摘要

第一部分:聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极同时测定多巴胺、抗坏血酸和尿酸

通过循环伏安法,将酸性铬蓝K电化学聚合到玻碳电极表面制得聚酸性铬蓝K 膜化学修饰电极。该修饰电极可以用来同时测定多巴胺(DA)、抗坏血酸(AA) 和尿酸(UA)。采用原子力显微镜(AFM)、衰减全内反射红外光谱(ATR-FTIR)、 电化学阻抗图谱(EIS)和电化学方法对电极表面的聚酸性铬蓝K膜进行了表征。 在pH 4.0的磷酸盐缓冲液介质中,聚酸性铬蓝K膜修饰玻碳电极能够很好的电催化 氧化DA、AA和UA。在示差脉冲伏安曲线上,AA/DA,DA/UA 和AA/UA阳极峰电 位之差分别为193,166和359mV。在最佳实验条件下,DA、AA和UA的阳极峰电流 与其浓度在1.0~200.0,50.0~1000.0和1.0~20.0 μmol·L⁻¹范围内呈良好线性关系, 检测限分别为 0.5,10.0和0.5 μmol·L⁻¹。利用该修饰电极测定盐酸多巴胺注射液中 的DA,维生素C片中的AA和尿样中的UA,获得了令人满意的效果。

第二部分: 聚氨基磺酸修饰玻碳电极测定氨基嘌呤

通过循环伏安法,将氨基磺酸电化学聚合到玻碳电极表面制得聚氨基磺酸膜 化学修饰电极。利用聚氨基磺酸修饰的玻碳电极,采用示差脉冲伏安法,建立了 一种新颖、可行的测定氨基嘌呤的直接电化学方法。采用原子力显微镜(AFM)、 和电化学阻抗图谱(EIS)对电极表面的氨基磺酸膜进行了表征。此修饰电极能够 极大的提高检测氨基嘌呤的灵敏度。在最佳实验条件下,氨基嘌呤的阳极峰电流 与其浓度在3.0×10⁻⁸ ~ 1.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的范围内呈现良好的线性关系,检测限为 8.0×10⁻⁹ mol·L⁻¹(信噪比为3)利用该修饰电极测定维生素B4片中的氨基嘌呤,获 得了令人满意的效果。

第三部分: 钴膜修饰碳纤维微电极选择性测定 H₂PO₄-

利用钴膜修饰碳纤维微电极作为离子选择性电极建立了一种测定磷酸二氢根的新方法。利用该选择性的微电极研究了测定磷酸盐的条件,并测定了该电极的性能参数,在1.0×10⁻⁶~1.0×10⁻³ mol·L⁻¹范围内,磷酸盐的浓度的对数与电位呈良好的线性关系并呈能斯特响应,检出限为6.0×10⁻⁷ mol·L⁻¹,并且该电极有良好的重现性、稳定性和选择性。

第四部分:磷酸根离子敏感电极的研制与应用

制备一种掺杂微米磷酸钴的溶胶-凝胶膜修饰玻碳电极。该电极对磷酸根离子 具有选择性电位响应,线性范围为 10⁻⁸~10⁻⁴ mol·L⁻¹,其斜率为 14.5mV·dec⁻¹。测 定了该电极有关性能参数。该修饰电极具有制备简单、灵敏度高、响应速度快、 稳定性和重现性良好等特点。用于土壤中磷酸根离子的测定,取得了令人满意的 结果。

ABSTRACT

Part 1. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly(acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode

A novel polymerized film of acid chrome blue K (ACBK) was prepared on the surface of a glassy carbon electrode (GCE) by electropolymerization, and then the modified electrode was successfully used to simultaneously determine dopamine (DA), ascorbic acid (AA) and uric acid (UA). The characterization of electrochemically synthesized poly-ACBK film was investigated by atomic force microscopy (AFM), attenuated total reflection (ATR-FTIR), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and voltammetric methods. The poly-ACBK modified GCE exhibited excellent electrocatalytic activity towards the oxidations of DA, AA and UA in 0.05mM phosphate buffer solution (pH 4.0). The separations of anodic peak potentials of AA/DA, DA/UA and AA/UA on this modified electrode are 193, 166 and 359mV in DPV, respectively. Under the optimum conditions, the calibration curves for DA, AA and UA were obtained in the range of 1.0-200.0, 50.0-1000.0 and 1.0-120.0 μ mol·L⁻¹, respectively. The detection limits (S/N = 3) were 0.5, 10.0 and 0.5 μ mol·L⁻¹ for DA. AA and UA, respectively. With good selectively and sensitivity, the present method was applied to the determination of DA in dopamine hydrochloride injections, AA in vitamin C tablets and UA in urine samples.

Part 2. Sensitive determination of adenine on poly(amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode

A novel and reliable direct electrochemical method was established for the detection of adenine, based on the differential pulse anodic stripping response at a poly(amidosulfonic acid) (poly-ASA)-modified glassy carbon electrode (GCE) fabricated by electropolymerization. The characterization of electrochemically synthesized poly-ASA film was investigated by atomic force microscopy and electrochemical impedance spectroscopy. This poly-ASA-modified GCE could greatly enhance the detection sensitivity of adenine. At optimum conditions, the anodic peak exhibits a good linear concentration dependence in the range from 3.0×10^{-8} to 1.0×10^{-6} mol·L⁻¹ (r=0.9994). The detection limit is 8.0×10^{-9} mol·L⁻¹ (S/N=3). The proposed method could be used to determinate the adenine in tablets of vitamin B4 with satisfactory results.

Part 3. Selective determination of dihydrogen phosphate using cobalt membrane modified carbon fiber microelectrode

In this work, a highly selective and sensitive dihydrogen phosphate membrane sensor based on cobalt membrane modified carbon fiber microelectrode is reported. On optimal conditions, the sensor shows a linear dynamic range between 1.0×10^{-6} and 1.0×10^{-3} mol·L⁻¹, with a nice Nernstian behavior in pH of 4.0. The detection limit of the electrode is 6.0×10^{-7} mol·L⁻¹. The sensor possesses the advantages of short response time, good reproducibility, stability and selectivity.

Part 4. The development and application of phosphate anion ion sensitive electrode

Sol-gel containing cobalt phosphate membrane modified glassy carbon electrode was prepared, which showed Nemstian response for PO_4^{3-} in the concentration range of $10^{-8} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with a slope of 14.5 mV·dec⁻¹. Performance parameters of the modified electrodes were studied. This modified electrode was characterized by its simple preparation, high sensitivity, good stability and reproducibility, as well as fast response. In the end, this proposed method was successfully applied to determine the concentration of PO_4^{3-} in soil samples.

扬州大学学位论文原创性声明和版权使用授权书

学位论文原创性声明

本人声明: 所呈交的学位论文是在导师指导下独立进行研究工作所取得的研 究成果。除文中已经标明引用的内容外,本论文不包含其他个人或集体已经发表 的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。 本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名: JR js

学位论文版权使用授权书

本人完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留并向 国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子文档,允许论文被查阅和借 阅。本人授权扬州大学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。同时授权中国 科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》,并通过 网络向社会公众提供信息服务。

学位论文作者签名: 3 4 7 导师签名: - f f j j j j 签字日期: 2009年6月9日 签字日期: 2009年6月(4日

第一章 前言

电分析化学法是研究生命现象最基本过程—电荷运动的重要方法之一,它具 有结构简单、方法多样、检测迅速、无损等特点。近年来,电化学分析在生物、 医学、环境检测领域的研究日新月异,其各种电流理论不断完善,形成了一门独 立的电分析化学研究领域。

代谢是生物体与外界物质和能量的交换过程,是活细胞中所有化学变化的总称。这些化学变化中任一种反应物、中间物或者产物都可被称为代谢物。代谢物 分为中间代谢产物和最终代谢产物。代谢物通常是相对分子质量小于1000的小分 子化合物,由于其存在的生物机制的复杂性,它的分析与核酸蛋白等大分子物质 的分析在方法上有很大的差别,代谢物研究对象主要是生物体液,如尿液和血液 中的小分子化合物。本论文主要研究多巴胺、抗坏血酸、尿酸、氨基嘌呤和磷酸 根等代谢产物。研究的检测内容主要是离子选择性电极、示差脉冲极谱和聚合膜 修饰电极等。

1.1 离子选择性电极

离子选择性电极(Ion selective electrode, ISE)是 20 世纪中期在分析化学领 域出现的一个崭新分支。离子选择性电极是一种简单、迅速、能用于有色和混浊 溶液的非破坏性分析工具,它不要求复杂的仪器,可以分辨不同离子的存在形式, 能测量少到几微升的样品,所以十分适用野外分析和自动连续监测。这一分析技 术也成为电化学分析法的一个独立分支科学。与其它分析方法相比,它在阴离子 分析方面特别具有竞争能力。电极对活度产生响应这一点也有特殊意义,使它不 但可用作配合物化学和动力学的研究工具,而且通过电极的微型化已被用于直接 观察体液甚至细胞内某些重要离子的活度变化。

1.1.1 离子选择性电极的分析原理

离子选择性电极是一类指示电极,它的电化学活性元件是个"膜"称活性膜或 敏感膜^[1]。离子选择性电极由敏感膜,内导体系,电极腔体等组成,是一类电化 学传感器。在试样溶液分析中就是利用它的敏感膜,直接地,有选择地将被测离 子的浓度(活度)转换成电讯号---电位,而此电位与溶液中给定离子活度的负对 数成线性关系。在此基础上建立起来的分析方法称为离子选择性电极分析法。

离子选择性电极分析法遵循能斯特(Nernst)公式,在离子选择性电极中薄 膜能使溶液中某些组分有选择性地,不相等地渗透,这种膜称为电化学膜。它的 重要性质是在两个溶液中能形成电位差。假设离子选择性电极 i 离子有选择性响 应,则选择性电极膜仅允许 i 离子由薄膜外部表面接触的溶液进入电极内部溶液。 而内部溶液中含有一定活度的平衡离子,当电极浸入试样溶液中时,由于薄膜内 外离子活度的不同,可移动的离子将由活度高的试样溶液向活度低的内充溶液有 一瞬间的通量,而其它离子 j 就被阻止不能通过^[2]。因离子带有电荷,此时电极 膜两侧电荷分布不均匀,就形成了双电层,产生了一定的电位差,即电极的选择 性膜电位。

膜电位可以看成是一种浓差电位。因此,膜电位 *E*_M 与离子活度的关系,可以用浓差电池表示:

$$E_{M} = \frac{2.303RT}{Z_{i}F} \lg \frac{\alpha_{i}}{\alpha_{i}}$$
(1-1)

式中: a_i—离子 i 的活度;

Z_i—离子 i 的电荷;

F—将电荷转化以克分子表示的法拉第常数,为96487($c \cdot mol^{-1}$);

R—气体常数, 8.31(J/mol·K);

T—绝对温度, 273+t (K)。

因为离子选择性电极的内充溶液中离子活度 ai 是固定的,故上式可表示为:

$$E_M = E_0 \pm \frac{2.303RT}{Z_i F} \lg \alpha_i \tag{1-2}$$

其中: 当离子活度 α_i =1 时, E₀ 定义为电极的标准电势; 2.303 RT/Z_iF 值称 为电极的理论斜率,对一价离子 25 ℃ 时此值为 59.16 mV,对二价离子为 29.58 mV。被测离子是阳离子时取"+"号; 阴离子时取"-"号。即试液中阳离子浓度愈 大,电池电动势 E_M 愈大,反之愈小; 试液中被测阴离子浓度愈大,电池电动势 E_M 愈小,反之愈大。

(1-2)为 Nernst 公式的一般形式,当离子电极与参比电极构成测量电池时,可表示成:

$$E = E_0' + \frac{2.303RT}{nF} \lg \alpha_i$$
 (1-3)

式中: $E_0' = E_0 - E_{ret} - E_{j}$ 包括离子电极标准电势 E_0 ,参比电极电势 E_{ret} 及液接界 电势 E_i 。而 E_0 一般由内参比电极电势,内膜电势及膜的不对称电势所组成。

1.1.2 离子选择电极分析方法的特点

与其它分析方法相比,离子选择电极具有许多独特的优点。

(1)离子选择电极是一种直接的、非破坏性的分析方法,它不受样品的颜色,浑 浊,悬浮物或粘度的影响,用少量样品可以实现测量。

(2)离子电极分析所需设备简单、操作方便,仪器及电极均可携带,适合现场测 定。

(3)离子电极分析速度快,典型的单次分析只需要一到两分钟。因此可以应用电极进行反复测量,达到减少误差的目的。

(4) 电机输出为电信号,不需要经过转化就可以直接放大及测量记录。因此采用 电极法容易实现自动、连续测量及控制。

(5) 电极法的测量范围广,灵敏度高。

(6)离子电极分析法还有一些独特的长处:离子电极电位所响应的是溶液中给定 离子的活度,而不是一般分析中离子之总浓度。

1.1.3 离子选择性电极的应用

二十世纪八十年代末期以来,离子选择电极分析方法日益趋于成熟。随着离 子电极的膜材料和制作技术的不断改进和革新,它的应用范围也不断的扩展。目 前,已经制备了多种类型的离子选择电极。如在分析无机离子方面已制成 Ag⁺选 择电极^[3]、Zr²⁺选择电极^[4]、新型 Co²⁺选择电位传感器^[5]、Pb²⁺选择电极^[6]、Al³⁺ 选择电极^[7]、Ca²⁺选择电极^[8]、Ta⁺选择电极^[9]和氟化物选择电极^[10]等;在药物分 析方面,利用药物电极对药物进行直接电位测定,如测定普鲁卡因胺^[11],诺氟沙 星^[12]、氧氟沙星^[13]。

除研制各种新型离子电极外,离子选择性电极正向微型化、多功能化方向发展,并且应用范围不断扩展。如胡卫军等^[14]采用硫属玻璃敏感材料,结合脉冲激 光沉积技术与光寻址电位传感器的特点,在光寻址电位传感器表面上沉积对镉离 子敏感的薄膜材料,研制出一种新型的镉离子敏感薄膜传感器; O.O. Soldatkina等 ^[15]将葡萄糖氧化酶和己糖激酶固定到聚间苯二胺膜修饰的铂微电极的表面来选择 性的测定ATP; Balazs Csoka等^[16]研制了Cu²⁺选择碳糊微电极,该选择性微电极可 应用于扫描电化学显微镜的电流和电位两种模式。Mamun Jamala等^[17]制备了一种 稳定且选择性良好的谷氨酸氧化酶修饰铂微电极测定人体肝脏中的丙氨酸转氨 酶。

1.2 聚合物膜修饰电极

近十年来,电聚合高聚物包括导电的和非导电的聚合物膜更广泛用来构筑各 种化学和生物传感器。功能化导电聚合物修饰电极在分子水平实现了新功能体系 的设计,而非导电聚合物具有强的抗干扰能力和快的伏安响应,他们引起了许多 电化学研究者的广泛关注。

目前,聚合物膜修饰电极已发展为几大类,包括导电性、氧化还原性、离子 交换性和惰性的聚合物膜修饰电极。 1.2.1 聚合物膜修饰电极上的电极反应全过程

图 1.1 为聚合物修饰电极在含氧化还原活性物质的溶液中,电化学响应的模 式图^[18],它直观地给出了在聚合物修饰电极上的电极反应全过程:①电极与修饰 膜内电活性物之间的非均相电子移动反应;②电极修饰膜中电荷与物质的移动; ③膜内固定的电活性物质与溶液本体相中的氧化还原性物质间的电子交换反应 等。



图 1.1 聚合物膜修饰电极上的电荷(电子)转移过程

在图 1.1 中, O_x(膜)与 R_{ed}(膜)分别为聚合物膜修饰中固定的电活性氧化还原 电对的氧化体和还原体, P 和 Q 分别为从溶液本体相向膜中扩散的氧化还原活性 物质(即: 基质)的氧化体和还原体, k₁ 和 k₁分别表示正方向和逆方向的电子交 换反应速率常数。从该模式图可知,聚合物膜修饰电极上的电极反应全过程主要 有以下几个过程:

(1) 溶液中基质向膜/溶液界面的扩散过程 iA;

(2) 溶液中基质跨过膜/溶液界面的过程 ip;

(3) 溶液中基质在聚合物膜中的扩散过程 is;

(4) 膜中氧化还原体间的电子转移过程(膜中电子扩散) i_E;

(5) 氧化还原体与溶液中基质交叉反应(电催化反应) i;

(6) 氧化还原体在膜/电极界面的异相电子转移 is,

1.2.2 聚合物膜修饰电极的特点

聚合物又称高聚物,是由低分子化合物(单体)经由化学聚合和电化学聚合 反应而形成的。总的来说,聚合物膜修饰电极具有以下特点:

(1)聚合物膜修饰电极的制备方法多(可由滴涂、旋涂、电沉积、等离子聚合、 电化学聚合等),再加上能发生聚合的单体种类多,所以可以制备各种功能的化学 及生物传感器。

(2)聚合物膜修饰电极操作简单,容易制备。另外所制备的膜中含有更多的活性中心(约10⁻¹⁰~10⁻⁶mol·cm⁻²,相当于1~10⁵个)且活性中心呈三维分布,可使反应在三维空间内进行成为可能,十分有利于电催化,因而使化学修饰电极的研究面目一新。

(3)聚合物膜具有良好的化学和物理稳定性,与通过吸附法和共价键合方法制得的传感器相比,聚合物膜与基体电极有更强的结合力。因此聚合物膜修饰电极具 有更强的机械强度,有更强的催化能力以及其对某些分析底物有特定的选择性预 富集作用,所以他们的应用大大增强了传感器的稳定性、选择性和灵敏度。

聚合物膜修饰电极比其它任何类型的修饰电极应用更为广泛,成为一个重要的发展方向。

1.2.3 聚合物膜修饰电极的应用

聚合物薄膜具有三维空间结构的特征,可提供许多能利用的势场,薄膜厚度 大约为 10-1000nm,相当于几百至上万个单分子层,薄膜内含有大量的活性基电 活性氧化还原体或化学活形体,十分有利于电催化。另一方面,聚合物膜修饰电 极有目的地在电极表面接着所选择的化学功能团,赋予电极某种特定的性质,可 高选择地进行所期望的反应。

近年来聚合物薄膜修饰电极的应用尤其在电催化作用方面的应用主要有:(1) 对生物大分子,如血红蛋白、肌红蛋白、NADH等的电催化作用及分析应用^[19-23]; 如 D. Shan 等^[20]基于血红素在聚(丙烯腈-丙烯酸)修饰玻碳电极上的直接电化学 制成了过氧化氢传感器; K. Qiao 等^[21]利用非离子的聚乙二醇和二氧化锆纳米粒 子修饰电极电催化肌红蛋白; D. Gligor 等^[22]利用聚噻吩衍生物修饰玻碳电极实现 了对 NADH 的电催化氧化。(2) 对生物小分子,如儿茶酚类神经递质等的电催化 作用并力求用于活体监测^[24-26];如 C. X. Chen 等^[24]利用聚(苯胺-对氨基苯酚)制 备了儿茶酚传感器,此共聚膜修饰电极能够很好的催化氧化儿茶酚。(3) 对其它 物质,如亚硝酸盐、抗坏血酸和苯酚类物质的电催化作用^[27-32]等。如 X. Huang 等^[27]利用金纳米粒子和聚三甲基噻吩的复合物修饰的玻碳电极可以测定亚硝酸 盐和碘酸盐; 苯酚和磺酸盐的复合物修饰电极可以对苯酚进行电催化氧化; S. A. Kumar 等^[28]电聚合直接耐晒蓝到玻碳电极表面选择性的测定抗坏血酸; M. A. Heras 等^[31]利用聚(3,4-亚乙二氧基噻吩)-聚(苯乙烯磺酸)修饰电极电化学氧化苯 酚。

1.3 磷酸盐的电分析研究现状

磷元素是生命体重要的基本元素之一,参与了许多重要的生命过程。磷酸盐 作为营养和能量的携带者,在人类的生命活动中起到十分重要的作用。人体中有 多种山磷酸根与某些有机基团结合而构成的物质。它们在人的生命活动中起着重 要的作用。其中最重要的有核酸和三磷酸腺苷(ATP)。

生物体通过生物氧化所产生的能量,除一部分用于维持体温外,大部分可以 通过磷酸化作用转移至高能磷酸化合物 ATP 中。此种伴随放能的氧化作用而进行 的磷酸化称为氧化磷酸化作用。ATP 主要由 ADP 磷酸化所生成,少数情况下, 可由 AMP 焦磷酸化而生成 (如下所示)。

ADP+Pi+能量→ATP

AMP+PPi+能量→ATP

因此生命有机磷和生命无机磷等含磷化合物的研究一直是化学、生物化学、 分子生物化学研究的前沿课题。含有磷酸盐的产品已广泛应用在医药、生命科学、 临床医学、工业生产、环境保护等领域^[33],开发新方法快速、简便的检测磷酸盐, 已经引起研究者的重视。目前,有各种关于磷酸盐测定的方法,包括离子色谱法^{[34,} 35],荧光法^[36, 37],分光光度法^[38],微波加热分光光度法^[39]等。

对磷酸盐离子选择电极的电分析研究,目前已有很多这方面的报道。如: E. Khaled等^[40]用硫脲做为离子载体制成新型磷酸盐丝网印刷选择电极,磷酸氢盐离子在1.0×10⁻⁵~1.0×10⁻² mol·L⁻¹浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为32.8 mV·dec⁻¹,并且电极寿命可长达4个月;苏宾等^[41]用电沉积在紫铜基体上电沉积钴磷合金制备成的磷酸盐响应电极,在1.0×10⁻⁵~1.0×10⁻² mo·L⁻¹浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为21.0 mV·dec⁻¹,检测下限为9×10⁻⁶ mol·L⁻¹; R.Q. Yu等^[42]报道了基于双核有机锡高分子膜的磷酸氢盐离子选择性电极,在5.0×10⁻⁶~1.0×10⁻² mol·L⁻¹浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为-30.1 mV·dec⁻¹; W. Liu等^[43]基于大环氨基化合的二茂铁的PVC膜电极选择测定磷酸氢盐,在1.0×10⁻⁵~1.0×10⁻¹ mol·L⁻¹浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为29.8 mv·dec⁻¹; D. Xiao等^[44]利用钴作为基体制成磷酸盐的选择性电极,在1.0×10⁻⁵~1.0×10⁻² mol·L⁻¹ 浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为32.8 mV·dec⁻¹; D. Xiao等^[44]利用钴作为基体制成磷酸盐的选择性电极,在1.0×10⁻⁵~1.0×10⁻² mol·L⁻¹ 浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为29.8 mV·dec⁻¹; D. Xiao等^[44]利用钴作为基体制成磷酸盐的选择性电极,在1.0×10⁻⁵~1.0×10⁻¹ mol·L⁻¹ 浓度范围内呈能

1.4 嘌呤类化合物的电分析研究现状

嘌呤是一种重要的双环杂原子化合物,和嘧啶是组成遗传物质——核酸的重要 碱基,本身由嘧啶环和咪唑环缩合而成,最初由 EmilFischer 命名。嘌呤是细胞中 核物质的组成元素,在正常情况下,从饮食摄入的嘌呤和人体自身代谢生成的嘌 呤会以尿酸的形式通过肾脏从尿中排出,"入"与"出"处于动态平衡中。一旦这种 平衡被破坏,就引起痛风。痛风的营养治疗就要把好饮食关,使嘌呤的摄入量尽 量降低,低嘌呤膳食在痛风的治疗中极其重要。因此,研究嘌呤碱基的分离和测 定在生化、医学、药物和食品行业中都具有很重要的现实意义。

DNA 是遗传信息的储存和携带者,是核酸的重要组成部分,它决定生物物种的遗传特征。鸟嘌呤(G),氨基嘌呤(A),胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)四种碱基是 DNA 的重要组成部分。目前,已有许多方法用于测定核酸中的嘌呤,包

括高效液相色谱法^[46-49],毛细管电泳法^[50-55],胶束电动色谱法^[56],化学发光法^[57]。

嘌呤类化合物的电化学分析研究已有很多相关报道。如:Z.H.Wang等^[58]利用 β -环糊精包裹碳纳米管修饰电极同时测定氨基嘌呤和鸟嘌呤,其检测限分别为0.1 和0.2 mg·mL⁻¹; H.Y.Liu等^[59]制备了聚硫瑾/金纳米粒子/多壁碳纳米管修饰玻碳电 极,利用此电极同时测定了DNA中的氨基嘌呤和鸟嘌呤,其检测限分别为1×10⁻⁸ 和8×10⁻⁹ mol·L⁻¹; H.Y.Chen等^[60]利用预处理玻碳电极同时测定氨基嘌呤和鸟嘌 呤,其检测限为3.0×10⁻⁸ mol·L⁻¹; P.A.M.Farias等^[61]利用滴汞电极在铜的存在下, 采用吸附溶出伏安法超痕量的测定了氨基嘌呤,其检测限达到3.0×10⁻¹¹ mol·L⁻¹。

1.5 多巴胺、抗坏血酸和尿酸的电分析研究现状

多巴胺是非常重要的单胺类神经递质,也是重要的激素物质,在人体的心血 管系统等组织系统中有广泛的调节作用,抗坏血酸是维持人体健康必需的维生素, 尿酸是人体内嘌呤代谢的最终产物。因此,测定多巴胺、抗坏血酸 和尿酸有着十 分重要的意义。电分析方法测定这三种物质的有关报道已有很多。特别是化学修 饰电极被研制来提高测定的选择性^[62-67]。

聚合物膜修饰电极作为重要的化学修饰电极之一,越来越多的被应用于有选 择性的测定多巴胺、抗坏血酸和尿酸。例如:L.Zhang 等^[68]利用聚苯胺/聚氨基苯 磺酸复合膜修饰玻碳电极同时测定了抗坏血酸和尿酸;L.Q.Lin 等^[69]将埃文斯蓝 电聚合到玻碳电极表面,利用此修饰电极同时测定了多巴胺、抗坏血酸和尿酸三 种物质,取得了良好的结果;A.L.Liu 等^[70]制得聚钙羧酸指示剂修饰玻碳电极, 同时分离并测定了抗坏血酸、尿酸和肾上腺素;S.A.Kumar 等^[71]利用聚(4-氨基 1-1'-偶氮苯-3,4'-二磺酸)修饰电极选择性的测定了多巴胺;A.H.Lin 等^[72]利用 聚丙烯酸/多壁碳纳米管复合物修饰玻碳电极在抗坏血酸存在的条件下,同时测定 了多巴胺和尿酸;P.R.Roy 等^[73]通过聚(N,N'-二甲基苯胺)修饰玻碳电极实现 了对尿酸和抗坏血酸的同时检测;H.Yao 等^[74]通过电化学聚合得到聚铬黑 T 修 饰玻碳电极,利用此修饰电极同时分离并测定了多巴胺、抗坏血酸和尿酸。

1.6 本论文的主要研究内容及创新点

一、采用电聚合的方法首次将酸性铬蓝 K 聚合到玻碳电极表面制得聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极。运用多种手段对聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极进行了表征和研究。该修饰电极对多巴胺、抗坏血酸和尿酸有明显的电催化作用,并可以用于同时测定这三种物质。此方法可用于测定针剂中的多巴胺, VC 片中的抗坏血酸和尿样中的尿酸。

二、通过循环伏安法将氨基磺酸电化学聚合到玻碳电极表面制得聚氨基磺酸修饰 电极。研究了氨基嘌呤在该修饰电极上的伏安行为,建立了测定氨基嘌呤的新方 法。本方法可以准确的测定维生素 B₄ 片中氨基嘌呤的含量。

三、利用钴膜修饰碳纤维微电极作为离子选择性电极建立了一种测定磷酸二氢根 的新方法,磷酸二氢根的浓度的负对数与电位呈能斯特响应,该电极有良好的重 现性,稳定性和选择性。

四、 首次制备了掺杂磷酸钴微米粒子的溶胶-凝胶膜修饰玻碳电极。该电极对磷 酸根离子有选择性的电位响应,用于土壤中磷酸根的测定取得了令人满意的结果。 该修饰电极制备简单、灵敏度高、响应速度快、稳定性和重现性好。

1.7 参考文献

- [1] 李启隆, 电分析化学, 北京, 北京师范大学出版社, 1997.
- [2] 杜宝中, 环境监测中的电化学分析法,北京, 化学工业出版社环境科学与工程出版中心, 2003.
- [3] W. Ngeontae, W. Janrungroatsakul, N. Morakot, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, New silver selective electrode fabricated from benzothiazole calix[4]arene: Speciation analysis of silver nanoparticles, *Sensor. Actuat. B*, 2008, 134, 377.
- [4] H. A. Arida, Novel PVC membrane-based thoron ion selective electrode and its application: Determination of zirconium, *Talanta*, 2008, 76, 40.

- [5] P. Kumar, Y. B. Shim, A novel cobalt(II)-selective potentiometric sensor based on p-(4-n-butylphenylazo)calix[4]arene, *Talanta*, 2009, 77, 1057.
- [6] X. G. Li, X. L. Ma, M. R. Huang, Lead(II) ion-selective electrode based on polyaminoanthraquinone particles with intrinsic conductivity, *Talanta*, 2009, 78, 498.
- [7] V. K. Gupta, R. N. Goyal, A. K. Jain, R. A. Sharma, Aluminium (III)-selective PVC membrane sensor based on a Schiff base complex of N,N'-bis (salicylidene)-1, 2-cyclohexanediamine, *Electrochimica Acta*, 2009, 54, 3218.
- [8] 黄载福,徐伟,郭斌,新型钙离子选择电极测定血清中总钙,分析化学, 1993,21,1058.
- [9] A. C. L. Conceiçao, M. M. C. Santos, M. L. S. Simoes Gonçalves, Adaptation of a commercial ion selective fluoride electrode to a tubular configuration for analysis by flow methodologies, *Talanta*, 2008, 76, 107.
- [10] A. A. Abdel Gaber, New thallium(I) ion selective electrode based on indeno pyran compound, Sensor. Actuat. B, 2003, 96, 615.
- [11] T. K. K. Fruno, S. Yamashita, Ion-selective electrode for procainamide determination in blood serum, Anal. Chim. Acta, 1995, 312, 35.
- [12] 贾云宏,李东辉,于秋汉,聚氯乙烯诺氟沙星选择电极的研制及应用,分 析化学,2002,30,1531.
- [13] 吴静,赵海兰,魏林恒,氧氟沙星聚氯乙烯涂层玻璃电极研制及应用,分 析化学,2001,29,1106.
- [14] 胡卫军,李 毅,邹绍芳,王 平,基于脉冲激光沉积的新型镉离子薄膜传感器,浙江大学学报,2008,42,286.
- [15] O. O. Soldatkin, O. M. Schuvailo, S. Marinesco, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin, Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection, *Talanta*, 2009, 78, 1023.
- [16] B. Csoka, Z. Mekhalif, Carbon paste-based ion-selective dual function

microelectrodes for SECM measurements, Electrochim. Acta, 2009, 54, 3225.

- [17] M. Jamala, O. Worsfolda, T. McCormacb, E. Dempseya, A stable and selective electrochemical biosensor for the liver enzyme alanine aminotransferase (ALT), *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 2926.
- [18] 董绍军,车广礼,谢远武, 化学修饰电极,北京,科学出版社,2003.
- [19] N. Q. Jia, Q. Lian, Z. Y. Wang, H. B. Shen, A hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin incorporated in PEO-PPO-PEO triblock copolymer film, 2009, Sensor. Actuat. B, 137, 230.
- [20] D. Shan, G. X. Cheng, D. B. Zhu, H. G. Xue, S. Cosnier, S. N. Ding, Direct electrochemistry of hemoglobin in poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) and its catalysis to H₂O₂, 2009, Sensor. Actuat. B, 137, 259.
- [21] K. Qiao, N. F. Hu, Direct electron transfer and electrocatalysis of myoglobin loaded in layer-by-layer films assembled with nonionic poly(ethylene glycol) and ZrO₂ nanoparticles, *Bioelectrochemistry*, 2009, 75, 71.
- [22] D. Gligor, Y. Dilgin, I. C. Popescu, L. Gorton, Poly-phenothiazine derivative-modified glassy carbon electrode for NADH electrocatalytic oxidation, *Electrochim. Acta*, 2009, 54, 3124.
- [23] S. A. Kumar, S. M. Chen, Electrochemically polymerized composites of conducting poly(p-ABSA) and flavins (FAD, FMN, RF) films and their use as electrochemical sensors: A new potent electroanalysis of NADH and NAD⁺, Sensor: Actual. B, 2007, 123, 964.
- [24] C. X. Chen, C. Sun, Y. H. Gao, Application of electrosynthesized poly(aniline-co-p-aminophenol) as a catechol sensor, *Electrochim. Acta*, 2009, 54, 2575.
- [25] S. Cosnier, S. Szunerits, R. S. Marks, J. P. Lellouche, K. Perie, Mediated electrochemical detection of catechol by tyrosinase-based poly(dicarbazole) electrodes, J. Biochem. Biophy. Methods, 2001, 50, 65.

- [26] S. L. Mu, Catechol sensor using poly(aniline-co-o-aminophenol) as an electron transfer mediator, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21, 1237.
- [27] X. Huang, Y. X. Li, Y. L. Chen, L. Wang, Electrochemical determination of nitrite and iodate by use of gold nanoparticles/poly(3-methylthiophene) composites coated glassy carbon electrode, 2008, Sensor. Actuat. B, 134, 780.
- [28] S. A. Kumar, P. H. Lo, S. M. Chen, Electrochemical selective determination of ascorbic acid at redox active polymer modified electrode derived from direct blue 71, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 518.
- [29] B. Z. Wang, T. Noguchi, J. I. Anzai, Layer-by-layer thin film-coated electrodes for electrocatalytic determination of ascorbic acid, *Talanta*, 2007, 72, 415.
- [30] G. Y. Kim, N. M. Cuong, S. H. Cho, J. Shim, J. J. Woo, S. H. Moon, Improvement of an enzyme electrode by poly(vinyl alcohol) coating for amperometric measurement of phenol, *Talanta*, 2007, 71, 129.
- [31] M. A. Heras, S. Lupu, L. Pigani, C. Pirvu, R. Seeber, F. Terzi, C. Zanardi, A poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulphonate) composite electro- de coating in the electrooxidation of phenol, *Electrochim. Acta*, 2005, 50, 1685.
- [32] L. Pigani, M. Musiani, C. Pirvu, F. Terzi, C. Zanardi, R. Seeber, Electro-oxidation of chlorophenols on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)- poly(styrene sulphonate) composite electrode, *Electrochim. Acta*, 2007, 52, 1910.
- [33] S.A. Glazier, M.A. Arnold, Phosphate-selective polymer membrane electrode. Anal.Chem., 1988, 60, 2540.
- [34] M. Ikedo, M. Mori, K. Kurachi, W. Hu, K. Tanaka, Selective and simultaneous determination of phosphate and silicate ions in leaching process waters for ceramics glaze raw materials of narutal origin by ion-exclusion chromatography coupled with UV-detection after postcolumn derivatization, *Anal. Science*, 2006, 22, 117.
- [35 王野秋,顾明通,姜淑荣等,电导检测离子色谱法测定多聚磷酸盐,分析测

试学报,1996,13,28.

- [36] M. J. Vazquez, B. Rodriguez, C. Zapatero, D. G. Tew, Determination of phosphatein nanomolar range by an enzyme-coupling fluorescent method, *Anal. Biochem.*, 2003, 20, 292.
- [37] 施丽芳, 王冬媛, 赵一兵, 铽-钛铁试剂络合物荧光猝灭法测定磷酸盐, 分析 化学, 2004, 32, 335.
- [38] 曲秀花,叶明亮,郜洪文,双波长分光光度法测定饮料色度和磷酸盐,光谱 实验室,1999,16,468.
- [39] 高歧,李玉华,张泽志,微波加热分光光度法在磷酸根含量测定中的应用, *河海农业大学学报*,2002,36,95.
- [40] E. Khaled, H. N. A. Hassan, A. Girgis, R. Metelka, Construction of novel simple phosphate screen-printed and carbon paste ion-selective electrodes, *Talanta*, 2008,77, 737-743.
- [41] 苏宾,袁红雁,唐志文,肖丹,王柯敏,基于钴磷合金的磷酸根离子敏感电极研究,广西化工,2000,S1,91.
- [42] D. Liu, W. C. Chen, R. H. Yang, G. L. Shen, R. Q. Yu, Polymeric membrane phosphate sensitive electrode based on binuclear organotin compound, *Anal.Chim. Acta*, 1997, 338, 209.
- [43] W. Liu, Xl Li, M. P. Song, Y. J. Wu, A novel dibasic phosphate-selective electrode based onFerrocene-bearing macrocyclic amide compound, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 12, 609.
- [44] D. Xiao, H. Y. Yuan, J. Li, R. Q. Yu, Surface-Modified Cobalt-Based Sensor as a Phosphate-Sensitive Electrode, Anal. Chem., 1995, 6, 288.
- [45] F. Kivlehan, W. J. Mace, H. A. Moynihan, D. W.M. Arrigan, Potentiometric evaluation of calix[4]arene anion receptors in membrane electrodes: Phosphate detection, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 58, 154.
- [46] R. S. Sheng, F. Ni, T. M. Cotton, Determination of Purine Bases by Reversed-Phase

High-Performance Liquid Chromatography Using Real-Time Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, Anal. Chem., 1991, 63, 437.

- [47] T. A. Ivandini, K. Hond, T. N. Rao, A. Fujishima, Y. Einag, Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography, *Talanta*, 2007, 71, 648.
- [48] P. Garcia del Moral, M. J. Arin, J. A. Resines, M. T. Diez, Simultaneous determination of adenine and guanine in ruminant bacterial pellets by ion-pair HPLC, J. Chromatogr. B, 2005, 826, 257.
- [49] 凌云,王新宴,雍炜,袁家齐,储晓刚,高效液相色谱法检测肉类食品中4种 嘌呤碱,分析化学,2008,36,724
- [50] M. J. Markuszewski, P. Britz-McKibbin, S. Terabe, K. Matsuda, T. Nishioka, Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in bacillus subtilis cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A, 2003, 989, 293.
- [51] P. Kiessling, K. E. Scrib, F. Suss, G. Werner, H. Knoth, M. Hartmann, Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay and a capillary electrophoresis assay for the analysis of adenosine and the degradation product adenine in infusions, J. Pharmaceut. Biomed., 2004, 36, 535.
- [52] C. S. Robb, S. C. Yang, P. R. Brown, Enhanced analysis of purine and pyrimidine bases by the use of double-strand polyaniline coatings in micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis*, 2002, 23, 1900.
- [53] C. W. Klampfl, M. Himmelsbach, W. Buchberger, H. Klein, Determination of purines and pyrimidines in beer samples by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 454, 185.
- [54] Y. C. Huang, C. C. Lin, C. Y. Liu, Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers based on 9-ethyladenine for the recognition of nucleotide bases in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 2004, 25, 554.

- [55] X. Xiong, J. Ouyang, W. R. G. Baeyens, J. R. Delanghe, X. M. Shen, Y. P. Yang, Enhanced separation of purine and pyrimidine bases using carboxylic multiwalled carbon nanotubes as additive in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 2006, 27, 3243.
- [56] W. P. Wang, L.Zhou, S. M. Wang, Z. Luo, Z. D. Hu, Rapid and simple determination of adenine and guanine in DNA extract by micellar electrokinetic chromatography with indirect laser-induced fluorescence detection, *Talanta*, 2008, 74, 1050.
- [57] E. B. Liu, B. C. Xue, Flow injection determination of adenine at trace level based on luminol-K₂Cr₂O₇ chemiluminescence in a micellar medium, J. Pharmaceut. Biomed., 2006, 41, 649.
- [58] Z. H. Wang, S. F. Xiao, Y. Chen, β-Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine, J. Electroanal. Chem., 2006, 589, 237.
- [59] H. Y. Liu, G. F. Wang, D. L. Chen, W. Zhang, C. J. Li, B. Fang, Fabrication of polythionine/NPAu/MWNTs modified electrode forsimultaneous determination of adenine and guanine in DNA, *Sensor. Actuat. B*, 2008, 128, 414.
- [60] H. S. Wang, H. X. Ju, H. Y. Chen, Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461, 243.
- [61] P. A. M. Farias, A. L. R. Wagener, A. A. Castro, Ultratrace determination of adenine in the presence of copper by adsorptive stripping voltammetry, *Talanta*, 2001, 55, 281.
- [62] C. Y. Deng, J. H. Chen, M. D. Wang, C. H. Xiao, Z. Nie, S. Z. Yao, A novel and simple strategy for selective and sensitive determination of dopamine based on the boron-doped carbon nanotubes modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 2091.

- [63] M. Mazloum-Ardakani, H. Beitollahi, B. Ganjipour, H. Naeimi, M. Nejati, Electrochemical and catalytic investigations of dopamine and uric acid by modified carbon nanotube paste electrode, *Bioelectrochemistry*, 2009, 75, 1.
- [64] A. I. Gopalan, K. P. Lee, K. M. Manesh, P. Santhosh, J. H. Kim, J. S. Kang, Electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid at a novel gold nanoparticles distributed poly(4-aminothiophenol) modified electrode, *Talanta*, 2007, 71, 1774.
- [65] H. S. Wang, T. H. Li, W. L. Jia, H. Y. Xu, Highly selective and sensitive determination of dopamine using a Nafion/carbon nanotubes coated poly(3-methylthiophene) modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22, 664.
- [66] P. Kalimuthu, D. Suresh, S. A. John, Uric acid determination in the presence of ascorbic acid using self-assembled submonolayer of dimercaptothiadiazole modified gold electrodes, *Anal. Biochem.*, 2006, 357, 188.
- [67] Y. Liu, J. S. Huang, H. Q. Hou, T. Y. You, Simultaneous determination of opamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode, *Electrochem. Commun.*, 2008, 10, 1431.
- [68] L. Zhang, C. H. Zhang, J. Y. Lian, Electrochemical synthesis of polyaniline nano-networks on *p*-aminobenzene sulfonic acid functionalized glassy carbon electrode: Its use for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 690.
- [69] L. Q. Lin, J. H. Chen, H. Yao, Y Z. Chen, Y. J. Zheng, X. H. Lin, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at poly (Evans Blue) modified glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, 2008, 73, 11.
- [70] A. L. Liu, S. B. Zhang, W. Chen, X. H. Lin, X. H. Xia, Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23, 1488.

- [71] S. A. Kumar, C. F. Tang, S. M. Chen, Poly(4-amino-1-1'-azobenzene-3, 4'-disulfonic acid) coated electrode for selective detection of dopamine from its interferences, *Talanta*, 2008, 74, 860.
- [72] A. H. Liu, I. Honma, H. S. Zhou, Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid at their physiological level in the presence of ascorbic acid using poly(acrylic acid)-multiwalled carbon-nanotube composite-covered glassy-carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 23, 74.
- [73] P. Rani Roy, T. Okajima, T. Ohsaka, Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly(N, N'-dimethylaniline) film-coated GC electrode, J. Electroanal. Chem., 2004, 561, 75.
- [74] H. Yao, Y. Y. Sun, X. H. Lin, Y. H. Tang, L. Y. Huang, Electrochemical characterization of poly(eriochrome black T) modified glassy carbon electrode and its application to simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid, *Electrochim. Acta*, 2007, 52, 6165.

第二章 聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极同时 测定多巴胺、抗坏血酸和尿酸

多巴胺 (DA)、抗坏血酸 (AA)和尿酸 (UA) 是生物、医学领域的重要化合物, 在人体的新陈代谢过程中起着重要作用。DA 是哺乳动物的中枢神经系统中一类重 要的儿茶酚胺类神经传递质^[1,2],它对神经中枢、肾脏、激素的的分泌和心血管系 统有重要的作用^[3,4]。因此,DA 的缺乏可以导致神经系统紊乱,如帕金森症和精 神分裂症^[5]。AA 无论在动物界还是植物界都是一种重要的维他命,它的抗氧化性 性质也倍受重视,它被用来预防和治疗感冒、精神病、营养不良、癌症和艾滋^[6]。 UA 是嘌呤代谢的主要最终产物。身体中尿酸含量的不正常可能引发多种疾病, 如痛风、高尿酸血症和莱施-尼汉综合症^[7]。因此,同时测定 DA、AA 和 UA 不 仅对生物医药化学和神经化学有重要意义,而且可用于诊断和病理学的研究。然 而,由于在常规的电极(如金属、玻碳)上,它们有相近氧化电位,并且氧化产 物很容易吸附在电极表面污染电极,所以很难直接同时测定这三种物质^[8-10]。因 此,研制简单、快速且没有相互交叉干扰的测定方法是十分必要的。这种情况下, 生物化学和电分析化学家在这一领域起到了重要的作用,研制出各种分析测定这 三种物质的修饰电极。已经报道的有聚合物膜^[11-16],纳米粒子^[17],自组装单层膜 ^[18],金属氧化物^[3,19]等修饰电极可以在同一体系中同时测定这三种物质。

近来,聚合物膜修饰电极由于它在化学传感器和生物传感器方面的广泛应用, 已经引起了研究者极大的兴趣^[20-23]。聚合物膜电沉积时的同质性、与电极表面强 的结合力和化学稳定性使聚合物膜修饰电极具有高选择性,高灵敏度的特点,这 使聚合物膜修饰电极在测定分析物质时有很大的优势^[24-26]。在众多制备聚合物膜 修饰电极的方法中,电聚合方法是一种很有实用价值的修饰方法。它可以控制膜 的厚度、膜的渗透性和电荷传递的性质。

据我们所知,电化学聚合酸性铬蓝 K (ACBK) (见图解 1.1)目前尚无报道。 本文中,通过循环伏安法将酸性铬蓝 K 电化学聚合到玻碳电极表面制得聚酸性铬 蓝 K 膜修饰玻碳电极,并对其电化学性质进行了研究。应用原子力显微镜(AFM)、 衰减全内反射红外光谱(ATR-FTIR)和电化学阻抗图谱(EIS)对电极表面的聚 酸性铬蓝 K 膜进行了表征。聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极可以成功的用来同时测 定 DA, AA 和 UA。研究了 DA, AA 和 UA 在聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极 的电化学行为。结果表明, DA, AA 和 UA 的氧化电流峰得到很好的分离。基 于聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极对 DA, AA 和 UA 的不同电催化活性,建立了 一种灵敏度高、选择性好的电化学方法同时测定 AA、DA 和 UA。



Scheme 2.1. The molecular structure of ACBK.

2.1 实验部分

2.1.1 试剂与仪器

酸性铬蓝K (acid chrome blue K, ACBK) 购自中国上海化学试剂公司;多巴胺 (dopamine, DA)、抗坏血酸 (ascorbic acid, AA) 和尿酸 (uric acid, UA) 购自美 国Sigma公司;其它所用试剂均为分析纯;磷酸盐缓冲液 (PBS) 由0.05 M KCl和 0.05mol·L⁻¹KH₂PO₄-Na₂HPO₄配制,用0.05mol·L⁻¹H₃PO₄或者0.05 mol·L⁻¹NaOH调 节pH值;实验用水均为二次蒸馏水。

循环伏安实验在CHI 660A电化学工作站(上海辰华仪器公司)上进行,采用 三电极体系:聚酸性铬蓝K膜修饰玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为 参比电极,铂丝为对电极。

原子力显微镜图片在 multimode Nanoscope III-扫描探针显微镜 (Veeco Company, 美国)上,采用轻敲模式获得。微悬臂的弹性系数 20-80 N·m⁻¹, 共振频

率 229-287 kHz,采集图像的速度 1.0 Hz。

电化学交流阻抗谱图在Autolab电化学工作站(PGSTAT30,荷兰)上进行。电 化学交流阻抗测定的频率范围是0.1 Hz到10⁶Hz,施加的正弦波电位的振幅为5 mV, 测定电位为0.18 V。阻抗测试液为含有 1 mmol·L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ +K₄Fe(CN)₆的0.1 mol·L⁻¹ KNO₃溶液。

傅立叶红外光谱实验在IFS66/S型光谱仪(Bruker,德国)上完成。衰减全内 反射光谱以波数4cm⁻¹的速度,对64次扫描结果进行采集而得到其相应的光谱图。 酸性铬蓝K单体和聚酸性铬蓝K的衰减全内反射红外光谱均在玻碳电极表面直接 获得。

所有实验均在室温条件下完成。

2.1.2 聚酸性铬蓝 K 膜修饰电极的制备

在制备聚酸性铬蓝 K 膜修饰电极之前,首先将玻碳电极(直径 3mm)用 0.05μm 的 Al₂O₃ 抛光粉抛光成镜面。抛光后电极用二次水冲洗,然后依次用 1:1 HNO₃、 1:1 乙醇和二次蒸馏水超声清洗。

电极经过以上抛光处理后,将其置于0.5mol·L⁻¹ H₂SO₄溶液中,在--0.5~+1.4V 电位区间内循环扫描极化处理至获得稳定的伏安曲线为止。将预处理好的玻碳电 极再置于含0.50 mmol·L⁻¹酸性铬蓝K的0.05 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH =7.0)中,于 --0.5~+1.5 V范围内,以100 mV·s⁻¹ 的扫描速度循环扫描25周。将电化学聚合好的 电极用二次蒸馏水冲洗干净以备用。

2.2 结果与讨论

2.2.1 聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极的制备及表征

图 2.1 为酸性铬蓝 K 在以 0.05 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 为介质,于-0.5 ~+1.5V 电位范围内,在 100 mV·s⁻¹ 扫速条件下电聚合 25 圈的循环伏安曲线。由 图可见,第一圈循环伏安扫描时在+0.46V 出现一很强的氧化蜂,从第二圈开始,

氧化峰电流开始减少,10圈后达到稳定。这一现象表明,聚酸性铬蓝 K 膜在电极 表面形成。

图 2.2 是裸玻碳电极和聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极的原子力显微镜图。从 图中可以看出,聚合后电极表面变的比较粗糙。这种现象说明酸性铬蓝 K 已被聚 合到玻碳电极表面。



Figure 2.1. Cyclic voltammograms of polymerization of acid chrome blue K (0.5 m $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate buffer solution (pH 7.0) on the glassy carbon electrode in the potential range from -0.4 to 1.5V at a scan rate 100 mV·s⁻¹. The cycling number is 10. Inset: the cyclic voltammograms of circle portion are zoomed in.



Figure 2.2. AFM images of a bare GCE (A) and a poly-ACBK film modified GCE with 25 cyclic times surface (B).

为了进一步验证酸性铬蓝 K 被聚合到玻碳电极表面,本文又采用了衰减全反 射红外光谱法(ATR-FTIR)对聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极进行了表征。酸性 铬蓝 K 和聚酸性铬蓝 K 的 ATR-FTIR 谱图通过其修饰电极谱图与裸电极谱图采用 差减法获得。图 2.3 给出了酸性铬蓝 K (曲线 a)和聚酸性铬蓝 K (曲线 b)的 ATR-FTIR 谱图,通过比较可以看出聚合前后酸性铬蓝 K 图谱发生了明显的变化。 由图可知,由于氢健的作用,酸性铬蓝 K (曲线 a)大约在 3326 cm⁻¹ 有一个强 而宽的吸收峰。聚酸性铬蓝 K (曲线 b)在 3742 cm⁻¹ 附近有一个新的吸收峰, 这可能是由-OH 的伸缩振动产生的,在 1235cm⁻¹ 和 1090 cm⁻¹ 产生两个新的吸收 带,这是由酸性铬蓝 K 电聚合而产生新的 C-O-C 伸缩振动引起的。这些新官能 团的出现和 ATR-FTIR 谱图明显的变化进一步说明通过电化学方法酸性铬蓝 K 已 被聚合到玻碳电极表面。



Figure 2.3. ATR-FTIR spectra of ACBK (curve a) and poly-ACBK (curve b) on the surface of GCE.

2.2.2 聚 ACBK 膜修饰玻碳电极的交流阻抗表征及电化学性质

图 2.4 是裸玻碳电极和聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极的电化学交流阻抗图。 由图可见, 在裸玻碳电极表面 (曲线 a), [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻氧化还原过程的 电荷传递电阻是 120 Ω。当裸玻碳电极聚合酸性铬蓝 K 25 圈后, [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻氧化还原过程在聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极表面的电荷 传递电阻为 3150 Ω (曲线 b), 这表明聚酸性铬蓝 K 膜阻碍了电化学探针的电子 传递。电化学交流阻抗的结果也同样表明酸性铬蓝 K 被聚合到玻碳电极表面。应 用如下方程^[27]:

$$R_{\rm ct} = (RT / n^2 F^2 A k^0) (1 / C_0^{(1-\alpha)} C_R^{\alpha})$$
(2-1)

这里,电子的传递系数 $\alpha \ge 0.5$,电极的几何表面积为 0.0706 cm²。通过计算, 裸玻碳电极和聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极的标准异相电子迁移速率常数 k^0 分别 为 3.14×10⁻² cm·s⁻¹ 和 1.32×10⁻³ cm·s⁻¹。显而易见,裸玻碳电极的标准异相电子 迁移速率常数 k^0 (3.14×10⁻² cm·s⁻¹)大于聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极的标准异 相电子迁移速率常数 k^0 (1.32×10⁻³ cm·s⁻¹),说明聚酸性铬蓝 K 膜阻碍了电化学 探针的电子传递。电极表面覆盖率 (θ) 是评价电极表面状态的一个重要参数,利 用电荷传递电阻可以用来计算电极的表面覆盖率。根据方程^[28, 29]:

$$\theta = 1 - R_{\rm ct}^{\rm Bare} / R_{\rm ct}^{\rm Poly-ACBK}$$
(2-2)

R^{Bare} 是裸玻碳电极的电荷传递电阻, R^{Poly-ACBK} 是聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳 电极的电荷传递电阻。通过计算可得,修饰电极的表面覆盖率为 96.2%。





图2.5A给出了酸性铬蓝K膜修饰玻碳电极在0.05 mol·L⁻¹H₂SO₄溶液中不同扫 描速度的循环伏安曲线。从图中可以看出,每一条循环伏安曲线都有一对氧化还 原峰,并且阳极峰的峰电流与阴极峰的峰电流基本相等,峰电位随着扫描速度的 增加而基本不变。由图2.5B可见,阳极峰电流与扫描速度的一次方成正比,其线性 回归方程为: I_{pa} (μ A) = 0.013 v + 0.015 (r = 0.9998)。根据峰电位的差值 ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$)为33mV和公式(在25°C下 ΔE_p 的值接近 $\frac{2.3RT}{nF}$ 或59/n)^[27], 电化学过程中参与的电子转移数为2 (n≈1.8)。聚酸性铬蓝K膜的电活性物质在电 极表面的覆盖度可以被计算,根据公式^[30,31]:

$$i_p = n^2 F^2 \frac{A\Gamma \nu}{4RT}$$
(2-3)

公式中的n表示反应中的电子转移数;A表示电极表面的几何面积(0.0706

 cm^2); Γ (mol·cm⁻²)表示表面覆盖度; v表示扫描速率; R, T和F分别为常数。依据 图2.5B中阳极峰电流与扫描速率的一次方的线性关系的斜率 (0.013),可以计算出 电极表面覆盖度为4.90 × 10⁻¹¹ mol·cm⁻²。

与此同时,研究了支持电解液不同 pH 值对聚酸性铬蓝 K 膜修饰电极的电化 学行为的影响。当 pH 值从 2.0 到 7.0 逐渐增大时,每一循环伏安曲线上都可以观 察到一对氧化还原峰,并且阳极峰电位和阴极峰电位随着 pH 值的增加发生负移。 由图 2.5C 可见,阳极峰电位与 pH 值 (2.0–7.0)成线性关系,斜率为 61.7 mV·pH⁻¹ (r = 0.9996),这表明聚酸性铬蓝 K 膜氧化还原反应的过程中参与的质子数与转 移的电子数相等。



Figure 2.5. (A) Cyclic voltammograms of a poly-ACBK modified glassy carbon electrode in 0.05 mol·L⁻¹ H₂SO₄ at various scan rates. From a to l, the scan rates are 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 250, $300mV \cdot s^{-1}$. Inset (B): Plot of the peak current as a function of the scan rate. (C): The effect of pH on the electrochemical behavior of the poly-ACBK modified GCE in 0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer solutions with different pH.

2.2.3 聚 ACBK 膜修饰玻碳电极对 DA、AA 和 UA 的电催化氧化

聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极对 DA 、AA 和 UA 有良好的电催化活性。图 2.6A 给出了在 pH 4.0 的 PBS 介质中, DA 在裸玻碳电极(曲线 a) 和聚酸性铬蓝

K 膜修饰玻碳电极 (曲线 b) 的循环伏安曲线。由图可见,在裸玻碳电极上,DA 有一对氧化还原峰,其氧化峰电位在 0.328V,还原峰电位在 0.278V (曲线 a)。 在聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极上,DA 的阳极峰电位负移到 0.320V,阴极峰 电位正移到 0.295V,这增加了 DA 氧化还原的可逆性 (Δ*E*_p =25 mV)。而且,电 荷转移过程中可逆性的增强使得峰电流明显增大。这表明聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻 碳电极能够很好的电催化氧化 DA。同时,本文研究了扫描速度对 DA 阳极峰电 流的影响。在 20 ~ 300 mV·s⁻¹的范围内,DA 的阳极峰电流跟扫描速度的一次方 成正比,其线性回归方程为: *I*_{pa} (μA)= 0.032ν(mV·s⁻¹) + 0.937,相关系数是 0.9993。 这表明 DA 在修饰电极表面受吸附控制。

图 2.6B 给出了在 pH 4.0 的 PBS 介质中, AA 在裸玻碳电极 (曲线 a) 和聚酸 性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极 (曲线 b) 的循环伏安曲线。由图可见,裸玻碳电极上, AA 在 0.410V 有一个宽而小的氧化峰。在聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极上, AA 的氧化峰电位负移到 0.120V,并且峰电流明显的的增大。这表明聚酸性铬蓝 K 膜 修饰玻碳电极能够很好的电催化氧化 AA。另外,随着扫描速度的增加, AA 的氧化峰电位负移,这与不可逆的电化学过程特征相一致。在 20~300 mV·s⁻¹ 的范围 内, AA 的氧化峰电流跟扫描速度的二分之一次方成正比,其线性回归方程为: I_{pa} (μ A)= 0.014 $v^{1/2}$ (mV·s⁻¹)^{1/2} + 1.761。这表明 AA 在修饰电极表面受扩散控制。

图 2.6C 给出了在 pH 4.0 的 PBS 介质中, UA 在裸玻碳电极 (曲线 a) 和聚酸 性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极 (曲线 b) 的循环伏安曲线。由图可见,裸玻碳电极上, UA 在 0.512V 有一个小的氧化峰。在聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极上, UA 的氧 化峰变的尖锐,其电位负移到 0.481V,并且峰电流明显的的增大。在 20 ~ 300 mV·s⁻¹ 的范围内, UA 的氧化峰电流跟扫描速度的一次方成正比,其线性回归方 程为: I_{pa} (μ A) = 0.027 ν (mV·s⁻¹) + 1.943,相关系数是 0.9993。这表明 UA 在修 饰电极表面受吸附控制。



Figure 2.6. Cyclic voltammograms of 30 μ mol·L⁻¹DA (A), 300 μ mol·L⁻¹ AA (B) and 30 μ mol·L⁻¹ UA (C) at a bare GCE (a) and a poly-ACBK modified GCE (b) in pH 4.0 PBS. Scan rate: 100 mV·s⁻¹.

2.2.4 聚 ACBK 膜修饰玻碳电极同时分离 DA、AA 和 UA 的电化学响应

图 2.6 的结果明显地给出在聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极上, DA、AA 和 UA 的电化学响应在不同的电位窗口,这就意味着这三种物质可以在它们的混合

液中被完全分离开来。图 2.7 给出了在 pH 4.0 的 PBS 介质中,30 µmol·L⁻¹ DA, 300 µmol·L⁻¹ AA 和 30 µmol·L⁻¹UA 混合溶液在裸玻碳电极(曲线 a)、预处理的 玻碳电极(曲线 b)和聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极(曲线 c)上的电化学响应 曲线。在裸玻碳电极上,DA、AA 和 UA 的混合溶液仅有一个宽的阳极峰(曲线 a),因此用裸玻碳电极不可能从其混合溶液中检测某一单一物质。在预处理的玻 碳电极上,混合溶液中 DA、AA 和 UA 各自的氧化峰可以被看到(曲线 b),但 仍然很难在这三种物质的混合溶液中同时测定它们。然而,在聚酸性铬蓝 K 膜修 饰玻碳电极上,混合溶液中 DA、AA 和 UA 的氧化峰电位可以得到很好的分离, 其峰电位分别在 315 mV,115 mV 和 483 mV(曲线 c)。若用示差脉冲伏安法来 评价该体系,三个分离非常好的阳极峰分别在 288 mV,95 mV 和 454 mV,依次 对应 DA、AA 和 UA (如图 2.7B)。聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极对 DA、AA 和 UA 阳极峰良好的分离,使其有能力在这三种物质的混合溶液中同时测定它们。



Figure 2.7. (A) Cyclic voltammograms of 30 μ mol·L⁻¹ DA, 300 μ mol·L⁻¹ AA and 30 μ mol·L⁻¹ UA at a bare GCE (a), a pretreated GCE (b) and a poly-ACBK modified GCE (c) in pH 4.0 PBS. (B) The DPV of 30 μ mol·L⁻¹ DA, 300 μ mol·L⁻¹ AA and 30 μ mol·L⁻¹ UA at the poly-ACBK modified GCE in pH 4.0 PBS.

2.2.5 底液 pH 值对 AA、DA 和 UA 峰电流的影响

图 2.8 给出了以 PBS 为底液,在不同 pH 值条件下采用阳极溶出伏安法测得

的 AA、DA 和 UA 阳极峰电流与 pH 之间的关系曲线。由图可见, AA 和 UA 的 氧化峰电流在 pH=4.0 达到最大, 然后随着 pH 的增加又逐渐降低。而 DA 的氧化 峰电流在 pH=6.0 时达到最大,但与在 pH=4.0 时的值十分接近。因此,选择 pH=4.0 的 PBS 作为同时测定这三种物质的底液。



Figure 2.8. Effect of pH on the peak current for the oxidation of DA, AA and UA. Concentrations: DA: 30 μ mol·L⁻¹; AA: 400 μ mol·L⁻¹; UA: 20 μ mol·L⁻¹. Scan rate: 100 mV·s⁻¹.

2.2.6 同时测定 DA、AA 和 UA

在 DA、AA 和 UA 三种物质的混合液中,固定其中两种物质的浓度,改变另一种物质的浓度,用聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极进行测定(见图 2.9)。由图 2.9A 可知,固定 AA 和 UA 的浓度,改变 DA 的浓度,DA 的峰电流与其浓度在一定范围内呈良好的线性关系,并且随着 DA 的加入对 AA 和 UA 的峰电流和峰电位 没有显著的影响。同样,如图 2.9B 和 2.9C 所示,在固定其它两种物质的浓度时,AA 和 UA 的峰电流与其浓度在一定范围内都呈良好的线性关系。上述结果看出,在 pH 4.0 的 PBS 介质中,聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极可以实现对 DA、AA 和 UA,并
且彼此之间没有相互干扰。通过示差脉冲伏安法,对 DA、AA 和 UA 的测定结果如 Table2.1.所示。



Figure 2.9. (A) Differential pulse voltammograms of DA at poly-ACBK modified GCE in the presence of $300.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA and $30.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ UA in pH 4.0 PBS. DA concentrations (from a to j): 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0, 30.0, 50.0, 70.0, 100.0 and $200.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. (B) Differential pulse voltammograms of AA at poly-ACBK modified GCE in the presence of $30.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DA and $30.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ UA in pH 4.0 PBS. AA concentrations (from a to g): 50.0, 80.0, 100.0, 200.0, 400.0, 700.0 and 1000.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. (C) Differential pulse voltammograms of UA at poly-ACBK modified GCE in the presence of $30.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DA and $300.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA in pH 4.0 PBS. UA concentrations (from a to j): 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0, 30.0, 50.0, 70.0, 100.0 and 120.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Analyte	Linear range $(\mu mol \cdot L^{-1})$	Regression equation (i_p^a, C^b)	r	Detection limit $(\mu mol \cdot L^{-1})$
DA	1.0 - 200.0	$i_{\rm p} = 0.1234C + 0.4528$	0.9983	0.5
AA	50.0 - 1000.0	$i_{\rm p} = 0.0137C + 0.2079$	0.9995	10.0
UA	1.0 - 120.0	$i_{\rm p} = 0.1311C + 0.4642$	0.9995	0.5

Table 2.1 Analytical parameters for simultaneous determination of DA, AA and UA

^a $i_p(\mu A)$ is the peak current after background subtraction CL intensity. ^b $C(\mu mol \cdot L^{-1})$ is the concentration of the analyte.

2.2.7 干扰试验

固定DA浓度为20 umol·L⁻¹, AA浓度为100 umol·L⁻¹, UA浓度为20 umol·L⁻¹, 考察了可能的干扰物质对 DA、AA 和 UA 的测定的影响。测定 20 μ mol·L⁻¹ DA, 100 $\text{umol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 和 20 $\text{umol}\cdot\text{L}^{-1}$ UA 电流变化±5%误差时,允许存在的各干扰物的 最大量,结果列于表 2.2。实验数据表明大部分物质均没有明显干扰,说明该修饰 电极有良好的抗干扰能力。

Table 2.2 Interferences of some foreign substances for 20 μ mol·L⁻¹ DA, 100 μ mol·L⁻¹ AA, and 20 μ mol·L⁻¹ UA

Foreign substances	Tolerance level (μ mol·L ⁻¹)
K^+ , Na ⁺	300
$Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}$	200
citric acid	100
cysteine, lysine, glucose	50

2.2.8 重现性能和稳定性

在最佳实验条件下,用同一支修饰电极对 30.0 μmol·L⁻¹ DA 连续测定 20 次, 电流响应的平均值为 4.34 μA,相对标准偏差为 3.1%。如果在每次测定前重新修 饰电极表面,连续测定 10 次,电流响应的平均值为 4.46 μA ,相对标准偏差为 4.3%,说明该修饰电极有很好的重现性。

在 2 周内研究了此修饰电极的稳定性。修饰电极浸泡在 0.05 mol·L⁻¹ PBS 中, 放到 4℃ 的冰箱中。2 周后,用来测定 30.0 μmol·L⁻¹ DA,阳极峰电流比初始值下 降约 4.9%,证明此电极具有较好的稳定性。

2.3 样品的测定

2.3.1 多巴胺针剂中 DA 的测定

聚酸性铬蓝 K 膜修饰玻碳电极被应用于测定盐酸多巴胺注射液(10 mg·mL⁻¹, 2mL/支)中的多巴胺。取 5 μL 盐酸多巴胺注射液置于 10mL 的容量瓶中,用 0.05 mol L⁻¹ PBS (pH 4.0)稀释到刻度,摇勾。在上述优化的实验条件下,采用标准加 入法对盐酸多巴胺注射液中多巴胺的含量进行了测定,分析结果如表 2.3 所示。

Sample	Content	Added	Found	RSD	Recovery
	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	(%)	(%)
1	32.71	0	33.21	3.6	101.5
		10.0	43.08	2.9	98.7
		20.0	53.98	3.1	103.8
2	32.71	0	32.57	2.8	99.6
		10.0	42.96	3.3	103.9
		20.0	52.94	3.5	101.8

Table 2.3 Determination result of DA in injections (*n*=6)

2.3.2 测定维生素 C 片中的 AA

取维生素 C 片 20 片 (100.0 mg /片),精确称重并研磨成粉末。然后,准确称 取 200mg 研磨好的粉末,加入 50mL 二次蒸馏水,振荡 20 分钟,过滤到 100 mL 的容量瓶中,残渣用二次蒸馏水洗涤三次,洗涤液合并到 100 mL 的容量瓶中,

用二次蒸馏水稀释到刻度。

取 200 μL 上述样品溶液于 10mL 的容量瓶中,用 0.05 mol·L⁻¹ PBS (pH 4.0) 稀释到刻度,摇匀。在上述优化的实验条件下,采用标准加入法对维生素 C 片中 AA 的含量进行了测定。结果如表 2.4 所示。

Sample	Content	Added	Found	RSD	Recovery
	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	(%)	(%)
1	148.75	0	147.85	3.2	99.4
		100.0	248.93	3.6	101.1
		200.0	342.97	2.7	97.6
2	148.75	0	146.63	2.8	98.6
		100.0	252.42	3.3	105.8
		200.0	349.79	3.5	101.6

 Table 2.4 Determination result of AA in vitamin C tablets (n=6)

2.3.3 尿样中 UA 的测定

在上述优化的实验条件下,利用聚酸性铬蓝K膜修饰玻碳电极直接对尿样中 UA进行了测定。测定前,尿样用0.05 mol·L⁻¹ PBS (pH 4.0)稀释200倍。测定结果如 表2.5所示,其回收率范围为97.9%~102.2%,结果令人满意。

Sample	Detected	Added	Found	RSD	Recovery
	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot L^{-1})$	(%)	(%)
1	14.26	20	33.84	. 3.7	97.9
2	14.32	20	34.75	3.4	102.2
3	14.19	20	34.56	4.1	101. 8

 Table 2.5 Determination result of UA in human urine samples (n=6)

2.4 结论

通过电聚合的方法制备了聚 ACBK 膜修饰玻碳电极。该修饰电极对 DA、AA 和 UA 有明显的电催化活性。通过 DPV 法,该修饰电极可以实现分别或同时对 DA、AA 和 UA 的测定,并且具有良好的稳定性,灵敏度,选择性。将此电极 应用于实际样品中 DA、AA 和 UA 的测定,获得了令人满意的结果。

2.5 参考文献

- [1] H. R. Zare, N. Rajabzadeh, N. Nasirizadeh, M. M. Ardakani, Voltammetric studies of an oracet blue modified glassy carbon electrode and its application for the simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid, *J. Electroanal. Chem.*, 2006, 589,60.
- [2] J. Li, X. Q. Lin, Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 124, 486.
- [3] P. Shakkthivel, S. M. Chen, Simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine in the presence of uric acid on ruthenium oxide modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 1680.
- [4] J. Kima, M. Jeona, K. J. Paengb, I. R. Paenga, Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamine, dopamine in serum, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 619, 87.
- [5] R.M. Wightman, L.J. May, A.C. Michael, Detection of dopamine dynamics in the brain, Anal. Chem., 1988, 60, 769A.
- [6] O. Arrigoni, M. C. Tullio, Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, Biochim. Biophys. Acta, 2002, 1569, 1.
- [7] V. S. E. Dutt, H. A. Mottola, Determination of uric acid at the microgram level by a kinetic procedure based on a pseudo-induction period, *Anal. Chem.*, 1974, 46, 1777.

- [8] H. R. Zare, N. Nasirizadeh, M. M. Ardakani, Electrochemical properties of a tetrabromo-p-benzoquinone modified carbon paste electrode. Application to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, 577, 25.
- [9] S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. Phani, Exploration of synergism between a polymer matrix and gold nanoparticles for selective determination of dopamine, J. *Electroanal. Chem.*, 2005, 578, 95.
- [10] J. Premkumar, S. B. Khoo, Electrocatalytic oxidations of biological molecules (ascorbic acid and uric acids) at highly oxidized electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, 576, 105.
- [11]A. Balamurugan, S. M. Chen, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co- (5-amino -2-naphthalenesulfonic acid)) (PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 596, 92.
- [12] Y. X. Li, X. Q. Lin, Simultaneous electroanalysis of dopamine, ascorbic acid and uric acid by poly (vinyl alcohol) covalently modified glassy carbon electrode, *Sensor. Actuat. B*, 2006, 115, 134.
- [13] L. Q. Lin, J. H. Chen, H. Yao, Y. Z. Chen, Y. J. Zheng, X. H. Lin, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at poly (Evans Blue) modified glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, 2008, 73, 11.
- [14] Y. F. Zhao, Y. Q. Gao, D. P. Zhan, H. Liu, Q. Zhao, Y. Kou, Y. H. Shao, M. X. Li, Q. K. Zhuang, Z. W. Zhu, Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode, *Talanta*, 2005, 66, 51.
- [15] H. Yao, Y. Y. Sun, X. H. Lin, Y. H. Tang, L. Y. Huang, Electrochemical characterization of poly(eriochrome black T) modified glassy carbon electrode and its application to simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric

acid, Electrochim. Acta, 2007, 52, 6165.

- [16] X. H. Lin, Q. Zhuang, J. H. Chen, S. B. Zhang, Y. J. Zheng, Electrocatalytic property of poly-chromotrope 2B modified glassy carbon electrode on dopamine and its application, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 125, 240.
- [17] L. Zhang, X. E. Jiang, Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine, J. *Electroanal. Chem.*, 2005, 583, 292.
- [18] C. R. Raj, K. Tokuda, T. Ohsaka, Electroanalytical applications of cationic self-assembled monolayers: square-wave voltammetric determination of dopamine and ascorbate, *Bioelectrochemistry*, 2001, 53, 183.
- [19] Q. W. Li, Y. M. Wang, G. A. Luo, Voltammetric separation of dopamine and ascorbic acid with graphite electrodes modified with ultrafine TiO₂, *Mater. Sci. Eng. C*, 2000, 11, 71.
- [20] K. M. Manesh, P. Santhosh, A. Gopalan, K. P. Lee, Electrocatalytic oxidation of NADH at gold nanoparticles loaded poly(3,4-ethylenedio xythiophene)-poly(styrene sulfonic acid) film modified electrode and integration of alcohol dehydrogenase for alcohol sensing, *Talanta*, 2008, 75, 1307.
- [21] W. Y. Su, S. H. Cheng, Electrocatalysis and sensitive determination of cysteine at poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified screen-printed electrodes, *Electrochem. Commun.*, 2008, 10, 899.
- [22] W. Zheng, J. Li, Y. F. Zheng, An amperometric biosensor based on hemoglobin immobilized in poly(ε-caprolactone) film and its application, *Biosensor*. *Bioelectron.*, 2008, 23, 1562.
- [23] A. L. Liu, S. B. Zhang, W. Chen, X. H. Lin, X. H. Xia, Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode, *Biosensor. Bioelectron.*, 2008, 23, 1488.

- [24] S. A. Kumar, C. F. Tang, S. M. Chen, Poly(4-amino-1-1'-azobenzene-3, 4'-disulfonic acid) coated electrode for selective detection of dopamine from its interferences, *Talanta*, 2008, 74, 860.
- [25] P. F. Huang, L. Wang, J. Y. Bai, H. J. Wang, Y. Q. Zhao, S. D. Fan, Simultaneous electrochemical detection of dopamine and ascorbic acid at a poly(p-toluene sulfonic acid) modified electrode, *Microchim Acta*, 2007, 157, 41.
- [26] P. R. Roy, T. Okajima, T. Ohsaka, Simultaneous electroanalysis of dopamine and ascorbic acid using poly(N,N-dimethylaniline)-modified electrodes *Bioelectrochemistry*, 2003, 59, 11.
- [27] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [28] E. Sabatani, J. Cohen-Boulakia, M. Bruening, I. Rubinstein, Thioaromatic monolayers on gold: a new family of self-assembling monolayers, *Langmuir*, 1993, 9, 2974.
- [29] C. Henke, C. Steinem, A. Janshoff, G. Steffan, H. Luftmann, M. Sieber, H. J. Galla, Self-assembled monolayers of monofunctionalized cyclodextrins onto gold: a mass spectrometric characterization and impedance analysis of host-guest interaction, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3158.
- [30] A. P. Brown, F. C. Anson, Cyclic and differential pulse voltammetric behavior of reactants confined to the electrode surface, *Anal. Chem.*, 1977, 49, 1589.
- [31] M. Sharp, M. Petersson, K. Edström, Preliminary determinations of electron transfer kinetics involving ferrocene covalently attached to a platinum surface, J. *Electroanal.l Chem.*, 1979, 95, 123.
- [32] M. A. Dayton, A. G. Ewing, R. M. Wightman, Response of microvoltammetric electrodes to homogeneous catalytic and slow heterogeneous charge-transfer reactions, *Anal. Chem.*, 1980, 52, 2392.

第三章 聚氨基磺酸修饰玻碳电极测定氨基嘌呤

DNA 是牛物体中的一种重要物质,而氨基嘌呤是 DNA 的一个重要部分。测 定 DNA 中氨基嘌呤的浓度对衡量自身核酸的浓度是十分重要的。核酸在贮存基 因信息和蛋白质的生物合成方面扮演了十分重要的角色。实际上,生理流体、组 织、细胞中的核酸组分与核酸的分解代谢,组织中酶的降解,饮食习惯以及一些 补救合成途径有关^[1,2]。因此, 氨基嘌呤可以在某些疾病^[3]和遗传诊断^[4]方面提供 重要的信息,定量的测定氨基嘌呤是一项非常重要的工作。目前,已经有多种的 方法用于定量和定性的测定核酸中的氨基嘌呤,包括高效液相色谱法^[2, 5-7],毛细 管电泳法[8-13], 胶束电动色谱法[14], 化学发光法[3]。以上方法均需要专业的实验 人员和优越的实验室条件。因此,一种简单、廉价的测定氨基嘌呤的方法是十分 必要的。近来, DNA 的直接电化学已经引起了分析化学家的兴趣。相比于以上的 其它方法,电化学方法具有高灵敏度,高选择性,响应快速、简单和低成本的特 点,这是其更加适合测定 DNA 中的氨基嘌呤。目前,关于氨基嘌呤的电化学检 测方法已有报道^[1,15-21]。如, H. Y. Chen 等^[1]用预处理的玻碳电极同时测定腺嘌呤 和鸟嘌呤: P. A. M. Farias 等^[18]利用静态滴汞电极,采用吸附溶出伏安法超痕量的 测定了腺嘌呤; Z. H. Wang 等^[17]利用 β-环糊精包裹碳纳米管修饰电极同时测定腺 嘌呤和鸟嘌呤。然而,研制一种高效,方便可行的测定氨基嘌呤的方法仍然是非 常必要的。目前,利用聚氨基磺酸修饰玻碳电极直接电化学测定氨基嘌呤未见报 道。

由于它可以增强灵敏度、提高催化性能、稳定性好,聚合膜修饰电极已经被 广泛的应用于传感器的制备^[22-26],但未见应用于氨基嘌呤的测定。本文中,利用 了(记为 poly-ASA-GCE)建立了一种电化学方法灵敏的测定氨基嘌呤。研究了 氨基嘌呤在聚氨基磺酸修饰玻碳电极上的电化学行为。通过阳极溶出微分脉冲伏 安法,利用 poly-ASA-GCE 建立了一种简单、可行、低耗、灵敏的电化学方法测 定痕量的氨基嘌呤。聚氨基磺酸修饰玻碳电极有好的重现性和稳定性。

3.1 实验部分

3.1.1 试剂与仪器

氨基嘌呤(adenine) 购自 Sigma 公司, 1.0×10^{-2} mol·L⁻¹ 的贮备液由适量氨 基嘌呤溶于二次蒸馏水中配制; 氨基磺酸购自国药集团化学试剂有限公司; 其它 试剂均为分析纯; 磷酸盐缓冲液(PBS)由 0.1 mol·L⁻¹KCl 和 0.1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄-Na₂HPO₄配制,用 0.1 mol·L⁻¹ H₃PO₄或者 0.1 mol·L⁻¹NaOH 调节 pH 值; 实验用水均为二次蒸馏水。

循环伏安实验在CHI 660A电化学工作站(上海辰华仪器公司)上进行,采用 三电极体系:裸玻碳电极或聚氨基磺酸修饰玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极 (SCE)为参比电极,铂丝为对电极。

原子力显微镜图片在 multimode Nanoscope III-扫描探针显微镜 (Veeco Company, 美国)上,采用轻敲模式获得。微悬臂的弹性系数 20-80 N·m⁻¹,共振频 率 229-287 kHz,采集图像的速度 1.0 Hz。

电化学交流阻抗谱在Autolab电化学工作站 (PGSTAT30, 荷兰) 上进行。电化 学交流阻抗测定的频率范围是0.1Hz到10⁶Hz, 施加的正弦波电位的振幅为5 mV, 测定电位为0.18 V。阻抗测试液为含有 1 mmol·L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ +K₄Fe(CN)₆的0.1 mol·L⁻¹ KNO₃溶液。

3.1.2 聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极的制备^[27]

在制备聚氨基磺酸膜修饰电极之前,首先将玻碳电极(直径 3mm)用 0.05μm 的 Al₂O₃ 抛光粉抛光成镜面。抛光后电极用二次水冲洗,然后依次用 1:1 HNO₃、 1:1 乙醇和二次蒸馏水超声清洗。电极经过以上抛光处理后,将其置于 PBS (pH 7.0)中,在-1.2~+1.2V 电位区间内循环扫描 20 圈。

将预处理好的玻碳电极再置于含2.0 mmol·L⁻¹氨基磺酸的0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓 冲液(pH =7.0)中,于–1.5~+2.5 V范围内,以100 mV·s⁻¹的扫描速度循环扫描15 周。将电化学聚合好的电极用二次蒸馏水冲洗干净后备用。

3.1.3 药片样品的制备

取维生素 B₄ 片 20 片 (10.0 mg/片),精确称重并研磨成粉末。然后,准确称 取 70.0mg 研磨好的粉末,加入 50mL0.01mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液,振荡 20 分钟,过 滤到 100 mL 的容量瓶中,残渣用 0.01mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液洗涤几次,洗涤液合并 到 100 mL 的容量瓶中,用 0.01mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液稀释到刻度。

3.2 结果与讨论

3.2.1 聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极的制备及表征

图3.1为2.0 mmol·L⁻¹氨基磺酸在以0.01 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 7.0)为介 质,于-1.5~+2.5V电位范围内,在100 mV·s⁻¹扫速条件下电聚合15圈的循环伏安曲 线。第一圈,在-0.72V有一个阴极峰1。随着扫描圈数的增加,阳极峰2和阳极峰3 出现在+0.05 V和+1.46V。并且,随着扫描圈数的继续增长,峰电流不断增大,10 圈后基本达到稳定。这一现象表明,聚氨基磺酸膜在电极表面不断增长,并最终 达到饱和。这些事实表明氨基磺酸已被电聚合到玻碳电极表面。修饰好的电极用 二次蒸馏水冲洗干净,放到的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中待用。

图 3.2 是裸玻碳电极和聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极的原子力显微镜图。从图 中可以看出,聚合后的电极表面变的非常粗糙。这种现象说明氨基磺酸已被聚合 到玻碳电极表面。



Figure 3.1. Cyclic voltammograms of polymerization of poly amidosulfonic acid (2.0 m $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on a bare glassy carbon electrode in the potential range from -1.5 V to 2.5 V in a 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0) at a scan rate of 100mV·s⁻¹.



Figure 3.2. AFM images of a bare GCE (A) and a poly-ASA film modified GCE with 15 cyclic times surface (B).

3.2.2 聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极的交流阻抗表征

图3.3A是裸玻碳电极和聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极的电化学交流阻抗图。由 图可见, 在裸玻碳电极表面(曲线a), [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻氧化还原过程的电 荷传递电阻是87 Ω。当裸玻碳电极聚合不同圈数氨基磺酸后, [Fe(CN)₆]³⁻/ [Fe(CN)₆]⁴⁻氧化还原过程在聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极表面的电荷传递电阻不断 增大, 10圈后达到稳定(曲线d-h)。电极表面覆盖率(θ)是评价电极表面状态的 一个重要参数, 电荷传递电阻可以用来计算电极的表面覆盖率。根据方程^[28, 29]:

$$\theta = 1 - R_{\rm ct}^{\rm Bare} / R_{\rm ct}^{\rm Poly-ASA}$$
(3-1)

R^{Bare}表示裸玻碳电极的电荷传递电阻, R^{Poly-ASA}表示不同聚合圈数的氨基磺酸膜 修饰电极的电荷传递电阻。图3.3B 给出了聚氨基磺酸膜在玻碳电极表面的覆盖率。 从图中可以看出,聚合10圈后电极表面的覆盖率基本不再变化,这表明聚氨基磺 酸膜在电极表面已达到饱和。



Figure 3.3. (A) Nyquist plots in impedance measurements of electrodes: (a) a bare GCE; (b-h) the poly-ASA film modified GCEs with different electropolymerization cyclic times. Cyclic times: (b) 3; (c) 5; (d) 10; (e) 20; (f) 30; (g) 40; (h) 60. (B) Plot of the surface coverage (θ) against the cyclic times. The data were obtained from (A).

3.2.3 氨基嘌呤在聚氨基磺酸修饰电极上的电化学行为

图3.4给出了在PBS (pH 4.0) 介质中, 1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹的氨基嘌呤在裸玻碳

电极(曲线c)和聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极(曲线b)上的循环伏安曲线。在聚 氨基磺酸膜修饰玻碳电极上,氨基嘌呤在+1.2 V有一个强的氧化峰。相比之下,在 裸玻碳电极上的氨基嘌呤氧化峰电流信号较差。这主要由于在0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH =4.0)的缓冲液中,聚氨基磺酸膜带负电荷,而氨基嘌呤带正电荷,这使聚氨基磺 酸膜修饰玻碳电极通过静电作用将氨基嘌呤吸附到修饰电极的表面。氨基嘌呤在 聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极上的峰电位与在裸电极上的峰电位几乎相同。阴极扫 描没有观察到还原峰,说明氨基嘌呤在聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极上的氧化是一 个不可逆的过程。



Figure 3.4. Cyclic voltammograms of poly-ASA modified GCE in 0.1 mol·L⁻¹PBS (pH 4.0): Adenine (a) 0.0 mol·L⁻¹, (b) 1.0×10^{-4} mol·L⁻¹ and (c) bare GCE with 1.0×10^{-4} mol·L⁻¹ adenine. Scan rate: 100 mV·s⁻¹.

3.2.4 扫速和pH值的影响

图3.5A 给出了在PBS (pH 4.0) 介质中, 1×10⁻⁴ mol·L⁻¹的氨基嘌呤在聚氨基 磺酸膜修饰玻碳电极不同扫速的循环伏安图。随着扫速的增加峰电流不断增加, 峰电位正移。如图3.5B所示, 在10~200 mV·s⁻¹范围内, 氨基嘌呤阳极峰电流与扫

描速度的一次方成正比,其线性回归方程为: *I*_{pa} = 0.267v + 4.074 (r = 0.9996)。以上结果表明,氨基嘌呤在聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极表面氧化过程同时受吸附和 扩散控制^[1, 16]。



Figure 3.5. (A) Cyclic voltammograms of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenine in 0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ PBS at various scan rates: (a) 10; (b) 20; (c) 40; (d) 60; (e) 80; (f) 100; (g) 150; (h) 200. (B) Plot of I_{pa} vs. scan rate.

研究了PBS底液的不同pH值(2.0~8.0)对氨基嘌呤在聚氨基磺酸膜修饰玻碳 电极上电化学响应的影响。如图3.6A和3.6B所示,在PH 4.0时,氨基嘌呤阳极峰电 流达到最大,然后,随着PH的增加峰电流逐渐降低。氨基嘌呤氧化峰电位与pH值 的关系如图3.6A和3.6C所示,氧化峰电位随着pH值的增加而发生负移,并且氧化 峰电位与pH值成线性关系,其线性方程为: *E*_p=1.427 – 0.061pH (*r* = 0.9994),根 据线性方程的斜率-61mV·pH⁻¹,说明电极反应过程中发生的电子数与质子数之比 为1。氨基嘌呤在固态电极上的氧化反应被认为有三步,总共失去了六个电子(如 图解3.1所示),并且前两个电子的氧化是决定反应速率的步骤^[1,16,17,30]。



Figure 3.6. (A) Differential pulse voltammograms of $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ adenine in 0.1 mol·L⁻¹ PBS at different pH values. (B) plot of peak current vs. pH. (C) E_{pa} as a function of pH.



Scheme 3.1. The reaction mechanism for adenine

3.2.5 富集电位和富集时间的影响

图 3.7A 给出了富集电位对 1.0 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 氨基嘌呤阳极峰电流的影响, 当富集电位在+0.4 到+0.80 V 范围内时,氨基嘌呤阳极峰电流不断增大,而当富 集电位更正时,峰电流下降。故选择+0.80 V 做为测定氨基嘌呤的最佳富集电位。

与此同时,考察了不同富集时间对 1.0 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 氨基嘌呤阳极峰电流的 影响(见图 3.7B),当富集时间小于 300s 时,随着富集时间的增加,氨基嘌呤的 峰电流逐渐增大;当富集时间大于 300s 时,氨基嘌呤的峰电流基本保持不变,故 实验中选择 300s 作为最佳富集时间。



Figure 3.7. Effect of accumulation potential (A) and accumulation time (B) on the peak current of 1.0×10^{-7} mol·L⁻¹ adenine in 0.1 mol·L⁻¹PBS (pH 4.0).

3.2.6 氨基嘌呤的测定

图 3.8 给出了在最佳实验条件下,在聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极上改变氨基 嘌呤的浓度而得到的示差脉冲伏安曲线。氨基嘌呤的浓度与其氧化峰电流在 0.03 ~ 1.0 μ mol·L⁻¹范围呈良好的线性关系,其线性方程为: $I_{pa}(\mu A) = -0.42 + 30.81C$ (μ mol·L⁻¹),相关系数为 0.9994。在信噪比为 3 时,检测限为 8.0 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹。



Figure 3.8. Differential pulse voltammograms of adenine at poly-ASA modified GCE in 0.1 mol·L⁻¹PBS (pH 4.0). Adenine concentrations from curve a to curve i are 0.0, 0.030, 0.050, 0.080, 0.10, 0.30, 0.50, 0.80, and 1.0 μ mol·L⁻¹, respectively. Inset: Calibration plots for adenine. Accumulation potential: +0.8V; accumulation time: 300s.

3.2.7 干扰试验

固定氨基嘌呤的浓度 0.1 μmol·L⁻¹,考察了可能的干扰物质对氨基嘌呤测定的 影响。测定 0.1 μmol·L⁻¹氨基嘌呤电流变化±5%误差时,允许存在的各干扰物的最 大量,结果列于表 3.1。实验数据表明大部分物质均没有明显干扰,说明该修饰电 极有良好的抗干扰能力。

Foreign substances	Tolerance level (μ mol·L ⁻¹)
Na ⁺ , glucose	1000
carbamide, ascorbic acid	800
Ca^{2+}, Mg^{2++}	300
Cu ²⁺	250
Cucitric acid,	200
dopamine	100
lysine, cysteine	50

Table 3.1 Interferences of some foreign substances for 0.1 μ mol·L⁻¹ adenine

3.2.8 重现性和稳定性

在最佳实验条件下,用同一支修饰电极对1.0 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹氨基嘌呤连续测定 20次,电流响应的平均值为2.38 μA,相对标准偏差为4.3%(见图3.9)。如果在每 次测定前重新修饰电极表面,连续测定10次,电流响应的平均值为2.32 μA,相对 标准偏差为4.6%,说明该修饰电极有很好的重现性。

在 2 周内研究了此修饰电极的稳定性。修饰电极浸泡在 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.0)中, 放到 4℃ 的冰箱中。2 周后,用来测定 1.0 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 氨基嘌呤,阳极 峰电流比初始值下降约 5.1%,证明此电极具有较好的稳定性。



Figure 3.9. Repeatability at the identical surface of poly-ASA modified electrode in 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 4.0). The numbers represent the times of successive measurement is 20. Adenine concentration: $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Accumulation time: 300 s, accumulation potential: +0.80 V.

3.3 样品的测定

聚氨基磺酸膜修饰玻碳电极被应用于测定维生素B4片中的氨基嘌呤。根据选择的实验条件,稀释维生素B4片到一定的浓度,采用标准加入法测定维生素B4片 中氨基嘌呤的浓度,测定结果为10.29 mg/片,与说明书上标示的含量(10.0 mg/ 片)基本一致。同时,并对其进行了回收率试验(见表3.2),其回收率范围为97.22 ~104.00%,结果令人满意。

Sample	Added $(\times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Found $(\times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery (%)	RSD (%)
Adenine	0.00	3.81	/	3.8
	3.00	6.93	104.00	4.2
	10.00	13.79	99.80	4.1
	30.00	34.48	102.23	3.9
	50.00	52.42	97.22	4.5

Table 3.2 Recovery test of adenine in tablet (n=5)

3.4 结论

本文报道了聚氨基磺酸膜修饰的玻碳电极,采用示差脉冲伏安法测定氨基嘌呤的新方法。实验结果表明,此修饰电极能够提高检测的灵敏度,检测限可达到 8.0×10⁻⁹ mol·L⁻¹。本方法可用于药物样品中氨基嘌呤的测定。该修饰电极制备简 单、重现性好、抗干扰能力强。本文中测定氨基嘌呤的新方法进一步拓展了聚合 物膜修饰电极在电化学领域内的应用。

3.5 参考文献

- H. S. Wang, H. X. Ju, H. Y. Chen, Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461, 243.
- [2] R. S. Sheng, F. Ni, T. M. Cotton, Determination of purine bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography using real-time surface-enhanced raman spectroscopy, *Anal. Chem.*, 1991, 63, 437.
- [3] E. B. Liu, B. C. Xue, Flow injection determination of adenine at trace level based on luminol-K₂Cr₂O₇ chemiluminescence in a micellar medium, J. Pharmaceut. Biomed., 2006, 41, 649.
- [4] C. E. Amri, M. H. Baron, M. C. Maurel, Adenine and RNA in mineral samples. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for picomole detections, Spectrochim. Acta A, 2003, 59, 2645.
- [5] T. A. Ivandini, K. Hond, T. N. Rao, A. Fujishima, Y. Einag, Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography, *Talanta*, 2007, 71, 648.
- [6] P. G. Moral, M. J. Arin, J. A. Resines, M. T. Diez, Simultaneous determination of adenine and guanine in ruminant bacterial pellets by ion-pair HPLC, J. Chromatogr. B, 2005, 826, 257.

- [7] W. Mailinger, A. Baumeister, M. Reuss, M. Rizzi, Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cere6isiae* using a micro robotic sample preparation-HPLC system, J. Biotechnol., 1998, 63, 155.
- [8] M. J. Markuszewski, P. Britz-McKibbin, S. Terabe, K. Matsuda, T. Nishioka, Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in bacillus subtilis cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A, 2003, 989, 293.
- [9] P. Kiessling, G. K. E. Scrib, F. Suss, G. Werner, H. Knoth, M. Hartmann, Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay and a capillary electrophoresis assay for the analysis of adenosine and the degradation product adenine in infusions, J. Pharmaceut. Biomed., 2004, 36, 535.
- [10] C. S. Robb, S. C. Yang, P. R. Brown, Enhanced analysis of purine and pyrimidine bases by the use of double-strand polyaniline coatings in micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis*, 2002, 23, 1900.
- [11] C. W. Klampfl, M. Himmelsbach, W. Buchberger, H. Klein, Determination of purines and pyrimidines in beer samples by capillary zone electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 454, 185.
- [12] Y. C. Huang, C. C. Lin, C. Y. Liu, Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers based on 9-ethyladenine for the recognition of nucleotide bases in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 2004, 25, 554.
- [13] X. Xiong, J. Ouyang, W. R. G. Baeyens, J. R. Delanghe, X. M. Shen, Y. P. Yang, Enhanced separation of purine and pyrimidine bases using carboxylic multiwalled carbon nanotubes as additive in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 2006, 27, 3243.
- [14] W. P. Wang, L. Zhou, S. M. Wang, Z. Luo, Z. D. Hu, Rapid and simple determination of adenine and guanine in DNA extract by micellar electrokinetic

chromatography with indirect laser-induced fluorescence detection, *Talanta*, 2008, 74, 1050.

- [15] J. L. M. Alvarez, J. A. G. Calzon, J. M. L. Fonseca, Electrocatalytic effects of deoxyribonucleic acids, adenine and guanineon the reduction of Ni(II) at a mercury electrode, *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, 457, 53.
- [16] H. Y. Liu, G. F. Wang, D. L. Chen, W. Zhang, C. J. Li, B. Fang, Fabrication of polythionine/NPAu/MWNTs modified electrode forsimultaneous determination of adenine and guanine in DNA, *Sensor. Actuat. B*, 2008, 128, 414.
- [17] Z. H. Wang, S. F. Xiao, Y. Chen, β-Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine, J. Electroanal. Chem., 2006, 589, 237.
- [18] P. A. M. Farias, A. L. R. Wagener, A. A. Castro, Ultratrace determination of adenine in the presence of copper by adsorptive stripping voltammetry, *Talanta*, 2001, 55, 281.
- [19] U. Yogeswaran, S. Thiagarajan, S. M. Chen, Pinecone shape hydroxypropyl-bcyclodextrin on a film of multi-walled carbon nanotubes coated with gold particles for the simultaneous determination of tyrosine, guanine, adenine and thymine, *Carbon*, 2007, 45, 2783.
- [20] K. B. Wu, J. J. Fei, W. Bai, S. H. Hu, Direct electrochemistry of DNA, guanine and adenine at a nanostructured film-modified electrode, *Anal. Bioanal. Chem*, 2003, 376, 205.
- [21] F. Jelen, B. Yosypchuk, A. Kourilova, L. Novotny, E. Palecek, Label-free determination of picogram quantities of DNA by stripping voltammetry with solid copper amalgam or mercury electrodes in the presence of copper, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4788.
- [22] D. Ragupathy, A. I. Gopalan, K. P. Lee, K. M. Manesh, Electro-assisted fabrication of layer-by-layer assembled poly(2,5-dimethoxyaniline)/phospho- tungstic acid

modified electrode and electrocatalytic oxidation of ascorbic acid, *Electrochem*. Commun., 2008, 10, 527.

- [23] A. H. Liu, I. Honma, H. S. Zhou, Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid at their physiological level in the presence of ascorbic acid using poly(acrylic acid)-multiwalled carbon-nanotube composite covered glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 23, 74.
- [24] S. A. Kumar, C. F. Tang, S. M. Chen, Poly(4-amino-1-1'-azobenzene-3, 4'-disulfonic acid) coated electrode for selective detection of dopamine from its interferences, *Talanta*, 2008, 74, 860.
- [25] H. S. Wang, D. Q. Huang, R. M. Liu, Study on the electrochemical behavior of epinephrine at a poly(3-methylthiophene)-modified glassy carbon electrode, J. Electroanal. Chem., 2004, 570, 83.
- [26] A. L. Liu, S. B. Zhang, W. Chen, X. H. Lin, X. H. Xia, Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode, *Biosensor*. *Bioelectron.*, 2008, 23, 1488.
- [27] Y. Z. Zhang, G. Y. Jin, Z. S. Yang, H. Zhao, Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using a poly(amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode, *Microchim. Acta*, 2004, 147, 225.
- [28] E. Sabatani, J. Cohen-Boulakia, M. Bruening, I. Rubinstein, Thioaromatic monolayers on gold: a new family of self-assembling monolayers, *Langmuir*, 1993, 9, 2974.
- [29] C. Henke, C. Steinem, A. Janshoff, G. Steffan, H. Luftmann, M. Sieber, H. J. Galla, Self-assembled monolayers of monofunctionalized cyclodextrins onto gold: a mass spectrometric characterization and impedance analysis of host-guest interaction, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3158.

[30] C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, S. H. P. Serrano, On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes, J. Electroanal. Chem., 1994, 366. 225.

第四章 钴膜修饰碳纤维微电极选择性测定 H₂PO₄~

磷酸盐作为营养和能量的携带者,在人类的牛命活动中起到十分重要的作用。 含有磷酸盐的产品已广泛应用在医药、生命科学、临床医学、工业生产、环境保 护等领域^[1]。因此,一个快速、简便的检测磷酸盐浓度的方法是十分必需的。由于 磷酸盐在生命体中的重要作用,在过去的几十年中它一直是人们研究的热点^[2]。目 前,测定磷酸盐的方法主要有离子色谱法^[3,4]、荧光法^[5,6]和基于离子选择性电极的 电势测定法^[7,8]等。在这些方法中,由于离子选择性电极具有简单、快速、低成本、 便于携带、不易损坏等优点,已引起了人们对它的更多关注。目前,已有很多这 方面的报道,如W. Liu等^[9]的基于大环氨基化合的二茂铁的PVC膜磷酸盐选择电极 研究: D. Xiao等^[10]利用钴作为基体制成磷酸盐的选择性电极: F. Kivlehana等^[11] 利用尿素或硫尿键合杯芳烃的载体制成离子选择性测定磷酸盐。虽然磷酸盐的选 择性电极至今已得到很大的发展,并且电极的选择性、稳定性、重现性等问题也 得到很好的解决,但还未见到有关测定磷酸盐的微电极的报道。近年来微电极以 其许多独特的优点在生命科学领域引起了人们的广泛重视,已成功地用于大脑中 枢神经系统和一些器官组织的活体伏安分析^[12]。以及蛋白质^[13]、金属离子^[14]、尿 酸^[15]等的测定。本实验首次利用钴膜修饰的碳纤维微电极在1.0×10⁻⁶~1.0×10⁻³ mol $mol \cdot L^{-1}$ 浓度范围准确测定了磷酸二氢根。

4.1 实验部分

4.1.1 仪器和试剂

CHI 660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司); PXD-2 型数字离子计(江苏 电分析仪器厂); XL-30E 电子扫描仪(荷兰,飞利浦公司); Autolab 电化学工作 站(PGSTAT30,荷兰); 硝酸钴(AR)、磷酸二氢钾(AR)、邻苯二甲酸氢钾(KHP, AR)等试剂均购自上海化学试剂公司; 实验用水为二次蒸馏水。

4.1.2 碳纤维微电极的制备

将碳纤维依次用丙酮、乙醇、二次蒸馏水浸泡。另取一段铜丝,其一端用银 导电胶粘结 2~3mm 处理过的碳纤维,晾干后,封入一内径为6mm 的塑料管中, 然后在二次水中超声清洗数次,即制得碳纤维微电极(CFE)。

4.1.3 钴膜修饰碳纤维微电极的制备

将制备好的碳纤维微电极置于含 2×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 钴离子的 0.025 mol·L⁻¹ 邻苯 二甲酸氢钾 (pH=4.0) 溶液中,用计时安培电流法在-1.0V 下沉积 1000s,取出后 用水冲洗即制得钴膜修饰碳纤维微电极 (Co/CFE)。

4.1.4 修饰电极的活化

首先在二次水中浸泡电极 2~3h,然后转移到被测的含磷酸二氢根的低浓度的 盐溶液中反复测几次,直到电位值稳定时开始测量。

4.1.5 H₂PO₄ 的测定

用 0.025 mol·L⁻¹ 邻苯二甲酸氢钾 (pH=4.0) 溶液和 H₂PO₄-标准溶液配制一系 列不同浓度的 H₂PO₄-溶液,以钴膜修饰碳纤维微电极为指示电极,饱和甘汞电极 为参比电极组成电池,测量其电动势。

在溶液中,磷酸盐以 H_3PO_4 、 $H_2PO_4^-$ 、 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 四种物质形式存在。 每一种物质的分布分数由溶液的 pH 值决定,在 pH=4.0 时, $H_2PO_4^-$ 的分布系数为 0.9864。

4.2 结果与讨论

4.2.1 钴膜修饰碳纤维微电极的表征

图 4.1 为碳纤维微电极和钴膜修饰碳纤维微电极的扫描电镜图片。比较图 4.1a



和图 4.1b 可以看出, 钴膜已成功地修饰在碳纤维微电极表面。

Figure 4.1. SEM images of the bare CFE(a) and Co/CFE(b)

在 25°C,频率范围为 $10^6 \sim 10^{-1}$ Hz,施加正弦波电位的振幅为 5mV,测定电 位为 0.18V 条件下,碳纤维微电极和钴膜修饰碳纤维微电极的阻抗复平面图见图 4.2。碳纤维微电极的电荷传递电阻 R_{CT} (曲线 a)远大于钴膜修饰碳纤维微电极 的电荷传递电阻 R_{CT} ,这主要是由于[Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻氧化还原过程钴膜修 饰碳纤维微电极表面的电荷传递速度加快。(曲线 b),这表明钴膜已修饰到电极 表面,并且钴膜具有良好的导电性。



Figure 4.2. EIS in 0.1 mol·L⁻¹ KCl solution containing $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol·L}^{-1}$ Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻with (a) bare CFE, (b) Co/CFE.

4.2.2 电极的响应机理

根据文献^[16],在 pH=4.0 的酸性介质中,钴膜修饰碳纤维微电极的表面发生的如下反应:

$$2C_0 + O_2 = 2C_0O$$
 (4-1)

因此,在含有磷酸二氢根的pH=4.0的0.025 mol·L⁻¹邻苯二甲酸氢钾溶液中, Co₃(PO₄)₂在电极表面生成,反应如下:

 $3\text{CoO} + 2\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}^+ = \text{Co}_3(\text{PO}_4)_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ (4-2)

总之,磷酸二氢根接触钴膜修饰的电极时,由于生成Co₃(PO₄)₂而使电极表面 的氧化还原电对Co²⁺/Co⁰浓度的比值发生变化。由于电极电势的大小由电极表面的 Co²⁺的浓度决定,因此磷酸二氢根的浓度大小也决定了电极表面的电极电势的大 小。磷酸二氢根的浓度决定的电极电势符合能斯特方程,于是,其浓度的负对数 与其决定的电位响应值呈线性关系^[8]。

4.2.3 实验条件的选择

4.2.3.1 沉积电位和沉积时间的影响

本实验研究了钴膜沉积到碳纤维电极上时,不同的沉积电位对 H₂PO₄⁻响应的 影响(如图 4.3A 所示),实验结果表明-1.0V 为最佳沉积电位。同时,在-1.0V 下,探讨了不同沉积时间对 H₂PO₄⁻响应的影响(见图 4.3B),实验结果表明 1000 s 或大于 1000s 时对 H₂PO₄⁻的响应斜率基本不变,并且都符合能斯特响应,本实 验选择 1000s 作为沉积时间。



Figure 4.3. Effect of deposition time and deposition potentials on electrode response

4.2.3.2 pH 值的影响

图 4.4 给出了不同 pH 值(2.0, 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0)的 0.025 mol·L⁻¹ 邻苯二甲酸氢 钾底液对测定 H₂PO₄⁻ (1.0×10⁻⁶~1.0×10⁻³ mol·L⁻¹) 响应电位的影响。由图可见, 电极的电位响应在 pH 为 4.0 时呈能斯特响应。因为 pH 值<4 时, 溶液中 H₃PO₄ 的比例较大, 而 pH 值>4 时, HPO₄²⁻或 PO₄³⁻的比例较高, 所以响应的斜率较低。 所以本实验选择 pH=4.0 的邻苯二甲酸氢钾为底液。



Figure 4.4. Effect of pH on electrode response

4.2.4 线性范围、检测限和响应斜率

在最佳实验条件下,配制一系列 H_2PO_4 的标准溶液按实验方法测定其电位 值,以E对-logc 作图,得到校正曲线如图 4.5 所示。由图可见, H_2PO_4 的电位变 化与其浓度($1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol·L}^{-1}$)呈良好的线性关系,响应斜率为-58.0 mV·dec⁻¹,检测限为 $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol·L}^{-1}$ 。



Figure 4.5. Potential-concentration response curve at pH 4.0

4.2.5 电位选择性系数

电位选择性系数*K_{i,j}*是指共存离子*j*对响应离子*i*的干扰程度,其值越小说明电极 对被测离子的选择性越好。表1给出了钴膜修饰碳纤维微电极的电位选择性系数。 ¹ 从表4.1中可以看出,钴膜修饰碳纤维微电极对H₂PO₄⁻具有良好的选择性。因此, 钴膜修饰碳纤维微选择性电极具有较强的抗干扰能力和较高的选择性。

Table 4.1. Selectivity coefficients of the electrode, $K_{H_2PO_{4}}^{pot}$

Foreign species	I	SO4 ²⁻	Ac	NO ₃ ⁻	Cl
$K^{pot}_{H_2PO_4^-,j}$	1.0×10 ⁻³	1.0×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻³	5.0×10 ⁻⁴	2.0×10 ⁻³

4.2.6 电极的重现性与稳定性

在相同条件下,用同一支钴膜修饰碳纤维微电极反复测定 1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹ H₂PO₄⁻¹ 10 次,得到的平均电位为-138mV,相对标准偏差为 1.4%(如图 4.6 所示),表明该电极有良好的重现性。



Figure 4.6. Potential responses to 10-time repeated injections of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂PO₄⁻ to the same Co/CFE.

将钴膜修饰碳纤维微电极浸入1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的 H₂PO₄⁻标准溶液中,每3min 记录一次数值,连续测定3小时。结果发现:3小时内电位的漂移值小于10mV,说 明该电极有良好的稳定性。

4.2.7 响应时间

在浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol·L}^{-1} \text{ H}_2\text{PO}_4$ 溶液当中, 钴膜修饰碳纤维微电极的响应时间为 6min。在浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol·L}^{-1}$ 的 H₂PO₄ 溶液中, 该电极的响应时间为 3min。

4.2.8 回收率的测定

采用标准加入法对H2PO4-的回收率进行了测定,结果回收率在96.1%~103.7%

之间,见表4.2。

T-LL-	4 3	D A	• · · · · · · ·			
Table	4. L.	Determ	ination	\mathbf{OI}	recov	erv
# ** K/ I *		Dotorin			10001	vrj

Added (mol· L^{-1})	Found (mol· L^{-1})	Recovery (%)
2.0×10 ⁻⁶	2.05×10 ⁻⁶	102.5
8.0×10 ⁻⁶	7.69×10 ⁻⁶	96.1
3.0×10 ⁻⁵	3.11×10 ⁻⁶	103.7

4.3 结论

本实验利用电化学沉积成功地将钴膜修饰到碳纤维微电极的表面,制备出一种新型的磷酸二氢根选择性电极。该方法制得的电极简单、方便、廉价,并且对H₂PO₄⁻有很好的选择性,其线性范围为1.0×10⁻⁶~1.0×10⁻³ mol·L⁻¹,检出限为6.0×10⁻⁷ mol·L⁻¹。该电极具有良好的稳定性、重现性和短的响应时间,完全可以用于磷酸二氢根离子的实际分析测定。这为进一步研究微电极测定对人体内有重要作用的磷酸根离子,也很有参考价值。

4.4 参考文献

- S.A. Glazier, M.A. Arnold, Phosphate-selective polymer membrane electrode. Anal.Chem., 1988, 60, 2540.
- [2] Engblom, S.O., 1998a. Biosens. Bioelectron. 13 (9), 981-994.
- [3] M. Ikedo, M. Mori, K. Kurachi, W. Hu, K. Tanaka, Selective and simultaneous determination of phosphate and silicate ions in leaching process waters for ceramics glaze raw materials of narutal origin by ion-exclusion chromatography coupled with UV-detection after postcolumn derivatization, *Anal. Science*, 2006, 22, 117.
- [4] 王野秋, 顾明通, 姜淑荣等, 电导检测离子色谱法测定多聚磷酸盐, 分析测 试学报, 1996, 13, 28.

- [5] M. J. Vazquez, B. Rodriguez, C. Zapatero, D. G. Tew, Determination of phosphatein nanomolar range by an enzyme-coupling fluorescent method, *Anal. Biochem.*, 2003, 20, 292.
- [6] 施丽芳, 王冬媛, 赵一兵, 铽-钛铁试剂络合物荧光猝灭法测定磷酸盐, 分析 化学, 2004, 32, 335.
- [7] R. D. Marco, C. Phan, Determination of phosphate in hydroponic nutrient solutions using flow injection potentiometry and a cobalt-wire phosphate ion-selective electrode, *Talanta*, 2003, 60,1215.
- [8] Z. L. Chen, P. Grierson, M. A. Adams, Direct determination of phosphate in soil extracts by Potentiometric flow injection using a cobalt wire electrode, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 363, 191.
- [9] W. Liu, Xl Li, M. P. Song, Y. J. Wu, A novel dibasic phosphate-selective electrode based onFerrocene-bearing macrocyclic amide compound, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 12, 609.
- [10] D. Xiao, H. Y. Yuan, J. Li, R. Q. Yu, Surface-Modified Cobalt-Based Sensor as a Phosphate-Sensitive Electrode, Anal. Chem., 1995, 6, 288.
- [11] F. Kivlehan, W. J. Mace, H. A. Moynihan, D. W.M. Arrigan, Potentiometric evaluation of calix[4]arene anion receptors in membrane electrodes: Phosphate detection, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 58, 154.
- [12] 张祖训,超微电极电化学,北京,科学出版社,1998.
- [13] O. A. Biloivan, S. V. Dzyadevych, A.V. Elskaya, N. Jaffrezic-Renault, N. Zine, J. Bausells, J. Samitier, A. Errachid, Development of bi-enzyme microbiosensor based on solid-contact ion-selective microelectrodes for protein detection, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 123, 1096.
- [14] D. Barancok, J. Cirak, P. Tomcık, K. Gmucova, Surface modified microelectrodes for selective electroanalysis of metal ions in environmental components, *Bioelectrochemistry*, 2002, 55, 153.

- [15] J. W. Luo, M. Zhang, D. W. Pang, Selective and sensitive determination of uric acid at DNA-modified graphite powder microelectrodes, *Sensor. Actuat. B*, 2005, 106, 358.
- [16] R. K. Meruva, M. E. Meyerhoff, Mixed potential response mechanism of cobalt electrodes toward inorganic phosphate, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2022.

第五章 磷酸根离子敏感电极的研制与应用

磷元素是生命体重要的基本元素之一,参与了许多重要的生命过程。因此生命有机磷和生命无机磷等含磷化合物的研究一直是化学、生物化学、分子生物化学研究的前沿课题。开发新方法研究含磷化合物,已经引起研究者的重视。目前, 有各种关于磷酸盐测定的方法,包括离子色谱法^[1,2],荧光法^[3,4],磷铋钼蓝分光 光度法^[5],微波加热分光光度法^[6]和基于离子选择性电极的电势测定法^[7,8]等。

在离子选择性电极的研究中,新型敏感材料和新的制备技术的引入是离子电极研究中的一个新的方向,当然选择新型材料对磷酸根离子有较好的响应性能,亦是磷酸根离子电极的一个研究热点。目前,已有很多关于这方面的报道,如苏 宾^[9]的基于钴磷合金的磷酸根离子敏感电极研究,R.Q.Yu等^[10]的双核有机锡高 分子膜的磷酸氢盐离子选择性电极研究,W.Liu等^[11]的基于大环氨基化合的二茂 铁的 PVC 膜磷酸盐选择电极研究; F. Kivlehana 等^[12]利用尿素或硫脲键合杯芳烃 的载体制成离子选择性测定磷酸盐。

溶胶-凝胶(Sol-gel)薄膜一般是通过金属或半金属醇盐在水、互溶剂(通常为 醇)及催化剂(酸或碱)存在下发生水解和缩聚反应、并经陈化、干燥形成的三维网 络。该薄膜具有良好的光学透过性、稳定性、渗透性、抗磨性和化学惰性,以及 高的热稳定性和光化学稳定性^[13]。

用掺杂微米磷酸钴的溶胶-凝胶膜制备了磷酸根离子的响应电极,通过改变 Sol-gel 的量、预还原的时间、底液 pH 值的大小等条件来获得对磷酸根离子有较 好的响应电极,实验测得在 $10^{-8} \sim 10^4 \text{ mol·L}^{-1}$ 浓度范围内呈线性响应,响应斜率为 14.5 mV·dec⁻¹,并且该条件下制备的电极有良好的重现性和稳定性,较长的测量 寿命。葡萄糖、柠檬酸、SO₄²⁻、AC⁻、CO₃²⁻等无严重干扰。

5.1 实验部分

5.1.1 仪器和试剂

PXD-2 型数字离子计(江苏电分析仪器厂); PHS-25 型 PH 计(上海雷磁 仪器厂); 微波炉(三星 N8A78 型,苏州三星电子有限公司); XL-30E 电子扫描 仪(荷兰,飞利浦公司); IFS66/S 型红外光谱仪(Bruker,德国)。

磷酸钠(AR),硫酸钴(AR),十二烷基苯磺酸钠(AR),四乙氧基硅烷(TEOS) (AR),邻苯二甲酸氢钾(KHP, AR)等试剂均购自于上海化学试剂公司,实验 用水均为二次蒸馏水。

5.1.2 微米磷酸钴的制备

配制含硫酸钴 (3.0×10⁻³ mol·L⁻¹),磷酸二氢钠 (3.0×10⁻³ mol·L⁻¹),十二 烷基苯磺酸钠 (1.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹),尿素 (1.0×10⁻³ mol·L⁻¹) 的混合液 100 mL, 放入 250 ml 锥形瓶中,置微波炉中用中火档 (约 500 W) 辐射 3 min,待混合液 沸腾后调到小火档 (约 200 W) 辐射 2 min,取出后置于冷水中冷至室温,加入约 50 mL 无水乙醇,静置片刻,离心分离 (转速 3000 r·min⁻¹)。倾去上层清液,用 无水乙醇洗沉淀 2~3 次,所得沉淀于 100 ℃ 以下烘干,贮于干燥器中备用^[14]。

5.1.3 溶胶-凝胶(Sol-gel)膜的制备

600 μL 无水乙醇, 50 μL TEOS, 60 μL 二次蒸馏水和 10 μL 5 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液混合后超声半个小时,置于冰箱内冷藏备用。

5.1.4 掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰电极的制备

在制备修饰电极之前,首先将玻碳电极(直径 3 mm)用 0.05 μm 的 Al₂O₃ 抛 光粉抛光成镜面。抛光后电极用二次水冲洗,然后依次用 HNO₃(1:1, V/V)、 丙酮和二次蒸馏水超声洗净,用氦气吹干。用 10 μL 微量注射器吸取混匀后的掺 杂磷酸钴微米粒子的溶胶-凝胶 10 μL 滴在玻碳电极的表面,置冰箱冷藏备用。
5.2 结果与讨论

5.2.1 磷酸钴的表征

图 5.1 给出了磷酸钴的 FT-IR 谱图,从图中可以看出较宽的水带在 3000 ~ 3500 cm⁻¹ 处,磷酸根中的 P-O 键伸缩振动在 984 cm⁻¹ 处。



Figure 5.1. The infrared spectra of Cobalt phosphate powder

图 5.2 是制得磷酸钴的 SEM 照片,从图中可以看出磷酸钴微粒呈片状,平均 粒径为 3μm,比较均匀。



Figure 5.2. SEM images of the Cobalt phosphate

5.2.2 实验条件的选择

5.2.2.1 pH 值的影响

图 5.3 给出了不同 pH 值(11.0, 12.0, 13.0, 14.0)的 0.025 mol·L⁻¹ 邻苯二甲酸氢 钾底液对测定 PO4³⁻(1.0×10⁻⁸~1.0×10⁻³ mol·L⁻¹)响应电位的影响。由图可见, 电极的电位响应在 pH 为 13.0 时呈较好的能斯特响应。故本文选择 pH=13.0 的底 液。



Figure 5.3. Effect of pH on sensitive electrode response

5.2.2.2 修饰电极的溶胶-凝胶量的影响

图 5.4 为不同的 Sol-gel 量的修饰电极对测定磷酸根响应的影响。从图中可以 看出,在 0.1mg 的磷酸钴固体中修饰 10 μL Sol-gel 时,电极对磷酸根的响应最佳。 因玻碳电极的直径为 3mm,计算得出,磷酸钴的密度为 1.4×10⁻³g·cm⁻²。故本实 验选择 10 μL 作为修饰电极的量。



Figure 5.4. Effect of sol-gel quantity on sensitive electrode response

5.2.2.3 预还原时间的选择

修饰好的电极在测定之前,因为钴主要以二价钴的形式存在,所以需要在底 液中进行一定时间的预还原过程,将其还原为钴单质。本实验研究了不同的预还 原时间对 PO₄³⁻响应的影响,如图 5.5 所示,当预还原时间为 50 s 时,电极对磷酸 根的响应最佳。故本实验选择的预还原时间为 50 s。



Figure 5.5. Effect of preconditional time on sensitive electrode response

5.2.2.4 微米磷酸钴与溶胶-凝胶不同比例的影响

本实验研究了微米磷酸钴 4 种不同含量(4%,3%,2%,1%)对 PO4³⁻响应 的影响(见图 5.6),从图中可以看出,微米磷酸钴的含量为 1%时,对磷酸根离 子的响应最佳。故本实验选择的微米磷酸钴与溶胶-凝胶的比例为 1:99。



Figure 5.6. Effect of the different proportion on sensitive electrode response

5.2.3 电极的响应机理

根据文献^[15],在 pH=13 的底液中,掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰玻碳电极的表面发生的反应如下:

$$2C_0 + O_2 = 2C_0O$$
 (5-1)

因此,在含有磷酸盐的pH=13的底液中,Co₃(PO₄)₂在电极表面生成,反应如下:

 $3C_{0}O + 2PO_{4}^{3-} + 3H_{2}O = Co_{3}(PO_{4})_{2} + 6OH^{-}$ (5-2)

总而言之,磷酸根接触溶胶-凝胶膜修饰的电极时,电极表面的氧化还原电对 Co²⁺/Co⁰的比值发生变化。由于电极电势的大小是由电极表面的Co²⁺的浓度决定 的,因此磷酸盐的浓度大小也决定了电极表面的电极电势的大小,磷酸盐浓度决 定的电极电势符合能斯特方程。这样,其浓度的负对数与其决定的电位响应值呈 线性关系。 5.2.4 线性范围、检测限和响应斜率

在最佳实验条件下,配制一系列 PO₄³⁻的标准溶液按实验方法测定其电位值, 以 E 对-logc 作图,得到校正曲线如图 5.7 所示, PO₄³⁻的电位值变化与其浓度 $(1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol·L}^{-1})$ 呈良好的线性关系,斜率为-14.5 mV·dec⁻¹,检测 限为 7.0×10⁻⁹ mol·L⁻¹。



Figure 5.7. Potential-concentration response curve at pH 13.0

5.2.5 电位选择性系数

电极的选择性系数是评价离子选择性电极性能的重要指标之一,本文采用混合溶液法,固定被测离子浓度改变干扰离子的浓度测定了该电极一系列 K_{ij}^{pot} 值。如表 5.1 所示,掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰电极对 PO₄³⁻具有良好的选择性。 **Table 5.1.** Selectivity coefficient of the electrode, K_{pot}^{pot} .

Foreign species	Glucose	Urea	Citric acid	SO4 ²⁻
$K_{PO_4^{3-},j}^{pot}$	1.5×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁴	3.0×10 ⁻⁴	1.6×10 ⁻³
Foreign species	CO3 ²⁻	Ac	NO ₃ ⁻	Br
$K^{pot}_{PO_4^{3-},j}$	1.3×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻⁴	2.8×10 ⁻⁴

5.2.6 响应时间

掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰电极对 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol·L}^{-1}$ 的 PO₄³⁻响应时间 小于 2 min,表明电极对 PO₄³⁻的响应速度比较快。

5.2.7 电极的重现性和稳定性

在相同条件下,用同一支掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰的电极在1.0×10⁻⁷ mol·L⁻¹ PO₄³⁻溶液中反复测定 10 次,得到的平均电位为--236 mV,相对标准偏差 为 1.6% (如图 5.8 所示),表明该电极有良好的重现性。

掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰的电极在 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol·L}^{-1} PO_4^{3-}$ 溶液中连续测定 2h,电位漂移小于 10 mV,这表明电极具有良好的稳定性。



Figure 5.8. Potential responses to 10-time repeated injections of $1.0 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PO₄³⁻ to the same electrode

5.3 样品测定

为了评价该方法的实际应用价值,用微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰电极对土壤中的 PO4³⁻进行了测定。称取风干土样 3.0g,以 0.5 mol·L⁻¹NaHCO₃ 50mL 作为提取液,振荡 1 小时,过滤,收集滤液^[16]。在上述优化的实验条件下,采用标准加

入法对土壤中 PO₄³⁻的含量进行了测定,测其含量为 2.89 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹。同时, 采用磷铋钼蓝分光光度法测定 PO₄³⁻含量为 2.73×10⁻⁶ mol·L⁻¹。两者实验结果良好 的一致性说明该方法具有较高的准确性。同时,并对其进行了回收率实验(见表 5.2),其回收率范围为 97.10%~102.89%,结果令人满意。

Table 5.2. Recovery data for PO_4^{3-} obtained on soil sample by the proposed method

Added (mol· L^{-1})	Found (mol· L^{-1})	Recovery (%)
0	2.89×10^{-8}	/
6. 20×10 ⁻⁸	8.91×10^{-8}	97.10
5.58×10 ⁻⁷	6.03×10^{-7}	102.89
8.24×10 ⁻⁶	8 .09 × 10 ⁻⁶	97.94

5.4 结论

本实验利用掺杂微米磷酸钴溶胶-凝胶膜修饰玻碳电极制备出一种新型的磷酸根离子选择性电极。该方法制得的电极简单、方便、廉价,并且对 PO_4^{3-} 有很好的选择性,在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol·L}^{-1}$ 浓度范围内呈能斯特响应,响应斜率为 $-14.5 \text{ mV·dec}^{-1}$,检出限为 $7.0 \times 10^{-9} \text{ mol·L}^{-1}$ 。该电极具有良好的稳定性、重现性和 短的响应时间,并且可用于土壤中磷酸根离子的实际分析测定。

5.5 参考文献

[1] M. Ikedo, M. Mori, K. Kurachi, W. Hu, K. Tanaka, Selective and simultaneous determination of phosphate and silicate ions in leaching process waters for ceramics glaze raw materials of narutal origin by ion-exclusion chromatography coupled with UV-detection after postcolumn derivatization, *Anal. Science*, 2006, 22, 117.

- [2] 王野秋,顾明通,姜淑荣等,电导检测离子色谱法测定多聚磷酸盐,分析测 试学报,1996,13,28.
- [3] M. J. Vazquez, B. Rodriguez, C. Zapatero, D. G. Tew, Determination of phosphatein nanomolar range by an enzyme-coupling fluorescent method, *Anal. Biochem.*, 2003, 20, 292.
- [4] 施丽芳, 王冬媛, 赵一兵, 铽-钛铁试剂络合物荧光猝灭法测定磷酸盐, 分析 化学, 2004, 32, 335.
- [5] R. D. Marco, C. Phan, Determination of phosphate in hydroponic nutrient solutions using flow injection potentiometry and a cobalt-wire phosphate ion-selective electrode, *Talanta*, 2003, 60,1215.
- [6] Z. L. Chen, P. Grierson, M. A. Adams, Direct determination of phosphate in soil extracts by Potentiometric flow injection using a cobalt wire electrode, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 363, 191.
- [7] W. Liu, Xl Li, M. P. Song, Y. J. Wu, A novel dibasic phosphate-selective electrode based onFerrocene-bearing macrocyclic amide compound, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 12, 609.
- [8] D. Xiao, H. Y. Yuan, J. Li, R. Q. Yu, Surface-Modified Cobalt-Based Sensor as a Phosphate-Sensitive Electrode, Anal. Chem., 1995, 6, 288.
- [9] 苏宾,袁红雁,唐志文,肖乃,王柯敏,基于钴磷合金的磷酸根离子敏感电极研究,广西化工,2000,S1,91.
- [10] D. Liu, W. C. Chen, R. H. Yang, G. L. Shen, R. Q. Yu, Polymeric membrane phosphate sensitive electrode based on binuclear organotin compound, *Anal.Chim. Acta*, 1997, 338, 209.
- [11] W. Liu, XI Li, M. P. Song, Y. J. Wu, A novel dibasic phosphate-selective electrode based onFerrocene-bearing macrocyclic amide compound, *Sensor. Actuat. B*, 2007, 12, 609.
- [12] F. Kivlehan, W. J. Mace, H. A. Moynihan, D. W.M. Arrigan, Potentiometric

evaluation of calix[4]arene anion receptors in membrane electrodes: Phosphate detection, Anal. Chim. Acta, 2007, 58, 154.

- [13] 张贵贤,傅崇岗,基于溶胶-凝胶普鲁士蓝膜修饰玻碳电极电催化氧化测定水 果中抗坏血酸,理化检验,2007,43,260.
- [14] 杜小旺,磷酸钴纳米粒子的微波辐射制备法,重庆师范大学学报,2004,21,51.
- [15] R. K. Meruva, M. E. Meyerhoff, Mixed potential response mechanism of cobalt electrodes toward inorganic phosphate, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2022.
- [16] 康彩艳,张春光,蒋勉,周性尧,掺杂磷钼酸根离子聚吡咯膜电极对磷钼酸 根离子电位响应研究,分析试验室,1996,15,6.

硕士研究生期间发表的论文

- Rui Zhang, Gen-Di Jin, Da Chen, Xiao-Ya Hu^{*}, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly(acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode .Sensors & Actuators: B. Chemical, 138 (2009) 174–181.
- 2. Rui Zhang ,Gen-Di Jin, Xiao-Ya Hu^{*}, Sensitive determination of adenine on poly(amidosulfonic acid)-modified glassy carbon electrode, Journal of Solid State Electrochemistry, in press.
- 3. Qin Xu, Ai-Ju Yuan, **Rui Zhang**, Xiao-Jun Bian, Da Chen, Xiao-Ya Hu^{*}, Application of electrochemical methods for pharmaceutical and drug Analysis.Current Pharmaceutical Analysis, 5(2009)
- .4 Qin Xu, Xiao-Jun Bian, Xin-Xin Zhang, Min Sun, **Rui Zhang**, Xiao-Ya Hu. Apatite-gold nanoparticle nanocomposite enhanced direct electron transfer of myoglobin (submitted)
- 张瑞,金根娣,胡效亚,钻膜修饰碳纤维离子选择性微电极测定 H₂PO₄,《扬 州大学学报》(自然科学版)2009 年 2 月第 11 卷第 1 期。
- 金根娣,张瑞,胡效亚*, 镍和氧化镍膜修饰的过氧化氢传感器的研究,《化学传感器》第28卷第3期,2008年9月。
- 金根娣,杜诗,张瑞,胡效亚*,锑膜微电极作为PH固体传感器的研制及应用, 《化学传感器》 第28卷第3期,2008年9月。

致 谢

在本论文即将付梓之时, 谨向所有给予我无私帮助的老师、同学表示最真挚 的谢意。

本论文是在导师胡效亚教授的精心指导下完成的。胡老师严谨的治学态度、 活跃的学术思想、渊博的学识、开放的科研思路、丰富宽广的阅历和谦虚平易的 品德使我受益匪浅。在学术上,胡老师为学生提供良好而自由的学术环境,善于 引导和启发; 生活上,更如挚友与亲人。不论是做学问还是做人,都为我树立了 高尚的道德风范。在此,谨向恩师致以诚挚的感谢和崇高的敬意!

感谢徐琴老师和金根娣老师在我实验过程中给予的热情帮助和指导。感谢朱 霞石老师、杨功俊老师、王赪胤老师、瞿其曙老师、刁国旺老师、刘天晴老师、 菅盘铭老师和郭霞老师给予我学习上的指导和帮助。感谢吴昊老师和赵静老师在 实验中提供的帮助。同时还要感谢在我成长中给予关心和帮助的宋根萍老师和唐 莉莉老师。

感谢我的师兄、师姐、师弟、师妹们,感谢其他很多和我朝夕相处的朋友们, 你们对我的深厚情谊将是我一生中最宝贵的财富。

感谢我的家人在我求学过程之中给予我精神上的鼓励和物质上的支持。 感谢一路为我打气,为我付出,陪我度过三年艰辛而又美好时光的人!

谨把此文献给所有关心我,爱护我的人!