

# 基于石墨烯量子点构建生物传感器 检测尿酸和多巴胺的实验研究\*

蒋晶慧<sup>1</sup>, 于洪伟<sup>2</sup>, 张 泽<sup>2</sup>, 常 东<sup>1</sup> (1. 哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 哈尔滨 150001;  
2. 复旦大学附属浦东医院检验科, 上海 200120)

**摘要:**目的 制备石墨烯量子点(GQDs)以构建生物传感器检测尿酸和多巴胺。方法 一步法碳化枸橼酸合成含羧基的石墨烯量子点用以构建电化学生物传感器,以差分脉冲法检测尿酸和多巴胺,并评估其检测性能。采集2016年7月29日三名实验人员晨尿,用构建的传感器以完成生物样本检测。结果 透射电镜观察到制备的GQDs大小在3~5 nm之间。构建的生物传感器检测50~600  $\mu\text{mol/L}$  尿酸( $r^2=0.9966$ )和2~240  $\mu\text{mol/L}$  多巴胺( $r^2=0.9925$ )的浓度线性相关性良好。检测尿液样本中尿酸的浓度( $n=3$ ),RSD值小于3%。尿酸和多巴胺的加标回收率范围分别在95.7%~101.4%和96%~102%。结论 成功构建了基于石墨烯量子点的生物传感器检测尿酸和多巴胺。

**关键词:**石墨烯量子点;生物传感器;尿酸;多巴胺

中图分类号:R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)04-009-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.003

## Simultaneous Electrochemical Detection of Uric Acid and Dopamine Based on Graphene Quantum Dot Modified Glassy Carbon Electrode

JIANG Jing-hui<sup>1</sup>, YU Hong-wei<sup>2</sup>, ZHANG Ze<sup>2</sup>, CHANG Dong<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of the Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Pudong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200120, China)

**Abstract:** Objective To prepare graphene quantum dots (GQDs) and construct a novel biosensor for determination of dopamine (DA) and uric acid (UA). **Methods** The GQDs was prepared by carbonization method from citric acid as carbon sources. Differential pulse voltammetry was used by the modified electrodes to detect uric acid and dopamine, and the detection performance was evaluate. Collected three experimenters morning urine on July 29, 2016. The proposed sensor was used for biological samples detection. **Results** The size of GQDs were between 3 to 5 nm, which was observed by transmission electron microscopy (TEM). The proposed sensor had good linear correlation of 50~600  $\mu\text{mol/L}$  UA ( $r^2=0.9966$ ) and 2~240  $\mu\text{mol/L}$  DA ( $r^2=0.9925$ ). In uric acid in urine samples' detection ( $n=3$ ), RSD value was less than 3%. The standard addition recovery rates of UA and DA were in 95.7%~101.4% and 96%~102% respectively. **Conclusion** The biosensor based on GQDs for determination DA and UA had been constructed successfully.

**Keywords:** grapheme quantum dots; biosensors; uric acid; dopamine

近年来饮食习惯的改变使高尿酸血症的发生率持续上升,可并发多种代谢疾病,尿酸的水平监测十分关键<sup>[1]</sup>。电化学方法检测尿酸(uric acid, UA)因其前处理简单,操作方便,环保经济而倍受关注<sup>[2,3]</sup>。然而生物样本中尿酸和多巴胺(dopamine, DA)共同存在,用普通电极检测时两者氧化电位相近,互相干扰,限制了电化学检测在临床中的应用<sup>[4]</sup>。石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs)生产简单环保,比表面积大且具备导

电性,可通过不同方法合成单独或混合其他材料应用于生物传感器来改善电极的性能<sup>[5,6]</sup>。用GQDs单独修饰玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)构建传感器来混合检测尿酸和多巴胺的研究并未报道。本实验用碳化法一步合成的GQDs构建的生物传感实现对UA和DA的同时快速检测。

### 1 材料与方法

1.1 实验样本 UA, DA的标准品购自Sigma-Aldrich公司。2016年7月29日采集三名实验人

\* 基金项目:国家自然科学基金(81573200)(81373047),上海市浦东新区领先人才培养计划(PWRI2016-04)。

作者简介:蒋晶慧(1990—),女,硕士在读,临床检验诊断学,研究方向:分子生物学,生物传感器, E-mail:410882656@qq.com。

通讯作者:常 东(1969—),女,博士研究生,主任医师,研究方向:分子生物学,生物传感器,哈尔滨医科大学教授,复旦大学附属浦东医院检验科主任, E-mail:dongchang1969@163.com。

员晨尿进行检测。

1.2 试剂和仪器 枸橼酸,铁氰化钾,亚铁氰化钾,氢氧化钾,氢氧化钠,盐酸,磷酸二氢钾,磷酸氢二钾(国药集团化学试剂有限公司)。试验中所有用水均为超纯水,试剂均为分析纯。JEM-2100型透射电子显微镜(日本电子株式会社);CHI660A电化学工作站(上海华辰仪器有限公司);三电极体系:工作电极为GQDs/GCE,Pt电极为辅助电极,饱和Ag/AgCl电极为参比电极(天津英科联合科技有限公司);PHSJ-3F pH计(上海精密仪器有限公司);KQ-100DA型数控超声波清洗器(昆山市仪器公司);集热式恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 GQDs的合成:取2.0 g 枸橼酸,在集热式恒温磁力搅拌器中200℃油浴加热,直到枸橼酸的颜色变为橘黄色。在得到橘黄色液体中逐滴加入10 mg/ml的NaOH溶液共100 ml,同时剧烈搅拌。接着离心取沉淀物0.1 g用100 ml的超纯水溶解,超声混匀后储存在棕色瓶中4℃避光保存待用。

1.3.2 GQDs/GCE修饰电极的制备:将玻碳电极用Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抛光液打磨抛光至镜面,并依次用超纯水,乙醇,丙酮超声清洗各3 min。清洗后的电极在室温下氮气吹干。GQDs溶液在使用前超声混匀30 min,取10 μl滴加在干燥后的裸玻碳电极上,4℃冰箱内过夜干燥。

1.3.3 表征和检测方法:用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)对合成的GQDs形态进行表征。用电化学交流阻抗法(EIS)分别对裸GCE和GQDs/GCE进行电化学表征。用差分脉冲伏安法(DPV)进行条件优化并对UA和DA进行检测。

1.4 统计学分析 实验数据采用SPSS16.0统计软件处理,所有统计结果均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;对标准曲线数据采用相关与回归分析;超过 $\bar{x} \pm 2s$ 范围的数值作为正态分布计量资料的离群值标准。

## 2 结果

2.1 GQDs/GCE的表征 TEM扫描结果显示合成的GQDs直径在3~5 nm之间,分散良好。EIS曲线显示,通过修饰GQDs,代表电极表面电子传递电阻的高频区阻抗值的大小增加,证实GQDs有效的修饰在玻碳电极表面。

2.2 电化学检测 UA和DA的pH值优化 在不同pH值时检测UA和DA的峰电位和峰电值的

变化。在pH值为7时,UA和DA的峰电位距离最远,电位差为0.172V。同时DA和UA均可得到较大的响应电流,另外pH值为7时更接近生物标本的正常酸碱度,也有利于后续对生物样本的检测,所以选择pH=7进行后续实验。

2.3 UA和DA的检测 根据浓度与峰电流大小的关系绘制了标准曲线。 $\mu A$ 的浓度线性回归方程为 $I_{UA}(\mu A) = 4.558 C_{UA}(\mu mol/L) + 2.408$ ,  $r_2 = 0.9966$ ,检测范围在50~600  $\mu mol/L$ ,检测限为1.67  $\mu mol/L$ ;DA的浓度线性回归方程为 $I_{DA}(\mu A) = 1.238 C_{DA}(\mu mol/L) + 0.1924$ ,  $r_2 = 0.9925$ ,检测范围在2~240  $\mu mol/L$ ,检测限为0.27  $\mu mol/L$ 。UA和DA的浓度与峰电流大小均呈良好的线性关系。当固定DA和UA中一种物质的浓度来检测另一种时,随DA或UA浓度的增加,对另一种物质的峰值影响不大。当UA和DA浓度同时变化时,两组峰电流逐渐增大且峰电位相互分离。所以GQDs/GCE可以将UA和DA的DPV曲线电位差增加从而进行同时检测。

2.4 传感器的性能评估 选择几种生物样本中常见的共存物质:Fe<sup>3+</sup>,Ca<sup>2+</sup>,Zn<sup>2+</sup>,K<sup>+</sup>,Na<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup>,Br<sup>-</sup>,SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,葡萄糖作为干扰物质,使其在PBS底液中浓度达到10倍UA或DA的浓度,分别检测UA和DA,峰电流改变均<5%,特异性良好。使用同一修饰电极分别对等浓度UA和DA溶液连续进行5次平行测定,峰电流的CV值为3.07%和3.67%,无离群值。分别用5个不同的修饰电极对以上溶液进行检测,峰电流的CV值为5.98%和6.38%,无离群值。将修饰好的电极在4℃的冰箱内分别储存7天和15天,DPV曲线峰电流为最初峰电流的97.23%和96.45%。

2.5 生物样本的检测 用DPV法直接检测其UA和DA浓度( $n=3$ ),检测UA的RSD值小于3%,DA未检出。用标准加入法检测了尿液样本中UA和DA的加标回收率,结果记录见表1。

3 讨论 合成的GQDs是一种三维的纳米结构,用于生物传感器检测生物分子可构成传感单元和生物分子充分接触。将GQDs用于检测UA和DA,这是由于其含有带负电荷的羧基和结构,更有利DA的富集,使DA峰电位负向移动,另外UA的等电点在5.75而DA的等电点在8.87,在pH=7的PBS溶液中,UA带负电而DA带正电。修饰电极表面的GQDs在溶液中带有负电荷,与UA表面的负电荷相排斥,使UA的峰电位向右移动。所以GQDs通过增加UA和DA的电位差,提高了电化学传感器的选择性。

表1 人体尿样中 UA 和 DA 浓度的检测及加标回收率的测定 ( $n=3, \times 10^{-6}$  mol/L)

样 本		浓度测定值	加入量	加标测定值	加标回收率(%)
尿样 1	UA	117.15±1.78	20	137.43±1.57	101.4
	DA	未检出	10	9.6±0.75	96
尿样 2	UA	442.25±5.19	20	461.67±5.34	97.1
	DA	未检出	25	25.42±0.30	102
尿样 3	UA	571.04±5.16	20	590.18±5.03	95.7
	DA	未检出	50	49.74±0.68	99.48

尿样中未检出 DA,这是由于 DA 经人体代谢转化为终产物高香草酸。其中 UA 的回收率在 95.7%~101.4%,DA 的加标回收率在 96%~102%的范围内,说明 GQDs/GCE 构建的电化学生物传感器可以完成生物样本中 UA 和 DA 的测定,证实了该传感器在生物样本中检测 UA 和 DA 的准确性。

本实验用简单经济的方法合成了 GQDs,并将其运用于电化学生物传感器,从而提高生物传感器的选择性,实现对 UA 和 DA 的同时检测。构建了良好的浓度线性关系,有较好的特异性和重现性。为今后临床 UA 和 DA 的同时检测提供了一个简单、快速和经济的检测方法。但该传感器还不够便携,还应研究用丝网印刷电极代替玻碳电极,实现批量生产才能适应临床床旁检测的需求。

#### 参考文献:

- [1] 安映红,翁余海,陈友谊,等.浙江舟山群岛居民高尿酸血症人群分布及发病率分析[J].现代检验医学杂志,2016,31(3):102-104,107.  
An YH,Weng YH,Chen YY,et al. Population distribution and incidence analyses of hyperuricemia in zhoushan island[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(3):

102-104,107.

- [2] Yu HW,Jiang JH,Zhang Z,et al. Pre-paration of quantum dots CdTe decorated graphene composite for sensitive detection of uric acid and dopamine[J]. Anal Biochem,2017(519):92-99.
- [3] Jiang Y, Wang B, Meng F,et al. Microwave-assisted pre-paration of N-doped carbon dots as a biosensor for electrochemical dopamine detection[J]. J Colloid Interface Sci,2015(452):199-202.
- [4] Chauhan N,Kumar A,Pundir C. Construction of an uricase nanoparticles modified au electrode for amperometric determination of uric acid[J]. Appl Biochem Biotechnol,2014,174(4):1683-1694.
- [5] Zhou X,Wang A,Yu C,et al. Facile synthesis of molecularly imprinted graphene quantum dots for the determination of dopamine with affinity-adjustable[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(22): 11741-11747.
- [6] Zhang L,Peng D,Liang R,et al. Graphene quantum dots assembled with metalloporphyrins for "turn on" sensing of hydrogen peroxide and glucose[J]. Chemistry,2015,21(26):9343-9348.

收稿日期:2017-04-27

修回日期:2017-06-26

(上接 8 页)

- [13] Volpon LC, Sugo EK, Carlotti AP. Diagnostic and prognostic value of serum cystatin C in critically ill children with acute kidney injury[J]. Pediatr Crit Care Med,2015,16(5):125-131.
- [14] Asilioglu N, Acikgoz Y, Pakso MS, et al. Is serum cystatin C a better marker than serum creatinine for monitoring renal function in pediatric intensive care unit? [J]. J Trop Pediatr,2012,58(6):429-434.
- [15] Murty MS, Sharma UK, Pandey VB, et al. Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury[J]. Indian J Nephrol, 2013,23(3):180-183.
- [16] Ferguson JF, Hinkle CC, Mehta, et al. Translational studies of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in inflammation and atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol,2012,59(8):764-772.
- [17] 姚创利,赵 佳,鲁旭娟,等.冠心病患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与锰超氧化物歧化酶 9 Ala/

Val 基因多态性关系探讨[J].现代检验医学杂志,2017,32(1):26-29.

- Yao CL,Zhao J,Lu XJ,et al. Study on the relationship between lipoprotein associated phospholipase A2 level and manganese superoxide dismutase 9 Ala/val genetic polymorphism in patients with coronary heart disease[J]. J Mod Lab Med,2017,32(1): 26-29.
- [18] 阿尔孜古丽·吐尔逊,努尔比亚·阿布都热西提,田刚.脂蛋白相关性磷脂酶 A2 与冠心病的关系研究[J].现代检验医学杂志,2014,29(4):65-66,70.
- [19] Szabo MZ,Szodoray P,Kiss E. Dyslipidemia in systemic lupus erythematosus[J]. Immunol Res,2017, 65(2):543-550.
- [20] Tellis CC,Tselepis AD. Pathophysiological role and clinical significance of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) bound to LDL and HDL [J]. Curr Pharm Des,2014,20(40):6256-6269.

收稿日期:2017-05-22

修回日期:2017-07-04