

电化学和新能源

基于化学修饰玻碳电极的血清素生物医学传感

张少洋¹, 刘晓军^{1,2,3}, 朱春楠^{1,2,3}, 刘超^{1,2,3}, 郑冬云^{*1,2,3}

(1. 中南民族大学 生物医学工程学院, 湖北 武汉 430074;

2. 医学信息分析及肿瘤诊疗湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430074;

3. 认知科学实验室国家民委重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘要:以玻碳电极为基底,多壁碳纳米管-聚溴酚蓝纳米复合膜为敏感功能材料,采用简单可控的滴涂成膜法和电化学聚合合法,构建了一种新型血清素生物医学传感界面。借助于电化学技术、扫描电镜技术和交流阻抗技术对传感界面的构建和适用条件进行了优化,对传感机理进行了探讨,并对传感器的性能进行了评价。在最佳检测条件下,传感器用于血清素检测的线性范围为: $2.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ mol/L,检出限为 6.0×10^{-8} mol/L,灵敏度为 $2.26 \mu\text{A}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 。此外,该传感器性能良好,用于血清样品中血清素含量检测时,响应迅速,结果准确。

关键词:溴酚蓝;多壁碳纳米管;化学修饰电极;血清素;检测

中图分类号: O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2025)02-0055-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0364

Biomedical Sensing of Serotonin based on Chemical Modified Glassy Carbon Electrode ZHANG Shao-yang¹, LIU Xiao-jun^{1,2,3}, ZHU Chun-nan^{1,2,3}, LIU Chao^{1,2,3}, ZHENG Dong-yun^{*1,2,3} (1. School of Biomedical Engineering, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China; 2. Hubei Key Laboratory of Medical Information Analysis and Tumor Diagnosis & Treatment, Wuhan 430074, China; 3. Key Laboratory of Cognitive Science of State Ethnic Affairs Commission, Wuhan 430074, China)

Abstract: Using a glassy carbon electrode as the substrate and a multi-walled carbon nanotube-polybromophenol blue nanocomposite film as the sensitive functional material, a new type of serotonin biomedical sensing interface was constructed by simple and controllable drop-coating method and electrochemical polymerization method. The construction and application conditions of the sensing interface were optimized by means of electrochemical technology, scanning electron microscopy, and impedance technology. The sensing mechanism was investigated, and the performance of the sensor was evaluated. Under the optimal detection conditions, the linear range of the sensor for the detection of serotonin ranged from 2.0×10^{-7} mol/L to 2.0×10^{-5} mol/L, the detection limit was 6.0×10^{-8} mol/L, and the sensitivity was $2.26 \mu\text{A}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$. In addition, the sensor has good performance, rapid response and accurate results when used to detect the content of serotonin in serum samples.

Key words: bromophenol blue; multi-walled carbon nanotubes; chemical modified electrode; serotonin; detection

血清素,又称 5-羟色胺,是哺乳动物体内的一种神经递质,在调节情绪、睡眠等生理功能方面发挥着重要的作用^[1-4],在人体血液中的正常浓度范围为 $0.4 \sim 1.6 \mu\text{mol/L}$ ^[5],浓度异常可导致糖尿病、偏头疼以及抑郁症等多种疾病^[6-10]。因此,实现对血清中 5-羟色胺含量的高灵敏快速检测对于相关疾病的诊断具有重要的临床意义。

已报道的血清素检测方法主要有生物法、放射免疫法、荧光法以及高效液相色谱法等^[11-14]。与上述检测方法相比,电化学传感法^[15-19]因具有灵敏度高、选择性好、响应时间短、仪器价格低廉、使用方便、可实现实时监测等优势,而备受青睐。

本文通过一步电聚合法在玻碳电极(Glassy carbon electrode, GCE)上修饰聚溴酚蓝(Poly(bromophenol blue), PBPB),再通过滴涂成膜法进一步修饰多壁碳纳米管(Multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs),从而制得 MWCNTs/PBPB/GCE,构建了一种新型血清素生物医学传感界面。

收稿日期:2024-07-15;修回日期:2024-08-21

基金项目:企事业单位委托项目:神经递质生物医学传感器研发(HZY22134)。

作者简介:张少洋(1999-),男,安徽六安人,硕士生,主要研究方向为电化学传感。

通讯作者:郑冬云, E-mail: wintercloud@mail.scuec.edu.cn。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

CHI830D 型电化学工作站、饱和甘汞电极 (SCE)、铂柱电极 (上海辰华仪器有限公司); 玻碳电极 (GCE, $\Phi = 3.0$ mm, 天津高仕睿联仪器有限公司); pH5-3E 型酸度计 (上海佑科仪器仪表有限公司); KQ3200DB 型超声仪 (上海科导超声仪器有限公司); Universal 320R 型超速离心机 (德国 Hettich 公司); PGUV-10-AS 型超纯水仪 (武汉品冠仪器设备有限公司); SU8100 型场发射扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); Zennium IM6 型电化学交流阻抗系统 (德国 Zahner 公司)。

5-羟色胺盐酸盐 (5-HT)、磷酸盐缓冲液 (PBS) (上海源叶生物科技有限公司); 硝酸、无水乙醇、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $K_2Fe(CN)_6$ 、溴酚蓝 (Bromophenol blue, BPB)、多巴胺 (Dopamine, DA)、抗坏血酸 (Ascorbic acid, AA)、尿酸 (Uric acid, UA)、葡萄糖 (Glucose, Glu) (国药集团化学试剂有限公司); 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 多壁碳纳米管 (MWCNTs, 苏州碳丰科技有限公司); 科研用人体血清 (南京信帆生物技术有限公司)。所用试

剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 血清素电化学传感器的制备

MWCNTs/PBPB/GCE 的制备及其应用过程示意图如图 1 所示, 主要包括以下几个步骤: 1) GCE 的预处理: 首先, 将直径为 3 mm 的裸 GCE 在含有抛光粉泥浆的抛光布上进行打磨 (抛光粉的主要成分是 Al_2O_3 , 颗粒直径为 50 nm); 然后, 依次用体积比为 1:1 的硝酸水溶液、无水乙醇和超纯水进行超声清洗, 各 2 min; 最后, 取出晾干备用。2) PBPB/GCE 的制备: 将预处理后的 GCE 置于浓度为 5×10^{-4} mol/L 的溴酚蓝磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH 5.6) 中, 于 $-1.0 \sim 1.8$ V 的电位区间内, 以 100 mV/s 的扫描速率, 循环伏安扫描 20 圈, 即可制得 PBPB/GCE。3) MWCNTs/PBPB/GCE 的制备: 首先, 将 10 mg MWCNTs 加入 10 mL (1 mg/mL) SDS 水溶液中, 超声分散 8 h, 制得浓度为 1 mg/mL 的 MWCNTs 分散液; 然后, 取 8 μ L 上述分散液滴涂至 PBPB/GCE 表面, 自然晾干, 即可制得 MWCNTs/PBPB/GCE。4) MWCNTs/GCE 的制备: 将 8 μ L (1 mg/mL) 的 MWCNTs 分散液滴涂至裸 GCE 表面, 自然晾干, 即可制得。

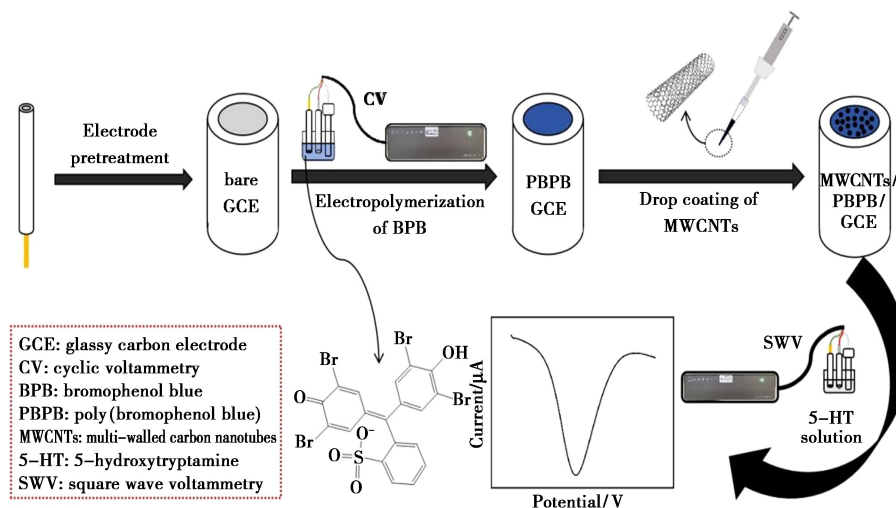


图 1 MWCNTs/PBPB/GCE 的制备及应用示意图

Fig.1 Schematic diagram of preparation and application of MWCNTs/PBPB/GCE

1.2.2 血清素的电化学检测

检测体系均采用三电极系统: GCE 或修饰 GCE 为工作电极; SCE 为参比电极; 铂柱电极为对电极。检测底液为 0.1 mol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 扫描电位范围为 0.1~0.5 V。

1.2.3 血清样品预处理

将一定量的科研用人血清于 3 000 r/min 的

转速下, 超速离心 5 min, 取上清液备用。

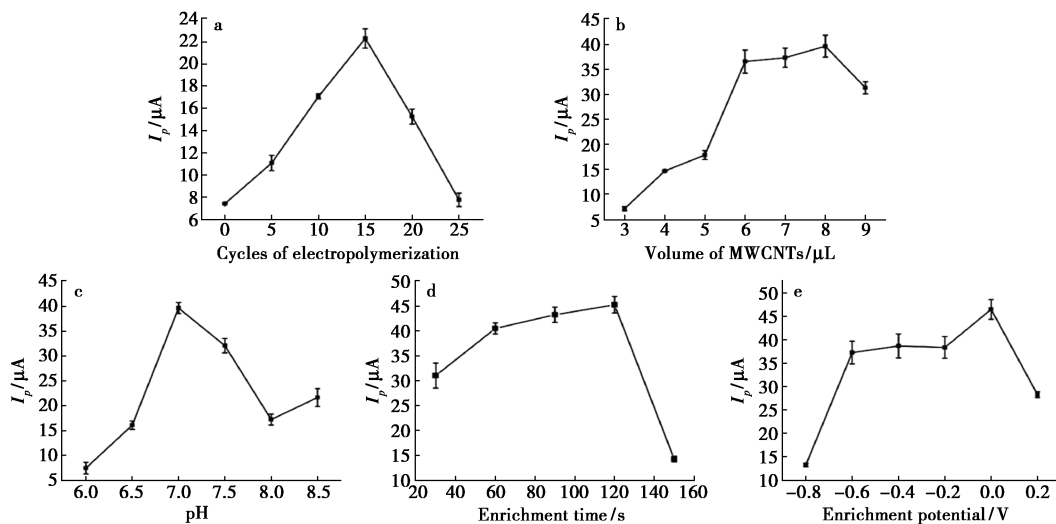
2 结果与讨论

2.1 传感器制备与使用条件优化

为确保 MWCNTs/PBPB/GCE 用于血清素检测时拥有良好的性能, 首先对 MWCNTs/PBPB/GCE 的制备及使用条件进行了优化, 包

括 PBPB 的聚合圈数、MWCNTs 的滴涂量、检测底液 pH、富集时间和富集电位,结果如图 2 所示,PBPB 的最佳聚合圈数为 15;MWCNTs 的最佳滴涂量为 8 μL ;人体血液正常 pH 范围为

7.35~7.45,因此底液最佳 pH 选择为 7.4;最佳富集时间为 60 s(120 s 时的响应电流最大,但与 60 s 时相差甚微,选择 60 s 可节约时间);最佳富集电位为 0 V。



a. 优化 PBPB 聚合圈数; b. 优化 MWCNTs 滴涂量; c. 优化底液 pH; d. 优化富集时间; e. 优化富集电位

图 2 传感器制备及使用条件的优化

Fig.2 Optimization of preparation and use conditions for the sensor

2.2 不同电极表面形貌表征

图 3 为裸 GCE、PBPB/GCE、MWCNTs/GCE 和 MWCNTs/PBPB/GCE 的扫描电镜图,裸 GCE 表面光滑洁净;PBPB/GCE 表面有一层网状的薄膜,使电极表面变得粗糙,凹凸不平;在 MWCNTs/GCE 表面可看到大量的 MWCNTs,细致紧密;而在

MWCNTs/PBPB/GCE 表面,MWCNTs 的量有所增加且较疏松多孔,有利于增大电极有效面积,提高血清素在电极表面的富集量。

2.3 电化学交流阻抗表征

以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 为探针,借助于电化学交流阻抗谱(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)技术,对不同电极进行了表征,结果如图 4 所示。图中半圆半径的大小代表电阻的大小,显然,裸 GCE 的电阻最大(曲线 1),修饰 PBPB 后,电阻明显降低(曲线 2),继续修饰 MWCNTs 后,电阻进一步降低(曲线 3),表明 MWCNTs-PBPB 纳米复合膜可有效改善电极表面的导电性,从而加快界面电子传递速率。

2.4 血清素在不同电极上的电化学响应

借助方波伏安法(Square wave voltammetry, SWV),对比了相同浓度的血清素在不同电极上的电化学响应,结果如图 5 所示。在空白溶液中,传感器无响应(曲线 2);当底液中含有 20 $\mu\text{mol/L}$ 血清素时,相较于裸 GCE(曲线 1)、PBPB/GCE(曲线 3)和 MWCNTs/GCE(曲线 4),在 MWCNTs/PBPB/GCE(曲线 5)上出现了一个最为灵敏的电化学响应信号,表明纳米复合膜对血清素的电化学响应具有明显的增敏效应。

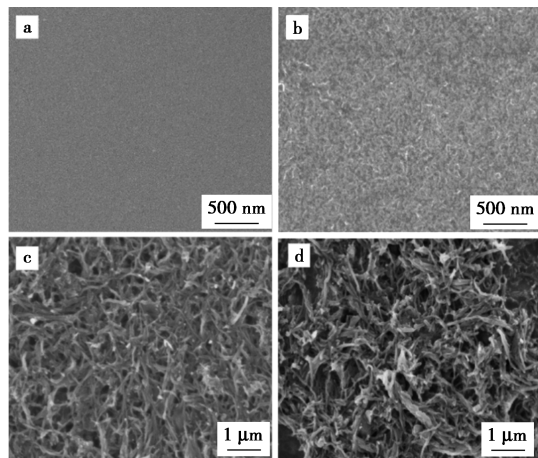


图 3 裸 GCE(a)、PBPB/GCE(b)、MWCNTs/GCE(c)、MWCNTs/PBPB/GCE(d)的扫描电镜图

Fig.3 SEM images of bare GCE(a), PBPB/GCE(b), MWCNTs/GCE(c) and MWCNTs/PBPB/GCE(d)

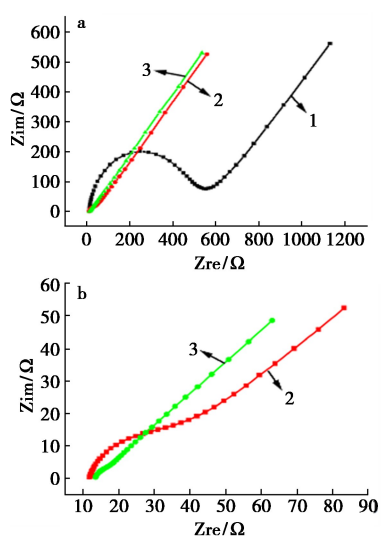
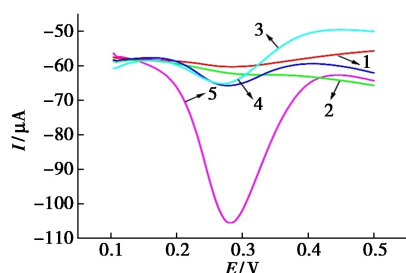


图 4 裸 GCE(曲线 1)、PBPB/GCE(曲线 2)及 MWCNTs/PBPB/GCE(曲线 3)电极的 EIS 图(a)和局部图(b)

Fig.4 EIS images (a) of bare GCE(line 1), PBPB/GCE(line 2) and MWCNTs/PBPB/GCE (line 3) and partial image (b)



曲线 1、3、4、5 分别为底液中含有 20 μmol/L 血清素时,裸 GCE、PBPB/GCE、MWCNTs/GCE、MWCNTs/PBPB/GCE 的 SWV 响应;曲线 2 为空白溶液中电极响应

图 5 血清素在不同电极上的 SWV 响应

Fig.5 SWV response of serotonin on different electrodes

2.5 扫描速率对血清素电化学响应的影响

借助线性扫描伏安法 (Linear sweep voltammetry, LSV), 考察了扫描速率对血清素电化学响应的影响, 结果如图 6a 所示。在 50 ~ 200 mV/s 的扫描速率范围内, 血清素的氧化峰电流 (I_p) 与扫描速率呈良好的线性关系 (图 6b): $I_p = 0.048v + 0.935$, $R^2 = 0.999$, 表明血清素在传感器上的电化学反应过程受吸附控制^[20]。此外, 如图 6c 所示, 血清素的氧化峰电位 (E_p) 与扫描速率的自然对数线性相关: $E_p = 0.030 \ln v + 0.153$, $R^2 = 0.977$ 。根据 Laviron 理论^[21], 可计算得出电子转移数 $n = 1.7 \approx 2$, 即血清素在传感器上发生电化学氧化时,

有两个电子发生了转移。

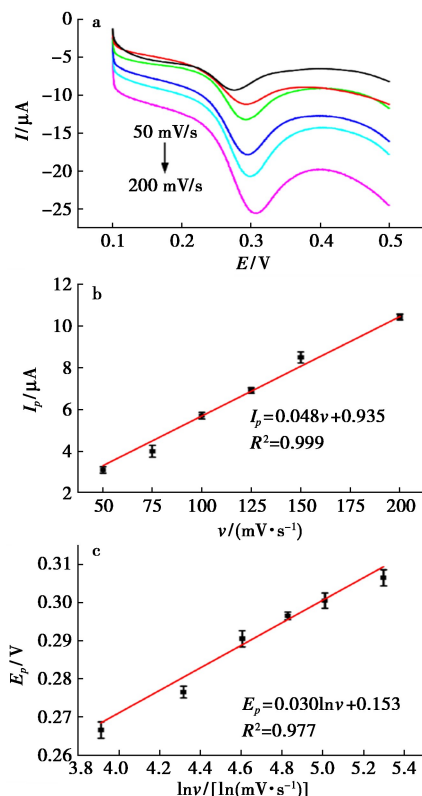


图 6 不同扫速下, 血清素在传感器上的电化学响应图(a)、扫速对血清素氧化峰电流(b)以及氧化峰电位(c)的影响

Fig.6 Electrochemical response of serotonin on the sensor at different scan rates (a), the influence of scan rate on the oxidation peak current (b) and oxidation peak potential (c) of serotonin

2.6 MWCNTs/PBPB/GCE 有效面积的测定

以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 为探针, 采用循环伏安法 (Cyclic voltammetry, CV), 对 MWCNTs/PBPB/GCE 的有效面积进行了测定, 结果如图 7a 所示。结合 Randles-Sevcik 公式^[22], 即公式 (1), 即可计算出电极的有效面积。

$$I_p = (2.69 \times 10^5) \times n^{3/2} v^{1/2} D^{1/2} A c \quad (1)$$

式中, I_p 为氧化峰电流, A; c 为探针溶液的浓度, mol/cm³; A 为电极的有效面积, cm²; D 为扩散系数, 5 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 1 \text{ mol/L KCl}$, $D_{\text{ox}} = 7.63 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$; v 为扫描速率, V/s。

将图 7b 的数据分析结果与公式 (1) 相结合, 计算得到 MWCNTs/PBPB/GCE 的有效面积为 0.046 cm², 是裸 GCE 面积 (0.011 cm²) 的 4.2 倍, 表明 MWCNTs/PBPB 纳米复合膜可显著提高电极的有效面积, 为血清素在电极表面的富集提供更多的活性位点。

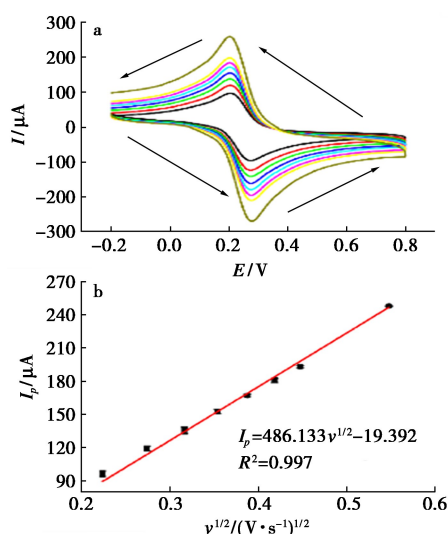


图 7 不同扫速下, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在传感器上的循环伏安响应图(a)和 I_p 和 $v^{1/2}$ 的线性关系(b)

Fig.7 Cyclic voltammograms of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ on the sensor at different scan rates (a) and the linear relationship between I_p and $v^{1/2}$ (b)

2.7 传感器的性能测试

2.7.1 线性范围、灵敏度和检出限

借助于 SWV 技术,对传感器的线性范围、灵敏度以及检测限进行了考察,结果如图 8a 所示。在 $0.2 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,血清素的氧化峰电流(I_p)与其浓度(c)呈良好的线性关系(图 8b): $I_p = 2.260c + 1.053$, $R^2 = 0.998$,传感器的检出限

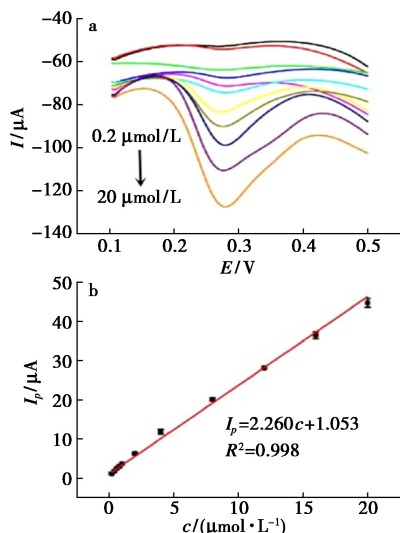


图 8 不同浓度血清素的 SWV 响应图(a)和 I_p 和 c 的线性关系(b)

Fig.8 SWV response of serotonin with different concentrations (a) and linear relationship between I_p and c (b)

为 $6.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$,灵敏度为 $2.26 \mu\text{A}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 。

2.7.2 传感器的选择性

采用 SWV 技术对 MWCNTs/PBPB/GCE 的选择性进行了评价,在含有 $2 \mu\text{mol/L}$ 血清素的底液中加入相同浓度的 4 种常见干扰物:多巴胺(DA)、葡萄糖(Glu)、尿酸(UA)、抗坏血酸(AA)。当底液中只有血清素时,响应电流为 $5.6 \mu\text{A}$,加入干扰物后,如图 9 所示,响应电流仅发生微小的变化,所造成的响应相对误差均小于 5%,表明 MWCNTs/PBPB/GCE 对血清素具有良好的特异性。这可能归功于 MWCNTs 与血清素之间的疏水作用, PBPB 与血清素之间的氢键作用、范德华力和疏水作用。

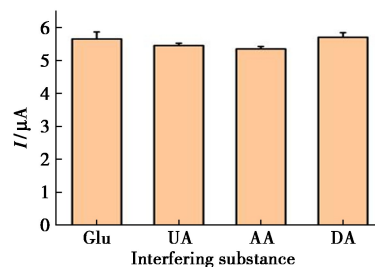
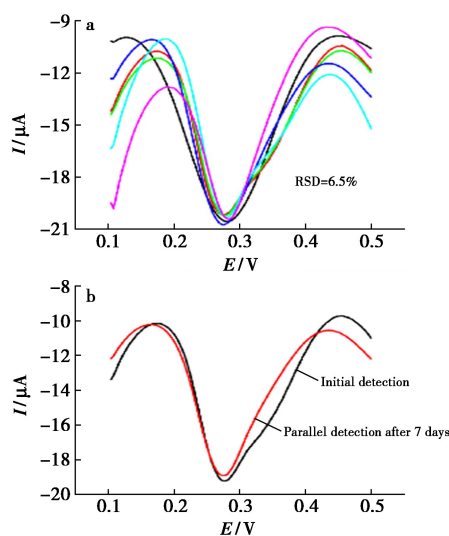


图 9 传感器的选择性

Fig.9 Selectivity of the sensor

2.7.3 重现性和稳定性

借助于 SWV,对传感器的重现性和稳定性进行了考察,结果如图 10 所示。用 6 根不同的 MWCNTs/PBPB/GCE 对 $4 \mu\text{mol/L}$ 的血清素进行平行测定,测定结果的相对标准偏差为 6.5%



a. 重现性考察; b. 稳定性考察

图 10 传感器的重现性(a)和稳定性(b)评价

Fig.10 Evaluation of the reproducibility (a) and stability (b) of the sensor

(图 10a)。对于同一根 MWCNTs/PBPB/GCE, 在空气中静置 7 d 后进行平行测定, 结果仍能维持初始信号的 92.3% (图 10b)。以上结果表明, 传感器具有良好的重现性和稳定性。

2.8 实际样品分析

采用样品加标回收法对血清样品中的血清素进行检测, 结果如表 1 所示。每个样品均平行测定 3 次, 测定结果的相对标准偏差均小于 3.0%, 平均回收率为 100.1%, 说明该传感器用于血清中血清素含量的检测时, 具有良好的重现性和准确性, 为其实用性提供了有效保障。

表 1 人体血清样品中血清素含量的测定

Tab.1 Determination of serotonin in human serum samples ($n=3$)

Sample	Adding standard amount/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Detected amount/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/ %	RSD/ %
1	0	1.50	—	—
2	0.5	2.01	102.5	2.9
3	1.0	2.49	99.2	2.8
4	1.5	2.98	98.7	2.0

3 结论

本文以 MWCNTs-PBPB 纳米复合膜为敏感功能材料, 搭建了一个血清素生物医学传感平台。传感界面疏松多孔的结构, 为血清素的富集提供了更多的活性位点, 可有效提高传感器的灵敏度; 纳米复合膜的良好导电性有利于缩短传感器的响应时间; MWCNTs-PBPB 与血清素之间的相互作用力(范德华力、疏水作用力和氢键等)为传感器的特异性提供了有效保障。传感器制备及操作简单, 且性能良好, 用于血清样品中血清素含量的检测时, 响应快速且灵敏准确, 展现了其良好的生物医学应用前景。

参考文献:

- [1] Tow D H, Chan C H, Howe J R, Ear P H. *Surgery*, 2024, **175**(3): 726-734.
- [2] Kwon W B, Soto J A, Stein H H. *J. Anim. Sci.*, 2022, **100**(1): 356.
- [3] Jiang M Y, Tian L, Su M J, Cao X Q, Jiang Q Y, Huo X L, Yu C M. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, **414**(28): 7 967-7 976.
- [4] Wang S Y, Yang Y L, Si Q Q, Guo T L, Huang X H. *J. Biol.*, 2024, **41**(2): 51-56.

- 王思瑜, 杨雅丽, 司琪琦, 郭泰林, 黄新河. *生物学杂志*, 2024, **41**(2): 51-56.
- [5] Li Y H, Ji Y, Ren B B, Ma G D, Liu X S. *Mater. Res. Bull.*, 2019, **109**: 240-245.
- [6] Guo Z Y, Chen B B, Wang Z B, Jiang X H. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2015, **209**: 579-585.
- [7] Li M H, Yin H, Wang L. *Chin. Med. Mod. Dist. Edu. Chin.*, 2024, **22**(7): 158-161.
- 李梦涵, 尹航, 王蕾. *中国中医药现代远程教育*, 2024, **22**(7): 158-161.
- [8] Wang Y T, Wang S, Tao L, Min Q, Xiang J, Wang Q M, Xie J M, Yue Y, Wu S C, Li X F, Ding H. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **65**: 31-38.
- [9] Evers T M J, Beumer J, Clevers H, Mashaghi A. *Mech. Biol. Med.*, 2024, **2**(2): 100 044.
- [10] Nafiisha G, Marie B, Rodrigue R, Mathilde D, Jennifer G D, Isakson B E, Roger M, Jean-Pierre S, Christelle G. *Front. Physiol.*, 2017, **8**: 76.
- [11] Wu S F. *Ind. Microbiol.*, 2024, **54**(1): 197-199.
- 吴世芳. *工业微生物*, 2024, **54**(1): 197-199.
- [12] Tang S S, Liang A X, Liu M, Wang W, Zhang F L, Luo A Q. *Carbon Lett.*, 2023, **33**(7): 2 129-2 139.
- [13] Chiba T, Maeda T, Tairabune T, Tomita T, Sanbe A, Takeda R, Kikuchi A, Kudo K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, **485**(1): 102-106.
- [14] Liang H R, Zhu M F, Ye H Q, Zeng C Q, Wang S M, Niu Y A. *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1 186**: 339 086.
- [15] Hu P, Zhu X M, Wang J T, Li Z Y, Ji L D. *Shandong Chem. Ind.*, 2024, **53**(9): 263-265; 278.
- 胡鹏, 朱晓明, 王军涛, 李泽宇, 姬柳迪. *山东化工*, 2024, **53**(9): 263-265; 278.
- [16] Wu X Z, Ma P Y, Sun Y, Du F X, Song D Q, Xu G B. *Electroanalysis*, 2021, **33**(8): 1 827-1 851.
- [17] Xu Q Q, Luo L, Liu Z G, Guo Z, Huang X J. *Biosens. Bioelectron.*, 2023, **222**: 114 990.
- [18] Guth U, Vonau W, Zosel J. *Meas. Sci. Technol.*, 2009, **20**(4): 42 002.
- [19] Guo C. *J. Sens.*, 2021, **2 021**: 6 573 771.
- [20] Duan Y, Kong D B, Wang D X, Wang H, Li S N, Hu M K, Zhang J M, Du H J. *Chem. Reagents*, 2023, **45**(9): 116-121.
- 段禹, 孔大彬, 王德响, 王洪, 李胜男, 胡民康, 张津铭, 杜海军. *化学试剂*, 2023, **45**(9): 116-121.
- [21] Laviron E. *J. Electroanal. Chem.*, 1979, **101**(1): 19-28.
- [22] Gau V, Ma S C, Wang H, Tsukuda J, Kibler J, Haake D A. *Methods*, 2005, **37**(1): 73-83.