

用于褪黑素检测的电化学生物传感器研究进展

余栅删 唐丽娜 李玉桃*

(湖北中医药大学检验学院 武汉 430065)

摘要 褪黑素是人体松果体分泌的一种重要的神经递质,近年来其在控制昼夜节律和提供免疫抗炎特性等生理调节作用方面备受关注。因此,发展可靠、快速检测体内和体外样本中褪黑素浓度的方法,对于探索褪黑素的临床应用和生物学特性具有重要的意义。本文对褪黑素及其传统检测方法进行简要介绍,重点阐述了近几年报道的用于生物样本和药物样本中褪黑素定量检测的电化学传感器,并对褪黑素传感器的未来发展方向进行展望。

关键词 褪黑素 电化学 传感器 伏安法

Advances of Electrochemical Biosensors for Detection of Melatonin

Yu Shanshan, Tang Lina, Li Yutao*

(Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, 430065)

Abstract Melatonin is an important neurotransmitter secreted by the human pineal gland. In recent years it has received much attention for its physiological regulatory role in controlling circadian rhythms and providing immune anti-inflammatory properties. Therefore, the development of reliable and rapid methods for the detection of melatonin concentration *in vivo* and *in vitro* is of great significance for exploring the clinical application and biological characteristics of melatonin. In this paper, we give a brief overview of melatonin and traditional methods for melatonin detection. We also highlight the electrochemical sensors reported in recent years for the quantitative detection of melatonin in biological and pharmaceutical samples and provide an outlook on the future direction of melatonin sensors.

Keywords Melatonin, Electrochemistry, Sensor, Voltammetry

褪黑素 (Melatonin, MEL), 化学名称 *N*-乙酰基-5-甲氧基色胺, 是自然界中普遍存在的一种分子, 几乎存在于所有生物体中, 主要由大脑松果体合成和分泌, 并释放入血, 进而在机体中发挥生理作用的一种吲哚胺类神经递质。在哺乳动物中, 褪黑素是一种多功能的生理信号, 光周期信息通过褪黑素传递, 然后作用于大脑和神经内分泌系统, 在内分泌学、解剖学和生理学上产生适应性变化, 从而影响睡眠、繁殖、蜕皮、免疫反应和能量平衡等活动^[1]。褪黑素的分泌是有昼夜节律的, 夜晚的分泌量是白天的几百倍, 因此, 确定褪黑素的浓度水平已成为诊断某些精神类疾病的手段, 并对患有睡眠和情绪障碍的患者进行阶段分期。褪黑素具有小分子尺寸和两亲性, 使得它可以轻松

穿过细胞屏障, 作用于人体组织、细胞和亚细胞器, 基于这一特性, 开发出了很多褪黑素保健品和药品, 用于治疗缓解睡眠障碍、儿童多动症和高血压等疾病^[2]。在生物体内和商业药品中, 褪黑素的含量变化大, 基质复杂, 准确定量是褪黑素样本分析的关键。

褪黑素最早是 1960 年从 100 多公斤牛松果体 (约 20 万个腺体) 中提取出来的, 当时的技术手段仅能分离得到几百微克的褪黑素^[3]。在科学技术日新月异的今天, 如何更加快速且准确的定量分析一直以来都是科研人员关注的重点。在过去的六十年里, 测量各种样品中褪黑素浓度水平的需求不断增长, 人们相继报道了不同的褪黑素测量方法, 如紫外分光光度法、免疫荧光法和色

* 联系人, 李玉桃 博士, 副教授, 主要从事纳米生物传感方面的研究。E-mail: lyt2015@hbtc.edu.cn

国家自然科学基金项目(21974036)资助

2022-07-15 收稿, 2022-09-30 接受

谱法等。紫外分光光度法虽然操作简便,不需要复杂和昂贵的设备,但其灵敏度较差,难以检测到微量物质。荧光法可实现对物质的高灵敏定量分析,形象直观,但目前常用的荧光分析技术中,时间分辨荧光免疫法的试剂盒昂贵;上转换荧光法能量转移率较低,发光强度较弱;化学发光法则容易受到背景荧光的干扰,检测精度受限。色谱法的分离效率高,选择性好,但其设备昂贵,对检测人员的技术水平要求高,检测周期较长。

近年来,基于电化学平台的生物传感器是检测多种生物分子的理想选择,因其具有高灵敏度、高特异性、低成本、简便快捷且具有连续检测能力等优点受到人们的广泛关注。在电化学试验中,人们常使用三电极系统,它由工作电极、参比电极和对电极组成,使用不同的电催化材料和生物识别元件对工作电极进行修饰,来增强电极表面的催化活性,提高传感器的灵敏度和选择性。测量时,将工作电极置于含有分析物的溶液中,分析物在特定的电势条件下发生氧化还原反应,最后通过电流变化趋势来反映待测分析物的浓度水平^[4]。目前,基于电化学的生物传感器已经成为褪黑素定量分析的新兴技术方法。

1 褪黑素的概述

人体内褪黑素的合成是由色氨酸启动的,合成路径分为四个步骤(图 1)^[5],其中,芳基烷胺 *N*-乙酰基转移酶以及乙酰复合胺-*O*-甲基转移酶,是褪黑素合成的关键酶^[6],由位于视交叉上核的昼夜节律起搏器和眼光照射调节,随着夜晚黑暗光照条件的开始,视交感神经投射到松果体,释放去甲肾上腺素来控制松果体的活动,同时,褪黑素合成的关键酶也被激活^[7]。因此,褪黑素的分泌与环境的明暗周期、光照强度同步,具有夜晚高、白天低的昼夜节律。在血液中,褪黑素通常与白蛋白结合,通过细胞色素 P450 亚型(主要是 CYP1A2)代谢为 6-羟基内皮素,并在肝脏与 6-羟基硫酸内皮素结合,随着尿液排泄。6-羟基硫酸褪黑素的产生能很好地反映血浆褪黑素的水平,通过尿液测定来评估松果体功能和褪黑素产生是一种侵入性较小的方法^[8]。除了反应昼夜节律计时系统的状态,褪黑素还具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、抗衰老、降压、免疫调节的功能,对阿尔茨海默症、帕金森、多动症等神经退行性疾病以及糖尿病、肿瘤性疾病、心血管疾病、呼吸系统疾病在内

的多种病症都有缓解作用^[9,10]。在此次新冠肺炎疫情中,褪黑素被认为是潜在的管理和治疗的辅助剂^[11]。褪黑激素首次高于其基线水平的时间被称为暗光褪黑激素释放(DLMO),是反映昼夜节律时相的标志,人体血浆中褪黑素的含量水平从白天的几 pmol/L 到晚上的 215~430 pmol/L 不等^[12]。不同个体褪黑素含量水平差别也很大,一项针对 170 名健康受试者凌晨 3:00 褪黑素释放水平的研究报告显示,其总体范围在 80~775 pmol/L^[13],因此在设计临床实验时需要考虑到这些可变性。

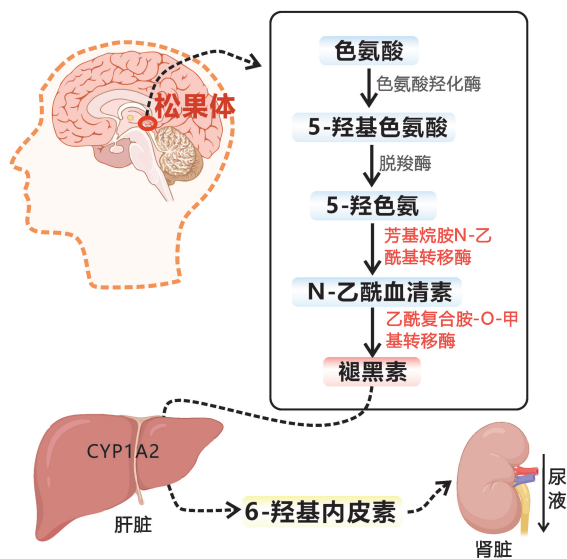


图 1 褪黑素的合成途径以及肝脏代谢途径

Fig. 1 The synthetic pathway and liver metabolic pathway of melatonin

2 褪黑素的传统检测方法

褪黑素在人体中分布广泛,生理作用复杂,快速检测褪黑素含量水平的变化,对探究褪黑素在正常和异常生物过程中的作用非常重要。目前报道较多的检测方法包括高效液相色谱(HPLC)、免疫分析法、气相色谱法、毛细管电泳等。

HPLC 是实验室检测褪黑素含量最常用的方法,广泛用于研究从人类样本、植物、动物到药物制剂等各种标本中提取出的褪黑素^[14~16]。目前,已经有各种检测技术与 HPLC 联用定量检测褪黑素的含量,例如质谱法(MS)、荧光检测法(FSD)等。Eriksson 等^[15]开发了一种使用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS-MS)来测定人唾液中褪黑素,向收集有唾液的塑料管中加入 7-D-褪黑激素作为同位素标记,加入 1,4-二硫苏糖醇通过

固相萃取柱对样本进行清洗浓缩,对褪黑素检测限为 4.52 pmol/L。FSD 是 HPLC 联合应用中最灵敏的检测技术,由于褪黑素具有 π 电子的芳环,因此可以产生荧光活性,再通过衍生化以增强其荧光特性。Hamase 等^[16]使用反向高效液相色谱系统(RP-HPLC)测定了大鼠和小鼠松果体中微量的内源性褪黑素,经过柱前衍生化后分离得到褪黑素,在激光波长下通过检测荧光信号反映褪黑素含量,检测限可达 1 fmol/L。临床上常用的检测内源性褪黑素方法为免疫分析法,包括放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA),目前已经有各种各样的商品化试剂盒供临床检测使用^[12,13]。褪黑激素测量的 RIA 原理是将已知量的放射性褪黑素(I^{125} -褪黑素或 3^H -褪黑素)与固定量的抗褪黑素抗体混合,放射性褪黑素与未标记的褪黑素混合物竞争性地结合抗体,因此,待测褪黑素的浓度与放射强度成反比^[17]。免疫测定最关键的步骤是抗血清的制备,由于褪黑素没有免疫原性,因此,要引起抗体产生就必须将褪黑素或其类似物与免疫原性分子(通常是牛血清白蛋白或甲状腺球蛋白)进行化学连接,首次发表的褪黑素 RIA 检测使用的抗体是兔抗 5-甲氧基-*N*-乙酰色氨酸-牛血清白蛋白- H^3 褪黑素结合物抗体^[18]。然而,抗体的特异性会因为褪黑素与蛋白质偶联位置的不同而产生重大影响,因此在实际检测过程中存在相似结构的化合物发生交叉反应的潜在问题^[19]。ELISA 检测使用的抗体与 RIA 检测中使用的抗体制备方式相同,都有一个褪黑素分子的免疫修饰过程^[20]。

其他的检测褪黑素的常规方法有气相色谱法^[21]、毛细管电泳^[22]等,虽然这些常规检测方法有一定灵敏度和特异性的优点,但是也存在一些不可避免的问题,例如检测设备昂贵笨重、耗时长、复杂的前处理过程、需要专业的实验室技术人员,不便于简便快速地检测褪黑素,随着现代科学技术的革新,新的褪黑素检测手段应运而生。

3 电化学传感器在褪黑素检测中的应用

在过去的二十年时间里,使用电化学方法来构建微型诊断工具的研究发展迅速,通过快速检测人体内相关生物分子来获取临床诊断信息,进而对疾病或机体功能进行判断。在新型褪黑素检测技术的开发中,电化学平台因其灵敏度高、重复

性好、操作简单等优势受到科研人员的青睐。

3.1 基于循环伏安法(CV)的电化学传感器

CV 法是目前电化学分析中使用最广泛的技术,它的工作原理是将三角波形的脉冲电压施加到工作电极上,工作电极电势在两个电势极限之间循环,推动电活性物质的连续氧化和还原,通过电流-电位伏安曲线来反映待测物质的电子转移动力学,从而进行定量分析。

褪黑素作为保健食品原料之一,在医疗药物的含量检测中有着重要意义。Irina 等^[23]开发了一种基于石墨烯(rGO)修饰的丝网印刷碳电极(SPCE)用来检测褪黑素,由于纳米材料石墨烯可以增大表面积,增加活性位点,加快表面电荷转移速度,从而提高传感器的检测灵敏度。在优化条件下,使用 CV 法测定了三种市面在售药物中的褪黑素浓度,检测线性范围在 1 ~ 300 $\mu\text{mol/L}$,检出限为 870 nmol/L。近年来,采用不同化合物组装复合材料修饰电极在电化学检测的应用中较为常见。Topçu 等^[24]报道了一种采用真空过滤和碘化氢化学还原的方法制备的氧化硼-石墨烯(B_2O_3 -rGO)柔性纸电极,用于同时检测抗坏血酸和褪黑素(图 2(A))。 B_2O_3 纳米棒的掺入增加了复合纸电极的比表面积和电化学活性,而且薄层纸片状的结构使得电极的机械耐用性和柔韧性大大提高。该传感器运用线性扫描伏安法测定了人血清中的褪黑素,加标回收率可以达到 100.6% ~ 104.0%,也验证了在血清常见物质存在的情况下电极良好的抗干扰能力。免疫衍生是褪黑素生成的重要来源,它在免疫衰老、自身免疫、炎症反应以及传染病的免疫调节中起着重要作用^[25]。2018 年,Brazaca 等^[26]首次提出了一种用于褪黑素快速定量的电化学免疫传感器,用 γ -氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作为交联剂将特异性褪黑素抗体修饰在 ITO 电极上,通过检测电流响应对褪黑素进行定量分析(图 2(B))。该装置对褪黑素的线性响应范围为 0.75 ~ 7.5 $\mu\text{mol/L}$,检测限为 0.513 $\mu\text{mol/L}$,该传感器成功应用于人工添加褪黑素的大鼠肝脏提取物的检测。淋巴结的肥大细胞可以通过降解和释放褪黑素来调节免疫反应,Hensley 等^[27]在亚秒级时间分辨率下于碳纤维微电极上使用快速扫描循环伏安法(FSCV)检测了褪黑素。其在 600 V/s 的速度下,

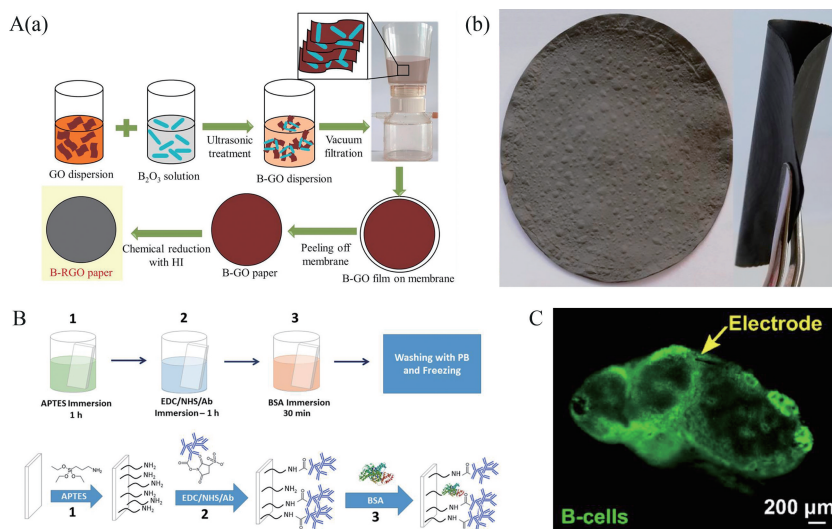


图 2 CV 法检测褪黑素: (A) (a) B_2O_3 -rGO 柔性复合纸制造示意图; (b) B_2O_3 -rGO 复合纸的数码相机图^[24]; (B) ITO-APTES-EDC/NHS-Ab 生物传感器的原理图(上半部分:薄膜生长方法,下半部分:建立在薄膜上的化学键)^[26]; (C) 在活体淋巴结切片内插入该碳纤维电极(黄色箭头),用抗 CD45R/B220(绿色)对 B 细胞进行免疫染色,显示了该技术的空间分辨率^[27]

Fig. 2 Cyclic voltammetry detection of melatonin. (A) (a) Schematic diagram of B_2O_3 -rGO flexible composite fabrication; (b) digital camera diagram of B_2O_3 -rGO composite paper^[24]; (B) schematic diagram of ITO-APTES-EDC/NHS-Ab biosensor, upper part: film growth method, lower part: chemical bonding established on the film^[26]; (C) in vivo lymph node sections with this carbon fiber electrode inserted inside (yellow arrow) and immunostaining of B cells with anti-CD45R/B220 (green), showing the spatial resolution of the technique^[27]

从 0.2V 扫描到 1.3V,得到了优化的波形,克服了在电聚合过程中氧化污垢吸附到电极表面的问题,证实了褪黑素在与合成前体 5-羟色胺或 *N*-乙酰-5-羟色胺的联合检测中的特异性,同时保持对褪黑素检测的足够灵敏度,检测限达 $24 \pm 10 \text{ nmol/L}$ 。他们随后在肠系膜淋巴结切片上成功检测到了褪黑素的实时响应信号,为进一步研究免疫反应过程中褪黑素的动态变化提供新的检测平台,从而对免疫调节机制有更深入的认识(图 2(C))。

3.2 基于差分脉冲伏安法(DPV)的电化学传感器

DPV 法是在 CV 法的线性扫描波形上,叠加一系列小振幅、短脉冲,在每个脉冲处测量电流的响应有助于最大限度地减少由于直流波形引起的背景电流。并且 DPV 的短频脉冲导致测量伏安峰更窄,因此 DPV 经常被用来区分具有类似氧化电位的分析物^[28]。

Zeinali 等^[29]开发了一种 SnO_2 - Co_3O_4 -rGO 纳米复合材料修饰的新型离子液体碳糊电极用于同时测定色氨酸和褪黑素,石墨烯、 Co_3O_4 、 SnO_2 纳米颗粒三者复合,很好地改善了电极的电化学特性,促进了特定的传感反应。在优化的实验条件下,该传感器对褪黑素的检测范围在 $0.02 \sim$

$6 \mu\text{mol/L}$,检出限为 4.1 nmol/L 。最后,通过对人血清和片剂样品中褪黑素和色氨酸进行检测,验证了该传感器的适用性。2019 年, Soltani 等^[30]也提出了一种基于 Al_2O_3 和 Pd 纳米颗粒组成的纳米复合材料的电学生物传感器, Al_2O_3 具有高机械强度和抗压强度, Pd 纳米颗粒优异的催化作用极大增强了信号,成功实现了褪黑素、多巴胺和乙酰氨基酚的同时检测。该电极对褪黑素的检测范围为 $6.0 \sim 1400 \text{ nmol/L}$,检出限为 21.6 nmol/L ,可用于人血清样品和药物样品中褪黑素浓度的检测。由于纳米通道具有一定的富集效应和抗污染能力,高度有序和垂直取向的介孔二氧化硅薄膜(VMSF)修饰电极在复杂样品的直接和高灵敏度分析中显示出巨大的潜力。最近, Zhou 等^[31]报道了在高度电化学还原氧化石墨烯-碳纳米管(rGO-CNT)复合衬底上修饰 VMSF 的方法,用于同时测定 5-羟色胺和褪黑素(图 3(A))。他们采用 CV 法将 rGO-CNT 膜电沉积到 ITO 电极表面,然后通过电化学辅助自组装在 rGO-CNT/ITO 表面快速生长 VMSF,由于其外层的静电预富集和良好的抗污染能力以及底层 rGO-CNT 的高效电活性,在人全血和人工脑脊液等复杂生物体液样品的直接电化学分析中表现出很高的性能。金纳米颗粒

(AuNPs) 是一种易于制备、具有高比表面积、高电催化能力和化学惰性的纳米材料。Selvam 等^[32]设计并开发了一种探头超声技术来自组装 AuNPs 和 MoS₂ 集成的电化学传感平台,用于同时检测尿酸和褪黑素。该传感器制作简便,对褪黑素具有快速的响应,线性范围为 0.033~10 μmol/L,检出限为 15.7nmol/L,对尿样的褪黑素加标回收率在 92.0%~105.6%。2020 年,Liu 等^[33]构建了三元纳米复合材料修饰的丝网印刷电极用于褪黑素的电化学检测,该复合材料由二硫化锡纳米片(SnS₂)、rGO 和 β-环糊精(β-CD)组成。其中,β-CD 可以通过主客体相互作用有效地将疏水性褪黑素吸附到电极表面,提高了修饰电极的选择性;此外,SnS₂-rGO 复合材料有效地促进了电子传递速率,增强了复合电极的电催化活性和协同活性。

该传感器的线性范围为 1nmol/L~100μmol/L,检测限为 0.17nmol/L,成功应用于市售药品和人唾液中褪黑素的检测,并且与 ELISA 结果一致。褪黑素和抗坏血酸在维持人体生态平衡和防治心血管疾病方面发挥着重要作用。最近,Fu 等^[34]在 Au 功能化的 CeFeO₃ 纳米球(CeFeO₃ NSs)基础上制造了双通道光辅助电化学传感器,以实现褪黑素和抗坏血酸的同时监测(图 3(B))。CeFeO₃ NSs 作为光敏负载平台,通过水热法和退火过程制备,然后将还原的 Au 纳米团簇固定在 CeFeO₃ NSs 表面,得到 Au-CeFeO₃ 双纳米球传感探头。在电化学测量中,该传感器在光照下产生的电流信号比在黑暗环境中产生的信号高 11%,在优化的实验条件下,对褪黑素的检测范围为 1nmol/L~5μmol/L,检出限为 0.8nmol/L。

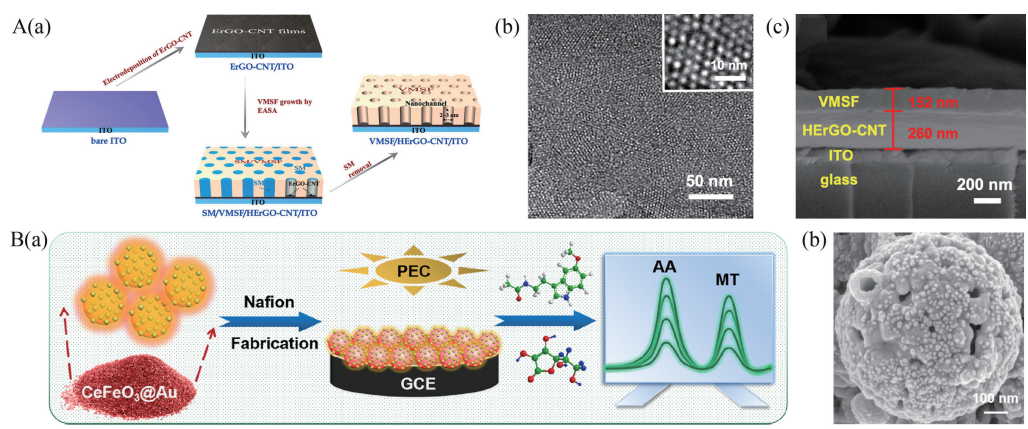


图 3 DPV 法检测褪黑素:(A) (a) VMSF/HERGO-CNT/ITO 电极的制备;(b) VMSF/HERGO-CNT/ITO 电极的透射电子显微镜图像;(c) VMSF/HERGO-CNT/ITO 电极横断截面的扫描电子显微镜图像^[31];(B) (a) Au-CeFeO₃ NSs 光辅助电极同时检测褪黑素和抗坏血酸的原理图;(b) Au-CeFeO₃ NSs 的扫描电子显微镜图像^[34]

Fig. 3 Differential pulse voltammetry for melatonin detection. (A) (a) Preparation of VMSF/HERGO-CNT/ITO electrode; (b) transmission electron microscopy images of VMSF/HERGO-CNT/ITO electrode; (c) scanning electron microscopy images of cross-section of VMSF/HERGO-CNT/ITO electrode^[31]; (B) (a) The schematic of the Au-CeFeO₃ NSs photo-assisted electrode to simultaneously determine melatonin and ascorbic acid; (b) scanning electron microscopy images of Au-CeFeO₃ NSs^[34]

3.3 基于方波伏安法 (SWV) 的电化学传感器

除 CV 和 DPV 外,SWV 法也是一种常用的电化学分析技术,它的原理是在阶梯扫描电位的基础上,再叠加一个小振幅的方波,在正向和反向的阶梯结束时进行电流采样,并将两次采样电流的差值对电压作图。与 DPV 类似,它们给出了一个峰形电流响应曲线,能有效地消除背景电容电流,并且 SWV 具有更快的扫描速度、更高的灵敏度,是未来开发电化学传感器的理想技术^[35]。

随着材料科学的进步,基于可持续和廉价材

料的一次性电化学传感器是未来新型传感平台的发展趋势。防水纸是一种可生物降解且具有生物兼容性的材料,具有将样品滴在其表面而不被纤维吸收的特点。Camargo 等^[36]设计了一种一次性油墨传感器,该传感器用指甲油和石墨烯组成导电油墨,并以防水纸为传感基质,用于扑热息痛和褪黑素的同时测定,SWV 法检测褪黑素的线性范围为 0.80~100 μmol/L,检出限为 32.5nmol/L,该传感器易于制造和功能化,并且使用了低成本的防水材料,为实现生物传感器的商业化生产提供了一种新思路。分子印迹聚合物作为一种高亲和

力和特异性识别的典型方法,在传感器的开发中受到了人们的广泛关注,它可以取代抗体-抗原、酶等生物识别系统,产生具有一定选择性的印迹,印迹层可作为分子模板,根据立体构型的区别与所需的目标分子聚合。Gupta 等^[37]采用石墨烯、4-氨基-3-羟基-1-萘磺酸 (AHNSA) 和三聚氰胺 (MM) 共聚物,制备了一种用于褪黑素检测的分子印迹聚合物传感器 (图 4(A))。该传感器通过将石墨烯沉积在玻碳电极 (GCE) 表面,然后在褪黑素为模板的情况下电聚合 AHNSA 和 MM,最后在 H₂SO₄ 溶液中洗脱印迹中的模板褪黑素就制得了分子印迹膜。SWV 测试结果表明,氧化峰电流与褪黑素的浓度呈良好的线性关系,该装置对褪黑素的检测范围在 0.05 ~ 100 μmol/L,检出限为 600nmol/L,并成功应用于药物制剂和人体体液中褪黑素的含量测定。2019 年,Anithaa 等^[38]

报道了能同时测定去甲肾上腺素、褪黑素和尼古丁的方法,他们选择阴离子表面活性剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 介导 WO₃ 纳米粒子的合成,随后通过 γ 射线照射,最后将 WO₃ 纳米粒子和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 修饰到 GCE 上,构成一种联合检测的电化学传感器 (图 4(B))。其中,γ 射线照射有利于 WO₃ 纳米粒子晶格缺陷和空位的形成,这些空穴是随后 NAD 固定化的位点。NAD 辅酶在细胞代谢的氧化还原反应中起到氢受体和电子载体的作用,能为细胞生命活动提供能量来源;而沉积到电极上的 NAD 的强氧化还原性质使得褪黑素、去甲肾上腺素和尼古丁能够发生不同的电化学氧化,就能对这三种分析物进行识别和定量分析。该传感器表现出良好的选择性和灵敏度,对褪黑素检测的浓度线性范围为 0.01 μmol/L ~ 1mmol/L,检测限为 2.6nmol/L。

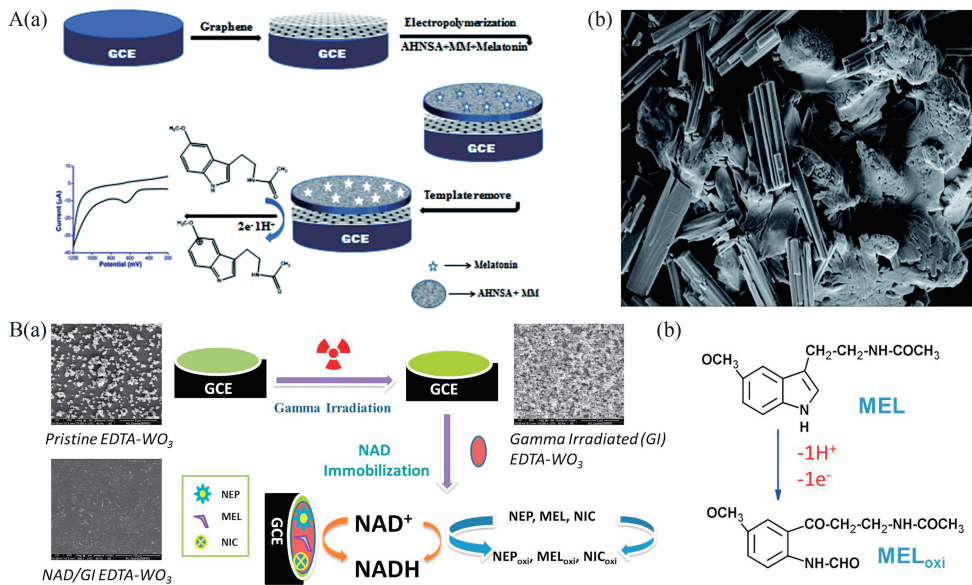


图 4 方波伏安法检测褪黑素: (A) (a) 使用石墨烯和共聚复合材料制造分子印迹传感器的流程图; (b) 分子印迹传感器的扫描电镜图^[37]; (B) (a) NAD/EDTA/WO₃/GCE 传感器的构建; (b) 氧化测定褪黑素的机理^[38]

Fig. 4 Square wave voltammetry for melatonin detection. (A) (a) Flow chart of molecularly imprinted sensors fabricated using graphene and copolymer composites; (b) scanning electron microscope images of molecularly imprinted sensors^[37]; (C) (a) Construction of NAD/EDTA/WO₃/GCE sensor; (b) mechanism of oxidizing determination of melatonin^[38]

3.4 基于安培法的电化学传感器

安培法是一种简单且应用广泛的电化学检测技术,它的工作原理是给予指示(工作)电极一个恒定的电位,当待测物扩散至电极表面会被氧化或还原,进而发生电子的转移,通过电极记录到的电流来指示分析物的动态变化。

基于芯片电泳 (ME) 的电化学检测是一种理想、有价值的分析技术,它可以在不损失性能的情

况下实现检测装置小型化,并且与微观纳米技术具有高度兼容性。2015 年, Gomez 等^[39]开发了一种单壁碳纳米管压移电极 (SW-PTEs), 通过与微流控芯片电泳结合, 实现了褪黑激素、色氨酸和 5-羟色胺的快速分析。SW-PTEs 是将过滤后的单壁碳纳米管分散在不导电的 PMMA 基底上制得的, 然后用导电银胶作为电接触, 最后再与芯片电泳结合。这项工作揭示了 ME、SW-PTEs 与安培

法联合的分析优势,在 150s 内实现了对褪黑素及其前体物质的快速测定,对褪黑素的线性检测范围为 50~500 μmol/L,检测限为 4μmol/L。

4 不同电化学传感器的检测性能

电化学传感器是以电极作为信号处理元件的分析工具,它通过表征修饰电极的氧化还原特性、有效表面积等来反映待测物的性质特点,因此,其成功构建在很大程度上取决于修饰电极和待测物质的交互作用。为了对分析物进行全面客观的评价,根据分析物的电荷、电位、基质和大小等特点,选择最合适的电化学检测方法同样重要^[40]。本文主要综述了四种不同类型

电化学传感器,它们在褪黑素的定量分析中展现出不同的优势(表 1)。CV 法检测原理简单,操作方便,但其难以区分多个分析物,并且容易受到背景噪音的干扰。DPV 法和 SWV 法具有更高的分辨率,可同时分析多个物质,与 DPV 法相比,SWV 法分析速率更快,适用于快反应体系。安培法可以观察到待测电流的实时变化,在神经递质的动力学检测中应用广泛。同一分析物在不同的电极表面发生不同的氧化还原反应,电化学检测方法的选择也影响着反应进程,因此,在实际应用中仍需根据不同的电极类型、待测物的性质以及检测目的,选择最佳的检测方法。

表 1 用于褪黑素检测的电化学传感器的性能比较

Tab.1 Performance comparison of electrochemical sensors for melatonin detection					
检测方法	电化学传感器	检测范围/(μmol/L)	检测限	实际样本	参考文献
CV	rGO/SPCE	1~300	870nmol/L	药物	[23]
	B ₂ O ₃ -rGO 柔性纸电极	2.3~2000	0.7μmol/L	血清	[24]
	Ab-NHS/EDC-APTES-ITO	0.75~7.5	0.513μmol/L	大鼠肝脏提取物	[26]
	碳纤维微电极	0.05~10	24±10nmol/L	肠系膜淋巴结切片	[27]
DPV	SnO ₂ -Co ₃ O ₄ -rGO 电极	0.02~6	4.1nmol/L	药物;血清	[29]
	Al ₂ O ₃ -PdNP 碳糊电极	0.006~1.4	21.6nmol/L	药物;血清	[30]
	VMSF/HErGO-CNT/ITO	20~100	14.4nmol/L	全血;人工脑脊液	[31]
	AuNPs-MoS ₂ 电极	0.033~10	15.7nmol/L	尿液	[32]
	SnS ₂ /rGO/β-CD/SPCE	0.001~100	0.17nmol/L	药物;唾液	[33]
	Au-CeFeO ₃ NSs 电极	0.001~5	0.8nmol/L	海水;尿液	[34]
SWV	一次性防水纸基传感器	0.8~100	32.5nmol/L	药物;唾液;尿液;汗液	[36]
	rGO-AHNSA-MM 分子印迹传感器	0.05~100	600nmol/L	药物;血浆;尿液	[37]
	NAD/EDTA/WO ₃ /GCE	0.01~1000	2.6nmol/L	药物	[38]
安培法	SW-PTEs 结合芯片电泳	50~500	4μmol/L	药物	[39]

5 结语与展望

近年来,随着纳米技术、分子识别技术以及新材料技术的高速发展,电化学生物传感器已成为一种极具优势的的平台,满足了褪黑素以及其他物质在定量检测中高灵敏度、高特异性、低成本、快速响应的要求。随着人们对神经科学的认识加深,未来基于褪黑素检测的生物传感技术将会继续丰富和完善,可有以下几个发展方向:(1)开发微型系统检测平台(由高通量小型化的纳米电极传感器或场效应晶体管阵列组成),实现褪黑素的高分辨率、大规模检测;(2)由于褪黑素主要是在大脑的特定区域产生的,所以体内褪黑素的准确定量仍然是一个挑战,未来生物传感器可以发展微针型传感器,实现连续、实时、在体监测褪黑素的动态变化;(3)将电化学检测与电生理学相结合,为深度解析褪黑素在大脑内的信息传

递提供新的模式;(4)结合多功能光纤传感器,与不同的纤维电子技术或神经元探针轻松组装,形成一体式纤维化结构,实现对褪黑素及其他物质的在体同步监测,有望揭示其生理机制。

参 考 文 献

[1] Arendt J. Chronobiol. Int. , 2006, 23(1-2) : 21~37.
[2] Samanta S. Arch. Physiol. Biochem. , 2020, 128 (5) : 1346~1367.
[3] Lerner A B, Case J D, Takahashi Y. J. Biol. Chem. , 1960, 235(7) : 1992~1997.
[4] Ronkainen N J, Halsall H B, Heineman W R. Chem. Soc. Rev. , 2010, 39(5) : 1747~1763.
[5] Romano E, De Luca S. New research on neurosecretory systems. New York: Nova Biomedical Books, 2008: 299.
[6] Tan D X, Hardeland R, Manchester L C, et al. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. , 2010, 85(3) : 607~623.
[7] Binkley S A. Endocr. Rev. , 1983, 4(3) : 255~270.
[8] Ma X, Idle J R, Krausz K W, et al. Drug Metab. Dispos. , 2005, 33(4) : 489~494.

[9] Brzezinski A. New Engl. J. Med. , 1997, 336 (3) : 186 ~ 195.

[10] Claustat B, Brun J, Chazot G. Sleep Med. Rev. , 2005, 9 (1) : 11 ~ 24.

[11] Zhang R, Wang X, Ni L, et al. Life Sci. , 2020, 250 : 117583.

[12] Kennaway D J, Voultisios A. J. Clin. Endocrinol. Metab. , 1998, 83 (3) : 1013 ~ 1015.

[13] Terzieva D D, Mateva N D, Vladimirova-Kitova L G. Clin. Lab. , 2009, 55 (9-10) : 359 ~ 361.

[14] Hattori A, Migitaka H, Iigo M, et al. Biochem. Mol. Biol. Int. , 1995, 35 (3) : 627 ~ 634.

[15] Eriksson K, Ostin A, Levin J O. J. Chromatogr. B, 2003, 794 (1) : 115 ~ 123.

[16] Hamase K, Tomita T, Kiyomizu A, et al. Anal. Biochem. , 2000, 279 (1) : 106 ~ 110.

[17] Fraser S, Cowen P, Franklin M, et al. Clin. Chem. , 1983, 29 (2) : 396 ~ 397.

[18] Arendt J, Paunier L, Sizzenenko P C. J. Clin. Endocrinol. Metab. , 1975, 40 (2) : 347 ~ 350.

[19] Blair I A, Seaborn C J. Aust. J. Chem. , 1979, 32 (2) : 399 ~ 403.

[20] Ferrua B, Masseyeff R. J. Immunoassay, 1985, 6 (1-2) : 79 ~ 94.

[21] Sack R L, Blood M L, Lewy A J. Sleep, 1992, 15 (5) : 434 ~ 441.

[22] Kim Y O, Chung H J, Chung S T, et al. J. Chromatogr. A, 1999, 850 (1-2) : 369 ~ 374.

[23] Apetrei I M, Apetrei C. Int. J. Nanomed. , 2016, 11 : 1859 ~ 1866.

[24] Topçu E, Kiransan K D. Diam. Relat. Mater. , 2020, 105 : 107811.

[25] Calvo J R, Gonzalez-Yanes C, Maldonado M D. J. Pineal Res. , 2013, 55 (2) : 103 ~ 120.

[26] Brazaca L C, Bramorski C B, Cancino-Bernardi J, et al. Colloids Surf. B, 2018, 171 : 94 ~ 100.

[27] Hensley A L, Colley A R, Ross A E. Anal. Chem. , 2018, 90 (14) : 8642 ~ 8650.

[28] Manivel P, Dhakshnamoorthy M, Balamurugan A. RSC Adv. , 2013, 3 : 14428 ~ 14437.

[29] Zeinali H, Bagheri H, Monsef-Khoshhesab Z, et al. Mater. Sci. Eng. C, 2017, 71 : 386 ~ 394.

[30] Soltani N, Tavakkoli N, Shahdost-Fard F, et al. Mikrochim. Acta, 2019, 186 (8) : 540.

[31] Zhou H, Ma X, Sailjoi A, et al. Sens. Actuat. B, 2022, 353 : 131101.

[32] Selvam S P, Hansa M, Yun K. Sens. Actuat. B, 2020, 307 : 127683.

[33] Liu X, Sakthivel R, Chen Y C, et al. J. Mater. Chem. B, 2020, 8 (33) : 7539 ~ 7547.

[34] Fu D, Liu H, Chen T, et al. Biosens. Bioelectron. , 2022 : 114457.

[35] Chen A, Shah B. Anal. Methods, 2013, 5 (9) : 2158 ~ 2173.

[36] Camargo J R, Andreotti I A A, Kalinke C, et al. Talanta, 2020, 208 : 120458.

[37] Gupta P, Goyal R N. RSC Adv. , 2015, 5 (50) : 40444 ~ 40454.

[38] Anithaa A C, Asokan K, Lavanya N, et al. Biosens. Bioelectron. , 2019, 143 : 111598.

[39] Gomez F J V, Martín A, Silva M F, et al. Electrophoresis, 2015, 36 (16) : 1880 ~ 1885.

[40] Manring N, Ahmed M M N, Tenhoff N, et al. Anal. Chem. , 2022, 94 (20) : 7149 ~ 7157.