

分析测试

聚乙烯亚胺和手性肽自组装膜
用于电化学区分色氨酸对映体

何家辉, 孙一新*, 黄经纬, 张 嵘, 盛 扬

(常州大学材料科学与工程学院, 江苏常州 213100)

摘要:利用自组装技术,在玻碳电极(GCE)表面构建了一种基于聚乙烯亚胺(PEI)/手性肽(D-BGAc)的手性界面,用于对色氨酸(Trp)对映体的电化学识别。首先在玻碳电极表面修饰一层PEI,D-BGAc与PEI通过静电自组装形成多孔膜,制备得到PEI/D-BGAc手性界面,并对其进行了表征。差分脉冲伏安法(DPV)的分析表明,在最优条件下,此手性界面对于L-Trp和D-Trp之间的电流识别效果(I_D/I_L)可达3.4。在0.005~0.15 mmol/L的浓度范围内,不同浓度的Trp对映体与其峰电流有良好的线性关系。此外,手性界面还能够用于识别Trp外消旋溶液,显示该手性界面能成功用于Trp对映体的识别。

关键词:电化学识别;手性肽;色氨酸对映体;自组装

中图分类号:O657.1;TP212.2

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)12-0226-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2020.12.048

Electrochemical recognition of tryptophan enantiomers by self-assembly membrane from polyethyleneimine and chiral peptide

HE Jia-hui, SUN Yi-xin*, HUANG Jing-wei, ZHANG Rong, SHENG Yang

(School of Materials Science & Engineering, Changzhou University, Changzhou 213100, China)

Abstract: A chiral interface based on polyethyleneimine (PEI) and chiral peptide (D-BGAc) is constructed on the surface of glassy carbon electrodes (GCE) by self-assembly technology and used for electrochemical recognition of tryptophan (Trp) enantiomers. Firstly, a layer of PEI is modified onto the surface of a glassy carbon electrode. PEI/D-BGAc chiral interface is manufactured by electrostatic self-assembly of D-BGAc and PEI, and is characterized. Differential pulse voltammetry (DPV) results show that the current recognition effect (I_D/I_L) between L-tryptophan (L-Trp) and D-tryptophan (D-Trp) can reach 3.4 by PEI/D-BGAc chiral interface under the optimal conditions. In addition, within the concentration range of 0.005 mM to 0.15 mM, different concentrations of Trp enantiomers show a better linear relationship with the corresponding peak currents. More importantly, the chiral interface can also be used to identify racemic Trp solutions, i. e. to quickly determine the relative content of either enantiomer. Therefore, the chiral interface can be successfully used for the recognition of electrochemical enantiomers.

Key words: electrochemical recognition; chiral peptide; tryptophan enantiomers; self-assembly

自然界中大多数生物活性物质都是手性分子,如氨基酸、碳水化合物、蛋白质、酶和DNA等^[1]。在相同条件下,手性分子的2种对映体具有相同的物理和化学性质。然而,它们在生物相互作用、药理活性和生物系统的代谢行为方面可能有很大差异^[2]。如具有不同手性结构的L-色氨酸(L-Trp)和D-色氨酸(D-Trp)具有完全不同的生物学性质^[3]。L-Trp是蛋白质生物合成的基石,是许多生物活性分子(包括色胺、褪黑素、5-羟色胺、生长素和烟酸)的合成前驱体^[4],且L-色氨酸(L-Trp)是人体必需的氨基酸,在生物体中L-Trp不平衡或缺乏都会引起慢性疾病^[5]。然而在医学上,D-色氨酸(D-Trp)是

合成肽类抗生素的重要中间体,也是医药工业中重要的免疫抑制剂。因此对手性分子对映体的识别研究在药学、生物分析、药物筛选、分析分离等领域中具有重要意义。

目前,氨基酸对映体的手性鉴别主要方法包括高效液相色谱、气相色谱和毛细管电泳、比色测定、荧光检测、分子印迹技术等。这些方法存在一些缺点,如仪器过于昂贵,样品制备烦琐,实验流程耗时等^[6],因此它们的实际应用受到很大阻碍。近年来,电化学方法由于具有成本更低,特异性、灵敏度更高,响应更快以及分析物检测更容易再生的优点引起了许多关注。设计和构建对映体电化学手性界

收稿日期:2020-01-14;修回日期:2020-10-08

基金项目:国家自然科学基金项目(51563003)

作者简介:何家辉(1995-),男,硕士生,研究方向为生物材料,861096281@qq.com;孙一新(1972-),女,博士,副教授,研究方向为生物材料,通讯联系人,sunyixin@cczu.edu.cn。

面的关键是在电极上构建手性表面,此手性表面可以识别并放大2种对映体之间的微小差异。有2类手性电极可实现这种区分,一是电极本身为手性的电极,如Cu、Au、Ag^[7-8];二是用手性材料构建手性界面。最常用的手性材料有环糊精(α -CD、 β -CD、 γ -CD)及其衍生物、多糖、蛋白质、DNA等^[9]。顾晓刚^[10]采用电沉积的方法将壳聚糖(CS)沉积到玻碳电极表面,并用碱处理CS膜,然后通过配位作用自组装Cu₂- α -CD得到修饰电极很好地识别了酪氨酸(Tyr)。Sun等^[11]通过牛血清蛋白/精氨酸(Arg)混合溶液在纳米通道内的离子电流不同实现了精氨酸的有效识别。在利用手性识别材料来识别手性对映体的前提下,还可以通过加入石墨烯、多壁碳纳米管^[12]、金属纳米离子(如Au、Ag^[12-14]等,且金、银纳米离子本身具有手性识别能力)增大电流响应,提高识别效率。Zhang等^[15]成功合成了金纳米粒子-亚甲基蓝-多壁碳纳米管复合物(nanoAu-MB-MWNTs)作为电化学氧化还原探针指示剂和固化剂来吸附小牛胸腺DNA(ct-DNA)对手性药物进行有效识别。

本研究利用自组装技术在玻碳电极表面构建了一种基于聚乙烯亚胺(PEI)/手性肽(*D*-BGAc)的手性界面,用于电化学识别Trp对映体。聚阳离子PEI与带负电的*D*-BGAc通过静电作用相结合,使*D*-BGAc吸附在PEI表面。再利用*D*-BGAc的-COOH与Trp对映体的-NH₂形成氢键的难易程度,实现Trp对映体的电化学选择性识别。

1 试剂和材料

1.1 试剂

L-色氨酸(*L*-Trp, 99%)、*D*-色氨酸(*D*-Trp, 98%)、聚乙烯亚胺(PEI)、壳聚糖(CS)均购买于Aldrich试剂公司。手性肽(*D*-BGAc)由国家纳米中心段鹏飞教授友情提供,结构式见图1(a)^[16]。PEI、*D*-BGAc、PEI/*D*-BGAc红外光谱见图1(b)。

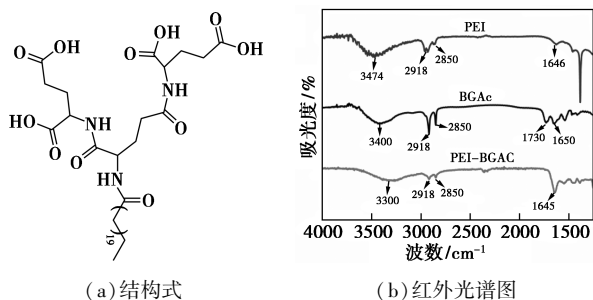


图1 *D*-BGAc结构式与PEI、*D*-BGAc、PEI/*D*-BGAc红外光谱图

1.2 材料与仪器

PEI、BGAc和PEI/BGAc膜的红外光谱采用PET膜自组装的方式进行测试。电化学表征包括差分脉冲伏安法(DPV)、循环伏安法(CV)、阻抗(EIS),所用仪器为CHI-660E(上海辰华有限公司)。所用工作电极均为从上海辰华公司购买的玻碳电极,参比电极为Ag/AgCl电极,对电极为铂丝电极。

2 实验

2.1 修饰电极的制备

将抛光好的GCE在0.01 mol/L H₂SO₄溶液中活化,即以0.1 V/s扫速在-1.0~1.0 V电位范围内扫描10次。活化后的GCE分别置于0.5 mg/mL PEI或0.5 mg/mL的*D*-BGAc溶液中浸泡30 min后取出晾干,获得PEI/GCE或者*D*-BGAc/GCE。将制备好的PEI/GCE浸入*D*-BGAc溶液中不同时间可得到(PEI/*D*-BGAc)/GCE。

2.2 电化学识别色氨酸对映体

取100 μ L已配置的5 mmol/L *D/L*-Trp母液加入10 mL 0.1 mol/L PBS溶液中,得到0.05 mmol/L的*D/L*-Trp溶液。将三电极系统同时浸于此*D/L*-Trp溶液中示差脉冲伏安(DPV)扫描(弛豫时间2 min,每次DPV扫描后将电极置于PBS溶液中在0.4~1.0 V范围内活化10圈,然后再重新浸于*D/L*-Trp测定溶液中2 min DPV扫描。

3 结果与讨论

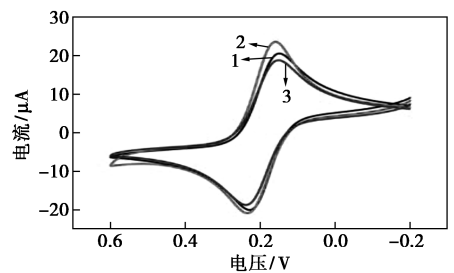
3.1 膜的表征

为获取PEI/*D*-BGAc膜界面的构象信息,分别测试了PEI、*D*-BGAc、PEI/*D*-BGAc红外光谱[图1(b)]。红外谱图中1 646、3 474 cm⁻¹处的峰分别是典型的仲胺(-NH-)伸缩振动和伯胺(-NH₂)剪式振动的特征峰,在2 918、2 850 cm⁻¹还可以观察到亚甲基(-CH₂-)的特征峰,符合PEI的结构。对*D*-BGAc而言,3 430、1 650 cm⁻¹的峰对应于肽键中N-H键、C=O键的伸缩振动,1 730 cm⁻¹处对应-COOH峰,在2 918、2 850 cm⁻¹处出现了二十二碳链中的甲基(-CH₃)、亚甲基的2个峰。当PEI和*D*-BGAc组装成膜后,2 918、2 850 cm⁻¹处的峰得以保留,而BGAc中3 430 cm⁻¹峰大幅红移至3 300 cm⁻¹处,且变为一宽峰,原因可能是*D*-BGAc与PEI之间有分子间氢键形成,使N-H的键长增加,振动频率减小,发生红移。1 730 cm⁻¹处峰消失也可说明-COOH和-NH₂之间形成了氢键。PEI/*D*-

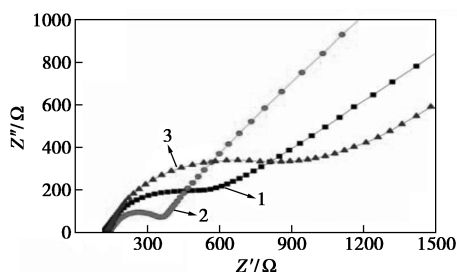
BGAc 红外谱中 PEI 和 D-BGAc 特征峰的位置部分发生了变化,表明 PEI 和 D-BGAc 自组装除了静电吸引还有氢键作用。

3.2 手性界面的电化学表征

首先用 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 作为电活性探针分子,使用循环伏安法考察了各电极的电化学行为,结果如图 2 所示。GCE 上出现了 1 对准可逆的氧化还原峰,峰电位差为 65 mV,这是典型的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 探针分子对应的峰。用 PEI 修饰后,峰电流变大,原因可能是 PEI 支链上带正电荷的 $-\text{NH}_2$ 与带负电荷的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 离子间有静电作用,这样有利于电子传递,增强了电极表面的电信号,使得 PEI/GCE 的峰电流大于 GCE。而当 D-BGAc 和 PEI 自组装到玻碳电极表面时由于膜厚增加,阻碍电子传递,因此探针分子在 (PEI/D-BGAc)/GCE 上的可逆性比 GCE 或 PEI/GCE 要差。阻抗是一种表征修饰电极表面性质的有效工具,阻抗谱中半圆部分直径大小即为电子传递阻抗 R_{ct} ,不同物质修饰到电极表面其阻抗值会发生变化。3 种电极也用 EIS 进行了表征[图 2(b)]。PEI/D-BGAc/GCE 显示了最大的阻抗值(Ω),比 PEI/GCE (Ω)、GCE(Ω)值均高,这与上述 CV 所测得的结果相一致。



(a) 循环伏安图



(b) 阻抗图

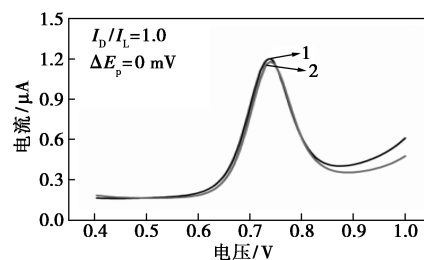
1—GCE; 2—PEI/GCE; 3—(PEI/D-BGAc)/GCE

图 2 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 溶液中手性界面的循环伏安图和阻抗图

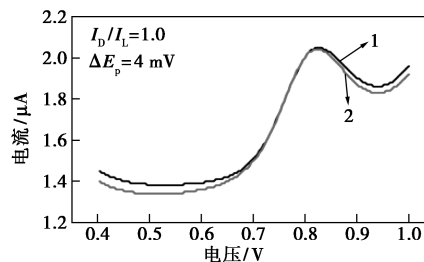
3.3 手性界面识别色氨酸对映体

用示差脉冲伏安法研究了 Trp 对映体在不同电

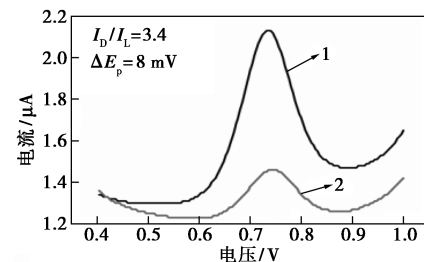
极上的手性识别,结果如图 3 所示。GCE (a) 和 PEI/GCE (b) 对 L-Trp 和 D-Trp 测定的 2 个氧化峰重叠,识别效率电流比 I_D/I_L 均接近 1,反映了两者均不具备电化学识别 Trp 对映体的能力。这是由于 GCE 表面无任何手性识别位点,而 PEI/GCE 表面同样没有手性位点与空间结构,因而不能电化学识别 Trp 对映体。并且由于 PEI/GCE 表面形成致密薄膜,阻碍了电子传递,所以 Trp 对映体在 PEI/GCE 上的 DPV 测试电位在 0.82 V,比 GCE 的测试电位 0.73 V 要高。图 3(c) 显示 (PEI/D-BGAc)/GCE 对 Trp 对映体的电化学识别效率明显增大,电流比 $I_D/I_L=3.4$, $\Delta E_p=8$ mV。在 (PEI/D-BGAc)/GCE 表面具有手性中心,Trp 对映体和 PEI/D-BGAc 膜之间形成氢键,由于对映体不同的空间结构,导致 PEI/D-BGAc 膜更容易和 L-Trp 之间形成氢键,因此当具有同样浓度的 L-Trp 与 D-Trp 穿过 PEI/D-BGAc 膜时,L-Trp 与膜表面结合更多,因而到达电极表面被氧化的 L-Trp 相较于 D-Trp 较少,所以 $I_{L-\text{Trp}}$ 明显比 $I_{D-\text{Trp}}$ 低,即 $I_{D-\text{Trp}}/I_{L-\text{Trp}}$ 明显增加,识别效率比单个



(a) GCE



(b) PEI/GCE



(c) (PEI/D-BGAc)/GCE

1—D-Trp; 2—L-Trp

图 3 不同界面对色氨酸对映体的电化学识别示差脉冲伏安图

的 *D*-BGAc 膜更好,从而达到有效区分 Trp 对映体的目的。

3.4 手性界面识别机理

识别机理是手性识别中的核心问题。因此基于实验结果提出了色氨酸对映体在 PEI/*D*-BGAc 手性界面上的识别机理(图4)。借助于文献中“准两点相互作用”模式^[17],即被选择物和手性界面之间如果吸引的相互作用足够强,则不需要3点相互作用也会至少形成1个连接点,或者说如果排斥的相互作用足够强,被选择物和手性界面之间则无法建立连接。对于 PEI/*D*-BGAc 手性界面, *L*-Trp 中胺基能容易地和手性界面上羧基通过强的氢键与膜相连接。相反, *D*-Trp 由于立体位阻而受到阻碍,氢键的形成不如 *L*-Trp 和手性界面形成的多。

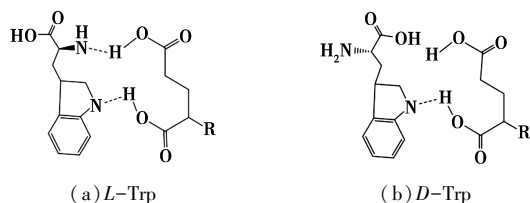


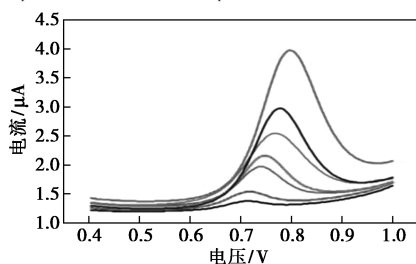
图4 2种氨基酸识别机理

3.5 手性界面对 Trp 浓度的测定

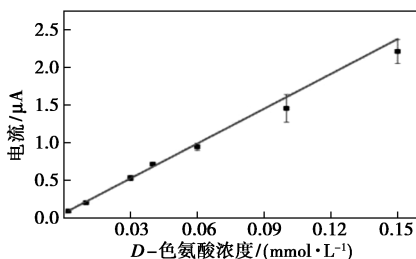
用 DPV 法对不同浓度的 *D*-Trp 或 *L*-Trp 在 (PEI/*D*-BGAc)/GCE 上进行了测定,结果如图5所示。可以看出,峰电流随着 Trp 对映体浓度的增加而增加,显示了手性界面对 Trp 对映体的定量检测是灵敏的,且浓度范围在 0.005~0.15 mmol/L,峰电流与浓度均呈线性关系,线性方程分别为:

$$I_{D-\text{Trp}}(\mu\text{A}) = 15.42C_{D-\text{Trp}} + 0.063R^2 = 0.9946$$

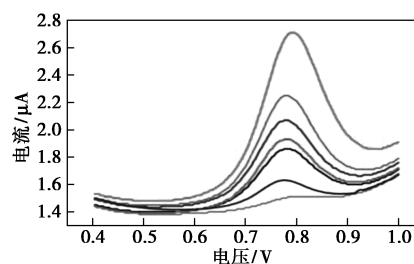
$$I_{L-\text{Trp}}(\mu\text{A}) = 6.59C_{L-\text{Trp}} + 0.046R^2 = 0.9697$$



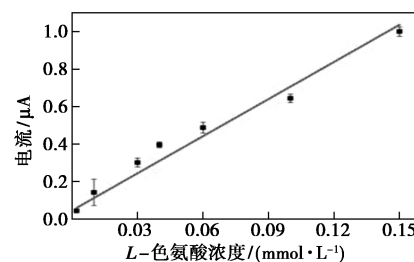
(a) *D*-Trp 不同浓度 DPV 图



(b) *D*-Trp 不同浓度线性拟合



(c) *L*-Trp 不同浓度 DPV 图

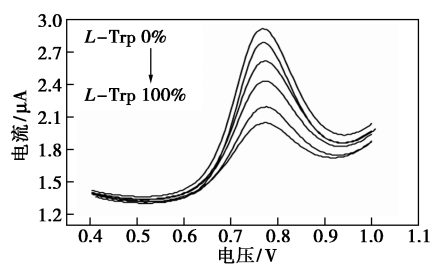


(d) *L*-Trp 不同浓度线性拟合

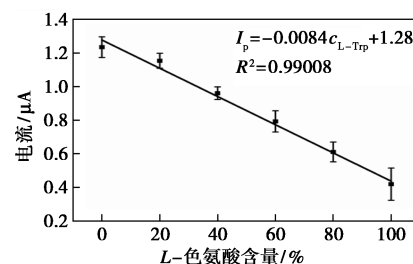
图5 手性界面测试不同色氨酸浓度示差脉冲伏安图及线性拟合图

3.6 手性界面对 Trp 外消旋溶液的识别效果

由于 *L*-Trp 和 *D*-Trp 可能同时存在于药物或人体组织液中,因而实际应用中预测 Trp 外消旋溶液中 *D*-Trp 对 *L*-Trp 的比例是十分重要的。为此考察了手性界面对 Trp 外消旋溶液的识别效果,其中 Trp 外消旋溶液的总浓度为 0.08 mmol/L, *L*-Trp 溶液在其中的比例依次为 0%、20%、40%、60%、80%、100%, DPV 记录 PEI/*D*-BGAc/GCE 在不同百分比的外消旋溶液中的电化学行为,结果如图6(a)



(a)



(b)

图6 手性界面对色氨酸外消旋溶液的识别效果图及线性拟合图

所示。可以看出, Trp 峰电流随着 *L*-Trp 混合比例的增加而降低, 且呈现出良好线性关系[图 6(b)]。这表明 PEI/*D*-BGAc 手性界面能用来快速确定 Trp 外消旋溶液中任意一种的相对含量, 这对手性氨基酸对映体的检测具有重要意义。

3.7 温度对手性界面的影响

因为 Trp 对映体在 PEI/*D*-BGAc 手性界面的识别是由于界面和 Trp 对映体之间氢键形成过程中不同的空间阻碍导致的, 而氢键受温度的影响显著, 因而温度在对映体的识别中起着关键的作用, 有必要考察不同温度下 PEI/*D*-BGAc 手性界面对 Trp 对映体的电化学识别。表 1 为不同温度下 PEI/*D*-BGAc 手性界面对 Trp 对映体的识别效果。可以看出, 25℃ 下识别效果 ($I_D/I_L = 3.4$) 最佳, 这可能是因为手性界面在 25℃ 下与 *L*-Trp 形成更多更稳定的氢键^[18], 所以具有最佳的实验结果; 在低于 25℃ 的温度下, 手性界面和 *L*-Trp 之间形成氢键减少, 从而导致识别效果降低; 而在温度高于 25℃ 时, 可能手性界面与 *L*-Trp 之间的氢键由于取向紊乱增加, 氢键的破坏更加频繁^[19], 因此自组装体系中氢键衰减更快, 导致和氢键相关的识别效率也大大降低。

表 1 不同温度对手性界面影响

温度/℃	10	20	25	30	40
I_D/I_L	2.5	2.6	3.4	2.7	2.8

4 结论

制备了一种基于自组装的 PEI/*D*-BGAc 手性界面, 用于对 Trp 对映体的电化学识别。PEI 与 *D*-BGAc 通过静电力及氢键作用修饰到玻碳电极表面, 构建 PEI/*D*-BGAc 手性界面。*D*-BGAc 作为手性界面中的手性组分, 通过与 Trp 对映体形成氢键的难易进行有效识别。DPV 的分析结果表明, 在 25℃ 的最优条件下, 此手性界面对于 Trp 对映体之间的电化学识别效果 (I_D/I_L) 可以达到 3.4。另外, 在 0.005~0.15 mmol/L 的浓度范围内, 手性界面对于不同浓度的 Trp 对映体与其峰电流有良好的线性关系。更重要的是, 手性界面还能用于快速确定 Trp 外消旋溶液中任意一种的相对含量, 在对映体识别上有较好的潜在应用前景。

参考文献

[1] Tiwari M P, Prasad A. Molecularly imprinted polymer based enantioselective sensing devices: A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 853: 1-18.

[2] Newgard C B, An J, Bain J R, *et al.* A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance [J]. *Cell Metabolism*, 2009, 9(4): 311-326.

[3] Zhang Qing, Guo Liju, Huang Yihan, *et al.* A reagentless enantioselective sensor for tryptophan enantiomers via nanohybrid matrices [J]. *Analytical Methods*. DOI: 10.1039/c3ay40236c.

[4] Shabi Abbas Zaidi. Facile and efficient electrochemical enantiomer recognition of phenylalanine using β -Cyclodextrin immobilized on reduced graphene oxide [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 94: 714-718.

[5] Ruddick J P, Evans A K, Nutt D J, *et al.* Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications [J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2006, 8(20): 1-27.

[6] Zou J, Chen X Q, Zhao G Q, *et al.* A novel electrochemical chiral interface based on the synergistic effect of polysaccharides for the recognition of tyrosine enantiomers [J]. *Talanta*, 2019, 195: 628-637.

[7] Raval. Chiral expression from molecular assemblies at metal surfaces: Insights from surface science techniques [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(3): 707-721.

[8] Zehnacker A, Suhm M. Chirality recognition between neutral molecules in the gas phase [J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 47(37): 6970-6992.

[9] Satoshi Rikimaru, Yoko Wakabayashi, Motoyoshi Nomizu, *et al.* DNA-Chitosan bilayer membrane as a bi-functional biomedical adhesive [J]. *Polymer Journal*, 2003, 35(3): 255-260.

[10] 顾晓刚. 基于自组装环糊精双核铜手性识别氨基酸对映体 [D]. 常州: 常州大学, 2016.

[11] Sun Zhongyue, Zhang Fan, Zhang Xiaoyan, *et al.* Chiral recognition of Arg based on label-free PET nanochannel [J]. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 2015, 51(23): 4823-4826.

[12] Saha A, Jiang C, Martí, *et al.* Carbon nanotube networks on different platforms [J]. *Carbon*, 2014, 79: 1-18.

[13] Wenya, He Jianying, *et al.* Novel strategy for the investigation on chirality selection of single-walled carbon nanotubes with DNA by electrochemical characterization [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90: 12810-12814.

[14] Qing Liu, Xu Yanb, Qi La. Bimetallic gold/silver nanoclusters-gold nanoparticles based fluorescent sensing platform via the inner filter effect for hyaluronidase activity detection [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 282: 45-51.

[15] Zhang Q, Guo L, Huang Y, *et al.* An electrochemical chiral sensing platform for propranolol enantiomers based on size-controlled gold nanocomposite [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 199: 239-246.

[16] Li C, Jin X, Zhao T, *et al.* Optically active quantum dots with induced circularly polarized luminescence in amphiphilic peptide dendron hydrogel [J]. *Nanoscale Adv*, 2019. DOI: 10.1039/c8na00216a.

[17] Dong L, Zhang Y, Duan X, *et al.* Chiral PEDOT-based enantioselective electrode modification material for chiral electrochemical sensing: Mechanism and model of chiral recognition [J]. *Anal Chem*, 2017, 89: 9695-9702.

[18] Bao L, Chen X, Yang B, *et al.* Construction of electrochemical chiral interfaces with integrated polysaccharides via amidation [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2016, 8: 21710-21720.

[19] Mizan T I, Savage P E, Ziff R M. Temperature dependence of hydrogen bonding in supercritical water [J]. *J Phys Chem*, 1996, 100: 403-408. ■