

鼠脑中维生素 C 活体电化学分析研究进展

纪文亮¹ 张美宁^{*1} 毛兰群^{*2,3}

¹(中国人民大学化学系, 北京 100872)

²(北京分子科学国家研究中心, 中国科学院化学研究所活体分析化学重点实验室, 北京 100190)

³(中国科学院大学, 北京 100048)

摘 要 维生素 C, 又名抗坏血酸(Ascorbic acid, AA), 是脑内重要的小分子化学物质, 作为抗氧化剂和神经调质, 在脑神经生理与病理过程中发挥着重要作用, 因此, 中枢神经系统中 AA 的测定越来越受到关注。传统的检测 AA 的方法需要复杂的样品处理, 时间分辨率不高, 而 AA 在空气中易于氧化, 在电极上的氧化具有大的过电位。因此, 选择性高时空分辨率检测 AA 具有很大挑战。本文首先介绍了 AA 的电化学性质, 对通过设计电极表面的性质, 实现鼠脑和单细胞中 AA 的选择性、高时空分辨率、实时分析的研究进展进行了评述。

关键词 维生素 C; 活体; 电化学分析; 选择性; 评述

1 引言

维生素 C, 又名抗坏血酸(Ascorbic acid, AA), 是重要的水溶性维生素, 具有防治坏血病的作用^[1]。豚鼠、蝙蝠、灵长类动物和人肝脏中由于缺少 L-古洛糖酸内酯氧化酶, 所以无法自身合成, 必须依赖食物摄取补充体内所需的 AA^[2]。AA 在体内参与多种生理生化反应, 研究发现, AA 可靶向抑制甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 选择性地杀死 KRAS 和 BRAF 突变的结肠癌细胞^[3], 可调控 TET 蛋白影响造血干细胞功能, 抑制白血病的发生^[4]。最近发现, 在莱茵衣藻鉴定到一种新型的 TET 同源蛋白, 该蛋白可将 AA 的碳基骨架转移到 DNA 上产生一种全新的 DNA 修饰^[5]。

此外, 虽然 AA 在全身组织中的分布具有很大的差异性, 但是在大多数动物中, 脑是 AA 含量最高的组织器官之一, 且在脑内具有重要的神经生理功能。大量研究表明, AA 在脑内主要充当抗氧化剂和神经调质的角色^[6,7]。首先, 在生物体内, AA 作为一种强的还原剂, 参与诸多的生理过程, 通过其氧化反应消除自由基, 减少氧化应激的损伤, 如研究发现 AA 可缓解癫痫、脑缺血、脑水肿等中枢神经系统疾病的症状^[8-10]。其次, AA 被认为是脑内重要的神经调质之一, 研究表明, AA 在脑内的分布与儿茶酚类和谷氨酸等神经递质分布密切相关, 并作为重要辅酶因子, 对去甲肾上腺素和多种神经肽合成具有影响^[1,11,12]。Wang 等^[13]发现, 嗜铬细胞内 AA 通过囊泡释放, 也说明其可能作为调质参与到神经传递过程。

脑内 AA 的分布具有一定区域性差异, 胞内转运及细胞释放机制复杂。AA 是极性小分子化学物质, 且不能自由进出细胞膜, 所以不能通过单纯扩散的方式穿越细胞膜。大鼠脑内 AA 的来源及浓度分布同人类基本一样, AA 通过大脑的脉络丛从血液进入中枢神经系统, 然后扩散到细胞间液, 细胞间液中 AA 的浓度约为 200 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$, 并且浓度可保持相对稳定^[14]。细胞间液的 AA 进一步被转运到细胞内, 神经元内 AA 浓度约为 10 mmol/L , 神经胶质细胞内 AA 浓度约为 1 mmol/L ^[15]。目前的研究表明, AA 从细胞间液到细胞内的转运机制有两种: 葡萄糖转运体控制的协同扩散脱氢抗坏血酸(AA 的氧化产物)的形式进行转运; Na^+ 依赖的 AA 转运体控制的主动转运^[16,17]。与神经递质不同, AA 从细胞内释放的机制更加复杂, 并不是单一的释放过程。目前已报道的主要有 3 种: 一种认为 AA 是通过体积敏感阴离子通道实现释放^[18]; 另一种认为 AA 可通过与谷氨酸异相交换机制来实现从细胞内释放至细胞外^[1,19,20]; 也有文献报道 AA 可与儿茶酚胺同时分泌到细胞外, 而且 AA 的分泌与儿茶酚胺的分泌具有依赖细胞外 Ca^{2+} 的一致性^[21]。总体而言, AA 释放机制涉及诸多生理病理过程, 例如胞吐、缺氧去极化、

2019-07-30 收稿; 2019-08-20 接受

本文系国家自然科学基金项目(No. 21874152)资助

* E-mail: mnzhang@ruc.edu.cn; lqmao@iccas.ac.cn

谷氨酸兴奋毒性、水肿等。因此,可准确、实时、选择性检测不同脑区,不同层次 AA 的方法对于研究脑 AA 相关的神经生理及病理过程具有重要意义^[22]。

目前,有多种方法可实现不同时间空间分辨率条件下脑内化学物质的分析,如磁共振成像、功能磁共振脑成像、磁共振波谱、正电子发射断层扫描和单光子发射断层扫描、荧光成像等^[23,24]。电分析化学方法具有仪器设备简单、灵敏度高、可实现原位实时分析和多组分同时测定等优点,在脑神经科学研究中具有独特的优势,在活体研究中受到了越来越多的关注和应用^[25~28]。目前,脑神经电化学分析方法主要可分为微电极活体伏安法、微透析活体取样-样品分离-电化学检测及微透析活体取样-在线电化学检测 3 种方法。其中活体伏安法和微透析活体取样-在线电化学检测,由于时间分辨率高,无需分离,在活体分析中的需求最大。但是,脑内物质繁多,不仅有小分子的物质,更有大分子的蛋白,如何实现 AA 的高选择性、稳定的电化学分析具有很大的挑战。本文简单介绍了 AA 的基础电化学性质,详细地对如何在活的整体动物层次和细胞层次上,实现不同时空分辨率的 AA 的选择性分析的研究进展进行了评述。

2 抗坏血酸的电化学

如图 1 所示,AA 是有两个可电离质子的水溶性六元糖酸,pKa 分别为 4.2 和 11.8。在生理条件下,AA 是带负电荷的离子;在中性条件下,AA 的电化学氧化为一质子、两电子过程,其电化学氧化产物进一步水解,生成二酮古洛糖酸^[29,30]。虽然,AA 在电极表面氧化电位是 0.05 V (*vs* NHE),但由于 AA 氧化后的最终水解产物易吸附在电极表面,AA 在一般电极上的氧化都具有大的过电位,导致其氧化电位和脑内共存的其它电化学活性神经化学物质(如多巴胺(Dopamine, DA)、二羟基苯乙酸(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、肾上腺素(Epinephrine, E)、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)、5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)等)的氧化电位无法分开,使得 AA 的选择性分析具有很大的挑战。

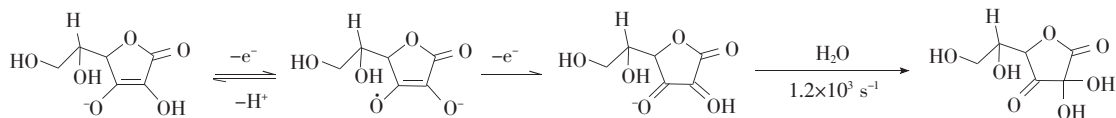


图 1 中性条件下抗坏血酸(AA)的电化学氧化过程^[30]

Fig. 1 Electrochemical oxidation process of ascorbic acid (AA) under neutral conditions^[30]

在大多数碳电极表面,AA 是一种内壳层活性物质,在电极上的电化学行为与电极的表面化学性质密切相关。碳电极,如玻碳电极、高定向热解石墨电极(Highly oriented pyrolytic graphite, HOPG)和金刚石电极,其结构与电化学活性之间的关系一般由以下一个或几个因素决定:电极表面微结构、表面洁净程度、电子结构以及表面官能团等。研究发现,预处理的碳电极可加快 AA 的电子转移速度^[31,32]。Guo 等^[33]通过调控石墨炔的电子态和化学界面,发现 AA 在化学还原和电化学还原的石墨炔上的电子转移速率比石墨炔和氧化的石墨炔电极上的快。最近,Xiao 等^[34]系统研究了不同碳纤维对 AA 电化学氧化的影响(图 2)。他们选取 3 种来源的碳纤维电极(Carbon fiber microelectrode, CFE, Type-1, Type-2 和 Type-3 CFEs),将 CFE 分别在酸溶液(0.5 mol/L H₂SO₄)和碱溶液(1.0 mol/L NaOH)中进行电化学处理。在硫酸和碱溶液中电化学处理的 Type-1 和 Type-3 CFE 可显著增加 AA 的电子转移速率(图 2A 和 2C),但经处理的 Type-2 CFE 对 AA 的氧化却无显著改变(图 2B)。研究表明,由于电极表面的含氧官能团、表面结构(如缺陷)及电子态密度与 CFE 来源和电化学预处理密切相关,因此,电极对于 AA 的电化学氧化的催化活性与所采用的处理条件和碳纤维的来源有着密切的联系,且表现出较大差异。

用化学物质修饰电极表面,调控 AA 在电极表面的电化学过程是实现高选择性检测 AA 的有效策略。通常,在裸金电极表面,由于 AA 氧化产物在电极表面的吸附 AA 的氧化峰电位约为 0.5 V。Raj 等^[35]将有机硫化合物,如 2,2-二硫代双乙胺和 6,6-二硫代双己胺,通过 Au—S 键在金电极表面形成单分子自组装膜(Self-assembled monolayer, SAM),由于 SAM 末端的正电荷和带负电 AA 之间的静电相互作用,AA 的氧化峰电位负移了约 0.45 V,而在 SAM 组装电极上,DA 的氧化电位约为 0.2 V,实现了用微分脉冲伏安法(Differential pulse voltammetry, DPV)选择性分析 AA。

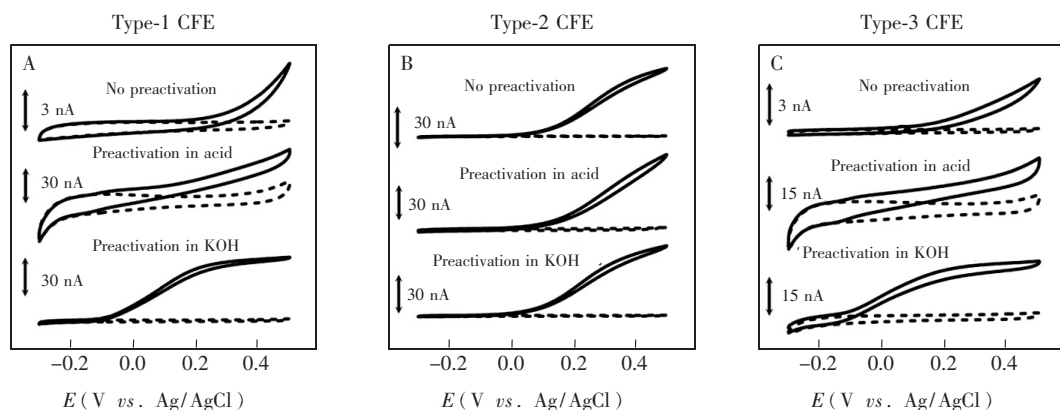


图2 不同来源的CFEs(A)、(B)和(C)在不同处理条件下(0.5 mol/L H_2SO_4 或 1.0 mol/L NaOH)进行电化学处理对AA的电化学响应^[34]

Fig. 2 Typical cyclic voltammetry curves (CVs) obtained at carbon fiber microelectrode (CFEs) in artificial cerebrospinal fluid (aCSF, pH 7.4) in the absence (dashed curves) and presence (solid curves) of 400 $\mu\text{mol/L}$ ascorbate. CFEs were prepared with CFs from different sources (i. e., Type-1 (A); Type-2 (B), and Type-3 (C)) and electrochemically pretreated in 1.0 mol/L NaOH or 0.5 mol/L H_2SO_4 ^[34]

利用材料提高AA电子转移速率从而实现AA的选择性分析是另外一种有效的策略。碳纳米管(Carbon nanotube, CNT)具有独特的电子、化学、光学和机械性能。早期的研究表明,CNT侧壁碳的性质与HOPG电极的层状碳类似,其电化学性质不活泼。相反地,CNT的端口碳的性质类似于HOPG电极的边缘碳,而具有很好的电化学活性。Zhang等^[36]利用硝酸和硫酸混酸切割的单壁碳纳米管(Single-walled carbon nanotube, SWNT)表面带负电荷的性质,将其和具有正电荷性质的聚二烯丙基二甲基氯化铵通过静电作用逐层组装在基底电极上,组装的SWNT电极对AA具有很好的催化性能。他们进一步系统研究了AA在裸玻碳电极、石墨、SWNT、真空高温处理的SWNT不同碳材料电极上的电化学行为。从图3K可见,AA在SWNT电极上的氧化电位比在玻碳电极和石墨修饰电极上的氧化电位负,说明SWNT电极降低了AA的过电位,加速了AA的电子转移动力学。从AA在纯化的SWNT电极上的响应(图3)可见,含氧官能团的氧化还原峰并未发生变化,所以SWNT的含氧官能团没有影响AA的催化。同时他们发现,AA在未纯化的SWNT和酸纯化的SWNT电极上的电化学行为没有明显的区别,所以SWNT中所含的杂质不是引起AA电子转移加快的原因。尽管AA在SWNT上电催化性能还需进一步研究,但推测AA在SWNT电极上快的电子转移可能与SWNT碳结构有关。

3 活体原位电化学分析

活体伏安法是将微电极直接插入大脑特定部位,实现脑内生理活性物质的活体实时分析的电化学分析方法^[37]。因其所用微电极尺寸小,可置入脑组织,分析时空分辨率高,活体伏安法在脑神经化学过程的研究中备受关注^[38~40]。Adams等^[41]于1972年第一次将碳糊电极(直径约300 μm)植入大鼠脑内,并获得了脑内第一张循环伏安图,并猜测所获得的伏安信号为AA的氧化峰。用同样的方法,O'Neill等^[42]通过脑区微注射和腹腔注射AA,增加了伏安信号,Brazell等^[43]通过向脑区注射AA选择性氧化酶(Ascorbate oxidase, AAOx),证实了获得的伏安信号为AA,并用该方法测定了不同脑区和微注射谷氨酸时AA的变化。然而,碳糊电极直径太大,碳纤维电极(CFE, 5~7 μm)具有较高空间分辨率和生物相容性等性能,因此,越来越多研究开始关注CFE,并发展了许多检测AA的方法^[44~47]。Gonon等^[48]第一次对CFE进行处理(图4A),用DPV法实现了脑内AA的选择性分析。Heien等^[49]通过快速扫描循环伏安法(Fast scan cyclic voltammetry, FSCV)和主成分回归分析对FSCV数据进行了多组分分析,可同时测定AA、5-HT、DA、DOPAC、pH值的实时变化(图4B)。

如前所述,对电极表面进行合理的功能化^[50~53],是实现AA选择性分析的有效策略。Zhang等^[36]

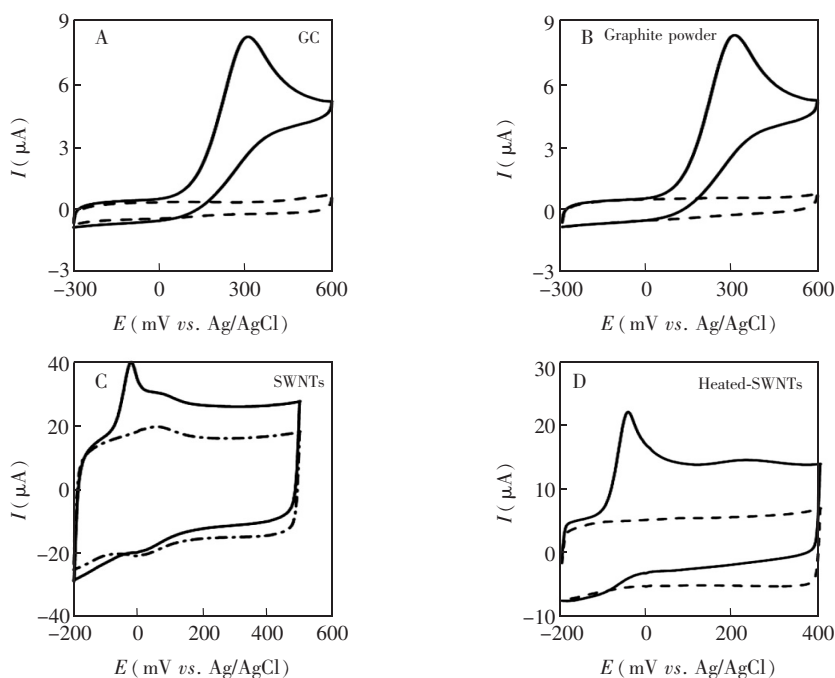


图3 AA在(A)裸玻碳电极、(B)石墨、(C)SWNT修饰电极和(D)真空高温SWNT修饰电极上的电化学生行为^[36]

Fig. 3 Typical CVs obtained at bare glass carbon (GC) (A), graphite-modified (B), single walled nanotubes (SWNT)-modified (C), and heat-treated SWNT-modified (D) GC electrodes in 0.10 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) in the absence (dotted lines) and presence (solid lines) of 0.5 mmol/L AA^[36]

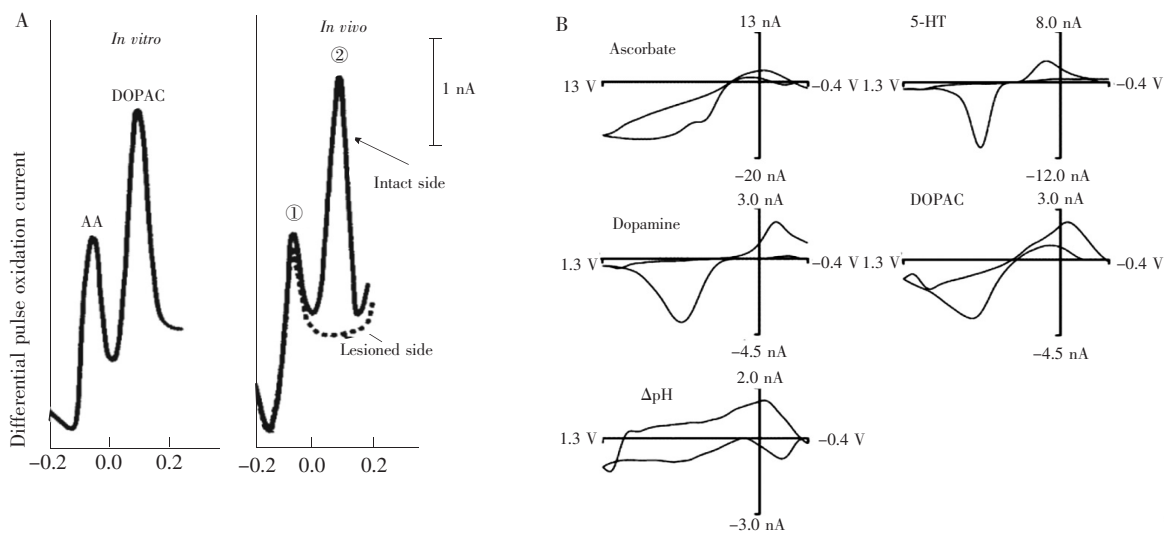


图4 (A)AA在体内、体外的DPV选择性响应^[48]; (B)多种组分化学物质在CFE上的FSCV图^[49]

Fig. 4 (A) Differential pulse voltammetry (DPVs) curves from *in vitro* experiments and from the neostriatum of anaesthetized rats (*in vivo*)^[48]; (B) Background-subtracted fast scan cyclic voltammetry (FSCV) of five neurochemicals: AA (i. e. ascorbate 100 $\mu\text{mol/L}$), 5-hydroxytryptamine (5-HT, 1 $\mu\text{mol/L}$), dopamine (DA, 1 $\mu\text{mol/L}$), 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, 10 $\mu\text{mol/L}$), and an acidic change in pH (0.1 pH unit)^[49]

第一次在电极表面修饰CNT,实现了AA的活体检测。AA在CNT修饰的CFE上在0.0 V左右达到稳态电流,说明修饰在CFE上的CNT对AA具有很好的电催化作用。此外,DA、尿酸和5-HT这些脑内神经化学物质的氧化电位都比AA在CNT修饰的CFE氧化电位正,因此不干扰AA的电化学分析。

他们通过多壁碳纳米管(Multiwalled carbon nanotube, MWNT)修饰的 CFE,用 DPV 的方法检测鼠脑细胞间液中 AA 的浓度约为 (0.20 ± 0.05) mmol/L。他们通过向电极附近注入 AAOx,证明 MWNT 修饰的 CFE 电极对 AA 具有很好的选择性^[54](见图 5)。

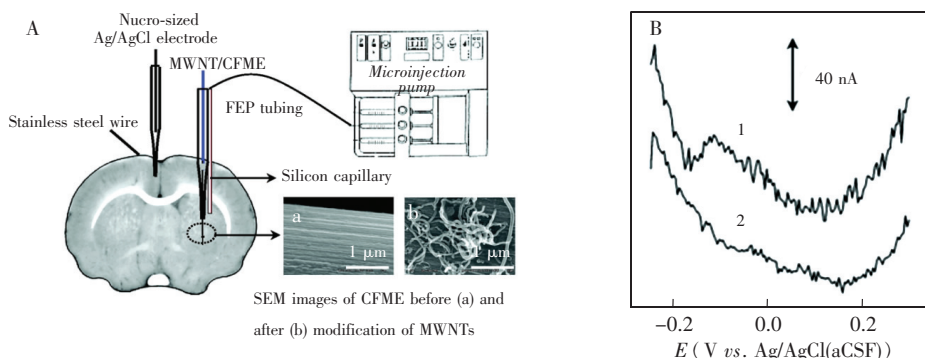


图 5 (A) MCNT 修饰的 CFE 活体检测纹状体脑区 AA 示意图; (B) MCNT 修饰的 CFE 用 DPV 方法检测微注射 AA 后电流响应(曲线 1)和注入 AAOx 时, MWNT 修饰的 CFE 上 AA 的电流响应(曲线 2)^[54]

Fig. 5 (A) Schematic illustration of *in vivo* voltammetric recording of striatum AA by using the multiwalled carbon nanotubes (MWNT)-modified CFE; (B) DPVs at the MWNT-modified CFMEs in aCSF containing AA (0.3 mmol/L) (curve 1) and after (curve 2) exogenous infusion of AA oxide (AAOx) into the striatum^[54]

由于 CNT 修饰 CFE 的技术在神经科研领域的研究较难,且电极制备的可重复性有待进一步提高, Xiang 等^[55]制备了阵列碳纳米管覆盖的碳纤维微电极(Vertically aligned carbon nanotube sheathed carbon fiber, VACNT-CFE),大大简化了碳纳米管微电极的制备方法,避免了手工滴涂修饰 CNT 引起的电极性能差异,以及繁杂修饰步骤。图 6 为 CFE (A)和 VACNT-CFE (B)的扫描电镜图, CNT 均匀生长在 CFE 表面,在稀 H_2SO_4 溶液中电化学预处理,得到的 VACNT-CFE 对 AA 的响应与裸 CFE 相似,然而, VACNT-CFE 在 NaOH 溶液中电化学活化后,表现出对 AA 良好的电催化性能,降低了 AA 氧化的过电位,并增大了其电流响应,这些实验结果证明了 CNT 的端口碳对 AA 具有良好的催化性能。VACNT-CFE 对 AA 的分析呈现出良好的选择性和线性关系,并可观察到灌注谷氨酸所引起的 AA 释放,实时监测了 AA 和谷氨酸的异相交换行为(图 6E)。

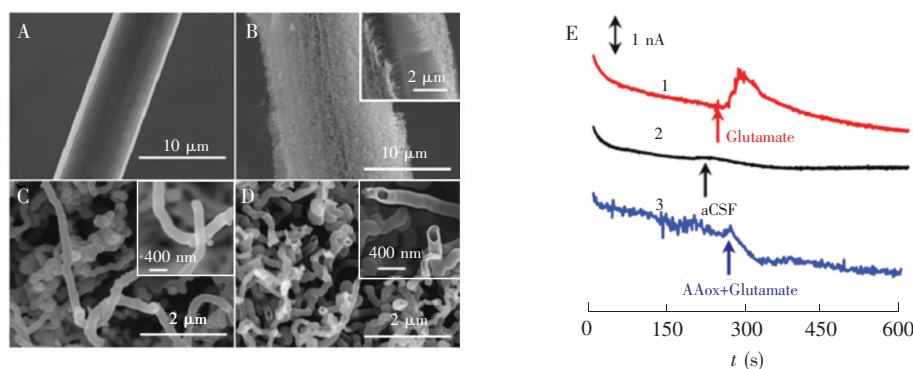


图 6 (A) CF、(B) VACNT-CFE 和在 NaOH 溶液电化学处理 (C) 前和 (D) 后的 VACNT-CFE 尖端扫描电镜图 (E); VACNT-CFE 活体实时电化学分析谷氨酸诱导 AA 释放 (曲线 1), aCSF 注射基线电流 (曲线 2) 和 AAOx 消除谷氨酸诱导 AA 释放 (曲线 3)^[55]

Fig. 6 Scanning electron microscopy (SEM) images of (A) CFE; (B) vertically aligned carbon nanotube sheathed carbon fiber (VACNT-CFE), and the tips of VACNT-CFE (C) before and (D) after electrochemical treatment in 1.0 mol/L NaOH; (E) Typical current-time responses *in vivo* recorded at the VACNT-CFEs during local microinjection of glutamate (curve 1), aCSF (curve 2), and glutamate containing AAOx (curve 3) into rat striatum^[55]

在 CFE 表面垂直生长 CNT 方法可用于脑内 AA 测定,虽然该电极制备方法可避免人工修饰引起的一系列问题,但是该方法复杂,不利于大量制备电极。为进一步简化 CNT 电极的制备,Xiao 等^[34]发展了一种可控且重现性极高的电泳沉积 SWNT 修饰电极的方法,电泳的方法可非常简单地酸化处理的 SWNT 沉积到 CFE 表面,该电极对 AA 的电化学氧化表现出良好的催化作用,重现性高(如图 7)。

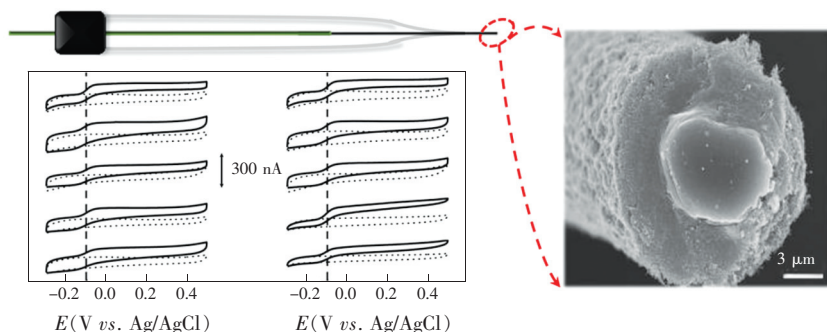


图 7 电泳沉积 SWNT 到 CFE 表面扫描电镜图及对 AA 的电化学氧化^[34]

Fig. 7 SEM images of SWNT-sheathed CFEs and typical CVs obtained at ten SWNT-sheathed CFEs in the absence (dashed curves) and presence (solid curves) of 400 $\mu\text{mol/L}$ AA^[34]

重要的是,检测 AA 时,CNT 修饰的 CFE 比电化学处理的 CFE 具有更好的稳定性,因此有利于研究脑科学与 AA 相关的生理或者病理过程中 AA 变化。如扩散性抑制(Spreading depression, SD)是一种在脑内神经细胞去极化,随后受到抑制并类似去极化波在神经及胶质细胞间进行传播的现象。SD 发病过程与偏头痛、癫痫发病过程非常相似^[56]。因此 SD 发病过程中机理的研究,对于相关疾病的发病机制的研究和治疗都有重要的参考意义。Xiao 等^[57]用 SWNT 修饰的 CFE 测定了鼠脑皮层由电刺激引发的 SD 过程中 AA 的浓度动态变化。如图 8A 和 8B 所示,利用给予局部注射 AAOx 和改变施加电位的方式,进一步验证记录到的电流的变化是由 SD 导致胞外 AA 浓度变化引起的。为进一步理解 SD 过程中 AA 释放的机理,局部注射 NMDA 受体拮抗剂地佐环平(MK-801)阻断谷氨酸依赖的 SD 的传播,并可抑制 SD 过程中 AA 的释放(图 8C),进一步证明了 AA 的释放受 SD 过程中谷氨酸的调节。为了探索 AA 的释放是否是由于谷氨酸异相交换引起的,采用 *D,L*-苏式- β -苄氧基天冬氨酸(*D,L*-TBOA)进行干预,大鼠给予 *D,L*-TBOA 后,发现电刺激 AA 的释放并未被抑制(图 8D)。因此,报道认为 SD 过程中 AA 释放并不是谷氨酸的异相交换引起的,可能与 SD 过程中细胞水肿密切相关。

比率型电分析引入内参比氧化还原电对,使用待分析物和内参比的电流响应对分析物进行分析,可克服复杂体系的基底效应。Tian 研究组^[58,59]首次提出比率型电分析策略,并将 CNT 纺成碳纤维丝,制备得到 CNT 纤维(Carbon nanotube fiber, CNF),实现了活体内比率型 AA 的分析检测。如图 9 所示,AA 在 CNF 上的氧化电位为 -50 mV,利用 DPV 技术,结合比率型电化学方法,对脑内的 AA 实现了选择性分析,采用该方法观察到老年痴呆症大鼠皮层、纹状体和海马 3 个脑区 AA 含量明显低于正常大鼠。Cheng 等^[60]将硫瑾固定在炭黑修饰的 CFE 上,结合比率型电化学,用循环伏安法选择性检测听皮层的 AA,并观察到水杨酸钠引起的耳鸣过程中 AA 的变化。

同时记录神经元的电活动信息以及脑内 AA 的动态变化可将神经细胞之间的信号传递与 AA 密切相关的神经调节过程联系起来,从而深入理解脑生理和病理过程的信号转导机制^[61]。Cheng 等^[62]将 SWNT 修饰的 CFE 和毛细管玻璃微电极有效集成为双通道微电极(Integrated dual-mode microelectrode, IDMME),用 CFE 选择性记录 AA,用玻璃管微电极记录电生理信号,该双通道微电极可独立记录化学和电信号,两种信号之间没有交叉干扰,并成功地用于原位连续监测大鼠脑缺血/再灌注过程中 AA 以及神经元细胞电活动的动态变化。

生物大分子在电极表面的吸附是活体原位分析 AA 面临的另一个挑战,因为脑内环境较复杂,不仅存在许多小分子干扰物质,还包含许多生物大分子(如脂质、蛋白质)^[63]。电极植入后脑内生物大分子

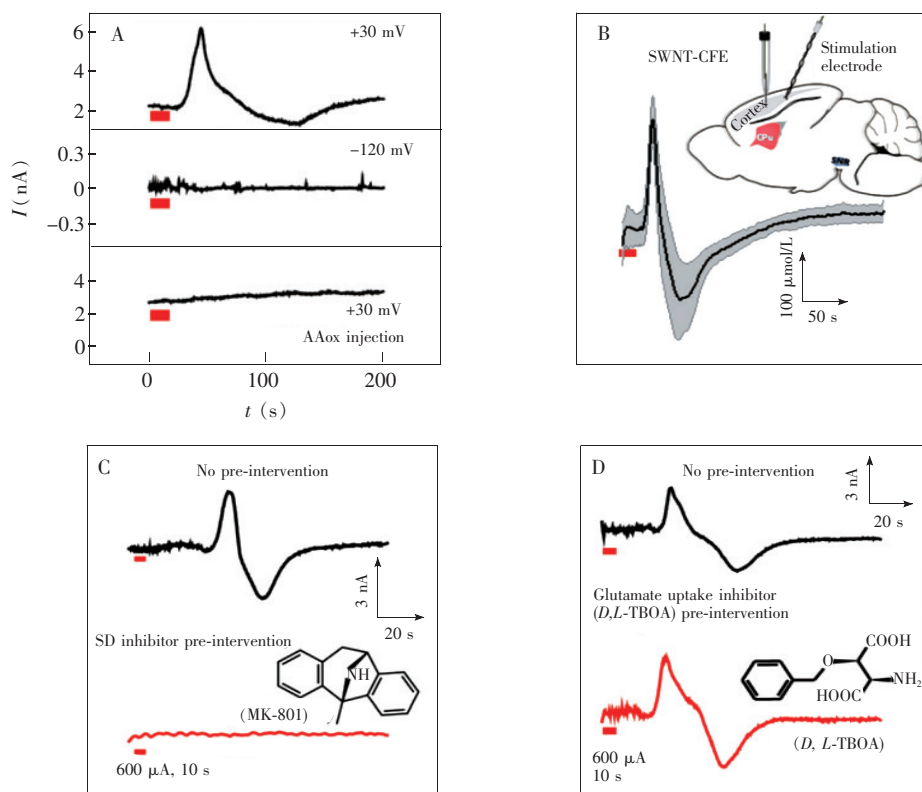


图 8 (A~B)SWNT 修饰 CFE 在鼠脑皮层由电刺激引发的 SD 过程中 AA 选择性检测; (C) 局域注射 MK-801 时,SD 过程中 AA 释放; (D) 局域注射 *D,L*-TBOA 时,SD 过程中 AA 的释放^[57]

Fig. 8 (A) Current signal by local electrical stimulation in the rat cortex recorded with the SWNT-CFE at +30 mV, -120 mV, and +30 mV after local perfusion of AAOx ($n=3$ rats); (B) Current recordings with the SWNT-CFE at a potential of +30 mV upon electrical stimulation every 15 min ($n=5$ rats, 3 electrical stimulations per rat); (C) Local electrical stimulation evoked ascorbate fluctuation before (black) and after (red) local injection of MK-801 in the rat cortex ($n=3$ rats). (D) Ascorbate fluctuation evoked by local electrical stimulation in rat cortex before (black) and after (red) local infusion of dl-threo-β-methylaspartic acid (*D, L*-TBOA) ($n=5$ rats)^[57]

会在电极表面吸附,导致电极检测灵敏度下降,使得电极必须在活体检测后进行校正,才能对活体数据进行分析。Liu 等^[64]发现,用牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)处理后的 CNT 修饰 CFE 电极的活体检测前校准曲线和活体检测后校准曲线基本一致,从而巧妙地实现了活体前校准,克服了活体检测过程中或者活体分析后微电极取出时电极断裂无法校准的问题。

4 活体微透析取样-在线电化学分析

微透析技术是一种从生物活体内进行动态微量生化采样的技术,最早由 Delgado 提出并申请了美国专利, Ungerstedt 等^[65]于 1982 年报道了采用微透析技术检测 DA 的实验结果,并于 1987 年申请了现在应用最为广泛的同心型探针的专利。微透析活体取样-色谱分离-电化学检测方法是先将微透析液首先经过高效液相色谱或毛细管电泳分离,然后进行电化学检测。这种方法中对电极的选择性要求不苛刻,方法简单,广泛地应用于脑神经化学过程中生理活性物质的检测以及生理和病理过程的研究^[66]。如 Lee 等^[67]用微透析取样-色谱分离-电化学检测方法检测了脑内的 AA。虽然微透析取样-色谱分离-电化学检测方法的建立比较容易,但是这种分析方法必须首先收集微透析样品,然后用色谱(或者电泳)分离,再进行电化学检测。样品收集和色谱分离需要的时间都很长,因此方法的时空分辨率低,而且样品在收集过程中 AA 容易被氧化而失真。尽管 Qian 等^[68]设计了毛细管电泳分离-电化学检测 DA 的芯

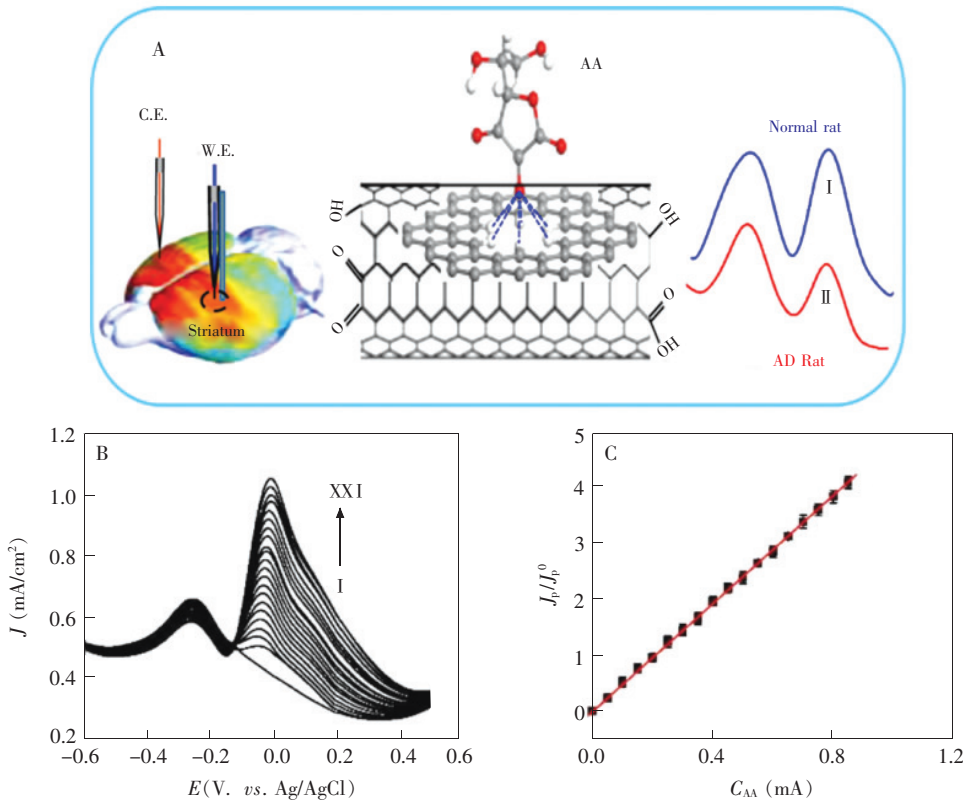


图9 (A)活体内比率型 AA 的选择性分析示意图; (B)DPV 技术结合比率型电化学方法实现 AA 线性响应; (C)比率峰值电流密度(J_p/J_p^0)与 AA 浓度的关系图^[58]

Fig. 9 (A) Schematic illustration of ratiometric method with electrochemically treated carbon nanotube fiber (CNFs) for *in vivo* measurement of cerebral AA of living rats; (B) DPVs recorded with the electrochemically treated CNFs in the aCSF containing various concentrations of AA; (C) Plot of ratiometric peak current density (J_p/J_p^0) versus concentration of AA^[58]

片,将样品收集的时间缩短为 1 min,同时也缩短了分离的时间,但是,微透析活体取样-样品分离-电化学检测方法仍然存在一些问题,需进一步完善。

微透析取样-电化学在线检测系统(Online electrochemical system, OECS)无需分离,样品保真程度高,样品取出后直接电化学检测,可实现近似实时的分析。Zhang 等^[53]第一次利用 CNT 修饰的玻璃碳电极,结合微透析技术,提出并建立了 AA 的活体、在线电化学分析新技术和新方法。该方法具有很好的选择性、稳定性和重现性。大鼠活体实验结果表明,正常状态下大鼠纹状体透析液中的 AA 浓度为 $(5.0 \pm 0.5) \mu\text{mol/L}$ ($n=5$),将专一催化 AA 氧化的 AAOx 与 aCSF 混合作为灌流液,如图 10 所示,电流值基本无变化,说明透析液中其它神经化学物质不干扰 AA 的测定。

基于 CNT 修饰电极所构建的在线电化学检测方法对于 AA 的响应在一定范围内不随脑内氧气和 pH 值的改变而变化,稳定性好,有利于连续监测 AA 在各种生理/病理过程中的动态变化,探索 AA 的神经化学机制^[69]。Liu 等^[70]利用该系统研究了脑缺血过程中脑内 AA 的变化规律,发现了大鼠纹状体脑区 AA 浓度在不同脑缺血/再灌注过程中的变化差异,以及同样程度的 2-VO 全脑缺血所导致的 AA 在纹状体、皮层感觉运动区、背侧海马和腹侧海马 4 个脑区的空间变化差异^[71];同时也发现了 2-VO 全脑缺血后早期静脉注射抗氧化剂(如 AA,谷胱甘肽)能有效抑制海马区的 AA 在缺血后的上升^[9]。这些实验结果对于深刻理解脑缺血病理过程中与 AA 相关的神经化学机制具有重要意义。

活体多组分的检测对理解 AA 相关的生理病理分子机制具有重要作用,因为在这些生理病理的发生与发展过程中,常伴随着多种物质的同时变化,如能量代谢物质(如葡萄糖,乳酸)和各种离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+})等。商品化的可用于在线电化学检测的电极形状固定限制了多组分检测^[72]。微流控芯片

技术因其独特的优点(如流路的可设计性,样品量需求少等^[73,74])而广泛应用于生物分析。Lin 等^[75]设计了一个聚二甲基硅氧烷(Poly(dimethylsiloxane), PDMS)微流控芯片,工作电极为 CNT 修饰的铜锡氧化物(Indium-tin oxide, ITO)电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,Pt 丝电极为对电极,对微透析液中的 AA 实现了选择性连续分析。

连续检测脑内的 AA 和 Mg^{2+} 具有重要的生理病理意义,因为脑内的很多生理病理活动中都伴随两种物质的变化^[76]。Gao 等^[77]设计了可连续检测 AA 和 Mg^{2+} 的微透析取样-微流控在线电化学分析系统,在同一个通道内内嵌两个电极,分别修饰 CNT 和聚甲苯胺蓝,选择性检测 AA 和 Mg^{2+} ,方法具有高的选择性和稳定性。测得脑透析液中 AA 和 Mg^{2+} 浓度分别为 21.9 和 139.4 $\mu\text{mol/L}$,全脑缺血后 AA 和 Mg^{2+} 浓度分别下降了 20.9% 和 31.3%

微流控芯片还可通过设计流路,实现两种以上物质的检测。Lin 等^[78]建立了可同时检测葡萄糖、乳酸和 AA 的微透析取样-微流控在线分析系统。通过巧妙设计微透析的进样、辅酶和微透析液的混合、电极的排列形式,避免 3 个电极之间的交叉干扰,设计了如图 11 所示的微流控芯片。在流路的上游用 CNT 修饰的 ITO 电极检测 AA,在流路的下游用两个平行的电极分别修饰用亚甲基绿(Methylene green, MG)吸附的 CNT 和脱氢酶,分别检测葡萄糖和乳酸,有效避免了 3 个电极之间的交叉干扰,并用该体系

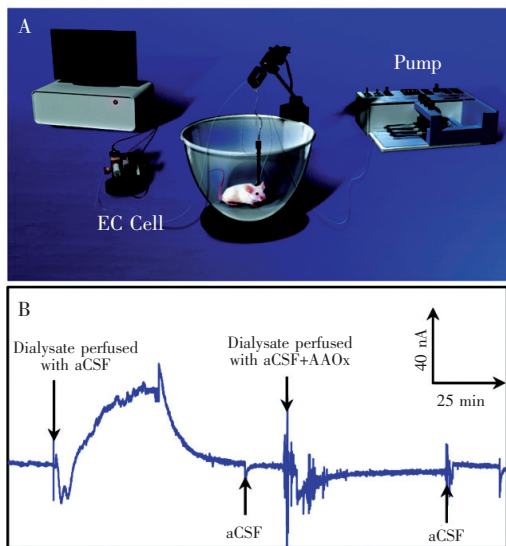


图 10 (A) OECS 活体检测脑内 AA 的示意图; (B) OECS 实现活体脑内 AA 选择性检测^[53]

Fig. 10 (A) Schematic illustration of CNT-based online electrochemical system (OECS) for *in vivo* real-time measurement of cerebral AA in living rats; (B) Typical current responses of AA from microdialysate continuously sampled from striatum of living rats^[53]

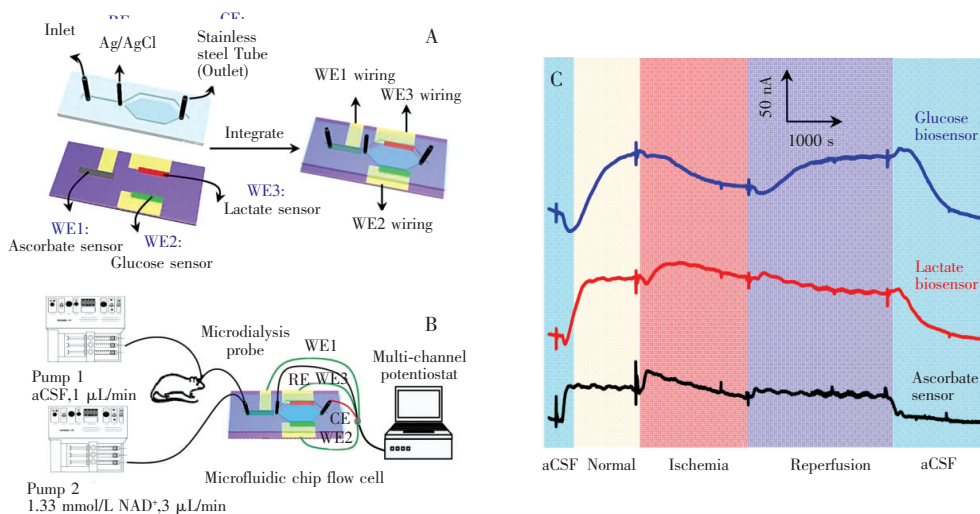


图 11 (A) 微流控 OECS 结构示意图; (B) 微流控 OECS 检测脑内葡萄糖、乳酸和 AA 的示意图; (C) 微流控 OECS 实时连续检测脑内葡萄糖、乳酸和 AA^[78]

Fig. 11 (A) Structure of microfluidic chip-based electrochemical flow cell. The cell consists of two independent substrates; (B) Schematic illustration of microfluidic chip-based OECS for continuous monitoring of glucose, lactate and AA in rat brain; (C) Typical current-time responses recorded with microfluidic chip-based OECS for the microdialysates continuously sampled from the rat striatum following the global cerebral ischemia/reperfusion^[78]

观察了大鼠脑缺血/再灌注过程中脑内 AA、葡萄糖和乳酸的变化规律,深刻理解了脑缺血病理过程中相关的神经化学机制^[79,80]。

5 单细胞安培法

单细胞安培法是一种具有高时空分辨率的电化学方法,可记录到单细胞水平神经递质,如儿茶酚胺类^[81~83]。Wang 等^[13]发现用碱性条件处理的 CFE 对 AA 具有很好的选择性,并首次观察到 AA 类似囊泡释放的释放行为。如图 12 所示,给予细胞 10 s 的高钾溶液刺激后,单细胞安培法明显记录到了大量分泌信号,且该信号与普通碳纤维记录到的儿茶酚胺通过囊泡释放的现象具有一致性。为进一步验证获取的信号为分泌的 AA,用高浓度 AAOx 孵育细胞,发现未孵育的细胞裂解液中的氧化电流消失,说明该电极检测到的是 AA 的释放。为了进一步验证 AA 是囊泡释放,他们利用囊泡的释放依赖于细胞外液中 Ca^{2+} 浓度的经典理论,将标准细胞外液替换为不含有 Ca^{2+} 的细胞外液后,再次给予细胞相同的高钾刺激后,观察不到分泌信号。以上结果证明了 AA 可通过囊泡的形式进行胞吐释放。同时,为进一步确认信号是由 AA 引起的,而非噪声,他们将钳制电压由 0 V 变为 -0.2 V,发现类似囊泡释放样的信号消失。这进一步证明 AA 胞吐现象不是噪声引起。该研究为 AA 的囊泡释放提供了最直接的证据,有利于深入探讨 AA 的释放机制,为神经科学的发展提供了方法。

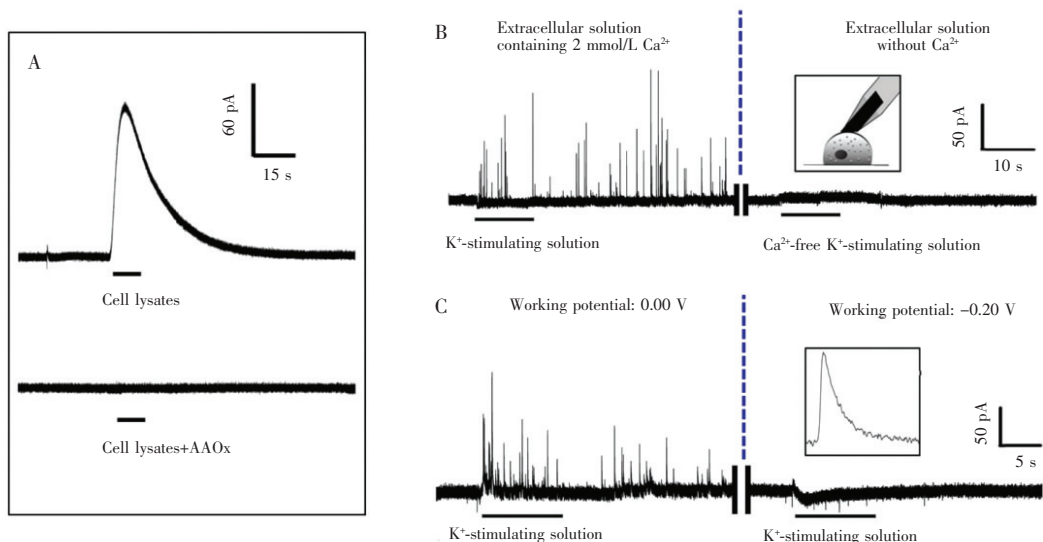


图 12 (A) 单细胞安培法 AA 选择性检测; (B) 单细胞安培法记录 AA 分泌信号依赖于细胞外液中的钙离子; (C) 单细胞安培法记录 AA 分泌信号依赖于 0 V 钳制电压^[13]

Fig. 12 (A) Amperometric response of CFE toward a 10 s puffer application of cell lysate (top) and cell lysate+AAOx (bottom); (B) (Left) Amperometric spikes recorded with the pretreated CFE closely attached to a single rat adrenal chromaffin cell that is cultured in the standard extracellular solution and stimulated by K^{+} -stimulating solution, (Right) Current-time trace recorded with the pretreated CFE closely attaches to a single rat adrenal chromaffin cell that is cultured in the Ca^{2+} -free extracellular solution and stimulated by Ca^{2+} -free K^{+} -stimulating solution; (C) High K^{+} evoked amperometric spikes recorded with the pretreated CFE closely attaches to a single rat adrenal chromaffin cell cultured in the standard extracellular solution at different holding potentials of 0.0 V (left) and -0.20 V (right)^[13]

6 结论与展望

本文对近期 AA 的高时空分辨率的电化学方法和技术进行了评述,这些方法将为 AA 相关的生理和病理的研究提供有力的方法学保证,如 CFE 选择性分析 AA 促使首次利用 CFE 发现 AA 的胞吐行为,推动了与 AA 相关的生理和病理的研究。本文所述方法可实现 AA 的选择性分析,随着其它学科的发

展,如材料科学、微加工技术、电子信息技术等,这些方法将会得到进一步发展。另外,电化学方法与生理学技术(如光遗传、电生理和成像等)联用,进而实现多种方法和技术的高度集成,也将是 AA 方法学未来发展的主要方向之一。

References

- 1 Rice M E. *Trends Neurosci.* , **2000** , 23(5) : 209–216
- 2 Nandi A, Mukhopadhyay C K, Ghosh M K, Chattopadhyay D J, Chatterjee I B. *Free Radic. Biol. Med.* , **1997** , 22(6) : 1047–1054
- 3 Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch K N, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio II, Giannopoulou E G, Rago C, Muley A, Asara J M, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin D J, Dow L E, Papadopoulos N, Gross S S, Cantley L C. *Science* , **2015** , 350(6266) : 1391–1396
- 4 Agathocleous M, Meacham C E, Burgess R J, Piskounova E, Zhao Z, Crane G M, Cowin B L, Bruner E, Murphy M M, Chen W, Spangrude G J, Hu Z, DeBerardinis R J, Morrison S J. *Nature* , **2017** , 549(7673) : 476–481
- 5 Xue J, Chen G, Hao F, Chen H, Fang Z, Chen F, Pang B, Yang Q, Wei X, Fan Q, Xin C, Zhao J, Deng X, Wang B, Zhang X, Chu Y, Tang H, Yin H, Ma W, Chen L, Ding J, Weinhold E, Kohli R M, Liu, Zhu Z, Huang K, Tang H, Xu G. *Nature* , **2019** , 569(7757) : 581–585
- 6 Rebec G V, Wang Z. *J. Neurosci.* , **2001** , 21(2) : 668–675
- 7 Dutta A, Gautam R, Chatterjee S, Ariese F, Sikdar S K, Umapathy S. *ACS Chem. Neurosci.* , **2015** , 6(11) : 1794–1801
- 8 Dong Y, Wang S, Zhang T, Zhao X, Liu X, Cao L, Chi Z. *Brain Res.* , **2013** , 1535 : 115–123
- 9 Liu K, Yu P, Lin Y, Wang Y, Ohsaka T, Mao L. *Anal. Chem.* , **2013** , 85(20) : 9947–9954
- 10 Brahma B, Forman R E, Stewart E E, Nicholson C, Rice M E. *J. Neurochem.* , **2000** , 74(3) : 1263–1270
- 11 Levine M, Morita K, Heldman E, Pollard H B. *J. Biol. Chem.* , **1985** , 260(29) : 15598–15603
- 12 Meredith M E, May J M. *Brain Res.* , **2013** , 1539 : 7–14
- 13 Wang K, Xiao T, Yue Q, Wu F, Yu P, Mao L. *Anal. Chem.* , **2017** , 89(17) : 9502–9507
- 14 Harrison F E, Dawes S M, Meredith M E, Babaev V R, Li L, May J M. *Free Radic. Biol. Med.* , **2010** , 49(5) : 821–829
- 15 Rice M E, Forman R E, Chen B, Avshalumov M V, Cragg S J, Drew K L. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* , **2002** , 133(4) : 515–525
- 16 Corti A, Casini A F, Pompella A. *Arch. Biochem. Biophys.* , **2010** , 500(2) : 107–115
- 17 Huang J, Agus D B, Winfree C J, Kiss S, Mack W J, McTaggart R A, Choudhri T F, Kim L J, Mocco J, Pinsky D J, Fox W D, Israel R J, Boyd T A, Golde D W, Connolly E S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **2001** , 98(20) : 11720–11724
- 18 Knoth J, Viveros O H, Diliberto E J. *J. Biol. Chem.* , **1987** , 262(29) : 14036–14041
- 19 Grunewald R A, Fillenz M. *Neurochem. Int.* , **1984** , 6(4) : 491–500
- 20 Wilson J X, Peters C E, Sitar S M, Daoust P, Gelb A W. *Brain. Res.* , **2000** , 858(1) : 61–66
- 21 Daniels A J, Dean G, Viveros O H, Diliberto E J. *Science* , **1982** , 216(4547) : 737–739
- 22 QIN Tai-Chun, LI Xiao-Gang, HAO Jie, MAO Lan-Qun. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2015** , 43(3) : 457–462
秦泰春, 李晓钢, 郝洁, 于萍, 毛兰群. *分析化学* , **2015** , 43(3) : 457–462
- 23 Michael A C, Borland, L M. CRC Press: Boca Raton, FL, **2006**
- 24 Robinson D L, Hermans A, Seipel A T, Wightman R M. *Chem. Rev.* , **2008** , 108(7) : 2554–2584
- 25 Wu F, Yu P, Mao L. *Chem. Soc. Rev.* , **2017** , 46(10) : 2692–2704
- 26 Yu P, He X, Mao L. *Chem. Soc. Rev.* , **2015** , 44(17) : 5959–5968
- 27 Wang Y, Mao L. *Electroanalysis* , **2016** , 28(2) : 265–276
- 28 Wu F, Yu P, Mao L. *ACS Omega* , **2018** , 3(10) : 13267–13274
- 29 Prieto F, Coles B A, Compton R G. *J. Phys. Chem. B* , **1998** , 102(38) : 7442–7447
- 30 Cheng H, Li L, Zhang M, Jiang Y, Yu P, Ma F, Mao L. *TrAC-Trends Anal. Chem.* , **2018** , 109 : 247–259
- 31 Hu I, Kuwana T. *Anal. Chem.* , **1986** , 58(14) : 3235–3239
- 32 Deakin M R, Kovach P M, Stutts K J, Wightman R M. *Anal. Chem.* , **1986** , 58(7) : 1474–1480
- 33 Guo S, Yan H, Wu F, Zhao L, Yu P, Liu H, Li Y, Mao L. *Anal. Chem.* , **2017** , 89(23) : 13008–13015

- 34 Xiao T, Jiang Y, Ji W, Mao L. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(7): 4840–4846
- 35 Raj C R, Ohsaka T. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 496(1-2): 44–49
- 36 Zhang M, Liu K, Gong K, Su L, Chen Y, Mao L. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(19): 6234–6242
- 37 Xiang L, Yu P, Zhang M, Hao J, Wang Y, Zhu L, Dai L, Mao L. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(10): 5017–5023
- 38 Xiao T, Wu F, Hao J, Zhang M, Yu P, Mao L. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(1): 300–313
- 39 Li R, Liu X, Qui W, Zhang M. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(15): 7769–7776
- 40 Li R, Guo D, Ye J, Zhang M. *Analyst*, **2015**, 140(11): 3746–3752
- 41 Adams R N, Murrill E, McCreery R, Blank L, Karolczak M. *Eur. J. Pharmacol.*, **1972**, 17(2): 287–292
- 42 O'Neill R D, Grunewald R A, Fillenz M, Albery W J. *Neuroscience*, **1982**, 7(8): 1945–1954
- 43 Brazell M P, Marsden C A. *Brain Res.*, **1982**, 249(1): 167–172
- 44 Dayton M A, Ewing A G, Wightman R M. *Anal. Chem.*, **1980**, 52(14): 2392–2396
- 45 Gonon F, Buda M, Cespuglio R, Jouvet M, Pujol J F. *Brain Res.*, **1981**: 223(1): 69–80
- 46 Ewing A G, Wightman R M, Dayton M A. *Brain Res.*, **1982**, 249(2): 361–370
- 47 Stamford J A, Kruk Z L, Millar J. *Brain Res.*, **1984**, 299(2): 289–295
- 48 Gonon F, Buda M, Cespuglio R, Jouvet M, Pujol J F. *Nature*, **1980**, 286(5776): 902–904
- 49 Heien M L, Johnson M A, Wightman R M. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(19): 5697–5704
- 50 Wang J, Tuzhi P, Villa V. *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, 234(1-2): 119–131
- 51 Capella P, Ghasemzadeh B, Mitchell K, Adams R N. *Electroanalysis*, **1990**, 2(3): 175–182
- 52 Feng J X, Brazell M, Renner K, Kasser R, Adams R N. *Anal. Chem.*, **1987**, 59(14): 1863–1867
- 53 Zhang M, Yu P, Mao L. *Acc. Chem. Res.*, **2012**, 45(4): 533–543
- 54 Zhang M, Liu K, Xiang L, Lin Y, Su L, Mao L. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(17): 6559–6565
- 55 Xiang L, Yu P, Hao J, Zhang M, Zhu L, Dai L, Mao L. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(8): 3909–3914
- 56 Pietrobon D, Moskowitz M A. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2014**, 15(6): 379–393
- 57 Xiao T, Wang Y, Wei H, Yu P, Jiang Y, Mao L. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2019**, 58(20): 6616–6619
- 58 Zhang L, Liu F, Sun X, Wei G, Tian Y, Liu Z, Huang R, Yu Y, Peng H. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(3): 1831–1837
- 59 Chai X, Zhou X, Zhu A, Zhang L, Qin Y, Shi G, Tian Y. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2013**, 52(31): 8129–8133
- 60 Cheng H, Wang X, Wei H. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(17): 8889–8895
- 61 XU Sheng-Wei, WANG Li, SONG Xian-Teng, ZHANG Song, WANG Mi-Xia, YU Ping, MAO Lan-Qun. CAI Xin-Xia. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(9): 1458–1464
徐声伟, 王 力, 宋先腾, 张 松, 王蜜霞, 于 萍, 毛兰群, 蔡新霞. 分析化学, **2016**, 44(9): 1458–1464
- 62 Cheng H, Xiao T, Wang D, Hao J, Yu P, Mao L. *J. Electroanal. Chem.*, **2016**, 781: 90–96
- 63 Liu X, Xiao T, Wu F, Shen M-Y, Zhang M, Yu H, Mao L. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2017**, 56(39): 11802–11806
- 64 Liu X, Zhang M, Xiao T, Hao J, Li R, Mao L. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(14): 7238–7244
- 65 Ungerstedt U, Herrera-Marschitz M, Jungnelius U, Stahle L, Tossman U, Zetterström T. *Advances in Dopamine Research*, **1982**: 219–231
- 66 Yue X, Zhu Z, Zhang M, Ye Z. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(3): 1839–1845
- 67 Lee M S, Yang D, Cheng C, Liang Y, Yang L, Cheng F. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 985(1-2): 387–394
- 68 Qian J, Wu Y, Yang H, Michael A C. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(20): 4486–4492
- 69 LYU Yang, ZHANG Ya-Wen, TAN Lei, JI Wen-Liang, YU Ping, MAO Lan-Qun, ZHOU Fang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(11): 1595–1599
吕 扬, 张雅文, 谭 磊, 纪文亮, 于 萍, 毛兰群, 周 方. 分析化学, **2017**, 45(11): 1595–1599
- 70 Liu K, Lin Y, Xiang L, Yu P, Su L, Mao L. *Neurochem. Int.*, **2008**, 52(6): 1247–1255
- 71 Liu K, Lin Y, Yu P, Mao L. *Brain Res.*, **2009**, 1253: 161–168
- 72 Dalbasti T, Cagli S, Kilinc E, Oktar N, Ozsoz M. *Nitric Oxide-Biol. Chem.*, **2002**, 7(4): 301–305
- 73 ZHANG Feng, GAO Dan, LIANG Qiong-Lin. *Chinese J. Anal. Chem.* **2016**, 44(12): 1942–1949
张 逢, 高 丹, 梁琼麟. 分析化学, **2016**, 44(12): 1942–1949
- 74 Wang S, Liu X, Zhang M. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(10): 5382–5388
- 75 Lin Y, Lu X, Gao X, Cheng H, Ohsaka T, Mao L. *Electroanalysis*, **2013**, 25(4): 1010–1016

- 76 Marinov M B, Harbaugh K S, Hoopes P J, Pikus H J, Harbaugh R E. *J. Neurosurg.* , **1996**, 85(1): 117–124
- 77 Gao X, Yu P, Wang Y, Ohsaka T, Ye J, Mao L. *Anal. Chem.* , **2013**, 85(15): 7599–7605
- 78 Lin Y, Yu P, Hao J, Wang Y, Ohsaka T, Mao L. *Anal. Chem.* , **2014**, 86(8): 3895–3901
- 79 ZHAO Fan, SHI Guo-Yue, TIAN Yang. *Chinese J. Anal. Chem.* **2019**, 47(3): 347–354
赵 凡, 施国跃, 田 阳. *分析化学*, **2019**, 47(3): 347–354
- 80 WANG Qian-Qian, ZHANG Yan, MENG Lu-Lu, PI Zi-Feng, LIU Shu, SONG Feng-Rui, LIU Zhi-Qiang. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2015**, 43(11): 1754–1760
王倩倩, 张 艳, 孟璐璐, 皮子凤, 刘 舒, 宋凤瑞, 刘志强. *分析化学*, **2015**, 43(11): 1754–1760
- 81 Li X, Dunevall J, Ewing A G. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2016**, 55(31): 9041–9044
- 82 Li X, Majdi S, Dunevall J, Fathali H, Ewing A G. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2015**, 54(41): 11978–11982
- 83 Ren L, Pour M D, Majdi S, Li X, Malmberg P, Ewing A G. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2017**, 56(18): 4970–4975

Recent Advances on *in Vivo* Electrochemical Analysis of Vitamin C In Rat Brain

JI Wen-Liang¹, ZHANG Mei-Ning^{*1}, MAO Lan-Qun^{*2,3}

¹(Department of Chemistry, Renmin University of China, Beijing 100872, China)

²(Beijing National Laboratory for Molecular Science, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

³(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Vitamin C, also known as ascorbic acid, is an important neurochemicals in the brain. It serves as one of most important small-molecular-weight antioxidants for neuro-protection and neuromodulator to modulate neurological functions through glutamatergic, dopaminergic and neurotransmission. It is also a cofactor of enzymes involved in biosynthetic reactions such as the synthesis of catecholamines. Therefore, increasing interest has attracted in the measurement of AA in the brain. The high-potential oxidation of AA essentially renders difficulties in exploring the electrochemical property of AA to constitute an electrochemical protocol for its selective detection of AA with high spatial and temporal resolution in the brain. This review mainly focuses on recent updates on detection of AA by modulating the electron transfer of AA to achieve the high temporal, spatial resolution and selectivity for its detection in the rat brain and single-cell.

Keywords Vitamin C; *In vivo*; Electrochemical analysis; Selectivity; Review

(Received 30 July 2019; accepted 20 August 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21874152).