

离子液体修饰碳糊电极对碱基及其衍生物的电化学测定

摘要

核酸的组成物质中只有碱基部分具有电化学活性, 核酸碱基的电化学氧化通常发生在固体电极校正的电位窗口中。离子液体(ILs)具有稳定性好、离子导电率高、挥发性小、电化学窗口宽等独特的理化性质, 用离子液体制作化学修饰电极, 能有效地提高电活性物质的电子传递速率, 降低生物分子的氧化过电位和增强电化学信号。本论文开展了核酸碱基及其衍生物的电化学研究, 实验内容总结如下:

1. 分别用疏水性离子液体六氟磷酸正丁基吡啶(BPPF₆)和六氟磷酸正己基吡啶(HPPF₆)与碳粉混合, 制备了两种离子液体碳糊电极(CILE)。在这两种电极上分别研究了鸟苷和腺苷的电化学氧化反应, 与传统碳糊电极 CPE 比较, 鸟苷和腺苷的氧化峰电位都发生负移, 氧化峰电流都显著增加, 表明离子液体既有粘合剂的功效, 又是良好的修饰剂和催化剂。分别计算了鸟苷和腺苷氧化反应的电化学参数。在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围内, 鸟苷的循环伏安氧化峰电流与鸟苷浓度呈良好的线性关系, 检测限为 $2.61 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ (3σ); 在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围内, 腺苷的微分脉冲伏安氧化峰电流与腺苷浓度呈良好的线性关系, 检测限为 $9.1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ (3σ)。以上两种电极都成功应用于尿样的检测。

2. 将碳粉、液体石蜡和 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯([EMIM][EtSO₄])三者混合, 制备了一种离子液体修饰碳糊电极(IL-CPE)。在 IL-CPE 上用微分脉冲伏安法对鸟苷和腺苷进行同时测定, 建立鸟苷在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围和腺苷在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 2.7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围内同时测定的分析方法。共存物质对鸟苷和腺苷的测定无影响, 该方法成功应用于人体尿样中鸟苷和腺苷的检测。制备了该离子液体修饰碳糊微电极(m-IL-CPE), 在 m-IL-CPE 上研究了脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)的电化学氧化, 探讨了 dGTP 的在 m-IL-CPE 上的电化学反应过程, 在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 7.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围内 dGTP 的氧化峰电流与浓度线性回归方程为 $\log I_{pa}(A) = 0.771 \log C (\text{mol/L}) - 4.082$ ($n=9, \gamma=0.999$), 检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (3σ), 共存物质对 dGTP 的测定无影响。

3. 在 CPE 上详细研究了胞嘧啶的电化学氧化, 在 pH 5.0 的缓冲溶液中, 胞嘧啶的氧化峰电位为 1.412 V, 计算出了胞嘧啶在 CPE 上电化学氧化的相关参数, 如转移电子数(n), 电子传递系数(α)和电极反应速率常数(k_t)分别为 2.14, 0.15 和 $1.049 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 。在 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 浓度范围内, 胞嘧啶的氧化峰电

流与浓度呈良好的线性关系，线性回归方程为 $I_p(\mu A)=0.0519C(\mu mol/L)+0.419$ ($n=9, \gamma=0.999$)，检测限为 $1.9 \times 10^{-6} mol/L (3\sigma)$ 。常见共存物质对胞嘧啶的测定无影响。

关键词： 碱基，离子液体，碳糊电极，直接电化学

ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF BASES AND ITS RELATED DERIVATIVES ON IONIC LIQUID MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE

ABSTRACT

Among the constituents of nucleic acid, only bases can undergo reduction and/or oxidation at the electrodes. Electrooxidation of nucleic acid bases often takes place at highly positive potentials on the solid electrodes. In recent years ionic liquids (ILs) have received great attention due to their specific characteristics such as good chemical and thermal stability, high ionic conductivity, negligible vapor pressure and wide electrochemical windows. ILs modified electrodes have been exhibited the advantages including the increase the electron transfer rate of electroactive compounds, the decrease the overpotential for biomolecules and the enhancement of the electrochemical signals. In this thesis the electrochemical investigation on nucleic acid bases and its related derivatives were carried out with the results summarized as follows:

1. Two kinds of carbon ionic liquid electrodes (CILE) were constructed by mixing graphite powder with hydrophobic ionic liquids N-butylpyridinium hexafluorophosphate (BPPF₆) or N-hexylpyridinium hexafluorophosphate (HPPF₆). The electrochemical behaviors of guanosine and adenosine were studied on the CILE, respectively. Compared with that of CPE, both the oxidation peaks potentials were shift to the negative direction and two oxidation peaks current increased on the CILE, which indicated the presence of ionic liquid in the carbon paste not only as the binder but also as the modifier and the promoter. The electrochemical parameters of guanosine and adenosine were calculated respectively. Under the optimal conditions, a good linear relationship was established between the cyclic voltammetric current and guanosine concentration in the range from 1.0×10^{-6} mol/L to 1.0×10^{-4} mol/L with the

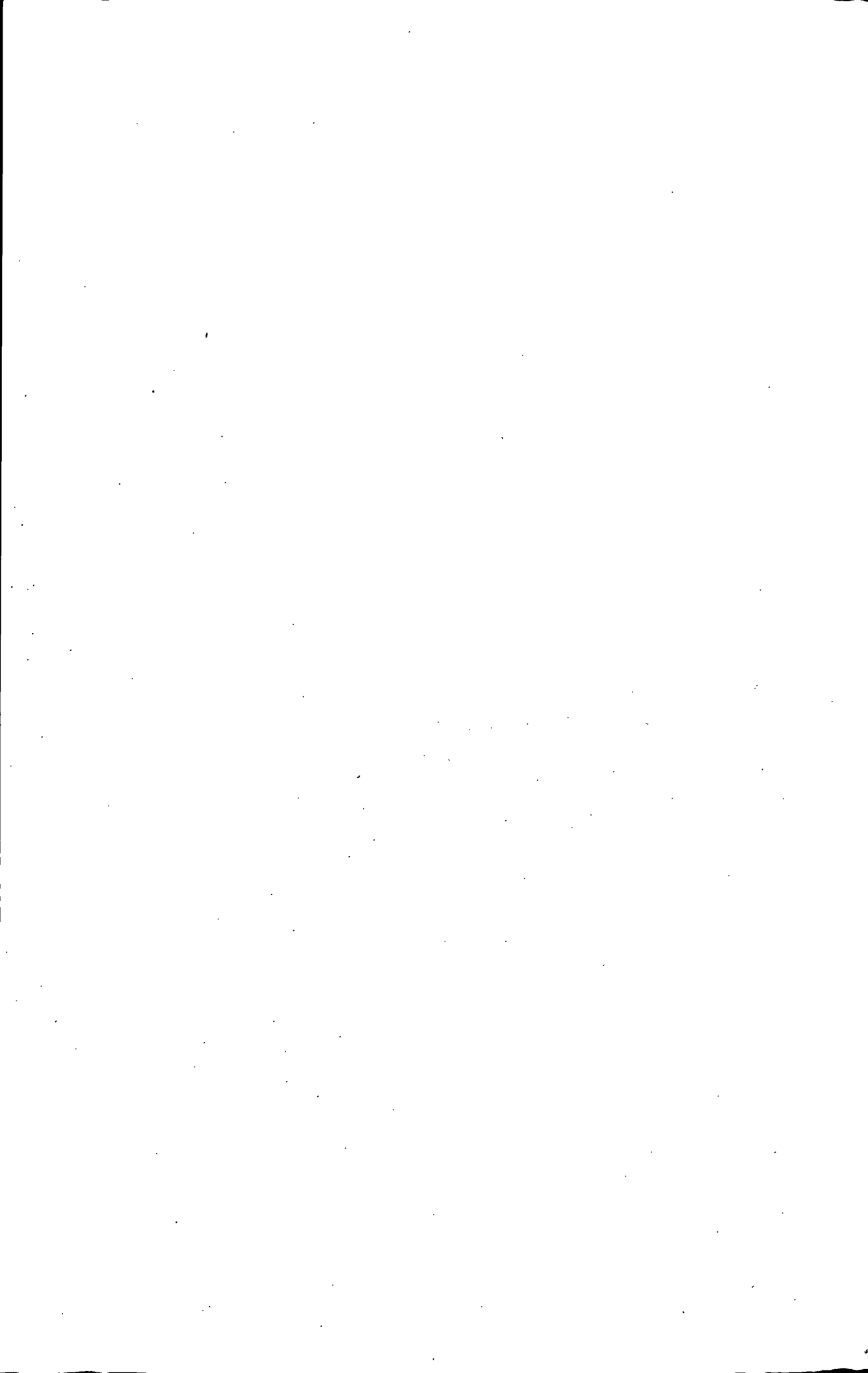
detection limit of 2.61×10^{-7} mol/L (3σ); the differential pulse voltammetric current showed a good linear relationship with the adenosine concentration in the range from 1.0×10^{-6} mol/L to 1.4×10^{-4} mol/L with the detection limit of 9.1×10^{-7} mol/L (3σ). Both the proposed method was applied to the human urine samples detection with satisfactory results.

2. An hydrophile ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ([EMIM][EtSO₄]) modified carbon paste electrode was prepared by mixing graphite powder, liquid paraffin and IL together. The fabricated ionic liquid carbon paste electrode (IL-CPE) was used for the simultaneous determination of guanosine and adenosine by differential pulse voltammetry. Under the optimal conditions the linear calibration curves were obtained over the concentration range from 1.0×10^{-6} mol/L to 1.6×10^{-4} mol/L for guanosine and from 1.0×10^{-6} mol/L to 2.7×10^{-4} mol/L for adenosine in pH 3.5 B-R buffer solution. Coexisting substances in the biological samples showed no interference for guanosine and adenosine determination and the proposed method was successfully applied to the human urine sample detection without preliminary pre-treatments. The ionic liquid modified carbon paste microelectrode (m-IL-CPE) was prepared by packing ionic liquid modified carbon paste at the end of a pipette tip and contacting with a copper wire. The electrochemical oxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate (dGTP) was investigated on the m-IL-CPE by cyclic voltammetry. Then the electrochemical processes of dGTP on the m-IL-CPE were recorded with the oxidation mechanism discussed. Under the optimal conditions the differential pulse voltammetric response was proportional to the dGTP concentration in the range of 1.0×10^{-6} mol/L to 7.0×10^{-4} mol/L with the linear regression equation as $\log I_{pa}(A) = 0.771 \log C(\text{mol/L}) - 4.082$ ($n=9$, $\gamma=0.999$) and the detection limit as 1.0×10^{-6} mol/L (3σ). The proposed method showed good selectivity and stability without the interferences of coexisting substances.

3. Electrochemical oxidation of cytosine was investigated on a carbon paste electrode. In pH 5.0 Britton-Robinson (B-R) buffer solution a well-define irreversible oxidation peak appeared at the potential of 1.412 V, which indicated the oxidation of cytosine on the electrode. The electrochemical parameters such as the electron transfer number (n), the electron transfer coefficient (α), and the electrode reaction standard rate constant (k_s) was calculated with the results as 2.14, 0.15 and $1.049 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ respectively. Under the selected condition the cytosine concentration showed a good linear relationship with the differential pulse voltammetric current in the range from

1.0×10^{-5} mol/L to 1.0×10^{-3} mol/L with the linear regression equation as $I_p(\mu A) = 0.0519C(\mu mol/L) + 0.419$ ($n=9$, $r=0.999$) and the detection limit as 1.9×10^{-6} mol/L (3σ). Coexisting substances showed no interferences on the cytosine detection.

KEY WORDS: base, ionic liquids, carbon paste electrode, direct electrochemistry



目 录

| | |
|---|----|
| 第一章 文献综述 | 1 |
| 1.1 碱基及其衍生物简介 | 1 |
| 1.1.1 碱基 | 1 |
| 1.1.2 核苷 | 1 |
| 1.1.3 核苷酸 | 2 |
| 1.2 碱基及其衍生物的电化学研究 | 2 |
| 1.2.1 研究意义 | 2 |
| 1.2.2 研究进展 | 3 |
| 1.3 碳糊电极 | 5 |
| 1.3.1 传统碳糊电极 | 5 |
| 1.3.2 离子液体碳糊电极 | 5 |
| 1.3.3 微碳糊电极 | 7 |
| 1.4 本论文的基本思路和目的 | 9 |
| 参考文献 | 10 |
| 第二章 鸟苷在 BPPF ₆ 离子液体碳糊电极上的电化学行为和测定 ..20 | |
| 2.1 实验部分 | 21 |
| 2.1.1 仪器与试剂 | 21 |
| 2.1.2 实验方法 | 21 |
| 2.2 结果与讨论 | 21 |
| 2.2.1 鸟苷在 CILE 上的电化学行为 | 21 |
| 2.2.2 缓冲溶液 pH 值的影响 | 22 |
| 2.2.3 扫描速率的影响 | 23 |
| 2.2.4 富集条件的影响 | 25 |
| 2.2.5 工作曲线 | 25 |
| 2.2.6 CILE 对鸟苷和鸟嘌呤的同时测量 | 25 |
| 2.2.7 干扰研究 | 26 |
| 2.2.8 电极的重现性和稳定性 | 27 |
| 2.2.9 分析应用 | 27 |
| 2.3 结论 | 27 |

| | |
|---|----|
| 参考文献 | 28 |
| 第三章 腺苷在 HPPF ₆ 离子液体碳糊电极上的电化学行为研究 | 29 |
| 3.1 实验部分 | 30 |
| 3.1.1 仪器与试剂 | 30 |
| 3.1.2 实验方法 | 30 |
| 3.2 结果与讨论 | 30 |
| 3.2.1 CILE 的表征 | 30 |
| 3.2.2 腺苷在 CILE 上的电化学行为 | 32 |
| 3.2.3 缓冲液 pH 值的影响 | 33 |
| 3.2.4 扫描速率的影响 | 34 |
| 3.2.5 工作曲线 | 35 |
| 3.2.6 干扰研究 | 37 |
| 3.2.7 分析应用 | 37 |
| 3.3 结论 | 38 |
| 参考文献 | 39 |
| 第四章 鸟苷和腺苷在 [EMIM][EtOSO ₃] 离子液体修饰碳糊电极上的同 时检测 | 41 |
| 4.1 实验部分 | 42 |
| 4.1.1 仪器与试剂 | 42 |
| 4.1.2 实验方法 | 42 |
| 4.2 结果与讨论 | 42 |
| 4.2.1 鸟苷和腺苷在 IL-CPE 上的电化学行为 | 42 |
| 4.2.2 缓冲溶液 pH 值的影响 | 44 |
| 4.2.3 扫描速率的影响 | 44 |
| 4.2.4 鸟苷和腺苷的工作曲线 | 45 |
| 4.2.5 干扰研究 | 48 |
| 4.2.6 电极的重现性和稳定性 | 49 |
| 4.2.7 分析应用 | 50 |
| 4.3 结论 | 50 |
| 参考文献 | 51 |
| 第五章 dGTP 在 [EMIM][EtOSO ₃] 离子液体修饰碳糊微电极上的电化 | |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 学行为研究 | 53 |
| 5.1 实验部分 | 54 |
| 5.1.1 仪器与试剂 | 54 |
| 5.1.2 实验方法 | 54 |
| 5.2 结果与讨论 | 54 |
| 5.2.1 微电极表征 | 54 |
| 5.2.2 dGTP 在 m-IL-CPE 上的电化学行为 | 56 |
| 5.2.3 缓冲溶液 pH 值的影响 | 57 |
| 5.2.4 扫描速率的影响 | 58 |
| 5.2.5 工作曲线 | 59 |
| 5.2.6 电极的重现性和稳定性 | 60 |
| 5.2.7 干扰研究 | 60 |
| 5.3 结论 | 61 |
| 参考文献 | 62 |
| 第六章 胞嘧啶在碳糊电极上的电化学氧化研究和测定 | 63 |
| 6.1 实验部分 | 64 |
| 6.1.1 仪器与试剂 | 64 |
| 6.1.2 实验方法 | 64 |
| 6.2 结果与讨论 | 64 |
| 6.2.1 胞嘧啶在 CPE 上的电化学行为 | 64 |
| 6.2.2 缓冲溶液 pH 值的影响 | 65 |
| 6.2.3 扫描速率的影响 | 66 |
| 6.2.4 富集条件的影响 | 68 |
| 6.2.5 工作曲线 | 68 |
| 6.2.6 干扰研究 | 68 |
| 6.2.7 分析应用 | 69 |
| 6.3 结论 | 70 |
| 参考文献 | 71 |
| 致 谢 | 72 |
| 攻读学位期间已发表和待发表的相关学术论文题录 | 73 |
| 声 明 | 74 |

第一章 文献综述

碱基是 DNA 和 RNA 中最小的结构单元,是构成遗传物质的基础组分。随着基因生物学和医学的飞速发展,在分子水平上研究生命现象的本质成为生物学和化学的发展趋势。衰老和疾病一直是困扰人类的难题,临床疾病的诊断研究中发现,碱基的变异在疾病演变过程中发挥着重要的作用,因此对单个碱基及其衍生物快速、准确的识别成为疾病研究的必要手段。

1.1 碱基及其衍生物简介

1.1.1 碱基

生物学上的碱基(base)是指一类含氮核碱基(nitrogenous nucleobase),简称碱基,是 DNA 和 RNA 中起配对作用的部分。碱基都是杂环化合物,其氮原子位于环上或取代氨基上,其中一部分(取代氨基,以及嘌呤环的 1 位氮、嘧啶环的 3 位氮)直接参与碱基配对。常见的核碱基共有 5 种:胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T,通常为 DNA 专有)和尿嘧啶(U,通常为 RNA 专有)。腺嘌呤和鸟嘌呤属于嘌呤族,它们具有双环结构。胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶属于嘧啶族,它们的环是一个六元杂环。嘌呤族与嘧啶族的化学性质完全互补,腺嘌呤与胸腺嘧啶有两个氢键,鸟嘌呤与胞嘧啶有三个氢键,嘧啶单环之间连接空间太大,嘌呤双环之间连接空间不够,这样使 A 与 T、G 与 C 配对成为必然,这就是碱基互补配对原则(the principle of complementary base pairing)。除以上 5 种主要碱基外,核酸中也有一些含量很少的稀有碱基。稀有碱基的结构多种多样,多半是在上述主要碱基的不同部位甲基化(methylation)或进行其它的化学修饰而形成的衍生物。tRNA 往往含有较多的稀有碱基,有的 tRNA 含有的稀有碱基多达 10%。

1.1.2 核苷

核苷(nucleoside)是碱基通过糖苷键与核糖缩合而成的化合物,核糖与碱基一般都是由糖的异头碳与嘧啶的 N-1 或嘌呤的 N-9 之间形成的 β -N-糖苷键连接的,所以糖与碱基之间的 N-C 连接键,一般称为 N-糖苷键。核苷中的 D-核糖及 D-2-脱氧核糖均为呋喃环结构,糖环中的 C-1 是不对称碳原子,所以有 α -及 β -两种构型,但核酸分子中的糖苷键均为 β -糖苷键,X 射线衍射法已经证明核苷中的碱基与糖环平面是互相垂直的。

RNA 中还存在异构化的稀有碱基核苷。如在 tRNA 和 rRNA 中含有少量假尿

嘧啶核苷, 在它的结构中戊糖的 C-1 不是与尿嘧啶的 N-1 相连接, 而是与尿嘧啶 C-5 相连接。

1.1.3 核苷酸

核苷与磷酸结合就形成核苷酸, 磷酸基接在五碳糖的 C-5 上。根据糖的不同, 核苷酸分为核糖核苷酸及脱氧核苷酸两类。根据碱基的不同, 又有腺嘌呤核苷酸(腺苷酸, AMP)、鸟嘌呤核苷酸(鸟苷酸, GMP)、胞嘧啶核苷酸(胞苷酸, CMP)、尿嘧啶核苷酸(尿苷酸, UMP)、胸腺嘧啶核苷酸(胸苷酸, TMP)及次黄嘌呤核苷酸(肌苷酸, IMP)等。核苷酸中的磷酸有一分子、两分子及三分子三种形式, 5'-单核苷酸的磷酸基可进一步磷酸化生成二磷酸核苷及三磷酸核苷, 其中磷酸之间是以高能键相连, 脱氧核苷酸的情况也是如此。此外, 核苷酸分子内部还可脱水缩合成为 3',5'-环核苷酸, 即单核苷酸中磷酸部分与核糖中第三位和第五位碳原子同时脱水缩合形成一个环状二酯, 常见的有 3',5'-环腺苷酸(cAMP)和 3',5'-环鸟苷酸(cGMP)。

核苷酸是核糖核酸及脱氧核糖核酸的基本组成单位, 是体内合成核酸的前躯体, 核苷酸随着核酸分布于生物体内各器官、组织、细胞的核及胞质中, 并作为核酸的组成成分参与生物的遗传、发育、生长等基本生命活动。生物体内还有相当数量以游离形式存在的核苷酸。这些核苷酸具有多种重要的生物学功能, 例如三磷酸腺苷(ATP)在细胞能量代谢中起着主要的作用, 体内的能量释放及吸收主要是以产生及消耗三磷酸腺苷来体现的; 此外三磷酸尿苷(UTP)、三磷酸胞苷(CTP)及三磷酸鸟苷(GTP)也是有些物质合成代谢中能量的来源。腺苷酸还是某些辅酶, 如辅酶 I、II 及辅酶 A 等的组成成分。某些核苷酸的类似物能干扰核苷酸代谢, 可作为抗癌药物。

1.2 碱基及其衍生物的电化学研究

1.2.1 研究意义

人体尿液和血清中的碱基和核苷的含量常常用来指示一些疾病如癌症, 获得性免疫缺陷综合症(AIDS)和 RNA 翻转症等等。Fujita^[1]等人发现 40 例慢性肝炎病人肝组织中 8 羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量与血清转氨酶的含量比健康人高, 认为 8-OHdG 可当做肝组织离子储量的指标, 详细探讨了肝组织中 DNA 的氧化性损伤和离子超负荷导致 C 型慢性肝炎的致病机理。Svoboda^[2]等人用高效液相色谱(HPLC)结合酶联免疫分析(ELISA)分别对比了健康的老年人和青年人尿液中

8-OHdG 和蝶呤的含量,建立了同时评估 DNA 氧化损伤和免疫反应的尿样检测体系,对肿瘤和一些传染病的病理生理学研究具有重要意义。杨军^[3]等人用 HPLC 法测定了 69 个尿样和 42 个血清样本中的 15 种核苷,为人工仿真鉴别健康人和癌症患者的检测系统提供了充分的数据支持,建立的测定体系对尿液和血清样品中核苷的识别率高达 95.8% 和 92.9%。Nakano^[4]等人采用反相 HPLC 法用 5'-脱氧腺苷合成 5'-脱氧黄苷,并用反相 HPLC 法同时测定 5,6-尿苷和假尿苷,采集 4 个肠胃癌病人的尿液,并对其中的 5,6-尿苷和假尿苷的含量进行跟踪测定,在治疗一段时间后其中 3 个病人尿液中的以上两种核苷的含量明显降低。Wang^[5]等人在碳糊电极上建立了用 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 做指示剂,针对人类免疫病毒 HIV-1 中较短 DNA 序列测定的电化学传感器。Chen^[6]等人利用无机盐导致纳米金团聚变色和 ATP 与纳米金结合构型变化的原理,用比色法建立纳米金溶液测定尿液中 ATP 的分析方法。Goyal^[7]等人用 C_{60} 修饰的玻碳电极同时测定肝癌病人血液和尿液中的 2'-脱氧腺苷和腺嘌呤,检测限达到 $0.8 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 和 $0.95 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

1.2.2 研究进展

1969 年 Dryhurst^[8]提出黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤、以及鸟苷和腺苷能在热解石墨电极上发生氧化,从此开始了核酸类物质电化学领域的氧化研究,人们不断地深入探讨碱基及其衍生物的氧化机制。1982 年 Goyal 和 Dryhurst^[9]对鸟嘌呤和 8-氧鸟嘌呤的电化学氧化以及过氧化物酶催化氧化进行了对比,发现两种氧化途径是一样的。鸟嘌呤是 DNA 电化学氧化中最容易氧化的碱基,鸟嘌呤的氧化产物 8-氧鸟嘌呤成为定量研究 DNA 氧化损伤比较稳定的考察依据。2000 年 Oliveira-Brett^[10]等人详细地研究了 8-氧鸟嘌呤在玻碳电极上的可逆电化学过程。2004 年 Ferapontova^[11]在金电极上对鸟嘌呤和 8-氧鸟嘌呤的电化学氧化进行了对比研究,提出了鸟嘌呤氧化的两步 4e 氧化反应过程以及 8-氧鸟嘌呤的 1e 准可逆氧化还原反应。

早在 1968 年 Dryhurst 和 Elving^[12]就研究了腺嘌呤在热解石墨上的氧化机理,提出了腺嘌呤的氧化过程共有 6e 参与,产生不稳定的二正碳离子中间体。Diculescu^[13]等人运用循环伏安法,示差脉冲伏安法和方波伏安法研究了腺嘌呤氧化产物 2,8-二羟基腺嘌呤在玻碳电极上的准可逆氧化还原,除氧的条件下,2,8-二羟基腺嘌呤在电极上发生可逆的氧化还原反应。

鸟嘌呤和腺嘌呤构成核酸碱基的嘌呤组分,在双链 DNA 中占有 50% 的比例且能在较低电位下发生电化学氧化,随着化学修饰电极方法学的发展,涌现了诸多用各种修饰电极同时测定鸟嘌呤和腺嘌呤的电化学研究。Zen^[14]等人在聚氯化钕/Nafion 修饰玻碳电极上对变性 DNA, RNA 和合成寡核苷酸中的鸟嘌呤和腺嘌呤

呤进行了同时测定研究, 检测限达到 5.9×10^{-9} mol/L 和 2.0×10^{-8} mol/L。王怀生^[15]等人在活化处理的玻碳电极上采用恒电位吸附溶出伏安法测定了酸变性 DNA 中的鸟嘌呤和腺嘌呤的含量。王宗花^[16]等人用 β -环糊精包埋碳纳米管涂布在热解石墨电极上, 用该修饰电极研究了鸟嘌呤和腺嘌呤在这种复合电极界面微环境中的电催化氧化机理, 提出了一种能有效降低嘌呤碱基氧化电位的电化学测定方法。刘红英^[17]等人先把多壁碳纳米管和金纳米粒子沉积在玻碳电极上, 之后电聚合一层聚硫磺膜, 研究了这种聚硫磺包埋的纳米复合膜修饰电极对鸟嘌呤和腺嘌呤的电催化氧化, 检测限能达到 1×10^{-8} mol/L 和 8×10^{-8} mol/L。

核苷以及核苷酸中的核糖和磷酸基团是非电活性的, 只在碱基基团上发生氧化还原反应, 近几年碱基类物质的电化学氧化研究逐渐关注于基团增大的核苷及其核苷酸的研究, 由于测定对象空间结构增大, 氧化位点不容易曝露出来, 与碱基相比核苷和核苷酸表现出氧化电位增高, 电流信号降低, 在电极上的吸附性能减弱等电化学现象。Goyal 课题组在碱基及其系列衍生物电化学氧化研究方面的工作较为突出, 主要以玻碳电极、热解石墨电极以及氧化铟锡电极为基体电极, 修饰纳米金, 碳纳米管, 富勒烯 C_{60} ^[18]等纳米材料, 对鸟苷, 腺苷, 次黄苷^[19], 2'-脱氧腺苷^[20], 8-羟基鸟苷^[21], 鸟苷单磷酸^[22], 腺苷单磷酸^[23], 鸟苷三磷酸^[24,25], 腺苷三磷酸^[26]等多种物质进行了单独和同时测定的电化学研究。

1997 年 Oliveira-Brett^[27]首次提出胞嘧啶和胸腺嘧啶在玻碳电极上产生氧化峰, 在此之前嘧啶碱基的电化学研究大多集中在汞电极上的还原反应, 人们曾一度认为胞嘧啶和胸腺嘧啶不具有电化学氧化活性。Ivandini^[28]等人用微波辅助等离子体化学气象沉积法制备了高效硼掺杂金刚石电极, 并对比研究了未阴极化处理和阴极化处理的硼掺杂金刚石电极对鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶的电化学响应。吴寿国^[29]等人用电沉积和恒电位吸附法制备了 β -环糊精/聚乙酰苯胺修饰的玻碳电极, 对胸腺嘧啶在该电极界面超分子微孔环境中的电化学氧化行为进行了详细研究, 检测限可达到 6.26×10^{-6} mol/L。王宗花^[30]等人用 β -环糊精包埋碳纳米管修饰的热解石墨电极研究了胸腺嘧啶的电催化氧化, β -环糊精和碳纳米管的存在使胸腺嘧啶的氧化峰电位负移到 0.87V, 大大提高了它的氧化效率, 检测限达到 5×10^{-6} mol/L。Shen^[31]等人用 β -环糊精/多壁碳纳米管修饰的玻碳电极同时测定鸟嘌呤、腺嘌呤和胸腺嘧啶, 检测限分别达到 3.37×10^{-8} 、 7.5×10^{-10} 和 6.77×10^{-9} mol/L。Oliveira-Brett^[32]等人研究了 DNA 中四种碱基及其核苷酸在玻碳电极上的电化学氧化, 探讨了较小的电极面积能进一步提高嘧啶碱基的响应信号。Stempkowska^[33]等人用传统碳糊电极研究了 DNA 四种核苷酸的电化学氧化, 并进一步分析了合成的核苷酸链中各种核苷酸的信号强度与组分含量的关系。

碱基类物质的电化学中还包括一些硫代碱基的研究, Shahrokhian^[34]等人研究了钴希夫碱修饰的碳糊电极对硫胞嘧啶的电化学催化氧化。Salimi^[35]等人将多壁碳纳米管修饰的玻碳电极用于硫胞嘧啶, L-半胱氨酸和谷胱氨酸的伏安检测。Wen^[36]等人研究了 Gemini 阳离子表面活性剂对银电极上 2-硫尿嘧啶电化学氧化行为的影响。

1.3 碳糊电极

1.3.1 传统碳糊电极

早在 20 世纪 50 年代末 Adams^[37]就提出了碳糊电极(CPE)的制备方法, 将导电性碳粉和不导电的粘合剂(如石蜡油、医用润滑油 Nujol 等)混合, 碳粉与粘合剂比例一般在 5g:2~3.5 mL 范围内。与贵金属电极相比碳糊电极的特点是电位窗宽、残余电流低、制备方法简单、表面更新容易、而且价格便宜。1964 年 Kuwana^[38]等发表了固定二茂铁和蒽醌等电活性物质的原理性研究, 逐渐兴起了在碳糊表面固定修饰剂的化学修饰碳糊电极(CMCPE)。直至 1981 年 Baldwin^[39]等提出直接混合的简单制备方法后, 化学修饰碳糊电极才得到较快发展。碳糊电极对电活性物质的富集主要依靠吸附和萃取^[40], 如果电化学反应在裸电极上能够合理地、有选择性地和容易地进行, 电极表面的修饰则没有必要和毫无价值, 加入的修饰剂必须能增强碳粉微粒的吸附作用或与粘合剂形成协同萃取作用等。化学修饰碳糊电极的出现提高了碳糊电极的选择性和灵敏度, 使分离、富集和选择性测定三者合一。迄今为止, 碳糊电极及化学修饰碳糊电极已在无机物分析^[41~43]、有机物分析^[44~46]及药物分析^[47,48]、电化学^[49-51]和生物传感器^[52,53]等研究中得到广泛应用。

1.3.2 离子液体碳糊电极

1992 年 Zaworotk^[54]等合成了以二烷基咪唑为阳离子、以 BF_4^- 、 NO_3^- 、 CH_3COO^- 和 SO_4^{2-} 为阴离子的一系列亲水性离子液体, 使离子液体发展成为具有广泛应用前景的物质。Fuller^[55-57]等在 Zaworotk 的工作基础上, 合成了一系列阴离子体积更大的离子液体, 丰富了离子液体的种类, 实现了离子液体的可设计性。随后 Bonhote^[58]等在 1996 年报道了一系列疏水性离子液体, 进一步拓宽了离子液体的种类和用途。2001 年出现了功能化离子液体^[59], 使离子液体的研究和应用得到巨大的发展。离子液体在电分析化学领域的应用主要集中在制备电化学传感器、做支持电解质和制备碳糊电极等方面, 接下来简述近年来离子液体用于碳糊电极制备中的研究进展。

由于疏水性离子液体具有不溶于水、电导率高和粘性大等特性,因而可作为粘合剂和修饰剂用于离子液体碳糊电极(CILE)或离子液体修饰碳糊电极(IL-CPE)的制备。而亲水性离子液体由于与水互溶,直接用其作粘合剂制备的碳糊电极在水溶液中会发生溶胀现象,影响电极性能,因此需借助液体石蜡或其它粘合剂来实现 IL-CPE 的制备。和传统碳糊电极相比, CILE 和 IL-CPE 具有良好的电化学性能,并能显著地降低一些生物分子的过电位,改善电极反应的可逆性,有效地提高一些电活性物质的电子转移速率和电流响应灵敏度。因此,将离子液体用于碳糊电极的制备,极大的促进了传统碳糊电极和化学修饰碳糊电极的发展。

(1)疏水性咪唑类离子液体用于碳糊电极的制备

作为最早制备的一类疏水性离子液体碳糊电极,其研究工作已取得了一定的进展。Liu^[60]等制备了磷钼杂多酸盐掺杂的[BMIM][PF₆]离子液体碳糊电极,用于亚硝酸盐的电催化还原研究。孙伟等制备了多种复合膜^[61-64]包埋 Hb 的 [BMIM][PF₆]离子液体碳糊电极,用紫外可见光谱、红外光谱和电化学方法等手段对包埋于膜内的 Hb 的性质进行了表征,并研究了 Hb 对 H₂O₂^[61,62]和三氯乙酸(TCA)^[63,64]的电催化行为。王升富^[65]等将血红素蛋白质(Mb、Hb、HRP)、[BMIM][PF₆]、碳粉和液体石蜡按照一定的比例均匀混合,制备了含血红素蛋白质的离子液体修饰碳糊电极,并用于 H₂O₂ 的测定。Musameh^[66]等采用 [BMIM][PF₆]、[HMIM][PF₆]、[OMIM][PF₆]、[HMIM][PF₃]、[HMIM][Imide]制备了不同的离子液体修饰的碳糊微电极,研究了不同离子液体对微电极的背景电流、信号响应、阻抗、电容和峰分离的影响,并应用于 NADH、胍等物质的流动注射分析。张亚^[67]等表征了用 [HMIM][PF₆]制备的 CILE 和 IL-CPE 的电极表面形貌和性能,对比研究了对苯二酚在这两种电极上的电化学行为,并应用于医用皮肤膏中对苯二酚含量的测定。郑建斌^[68]等研究了多贝斯在用 [AMIM][PF₆]制备的 CILE 上的电化学行为,并测定了胶囊和尿液中多贝斯的含量。Franzoi^[69]等将漆酶、离子液体([BMIM][PF₆]或[BMIM][BF₄])、石蜡油和石墨粉按一定比例均匀混合,制备的生物传感器用于植物提取物迷迭香酸的测定。

(2)疏水性吡啶类离子液体用于碳糊电极的制备

与疏水性咪唑类离子液体碳糊电极相比较,疏水性吡啶类离子液体碳糊电极能明显降低电催化反应过程中存在的背景电流。Maleki 和 Safavi 课题组以 [OPy][PF₆]为粘合剂制备了吡啶类离子液体碳糊电极,研究了抗坏血酸(AA)、多巴胺(DA)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)等生物分子在 CILE 上的电化学行为,发现它们的氧化还原电位明显降低^[70];良好的实现了 AA、DA 和尿酸(UA)的同时测定^[71];在此电极上沉积 Pd 纳米粒子,构建了 Pd/CILE 修饰电极,研究了溶解 O₂、H₂O₂、DA、AA^[72]和胍^[73]的电化学催化作用;研究了亚硫酸盐在 CILE

上的电催化氧化,并测定了矿泉水、葡萄汁和啤酒中亚硫酸盐的含量^[74];对比研究了L-半胱氨酸(CySH)在CILE、GCE上的电化学行为,探讨CySH的反应机理并检测了豆奶中CySH的含量^[75]。孙伟等制备并表征了[BPy][PF₆]离子液体碳糊电极^[76],在该电极上分别研究了儿茶酚^[77]、DA^[78]和硝基酚^[79]的电化学行为;构建了Nafion/nano-CaCO₃-Hb/CILE修饰电极,研究了其对H₂O₂、三氯乙酸(TCA)和亚硝酸盐的电催化作用^[80]。Musameh^[81]等制备[Opy][PF₆]/石墨复合电极,考察了[Opy][PF₆]的用量对[OPy][PF₆]/石墨电极的电容、阻抗、阴极电流和峰分离的影响,然后将GOx加入[OPy][PF₆]石墨复合物中构建了葡萄糖传感器。丁彩凤等^[82]构建了HRP-海藻酸钠水凝胶膜修饰的[BPy][PF₆]碳糊电极,研究了其对H₂O₂的电催化活性。

(3)亲水性离子液体用于碳糊电极的制备

将亲水性离子液体与液体石蜡或其它的修饰剂混合制备的IL-CPE,进一步拓宽了离子液体在碳糊电极中的应用范围,但存在背景电流较大的缺点。张亚等人分别采用[AMIM]Cl、[HMIM]Br、[AMIM]Br制备了IL-CPE,研究了黄岑苷^[83]、芦丁^[84]、对氨基酚^[85]的电化学行为并建立了它们的电化学分析方法;构建了Nafion/[OMIM]Br/CPE修饰电极,研究了DA在该修饰电极上的电化学行为,实现了AA、UA共存下DA的选择性测定^[86]。贾晓光^[87]等通过[BMIM][BF₄]、甲基硅油分别与石墨粉混合制备了碳糊电极,研究了对苯二酚在这两种电极上的电化学行为,解释了[BMIM][BF₄]碳糊电极充电电流比甲基硅油碳糊电极大的原因可能是由于[BMIM][BF₄]、甲基硅油表面基团不同,导致了介电常数性质存在差异。孙伟^[88]等制备和表征了[EMIM][BF₄]修饰碳糊电极,研究了米吐尔在该电极上的电化学行为并建立了测定其含量的电化学分析方法。

1.3.3 微碳糊电极

微电极是指相对于常规电极而言,一维尺寸为纳米级或微米级的一类电极。上世纪60年代中期,当在旋转圆盘电极的电流-时间曲线测定中排除了对流的影响时,人们才发现电极反应过程与旋转圆盘电极的半径有关。直到20世纪70年代末期,英国南安普敦大学的Fukushima^[89]才指出减小电极的尺寸对电极反应不仅有量的影响,而且有着质的改变。

当电极的一维尺寸从mm级降至 μm 级时,表现出许多优良的电化学特性,如高稳态电流密度、高信噪比、极小时间常数、低溶液电位降等。微电极上的极化电流和欧姆压降小,在快速电极过程的研究、高阻抗电解质体系中的测量和生命科学领域都得到了应用^[90-92]。常用的微电极材料包括铂^[93-95]、金^[96-98]和碳纤维^[99]等,其中碳纤维微电极电势窗口较宽,因而能广泛应用于水介质中的电分析

[100,101]。

在常规电极体系中, 电化学反应中的物质扩散一般接近于半无限的平面扩散, 而微电极因为其特殊的尺寸, 除了存在平常的轴向扩散之外还有平行于电极表面的径向扩散, 电解时电极表面能形成薄而稳定的半球形扩散层, 边缘效应明显^[102]。因此微电极的电化学理论是建立在多维扩散基础上的^[103], 具有许多常规电极所不能比拟的电化学特性, 如传质速率高, 能迅速达到稳态电流, 电流密度大, 具有低的欧姆降, 时间常数小等等。

微电极上的扩散传质速率与其几何尺寸成反比, 尺寸越小扩散传质速率越快, 随着电极半径越来越小, 传质速率越来越高, 以致许多在较小电极上可逆的过程, 在更小的电极上会变得不可逆, 这就可以在无需借助暂态技术的情况下对快速电极过程和伴随化学反应过程进行研究^[104-110], 由于高的扩散传质速率, 溶液的流动对电流影响不大, 微电极还可用于流动体系的研究^[111,112]。

微电极的体积小, 用它制作的仪器便于携带, 十分灵活, 可进行现场测量, 在此基础上发展起来的微电极定位技术和微电极测量技术在许多化学领域, 特别是生物化学和临床医学的应用上很有实际意义^[113,114]。同时微电极也因为其面积的限制, 电流强度很小, 有时这一缺点限制了它的应用, 在这种情况下, 人们将多个微电极组合起来, 成为一个组合式微电极加以使用, 起到了很好的效果, 既具有微电极的一般特性, 又提高了电流强度。

当电极尺寸进一步减小到纳米级时, 微电极制作的难度显著加大, 弱信号检测的问题也更加突出。随着纳米线制备方法研究的发展以及实验仪器性能的提高, 近几年纳米微电极已逐渐引起电化学和电分析化学工作者的关注, 并且在纳米生物传感器^[115,116], 单细胞分析^[117], 微量、痕量检测^[118], 电化学动力学研究^[119,120], 电催化反应电极材料^[121]等众多领域显示出了巨大的潜在应用性。

常见碳材料微电极包括碳纤维微电极, 玻碳微电极和碳糊微电极, 其中因碳纤维电极制作比较方便, 研究报道比较多, 在这里我们主要介绍碳糊微电极的一些研究进展。陈洪渊^[122]等人提出了一种新的用金微电极刻蚀后装入碳糊的碳糊微电极制备方法, 此方法能很好的控制碳糊微电极的一维尺度, 制作较为方便。王敌清^[123]等人采用碳基针孔微电极作为基体, 把蒙脱土/碳糊修饰在针孔微电极中, 制成组合式修饰微电极, 测试了该修饰碳糊微电极对铜离子的阳极溶出伏安特性。邓培红等人用碳黑微电极研究了 DA 的可逆电化学行为, 并且极大地提高了 DA 测定的灵敏度^[124]; 将多壁碳纳米管用涂布法修饰在乙炔炭黑微电极表面, 用阳极溶出伏安法测定痕量 Sn(II)^[125]; 采用循环伏安法将氨基乙酸聚合在碳黑微电极表面制得聚氨基乙酸修饰碳黑微电极, 并研究了 DA 和 AA 在该电极上的电化学行为^[126]。Labuda^[127]等人用金属氧化物粉末混合光谱纯石墨粉、医用凡士林制成

碳糊，装在 150 μm 的硅胶毛细管中，用铜线连接制成氧化物修饰碳糊微电极，应用于毛细管电泳中研究氨基酸的电化学行为。Musameh^[128]等人为了克服离子液体碳糊微电极较大的充电电容和提高检测灵敏度，研究了用不同种类离子液体制备的碳糊微电极的性能，优化了离子液体碳糊微电极中的离子液体的比例。Nigam^[129]等人用四氢呋喃作溶剂研磨碳粉和锌希夫碱，待溶剂挥发后加入医用液体石蜡，制成修饰碳糊微电极，用该电极研究了头孢噻肟酸的电化学行为。

1.4 本论文的基本思路和目的

衰老和疾病一直是人们关注的话题，医学界认为氧活性物质(reactive oxygen species, ROS)是造成DNA损伤的罪魁祸首，是衰老和疾病的根源。ROS能使核酸在线粒体上氧化生成正常代谢的副产物，这些副产物很容易成为基因突变和DNA复制中碱基错配的位点，8-O-dG就是最显著的例子。核酸碱基类物质的氧化研究对于获得DNA中各级组分的反应动力学信息，了解一些人类疾病的病理学，建立合理的疾病检测机制，开发有效的疾病治疗途径等均有重要意义。近年来，核酸碱基的直接电化学氧化引起了越来越多研究者的兴趣。离子液体具有导电率高、电化学窗口宽的特点，使其在电化学和电分析化学领域中具有明显的优点，而且其挥发性小、溶解性好、酸碱性可调，使其在电化学领域有广泛的应用前景。因此，本文使用不同种类的离子液体做粘合剂或修饰剂来改善碳糊电极的性能，试图提高核酸碱基在离子液体碳糊电极上的直接电化学信号，从而实现碱基及其衍生物的直接电化学氧化，进一步探讨它们的氧化机理，建立可靠的碱基及其衍生物直接电化学氧化测定方法。

参考文献

- [1] Fujita N., Horiike S., Sugimoto R., et. al, Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients [J], *Free Radical Biol. Med.*, 2007, 42: 353~362
- [2] Svoboda P., Ko S., Cho B., et. al, Neopterin, a marker of immune response, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress, correlate at high age as determined by automated simultaneous high-performance liquid chromatography analysis of human urine [J], *Anal. Chem.*, 2008, 383: 236~242
- [3] Yang J., Xu G. W., Kong H. W., et. al, Artificial neural network classification based on high-performance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer [J], *J. Chromatogr. B*, 2002, 780: 27~33
- [4] Nakano K., Yasaka T., Isolation and identification of urinary nucleosides: applications of high-performance liquid chromatographic methods to the synthesis of 5'-deoxyxanthosine and the simultaneous determination of 5,6-dihydrouridine and pseudouridine [J], *J. Chromatogr.*, 1990, 515: 537~546
- [5] Wang J., Cai X. H., Rivas G., et. al, DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus [J], *Anal. Chem.*, 1996, 68: 2629~2634
- [6] Chen S. J., Huang Y. F., Huang C. C., et. al, Colorimetric determination of urinary adenosine using aptamer-modified gold nanoparticles [J], *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1749~1753
- [7] Goyal R. N., Chatterjee S., Bishnoi S., Voltammetric determination of 2'-deoxyadenosine and adenine in urine of patients with hepatocellular carcinoma using fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode [J], *Electroanalysis*, 2009, 21: 1369~1378
- [8] Dryhurst G., Dicarbonium ions as products of electrochemical oxidation of biologically important purines at the pyrolytic graphite electrode [J], *J. Electrochem. Soc.*, 1969, 116: 1411~1412
- [9] Goyal R. N., Dryhurst G., Redox chemistry of guanine and 8-oxoguanine and a comparison of the peroxidase-catalyzed and electrochemical oxidation of 8-oxoguanine [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1982, 135: 75~91
- [10] Oliveira-Brett A. M., Piedade J. A. P., Serrano S. H. P., Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine [J], *Electroanalysis*, 2000, 12: 969~973
- [11] Ferapontova E. E., Electrochemistry of guanine and 8-oxyguanine at gold electrodes [J], *Electrochim. Acta*, 2004, 49: 1751~1759

- [12] Dryhurst G., Elving P. J., Electrochemical oxidation of adenine: reaction products and mechanisms [J], *J. Electrochem. Soc.*, 1968, 115: 1014~1020
- [13] Diculescu V. C., Piedade J. A. P., Oliveira-Brett A. M., Electrochemical behaviour of 2,8-dihydroxyadenine at a glassy carbon electrode [J], *Bioelectrochemistry*, 2007, 70: 141~146
- [14] Zen J. M., Chang M. R., Ilangovan G., Simultaneous determination of guanine and adenine contents in DNA, RNA and synthetic oligonucleotides using a chemically modified electrode [J], *Analyst.*, 1999, 124: 679~684
- [15] Wang H. S., Ju H. X., Chen H. Y., Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode [J], *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461: 243~250
- [16] Wang Z. H., Xiao S. F., Chen Y., β -Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine [J], *J. Electroanal. Chem.*, 2006, 589: 237~242
- [17] Liu H. Y., Wang G. F., Chen D. L., et. al, Fabrication of polythionine/NPAu/MWNTs modified electrode for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA [J], *Sens. Actuators, B*, 2008, 128: 414~421
- [18] Goyal R. N., Gupta V. K., Oyama M., et. al, Voltammetric determination of adenosine and guanosine using fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode [J], *Talanta*, 2007, 71: 1110~1117
- [19] Goyal R. N., Gupta V. K., Chatterjee S., Simultaneous determination of adenosine and inosine using single-wall carbon nanotubes modified pyrolytic graphite electrode [J], *Talanta*, 2008, 76: 662~668
- [20] Goyal R. N., Dhawan A., Oxidation chemistry of 2'-deoxyadenosine at pyrolytic graphite electrode [J], *Bioelectrochemistry*, 2006, 69: 223~233
- [21] Goyal R. N., Jain N., Garg D. K., Electrochemical and enzymic oxidation of guanosine and 8-hydroxyguanosine and the effects of oxidation products in mice [J], *Biosens. Bioelectron.*, 1997, 43: 105~114
- [22] Goyal R. N., Puri B. K., Jain N., Electrochemical oxidation of guanosine-5'-monophosphate at the pyrolytic graphite electrode [J], *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2001, 2: 832~837
- [23] Goyal R. N., Sangal A., Electrochemical oxidation of adenosine monophosphate at a pyrolytic graphite electrode [J], *J. Electroanal. Chem.*, 2003, 557: 147~155
- [24] Goyal R. N., Tyagi A., Investigations into the electrooxidation of guanosine-5'-triphosphate at the pyrolytic graphite electrode [J], *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 382: 1683~1690

- [25] Goyal R. N., Oyama M., Tyagi A., Simultaneous determination of guanosine and guanosine-5'-triphosphate in biological sample using gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode [J], *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581: 32~36
- [26] Goyal R. N., Oyama M., Singha S. P., Simultaneous Determination of adenosine and adenosine-5'-triphosphate at nanogold modified indium tin oxide electrode by osteryoung square-wave voltammetry [J], *Electroanalysis*, 2007, 19: 575~581
- [27] Oliveira-Brett A. M., Matysik F. M., Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1997, 429: 95~99
- [28] Ivandini T. A., Honda K., Rao T. N., Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography [J], *Talanta*, 2007, 71: 648~655
- [29] Wu S. G., Zheng L. Z., Rui L., et. al, Electrochemical studies on the oxidation of thymine at β -Cyclodextrin modified electrode [J], *Electroanalysis*, 2001, 13: 967~970
- [30] Wang Z. H., Wang Y. M., Luo G. A., The electrocatalytic oxidation of thymine at α -Cyclodextrin incorporated carbon nanotube-coated electrode [J], *Electroanalysis*, 2003, 15: 1129~1133
- [31] Shen Q., Wang X. M., Simultaneous determination of adenine, guanine and thymine based on β -cyclodextrin/MWNTs modified electrode [J], *J. Electroanal. Chem.*, 2009, 632: 149~153
- [32] Oliveira-Brett A. M., Piedade J.A.P., Silva L.A., et. al, Voltammetric determination of all DNA nucleotides [J], *Anal. Biochem.*, 2004, 332: 321~329
- [33] Stempkowska I., Ligaj M., Jasnowska J., et. al, Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode [J], *Bioelectrochemistry*, 2007, 70: 488~494
- [34] Shahrokhian S., Amiri M., Voltammetric determination of thiocytosine based on its electrocatalytic oxidation on the surface of carbon-paste electrode modified with cobalt Schiff base complexes [J], *J Solid State Electrochem.*, 2007, 11: 1133~1138
- [35] Salimi A., Hallaj R., Catalytic oxidation of thiols at preheated glassy carbon electrode modified with abrasive immobilization of multiwall carbon nanotubes: applications to amperometric detection of thiocytosine, L-cysteine and glutathione [J], *Talanta*, 2005, 66: 967~975
- [36] Wen D., Zhu X., Zhao F. Q., et. al, Influence of cationic gemini surfactants on the electrochemical behavior of 2-thiouracil at silver electrodes [J], *J Solid State Electrochem.*, 2006, 10: 69~77
- [37] Adams R. N., Carbon paste electrodes [J], *Anal. Chem.*, 1958, 30: 1576

- [38] Kuwana T., French W. G., Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solutions using carbon paste electrode [J], *Anal. Chem.*, 1964, 36: 241~242
- [39] Ravichandran R., Baldwin R. P., Chemically modified carbon paste electrodes [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1981, 126: 293~300
- [40] 董绍俊, 车广礼, 谢远武, 化学修饰电极[M], 北京: 科学出版社, 2003
- [41] Sanaa M., Mamia E. R., Aziz A., et. al, Carbon paste electrode bulk-modified with the conducting polymer poly(1, 8-diaminonaphthalene): Application to lead determination[J], *Microchim. Acta*, 2003, 143: 195~204
- [42] 李桂敏, 吴志皓, 赵阁, 等, 2-羟基-3-(三乙胺基)丙基正癸基硫醚修饰碳糊电极测定痕量金 [J], *分析测试学报*, 2004, 23: 22~24
- [43] 傅崇岗, 苏昌华, 流动注射掺杂普鲁士蓝碳糊电极测定过氧化氢[J], *分析科学学报*, 2005, 21: 256~258
- [44] Kagan K., Burcu M., Dilsat O., et. al, Electrochemical DAN biosensor for the determination of benzopyrene-DNA adducts[J], *Anal. Chim. Acta*, 2001, 450: 45~52
- [45] Radi A., Anodic voltammetric assay of lansoprazole and omeprazole on a carbon paste electrode [J], *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 31: 1007~1012
- [46] Wang C. Y., Hu X. Y., Jin G. D., et al, Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine [J], *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 30: 131~139
- [47] 钟爱国, 利眠宁汞修饰碳糊电极的制作及应用[J], *分析科学学报*, 2003, 19: 590~591
- [48] 易兰花, 王俊芬, 黎拒难, 等, 碳糊电极阳极吸附伏安法测定环丙沙星[J], *化学研究*, 2005, 16: 59~61
- [49] 唐丽娜, 王凤平, 朱永春, 硬脂酸钠在油/水界面自组装膜的电化学研究[J], *电化学*, 2006, 12: 324~328
- [50] Tang L. N., Wang F. P., Electrochemical evaluation of allylthiourea layers on copper surface[J], *Corros. Sci.*, 2008, 50: 1156~1160
- [51] 郑行望, 章竹君, 王琦, 皂土修饰碳糊电极的电化学发光特性研究及其分析应用[J], *高等学校化学学报*, 2003, 24: 1385~1389
- [52] 焦奎, 张旭志, 徐桂云, 等, ssDNA/十八酸修饰碳糊电极的制备及伏安法表征[J], *化学学报*, 2005, 63: 1100~1104
- [53] 张正奇, 谢建平, 熊劲芳, 等, 黄瓜 DNA 伏安传感器的制备及其应用[J], *分析科学学报*, 2005, 21: 5~8
- [54] Wilkes J.S., Zaworotko M., Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids [J], *Chem. Commun.*, 1992, 13: 965~967

- [55] Fuller J., Carlin R.T., Structural and electrochemical characterization of 1,3-bis(4-methylphenyl) imidazolium chloride [J], *J. Chem. Crystallogr.*, 1994, 24: 489~493
- [56] Carlin R.T., Delong H.C., Fuller J., et. al, Dual intercalating molten electrolyte batteries [J], *J. Electrochem. Soc.*, 1994, 141: L73~L76
- [57] Fuller J, Carlin R.T., Delong H.C., et. al, Structure of 1-ethyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: model for room temperature molten salts [J], *Chem. Commun.*, 1994, 3: 299~300
- [58] Bonhote P., Dias A.P., Papageorgiou N., et. al, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts [J], *Inorg. Chem.*, 1996, 35: 1168~1178
- [59] Visser A.E., Swatoski R.P., Reichert W.M., et. al, Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions [J], *Chem. Commun.*, 2001, 1: 135~136
- [60] Liu H.T., He P., Liu Z.Y., et. al., An ionic liquid-type carbon paste electrode and its polyoxometalate-modified properties [J], *Electrochem. Commun.*, 2005, 7: 1357~1363
- [61] 孙伟, 高瑞芳, 王丹丹, 等, 血红蛋白在离子液体[BMIM]PF₆ 碳糊电极上的直接电化学 [J], *物理化学学报*, 2007, 23: 247~1251
- [62] Sun W., Wang D. D., Gao R. F., et. al., Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in sodium alginate film on a BMIMPF₆ modified carbon paste electrode [J], *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 1159~1164
- [63] Sun W., Zhai Z.Q., Wang D.D., et. al., Electrochemistry of hemoglobin entrapped in a Nafion/nano-ZnO film on carbon ionic liquid electrode [J], *Bioelectrochemistry*, 2009, 74: 295~300
- [64] Sun W., Wang D. D., Li G.C., et. al., Direct electron transfer of hemoglobin in a CdS nanorods and Nafion composite film on carbon ionic liquid electrode [J], *Electrochim. Acta*, 2008, 53: 8217~8221
- [65] Wang S.F., Xiong H.Y., Zeng Q.X., Design of carbon paste biosensors based on the mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder for high performance and stabilization [J], *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 807~812
- [66] Musameh M., Wang J., Sensitive and stable amperometric measurements at ionic liquid-carbon paste microelectrodes [J], *Anal. Chim. Acta*, 2008, 606: 45~49
- [67] Zhang Y., Zheng J. B., Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode [J], *Electrochim. Acta*, 2007, 52: 7210~7216

- [68] Zheng J. B., Zhang Y., Yang P.P., An ionic liquid-type carbon paste electrode for electrochemical investigation and determination of calcium dobesilate [J], *Talanta*, 2007, 73: 920~925
- [69] Franzoi A.C., Dupont J., Spinelli A. et. al., Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts [J], *Talanta*, 2009, 77: 1322~1327
- [70] Maleki N., Safavi A., Tajabadi F., High-performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder [J], *Anal. Chem.*, 2006, 78: 3820~3826
- [71] Safavi A., Maleki N., Moradlou O., et. al., Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode [J], *Anal. Biochem.* 2006, 359: 224~229
- [72] Safavi A., Maleki N., Tajabadi F., et. al., High electrocatalytic effect of palladium nanoparticle arrays electrodeposited on carbon ionic liquid electrode [J], *Electrochem. Commun.*, 2009, 8: 1963~1968
- [73] Maleki N., Safavi A., Farjami E., et. al., Palladium nanoparticle decorated carbon ionic liquid electrode for highly efficient electrocatalytic oxidation and determination of hydrazine [J], *Anal. Chim. Acta*, 2008, 611: 151~155
- [74] Safavi A., Maleki N., Momeni S., et. al., Highly improved electrocatalytic behavior of sulfite at carbon ionic liquid electrode: Application to the analysis of some real samples [J], *Anal. Chim. Acta*, 2008, 625: 8~12
- [75] Maleki N., Safavi A., Sedaghati F., et. al., Efficient electrocatalysis of L-cysteine oxidation at carbon ionic liquid electrode [J], *Anal. Biochem.*, 2007, 369: 149~153
- [76] 孙伟, 高瑞芳, 毕瑞锋, 等, 室温离子液体六氟磷酸正丁基吡啶修饰碳糊电极的制备与表征 [J], *分析化学*, 2007, 35: 567~570
- [77] Sun W., Li Y.Z., Yang M.X., et. al., Application of carbon ionic liquid electrode for electrooxidative determination of catechol [J], *Sens. Actuators B: Chem.*, 2008, 133: 387~392
- [78] Sun W., Yang M. X., Jiao K., Electrocatalytic oxidation of dopamine at an ionic liquid modified carbon paste electrode and its analytical application [J], *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389:1283~1291
- [79] Sun W., Yang M. X., Jiang Q., et. al., Direct electrocatalytic reduction of p-nitrophenol at room temperature ionic liquid modified electrode [J], *Chin. Chem. Lett.*, 2008, 19:1156~1158
- [80] Sun W., Gao R. F., Jiao K., Electrochemistry and electrocatalysis of Hemoglobin Nafion/nano-CaCO₃ film on a new ionic liquid BPPF6 modified carbon paste electrode [J], *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111: 4560~4567
- [81] Musameh M. M., Kaehoosangi R. T., Xiao L., et. al., Ionic liquid-carbon composite glucose biosensor [J], *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24: 87~92

- [82] Ding C. F., Zhang M. L., Zhao F., et. al., Disposable biosensor and biocatalysis of horseradish peroxidase based on sodium alginate film and room temperature ionic liquid [J], *Anal. Biochem.*, 2008, 378: 32~37
- [83] 张亚, 乔广军, 张宏芳, 等, 离子液体修饰碳糊电极对 Bai 的电催化作用及其分析应用 [J], *应用化学*, 2008, 25: 899~903
- [84] Zhang Y., Zheng J. B., Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode [J], *Talanta*, 2008, 77: 325~330
- [85] Zhang Y., Zheng J. B., An ionic liquid bulk-modified carbon paste electrode and its electrocatalytic activity toward p-aminophenol [J], *Chin. J. Chem.*, 2007, 25: 1652~1657
- [86] 张亚, 张宏芳, 郑建斌, Nafion/离子液体修饰碳糊电极在抗坏血酸和尿酸存在下选择性测定多巴胺 [J], *分析实验室*, 2008, 27(12): 34~37
- [87] 贾晓光, 张玲, 朱永春, 对苯二酚在室温离子液体碳糊电极上电化学反应的半经验量子化学 AM1 研究 [J], *沈阳师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 26: 340~343
- [88] Sun W., Jiang Q., Wang Y., et. al., Electrochemical behaviors of metol on hydrophilic ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate-modified electrode [J], *Sens. Actoators B: Chem.*, 2009, 136: 419~424
- [89] Fukushima T., Kosaka A., Lshimura Y., et. al., Molecular ordering of organic molten salts triggered by single-walled carbon nanotubes [J], *Science*, 2003, 300: 2072~2075
- [90] Morin F.O., Takamura Y., Tamiya E., Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives [J], *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 100: 131~143
- [91] Basa A., Magnuszewska J., Krogulec T., et. al., Cyclic chronopotentiometric determination of sugars at Au and Pt microelectrodes in flowing solutions [J], *J. Chromatogr. A*, 2007, 1150: 312~319
- [92] Fruk L., Muller J., Weber G., et. al., DNA-directed immobilization of horseradish peroxidase-DNA conjugates on microelectrode arrays: towards electrochemical screening of enzyme libraries [J], *Chem. Eur. J.*, 2007, 13: 5223~5231
- [93] Bond A. M., Pfund V. B., Cyclic voltammetry at gold, platinum and carbon microelectrodes in ice without added supporting electrolyte: Evidence for liquid microphases at temperatures well below the freezing point of water [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1992, 335: 281~295
- [94] Nie M., Elliott J. M., Electrochemical fabrication and electrocatalytic properties of nanostructured mesoporous platinum microelectrodes [J], *J. Mater. Sci. Technol.*, 2005, 21: 863~865.

- [95] Wu Z. Y., Chen L.G., Shen G. L., et. al., Platinum nanoparticle-modified carbon fiber ultramicroelectrodes for mediator-free biosensing [J], *Sens. Actuators, B: Chem.*, 2006, 119: 295~301
- [96] Garnier C., Lesven L., Billon G., et. al., Voltammetric procedure for trace metal analysis in polluted natural waters using homemade bare gold-disk microelectrodes [J], *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 386: 313~323
- [97] Shi G. D., Garfias-Mesias L. F., Smyrl W. H., Preparation of a gold-sputtered optical fiber as a microelectrode for electrochemical microscopy [J], *J. Electrochem. Soc.*, 1998, 145: 2011~2016
- [98] Aguiar F. A., Gallant A. J., Rosamond M. C., et. al., Conical recessed gold microelectrode arrays produced during photolithographic methods: Characterisation and causes [J], *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 879~885
- [99] Liu Z. M., Niwa O., Kurita R., et. al., Carbon film-based interdigitated array microelectrode used in capillary electrophoresis with electrochemical detection [J], *Anal. Chem.*, 2000, 72: 1315~1321.
- [100] Sbai M., Essis-Tome H., Gombert U., et. al., Electrochemical stripping analysis of methyl-parathion (MPT) using carbon fiber microelectrodes (CFME) modified with combinations of poly-NiTSPc and Nafion films [J], *Sens. Actuators, B: Chem.*, 2007, 124: 368~375
- [101] Zhang M. N., Liu K., Xiang L., et. al., Carbon nanotube-modified carbon fiber microelectrodes for in vivo voltammetric measurement of ascorbic acid in rat brain [J], *Anal. Chem.*, 2007, 79: 6559~6565
- [102] 古宁宇, 董绍俊, 超微电极新进展[J], *大学化学*, 2001, 16: 26~31
- [103] 张祖训, 超微电极电化学[M], 北京: 科学出版社, 1998
- [104] Russell A., Repka K., Dibble T., et. al, Determination of electrochemical heterogeneous electron-transfer reaction rates from steady-state measurements at ultramicroelectrodes [J], *Anal. Chem.*, 1986, 58: 2961~2964
- [105] Oldham K. B., Myland J. C., Zoski C. G., et. al, Kinetic parameters from steady-state voltammograms at microdisc electrodes [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1989, 270: 79~101
- [106] Galus Z., Golas J., Osteryoung J., Determination of kinetic parameters from steady-state microdisk voltammograms [J], *J. Phys. Chem.*, 1988, 92:1103~1107
- [107] Tutty O. R., Second-order kinetics for steady state EC' reactions at a disc microelectrode [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 377: 39~51

- [108] 吴志斌, 张祖训, 线性扫描伏安法研究: II 超微盘电极上催化电流理论[J], 化学学报, 1992, 50: 274~281
- [109] 鞠焯先, 陈洪渊, 碳纤维微电极研究: XX 甲苯胺蓝在碳纤维微盘电极上的电化学性质 [J], 化学学报, 1994, 52: 1118~1126
- [110] Winkler K, Baranski A, Ac voltammetric measurements of fast charge-transfer processes at ultramicroelectrodes [J], J. Electroanal. Chem., 1993, 346:197~210
- [111] Kristensen E. W., Wilson R. L., Wightman R. M., Dispersion in flow injection analysis measured with microvoltammetric electrodes [J], Anal. Chem., 1986, 58: 986~988
- [112] Tait R. J., Bury P. C., Finnin B. C., et. al, Achievement of the analytically ideal steady-state response at a microelectrode-based scanning electrochemical detector under flow injection analysis and normal-phase chromatography conditions [J], Anal. Chem., 1993, 65: 3252~3257
- [113] 王来兴, 周晓平, 胡小吾, 等, 微电极导向立体定向毁损顽固性痉挛斜颈一例[J], 立体定向和功能性神经外科杂志, 2001, 14 : 88
- [114] 崔高宇, 冯华, 王宪荣, 等, 微电极引导立体定向手术治疗帕金森病 71 例报告[J], 第三军医大学学报, 2001, 23: 1209~1211
- [115] Shao Y. H., Mirkin M. V., Fish G., et. al, Nanometer-sized electrochemical sensors [J], Anal. Chem., 1997, 69: 1627~1634
- [116] Zhang X. J., Wang J., Ogorevc B., et. al, Glucose nanosensor based on prussianblue modified carbon-fiber cone nanoelectrode and an integrated reference electrode [J]. Electroanalysis, 1999, 11: 945~949
- [117] Bratten C. D., Cobbold P. H., Cooper J. M., Single-cell measurements of purine release using a micromachined electroanalytical sensor [J], Anal. Chem., 1998, 70: 1164~1170
- [118] Menon V. P., Martin C. R., Fabrication and evaluation of nanoelectrode ensembles [J], Anal. Chem., 1995, 67: 1920~1928
- [119] Slevin C. J., Gray N. J., Macpherson J. V., et. al, Fabrication and characterization of nanometer-sized platinum electrodes for voltammetric analysis and imaging [J], Electrochem. Commun., 1999, 1: 282~288
- [120] Dryfe R. A. W., Kralj B., Voltammetric ion transfer in the presence of a nanoporous material [J], Electrochem. Commun., 1999, 1: 128~130
- [121] Penner R. M., Martin C. R., Preparation and electrochemical characterization of ultramicroelectrode ensembles [J], Anal. Chem., 1987, 59: 2625~2630
- [122] Sun J. J., Fang H. Q., Chen H. Y., A simple new method for the fabrication of carbon paste microelectrode and its characterization [J], Chin. Chem. Lett., 1996, 7: 1016~1018

- [123] 王敬清, 赵凯元, 碳糊微电极溶出伏安法测定铝合金中微量铜[J], 冶金分析, 2005, 25: 5~8
- [124] 邓培红, 张军, 匡云飞, 用碳黑微电极伏安法测定多巴胺[J], 理化检验-化学分册, 2006, 42: 286~288
- [125] 邓培红, 费俊杰, 张军, 等, 多壁碳纳米管修饰乙炔炭黑微电极溶出伏安法测定痕量锡[J], 冶金分析, 2009, 29: 21~24
- [126] 邓培红, 张军, 黎拒难, 聚氨基乙酸修饰碳黑微电极同时测定多巴胺和抗坏血酸[J], 理化检验-化学分册, 2009, 45: 7~10
- [127] Labuda J., Meister A., Glaser P., et. al, Metal oxide-modified carbon paste electrodes and microelectrodes for the detection of amino acids and their application to capillary electrophoresis [J], Fresenius. J. Anal. Chem., 1998, 360: 654~658
- [128] Musameh M., Wang J., Sensitive and stable amperometric measurements at ionic liquid-carbon paste microelectrodes [J], Anal. Chim. Acta, 2008, 606: 45~49
- [129] Nigam P., Mohan S., Kundu S., et. al, Trace analysis of cefotaxime at carbon paste electrode modified with novel Schiff base Zn(II) complex [J], Talanta, 2009, 77: 1426~1431

第二章 鸟苷在 BPPF₆ 离子液体碳糊电极上的 电化学行为和测定

摘要: 本章研究了鸟苷在疏水性离子液体六氟磷酸正丁吡啶(BPPF₆)修饰碳糊电极上的电化学行为, 并且进一步用于鸟苷的测定。鸟苷在该电极上发生吸附性不可逆氧化过程, 在 pH 4.5 的 B-R 支持电解质中, 鸟苷的氧化峰出现在 1.12V。与传统碳糊电极相比, 氧化峰电位出现较小的负移, 氧化峰电流有增大较强, 这主要是由于电极中存在的离子液体使鸟苷更容易吸附在电极表面, 提高的离子导电率使鸟苷的电化学响应信号增强。求解了相关的电化学参数如电子传递系数 α 、电极反应速率常数 k_s 和电子转移数 n 。在优化的实验条件下, 鸟苷的循环伏安氧化峰电流与鸟苷浓度在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内呈现良好的线性关系, 检测限为 $2.61 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。几种常见的共存物质对鸟苷的氧化峰电流的干扰较小, 在鸟嘌呤和鸟苷的混合溶液中离子液体电极对两种物质均表现出良好的电化学响应。上述分析方法进一步运用于对尿样中鸟苷的测定, 结果令人满意。

关键词: 鸟苷, 六氟磷酸正丁基吡啶, 离子液体, 循环伏安法

鸟苷是由鸟嘌呤与核糖组成的一种核苷, 两者之间由 β -N-糖苷键相连。若鸟苷与脱氧核糖相连, 则会产生脱氧鸟苷。鸟苷的用途十分广泛, 是食品和医药产品的重要中间体, 可用于合成食品增鲜剂——5'-鸟苷酸二钠、呈味核苷酸二钠, 以及核苷类抗病毒药物如利巴韦林、阿昔洛韦等, 也是用于制造无环鸟苷、三氮唑核苷、鸟苷三磷酸钠等药物的主要原料。鸟苷在许多生命进程中有着重要作用, 例如调节 RNA 的组装, 在大脑缺血时进行保护等。鸟苷经过磷酸化之后可变成鸟苷单磷酸、环鸟苷单磷酸、鸟苷双磷酸或鸟苷三磷酸。尿液中鸟苷的含量是医学上检测肾癌和肝病的衡量指标。因此建立灵敏的鸟苷测定方法有着十分重要的研究意义, 许多分析方法已经应用于检测鸟苷, 如高效液相色谱法^[1,2], 毛细管电泳法^[2]和薄层色谱法。由于鸟苷中的碱基具有电化学氧化性质, 电化学工作者不断构建选择性好、灵敏度高的化学修饰电极用于测定鸟苷。Goyal^[4-5]等人分别使用纳米金修饰的氧化铟锡电极和富勒烯 C₆₀ 修饰的玻碳电极对鸟苷进行了研究。Fortin^[6]等人在硼掺杂的金刚石电极上研究了鸟苷的直接电化学氧化。

本章在 BPPF₆ 离子液体碳糊电极上详细研究鸟苷的电化学行为, 求解了相关的电化学参数, 与 CPE 相比, 鸟苷的氧化电位降低了 10 mV, 氧化电流增加了

42 倍, 离子液体碳糊电极上鸟苷氧化峰电流的信号显著增强。在最优实验条件下, 建立了一种 BPPF₆ 离子液体碳糊电极灵敏测定鸟苷的分析方法。

2.1 实验部分

2.1.1 仪器与试剂

CHI 1210A 型电化学工作站(上海辰华仪器公司), 三电极系统: 自制离子液体碳糊电极(CILE)为工作电极; 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极; 铂丝为辅助电极; pH S-25C 型酸度计(上海理达仪器厂)。

六氟磷酸正丁基吡啶(BPPF₆, 杭州科默化学有限公司, 分子量 281.18, 熔点 60 °C); 石墨粉(上海胶体化学厂, 颗粒度 $\leq 30 \mu\text{m}$); 鸟嘌呤, 鸟苷(美国 Sigma 公司); 尿酸, 多巴胺, 抗坏血酸, 液体石蜡(天津巴斯夫化学试剂有限公司); 0.2 mol/L Britton-Robinson (B-R)缓冲溶液的配制方法是将 12.35 g H₃BO₄, 13.55 mL 浓 H₃PO₄ 和 11.80 mL CH₃COOH 混合用二次蒸馏水定容至 1000 mL, 然后再用 0.5 mol/L NaOH 调节, 得到所需 pH 值的 B-R 缓冲溶液。所用其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

2.1.2 实验方法

传统碳糊电极(CPE)的制备是将 1.6 g 石墨粉和 0.5 mL 液体石蜡置于研钵中研磨均匀, 填入内径 4 mm 的玻璃管中压实, 用铜导线连接, 使用前将电极表面在称量纸上打磨光滑。将石墨粉和离子液体 BPPF₆ 以 3:1 的质量比混合, 在 80°C 放置 1 小时后研磨均匀, 将混合物填入玻璃管中, 内插铜导线压实, 并在称量纸上打磨光滑即可得到 CILE。

将三电极浸入 B-R 缓冲溶液为支持电解质的 10 mL 电化学池中进行电化学实验。在含有一定量鸟苷的电化学池溶液中进行循环伏安扫描, 对鸟苷测定的相应实验参数和实验条件进行优化。最终选择 0.6 V 电压下开路富集 300 s 后, 在 0.5 V ~ 1.3 V 的电位范围内进行循环伏安测定。

2.2 结果与讨论

2.2.1 鸟苷在 CILE 上的电化学行为

用 CPE 和 CILE 分别研究了浓度为 5.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷在 0.2 mol/L pH 4.5

的 B-R 缓冲溶液中的电化学行为, 结果如图 2-1 所示, 在两种电极上均出现了一个不可逆的电化学氧化峰。在 CPE 上氧化峰电位位于 1.13 V (曲线 b), 电流为 6.644×10^{-6} A; 在 CILE 上氧化峰电位为 1.12 V (曲线 d), 电流为 2.780×10^{-4} A。比较上述数据得出 CILE 上氧化峰电位负移了 10 mV, 峰电流是 CPE 上电流值的 42 倍, 这表明 CILE 表面的离子液体对鸟苷的氧化反应有显著的催化能力。根据文献^[7,8], CILE 具有电导率高、电子传递速率快, 固有的催化和吸附性能等优点。因此在 CILE 表面能富集更多的鸟苷, 离子液体作为高效催化剂促进了鸟苷氧化的过程动力学反应。同时背景电流增加, 可能是由于高粘度离子液体的存在增加了双电层电容的缘故。

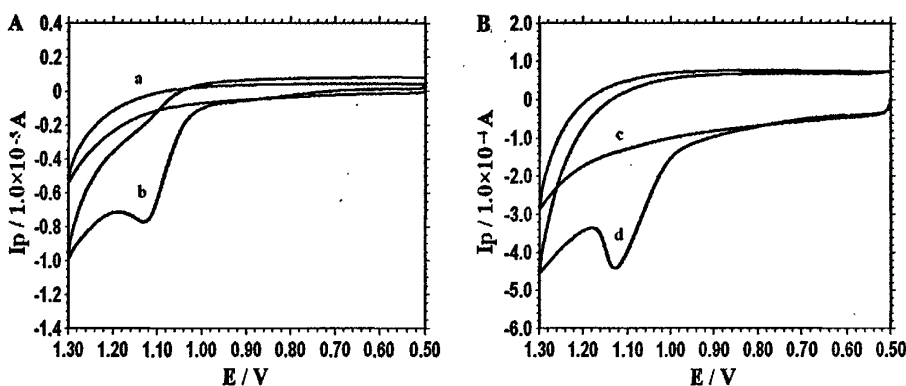


图 2-1 在 CPE (A) 和 CILE (B) 上 0.2 mol/L pH 4.5 的 B-R 缓冲溶液
和 5.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷溶液的循环伏安曲线, 扫速: 100 mV/s

Fig. 2-1 (A) Cyclic voltammograms on CPE for 0.2 mol/L pH 4.5 B-R (a) and 5.0×10^{-5} mol/L guanosine in buffer solution (b); (B) Cyclic voltammograms on CILE for 0.2 mol/L pH 4.5 B-R (c) and 5.0×10^{-5} mol/L guanosine in buffer solution (d). Scan rate: 100 mV/s

2.2.2 缓冲溶液 pH 值的影响

在 pH 3.0 到 6.0 范围内改变缓冲溶液的 pH 值, 对不同 pH 值下的鸟苷溶液进行循环伏安扫描, 实验结果如图 2-2 所示。随着缓冲溶液 pH 值的增加, 鸟苷的氧化峰电位负移, 说明氢质子(H^+)参与鸟苷的电化学氧化反应。氧化峰电位与溶液 pH 值存在如下线性关系:

$$E_{pa}(V) = -0.041\text{pH} + 1.257 \quad (n=7, \gamma=0.998)$$

据文献报道, 鸟苷氧化需要两步过程, 一共失去 4 个电子和 4 个质子, 第一步 2 电子 2 质子氧化反应是决速步反应。

缓冲溶液 pH 值对鸟苷氧化峰电流也有较大影响, 当鸟苷溶液的 pH 值为 4.5 时, 峰电流响应最大, 且峰形良好, 故实验中选择 0.2 mol/L pH 4.5 的 B-R 缓冲

溶液作为支持电解质。

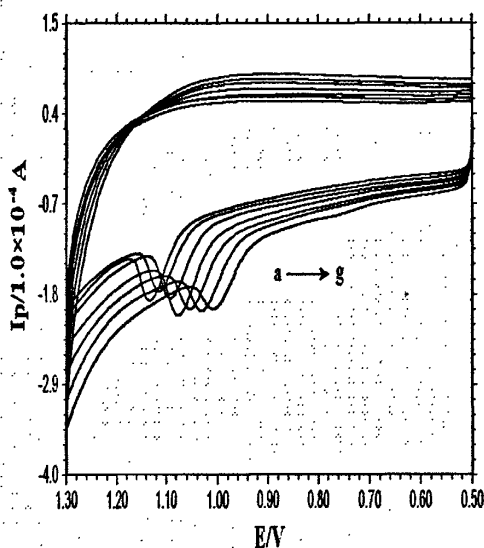


图 2-2 缓冲溶液 pH 值对鸟苷循环伏安响应的影响

(从 a 到 g: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0) 扫速: 100 mV/s

Fig.2-2 Influence of buffer pH (from a to g: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0) on the cyclic voltammometric response of guanosine at the scan rate of 100 mV/s

2.2.3 扫描速率的影响

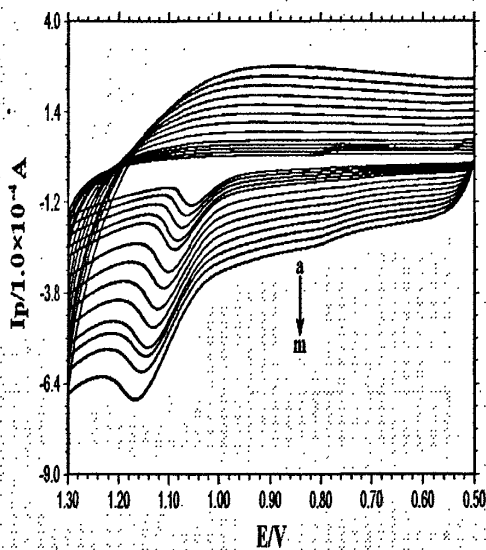


图 2-3 不同扫速下 5.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷溶液在 CILE 上的循环伏安图

(从 a 到 m: 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 mV/s)

Fig. 2-3 Cyclic voltammograms of 5.0×10^{-5} mol/L guanosine in pH 4.5 B-R with different scan rates (from a to m: 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 mV/s)

图 2-3 显示了不同扫速下 5.0×10^{-5} mol/L 鸟苷在 CILE 上的循环伏安曲线。由图可见, 鸟苷在 CILE 上的氧化峰电流和峰电位都随着扫描速率的变化而变化。随着扫速的增加, 氧化峰电流逐渐增大, 峰电位逐渐正移。在扫速为 10 ~ 300 mV/s 的范围内, 考察了峰电流与扫速的关系, 其线性回归方程为: $I_{pa} (\mu A) = 9.311v (V/s) + 105.7$ ($n=13, \gamma=0.996$)。由电流与扫速的线性关系表明鸟苷在 CILE 上的电极反应过程为吸附控制, 可认为本实验中鸟苷首先从溶液吸附到电极表面, 然后发生电化学氧化反应。

鸟苷在 CILE 上的表面吸附量, 即最大表面浓度可以根据以下公式计算:

$$I_p = \frac{nFQ\kappa}{4RT} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma_T v}{4RT} \quad (1)$$

公式(1)中 n 为电活性物质发生电极反应时的电子转移数, F (C/mol)为法拉第常数, A (cm^2)为 CILE 电极面积, Γ_T (mol/ cm^2)为表面吸附量, Q (C)为发生电极反应时消耗的电量, v (V/s)为循环伏安扫描速率。分别依据鸟苷氧化峰面积的积分和峰电流与扫速的关系, 计算出 n 和 Γ_T 的值分别为 1.9 和 5.02×10^{-9} mol/ m^2 , 所得 n 值表明有两个电子参与氧化反应过程, 与文献^[9,10]结果一致。

通过考察鸟苷的氧化峰电位 E_{pa} 与 $\ln v$ 的关系, 计算出鸟苷氧化的电化学反应参数。在扫速 10 ~ 300 mV/s 的范围内, 线性回归方程为 $E_{pa} (V) = 0.049 \ln v (V/s) + 1.228$ ($n=13, \gamma=0.991$)。

根据 Laviron 公式^[8]:

$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1-s)nF} \ln v \quad (2)$$

$$\log k_s = s \log(1-s) + (1-s) \log s - \log \frac{RT}{nFk} - \frac{(1-\alpha)\alpha n F \Delta E_p}{2.3RT} \quad (3)$$

式中 E^0 为式电位, α 为电子传递系数, k_s 为表观异相电子转移速率常数, 代入 $n=2$, 联立方程 (2) (3), 求得 $\alpha=0.74$, $k_s=1.26 \times 10^{-4} s^{-1}$ 。

根据相关文献^[9,10], 鸟苷电化学氧化机理可归纳为总体失去 4 个电子和 4 个质子的两步连续反应, 因此推导本实验中鸟苷在 CILE 上发生了如下电化学氧化反应:

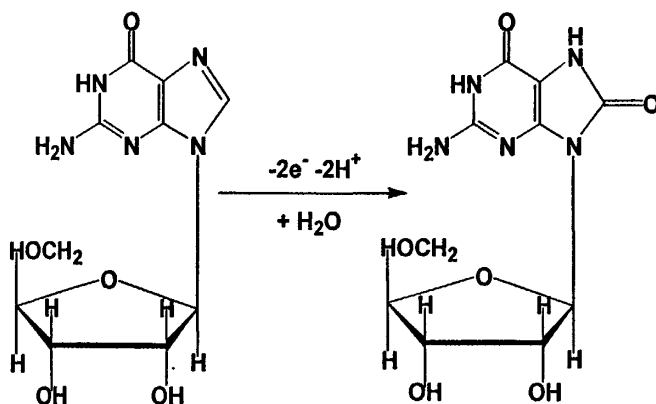


图 2-4 鸟苷电化学氧化反应机理

Fig. 2-4 Electrochemical oxidation process of guanosine

2.2.4 富集条件的影响

由于鸟苷在 CILE 上发生的电化学氧化反应为吸附控制，本实验中详细考察了富集条件对 5.0×10^{-5} mol/L 鸟苷电化学响应信号的影响。随着富集时间的延长，鸟苷的氧化峰电流逐渐增强，300 s 以后峰电流保持恒定不再增加，可以认为富集 300 s 后 CILE 电极表面的鸟苷吸附达到饱和状态。同时在 0.1 V~0.8 V 的范围内考察了富集电位对峰电流变化的影响，在 0.6 V 时得到最大电流值。因此选择鸟苷测定的最佳富集条件为 0.6 V 下开路富集 300 s。

2.2.5 工作曲线

在优化的实验条件下，对一系列浓度的鸟苷溶液进行电化学循环伏安测量，探讨鸟苷在 CILE 上电化学测定方法的可行性，并建立 CILE 测定鸟苷的工作曲线。在 1.0×10^{-6} mol/L ~ 1.0×10^{-4} mol/L 浓度范围内，鸟苷的氧化峰电流随着浓度的增加而不断增加，分区间呈线性关系。在 1.0×10^{-6} mol/L ~ 1.0×10^{-5} mol/L 浓度区间，线性方程为 $I_{pa} (\mu A) = 12.66C (\mu mol/L) - 5.2$ ($n=10, \gamma=0.990$)；在 1.0×10^{-5} mol/L ~ 1.0×10^{-4} mol/L 浓度区间，线性方程为 $I_{pa} (\mu A) = 2.58C (\mu mol/L) + 117.1$ ($n=11, \gamma=0.993$)。7 次平行测量 1.5×10^{-6} mol/L 的鸟苷溶液，求解出相对标准偏差(RSD)为 3.5%，计算出 CILE 测定鸟苷的检测限为 2.61×10^{-7} mol/L ($S/N=3$)。

2.2.6 CILE 对鸟苷和鸟嘌呤的同时测量

本实验中 CILE 电极对鸟苷和鸟嘌呤都具有良好的电化学响应，进一步研究了一定浓度的鸟嘌呤共存时，对鸟苷测定工作曲线的影响，探讨该测定方法在鸟嘌呤存在时的适用性。在 0.2 mol/L pH 4.5 的 B-R 电解质溶液中，加入鸟嘌呤和

鸟苷溶液,使鸟嘌呤浓度为 1.5×10^{-6} mol/L,调节鸟苷的浓度使其在 1.0×10^{-6} mol/L $\sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内变化,测定结果如图 2-5 所示,分别在 1.14 V 和 0.84 V 出现两个明显的氧化峰,对应为鸟苷和鸟嘌呤的氧化峰,峰电位差值达 300 mV,因此很容易对两种物质进行同时测量。随着鸟苷浓度的增加,峰电流逐渐增大,峰电位正移,与此同时鸟嘌呤的氧化峰电流和峰电位基本保持不变,可认为鸟嘌呤和鸟苷在 CILE 上都具有稳定良好的电化学响应且相互独立互不影响,由此表明 CILE 测定鸟苷的方法具有优良的适用性。

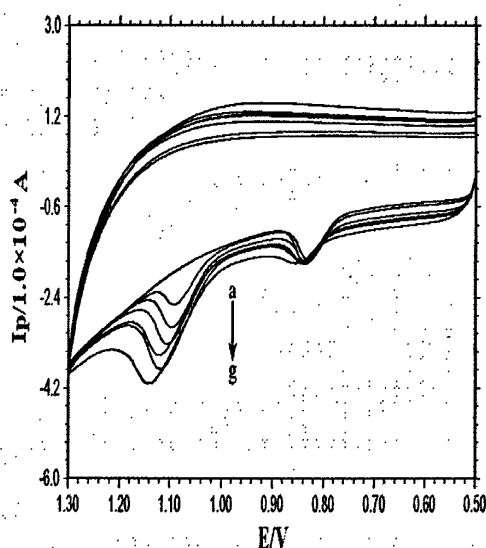


图 2-5 1.0×10^{-5} mol/L 鸟嘌呤共存时不同浓度鸟苷溶液的循环伏安图

(从 a 到 m: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 80 μ mol/L) 扫速: 100 mV/s

Fig.2-5 Cyclic voltammograms of different guanosine concentration

(from a to m: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 80 μ mol/L) in the presence of 1.0×10^{-5} mol/L guanine

in pH 4.5 B-R buffer solution at the scan rate of 100 mV/s.

2.2.7 干扰研究

研究了外源性物质对 1.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷测定信号的影响。选择相当于鸟苷浓度 10 倍的金属阳离子(例如 Al^{3+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+})和相同浓度的生物小分子(例如尿酸, 抗坏血酸, 多巴胺), 这些物质的存在均对 1.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷氧化峰电流值无明显影响, 测定的电流值偏差低于 $\pm 5\%$, 表明以上 CILE 测定鸟苷的方法具有优良的选择性。

2.2.8 电极的稳定性和重现性

用 CILE 测定浓度为 5.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷溶液, 考察鸟苷氧化峰信号的变化情况。CILE 在常温密闭环境中放置 2 周后, 峰电流值略有降低, 最大 RSD 为 4.7%, 表明本实验中的 CILE 具有良好的稳定性。用制作过程相同的四批电极测量鸟苷溶液, 峰电流的 RSD 控制在 $\pm 3.2\%$ 范围内, 说明电极的重现性良好。

2.2.9 分析应用

向 0.2 mol/L pH 4.5 的 B-R 缓冲溶液稀释的尿样中标准加入已知浓度的鸟苷溶液, 对此实际样品进行测定, 测量值列于表 2-1 中。计算出加入鸟苷的回收率在 96.5%~104.6% 之内, 可认为两个尿样中均不存在鸟苷。

表 2-1 尿样中鸟苷的回收率测量(n=3)

Table 2-1 Analytical recovery of guanosine added to urine samples (n=3)

| | Added ($\mu\text{mol/L}$) | Found ($\mu\text{mol/L}$) | Recovery (%) |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| Sample 1 | 10.0 | 10.27 | 102.7 |
| | 30.0 | 29.22 | 97.4 |
| | 50.0 | 51.90 | 103.8 |
| | 80.0 | 83.44 | 104.3 |
| Samples 2 | 10.0 | 9.82 | 98.2 |
| | 30.0 | 30.87 | 102.9 |
| | 50.0 | 48.25 | 96.5 |
| | 80.0 | 83.68 | 104.6 |

2.3 结论

本章采用疏水性六氟磷酸正丁基吡啶制备了 CILE, 与 CPE 相比由于六氟磷酸正丁基吡啶的存在, CILE 对测定物质表现出较强的吸附和氧化催化效能, 优良的信号增强功能。在 CILE 上详细研究了鸟苷的电化学氧化行为, 探讨了鸟苷在该电极上的氧化机理, 求解了相关的电化学参数, 建立了鸟苷电化学测定的新方法, 并成功应用于尿样中鸟苷的检测。

参考文献

- [1] Magana A. A., Wrobel K., Caudillo Y. A., et. al, High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests [J], *Anal. Biochem.*, 2008, 374: 378~385
- [2] Yang F. Q., Guan J., Li S. P., Fast simultaneous determination of 14 nucleosides and nucleobases in cultured cordyceps using ultra-performance liquid chromatography [J], *Talanta*, 2007, 73: 269~273
- [3] Li S. P., Li P., Dong T. T. X., et. al, Determination of nucleosides in natural cordyceps sinensis and cultured cordyceps mycelia by capillary electrophoresis [J], *Electrophoresis*, 2001, 22: 144~150
- [4] Goyal R. N., Gupta V. K., Oyamab M., et. al, Voltammetric determination of adenosine and guanosine using fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode [J], *Talanta*, 2007, 71: 1110~1117
- [5] Goyal R. N., Oyamab M., Tyagi A., Simultaneous determination of guanosine and guanosine-5'-triphosphate in biological sample using gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode [J], *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581: 32~36
- [6] Fortin E., Tune J. C., Mailley P., et. al, Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes [J], *Bioelectrochemistry*, 2004, 63: 303~306
- [7] Maleki N., Safavi A., Tajabadi F., High-performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder [J], *Anal. Chem.*, 2006, 78: 3820~3826
- [8] Laviron E., The use of linear potential sweep voltammetry and of a.c. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1979, 100: 263~270
- [9] Oliveira-Brett A. M., Diculescu V., Piedade J. A. P., Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode [J], *Bioelectrochemistry* 2002, 55: 61~62
- [10] Yao T., Wasa T., Musha S., Linear-sweep voltammetry and the simultaneous determination of purine bases and their nucleosides in the glassy carbon electrode [J], *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1977, 50: 2917~2920

第三章 腺苷在 HPPF₆ 离子液体碳糊电极上的 电化学行为研究

摘要:用疏水性离子液体六氟磷酸正己基吡啶(HPPF₆)制作的离子液体碳糊电极为工作电极,采用循环伏安法为主要手段,研究了腺苷在该电极上的电化学行为。与传统的碳糊电极相比,腺苷的氧化峰电位负移,氧化峰电流明显增加,这是由于离子液体的存在对腺苷的电化学反应表现出良好的催化作用,使腺苷的电化学信号有了显著的提高,计算了腺苷在该电极表面氧化的电子传递系数 α 为0.68,电极反应速率常数 k_s 为 $5.92 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。利用微分脉冲伏安法对腺苷进行了浓度测定,在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内腺苷浓度与氧化峰电流呈良好的线性关系,检出限为 $9.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ (3σ)。

关键词:六氟磷酸正己基吡啶,腺苷,伏安法,碳糊电极

腺苷在人体和生物过程中有许多重要功能^[1]。它能调节心脏和大脑的生理功能,调节氧气在细胞内的供应压力,对调节肾功能也有作用^[2,3]。腺苷在尿液和血浆中的含量也可以用来标示一些疾病,如癌或肝脏疾病^[4]。因此,测定不同的体液样品中腺苷的浓度具有实际意义。已报道过的测定腺苷的分析方法有很多种,如光谱法^[5,6],这种方法灵敏度较高,但需要复杂的预处理过程;还有毛细管电泳分离与电化学测定相结合的方法。腺苷在常规工作电极上的电化学表现出较高的氧化电位和有限的灵敏度,因此各种化学修饰电极常用于克服这些缺点并有效提高灵敏度。例如,Chen^[7]等人用铜电极作为毛细管电泳电化学检测的工作电极,对嘌呤碱基、脱氧核糖核苷和脱氧核糖核苷酸进行同时测定。Goyal^[8-9]等人用富勒烯 C₆₀ 修饰玻碳电极和纳米金修饰氧化铟锡电极分别研究了腺苷和鸟苷的电化学行为。Yao^[10]等人采用线性扫描伏安法在玻碳电极上同时测定嘌呤碱基及其核苷。Fortin^[11]等人采用了硼掺杂金刚石电极研究了腺苷和鸟苷以及合成寡核苷酸序列的直接电化学氧化过程。

本章用离子液体 HPPF₆ 作粘合剂,成功地制备了一种疏水性吡啶类离子液体碳糊电极,采用循环伏安法为主要手段,研究了腺苷在该电极上的电化学氧化行为,计算了腺苷氧化的相关电化学参数,建立了离子液体碳糊电极微分脉冲伏安法测定腺苷的电化学分析新方法。

3.1 实验部分

3.1.1 仪器与试剂

CHI 750B 型电化学工作站(上海辰华仪器公司), 三电极系统: 自制离子液体碳糊电极(CILE)为工作电极(截面积为 0.16 cm^2); 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极; 铂丝为对电极; pHs-25C 型酸度计(上海理达仪器厂); JSM-6700F 型扫描电子显微镜(日本电子公司)。

六氟磷酸正己基吡啶(N-hexylpyridinium hexafluorophosphate, HPPF₆, 合成级, 分子量 309.32, 熔点 58°C , 杭州科默化学有限公司); 铁氰化钾(天津市瑞金特化学品有限公司); 石墨粉(上海胶体化学厂, 颗粒度 $\leq 30 \mu\text{m}$); 腺苷(99%, Sigma), 0.2mol/L B-R 系列缓冲溶液, 实验中所用其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

3.1.2 实验方法

将石墨粉和离子液体 HPPF₆ 以质量比为 2:1 的比例混合, 在 60°C 加热约 40 min 后研磨均匀, 将混合物填入玻璃管中压实, 内插铜线作为导线, 即可得到 CILE, 使用前将电极表面在称量纸上打磨成镜面。传统碳糊电极(CPE)制备方法同第二章 2.1.2。

将三电极浸入 10 mL 含一定浓度腺苷的 B-R 缓冲溶液中进行电化学实验。循环伏安扫描设定在 $0.95 \text{ V} \sim 1.65 \text{ V}$ 电位范围内, 微分脉冲伏安扫描在 $0.8 \text{ V} \sim 1.6 \text{ V}$ 范围内进行。

3.2 结果与讨论

3.2.1 CILE 的表征

利用扫描电子显微镜(SEM)可以了解电极表面形貌的相关信息。用 SEM 观察了不同碳糊电极的表面形貌, 结果如图 3-1 所示。CPE 表面为不连续的碳层(图片 a), 而 CILE 表面为连续光滑的界面(图片 b)。这是由于 HPPF₆ 是粘度较大的有机液体, 且具有较好的溶解性, 可以有效地将碳粉粘合在一起形成均一的界面。

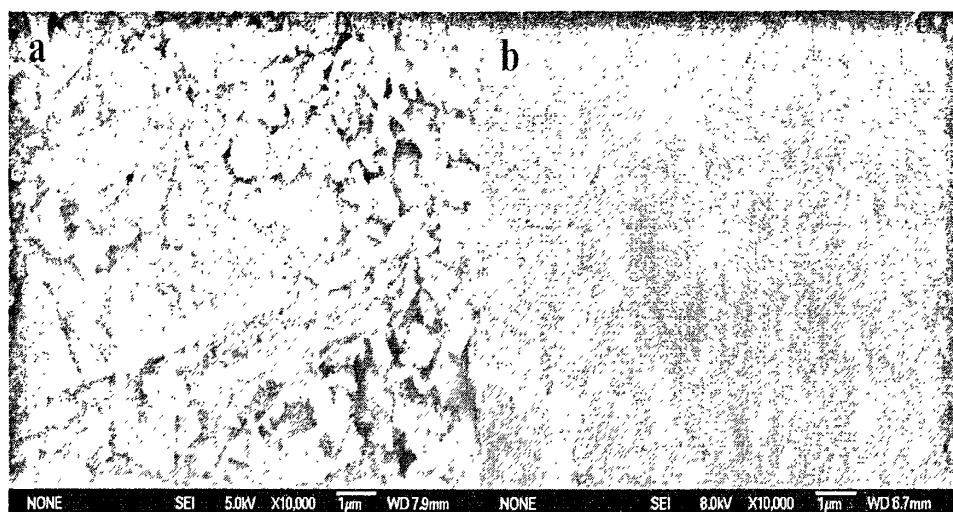


图 3-1 碳糊电极(a)和离子液体碳糊电极(b)的扫描电镜图

Fig. 3-1 SEM images of (a) CPE and (b) CILE.

以铁氰化钾为电化学探针对电极进行了表征, 结果如图 3-2 所示。

图 3-2A 为电化学阻抗法考察不同电极在 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.5 mol/L KCl 混合溶液中产生的电化学交流阻抗谱图。从图中可以看出, 两种电极的电化学阻抗谱有明显的不同。曲线 a 为 CPE 的交流阻抗谱图, 其高频部分出现明显的半圆(该半圆的直径代表电荷转移电阻), 说明电极表面存在阻碍电子转移的物质, 这是由于不导电的液体石蜡的存在降低了碳糊的导电率, 因此存在着较大的电子转移电阻。曲线 b 是 CILE 的交流阻抗谱图, 该阻抗谱在高频部分出现的半圆半径明显比曲线 a 的小且近似为一条直线, 表明此时电极上电荷转移电阻较小, 铁氰化钾较容易到达电极表面发生氧化还原反应, 这与离子液体高导电率的本质相一致。

图 3-2B 中曲线 a 和曲线 b 分别为 CILE 和 CPE 在 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 和 0.5 mol/L KCl 混合溶液中的循环伏安曲线。从图中可以看出在 CILE 上氧化还原峰电流明显增加, 电化学数据分别为: $I_{pc}=4.85 \times 10^{-5} \text{ A}$, $I_{pa}=4.32 \times 10^{-5} \text{ A}$, $E_{pc}=0.189 \text{ V}$, $E_{pa}=0.242 \text{ V}$, $\Delta E=53 \text{ mV}$, 与理论值 59 mV 非常接近; 而在 CPE 上, $I_{pc}=1.52 \times 10^{-5} \text{ A}$, $I_{pa}=1.29 \times 10^{-5} \text{ A}$, $E_{pc}=0.120 \text{ V}$, $E_{pa}=0.320 \text{ V}$, $\Delta E=200 \text{ mV}$ 。说明 HPPF₆ 的存在能够有效地提高电极的导电效率, 加快电子转移速率, 促进了电化学氧化还原过程, 峰电流的响应值增加 3.2 倍。

连续循环伏安扫描 20 圈后, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 在电极上产生的氧化还原峰基本不变, 表明电极具有较好的重现性和稳定性。

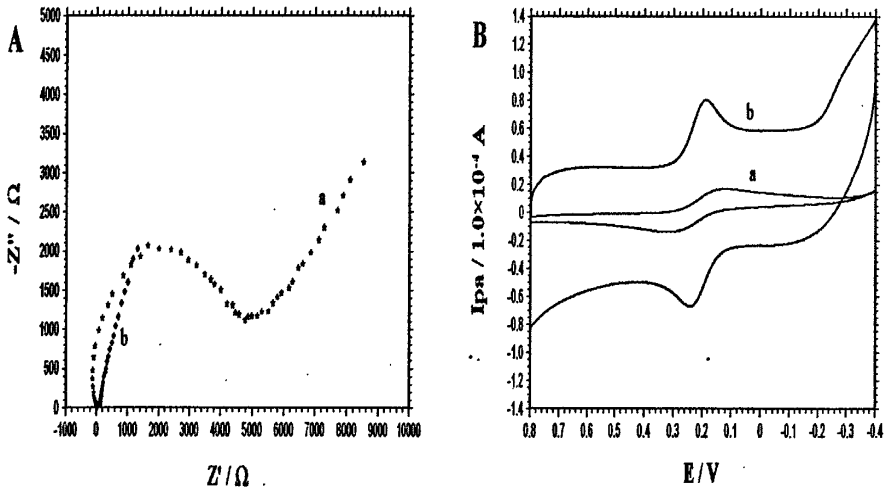


图 3-2 (A) CPE (a)和 CILE (b)在 5.0×10^{-4} mol/L $K_3[Fe(CN)_6]^{3-/4-} + 0.5$ mol/L KCl 溶液中的阻抗图; (B) 5.0×10^{-4} mol/L $K_3[Fe(CN)_6] + 0.5$ mol/L KCl 在 CPE (a)和 CILE (b) 上的循环伏安图, 扫速: 100 mV/s

Fig. 3-2 (A) Electrochemical impedance spectra for CPE (a) and CILE (b) in a mixture solution of 5.0×10^{-4} mol/L $K_3[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ and 0.5 mol/L KCl with the frequencies swept from 10^4 to 0.1 Hz; (B) Cyclic voltammograms of CPE (a) and CILE (b) in solution of 5.0×10^{-4} mol/L $K_3[Fe(CN)_6] + 0.5$ mol/L KCl at a scan rate of 100 mV/s.

3.2.2 腺苷在 CILE 上的电化学行为

图 3-3 显示了 1.0×10^{-4} mol/L 的腺苷分别在 CPE 和 CILE 上的循环伏安响应。腺苷在两种电极上均出现一个氧化峰, 表明腺苷的电化学反应是一个不可逆反应。在 CPE 上腺苷氧化峰电位为 1.416 V, 氧化峰电流为 7.49×10^{-6} A (图 3-3A); 而在 CILE 上腺苷氧化峰电位为 1.403 V, 氧化峰电流为 1.906×10^{-4} A (图 3-3B)。结果表明, 在 CILE 上腺苷氧化峰电流增大 25 倍, 峰电位发生负移, 表明 CILE 表面的 HPPF₆ 对腺苷的氧化反应具有良好的电催化作用, 极大地提高了腺苷检测的灵敏度。

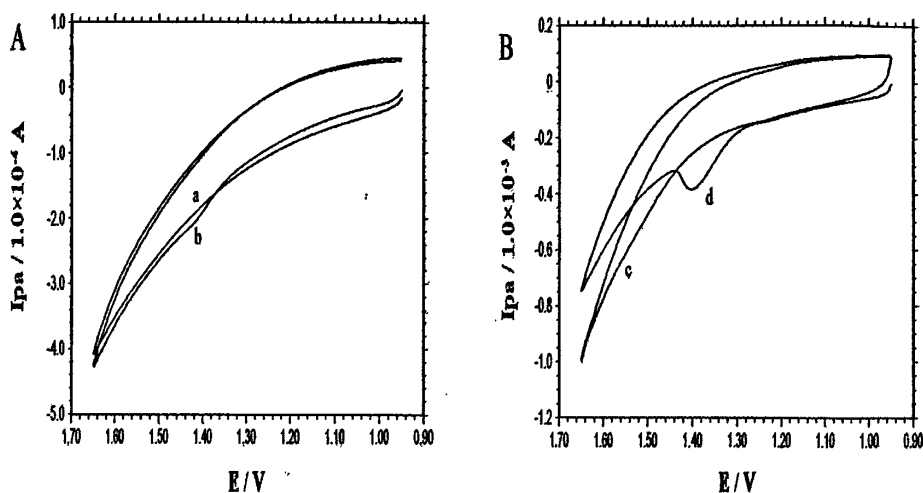


图 3-3 在 CPE (A) 和 CILE (B) 上 0.2 mol/L pH 4.0 的 B-R 缓冲溶液
和 1.0×10^{-4} mol/L 腺苷溶液的循环伏安图, 扫速: 100 mV/s

Fig.3-3 (A) Cyclic voltammograms on CPE for 0.2 mol/L pH 4.0 B-R (a) and 1.0×10^{-4} mol/L adenosine in buffer solution (b); (B) Cyclic voltammograms on CILE for 0.2 mol/L pH 4.0 B-R (c) and 1.0×10^{-4} mol/L adenosine in buffer solution (d). Scan rate: 100 mV/s.

3.2.3 缓冲溶液 pH 值的影响

本实验中使用 0.2 mol/L 的 B-R 缓冲溶液作支持电解质, 考察了腺苷在 2.0~7.0 的 pH 值范围内的电化学行为(pH 大于 7.0 时氧化峰电流急剧变小, 峰形变差, 故不再讨论), 结果如图 3-4 所示。

从图 3-4 中可以看出, 在 2.0~7.0 的范围内, pH 值对腺苷氧化峰电流和峰电位具有较大的影响, 当 pH 为 4.0 时得到腺苷的最大氧化峰电流, 因此实验中选用 0.2 mol/L pH 4.0 的 B-R 缓冲溶液作支持电解质。

考察了 pH 值对氧化峰电位的影响, 随着缓冲溶液 pH 值的增加, 腺苷的氧化峰电位发生负移。说明氢质子(H^+)参与鸟苷的电化学氧化反应。氧化峰电位与溶液 pH 值的线性回归方程为 $E_{pa}(V) = -0.040 \text{ pH} + 1.558$ ($n=11, \gamma=0.998$)。

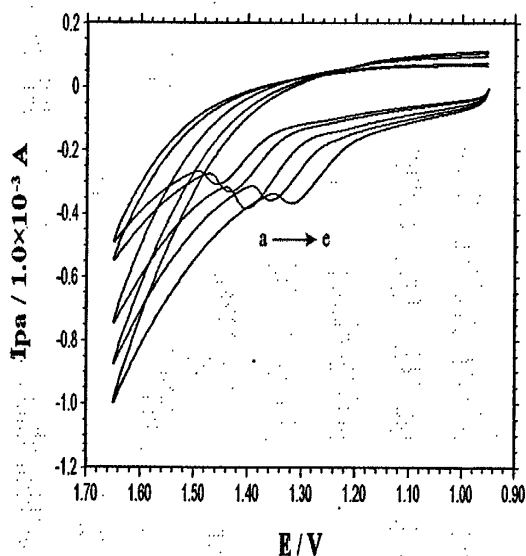


图 3-4 不同 pH 值下腺苷的循环伏安图

Fig.3-4 Cyclic voltammograms of different pH from 2.0~6.0

(a~e: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0)

3.2.4 扫描速率的影响

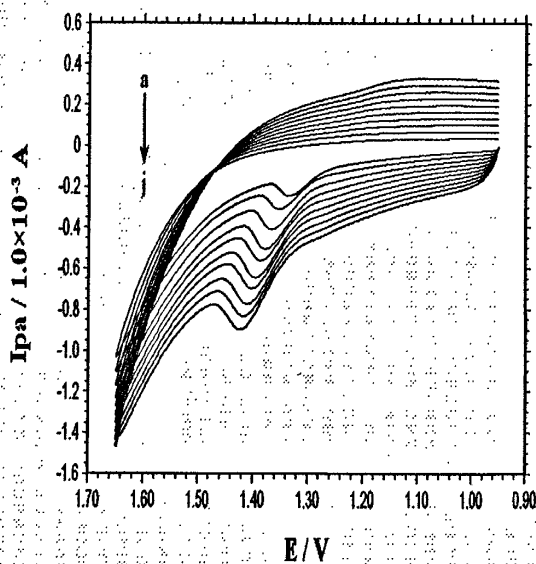


图 3-5 不同扫速下 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的腺苷溶液在 CILE 上的循环伏安图

(a~j: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mV/s)

Fig.3-5 Cyclic voltammograms of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ adenosine in pH 4.0 B-R buffer with different scan rates (from a to j: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mV/s).

在 10~500 mV/s 的范围内,考察了循环伏安扫速对腺苷电化学氧化信号的影响,结果如图 3-5 所示。随着扫速的增加,氧化峰电流逐渐增大,峰电位正向移动。在 10~500 mV/s 的扫速范围内,氧化峰电流与 $v^{1/2}$ 成线性关系,线性方程为 $I_{pa}(\text{mA})=4.013v^{1/2}(\text{V/s})+0.516$ ($n=10, \gamma=0.989$)。说明腺苷在 CILE 表面的电极反应为扩散控制反应。考察了 E_{pa} 和 $\ln v$ 的关系,得出线性回归方程为 $E_{pa}(\text{V})=0.040 \ln v(\text{V/s})+1.446$ ($n=10, \gamma=0.989$), 根据 Laviron 公式:

$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1-s)nF} \ln v \quad (1)$$

$$\log k_s = s \log(1-s) + (1-s) \log s - \log \frac{RT}{nFk} - \frac{(1-\alpha)\alpha nF \Delta E_p}{2.3RT} \quad (2)$$

式中 α 为电子传递系数, v 为扫描速率, n 为电活性物质发生电极反应时的电子转移数, k_s 为电极反应速率常数, E_{pa} 为氧化峰电位, F 为法拉第常数, 由式(1)可以计算出 α 为 0.68; 代入式(2)中可以计算出电极反应速率常数 k_s 为 $5.92 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。

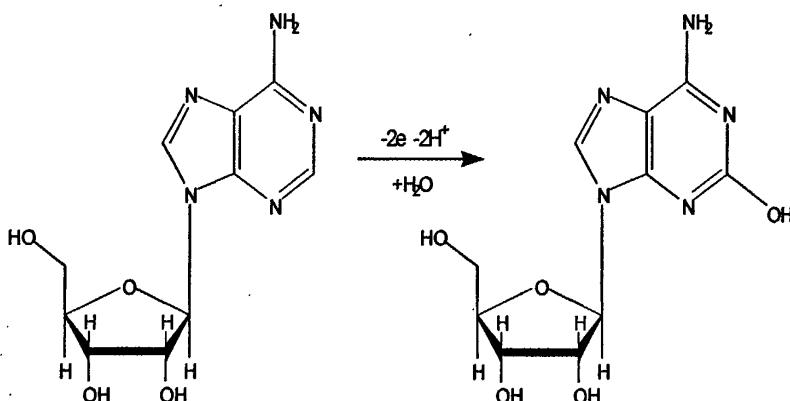


图 3-6 腺苷的电化学氧化机理

Fig.3-6 Electrochemical oxidation process of adenosine

3.2.5 腺苷测定工作曲线

考察了 CILE 对不同浓度腺苷的测定,微分脉冲伏安曲线如图 3-7 所示。分析实验数据可得,氧化峰电流与腺苷浓度分段成线性关系。在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内线性方程为: $I_{pa}(\mu\text{A})=251.06C+1.23$ ($n=18, \gamma=0.992$); 在 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \sim 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内线性方程为: $I_{pa}(\mu\text{A})=88.55C+8.85$ ($n=9, \gamma=0.975$)。通过以上工作曲线,建立腺苷在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 浓度范围内的电化学检测方法,计算出检测限(3σ)为 $9.1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。

本实验中 CILE 对腺苷测定的检测限与其他修饰电极测定腺苷的结果对比列在表 3-1 中, CILE 测定腺苷的检测限明显低于在单壁碳纳米管修饰的玻碳电极^[11]和碳纤维超微电极^[15]上的结果,与这些化学修饰电极相比, CILE 成本较低制备

方法简单, 重现性良好并且灵敏度较高, 有广泛的实际应用前景。

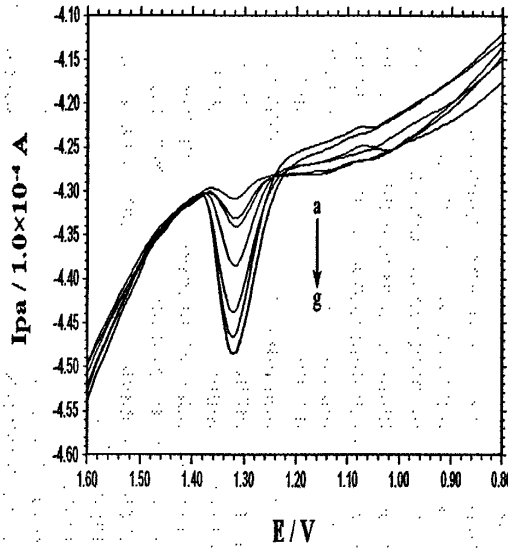


图 3-7 不同浓度的腺苷溶液的微分脉冲伏安图

(a~g: 5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 7.0×10^{-5} , 9.0×10^{-5} , 1.1×10^{-4} , 1.4×10^{-4} mol/L)

Fig. 3-7 Differential pulse voltammograms of different adenosine concentration (from a to g: 5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 7.0×10^{-5} , 9.0×10^{-5} , 1.1×10^{-4} , 1.4×10^{-4} mol/L) in pH 4.0 B-R buffer.

表 3-1 不同修饰电极测定腺苷的结果对比

Table 3-1 Comparison of different modified electrodes for adenosine determination

| Electrodes | Voltammetry | Linear range (mol/L) | Detection limit (mol/L) | References |
|----------------------|-------------|---|-------------------------|------------|
| C ₆₀ /GCE | DPV | $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-3}$ | 3.02×10^{-7} | [8] |
| SWCNT/PGE | OSWV | $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-3}$ | 5.1×10^{-8} | [10] |
| SWCNT/GCE | DPV | $1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$ | 3.47×10^{-5} | [11] |
| CFE | FSV | $1.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-5}$ | 1.0×10^{-6} | [15] |
| NG/ITO | OSWV | $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ | 7.0×10^{-8} | [16] |
| CILE | DPV | $1.0 \times 10^{-6} - 1.4 \times 10^{-4}$ | 9.1×10^{-7} | This paper |

GCE: glassy carbon electrode; SWCNT: single walled carbon nanotube;

PGE: pyrolytic graphite electrode; CFE: carbon fiber ultramicroelectrodes;

NG/ITO: nanogold modified indium tin oxide electrode; DPV: differential pulse voltammetry;

OSWV: osteryoung square wave voltammetry; FSV: fast scan voltammetry

3.2.6 干扰研究

考察了常见金属离子和有机小分子等共存物质对 2.0×10^{-5} mol/L 腺苷测定的影响, 结果见表 3-2 所示。可以看出浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的共存物质几乎不影响腺苷的测定, 说明本实验中的 CILE 对腺苷测定具有良好的选择性。

表 3-2 常见干扰物质对 2.0×10^{-5} mol/L 腺苷的影响

Table 3-2 Influence of interferences on the determination of 2.0×10^{-5} mol/L adenosine

| Coexisting substances | Concentration (mol/L) | Change of I_p (%) |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| MgCl ₂ | 1.0×10^{-4} | 0.24 |
| CuCl ₂ | 1.0×10^{-4} | 3.02 |
| ZnSO ₄ | 1.0×10^{-4} | 1.88 |
| CaCl ₂ | 1.0×10^{-4} | 2.07 |
| Dopamine | 1.0×10^{-4} | 0.32 |
| Folic acid | 1.0×10^{-4} | 4.63 |
| Uric acid | 1.0×10^{-4} | 3.26 |
| Ascorbic acid | 1.0×10^{-4} | 2.54 |
| L-glutamic acid | 1.0×10^{-4} | 3.88 |
| L-cysteine | 1.0×10^{-4} | 4.32 |
| L-valine | 1.0×10^{-4} | 3.94 |
| Glycin | 1.0×10^{-4} | 4.42 |
| Tyrosine | 1.0×10^{-4} | 2.74 |
| Glucose | 1.0×10^{-4} | 3.07 |

3.2.7 分析应用

用 0.2 mol/L pH 4.0 的 B-R 缓冲溶液稀释 50 倍的正常人尿样, 采用标准加入法对尿样中腺苷的浓度和回收率进行测定, 结果如表 3-3 所示, 腺苷的回收率在 97.35% ~ 104.30% 范围内, 说明尿样中的共存物质对腺苷的测定没有影响, 本章实验建立的微分脉冲伏安法测定腺苷的分析方法具有实际应用的可行性。

表 3-3 尿样中腺苷回收率的测定(n=3)

Table 3-3 Analytical recovery of adenosine added to urine samples (n=3)

| | Added ($\mu\text{mol/L}$) | Found ($\mu\text{mol/L}$) | Recovery (%) |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| Sample 1 | 10.0 | 10.43 | 104.30 |
| | 30.0 | 29.21 | 97.35 |
| | 60.0 | 62.27 | 103.78 |
| | 100.0 | 104.23 | 104.23 |
| Samples 2 | 10.0 | 9.82 | 98.16 |
| | 30.0 | 30.89 | 102.96 |
| | 60.0 | 59.09 | 98.49 |
| | 100.0 | 101.95 | 101.95 |

3.3 结论

本章采用疏水性六氟磷酸正己基吡啶制备了 CILE, 与 CPE 相比腺苷在 CILE 上的电化学响应和测定灵敏度显著提高。详细研究了腺苷在 CILE 上的电化学反应, 求解了相关的电化学参数。建立了微分脉冲伏安法测定腺苷的新方法, 工作曲线的范围为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 并成功应用于实际样品的检测, 结果令人满意。

参考文献

- [1] Cummings J., Leonard R. C. F., Miller W. R., Sensitive determination of 8-chloroadenosine 3',5'-monophosphate and 8-chloroadenosine in plasma by high-performance liquid chromatography [J], *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 1994, 658: 183~188
- [2] Zhang J. H., Belardinelli L., Jacobson K. A., et. al, Persistent activation by and receptor reserve for an irreversible A₁-Adenosine receptor agonist in DDT1 MF-2 cells and in guinea pig heart [J], *Mol. Pharm.*, 1997, 52: 491~498
- [3] Kloor D., Yao K., Delabar U., et. al, Simple and sensitive binding assay for measurement of adenosine using reduced S-adenosylhomocysteine hydrolase [J], *Clin. Chem.*, 2000, 46: 537~542
- [4] Yang J., Xu G. W., Kong H. W., et. al, Artificial neural network classification based on high-performance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer [J], *J. Chromatogr. B*, 2002, 780: 27~33
- [5] Huszar E., Barat E., Kollai M., Isocratic high-performance liquid chromatographic determination of plasma adenosine [J], *Chromatographia*, 1996, 42: 318~322
- [6] Yamamoto T., Moriwaki Y., Takahashi S., et. al, Determination of adenosine and deoxyadenosine in urine by high-performance liquid chromatography with column switching [J], *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 1998, 719: 55~61
- [7] Lin H., Xu D. K., Chen H. Y., Simultaneous determination of purine bases, ribonucleosides and ribonucleotides by capillary electrophoresis-electrochemistry with a copper electrode [J], *J. Chromatogr. A*, 1997, 760: 227~233
- [8] Goyal R. N., Gupta V. K., Oyamab M., et. al, Voltammetric determination of adenosine and guanosine using fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode [J], *Talanta*, 2007, 71: 1110~1117
- [9] Goyal R. N., Oyamab M., Tyagi A., Simultaneous determination of guanosine and guanosine-5'-triphosphate in biological sample using gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode [J], *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581: 32~36
- [10] Goyal R. N., Gupta V. K., Chatterjee S., Simultaneous determination of adenosine and inosine using single-wall carbon nanotubes modified pyrolytic graphite electrode [J], *Talanta*, 2008, 76: 662~668
- [11] Goyal R. N., Singh S. P., Simultaneous voltammetric determination of dopamine and adenosine using a single walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode [J], *Carbon*,

2008, 46: 1556~1562

- [12] Goyal R. N., Sangal A., Electrochemical investigations of adenosine at solid electrodes [J], *J. Electroanal. Chem.*, 2002, 521: 72~80
- [13] Yao T., Wasa T., Musha S., Linear-sweep voltammetry and the simultaneous determination of purine bases and their nucleosides in the glassy carbon electrode [J], *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1977, 50: 2917~2920
- [14] Fortin E., Tune J. C., Mailley P., et. al, Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes [J], *Bioelectrochemistry*, 2004, 63: 303~306
- [15] Elnour K. A., Toth A.B., Sensitivity of electrochemically nanostructured carbon fiber ultramicroelectrodes in the determination of adenosine [J], *Electroanalysis*, 2000, 12: 805~810
- [16] Goyal R. N., Oyama M., Singha S. P., Simultaneous determination of adenosine and adenosine-5'-triphosphate at nanogold modified indium tin oxide electrode by ossteryoung square-wave voltammetry [J], *Electroanalysis*, 2007, 19: 575~581

第四章 鸟苷和腺苷在[EMIM][EtOSO₃]离子液体修饰 碳糊电极上的同时检测

摘要: 将石墨粉、液体石蜡和离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯 ([EMIM][EtOSO₃])三者混合, 制备了相应的离子液体修饰碳糊电极。在该电极上对鸟苷和腺苷的电化学行为进行了详细的研究, 并利用微分脉冲伏安法建立了同时测定鸟苷和腺苷的新方法。与传统 CPE 相比, 鸟苷和腺苷的电流信号增强, 氧化电位负移。在 pH 3.5 的 B-R 缓冲溶液中鸟苷和腺苷的工作曲线范围分别为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 和 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 2.7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 常见的神经递质类共存物对鸟苷和腺苷的测定没有太大的影响。本方法成功应用于实际样品的检测。

关键词: 鸟苷, 腺苷, 微分脉冲伏安法, 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯

嘌呤核苷与人体的新陈代谢密切相关, 体液中的鸟苷和腺苷的浓度变化与一些癌症和肝脏疾病有关^[1], 所以核苷的灵敏检测在生化分析中具有重要的研究意义, 已有很多单独或同时测定鸟苷和腺苷的报道。Lin^[2]等人在铜电极上测定经毛细管电泳分离后的核苷, 检测灵敏度较高。Yan^[3]等人制作了 3,4,5-三甲氧基-苯甲酰甲醛作为信号识别探针的化学发光传感器用于腺苷分析, 当腺苷与碱基链上的鸟嘌呤键合时探针信号会发生变化。Chen^[4]等人用银包覆金胶体的表面增强拉曼散射传感平台检测腺苷。基于电化学氧化的测定方法已经用于嘌呤类化合物的检测。Yao^[5]等人采用线性扫描伏安法在玻碳电极上同时测定嘌呤及其核苷。Oliveira-Brett^[6,7]等人使用微分脉冲伏安法和电化学阻抗, 在玻碳微电极和玻碳电极上研究了鸟嘌呤和腺嘌呤电化学氧化的机制。由于碱基的氧化电位较高、测定灵敏性较差, 因此出现了不少化学修饰电极检测嘌呤及其核苷的研究。Fortin^[8]等人采用硼掺杂金刚石电极研究了鸟苷和腺苷的直接电化学氧化。Goyal 等人用富勒烯 C₆₀ 修饰的玻碳电极^[9]和纳米金修饰的氧化铟锡电极^[10]分别检测腺苷和鸟苷。Sun^[11,12]等人在 BPPF₆ 修饰的离子液体碳糊电极上研究了鸟苷的电化学行为, 并用该电极同时检测腺嘌呤和鸟嘌呤。

本章使用[EMIM][EtOSO₃]修饰碳糊电极, 研究鸟苷和腺苷在该电极上的电化学行为, 建立了微分脉冲伏安同时测定鸟苷和腺苷的电化学分析方法, 并进一步应用于模拟样品的检测, 结果令人满意。

4.1 实验部分

4.1.1 仪器与试剂

CHI 1210A 电化学工作站(上海辰华仪器公司), 三电极系统: 自制 IL-CPE (或 CPE)为工作电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, 铂丝为辅助电极。

腺苷, 鸟苷(美国 Sigma 公司); 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯([EMIM][EtOSO₃], 杭州科默化学有限公司); 石墨粉(上海胶体化学厂, 颗粒度 $\leq 30 \mu\text{m}$); 0.2mol/L B-R 系列缓冲溶液, 实验中所用其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

4.1.2 实验方法

将 1.6 g 石墨粉和 0.5 mL 石蜡混合研磨均匀制成 CPE。用 0.1 mL 的 [EMIM][EtOSO₃]取代相同体积的液体石蜡, 加入 1.6 g 石墨粉和 0.4 mL 石蜡的混合物中, 研磨均匀, 填入玻璃管中压实, 用铜线做导线, 制成 IL-CPE, 使用前将电极表面在称重纸上打磨光滑。

将三电极浸入 10 mL 含有适当样品的电化学池溶液中, 0.2 mol/L 的 B-R 缓冲溶液为支持电解质。电化学扫描在 0.90 V ~ 1.60 V 的电位范围内进行, 微分脉冲伏安扫描参数如下: 脉冲幅度 100 mV, 脉冲宽度 50 ms, 电位增量 5 mV, 周期 0.2 s。

4.2 结果与讨论

4.2.1 鸟苷和腺苷在 IL-CPE 上的电化学行为

图 4-1 为在 0.2 mol/L pH 3.5 的 B-R 支持电解质中, CPE 和 IL-CPE 对 1.0×10^{-4} mol/L 的鸟苷和腺苷混合溶液扫描的循环伏安图。在 CPE 上(曲线 a)鸟苷和腺苷的氧化峰分别出现在 1.147 V 和 1.414 V, 峰电流分别为 8.19×10^{-6} A 和 1.27×10^{-5} A, 对应鸟苷氧化为 8-氧鸟苷和腺苷氧化为 2,8-羟基腺苷的电化学反应, 均为双电子/双质子不可逆氧化进程。在 IL-CPE 上(曲线 b), 氧化峰电流为 2.28×10^{-5} A 和 2.75×10^{-5} A, 分别是 CPE 上氧化峰电流的 2.8 倍和 2.2 倍, 氧化峰负移到 1.091 V 和 1.387 V。由于离子液体的存在, IL-CPE 具有导电率高、电子传递速率快、电极抗污染性能良好等优点。上述结果表明 IL-CPE 对鸟苷和腺苷的电化学氧化具有良好的催化能力, 降低了氧化反应过电位、有效地提高了鸟苷和腺苷的氧化电流信号。

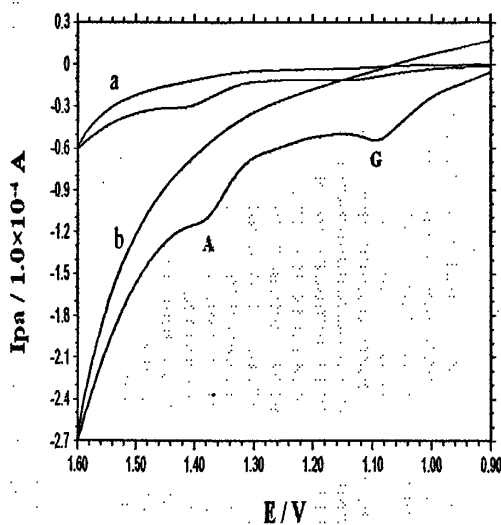


图 4-1 在 CPE (a) 和 IL-CPE (b) 上扫描 1.0×10^{-4} mol/L 的腺苷和 1.0×10^{-4} mol/L 的鸟苷混合溶液的循环伏安图, 扫速 100 mV/s

Fig. 4-1 Cyclic voltammograms on CPE (a) and IL-CPE (b) for 1.0×10^{-4} mol/L adenosine + 1.0×10^{-4} mol/L guanosine in 0.2 mol/L pH 3.5 B-R buffer solution, scan rate: 100 mV/s.

为了提高电化学响应的灵敏度, 用微分脉冲伏安法记录了 1.0×10^{-4} mol/L 鸟苷和腺苷溶液在 IL-CPE 上的电化学响应。图 4-2 是鸟苷和腺苷测定的 DPV 图, 氧化峰电位分别为 1.000 V 和 1.300 V, 氧化峰电流分别为 14.41 μ A 和 21.67 μ A, 峰电位差为 300 mV, 因此利用 IL-CPE 很容易实现鸟苷和腺苷的同时检测。

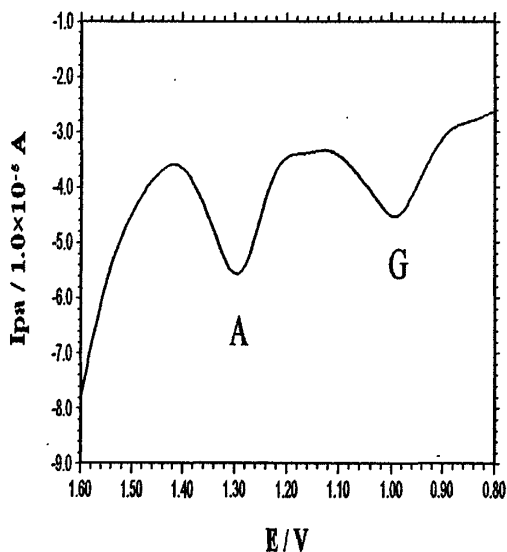


图 4-2 1.0×10^{-4} mol/L 腺苷和 1.0×10^{-4} mol/L 鸟苷溶液的微分脉冲伏安图

Fig. 4-2 Differential pulse voltammograms for 1.0×10^{-4} mol/L adenosine and guanosine

4.2.2 缓冲溶液 pH 值的影响

在 pH 2.0~6.0 的 0.2 mol/L B-R 缓冲溶液中记录 1.0×10^{-4} mol/L 的嘌呤核苷的循环伏安图, 研究缓冲溶液 pH 值对核苷电化学氧化的影响。图 4-3 显示了鸟苷和腺苷氧化峰电流和峰电位与缓冲溶液 pH 值之间的关系。鸟苷和腺苷的氧化峰电位都随 pH 值的增加而逐渐减小, 线性回归方程分别为 $E_{pa}(V) = -0.025pH + 1.110$ ($n=9, \gamma=0.998$) 和 $E_{pa}(V) = -0.029pH + 1.434$ ($n=9, \gamma=0.995$), 这表明氢质子参与了电极反应。在所研究的 pH 范围内, B-R 缓冲溶液 pH 值为 3.5 时, 鸟苷和腺苷的氧化峰电流都达到最大值, 因此伏安检测时选择缓冲溶液 pH 值为 3.5。

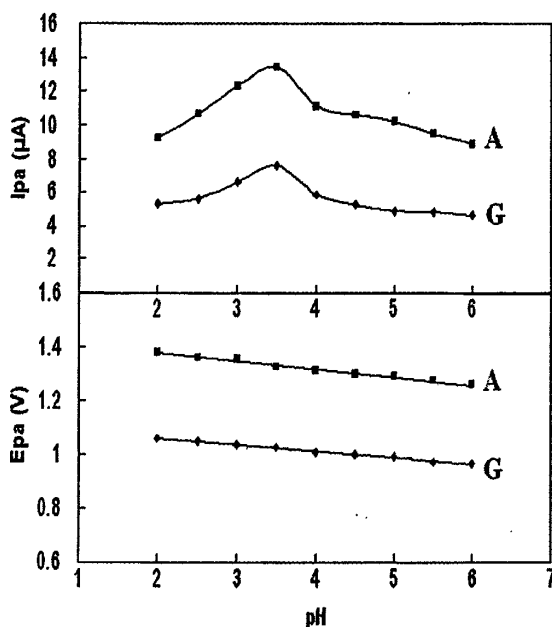


图 4-3 缓冲溶液 pH 值对腺苷和鸟苷氧化峰电流和峰电位的影响

Fig. 4-3 Influence of pH on the responses of 1.0×10^{-4} mol/L adenosine and guanosine

4.2.3 扫描速率的影响

为了研究嘌呤核苷在 IL-CPE 上的氧化反应机理, 考察扫描速度对 1.0×10^{-4} mol/L 的嘌呤核苷混合溶液中鸟苷和腺苷氧化峰的影响。

随着扫描速度的增加, 氧化峰电流逐渐增大, 峰电位逐渐正移, 表现出典型的不可逆电化学反应的特征。氧化峰电流与扫速呈良好的线性关系, 在扫速 0 ~ 500 mV/s 的范围内, 鸟苷和腺苷的线性回归方程分别为 $I_p (\mu A) = 50.8v (V/s) + 8.5$ ($n=10, \gamma=0.986$) 和 $I_p (\mu A) = 58.4v (V/s) + 15.3$ ($n=10, \gamma=0.973$), 结果表明电极反应过程均为吸附控制。

根据以下公式计算鸟苷和腺苷在 IL-CPE 上的表面吸附量:

$$I_p = \frac{nFQk}{4RT} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma_T \nu}{4RT}$$

式中 n 为电子转移数, F (C/mol) 为法拉第常数, A (cm^2) 为电极面积, Γ_T (mol/cm^2) 为表面吸附量, Q (C) 为电量, ν (V/s) 为循环伏安扫描速率。分别依据核苷氧化峰面积的积分和峰电流与扫速的关系, 计算出鸟苷和腺苷的 n 分别为 1.94 和 3.94, 与文献^[9,10]结果一致; Γ_T 分别为 $3.04 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{cm}^2$ 和 $2.53 \times 10^{-7} \text{ mol}/\text{cm}^2$ 。

氧化峰电位与 $\ln \nu$ 呈线性关系, 其回归方程式分别为 $E_{pa}(\text{V}) = 0.0158 \ln \nu + 1.130$ ($n=10, \gamma=0.996$) 和 $E_{pa}(\text{V}) = 0.0161 \ln \nu + 1.417$ ($n=10, \gamma=0.995$), 表明电极过程是一个 EC 反应进程, 在失去电子后伴随着化学反应发生。

4.2.4 工作曲线

进一步用微分脉冲伏安法检测鸟苷和腺苷, 在 IL-CPE 上单独与同时测定鸟苷和腺苷, 分析数据列于表 4-1 中。

表 4-1 在 IL-CPE 上鸟苷和腺苷的分析数据

Table 4-1 Analytical parameters determined on the IL-CPE

| Analytes | Concentration range | Linear regression equations | Sensitivity | Detection limit |
|------------------------|---------------------|---|--|------------------------------|
| | (μM) | (I_p in μA , C in μM) | ($\mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) | (μM)($S/N=3$) |
| Guanosine ^A | 1.0-10.0 | $I_p = 0.187C + 0.133$ ($n=9, R=0.993$) | 0.187 | 0.183 |
| | 10.0-110.0 | $I_p = 0.060C + 1.874$ ($n=14, R=0.993$) | 0.060 | |
| Adenosine ^B | 1.0-10.0 | $I_p = 0.623C + 0.205$ ($n=8, R=0.998$) | 0.623 | 0.137 |
| | 10.0-50.0 | $I_p = 0.223C + 4.338$ ($n=9, R=0.997$) | 0.223 | |
| Guanosine ^C | 50.0-200.0 | $I_p = 0.092C + 12.195$ ($n=15, R=0.996$) | 0.092 | 0.157 |
| | 1.0-40.0 | $I_p = 0.218C + 0.345$ ($n=13, R=0.997$) | 0.218 | |
| Adenosine ^C | 40.0-160.0 | $I_p = 0.086C + 5.809$ ($n=12, R=0.991$) | 0.086 | 0.161 |
| | 1.0-80.0 | $I_p = 0.239C + 0.654$ ($n=17, R=0.994$) | 0.239 | |
| | 80.0-270.0 | $I_p = 0.082C + 13.466$ ($n=18, R=0.991$) | 0.082 | |

^A The individual determination value of analytes in the Fig.3A.

^B The individual determination value of analytes in the Fig.3B.

^C The simultaneous determination value of analytes in the Fig.3C.

在 IL-CPE 上对不同浓度的鸟苷溶液进行 DPV 测定, 如图 4-4 所示。随着鸟苷浓度增大, 峰电流逐渐增大且峰形变宽, 当浓度较大时在 1.185 V 处出现一个小的氧化峰, 原因可能是在鸟苷氧化的过程中, 部分鸟苷失去一个电子后生成的

鸟苷二聚体也在电极上发生氧化所致^[6]。

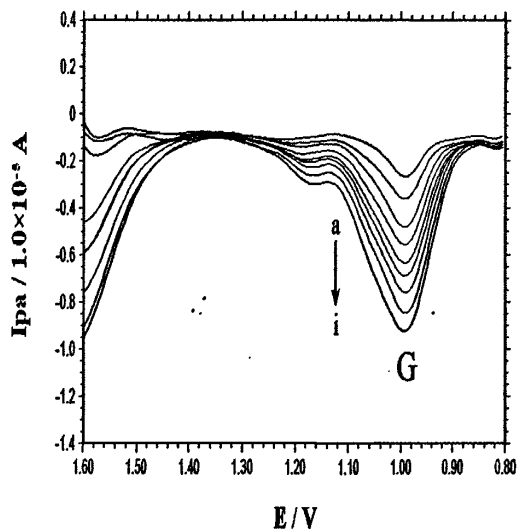


图 4-4 不同浓度鸟苷溶液的微分脉冲伏安图

Fig. 4-4 Differential pulse voltammograms of different guanosine concentration (from a to i: 2.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 5.0×10^{-5} , 6.0×10^{-5} , 7.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5} , 9.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} mol/L) in pH 3.5 B-R buffer

在 IL-CPE 上对不同浓度的腺苷溶液进行 DPV 测定，如图 4-5 所示。随着腺苷浓度的增大，峰电流逐渐增大，峰形变宽。

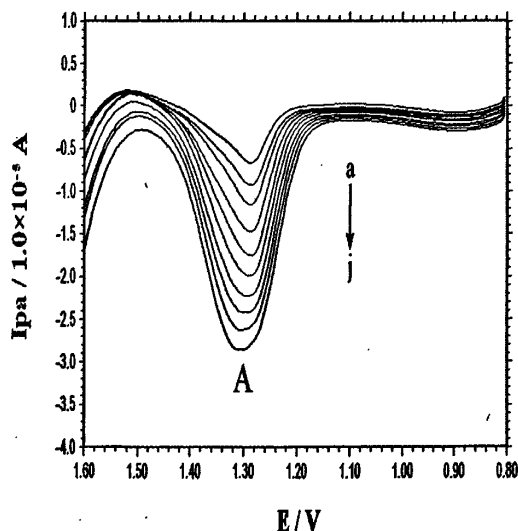


图 4-5 不同浓度腺苷溶液的微分脉冲伏安图

Fig. 4-5 Differential pulse voltammograms of different adenosine concentration (from a to j: 2.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 6.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} , 1.2×10^{-4} , 1.4×10^{-4} , 1.6×10^{-4} , 1.8×10^{-4} mol/L) in pH 3.5 B-R buffer

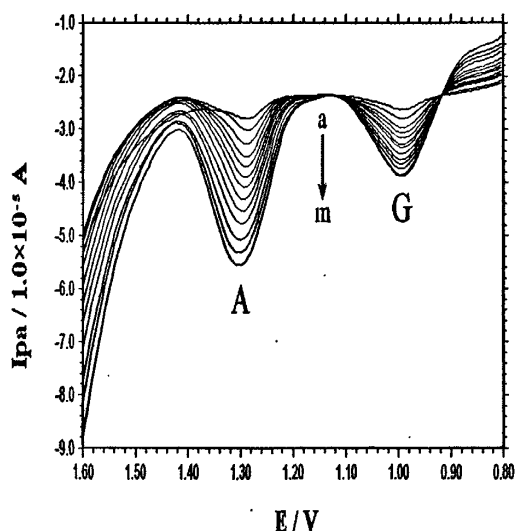


图 4-5 不同浓度的腺苷和鸟苷混合溶液的微脉冲伏安图

Fig. 4-5 Differential pulse voltammograms of different mixture concentration
(from a to m: 1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 5.0×10^{-5} , 6.0×10^{-5} , 7.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5} ,
 9.0×10^{-5} , 1.1×10^{-4} , 1.3×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 1.6×10^{-4} mol/L) in pH 3.5 B-R buffer

在 IL-CPE 上对鸟苷和腺苷的混合溶液进行 DPV 测定，如图 4-6 所示。与鸟苷和腺苷在 IL-CPE 上的单独测定比较，同浓度混合溶液测定使鸟苷和腺苷在 IL-CPE 上的电化学灵敏度增加，测定线性范围变大。同时由于鸟苷和腺苷在电极上的竞争吸附氧化，使 1.185 V 处鸟苷氧化过程中出现的不明肩峰的干扰减小。

鸟苷和腺苷单独测定与同时测定的检测限差别不大，说明 IL-CPE 电极对鸟苷和腺苷的电化学响应比较稳定。表 4-2 总结了不同修饰电极对鸟苷和腺苷测定的结果。在本章实验中鸟苷的检测限低于硼掺杂金刚石电极^[8]和玻碳电极^[15]上的结果，腺苷的检测限低于富勒烯 C₆₀ 修饰的玻碳电极^[13]和碳纤维超微电极^[14]上的结果，充分体现了该分析方法的优点。

表4-2 不同电极上测定鸟苷和腺苷的结果对比

Table 4-2 Comparison of different electrodes for guanosine and adenosine determination

| Analytes | Electrodes | Voltammetry | Linear range (mol/L) | Detection limit (mol/L) | References |
|-----------|----------------------|-------------|---|-------------------------|------------|
| Guanosine | BDDE | DPV | $1.0 \times 10^{-5} - 2.5 \times 10^{-3}$ | 1.0×10^{-5} | [8] |
| | C ₆₀ /GCE | DPV | $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-3}$ | 1.45×10^{-7} | [13] |
| | NG/ITO | DPV | $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ | 9.8×10^{-8} | [10] |
| | GCE | DPV | $1.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-4}$ | 3.0×10^{-6} | [15] |
| | MWCNT/CILE | DPV | $1.0 \times 10^{-7} - 4.0 \times 10^{-5}$ | 7.8×10^{-8} | [16] |
| | CILE | DPV | $1.0 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-4}$ | 1.57×10^{-7} | This paper |
| Adenosine | C ₆₀ /GCE | DPV | $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-3}$ | 3.02×10^{-7} | [13] |
| | CFE | FSV | $1.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-5}$ | 1.0×10^{-6} | [14] |
| | SWCNT/PGE | OSWV | $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-3}$ | 5.1×10^{-8} | [9] |
| | SWCNT/GCE | DPV | $1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$ | 3.47×10^{-7} | [17] |
| | NG/ITO | OSWV | $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ | 7.0×10^{-8} | [18] |
| | CILE | DPV | $1.0 \times 10^{-6} - 2.7 \times 10^{-4}$ | 1.61×10^{-7} | This paper |

BDDE: Boron doped diamond electrode; C₆₀/GCE: fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode; NG/ITO: nanogold modified indium tin oxide electrode; CFE: carbon fiber ultramicroelectrodes; FSV: fast scan voltammetry; OSWV: osteryoung square wave voltammetry.

4.2.5 干扰研究

对鸟苷和腺苷的电化学氧化测定的干扰主要来自于生物体液中的共存物质, 可能导致新的氧化峰出现或与现有核苷氧化峰发生重叠, 从而影响鸟苷和腺苷在 IL-CPE 上的电化学响应信号。分别检测了 1.0×10^{-4} mol/L 的肾上腺素, 多巴胺, 尿酸和抗坏血酸对 2.0×10^{-5} mol/L 鸟苷和 2.0×10^{-5} mol/L 腺苷混合溶液的氧化信号的影响, 结果见图 4-6 和表 4-3。除肾上腺素与腺苷的氧化峰出现重叠外, 其他干扰物在 5 倍于分析物浓度时对鸟苷和腺苷的峰电位和峰电流没有太大的影响, 这表明本章实验所提出的测定方法具有良好的选择性。

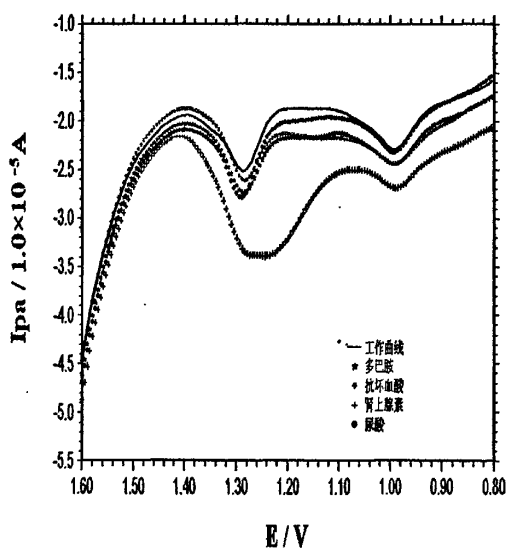


图 4-6 共存物质对鸟苷和腺苷同时测定的影响

Fig. 4-6 Influence of interferences on the voltammogram of 2.0×10^{-5} mol/L guanosine and 2.0×10^{-5} mol/L adenosine on IL-CPE

表 4-3 常见干扰物质对 2.0×10^{-5} mol/L 鸟苷和腺苷的影响

Table 4-3 Influence of interferences on the determination of 2.0×10^{-5} mol/L guanosine and adenosine

| Interferent | Guanosine | | | Adenosine | | |
|---------------|----------------------|---------------------------|------|----------------------|---------------------------|------|
| | Concentration | Change in ip of guanosine | | Concentration | Change in ip of adenosine | |
| | (mol/L) | (μ A) | (%) | (mol/L) | (μ A) | (%) |
| Ascorbic acid | 1.0×10^{-4} | -0.127 | -2.9 | 1.0×10^{-4} | -0.256 | -4.1 |
| Uric acid | 1.0×10^{-4} | 0.184 | 4.2 | 1.0×10^{-4} | 0.181 | 2.9 |
| Dopamine | 1.0×10^{-4} | -0.157 | -3.6 | 1.0×10^{-4} | -0.287 | -4.6 |
| Adrenaline | 1.0×10^{-4} | -0.162 | -3.7 | 1.0×10^{-4} | Overlap | - |

4.2.6 电极的稳定性和重现性

考察 IL-CPE 的稳定性, 1 周后对 2.0×10^{-5} mol/L 鸟苷和腺苷测定, 电流值稍有下降, 相对标准偏差分别为 3.3 % 和 4.8 %, 表明 IL-CPE 具有良好的稳定性。任选一个 IL-CPE 电极对 2.0×10^{-5} mol/L 的混合溶液进行 8 次平行测定, 相对标准偏差为 3.0 % 和 4.1 %, 表明该电极具有较好的重现性。分别在五个 IL-CPE 上检

测 2.0×10^{-5} mol/L 的鸟苷和腺苷混合溶液的 DPV 氧化信号, 相对标准偏差分别为 3.6% 和 4.7%, 表明电极制备的重现性良好。

4.2.7 分析应用

采用标准加入法对正常人尿样中鸟苷和腺苷的浓度进行测量, 用 0.2 mol/L pH 3.5 的 B-R 缓冲溶液将尿样稀释 50 倍后进行检测, 测定结果列于表 4-4 中, 鸟苷和腺苷的回收率范围分别为 95.2% ~ 103.3% 和 95.3% ~ 102.4%, 结果表明本章建立的分析测定方法可在实际分析中应用。

表 4-4 尿样中鸟苷和腺苷的回收率测定(n=3)

Table 4-4 Analytical recovery of adenosine and guanosine added to urine samples (n=3)

| Sample no. | Added (μM) | | Found (μM) | | Recovery (%) | |
|------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|--------------|-----------|
| | Guanosine | Adenosine | Guanosine | Adenosine | Guanosine | Adenosine |
| 1 | 20.00 | 20.00 | 20.44 | 19.62 | 102.2 | 98.1 |
| | 40.00 | 40.00 | 38.08 | 38.36 | 95.2 | 95.9 |
| | 60.00 | 60.00 | 59.16 | 58.32 | 98.6 | 97.2 |
| | 80.00 | 80.00 | 77.52 | 76.64 | 96.9 | 95.8 |
| | 100.00 | 100.00 | 99.10 | 97.60 | 99.1 | 97.6 |
| 2 | 20.00 | 20.00 | 20.66 | 20.48 | 103.3 | 102.4 |
| | 40.00 | 40.00 | 38.96 | 39.80 | 97.4 | 99.5 |
| | 60.00 | 60.00 | 59.52 | 57.18 | 99.2 | 95.3 |
| | 80.00 | 80.00 | 78.08 | 76.64 | 97.6 | 95.8 |
| | 100.00 | 100.00 | 99.40 | 96.70 | 99.4 | 96.7 |

4.3 结论

本章用离子液体[EMIM][EtOSO₃]作修饰剂, 与石墨粉和液体石蜡混合制备了 IL-CPE, 用于检测鸟苷和腺苷的混合溶液, 建立了 IL-CPE 测定等量鸟苷和腺苷的电化学分析方法, 比较了在 IL-CPE 上鸟苷和腺苷单独测定与同量测定的优缺点, 并将该方法成功地应用于人体尿样中腺苷和鸟苷的检测, 具有良好的回收率。

参考文献

- [1] Yang J., Xu G. W., Kong H. W., et. al, Artificial neural network classification based on high-performance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer [J], *J. Chromatogr. B*, 2002, 780: 27~33
- [2] Lin H., Xu D. K., Chen H. Y., Simultaneous determination of purine bases, ribonucleosides and ribonucleotides by capillary electrophoresis-electrochemistry with a copper electrode [J], *J. Chromatogr. A*, 1997, 760: 227~233
- [3] Yan X. L., Cao Z. J., Kai M., et. al, Label-free aptamer-based chemiluminescence detection of adenosine [J], *Talanta*, 2009, 79: 383~387
- [4] Chen J. W., Liu X. P., Feng K. J., et. al, Detection of adenosine using surface-enhanced Raman scattering based on structure-switching signaling aptamer [J], *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24: 66~71
- [5] Yao T., Wasa T., Musha S., Linear-sweep Voltammetry and the simultaneous determination of purine bases and their nucleosides in the glassy carbon electrode [J], *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1977, 50: 2917~2920
- [6] Oliveira-Brett A. M., Diculescu V., Piedade J. A. P., Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode [J], *Bioelectrochemistry*, 2002, 55: 61~62
- [7] Oliveira-Brett A. M., Silva L. A., Brett C. M. A., Adsorption of guanine, guanosine, and adenine at electrodes studied by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance [J], *Langmuir*, 2002, 18: 2326~2330
- [8] Fortin E., Tune J. C., Mailley P., et. al, Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes [J], *Bioelectrochemistry*, 2004, 63: 303~306
- [9] Goyal R. N., Gupta V. K., Chatterjee S., Simultaneous determination of adenosine and inosine using single-wall carbon nanotubes modified pyrolytic graphite electrode [J], *Talanta*, 2008, 76: 662~668
- [10] Goyal R. N., Oyama M., Tyagi A., Simultaneous determination of guanosine and guanosine-5'-triphosphate in biological sample using gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode [J], *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581: 32~36
- [11] Sun W., Duan Y. Y., Li Y. Z., et. al, Electrochemical behaviors of guanosine on carbon ionic liquid electrode and its determination [J], *Talanta*, 2009, 78: 695~699
- [12] Sun W., Li Y. Z., Duan Y. Y., et. al, Direct electrocatalytic oxidation of adenine and guanine on

- carbon ionic liquid electrode and the simultaneous determination [J], *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24: 994~999
- [13] Goyal R. N., Gupta V. K., Oyama M., et. al, Voltammetric determination of adenosine and guanosine using fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode [J], *Talanta*, 2007, 71: 1110~1117
- [14] El-Nour K. A., Brajter-Toth A., Sensitivity of electrochemically nanostructured carbon fiber ultramicroelectrodes in the determination of adenosine [J], *Electroanalysis*, 2000, 12: 805~810
- [15] Oliveira-Brett A. M., Matysik F. M., Sonoelectrochemical studies of guanine and guanosine [J], *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1997, 42: 111~116
- [16] Sun W., Li Y. Z., Duan Y. Y., et. al, Direct electrochemistry of guanosine on multi-walled carbon nanotubes modified carbon ionic liquid electrode [J], *Electrochim. Acta*, 2009, 54: 4105~4110
- [17] Goyal R. N., Singh S. P., Simultaneous voltammetric determination of dopamine and adenosine using a single walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode [J], *Carbon*, 2008, 46: 1556~1562
- [18] Goyal R. N., Oyama M., Singh S. P., Simultaneous determination of adenosine and adenosine-5'-triphosphate at nanogold modified indium tin oxide electrode by ossteryoung square-wave voltammetry [J], *Electroanalysis*, 2007, 19: 575~581

第五章 dGTP 在[EMIM][EtOSO₃]离子液体修饰

碳糊微电极上的电化学反应研究

摘要: 本章使用制备的 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯离子液体修饰碳糊微电极, 通过循环伏安法研究了 2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸(dGTP)的电化学氧化机理, 求解了电子传递系数 α 、反应速率常数 k_s 和电子转移数 n 等相关的电化学参数。在优化的实验条件下, 建立了离子液体修饰碳糊微电极测定 dGTP 的工作曲线, 在 1.0×10^{-6} mol/L ~ 1.0×10^{-3} mol/L 范围内, 微分脉冲伏安氧化峰电流 I_{pa} 的对数与 dGTP 浓度的对数成良好的线性关系, 线性方程为 $\log I_{pa}(A) = 0.771 \log C(\text{mol/L}) - 4.0823$ ($n=9$, $\gamma=0.999$), 检测限为 1.0×10^{-6} mol/L (3σ), 考察了电极的稳定性和重现性以及共存物质的影响。

关键词: 2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸, 离子液体, 微电极, 微分脉冲伏安

2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸(dGTP)是一种主要存在于细胞核中的脱氧核苷三磷酸, 在细胞质和细胞液中的含量较少。由于dGTP是染色体复制的主要原材料, 且鸟嘌呤基团很容易发生氧化损伤, 常作为一些药物的受体, 用于一些病变机理的研究。戴宇飞^[1]等人采用高效液相色谱-质谱联机技术及紫外分光光度法, 通过体外试管反应, 对苯在体内的代谢终产物——苯醌(BQ)与dGTP形成的加合物的结构及化学特性进行了初步研究, 以探讨体内苯-DNA加合物的形成过程, 揭示肿瘤发生的化学本质。季文萱^[2]等人应用多种质谱技术鉴定了体外合成的马兜铃酸(aristolochic acid, AA) - dGTP加合物, 多项研究认为具有特异性的马兜铃酸-DNA加合物是马兜铃酸导致肿瘤发生的重要原因, 同时可能参与了马兜铃酸肾病(AA nephropathy, AAN)的发病过程。Kaczmarek^[3]等人用电位测定法和电子吸收光谱法研究了镍螯合物、组氨酸与dGTP的三元复合体系的结合常数, 在H₂O₂存在下, 体系中的dGTP降解生成的8-O-dGTP, 提供了基因突变和碱基错配的位点, 是干扰DNA合成和癌变的诱因。Goyal课题组分别用热解石墨电极^[4]和纳米金修饰氧化铟锡^[5]电极研究了GTP的电化学行为, 详细探讨了GTP的多途径氧化机理。本章制备了亲水性离子液体[EMIM][EtOSO₃]修饰碳糊微电极, 在微电极上详细研究了dGTP的电化学行为, 求解了相关的电化学参数, 如电子传递系数 α 、电极反应速率常数 k_s 、电子转移数 n 等, 建立了一种离子液体碳糊微电极灵敏测定dGTP的新分析方法。

5.1 实验部分

5.1.1 仪器与试剂

CHI 1210A 型电化学工作站(上海辰华仪器公司), 三电极系统: 自制离子液体修饰碳糊微电极(m-IL-CPE)为工作电极; Ag/AgCl 为参比电极; 铂丝为辅助电极; pHs-25C 型酸度计(上海理达仪器厂)。

1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯盐([EMIM][EtOSO₃]), 杭州科默化学有限公司, 分子量 236.29, 熔点 < -65 °C); 石墨粉(上海胶体化学厂, 颗粒度 ≤ 30 μm); dGTP (100 mmol/L 水溶液, 上海闪晶生物科技公司); 0.2 mol/L B-R 缓冲溶液, 用 0.5 mol/L NaOH 调节成所需 pH; 其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

5.1.2 实验方法

将 40 μL [EMIM][EtOSO₃], 100 mg 石蜡和 500 mg 石墨混合于研钵中, 研磨成糊状, 取少量装入直径约 300 μm 的取样器塑料枪头尖端, 压实并用铜导线连接, 所制得电极就是 m-IL-CPE。用作对比的 m-CPE 电极制作方法相似, 电极使用前在称量纸上打磨光滑。

将 m-IL-CPE 和 m-CPE 作为工作电极分别置于 1.0×10^{-3} mol/L K₃[Fe(CN)₆] + 0.5 mol/L KCl 溶液的三电极电解池中进行循环伏安表征。在电化学工作站使用 1.0×10^{-3} mol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} + 0.5 mol/L KCl 的电化学探针溶液, 进行电极的交流阻抗测量。

dGTP 的电化学研究中使用 0.2 mol/L B-R 缓冲溶液作支持电解质, 将三电极浸入含有一定浓度 dGTP 的 B-R 缓冲溶液中, 选择恰当的实验参数, 进行电化学伏安扫描。

5.2 结果与讨论

5.2.1 微电极表征

以铁氰化钾为电化学探针对微电极进行电化学表征, 结果如图 5-1 所示。

图 5-1A 是 m-CPE(曲线 a)和 m-IL-CPE(曲线 b)在 1.0×10^{-3} mol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 和 0.5 mol/L KCl 探针溶液中的交流阻抗曲线。从图中可以看出, 两电极的阻抗曲线差异明显。曲线 a 在高频部分出现明显的半圆弧, 半圆弧的直径代表电荷转移电阻, 说明电极表面存在阻碍电子转移的物质, 这是由于不导电的石蜡降低了碳糊的导电率, 因此存在着较大的电荷转移电阻^[6]。曲线 b 在所有频率范围内近似

一条直线,表明此电极表面电子转移电阻较小,铁氰化钾容易到达电极表面发生氧化还原反应,这与离子液体的存在提高电极导电率相一致。

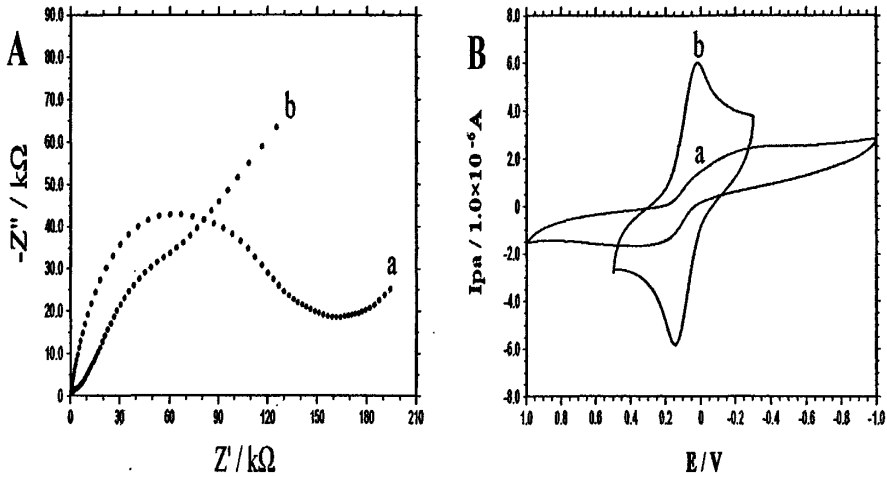


图 5-1 (A) m-CPE (a) 和 m-IL-CPE (b) 在 1.0×10^{-3} mol/L $K_3[Fe(CN)_6]^{3-/4-} + 0.5$ mol/L KCl 溶液中的阻抗图; (B) m-CPE (a) 和 m-IL-CPE (b) 在 1.0×10^{-3} mol/L $K_3[Fe(CN)_6] + 0.5$ mol/L KCl 溶液中的循环伏安图, 扫速: 100 mV/s

Fig. 5-1 (A) Electrochemical impedance spectra for m-CPE (a) and m-IL-CPE (b) in a mixture solution of 1.0×10^{-3} mol/L $K_3[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ and 0.5 mol/L KCl with the frequencies swept from 10^4 to 0.1 Hz; (B) Cyclic voltammograms of m-CPE (a) and m-IL-CPE (b) in solution of 1.0×10^{-3} mol/L $K_3[Fe(CN)_6] + 0.5$ mol/L KCl at a scan rate of 100 mV/s.

图 5-1B 是扫速 500 mV/s 时, m-CPE(曲线 a)和 m-IL-CPE(曲线 b)在 1.0×10^{-3} mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 0.5 mol/L KCl 溶液中的循环伏安曲线。曲线 a 的氧化还原电位差(ΔE_p)为 579 mV, m-CPE 上电极反应为准可逆电子传递过程;在曲线 b 上 ΔE_p 为 124 mV, 因此 m-IL-CPE 上电极反应的可逆性增强, 在 m-IL-CPE 上的峰电流是 m-CPE 的 2.23 倍。以上实验数据充分说明了加入的少量离子液体,使 m-IL-CPE 较 m-CPE 可逆性增强和灵敏度提高。

10 mV/s ~ 500 mV/s 的扫速范围内, 在 m-IL-CPE 和 m-CPE 上 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的氧化还原峰电流均随着扫速的增加而不断增大, 分别得出如下线性回归方程:

$$I_{pc(m-IL-CPE)}(\mu A) = 6.229v^{1/2} + 0.2147 \quad (n=11, \gamma=0.998)$$

$$I_{pc(m-CPE)}(\mu A) = 2.042v^{1/2} + 0.6735 \quad (n=8, \gamma=0.987)$$

表明 $K_3[Fe(CN)_6]$ 在两电极表面的电化学反应均为扩散反应控制。根据 Randles-Sevcik 方程^[7] $i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$, 式中 n 为电极反应电子数, A 是

电极面积(in cm^2), C 是电极反应物浓度 (in mol/cm^3), D 是反应物扩散系数(in cm^2/s), v 是扫描速率(in V/s)。参考文献^[8]取室温下 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 的扩散系数值为 $6.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, 计算出 m-IL-CPE 和 m-CPE 的有效电极面积分别为 0.908 mm^2 和 0.298 mm^2 。

5.2.2 dGTP 在 m-IL-CPE 上的电化学行为

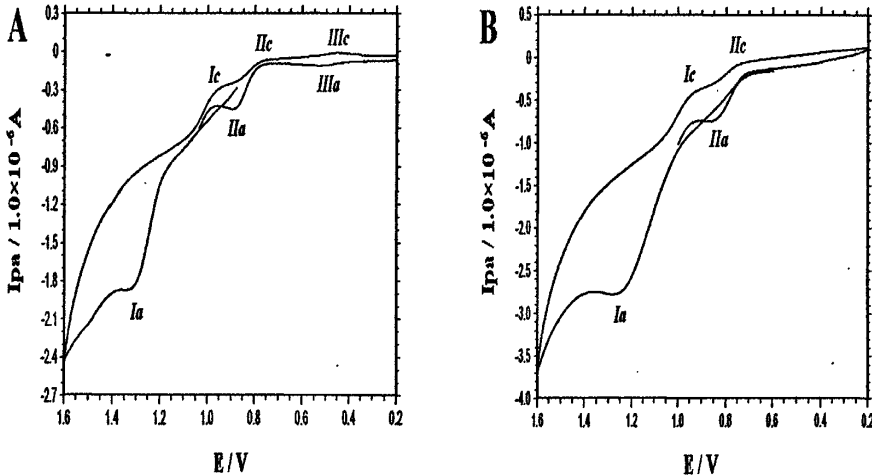


图 5-2 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 dGTP 在 m-CPE (A) 和 m-IL-CPE (B) 上的循环伏安图, 扫速 $200 \text{ mV}/\text{s}$

Fig. 5-2 Cyclic voltammograms on m-CPE (A) and m-IL-CPE (B) for $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ dGTP in pH 4.0 B-R buffer solution, scan rate: $200 \text{ mV}/\text{s}$.

分别在 m-CPE 和 m-IL-CPE 上, 用循环伏安法研究了 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 dGTP 在 0.2 mol/L pH 4.0 的 B-R 缓冲溶液中, 扫速为 $200 \text{ mV}/\text{s}$ 时的循环伏安电化学行为。

第一圈循环伏安正向扫描从 $0.2 \text{ V} \sim 1.6 \text{ V}$, 两电极上均出现了一个电化学氧化峰 I_a , 氧化峰 I_a 分别位于 1.305 V (图 A) 和 1.218 V (图 B); 氧化峰 I_a 的电流分别为 383.8 nA 和 734.6 nA 。

根据文献报道^[9], 离子液体的存在使 m-IL-CPE 具有电导率高, 电子传递速率快, 固有的催化和吸附性能等优点。使更多的 dGTP 富集在 m-IL-CPE 表面发生氧化, 峰电流值提高到 1.9 倍; 同时离子液体作为高效催化剂, 促进了电化学过程的动力学反应, 使氧化电位降低了 87 mV ; 背景电流增加, 是由于离子液体增加电容的缘故^[21]。

继续循环伏安反向扫描从 $1.6 \text{ V} \sim 0.2 \text{ V}$, 两电极上先后均出现两个还原峰 I_c 和 I_{IIc} 。在 m-CPE 上, 还原峰 I_c 峰电位为 0.969 V , 峰电流为 120.6 nA , 还原峰

I_{2c} 峰电位为 0.782 V, 峰电流为 56.3 nA; 在 m-IL-CPE 上, 还原峰 I_c 峰电位为 0.943 V, 峰电流为 170.2 nA, 还原峰 I_{2c} 峰电位为 0.756 V, 峰电流为 81.7 nA。在 m-IL-CPE 上两个还原峰电位均负移 26 mV, 电流值均有增大。

第二圈循环伏安正向扫描从 0.2 V 到 1.6 V, 在电位较低的区域出现一个新的氧化峰 I_{2a}, 根据文献^[10], 是由于还原产物吸附在电极上进一步发生氧化反应所致。在 m-IL-CPE 上 I_{2a} 位于 0.835 V, 电流值为 222.5 nA; 在 m-CPE 上 I_{2a} 位于 0.879 V, 电流值为 170.5 nA。

在两电极上均可以看到氧化峰 I_a 的再次出现, 较第一圈扫描 I_a 的峰高减小峰形变钝, 这是由于第一圈循环伏安扫描时 dGTP 在电极表面发生氧化还原反应, 部分产物吸附在电极表面, 阻碍了溶液中的 dGTP 在电极上的继续氧化, 致使 dGTP 氧化峰 I_a 信号变差。

在 0.2 V ~ 0.6 V 电位扫描范围内, m-CPE 上出现一对准可逆的氧化还原峰 III_a 和 III_c, 分别位于 0.447 V 和 0.535 V, 电流值为 28.7 nA 和 30.5 nA; 而在 m-IL-CPE 上对应位置没有出现。m-CPE 在空白缓冲溶液中的循环伏安扫描不存在 III_a 和 III_c, 表明这一对峰是循环伏安扫描 dGTP 产生的。

根据文献^[10]我们认为 dGTP 的氧化机理与 GMP 相似, 选择氧化峰 I_a 作为定量研究 dGTP 的对象。

5.2.3 缓冲溶液 pH 值的影响

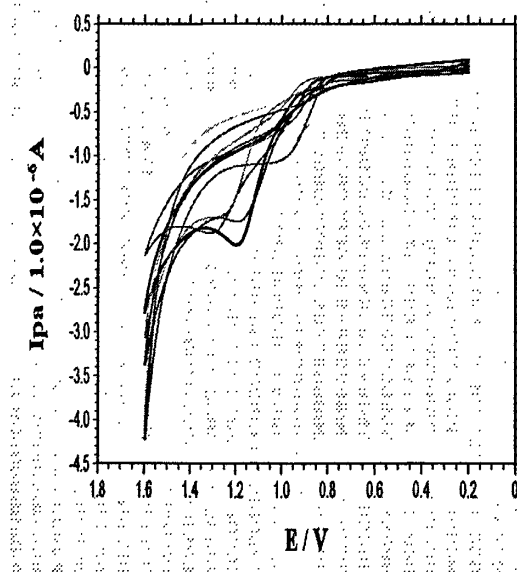


图 5-3 缓冲溶液 pH 值对 dGTP 循环伏安信号的影响, 扫速: 50 mV/s

Fig. 5-3 Effect of buffer pH on the cyclic voltammogram at the scan rate of 50 mV/s

在 50 mV/s 扫速下 pH 2.0 ~ 7.0 范围内考察了不同 pH 的 0.2 mol/L B-R 缓冲

溶液对 5.0×10^{-4} mol/L dGTP 的氧化还原峰电位和峰电流的影响, 结果如图 5-3 所示。氧化还原峰电位随着 pH 的增大不断负移, 表明有氢质子参与电极反应。在 2.0 ~ 7.0 的 pH 范围内, 得到氧化峰 Ia 和 IIa 随着 pH 变化的趋势; 还原峰 Ic 在 pH 大于 3.0 时才会出现; 还原峰 IIc 只在 pH 2.0 ~ 4.0 的范围内出现。各个峰的 E_p 与 pH 的线性方程列在表 5-1 中。

表 5-1 缓冲溶液 pH 对 dGTP 氧化还原峰的影响

Fig. 5-1 Influence of pH on dGTP's redox peaks

| Peak | pH range | Linear regression equations (E_p in V) |
|------|----------|---|
| Ia | 2.0-7.0 | $E_p = -0.041 \text{ pH} + 1.433 (n=4, \gamma=0.967)$ |
| Ic | 3.0-7.0 | $E_p = -0.056 \text{ pH} + 1.113 (n=5, \gamma=0.995)$ |
| IIc | 2.0-4.0 | $E_p = -0.040 \text{ pH} + 0.851 (n=3, \gamma=0.979)$ |
| IIa | 2.0-7.0 | $E_p = -0.078 \text{ pH} + 1.134 (n=4, \gamma=0.975)$ |

以上线性方程的斜率在 40 ~ 78 mV/pH 区间, 这与理论值 59 mV/pH 接近, 这说明在 dGTP 电化学氧化还原过程中各步反应均为等电子等质子反应。

考虑在 pH 3.0~4.0 范围内, 两个氧化峰和两个还原峰全部能出现, 而且在 pH 4.0 时氧化峰 Ia 的电流信号明显, 所以最终选择 pH 4.0 的条件进行之后的实验, 并选定氧化峰 Ia 作为 dGTP 定量研究的对象。

5.2.4 扫描速率的影响

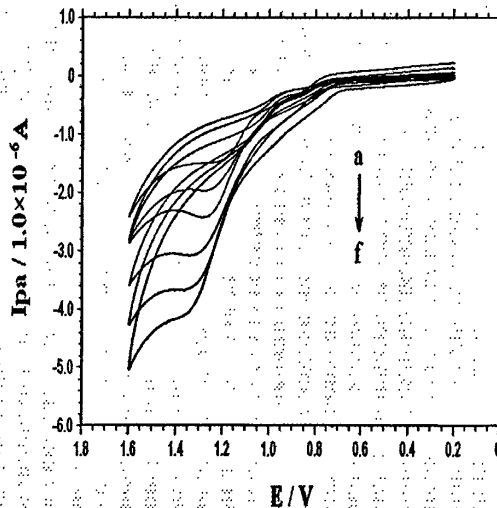


图 5-4 不同扫速下 dGTP 在 m-IL-CPE 上的循环伏安图

(从 a 到 f: 50, 100, 150, 200, 300, 400mV/s)

Fig.5-4 Cyclic voltammograms of dGTP on m-IL-CPE in pH 4.0 B-R with different scan rates

(from a to f: 50, 100, 150, 200, 300, 400mV/s)

以 pH 4.0 的 0.2 mol/L B-R 缓冲溶液作支持电解质, 在 10 ~ 400 mV/s 扫速范围内, 详细考察了扫速对 5.0×10^{-4} mol/L dGTP 的氧化峰电位和电流的影响, 结果如图 5-4 所示, 随着扫速的增加, 氧化峰电位不断正移, 峰电流逐渐增大; 还原峰电位不断负移, 峰电流也逐渐增大。各个峰的线性回归方程及电极反应参数列在表 5-2 中:

表 5-2 在 m-IL-CPE 上 dGTP 的分析数据
Table 5-2 Analytical parameters of dGTP on the m-IL-CPE

| Peak | Linear regression equations | | n | α | k_s |
|------|-------------------------------|--------------------|------|----------|-----------------------|
| | (Ep in V, Ip in nA, v in V/s) | | | | |
| Ia | $E_p = 0.0587 \ln v + 1.372$ | ($r=0.999, n=5$) | 1.28 | 0.71 | 3.91×10^{-6} |
| | $I_p = 2792v + 228.5$ | ($r=0.991, n=4$) | | | |
| Ic | $E_p = 0.0189 \ln v + 0.9913$ | ($r=0.995, n=4$) | 1.66 | 0.82 | 3.30×10^{-5} |
| | $I_p = 621.8v + 59.26$ | ($r=0.990, n=4$) | | | |
| IIc | $E_p = 0.0159 \ln v + 0.7866$ | ($r=0.996, n=5$) | 2.08 | 0.78 | 1.27×10^{-5} |
| | $I_p = 336.5v + 34.71$ | ($r=0.993, n=4$) | | | |
| IIa | $E_p = 0.0389 \ln v + 1.178$ | ($r=0.996, n=5$) | 2.00 | 0.25 | 2.50×10^{-6} |
| | $I_p = 780.7v + 72.03$ | ($r=0.986, n=5$) | | | |

总结上表数据, 电流与扫速在 10 ~ 400 mV/s 范围内均呈良好的线性关系, 因此各步电极反应过程均为吸附控制, 表明 dGTP 在电极上发生了吸附控制的连续多步电化学氧化还原反应。

根据 Laviron 公式^[11]:

$$E_{pa} = E^{\circ'} + \frac{RT}{(1-s)nF} \ln v \quad (1)$$

$$\log k_s = s \log(1-s) + (1-s) \log s - \log \frac{RT}{nFk} - \frac{(1-\alpha)\alpha nF \Delta E_p}{2.3RT} \quad (2)$$

$$I_p = \frac{nFQk}{4RT} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma_r v}{4RT} \quad (3)$$

分别计算出各步反应的电子传递系数 α , 电子转移数 n 和电子转移速率常数 k_s , 进一步讨论 dGTP 的氧化机理。我们可以认为 Ia 的氧化过程是由 1e 和 4e 两个氧化反应同时进行, Ic 和 IIc 分别为以上两个氧化反应产物的还原峰, 还原反应主要生成氧化产生 IIa 的物质。

5.2.5 分析应用

在最优实验条件下, 氧化峰 Ia 的电流值随 dGTP 浓度的增大而不断增大。在 1.0×10^{-6} mol/L ~ 7.0×10^{-4} mol/L 的范围内, 氧化峰电流 I_{pa} 的对数与 dGTP 浓度的

对数成良好的线性关系, 线性方程为 $\log I_{pa}(A) = 0.771 \log C(\text{mol/L}) - 4.0823$ ($n=9$, $\gamma=0.999$), 检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (3σ)。

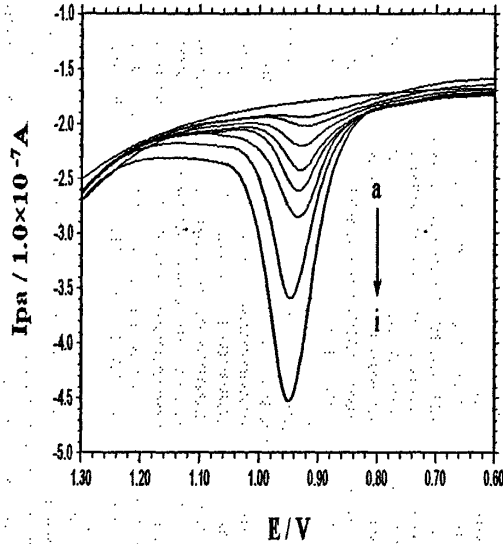


图 5-5 不同浓度 dGTP 的 DPV 图

Fig. 5-5 DPV curve of different concentration dGTP (from a to m: 0 , 4.0×10^{-6} , 7.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 7.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} , 4.0×10^{-4} , $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) in pH 4.0 B-R buffer

5.2.6 电极的重现性和稳定性

用 m-IL-CPE 对 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ dGTP 平行测定 5 次, 求出相对标准偏差(RSD) 为 $\pm 3.2\%$, 说明了 m-IL-CPE 具有良好的重现性。m-IL-CPE 能够在常温下保存一周而不会使其灵敏度发生明显变化, 显示了其良好的稳定性。选三根电极分别测定 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ dGTP, DPV 氧化信号的 RSD 值为 $\pm 4.8\%$, 表明电极重复性良好。

5.2.7 干扰研究

考察了外源性神经递质类物质对 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ dGTP 测定信号的影响, 如图 5-6 所示。选择适量的肾上腺素, 多巴胺, 抗坏血酸和尿酸加入 dGTP 溶液中, 使干扰物质的浓度与 dGTP 浓度相同, 均为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。多巴胺, 抗坏血酸, 尿酸对 dGTP 氧化峰 Ia 的电流值无明显影响, RSD 低于 $\pm 5\%$; $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的肾上腺素在 m-IL-CPE 上于 1.20 V 处产生一个显著地氧化峰, 极大地影响了 dGTP 的测定, RSD 达 -19.1% 。dGTP 在 m-IL-CPE 上的氧化峰电位也有一定变化, 多

巴胺和肾上腺素的存在对 dGTP 的电位无影响，抗坏血酸和尿酸的存在使 dGTP 的氧化电位略有降低，具体原因有待进一步研究。

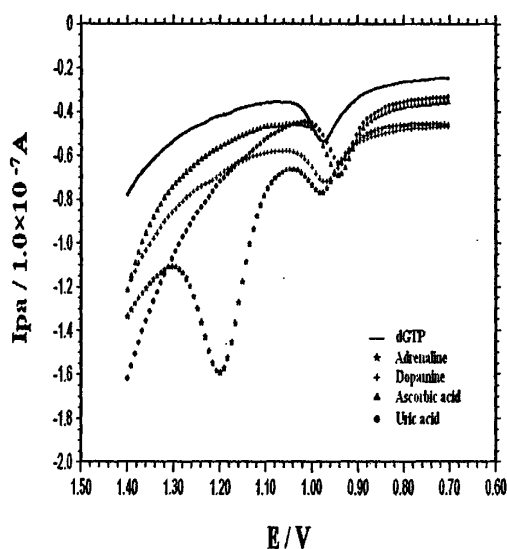


图 5-6 dGTP 的干扰测定图

Fig. 5-6 Influence of interferences on the determination of 2.0×10^{-4} mol/L dGTP on m-IL-CPE

表 5-3 干扰物质对 dGTP 氧化峰的影响

Table 5-3 Influence of interferences on the determination of 2.0×10^{-4} mol/L dGTP

| Interferent | Concentration | ΔI_{pa} | | ΔE_{pa} |
|---------------|----------------------|-----------------|-------|-----------------|
| | (mol/L) | (nA) | (%) | (mV) |
| Ascorbic acid | 2.0×10^{-4} | 0.84 | 3.9 | -36 |
| Uric acid | 2.0×10^{-4} | 0.91 | 4.2 | -36 |
| Dopamine | 2.0×10^{-4} | -1.04 | -4.8 | -4 |
| Adrenaline | 2.0×10^{-4} | -41.07 | -19.1 | 2 |

5.3 结论

本章制作了一种离子液体修饰碳糊微电极，在该微电极上研究了 dGTP 的电化学氧化还原反应，考察了缓冲溶液 pH 值和循环伏安扫速等因素对各个峰的影响，计算了 dGTP 各个峰对应的电化学反应参数，选择氧化峰 Ia 作为 dGTP 电化学测定的考察对象，建立了微分脉冲伏安氧化法测定 dGTP 的新分析方法。

参考文献

- [1] 戴宇飞, 常平, 李桂兰, 苯醌-脱氧鸟苷酸加合物的结构及化学特性初步研究[J], *Chin. J. Ind. Hyg. Occup. Dis.*, 2003, 21: 117~120
- [2] 季文萱, 刘密新, 杨成对, 等, 马兜铃酸-脱氧鸟苷酸加合物的合成及质谱分析[J], *Acta Pharm. Sinica*, 2008, 43: 295~298
- [3] Kaczmarek P., Jezowska-Bojczuk M., Bal W., et. al, Determination of the stability constants and oxidation susceptibility of nickel(II) complexes with 2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate and L-histidine [J], *J. Inorg. Biochem.*, 2005, 99: 737~746
- [4] Goyal R. N., Tyagi A., Investigations into the electrooxidation of guanosine-5'-triphosphate at the pyrolytic graphite electrode [J], *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 382: 1683~1690
- [5] Goyal R. N., Oyama M., Tyagi A., Simultaneous determination of guanosine and guanosine-5'-triphosphate in biological sample using gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode [J], *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581: 32~36
- [6] 崔晓莉, 江志裕, 交流阻抗谱的表示及应用[J], *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 30: 53~61
- [7] Wang J., *Analytical Electrochemistry* [M], 2nd ed., Wiley, 2000
- [8] Bard A. J., Faulkner L. R., *Electrochemical Methods* [M], 2nd ed., Wiley, 2001
- [9] Maleki N., Safavi A, Tajabadi F., High-performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder [J], *Anal. Chem.*, 2006, 78: 3820~3826
- [10] Goyal R. N., Puri B. K., Jain N., Electrochemical oxidation of guanosine-5'-monophosphate at the pyrolytic graphite electrode [J], *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2001, 2: 832~837
- [11] E. Laviron, The use of linear potential sweep voltammetry and of a.c. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes [J], *J. Electroanal. Chem.*, 1979, 100: 263~270

第六章 胞嘧啶在碳糊电极上的电化学氧化研究和测定

摘要: 本章研究了胞嘧啶在碳糊电极上的电化学氧化行为, 分别考察了缓冲溶液 pH 和循环伏安扫描速率对胞嘧啶氧化信号的影响, 求解了胞嘧啶在碳糊电极上电化学氧化的相关参数如电子传递系数 α 、电极反应速率常数 k_s 、电子转移数 n 等。在 pH 5.0 的 B-R 缓冲溶液中胞嘧啶的循环伏安氧化峰出现在 1.480 V。胞嘧啶的微分脉冲伏安氧化峰电流与浓度在 1.0×10^{-5} mol/L ~ 1.0×10^{-3} mol/L 范围内呈良好的线性关系, 检测限为 1.9×10^{-6} mol/L (3σ)。考察了四种 DNA 碱基的混合溶液中胞嘧啶的测定和几种常见干扰物质对胞嘧啶氧化峰的影响。

关键词: 胞嘧啶, 碳糊电极, 电化学氧化

胞嘧啶是核酸中嘧啶型碱基之一, 存在于 DNA 和 RNA 中。在植物 DNA 中, 除胞嘧啶外, 还有少量的 5-甲基胞嘧啶。在 DNA 的双螺旋链中, 一条链上的胞嘧啶与另一条链上的鸟嘌呤配对, 分子间形成三个氢键。这种碱基互补对之间的氢键是 DNA 双螺旋结构稳定性的重要作用力之一^[1]。胞嘧啶是精细化工、农药和医药的重要中间体, 特别在医药领域, 主要用于合成抗艾滋病药物及抗乙肝药物拉米夫定, 抗癌药物吉西他宾、依诺他宾以及 5-氟胞嘧啶等, 应用非常广泛。胞嘧啶的电化学研究中, 主要集中在胞嘧啶在汞电极上的还原。胞嘧啶得到 3 个电子发生还原, 快速脱氨后生成激发态二聚体^[2-4]或者与汞电极结合后阳极溶出生成可溶性化合物, 检出浓度可达到 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$ ^[5-7]。由于胞嘧啶的氧化电位在碳电极电化学窗口极正的位置, 氧化峰经常被背景电流掩盖, 比较难观察到, 曾经一致认为胞嘧啶在石墨和碳材料电极上没有电化学活性。直到 1997 年 Brett 等人报道了较大浓度的胞嘧啶在超声辅助的玻碳电极上的氧化^[8,9]。最近 Ivandini 等人^[10]报道了用酸性反相高效液相色谱分离出 DNA 中降解的鸟嘌呤, 腺嘌呤, 胞嘧啶, 胸腺嘧啶和 5-甲基胞嘧啶, 并在高效硼掺杂金刚石电极上实现五种碱基的同时测定。

本章中详细研究了胞嘧啶在碳糊电极上的电化学氧化行为, 求解了胞嘧啶氧化的电化学参数, 如电子传递系数 α 、电极反应速率常数 k_s 、电子转移数 n 等, 提出了胞嘧啶在碳糊电极上的氧化机理。在最优实验条件下, 建立了碳糊电极测定胞嘧啶的分析新方法。

6.1 实验部分

6.1.1 仪器与试剂

CHI 1210A 型电化学工作站 (上海辰华仪器公司), 三电极系统: 碳糊电极 (CPE) 为工作电极; 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极; 铂丝为辅助电极; pH S-25C 型酸度计 (上海理达仪器厂)。

胞嘧啶, 胸腺嘧啶, 鸟嘌呤, 腺嘌呤 (美国 Sigma 公司); 石墨粉 (上海胶体化学厂, 颗粒度 $\leq 30 \mu\text{m}$); 液体石蜡 (天津巴斯夫化学试剂有限公司); 用二次蒸馏水配制 10 mmol/L 的以上碱基水溶液各 25 mL; 0.2 mol/L B-R 缓冲溶液的配制方法为 12.35 g H_3BO_4 , 13.55 mL 浓 H_3PO_4 和 11.80 mL CH_3COOH 混合用二次蒸馏水定容至 1000 mL, 然后再用 0.5 mol/L NaOH 调节。其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

6.1.2 实验方法

准确称取石墨粉 1.6 g 和液体石蜡 0.5 mL, 在研钵中研磨均匀, 将混合物填入内径 4 mm 的玻璃管中压实, 用铜导线连接, 即可制得 CPE, 使用前将电极表面在称量纸上打磨光滑。

将三电极系统放入含有待测物质的 B-R 缓冲溶液中, 选择富集电位为 0.8 V, 富集时间为 60 s, 进行循环伏安扫描, 记录循环伏安曲线。

6.2 结果与讨论

6.2.1 胞嘧啶在 CPE 上的电化学行为

CPE 作为工作电极, 对 2.0×10^{-3} mol/L 的胞嘧啶溶液进行循环伏安扫描, 在 1.480 V 出现一个不可逆的氧化峰, 结果如图 6-1 所示。连续扫描氧化峰信号逐渐降低, 与文献^[8]所述一致, 是由于氧化产物吸附在电极表面的缘故。

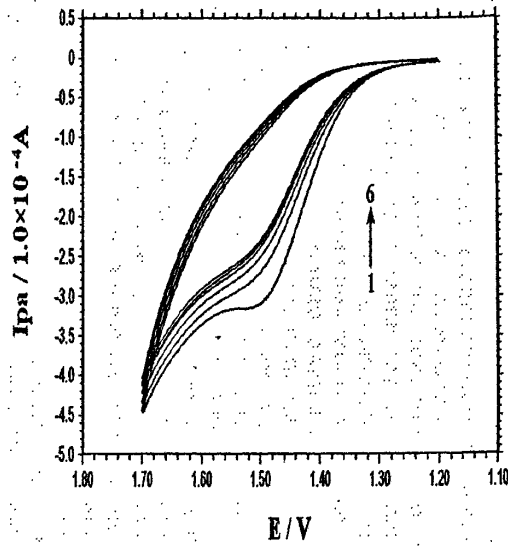


图 6-1 2.0×10^{-3} mol/L 胞嘧啶溶液的多扫循环伏安图
Fig. 6-1 Multi-cyclic voltammograms of 2.0×10^{-3} mol/L cytosine in pH 5.0 B-R buffer solution, scan rate: 100 mV/s

6.2.2 缓冲溶液 pH 值的影响

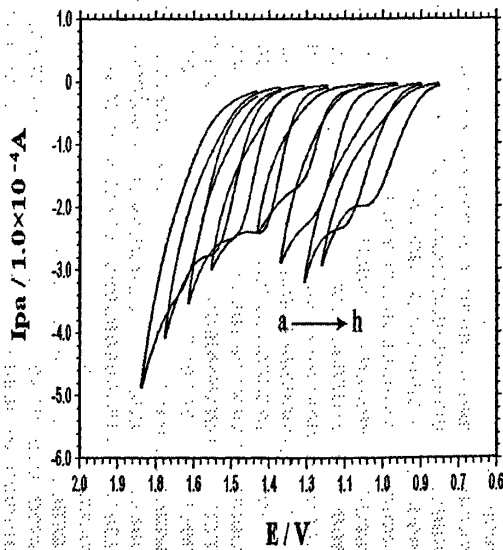


图 6-2 不同 pH 值下胞嘧啶的循环伏安图
(从 a-h: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 11.0, 12.0)
Fig. 6-2 Cyclic voltammograms of different pH from 3.0~12.0
(a-h: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 11.0, 12.0) scan rate: 100 mV/s

在 2.0~12.0 范围内考察了 2.0×10^{-3} mol/L 胞嘧啶在不同 pH 值 B-R 缓冲液中

的电化学行为,结果如图 6-2 所示。随着缓冲溶液 pH 值的增加,胞嘧啶的氧化峰电位负移,说明有质子参与胞嘧啶的电化学氧化反应。氧化峰电位与溶液 pH 值存在如下线性关系: $E_{pa}(V) = -0.069pH + 1.849$ ($n=11, \gamma=0.995$), 斜率值 69 mV/pH 表明参与反应的质子数与电子数相等。缓冲溶液 pH 值对胞嘧啶氧化峰电流也有较大影响,当胞嘧啶溶液的 pH 值为 5.0 时,峰电流响应最大且峰形良好,另外在 pH 11.0 时胞嘧啶氧化峰电流也存在一个峰值,结果与文献报道大体一致^[11],主要是由于胞嘧啶存在两个 pK 值的缘故。故实验中选择 0.2 mol/L pH 5.0 的 B-R 缓冲溶液作为支持电解质。

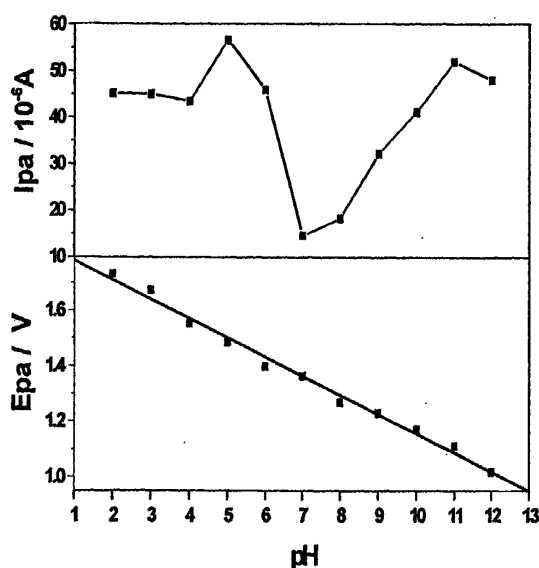


图 6-3 胞嘧啶氧化峰电流和氧化峰电位与 pH 的关系

Fig. 6-3 The relationship of cytosine oxidation peak current and peak potential against pH

6.2.3 扫描速率的影响

不同扫速下 1.0×10^{-3} mol/L 的胞嘧啶在 CPE 上的循环伏安曲线如图 6-4 所示。由图可见,胞嘧啶在 CPE 上的氧化峰电流和峰电位都随着扫描速率的变化而变化。随着扫速的增加,氧化峰电流逐渐增大,峰电位逐渐正移,表明电极反应为不可逆反应。在扫速为 10~300 mV/s 的范围内,考察了峰电流与扫速的关系,其线性回归方程为 $I_{pa} (\mu A) = 367.08v (V/s) + 8.34$ ($n=10, \gamma=0.998$)。线性关系表明胞嘧啶在 CPE 上的电极反应过程为吸附控制,可认为溶液中的胞嘧啶首先经过富集过程吸附在电极表面,然后发生电化学氧化反应。

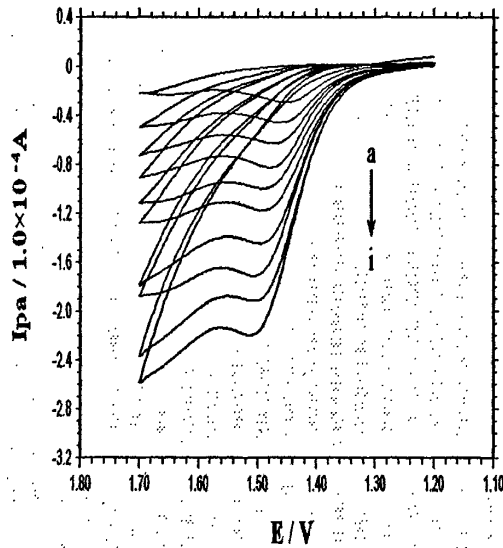


图 6-4 不同扫速下 1.0×10^{-3} mol/L 胞嘧啶在 pH 5.0 B-R 缓冲溶液中的循环伏安图

(a~i: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 mV/s)

Fig. 6-4 Cyclic voltammograms of 1.0×10^{-3} mol/L cytosine in pH 5.0 B-R buffer with different scan rates (a~i: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 mV/s)

胞嘧啶的氧化峰电位 E_{pa} 与 $\ln v$ 的呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $E_{pa}(V) = 0.0142 \ln v + 1.505$ ($n=10, \gamma = 0.999$)。根据 Laviron 公式:

$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1-s)nF} \ln v$$

$$\log k_s = s \log(1-s) + (1-s) \log s - \log \frac{RT}{nFk} - \frac{(1-\alpha)\alpha nF \Delta E_p}{2.3RT}$$

分别计算出胞嘧啶在 CPE 上氧化反应的电化学参数电极反应电子数 n 等于 2.14, 电子传递系数 α 为 0.15, 电子转移速率常数 k_s 为 $1.049 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 。

根据参考文献^[12], 胞嘧啶在 CPE 上的电化学氧化过程中有 2 个电子 2 个质子参与电极反应过程, 氧化反应方程式如图 6-5 所示。

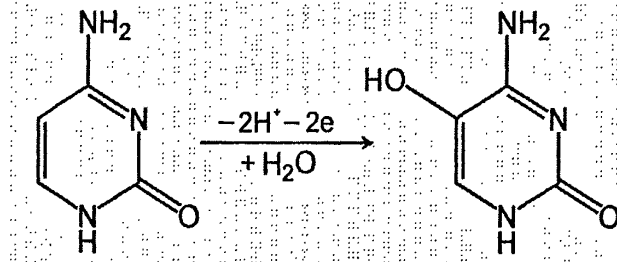


图 6-5 胞嘧啶的电化学氧化机理

Fig. 6-5 Electrochemical oxidation mechanism of cytosine

6.2.4 富集条件的影响

由于胞嘧啶在 CPE 上发生的电化学氧化反应为吸附控制,详细考察了富集条件对 3.0×10^{-4} mol/L 胞嘧啶电化学响应信号的影响。在 0~1.0 V 的范围内考察了富集电位对峰电流变化的影响,在 0.8 V 时得到最大电流值;同时在 0~120 s 范围内考察了富集时间对胞嘧啶氧化峰电流的影响,在 60 s 时得到最大值。胞嘧啶测定的最佳富集条件设定为 0.8 V 下富集 60 s。

6.2.5 工作曲线

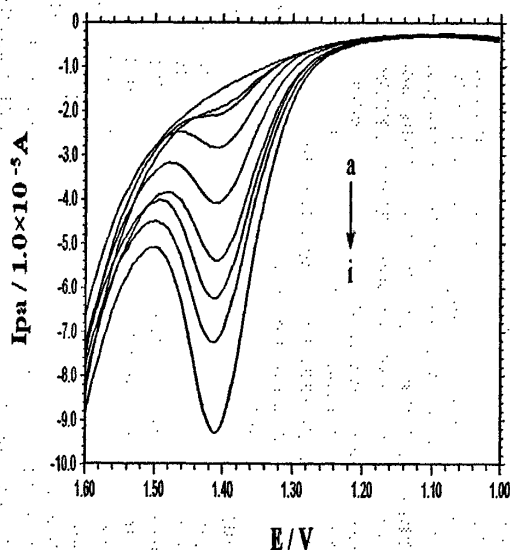


图 6-6 不同浓度胞嘧啶溶液的 DPV 测定曲线(a~i: $0, 4.0 \times 10^{-5}, 7.0 \times 10^{-5}, 2.5 \times 10^{-4}, 4.0 \times 10^{-4}, 5.5 \times 10^{-4}, 7.0 \times 10^{-4}, 8.5 \times 10^{-4}, 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L)

Fig. 6-6 DPV curve of different concentration cytosine(a~i: $0, 4.0 \times 10^{-5}, 7.0 \times 10^{-5}, 2.5 \times 10^{-4}, 4.0 \times 10^{-4}, 5.5 \times 10^{-4}, 7.0 \times 10^{-4}, 8.5 \times 10^{-4}, 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L)

利用 DPV 方法考察胞嘧啶浓度与其氧化峰电流之间的关系,结果如图 6-6 所示。可以看出,随着胞嘧啶浓度的增大,氧化峰电流不断增大。

在 1.0×10^{-5} mol/L ~ 1.0×10^{-3} mol/L 范围内,胞嘧啶的氧化峰电流与浓度呈良好的线性关系,线性回归方程为 $I_{pa}(\mu A) = 0.0519C(\mu mol/L) + 0.419$ ($\gamma = 0.999$, $n=8$),检测限为 1.9×10^{-6} mol/L (3σ)。7 次平行测量 3.0×10^{-5} mol/L 的胞嘧啶溶液,相对标准偏差为 4.7%。

6.2.6 干扰研究

考察了外源性神经递质类物质对 5.0×10^{-4} mol/L 胞嘧啶测定信号的影响。选

择适量的肾上腺素,多巴胺,抗坏血酸和尿酸,加入胞嘧啶溶液中使干扰物质的浓度为 5.0×10^{-4} mol/L,测定的结果见图 6-7 和表 6-1。多巴胺,抗坏血酸,尿酸均对 1.0×10^{-5} mol/L 胞嘧啶的氧化峰电流值无明显影响,偏差低于 $\pm 5\%$;而 5.0×10^{-4} mol/L 肾上腺素在 1.24 V 产生一个信号显著的氧化峰,极大地影响了胞嘧啶的氧化测定。

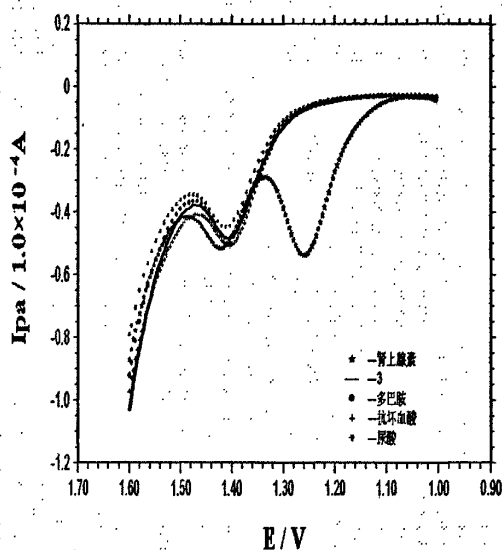


图 6-7 5.0×10^{-4} mol/L 胞嘧啶和共存物质在 pH 5.0 B-R 缓冲溶液中的 DPV 图

Fig. 6-7 DPV of 5.0×10^{-4} mol/L cytosine and different interferences in pH 5.0 B-R buffer

表 6-1 干扰物质对胞嘧啶氧化峰电流影响

Table 6-1 Influence of interferences on the determination of 5.0×10^{-4} mol/L cytosine

| Interference | Concentration (mol/L) | Ipa | |
|---------------|--------------------------|------------|--------|
| | | (μ A) | (%) |
| Ascorbic acid | 5.0×10^{-4} | 0.70 | 2.86 |
| Uric acid | 5.0×10^{-4} | 0.53 | 2.19 |
| Dopamine | 5.0×10^{-4} | 1.16 | 4.77 |
| Adrenaline | 5.0×10^{-4} | -5.92 | -24.20 |

6.2.7 分析应用

CPE 对 DNA 碱基混合溶液中的四种碱基表现出优良的电化学识别性能。图

6-8 是四种碱基混合溶液的同时测定曲线, 固定鸟嘌呤和腺嘌呤的浓度为 4.0×10^{-4} mol/L, 胸腺嘧啶的浓度为 2.0×10^{-4} mol/L, 胞嘧啶的浓度从零增大到 2.0×10^{-3} mol/L。电化学扫描发现四个明显的氧化峰依次出现在 0.768 V, 1.040 V, 1.226 V 和 1.412 V 处, 分别对应鸟嘌呤, 腺嘌呤, 胸腺嘧啶和胞嘧啶四种碱基的氧化。相邻两峰之间电位差约 200 mV, 可以进行四种碱基的同时测定。胞嘧啶浓度在 $0 \sim 2.0 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内变化时, 得到电流与浓度的线性回归方程为 $I_{pa}(\mu A) = 0.0388C(\mu mol/L) + 0.20$ ($n=9, \gamma=0.998$)。

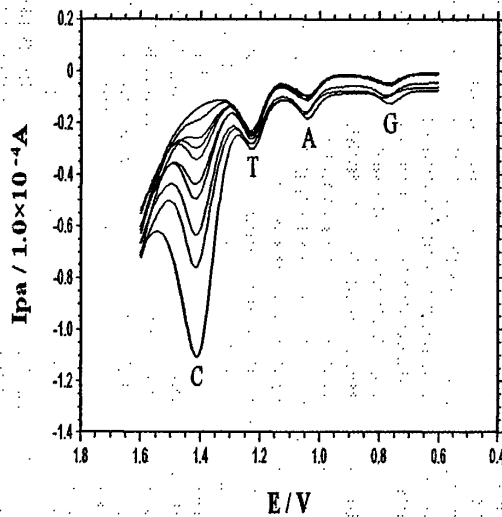


图 6-8 鸟嘌呤, 腺嘌呤, 胸腺嘧啶与不同浓度胞嘧啶共存时的 DPV 图

Fig.6-8 DPV of cytosine on different concentration (from 0 to 2.0×10^{-3} mol/L) in the presence of 4.0×10^{-4} mol/L guanine, 4.0×10^{-4} mol/L adenine and 2.0×10^{-4} mol/L thymine

6.3 结论

本章研究了胞嘧啶在 CPE 上的电化学行为, 在循环伏安扫描中只有一个氧化峰, 表明胞嘧啶在 CPE 上发生不可逆氧化反应, 求解了电化学参数, 电子传递系数 α 为 0.15, 电极反应速率常数 k_s 为 $1.049 \times 10^{-3} s^{-1}$ 。在 1.0×10^{-5} mol/L $\sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 范围内氧化峰电流与胞嘧啶浓度呈线性关系, 检测限为 1.9×10^{-6} mol/L (3σ)。考察了常见的神经递质类物质对胞嘧啶测定的干扰以及四种碱基的电化学同时测定, 结果令人满意。

参考文献

- [1] Brown W. H., Introduction to Organic and Biochemistry, fourth ed. [M], Brooks Cole Publishing, Monterey, 1987, p. 418
- [2] Smith D. L., Elving P. J., Electrochemical reduction of pyrimidine, cytosine and related compounds: polarography and macroscale electrolysis [J], J. Am. Chem. Soc., 1962, 84: 2741~2747
- [3] Webb J. W., Janik B., Elving P. J., Cytosine nucleoside-nucleotide series: Electrochemical study of reduction mechanism, association, and adsorption [J], J. Am. Chem. Soc., 1973, 95: 991~1003
- [4] Dryhurst G., Electrochemistry of Biological Molecules [M], vol. 88, Academic Press, New York, USA, 1977, p. 203
- [5] Palecek E., Jelen F., Reaction of nucleic acid bases with the mercury electrode: determination of submicromolar concentrations of pyrimidine bases by means of cathodic stripping voltammetry [J], Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 1980, 45: 3472~3481
- [6] Palecek E., Jelen F., Hung M. A., et. al, Reaction of the purine and pyrimidine derivatives with the electrode mercury [J], Bioelec trochem. Bioenerg., 1981, 8: 621~631
- [7] Palecek E., Determination of pseudouridine at submicromolar concentrations by cathodic stripping voltammetry at a mercury electrode [J], Anal. Chim. Acta, 1985, 174: 103~113
- [8] Oliviera-Brett A. M., Matsyik F.M., Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode [J], J. Electroanal. Chem., 1997, 429: 95~99
- [9] Oliviera-Brett A. M., Piedade J. A. P., Silva L.A., et. al, Voltammetric determination of all DNA nucleotides [J], Anal. Biochem., 2004, 332: 321~329
- [10] Ivandini T. A., Honda K., Rao T. N., et. al, Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography [J], Talanta, 2007, 71: 648~655
- [11] Yoshida M., Makino K., Morita H., et. al, Substrate and mispairing properties of 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate assessed by in vitro DNA polymerase reactions [J], Nucleic Acids Res., 1997, 25: 1570~1577
- [12] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Free radicals in biology and medicine, third ed. [M], Oxford University Press, New York, 1999

致 谢

本学位论文在孙伟教授的悉心指导下完成。孙伟教授渊博的学识、严谨的治学态度、执着的钻研精神、活跃的学术思想永远是我学习的典范，在此表达我最诚挚的敬意。求学期间，在学习、工作和生活诸方面都得到导师的关心和帮助，再次向孙伟教授表示深深的谢意。

论文完成期间焦奎教授、赵常志教授给予了我热心的指导和帮助，在此真诚地感谢他们。此外感谢本实验室的赵瑞军、覃鹏、王艳、西孟颖、孙晓英、李侠等同学对我无私的帮助和支持。最后，我要特别感谢我的父母对我多年的关爱和支持。

攻读学位期间已发表和待发表的相关学术论文题录

- [1] Wei Sun, Yuanyuan Duan, Yinzhuo Li, Hongwei Gao, Kui Jiao, Electrochemical behaviors of guanosine on carbon ionic liquid electrode and its determination, *Talanta*, 2009, 78: 695~699
- [2] Wei Sun, Yuanyuan Duan, Yinzhuo Li, Tianrong Zhan, Kui Jiao, Electrochemistry and voltammetric determination of adenosine with n-hexylpyridinium hexafluorophosphate modified electrode, *Electroanalysis*, 2009, 21: 2667~2673
- [3] Wei Sun, Yinzhuo Li, Yuanyuan Duan, Kui Jiao, Direct electrocatalytic oxidation of adenine and guanine on carbon ionic liquid electrode and the simultaneous determination, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24: 994~999
- [4] Wei Sun, Yinzhuo Li, Yuanyuan Duan, Kui Jiao, Direct electrochemistry of guanosine on multi-walled carbon nanotubes modified carbon ionic liquid electrode, *Electrochim. Acta* 2009, 16: 4105~4110

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

本人签名：段园园

签字日期：2010年6月12日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青岛科技大学。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

本学位论文属于：

保密 ，在 年解密后适用于本声明。

不保密 。

本人签名：段园园

签字日期：2010年6月12日

导师签字：孙伟

签字日期：2010年6月12日