

谷胱甘肽在咖啡酸修饰碳糊电极上的电催化氧化及电分析方法

张艳梅, 段成茜, 高作宁*

(宁夏大学能源化工重点实验室 化学化工学院, 银川 750021)

摘要 目的: 研究了谷胱甘肽(还原型, glutathione, GSH)在咖啡酸(Caffeic acid, CFA)修饰碳糊电极(CFA/CPE)上的电催化氧化行为和电化学分析方法。方法: 循环伏安法(CV), 计时电流法(CA)和线性扫描伏安法(LSV)。结果: GSH在碳糊电极(CPE)上的直接电化学氧化过程十分迟缓, CFA/CPE对GSH电化学氧化具有良好的催化作用。同时测定了GSH在CFA/CPE上的电极过程动力学参数, 用LSV法测得催化氧化峰电流与GSH在 $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈良好线性关系, 线性回归方程为 $I_{pa} (\mu\text{A}) = 2.003c (10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 3.448$, $r = 0.9989$, 检出限为 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: CFA/CPE对GSH电化学氧化具有良好的催化作用, 该方法可用于市售还原型谷胱甘肽药物含量的电化学定量测定。

关键词: 谷胱甘肽; 咖啡酸; 碳糊修饰电极; 电催化氧化; 电分析方法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)12-2308-04

Electrocatalytic oxidation of glutathione at caffeic acid modified carbon paste electrode and its electrochemical determination

ZHANG Yan - mei, DUAN Cheng - qian, GAO Zuo - ning*

(Key Laboratory of Energy Sources and Chemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract Objective: Electrocatalytic oxidation behaviors and electrochemical determination of glutathione(GSH) at carbon paste electrode(CPE) and caffeic acid modified carbon paste electrode(CFA/CPE) were investigated. **Methods:** Cyclic voltammetry(CV), chronoamperometry(CA) and linear sweep voltammetry(LSV). **Results:** It was found that glutathione itself showed a poor electrochemical response at carbon paste electrode(CPE), the electrochemical behaviors could be greatly enhanced by using CFA/CPE, which enables a sensitive electrochemical determination of the substrate glutathione. The kinetic parameters of the reaction were evaluated. The catalytic oxidation peak currents of glutathione versus its concentration had a good linear relationship in the concentration range of $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with the correlation coefficient of 0.9989, and the detection limit of $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ by LSV. **Conclusion:** CFA/CPE can catalyze the oxidation of GSH well. Furthermore, the proposed method can be applied in the electrochemical determination of glutathione content with real samples with the simple manipulation.

Key words: glutathione; caffeic acid; modified carbon paste electrode; electrocatalytic oxidation; electrochemical determination

谷胱甘肽(glutathione, GSH)在自然界中以氧化型(GSSG)和还原型(GSH)2种形式存在^[1], 两者在活细胞的新陈代谢中起着重要的作用^[2]。还原型谷胱甘肽是细胞内含量最丰富的非蛋白质硫醇化合物^[3], 它具有清除自由基、解毒、抗病毒、抗肿瘤、保护肝脏、促进铁质吸收, 维持红细胞的完整性、维持

DNA的生物合成、细胞的正常生长及细胞免疫等多种生理功能^[4], 是人体中具有重要生理作用的抗氧化剂。因此, 对GSH电化学研究在药物研究具有重要意义。

目前研究GSH的主要方法有高效液相色谱法^[5,6]、分光光度法^[7]、荧光光谱法^[8]、毛细管电泳

法^[9]及电化学方法^[10-14]等。由于 GSH 在固体电极上有较高的过电位^[11,12],电极反应迟缓,利用化学修饰电极可降低其较高的过电位,因此采用化学修饰电极测定 GSH 引起了众多学者的关注。如二苯基二硫代氨基甲酸盐修饰电极^[10],TTF-TCNQ 修饰电极^[11],二茂铁修饰电极^[12]以及 nano-TiO₂/二茂铁羧酸复合修饰电极^[13]等等。咖啡酸修饰电极电催化氧化生物小分子的研究已有报道^[15-18],但采用咖啡酸修饰碳糊电极研究 GSH 的方法目前尚未见国内外文献报道。

本文在前期研究工作的基础上^[18-21]制备了咖啡酸修饰碳糊电极(CFA/CPE),研究了 GSH 在 CFA/CPE 上的电催化氧化行为,测定了其电极过程动力学参数,并建立了 GSH 电化学定量测定方法。

1 仪器与试剂

CHI660A 电化学工作站(美国 CHI 仪器公司),以 CPE 和 CFA/CPE 为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,CHI115 铂丝为辅助电极。

咖啡酸(上海化学试剂一厂,分析纯),GSH(上海希匹吉生物技术有限公司,批号:GS1106B108C,纯度(98%)),松泰斯粉针剂(STS,昆明积大制药有限公司,批号:100901),所用其他试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。本文所涉及到的电位均为相对于 SCE 电极电位,在电化学测试前于电解池中通入高纯氮除氧 5 min,所有电化学测试均在室温(22℃)下进行。

2 电极制作

将 CFA 0.09 g 溶于 5 mL 乙醇中,与 1.8 g 石墨粉混匀,研磨至乙醇完全挥发,按照与裸碳糊电极相同的比例加入液体石蜡,研磨均匀,压入聚四氟乙烯管中,压实,另一端插一根铜丝做导线即制得 CFA 修饰碳糊电极(CFA/CPE),CPE 制作参照文献^[21],将所制得的 CPE 和 CFA/CPE 在称量纸上抛光待用。

3 结果与讨论

3.1 CFA/CPE 的伏安行为 在 -0.30~0.80 V 电位窗口及 0.10 mol·L⁻¹ PBS(pH 6.8)中以 50 mV·s⁻¹扫描速度得到 CFA/CPE 循环伏安曲线(见图 1)。由图 1 曲线 a 可知,CFA/CPE 在 0.197 V 和 0.157 V 处有一对良好的氧化还原峰,ΔE=40 mV。在扫描速度 10~1000 mV·s⁻¹范围内,CFA 氧化峰电流(*I*_{pa})与扫描速度平方根(*v*^{1/2})呈良好的线性关系,线性方程为:

$$I_{pa} = -1.173 + 0.535v^{1/2} \quad r = 0.9990$$

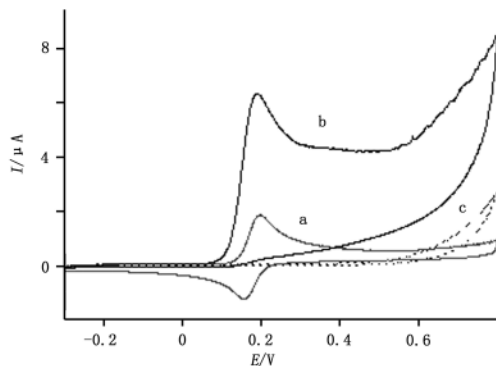


图 1 GSH 循环伏安图

Fig 1 CVs of CFA/CPE in the presence (curve b) and the absence (curve a) of $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH in $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS. Curve c is CV of $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH at CPE in $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS. Scan rate: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

在 pH 2.0~9.0 范围内考察了介质 pH 对 CFA/CPE 伏安行为影响。实验结果表明,在 pH 2.0~9.0 范围内氧化峰电位(*E*_{pa})随着 pH 增大负移,其线性方程为:

$$E_{pa}(\text{mV}) = 595.4 - 57.4\text{pH} \quad r = 0.9972$$

斜率为 57.4 mV/pH,该斜率与 Nernstian 理论值(59 mV/pH)非常接近,由 $E_{pa} = E - 59(m/n)\text{pH}$ 可知: $m = n$,依据文献^[15]得 $n = 2$,则 $m = 2$,即 CFA/CPE 电化学氧化还原过程有 2 质子和 2 电子参与。在 pH 2.0~4.0 范围内 *I*_{pa} 随着 pH 增加而增大;在 pH 4.0~9.0 范围内 *I*_{pa} 随着 pH 增大而降低。

3.2 GSH 在 CFA/CPE 上伏安行为

在 -0.30~0.80 V 电位窗口及 0.10 mol·L⁻¹ PBS 中以 50 mV·s⁻¹扫描速度得到 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 在 CPE 和 CFA/CPE 上的循环伏安曲线(见图 1)。实验结果表明,GSH 在 CPE 上的直接电化学氧化过程十分迟缓(图 1-c),氧化电流随电位的正移而逐渐增大但无氧化峰出现,说明在此电位范围内过电位较高,不易直接发生电化学氧化反应,但在 CFA/CPE 上于 0.193 V 处出现了 1 个不可逆氧化峰(图 1-b),且氧化峰电流大幅度增大(增大约 3 倍),还原峰消失,此实验结果表明 CFA/CPE 对 GSH 的电化学氧化有显著催化作用。在扫描速度 10~1000 mV·s⁻¹范围内,GSH 氧化峰电流(*I*_{pa})与扫描速度平方根(*v*^{1/2})呈良好的线性关系,表明 GSH 在 CFA/CPE 上的电催化氧化反应是受一扩散控制的电极反应过程。

在 pH 2.0~9.0 范围内考察了介质 pH 对催化体系伏安行为的影响。实验结果表明,在 pH 2.0~

7.0 范围内,催化氧化峰电位(E_{pa}) 随 pH 增加而减小,其线性方程为:

$E_{pa} = 583.3 - 60.6 \text{pH} \quad r = 0.9959$

斜率为 60.6 mV/pH,该斜率与 Nernstian 理论值(59 mV/pH) 非常接近,依据 $E_{pa} = E - 0.059 (m/n) \text{pH}$ 得 $m = n$,表明 GSH 的电催化氧化过程有质子参与;在 pH 7.0 ~ 9.0 范围内, $E_{pa} \sim \text{pH}$ 关系曲线出现平台。在 pH 2.0 ~ 7.0 范围内,催化氧化峰电流(I_{pa}) 随 pH 增加而减小,在 pH 7.0 ~ 9.0 范围内, $I_{pa} \sim \text{pH}$ 关系曲线出现平台。

4 电化学动力学

4.1 电荷传递系数 α

在 50 ~ 400 mV · s⁻¹ 扫描速度范围内对 3.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ GSH 在 CFA/CPE 上的循环伏安测试,结果表明 GSH 的峰电位(E_{pa}) 与 log ν 呈良好的线性关系。线性方程为:

$E_{pa} (\text{mV}) = 98.1 + 47.9 \log \nu (\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}) \quad r = 0.9988$

由直线斜率求得 $\partial E_{pa} / \partial (\log \nu) = 47.9 \text{ mV}$ 。根据完全不可逆扩散控制过程方程式^[7]

$E_{pa} = (b \log \nu) / 2 + \text{constant} \quad (1)$

式中 b 代表 Tafel 斜率,由此可得 $E_{pa} \sim \log \nu$ 直线斜率为 $b/2$,即 $b = 2 \times \partial E_{pa} / \partial (\log \nu) = 95.8 \text{ mV}$ 。根据 $b = 2.303RT/n(1 - \alpha) F$ (式中 T 为 293K, n 为参与电极反应电子转移数, α 为电荷传递系数, F 为法拉第常数 96485 C · mol⁻¹),求得电荷传递系数 $\alpha = 0.70$ 。

4.2 电催化氧化表观速率常数 k 运用 CA 法在有 GSH 存在情况下对 CFA/CPE 进行 CA 测试(见图 2) 。根据计时电流公式^[2]:

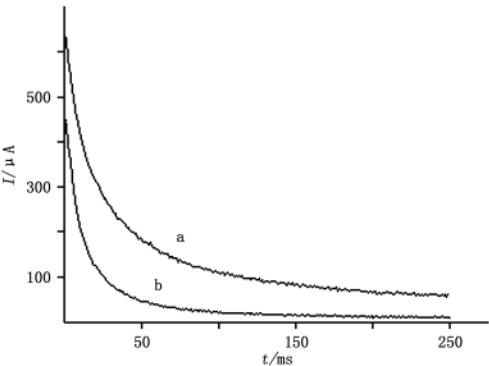


图2 在无 GSH (a) 及 GSH (b) 存在下的计时电流曲线
Fig 2 Chronoamperograms of CFA/CPE in the absence (a) and presence (b) of GSH

$I_c / I_L = \lambda^{1/2} [\pi^{1/2} \text{erf} (\lambda^{1/2}) + \exp (- \lambda) / \lambda^{1/2}] \quad (2)$

式中 I_c 表示 GSH 存在时的催化电流, I_L 表示 GSH 不存在时的扩散电流。 $\lambda = kc^0 t$ (式中 k 为催化体系的速率常数, c^0 为 GSH 初始浓度, t 为催化反应时间) 。当 $\lambda > 1.5$ 时, $\text{erf} (\lambda^{1/2}) \rightarrow 1$, $\exp (- \lambda) / \lambda^{1/2} \rightarrow 0$,该催化反应受动力学控制,则 $I_c / I_L = \pi^{1/2} \lambda^{1/2} = \pi^{1/2} (kc^0 t)^{1/2}$,由上式可计算电催化氧化表观速率常数 k ,当 $t > 14 \text{ ms}$ 时, $k = (2.78 \pm 0.01) \times 10^2 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

5 电分析方法应用

5.1 线性范围与检出限 运用 LSV 法研究了电催化氧化峰电流(I_{pa}) 与 GSH 浓度的关系。在浓度 5.0 × 10⁻⁵ ~ 1.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹,该催化氧化反应体系 I_{pa} 与 GSH 浓度 c 呈现良好的线性关系,线性回归方程为:

$I_{pa} (\mu \text{A}) = 2.003c (10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 3.448 \quad r = 0.9989$

检出限为 4.0 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹。

5.2 共存物质干扰 用 LSV 法在 0.10 mol · L⁻¹ PBS 中对 3.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ GSH 进行干扰测试。结果表明,当相对误差不超过 ± 5% 时,500 倍的葡萄糖、淀粉、蔗糖,300 倍的 Mg²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、NO₃⁻、SO₄²⁻ 对 GSH 的电流响应均不产生影响。

5.3 CFA/CPE 重现性与稳定性 同一修饰电极对 3.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ GSH 平行测定 10 次, RSD 为 2.9%; 将电极在 4 °C 下保存 3 周后测定, RSD 为 2.3%, 表明 CFA/CPE 有良好的重现性与稳定性。

5.4 样品测定

在相同实验条件下,测定市售 STS 粉剂剂中 GSH 含量。准确称取 STS 粉剂剂 0.3073 g,用二次蒸馏水溶解后定容至 100 mL。取定容后的溶液,运用 LSV 法进行测定,然后加入已知量的 GSH 标准品进行回收率测定,测定结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n = 6$)
Tab 1 Determination results of the samples

标示量 (labeled)	测得值 (found) /g	RSD /%	加入量 (added) /g	测得值 (measured) /g	回收率 (recovery) /%
g · 支 ⁻¹	1.171	2.9	0.200	1.367	98.00
	1.223	2.7	0.400	1.640	104.3
	1.204	2.6	0.800	2.033	103.6

与已报道的文献^[10~13,15~17]相比,CFA/CPE 制作简单,表面易于更新,具有良好的重现性与稳定性。

参考文献

- Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*,1988,263 (33): 17205
- Safavi A, Maleki N, Farjami E, *et al*. Simultaneous electrochemical determination of glutathione and glutathione disulfide at a nanoscale copper hydroxide composite carbon ionic liquid electrode. *Anal Chem*,2009,81 (18): 7538
- Ohmori S, Kawase T, Higashiura M, *et al*. High - performance liquid chromatographic method to analyze picomole levels of glutathione, cysteine and cysteinylglycine and its application to pre - cancerous rat livers. *J Chromatogr B*,2001,762: 25
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent . *J Biol Chem*,1951,193: 265
- Vignaud C, Rakotozafy L, Falguieres A, *et al*. Separation and identification by gel filtration and high - performance liquid chromatography with UV or electrochemical detection of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. *J Chromatogr A*, 2004,1031 (1 - 2): 125
- Yoshida T. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high - performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*,1996,678 (2): 157
- Raggi M, Nobile L, Giovannini AG. Spectrophotometric determination of glutathione and of its oxidation product in pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal*,1991,9(10 - 12): 1037
- Liang SC, Wang H, Zhang ZM, *et al*. Direct spectrofluorimetric determination of glutathione in biological samples using 5 - maleimidyl - 2 - (*m* - methylphenyl) benzoxazole. *Anal Chim Acta*,2002,451 (2): 211
- Jin WR, Li XJ, Gao N. Simultaneous determination of Tryptophan and Glutathione in individual rat hepatocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection at a carbon fiber bundle - Au/Hg dual electrode. *Anal Chem*,2003,75 (15): 3859
- Nalini B, Narayanan SS. Electrocatalytic oxidation of sulfhydryl compounds at ruthenium(III) diphenyldithiocarbamate modified carbon paste electrode. *Electroanalysis*,1998,10 (11): 779
- Calvo - Marzal P, Chumbimuni - Torres KY, Höehr NF, *et al*. Determination of reduced glutathione using an amperometric carbon paste electrode chemically modified with TTF - TCNQ. *Sens Actuators B*,

- 2004,100 (3): 333
- Raouf JB, Ojani R, Kolbadinezhad M. Voltammetric sensor for glutathione determination based on ferrocene - modified carbon paste electrode. *J Solid State Electrochem*,2009,13 (9): 1411
- Raouf JB, Ojani R, Baghayeri M. Simultaneous electrochemical determination of glutathione and tryptophan on a nano - TiO₂/ferrocene carboxylic acid modified carbon paste electrode. *Sens Actuators B*, 2009,143 (1): 261
- Gong X, Li HL. Electrocatalytic and analytical responses of 10 - Methylphenothiazine toward reduced glutathione. *J Electrochem Soc*, 2000,147 (1): 238
- Zare HR, Golabi SM. Caffeic acid modified glassy carbon electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) . *J Solid State Electrochem*,2000,4 (2): 87
- Ren W, Luo HQ, Li NB. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. *Biosens Bioelectron*,2006,21 (7): 1086
- Golabi SM, Zare HR. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with electrodeposited film derived from caffeic acid. *Electroanal*,1999,11 (17): 1293
- WANG Chun - mei(王春梅), GAO Zuo - ning(高作宁). Electrocatalytic oxidation of N - acetyl - L - cysteine at caffeic acid modified carbon paste electrode (N - 乙酰 - L - 半胱氨酸在咖啡酸修饰碳糊电极上的电催化氧化) . *J Instrum Anal (分析测试学报)*, 2008,27 (12): 1326
- BAI Li(白莉), GAO Zuo - ning(高作宁). Electrocatalytic oxidation of glutathione at 10 - methylphenothiazine modified carbon paste electrode and its practical analytical application(谷胱甘肽在 10 - 甲基吩噻嗪修饰碳糊电极上的电催化氧化及电分析方法) . *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008,43 (3): 291
- WANG Chun - mei(王春梅), GAO Zuo - ning(高作宁). Electrocatalytic oxidation of isoniazid at 10 - methylphenothiazine modified carbon paste electrode and its electrochemical determination(异烟肼在 10 - 甲基吩噻嗪修饰碳糊电极上的电催化氧化及电分析方法) . *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2010,30 (2): 325
- YOU Wei(犹卫), GAO Zuo - ning(高作宁). Electrochemical behaviors and its electroanalytical application of ganciclovir at carbon paste electrode(更昔洛韦在碳糊电极上的电化学性质及电分析方法研究) . *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2009,29 (5): 837
- Galus Z. Fundamentals of Electrochemical Analysis. New York: Ellis Horwood Press,1994. 398

(本文于 2010 年 12 月 22 日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告