

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

## 10,10'-二甲基-3,3'-二磺酸基-9,9'-双吡啶的电致化学发光行为

黄风华<sup>1,2</sup> 庄惠生<sup>3</sup> 陈国南<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>福州大学食品安全分析与检测教育部重点实验室,福州 350002; <sup>2</sup>福建师范大学化学与材料学院,福州 350007;  
<sup>3</sup>东华大学环境科学与工程学院,上海 200051)

**摘要:** 研究了新试剂10,10'-二甲基-3,3'-二磺酸基-9,9'-双吡啶(简称 DMDSBA)的电致化学发光(ECL)行为. 考察了电化学参数、反应介质以及 pH 等条件对 DMDSBA 电致化学发光信号的影响. 结果表明,在玻碳电极上施加适当电压时,DMDSBA 在 KNO<sub>3</sub> 溶液介质中产生很强的电致化学发光信号,于优化的实验条件下,发光强度的自然对数与 DMDSBA 浓度的自然对数在 1.0×10<sup>-5</sup>–1.0×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系,DMDSBA 的检测限可达 2.3×10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>. 用循环伏安法、电致化学发光光谱以及荧光光谱,研究了 DMDSBA 的电致化学发光机理.

**关键词:** 10,10'-二甲基-3,3'-二磺酸基-9,9'-双吡啶; 电致化学发光; 机理

**中图分类号:** O646; O657

## Electrochemiluminescent Behavior of 10,10'-dimethyl-3,3'-disulfo-9,9'-biacridine

HUANG Feng-Hua<sup>1,2</sup> ZHUANG Hui-Sheng<sup>3</sup> CHEN Guo-Nan<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety of the Ministry of Education, Fuzhou University, Fuzhou 350002, P. R. China; <sup>2</sup>College of Chemistry and Material Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, P. R. China;  
<sup>3</sup>College of Environment Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 200051, P. R. China)

**Abstract:** The electrochemiluminescence (ECL) behaviour of a new reagent 10,10'-dimethyl-3,3'-disulfo-9,9'-biacridine (DMDSBA) was studied. The effects of the electrochemical parameters, the reaction medium and pH on the ECL were investigated in detail. It was found that the new reagent DMDSBA gave a strong electrochemiluminescence in KNO<sub>3</sub> solution when an appropriate voltage was applied on glassy carbon electrode. Under the optimum conditions, the natural logarithm of the ECL intensity of DMDSBA has a good linear relationship with the natural logarithm of the concentration of DMDSBA in the range of 1.0×10<sup>-5</sup>–1.0×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>, the detection limit of DMDSBA was 2.3×10<sup>-9</sup> mol·L<sup>-1</sup>. The cyclic voltammetry, fluorescence spectrum and ECL spectrum for this ECL system have also been investigated in detail, based on which a possible mechanism for the ECL of DMDSBA was proposed.

**Key Words:** DMDSBA; Electrochemiluminescence; Mechanism

电致化学发光(ECL)是一种将电化学与化学发光结合起来的分析技术,兼有电化学与化学发光的优点. 与其它检测方法相比,电致化学发光具有灵敏度高、选择性好、操作简便、易于控制,并且实验中的一些试剂可重复使用等优点,近年来受到人们的特

别关注<sup>[1-4]</sup>. 已报道的ECL体系包括酰肼类化合物体系、多环芳烃类物质体系、吡啶酯体系、光泽精体系、钉联吡啶及其衍生物等无机配合物体系<sup>[3-6]</sup>. 将具有电致化学发光性质的化合物作为分子探针对核酸进行标记和检测,是近年来备受关注的新技术. 目前实

Received: March 14, 2007; Revised: June 20, 2007; Published on Web: September 3, 2007.

\*Corresponding author. Email: guonanchen@126.com; Tel: +86591-83713866.

国家自然科学基金(20575011)资助项目

际应用于免疫分析及 DNA 探针的 ECL 试剂是钌联吡啶类络合物<sup>[7,8]</sup>, 但该试剂的售价昂贵. 因此寻找新型、高效、价廉的 ECL 试剂有重要意义.

由于多数 ECL 化合物的分子中缺少可用于标记生物大分子的活性基团, 且大多数 ECL 化合物必须在碱性条件下才有较好的发光行为, 在弱酸性或中性介质中不发光或发光很弱, 而生命物质一般在中性介质中才能保持活性, 因此限制了 ECL 试剂在生物大分子研究中的应用. 文献[9,10]报道了光泽精在中性、碱性介质中均有较强的电致化学发光现象. 这一结果可望使光泽精应用于生物分析. 但是光泽精分子中同样缺少可用于标识的活性基团, 也不能用于标记蛋白质、DNA 及其它生物活性物质, 限制了其在生物大分子分析中的应用. 为此, 本实验室设计合成了一系列具有可标记的活性基团(如—COOH, —NH<sub>2</sub>, —SO<sub>3</sub>H 等)的 9, 9'-双吡啶衍生物<sup>[11-13]</sup>, 并对其电致化学发光性质进行了研究, 可望其在生物大分子标识分析中有较大的应用价值. 本文着重讨论 10, 10'-二甲基-3, 3'-二磺酸基-9, 9'-双吡啶(简称 DMDSBA, 分子结构式见 2.4.3 节的式(2))的电致化学发光性质及发光机理.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

BPCL 超微弱发光分析仪及干涉滤光片一套(中国科学院生物物理研究所, 北京); CHI660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司), RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津), KS-50D 超声波清洗机(宁波科生仪器厂), PHS-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂).

DMDSBA 为本实验室合成并提纯<sup>[13]</sup>. 其余试剂

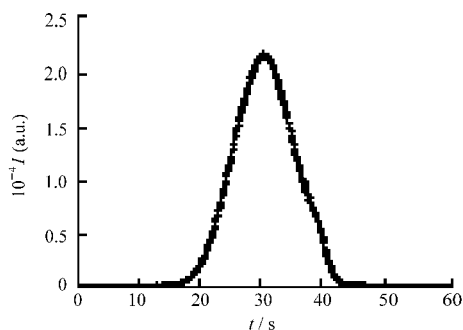


图 1 DMDSBA 在 KNO<sub>3</sub> 溶液中的 ECL 图  
Fig.1 electrochemiluminescence (ECL) pattern of DMDSBA in KNO<sub>3</sub> solution

$c(\text{DMDSBA})=1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{KNO}_3)=0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  
DMDSBA: 10, 10'-dimethyl-3, 3'-disulfo-9, 9'-biacridine

均为分析纯, 购自上海国药化学试剂公司. 实验用水为石英亚沸二次蒸馏水.

用 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)配制浓度为  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DMDSBA 储备液, 放入冰箱于 4 °C 下保存, 使用时不同浓度的 DMDSBA 溶液均由储备液依次稀释得到.

### 1.2 实验方法

实验采用三电极系统, 工作电极为玻碳电极(表面积为 0.0707 cm<sup>2</sup>), 辅助电极为铂丝, 参比电极为 Ag/AgCl(饱和 KCl 溶液)电极. 每次实验前, 将工作电极表面用氧化铝粉末在抛光布上研磨、抛光, 水洗, 然后放在超声波中依次用乙醇、二次蒸馏水洗涤.

将不同体积、不同浓度的 DMDSBA 及 2 mL  $3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 KNO<sub>3</sub> 溶液分别加入 10 mL 容量瓶中, 并用水稀释至刻度. 分别取 4 mL 倒入电解发光池中, 置于测量室内. 将处理过的电极放入电解池中, 关闭测量室, 调好仪器的各种电学参数, 打开光门, 施加扫描电位, 记录 ECL 信号.

## 2 结果与讨论

### 2.1 DMDSBA 的 ECL 现象

初步实验发现, 在 KNO<sub>3</sub> 介质中, 于电极上施加一定的电压, DMDSBA 会有很明显的电致化学发光现象. 测试中发现, 发光起始位置对应的反应时间  $t$  为 16 s, 所对应的电位是 -0.38 V, 发光强度最高点的  $t=30$  s, 电位为 -0.72 V. 图 1 为 DMDSBA 的电致化学发光图, 空白介质  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KNO<sub>3</sub> 溶液无电致化学发光现象(见图 2).

### 2.2 DMDSBA 的 ECL 条件的优化

#### 2.2.1 电学参数的影响

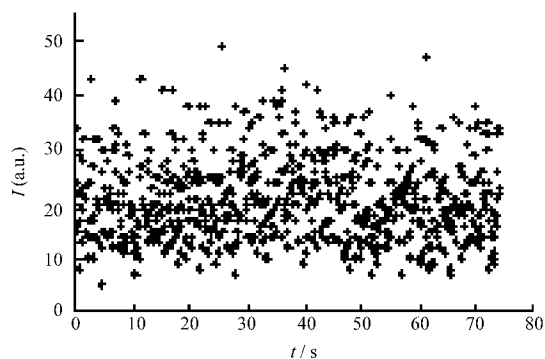


图 2  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KNO<sub>3</sub> 溶液的 ECL 图  
Fig.2 ECL pattern in  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KNO<sub>3</sub> solution

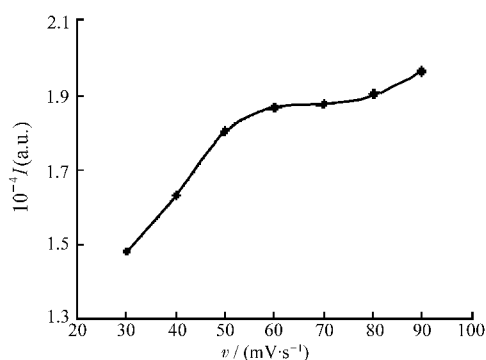


图3 不同电位扫描速率对 DMDSBA 在  $\text{KNO}_3$  介质中的 ECL 的影响

Fig.3 Effect of voltage scanning speed on ECL of DMDSBA in  $\text{KNO}_3$  solution

$c(\text{DMDSBA})=8.0\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{KNO}_3)=0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

不同电位扫描模式的影响. 在 0–-1800 mV 电位范围内, 分别尝试线性扫描伏安法、常规脉冲伏安法、差分脉冲伏安法、方波伏安法等电位扫描方式对 DMDSBA 电致化学发光的影响. 实验结果表明, DMDSBA 在四种波形下均产生 ECL 信号, 但是线性扫描伏安法激发方式下发光信号最强, 因此在本实验中选择线性扫描伏安法作为发光激发模式.

电位扫描速率的影响. 在线性扫描方式下, 考察了不同扫描速率对 DMDSBA 的 ECL 的影响, 结果见图 3 所示. 从图中可看出, 随着扫描速率的增大 DMDSBA 的 ECL 信号增强. 考虑到扫描速率太低将会降低 ECL 检测的灵敏度, 而扫描速率太高又会使 ECL 的峰形不好, 因此, 在下面的实验中所选用的扫描速率为  $60 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

光电倍增管工作电压的选择. 随光电倍增管的负高压增高, 同一溶液的光电信号增强. 考虑到光电倍增管的寿命以及光信号的稳定性, 选择光电倍增管的工作电压为 -950 V 时, 灵敏度和信噪比都较为理想.

### 2.2.2 介质的影响

生命物质的活性范围大致处于  $\text{pH}=4\text{--}8$  范围内, 考虑到把 DMDSBA 应用于生物分子分析体系的需要, 选择几种中性介质进行 DMDSBA 的 ECL 研究. 分别考察了 DMDSBA 在相同浓度的  $\text{pH}=7$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaAc-HAc}$ 、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 、Britton-Robison(BR)等几种中性缓冲液, 以及近中性的非缓冲水溶液, 如  $\text{KCl}$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、纯水等介质中的 ECL 情况. 实验发现, 在不同的介质中, DMDSBA 的发光强度、峰形状等有差异, 在  $\text{KNO}_3$

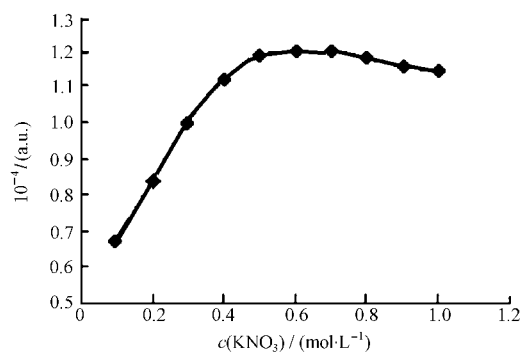


图4 不同  $\text{KNO}_3$  浓度对 DMDSBA 的 ECL 的影响  
Fig.4 Effect of  $\text{KNO}_3$  concentration on the ECL of DMDSBA

$c(\text{DMDSBA})=4.0\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

中的电致化学发光强度最大, 说明不同的电解质对 DMDSBA 的 ECL 有影响.

本实验选择不同浓度的  $\text{KNO}_3$  溶液为发光介质, 考察不同  $\text{KNO}_3$  浓度对 DMDSBA ECL 的影响, 结果见图 4. 从图中可看出, 随着  $\text{KNO}_3$  浓度的增大, 发光信号增强, 当  $\text{KNO}_3$  溶液的浓度达到  $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 发光强度最大, 当  $\text{KNO}_3$  浓度继续增大, ECL 强度又有所下降. 这是因为电致化学发光与化学发光不同, 电致化学发光必需有一定量的支持电解质存在, 以提高体系的导电性, 且电解质的离子强度必需在适当的范围.

实验还发现, DMDSBA 在  $\text{pH}=4\text{--}12$  范围内均有较强的电致化学发光现象, 信号强度基本一致, 且比较稳定, 因此反应体系无须加入任何缓冲溶液. 本实验选择  $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$  为介质.

### 2.3 DMDSBA 电致化学发光的线性范围、检测限及精密度

在选定的实验条件下,  $\text{KNO}_3$  水溶液体系中 DMDSBA 浓度( $c(\text{DMDSBA})$ )的自然对数与其电致化学发光强度( $I$ )的自然对数, 在  $1.0\times 10^{-5}\text{--}1.0\times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系, 回归方程为

$\ln I=0.7233\ln c(\text{DMDSBA})+18.325(R^2=0.9923)$  检测限为  $2.3\times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (信噪比  $S/N=3$ ). 对  $1.0\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DMDSBA 进行 8 次平行测定, 相对标准偏差为 2.8%.

### 2.4 DMDSBA 电致化学发光机理

#### 2.4.1 循环伏安行为

图 5 曲线 a 是 DMDSBA- $\text{O}_2$ - $\text{KNO}_3$ - $\text{H}_2\text{O}$  体系的循环伏安曲线, 图 5 曲线 b 是 DMDSBA- $\text{KNO}_3$ - $\text{H}_2\text{O}$

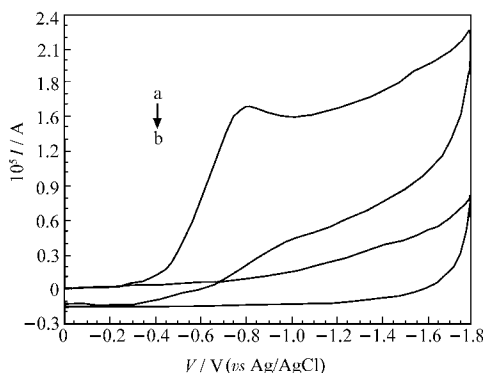


图5 DMDSBA 的循环伏安曲线

Fig.5 Cyclic voltammograms curves for DMDSBA

(a) DMDSBA-O<sub>2</sub>-KNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O,(b) DMDSBA-KNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O; c(DMDSBA)=4.0×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>,  
c(KNO<sub>3</sub>)=0.6 mol·L<sup>-1</sup>

(DMDSBA-O<sub>2</sub>-KNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 体系经通氮气除氧 15 min)的循环伏安曲线. 比较图 5 的 a、b 曲线可知, 曲线 a 中的还原峰是氧气的还原峰, -0.75 V 处的还原峰是 O<sub>2</sub> 得电子还原生成 HO<sub>2</sub><sup>-</sup> [14-16]. 还原峰的起始电位位于 -0.35 V, 最高点峰电位在 -0.75 V, 这一结果与上述 2.1 节中电致化学发光的起始及最高点电位 (-0.38 V 及 -0.72 V) 的位置基本一致.

#### 2.4.2 电致化学发光光谱

实验发现, 通氮气除氧 15 min 后的 DMDSBA-KNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 体系无电致化学发光现象, 而 DMDSBA-O<sub>2</sub>-KNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 体系却有强的电致化学发光. 由此说明 DMDSBA-KNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 体系的电致化学发光必需有氧的存在. 实验中, 在光电倍增管与发光反应池之间分别插入不同波长 (400、425、440、460、490、535、555、575、620 nm) 的滤光片, 记录各波长下的电致化学发光光强. 图 6 为 1.0×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的 DMDSBA

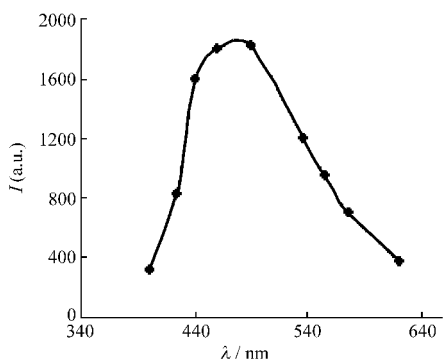


图6 DMDSBA 电致化学发光波长与发光强度的关系曲线

Fig.6 The curve of relationship between ECL wavelength and ECL intensity of DMDSBA

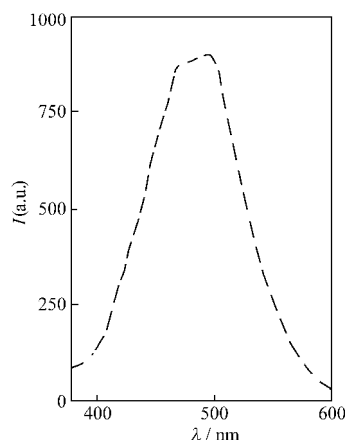
c(DMDSBA)=1.0×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>

图7 DMDSBA 的荧光光谱图

Fig.7 Fluorescent spectrum of DMDSBA

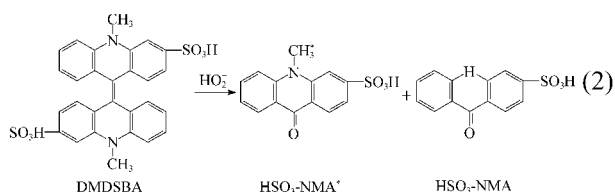
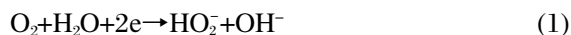
c(DMDSBA)=1.0×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>; λ<sub>ex</sub>=360 nm

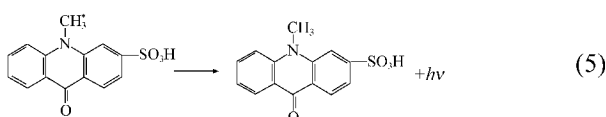
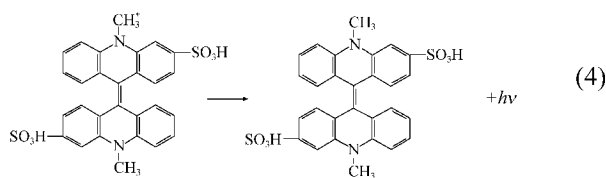
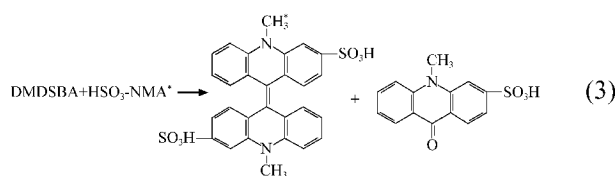
电致化学发光波长与发光强度的关系曲线. 由图 6 可见, DMDSBA 的电致化学发光的最大发射波长位于 460–490 nm 范围内.

#### 2.4.3 荧光光谱研究

图 7 为 DMDSBA 的荧光光谱图. 可以看出, DMDSBA 的最大发射波长位于 490 nm (λ<sub>ex</sub>=360 nm). 文献 [17] 报道的吡啶酮 (NMA) 类物质的荧光最大发射波长位于 450 nm 左右. 参考文献 [10, 16, 17] 的报道, 并结合本实验结果, 我们推测 DMDSBA 电致化学发光的最后三步机理 (即下面机理反应式中的式 (3)、(4)、(5)) 是: 在式 (3) 中, 一部分激发态的 HSO<sub>3</sub>-NMA\* 分子把能量转移到 DMDSBA 上使之激活, 因此, 发光过程的两个发光体分别是激发态的 HSO<sub>3</sub>-NMA\* 和 DMDSBA\*, 在式 (4)、(5) 中, 激发态的 DMDSBA\* 和 HSO<sub>3</sub>-NMA\* 发光回到基态, 电致化学发光的最大发射波长位于 460–490 nm 范围的光谱是这两个发光体发射光谱的叠加.

综合上述实验结果的分析, 并参考文献 [14–16, 18–22] 关于光泽精及鲁米诺的电致化学发光机理的报道, 我们认为 DMDSBA 的电致化学发光机理共有五步:





### 3 结论

本实验室合成的 DMDSBA 在 pH 为 4–12 范围内均表现出较好的电致化学发光活性. 本文在中性体系中详细研究了影响该新试剂电致化学发光的各种因素, 结果表明, 在线性扫描伏安法模式下, 扫描速率为  $60 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 在  $\text{KNO}_3$  水溶液中 DMDSBA 表现出最佳的电致化学发光行为. 该发光体系较为简单, 更重要的是该新试剂带有可标记生物大分子的活性基团, 且它可以在中性介质中产生很强的电致化学发光, 特别适用于生物样品的分析, 为在生物大分子电致化学发光分析检测中的应用奠定了良好的基础.

### References

- 1 Knight, A. W. *Anal. Chem.*, **1999**, **18**: 47
- 2 Fahrnich, K. A.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. *Talanta*, **2001**, **54**: 531

- 3 Wang, P.; Yuan, Y.; Zhu, G. Y.; Zhang, M. L. *Chin. J. Anal. Chem.*, **1999**, **27**(10): 1219 [王鹏, 袁艺, 朱果逸, 张密林. *分析化学*, **1999**, **27**(10): 1219]
- 4 Xu, G. B.; Dong, S. J. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2001**, **29**(1): 103 [徐国宝, 董绍俊. *分析化学*, **2001**, **29**(1): 103]
- 5 Richter, M. M.; Bard, A. *J. Anal. Chem.*, **1998**, **70**: 310
- 6 Richard, T. C.; Bard, A. *J. Anal. Chem.*, **1995**, **67**: 3140
- 7 Deaver, D. R. *Nature*, **1995**, **337**: 758
- 8 Yu, H.; Bruno, J. G.; Chang, T. *J. Biolumin. Chemlumin.*, **1995**, **10**(4): 239
- 9 Kenneth, D. L.; David, M. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, **91**: 1902
- 10 Zhang, J.; Yan, F. X.; Wang, X. M.; Fang, Y. Z. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **1995**, **15**(1): 109 [张棘, 严凤霞, 王筱敏, 方禹之. *光谱学与光谱分析*, **1995**, **15**(1): 109]
- 11 Zhuang, H. S.; Chen, G. N.; Huang, J. L. *Chin. J. Anal. Chem.*, **1999**, **27**(10): 1146 [庄惠生, 陈国南, 黄金陵. *分析化学*, **1999**, **27**(10): 1146]
- 12 Zhuang, H. S.; Wang, Q. E.; Chen, G. N.; Huang, J. L. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2004**, **24**(12): 1514 [庄惠生, 王琼娥, 陈国南, 黄金陵. *光谱学与光谱分析*, **2004**, **24**(12): 1514]
- 13 Zhuang, H. S.; Huang, J. L.; Chen, G. N. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, **512**: 347
- 14 Lin, X. Q.; Sun, Y. G.; Cui, H. *Chin. J. Anal. Chem.*, **1999**, **27**(5): 497 [林祥钦, 孙玉刚, 崔华. *分析化学*, **1999**, **27**(5): 497]
- 15 Haapakka, K. E.; Kankare, J. *J. Anal. Chim. Acta*, **1982**, **138**: 263
- 16 Sun, Y. G.; Cui, H.; Lin, X. Q. *J. Lumin.*, **2001**, **92**: 205
- 17 Week, I.; Sturgess, M.; Brown, R. C. *Methods Enzymol.*, **1986**, **133**: 366
- 18 Sakura, S. *Anal. Chim. Acta*, **1992**, **262**: 49
- 19 Okajima, T.; Ohsaka, T. *J. Electroanal. Chem.*, **2002**, **534**: 181
- 20 Haapakka, K. E.; Kankare, J. *J. Anal. Chim. Acta*, **1981**, **130**: 415
- 21 Chen, G. N.; Zhang, L.; Lin, R. E. *Talanta*, **2000**, **50**: 1275
- 22 Su, Y. Y.; Wang, J.; Chen, G. N. *Talanta*, **2005**, **65**: 531