

微柱碳纤维电极的分析应用

——电化学预处理和一些神经递质的测定*

彭图治 吕红环 朱 萍

(杭州大学化学系, 杭州 310028)

刘国卿 曹于平

(中国药科大学药理学系, 南京 210009)

提 要

用恒电位方法对碳纤维电极进行表面预处理, 电极经 +3.0V, 30s 和 -2.0V, 10s 电化学处理之后, 对神经递质多巴胺, 5-羟色胺等显示了很高的灵敏度和分辨率, 检测限可达 $5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$, 并能对抗坏血酸和多巴胺进行分辨。实验表明, 这种恒电位预处理方法简便实用, 灵敏度高而稳定性好, 完全适合神经递质的离体和体分析。

关键词 微柱碳纤维电极, 半微分线性扫描伏安法, 神经递质, 恒电位预处理

碳纤维电极的体积极小, 其尖端微柱部分的直径仅 6—10 μm , 长度 1—2mm, 可以直接插入动物体内进行活体分析, 已在脑神经递质测试方面发挥了重大作用^[1-4]。多巴胺, 5-羟色胺等重要神经递质都具有电化学活性, 直接使用碳纤维测定, 灵敏度低而结果不稳定。为此, 电极必须经过 70Hz, 0—3.0V 的三角波预处理^[5], 以达到活化的目的。

本文提出了一种新的碳纤维预处理方法——恒电位法。首先将电极在 +3.0V 活化 30s, 使灵敏度增加, 再置于 -2.0V 处理 10s, 以提高电极的分辨率。处理后的电极对多巴胺和 5-羟色胺的检测限可低达 $5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$, 并能将活体分析中的主要干扰物质抗坏血酸与多巴胺很好地区分。由于一般伏安仪上都具有恒电位功能, 采用这种预处理方法, 无疑将大大简化活体分析的操作程序。

1 材料与方法

1.1 仪器

CV-37 微电流伏安仪及 X-Y 记录仪(美国 BAS), JH2C 恒电位仪(上海电子元件二厂), 毛细管控制器(美国 DKI), 单根微柱碳纤维

玻管电极(纤维直径 7 μm , 长度 2mm; 尖端玻管内径约 10 μm , 外径约 50 μm), Ag-AgCl 参比电极, 铂丝对电极, 10ml 电解池。

1.2 试剂

多巴胺(DA), 5-羟色胺(5-HT), 3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC), 高香草酸(HVA), 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)均为 SIGMA 公司产品, 将上述试剂溶解于 0.1mol/L HClO₄ 溶液中, 配制成 $1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 储备液, 抗坏血酸(AA)储备液浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 。尿酸(UA)储备液浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 称取适量试剂溶于 pH10 NaOH 溶液。底液为 PBS 缓冲溶液(pH7.4), 称取适量下列试剂: KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, KCl 0.2g, MgCl₂ 0.047g, NaCl 8g 溶解于蒸馏水中并稀释至 1L。

1.3 电极的制作方法

碳纤维为美国 Union Carbide 公司产品, 直径 7 μm 。2-氰基丙烯酸乙酯快干胶水为浙江黄岩有机化工厂产品, 将一份此胶水和三份光谱纯碳粉调制导电胶。将一根细铜导线顶

* 系国家和浙江省自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-01-28 修回日期: 1991-04-27

端涂上少许碳粉导电胶,并粘接一根碳纤维(已在丙酮中浸泡 24h),在红外灯下烘干 10min.待导电胶硬化后,将粘有碳纤维的导线穿入玻璃毛细管中,待碳纤维伸出约 1cm 后,在玻璃后端用快速环氧树脂将导线与玻管固定.待环氧树脂硬化后(约 2—3h),用针尖沾取少许快干胶水,小心接触毛细管尖端,在显微镜下可见胶水因毛细现象自动上升并封闭碳纤维和玻管内壁(见图 1).待胶水干燥后,将碳纤维切至 2 mm,即可使用.

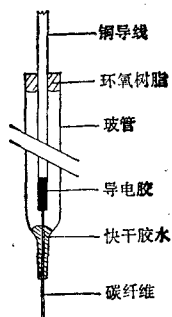


图 1 微柱碳纤维玻管电极示意图

1.4 测定步骤

将碳纤维电极,参比电极和对电极插入 PBS 缓冲溶液中,接通恒电位仪,在 +3.0V 活化 30s,再将电位调至 -2.0V 处理 10s. 将已处理好的电极移入分析溶液中,接通伏安仪,电位从 -0.2V 扫描至 +0.8V,记录半微分伏安曲线.

2 结果与讨论

2.1 碳纤维电极的恒电位预处理

在含有 DA, 5-HT 各为 2×10^{-7} mol/L 的 PBS 缓冲溶液中,经恒电位处理的电极在伏安曲线上显示了明显的 DA 和 5-HT 的半微分电流峰,而未经处理的电极,几乎没有伏安响应(图 2),DA 和 5-HT 的峰电位分别为 +0.18 和 +0.36V (相对于 Ag-AgCl 电极).图 2 证实恒电位预处理活化了碳纤维电极,使其对 DA 等神经递质产生了灵敏的伏安响应.

2.2 电极的灵敏度

实验表明,碳纤维电极灵敏度的提高,即电

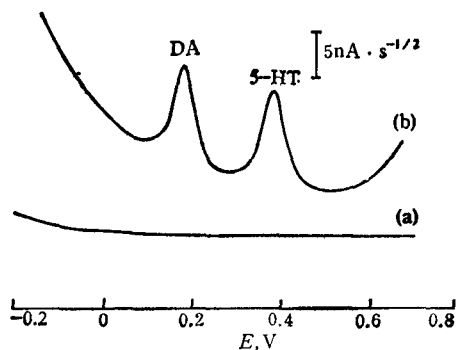


图 2 DA, 5-HT 的半微分伏安图

(a) 未处理电极; (b) 经 +3.0V, 30s, -2.0V, 10s 处理后的电极; DA: 4×10^{-7} mol/L; 5-HT: 4×10^{-7} mol/L; PBS 底液 (pH7.4); 电位扫描速度: 100 mV/s

极的活化,取决于正电位处理,电位数值和处理时间与半微分峰高有密切的关系.表 1 的结果说明,峰高随正电位的增加而升高,但过高的电位会使碳纤维表面产生大量氧气泡,并使纤维折断.同时,峰高也随处理时间增长而升高,但 30s 后趋于稳定.因此,选择的最佳条件为 +3.0V 处理 30s.

表 1 DA 峰高与活化电位及活化时间的关系

活化电位 (V) ¹⁾	2.00	2.25	2.50	3.00	3.25
峰高 (nA · s ^{-1/2})	18	45	105	205	200
活化时间 (s) ²⁾	10	20	30	40	50
峰高 (nA · s ^{-1/2})	96	184	210	196	128

DA: 5×10^{-6} mol/L, 1) 活化时间: 30s, 2) 活化电位: +3.0V

2.3 电极的分辨率

在活体分析中,AA 严重干扰 DA 的测定,由于 AA 本身浓度较高并且与 DA 具有相近的峰电位,在伏安图中两峰重叠而无法测定.图 3a 表明了当 AA 浓度为 2×10^{-5} mol/L 时对 2×10^{-7} mol/L DA 的干扰情况.为此,将活化后的电极再置于 -2.0V 处理 10s,电极显示了很好的分辨率,AA 和 DA 峰间距 (ΔE_p) 相差 170mV (图 3b). ΔE_p 与负电位和处理时间有关,当电位低于 -2.0V,时间超过 10s 后, ΔE_p 不再有明显变化.

2.4 标准曲线

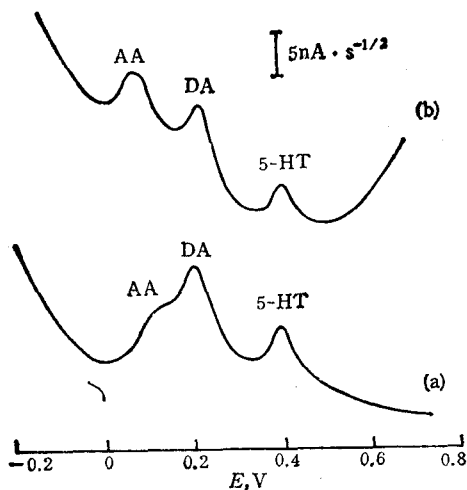


图 3 不同电位处理的 AA, DA, 5-HT 半微分伏安图
(a) +3.0V, 30s 处理; (b) +3.0V, 30s; -2.0V, 10s 处理; AA: 2×10^{-5} mol/L; DA: 2×10^{-7} mol/L; 5-HT: 2×10^{-7} mol/L; 其他条件同图 2

DA 及其代谢产物 DOPAC 和 HVA, 5-HT 及其代谢产物 5-HIAA 的浓度与半微分峰高具有线性关系, 图 4 显示了 DA, 5-HT 和 5-HIAA (10^{-7} mol/L) 和 DOPAC, HVA (10^{-6} mol/L) 的标准曲线。DA 标准曲线斜率为 $5.2 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1/2} (10^{-7} \text{ mol/L})$, 相关系数为 0.9917; 5-

HT 斜率 $5.0 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1/2} (10^{-7} \text{ mol/L})$, 相关系数 0.9959; 5-HIAA 斜率 $3.3 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1/2} (10^{-7} \text{ mol/L})$, 相关系数 0.9935; DOPAC 斜率 $2.1 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1/2} (10^{-6} \text{ mol/L})$, 相关系数 0.9959; HVA 斜率 $2.2 \text{ nA} \cdot \text{s}^{-1/2} (10^{-6} \text{ mol/L})$, 相关系数 0.9798. 由于碳纤维电极的伏安响应受到多种因素, 如纤维品种, 纤维长度及制作方法等的影响, 虽然采用相同的处理方法, 每根电极的灵敏度会略有差别。因此, 对于选定用作活体分析的电极应分别作其标准曲线。

2.5 峰电位和检测限

经恒电位处理的电极在半微分伏安法中测定 DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA 时的峰电位和检测见表 2。其中对 DA 的检测限低于文献[1]报道的采用三角波活化, 示差脉冲伏安法的检测限。

2.6 电极的稳定性

电极经恒电位处理后, 在测定中显示了良好的稳定性。对同一支电极在 5×10^{-7} mol/L DA 溶液中连续 9 次测定结果表明, 相对标准偏差为 5.9%, 变动系数 2.28。由于活体分析时间较长, 试验了 7 根电极在 24h 前后测定的峰高改变情况, 平均变化率为 6.2% (表 3)。

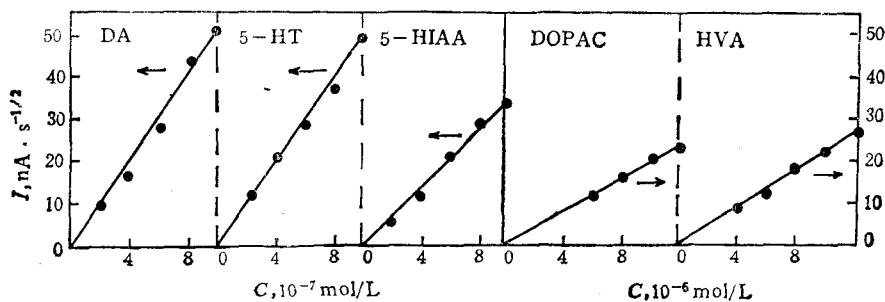


图 4 标准曲线
(条件同图 2)

表 2 部分神经递质的峰电位和检测限¹⁾

神经递质	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
峰电位 (V)	+0.18	+0.18	+0.54	+0.36	+0.29
检测限 (mol/L)	5×10^{-8}	5×10^{-6}	4×10^{-6}	5×10^{-8}	1×10^{-7}

1) 因电极不同, 略有变化。

表 3 24h 稳定性试验¹⁾

电极编号	1	2	3	4	5	6	7
原始峰高 ($\text{nA} \cdot \text{s}^{-1/2}$)	13.5	14.0	18.5	13.7	18.2	15.5	16.0
24h 后峰高 ($\text{nA} \cdot \text{s}^{-1/2}$)	14.5	16.5	21.5	14.0	16.0	15.0	17.5
峰高变化率 (%)	+7	+17	+16	+2	-4	-3	+9

1) DA: $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$

2.7 碳纤维活化机理探讨

电极经恒电位处理后,灵敏度增加,分辨率改善,与碳纤维表面性质有密切关系。为了研究电位处理的本质,对处理前后的电极分别进行了扫描电镜 (SEM) 观察和 X 射线光电子能谱 (XPS) 及循环伏安法 (CV) 实验。放大 10000 倍的 SEM 照片显示,普通碳纤维表面条纹细而密,而处理后的表面条纹变宽,阴影加深,表明电极表面经处理后变得粗糙而疏松,由此引起的表面积增加和表面净化^[6]都有利于电极灵敏度提高。XPS 的结果显示,碳纤维表面碳氧比值从未处理前的 0.047 急剧增加到处理后的 0.13,表明电极表面在处理过程中生成了大量含氧基团。在纯底液中的 CV 图表明,处理后的电极在 $+0.35 \sim +0.50 \text{V}$ 之间出现了对明显的氧化还原峰,进一步证明该类含氧基团的存在,根据峰电位可以推断这类基团极可能是碳表面氧化过程中生成的类醌基团^[7]。

Oenas 等的研究表明,AA 在电极上的氧化是受类醌基团催化所致,并且具有极大的催化速度^[8]。由此,我们认为还原态类醌基团对 AA 的催化氧化,大大加速了 AA 在电极上的反应速度,使峰电位负向移动,导致了 AA 与 DA 的分辨。

参 考 文 献

- 1 Gonon F, Buda M J, Cespuaglio R *et al. Nature*, 1980; 286: 902
- 2 邓家祺,葛振方,盛玲玲等. 见: 1987 年电分析化学学术会议论文集,广州: 中国化学会,1987: B33
- 3 吴持平,陈洪渊,方惠群. 分析化学,1988;16: 566
- 4 傅业伟,郑建斌,傅紫霞. 分析化学,1990;18: 485
- 5 Gonon F, Fombarlet C M, Buda M J *et al. Anal Chem.* 1981; 53: 1386
- 6 Wang J, Peng T, Vince V. *J Electroanal Chem*, 1987; 234: 119
- 7 Engstrom R C, Strasser V A. *Anal Chem*, 1984; 56: 136
- 8 Oenas N, Rozgaite J, Pocius A *et al. J Electroanal Chem*, 1983; 154: 12

一种简便灵活的蛋白质结晶的接种技术

戴伟文 熊建平 郝治平 夏宗茅

(中国科学院上海有机化学研究所,上海 200032)

提 要

介绍一种简便灵活的蛋白质结晶的微量接种技术,描述了接种容器的特点、接种方法、实验技巧及其在蛋白质单晶培养中的应用。

关键词 蛋白质,晶体生长,接种技术

蛋白质晶体结构的研究是近三十余年发展起来的一门新兴学科,现已成为生命科学中的一个重要领域。作为研究工作的第一步是得到

可用于 X-射线衍射的单晶,而由于蛋白质的 X