

DOI 编码 :10.3969/j.issn.1006-6144.2010.02.005

基于表面活性剂单分子层修饰碳糊电极的一氧化氮 电化学传感器及其应用

张小林^{1,2}, 彭艳芬², 许艳霞², 胡成国^{*2}

(1. 甘肃省平凉医学高等专科学校, 甘肃平凉 744000;

2. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北武汉 430072)

摘 要:报道了一种表面活性剂单分子层修饰碳糊电极,并用于 NO 的高灵敏电化学检测。研究表明,表面活性剂通过烷基链在电极表面形成的疏水性单分子层微环境对 NO 的电化学响应具有较好的促进作用。其中,阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)对 NO 的电化学氧化表现出最强的催化活性和增敏作用。在 Nafion 膜覆盖的 CTAB 修饰碳糊电极上,NO 的安培响应与其浓度在 $3.6 \times 10^{-8} \sim 1.8 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系,检出限为 1.8×10^{-8} mol/L。该电极作为低成本、高灵敏的 NO 电化学传感器,被成功应用于大鼠肺组织细胞中 NO 释放的实时监测。

关键词:表面活性剂;碳糊电极;自组装;一氧化氮;电化学传感器

中图分类号:O657.1

文献标识码:A

文章编号:1006-6144(2010)02-0143-05

表面活性剂能自发吸附在电极溶液界面,形成有序的单分子或多分子层结构,并能改变电极的界面性质,因而被广泛应用于电化学和电分析化学领域^[1]。Hu 等^[2-7]在表面活性剂的界面吸附行为表征及电分析应用方面开展了系统深入的研究。基于表面活性剂形成的稳定单分子层结构,Hu 等^[8]还成功实现了血红蛋白在碳糊电极表面的自组装固定与直接电子传递。

作为一种细胞内信使分子,NO 广泛参与血管调节、神经传递和免疫反应等生理和病理调节^[9-10],因此其检测对于生物医学研究具有重要的意义。在众多的 NO 分析方法中,电化学方法优势明显^[11-12]。其中,化学修饰微电极可用于生物组织中 NO 释放的直接检测^[12-16]。目前,常见的 NO 电化学敏感材料包括金属卟啉配合物^[17-18]、金属酞菁配合物^[19]和高分子材料^[20-21]等,而以表面活性剂作为敏感材料的 NO 电化学传感器尚未见报道。基于简单的表面自组装技术,作者制备了一种十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)单分子层修饰碳糊电极,研究了 NO 在该电极上的电化学行为,建立了一种简单、快速的 NO 电化学检测方法,并探索其在大鼠肺组织细胞 NO 释放监测中的应用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI 660A 电化学工作站(上海辰华仪器公司),采用三电极系统:表面活性剂修饰碳糊电极为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。采用半密闭电解池,测量前先通 30 min 高纯 N₂ 除氧,测量时用微量注射器向磷酸盐缓冲溶液(PBS)中加入一定体积的 NO 饱和溶液至所需浓度。实验温度为室温(25)。

5.0% Nafion 购自 Aldrich 公司,用无水乙醇稀释至 0.1%;L-精氨酸(L-Arg)购自上海试剂公司;NO

收稿日期:2009-07-21

修回日期:2009-09-15

基金项目:国家自然科学基金(No.20805035,90817103)

* 通讯作者:胡成国,男,博士,副教授,研究方向:生物电分析化学。

气体通过 NaNO_2 与稀 H_2SO_4 的反应产生,其饱和溶液和标准溶液的制备同文献^[21];磷酸盐缓冲溶液(PBS)的组成为 8.0 g/L NaCl 、0.2 g/L KCl 、0.2 g/L KH_2PO_4 和 2.87 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,并用 HCl 和 NaOH 溶液调节至 $\text{pH} = 7.4$;表面活性剂(上海试剂公司)均配成 0.01 mol/L 的水溶液;其它试剂为分析纯,未经纯化直接使用;实验用水为二次蒸馏水。

1.2 表面活性剂修饰碳糊电极的制备

将光谱纯石墨粉与石蜡油以 100 mg/16 μL 的比例混合调成糊状,挤入到一支自制的聚四乙烯管(内径 2.0 mm)中,并用铜线引出导电。将该电极在称量纸上打磨光滑,于 0.01 mol/L CTAB 溶液中浸泡 30 s,取出在水中浸洗 30 s,空气中自然晾干,即为 CTAB 修饰碳糊电极(CTAB/CPE)。用微量注射器取 2.0 μL 0.1% Nafion 溶液滴涂到 CTAB/CPE 表面,即制备出 Nafion 膜覆盖的 CTAB/CPE(Nafion/CTAB/CPE)。Nafion 膜能提高 CTAB/CPE 的稳定性,还可以排除某些阴离子物质的干扰。

1.3 电化学分析步骤

NO 测定前,先将修饰电极置于 10 mL PBS 底液中,在 0.0~0.8 V 区间内以 100 mV/s 循环扫描至恒定。采用循环伏安法研究 NO 传感器的电化学响应,电位范围 0.0~0.8 V。采用安培法在 0.70 V 恒电位下研究传感器对 NO 的线性响应,实验时用微量注射器向含 10 mL PBS 溶液的半密闭电解池中连续加入 NO 标准溶液,并记录电流响应。

1.4 大鼠肺组织细胞中 NO 释放的实时监测

将大鼠用乙醚麻醉窒息死亡,然后迅速移入超净台内,再分别用 2% 碘酊和 75% 乙醇消毒胸腹部皮肤,用医用镊剪打开胸腔,取出肺组织,用无菌 PBS 洗净血液,并剪成小碎块,置于经高温消毒除菌的 10 mL 塑料离心管内,加入含胰酶的 PBS 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 10 min,然后以 4 000 r/min 离心 4 min,弃去上层溶液,向沉淀物中加入 1 mL PBS 并摇匀,再以 4 000 r/min 离心 4 min。如此洗涤三次,向沉淀物中加入 1 mL PBS 并摇匀,即得到肺组织细胞溶液。电化学测量肺细胞中 NO 的释放前,先将传感器置于空白 PBS 底液中,如上所述循环扫描至电流稳定。再将传感器置于含肺细胞的 10 mL 半密闭 PBS 中,在恒电位 0.70 V 下进行安培实验。

2 结果与讨论

2.1 NO 的电化学行为

NO 在不同电极上的循环伏安图如图 1 所示,NO 在裸碳糊电极(CPE)上的氧化峰不明显(曲线 a);而在 CTAB/CPE 上,于 0.60 V 处产生一个灵敏的氧化峰,峰电流达 56.0 μA (曲线 b),表明 CTAB 膜对 NO 的氧化呈现良好的电催化活性和增敏作用。CTAB 分子结构中没有任何特殊的功能化基团,对 NO 的催化氧化机理不同于金属卟啉和高分子染料聚合物,应归结于电极表面 CTAB 单分子层疏水性微环境对自由基性 NO 的富集及稳定效应。当 CTAB/CPE 上加涂 Nafion 膜后,NO 的氧化电流(峰)下降约 30%,而峰电位负移 20 mV(曲线 c),同时在 0.73 V 处出现一个弱氧化峰(峰)。若将经过富集的修饰电极转移至空白 PBS 中扫描,峰 仍然保留,而峰 消失。因此,峰 应为 NO 的吸附峰,而峰 可能为 NO 的扩散峰。

研究了不同扫描速率下 NO 在 Nafion/CTAB/CPE 上的电化学行为(峰)。结果表明,NO 的氧化峰电位随扫描速率的增加而逐渐正移。在 50~200 mV/s 范围内,其峰电流(I_p)与扫描速率(v)呈较好的线性关系,其线性方程为: $I_p(\mu\text{A}) = 12.1 + 111.2 v(\text{V/s})$,相关系数为 0.9993,说明峰 为 NO 在 Nafion/CTAB/CPE 上受吸附控制的电极反应过程,这与图 1 的结论吻合。

2.2 表面活性剂类型的影响

图 2 是 NO 在不同表面活性剂修饰碳糊电极上的循环伏安响应。在阳离子表面活性剂修饰电极上,NO 表现出灵敏的氧化峰。其中,CTAB 修饰电极上的氧化电流最大,氧化电位也最负(曲线 a);在具有与 CTAB 类似烷基链长度的十六烷基溴化吡啶(CPB)修饰电极上,NO 的氧化电流次之(曲线 b);随着烷基链长度的增大(十八烷基三甲基溴化铵(STAB),曲线 c)或减小(十四烷基溴化吡啶(TPB),曲线 d),NO 的氧化电流都会减小。非离子表面活性剂 Triton X-100(曲线 e)和阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)(曲线 f)修饰电极上,NO 氧化峰的峰形较差,峰电流也较低。

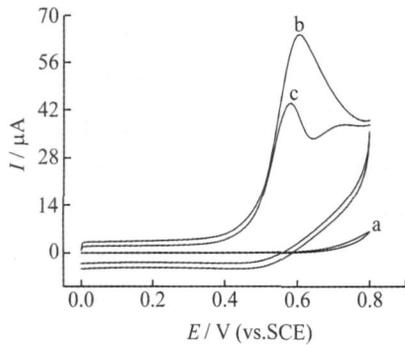


图 1 3.6×10^{-5} mol/L NO 在不同碳糊电极上的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of 3.6×10^{-5} mol/L NO in pH 7.4 PBS at CPE (a), CTAB/CPE (b) and Nafion/CTAB/CPE (c)

Accumulation time:30 s; Accumulation potential:0.0 V; Scan rate:0.1 V/s.

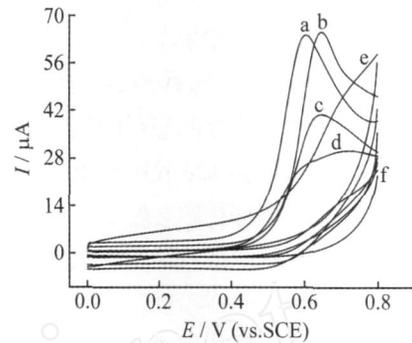


图 2 NO 在不同表面活性剂修饰碳糊电极上的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of 3.6×10^{-5} mol/L NO in pH 7.4 PBS at CTAB/CPE (a), CPB/CPE (b), STAB/CPE (c), TPB/CPE (d), Triton X 100/CPE (e) and SDS/CPE (f)

Accumulation time:30 s; Accumulation potential:0.0 V; Scan rate:0.1 V/s.

表面活性剂能通过疏水吸附在碳糊电极表面形成单分子吸附层,其极性端暴露在溶液中,从而改变电极溶液界面的电化学特性^[6,22-23]。同时,NO 分子上有一个未成对电子,是具有给电子能力的自由基性小分子。由图 2 可知,NO 在 SDS 和 Triton X-100 修饰电极上的响应相比于裸电极也有明显的增强,但远弱于阳离子表面活性剂修饰电极。这表明,NO 在阳离子表面活性剂修饰电极表面的高效富集可能源于表面活性剂正电性亲水基与电负性 NO 分子之间的静电作用。另一方面,CTAB 具有合适长度的烷基疏水链,能在碳糊电极表面形成最致密有序的疏水性单分子层,在电分析体系中往往表现出最强的增敏效果^[7,23-24],这可以解释 CTAB 修饰碳糊电极上 NO 电化学响应最灵敏的现象。因此,阳离子表面活性剂修饰碳糊电极上 NO 的高效富集与电化学增敏机制可能源于 NO 与表面活性剂单分子层之间的疏水和静电相互作用(图 3)。

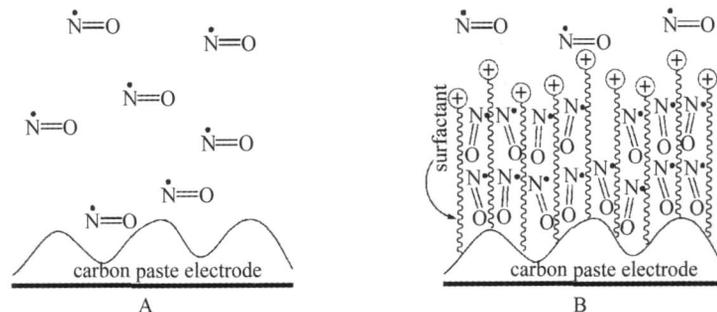


图 3 阳离子表面活性剂单分子层对 NO 的电化学增敏机制示意图

Fig. 3 Schematic representation on the possible mechanism of surface enrichment of NO at bare CPE (A) and cationic surfactant modified CPE (B)

2.3 计时库仑研究

根据 Cottrell 方程^[25],NO 发生氧化反应的电子转移数可由计时库仑实验中的电量 (Q) 与时间平方根 ($t^{1/2}$) 之间线性关系的斜率求算,而其斜率可表示为 $2nFAD^{1/2}c^*t^{1/2}$ 。式中, n 是电子数, A 是电极的表现面积, c^* 是 NO 的浓度, D 是 NO 在水溶液中的扩散系数 ($D = 2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ^[26])。由线性关系得到的斜率为 $32.0 \mu\text{C} \cdot \text{s}^{-1/2}$,可推算出电子转移数 $n = 0.9$,这表明 NO 在 Nafion/CTAB/CPE 上的电化学氧化(峰)是一个单电子转移的过程。

2.4 NO 传感器的安培响应

研究表明,传感器 Nafion/CTAB/CPE 对 NO 具有较好的灵敏度(图 4)。在 0.7 V 恒电位下,其安培响应与 NO 浓度在 $3.6 \times 10^{-8} \sim 1.8 \times 10^{-5}$ mol/L 呈良好的线性关系: $I(\text{nA}) = 2.2 + 84.4 \times c_{\text{NO}}(\mu\text{mol/L})$

L), 相关系数 $R=0.9994$ 。当信噪比(S/N)等于 3 时, 检出限可达 1.8×10^{-8} mol/L。

2.5 NO 传感器的抗干扰能力

采用安培法考察了传感器的抗干扰能力。以信号变化 $<5\%$ 为准, 当 NO 浓度为 1.8×10^{-6} mol/L 时, 5.0×10^{-4} mol/L L-Arg、 1.0×10^{-4} mol/L 牛血清白蛋白(BSA)、 1.0×10^{-5} mol/L NO_2^- 、 2.0×10^{-5} mol/L 抗坏血酸(AA)和 1.0×10^{-5} mol/L 尿酸(UA)均不干扰 NO 的测定, 而同等浓度的多巴胺(DA)、盐酸肾上腺素(EP)和去甲肾上腺素(NE)有干扰。

2.6 大鼠肺细胞中 NO 释放的实时监测

生物体内的 NO 是一氧化氮合酶(NOS)以 L-Arg 为底物催化产生的。用新制备的传感器监测大鼠肺细胞中 NO 的释放过程, 结果如图 5 所示。当 PBS 中加入 1.0 mmol/L L-Arg 时, 传感器仅有较小的电流变化(曲线 a), 源于高浓度 L-Arg 的电化学响应。然而, 当 PBS 中有大鼠肺细胞(最终浓度为 6.25×10^3 个 cell/mL)存在时, 在 200 s 处加入 1.0 mmol/L L-Arg 后, 传感器上出现显著的电流变化(曲线 b)。同时, 大鼠肺细胞存在下, L-Arg 加入前后的一段时间内, 该传感器的电流响应均无明显变化, 表明加入 L-Arg 时的电流变化应源于大鼠肺细胞中 NOS 在 L-Arg 刺激下连续释放的 NO。根据传感器的灵敏度可估算出, 所释放 NO 的浓度为 $1.4 \mu\text{mol/L}$ 。因此, 该 NO 传感器可用于实际生物组织样品的分析。

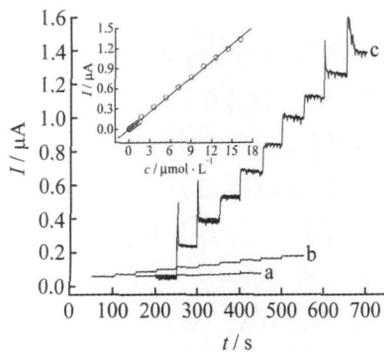


图 4 NO 在 Nafion/CTAB/CPE 上的安培响应

Fig. 4 Amperometric response at Nafion/CTAB/CPE for successive injection of 3.6×10^{-8} (a), 1.8×10^{-7} (b) and 1.8×10^{-6} mol/L NO (c) in deaerated PBS (pH 7.4), and the linear relationship between amperometric current and NO concentration (inset)

Operational potential: 0.70 V.

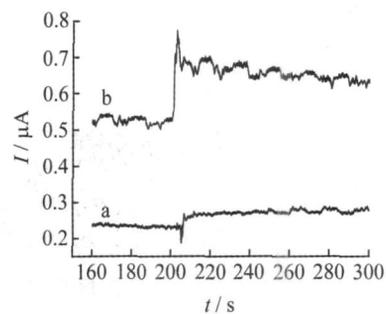


图 5 L-精氨酸刺激下大鼠肺组织释放 NO 在 Nafion/CTAB/CPE 上的安培响应: (a) 空白 PBS 缓冲液; (b) 大鼠肺组织样品 PBS 缓冲液

Fig. 5 Amperograms of Nafion/CTAB/CPE in deaerated PBS (pH 7.4) in the absence (a) and the presence (b) of rat lung samples by adding 1.0 mmol/L L-Arg

Operation potential: 0.70 V.

参考文献:

- [1] Rusling J F. Acc. Chem. Res. [J], 1991, **24**(3): 75.
- [2] Hu S S, Yan Y Q, Zhao Z F. Anal. Chim. Acta [J], 1991, **248**(1): 103.
- [3] Yi H C, Wu K B, Hu S S, Cui D F. Talanta [J], 2001, **55**(6): 1205.
- [4] Hu S S, Wu K B, Yi H C, Cui D F. Anal. Chim. Acta [J], 2002, **464**(2): 209.
- [5] Zhang S, Wu K B, Hu S S. Talanta [J], 2002, **58**(4): 747.
- [6] Hu C G, Hu S S. Electrochim. Acta [J], 2004, **49**(3): 405.
- [7] Hu C G, Dang X P, Hu S S. J. Electroanal. Chem. [J], 2004, **572**(1): 161.
- [8] Lu Q, Hu C G, Cui R, Hu S S. J. Phys. Chem. B [J], 2007, **111**(33): 9808.
- [9] Schmidt H H, Walter U. Cell [J], 1994, **78**(2): 919.
- [10] Kerwin J F, Lancaster J R, Feldman P L. J. Med. Chem. [J], 1995, **38**(22): 4343.
- [11] Bedioui F, Villeneuve N. Electroanalysis [J], 2003, **15**(1): 5.
- [12] Wadsworth R, Stankevicius E, Simonsen U. J. Vasc. Res. [J], 2006, **43**(1): 70.
- [13] Gryglewski R J, Palmer R M, Moncada S. Nature [J], 1986, **320**(6061): 454.
- [14] Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper H M, Noack E, Schrader J. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1988, **154**(1): 236.

- [15] Taha Z H. Talanta [J], 2003, **61**(1) :3.
- [16] Parniente F, Alonso J L, Abruna H D. J. Electroanal. Chem. [J], 1994, **379**(1-2) :191.
- [17] Manlinski T, Taha Z. Nature [J], 1992, **358**(6388) :676.
- [18] Trevin S, Bedioui F, Devynck J. J. Electroanal. Chem. [J], 1996, **408**(1-2) :261.
- [19] Pontie M, Pontie H, Bedioui F. Sens. Actuat. B [J], 1999, **56**(1-2) :1.
- [20] Friedemann M N, Robinson S W, Gerhardt G A. Anal. Chem. [J], 1996, **68**(15) :2621.
- [21] Wang Y Z, Hu S S. Biosens. Bioelectro. [J], 2006, **22**(1) :10.
- [22] Xie P P, Chen X X, Wang F, Hu C G, Hu S S. Colloids. Surf. B [J], 2006, **48**(1) :17.
- [23] Yuan S, Hu C G, Hu S S. Electrochim. Acta [J], 2006, **51**(25) :5274.
- [24] Hu C G, He Q, Li Q, Hu S S. Anal. Sci. [J], 2004, **20**(7) :1049.
- [25] Bard A J, Faulkner L R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications [M]. New York: Wiley, 2001 :210.
- [26] Colucci J A, Foral M J, Langer S H. Electrochim. Acta [J], 1985, **30**(4) :521.

Electrochemical Sensor of Nitric Oxide Based on Self-Assembled Monolayer of Surfactant on Carbon Paste Electrode and Its Application in Biological System

ZHANG Xiao-lin^{1,2}, PENG Yan-fen², XU Yan-xia², HU Cheng-guo^{*2}

(1. Gansu Pingliang Medical College, Pingliang 744000;

2. College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract : In this work, a novel electrochemical sensor of nitric oxide (NO) based on a surfactant self-assembled monolayer modified carbon paste electrode (CPE) was reported. The monolayer of surfactant on CPE was believed to create a hydrophobic microenvironment favorable to the accumulation of NO on CPE. A cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), exhibited the strongest catalytic activity and accumulation capacity for the electrochemical oxidation of NO at CPE. The amperometric response of NO at a Nafion film coated CTAB modified CPE was in a good linear relationship with its concentration in the range of $3.6 \times 10^{-8} \sim 1.8 \times 10^{-5}$ mol/L, along with a low detection limit of 1.8×10^{-8} mol/L ($S/N = 3$). This NO electrochemical sensor was successfully applied to the real-time monitoring of NO release from lung tissue cells of rat by the stimulation of L-arginine (L-Arg).

Keywords : Surfactant; Carbon paste electrode; Self-assembling; Nitric oxide; Electrochemical sensor