

DL-赖氨酸- β -环糊精/碳纳米管修饰电极的 制备与应用研究

赵志伟 申贵隽* 谷灵燕

(大连大学 环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622)

摘 要 对 DL-赖氨酸- β -环糊精/碳纳米管修饰金电极的制备与应用进行了研究,建立了一种新的测定 DL-赖氨酸的电化学分析方法。用循环伏安法研究了该修饰电极的选择性和灵敏度以及 DL-赖氨酸在修饰电极上的氧化还原特性,结果表明该修饰电极对 DL-赖氨酸具有显著的催化还原和选择作用。在 pH=5.6 的磷酸盐缓冲溶液中,还原峰电流与 DL-赖氨酸浓度在 5~100 mg/L 范围内呈良好的线性关系,最低检出限为 0.1 mg/L。方法操作简便,可用于药剂中 DL-赖氨酸含量的测定。

关键词 β -环糊精;多壁碳纳米管;修饰电极;DL-赖氨酸

中图分类号:O657.1;TH832 文献标志码:A 文章编号:2095-1035(2015)01-0070-05

Preparation and Application of DL-lysine- β -cyclodextrin/Carbon Nanotube Modified Electrode

ZHAO Zhiwei, SHEN Guijun*, GU Lingyan

(College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract A DL-lysine- β -cyclodextrin/carbon nanotube modified gold electrode was prepared and its application was studied. Based on this, a new electrochemical analysis method was developed for the determination of DL-lysine. The selectivity and sensitivity of the modified electrodes and the oxidation reduction properties of DL-lysine on the modified electrodes were investigated by cyclic voltammetry. The results showed that the modified electrodes exhibited significant catalytic reduction and selectivity for DL-lysine. A good linear relationship between the reductive peak current and the concentration of DL-lysine in the range of 5~100 mg/L was obtained in phosphate buffer solution with pH=5.6, and the detection limit was 0.1 mg/L. The method is simple and can be used for the determination of DL-lysine content in medicament.

Keywords β -cyclodextrin; multiwall carbon nanotubes; modified electrode; DL-lysine

0 前言

赖氨酸(Lysine)是人体必需氨基酸之一,在食物中含量甚低,加工过程中极易破坏,又不能在体内合成,但是它不仅是合成体内蛋白不可缺少的成分,

而且还参与体内的能量代谢等过程,因此广泛应用于食品、饲料和医药工业。

目前,测定赖氨酸的方法有 DBL 法^[1]、茚三酮比色法^[2]、近红外光谱分析法^[3]、FDNB 法^[4]、胍基反应法^[5]、荧光分析法^[6]、染料法^[7]、分光光度法^[9]、

收稿日期:2014-09-24 修回日期:2014-11-13

基金项目:大连市科技计划项目(2012E15-8F169)资助

作者简介:赵志伟,男,学生。E-mail:18042656813@163.com

* 通信作者:申贵隽,男,教授,硕士生导师,主要从事电分析化学分析方面研究。E-mail:sgj0501@163.com

毛细管电泳法^[10]等,但是这些方法大多涉及贵重的仪器和复杂的操作,并且灵敏度不高,使用受到限制,而电化学方法操作简单,快速,成本低廉,并且能够克服这些缺点,可以被应用于赖氨酸的测定。但是,未修饰的电极对赖氨酸的选择性和灵敏度差,并且反应缓慢^[10],因此,通过电聚合的方法将具有空腔结构的 β -环糊精^[11-12]和 DL-赖氨酸共同修饰于电极表面,然后把具有导电催化效应的羧基化多壁碳纳米管微管滴涂到电极表面,定量测定药剂中的赖氨酸含量。这种修饰电极制作简单,并具有良好的稳定性和重现性,测定结果较为理想,与未修饰的金电极相比较,它具有选择性好、灵敏度高、线性范围宽等优点。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

CHI600C 电化学工作站(上海辰华仪器公司);三电极系统:金电极(天津艾达恒晟科技发展有限公司)或修饰电极为工作电极,参比电极为饱和甘汞电极(天津市兰力科化学电子技术有限公司),对电极为铂电极(天津艾达恒晟科技发展有限公司);KQ-100DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);离心沉淀机 80-1 型(上海机械手术厂);pHB-1 型酸度计(上海宇隆仪器有限公司);FA1604 型分析天平(上海雷韵试验仪器制造有限公司)。

多壁碳纳米管(纯度 $>95\%$, $\Phi 8\sim 15$ nm,中国科学院成都有机化学研究所); β -环糊精(天津市盛铭宝商贸有限公司);DL-赖氨酸(中国惠兴生化有限公司);磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(PBS 缓冲溶液,自制)。赖氨肌醇维 B 口服溶液(济川药业股份有限公司);所有试剂均为分析纯,实验用水为去离子水。

1.2 修饰电极的制备

1.2.1 金电极预处理

将金电极在金相砂纸上打磨,然后在麂皮垫上依次用 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末抛光,依次用无水乙醇和水充分超声清洗。将处理后的电极置于 1.0 mol/L 的 H_2SO_4 溶液中,以 50 mV/s 扫描速度,在 -0.2~+1.6 V 电位区间用循环伏安法(CV)扫描直至稳定^[13]。将电极取出后用去离子水冲洗干净,然后将清洗完毕的电极保存在去离子水中备用。

1.2.2 DL-赖氨酸- β -环糊精/多壁碳纳米管修饰电极的制备

将 5 mL β -CD(5×10^{-3} mol/L), 5 mL DL-lys

(100 mg/L)和 5 mL H_2SO_4 (0.5 mol/L)混合到一起超声反应 15 min,然后以金电极为基体电极,在此介质中,溶液静置条件下。以 100 mV/s 的扫描速度,-0.6~1.0 V 电位范围之间,通过循环伏安法扫描 20 圈至 CV 曲线稳定,然后取出电极,经去离子水淋洗电极表面,在红外灯下干燥。

采用 $V_{(\text{HNO}_3)}:V_{(\text{HCl})}=1:3$ 回流 12 h 的方法将 MWNTs 羧基化,用 NaOH (0.01 mol/L)洗至 pH 值为近中性时止,离心后干燥。称取 5.0 mg 预处理过的 MWNTs 于 5.0 mL DMF(N,N-二甲基甲酰胺)中超声分散 30 min,最后得到稳定的黑色分散液。取适量滴在 DL-赖氨酸- β -环糊精修饰电极的表面,红外灯下烘干即制得 DL-lys- β -CD/MWNTs 修饰电极,放在 PBS 缓冲溶液中保存,待用。

1.2.3 对比修饰电极制备

将 5 mL DL-赖氨酸(100 mg/L), 5 mL 去离子水和 5 mL H_2SO_4 (0.5 mol/L)混合到一起超声反应 15 min,其它实验步骤同 1.2.2,即得到 DL-lys/MWNTs 修饰电极;将 5 mL β -CD(5×10^{-3} mol/L), 5 mL 去离子水和 5 mL H_2SO_4 (0.5 mol/L)混合到一起超声反应 15 min,其它实验步骤同 1.2.2,即得到 β -CD/MWNTs 修饰电极。

2 结果与讨论

2.1 电聚合膜的循环伏安法表征

以为探针分子,分别测定了裸金电极, β -CD/MWNTs 修饰电极,DL-Lys/MWNTs 修饰电极、MWNTs 修饰电极,DL-Lys- β -CD/MWNTs 修饰电极的循环伏安图(图 1)。图 1 中, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 探针分子在裸金电极上的氧化峰与还原峰对称性良好,具有良好的可逆性,而在 DL-Lys- β -CD/MWNTs 修饰电极(曲线 e)上的氧化峰正移,峰型变宽,峰电流显著减小,甚至还原峰消失,探针分子在修饰电极上的可逆性严重减弱。可能由于修饰电极表面 β -CD 和氨基酸形成的包络物分子含-COOR 基团,具有较高的负电荷密度,因此这种静电排斥抵制铁氰化钾到达修饰电极的表面,从而阻止其在电极表面的电子传递。这表明,DL-Lys- β -CD/MWNTs 修饰电极表面的电活性物质增加^[11],电极表面已经形成了一定覆盖率的膜层,抑制了 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 探针分子向金电极表面的扩散,可以证明电极的修饰结果较好^[14-15]。此外,曲线 e 与 b, c, d 相比较,曲线 b, c, d 三者几乎相同,并且与曲线 a 的峰电流相差不大,这说明只有 DL-Lys, β -CD 和

MWNTs 共同修饰于金电极表面时,才会有较好的修饰效果。

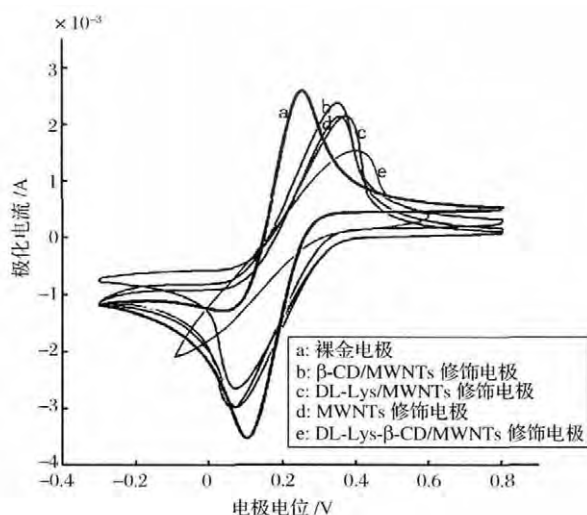


图 1 不同电极在铁氰化钾中的循环伏安响应曲线
Figure 1 Cyclic voltammograms of different electrodes in Potassium ferricyanide solution.

2.2 DL-Lys-β-CD/MWNTs 修饰电极的电化学性能

2.2.1 灵敏度

将裸金电极和不同的修饰电极,以 50 mV/s 的扫描速度,在 -0.8~1.0 V 电位范围之间,用循环伏安法扫描 20 mg/L 的 DL-lys,结果如图 2 所示。图 3 为 DL-lys 在修饰电极表面可能发生的氧化还原反应。图 2 中,该修饰电极的氧化峰电流很小,是由于在酸性介质中 H^+ 对 DL-lys 的氧化反应起到了抑制作用,金电极优先失去了电子^[16];还原峰产生较大的峰电流是因为 DL-lys 在电极表面发生了加氢的还原反应,生成了醛基化合物。同时,DL-Lys-β-CD/MWNTs 修饰电极的峰电流的绝对值最大,较裸金电极高出两个数量级,较其它修饰电极高出两倍以上,说明该修饰电极具有较好的灵敏度。

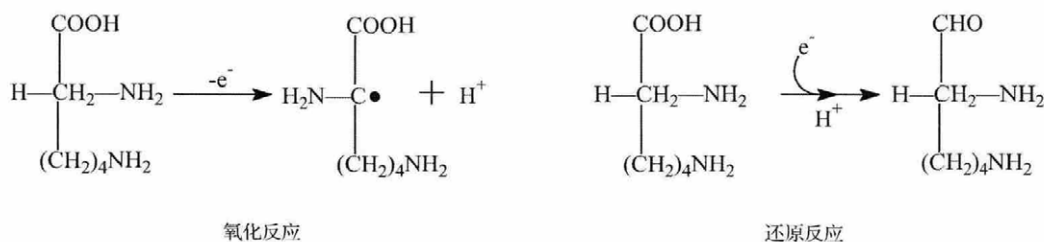


图 3 DL-lys 在修饰电极上的化学反应

Figure 3 Chemical reactions of DL-lys on the modified electrodes

2.3 实验条件优化

在 pH=4.8~6.4 范围内改变底液的 pH 值,

此外,与曲线 a 相比,曲线 b,c,d 相差不多,表明该修饰电极灵敏度提高是由于 DL-Lys 和 β-CD 的共同作用,而不是因为 DL-lys 和 β-CD 的单独作用或电极在酸性介质中循环扫描活化的影响。

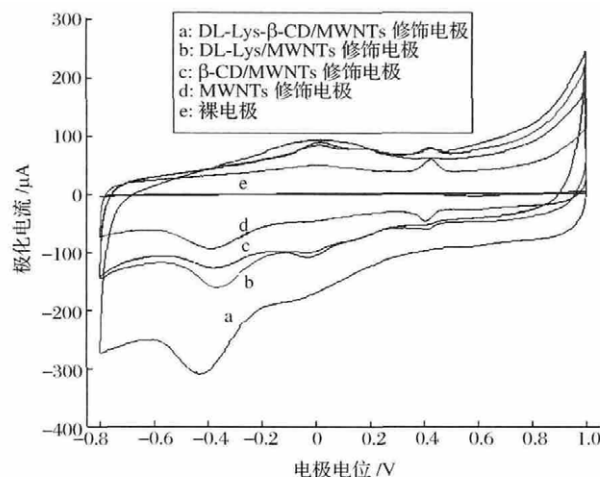


图 2 不同修饰电极在 DL-赖氨酸中的循环伏安图
Figure 2 Cyclic voltammograms of different modified electrodes in DL-lysine solution.

2.2.2 选择性

以 DL-Lys-β-CD/MWNTs 修饰电极,分别在 PBS 缓冲底液、DL-赖氨酸 (20 mg/L)、L-色氨酸、DL-苯丙氨酸和 DL-谷氨酸介质中,以 50 mV/s 的扫速,在 -0.6~1.0 V 电位范围内用循环伏安法扫描,结果如图 4 所示。图 4 中,与缓冲溶液峰电流相近的依次是 DL-谷氨酸,DL-苯丙氨酸,L-色氨酸和 DL-赖氨酸,同时,赖氨酸与其它氨基酸的峰电位相差 0.08 V 左右。氨基酸的峰电流与缓冲溶液越接近,表明修饰电极对该种氨基酸的响应值越差,并且它们之间的峰电位有明显的区别,证明了 DL-Lys-β-CD/MWNTs 修饰电极对 DL-赖氨酸具有良好的选择性。

测定 DL-Lys-β-CD/MWNTs 修饰电极上 20 mg/L 的 DL-lys 的峰电流。DL-lys 的还原峰电流绝对值

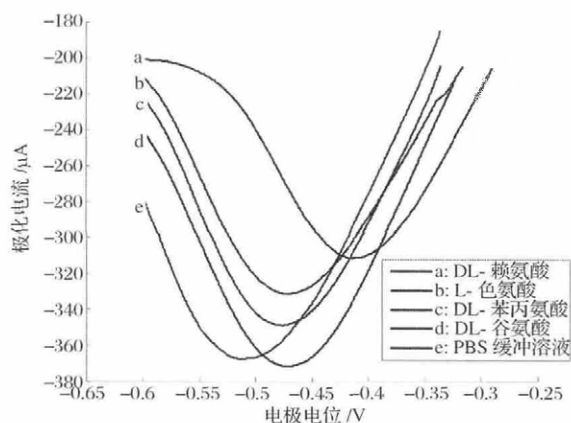


图 4 修饰电极在不同氨基酸中的循环伏安图

Figure 4 The cyclic voltammogram of modified electrode in the different amino acids solutions

大小在 $\text{pH}=4.8 \sim 6.4$ 范围内先增大后减小,在 $\text{pH}=5.6$ 时达到最大,故选择 $\text{pH}=5.6$ 的 PBS 为最佳底液。在 $20 \sim 160 \text{ mV/s}$ 范围内改变扫描速率进行实验, 100 mV/s 时峰电流的绝对值最大,故实验选择 100 mV/s 的扫描速率。用 DL-Lys 和 β -CD 修饰电极,扫描次数为 20 时,峰电流的绝对值最大,故选择实验的最佳扫描次数为 20 次。

2.4 工作曲线、重线性 and 稳定性

在最佳实验条件下,用循环伏安法对不同浓度的 DL-赖氨酸标准溶液进行了定量测定,浓度在 $5 \sim 100 \text{ mg/L}$ 范围内的线性关系为 $I(\mu\text{A}) = 0.7342C - 335.08$,相关系数 $Y=0.9668$,最低检出限为 0.1 mg/L ,如图 5 所示。图 5 中,峰电位随着 DL-lys 浓度的增加而增大,这个实验结果与能斯特方程反映的规律完全一致。

用 DL-Lys- β -CD/MWNTs 修饰电极对 20 mg/L 的 DL-赖氨酸标准溶液连续测定 10 次,测定结果的相对标准偏差(RSD)为 2.5% ,说明该修饰电极重现性良好。

DL-Lys- β -CD/MWNTs 修饰电极在室温、空气流通的条件下保存 14 d,对 DL-lys 标准溶液响应电流基本不变,说明该电极具有较好的稳定性。

2.5 样品分析及加标回收实验

在最佳实验条件下,对赖氨酸肌醇维 b12 口服液经稀释处理后得到 50 mg/L 的样品溶液,用修饰好的电极连续测定 3 次,并在样品中加入 DL-赖氨酸标准溶液进行加标回收实验,结果见表 1。实验结果表明,该修饰电极对 DL-赖氨酸的测定,具有较好的准确度和精密度。

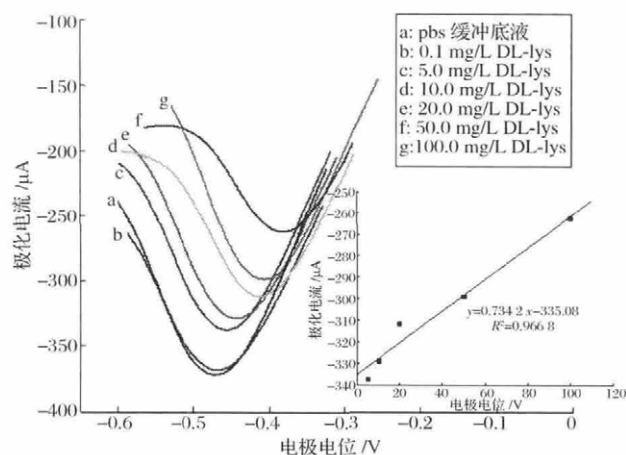


图 5 DL-lys 标准溶液的循环伏安图与标准曲线

Figure 5 The cyclic voltammograms of DL-lys standard solutions and standard curve

表 1 样品测定及回收率实验

Table 1 Determination of the sample and results of recovery test $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$

样品浓度	实际测定值	相对标准偏差/%	加标值	加标后测定值	回收率/%
50.0	48.2		10.0	60.5	105.0
50.0	51.4	4.6	20.0	69.5	97.5
50.0	52.8		30.0	79.4	98.0

3 结论

论文研究了 DL-赖氨酸在 DL-赖氨酸- β -环糊精/碳纳米管修饰电极上的电化学行为。由于环糊精与 DL-赖氨酸之间强烈的相互作用,共同修饰于电极表面后,增加了对 DL-赖氨酸的响应,而且多壁碳纳米管具有大的比表面积以及较多的活性位点,能够提高 DL-赖氨酸检测的灵敏度,使得 DL-赖氨酸在 DL-lys- β -CD/MWNTs 修饰金电极上显示了很好的氧化还原活性。修饰电极具有选择性好、灵敏度高、电化学稳定性好和抗干扰能力强等优点,表现出优越的导电性能。该修饰电极可用于测定药剂中的 DL-赖氨酸,并将具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 罗伟胜,甄海,黄焱林,等. 以 DBL 法作为 GQA-31 型谷物品质分析仪定标方法测定稻米的赖氨酸含量[J]. 氨基酸杂志,1991,17(3):42-44.
- [2] 刘飞飞,李群,于岚. 茚三酮比色法定量检测赖氨酸条件的研究[J]. 中国食品添加剂,2010,21(5):223-225,234.
- [3] 孙通,徐惠荣,应义斌. 近红外光谱分析技术在农产品/食品品质在线无损检测中的应用研究进展[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(1):122-126.

- [4] Carpenter K J. The estimation of the available lysine in animal-protein foods [J]. *Biochemical Journal*, 1960, 77(3):604.
- [5] Blom L, Hendricks P, Caris J. Determination of available lysine in foods [J]. *Analytical biochemistry*, 1967, 21(3):382-400.
- [6] Goodno C C, Swaisgood H E, Catignani G L. A fluorimetric assay for available lysine in proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 115(1):203-211.
- [7] Perl I M, Szakács M P, Kővágó Á, et al. Stoichiometric dye-binding procedure for the determination of the reactive lysine content of soya bean protein [J]. *Food chemistry*, 1985, 16(2):163-174.
- [8] 邱光葵, 薛茂杰. 赖氨酸的快速分光光度测定[J]. *分析化学*, 1989, 17(10):906-908.
- [9] 王力, 冯珍鸽, 骆聪婷, 等. 毛细管电泳-电化学发光分离检测饮料中 L-赖氨酸[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(4):224-228.
- [10] 刘有芹, 颜芸, 沈含熙. 化学修饰电极的研究及其分析应用[J]. *化学研究与应用*, 2006, 18(4):337-343.
- [11] 侯晓兰, 申贵隼, 刘倩, 等. β -环糊精/碳纳米管修饰电极上盐酸异丙嗪的电化学行为研究[J]. *分析科学学报*, 2011, 27(5):603-606.
- [12] 王宗花, 刘军, 颜流水, 等. 羧基化碳纳米管嵌入石墨修饰电极对多巴胺和抗坏血酸的电催化[J]. *分析化学*, 2002, 30(9):1053-1057.
- [13] 杨秋霞, 李国宝, 张颖. 维生素 B₁ 自组装膜修饰金电极对多巴胺、尿酸的电催化作用[J]. *分析化学*, 2009, 37(7):1004-1008.
- [14] Green T A, Quickenden T I. Calorimetric studies of highly loaded deuterides and hydrides of palladium[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1995, 389(1):91-103.
- [15] Green T A, Quickenden T I. Electrolytic preparation of highly loaded deuterides of palladium[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1994, 368(1):121-131.
- [16] 孙凯, 孙登明. 黄嘌呤和尿酸在修饰电极上的电化学反应及测定研究[J]. *分析化学*, 2014, 42(7):991-996.