

· 基础研究 ·

基于 Teflon/纳米金的新型 NO 微传感器制备及性能分析*

吴汪泽¹, 熊涛², 甘甜³, 卢忠心¹, 乔治^{2Δ}

(1. 湖北省武汉市中心医院检验科 430014; 2. 武汉大学医学院微生物教研室, 武汉 430071;

3. 信阳师范学院化学化工学院, 河南信阳 464000)

摘要:目的 探讨基于纳米金修饰玻璃纤维构建的新型一氧化氮(NO)微传感器的性能。方法 以玻璃纤维为基底材料, 采用原位化学种子-生长技术制备了一种 NO 微传感器, 并使用安培响应法考察该微传感器的各种性能。结果 该 NO 微传感器对 NO 反应非常灵敏, 其线性范围为 7.2 nmol/L 至 11.7 μmol/L, 相关系数(*r*)为 0.998, 检出限为 3.6 nmol/L。结论 成功制备了一种基于纳米金柱电极的电化学微传感器, 该 NO 微传感器具有灵敏度高、线性范围宽、重现性好和抗干扰能力强等优点。

关键词:一氧化氮; 电化学微传感器; 纳米金; 原位生长

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.25.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)25-3002-02

Analysis on fabrication and performance of novel NO electrochemical microsensor based on Teflon/Au nanoparticles*

Wu Wangze¹, Xiong Tao², Gan Tian³, Lu Zhongxin¹, Qiao Zhi^{2Δ}

(1. Department of Laboratory, Wuhan Municipal Central Hospital, Wuhan, Hubei 430014, China; 2. Department of

Microbiology, Medical School, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 3. Department of

Chemistry and Chemical Engineering, Xinyang Normal University, Xinyang, Henan 464000, China)

Abstract: Objective To explore the performance of the novel nitric oxide(NO) electrochemical microsensor based on Au nanoparticles(nano-Au) modified glass-fiber. **Methods** With columnar glass-fiber as the substrate material, the in-situ chemical seed-growth technology was adopted to fabricate one kind of electrochemical microsensor based on gold nanoparticles pole electrodes and the amperometric response method was used to investigate the various properties of the NO microsensor. **Results** This microsensor had high sensitivity response to NO, its linear range was 7.2 nmol/L—11.7 μmol/L(*r*=0.998) with a detection limit of 3.6 nmol/L. **Conclusion** A novel electrochemical microsensor based on nano-Au pole electrode was fabricated. The NO microsensor possesses high sensitivity, wide linear range, good reproducibility and excellent anti-interference ability.

Key words: nitric oxide; electrochemical microsensor; Au nanoparticles; in-situ growth

一氧化氮(nitric oxide, NO)是生物机体中一种重要的生物信息分子和效应分子^[1]。它在舒张血管平滑肌、传递神经信息、抑制血小板聚集、介导炎症和免疫反应等生理和病理过程均发挥着重要的作用^[2]。因此其准确检测对 NO 作用机制的研究具有重要的意义。电化学方法是目前惟一能够对生物体内 NO 释放过程进行直接、实时、连续检测的方法^[3]。本实验采用原位化学种子-生长技术, 制备了一种基于纳米金柱电极的 NO 电化学微传感器, 并通过修饰高分子材料 Teflon 膜, 极大地提高了传感器的选择性和稳定性, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 MonoStat 电化学工作站(美国 DTI 公司), AB204-E 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), QB-206 旋转摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司), DHG-9023A 干燥箱(上海精宏仪器有限公司)。直径为 150 μm 的玻璃纤维(美国 WPI 公司), Teflon AF2400(美国 DuPont 公司), 氯金酸、盐酸羟胺、硼氢化钾和柠檬酸钠均购于中国医药集团上海化学试剂公司, 其他试剂均为国产分析纯, 实验用水为双蒸水。

1.2 方 法

1.2.1 NO 标准溶液的制备 如文献[4]所述。

1.2.2 纳米金溶液的制备 将 1 mL 1% 氯金酸溶于 90 mL 双蒸水中, 搅拌 1 min 后加入 2 mL 38.8 mmol/L 柠檬酸钠溶液, 搅拌 1 min。再加入 1 mL 现配的 0.075% 硼氢化钾溶液, 搅拌 5 min, 4 ℃ 避光保存^[5]。

1.2.3 纳米金柱的制备 将长度为 1.5 cm 的玻璃纤维依次置于 10 mmol/L 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液 30 ℃ 浸泡 1 h、纳米金溶液中 4 ℃ 过夜; 然后置于 1.5 mL 双蒸水中, 加入 20 mL 0.2 mol/L 氯金酸和 10 μL 0.2 mol/L 盐酸羟胺, 于摇床上旋转 30 min 后洗涤; 重复以上操作 4 次后自然晾干, 玻璃纤维表面呈金黄色, 即制得纳米金柱。

1.2.4 修饰电极的制备 用银导电胶将细铜丝粘连到纳米金柱的一端, 然后用 10 μL 移液器枪头对其加以固定, 并用环氧树脂胶将两端粘结封闭。将露出的纳米金柱剪至长度为 5 mm, 即制得纳米金修饰玻璃纤维电极。将电极在 1% Teflon 溶液中浸泡 10 s 后, 100 ℃ 烘烤 2 h, 即制得 NO 微传感器。

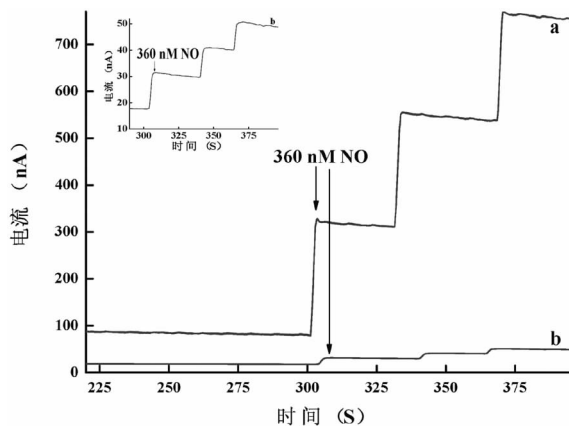
1.2.5 检测方法 采用三电极系统: Ag/AgCl 为参比电极, 铂丝为对电极和所制备的电极作为工作电极。0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.2)作为底液, 利用安培响应法对 NO 进行测定, 考察该 NO 微传感器对 NO 的电化学响应及其灵敏

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61201091)。作者简介: 吴汪泽(1982~), 检验技师, 硕士, 主要从事电化学传感器在实验室诊断中的应用研究。 Δ 通讯作者, Tel:(027)87331681; E-mail: zq6011@163.com。

度、线性范围、重现性和稳定性等。

2 结果

2.1 纳米金柱微电极上 NO 的电化学响应 加入 360 nmol/L 的 NO 标准溶液, 纳米金柱微电极上的氧化峰电流很大(图 1 曲线 a), Teflon 修饰后电极上的氧化峰电流减小(图 1 曲线 b); Teflon 修饰后电极的背景噪声明显减小, 且背景基线显著降低。由于纳米金柱具有较大的有效表面积, 为 NO 的电化学氧化提供更多的活性位点, 因此纳米金柱对 NO 的氧化有优异的电催化作用, 见图 1。



a: 纳米金柱微电极; b: Teflon 修饰纳米金柱微电极。

图 1 不同修饰电极上 NO 的安培响应

2.2 NO 微传感器的性能分析 在 10 mL 半密闭电解池中以 5 mL PBS 作为底液, 插入电极, 在氮气保护下, 加入一定体积的 NO 标准溶液到底液中, 利用安培响应法对 NO 进行测定。随着 NO 标准溶液的连续加入, 其氧化峰电流迅速增加并很快达到稳态, 并与加入 NO 标准溶液的量呈正相关。在 7.2 nmol/L 至 11.7 μ mol/L 范围内呈良好的线性关系 ($r = 0.998$), 线性方程是 $I/nA = 15.028 + 0.036 CNO$, 检出限是 3.6 nmol/L ($S/N = 3$)。同一支 NO 微传感器连续 5 次相同检测, 相对标准差 (RSD) 为 2.4%, 将同批制备的 5 支 NO 微传感器在相同条件下检测, RSD 为 4.6%, 表明该传感器具有良好的重现性。将传感器在室温下放置 7 d, 其响应电流是放置前的 95%, 提示其稳定性优异。干扰试验的结果显示: 2 μ mol/L 的 NO_2^- 、多巴胺 (DA)、抗坏血酸 (AA) 和 NH_4^+ , 或 20 μ mol/L 的 NO_3^- 、尿酸 (UA)、葡萄糖等物质对 NO 的检测不产生干扰 (信号变化小于 5%)。因此, 该传感器具有良好的选择性, 可用于检测生物样品中 NO 含量。

3 讨论

硝酸甘油作为治疗突发性心绞痛的特效药已沿用了 100 多年, 其药理作用是硝酸甘油在生理条件下释放出的 NO 可以舒张心血管平滑肌, 近年逐渐发现 NO 在生物体内发挥着更加重要的作用。NO 作为一种重要的生物信使分子, 参与血管调节、神经传递、炎症与免疫等过程, 其广泛分布在脑、血管、肺、生殖器等多种组织器官中, 且与高血压、心肌缺血、动脉硬化和哮喘等系统性疾病有关^[6-8]。对 NO 的认识首先要归功于微量分析技术的发展, 因为 NO 在机体内的浓度通常处于纳摩尔级水平, 且 NO 半衰期为 5 s, 因而直接检测难度极大^[9]。因此, 准确地分析 NO 在生物机体中的浓度变化, 已成为进一步揭示 NO 功能的必要手段。

建立准确、简便、快速、灵敏的 NO 检测方法成为医学界普

遍关心的问题, 重氮反应法是目前应用最为广泛的方法之一, 其原理是通过检测 NO 的代谢终产物 NO_2^- 和 NO_3^- 来间接推算出 NO 的浓度。但机体中 NO_2^- 和 NO_3^- 不完全来源于 NO 代谢, 这就造成该方法存在较大误差^[10]。电化学方法能够直接、实时、连续检测生物体内释放的 NO, 其特点是灵敏度高、响应快、操作简单、选择性好、仪器设备成本低^[11]。安培响应法是在工作电极和参比电极间施加一个固定电位, 通过检测 NO 氧化时所产生的微小的氧化峰电流, 氧化峰电流与 NO 的浓度呈正相关。其具有灵敏度高和响应时间快等优点, 可用于检测生物体内 NO 浓度随时间变化的情况^[12]。

纳米金具有良好的生物兼容性和优异的电催化性能^[13], 本研究选择直径为 150 μ m 的柱状玻璃纤维为基底材料, 采用原位化学种子-生长技术, 制备了一种基于纳米金柱的 NO 电化学微传感器。采用快速化学还原法制备纳米金晶核, 并将晶核作为种子吸附在玻璃纤维表面; 然后在稳定的生长溶液中将氯金酸还原为金单质, 随着金单质在纳米金晶核上不断析出, 纳米金颗粒逐渐变大, 从而实现纳米金颗粒的可控生长。Teflon 是目前已知所有聚合物中透气性最高的高分子化合物^[14], 允许 NO 以与样品中的 NO 浓度成比例的速度通过 Teflon 膜达到电极表面并被氧化, 大大加快了传感器的响应时间。Teflon 膜还可以防止蛋白质等一些生物分子在电极表面的非特异性吸附而引起的电极表面钝化, 从而提高电极的稳定性和电极的使用寿命。本研究还考察了体内存在的一些电活性强的物质对微传感器检测的影响, 发现微传感器不受高浓度的亚硝酸盐、硝酸盐、多巴胺、抗坏血酸、铵盐和 L-精氨酸等生物小分子的干扰, 信号变化均小于 5%, 且干扰实验前后加入同浓度的 NO 标准溶液, 其安培响应无显著差别。因此, 本方法制备的微传感器表现出灵敏度高、线性范围宽、重现性好和抗干扰能力强等优点。

综上所述, NO 电化学微传感器的使用为 NO 的实时检测和生物样品的检测提供了一种实用、简便的方法, 不仅能够从本质上揭示某些生理现象, 也为探索相关疾病的监控和病理研究提供了技术保障。

参考文献:

- [1] 赵保路. 一氧化氮自由基[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 15.
- [2] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response[J]. Nat Immunol, 2001, 2(10): 907-916.
- [3] 陈晓霞, 易洪潮, 王颖, 等. 一氧化氮电化学传感器及其在生物医学中的应用[J]. 现代科学仪器, 2006, 6(3): 17-20.
- [4] Zheng DY, Hu CG, Peng YF, et al. A carbon nanotube/polyvanillin composite film as an electrocatalyst for the electrochemical oxidation of nitrite and its application as a nitrite sensor[J]. Electrochim Acta, 2009, 54(21): 4910-4915.
- [5] Brown KR, Walter DG, Natan MJ. Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions improved control of particle size and shape[J]. Chem Mater, 2000, 12(2): 306-313.
- [6] 武宇阳, 明钰, 姚尚龙. 吸入一氧化氮对内毒素性急性肺损伤大鼠的作用[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2012, 41(1): 41-44.

参考文献:

- [1] Cau SB, Guimaraes DA, Rizzi E, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(2):372-381.
- [2] Ben-David D, Livne E, Reznick AZ. The involvement of oxidants and NF- κ B in cytokine-induced MMP-9 synthesis by bone marrow-derived osteoprogenitor cells[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(7):673-688.
- [3] Zhang JJ, Xu ZM, Chang H, et al. pyrrolidine dithiocarbamate attenuates nuclear factor- κ B activation, cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic epithelial cells[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2011, 72(3):163-168.
- [4] Kumar S, Seqqat R, Chgurupati S, et al. Inhibition of nuclear factor κ B regresses cardiac hypertrophy by modulating the expression of extracellular matrix and adhesion molecules[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(1):206-215.
- [5] 刘元生, 陈运贞. 慢性心肌梗死大鼠实验模型[J]. *重庆医科大学学报*, 2002, 27(2):153-155.
- [6] Li Y, Ha T, Gao X, et al. NF- κ B activation is required for the development of cardiac hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(4):1712-1720.
- [7] Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE, et al. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 50(5):647-654.
- [8] Rosano JM, Cheheltani R, Wang B, et al. Targeted Delivery of VEGF after a Myocardial Infarction Reduces Collagen Deposition and Improves cardiac function[J]. *Cardiovasc Eng Technol*, 2012, 3(2):237-247.
- [9] Aggeli C, Pietri P, Felekos I, et al. Myocardial structure and matrix metalloproteinases[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(10):1113-1131.
- [10] 杨永健, 张鑫, 朱文玲, 等. 基质金属蛋白酶参与心力衰竭患者心肌细胞外基质的调控[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(24):1693-1696.
- [11] Hojo Y, Ikeda U, Ueno S, et al. Expression Of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction[J]. *Jpn Circ J*, 2001, 65(2):71-75.
- [12] 陈昭喆, 宋亚辉, 谢秀乐, 等. MMP-2 对大鼠心肌梗死后心肌 II、III 型胶原表达的影响及洛沙坦的干预效应[J]. *重庆医学*, 2007, 36(12):1173-1174.
- [13] Gu Y, Wang X. Artemisinin Attenuates Post-Infarct Myocardial Remodeling by Down-Regulating the NF- κ B Pathway[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 227(3):161-170.
- [14] Xie Z, Singh M, Singh K, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1 β [J]. *J Bio Chem*, 2004, 279(38):39513-39519.
- [15] Li YQ, Zhang ZX, Xu YJ, et al. N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor- κ B activation in alveolar macrophages by different mechanisms[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(3):339-346.
- [16] 刘晓黎, 王昌明, 蒋明, 等. 核转录因子- κ B 抑制剂对慢性阻塞性肺疾病气道、肺血管重构的防治作用[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(4):582-584.
- (收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-05-21)
- (上接第 3003 页)
- [7] 王立生, 潘令嘉, 施理, 等. 苏州市 1 453 名女性血清一氧化氮与高血压关系的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(8):4-6.
- [8] 张诗卉, 丁建松, 焦阳, 等. 双歧杆菌的完整肽聚糖对 LPS 激活裸鼠腹腔巨噬细胞的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(1):760-763.
- [9] Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo[J]. *Nitric Oxide*, 2009, 21(2):92-103.
- [10] Sun J, Zhang XJ, Broderick M, et al. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess Reaction assay[J]. *Sensors*, 2003, 3(8):276-284.
- [11] Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples[J]. *Free Radic Bioc Biol Med*, 2007, 43(5):645-657.
- [12] 杜富滢, 黄卫华, 吴文展, 等. 新型微盘传感器的研制及用于单细胞释放 NO 监测[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(6):1069-1071.
- [13] 陈静, 胡文成, 杜凯, 等. 纳米多孔金属的制备方法研究进展[J]. *材料导报*, 2010, 24(16):24-27.
- [14] Cha W, Meyerhoff ME. Enhancing the selectivity of amperometric nitric oxide sensor over ammonia and nitrite by modifying gas-permeable membrane with teflon AF [J]. *Chem Analityczna*, 2006, 51(6):36-44.
- [15] Kamei K, Mie M, Yanagida Y, et al. Construction and use of an electrochemical NO sensor in a cell-based assessing system [J]. *Sensors and Actuators B*, 2004, 99(1):106-112.
- (收稿日期:2013-03-10 修回日期:2013-05-17)