



论文

十二烷基磺酸钠增敏电化学法超灵敏地测定尿液中拓扑替康盐酸盐

李红波^{①②}, 李静^②, 杨占军^①, 徐琴^①, 胡效亚^{①*}^① 扬州大学化学化工学院, 扬州 225002^② 盐城工学院化学与生物工程学院, 盐城 224051

*通讯作者, E-mail: xyhu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2010-05-08; 接受日期: 2010-06-24; 网络版发布日期: 2010-09-14
doi: 10.1360/032010-607

摘要 提出了在一次性电极(改进的石墨浸蜡电极)上, 利用十二烷基磺酸钠增敏电化学法亚皮摩尔级测定拓扑替康盐酸盐的方法. 考察了不同种类的表面活性剂对拓扑替康盐酸盐的电化学响应. 结果表明, 十二烷基磺酸钠能够显著地提高其电化学响应. 在优化的实验条件下, 氧化峰电流跟拓扑替康盐酸盐浓度的对数在 2.0×10^{-12} 至 1.0×10^{-11} mol/L 和 8.0×10^{-11} 至 8.0×10^{-10} mol/L 范围内成线性关系, 检出限为 6.4×10^{-13} mol/L. 该方法用于检测尿液中的拓扑替康盐酸盐.

关键词拓扑替康盐酸盐
电分析
十二烷基磺酸钠
一次性电极

1 引言

拓扑替康盐酸盐(结构式见图 1)是喜树碱的半合成衍生物之一, 且能够抑制拓扑异构酶 I. 拓扑异构酶 I 可诱导 DNA 单链可逆性断裂, 使 DNA 螺旋链松解^[1]. 拓扑异构酶 I 常常存在于增生和非增生细胞内. 因此, 对于治疗慢性肿瘤而言, 抑制酶将提供一种独立的治疗方法^[2]. 该药已显示出对很多类型的肿瘤具有很好的抗癌活性, 例如: 结肠直肠癌、非小细胞肺癌和非淋巴细胞血液学恶性肿瘤^[3]. 比起喜树碱, 该药能够减少蛋白结合和毒性反应^[4].

假药或者不合格的药品可能会导致病人病情的恶化甚至死亡. 因此, 有必要对药品质量加以监控. 拓扑替康盐酸盐检测方法的建立对药物动力学和药效学的研究很有帮助. 目前, 测定拓扑替康盐酸盐的方法主要依靠带有不同检测器的高效液相色谱法^[5-7]. 尽管这些方法具有低的检出限和不受基体干扰等特点, 但是它们需要很长的分析时间、复杂的实验方案以及昂贵的实验设备. 拓扑替康盐酸盐具有很好的

电化学活性, 然而, 到目前为止用电化学方法测定其含量还没有报道. 因此, 有必要建立一种方便、快速和灵敏地检测拓扑替康盐酸盐的新方法.

表面活性剂是一种一端接有亲水基另一端接有亲油基的两性分子或离子, 常被应用于电分析化学领域^[8]. 通过表面吸附或者聚集成超分子结构来改变电极溶液表面的电化学特征和进程^[9]. 胡的小组将表面活性剂用于生物样品的分析^[10-12]. 结果表明, 在一

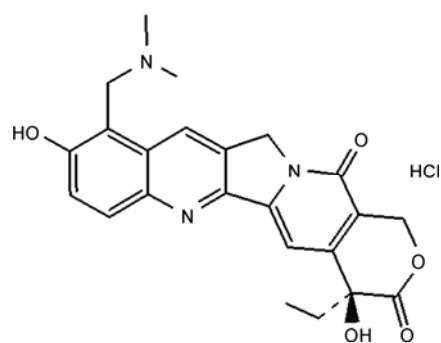


图 1 拓扑替康盐酸盐的化学结构式

些表面活性剂存在条件下, 待测分子的电化学响应得到显著提高. 一次性电极常被修饰一些材料后用于各种物质的测定^[13-15]. 在此, 我们制作了一种经过改进的浸蜡石墨一次性电极. 基于一次性电极和增敏作用的十二烷基磺酸钠, 建立了亚皮摩尔水平测定尿液中拓扑替康盐酸盐的新方法.

2 实验内容

2.1 试剂和溶液

拓扑替康盐酸盐购于中国药品生物制品检定所(北京); 尿液由志愿者提供; 1.0 mmol/L 拓扑替康盐酸盐标准溶液通过其适当量溶于水中制得, 存放在黑暗处, 使用前用水将其稀释成所需浓度; 鳞片石墨和十二烷基磺酸钠购于上海国药试剂有限公司; 将适量的十二烷基磺酸钠溶于水中形成 0.1 mmol/L 的溶液; 不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.1 mol/L)是通过不同体积的 0.1 mol/L 磷酸、磷酸一氢钠和磷酸二氢钠标准溶液混合而得; 所有的试剂均为分析纯, 在使用前没有进一步纯化; 所有的电化学实验在室温下进行; 所用的水均是二次蒸馏水.

2.2 仪器装置

CHI760D 电化学工作站(中国上海辰华仪器公司)用于电化学测试, 惯用的三电极体系包括一次性工作电极、铂丝对电极和饱和甘汞电极; 文中提及的所有电位都是相对于参比电极电位; 如果没有另外说明, 所有的循环伏安测试扫描速率为 100 mV/s; pH 是由 pHS-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)在室温条件下测得; KQ118 超声振荡器(昆山超声仪器有限公司)应用于待分析物的配制.

2.3 一次性电极的制备

一次性电极是由半固化片和铜箔经过程序升温压合而成. 压合前, 半固化片(图 2(A)-b)、铜箔(图 2(A)-c)和耐热塑料膜(图 2(A)-a)被层叠成一版(图 2(A)), 当多版完成后, 它们被送入真空压机内(图 2(B)), 压合程序完成后, 经拆卸、裁切成小片状的复合板, 分别在每片小板两端钻有 1.0 mm 和 5.0 mm 直径的小孔(图 2 C), 7:3 质量比的鳞片石墨和石蜡油通过碾槌在研钵里均匀地研磨后, 适当量的混合物被填充

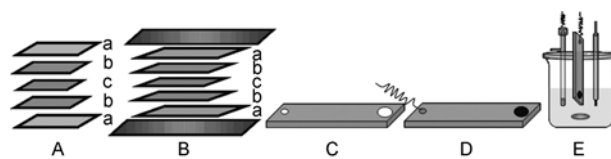


图2 一次性电极的详细制作过程及三电极体系; A 中的 a, b, c 分别是耐热塑料膜、半固化片和铜箔

在直径为 5.0 mm 的孔内并抹平, 另一端连接导线(图 2 D). 图 2E 示出了一次性工作电极被用于测定尿液中的拓扑替康盐酸盐.

2.4 分析方法

一定量的拓扑替康盐酸盐和实际样品溶液被加入到 10 mL 0.1 mol/L PBS(pH 4.0)中, 并在优化的实验条件下预富集待分析样品. 循环伏安法和差示脉冲溶出伏安法用于本实验的研究, 差示脉冲溶出伏安法的测试条件如下: 振幅 0.05 V; 脉冲宽度 0.05 s; 脉冲周期 0.2 s.

3 结果与讨论

3.1 pH 的影响

如图 3 所示, 在未加入十二烷基磺酸钠的条件下, 随着缓冲溶液 pH 的增大, 在 0.862 V 的氧化峰电流显著增大, 并且在 pH 4.0 时达到最大值. 当 pH 大于 4.0 时, 氧化峰电流逐渐减小. 结果表明, 拓扑替康盐酸盐更容易在酸性条件下发生氧化反应. 可以被

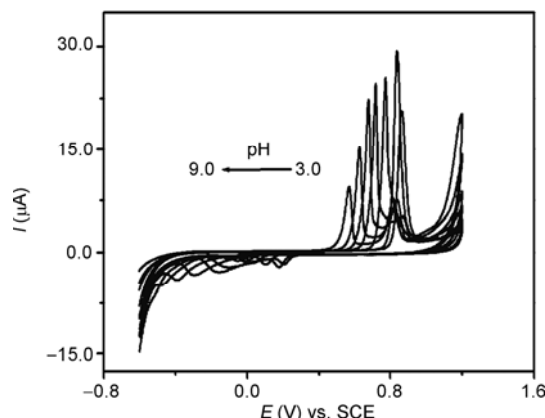


图3 在未加入 SDS 的条件下, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 拓扑替康盐酸盐在不同 pH PBS 体系中于一次性电极上的循环伏安曲线

解释为在酸性介质中, 质子化的拓扑替康盐酸盐能够促进其酚羟基的氧化. 然而, pH 3.0 时的氧化峰电流强度小于其在 pH 4.0 时, 可能是在酸性更强的底液中, 拓扑替康盐酸盐的酚羟基和十二烷基磺酸钠中的氧原子形成氢键从而抑制了酚羟基的氧化. 因此, pH 4.0 被选为下列实验的最佳 pH 值.

3.2 富集电位和富集时间对峰电流的影响

考察富集电位时, 富集时间被预设为 100 s. 如图 4(A)所示, 在未加入十二烷基磺酸钠的条件下, 当富集电位从 -0.1 V 到 1.0 V 时, 峰电流逐步增大, 并在 0.6 V 处达到最大值, 然后减小. 因此, 更正的电位更适合于拓扑替康盐酸盐的富集. 在电位为 0.6 V 时优化富集时间, 随着富集时间的延长, 峰高显著增强, 并在 300 s 时达到最大值(见图 4(B)). 结果表明, 此时拓扑替康盐酸盐在电极表面接近饱和状态. 因此, 0.6 V 和 300 s 被分别选为最佳富集电位和富集时间.

3.3 不同表面活性剂的影响

在一次性电极上, 利用循环伏安法研究了不同种类表面活性剂(阴离子型的十二烷基磺酸钠(SDS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS); 中性的曲拉通-100 (Triton X-100); 阳离子型的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB))对拓扑替康盐酸盐电化学响应的影响. 如图 5 所示, 上述四种表面活性剂都能促进拓扑替康盐酸盐峰电流的增大, 其中, SDS 对氧化峰电流增敏最明显. 在 SDS 的条件下, 氧化峰电流增大 5.9 倍. 可能的增敏机理是 SDS 通过其亲油基和电极表面的石蜡油作用被吸附到电极表面, 从而电极表面形成伸向缓冲液里的带有极性基团的负电荷亲水膜. 同时, 拓扑替康盐酸盐含有二甲氨基取代基, 其能够在

酸性的底液中被质子化从而带上正电荷. 带负电荷的 SDS 能够通过静电作用吸附带正电的拓扑替康盐酸盐到电极表面, 从而加速电子的转移. 因为质子化的拓扑替康盐酸盐带正电荷不容易和带正电荷的 CTAB 和中性的 Triton X-100 作用, 导致在电极上发生的是弱吸附. 当加入阴离子表面活性剂时, 拓扑替康盐酸盐呈现了明显增强的氧化峰电流是因为带负电荷的表面活性剂跟带正电的拓扑替康盐酸盐作用, 使得更多的被测物到达电极表面. 另外, 由于不同阴离子表面活性剂结构的不同, 疏水作用和离子交换作用也不一样, 于是产生的增敏效果也不同. 因此, SDS 被用于接下来的实验中. 图 5 插图示出了 SDS 浓度和氧化峰电流的关系, 氧化峰电流随着 SDS 浓度的增大而增大, 直到 SDS 浓度达到 10 nmol/L 时, 峰电流达到最大值. 此现象可以解释为随着 SDS 浓度的增大, SDS 的吸附从单分子层过渡到多分子层, 导致更多的被测物吸附到电极表面. 由于 SDS 在电极表面上的吸附和富集协同效应, 10 nmol/L 的 SDS 可能达到胶束浓度值^[16]. 然而, 随着 SDS 浓度的进一步增大, 峰电流反而减小. 可能是胶团效应导致. 也就是说, 由于胶团的聚集以至形成超分子结构被吸附到电极表面, 导致介于拓扑替康盐酸盐与电极表面的电子传递将被抑制. 因此, 10 倍量的 SDS 被选为最佳比例用于拓扑替康盐酸盐电化学响应的增敏.

3.4 校正曲线

在优化的实验条件下, 差示脉冲溶出伏安法用于研究拓扑替康盐酸盐氧化峰电流随浓度的关系. 从图 6 可以看出, 氧化峰电流随拓扑替康盐酸盐的浓度在 2.0×10^{-12} 至 1.0×10^{-11} mol/L 和 8.0×10^{-11} 至 8.0×10^{-10} mol/L 范围内的对数成线性关系. 线性方程

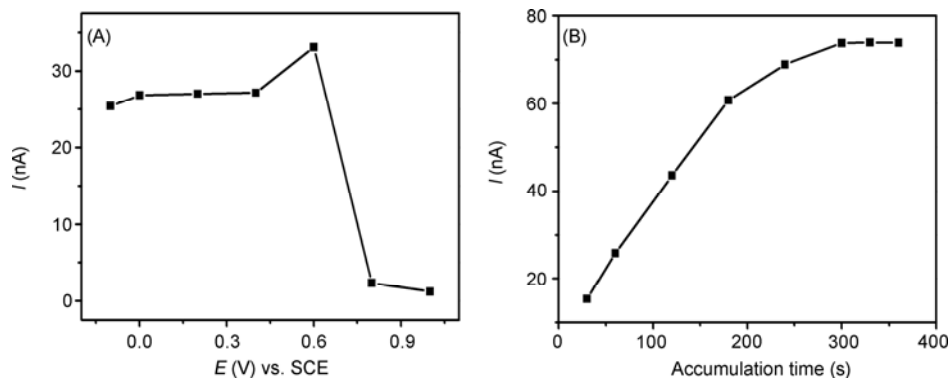


图 4 在未加入 SDS 的 pH 4.0 PBS 条件下于一次性电极上富集电位和时间对 1.0 μ mol/L 拓扑替康盐酸盐峰电流的影响

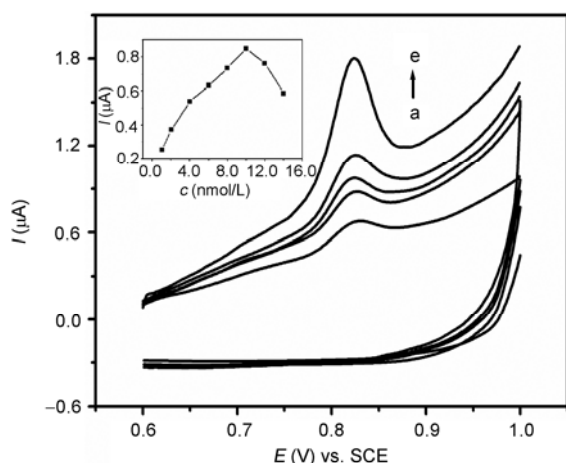


图5 在富集电位和时间为 0.6 V 和 300 s 条件下, 不同种类的表面活性剂对 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 拓扑替康盐酸盐峰电流的影响. (a) 无表面活性剂; (b) CTAB; (c) Triton X-100; (d) SDBS; (e) SDS. 插图: 不同浓度的 SDS 对 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 拓扑替康盐酸盐峰电流的影响

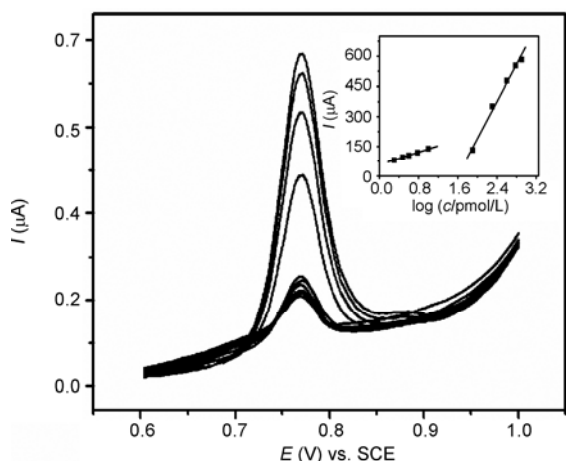


图6 在加入 SDS 的条件下, 不同浓度拓扑替康盐酸盐的差示脉冲溶出伏安曲线. 拓扑替康盐酸盐的浓度(从底到顶, pmol/L)分别为 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 10.0, 80.0, 200.0, 400.0, 600.0 和 800.0. 插图: 拓扑替康盐酸盐浓度随峰电流的关系

分别为 $I_{\text{Pa}} (\text{nA}) = 55.3259 + 82.7298 \lg (C(\text{pmol/L}))$, $r = 0.9993$ 和 $I_{\text{Pa}} (\text{nA}) = -728.9890 + 460.2668 \lg$

表1 尿液中拓扑替康盐酸盐的测试结果($n = 3$)^{a)}

分析物	检出值 (pmol/L)	添加值 (pmol/L)	实测值 (pmol/L)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
尿液	4.2	0	4.141	3.6	98.6
	4.2	1.0	5.213	3.4	101.3
	4.2	2.0	6.182	3.1	99.1
	4.2	3.0	7.385	3.9	106.2

a) n 指重复测量次数.

($C(\text{pmol/L})$), $r = 0.9962$. 检出限为 $6.4 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$, 比之前报道的方法低三至四个数量级^[5-7].

3.5 稳定性和重现性

在优化的实验条件下研究了一次性电极的稳定性和重现性, 研究表明, 同一批电极测得的氧化峰电流值变化不超过 5%. 重现性是通过连续测定含有 6.0 pmol/L 的拓扑替康盐酸盐标准溶液 9 次来评估的, 结果是氧化峰电流的相对标准偏差为 3.5%, 因此, 该方法具有很好的重现性.

3.6 干扰实验

对可能存在的干扰物质进行了检测. 结果表明, 在优化的实验条件下, 200 倍的 Fe^{3+} , Al^{3+} , Na^+ , Zn^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ 和 Mg^{2+} 对拓扑替康盐酸盐的定量测定不构成干扰. 可能由于选用的是阳极电位窗口, 大多数上述离子不能形成氧化峰. 200 倍的 SO_4^{2-} , 100 倍的尿素和 50 倍的尿酸被分别加入含有拓扑替康盐酸盐的标准溶液中, 所观察到的氧化峰电流变化不超过 5%.

3.7 实际样品分析

测定实际样品时, 差示脉冲溶出伏安法被用于定量分析尿液中的拓扑替康盐酸盐, 分析结果见表 1. 结果表明, 提出的新方法可以用于实际样品的检测.

4 结论

本文在 SDS 的条件下, 建立了利用一次性电极亚皮摩尔水平地测定拓扑替康盐酸盐的新方法. 比起丝网印刷电极, 一次性电极具有更稳定、简单、方便和经济等特点. 研究表明, 阴离子表面活性剂 SDS 能够显著地促进拓扑替康盐酸盐电化学响应; 带有不同电荷和结构的表面活性剂影响拓扑替康盐酸盐伏安灵敏度的提高. 该方法具有简单、超灵敏、快速和准确等特点, 并被用于测定尿液中的拓扑替康盐酸盐.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20675071, 20705030 & 20875081)和盐城工学院自然科学基金(XKY2009009)资助, 特此致谢.

参考文献

- 1 Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME, Lacave AJ. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: A randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J Clin Oncol*, 2001, 19: 3312–3322
- 2 Underberg WJM, Goossen RMJ, Smith BR, Beijnen JH. Equilibrium kinetics of the new experimental anti-tumour compound SK&F 104864-A in aqueous solution. *J Pharm Biomed Anal*, 1990, 8: 681–683
- 3 Arun B, Frenkel EP. Topoisomerase I inhibition with topotecan: Pharmacologic and clinical issues. *Expert Opin Pharmacother*, 2001, 2: 491–505
- 4 Beijnen JH, Smith BR, Keijer WJ, Van Gijn R, Ten Bokkel Huinink WW, Vlasveld LT, Rodenhuis S, Underberg WJM. High-performance liquid chromatographic analysis of the new antitumour drug SK&F 104864-A (NSC 609699) in plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 1990, 8: 789–794
- 5 Chen J, Balthasar JP. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of total and free topotecan in the presence and absence of anti-topotecan antibodies in mouse plasma. *J Chromatogr B*, 2005, 816: 183–192
- 6 Rosing H, Doyle E, Davies BE, Beijnen JH. High-performance liquid chromatographic determination of the novel antitumour drug topotecan and topotecan as the total of the lactone plus carboxylate forms in human plasma. *J Chromatogr B*, 1995, 668: 107–115
- 7 Loos WJ, Van Zomeren DM, Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Determination of topotecan in human whole blood and unwashed erythrocytes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 2002, 766: 99–105
- 8 Rusling JF. Controlling electrochemical catalysis with surfactant microstructures. *Acc Chem Res*, 1991, 24: 75–81
- 9 Plavsic M, Krznaric D, Cosovic B. The electrochemical processes of copper in the presence of Triton X-100. *Electroanalysis*, 1994, 6: 469–474
- 10 Yi HC, Wu KB, Hu SS, Cui DF. Adsorption stripping voltammetry of phenol at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of surfactants. *Talanta*, 2001, 55: 1205–1210
- 11 Zhang SH, Wu KB, Hu SS. Voltammetric determination of diethylstilbestrol at carbon paste electrode using cetylpyridine bromide as medium. *Talanta*, 2002, 58: 747–754
- 12 Hu SS, Wu KB, Yi HC, Cui DF. Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Anal Chim Acta*, 2002, 464: 209–216
- 13 Zhang QT, Jagannathan L, Subramanian V. Label-free low-cost disposable DNA hybridization detection systems using organic TFTs. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 972–977
- 14 Kokkinos C, Economou A, Koupparis M. Determination of trace cobalt(II) by adsorptive stripping voltammetry on disposable microfabricated electrochemical cells with integrated planar metal-film electrodes. *Talanta*, 2009, 77: 1137–1142
- 15 Lee SR, Lee YT, Sawada K, Takao H, Ishida M. Development of a disposable glucose biosensor using electroless-plated Au/Ni/copper low electrical resistance electrodes. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 410–414
- 16 Xie PP, Chen XX, Wang F, Hu CG, Hu SS. Electrochemical behaviors of adrenaline at acetylene black electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Colloids Surf B*, 2006, 48: 17–23

Sodium dodecyl sulfate sensitized electrochemical method for ultrasensitive determination of topotecan hydrochloride in urine

LI HongBo^{1,2}, LI Jing², YANG ZhanJun¹, XU Qin¹ & HU XiaoYa¹

1 College of Chemistry and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225002, China

2 Chemistry and Biology Engineering School, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China

Abstract: A sub-picomole level topotecan hydrochloride determination method was proposed using sodium dodecyl sulfate (SDS) as sensitized reagent at a novel disposable electrode (an improved wax-impregnated graphite electrode). The effects of different kinds of surfactants were examined on the electrochemical response to topotecan hydrochloride. The results indicated the electrochemical signal was apparently improved by SDS. At optimal conditions, the oxidative peaks current increased linearly with the logarithm of concentrations for topotecan hydrochloride in the ranges of 2.0×10^{-12} to 1.0×10^{-11} mol/L and 8.0×10^{-11} to 8.0×10^{-10} mol/L with a detection limit of 6.4×10^{-13} mol/L. The proposed method could be applied in determining topotecan hydrochloride in urine.

Keywords: topotecan hydrochloride, electroanalysis, sodium dodecyl sulfate (SDS), disposable electrode