



原电池型氧化还原电位分析法

薛亦飞¹, 吴菲², 蒋亚楠¹, 于萍², 毛兰群^{1*}

1. 北京师范大学化学学院, 北京 100875

2. 中国科学院化学研究所, 活体分析化学学院重点实验室, 北京 100190

*通讯作者, E-mail: lqmao@bnu.edu.cn

收稿日期: 2022-01-26; 接受日期: 2022-03-16; 网络版发表日期: 2022-03-21

国家重点研发计划(编号: 2018YFE0200800), 国家自然科学基金(编号: 22134002, 21790390, 21790391), 国家基础研究计划(编号: 2016YFA0200104和2018YFA0703501), 中国科学院战略重点研究(编号: XDB30000000, QYZDJSSW-SLH030)资助项目

摘要 提出和发展分析化学原理和方法, 在整体动物层次实现对脑内神经化学分子的活体实时原位检测, 对揭示脑功能及脑疾病的分子机制具有重要意义. 电化学方法由于可以实现高的时空分辨率、选择性和灵敏度, 在脑化学检测较早得到了关注, 并展示出良好的应用前景. 然而, 随着研究的不断深入, 脑神经科学的发展对活体电化学分析的神经元兼容性提出更高的要求, 传统基于电解池原理的电化学分析方法由于在测量过程中需要施加极化电压并产生电流, 不仅可能会对神经元活动造成影响, 而且也会导致其难以与电生理技术联用. 针对这一方法的挑战, 近些年来本课题组提出了原电池型氧化还原电位分析法, 通过构筑自发的电化学氧化还原过程, 并以开路电位作为记录方式实现对电活性神经化学物质的定量分析. 该方法具有神经元兼容等优势并对其他电学信号记录无干扰, 在脑神经过程研究中的重要应用价值. 本文对原电池型氧化还原电位分析法的提出、方法原理、分析性能和应用等方面进行综述, 并对该方法未来的研究重点和发展方向做出了展望.

关键词 电化学分析, 活体分析化学, 原电池型氧化还原电位分析法

1 引言

大脑是人体中最精妙复杂的器官之一, 是由大量的各类神经元以及胶质细胞构成. 不同神经元之间通过突触结构形成庞杂的神经网络, 不同神经元之间以电或化学信号的形式进行信号传递^[1]. 中枢神经系统中复杂的生物化学组成、网络结构及其动态变化和相互作用是实现其高级功能之基础, 它们调控生命体的各项生理过程, 为情感、记忆、认知等高级神经活动奠定了重要的物质基础^[2]. 脑神经系统的复杂动态过

程需要多种神经化学物质共同参与, 其中包括离子(K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等)、小分子神经化学物质(神经递质、神经调质、能量物质、气体分子等)以及生物大分子物质(核酸、蛋白质、多糖、脂质等). 这些神经化学物质在神经信号的形成、传递、功能调控过程中发挥着决定性作用. 此外, 脑内神经化学物质的失衡也会对正常神经功能造成影响, 甚至引起脑疾病^[3]. 因此, 实现神经化学物质的精准分析, 尤其是在活体层次原位实时检测其基础浓度水平以及变化规律无疑为脑神经过程物质基础的研究提供可能.

引用格式: Xue Y, Wu F, Jiang Y, Yu P, Mao L. Galvanic redox potentiometry. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 848–857, doi: 10.1360/SSC-2022-0021

随着活体分析化学相关基础理论和实验水平的不断完善和提高, 目前已有多种基于电化学、荧光、质谱、核磁等原理的脑神经化学分析与成像方法, 可以实现单囊泡、单细胞、脑片以及活体等不同层次的神经化学分析与成像, 从不同维度阐释脑神经的化学过程^[4]. 其中, 电化学方法通过对电极/溶液界面的设计构筑、电极结构的优化以及测量过程的设计, 可以实现高时空分辨率、高选择性、高灵敏度的原位分析, 在活体分析领域具有广泛的应用前景^[5-8]. 另外, 活体原位电化学分析通过将微电极植入特定脑区, 结合电化学测量方法, 能够在保持神经系统结构和功能完整的前提下, 实现脑内神经化学物质的高时空分辨分析, 在脑神经生理病理过程的化学机制研究中具有重要意义^[9,10].

活体原位电化学分析方法通过在目标脑区植入微电极, 能够实现特定位点脑区神经化学物质的活体原位实时检测. 活体原位电化学分析方法的建立最早可以追溯到1958年, Clark等^[11]将玻璃封装的铂丝电极植入活动物脑内, 通过安培法实时记录了脑内氧气浓度的变化. 1973年Adams等^[12]将碳糊电极植入鼠脑内, 利用循环伏安法进行了活体电化学分析, 这一研究引起了电化学和神经科学领域的高度关注. 为了进一步提高该方法的时间分辨率, Armstrong-James等^[13]在1980年提出了快速扫描伏安法(Fast-scan cyclic-voltammetry, FSCV), 并由Wightman等^[14]不断发展完善, 并成功应用于活体分析. 近年来, 活体原位电化学分析研究领域在方法原理、电极结构以及分析性能等方面取得了一系列重要进展, 使得方法在选择性、灵敏度、时空分辨率、多组份分析等方面得到了显著提升^[15].

随着电化学、电分析化学和脑神经科学的不断发展与交叉融合, 电化学方法的生物相容性逐渐引起了人们的高度关注. 一般来说, 电化学方法的生物相容性主要包括三个方面: 电极植入脑组织造成的机械损伤、电极材料的生物相容性以及电化学测量过程产生的电学影响^[16,17]. 其中, 针对机械损伤和电极材料的生物相容性问题, 人们已经发展出许多电极微型化^[18]、柔性化^[19], 以及表面生物相容性修饰^[20]等策略. 而电化学测量过程中对神经系统产生的电学影响, 是基于电解池原理的电化学分析方法(如安培法、伏安法等)所难以避免的^[21]. 因此, 亟需创新电化学分析原理, 实

现具有神经兼容性的活体原位电化学分析.

电位分析法是通过记录开路状态下工作电极与参比电极之间电势差, 并以此作为输出信号实现化学物质定量分析的一种方法. 与其它电化学方法相比, 电位分析法的特点在于其测量过程中电极处于近似开路的状态, 回路中几乎没有电流流过. 因此, 利用该方法的测量过程并不会对神经系统以及其它测量设备产生电学影响和干扰. 最典型的电位分析法是离子选择性电极, 通过构筑选择性识别元件, 实现对离子活度的分析检测^[22,23]. 但是, 该方法无法实现氧化还原活性分子的分析检测. 针对这一问题, 我们提出了基于原电池原理的氧化还原电势分析法(Galvanic redox potentiometry, GRP), 通过构筑与待测物自发形成氧化还原过程的“原电池”, 在无需外加极化电压的条件下, 通过记录开路电位(Open-circuit potential, OCP)即可实现待测物的分析.

GRP不同于其它涉及氧化还原过程的电位型传感分析, 主要区别在于: GRP将由工作电极(或指示电极)和参比电极构成的测量回路作为一个整体, 同时考虑了工作电极和参比电极电极电位之间的关系. 而传统的电位型传感分析仅要求参比电极电位稳定, 对工作电极和参比电极之间电位关系没有要求. 传统的电位型传感分析主要通过利用热力学平衡状态下Nernst方程描述的电极电位与电极表面物质浓度关系, 来实现传感目的. 在实际测量过程中, 对于可逆的电化学过程(如: $\text{FcMeOH}/\text{FcMeOH}^{+}$ ^[24]、 $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{S}$ ^[25]等体系)容易建立平衡并实现准确的定量分析. 而对于不可逆或者更复杂的混合体系(如活体环境下的维生素C检测), 工作电极则难以达到待测物的热力学平衡电位. 考虑到OCP测量过程中回路存在微弱的电流, 在这种情况下, GRP方法可以通过设计参比电极的电化学过程, 实现对工作电极极化方向的调控, 从而获得稳定的电位输出.

2 基本原理

GRP传感器结构与原电池类似, 如图1a所示. 进行分析检测时, 通常制备成具有同等结构的微电极传感器, 如图1b所示. 该传感器包含正极(阴极)、负极(阳极), 正负极之间相互分隔并保持离子导通. 在负极上发生还原态物质 $\mathbf{R}$ 的电化学氧化过程, 电极电势为 E_a .

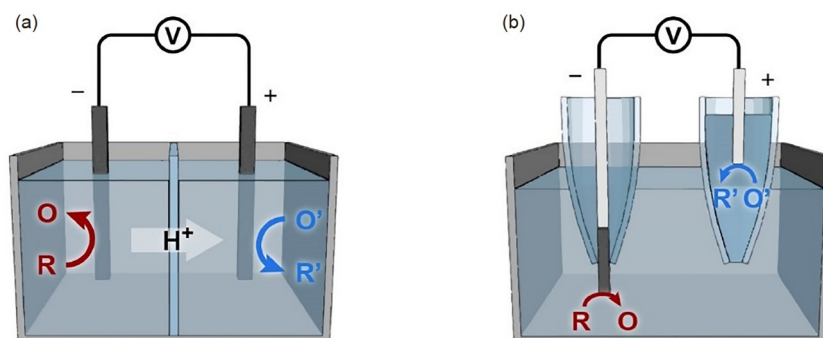
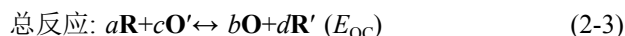
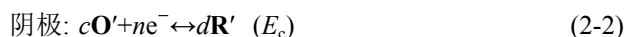


图 1 (a) GRP体系基本原理示意图; (b) 可植入GRP微传感器电极结构设计图 (网络版彩图)

Figure 1 (a) Schematic illustration of a prototype GRP sensor. (b) A design of implantable GRP microsensors (color online).

如式2-1所示. 在正极上发生氧化态物质 O' 的电化学还原过程, 电极电势为 E_c , 如式2-2所示. 其总反应如式2-3所示.



当处于开路状态时, 该体系中正极和负极近似处于平衡状态. 因此, 电极电位近似满足Nernst方程, 即:

$$E_a = E_a^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^*}{C_R^*} \quad (2-4)$$

$$E_c = E_c^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{O'}^*}{C_{R'}^*} \quad (2-5)$$

式中, E_a^0 与 E_c^0 分别为GRP体系阳极和阴极电化学过程的形式电势; C_O^* , C_R^* , $C_{O'}^*$, $C_{R'}^*$ 分别为物种 O , R , O' , R' 在电极表面处的浓度; n 为电子转移数; R 为理想气体常数; T 为温度; F 为法拉第常数. 因此, 其开路电压 E_{OC} 可表示为:

$$E_{OC} = E_c - E_a = E_c^0 - E_a^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_R^{*a} C_{O'}^{*c}}{C_O^{*b} C_{R'}^{*d}} \quad (2-6)$$

由式2-6可知, GRP体系开路电压 E_{OC} 与电极界面各物质对数浓度呈线性关系, 此式为GRP体系分析传感的基础.

$$\Delta G = -nFE_{OC} \quad (2-7)$$

且当 $E_c > E_a$ 时, $E_{OC} > 0$, 由式2-7可知, 该条件下体系吉布斯自由能变 $\Delta G < 0$, 反应为自发过程. 以维生素C的分析为例, 已有文献报道维生素C的氧化产物会在电极表面吸附, 因此表现为不可逆的电化学氧化过程^[26].

在这种情况下, 反应发生的方向与电极电位是否对待测物浓度变化敏感十分重要.

由式2-6可知, GRP传感器的开路电压由阳极和阴极共同决定. 因此, 在使用阳极端进行分析检测时, 其阴极端电位应保持恒定. 对于两电极体系的GRP传感器, 通常设计氧气还原过程作为阴极反应. 虽然通过合理的电极结构设计(如: 玻璃管封装)以及使用高效的氧气还原催化剂(铂基催化剂、漆酶等), 可以提供相对稳定且相对于阳极更正的电极电位, 用于构成自发氧化还原过程, 但是该电极结构相对复杂, 且阴极端的电位和性能不易调控.

为了实现对GRP体系阴极性质的调控, Yu等^[27]以GRP原理为基础, 利用双极化(Bipolar)原理构筑了单根碳纤维驱动的活体电化学传感器, 并深入研究了影响该传感器灵敏度、选择性和稳定性的可能因素. 双极化是一种在同一导体不同位置分别同时发生电化学氧化和还原过程的现象, 按照极化方式区分, 可以分为通过外部驱动的双极化过程和自发双极化行为. 按照电极结构区分, 可分为开放式双极化(Open bipolar)电极和封闭式双极化(Closed bipolar)电极^[28]. 封闭式自发双极化体系示意图如图2a所示, 进行活体原位检测时制备成具有同等结构的微传感器, 如图2b所示. 该体系开路电压可表达为:

$$E_{OC} = \varphi_1 - \varphi_2 = (\varphi_1 - \varphi_3) + (\varphi_3 - \varphi_5) + (\varphi_5 - \varphi_4) + (\varphi_4 - \varphi_2) \quad (2-8)$$

当Bipolar内部和外部溶液氯离子浓度相同时, $Ag/AgCl$ 电极电位相同, 式2-8可简化为:

$$E_{OC} = (\varphi_5 - \varphi_4) - (\varphi_5 - \varphi_3) = E_c - E_a \quad (2-9)$$

其中, E_c 和 E_a 分别是Bipolar电极阴极端和阳极端电位.

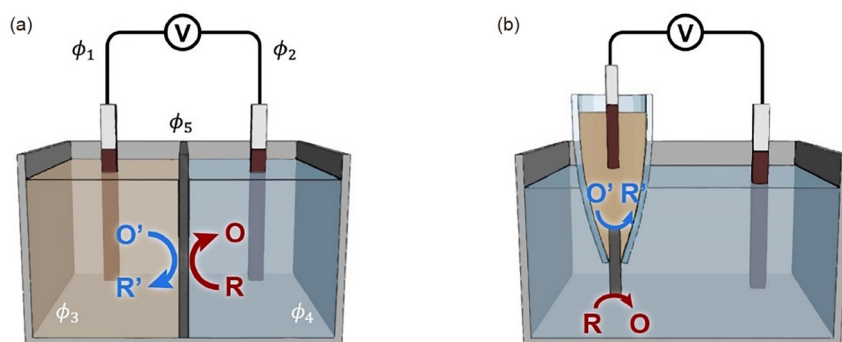


图 2 (a) 基于双极化电极的GRP体系基本原理示意图; (b) 基于双极化电极的可植入GRP微传感器电极结构设计图 (网络版彩图)

Figure 2 (a) Schematic illustration of bipolar-based GRP sensors and (b) bipolar-based brain tissue-implantable GRP microsensors (color online).

该式与式2-6描述的GRP体系有相同的数学形式. 虽然Bipolar结构的GRP传感器与两电极结构的GRP传感器具有相类似的原理, 但相对于两电极结构, Bipolar电极结构带来的优势是将GRP体系的阴极封装在玻璃管内部, 与测量环境隔离. 因此, 在GRP体系阴极电化学过程的设计和内充液的选择上有更高的灵活性, 可以使用较高浓度具有良好电化学活性的分子(如: $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ 等), 而不必考虑其对神经系统的影响.

3 实验基础

在实际测量过程中, 测量条件通常与理想的热力学平衡状态存在一定差异. 因此还需要从动力学角度考察GRP体系的开路电位特征. 以维生素C的检测为例, 使用GRP方法对其进行检测时, GRP体系的阳极端发生维生素C的不可逆氧化, 指示维生素C的浓度变化. GRP体系阴极端的构筑则可利用氧气^[29]或铁氰化钾^[30]等电化学还原过程, 用于构成自发的原电池体系. Yu等^[27]从电极过程动力学角度详细推导了该过程的GRP体系开路电压表达式, 其基本过程如下:

对阳极端电化学过程, 设电极半径为 r_0 . 在电化学测量过程中, 其定量关系满足Fick第二定律^[31]:

$$\frac{\partial C_R(r,t)}{\partial t} = D_R \left[\frac{\partial^2 C_R(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_R(r,t)}{\partial r} \right] \quad (3-1)$$

$$\frac{\partial C_O(r,t)}{\partial t} = D_O \left[\frac{\partial^2 C_O(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_O(r,t)}{\partial r} \right] \quad (3-2)$$

其中, D_R 和 D_O 分别为还原态待测物R及其电化学氧化

产物O的扩散系数. 当溶液中仅存在还原态待测物R时, 其初始条件和边界条件可写为:

$$C_R(r, 0) = C_R^*, C_O(r, 0) = 0 \quad (3-3)$$

$$\lim_{r \rightarrow \infty} C_R(r, t) = C_R^*, \lim_{r \rightarrow \infty} C_O(r, t) = 0 \quad (3-4)$$

由流量平衡, 可知:

$$D_R \left[\frac{\partial C_R(r,t)}{\partial r} \right]_{r=r_0} + D_O \left[\frac{\partial C_O(r,t)}{\partial r} \right]_{r=r_0} = 0 \quad (3-5)$$

对式3-1、3-2进行Laplace变换得:

$$\bar{C}_R(r,s) = \frac{C_R^*}{s} + \frac{B(s)}{r} e^{-(s/D_R)^{1/2}r} \quad (3-6)$$

$$\bar{C}_O(r,s) = -\frac{B(s)}{r \xi^{2\gamma}} e^{-(s/D_O)^{1/2}(r-r_0)} e^{-(s/D_R)^{1/2}r_0} \quad (3-7)$$

其中, s 为Laplace变量. 经过推导可得不可逆体系变换电流表达式:

$$\bar{i}(s) = \frac{nFA_a D_R C_R^*}{r_0 s} \left(\frac{\kappa}{1+\kappa} \right) \quad (3-8)$$

其中, A_a 为阳极端电极面积; $\kappa = r_0 k_b / D_R$; $k_b = k_a^0 e^{(1-\alpha_a)nf(E_a - E_a^0)}$; α_a 、 k_a^0 分别为GRP体系阳极反应传递系数和电子转移标准异相速率常数; $f = F/RT$; F 为法拉第常数. 上式可以逆变换为:

$$i = \frac{nFA_a D_R C_R^*}{r_0} \left(\frac{\kappa}{1+\kappa} \right) \quad (3-9)$$

其中, i 为阳极氧化还原反应的电流. 在开路状态下, 有 $i \rightarrow 0$, 可得阳极电势为:

$$E_{a,i \rightarrow 0} = E_a^0 - \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \ln(nFA_a k_a^0) + \lim_{i \rightarrow 0} \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \ln i - \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \ln C_R^* \quad (3-10)$$

设 $E_{c,i \rightarrow 0}$ 为开路状态下GRP体系阴极电位,且在测量过程中保持稳定.可得GRP体系输出开路电压 E_{OC} 表达式为:

$$E_{OC} = E_{c,i \rightarrow 0} - E_a^{0'} + \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \ln(nFA_a k_a^0) - \lim_{i \rightarrow 0} \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \ln i + \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \ln C_R^* \quad (3-11)$$

上式可以简化为:

$$E_{OC} = b + k \lg C_R^* \quad (3-12)$$

其中, k 为斜率项; b 为截距项.以上结果表明,GRP体系开路电位与待测物对数浓度呈线性关系,可以应用于分析测定.

4 方法与性能

4.1 选择性

在脑活体原位电化学分析过程中,通常会存在多种电活性神经化学物质的干扰.Yu等^[27]深入探讨了GRP体系的选择性问题.设其它干扰物反应过程如下:



此时,GRP体系阳极电势为待测物和干扰物共同形成的混合电势 E_a' .其表达式为:

$$E_{a,i \rightarrow 0} = E_{a,i \rightarrow 0} - \frac{RT}{(1-\alpha_a)nF} \times \ln \left(1 + \sum_x \frac{C_{R_x}^* k_x^0}{C_R^* k_a^0} e^{\frac{(1-\alpha_a)nF}{RT} (E_a^{0'} - E_x^{0'})} \right) \quad (4-2)$$

由式4-2可知,干扰物的存在对GRP输出开路电位(E_{OC})

的影响取决于干扰物与待测物浓度比($C_{R_x}^*/C_R^*$)、异相电子转移速率常数比(k_x^0/k_a^0)以及形式电位差($E_a^{0'} - E_x^{0'}$).Wu等^[29]在其实验研究中深入探讨了GRP体系的选择性问题.他们比较了不同神经化学物质在单壁碳纳米管修饰碳纤维电极上的线性伏安响应,如图3a所示.从图中可以看出,维生素C的氧化电位明显负于其它神经化学物质.从图3b、c中可以看出,当溶液中加入维生素C时,其开路电位的大小将由维生素C浓度决定,其它神经化学物质的加入并不会明显改变开路电位,这与理论推导结果一致.

4.2 稳定性

由于GRP体系输出开路电压等于阴极端和阳极端电极电位之差,因此GRP体系稳定性也受到两极稳定性的影响.当阴极端电极电位保持稳定时,GRP体系输出开路电压如式3-12所示.其中,斜率项 k 可表示为:

$$k = 2.3RT / ((1-\alpha_a)nF) \quad (4-3)$$

以上结果表明,GRP体系开路电位与待测物对数浓度呈线性关系,且其灵敏度不受电极有效面积以及电子转移速率的影响.

在活体原位检测过程中,脑内的蛋白质通常会吸附到电极表面,从而导致电极有效电活性面积的降低.Wu等^[29]在其实验研究中发现,GRP传感器在经过BSA溶液中浸泡处理后,虽然开路电位响应的绝对值发生改变,但灵敏度与浸泡处理之前保持一致,如图4a所示,与理论预测结果一致.而基于电解池原理的安培法记录的电流响应,在经过BSA处理后,灵敏度大幅

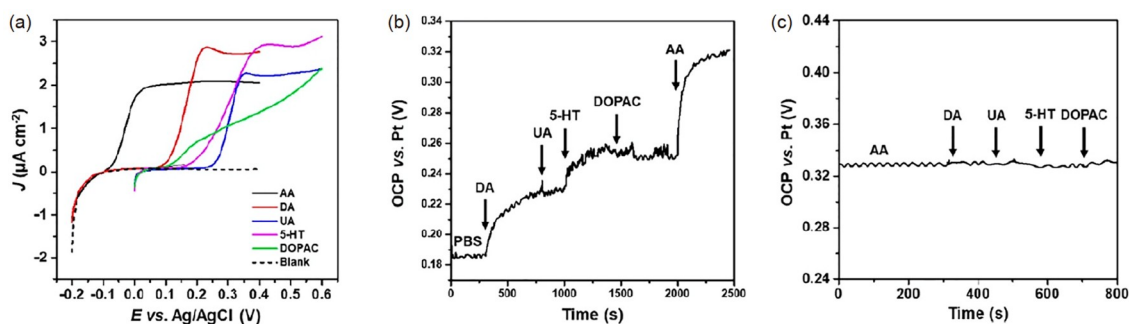


图3 (a) 单壁碳纳米管修饰碳纤维电极在1 mM不同神经化学物质溶液中的线性伏安曲线; (b) 在PBS溶液中加入0.2 mM不同神经化学物质后GRP体系开路电压响应; (c) 在含有0.2 mM 维生素C的PBS溶液中,加入0.2 mM其它神经化学物质后GRP体系的开路电压响应^[29] (网络版彩图)

Figure 3 (a) Linear sweep voltammograms recorded with single-walled carbon nanotube-modified carbon fiber electrodes in PBS containing 1 mM AA, DA, UA, 5-HT, and DOPAC. (b) OCP responses of GRP sensors to sequential injections of 0.2 mM different neurochemicals in blank PBS. (c) OCP responses of GRP sensors to sequential injection of different neurochemicals in PBS containing 0.2 mM AA ^[29] (color online).

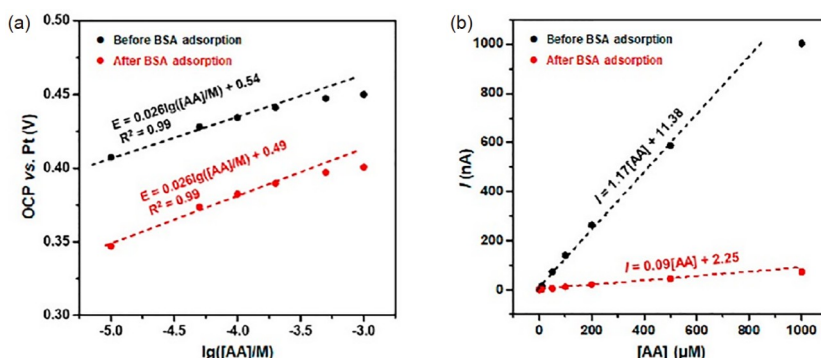


图 4 GRP传感器(a)和安培法传感器(b)在BSA溶液中浸泡前后校正曲线^[32] (网络版彩图)

Figure 4 Calibration curves of GRP sensors (a) and amperometric sensors (b) before and after immersion in 10 mM PBS solution containing 40 mg mL⁻¹ BSA ^[32] (color online).

下降, 如图4b所示。

阴极端电极电位的稳定性主要与电极结构、所设计的阴极反应以及底物浓度相关。对于两电极的GRP体系, 通常使用氧气还原过程作为阴极反应, 并使用外部敞开, 简短控制的玻璃毛细管进行封装。Wu等^[29]通过有限元模拟研究了玻璃管内物质的传输过程。他们发现对于该结构的GRP阴极电极, 即使经过24 h的扩散消耗过程, 管内物质浓度依然基本保持恒定。

为了进一步简化电极结构, 使GRP体系阴极端易于设计, Yu等^[27]发展了基于Bipolar电极结构的GRP传感器, 将阴极端与传感器外部测量环境相互分隔。该设计使阴极端电极反应的选择更加灵活。考虑如式4-4所示阴极过程:



由Nernst方程, 其电极电位可表示为:

$$E_c = E_c^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{O'}(x=0)}{C_{R'}(x=0)} \quad (4-5)$$

其中, $C_{O'}(x=0)$ 和 $C_{R'}(x=0)$ 分别为电极表面氧化态物质 $\mathbf{O}'$ 和还原态物质 $\mathbf{R}'$ 的浓度。可表示为:

$$C_{O'}(x=0) = C_{O'}^* \left(1 - \frac{i_c}{i_{d,c}} \right) \quad (4-6)$$

$$C_{R'}(x=0) = C_{R'}^* \left(1 - \frac{i_c}{i_{d,a}} \right) \quad (4-7)$$

其中, i_c 为阴极端电流; $C_{O'}^*$, $C_{R'}^*$ 分别为内充液中氧化态和还原态物质浓度; $i_{d,c}$ 和 $i_{d,a}$ 分别为阴极端还原和氧化过程的极限扩散电流, 且满足如下关系:

$$i_{d,c} = nFA_c m_{O'} C_{O'}^* \quad (4-8)$$

$$i_{d,a} = -nFA_c m_{R'} C_{R'}^* \quad (4-9)$$

其中, $m_{O'}$ 和 $m_{R'}$ 分别为氧化态物质 $\mathbf{O}'$ 和还原态物质 $\mathbf{R}'$ 的物质传递系数。 A_c 为阴极端电极面积。将式4-6~4-9代入式4-5可得:

$$E_c = E_c^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{m_{O'}}{m_{R'}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_{d,c} - i_c}{i_c - i_{d,a}} \quad (4-10)$$

令 $m_{O'} = m_{R'} = m$, $C_{O'}^*/C_{R'}^* = a$, $C_{O'}^* + C_{R'}^* = C$ 求得:

$$\frac{dE_c}{di_c}(i_c \rightarrow 0) = -C \frac{RT}{n^2 F^2 A_c m} \frac{(1+a)^2}{a} \quad (4-11)$$

当 $a=1$ 时, 即 $C_{O'}^* = C_{R'}^*$ 时, $dE_c/di_c(i_c \rightarrow 0)$ 有最小值, 处于最稳定状态。例如, 当使用 $K_3Fe(CN)_6$ 和 $K_4Fe(CN)_6$ 溶液作为内充液, 二者比例为1:1时体系最稳定。

4.3 兼容性

对于基于电解池原理的电化学分析方法, 测量过程中需要向工作电极施加极化电压并记录电流响应实现分析检测的目的。而该过程可能会对神经元电活动造成影响, 并对电生理等其它记录系统产生干扰。与之不同的是, 基于原电池原理的GRP方法则不需要外部施加极化电压, 理论上能够实现很好的神经元兼容性。

为了验证GRP方法的生物兼容性问题, Yu等^[27]将GRP传感器和电生理阵列电极同时植入大鼠皮层脑区(如图5a所示), 同时进行电化学以及电生理信号的记录(如图5b, c所示)。可以看出, GRP记录开始前后, 神经元放电频率并没有显著性改变。这一结果表明, GRP

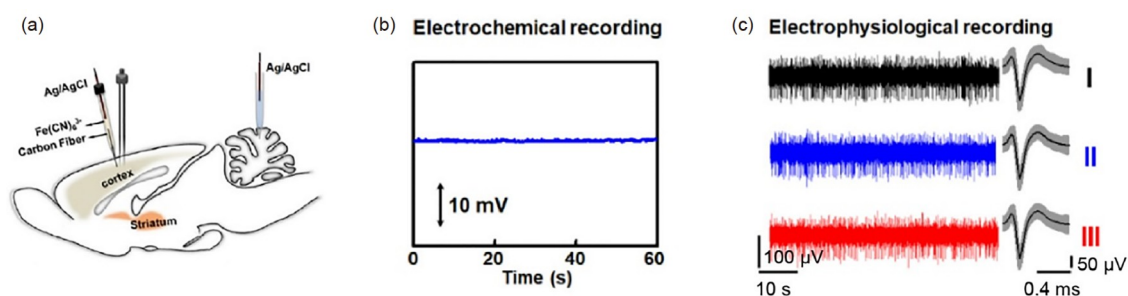


图5 (a) 单根碳纤维驱动的微传感器和电生理电极同步记录示意图; (b) 在电生理记录过程中OCV响应曲线; (c) 单根碳纤维驱动的微传感器开启前(I, 0~60 s)、开启时(II, 60~120 s)以及开启后(III, 120~180 s)电生理记录结果(左图标尺: 电位100 μ V, 时间10 s; 右图标尺: 电位50 μ V, 时间0.4 ms)^[27] (网络版彩图)

Figure 5 (a) Schematic illustration of *in vivo* synchronous open-circuit voltage (OCV) measurement with the microsensor and electrophysiological recording by MEA at calm state. (b) Plot of OCV versus time recorded by the microsensor during electrophysiological recording. (c) Left: Representative action potential traces recorded by the MEA before (I, 0–60 s), during (II, 60–120 s) and after (III, 120–180 s) the measurement by the microsensor and corresponding waveforms recorded during the three stages. Scale bars: 100 μ V (vertical), 10 s (horizontal). Right: Corresponding waveforms of an example neuron stably recorded during the three stages. Scale bars: 50 mV (vertical), 0.4 ms (horizontal) [27] (color online).

方法具有良好的神经元兼容性。此外, GRP记录和电生理记录之间也没有干扰, 可以同步进行。

5 应用举例

5.1 基于两电极体系的GRP传感器

维生素C(Vitamin C)是一种重要的水溶性维生素, 在脑神经系统中广泛分布。维生素C作为一种抗氧化剂和神经调质, 在许多神经生理、病理过程中起到重要作用^[33]。虽然使用碳电极可以在活体环境中实现维生素C的电化学氧化, 但其氧化过程为内壳层反应, 对电极表面化学性质敏感。此外, 其氧化产物脱氢抗坏血酸(Dehydroascorbic acid, DHA)容易发生水解并生成电化学惰性的二酮古洛糖酸(2,3-diketogulonic acid)吸附在电极表面而钝化电极, 造成灵敏度下降。因此, 在未经修饰的商用碳纤维电极上, 维生素C的电化学氧化普遍存在电子转移速率慢、过电位高以及稳定性差等问题^[34]。神经系统中细胞间隙通常含有较高浓度的维生素C, 为了在这种环境下实现脑内维生素C的精准测量, Zhang等^[35]率先利用碳纳米管对维生素C电化学氧化的催化性能, 通过利用差分脉冲伏安法(Differential pulse voltammetry, DPV)方法实现了维生素C的活体原位检测。而后, 基于安培法^[36,37]和快速扫描伏安法^[38]的维生素C检测方法相继被提出。

为了避免电化学测量过程中外部施加极化电压对神经系统的影响, 2018年Wu等^[29]基于上述GRP原理,

首次提出具有两电极结构的GRP传感器用于脑内维生素C活体原位分析的新思想。为了提高GRP传感器对维生素C的选择性, 他们使用单壁碳纳米管进行电极修饰, 以提高维生素C电催化性能, 并降低过电位。为了进一步增加该GRP体系自发电化学反应的驱动力, 他们使用漆酶修饰的碳纤维电极催化氧气还原反应作为阴极, 构成自发的氧化还原体系, 并通过系统的开路电压指示维生素C的浓度变化。实验结果表明, 该GRP传感器具有良好的稳定性, 能够实现脑内维生素C的活体原位实时监测。使用该GRP传感器, 他们研究了皮层脑区在全脑缺血-再灌注过程脑内维生素C的浓度变化规律。

5.2 基于阵列电极的GRP传感器

基于上述两电极体系的GRP传感器, Wei等^[30]进一步将GRP方法与在体多通道电生理记录方法相结合, 在阵列电极上通过对单个记录位点修饰单壁碳纳米管作为GRP体系的阳极端, 实现对维生素C高效的电催化氧化。使用铂电极作为GRP体系的阴极端, 与阳极端构成自发的氧化还原体系, 实现了维生素C和电生理信号的同步检测, 如图6a所示。随后, 他们将电极植入大鼠皮层脑区并同步记录电化学和电生理信号(图6b~d)。实验结果表明, GRP电化学记录过程和电生理记录过程之间不会产生干扰, 二者可以联用实现同步检测。利用该方法实现了传播性抑制过程中维生素C和神经元电活动的同步记录(图6e)。

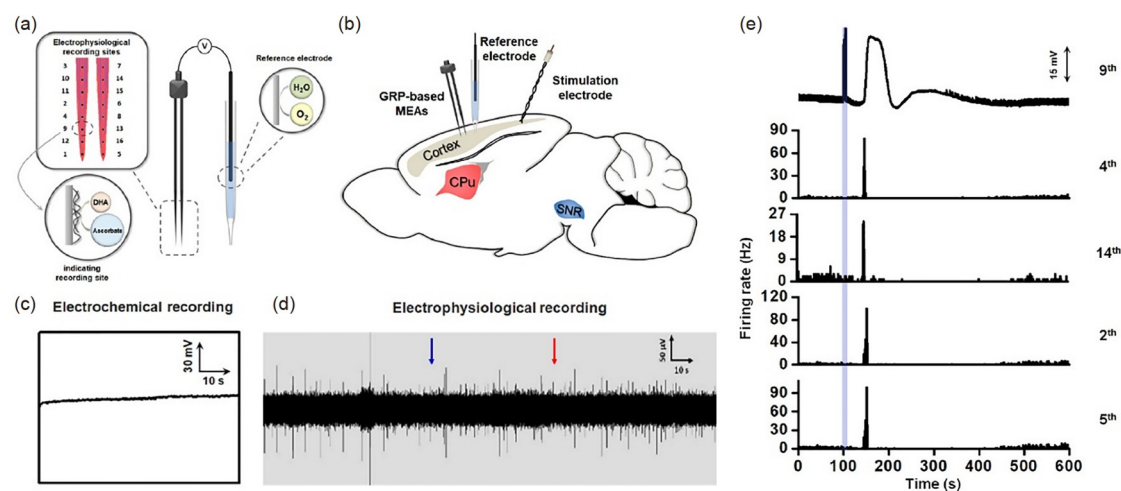


图 6 (a) 基于 GRP 的微电极阵列结构示意图; (b) 皮层脑区电极植入示意图; (c, d) 电化学(c)及电生理(d)同步记录结果; (e) 传播性抑制过程中电化学及电生理信号记录结果 (网络版彩图)

Figure 6 (a, b) Schematics of the GRP-based microelectrode array (MEA) sensor (a) and co-implantation of the GRP-based MEA and SD-inducing probe into the rat cortex (b). (B) Plot of OCV vs. time recorded by the indicating electrode over 60 s during electrophysiological recording. (c) Representative extracellular action potential traces recorded by MEAs. Blue and red arrows respectively indicate turn-on and turn-off of electrochemical recordings. (e) Synchronous concentration change of the ascorbate and spike-firing rates of four cortical neurons simultaneously measured by the MEA after electrical stimulation (indicated by a blue solid rectangle, 600 μ A, 5 s) (color online).

6 总结与展望

迄今为止, 活体原位电化学研究的重点从最初的方法学建立, 到脑神经化学物质高选择、高灵敏、高通量检测, 再到实现安全可靠的活体原位传感, 已经经历了多个阶段长时间的发展。通过设计不同的电化学分析方法、电极结构以及构筑功能化的传感界面, 已经实现了脑内多种小分子神经化学物质的高选择性、高时空分辨甚至长时程的活体分析检测, 活体原位电化学分析方法也因此成为脑神经化学过程研究的重要手段之一, 在神经化学的研究扮演者越来越重要的角色。尽管如此, 目前的原位电化学分析方法仍然面临着许多挑战, 需要进一步发展新一代的活体电化学分析原理和方法, 对脑内更多神经化学物质实现安全、精准的分析检测。GRP方法作为一个近年来提出

的新方法, 一方面具有神经元兼容性好、灵敏度受电极污染影响小等优势, 最大程度降低电化学测量方法对神经系统的影响。另一方面, 可以实现和电生理系统等脑神经分析方法进行同步记录, 为深入研究复杂神经生理过程, 理解脑神经化学物质生理作用提供重要工具, 在活体原位电化学分析中具有广泛的应用前景。虽然目前已报道的可以通过GRP原理进行分析检测的神经化学物质种类还十分有限, 但我们预期, 以本文所述GRP基本原理为基础, 通过对电极界面和电极结构的合理设计和构筑, 可以利用GRP方法实现更多神经化学物质的分析检测。此外, 该方法也能够与电生理、光遗传、神经影像学等生理学研究工具联用, 更全面地反映脑神经过程, 为复杂活体神经过程的化学分析提供可能。

参考文献

- 1 Frank JA, Antonini MJ, Anikeeva P. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1013–1023
- 2 Poldrack RA, Farah MJ. *Nature*, 2015, 526: 371–379
- 3 Dreier JP. *Nat Med*, 2011, 17: 439–447
- 4 Liu Z, Tian Y. *Sci China Chem*, 2021, 64: 915–931
- 5 Zhou M, Jiang Y, Wang G, Wu W, Chen W, Yu P, Lin Y, Mao J, Mao L. *Nat Commun*, 2020, 11: 3188

- 6 Wu F, Pan C, He CT, Han Y, Ma W, Wei H, Ji W, Chen W, Mao J, Yu P, Wang D, Mao L, Li Y. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 16861–16867
- 7 Gao X, Ma W, Mao J, He CT, Ji W, Chen Z, Chen W, Wu W, Yu P, Mao L. *Chem Sci*, 2021, 12: 15045–15053
- 8 Guo S, Yu P, Li W, Yi Y, Wu F, Mao L. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 2074–2082
- 9 Xu C, Wu F, Yu P, Mao L. *ACS Sens*, 2019, 4: 3102–3118
- 10 Zhou Q, Zhang LM, Tian Y. *J Electrochem*, 2019, 25: 160–171
- 11 Clark Jr. LC, Misrahy G, Fox RP. *J Appl Physiol*, 1958, 13: 85–91
- 12 Kissinger PT, Hart JB, Adams RN. *Brain Res*, 1973, 55: 209–213
- 13 Armstrong-James M, Millar J, Kruk ZL. *Nature*, 1980, 288: 181–183
- 14 Rodeberg NT, Sandberg SG, Johnson JA, Phillips PEM, Wightman RM. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8: 221–234
- 15 Xu C, Jiang Y, Yu P, Mao LQ. *J Electrochem*, 2022, doi: 10.13208/j.electrochem.210855
- 16 Frost M, Meyerhoff ME. *Anal Chem*, 2006, 78: 7370–7377
- 17 Wellman SM, Kozai TDY. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8: 2578–2582
- 18 Schwerdt HN, Shimazu H, Amemori KI, Amemori S, Tierney PL, Gibson DJ, Hong S, Yoshida T, Langer R, Cima MJ, Graybiel AM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 13260–13265
- 19 Wang L, Chen J, Wang J, Li H, Chen C, Feng J, Guo Y, Yu H, Sun X, Peng H. *Sci China Chem*, 2021, 64: 1763–1769
- 20 Feng T, Ji W, Zhang Y, Wu F, Tang Q, Wei H, Mao L, Zhang M. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 23445–23449
- 21 Hefti F, Felix D. *J Neurosci Methods*, 1983, 7: 151–156
- 22 Zhao L, Jiang Y, Hao J, Wei H, Zheng W, Mao L. *Sci China Chem*, 2019, 62: 1414–1420
- 23 Zhao F, Liu Y, Dong H, Feng S, Shi G, Lin L, Tian Y. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 10426–10430
- 24 Smith LA, Glasscott MW, Vannoy KJ, Dick JE. *Anal Chem*, 2020, 92: 2266–2273
- 25 Zhang L, Xu T, Ji W, Wang X, Cheng S, Zhang S, Zhang Y, Zhang M. *Anal Chem*, 2021, 93: 7063–7070
- 26 Ji WL, Zhang MN, Mao LQ. *Chin J Anal Chem*, 2019, 47: 1559–1571 (in Chinese) [纪文亮, 张美宁, 毛兰群. 分析化学, 2019, 47: 1559–1571.]
- 27 Yu P, Wei H, Zhong P, Xue Y, Wu F, Liu Y, Fei J, Mao L. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 22652–22658
- 28 Crooks RM. *ChemElectroChem*, 2016, 3: 357–359
- 29 Wu F, Cheng H, Wei H, Xiong T, Yu P, Mao L. *Anal Chem*, 2018, 90: 13021–13029
- 30 Wei H, Li L, Jin J, Wu F, Yu P, Ma F, Mao L. *Anal Chem*, 2020, 92: 10177–10182
- 31 Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. New York: John Wiley & Sons, 2001
- 32 Wu F, Yu P, Mao L. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 2692–2704
- 33 Dutta A, Gautam R, Chatterjee S, Ariese F, Sikdar SK, Umapathy S. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 6: 1794–1801
- 34 Cheng H, Li L, Zhang M, Jiang Y, Yu P, Ma F, Mao L. *TrAC Trends Anal Chem*, 2018, 109: 247–259
- 35 Zhang M, Liu K, Xiang L, Lin Y, Su L, Mao L. *Anal Chem*, 2007, 79: 6559–6565
- 36 Xiao T, Wang Y, Wei H, Yu P, Jiang Y, Mao L. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 6616–6619
- 37 Jin J, Ji W, Li L, Zhao G, Wu W, Wei H, Ma F, Jiang Y, Mao L. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 19012–19016
- 38 Xue Y, Ji W, Jiang Y, Yu P, Mao L. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 23777–23783

Galvanic redox potentiometry

Yifei Xue¹, Fei Wu², Yanan Jiang¹, Ping Yu², Lanqun Mao^{1*}

¹College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

²Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

*Corresponding author (email: lqmao@bnu.edu.cn)

Abstract: The development of *in vivo* analytical methods for accurate, efficient, and neuron-compatible measurement of neurochemicals during physiological and pathological processes in living brain has important implications for understanding complex neurophysiological processes and the molecular mechanisms of brain functions. Electrochemical methods have been widely used for the accurate measurement of multiple neurochemicals, which benefits from their high spatio-temporal resolution, selectivity, and sensitivity properties. However, the nervous system is sensitive to electrical stimuli. Therefore, traditional electrochemical measurement process would affect spontaneous neuronal activity in the brain and make it difficult to cooperate with electrophysiological recording. To address it, galvanic redox potentiometry has recently established for neuron-compatible *in vivo* electrochemical analysis. The method built on galvanic cell configurations bearing the advantages of high neuronal compatibility and no interference to electrical recording. These properties are useful for neurochemical studies. In this review, we summarize the status of *in vivo* electrochemical analysis, systematically elaborate the recent progress of galvanic redox potentiometry in terms of fundamental principles and practical applications and provide a perspective for the future development.

Keywords: electrochemical analysis, brain neurochemistry, *in vivo* sensing

doi: [10.1360/SSC-2022-0021](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0021)