

柠檬酸修饰电极对抗坏血酸、多巴胺和尿酸的同时检测

张英*, 任旺, 李敏娇

(四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: 研究柠檬酸(CA)修饰玻碳电极(CA/GC)在抗坏血酸(AA)、多巴胺(DA)和尿酸(UA)混合体系中的循环伏安(CV)行为. 结果表明, AA、DA和UA在CA/GC电极上氧化峰电流增大, 且三者氧化峰电位明显分离($\Delta E_{p(\text{DA}, \text{AA})} = 170 \text{ mV}$, $\Delta E_{p(\text{DA}, \text{UA})} = 130 \text{ mV}$, $\Delta E_{p(\text{AA}, \text{UA})} = 300 \text{ mV}$). 据此, 可同时检测 AA、DA和UA. 在优化的实验条件下, AA、DA和UA的氧化峰电流与其浓度分别在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $6.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性关系. 该电极重现性好, 可用于盐酸多巴胺针剂 DA、VC 片剂 AA 及人体尿液 UA 的测定.

关键词: 抗坏血酸; 多巴胺; 尿酸; 柠檬酸; 修饰电极

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

抗坏血酸(即 VC, AA)广泛存在于食品、药物及生物体中, 它能够参与许多生物体内的反应, 是维持生命的重要成分之一^[1]. 多巴胺(DA)是重要的神经递质, 人体内多巴胺失调会引发心脏病、帕金森氏症和多种神经疾病. 临床上多巴胺可用于心原性及感染性休克的急救药^[2]. 尿酸(UA)是鸟类和爬行类动物体内嘌呤代谢的最终产物. 人体液尿酸含量的变化与人体新陈代谢、免疫等机能密切相关, 同时也可间接预示与嘌呤代谢有关的各种疾病^[3]. AA、DA和UA共存于许多生物体中, 生物体和药物中这些物质的检测具有重要应用价值. 由于 AA、DA和UA都具有电活性, 因此可应用电化学方法测定^[4-5]. 但三者一般在固体电极上的氧化电位非常接近, 为了提高测定的选择性人们已研制出各种化学修饰电极^[6-7]. 作者课题组在前期工作^[8]中利用多巴胺和肾上腺素在柠檬酸修饰电极上的还原峰分离, 实现了二者的同时检测. 在此基础上, 本论文研究了柠檬酸修饰电极在 AA、DA和UA混合体系中的电化学行为, 利用此三者在该修饰电极上的氧化峰分离建立了同时测定 AA、DA和UA的电化学方法, 目前尚未见相关报道. 与前期工作相比, 本研究不仅实现了 AA、DA

和 UA 的同时检测, 利用同浓度 DA 的氧化峰电流响应远大于其还原峰电流响应, 还大大提高了 DA 检测的灵敏度.

1 实验

1.1 仪器与试剂

CHI440A 型电化学工作站(上海辰华), UP3200H 超声波清洗器, pH5-3D 型酸度计. 柠檬酸, 抗坏血酸, 尿酸(科龙化学试剂公司), 盐酸多巴胺(Fluka), 盐酸多巴胺针剂(江苏亚邦药业有限公司), VC 片剂(西南药业有限公司). 不同 pH 的磷酸缓冲溶液 PBS 均由 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 + 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ 配制. 以上试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水.

1.2 CA/GC 电极的制备及实验方法

柠檬酸修饰电极的制备同前期工作^[8]. 三电极体系(CA 修饰玻碳工作电极, 铂丝对电极, SCE 参比电极). 将含有 AA、DA和UA的溶液($0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.0)置入电解池, 经开路富集 30 s 后做伏安测试, 依据三者氧化峰电流值分别测定其含量.

2 结果与讨论

2.1 CA/GC 电极在 AA、DA 和 UA 混合溶液中的循环伏安行为

图 1 给出裸玻碳 (GC) 电极和 CA/GC 电极在空白底液和 AA、DA 和 UA 混合液中的循环伏安曲线。从图看出,空白底液中,CA/GC 电极(c)比 GC 电极(a)的背景电流大,这可能是修饰电极的有效表面积增大,表面电荷增多引起^[9]。实验表明,修饰电极上 CA 膜厚度对电极性能有较大的影响,并以恒电位 1.8 V 沉积 60 s 制备的修饰电极性能较好。据图可知,在 GC 电极上 AA、DA 和 UA 三者氧化峰不能分开(b),而在修饰电极(d)上其氧化峰明显分离($\Delta E_{p(DA,AA)} = 170$ mV, $\Delta E_{p(DA,UA)} = 130$ mV, $\Delta E_{p(AA,UA)} = 300$ mV),峰电流也增强。此外,DA 在修饰电极上还显示可逆的电化学响应(d),其氧化还原峰电位差 $\Delta E_p = 30$ mV,接近于理想状态下 2 电子反应的峰电位差 29.5 mV。由此可知,该修饰电极对 AA、DA 和 UA 的氧化具有良好的电催化作用,可望用于 AA、DA 和 UA 混合物的同时检测。

2.2 扫描速率与底液 pH 对 AA、DA 和 UA 电化学行为的影响

图 2 表明,随着扫速增加($10 \sim 60$ mV · s⁻¹), DA、UA 和 AA 氧化峰电位均略有正移(A),而且 AA、UA 氧化峰电流与扫速成正比,而 DA 氧化峰电流与扫速的平方根成正比,说明前二者在修饰电极上的氧化过程受表面吸附控制,而 DA 的氧化

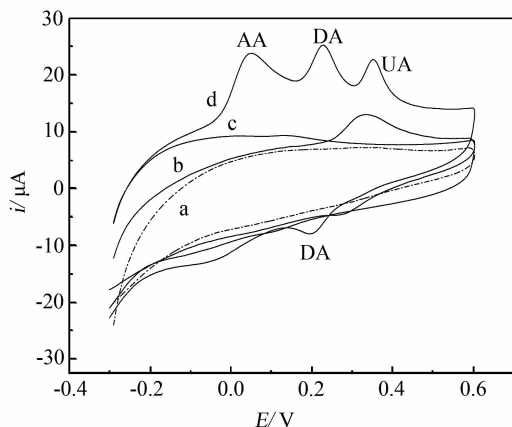


图 1 GC 电极(a,b)和 CA/GC 电极(c,d)在空白溶液(a,c)和含 DA + UA + AA 混合溶液(b,d)中的循环伏安曲线(扫描速率 50 mV · s⁻¹)

Fig. 1 CV curves of the GC electrode (a,b) and CA/GC electrode (c,d) in 0.03 mol · L⁻¹ PBS (pH 7.0) without (a,c) and with (b,d) 300.0 mol · L⁻¹ AA + 20.0 μmol · L⁻¹ DA + 10.0 μmol · L⁻¹ UA (scan rate: 50 mV · s⁻¹)

则受扩散控制。以下实验选择扫速为 50 mV · s⁻¹。

在底液 pH 4.0 ~ 9.0 范围内(B), AA、DA 和 UA 的氧化峰电位随溶液 pH 增加负移,表明三者的电化学氧化均有质子参与^[4]。而且随着溶液 pH 值增加,峰电流 $i_{pa,UA}$ 逐渐降低, $i_{pa,AA}$ 和 $i_{pa,DA}$ 呈先增后降, $i_{pa,AA}$ 在 pH 8.0 时达最大值, $i_{pa,DA}$ 在 pH 7.0 时达最大值。这是由于底液 pH 改变,溶液中化合物的存在形式相应发生变化,其与 CA 修饰膜之

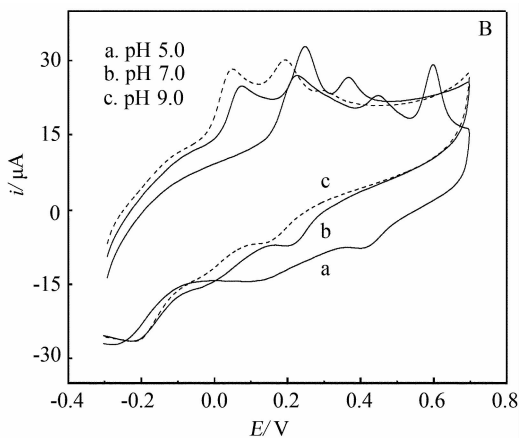
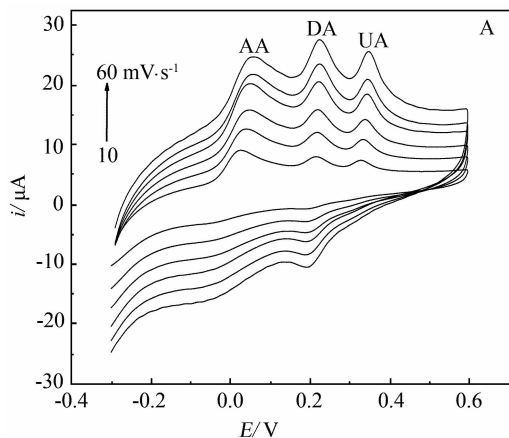


图 2 扫描速率(A)和底液 pH(B)对 CA/GC 电极于 300.0 μmol · L⁻¹ AA + 20.0 μmol · L⁻¹ DA + 10.0 μmol · L⁻¹ UA 溶液中循环伏安行为的影响

Fig. 2 Effects of scan rate (A) and pH (B) on the CV behaviors of CA/GC electrode in 300.0 μmol · L⁻¹ AA + 20.0 μmol · L⁻¹ DA + 10.0 μmol · L⁻¹ UA solution

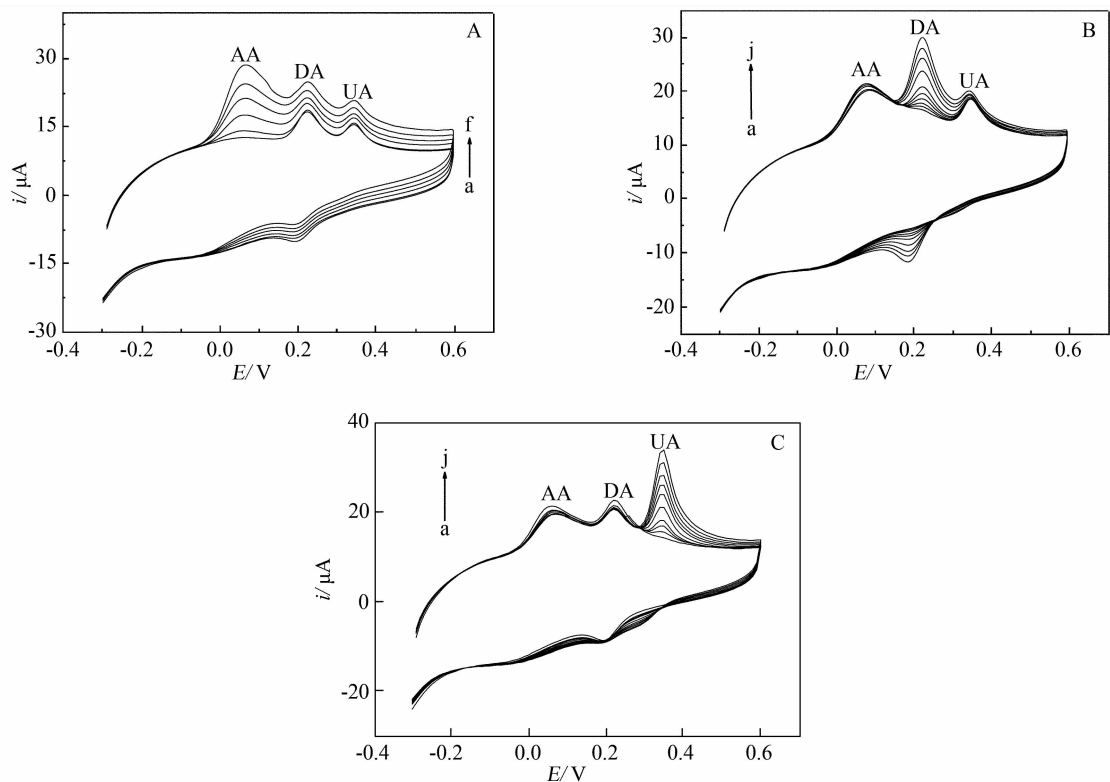


图3 AA、DA 和 UA 混合溶液改变 AA(A),DA(B)或 UA(C)浓度在 CA/GC 电极上的循环伏安曲线
Fig.3 CV curves of the AA,DA and UA mixtures with different concentrations of AA (A),DA (B) or UA (C) in PBS (pH 7.0) at CA/GC electrode
A. C_{DA} : $20.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{UA} : $10.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{AA} (a~f)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$: $8.0\sim500.0$
B. C_{AA} : $300.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{UA} : $10.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{DA} (a~j) / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$: $0.8\sim100.0$
C. C_{AA} : $300.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{DA} : $20.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{UA} (a~j)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$: $0.8\sim80.0$

间的作用力也因此随之改变^[5]. 考虑到 pH 对 AA、DA 和 UA 电化学行为的影响以及生理 pH 环境, 以下实验选择 pH 7.0 的 PBS 作为底液.

2.3 AA、DA 和 UA 检测及干扰实验

图 3 给出固定混合液两种物质浓度, 改变另一种物质浓度于 CA/GC 电极上的循环伏安响应. 如图可见, 固定 DA 和 UA 浓度, AA 在 $8.0\times10^{-6}\sim5.0\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内变化时, DA 和 UA 的氧化峰电流基本保持不变(A). 如仅改变 DA 浓度, 则其氧化峰和还原峰电流均随其浓度的增加而增大, 且在 $8.0\times10^{-7}\sim1.0\times10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内不干扰 AA 和 UA 的电化学响应(B). 再如 UA 在 $8.0\times10^{-7}\sim8.0\times10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内相应改变亦不干扰 AA 和 DA 的电化学响应(C). 据此可使用 CA/GC 电极同时测定溶液中 AA、DA 和 UA 的含量.

以 $300.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA + $20.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DA + $10.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ UA 的样液作参照, 500 倍的

Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} ; 100 倍的 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 NO_3^- 、尿素、葡萄糖; 50 倍的 NO_2^- 、 Ba^{2+} 、半胱氨酸, 谷氨酸、乳酸; 30 倍的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 均无干扰(相对误差在 $\pm5\%$ 范围内). 可见该修饰电极抗干扰能力强, 可用于样品中 AA、DA 和 UA 的同时检测.

2.4 线性范围及电极重现性

图 4 示出, 同时改变 AA、DA 和 UA 浓度, 三者混合液在 CA/GC 电极上的差分脉冲曲线. 从图看出, 其氧化峰电流与 AA、DA 和 UA 浓度分别在 $2.0\times10^{-6}\sim1.5\times10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6.0\times10^{-7}\sim1.0\times10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6.0\times10^{-7}\sim1.0\times10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内成良好的线性关系, 检测下限分别为 $8.0\times10^{-7}\text{ mol/L}$, $7.0\times10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.0\times10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 每次测定样品后, 将电极放在 pH 7.0 PBS 中循环扫描($-0.8\sim0.8\text{ V}$) 20 次即可恢复其活性. 对含有 $300.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA、 20.0

表1 使用 CA/GC 电极同时测定 AA、DA 和 UA 混合液中各化合物含量结果 (n = 6)

Tab.1 Simultaneous determinations of the AA,DA and UA contents in mixtures using the CA/GC electrode (n=6)

Content/Number		1	2	3	4
DA	Injected/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	5.56	5.56	42.90	42.90
	Found/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	5.51	5.69	43.68	41.93
	Recovery/%	99.10	102.33	101.82	97.74
	RSD/%	2.14	2.59	3.32	4.07
AA	Added/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0	50.0	0	300.0
	Found/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		49.70		308.85
	Recovery/%		99.40		102.95
	RSD/%		2.51		2.38
UA	Added/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0	10.0	0	50.0
	Found/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		10.26		48.95
	Recovery/%		102.60		97.90
	RSD/%		2.16		2.74

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DA 和 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ UA 的溶液分别平行测定 10 次,相对标准偏差分别为 2.7%, 2.2% 和 3.4%.

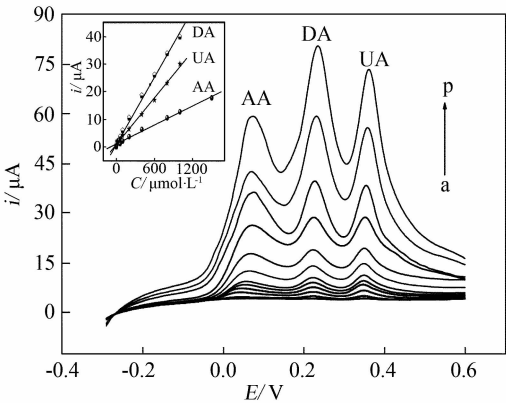


图4 不同浓度的 AA、DA 和 UA 混合液在 CA/GC 电极上的 DPV 响应曲线 (插图:各化合物之峰电流随浓度线性变化)

Fig.4 DPV responses of the mixtures containing AA,DA and UA with different concentrations at the CA/GC electrode (insert:the variation of anodic peak currents with the concentrations of AA,DA or AA)
 C_{AA} (a~p)/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0.0~1500.0
 C_{DA} (a~p)/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0.6~1000.0
 C_{UA} (a~p)/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0.6~1000.0

2.5 样品检测

取 志 愿 者 尿 样 (自 贡 市 第 一 人 民 医 院 提 供)

3.0 mL 和 2 mL pH 7.0 PBS 溶液置于 10.0 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度. 按上述条件检测,平行测定 5 次,以校准曲线法测得尿样中 UA 的含量为 $95.27 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 用加标法测得 UA 回收率为 95.6% ~ 104.8%,RSD 为 2.9 %. 将 VC 片剂 (100.0 mg/片配成 100.0 mL 溶液) 和盐酸多巴胺针剂 (20.0 mg/2 mL) 按一定比例混合后,用 2 mL pH 7.0 底液和去离子水适当稀释,按上述条件检测,由校准曲线测定 AA 和 DA 含量. 结果为:VC 片剂中 AA 的平均测定值为 98.5 mg/片,盐酸多巴胺针剂中 DA 的平均测定值为 10.29 mg/mL,与标示值吻合. 分别在盐酸多巴胺针剂中加入不同浓度的 AA 和 UA 标液测定其回收率,结果列于表 1.

3 结 论

作者课题组在前期工作^[8]基础上,进一步利用 AA、DA 和 UA 在 CA/GC 电极上氧化峰电位分离,实现了 AA、DA 和 UA 的同时测定;根据 DA 氧化峰电流响应远大于还原峰电流的特点,拓宽了 DA 检测线性范围,提高了 DA 检测灵敏度. CA/GC 修饰电极制备简单,重现性好,若将该修饰电极微型化并优化实验条件,可望实现 AA、DA、EP 和 UA 的同时在线检测.

参考文献(References):

- [1] Arrigoni O, De Tullio M C. Ascorbic acid: more than just an antioxidant [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 2002, 1569(1/3): 1-9.
- [2] Li N B, Ren W, Luo H Q. Caffeic acid-modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine [J]. *Electroanalysis*, 2007, 19(14): 1496-1502.
- [3] Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products [J]. *Chemico-biological interactions*, 1990, 73(2/3): 235-247.
- [4] Ren W, Luo H Q, Li N B. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, 21(7): 1086-1092.
- [5] Li N B, Ren W, Luo H Q. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid and dopamine on poly(caffeic acid)-modified glassy carbon electrode [J]. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2008, 12(6): 693-699.
- [6] Yuan Y, Ahammad, A J S, Xu G R, et al. Poly(thionine)-modified GC electrode for simultaneous detection of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid [J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2008, 29(10): 1883-1884.
- [7] Ensafi A A, Taei M, Khayamian T, et al. Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(sulfonazo III) modified glassy carbon electrode [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2010, 147(1): 213-221.
- [8] Ren W(任旺), Zhang Y(张英), Li M J(李敏娇). Simultaneous determination of dopamine(DA) and epinephrine [J]. *Journal of Electrochemistry(电化学)*, 2011, 17(3): 343-346.
- [9] Wan F L(万芳利), Zhang W(张文), Gu J(顾静), et al. Determination of tetrahydrobiopterin and other related compounds by Mn-doped PbO₂ modified electrode [J]. *Chemical Sensors(化学传感器)*, 2003, 23(4): 15-22.

Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid at CA/GC Electrode

ZHANG Ying*, REN Wang, LI Min-jiao

(College of Chemical & Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, Sichuan, China)

Abstract: The citric acid-modified glassy carbon electrode (CA/GC) was constructed by potentiostatic technique and used for simultaneous determination of ascorbic acid (AA), dopamine (DA) and uric acid (UA) by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The CA/GC electrode exhibits excellent electrocatalytic activity towards AA, DA and UA. The oxidation peaks are well separated with the potential differences between AA and DA, DA and UA, and AA and UA being 170, 130 and 300 mV, respectively, which is large enough to determine AA, DA and UA simultaneously. The catalytic peak currents obtained were linearly dependent on the concentrations of AA, DA and UA in the range of $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $6.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and $6.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The proposed sensor shows good reproducibility and may be applied practically in the determination of AA, DA and UA in real samples.

Key words: ascorbic acid; dopamine; uric acid; citric acid; modified electrode