

碳纤维微电极研究*(XVIII)

——亚甲基蓝/Nafion 修饰微柱碳纤维电极 测定血红蛋白的研究

鞠熷先 荀以刚 陈洪渊

(南京大学化学系, 南京, 210008)

摘要 研究了MB/Nafion 修饰微柱碳纤维电极的制备方法, 用扫描电镜对它的表面形态进行了观察. 该电极在缓冲溶液中扫描或放置的稳定性都很好, 在弱酸性介质中, 对血红蛋白在碳纤维电极上的氧化有催化作用, 峰电流的增加与血红蛋白的浓度在 $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内有良好的线性关系, 对 6×10^{-6} mol/L 的血红蛋白测定 6 次的变异系数为 3.5%, 可用于血清中血红蛋白的直接电化学测定, 探讨了电催化作用的机理.

关键词 碳纤维微电极, 微柱电极, Nafion 修饰电极, 亚甲基蓝, 血红蛋白

近年来, 越来越多的科学家对生物分子的电化学测定产生了兴趣^[1], 生物分子与电极之间的电子传递在某种程度上类似于生物分子之间的电子转移过程^[2]. 但由于生物分子所具有的结构以及它在电极表面的吸附而引起的电极钝化, 使其产生很大的过电位, 甚至没有明显的电化学响应. 修饰电极为生物分子的电化学研究提供了新方法. 亚甲基蓝在常规电极上的电化学性质及修饰的研究已有不少报道^[3~7], 文献^[8]也发现它对血红蛋白有电催化作用, 但是对血红蛋白进行直接电化学测定的报道还很少^[7,8]. 在微电极上由于其传质速率很高, 电子传递媒体很快离开电极表面, 使催化效率大大下降^[9], 因而微电极上利用 EC' 过程进行测定还未见报道. 由于微电极具有大电极无法比拟的优越性^[10], 它可用于高阻介质、流动体系、毛细管电泳、生物在体、微区及微样等方面的测定, 因而在微电极上研究 EC' 过程十分必要. 本文利用 Nafion 膜将亚甲基蓝固定在微柱碳纤维电极表面, 降低了媒体(MB)的传质速率, 大大提高了微电极的电催化效率和使用寿命, 从而使微电极上修饰的 MB 在弱酸性介质中能加速血红蛋白的氧化, 对血红蛋白进行电化学测定, 得到了比较满意的结果, 为碳纤维微柱电极的应用提供了新领域.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BAS-100B Electrochemical Analyzer 及 PA-1 Lowcurrent Module (美国 BAS 公司), FPG-310 Color Plotter (日本 Fujitsu 公司), Model-366 Bi-Potentiostat 及 Model RE0150 记

收稿日期: 1993-07-15. 修改稿收到日期: 1993-01-30. 联系人: 陈洪渊. 第一作者: 鞠熷先, 男, 29 岁, 博士, 讲师.

*国家自然科学基金资助课题.

录仪(美国 EG&G 公司), 501 型超级恒温槽(上海实验仪器厂)。

血红蛋白(牛, 结晶纯, 上海生物化学研究所), 亚甲基蓝(A. R., 上海试剂三厂), 配制磷酸盐缓冲溶液(pH 7.2, 0.1 mol/L)及醋酸盐缓冲溶液(pH5.5, 0.1 mol/L)。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为石英亚沸二次蒸馏水。Nafion (5wt%)乙醇溶液(美国 Aldrich 公司), Epon812 环氧树脂(美国)用于电极封口。

1.2 修饰电极的制备

将微柱碳纤维电极在 1.0 mol/L H_2SO_4 中用前文^[11]方法电化学处理后, 浸入 0.5% 的 Nafion 溶液, 几秒钟后取出凉干, 在红外灯下烘干, 重复一次涂饰步骤, 然后将其浸入含 1.0×10^{-3} mol/L 亚甲基蓝的溶液(pH 7.2), 20 min 后取出, 用蒸馏水冲洗, 将其泡在 pH7.2 的缓冲溶液中待用。

1.3 实验方法

以 SCE 作参比电极, Pt 丝为辅助电极, 亚甲基蓝/Nafion 修饰单丝微柱碳纤维电极为工作电极($r=3.8 \mu m$), 在测试溶液通 N_2 10 min 后, N_2 气氛下进行电化学实验, 实验温度控制在 $20 \pm 0.1^\circ C$ 。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极的表面形态

将 Nafion 修饰电极在电子显微镜下观察, 发现一次涂饰 Nafion 并烘干后, 在电极表面形成的 Nafion 膜很不均匀[图 1(a)], 有的地方还没形成膜, 而二次修饰后在电极表面则已形成一层很均匀的膜[图 1(b)], 因此实验采用两次涂饰制备 Nafion 修饰电极。将经 Nafion 修饰过的电极在含 1.0×10^{-3} mol/L 亚甲基蓝的溶液(pH 7.2)中浸泡一定时间, 取出用蒸馏水冲洗后喷金处理, 在电镜下观察发现: 浸泡 20 min 后, 已有亚甲基蓝吸附在电极表面[图 1(c)]; 若浸泡 1 h, 吸附层变厚, 但很不均匀[图 1(d)], 并且电化学响应减小, 循环伏安图的峰形变差。因而实验中浸泡 20 min 制备 MB/Nafion 修饰电极为宜。

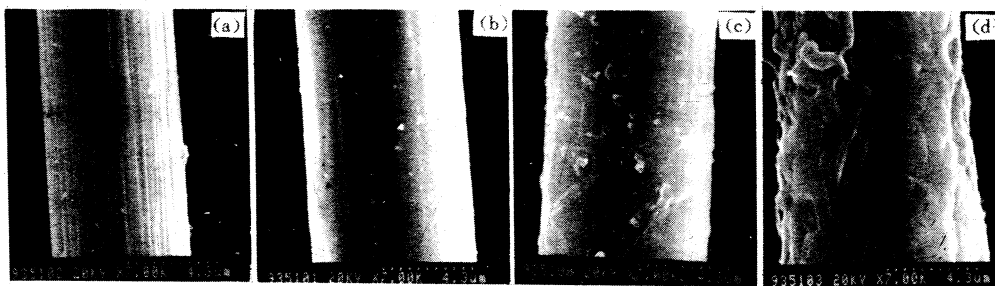


Fig. 1 The scanning electron micrographs of modified carbon fiber microcylinder electrodes

The electrodes were modified with Nafion only once(a) and twice(b). After modifying twice with Nafion, the electrodes were dipped in 1.0×10^{-3} mol/L MB for 20 min(c) and 1 h(d).

2.2 修饰电极的稳定性

将裸露的或经 Nafion 修饰的碳纤维电极在含 1.0×10^{-3} mol/L MB 的 pH7.2 溶液中浸泡 20 min 后置于缓冲溶液(pH 7.2)中, 在 0.0 V ~ -0.6 V 之间循环伏安连续扫描($v=100$ mV/s), 发现裸露的电极在 -0.24 V 和 -0.33 V 处出现一对氧化还原峰, 峰电流不断下降

(图 2(a)), 而经 Nafion 修饰后的电极峰电流很快趋向平衡(氧还原峰电位分别在 -0.31 V 和 -0.38 V) (图 2(b)). 它们的峰电流都以一级动力学规律衰减(图 2(c)), 半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 87 s 和 52 h , 如将亚甲基蓝/Nafion 修饰电极在缓冲溶液中浸泡一周, 浸泡前后峰电流基本上没变化. 可见修饰电极的稳定性非常好.

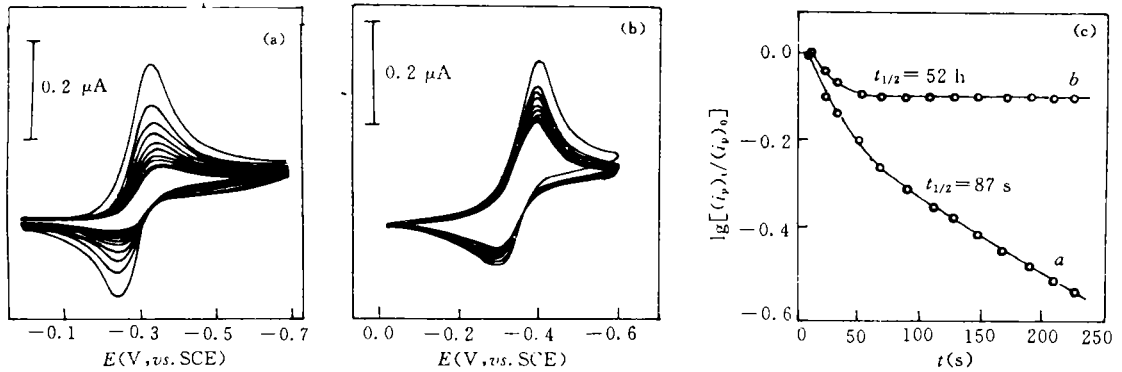


Fig. 2 The cyclic voltammograms of MB adsorbed at a bare (a) and Nafion modified (b) carbon fiber microcylinder electrode, as well as the dependence of $\lg[(i_p)_t/(i_p)_0]$ on scanning time (c)

The $(i_p)_0$ and $(i_p)_t$ are the peak current at the first sweep and time t , respectively.

2.3 修饰电极对血红蛋白的电催化

血红蛋白是红细胞内重要的呼吸蛋白, 对它实现直接的电化学测定具有重要的临床意义. 尽管血红蛋白有电活性中心, 但由于它的特殊结构及易吸附在电极表面而使电极钝化, 它在裸露的碳纤维电极上没有足够的电化学响应, 故在微电极上进行血红蛋白的测定极为困难. 为了充分发挥微电极的优越性, 利用微电极进行一些特殊环境的测试十分必要. 实验结果表明, 血红蛋白可使亚甲基蓝/Nafion 修饰微柱碳纤维电极的空白氧化峰增加, 同时还原峰略有减少, 氧化峰和还原峰的峰电位均略向正移(约 80 mV), 如图 3 所示. 可见, 该电极对血红蛋白的氧化有电催化作用. 催化电流的大小与血红蛋白浓度有关, 这正是定量测定血红蛋白的基础.

2.4 电催化机理

血红蛋白(HB)使 MB/Nafion 修饰电极的氧化峰电流增加, 还原峰有所减少, 表明 HB 对 MB 在电极上的氧化产物有再生能力, 显而易见该电极过程为 EC' 过程. 如将该电极再放入空白缓冲溶液, 则峰电流与图 3 曲线 a 一样, 这表明亚甲基蓝的氧化还原过程发生在电极表面的 Nafion 膜内, 而且固定在膜内的 MB 并未因氧化还原过程的发生而散失; 同时也表明血红蛋白没有渗入 Nafion 膜内, 这可能与它庞大的分子体积以及分子内复杂的基团所带电荷有关. MB 在这一过程中起电子传递媒体的作用. 在不含 HB 的缓冲溶液中, MB 的循环伏安峰电流与扫描速率 v 成正比, 电极过程受膜中 MB 的扩散控制(类似于薄层池); 而有 HB 存在时, 媒体 MB 与 HB 的电子

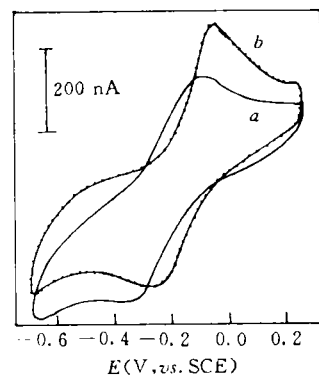
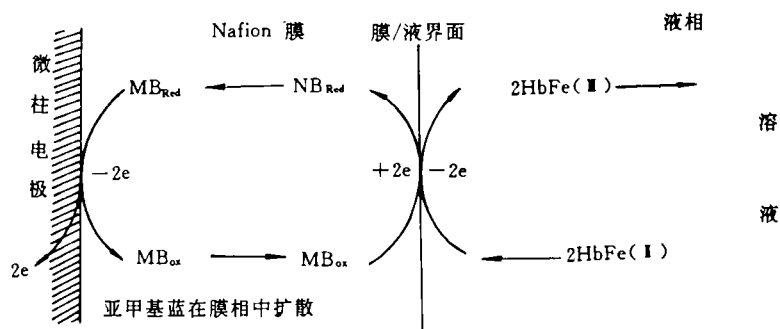


Fig. 3 The cyclic voltammograms of MB/Nafion modified microcylinder electrode at 50 mV/s . a. In pH 5.5 buffer solution; b. In a + $1.0 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ HB.

交换发生在膜界面, 其催化峰电流与 $v^{1/2}$ 成正比, 因而电极过程受溶液中 HB 的扩散控制. HB 在电极表面没有吸附, 而且 EC' 过程中的化学反应速率较大. 已知亚甲基蓝氧化还原过程的电子得失数为 2^[3], 因而, 其电极过程(为方便起见, 忽略了参与电极反应的 H⁺ 和分子的电荷)可由下列图解来表示:



关于催化电流与体系 pH 的关系较为复杂, 不但参与 MB 电极过程的 H⁺ 数及 MB 的氧化速率与 pH 有关, 而且 HB 与媒体 MB 的电子交换速率也与 pH 有关, pH 过小时, Nafion 膜表面的 -SO₃⁻ 基团被酸化, 使带正电荷的血红蛋白(等电点为 6.8)不易靠近电极表面; 而 pH 过高, 同样又存在负电荷的排斥作用.

2.5 峰电流与血红蛋白浓度的关系

在 pH=5.5 的醋酸盐缓冲溶液中, 在血红蛋白浓度为 $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内, 催化电流 (Δi_p) 与浓度有线性关系, 相关系数为 0.998(图 4). 检测下限为 2×10^{-6} mol/L. 在浓度低于 5×10^{-6} mol/L 时, 电流偏离直线, 连续测定 6×10^{-6} mol/L 的血红蛋白 6 次, 峰电流的变异系数为 3.5%.

正常人血液中血红蛋白的浓度约为 0.11~0.22 g/mL (即 $1.71 \times 10^{-3} \sim 3.10 \times 10^{-3}$ mol/L), 因而 MB/Nafion 修饰碳纤维微柱电极可进行血液中血红蛋白的体外测定. 取人血样 0.5 mL, 用 pH5.5 缓冲溶液稀释至 50.0 mL, 取 5.0 mL 溶液直接用微柱修饰电极测定, 3 次结果的平均值为 2.42×10^{-5} mol/L. 用 HiCN 法在 540 nm 处比色测定的结果为 2.46×10^{-5} mol/L; 两者测定的结果一致.

由于血液中其它大分子及细胞对修饰电极的沾污, 使用寿命大大缩短. 例如, 将修饰电极在血样中浸泡 2 h 后, 测定的重复性变差, 峰电流为开始时的 72%, 浸泡时间越长, 电流下降越多. 如将已浸泡 2 h 的电极用缓冲溶液冲洗后再置于样品溶液进行测定, 峰电流可恢复到开始时的 96%, 因而电极使用后要将其浸泡在 pH5.5 的缓冲溶液中.

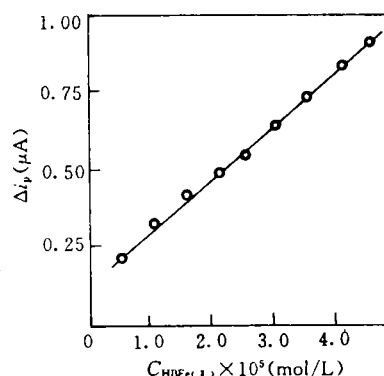


Fig. 4 The curve of Δi_p vs. C_{Hb} at MB/Nafion modified microcylinder electrode
 $v=50$ mV/s, pH=5.5.

参 考 文 献

- 1 Hill H. A. O., Pure Appl. Chem., 1987, 59, 743
- 2 Eddowes M. J. Hill H. A. O., Uosaki K., J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 7113
- 3 DONG Shao-Jun(董绍俊), Song Shi-Hua(宋士华), Acta Chimica Sinica(化学学报), 1991, 49, 493

- 4 Brdicka R. ; Z. Electrochem. , 1942, **48**: 278
- 5 Kuwabata S. , Mitsui K. , Yoneyama H. ; J. Electroanal. Chem. , 1990, **281**: 97
- 6 Lu Z. , Dong S. ; J. Chem. Soc. , Faraday Trans. 1, 1988, **84**(9): 2979
- 7 Ye J. , Baldwin R. ; Anal. Chem. , 1988, **60**: 2263
- 8 ZHOU Jian-Xun(周建迅), WANG Er-Kang(汪尔康); Chinese Science Bulletin (科学通报), 1991, **8**(4): 240
- 9 Dayton M. K. , Ewing A. G. , Wightman R. M. ; Anal. Chem. , 1980, **52**: 2392
- 10 JU Huang-Xian(鞠熲先), CHEN Hong-Yuan(陈洪渊); Chemical Sensors(化学传感器), 1990, **10**(1): 1
- 11 CHEN Hong-Yuan(陈洪渊), JU Huang-Xian(鞠熲先), WU Ci-Ping(吴持平); Chemical Sensors(化学传感器), 1988, **8**(4): 28

Investigation on Carbon Fiber Microelectrodes(XVIII)

——The Determination of Hemoglobin at a Methylene Blue/Nafion Modified Carbon Fiber Microcylinder Electrode

JU Huang-Xian, XUN Yi-Gang, CHEN Hong-Yuan*

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing, 210008)

Abstract The methylene blue/Nafion modified carbon fiber microcylinder electrode is manufactured. The state and constitution of the modified electrode surface is observed by scanning electron microscope. The stability is very good in either events scanned with cyclic voltmetry or immersed in the buffer solution of pH=7.2. The electrode shows significantly electrocatalytic activity to the oxidation of hemoglobin in the system of weak acid, it can be used for the determination of hemoglobin in the range of 5×10^{-6} — 5×10^{-5} mol/L. The variation coefficient of peak current is 3.5% determining continuously 6×10^{-6} mol/L HB for 6 times. The catalytic mechanism is discussed.

Keywords Carbon fiber microelectrode, Microcylinder electrode, Nafion modified electrode, Methylene blue, Hemoglobin

(Ed. : Z, A)

更 正

本刊刊登的“碳纤维微电极研究(V)——高阻介质中二茂铁及其衍生物的动力学研究”(原文见1991, **12**(11): 1459)一文中的式(2)和“碳纤维微电极研究(XI)——利用温度效应测定电极反应的热力学和动力学参数”(原文见1992, **13**(11): 1374)一文中的式(3), 由于作者疏漏, 在计算机撰稿排版和相互拷贝时将所引文献公式中的符号排错, 即均将 $(1+e^{-\zeta})$ 误为 $(1-e^{-\zeta})$ 。但作者在运算时用的仍是正确的公式, 因此并不影响 α 和 k^0 结果的正确性, 特此更正。