

DOI: 10.13208/j.electrochem.140432

Artical ID:1006-3471(2014)06-0533-05

Cite this: *J. Electrochem.* 2014, 20(6): 533-537

Http://electrochem.xmu.edu.cn

生物醌分子伏安响应的多电子转移辨析

周 浩, 龙亿涛*

(华东理工大学结构可控先进功能材料及其制备教育部重点实验室, 上海 200237)

摘要: 电化学反应中, 一个基元电子转移反应仅对应一个电子交换, 实际上多电子转移反应也涉及对应数目的单电子转移步骤, 分离、辨析每个电子基元反应的氧化还原峰电位十分重要. 本文以辅酶 Q_0 (CoQ_0)、亚甲基桥连双辅酶 Q_0 ($Bis-CoQ_0$) 为模型, 采用循环伏安和方波伏安技术研究其电化学特性, 提出了一种应用于多电子转移体系、分析单个电子转移电位的方法. 实验表明, CoQ_0 经历两步单电子还原反应. $Bis-CoQ_0$ 中两个醌单元发生强电子相互作用, 电极过程为 4 电子多步转移. 对于表观上的 4 电子“三步”转移反应, 拟用 Lorentzian-Gaussian 分峰拟合 CoQ_0 和 $Bis-CoQ_0$ 体系方波伏安响应曲线, 分别获取每个电子转移步骤的电位, 进一步证明 $Bis-CoQ_0$ 经历四步单电子转移反应, 为热力学研究提供更多信息.

关键词: 辅酶 Q_0 ; 电子相互作用; 方波伏安法; 多电子转移; 分峰; 单电子响应辨析

中图分类号: O646

文献标识码: A

电子转移反应是大量生物反应的关键步骤, 如代谢作用、信号传导和能量转换等. 生物体内的电子传递链包含一系列生物分子, 部分生物分子含有多个氧化还原活性辅因子^[1]. 因此, 研究辅因子或生物分子之间的多电子传递过程, 对生物体系中电子转移和能量转换机理的揭示和生物分子结构、理化性质与生物功能之间的关系探索有着重大意义^[2]. 在分子电子、电荷存储和光能转换等领域, 含多氧化还原活性中心的功能分子也越来越受关注^[3].

电化学技术是研究电子转移最直接的手段. 电化学反应中, 一个电子交换与一个基元电子转移反应相对应, 若整个电极反应中涉及多个电子的转移, 则必定有对应数目的单步单电子转移反应, 每步电子转移反应依次进行^[4]. 而大部分多电子转移体系中多步单电子转移反应的标准电位相当接近, 甚至因结构变化引起次序逆转, 导致其电化学响应信号叠加, 表观上与单步单电子转移反应极为类似, 这使得分析判断复杂多电子体系中电极过程的热力学、动力学信息存在一定难度. 循环伏安法作为“电化学谱”已广泛应用于研究多电子转移反应^[5], 而方波伏安法也有相同的适应性,

并可消除背景充电电流的干扰, 其灵敏度更高, 示差电流的峰形更对称^[6]. 若能借助合理的拟合方法, 对循环伏安曲线或方波伏安曲线的实验数据进行模拟分析, 并直接分离出每步电子转移反应所对应的电化学响应信号, 可为复杂多电子电极反应提供重要的热力学、动力学信息.

辅酶 Q_n 是一类广泛存在于生物体内的醌类化合物, 并作为关键的电子和质子传递中间体参与生物氧化的能量转换过程^[7-8]. 辅酶 Q_0 (CoQ_0) 是辅酶 Q_n 系列中结构最简单的分子, 具有单电活性中心, 其在质子惰性溶剂中经历两步单电子转移反应, 呈现 2 对氧化还原峰, 如图 1 所示^[9]. 两个 CoQ_0 被亚甲基桥连后, 因醌环之间存在着强烈的分子内电子相互作用, 两个电活性中心得失电子分步进行^[10], 因此, 亚甲基桥连的双辅酶 Q_0 ($Bis-CoQ_0$) 为多电子转移过程中单步电子转移的解析提供了代表性模型. 本文以 CoQ_0 、 $Bis-CoQ_0$ 为模型, 通过方波伏安曲线的 Lorentzian-Gaussian 分峰拟合, 辨析出 $Bis-CoQ_0$ 的多电子转移反应中单个电子转移对应的电化学响应.

1 实验

1.1 试剂与材料

收稿日期: 2014-04-29, 修订日期: 2014-06-23 * 通讯作者, Tel: (86-21)64250032, E-mail: ytlong@ecust.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 21125522)和上海高校特聘教授(东方学者, 跟踪计划)资助

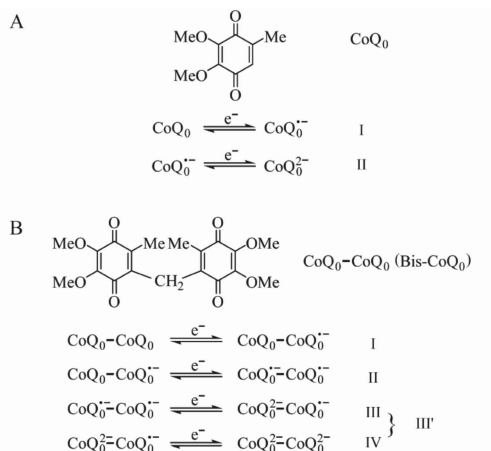


图 1 在质子惰性溶剂中 CoQ_0 (A)和 Bis-CoQ_0 (B)氧化还原过程的电子转移反应

Fig. 1 Electron transfer steps involved in the redox processes of 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (A, CoQ_0) and bis-(2,3-dimethoxy-5-methyl-4-benzoquinone)-methane (B, Bis-CoQ_0) in aprotic solvent

辅酶 Q_0 (CoQ_0 , >98%)、四丁基高氯酸铵 (TBAP, $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich 公司). CoQ_0 经柱色谱提纯后,在热石油醚中两次重结晶. CoQ_0 用硼氢化钾还原后经硫酸二甲酯甲基化,在三氯化铟催化下,继续与三氧六环反应生成甲氧基保护的亚甲基桥连双辅酶 Q_0 ,该产物被氧化银氧化后经分离纯化得到亚甲基桥连双辅酶 Q_0 (Bis-CoQ_0). 分子筛 (0.3 nm),超纯水 (电导率 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, Milli-Q Elga 净化). 其他试剂均为分析纯. 电化学电极与抛光材料 (上海辰华); 恒温五口电解池 (武汉高仕睿联).

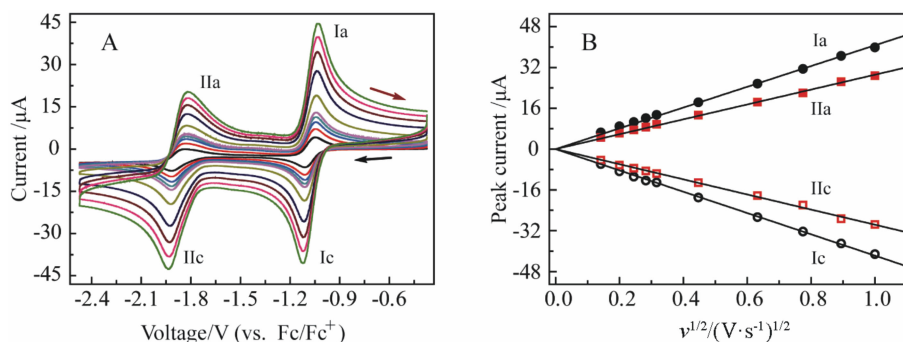


图 2 在 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoQ}_0 + 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{TBAP}$ 的 DMF 溶液中玻碳电极的循环伏安曲线(A)和 i_p - $\nu^{1/2}$ 曲线(B),扫描速率 $\nu/(\text{V} \cdot \text{s}^{-1})$: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1

Fig. 2 A. Cyclic voltammograms of glassy carbon electrode in distilled DMF containing $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoQ}_0$ and $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{TBAP}$ at varying scan rates ($\nu/(\text{V} \cdot \text{s}^{-1})$: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1), black arrow indicates the initial scan direction; B. The plots of peak currents for CoQ_0 (i_p) versus the square root of scan rate ($\nu^{1/2}$)

1.2 方法

分子筛 (0.3 nm) 240 °C 活化干燥 12 h, 支持电解质四丁基高氯酸铵 120 °C 干燥 2 h, 均置于真空干燥器里冷却. CaH_2 蒸馏干燥二甲基甲酰胺 (DMF), 置于分子筛保护的干燥器, 通入干燥氮气除溶解氧, 而后加入 Bis-CoQ_0 和电解质, 继续维持氮气氛围, 并在 25 mL 含分子筛的真空注射器内存放至少 12 h.

由玻碳工作电极 (玻碳依次用 $0.3 \mu\text{m}$ 、 $0.05 \mu\text{m}$ 的氧化铝粉打磨, 经超纯水冲洗, 50% 乙腈水溶液超声清洗, 氮气吹干)、铂丝对电极和银/氯化银丝准参比电极, 以二茂铁为内标组成三电极系统, 采用 CHI 660C 电化学工作站 (美国 CH Instruments 公司) 测试体系的电化学性能, 以干燥氮气流维持无氧环境, 分子筛保持干燥, 循环水浴控制体系温度为 25 °C.

2 结果与讨论

2.1 CoQ_0 的循环伏安特性

图 2 示出 CoQ_0 在重蒸二甲基甲酰胺溶液的循环伏安曲线. $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速率下, CoQ_0 有 2 对对称的氧化还原峰, 两步氧化还原电位分别为 -1.078 V 与 -1.874 V, 峰电位分别为 -1.044 V (Ia)、-1.113 V (Ic) 和 -1.829 V (IIa)、-1.919 V (IIc). 扫描速率增加, CoQ_0 氧化峰均微小正移, 其还原峰则负移, 氧化峰和还原峰电流与扫描速率的平方根成正比, 表明电极反应受扩散控制. 在扫描速率对应的时间范围内, CoQ_0 自由基的歧化反应、二聚反应对电极反应的影响并不显著. 在所研究的扫描速

率范围内, 第一步电子转移对应的氧化峰与还原峰的差值均小于 80 mV, 氧化峰与还原峰电流之比接近于 1; 第二步电子转移反应的峰峰差值均小于 110 mV, 氧化峰与还原峰电流之比稍小于 1. 这表明, 第一步电子转移系可逆反应, 第二步为准可逆反应. 第二步还原峰的峰电流均比第一步的小, 这归因于 CoQ_0 第二步还原反应生成的二价阴离子与 CoQ_0 初始态结合^[1], 扩散层里的 CoQ_0 不再全部还原生成自由基阴离子, 致使可电化学还原的 CoQ_0 阴离子自由基浓度明显小于本体溶液中 CoQ_0 初始态的浓度.

2.2 Bis- CoQ_0 的循环伏安特性

如图 3 所示, $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描速率, Bis- CoQ_0 在质子惰性二甲基甲酰胺溶液中经历多步 4 电子还原, 有 3 对氧化还原峰, 其电位分别位于 -1.052 V, -1.266 V 和 -1.902 V (第三步电极过程的“氧化峰电位”统计为氧化电流最大处对应的氧化电位), 对应的峰电位为 -1.022 V(Ia)、-1.083 V(Ic)、-1.236 V(IIa)、-1.297 V(IIc) 和 -1.774 V(III'a)、-2.031 V(III'c), 这表明, 亚甲基桥连后, 其醌环之间存在着强电子相互作用并造成能级裂分, 可连续得到单个电子, 依次形成 Bis- CoQ_0 的阴离子自由基、二价阴离子. 一价阴离子自由基中两个醌单元共有孤对电子; 两电子还原产物二价阴离子则不含孤对电子从而呈反磁性状态, 二价阴离子继续接受另外两个电子后被还原为四价阴离子^[10]. 第三个还原过程涉及两个电子转移, 其循环伏安曲线却只呈现出一对氧化还原峰.

扫速增加, Bis- CoQ_0 的氧化峰和还原峰电流

随扫描速率的平方根增加线性增长, 这表明电极反应受扩散控制, 且化学反应的作用基本保持不变. Bis- CoQ_0 的第一(I)、第二(II)氧化还原过程, 其氧化峰电流和还原峰电流比值为 0.97, 接近于 1. 氧化峰与对应还原峰的峰差值与同体系下 CoQ_0 的相似, 并随扫速递增而稍有增大, 可确证其为可逆电极反应, 峰差值的增加缘由溶液电阻未补偿. 第三(III')个氧化还原过程, 最低扫速下氧化峰明显, 扫速增加其半峰宽逐增, 峰形逐变为平头峰甚至呈现肩峰; 其电流(可统计的最大值)与还原峰电流之比为 0.55 ~ 0.84, 高扫速下该比值更小; 另外, 扫描速率增加, 其氧化峰、还原峰电位位移显著, 氧化峰电位在高扫速下增速减慢. 这表明第三步氧化还原过程不可逆, 其缘由电子转移反应速率常数较小, 且电子转移反应与一系列化学反应耦合, 其中作用最明显的是四价阴离子与 Bis- CoQ_0 初始态的结合反应^[11-12]. 改变扫描速率后, 两者造成的影响完全相反且同时进行, 使得峰电流与扫描速率的二分之一次方仍呈现较好的线性.

2.3 CoQ_0 与 Bis- CoQ_0 的方波伏安特性及拟合分析

Bis- CoQ_0 的第三步氧化还原涉及复杂的电极反应过程, 其循环伏安曲线只呈现出一对氧化还原峰, 分析难度较大. 为有效地辨析该过程中单个基元电子转移反应的电位, 采用拟合软件对方波伏安曲线进行分峰拟合, 从而定量分析每个单电子转移反应. 图 4 示出 CoQ_0 和 Bis- CoQ_0 在相同体系的方波伏安特性以及对应的拟合曲线, 方波伏安响应曲线的拟合参数列于表 1. 电极过程较简单

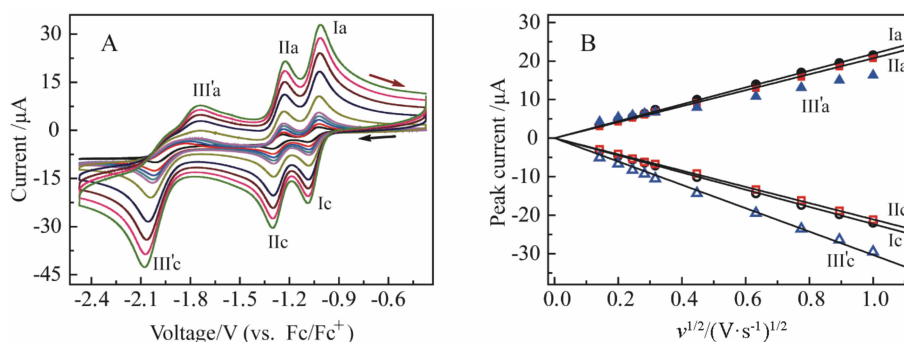


图 3 在 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bis- CoQ_0 + $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBAP 的 DMF 溶液中玻碳电极的循环伏安曲线 (A) 和 i_p - $v^{1/2}$ 曲线 (B), 扫描速率 $v/(\text{V} \cdot \text{s}^{-1})$: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1

Fig. 3 A. Cyclic voltammograms of glassy carbon electrode in distilled DMF containing $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bis- CoQ_0 and $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBAP at varying scan rates ($v/(\text{V} \cdot \text{s}^{-1})$: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1), black arrow indicates the initial scan direction; B. The plots of peak currents for Bis- CoQ_0 (i_p) versus the square root of scan rate ($v^{1/2}$)

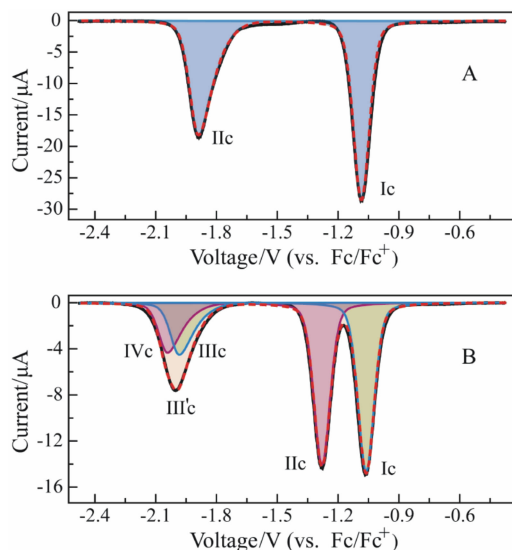


图 4 在 25 °C、0.5 mmol·L⁻¹ CoQ₀ (A) 或 Bis-CoQ₀ (B) + 0.15 mol·L⁻¹ TBAP 的 DMF 溶液, 玻碳电极的方波伏安曲线(原始数据(黑色实线)、拟合曲线(红色虚线)和分峰数据(彩色实线))

Fig. 4 Experimental (black line) and simulated (colored line) square-wave voltammetry values of CoQ₀ (A) and Bis-CoQ₀ (B), the experiments were preformed in distilled DMF containing 0.5 mmol·L⁻¹ quinone and 0.15 mol·L⁻¹ TBAP, at 25 °C

的 CoQ₀ 方波伏安曲线可拟合成 2 个峰, 两步电子转移的峰电位依次为 -1.080 V 与 -1.884 V, 半峰宽分别为 0.094 V 和 0.103 V, 其半峰宽与电子转移速率常数有关, 受化学反应速率的影响较小; 两步还原过程的峰差值为 0.804 V, 该值受不同价态分子的吉布斯自由能、溶剂化能量以及溶液中的水

含量影响^[12-13].

Bis-CoQ₀ 分子的强电子相互作用使两个醌环得失电子不同步, 其中一个醌环先得到一个电子, 而后另一个醌环在较负电位下得到第二个电子, 两步电子转移反应的电位有明显差异, 拟合可得两个峰 (峰 I 和 II). 两单峰的积分面积基本相同, 这意味着醌分子在电极表面几乎全部转换为二价阴离子; 其半峰宽与 CoQ₀ 第一个还原峰的一致, 故两个分子有近似的电子转移速率. 忽略化学反应对半峰宽的影响, 采用与 CoQ₀ 第二个还原峰相近的半峰宽 (0.103 V) 以及峰形参数 (0.5 与 50), 从 Bis-CoQ₀ 第三个氧化还原峰分离出两个半峰宽与 CoQ₀ 第二个还原峰相似的峰 (峰 III 与峰 IV), 这两个峰电位差值为 0.056 V、其积分面积比 0.96, 峰 III 的积分面积为峰 I 的 51%, 峰 IV 积分面积为峰 II 的 51%. 这表明 Bis-CoQ₀ 第三个峰中包含两个电子转移且分步进行, 其电极电位分别为 -1.985 V 与 -2.041 V. 另外电子转移反应后也可能发生一系列耦合化学反应: Bis-CoQ₀ 二价阴离子的歧化反应、Bis-CoQ₀ 二价阴离子的二聚反应、Bis-CoQ₀ 四价阴离子与 Bis-CoQ₀ 初始态的作用等. 其中, Bis-CoQ₀ 二价阴离子的歧化反应、二聚反应等化学反应主要影响第一、二步氧化还原过程的可逆性及其氧化、还原峰电流的比例, 但其反应速率缓慢, 作用并不明显; Bis-CoQ₀ 四价阴离子的反应活性较高, 与 Bis-CoQ₀ 初始态结合形成 Bis-CoQ₀ 二聚体, 改变峰 III 与峰 I 的比例 (或峰 IV 与峰 II 的比例), 该二聚体的电化学活性相对较差, 使得第三、四电子的氧化可逆性变差.

3 结 论

表 1 CoQ₀ 和 Bis-CoQ₀ 体系方波伏安响应曲线的拟合参数
Tab. 1 Simulation parameters of square wave voltammetric curves for CoQ₀ and Bis-CoQ₀ in distilled DMF containing 0.15 mol·L⁻¹ TBAP, at 25 °C

Compound		Reduction peak potential/V	Capacity of peak/(10 ⁻⁵ C)	Capacity ratio/S%	GL mixing parameter/M%	Half-width at half peak maximum/V
CoQ ₀	I	-1.080	10.8	0.98	30	0.094
	II	-1.884	10.5			0.103
Bis-CoQ ₀	I	-1.064	5.50	0.96	30	0.094
	II	-1.276	5.27			0.094
	III	-1.985	2.83			0.103
	IV	-2.041	2.72			0.103
	III'	-2.000	5.47			0.142

循环伏安和方波伏安曲线表明,CoQ₀在二甲基甲酰胺中经历两步单电子转移过程。Bis-CoQ₀由于分子内存在着强电子相互作用,还原过程两个醌环得失电子不同步。CoQ₀与Bis-CoQ₀有相近的电子转移速率。运用Lorentzian-Gaussian拟合CoQ₀和Bis-CoQ₀体系方波伏安响应曲线,发现Bis-CoQ₀实际经历四分步单电子转移反应。这种分析方法可辨析多电子转移过程的单个电子转移伏安响应,并可应用于更复杂的多电子转移电化学体系。

参考文献(References):

- [1] Moser C C, Keske J M, Warncke K, et al. Nature of biological electron transfer[J]. *Nature*, 1992, 355(6363): 796-802.
- [2] Ma W, Ying Y L, Qin L X, et al. Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(3):439-450.
- [3] Yao C J, Zhong Y W, Yao J. Multi-center redox-active System: Amine-amine electronic coupling through a cyclometalated bisruthenium segment[J]. *Inorganic Chemistry*, 2013, 52(7): 4040-4045.
- [4] Bard A J, Faulkner L R. *Electrochemical method: Fundamentals and applications* (2nd ed.)[M]. New York: Wiley & Sons, 2001: 108.
- [5] Heinze J. Cyclic voltammetry-"electrochemical spectroscopy". *New analytical methods* (25)[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1984, 23(11): 831-847.
- [6] Mirčeski V, Komorsky-lovrić Š, Lovrić M. *Square-wave voltammetry: Theory and application*[M]. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2007: 1.
- [7] Ma W, Long Y T. Quinone/hydroquinone-functionalized biointerfaces for biological applications from the macro- to nano-scale[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(1): 30-41.
- [8] Ma W, Li D W, Sutherland T C, et al. Reversible redox of NADH and NAD⁺ at a hybrid lipid bilayer membrane using ubiquinone[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(32): 12366-12369.
- [9] Ma W, Zhou H, Ying Y L, et al. *In situ* spectroelectrochemistry and cytotoxic activities of natural ubiquinone analogues[J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(33): 5990-6000.
- [10] Wang X W, Ma W, Ying Y L, et al. Bis-coenzyme Q₀: Synthesis, characteristics, and application[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2011, 6(4): 1064-1073.
- [11] Costentin C. Electrochemical approach to the mechanistic study of proton-coupled electron transfer[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(7): 2145-2179.
- [12] Hui Y, Chng E L K, Chng C Y L, et al. Hydrogen-bonding interactions between water and the one- and two-electron-reduced forms of vitamin K1: Applying quinone electrochemistry to determine the moisture content of non-aqueous solvents[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(4): 1523-1534.
- [13] Evans D H. One-electron and two-electron transfers in electrochemistry and homogeneous solution reactions[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(7): 2113-2144.

Resolve Mono-Electronic Process in the Voltammetric Behaviors of Multi-Redox Bis-Coenzyme Q₀

ZHOU Hao, LONG Yi-tao*

(Key Laboratory of Advanced Materials, Ministry of Education, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: A widely held concept in electrochemistry is that truly elementary electron-transfer reactions always involve the exchange of one electron, therefore, an overall process involving a change of n electrons must involve n distinct electron-transfer steps. It is highly desirable to resolve multiple-step electron transfer reactions into each electron transfer step. The electrochemical behaviors of coenzyme Q₀ and methylene-bridged bis-coenzyme Q₀ were investigated by cyclic voltammetry and square wave voltammetry in nonaqueous dichloromethane containing 0.15 mol·L⁻¹ Bu₄NClO₄ as the supporting electrolyte. The redox reaction of coenzyme Q₀ is well described as two chemically reversible one-electron reduction processes. Bis-coenzyme Q₀ exhibits three redox waves in voltammetric experiment, as two bridged coenzyme Q₀ units show strong intramolecular electron communication. Experimental data were curve fitted with a Gaussian and Lorentzian mixed product function after subtracting the Shirley background. Results show that four-electron reduction of bis-coenzyme Q₀ is preceded by stepwise pathways, defining as four successive, mono-electronic electron-transfer steps.

Key words: coenzyme Q₀; electron communication; square-wave voltammetry; multi-electron transfer; mono-electronic discrimination