

• 研究论文 •

基于聚 2,6-二氨基吡啶膜及纳米金修饰的癌胚抗原免疫传感器研究

管 姝 袁 若* 柴雅琴 唐点平 刘凯歌 王晋芬

(西南大学化学化工学院发光与实时分析教育部重点实验室 重庆 400715)

摘要 在玻碳电极表面电聚合 2,6-二氨基吡啶(pPA), 利用硫堇(Thi)、纳米金(nano-Au)固载癌胚抗体, 制得稳定性好、灵敏度较高、线性范围宽的电流型免疫传感器. 通过循环伏安法考察了该免疫传感器的电化学特性, 在优化的实验条件下, 该免疫传感器的峰电流随着检测溶液中癌胚抗原(CEA)浓度的增大而减小, 并在 0.5~20 和 20~160 ng/mL CEA 范围内呈现出良好的线性关系, 检测下限为 0.2 ng/mL. 该免疫传感器具有制作简单、重现性好、线性范围宽等优点, 可用于临床上对 CEA 的检测.

关键词 免疫传感器; 聚 2,6-二氨基吡啶(pPA); 硫堇(Thi); 纳米金(nano-Au); 癌胚抗原(CEA)

Amperometric Immunosensor for Carcinoembryonic Antigen Based on Poly(2,6-pyridinediamine) Membrane and Gold Nanoparticles

Guan, Shu Yuan, Ruo* Chai, Yaqin Tang, Dianping Liu, Kaige Wang, Jinfen

(Key Laboratory of Luminescence and Real-time Analysis of MOE, College of Chemical Engineering, Southwest China University, Chongqing 400715)

Abstract The poly 2,6-pyridinediamine (pPA) film was formed on the glassy carbon electrode by utilizing electropolymerization, which yielded an interface with amine groups for the assembly of thionine (Thi) and colloidal Au. The electrochemical characteristics of the immunosensor were studied by cyclic voltammetry. The factors influencing the performance of the resulting biosensor were studied in detail. Under the optimized conditions, the current response of the proposed immunosensor decreased linearly in two concentration ranges of CEA from 0.5 to 10 ng/mL and from 10 to 120 ng/mL with a detection limit of 0.2 ng/mL. Moreover, the studied immunosensor exhibited simple fabrication, good reproducibility and a broad linear range, which made it potentially application for determination of CEA in clinical analysis.

Keywords immunosensor; poly(2,6-pyridinediamine); thionine; gold nanoparticle; carcinoembryonic antigen

癌胚抗原(CEA)是一个分子量为 180~200 kD 的黏附性的糖蛋白分子, 1965年由 Gold 和 Freedman^[1]首先从结肠腺癌和胚结肠粘膜组织中分离得到. 当某些恶性肿瘤细胞基因调控受到损伤后, 可能重新启动有关蛋白的合成, 致使肿瘤患者血清中 CEA 的浓度升高^[2]. 因此, CEA 已作为肺癌^[3,4]、乳腺癌^[5,6]、肠癌^[7]等多种癌症的肿瘤标记物之一, 测定肿瘤患者血清中 CEA 的浓度, 对

于监测肿瘤的存在、生长、转移等有重要的参考价值. 近年来, 作为生物分析方法的重要组成部分之一的免疫传感技术, 对 CEA 的检测也得到了不断的发展. 将纳米二氧化钛^[8]、碳纳米管^[9]等引入免疫传感器的制作, 提高了免疫传感器对 CEA 检测的灵敏度、降低了检测限, 但是存在电极制作过程复杂且制备周期较长、价格较为昂贵等缺陷.

* E-mail: yuanruo@swu.edu.cn; Tel.: 024-68252277; Fax: 024-68254000

Received September 27, 2008; revised January 16, 2009; accepted March 31, 2009.

国家自然科学基金(No. 20675064)、重庆市自然科学基金(No. CSTC-2005BB4100)、西南大学高科技项目基金(No. XSGX 02)和发光与实时分析重庆市重点实验室(西南大学)资助项目.

导电聚合物又称导电高分子,是指通过掺杂等手段制备的电导率在半导体和导体范围内的聚合物.电子型导电高分子是以共轭高分子为主体的导电高分子材料,导电的载流子是电子(或空穴).这类材料是目前世界导电高分子材料研究开发的重点^[10],如聚苯胺(PANI)、聚吡咯(PPy)、聚噻吩(PTh),均具有良好的机械弹性、表面效应、化学特异性、易合成等特点.目前它们多用于酶生物传感器的制备^[11,12],但都存在一些缺陷,如 PPy 结构疏松易使酶流失^[13~15], PANI 溶解性不好,制备传感器时成膜性差,固定酶量有限,也不能很好地保持酶的活性^[16,17],制备的酶膜机械强度低,电极寿命较短等,因此需要采用交联、掺杂、接枝等方式来改善^[18~20].

我们将导电聚合物聚 2,6-二氨基吡啶(pPA)引入免疫传感器的制备,成功地完成了对 CEA 简单快速的检测.首先在玻碳电极(GCE)表面电聚合 PA,形成表面带 NH_3^+ 的聚 2,6-二氨基吡啶膜(pPA).而以 pPA 聚合膜为该免疫传感器固定矩阵有三大优势:首先在电极表面修饰导电聚合物薄膜 pPA 的过程简单时间短,不需要对聚合物前体进行进一步的改性;其次 pPA 聚合膜结构稳定,具有导电聚合物的特点,在电极表面形成特殊结构能提供更大的电极表面积,有利于氧化还原物质的吸附及电子的转移^[21];再次 pPA 膜表面含有大量带正电氨基^[22],使得生物分子、交联剂和纳米粒子能通过静电吸附或化学键合能方式,定向稳定地固定在导电聚合物膜上,从而使生物传感器的进一步修饰获得了更大的空间.然后在 pPA 膜的固定矩阵上,利用戊二醛的交联固定电活性物质硫堇(Thi),再利用硫堇分子丰富的氨基结合纳米金(nano-Au).继而利用纳米金大比表面积、良好的稳定性和生物相容性,将癌胚抗体(anti-CEA)固定于电极表面,并用牛血清白蛋白(BSA)封闭其活性位点,从而制得 CEA 免疫传感器.实验发现该传感器具有制作过程简单、检测限低、稳定性好以及线性范围宽等特点.

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

CHI660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司), AB204-S 电子天平(瑞士 Mettler&Toledo 公司), BRANSONIC200 超声清洗仪(德国 BRANSON UL-TRASCHALL 公司), UV-vis 8500 紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司), 扫描电子显微镜(SEM, S-4800, Hitachi, Tokyo, Japan), 透射电子显微镜(TEM, H-600, Hitachi, Tokyo, Japan). 采用三电极系统,修饰有抗体的玻碳电极为工作电极,甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极.

癌胚抗原(CEA)及癌胚抗体(anti-CEA)(郑州博赛生物技术研究所), NaBH_4 、柠檬酸三钠、硝酸钠(重庆川东化工集团化学试剂厂), 2,6-二氨基吡啶(PA)(百灵威化学

技术有限公司), 氯金酸、戊二醛(GA 25%)、硫堇(Thi)、牛血清白蛋白(BSA 96%~99%)(Sigma 公司). 纳米金溶液由氯金酸还原制得,其粒径用透射电子显微镜(TEM)测试约为 16 nm. 不同 pH 值 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液用 0.1 mol/L HAc+0.1 mol/L NaAc 配制. 其它试剂均为分析纯试剂,实验用水为二次蒸馏水.

1.2 免疫电极的制备

分别用 0.3 与 0.05 μm Al_2O_3 悬浊液将玻碳电极(GCE, 直径 4 mm)抛光至镜面,并在二次水中超声洗净,并依次用乙醇,水超声清洗 5 min,置于室温下晾干,备用.

参考文献[22],用 0.1 mol/L NaNO_3 溶液配制 1×10^{-2} mol/L 的 pPA 溶液(pH 6.0),将处理过后,干净的 GCE 置于该溶液中,用甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极,于 $-0.8 \sim 1.6$ V (vs. SCE)电压范围内,电聚合 15 圈后用二次重蒸水冲洗、晾干.再置于 2% GA 中交联 40 min,冲洗后晾干.而后将电极依次置于 Thi 溶液、nano-Au 溶液中,自组装 5 h 后取出,冲洗晾干后,再置于 anti-CEA 中于 4°C 下,浸泡 8 h.最后,将制好的电极浸泡于 BSA 溶液中 1 h,以封闭非特异性结合位点,然后用醋酸缓冲溶液(pH 5.5)和水洗涤,晾干,即得免疫传感器.置于 4°C 的冰箱中保存待用.免疫传感器的制作过程见图 1.

1.3 检测方法

利用循环伏安法,采用三电极体系,修饰电极为工作电极,甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极,进行电极制备过程的表征及对 CEA 的检测.测试底液为 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液(pH 5.5),电位区间为 $-0.6 \sim 0.2$ V,扫描速率 50 mV/s,实验温度均控制为 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$.

2 结果与讨论

2.1 电极修饰过程的表征

2.1.1 修饰电极的 SEM 表征

用扫描电子显微镜(SEM)表征免疫传感器制作过程中电极表面的微观形态(图 2).其中图 2a 为 GCE 表面电聚合 2,6-二氨基吡啶后的 SEM 图,从图中可以清晰地看到起伏的脉络网状结构,说明 pPA 膜成功地修饰于玻碳电极表面.图 2b 为 Thi/GA/pPA/GCE 电极的 SEM 图,与图 2a 相比电极的表面形貌发生了改变,通过 GA 交联的 Thi 定向固定于纤维网络状结构中,使得纤维结构变粗,从而将网络结构清晰地凸显出来.图 2c 为 nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE 电极的 SEM 图,纳米金定向连接于硫堇附着的纤维结构中,使得图中网络结构更加清晰,附于其上的物质分布在网络间及网络交叉处,从插图中能清

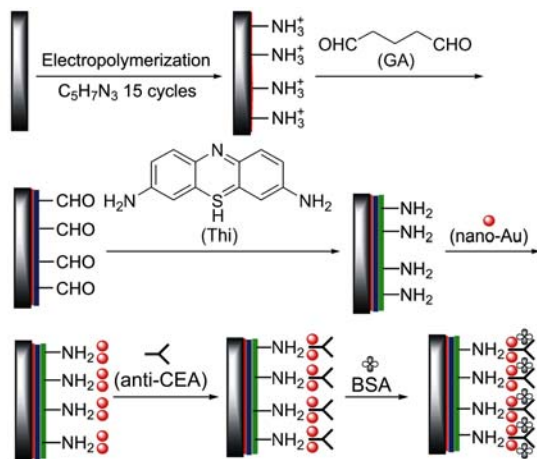


图 1 免疫电极的组装过程

Figure 1 Preparation process of the immunosensor

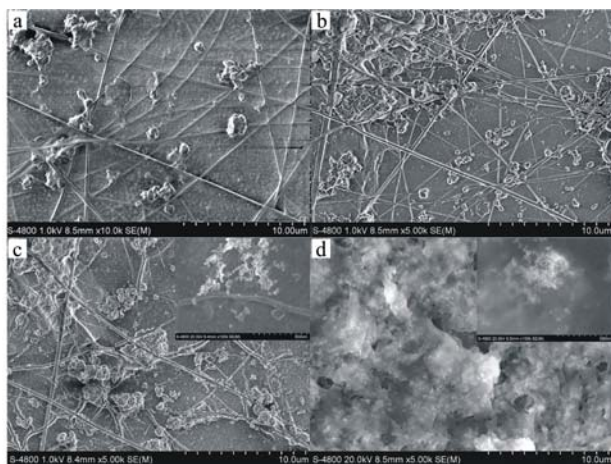


图 2 电极修饰过程中(a) pPA/GCE; (b) Thi/GA/pPA/GCE; (c) nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE 和(d) anti-CEA/nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE SEM 表征图

Figure 2 SEM photos of (a) pPA/GCE, (b) Thi/GA/pPA/GCE, (c) nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE and (d) anti-CEA/nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE

楚地看到, 尺寸在 16 nm 左右的 nano-Au 呈葡萄串状连于纤维状网络中, 其中一部分纳米金直接与连接纤维状物质, 另一部分纳米金连接的网络结构被其覆盖. 图 2d 为 anti-CEA/nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE 电极的 SEM 图, 由其可以看出表面形态发生了明显的变化, 大分子的 anti-CEA 云片状覆盖于修饰电极表面, 透过其还可以看到被覆盖的 nano-Au(插图), 说明抗体已成功固载于修饰电极表面.

2.1.2 修饰电极的紫外吸收光谱表征

用紫外分光光度计表征 2,6-二氨基吡啶(PA)在电聚合前后的紫外吸收(图 3). 图中曲线 a 为配制 PA 溶液所用的 NaNO₃ 溶液的紫外吸收光谱, 曲线 b 为 PA 溶液的紫外吸收光谱, 曲线 c 为在导电玻璃上电聚合 pPA 的紫外吸收. 对比聚合前后的紫外吸收光谱图, 可以发现紫

外吸收在聚合前后发生了明显的改变, 曲线 c 的吸收发生了变化, 已不再是 PA 溶液的形貌, 并根据文献[21]所述的聚合机理, 证明 PA 成功电聚合于导电玻璃表面形成了 pPA 膜.

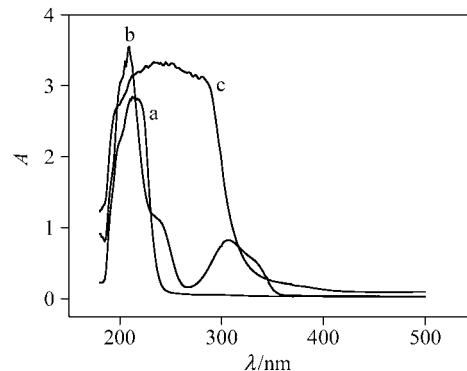


图 3 (a) NaNO₃ 溶液, (b) PA 溶液, (c) pPA 免疫传感器的紫外吸收光谱

Figure 3 UV-vis absorption spectra of (a) NaNO₃ solution, (b) PA solution, (c) pPA

2.1.3 修饰电极的电化学表征

在 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液(pH 5.5)中, 用循环伏安法对电极的修饰过程的电化学性质进行表征. 在图 4 中, 曲线 a 为裸电极的循环伏安表征, 曲线 b 为电聚合 PA 后的循环伏安图, 电流明显增大, 说明 pPA 膜已成功修饰于电极上[22]. 曲线 c 为 GA/pPA/GCE 电极置于 Thi 中, 自组装 5 h 后的循环伏安图, 在 -0.2 V 左右出现明显的硫氢氧化还原峰, 说明硫基已成功交联于电极表面. 而后将 Thi/GA/pPA/GCE 电极置于 16 nm 纳米金溶

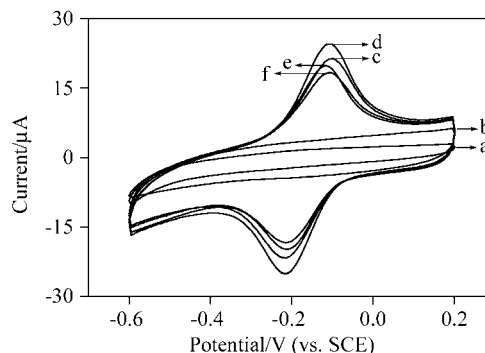


图 4 5 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.5)中不同修饰电极的循环伏安图

(a) GCE, (b) Ppa/GCE; (c) Thi/GA/pPA/GCE; (d) nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE (e) BSA/anti-CEA/nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE; (f) 修饰电极在 20 ng/mL 癌胚抗原中孵育 10 min 后

Figure 4 Cyclic voltammograms of different electrodes in 5 mL 0.1 mol/L HAC-NaAc buffer (pH 5.5)

(a) bare GCE; (b) Ppa/GCE; (c) Thi/GA/pPA/GCE; (d) nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE; (e) BSA/anti-CEA/nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE; (f) after the modified immunosensor was incubated with 20 ng/mL CEA in 10 min

液中自组装 5 h 后, 得到 nano-Au/Thi/GA/pPA/GCE 电极 (曲线 d), 由于纳米金良好的导电性加速了电子的传递, 使得氧化还原峰电流升高. 再将上述修饰电极依次组装癌胚抗体、牛血清白蛋白得到曲线 e, 由于两者都是大分子非导电物质, 氧化还原峰电流值较曲线 d 有明显的降低. 曲线 f 为免疫反应后的循环伏安图, 由于抗原抗体结合形成的复合物阻碍了电子的传递, 氧化还原峰明显降低.

图 5 是免疫电极在 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液(pH 5.5) 中, 于 $-0.6 \sim +0.2$ V 电位范围内, 以不同扫描速度进行测定的循环伏安图. 从图中可以看出, 随着扫描速度的不断增加, 氧化还原峰电流值均明显增大, 在 20~500 mV/s 范围内氧化还原峰峰电流值与扫描速度呈现良好的线性关系(见插图), 表明电极氧化还原反应受表面吸附控制.

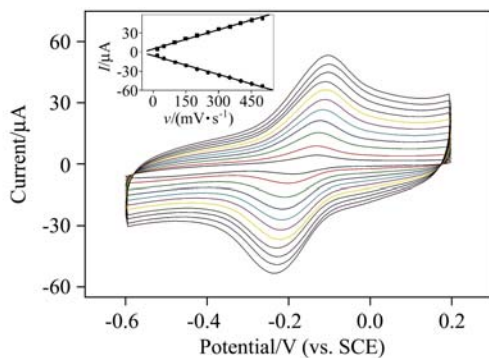


图 5 免疫传感器在(从内到外) 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 和 500 mV/s 扫速下的循环伏安图, 插图为峰电流与扫速的关系曲线

Figure 5 Cyclic voltammograms of the immunosensor in 5 mL 0.1 mol/L HAC-NaAc buffer (pH 5.5) at scan rate of (from inner to outer) 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, and 500 mV/s, inset is plot of peak current vs. scan rate

2.2 实验条件的优化

2.2.1 缓冲液酸度的选择

用循环伏安法考察了测试底液不同酸度对该免疫电极的影响: 将免疫电极依次置于不同 pH 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液中(pH 于 4.0~8.0 范围内), 然后将此电极在 20 ng/mL CEA 中孵育, 于相同条件下在不同 pH 缓冲溶液中进行检测. 根据孵育前后氧化峰电流的变化值作图(图 6). 从图中可知在 pH 5.5 的醋酸缓冲溶液中, 峰电流值变化最大, 即此时缓冲溶液的 pH 对抗原、抗体的活性及亲和性影响最小, 抗原抗体反应较为完全, 相对较多的抗原与电极表面的抗体发生特异性结合, 从而阻碍了电极上电子的传输. 故本文选择 pH 5.5 的醋酸缓冲溶液作为基体溶液.

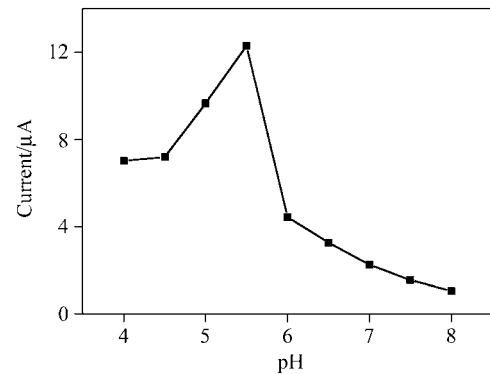


图 6 缓冲溶液 pH 对免疫传感器的影响

Figure 6 The effect of pH of detection solution on the response of the immunosensor

2.2.2 孵育时间的选择

根据修饰 anti-CEA 的免疫电极在 20 ng/mL CEA 中孵育时间的长短而引起的氧化峰峰电流值的大小, 选择孵育最适合时间. 在图 7 中, 随着孵育时间的增加, 氧化峰峰电流值逐渐下降, 说明癌胚抗原与抗体的反应不断加强, 孵育时间超过 12 min, 曲线趋于平缓, 即此时抗原-抗体反应已基本达到平衡, 故实验过程中选择 12 min 为孵育时间.

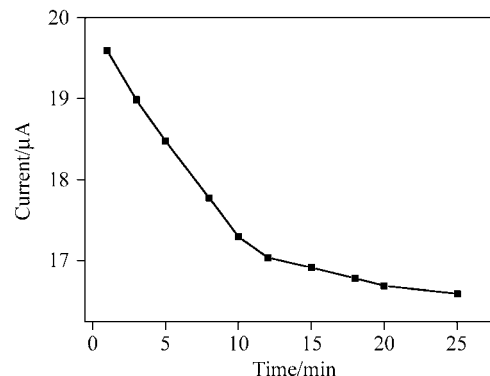


图 7 孵育时间对免疫传感器的影响

Figure 7 The effect of incubation time on the response of the immunosensor

2.2.3 孵育温度的选择

改变免疫电极在 20 ng/mL CEA 中孵育的温度, 考察温度对免疫传感器的影响, 根据温度对响应电流的影响作图(图 8). 从图中可以得出, 在 15~35 °C 之间, 随着温度的升高, 氧化峰电流迅速减小, 即随着抗原抗体活性的增强, 免疫反应随之增强, 而当温度高于 35 °C 后, 抗原抗体活性降低, 免疫反应随之减弱, 氧化峰电流值升高. 但温度过高会影响传感器的寿命, 本实验在 25 °C 条件下进行.

2.3 免疫传感器的响应特性

在优化的实验条件下, 用 0.1 mol/L 的醋酸缓冲溶液

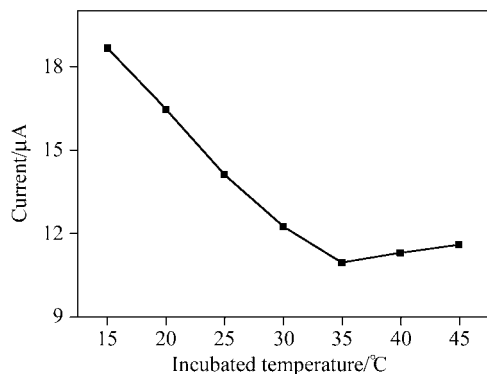


图 8 孵育温度对免疫传感器的影响

Figure 8 The effect of incubation temperature on the response of the immunosensor

(pH 5.5)将癌胚抗原配成不同浓度的溶液, 取修饰好的电极用循环伏安法测定其响应, 得到氧化峰峰电流随浓度变化的关系图(图 9). 由图可知, CEA 的浓度在 0.5~20 和 20~160 ng/mL 的范围内与峰电流呈良好的线性关系, 回归方程分别为 $y(\mu\text{A}) = -0.1399c_{\text{CEA}} + 17.897$ 和 $y(\mu\text{A}) = -0.0594c_{\text{CEA}} + 16.516$ (c 单位为 ng/mL), 相关系数分别为 0.9918 和 0.9985, 检测限为 0.2 ng/mL ($S/N=3$). 该免疫传感器与层层组装纳米金和硫堇制备的癌胚抗原免疫传感器^[23]、聚硫堇再利用纳米银制备的癌胚抗原免疫传感器^[24]相比, 具有更宽的线性范围, 其良好性能主要归功于 pPA 膜作为良好的电极基底, 为电子的传输提供了良好的通道^[22], 同时通过共价键合可使硫堇更稳定地固定于 pPA 膜表面^[25].

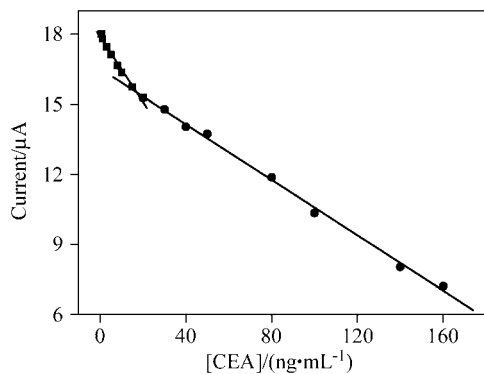


图 9 电流密度与浓度的关系曲线

Figure 9 Calibration curve of the developed immunosensor

2.4 传感器的稳定性、选择性和重现性

在 20 ng/mL CEA 溶液中, 分别加入 20 ng/mL 的甲胎蛋白、半胱氨酸、抗坏血酸和人绒毛膜促性腺激素作为干扰物质, 进行对比实验. 结果表明, 该免疫电极在加入干扰物和未加入干扰物的电流值相比仅有 2.6% 的差异, 表明该免疫传感器具有良好的选择性. 将免疫电极置于 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液(pH 5.5)中连续扫描 100 圈, 电流响应仅下降 3.4%, 表明该传感器具有较好的稳

定性. 将该免疫电极置于 20 ng/mL CEA 中孵育 10 min 后, 测定其响应电流, 重复 5 次测定的响应电流的平均值是 15.132, 相对标准偏差(RSD)是 2.7%; 同时考察了对同一样品, 5 支传感器在相同条件测定, 所得样品浓度平均值为 19.698 ng/mL, RSD 值为 3.0%. 由此说明该实验方法具有较好的重现性. 同时本实验采用甘氨酸-盐酸缓冲溶液(pH 2.8)对传感器进行了再生性考察, 通过实验可知该传感器可重复使用 4 次.

2.5 回收测定

用 0.1 mol/L 的醋酸缓冲溶液(pH 5.5)将标准癌胚抗原配成不同浓度的待测品, 在入血清中加入一定浓度标准 CEA 溶液, 将制备好的免疫传感器置于样品溶液中孵育 12 min, 按实验方法进行测定, 相关数据见下表 1, 根据回收率考察传感器的应用. 从表中可得, 回收率在 97%~104% 范围内, 从而可知通过本方法制得的免疫传感器, 能够运用于实际样品的检验.

表 1 CEA 免疫传感器的回收结果($n=5$)

Table 1 Recovery of the prepared immunosensor ($n=5$)

Sample	Standard value/ (ng·mL ⁻¹)	Found/ (ng·mL ⁻¹)	Recovery/%
1	5.00	5.2	104.0
2	10.0	9.8	98.0
3	20.0	19.7	98.5
4	50.0	48.6	97.2
5	100.0	103.1	103.1

3 结论

利用导电聚合物 pPA 膜和纳米金固定 anti-CEA, 成功构建了高灵敏的电流型 CEA 免疫传感器. 该方法有以下两个突出优点: 第一, 导电聚 pPA 膜的表面纤维网状结构较大地增加了电极比表面积, 其良好的导电性和特殊的表面结构为电子的转移提供了更多的通道, 并且其表面大量的正电荷氨基为进一步固定电活性物质、纳米材料提供了良好的固定矩阵; 第二, 纳米金由于其大的比表面积和良好的生物相容性, 增加了抗体的固定量, 并较好地保持了抗体的生物活性. 此外该免疫电极制备过程简单、灵敏度较高、重现性和稳定性良好, 并具有较宽的线性范围和较低的检出限. 因此, 采用该法制备的免疫传感器在健康检测、医学检测等方面具有潜在的应用价值.

References

- Shuster, J.; Silverman, M.; Gold, P. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 65.

- 2 Adam, J.-K.; Odhav, B.; Bhoola, K.-D. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *99*, 113.
- 3 Sahin, B.; Paydak, V.; Paydas, S. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32*, 24.
- 4 Kramer, S.; Jager, W.; Lang, N. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 42.
- 5 Kleisbauer, J.-P.; Castelnau, O.; Thomas, P.; Ramirze, J.; Lanteaume, A.; Roux, F. *Lung Cancer* **1996**, *15*, 148.
- 6 Hernadez, L.; Espasa, A.; Fenandez, C.; Candela, A.; Martin, C.; Romero, S. *Lung Cancer* **2002**, *36*, 83.
- 7 Mirjam, J.-A.; Henk, W.-A.; Pax, H.-X.; Jan, G. *Gynecol. Oncol.* **2000**, *78*, 16.
- 8 Shi, Y.-T.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Tang, M.-Y. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *604*, 9.
- 9 Ou, C.-F.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Tang, M.-Y. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *603*, 205.
- 10 Sheng, Y.; Chen, J.-D.; Zhu, D.-Q.; Wu, X.-Q. *J. Func. Polym.* **2002**, *15*, 236 (in Chinese).
(生瑜, 陈建定, 朱德钦, 吴叙勤, 功能高分子学报, **2002**, *15*, 236.)
- 11 Yang, M.-H.; Li, C.-X.; Yang, Y.-H. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 502 (in Chinese).
(阳明辉, 李春香, 杨云慧, 化学学报, **2004**, *62*, 502.)
- 12 Martin, C.-R.; Van Dyke, L.-S.; Cai, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8976.
- 13 Li, S.-L.; Cui, J.-M. *Mater. Rev.* **2006**, *20*, 38 (in Chinese).
(李松林, 崔建明, 材料导报, **2006**, *20*, 38.)
- 14 Lassalle, N.; Vieil, E.; Correia, J. P.; Abrantes, L. M. *Bio-sens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 295.
- 15 Thompson, L. A.; Kowalik, J.; Josowicz, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 324.
- 16 Gu, H.; Su, X. D.; Loh, K. P. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13611.
- 17 Xu, X.-H.; Lü, F.; Li, D.-G. *Chin. High Technol. Lett.* **2004**, *8*, 33 (in Chinese).
(许鑫华, 吕丰, 李冬光, 高科技通讯, **2004**, *8*, 33.)
- 18 Audebert, P.; Aldebert, P.; Girault, N. *Synth. Met.* **1993**, *58*, 251.
- 19 Lee, J.-Y.; Kim, D.-Y.; Kim, C.-Y. *Synth. Met.* **1995**, *74*, 103.
- 20 Qian, J.-M.; Li, X.-X. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **2002**, *18*, 21 (in Chinese).
(钱军民, 李旭祥, 高分子材料科学与工程, **2002**, *18*, 21.)
- 21 Taxis, P.-D.; Poet, D.; Miyamoto, S.; Murakami, T.; Kimura, J.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *235*, 255.
- 22 Cao, S.-R.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Zhang, L.-Y.; Li, X.-L. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2007**, *30*, 71.
- 23 Yuan, R.; Zhuo, Y.; Chai, Y.-Q.; Zhang, Y.; Sun, A.-L. *Sci. China, Ser. B, Chem.* **2007**, *50*, 97.
- 24 An, H.-Z.; Yuan, R.; Chai, Y.-Q.; Tang, D.-P.; Li, N. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 633 (in Chinese).
(安海珍, 袁若, 柴雅琴, 唐点平, 李娜, 化学学报, **2008**, *66*, 633.)
- 25 Li, Q.-W.; Zhang, J.; Yan, H.; He, M.-S.; Liu, Z.-F. *Carbon* **2004**, *42*, 287.

(A0809272 Zhao, C.; Zheng, G.)