

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

白莉, 高作宁*

(宁夏大学 化学化工学院 能源化工重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘要: 研究了谷胱甘肽(还原型, glutathione, GSH)在 10-甲基吩噻嗪(10-methylphenothiazine, MPT)修饰碳糊电极(MPT/CPE)上的电催化氧化行为。GSH 在裸碳糊电极(carbon paste electrode, CPE)上的直接电化学氧化过程十分迟缓,但在 MPT/CPE 上于 0.702 V 处出现一个不可逆氧化峰,氧化电流大幅度增大。计时电流(chronoamperometry, CA)实验测得该电催化氧化反应速率常数 k 为 $(5.44 \pm 0.03) \times 10^2 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。用线性扫描伏安法(linear sweep voltammetry, LSV)测得催化氧化峰电流与 GSH 在 $5.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系,线性回归方程 $I_{pa} = 3.536c + 2.117$, $r = 0.9990$, 检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时用本方法对含 GSH 的市售药品进行了含量测定,结果可靠。

关键词: 谷胱甘肽; 10-甲基吩噻嗪; 碳糊修饰电极; 电催化氧化; 线性扫描伏安法

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)03-0291-04

Electrocatalytic oxidation of glutathione at 10-methylphenothiazine modified carbon paste electrode and its practical analytical application

BAI Li, GAO Zuo-ning*

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

Abstract: The electrocatalytic oxidation of glutathione (reduced form GSH) at 10-methylphenothiazine (MPT) modified carbon paste electrode (MPT/CPE) was investigated by cyclic voltammetry (CV). Although GSH itself showed a very poor electrochemical response at carbon paste electrode (CPE), the response could be greatly enhanced by using MPT/CPE, which enables a sensitive electrochemical determination of the substrate GSH. The reaction rate constant for catalytic oxidation was evaluated as $(5.44 \pm 0.03) \times 10^2 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ by using chronoamperometry (CA). The catalytic oxidation peak current of GSH versus its concentration had a good linear relationship in the concentration range of $5.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with the correlation coefficient of 0.9990, and the detection limit of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ by linear sweep voltammetry (LSV). The method can be applied for the determination of GSH in injection samples with the satisfactory results.

Key words: glutathione; 10-methylphenothiazine; modified carbon paste electrode; electrocatalytic oxidation; linear sweep voltammetry

谷胱甘肽(还原型, GSH)是人类细胞质中自然合成的一种三肽,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成,含有巯基,广泛分布于机体各器官内,具有抗

氧化、消除自由基、解毒、抗癌、抗过敏和防止辐射损伤等作用^[1]。常见 GSH 测定方法有高效液相色谱法^[2]、荧光光谱法^[3]、流动注射分析法^[4]及电化学法等^[5~8]。由于 GSH 在固体电极上有较高的过电位^[6~8],因此对其电催化氧化的研究引起了众多关注。吩噻嗪及其衍生物是含有氮、硫原子的芳香杂环高度富电子体系,有良好的电化学活性和生

收稿日期: 2007-07-30.

基金项目: 宁夏高等学校科学研究项目(200623)资助.

*通讯作者 Tel: 86-951-2062066, Fax: 86-951-2062860,

E-mail: gaozn@nxu.edu.cn

理活性^[9], 以此类化合物作均相媒体催化氧化生物小分子的研究已有文献^[8,10]报道。目前, 已有文献报道用二苯基二硫代氨基甲酸盐修饰电极^[5]、TTF-TCNQ 修饰电极^[6]、金属酞菁类修饰电极^[7]等对 GSH 进行分析研究, 以 10-甲基吩噻嗪(10-methylphenothiazine, MPT)为均相媒体对 GSH 的电化学催化氧化行为的研究也有文献^[8]报道, 但有关 GSH 在 MPT 修饰碳糊电极(MPT/CPE)上的电催化氧化及其电分析方法研究尚未见报道。

本文在前期工作^[11]基础上制备了 MPT/CPE, 运用循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)研究了 GSH 在 0.25 mol · L⁻¹ NaClO₄ 溶液中及 MPT/CPE 上的电催化氧化行为, 运用计时电流法(chronoamperometry, CA)测定了 MPT 分散于液体石蜡中表现扩散系数 D_{app} , 电催化反应速率常数 k , 电荷传递系数 α 等动力学参数。用线性扫描伏安法(linear sweep voltammetry, LSV)测得催化氧化峰电流与 GSH 线性范围。同时用本方法对市售古拉定(Gluthion)及松泰斯(STS)粉针剂中 GSH 含量进行了测定, 结果可靠。

材料与方法

仪器与试剂 CHI 660A 电化学工作站(美国 CHI 仪器公司), 以 CPE 或 MPT/CPE 为工作电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, CHI 115 铂丝为辅助电极。MPT(美国 Aldrich 公司, 98%); GSH(上海伯奥生物科技有限公司, 生化试剂); 古拉定(意大利 Laboratorio Farmaceutico C. T. S. r. L 公司); STS(昆明积大制药有限公司)。

电极制作 将石墨粉与液体石蜡以质量比 2:1 混合, 研磨均匀, 装入内径为 2.6 mm 的聚四氟乙烯管中, 压实, 另一端插一根铜丝做导线即制得裸碳糊电极(CPE)。

将 MPT 2 mg 溶于乙醇 4 mL 中, 与石墨粉 1 g 混匀, 搅拌直至乙醇完全挥发, 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 MPT 修饰碳糊电极(MPT/CPE)。将所制得的电极在称量纸上抛光, 待用。

实验方法 电化学测量采用三电极体系, CPE 或 MPT/CPE 为工作电极, SCE 为参比电极, CHI 115 铂丝为辅助电极。电解液 10 mL, 支持电解质为 0.25 mol · L⁻¹ NaClO₄ (pH 6.8) 水溶液。电位窗口: 0 ~ 0.85 V, 运用 CV、CA 及 LSV 法进行测试。

结果与讨论

1 MPT/CPE 电化行为

MPT/CPE 在 0.25 mol · L⁻¹ NaClO₄ 水溶液中的循环伏安曲线见图 1b。MPT/CPE 在 0.671 V 和 0.587 V 处有一对可逆氧化还原峰, $E_p = 84$ mV。在扫描速度 20 ~ 1 000 mV · s⁻¹ 下, MPT 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 MPT 在碳糊中为近似可逆反应, 因此近似不移动, 电子传递是由 MPT 不同氧化态与还原态之间自交换完成, 因而具有与分子扩散相似行为^[12]。通过 CA 测定可计算出 MPT 在液体石蜡中的表现扩散系数。

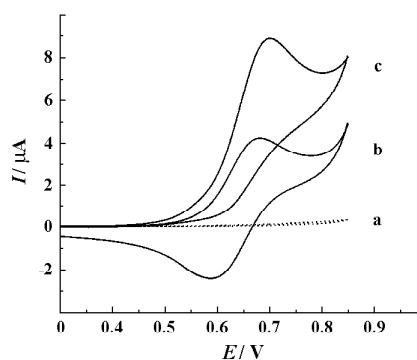


Figure 1 CV curves of unmodified electrode (a), modified electrode (c) in 3.0×10^{-3} mol · L⁻¹ GSH and modified electrode (b) all in 0.25 mol · L⁻¹ NaClO₄. Scan rate: 20 mV · s⁻¹

根据 Cottrell 方程式^[13]:

$$I = nFA_g D_{app}^{1/2} c \pi^{-1/2} t^{-1/2} \quad (1)$$

式中 n 为电子转移数, F 为法拉第常数, c 为 MPT 溶解于液体石蜡中的浓度, D_{app} 为 MPT 分散于液体石蜡中表现扩散系数, A_g 为碳糊电极面积。由其 $I-t^{-1/2}$ 曲线的斜率即可求得 D_{app} ^[14]。实验测得 $I-t^{-1/2}$ 曲线斜率为 5.906×10^{-6} , 计算得 $D_{app} = 6.28 \times 10^{-10}$ cm² · s⁻¹。

pH 2.0 ~ 9.5 考察了介质 pH 对 MPT/CPE 电化行为影响(图 2A)。实验结果表明, pH 2.0 ~ 9.5 氧化峰电位(E_{pa})几乎不改变, 说明 MPT 氧化还原反应没有质子参与, 仅是一个单电子转移的氧化还原反应。在 pH 2.0 ~ 7.0 I_{pa} 随着 pH 增加而增大; 在 pH 7.0 ~ 9.5 I_{pa} 随着 pH 增大而降低, 这可能是 MPT 阳离子发生水解所致^[8]。

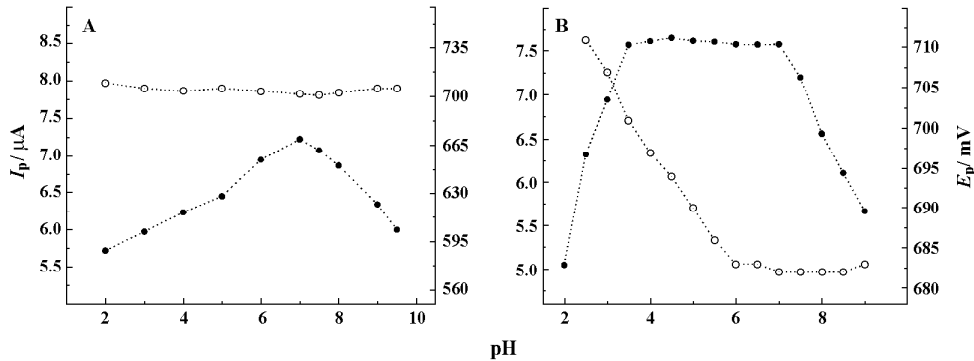


Figure 2 Dependence of I_{pa} (●—●) and E_{pa} (○—○) with pH in $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaClO}_4$ at MPT/CPE. (A) Scan rate: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) the concentration of GSH is $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Scan rate: $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

2 GSH 在 MPT/CPE 上的伏安行为

$3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 在 CPE 和 MPT/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 1a), 氧化电流随电位的正移略增大但无氧化峰出现, 说明 GSH 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 MPT/CPE 上于 0.702 V 处出现了一个不可逆氧化峰, 氧化电流大幅度增加, 且还原峰消失(图 1c), 表明 MPT/CPE 对 GSH 的电化学氧化有显著的催化作用。在扫描速度 $20 \sim 1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 下, GSH 在 MPT/CPE 上的 I_{pa} 与 $v^{1/2}$ 呈良好线性关系, 表明 GSH 在 MPT/CPE 上的电化学氧化反应是受扩散控制的电催化氧化电极反应过程。

在 pH 2.0~9.0 考察了介质 pH 对催化体系电化学行为的影响(图 2B)。实验结果表明, 在 pH 2.0~5.9 催化 E_{pa} 随 pH 增加而减小, 表明 GSH 的电催化氧化过程有质子参与; 在 pH 5.9~9.0, E_{pa} -pH 关系曲线出现平台。在 pH 2.0~3.5 催化 I_{pa} 随 pH 增加而增加, 这可能与 MPT 阳离子发生水解有关^[8]; 在 pH 3.5~7.0, I_{pa} -pH 关系曲线出现平台; 在碱性范围 I_{pa} 逐渐减小, 这可能是 MPT 阳离子发生水解所致^[8]。本研究选择与生理介质相近的 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaClO}_4$ 水溶液(pH 6.8)为介质。

在扫描速度 $20 \sim 1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 对 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 在 MPT/CPE 上进行循环伏安测试, 结果表明 $E_p - \log v$ 呈直线关系, 线性回归方程 $E_p(\text{mV}) = 629.80 + 41.53 \log v (\text{mV} \cdot \text{s}^{-1})$, $r = 0.9983$ 。由直线斜率求得 $E_p/(\log v) = 41.53 \text{ mV}$ 。

根据完全不可逆扩散控制过程方程式^[15]:

$$E_p = (b \log v) / 2 + \text{constant} \quad (2)$$

式中 b 为 Tafel 斜率, 由此可得 $E_p - \log v$ 的直线斜率为 $b/2$, 即 $b = 2 \times E_p/(\log v) = 83.06 \text{ mV}$ 。根据 $b = 2.303RT/n\alpha F$ (式中 T 为 293 K , n 为参与电极反应电子转移数, α 为电荷转移系数, F 为法拉第常数 $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), 求得电荷传递系数 $\alpha = 0.70$ 。

运用 CA 法在 MPT/CPE 上对有无 GSH 存在的情况下进行测试。根据计时电流方程式^[16]:

$$I_c/I_L = \lambda^{1/2} [\pi^{1/2} \text{erf}(\lambda^{1/2}) + \exp(-\lambda)/\lambda^{1/2}] \quad (3)$$

式中 I_c 表示 GSH 存在时的催化电流, I_L 表示 GSH 不存在时的残余电流。 $\lambda = kc_0t$ (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:

$$I_c/I_L = \pi^{1/2} \lambda^{1/2} = \pi^{1/2} (kc_0t)^{1/2} \quad (4)$$

由式(4)可计算电催化氧化反应速率常数 k 。当 $t > 115 \text{ ms}$ 时, $k = (5.44 \pm 0.03) \times 10^2 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

3 样品测定

3.1 线性范围和检测限 运用 LSV 法研究了电催化氧化峰电流与 GSH 浓度的关系。在浓度 $5.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该催化氧化反应体系氧化峰电流 (I_{pa}) 与 GSH 浓度 (c) 呈现良好的线性关系, 线性回归方程为 $I_{pa}(\mu A) = 3.536c(1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 2.117$, $r = 0.9990$, 检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通常催化波灵敏度可达 1×10^{-8} , 甚至 1×10^{-9} , 而本文的检测限为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这可能是修饰剂 MPT 自身具有明显的氧化还原峰所致。

3.2 共存物质干扰 在 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaClO}_4$ 水溶液中对 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 进行干扰实验。

结果表明,当相对误差小于 $\pm 5\%$ 时,500倍的葡萄糖、淀粉、蔗糖、果糖,300倍的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 对GSH的电流响应均不产生影响。

3.3 电极重现性 在优化实验条件下用同一电极平行测定 $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 10次,峰电流的RSD为2.8%;将该电极在4℃下保存30天,峰电流基本保持不变;利用同批修饰碳糊制备的不同MPT/CPE上对相同浓度GSH做CV测试,其电流响应的RSD为3.9%。表明MPT/CPE有良好的重现性和稳定性。

3.4 样品测定 在相同实验条件下,分别测定了市售古拉定及STS粉针剂中GSH的含量。准确称取古拉定和STS粉针剂各0.3300g,分别用二次蒸馏水溶解后定容至100mL。取定容后的溶液,运用LSV法进行测定,然后加入已知量的GSH对照品进行回收率测定,结果见表1。

Table 1 Determination results of the samples ($n=6$)

Sample	Labeled /g per ampoule	Found /g per ampoule	RSD /%	Added /g per ampoule	Recovered /g per ampoule	Recovery /%
Gluthion	0.6	0.590	0.77	0.899	1.480	99.00
		0.599	2.29	0.838	1.445	100.95
		0.592	2.77	0.300	0.903	103.67
STS	1.2	1.185	3.21	1.799	3.013	101.61
		1.190	1.12	1.677	2.926	103.52
		1.167	2.49	0.600	1.781	102.33

由表1可知,所测得不同样品GSH的RSD在0.77%~3.21%,对照品加入回收率在99.0%~103.5%。说明本方法的精密度和准确度符合测定要求。

References

- [1] Cerutti PA. Prooxidant states and tumour promotion [J]. *Science*, 1985,227:375-381.
- [2] Vignaud C, Rakotozafy L, Falgieres 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]. *J Chromatogr A*, 2004,1031:125-133.
- [3] Wang LY, Wang L, Xia TT, et al. A highly sensitive assay for spectrofluorimetric determination of reduced glutathione using organic nano-probes [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2005,61:2533-2538.
- [4] Juan JJ, Torriero AA, Salinas E, et al. Enzymatic rotating biosensor for cysteine and glutathione determination in a FIA system [J]. *Talanta*, 2006,68:1343-1352.
- [5] Nalini B, Narayanan SS. Electrocatalytic oxidation of sulfhydryl compounds at ruthenium (III) diphenyldithiocarbamate modified carbon paste electrode [J]. *Electroanalysis*, 1998,10:779-783.
- [6] Percy CM, Karin YCT, Nelci FH, et al. Determination of reduced glutathione using an amperometric carbon paste electrode chemically modified with TTF-TCNQ [J]. *Sens Actuators B*, 2004,100:333-340.
- [7] Shahrokhian S, Hamzehloei A, Thaghani A, et al. Electrocatalytic oxidation of 2-thiouracil and 2-thiobarbituric acid at a carbon-paste electrode modified with cobalt phthalocyanine [J]. *Electroanalysis*, 2004,16:915-921.
- [8] Gong X, Li HL. Electrocatalytic and analytical responses of 10-methylphenothiazine toward reduced glutathione [J]. *J Electrochem Soc*, 2000,147:238-241.
- [9] Motohashi N, Kawase M, Saito S, et al. Antitumor potential and possible targets of phenothiazine-related compounds [J]. *Curr Drug Targets*, 2000,1:237-245.
- [10] Tong J, Nie MY, Li HL. Electrochemical oxidation of L-cysteine catalyzed by 10-ethylphenothiazine [J]. *J Electroanal Chem*, 1997,433:121-126.
- [11] Han XX, Gao ZN. Electrochemical behavior of dopamine at dodecyl benzenesulfonate self-assembled monolayers modified electrode and its application [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007,42:413-417.
- [12] Deng ZF, Zhu ZL, Yang ZW, et al. Ferrocene modified green pepper seed carbon paste bioelectrodes for the determination of ascorbic acid [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 1999,27:323-326.
- [13] Greef R, Peat R, Peter LM, et al. Instrumental methods in electrochemistry [M]. Chichester: Ellis Horwood Press, 1990:57.
- [14] Raoof JB, Ojani R, Kolbadinezhad M. Electrocatalytic characteristics of ferrocenecarboxylic acid modified carbon paste electrode in the oxidation and determination of L-cysteine [J]. *Electroanalysis*, 2005,17:2043-2051.
- [15] Golabi SM, Zare HR. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with electrodeposited film derived from caffeic acid [J]. *Electroanalysis*, 1999,11:1293-1300.
- [16] Galus Z. Fundamentals of electrochemical analysis [M]. New York: Ellis Horwood Press, 1994:398.