

• 研究论文 •

以马铃薯组织为酶供体化学发光新方法测定血清中游离多巴胺

胡玉斐 章竹君*

(西南大学化学化工学院分析科学研究所 重庆 400715)

摘要 基于超常氧化态的 Cu(III)配合物 $K_5[Cu(HIO_6)_2]$ 能催化低浓度的鲁米诺-过氧化氢化学发光体系,用以测定痕量的过氧化氢;利用马铃薯组织作为酶的提供体,建立了一种测定多巴胺的新方法.多巴胺在马铃薯组织中的多酚氧化酶催化下被溶解氧氧化产生过氧化氢,通过测定产生的过氧化氢间接地测定多巴胺的浓度.实验表明,相对发光强度与多巴胺浓度在 $2.1 \times 10^{-10} \sim 2.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系,检出限为 $7.2 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.对 $3.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 多巴胺平行测定 7 次,相对标准偏差为 2.1%.该方法具有极高的灵敏度,可用于直接测定正常人血清中的游离多巴胺的浓度.

关键词 化学发光;二(过碘酸根)合铜(III)酸钾;马铃薯组织;多巴胺

A Novel Chemiluminescence Method for Determination of Unbound Dopamine in Serum by Using Potato Tissue as an Enzyme Supply

HU, Yu-Fei ZHANG, Zhu-Jun*

(Department of Chemistry, Institute of Analytical Science, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract A novel chemiluminescence-flow injection method was proposed for determination of trace dopamine, which is based on an ultrasensitive chemiluminescence system of luminol- H_2O_2 -(diperiodato)cuprate coupled with a selective enzymatic reaction in a potato tissue. The linear range of calibration curve was 2.1×10^{-10} to $2.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the limit detection was $7.2 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative standard deviation for $3.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of dopamine was 2.1% ($n=7$). The proposed method was successfully applied to the direct determination of inherent dopamine in human serum.

Keywords chemiluminescence; (diperiodato)cuprate; potato tissue; dopamine

多巴胺(dopamine)属于儿茶酚胺类物质,是人体内合成肾上腺素的前体,是一种重要的中枢神经调节物,多巴胺的缺乏会导致精神分裂症和帕金森症^[1];而作为药物,多巴胺能增强心肌收缩力,增加心排血量,能扩张内脏血管,广泛应用于治疗各种类型的休克(中毒性、心源性、出血性休克)、支气管哮喘、高血压和心脏病^[2,3].

近年来测定人血清中多巴胺的方法主要有分光光度法^[4,5]、高效液相色谱法^[6,7]、毛细管电泳法^[8,9]、电化学法^[10~13]、荧光法^[14,15]、化学发光法^[16~18]和生物传感器^[19,20]等.然而这些方法测定多巴胺的线性范围下限大

多数都在 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,最灵敏的方法也只能达到 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,只能测定人服用多巴胺后血清中多巴胺的含量.没有一种方法能够直接测出正常人血清中内源性多巴胺的含量.而这个含量值,对这类神经递质的研究具有重要意义.

我们最近发现,具有超常氧化态的三价铜与过碘酸络合形成的配合物 $K_5[Cu(HIO_6)_2]$ (DPC)对低浓度的鲁米诺与低浓度的 H_2O_2 之间的化学发光反应有极强的催化作用,远大于通常认为催化能力最强的 Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} 和辣根过氧化物酶(HRP).据此,建立起测定过氧

* E-mail: zzh18@hotmail.com

Received October 23, 2007; revised November 21, 2007; accepted December 7, 2007.

国家自然科学基金(No. 30470886)资助项目.

化氢的高选择性和超高灵敏度的新方法^[21].

本文利用马铃薯组织富含多酚氧化酶的特点,使用该组织作为酶的提供体,由多巴胺通过酶催化的氧化反应生成的过氧化氢,在 $K_5[Cu(HIO_6)_2]$ 的催化下同低浓度的鲁米诺($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)反应产生化学发光. 结合流动注射技术,实现多巴胺的在线测定. 实验发现,相对发光强度与多巴胺的浓度在 $2.1 \times 10^{-10} \sim 2.1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内与化学发光浓度呈良好的线性关系,检出限为 $7.2 \times 10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (3σ),对浓度为 $3 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多巴胺溶液连续测定 7 次,相对标准偏差为 2.1%. 这是目前测定多巴胺灵敏度最高的方法,已用于测定正常人血清中多巴胺的含量.

1 实验

1.1 试剂

鲁米诺(Luminol, 陕西师范大学提供, >95%). 高碘酸钾(KIO_4), 过二硫酸钾($Na_2S_2O_8$), 五水合硫酸铜($CuSO_4\cdot 5H_2O$), 氢氧化钾(KOH), 过氧化氢(H_2O_2)等试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水. 盐酸多巴胺注射液(上海禾丰制药厂, 批号 20070518).

多巴胺($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 购自 Sigma, 需要每天配制. 配制 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲁米诺储备液: 将 1.772 g 鲁米诺用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $NaCO_3$ 溶液溶解, 用二次水稀释至 1 L. $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KOH- KH_2PO_4 缓冲溶液作为载流. $K_5[Cu(HIO_6)_2]$ (DPC, $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 储备液按文献方法^[22]合成.

马铃薯购自当地的市场, 不用时放在冰箱 4°C 保存.

1.2 仪器

利用马铃薯组织作为酶的提供体, 在多酚氧化酶作用下, 多巴胺被氧化产生等量的过氧化氢. luminol- H_2O_2 -DPC 化学发光体系已成功用于测定痕量的 H_2O_2 . 通过定量测定酶反应产生的 H_2O_2 实现多巴胺的测定.

化学发光检测系统如图 1 所示, 所有流路用蠕动泵(HL-2, 上海沪西)输送. PTFE 管(内径 0.8 mm)连接所有元件, 体积为 $75 \mu\text{L}$ 的采样环是 PTFE 管(内径为 1 mm). 试样通过组织柱产生 H_2O_2 , 通过 Y 型三通与鲁米诺汇合, 混合溶液经过采样环同 DPC 一同流经流通池, 产生化学发光, 其信号由联机的超微弱化学发光分析仪(BPCL, 北京生物物理研究所)检测记录. 流通池(内径 1 mm×长度 80 mm)放在靠近 CR-105 光电倍增管的地方. 数据的获取与处理用 Window98 下的 BPCL 分析软件.

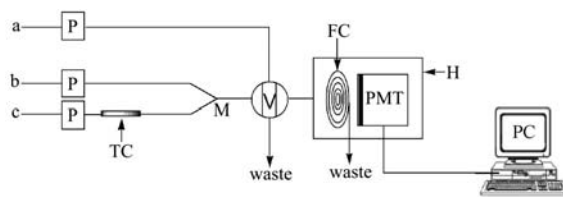


图 1 流动注射-化学发光系统示意图

TC: 植物组织柱; M: “Y”型三通; V: 注射阀; F: 流通池; PMT: 光电倍增管; PC: 计算机; H: 暗盒; W: 废液; P: 蠕动泵; a: DPC 溶液; b: 鲁米诺溶液; c: 二次水或多巴胺标准溶液或样品

Figure 1 Schematic diagram of the FIA-CL system

1.3 组织反应器的制备

取新鲜马铃薯用刀片切成碎块($2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$), 然后用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{pH}=7.0$ 的磷酸缓冲溶液(KH_2PO_4 -KOH)冲洗, 取 1.0 g 处理好的马铃薯组织装在玻璃管(内径 $4 \text{ mm} \times$ 长度 75 mm)中, 并将两端用玻璃棉封住. 使用前用二次蒸馏水以 $2.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度冲洗 30 min.

1.4 样品

样品是由西南大学校医院提供的血清样品. 准确吸取 2 mL 的血清样品, 加入 $HClO_4$ (6%, V/V), 混合后 $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去除蛋白, 吸取上层清液 1 mL, 用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{pH}=9.0$ 的磷酸缓冲溶液(KH_2PO_4 /KOH)稀释到合适的浓度直接用于测定.

2 结果和讨论

2.1 化学发光体系条件优化

碱性介质条件下, 鲁米诺与 H_2O_2 的反应在金属离子(Co^{2+} , Cu^{2+} 等)的催化下产生化学发光. 在该类反应中, DPC 显示了出色的催化作用. 在 DPC 的催化作用下, 低浓度的鲁米诺溶液($1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)亦能被低浓度的 H_2O_2 ($\leq 1 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)所氧化产生化学发光. 该发光反应的动力学曲线如图 2 所示.

作为催化剂, DPC 溶液的浓度对该体系有较大的影响. 浓度过低, 不稳定的性质直接影响催化效果; 浓度过大, 由于高浓度溶液中的自吸收亦影响其催化作用. 考察 DPC 的浓度在 $1 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内对化学发光强度的影响. DPC 的最佳浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 作为化学发光试剂, 鲁米诺浓度亦直接影响化学发光强度, 因此考察鲁米诺浓度在 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内对化学发光强度的影响并比较了在不同催化剂的催化作用下, 鲁米诺浓度对相对发光强度的影响(如图 3 所示). 鲁米诺的最佳浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

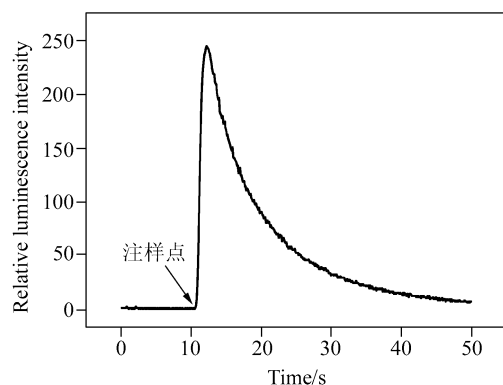


图2 luminol-H₂O₂-DPC 化学发光反应的动力学曲线

Figure 2 Kinetics curve of luminol-H₂O₂ catalyzed by DPC
luminol: $2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; H₂O₂: $1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; the injected DPC: $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

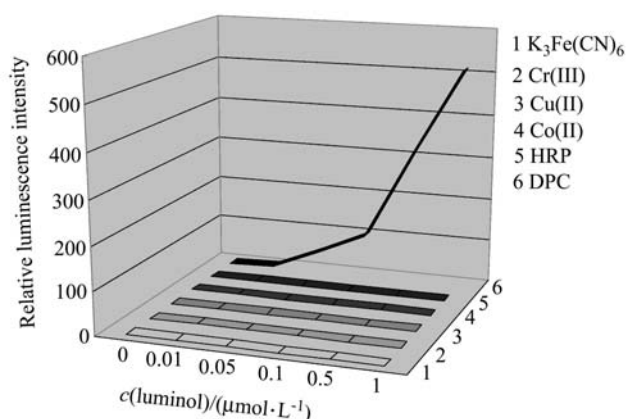


图3 在不同催化剂如 K₃Fe(CN)₆, Cr³⁺, Co²⁺, Cu²⁺ 和 DPC 催化下, 鲁米诺浓度对发光强度的影响

Figure 3 Effect of luminol concentration on CL intensity under the catalytic activity of catalysts such as K₃Fe(CN)₆, Cr³⁺, Co²⁺, Cu²⁺ and DPC

K₃Fe(CN)₆, Cr³⁺, Co²⁺, Cu²⁺ and DPC: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; H₂O₂: $5 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; flow rate: $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

pH 值不仅直接影响酶反应, 也对化学发光反应有影响. 在此化学发光体系中, 因为 DPC 溶液中的 Cu(III) 在 NaOH 条件下易析出, 我们选用了 KH₂PO₄-KOH 缓冲溶液化学发光反应的介质. 多酚氧化酶(PPO)最合适的 pH 值为 7.0, 而鲁米诺与过氧化氢的化学发光反应的最佳 pH 值是 10~11, 综合 pH 值对两者的影响, 得到最佳 pH 值为 9.0.

2.2 组织反应器的性能

由于马铃薯组织中富含 PPO, 不需要任何固定化步骤, PPO 可以保持较高的活性且时间相对于分离纯化的酶要长一些. 不同时期的马铃薯的活性是不同的, 实验表明新马铃薯的活性是最高的. 当不用时将传感器放在冰箱中 4 °C 保存. 此传感器在三周后其信号可保持原来

的 90%, 可重复使用 200 次. 马铃薯组织反应柱不仅易于制备、更换且价廉.

2.3 温度的影响

在酶反应中, 温度是影响酶活性的重要因素. 温度太低, 酶活性不高, 发光信号低; 温度过高, 酶容易变性失活. 大多数情况下, 酶的活性随着温度的升高而增大. 我们考察 10~45 °C 范围内温度对化学发光强度的影响, 结果表明在测试温度范围, 温度高时相对化学发光信号值也高, 而当温度超过 45 °C 后, 发光信号值随着温度的升高而下降, 可能是由于植物组织的结构和新陈代谢受到损害及酶的失活. 此外高温时, 马铃薯组织柱的寿命会缩短. 考虑到组织柱的寿命和操作的简便, 选定室温(25 °C)作为实验温度.

2.4 流速的影响

流速也是一个重要的影响因素. 流速小, 产生的化学发光信号小; 流速越大, 样品同马铃薯组织的接触时间越短, 产生的 H₂O₂ 的量会减少, 因此化学发光信号值也小. 因此选择合适的流速是很重要的. 我们考察了在 0.5~2 mL·min⁻¹ 范围内流速的影响, 如图 4 所示, 最佳的流速为 1.5 mL·min⁻¹.

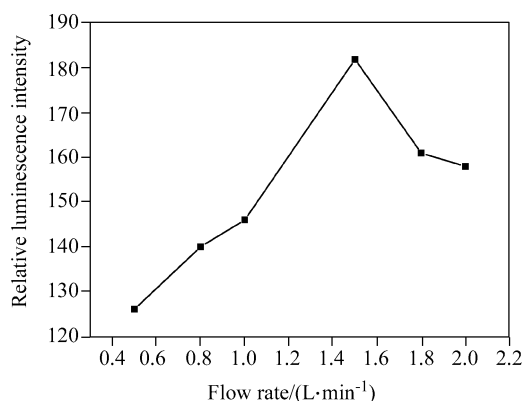


图4 流速对发光强度的影响

Figure 4 Effect of flow rate

luminol: $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; DPC: $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; dopamine: $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; flow rate: $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

2.5 工作曲线

在已优化的实验条件下, 多巴胺浓度在 $2.1 \times 10^{-10} \sim 2.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内与化学发光强度呈良好的线性关系. 在 $2.1 \times 10^{-10} \sim 2.1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内其线性方程为 $\Delta I = 13.85c + 27.60$ (c : 多巴胺的浓度, nmol·L⁻¹); 在 $2.1 \times 10^{-8} \sim 2.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内其线性方程为 $\Delta I = 26.69c + 169.98$ (c : 多巴胺的浓度, 0.1 μmol·L⁻¹). 检出限为 $7.2 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (3σ). 对于 $3 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 多巴胺平行测定 7 次, 相对标准偏差为 2.1%.

2.6 干扰试验

为了应用该方法对实际样品的测定,需要考察干扰离子的影响,方法是分析 $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 多巴胺标准溶液,不断增加干扰物的量,可以容许的限度是相对误差小于 5%. 考察结果为 1000 倍的 Co^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{2+} , Cr(VI) , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cu^{+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Fe(CN)_6^{3-} , NH_4^{+} , F^{-} , Br^{-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, IO_3^{-} , SeO_3^{2-} 不干扰; 500 倍的尿酸, 尿素, 乳酸不干扰; 100 倍的 Vc 不干扰; 10 倍的葡萄糖, 去甲肾上腺素不干扰. 干扰实验结果表明该方法具有良好的选择性.

2.7 样品测定

2.7.1 多巴胺注射液样品分析

多巴胺的注射液用二次水稀释至不同浓度, 作为样

品溶液进行检测. 并与其他方法的测定值进行了对照, 结果见表 1. 从表中可看出用本方法测得的结果与报道方法测得的结果一致.

2.7.2 血清样品测定

用分立取样方法估算血清中的多巴胺含量, 取新鲜血清 1 mL 稀释到 10 mL, 分成两份, 其中一份用 0.5 g 新鲜的马铃薯组织处理 20 min, 将两者进行分立取样方法测定的差值与用 $2.1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 多巴胺标准溶液的测定值相比较, 可估算出血清样品中的多巴胺的含量.

取新鲜血清稀释 100 倍, 按照实验方法(FIA-CL)对血清中的多巴胺进行标准加入回收实验, 结果见表 2.

表 1 多巴胺针剂中含量的测定($n=3$)

Table 1 Determination results of dopamine in injection with the proposed CL method and the official method ($n=3$)

样品	本法测定值 ^a /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	分光光度法测定值 ^{[4]a} /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%
No.1	1.03	1.06	2.8
No.2	4.20	4.27	1.6
No.3	8.70	8.61	1.0

^a表示三次测定的平均值.

表 2 人血清中多巴胺的浓度及加标回收试验

Table 2 Results of the determination of dopamine in human's serum and recovery

样品	血清样品中多巴胺含量/ ($10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加入浓度/ ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得浓度 ^a / ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/% ($n=3$)
No. 1	25.6	1.00	1.12	112	1.21
		3.00	3.06	102	0.98
		5.00	4.90	98	1.71
No. 2	28.3	4.00	4.07	102	2.44
		8.00	7.96	99	1.15
		12.00	12.05	100	3.27

^a表示三次测定的平均值.

References

- Perry, K. W.; Fuller, R. W. *Life Sci.* **1992**, 50, 1683
- Chen, X.-Q.; Jin, Y.-Y. *New Pharmacology*, People's Medical Publishing House, Beijing, **2000**, p. 293 (in Chinese). (陈新谦, 金有豫, 新编药理学, 人民卫生出版社, 北京, **2000**, p. 293.)
- National Codex Committee, *The Codex of the People's Republic of China*, Chemical Industry Press, Beijing, **2005**, p. 500 (in Chinese). (国家药典委员会, 中华人民共和国药典, 2005 年版二部, 化学工业出版社, 北京, **2005**, p. 500.)
- Wang, H.-Y.; Sun, Y.; Tang, B. *Anal. Lab.* **2003**, 22(1), 45 (in Chinese). (王怀友, 孙悦, 唐波, 分析实验室, **2003**, 22(1), 45.)
- Li, Q. M.; Li, J.; Yang, Z. J. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583(1), 147.
- Carrera, V.; Sabater, E.; Vilanova, E.; Sogorb, M. A. *J. Chromatogr. B* **2007**, 847(2), 88.
- Chen, F. N.; Zhang, Y. X.; Zhang, Z. J. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25(7), 942.
- Yue, M. E.; Jiang, T. F.; Shi, Y. P. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28(4), 360.
- Zhang, L. Y.; Qv, S. F.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K. *J. Chromatogr. B* **2003**, 792(2), 381.
- Wang, P.; Li, Y. X.; Huang, X.; Wang, L. *Talanta* **2007**, 73(3), 431.
- Li, J.; Lin, X. Q. *Sens. Actuators, B* **2007**, 124(2), 486.
- Jiao, S. F.; Li, M. G.; Wang, C.; Chen, D. L.; Fang, B. *Electrochim. Acta* **2007**, 52(19), 5939.

- 13 Zhang, Y. Z.; Pan, Y.; Su, S.; Zhang, L. P.; Li, S. P.; Shao, M. W. *Electroanalysis* **2007**, 19(16), 1695.
- 14 Seçkin, Z. E.; Volkan, M. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 547(15), 104.
- 15 Wang, H. Y.; Hui, Q. S.; Xu, L. X.; Jiang, J. G.; Sun, Y. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 497(1~2), 93.
- 16 Guo, Z. H.; Dong, S. J. *Electroanalysis* **2005**, 17(7), 607.
- 17 Wang, S.-H.; Du, L.-Y.; Wei, X.-T.; Wang, L.-Y.; Zhuang, H.-S. *Spectrosc. Spectr. Anal.* **2005**, 25(5), 678 (in Chinese).
(王术皓, 杜凌云, 魏新庭, 王良玉, 庄惠生, 光谱学与光谱分析, **2005**, 25(5), 678.)
- 18 Nalewajko, E.; Ramírez, R. B.; Kojlo, A. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 36(1), 219.
- 19 Lin, X. Q.; Kang, G. F.; Lu, L. P. *Bioelectrochemistry* **2007**, 70(2), 235.
- 20 Xiang, L.; Lin, Y. Q.; Yu, P.; Su, L.; Mao, L. Q. *Electrochim. Acta* **2007**, 52(12), 4144.
- 21 Hu, Y. F.; Zhang, Z. J.; Yang, C. Y. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 601(1), 95.
- 22 Kolthoff, I. M.; Belcher, R. *Volumetric Analysis*, Vol. 3, Translated by Liang, S. Q., Science Press, Beijing, **1963**, p. 598 (in Chinese).
(柯尔蜀夫 I. M., 贝尔学 R. 著, 梁树权译, 容量分析, 第3卷, 科学出版社, 北京, **1963**, p. 598.)

(A0710234 PAN, B. F.; LING, J.)