

2004-11-28

Electrochemical Behaviours of Hemoglobin-DDAB-Modified Powder Microelectrode and the Application of the Powder Microelectrode in Determination of Nitric Oxide

Zhi-mou GUO

Huan LIU

Jian CHEN

Wen-ting ZHANG

Recommended Citation

Zhi-mou GUO, Huan LIU, Jian CHEN, Wen-ting ZHANG. Electrochemical Behaviours of Hemoglobin-DDAB-Modified Powder Microelectrode and the Application of the Powder Microelectrode in Determination of Nitric Oxide[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2004 , 10(4): 404-408.

DOI: 10.61558/2993-074X.1593

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol10/iss4/6>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号: 1006-3471(2004)04-0404-05

血红蛋白修饰粉末微电极的电化学行为 及其在 NO 检测中的应用

郭志谋, 刘欢, 陈剑*, 张文婷

(武汉大学化学与分子科学学院, 电化学研究中心, 湖北 武汉 430072)

摘要: 制备并研究了使用表面活性剂 DDAB 和血红蛋白(Hb)修饰的粉末微电极(DDAB-Hb-PME)的电化学行为. 结果表明, Hb 于该修饰电极表面的表观载量较之文献报道提高了近 3 个数量级. 在 DDAB-Hb-PME 电极上, Hb 的氧化/还原过程转移的质子数为 1. NO 能在 DDAB-Hb-PME 电极表面富集, 利用 DDAB-Hb-PME 电极检测溶液中的 NO, 可以明显提高电极的输出性能, 测量灵敏度为 $3.1 \text{ mA}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$, 明显大于文献报道值 ($0.001 \sim 0.02 \text{ mA}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$). 相应的线性检测范围为 $9 \sim 100 \text{ nmol L}^{-1}$, 检测下限达到 9 nmol L^{-1} , 并可完全消除溶液中共存的抗坏血酸和尿酸对检测的干扰.

关键词: 血红蛋白; 粉末微电极; 一氧化氮

中图分类号: O 646

文献标识码: A

DDAB (Didodecyldimethylammoniumbromide) 是一种表面活性剂, 在水或氯仿中可以形成“泡囊”, 常用作生物体内亚铁血红蛋白(hemoglobin, 简称 Hb) 等氧化还原蛋白的固定基体. 当 DDAB 在电极表面固化成膜后, 形成“类生物膜”的结构, 在 $-7 \sim -15$ 下会形成液晶相, 能明显地促进蛋白分子与电极表面之间的电子交换反应^[1].

NO 是人体内皮衍生松弛因子, 也是人体神经系统和免疫系统的介质, 具有重要的生理功能. 在生理条件下, NO 在人体内的浓度较低且半衰期较短, 因此难以检测. NO 与 Hb 分子中的辅基 heme 能可逆地形成配位化合物^[2], 因此可以利用 Hb 修饰电极来检测 NO^[3].

应用粉末微电极(powder microelectrode, 简称 PME) 技术制备的修饰电极能明显提高电极的催化活性. 在粉末微电极上氧化/还原电对反应的表现可逆性及表现反应速率均有明显提高. 使用粉末微电极检测富集在电极表面的反应物(如 NO), 其测量灵敏度可因反应物在电极表面的富集而得到大幅度提高^[4].

本文制备并研究使用 DDAB 和 Hb 修饰的乙炔黑粉末微电极(DDAB-Hb-PME) 的电化学行为, 并利用该电极检测溶液中微量的 NO. 实验同时表明, 本法可完全消除溶液中抗坏血酸

收稿日期: 2004-01-17, 修订日期: 2004-02-21

*通讯联系人: Tel: (86-27) 87682858, E-mail: chen-j@whu.edu.cn

国家自然科学基金(30070219)资助

和尿酸对检测的干扰.

1 实验部分

1.1 化学试剂和生化试剂

Hb(Sigma 公司), DDAB(Aldrich), NO 高纯气体(>99.9%) (大连光明气体公司). 缓冲溶液为 pH=7.0 的 0.1 mol/L NaH_2PO_4 + 0.1 mol/L Na_2HPO_4 溶液(简称 PBS). 其他化学试剂均为分析纯, 溶液均用二次蒸馏水配制.

1.2 电极制备

粉末微电极用乙炔黑(acetylene black, 简称 AB, 比表面约 $50 \text{ m}^2/\text{g}$) 制作, 制备方法见文献[5], 电极的微孔直径为 $60 \mu\text{m}$, 孔深约 $90 \mu\text{m}$.

1.3 测量方法及仪器

二电极体系, 饱和甘汞电极(SCE)既是参比电极又作辅助电极. 电化学测量使用 CHI625 电化学工作站(上海辰华), 实验结果由微机记录.

NO 检测用密封且保持氩气氛的电解池. 实验时先将 PBS 溶液用氩气除氧 30min, 再将高纯 NO 通入除氧的 PBS 溶液约 20 min, 制得 NO 饱和溶液(浓度约 1.9 mmol/L). 然后用除氧的 PBS 稀释该 NO 饱和溶液得到一系列不同浓度的 NO 溶液, 分别测量各 NO 溶液的 CV 曲线.

2 结果与讨论

2.1 DDAB-Hb-PME 电极的电化学行为

图 1 是用 DDAB-Hb-PME 电极在 pH=7 的 PBS 溶液中得到的 CV 曲线. 图中, 在 -0.2 V 附近显示出了一对氧化还原电流峰, $E^{\circ'}$ = -0.23 V . 该电流峰乃由 Hb 的电化学氧化还原所致. 如按氧化峰包含的电量计算, 得到 Hb 在 PME 电极上的表观载量为 $2.83 \times 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$, 明显大于文献[6]采用的相同修饰方法, 对常规石墨修饰电极, 得到的 Hb 载量为 $2.2 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$.

上述氧化/还原电流峰的峰电流与扫速成良好线性关系, 且 $E^{\circ'}$ 随 pH 的增大而负移(见图 2). 在 pH=5~13 的范围内, $E^{\circ'}$ 与 pH 值之间存在线性关系, $E^{\circ'}/\text{pH} = 50 \text{ mV}/\text{pH}$, 可见在电极上 Hb 氧化/还原反应转移的质子数为 1, 与文献[7,8]报道的用 DDAB 和 Hb 修饰石墨电极的结论一致.

2.2 DDAB-Hb-PME 电极检测 NO

图 3 是 DDAB-Hb-PME 电极于不同浓度 NO 溶液中测得的 CV 曲线. 如图可见, 在 $+0.7 \text{ V}$ 附近出现了 NO 的氧化电流峰, 其峰电流随 NO 浓度的增大而线性增大. 计算表明, 该氧化电流峰所包含的电量明显大于粉末微电极粉层内可能存在于液相中的 NO 氧化时给出的电量, 显然, 此情况下 NO 已在 DDAB-Hb 修饰的乙炔黑粉末表面发生富集. 又实验表明, 图 1 中出现在 -0.2 V 处的 Hb 氧化峰则随 NO 浓度的增大而逐渐减小, 据此判断, 在 DDAB-Hb-PME 电极上, NO 似与 Hb 中的辅基 heme 形成了配合物^[2]. 这可能就是导致 NO 能够在电极表面

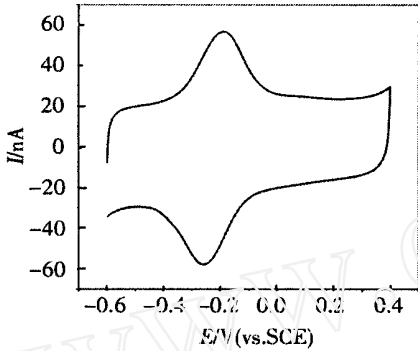


图 1 DDAB - Hb - PME 电极于 PBS 溶液 (pH = 7) 得到的 CV 曲线 电极半径 = 30mm, 电势扫速 = 20mV/s

Fig. 1 CV curves obtained with DDAB - Hb - PME in PBS (pH = 7) radius of the electrode: 30mm, scan rate: 20mV/s

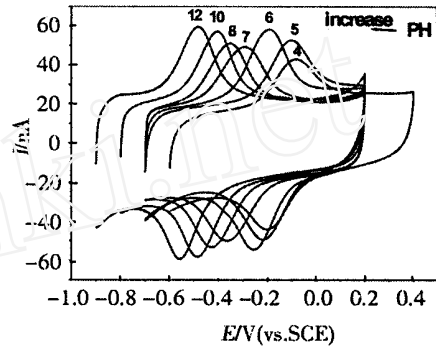


图 2 用 DDAB - Hb - PME 电极于不同 pH 的 PBS 溶液得到的 CV 曲线 电极半径 = 30mm, 电势扫速 = 20mV/s (曲线上的数字代表溶液的 pH 值)

Fig. 2 CV curves obtained with DDAB - Hb - PME in PBS with different pH radius of the electrode: 30mm, scan rate: 20mV/s (the numbers above the curves denote pH)

富集的原因. 用 DDAB-Hb-PME 电极检测 NO, 测量灵敏度为 $3.31 \text{ mA}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$, 明显大于文献报道值 ($0.001 \sim 0.02 \text{ mA}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$)^[9~11], 其线性检测范围为 $9 \sim 100 \text{ nmol L}^{-1}$, 检测下限达到 9 nmol L^{-1} .

2.3 利用粉末微电极技术消除抗坏血酸和尿酸对测量 NO 的干扰

使用 Hb - DDAB-PME 电极检测 NO, 还可同时避免人体体液中存在的还原性小分子, 如抗坏血酸(AA)及尿酸(UA)的干扰. 即如图 4 所示, 若向 NO 溶液中加入 AA 和 UA, 尽管 AA 和 UA 的氧化电流峰分别随其浓度的增加而增大, 但在电势范围 $+0.3 \text{ V} \sim +0.5 \text{ V}$ 之间, 扣除“背景”电流后, NO 的氧化电流基本不受 AA 和 UA 的影响.

3 结 论

1) 使用粉末微电极技术制备的 Hb 修饰电极, 明显提高了 Hb 在电极上的表观载量, 较之文献报道值提高了近 3 个数量级.

2) 由于 NO 能在 DDAB-Hb-PME 电极表面富集, 利用 DDAB-Hb-PME 电极检测溶液中的 NO, 其电极的输出性能大有提高, 测量灵敏度为 $3.1 \text{ mA}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$, 明显大于文献报道值 ($0.001 \sim 0.02 \text{ mA}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$). 该粉末微电极的线性检测范围为 $9 \sim 100 \text{ nmol L}^{-1}$, 检测下限达到 9 nmol L^{-1} .

3) 用粉末微电极技术可完全消除溶液中共存的抗坏血酸和尿酸对 NO 检测的干扰.

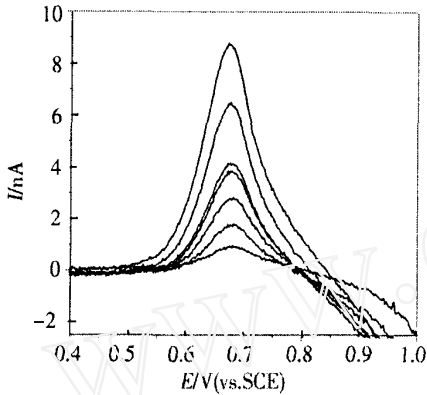


图3 用 DDAB-Hb-PME 电极于不同浓度的 NO 溶液中得到的 CV 曲线氧化支 电极半径 = 30 mm, 电势扫速 = 20 mV/s, NO 浓度由下而上依次为 9.50, 18.98, 28.46, 37.92, 47.38, 66.27, 94.52 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 CV curves obtained with DDAB-Hb-PME in NO solution radius of the electrode: 30mm, scan rate: 20 mV/s, from below to up, the concentration of NO was 9.50, 18.98, 28.46, 37.92, 47.38, 66.27, 94.52 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

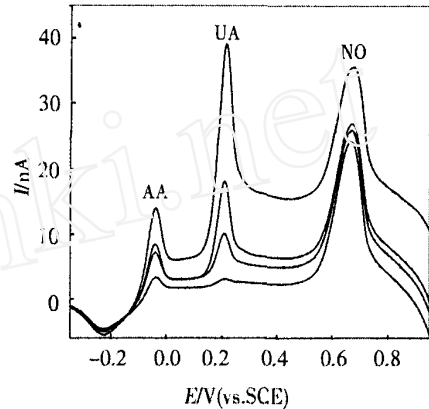


图4 用 DDAB-Hb-PME 电极于同时含有 UA、AA 和 NO 的溶液中得到的 CV 曲线

Fig. 4 CV curves obtained with DDAB-Hb-PME in NO solution coexisting AA and UA the concentration of NO was 94.52 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, radius of the electrode: 30 mm, scan rate: 20 mV/s, the concentration of AA was 0.056, 0.083, 0.111, 0.139 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the concentration of UA was 0.07, 0.104, 0.139, 0.173 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, from below to up

Electrochemical Behaviours of Hemoglobin-DDAB-Modified Powder Microelectrode and the Application of the Powder Microelectrode in Determination of Nitric Oxide

GUO Zhi-mou, LIU Huan, CHEN Jian*, ZHANG Wen-ting

(College of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The electrochemical behaviours of DDAB-Hb-PME were studied in this paper. The apparent surface concentration of Hb was enhanced greatly by using the powder microelectrode technique. NO reacts with Hb and absorbs on the surface of the modified carbon powder. Therefore, the output of the electrode was enhanced greatly by employing PME with higher reaction surface area. The sensitivity of DDAB-Hb-PME is $3.1 \text{ mA}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, which is much larger

than the values obtained with the traditional electrodes. The detection limit is 9 nmol L^{-1} and the linear response range is $9 \sim 100 \text{ nmol L}^{-1}$.

Key words: Hemoglobin, Powder microelectrode, Nitric oxide

References:

- [1] Rusling J F. Enzyme bioelectrochemistry in cast biomembrane-like films[J]. *Acc. Chem. Res.*, 1998, 31: 363.
- [2] Zhang P L, Yu A, Chen H Y. Electrocatalytic reduction of nitric oxide on myoglobin modified electrode[J]. *Acta Chimica Sinica*, 1997, 55:486.
- [3] Mimica D, Zagal J H, Bedioui F. Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films[J]. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 497:106.
- [4] Chen J, Cha C S. Detection of dopamine in the presence of a large excess of ascorbic acid by using the powder microelectrode technique[J]. *J. Electroanal. Chem.*, 1999, 463:93.
- [5] Cha C S, Li C M, Yang H X, et al. Powder microelectrodes[J]. *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 368:47.
- [6] Huang H, Hu N F, Zeng Y H, et al. Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 308:141.
- [7] Liu H Y, Wang L W, Hu N F. Direct electrochemistry of hemoglobin in biomembrane-like DHP-PDDA polyion-surfactant composite films[J]. *Electrochimica Acta*, 2002, 47:2 515.
- [8] Han X J, Huang W M, Jia J B, et al. Direct electrochemistry of hemoglobin in egg-phosphatidylcholine films and its catalysis to H_2O_2 [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, 17:741.
- [9] Fan C H, Li G X, Zhu J Q, et al. A reagentless nitric oxide biosensor based on hemoglobin DNA films[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 423:95.
- [10] Wu F H, Zhao G C, Wei X W. Electrocatalytic oxidation of nitric oxide at multi-walled carbon nanotubes modified electrode[J]. *Electrochemistry Communications*, 2002, 4:690.
- [11] Palmerini Carlo A, Arienti Giuseppe, Palombari Roberto. Electrochemical determination of nitric oxide and of its derivatives[J]. *Talanta*, 2003, 61:37.