

УДК 543.253:541.128.13

**ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ДОФАМИНА НА ГРАФИТОВОМ ЭЛЕКТРОДЕ,
МОДИФИЦИРОВАННОМ НАФИОНОВОЙ ПЛЕНКОЙ
С ЭЛЕКТРООСАЖДЕННЫМИ ЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА**

*Л.Г. Шайдарова, И.А. Челнокова, А.В. Гедмина,
Д.Р. Салманова, Г.К. Будников*

Аннотация

Частицы золота, электроосажденные на графитовом электроде, проявляют электрокаталитическую активность при окислении дофамина. Установлено, что использование электрода, покрытого пленкой из нафiona с включенными частицами золота, позволяет проводить селективное определение дофамина в присутствии аскорбиновой и мочевой кислот. Определены условия регистрации максимального каталитического тока в стационарном режиме и в условиях проточно-инжекционного анализа (ПИА). Предложена методика вольтамперометрического определения дофамина на графитовом электроде, покрытом нафионовой пленкой с включенными частицами золота. Линейная зависимость величины электрокаталитического отклика этого композитного электрода от концентрации дофамина наблюдается в интервале от $5 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ М и от 2.5 мкМ до 5 нМ в стационарном режиме и в условиях ПИА соответственно.

Введение

Дофамин (ДА), или 2-(3,4-диоксифенил)-этиламин, является биохимическим предшественником норадреналина и адреналина. Как химический медиатор нервных импульсов в определенных структурах мозга ДА играет важную роль в процессах нервной деятельности. Нарушение медиаторной функции ДА является одним из механизмов развития паркинсонизма и других психических заболеваний [1]. Поэтому разработка быстрых и простых способов определения ДА в биологических жидкостях, таких как внеклеточная жидкость головного мозга, плазма крови, моча, представляет несомненный интерес. Для количественного определения ДА используют титриметрию [2], спектрофотометрию [3], хемилюминесценцию [4], потенциометрию [5], высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) [6, 7] и иммунологические методы. Но эти методы имеют некоторые ограничения. Недостатком спектрофотометрии, потенциометрии и титриметрии является низкая концентрационная чувствительность. Иммунологические методы отличаются длительностью проведения анализа и высокой стоимостью реагентов, а для ВЭЖХ требуется проводить длительную предварительную пробоподготовку, иногда включающую стадию дериватизации [8]. Использование вольтамперометрии с химически модифицированными электродами (ХМЭ) позволяет повысить чувствительность, селективность и экспрессность определения ДА [9–12].

В настоящей работе изучена каталитическая активность частиц золота, включенных в катионообменную пленку из нафiona (НФ), при электроокислении ДА в стационарном режиме и в условиях ПИА.

1. Экспериментальная часть

Постояннотоковые вольтамперограммы с линейной формой изменения потенциала регистрировали на полярографе ПУ-1, циклические – на вольтамперометрическом анализаторе «Экотест-ВА». При регистрации вольтамперных кривых использовали трехэлектродную ячейку. В качестве рабочего электрода применяли электрод из стеклоуглерода (СУ) с видимой поверхностью 0.10 см^2 , покрытый электроосажденными частицами золота (Au-СУ), и СУ, покрытый НФ-пленкой (НФ-СУ) или НФ-пленкой с включенными частицами золота (Au-НФ-СУ). Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод, вспомогательным – платиновая проволока.

При получении пленочного электрода в качестве полимера использовали нафion марки «ч» фирмы Aldrich. Нанесение полимера на поверхность СУ проводили методом «капельного испарения». Электроосаждение золота на поверхности СУ проводили из раствора, содержащего тетрахлорозолотую кислоту (HAuCl_4) фирмы Aldrich на фоне $0.01 \text{ M H}_2\text{SO}_4$.

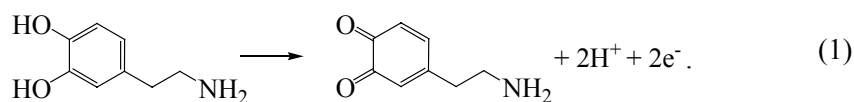
При регистрации вольтамперограмм использовали скорость наложения потенциала (v), равную 10 или 20 мВ/с. Коэффициент скорости электродной реакции определяли, варьируя величину v в интервале от 10 до 100 мВ/с.

Растворы ДА готовили разведением его стандартного раствора, а растворы аскорбиновой и мочевиной кислот готовили растворением их точных навесок в водном растворе фосфатного буфера с pH 6.86. Серии растворов меньших концентраций готовили разбавлением исходных растворов непосредственно перед измерениями. Значение pH контролировали на pH-метре типа pH-150.

Измерения в условиях ПИА проводили на установке, включающей перистальтический насос, инжектор, проточную электрохимическую ячейку и регистрирующее устройство [13]. Инъекцию осуществляли микрошприцем через уплотнительную мембрану.

2. Результаты и их обсуждение

Дофамин окисляется на твердых электродах в водных средах необратимо. При этом ДА теряет два электрона и два протона с образованием *o*-хиноидного фрагмента в структуре продукта окисления катехоламина по схеме [14]:



На циклической вольтамперограмме окисления ДА на СУ регистрируется пара анодно-катодных пиков (рис. 1, *a*), сильно растянутых по оси потенциалов. Разница потенциалов катодного и анодного пиков составляет 200 мВ, что превышает значение для обратимого процесса. Перенапряжение уменьшается при окислении ДА на ХМЭ с каталитическими свойствами.

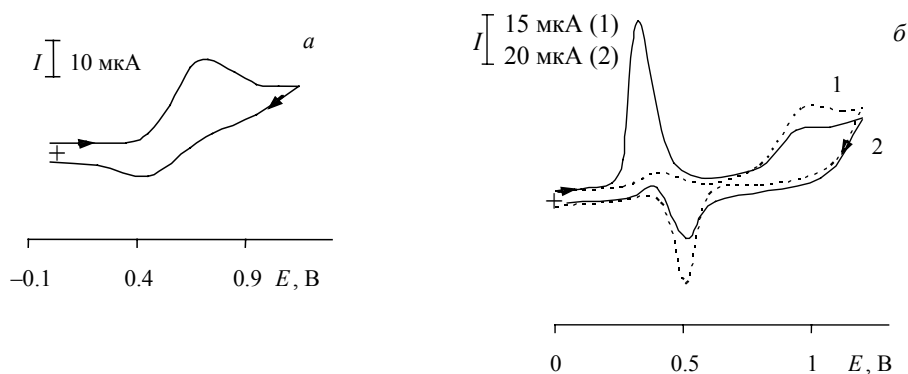
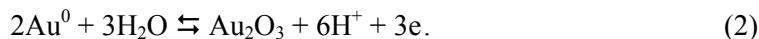


Рис. 1. Вольтамперограммы, полученные на СУ (а) и Au-СУ (б) в присутствии (а, б, кривая 2) и в отсутствие (б, кривая 1) дофамина ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ М) на фоне фосфатного буферного раствора с рН 6.86

Известно, что золото является универсальным катализатором ряда электрохимических реакций [15]. На вольтамперограмме, полученной на электроде Au-СУ на фоне 0.1 М H_2SO_4 , наблюдается одна пара пиков (рис. 2), соответствующая электродному процессу [16, 17]:



Анодный пик, регистрируемый фоне 0.1 М H_2SO_4 при $E_{\text{п}}$ 1.10 В, иногда разделяется на две ступени (рис. 2, кривая 1), которые, вероятно, связаны с образованием оксо- и гидроксочастиц Au^{3+} . Восстановление этих форм происходит при потенциалах катодного пика $E_{\text{п}}$ 0.80 В. Кроме того, на анодной ветви вольтамперограммы регистрируется небольшой максимум тока при $E_{1/2}$ 0.50 В, который, вероятно, связан с окислением наноразмерных частиц золота. Известно [18], что электрохимические свойства изолированных атомов металла отличаются от свойств атомов в объеме металла: отсутствие энергии стабилизации кристаллической решетки у наночастиц приводит к уменьшению перенапряжения окисления металла. Уменьшение перенапряжения также происходит и при наличии дефектов осадка.

Вольтамперные характеристики окисления частиц золота, осажденных на СУ, зависят от рН раствора. С ростом величины рН потенциалы пиков смещаются в катодную область, высота анодных пиков уменьшается, а катодных пиков увеличивается (рис. 2, кривые 1–3). Тем не менее, при любых значениях рН регистрируются четко выраженные и воспроизводимые пики. Поэтому этот электрод можно использовать в широкой области рН: в кислых, нейтральных и щелочных электролитах.

При анализе биологических объектов предпочтение имеют электроды-сенсоры, которые дают каталитический отклик при физиологических значениях рН. Поэтому изучение каталитических свойств осадка золота при окислении ДА проводили в нейтральной среде.

На анодной ветви циклической вольтамперограммы окисления ДА на электроде Au-СУ регистрируются две ступени (рис. 1, б). Высота первого четкого пика при $E_{\text{п}}$ 0.30 В зависит от концентрации ДА и многократно превышает ток

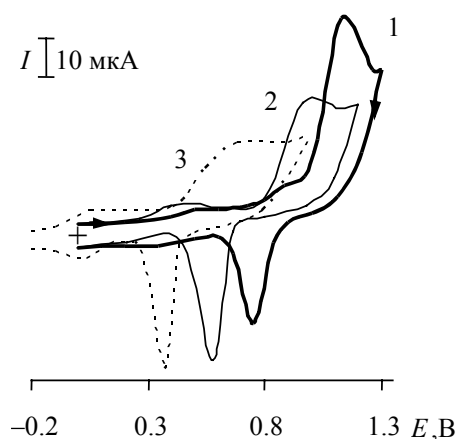


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы, полученные на электроде Au-CU на фоне 0.1 M H_2SO_4 (1), фосфатного буферного раствора с pH 6.86 (2) и боратного буферного раствора с pH 9.05 (3)

окисления медиатора. Высота волны при $E_{1/2}$ 1.10 В в присутствии субстрата уменьшается, то есть окисление субстрата происходит при потенциалах окисления медиатора по первой ступени, а при потенциалах второй ступени происходит окисление медиатора. Зависимость тока окисления ДА (I) от скорости наложения потенциала (v) в координатах I/\sqrt{v} от \sqrt{v} имеет отрицательный наклон, что свидетельствует об электродном процессе, осложненном химической реакцией [19].

Как видно из рис. 1, при окислении ДА на электроде Au-CU наблюдается катализ по току и потенциалу. Использование ХМЭ ведет к уменьшению перенапряжения окисления ДА и увеличению тока по отношению к току медиатора. Разность потенциалов окисления субстрата на ХМЭ ($E_{кат}$) и СУ (E_S) ($E_{кат} - E_S$) составляет 200 мВ. Каталитический эффект, рассчитанный как отношение разности каталитического тока окисления субстрата ($I_{кат}$) и тока окисления медиатора (I_M) к I_M , равен 40.

Установлено, что этот ХМЭ также проявляет каталитическую активность и по отношению к окислению АК и МК. При этом ДА, АК и МК окисляются при одних и тех же потенциалах, что ограничивает возможность селективного определения ДА на электроде Au-CU. Для исключения влияния кислот на определение ДА использовали ионообменную полимерную пленку – НФ. Известно, что при физиологическом значении pH ДА находится в катионной форме, а АК – в анионной. Поэтому анионы кислот электростатически недоступны катионообменной НФ-пленке и не мешают определению ДА. Поэтому использование электрода, модифицированного НФ-пленкой с электроосажденными частицами золота, позволяет проводить селективное определение ДА в присутствии АК и МК. При этом электрод Au-НФ-CU проявляет более высокую активность по сравнению с электродом Au-CU. Значительное увеличение тока в этом случае связано не только с медиаторными свойствами металла, но и с кумулятивными свойствами НФ. Накопление ДА на поверхности ХМЭ происходит в результате взаимодействия субстрата с гидрофильной группой $-SO_3^-$ нафионовой пленки.

Другими словами, регистрируемый ток окисления ДА отражает протекание двух процессов: электрокатализа и ионного обмена.

На основании полученных результатов разработан вольтамперометрический способ определения ДА по электрокаталитическому отклику электрода Au-НФ-СУ.

Методика определения дофамина на электроде Au-НФ-СУ. В мерную колбу на 10 мл вводили фиксированный объем стандартного раствора ДА и доводили до метки фосфатным буферным раствором с pH 6.86. Раствор переносили в электрохимическую ячейку. Затем в исследуемый раствор погружали ХМЭ, вспомогательный и хлоридсеребряный электроды и регистрировали постоянноточковую вольтамперограмму в интервале потенциалов от 0.0 до 1.3 В, на которой измеряли величину тока пика при E_p 0.40 В.

Величина каталитического тока пропорциональна концентрации ДА в широком интервале: $(5 \cdot 10^{-3} \div 1 \cdot 10^{-5})$ и $(5 \cdot 10^{-6} \div 1 \cdot 10^{-8})$ М. Эти зависимости описываются уравнениями:

$$I = (5.6 \pm 0.4) + (1.3 \pm 0.1) \cdot 10^4 \cdot C; (I, \text{мкА}; C, \text{М}); R = 0.9995, \quad (3)$$

$$I = (2.4 \pm 0.1) + (9.5 \pm 0.2) \cdot 10^6 \cdot C; (I, \text{мкА}; C, \text{М}); R = 0.9979. \quad (4)$$

Использование ХМЭ с электрокаталитическими свойствами по сравнению с немодифицированными электродом позволяет увеличить диапазон определяемых концентраций и понизить предел обнаружения ДА на три порядка. Правильность методики оценена методом «введено-найдено». Относительное стандартное отклонение (S_r) не превышает 5% во всем диапазоне концентраций.

Изучена возможность амперометрического детектирования ДА на электроде Au-НФ-СУ в условиях ПИА. Измерения проводили в потенциостатическом режиме. Как видно из рис. 3, а, максимальный аналитический сигнал на фоне фосфатного буферного раствора с pH 6.86 регистрируется при E 0.45 В. При определении гидродинамических параметров ДА установлено, что максимальная величина ПИА-сигнала наблюдается при объеме инжектируемой пробы (V), равном 0.70 мл, и скорости потока (u), равной 25 мл·мин⁻¹ (рис. 4, б).

На основании полученных зависимостей были выбраны рабочие условия регистрации аналитического сигнала в условиях ПИА.

Методика проточно-инжекционного определения дофамина на электроде Au-НФ-СУ. По силиконовым трубкам с внутренним диаметром 2 мм, герметично соединенным с проточной электрохимической ячейкой, содержащей ХМЭ, вспомогательный и хлоридсеребряный электроды, пропускали поток носителя, в качестве которого использовали фосфатный буферный раствор с pH 6.86, со скоростью $u = 25$ мл·мин⁻¹. Регистрацию ПИА-сигнала проводили при E 0.45 В после инжектирования пробы объемом $V = 0.70$ мл. Линейная зависимость ПИА-сигнала от концентрации ДА наблюдается в интервале от 2.5 мкМ до 5 пМ. Уравнение регрессии имеет вид:

$$\lg I = (3.87 \pm 0.12) + (0.81 \pm 0.02) \cdot \lg C; (I, \text{мкА}; C, \text{М}); R = 0.9988. \quad (5)$$

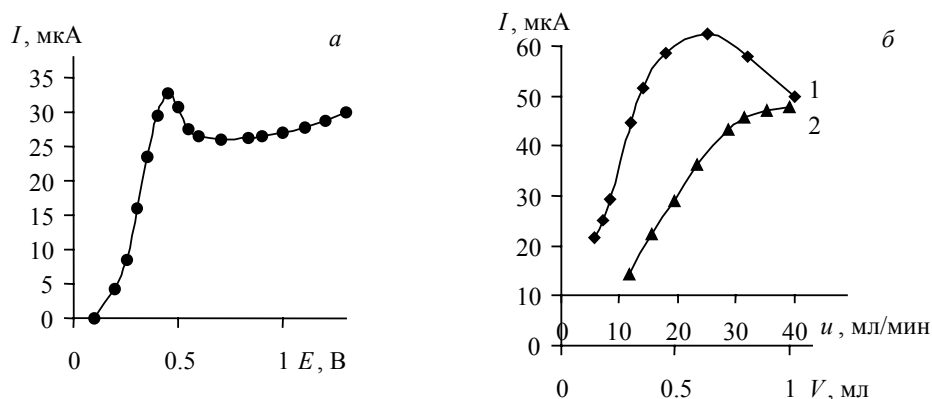


Рис. 3. Зависимости величины ПИА-сигнала при окислении дофамина ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ М) на электроде Au-НФ-СУ от накладываемого потенциала (а), скорости потока (б, кривая 1) и объема инъецируемой пробы (б, кривая 2), полученные на фоне фосфатного буферного раствора с рН 6.86

Следует отметить высокую сходимость результатов анализа в проточной системе ($S_r < 5\%$).

Электрод Au-НФ-СУ использовали для амперометрического детектирования ДА в моче и плазме крови в условиях ПИА. При этом для инъецирования использовали растворы анализируемых объектов, разбавленные в 5 и 50 раз для плазмы крови и мочи соответственно. Для определения ДА в крови проводили следующую пробоподготовку: к пробе крови (5 мл) добавляли антикоагулянт гепарин (0.1 мл) и проводили центрифугирование при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Содержание субстрата находили по градуировочным графикам, построенным по методу добавок. Результаты определения ДА в биологических жидкостях представлены в табл. 1.

Табл. 1

Результаты проточно-инжекционного вольтамперометрического определения дофамина на электроде Au-НФ-СУ в моче и плазме крови; $n = 6$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.57$

Объект анализа		С, М (для здорового человека)	Найдено, М	S_r
Моча	Образец 1	$(1-8) \cdot 10^{-7}$	$(7.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	0.04
	Образец 2		$(6.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.03
Плазма крови	Образец 1	$(3-9) \cdot 10^{-5}$	$(3.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-5}$	0.03
	Образец 2		$(5.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-5}$	0.02

Установлено, что полученные значения содержания ДА в моче и плазме крови находятся в пределах нормы для здорового человека. Получены высокие метрологические характеристики проточно-инжекционного определения ДА в биологических жидкостях. Это связано с тем, что в потоке жидкости удается избежать адсорбции на поверхности ХМЭ матричных компонентов (особенно белков) биологических объектов и продуктов электродных реакций.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Фундаментальные исследования и высшее образование» CRDF и Министерства образования и науки РФ (проект REC-007).

Summary

L.G. Shaidarova, I.A. Chelnokova, A.V. Gedmina, D.R. Salmanova, H.C. Budnikov. Flow-injection determination of dopamine at graphite electrode modified by nafion film with electrodeposited gold particles.

Gold particles electrodeposited on glassy carbon electrode show electrocatalytic activity at dopamine oxidation. It is established that the use of the electrode based on Nafion film with included gold particles allows spending the selective determination of dopamine at the presence of ascorbic and uric acids. Conditions of maximum catalytic current in stationary mode and in flow-injection analysis (FIA) conditions are obtained. The method of voltammetric determination of dopamine on the graphite electrode covered by Nafion film with included gold particles is suggested. Linear dependence of electrocatalytic response from dopamine concentration is observed in the range from $5 \cdot 10^{-3}$ to $1 \cdot 10^{-8}$ M and from 2.5 μ M to 5 pM in stationary mode and FIA accordingly.

Литература

1. *Gluck M.R., Santana L.A., Granson H., Yahr M.D.* Novel dopamine releasing response of an anti-convulsant agent with possible anti-Parkinson's activity // *J. Neural Trans.* – 2004. – V. 111. – P. 713–724.
2. *Amin D.* Titrimetric determination of catecholamines and related compounds via bromine oxidation and substitution // *Analyst.* – 1986. – V. 111, No 2. – P. 255–257.
3. *Sastry C.S., Das V.G., Rao K.E.* Spectrophotometric methods for the determination of *o*-dihydroxybenzene derivatives // *Analyst.* – 1985. – V. 110, No 4. – P. 395–398.
4. *Wang S., Du L., Wang L., Zhuang H.* Flow injection with inhibited chemiluminescence method for the determination of DA hydrochloride // *Anal. Sci.* – 2004. – V. 20, No 2. – P. 315–317.
5. *Lima J.L.F.C., Montenegro M.C.B.S.M.* Dopamine ion-selective electrode or potentiometry in pharmaceutical preparations // *Mikrochim. Acta.* – 1999. – V. 131, No 3–4. – P. 187–190.
6. *Kumarathasan P., Vincent R.* New approach to the simultaneous analysis of catecholamines and tyrosines in biological fluids // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – V. 987, No 1–2. – P. 349–358.
7. *Ragab G.H., Nohta H., Zaitso K.* Chemiluminescence determination of catecholamines in human blood plasma using 1,2-bis(3-chlorophenyl)ethylenediamine as pre-column derivatizing reagent for liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 403, No 1–2. – P. 155–160.
8. *Gao Z., Chen B., Zi M.* Voltammetric determination of dopamine in the presence of ascorbic acid at over-oxidized polypyrrole–indigo carmine film-coated electrodes // *Analyst.* – 1994. – V. 119, No 3. – P. 459–464.
9. *Zhang Y., Jin G., Wang Y., Yang Z.* Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly(acridine red) modified glassy carbon electrode // *Sensors.* – 2003. – V. 3, No 10. – P. 443–450.
10. *Erdogdy G., Mark H.B., Karagozler A.E.* Voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine at conducting polymer electrodes // *Anal. Lett.* – 1996. – V. 29, No 2. – P. 221–231.

11. *Erdogdy G., Ekinici E., Karagozler A.E.* Preparation and electrochemical behavior of dopamine-selective polymeric membrane // *Polymer Bull.* – 2000. – V. 44, No 2. – P. 195–201.
12. *Шайдарова Л.Г., Гедмина А.В., Челнокова И.А., Будников Г.К.* Электрокаталитическое окисление гидрохинона и пирокатехина на электроде, модифицированном поливинилпиридиновой пленкой с электроосажденным родием, и использования для анализа фармпрепаратов // *Журн. аналит. химии.* – 2004. – Т. 59, № 11. – С. 1138–1145.
13. *Шайдаова Л.Г., Зарипова С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К., Фицев И.М.* Электрокаталитическое определение оксалат-ионов на химически модифицированных электродах // *Журн. приклад. химии.* – 2001. – Т. 74, Вып. 5. – С. 728–733.
14. *O'Neill R.D.* Microvoltammetric techniques and sensors for monitoring neurochemical dynamics in vivo – a review // *Analyst.* – 1994. – V. 119, No 5. – P. 767–779.
15. *Burke L.D., Nugent P.F.* The electrochemistry of gold: II The electrocatalytic behavior of the metal in aqueous media // *Gold Bull.* – 1998. – V. 31, No 2. – P. 3950.
16. *Burke L.D., Nugent P.F.* The electrochemistry of gold: I The redox behaviour of the metal in aqueous media // *Gold Bull.* – 1997. – V. 30, No 2. – P. 43–53.
17. *Burke L.D.* The scope for new application for gold arising from the electrocatalytic behaviour of its metastable surface states // *Gold Bull.* – 2004. – V. 37, No 1–2. – P. 125–135.
18. *Петрий О.А., Цирлина Г.А.* Размерные эффекты в электрохимии // *Успехи химии.* – 2001. – Т. 70, № 4. – С. 330.
19. *Будников Г.К.* Принципы и применение вольтамперной осциллографической полярографии. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1975. – 197 с.

Поступила в редакцию
05.07.07

Шайдарова Лариса Геннадиевна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Larisa.Shaidarova@ksu.ru

Челнокова Ирина Александровна – кандидат химических наук, инженер кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Irina.Chelnokova@ksu.ru

Гедмина Анна Владимировна – кандидат химических наук, младший научный сотрудник кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Anna.Gedmina@ksu.ru

Салманова Диляра Рафисовна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Herman.Budnikov@ksu.ru