

# 氯过氧化物酶修饰电极对一氯二甲酮的催化氯化

张红霞, 吴霞琴, 后雯璟, 陆中庆, 谢文, 王荣, 李和兴  
(上海师范大学生命与环境科学学院化学系, 上海 200234)

**摘要** 通过将氯过氧化物酶溶液(Chloroperoxidase, CPO)与 Nafion 分散的单壁碳纳米管分散液混合后直接滴涂到玻碳电极表面制得修饰电极. 这个固定了氯过氧化物酶的碳纳米管修饰玻碳电极, 在 pH = 5.0 的磷酸缓冲溶液中测得的循环伏安曲线上有一对可逆的氧化还原电流峰, 经过与裸电极和没有固定氯过氧化物酶的碳纳米管修饰电极上测得的循环伏安行为对比后确认, 碳纳米管对氯过氧化物酶与电极之间的电子传递反应具有很好的促进作用. 利用该修饰电极能催化一氯二甲酮氯化为二氯二甲酮, 无需添加过氧化氢作为反应启动剂, 紫外光谱的测试结果表明, 每摩尔氯过氧化物酶可催化氯化  $4.0 \times 10^5$  mol 的一氯二甲酮, 表现出很高的催化效率.

**关键词** 氯过氧化物酶; 羧基化碳纳米管; 修饰电极; 一氯二甲酮; 电催化

中图分类号 O646

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)09-1863-03

氯过氧化物酶(Chloroperoxidase, CPO)是从海洋真菌中分离得到的一种非常特殊的过氧化物酶<sup>[1]</sup>. CPO 具有很高的立体选择性, 在药物研发中显示出广泛的应用前景<sup>[2]</sup>. 目前, 关于 CPO 催化有机体系的反应已有报道, 但主要集中在少数几个均相体系中的催化研究. 如 Osborne 等<sup>[3]</sup>将 CPO 应用于烯烃环氧化实验, 得到较好的产率. Morgan 等<sup>[4]</sup>将 CPO 用于催化对二甲苯氧化成对苯二酸的反应, 与使用无机催化剂相比, 用 CPO 催化反应避免了大量重金属污染物的产生, 对环境保护起到了积极的作用. Van de velde 等<sup>[5]</sup>用 CPO 在异辛烷中将茴香硫醚立体选择性地氧化, 产率高达 99%. Park 等<sup>[6]</sup>将 CPO 引入到用表面活性剂分散的水相/有机相乳状液体系中, 使甲苯和对二甲苯的氧化产率提高了 10 倍. 然而, 与传统的用过氧化物酶作催化剂的反应一样, 这些工作均必须向反应体系中加入过氧化氢启动反应, 而且其酶用量也相对较多. 另外, CPO 与细胞色素 c 这类含铁卟啉环的生物分子类似, 结构庞大、电活性中心不易暴露, 在电极上容易因吸附变性而造成表面的钝化, 因而在常规的固体电极上的电子传递速率极其缓慢<sup>[7]</sup>.

由于 CPO 在裸的玻碳电极表面上不能进行直接的电子传递或者电子传递速度很慢而难以观察到, 本文尝试将 CPO 固定到单壁碳纳米管(Single-wall carbon nanotubes, SWNTs)修饰的玻碳电极上, 以获得 CPO 直接、快速的电子传递反应, 并在此基础上应用该修饰电极在电化学方法原位产生过氧化氢的同时, 催化一氯二甲酮(Monochlorodimedone, MCD)氯化为二氯二甲酮(Dichlorodimedone, DCD).

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

CPO 购自 Sigma 公司(美国); SWNTs(直径 < 10 nm, 长度为 1 ~ 2  $\mu\text{m}$ , 纯度  $\geq 95\%$ )购自深圳纳米港, 使用前进行羧基化处理<sup>[8]</sup>. 即取一定量的 SWNTs 置于混酸溶液中(浓硝酸和浓硫酸的体积比为 1:3), 于常温超声 8 h 后, 离心水洗, 烘干, 经红外光谱表征后备用. Nafion 购自 Aldrich 公司, 使用时用无水乙醇稀释为质量分数 0.5%; MCD 购自 Sigma 公司; 其它试剂均为分析纯(中国国药集团), 所用溶液均用高纯水(Heal Force 超纯水发生器, 上海康雷分析仪器有限公司)配制.

循环伏安(Cyclic voltammetry, CV)等电化学实验利用计算机软件控制的 CHI 604 电化学工作站

收稿日期: 2007-12-24.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20503016)资助.

联系人简介: 吴霞琴, 女, 教授, 主要从事生物电化学和电化学传感器等研究. E-mail: xqwu@shnu.edu.cn

(上海辰华公司)和常规的三电极电化学池进行. 裸玻碳电极和经 CPO 和 SWNTs 修饰的玻碳电极为工作电极, 铂片电极作为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极, 文中所示电位均相对于 SCE. CV 测量在氮气气氛下进行.

在氧气饱和的条件下, 用 0.1 mmol/L MCD + 20 mmol/L KCl 的 pH = 2.75 的磷酸缓冲溶液, 在 -0.6 V 下进行恒电位电解, 按一定的时间间隔取样, 进行紫外-可见吸收光谱的测量(UV-7504 PC 紫外-可见分光光度计, 上海欣茂仪器有限公司), 以此评价底物反应的转化数或催化效率.

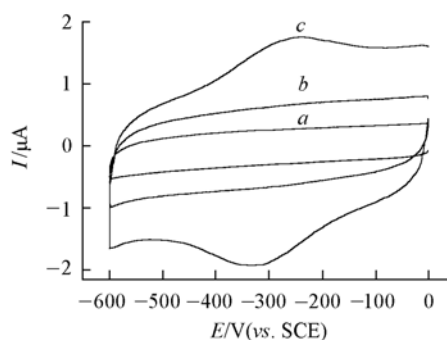
## 1.2 修饰电极的制备

将玻碳电极( $\phi = 3$  mm)先在 6# 金相砂纸上打磨后, 依次用 1.0, 0.3 和 0.05  $\mu\text{m}$  的氧化铝粉末在麂皮上抛光至镜面, 再用无水乙醇和超纯水超声清洗, 经氮气吹干后待用. 将一定量经过羧基化处理的 SWNTs 放入 1 mg/mL Nafion 乙醇溶液中, 超声数小时, 直至获得均匀分散的黑色悬浊液, 取 2  $\mu\text{L}$  悬浊液滴于已处理干净的玻碳电极表面上, 在室温下干燥, 制得的修饰电极记作 SWNTs-Nafion/GC 电极; 另取 2  $\mu\text{L}$  上述 SWNTs 悬浊液与 1  $\mu\text{L}$   $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L CPO 溶液混合后, 滴于已处理干净的玻碳电极表面, 于室温下干燥, 制得的修饰电极记作 CPO-SWNTs-Nafion/GC 电极.

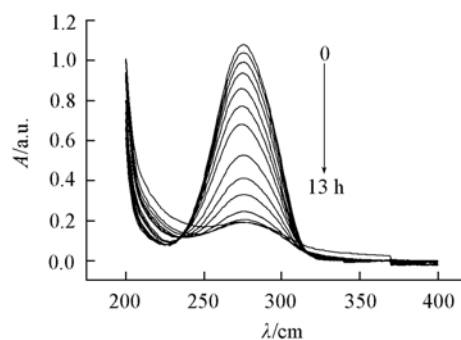
## 2 结果与讨论

### 2.1 CPO-SWNTs-Nafion/GC 修饰电极的循环伏安行为

图 1 是不同电极在含和不含 CPO 的磷酸缓冲溶液中的 CV 图. 在图 1 曲线 a 中没有观察到任何氧化还原电流峰, 表明 CPO 在玻碳电极上不能进行电化学反应. 在 SWNTs-Nafion/GC 电极上, 在不含 CPO 的缓冲溶液中也未见氧化还原电流峰(图 1 曲线 b). 在图 1 曲线 c 中可观察到一对明显的氧化还原电流峰. 氧化还原峰电位分别为 -255 和 -345 mV,  $\Delta E_p = 90$  mV, 氧化还原峰电流之比接近 1, 表明固定在 SWNTs 修饰电极上的 CPO 发生了准可逆的直接电化学反应, 其氧化还原式量电位为 -300 mV. 在 5 ~ 1000 mV/s 扫描速度范围内测得的 CV 曲线显示(图略), 峰电位几乎不随扫描速度的改变而变化, 作图得到峰电流与扫描速度成正比(图略), 表明该电化学反应不是扩散控制的, 这进一步证明进行电化学反应的 CPO 是固定在电极上的. 我们曾通过将 CPO 固定到应用分子层层组装技术制作的修饰电极上, 也实现了 CPO 与电极之间的直接电子传递<sup>[9]</sup>. 上述结果表明, 修饰在玻碳电极上的 SWNTs 能促进吸附的 CPO 进行电化学反应. 经过反复的 CV 测量显示, CPO 在 SWNTs 修饰电极上固定得非常牢固, 电极稳定性比较好.



**Fig. 1** Cyclic voltammograms of the phosphate buffer solution (pH = 5.0) with  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L CPO  
a. The bare GC electrode; b. without CPO at SWNTs-Nafion/GC electrode; c. without CPO at the CPO-SWNTs-Nafion/GC electrode. Scan rate: 100 mV/s.



**Fig. 2** UV-Vis adsorption spectra of the samples  
The phosphate buffer solution (pH = 2.75) with 0.1 mmol/L MCD + 20 mmol/L KCl after 0—13 h electrolysis at the CPO-SWNTs-Nafion/GC electrode at -0.6 V.

### 2.2 CPO 对氯化一氯二甲酮的催化作用

CPO 催化 MCD 氯化为 DCD 是检验 CPO 活性的典型反应<sup>[10]</sup>. 图 2 为在氧气饱和条件下、15 mL 含 0.1 mmol/L MCD + 20 mmol/L KCl 的 pH = 2.75 的磷酸缓冲溶液在 -0.6 V 进行恒电位电解时, 每隔 1 h 取得样品的紫外-可见吸收光谱图. 由图 2 可见, 随着电解时间的增加, 在 278 nm 处 MCD 的特征吸

收峰逐渐减小. 这是因为 MCD 通过反应转化成了 DCD, 而 DCD 在 278 nm 处没有紫外吸收峰. 当反应至 13 h 时, 吸光度几乎不再变化, 这表明溶液中的 MCD 基本上均已转化成了 DCD. 重复以上实验, 发现第 3 次实验时, 反应 4 h 后, 吸光度不再变化, 由此可判断这时 CPO 已失去催化活性. 由图 1 曲线 *c* 的积分求出电量  $Q$ , 根据公式  $Q = nFA\Gamma^*$ <sup>[10]</sup> (式中,  $n$  为电子转移数,  $F$  为法拉第常数,  $A$  为积分面积,  $\Gamma^*$  为单位面积上活性 CPO 的浓度), 计算出电极表面具有电活性的 CPO 的浓度, 结合图 2 数据估算出 MCD 转化为 DCD 的总转化数 (TTN) 为  $4.0 \times 10^5$ , 即 1 mol CPO 可催化氯化  $4.0 \times 10^5$  mol 的 MCD. 这一实验结果比已经报道的 CPO 催化其它有机反应的 TTN 值<sup>[11]</sup> 高得多.

综上所述, CPO 可以牢固地固定到 SWNTs-Nafion/GC 电极表面上, 且发生直接的电子传递反应. 固定有 CPO 的修饰电极能很好地催化 MCD 氯化为 DCD. 该实验结果提供了一种简便、高效的生物催化体系, 类似的研究还未见文献报道. 相关的作用机制有待于进一步的研究.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hager L. P., Morris D. R., Brown F. S., *et al.*. J. of Biol. Chem. [J], 1966, **241**(8): 1769—1777
- [ 2 ] FANG Wei-Shuo(方唯硕), CHENG Ke-Di(程克棣). Chin. J. Org. Chem. (有机化学)[J], 2002, **22**(10): 710—717
- [ 3 ] Osborne R. L., Raner G. M., Hager L. P., *et al.*. J. Am. Chem. Soc. [J], 2006, **128**(4): 1036—1037
- [ 4 ] Morgan J. A., Lu Z. Q., Clark D. S.. J. of Mol. Cat. B: Enzymatic [J], 2002, **18**: 147—154
- [ 5 ] Van de Velde F., Bakker M., van Rantwijk F., *et al.*. Biotech. Bioeng. [J], 2001, **72**(5): 523—529
- [ 6 ] Park J. B., Clark D. S.. Biotech. Bioeng. [J], 2006, **94**: 189—192
- [ 7 ] WU Xia-Qin(吴霞琴), Ichimura A. (市材彰男), Ge Jin(葛瑾), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 1991, **12**(11): 1529—1531
- [ 8 ] Zhao L. Y., Liu H. Y., Hu N. F.. Anal. Bioanal. Chem. [J], 2006, **384**: 414—422
- [ 9 ] Lu Z. Q., Hou W. J., Wu X. Q., *et al.*. Chem. Lett. [J], 2007, **36**(4): 564—565
- [ 10 ] Morris D. R., Hager L. P.. J. Biol. Chem. [J], 1966, **241**(8): 1763—1768
- [ 11 ] Murray R. W.. Electroanalytical Chemistry, Vol. 13[M], New York and Basel, Marcel Dekker, 1984: 191

## Catalytic Chlorination of MCD Using Chloroperoxidase Coated by Single-Wall Carbon Nanotubes Films on GC Electrodes

ZHANG Hong-Xia, WU Xia-Qin\*, HOU Wen-Jing, LU Zhong-Qing,  
XIE Wen, WANG Rong, LI He-Xing

(College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

**Abstract** A simple immobilized method of chloroperoxidase (CPO) was reported, that is, 1  $\mu$ L CPO solution was mixed with 2  $\mu$ L carboxylated SWNTs [1 mg/mL, which was dispersed in 0.5% (mass fraction) Nafion], dropped onto the surface of glass carbon (GC) electrode. The electrochemical behavior of the CPO/SWNTs modified GC electrode was investigated by cyclic voltammetry. A pair of well-defined redox peaks was observed in pH 5 phosphate buffer solutions. In contrast to no peaks for bare GC in CPO solution and only SWNTs coated electrode in phosphate buffer solutions, it is suggested that SWNTs promote the direct electron transfer between the CPO and the GC electrode. The redox peak current has no change in the scan rate range from 5 to 1000 mV/s. The formal potential is -300 mV. The peak separation is about 90 mV at the scan rate of 100 mV/s. Furthermore, the CPO/SWNTs modified GC electrode was used to catalyze chlorination of monochlorodimedone (MCD). A total turnover number of  $4.0 \times 10^5$  was obtained, indication of good catalysis efficiency.

**Keywords** Chloroperoxidase; Carboxylated carbon nanotubes; Modified electrode; Monochlorodimedone; Electrocalalysis