

## 流动体系中维生素 B<sub>1</sub> 的电致化学发光研究

陈曦\* 陈薇 王小如

(厦门大学化学化工学院现代分析科学教育部重点实验室 厦门 361005)

**摘要** 在 0.1 mol/L NaOH 水溶液中 (pH 12.6), 维生素 B<sub>1</sub> 的水解产物在玻碳电极上于 +0.88 V (vs. Ag/AgCl, 下同) 处被氧化, 其氧化产物在 +1.20 V 处与被氧化的 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 反应, 生成激发态的 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>\* 而发光, 发光波长为 609 nm, 研究结果表明水溶液的 pH 值影响了维生素 B<sub>1</sub> 的水解速率, 从而引起发光强度的明显差异.

**关键词** 电致化学发光, 维生素 B<sub>1</sub>, 流动注射分析, 联吡啶钌

## Electrochemiluminescent Behaviour of Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamine) and Tris(2,2' - bipyridyl) Ruthenium in a Flow System

CHEN Xi\* CHEN Wei WANG Xiao - Ru

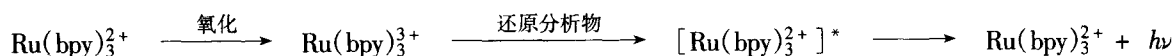
(The Key Laboratory of Analytical Sciences of MDE and Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Abstract** Upon the electrochemical oxidation of tris(2,2' - bipyridyl) ruthenium(II) [Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>] and vitamin B<sub>1</sub> (thiamine) in 0.1 mol/L NaOH (aqueous solution), a bright electrochemiluminescence (ECL) was observed. Vitamin B<sub>1</sub> was transformed into a yellow pseudo - base and a colorless thiol formed when treated with 0.1 mol/L NaOH for 5 and 20 min, respectively. The thiol form was oxidized at +0.88 V (vs. Ag/AgCl) to produce a free radical, which reacted with Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> at a glassy carbon electrode. The light emission at wavelength 609 nm was caused by the transition of the excited state of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> to its ground state. The pH of solution effected the hydrolysis of vitamin B<sub>1</sub>, which caused the different light emission intensity of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and vitamin B<sub>1</sub> solution. ECLs of some coexisting substances such as amino acids, sugars, hydroxyl carboxylic acids, vitamin B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> were also detected in this flow system.

**Keywords** electrochemiluminescence, vitamin B<sub>1</sub>, flow injection analysis, tris(2,2' - bipyridyl) ruthenium

自 1987 年 Noffsinger 和 Danielson<sup>[1]</sup> 发现脂肪胺与联吡啶钌 [Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>] 的电致化学发光 (ECL) 现象, 并提出其发光反应机理以来, 由于 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> ECL 在生化与药物分析上的高灵敏和很好的线性范围, 其 ECL 的研究与应用日益受到人们的

重视<sup>[2~5]</sup>. 一般认为 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 在电极上被氧化为 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, 当反应体系中存在还原性的自由基离子时, Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> 被还原生成激发态的 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>\* 而产生 610 nm 的光辐射.



\* E-mail: xichen@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期: 1999 - 05 - 21, 修回日期: 1999 - 10 - 25, 定稿日期: 1999 - 12 - 19, 国家自然科学基金 (29877022) 资助项目  
(Received May 21, 1999. Revised October 25, 1999. Accepted December 19, 1999)

水溶性维生素 B<sub>1</sub> 广泛存在于食品与药物中, 它的研究和分析应用仍然是人们感兴趣的研究课题<sup>[6,7]</sup>. Hart 等<sup>[8]</sup>曾研究过玻碳电极上维生素 B<sub>1</sub> 的电化学行为, 并用于安培法测定了药剂中维生素 B<sub>1</sub> 的含量. 在研究中性介质维生素 C 与 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> ECL 过程中, 我们发现维生素 B<sub>1</sub> 有微弱的发光, 其发光强度随体系 pH 值的增大而增大. 本文探讨碱性水溶液中, 维生素 B<sub>1</sub> 和 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 体系的电致化学发光反应机理及流动体系中测定的适宜条件, 为维生素 B<sub>1</sub> 的 HPLC 测定提供了一种新的方法.

## 1 实验

### 1.1 试剂

Ru(bpy)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 维生素 B<sub>1</sub> 购自 Sigma 公司, 无需进一步提纯, 直接使用. 其它所有试剂均为优级纯, 实验用水为石英亚蒸馏水. 维生素 B<sub>1</sub> 水溶液于实验前临时配制, 并依次稀释.

### 1.2 仪器

电致化学发光仪器由相马 S-3400 (Tokyo, Japan) 化学发光仪改制, 流动电解池<sup>[9]</sup>使用三电极系统, 工作电极为玻碳圆盘 (22.1 mm<sup>2</sup>), 流动液出口的不锈钢细管为辅助电极, 参比电极为 Ag/AgCl (饱和 KCl 溶液), 溶解池内体积为 1.5 μL, 恒电位仪 (Princeton Appl. Res. Co., Type 174A, USA) 用以控制电解池电位及进行循环伏安研究, 利用 IMUC-700 多道荧光检测器 (Dtsuka Electronics, Japan) 进行 ECL 光谱测量. UV240 (Simatzu, Japan) 自动扫描分光光度计用于检测维生素 B<sub>1</sub> 在碱性水溶液中的紫外可见光谱变化.

流动分析系统由一台 DM 2M-1024 (Saruki Ltd., Japan) 蠕动泵和带有 10 μL 定量管的 Rheodyne 7021 (Cotati, USA) 组成, 注射维生素 B<sub>1</sub> 后, 发光信号经发光仪转换放大后, 用 UP-6537A 笔式记录仪 (National, Japan) 记录<sup>[9]</sup>.

### 1.3 实验操作

为获得稳定的发光信号, 维生素 B<sub>1</sub> 水溶液在临实验前用水配制, 30 min 后使用. 循环伏安实验在 10 mL 电解池中进行. 流动注射分析 (FIA) 实验流动相为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH - 1 mmol·L<sup>-1</sup> Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, 控制流速 0.5 mL/min.

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 对发光强度影响

Maier 等曾研究过碱性水溶液中维生素 B<sub>1</sub> 的水

解过程<sup>[10]</sup>. 在水溶液中, OH<sup>-</sup> 的浓度是影响维生素 B<sub>1</sub> 水解速率的关键. 维生素 B<sub>1</sub> 在 OH<sup>-</sup> 作用下, 首先产生黄色的假碱式 (B), 然后生成无色的硫醇式 (C)<sup>[10]</sup>. 维生素 B<sub>1</sub> 在配制 5 min 后的吸收光谱显示 (图 1), 体系的 pH 在 12.6 时, 342 nm 处有一新的吸收峰出现, 同时 260 nm 处吸收峰消失, 相应的体系的 pH 从 6.9 至 9.0 时, 观察不到 342 nm 的吸收峰, 而 260 nm 处的吸收强度变化很小. pH 对维生素 B<sub>1</sub> - Ru·(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 体系的 ECL 影响结果表明, 在维生素 B<sub>1</sub> 配制 30 min 后的中性或微碱性 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 水溶液中, 只能观察到微弱的发光信号, 当体系的 pH 增大至 11 后, 体系的发光强度明显增大. pH 达到 12 以后, 发光强度基本上保持不变. 这表明维生素 B<sub>1</sub> - Ru·(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 的 ECL 与维生素 B<sub>1</sub> 的水解有关, 有利维生素 B<sub>1</sub> 水解产生的 OH<sup>-</sup> 浓度, 明显影响其发光强度.

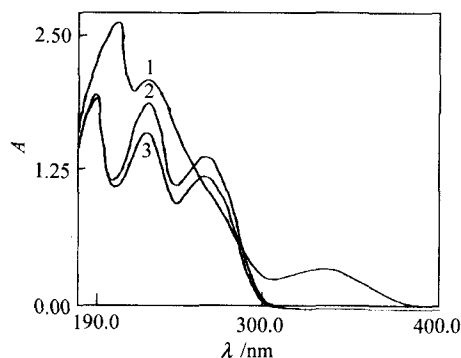
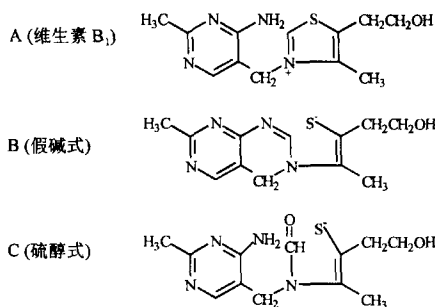


图 1 体系 pH 对维生素 B<sub>1</sub> 水解的影响

1—pH 12.65; 2—pH 9.0; 3—pH 6.90.

维生素 B<sub>1</sub> 浓度 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>, 放置 5 min



### 2.2 维生素 B<sub>1</sub> 溶液搁置时间的影响

由于维生素 B<sub>1</sub> (A) 的第一步水解产物是黄色的假碱式 (B), 不稳定的 B 在 OH<sup>-</sup> 作用下将进一步水解为无色的硫醇式 (C). 维生素 B<sub>1</sub> 水解吸收光谱实验表明维生素 B<sub>1</sub> 在 342 nm 处的吸收随其溶液搁置时间的增加而减少, 搁置 20 min 后该波长的吸收几乎为零 (图 2). FIA 系统中维生素 B<sub>1</sub> - Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> ECL 结果显示, 在 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中, 使用初配制的维生素 B<sub>1</sub> 溶液其发光强度很弱, 在溶液配制

并搁置 30min 后进样,发光强度达到最大,且稳定不变.这些结果说明,氧化的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  与维生素 B<sub>1</sub> 水解的最后产物作用而产生光辐射.

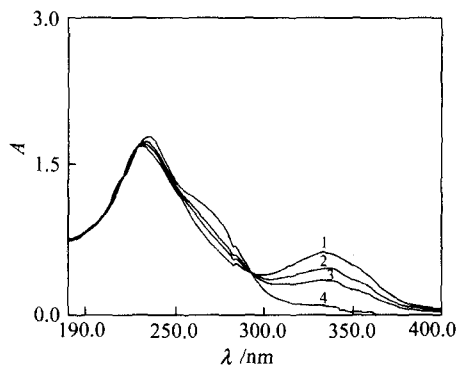


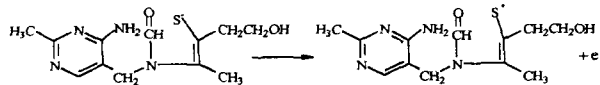
图 2 搁置时间对维生素 B<sub>1</sub> 水解的影响

1—1'48"; 2—2'37"; 3—3'46"; 4—20'

维生素 B<sub>1</sub> 浓度  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH (pH 12.6)

### 2.3 循环伏安实验及施加电极电势对发光强度的影响

$0.1 \text{ M}$  NaOH 水溶液中维生素 B<sub>1</sub> 的循环伏安实验结果如图 3a 所示.初配制维生素 B<sub>1</sub> 在  $+0.30 \text{ V}$  (vs. Ag/AgCl) 处出现一个不可逆的氧化峰,随溶液搁置时间的增长,  $+0.30 \text{ V}$  处氧化峰电流降低,在  $+0.88 \text{ V}$  处出现一个新的不可逆氧化峰,该处氧化电流随配制时间增加,溶液搁置 30 min 后其峰电流值保持恒定.维生素 B<sub>1</sub> 溶液搁置初始其主要形式为黄色的假碱式(B),相应的  $+0.30 \text{ V}$  处应为假碱式 B 的氧化电流,而硫醇式的水解产物(C)浓度随配制时间增加而增加,对应地出现了  $+0.88 \text{ V}$  处新的氧化峰. Hart 曾指出<sup>[8]</sup>,在 pH 11 水溶液的玻碳电极上维生素 B<sub>1</sub> 的水解产物(C),在施加电极电势大于  $+1.0 \text{ V}$  时将失去一个电子,氧化生成自由基离子:



$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  在  $0.1 \text{ M}$  NaOH 中,在  $+1.20 \text{ V}$  处的氧化是可逆的过程(图 3b).在碱性  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  - 维生素 B<sub>1</sub> 水溶液中,当施加电极电势小于  $+1.20 \text{ V}$  时,观察不到体系的发光,这表明体系的发光与  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的氧化有关.对  $+0.88 \text{ V}$  氧化峰的循环伏安实验结果表明,在 pH 9.0 ~ 13.0 范围内,其峰电流随 pH 值的增加而增大的比率为  $1.28 \mu\text{A}/\text{pH}$ ,峰电位不随 pH 变化而改变,说明硫醇式水解产物(C)的氧化过程中没有质子的介入;另外改变电位扫描速率,  $+0.88 \text{ V}$  氧化反应显现出典型的不可逆反应特征,即提高电位扫描速率,其氧化峰电位正移.在扫描速

率分别为  $50 \text{ mV/s}$ ,  $100 \text{ mV/s}$ ,  $200 \text{ mV/s}$  时,其峰电位分别为  $+0.88 \text{ V}$ ,  $+0.94 \text{ V}$  和  $+1.00 \text{ V}$ .

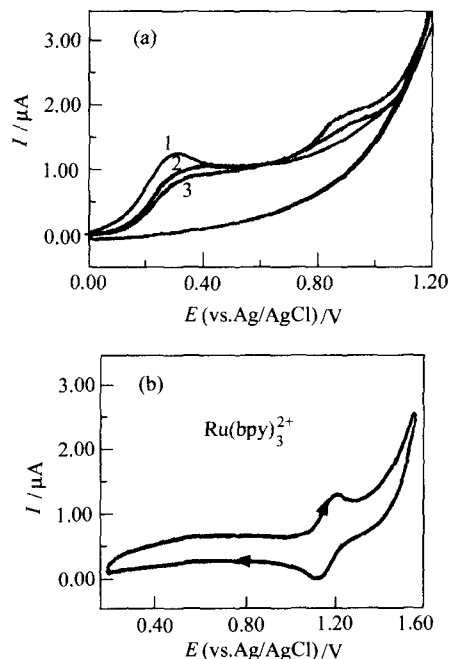


图 3 碱性水溶液中维生素 B<sub>1</sub>

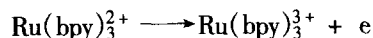
和  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  循环伏安图

(a) 维生素 B<sub>1</sub> ( $10^{-4} \text{ mol/L}$ ); (b)  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ( $10^{-3} \text{ mol/L}$ )

1—搁置 2min; 2—搁置 10min; 3—搁置 30min

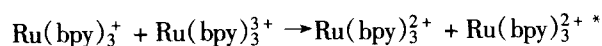
扫描速率  $50 \text{ mV/s}$ ,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH (pH 12.6)

因此体系的 ECL 与  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的氧化有关.当施加电极电势大于  $+1.20 \text{ V}$  时,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  失去一个电子,被氧化为  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ,体系的发光强度随施加电极电势的增大而增加,但由于  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  背景发光的存在,噪音也随之增大.选用施加电极电势为  $+1.70 \text{ V}$  (vs. Ag/AgCl).

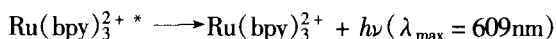
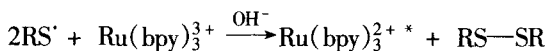
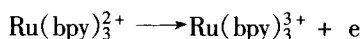
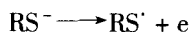
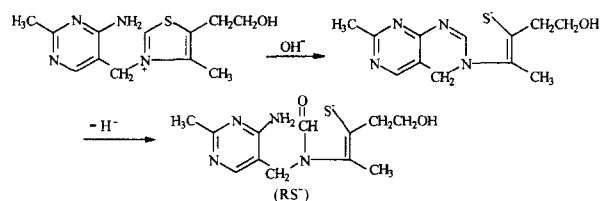


### 2.4 发光光谱

在碱性水溶液中,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  在选用的施加电极电势下有较弱的本底发光,最大发光波长为  $609 \text{ nm}$ ,其发光强度随体系  $\text{OH}^-$  浓度的增加而增大.当体系加入维生素 B<sub>1</sub> 后,发光强度增强,最大发光波长保证不变. Yamashita<sup>[11]</sup>指出  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  本底发光源于强氧化性的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  与体系中  $\text{OH}^-$  反应生成激发态的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ :



同时  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  易与体系中的还原性自由基作用生成激发态的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  [12]. 在碱性维生素  $\text{B}_1$  水溶液中, 维生素  $\text{B}_1$  经过水解, 首先生成黄色的假碱式(B), 不稳定的 B 进一步水解, 生成无色的硫醇式水解产物(C), 在一定电极电势下, 具有一定电活性的 C 在 +0.88V 处被氧化, 形成自由基离子 ( $\text{RS}^\cdot$ ). 该自由基离子与  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  反应, 生成激发态的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  而发出 609nm 的光, 同时在碱性介质中, ( $\text{RS}^\cdot$ ) 被氧化生成二聚体 ( $\text{RS}-\text{SR}$ ) [13]. 其反应过程可能为:



为进一步证实维生素  $\text{B}_1$  的水解, 以及水解产物的电氧化所产生的  $\text{RS}^\cdot$  自由基离子是 ECL 产生的关键, 在相同实验条件下, 检测了具有噻唑和吡啶基团的 3,4-二甲基-5-(2-羟乙基)-噻唑碘和 2-甲基-3-(β-羟乙基)吡啶溴的 ECL, 结果均无法观察到它们的 ECL 信号.

## 2.5 维生素 $\text{B}_1$ 测定条件及共存物质的影响

实验结果表明施加电极电势、体系 pH、支持电解质浓度、流动相的流速等均影响维生素  $\text{B}_1$  的 ECL, 较低的流速, 较高的施加电极电势、体系 pH 值和电解质浓度, 虽然能获得较强的发光信号, 但相应的噪音信号和本底发光也增加, 选用合适的实验条件为:  $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH (pH 12.6), 施加电压为 +1.70V, 流速为  $0.5\text{mL}/\text{min}$ , 该条件下维生素  $\text{B}_1$  的最低检测浓度为  $2 \times 10^{-6}\text{mol}/\text{L}$ , 线性范围为  $1.0 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-6}\text{mol}/\text{L}$ . 该体系中除维生素  $\text{B}_1$  有较强的发光信号外, 胺、氨基酸、糖、带羟基有机酸和维生素  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_6$  等都可观察到它们的发光信号 (表 1). 从表中看出一些氨基酸, 醇类和带有羟基的有机酸在该体系中均可观察到相应的发光信号, 通过适当的分离条件的选择, 利用 HPLC 方法, 可以对这些物质进行 ECL 检测.

表 1 一些共存物质在联吡啶钌流动体系中的 ECL 响应

化合物	检测限 (nmol)
脯氨酸 (proline)	0.008
羟基脯氨酸 (hydroxyproline)	0.008
组氨酸 (histidine)	0.020
甲醇 (methanol)	35
乙醇 (ethanol)	40
D-葡萄糖 (D-glucose)	30
D-果糖 (D-fructose)	32
酒石酸 (tartaric acid)	8.2
柠檬酸 (citric acid)	2.8
维生素 C (ascorbic acid)	0.55
苹果酸 (malic acid)	5.9
葡萄糖酸 (D-gluconic acid)	28
维生素 $\text{B}_1$ (thiamine)	20
维生素 $\text{B}_2$ (riboflavin)	48
维生素 $\text{B}_6$ (pyridoxine)	65

## References

- 1 J. B. Noffsinger, N. D. Danielson, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 865.
- 2 C. He, K. A. Cox, N. D. Danielson, *Anal. Lett.*, **1990**, 23, 195.
- 3 X. Chen, M. Sato, *Anal. Sci.*, **1995**, 11, 749.
- 4 J. S. Ridlen, D. R. Skotty, P. T. Kissinger, T. A. Nieman, *J. Chromatogr. B*, **1997**, 694, 393.
- 5 P. Liang, R. I. Sanchez, M. T. Martin, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2426.
- 6 D. Blanco, M. B. Llaneza, M. D. Gutierrez, *J. Liquid Chromatogr. & Related Technologies*, **1996**, 19(13), 2155.
- 7 K. Yamanaka, M. Matsuoka, K. Banno, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 726(1~2), 237.
- 8 J. P. Hart, M. D. Nanmar, S. Tsang, *Analyst*, **1995**, 120(4), 1059.
- 9 CHEN Xi, JIA Li, S. Masanori, *Acta Chimica Sinica*, **1998**, 56, 238 (in Chinese).
- 10 G. D. Maier, D. E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 4386.
- 11 K. Yamashita, S. Y. Nishida, Y. Harima, A. Segawa, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 872.
- 12 H. S. White, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6891.
- 13 I. Utsumi, K. Harada, K. Kohno, G. Tsukamoto, "Methods in Enzymology", Vol. 18, ed. by D. B. McLormick, L. D. Wright, Academic Press, New York, **1970**, p. 168.

(Ed. CHENG Biao)

(ZHENG Guo - Cheng)