

离子选择性电极技术快速检测透明质酸钠

陈 燕* 李雪梅 李秋顺 史建国

(山东省科学院生物研究所,山东省生物传感器重点实验室,济南 250014)

摘 要:以聚阴离子透明质酸钠为研究对象,以二壬基萘磺酸为阳离子交换剂,发展了基于鱼精蛋白可控释放的聚阳离子选择性电极,实现了透明质酸钠的快速、高灵敏检测。详细研究了亲脂性有机盐四(4-氯苯基)硼酸四(十二烷基)铵对电极响应性能的影响。在最佳条件下,电极对透明质酸钠的检出限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$,线性范围为 0.1 ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词:离子选择性电极,离子通量,透明质酸钠,聚阳离子。

中图分类号: O657.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2013)12-042-04

透明质酸(HA)最早从牛眼玻璃体中分离得到,又名玻璃酸,是一种链状天然高分子酸性粘多糖类物质。它具有很强的粘弹性,溶解性较差,在使用时常将其转化为钠盐(简称SH)。SH是由D-葡萄糖醛及N-乙酰葡萄糖胺组成的多糖的钠盐,已被广泛的应用于医药、化妆品和保健食品当中,因此它的定量分析在医学、药学和化妆品行业中具有重要^[1~3]意义。目前常用的检测方法有光度法^[4]、生化法^[5]、免疫法^[6]和共振瑞利散射光谱法^[7]等。

聚合物膜离子选择性电极具有操作简单、携带方便、对分析物可进行连续快速检测等优点,已广泛的应用于全血、血清、尿、组织、细胞内液及其稀释液中各种电解质离子的直接测定。近年来,将内充液流向样品溶液的主离子通量用于电位分析的研究受到重视^[8~10]。本文利用聚合物膜离子选择性电极控制识别元素的原位产生和检测,实现了检测的无试剂化。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

聚氯乙烯(PVC)、二壬基萘磺酸(DNNS)、邻硝基苯基辛基醚(*o*-NPOE)、硫酸鱼精蛋白(来源于鲑鱼)、肝素钠(来源于牛肠粘膜)(170 U/mg)、

四(4-氯苯基)硼酸四(十二烷基)铵(ETH 500)、三(十二烷基)甲基氯化铵(TDMAC)、癸二酸二正辛酯(DOS);四氢呋喃(THF);实验用水为二次去离子水(18.2 M Ω)。

1.2 电极的制备

将总量均为 200 mg 的膜 1(具体组成为 PVC: 48%, *o*-NPOE: 48%, ETH 500: 3%, DNNS: 1%)与膜 2(具体组成为 PVC: 66%, DOS: 32.5%, TDMAC: 1.5%),分别溶于 3 mL THF,剧烈搅拌 3 h,将混合均匀的溶液倒入固定在玻璃板上的玻璃环(3.6 cm i. d.)中,溶剂在室温条件下自然挥发完毕后,用打孔器切割成直径为 7 mm 的薄膜,用 THF/PVC 的混合液将敏感膜黏附到聚氯乙烯管顶端。电极在使用之前膜 1 以内充液和活化液均为 0.05 mg/mL 的鱼精蛋白,120 mmol/L NaCl 溶液和 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)溶液的混合液,在 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 活化 12 h;膜 2 的内充液和活化液均为 120 mmol/L NaCl 溶液,使用之前在活化液中活化 12 h。

1.3 电极电位的测定

电化学工作站(上海辰华仪器公司)用于电位测定,内、外参比电极均为 Ag/AgCl 电极,工作电极为鱼精蛋白活化的聚阳离子选择性电极。具体

收稿日期: 2013-05-29

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA021201)与山东省自然科学基金项目(ZR2012CM029)资助

E-mail: ychen@yic.ac.cn

检测过程如下: 首先将电极浸入 Tris-HCl 缓冲溶液中测定, 记录此时的开路电位为空白电位, 加入透明质酸钠后电极电位迅速下降, 根据此时电极电位的初始变化速率对透明质酸钠浓度作图, 得到电极的工作曲线。

电位检测过程中测试电池的结构为: Ag/AgCl/3 mol/L KCl/内充液/离子选择性电极//样品溶液/3M KCl/AgCl/Ag。

2 结果与讨论

2.1 电极的检测原理

和传统的聚离子选择性电极相比, 经主离子(鱼精蛋白)活化后的电极, 零电流条件下能够产生一个从内充液到溶液方向的稳态主离子通量, 向背景溶液中加入透明质酸钠, 由于透明质酸钠与鱼精蛋白之间强烈的相互作用, 使膜表面渗出的鱼精蛋白的量迅速减少, 促使膜相中的鱼精蛋白与溶液相中的 Na^+ 发生交换, 增加了膜相中 Na^+ 的活度, 电极电位迅速下降。完成一次检测之后, 将电极浸入含有高浓度的鱼精蛋白溶液中重新活化, 使鱼精蛋白重新占据膜表面被钠离子占据的离子位点, 完成膜的更新。

2.2 条件优化

2.2.1 ETH 500 含量对电极响应性能的影响 实验证明无离子交换作用的高亲脂性的盐 ETH 500 添加到聚合物膜中能够明显的提高二价离子的选择性^[11, 12]。根据得拜-休克理论亲脂性盐 ETH 500 的加入能够提高膜相中的离子强度, 降低离子的活度系数。对于高价态离子来说, 离子强度的增加使其活度系数的降低幅度比低价态离子大。

根据选择性系数公式(1)可知, 电极对低价态离子的选择性增加。

$$K_{1j}^{\text{pot}} = \frac{k_{1j}^{\frac{z_1}{z_j}} \gamma_1 [I^{z_1^+}]}{k_1 (\gamma_j [J^{z_j^+}])^{\frac{z_1}{z_j}}} \quad (1)$$

基于公式 1 推测高亲脂性的盐 ETH 500 添加到聚合物膜中能够大幅度的提高聚离子电极对低价态离子的选择性。探讨了添加不同浓度的 ETH 500 时, 聚阳离子选择性电极对 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鱼精蛋白阳离子响应的平衡电位, 其测定结果见文献^[10]。

为了考察电极活化时间对电极稳定性的影响, 分别以含有 0.05 mg/mL 鱼精蛋白和 120 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 为内充液和

活化液, 在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下活化电极。为达到相同的测试效果, 不含 ETH 500 的电极需活化 3 d 左右, 含有 3% ETH 500 的电极需要活化 1 d 左右, 含有 6% ETH 500 的电极仅需活化 12 h。由此可以看出, ETH 500 影响电极的活化时间, 其原因可能是由于鱼精蛋白是比较大的生物分子, 具有一定的亲脂性, 随着活化时间的延长, 通过共萃取效应进入膜相的鱼精蛋白的量增加, 增加了从内充液到溶液方向的离子通量, 使膜表面的鱼精蛋白离子浓度增加, 能够消除溶液中钠离子的干扰。

实验进一步研究了含不同 ETH 500 量的电极对透明质酸钠的电位响应, 其结果如图 1(A) 所示。实验中选定 ETH 500 的添加量分别为质量百分数 0%、3% 和 6%, 活化时间为 3 d, 活化液为含有 0.05 mg/mL 鱼精蛋白溶液和 120 mmol/L NaCl 溶液的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液。从图 1(A) 可以看出, 含有 3% ETH 500 的电极, 对 0.5 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 透明质酸钠响应最好。

由于膜相中离子载体 DNNS 的含量决定了电极膜中鱼精蛋白的量, 进而影响电极膜表面渗出的鱼精蛋白的量, 因此离子载体的量决定了电极的灵敏度和选择性。本实验考察了聚合物膜相中 DNNS 的含量对电极响应的影响, 实验结果如图 1(B) 所示。从图中可知, 当膜相中 DNNS 的含量较低时, 电极膜表面渗出的鱼精蛋白的量较少, 在低浓度范围内, 电极的灵敏度较高; 当膜相中 DNNS 的含量较高, 电极膜表面渗出的鱼精蛋白的量较多, 在高浓度范围内, 电极的灵敏度较高。综上可知, 聚合物膜相中 DNNS 的含量为 1% 时, 电极的检出限比较低, 线性范围比较宽, 电极的响应最佳。

2.3 电极的工作曲线

最优条件下, 测定了该电极对一系列浓度的透明质酸钠的电位响应, 其测定结果见图 2。如图所示, 在 0.1 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内电极电位的初始变化速率与透明质酸钠的浓度呈线性关系。线性方程为: $-dE/dt = -0.007 + 0.052\rho$, $r = 0.9981$, dE/dt 单位为 mV/s , ρ 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。电极的检出限为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3σ), 对于 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的透明质酸钠来说, 电极电位响应的相对标准偏差 (RSD) 为 5.0% ($n = 10$)。

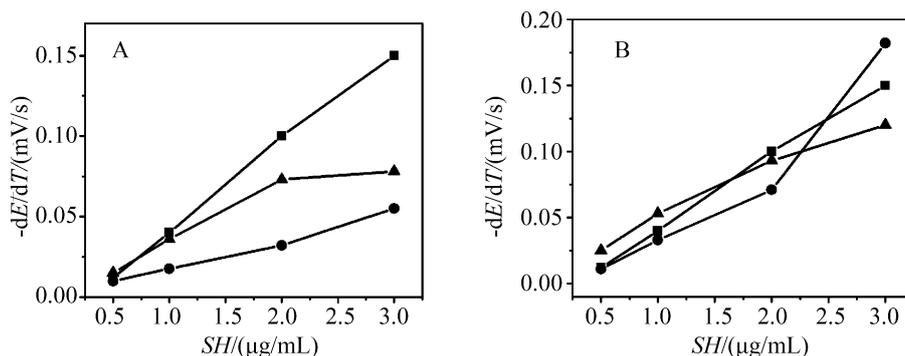


图 1 不同膜组分对电极响应性能的影响

Fig. 1 Effect of different contents of lipophilic salt ETH 500 and DNNS on the electrode responses

A - 膜组成为: 1 wt% DNNS, PCV: *o*-NPOE = 1: 1, ETH 500 的含量分别为(◆) 3(▲) 0(●) 6 % (质量分数); B - 膜组成为: 3 wt% ETH500, PCV: *o*-NPOE = 1: 1, DNNS 的含量分别为(◆) 1(▲) 0.5(●) 3 %

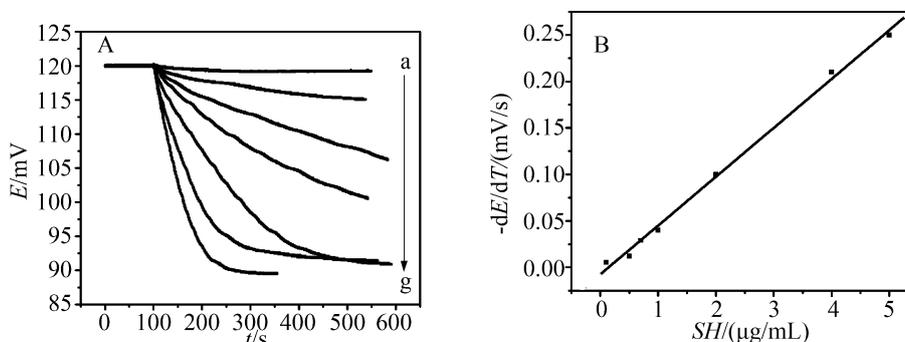


图 2 鱼精蛋白活化的聚阳离子选择性电极对不同浓度 HA 的动态响应曲线(A) 与起始速率对 HA 浓度的标准工作曲线(B)

Fig. 2 Dynamic response curves of poly cation-selective electrode activated by protamine (A) and the working curve between the initial slope of the potential change and the SH concentration

膜组成为: 1% DNNS, 3% ETH 500, 48% PVC, 48% *o*-NPOE

曲线 a ~ g: $\rho = 0.1 \ 0.5 \ 0.7 \ 1 \ 2 \ 4 \ 5 \ \mu\text{g/mL}$

参考文献

[1] 凌沛学, 梁红, 贺艳丽, 等. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(1): 1

[2] 徐红, 陆志华. 中国生化药理学杂志, 1998, 19(5): 222

[3] 陈金国, 路德元, 李伟道. 国际检疫医学杂志, 1992, 13(1): 1

[4] 陈莲惠, 刘绍璞, 罗红群, 等. 分析化学, 2004, 32(8): 1086

[5] 周荣清, 郭祀远, 李琳, 等. 华南理工大学学报, 2001, 29(11): 55

[6] 李迎利, 尚宁, 周民伟. 临床肺科杂志, 2001, 6(1): 15

[7] 陈莲惠, 刘绍璞, 罗红群, 等. 光谱实验室, 2005, 22(3): 547

[8] Ding J W, Qin W. Polymeric membrane ion-selective electrode for butyrylcholinesterase based on controlled release of substrate. *Electroanalysis*, 2009, 21: 2030

[9] Ding J W, Qin W. *Chem Commun*, 2009, 971

[10] Chen Y, Ding J W, Qin W. *Analyst*, 2012, 137, 1944

[11] Nägele M, Mi Y M, Bakker E. *Anal Chem*, 1998, 70: 1686

[12] Oh B K, Kim C Y, Lee H J, et al. *Anal Chem*, 1996, 68: 503

Potentiometric measurement of Sodium Hyaluronate by using a polymeric membrane ion-selective electrode

CHEN Yan^{}, LI Xue-mei, LI Qiu-shun and SHI Jian-guo* (Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Key Laboratory for Biosensors of Shandong Province, Jinan 250014), *Fenxi Shiyanshi* 2013, 32(12): 42 ~ 45

Abstract: A polycation-selective polymeric membrane electrode using dinonylnaphthalene sulfonate as an ion exchanger has been developed as a protamine controlled-release system for potentiometric detection of sodium hyaluronate (SH). The incorporation of tetradodecylammonium tetrakis(4-chlorophenyl) borate as a lipophilic salt in the membrane dramatically improves selectivity of the sensor selectivity towards protamine over sodium ions via influencing the activity coefficient of protamine in the membrane and a stable potential baseline is obtained in the presence of an electrolyte background. Under optimal conditions, the proposed polymeric membrane electrode exhibits a linear relationship between the initial slope of the potential change and the SH concentration in the range of 0.1 ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ with an improved detection limit of 0.05 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: Ion selective electrodes; On fluxes; Sodium hyaluronate; Polycation