E^0 正移了 15 mV, 表明苏丹 II 与 BHb 发生了相互作用.

由图 4 还可见, 苏丹 II /BHb/CNTs/GC 电极上的氧化还原峰峰电流要远小于苏丹 II /CNTs/GC 电极上的. 按照前述相似的方法, 计算苏丹 II 在 BHb/CNTs/GC 上的电极反应速率常数 $k_{s2} = 2.178 \text{ s}^{-1}$. 比较可知, k_{s2} 值小于 k_{s1} , 这可能是由两个因素引起的, 一是由于 BHb 的导电性不好而引起电流的下降, 二是由于苏丹 II 与 BHb 的相互作用引起电流的下降.

图 5 为不同 BHb 修饰量的苏丹 II /BHb/CNTs/GC 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线. 由图可见, 当 BHb 的滴加量从 0 到 4 μL 增加时, 苏丹 II 的氧化还原峰峰电流随 BHb 的滴加量的增加而降低 (图 6). 这是由于苏丹 II 与 BHb 相互作用和 BHb 本身的导电性不好而引起的. 当 BHb 的滴加量超过 2 μL 时, 苏丹 II 的氧化还原峰电流减小的幅度比较小, 说明苏丹 II 与 BHb 相互作用达到饱和, 所以本文中选取 BHb 的滴加量为 2 μL .

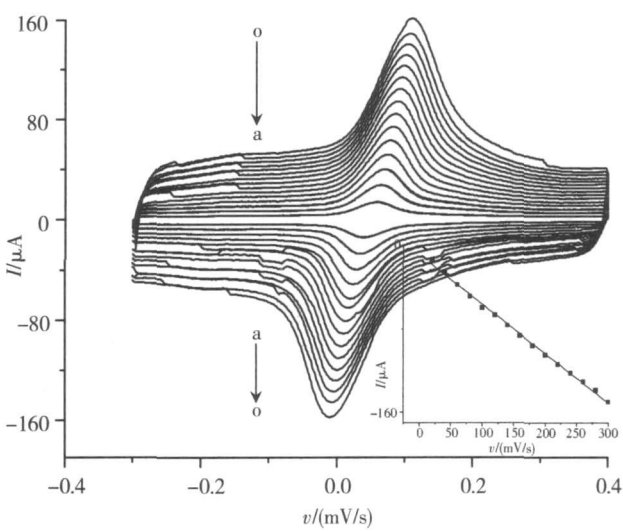


图 3 不同扫速时苏丹 II/CNTs/GC 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of the Sudan II/CNTs/GC electrode in 0.2 mol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.5) at the scan rate: (a) 20, (b) 40, (c) 60, (d) 80, (e) 100, (f) 120, (g) 140, (h) 160, (i) 180, (j) 200, (k) 220, (l) 240, (m) 260, (n) 280 and (o) 300 mV/s. Inset: plot of I_{pc} vs. v

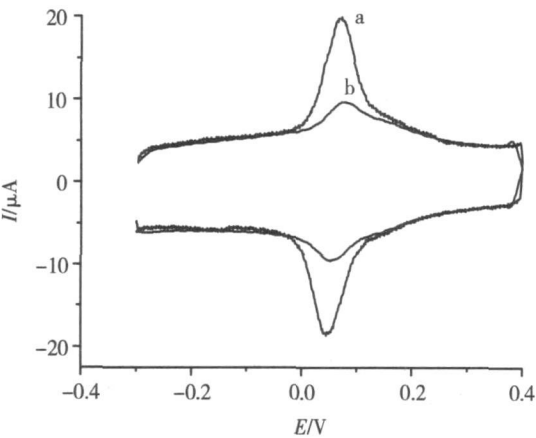


图 4 苏丹 II/CNTs/GC 和苏丹 II/BHb/CNTs/GC 电极在醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中的循环伏安曲线

Fig.4 Cyclic voltammograms of (a) Sudan II/CNTs/GC and (b) Sudan II/BHb/CNTs/GC electrodes in 0.2 mol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.5)

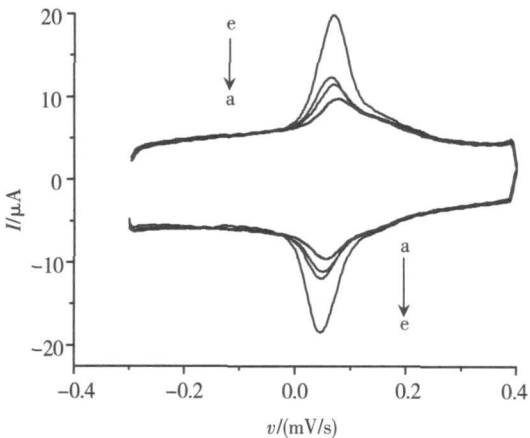


图 5 不同 BHb 修饰量的苏丹 II/BHb/CNTs/GC 电极在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的循环伏安曲线

Fig.5 Cyclic voltammograms of Sudan II/BHb/CNTs/GC electrodes with (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 3 and (e) 4 μL BHb in 0.2 mol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.5)

图 7 为在不同 pH 的醋酸-醋酸钠缓冲液中, 苏丹 II 在 CNTs/GC 和 BHb/CNTs/GC 电极上氧化峰电流与 pH 的关系曲线. I_1 为苏丹 II 在 CNTs/GC 上的氧化峰峰电流, I_2 为苏丹 II 在 BHb/CNTs/GC 电极上的氧化峰峰电流, $(I_1 - I_2)/I_1$ 代表苏丹 II 与 BHb 作用后氧化峰电流变化的相对大小, 因此 $(I_1 - I_2)/I_1$ 的大小也表明苏丹 II 与 BHb 结合作用强弱. 由图 7 可知, 在 pH 4.5 时, 苏丹 II 的氧化峰峰电流减小的程度最大, 说明苏丹 II 与 BHb 相互作用与溶液 pH 有关, 当 pH 为 4.5 时, 它们的相互作用最强.

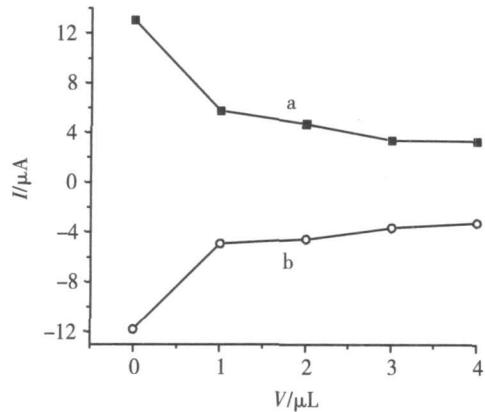


图 6 苏丹 II/BHb/CNTs/GC 电极上的峰电流与 BHb 修饰量的关系曲线

Fig.6 Plots of (a) I_{pa} and (b) I_{pc} at the Sudan II/BHb/CNTs/GC electrodes vs. V_{BHb}

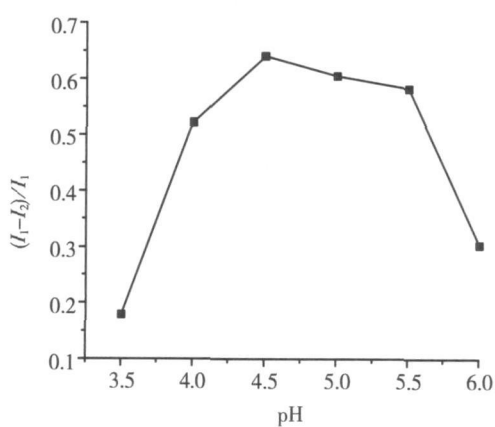


图 7 $(I_1 - I_2)/I_1$ 与醋酸-醋酸钠缓冲液 pH 的关系曲线

Fig.7 Plot of $(I_1 - I_2)/I_1$ vs. pH in 0.2 mol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution

3 结论

- 用循环伏安法研究了苏丹 II 的电化学行为和与 BHb 的相互作用, 得到如下结论:
- (1) CNTs 能促进苏丹 II 的电化学反应, 苏丹 II 在 CNTs/GC 电极上能进行准可逆的电化学反应, E^0 为 55 mV.
 - (2) 苏丹 II 在 BHb/CNTs/GC 电极上的电化学反应也是准可逆的, 但其 E^0 为 70 mV, 比在 CNTs/GC 电极上正移了 15 mV, 峰电流也减小, 除了 BHb 的导电性不好之外, 主要是由于苏丹 II 与 BHb 发生了相互作用.
 - (3) 苏丹 II 与 BHb 的相互作用与溶液 pH 有关, 当溶液 pH 为 4.5 时, 苏丹 II 与 BHb 的相互作用最强.

[参考文献]

- [1] Stiborova M, Martinek V, Rydlova H. Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant Cytochrome P450 1A1 and liver microsomes[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(20): 5678-5684.
- [2] 徐颖, 顾岚, 赵晓卫. 从苏丹红事件引发的对我国食品安全性问题的思考[J]. *中国调味品*, 2006(4): 4-8.
- [3] Comet V, Govaert Y, Moens G. Development of a fast analytical method for the determination of Sudan dyes in chilli and curry-containing food stuffs by high performance liquid chromatography-photodiode array detection[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(3): 639-644.
- [4] Tateo F, Bononi M. Fast determination of Sudan I by HPLC/APC-MS in hot chilli spices and oven-baked foods[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(4): 655-658.
- [5] 吴银良, 李存, 沈建忠. 高效液相色谱法快速测定鸭肉和鸭蛋中苏丹红染料[J]. *分析化学*, 2008, 36(6): 843-845.
- [6] Cabiani F, Careri M, Zagnoni I. Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products[J]. *J Chromat A*, 2004, 1042(1): 123-130.
- [7] Zhang Y T, Zhang Z J, Sun Y H. Development and optimization of an analytical method for the determination of Sudan dyes in hot chilli pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated BrO₂-luminescence detection[J]. *J Chromat A*, 2006, 1129(1): 34-40.
- [8] 韩丹, 于梦, 邓安平. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. *分析化学*, 2007, 35(8): 1168-1170.
- [9] Du M J, Zhou Z H, Wu S G. Determination of Sudan I in hot chili powder by using an activated glassy carbon electrode[J]. *Food Chem*, 2007, 105(2): 883-888.
- [10] Lin H G, Li G, Wu K B. Electrochemical determination of Sudan I using montmorillonite calcium modified carbon paste electrode[J]. *Food Chem*, 2008, 107(1): 531-536.
- [11] 常凤滨. 苏丹红 II 对小鼠血液的影响[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2007, 28(20): 2433-2435.
- [12] Bard A J, Faulkner L R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001: 231.
- [13] Carter M T, Rodriguez M, Bard A J. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine[J]. *J Am Chem Soc*, 1989, 111(24): 8901-8911.

[责任编辑: 顾晓天]