单颗粒电化学分析

李婷^{①③}, 刘洋^{①②}, 蒋亚楠^①, 王建华^②, 于萍^{①③*}, 毛兰群^{①③*}

① 中国科学院化学研究所, 中国科学院活体分析化学重点实验室, 北京分子科学国家实验室, 北京 100190

② 东北大学理学院分析科学研究中心, 沈阳 110819

③ 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: yuping@iccas.ac.cn; lqmao@iccas.ac.cn

收稿日期: 2016-04-27; 接受日期: 2016-06-23; 网络版发表日期: 2016-09-05

国家自然科学基金(编号: 21321003, 21435007, 21210007, 21475138, 21322503)、国家重点基础研究发展计划(编号: 2013CB933704)资助项目

摘要 颗粒因其在基础研究和实际应用中均具有重要的价值, 因而得到了广泛的关注. 由于颗粒的功能和性质与其形貌、尺寸、电荷密度和表面化学性质等密切相关, 因此, 发展可用于单个颗粒(简称单颗粒)检测和分析的方法对于了解颗粒结构与性能的关系, 进而研究其功能将具有重要的意义. 单颗粒电化学(electrochemical analysis of single nanoparticle)检测技术是在最近几年发展起来的, 由于其可以精确地探测单个纳米颗粒的性质(如表面电荷、几何尺寸、表面化学), 因而展现出了诱人的应用前景. 本文将对最近发展起来的单颗粒电化学检测方法进行详细介绍, 并根据检测原理将单颗粒电化学检测分为3类: 基于碰撞原理的微电极技术、基于电阻-脉冲原理的纳米通道技术以及基于电化学和其他方法的联用技术. 基于此分类, 重点综述单颗粒电化学检测的原理、方法和潜在的应用.

关键词 单颗粒, 电化学, 碰撞, 电阻-脉冲

1 引言

纳米颗粒, 包括金属、金属氧化物、聚合物等人工合成以及蛋白质、病毒、囊泡等自然界存在的粒子, 因其在基础研究和实际应用领域均具有重要的意义, 因此在最近几十年中被广泛关注^[1-4]. 例如, 无机纳米颗粒已经是生活中常见的材料, 从纺织品到电子设备以及医疗保健产品等, 纳米颗粒无处不在^[5]; 在食品行业, 二氧化钛、二氧化硅、金属银及人工纳米脂质体、囊泡等多种纳米颗粒已被用作食品添加剂和包装材料^[6]; 在环境科学方面, 纳米颗粒的释放对生态系统的影响, 已经引起了人们的高度重视^[7]. 除了上述

领域, 纳米颗粒在基础研究领域也受到了人们的密切关注. 由于具有较高的比表面积和可调控的物理化学性质, 纳米颗粒在催化和能源等领域有着巨大的应用价值. 例如, 纳米材料已经被广泛应用于能量的转化和存储^[8-10]. 而有机纳米颗粒由于其分子结构的多样性及其与其他材料的复合能力, 在生物制药和生物成像方面的应用日渐凸显, 这些材料已经被应用于药物的输送等领域^[11,12]. 另外, 生物纳米颗粒, 如蛋白、囊泡和病毒等, 在生命的代谢以及生理病理过程中都起着重要的作用. 然而, 所有这些颗粒的功能和性质都与其形貌、尺寸、电荷密度和表面化学性质等密切相关. 因此, 发展可用于单颗粒检测和分析的研究方

引用格式: 李婷, 刘洋, 蒋亚楠, 王建华, 于萍, 毛兰群. 单颗粒电化学分析. 中国科学: 化学, 2016, 46: 1064-1079
Li T, Liu Y, Jiang Y, Wang J, Yu P, Mao L. Electrochemical analysis of single particles. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 1064-1079, doi: 10.1360/N032016-00094

法, 对于了解颗粒结构和性能的关系, 进而研究其功能具有重要的意义.

目前, 可用于颗粒检测的方法和技术主要包括电镜技术和光谱技术两大类. 对于前者, 比较普遍的有扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM). 但是, 这类方法目前还很难直接用于单颗粒在溶液状态下的实时检测. 动态光散射技术(DLS)虽然可用于颗粒在溶液中原位实时检测, 但其给出的仍是整个体系中颗粒的统计结果, 尚无法提供单个颗粒的具体特征, 并且体系中存在的已团聚的大颗粒或杂质对检测结果会存在干扰^[13].

除了上述两种常见手段, 人们最近也发展了一系列新的可用于单颗粒检测的方法, 如单纳米颗粒光谱学(single nanoparticle spectroscopy)、电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectroscopy, ICPMS)、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、纳米粒子追踪分析法(nanoparticle tracking analysis)等^[14,15]. 单纳米颗粒光谱学可用于测量单个颗粒的吸附. 光谱法不仅能反映单颗粒的化学沉积、形貌和尺寸, 还能灵敏地反映颗粒周围介质的折射率的变化, 进而检测颗粒表面的分子事件^[16]. 光学吸收可以从彩色数码相机的RGB值或者更精确地利用光度计进行分析^[17,18]. Ament等^[19]尝试通过改善光学条件和数据处理来检测单个蛋白质分子是否成功键合到纳米棒上. 他们发现, 当分子量为450 kDa的纤维粘连蛋白吸附到单个纳米棒时, 其散射光波长移动了0.3 nm. 电感耦合等离子体质谱也可以用来对单颗粒进行检测和计数. 例如, 当Au纳米颗粒穿过质谱检测器时, 则产生单个颗粒的脉冲信号峰^[20]. Rakcheev等^[21]通过将ICPMS与色谱法联用, 进一步提高了该技术对单颗粒检测和计数的性能. 荧光共振能量转移则是另一种可以达到单分子水平的检测手段^[22,23]. 量子点(quantum dots, QDs)由于其窄的发射频宽、可调控的光学性质、高的量子产率和优良的光稳定性, 已被广泛用作荧光标记物. 通过对单个QD荧光信号峰进行统计, 可以实现对QD浓度的定量测定. 例如, 将包裹了QDs的脂质体用DNA探针修饰后负载到分散在含有目标DNA溶液中的磁性颗粒上, 磁性分离之后, 可以分析出QDs和目标DNA的含量^[24]. 纳米粒子追踪分析法也可以实现对单个纳米颗粒的分析. 但是, 由于尺寸特别小的颗粒产生的散射光很弱, 所以该方法

在实际检测中受到限制^[25].

随着电分析化学技术和微纳加工技术的发展, 单颗粒电化学检测技术在最近几年得到了快速发展. 由于该方法可以精确地探测单颗粒的性质(如表面电荷、几何尺寸、表面化学), 因而在单颗粒分析中展现出了强大的应用前景^[26-28]. 本文将根据单颗粒电化学检测的原理将此方法分为3类: 基于碰撞原理的微电极技术、基于电阻-脉冲原理的纳米通道技术、基于电化学和其他方法的联用技术. 并按照此分类, 对单颗粒电化学检测的原理和应用展开综述.

2 基于碰撞原理的微电极技术 (nanoparticle-microelectrode collision)

理论上, 若电活性物质的浓度降至约1 pmol L⁻¹, 扩散通量(j)则会降至10⁻¹⁸ mol s⁻¹ cm⁻²或6×10⁵ s⁻¹ cm⁻², 产生的电流密度将为10⁻¹³ A cm⁻². 据此, 可估算出经扩散迁移至直径10 μm (或面积约10⁻⁶ cm²)的超微电极(ultramicroelectrode, UME)的颗粒数约为1 s⁻¹. 这样一个时间尺度显然可以满足研究单个颗粒的碰撞行为, 为利用电化学方法检测单颗粒提供了理论依据.

研究单颗粒电化学行为, 可以追溯到20世纪90年代, Heyrovský等最早提出了利用颗粒与电极间的相互作用, 实现了颗粒的电化学研究. 利用此方法, 可以实现对颗粒尺寸分布^[29]、还原机理^[30]、混合颗粒的成分和含量^[31]等进行分析. 然而, 由于他们当时研究采用的粒子浓度较大, 故很难观察到单个粒子的电化学行为. 近几年, 该领域在Bard等和Compton等的积极探索下, 不断发展, 并取得了显著的研究成果. 通过对单颗粒与电极间碰撞过程的研究, 实现了单颗粒的实时检测, 可探究颗粒的碰撞频率、尺寸分布、浓度大小、形貌特征以及电极表面状态等. 通过颗粒与电极碰撞来实现单颗粒检测的方法具有如下优点: (1) 可以用来研究颗粒催化下某一氧化还原反应的动力学; (2) 可以用于金属纳米颗粒催化性能的研究; (3) 由于只有发生电子转移才能引起电流变化, 所以溶液中的杂质很难产生干扰信号. 本部分将根据基于颗粒与微电极碰撞检测单颗粒的不同模式, 如电催化电流放大(electrocatalytic current amplification)、区域扩散阻塞(area and diffusion blocking)、颗粒直接电解(direct electrolysis), 对每一种模式的检测原理、定量模型以及检测对象进行综述.

2.1 电催化电流放大(electrocatalytic current amplification)

2.1.1 检测原理

Bard等^[32]于2007年首次提出利用电催化电流放大原理,实现单金属颗粒铂纳米粒子(Pt nanoparticles, NPs)在碳和金超微电极上的碰撞检测。一般地,将颗粒分散于含有电活性物质的溶液中,颗粒将随机与电极发生碰撞。在这种场合,电极对所选择的电活性物种的活性相对较低,即在施加特定的电压下,电活性物种在电极表面基本不能发生法拉第反应。当颗粒与电极之间发生碰撞时,通过颗粒与电极之间存在的隧道效应等,即可形成电接触。此时的纳米颗粒即相当于纳米电极,催化溶液中存在的电活性物种的氧化还原反应,进而实现单颗粒的高灵敏检测,具体原理如图1所示。在特定的施加电压下,电极材料本身是稳定的,而且对于溶液相电活性物种的电化学活性相对较低,即形成了惰性电极,其响应电流较小;而在相同的施加电压下,颗粒则可以对于电活性物种产生较大的催化电流,从而形成电催化电流放大。为了实现这一目的,可利用内球层(inner-sphere, IS)电子转移反应(如肼的氧化或质子的还原)。由于这类反应中反应物与电极材料之间存在较强的相互作用,电催化响应电流会因电极材料的不同而发生变化。然而,对于外球层(outer-sphere, OS)电子转移反应,反应物和电极之间的相互作用较弱,不同电极材料间响应的差异较小,则很难应用于该模型的研究。

图1 利用不同材料间的电催化差异实现单颗粒检测的示意图(网络版彩图)

2.1.2 定量模型

基于电催化电流放大来实现单颗粒检测,对于不同的电催化体系,单颗粒碰撞产生的响应电流模式有所不同。单颗粒碰撞检测的电流响应模式主要受颗粒与电极间相互作用的影响,即取决于颗粒在电极表面吸附能力的强弱。如图2所示,当颗粒与电极发生碰撞并黏附在电极表面时,颗粒相当于球电极,其电催化作用引起增大的阶梯状(staircase)电流产生。某些电催化体系可得到稳态的电流响应,如质子的还原^[32]、肼的氧化^[33]、过氧化氢的还原^[32]等。若电催化反应过程中的电子转移速率很快(如扩散限制),则产生的阶梯状电流的大小可根据式(1)进行估算^[34]:

$$i = 4\pi(\ln 2)n_0FD_0C_0r_0 \quad (1)$$

式中 n_0 为电子转移数, F 为法拉第常数, D_0 为反应物扩散常数, C_0 为反应物浓度, r_0 为颗粒半径。

Bard等^[35]对颗粒的碰撞频率进行了研究。他们发现,若颗粒的吸附速率常数 k_{ads} 较大,则最大碰撞频率满足菲克(Fick)定律,可根据式(2)进行估算:

$$f_{\text{ads}} = 4D_p r_d c_p^{\text{bulk}} \quad (2)$$

式中 D_p 为颗粒扩散系数, r_d 为电极半径, c_p^{bulk} 为颗粒的平均体相浓度。

若颗粒的吸附速率常数 $k_{\text{ads}} \ll 4D_p/\pi r_d$,则最大碰撞频率可根据式(3)进行估算:

$$f_{\text{ads}} = \pi r_d^2 k_{\text{ads}} c_p^{\text{bulk}} \quad (3)$$

如图3所示,当颗粒与电极表面只发生短时间的电接触,如颗粒与电极表面接触但不充分黏附,即发

图2 阶梯状稳态电流响应模式的原理示意图(网络版彩图)

图3 峰形瞬态电流响应模式的原理示意图(网络版彩图)

生弹性碰撞时,会产生峰形的(blip or spike)电流瞬态响应.若颗粒在与电极碰撞的过程中可稳定存在,则峰形电流的形状只受颗粒停留时间的影响.但在某些情况下,如杂质吸附、气泡截留、颗粒解离及钝化失活等,可能使得阶梯状电流响应信号发生衰减,形变为类似峰形的电流响应^[32-33,36].与阶梯状电流响应不同,当体系产生的是峰形电流响应时,因不存在浓度梯度,颗粒的碰撞频率不能根据其扩散控制通量进行估算,也不能根据最终的电流来估算电极吸附的颗粒数.一般认为,此时颗粒的碰撞频率 f_{ela} 与电极表面积呈正相关^[35],如式(4)所示.

$$f_{\text{ela}} = \pi r_d^2 k_{\text{ads}} c_p^{\text{pca}} \quad (4)$$

式中 c_p^{pca} 为颗粒在电极表面(或最接近点平面)的平均浓度(time-averaged concentration).

然而,产生峰形电流响应的电催化体系中,其背景电流能保持相对稳定,可掩盖连续颗粒碰撞信号的干扰,使得碰撞事件的区分变得容易.因此,基于峰形电流响应模式的单颗粒检测在某些分析应用方面中具有独特的优势(如研究颗粒的尺寸分布等).

颗粒在电极上的黏附过程较复杂,至今人们对其理解还不是很充分.黏附过程与电极材料、颗粒材料、颗粒封端剂、零电点、电极表面处理、电解质溶液组成以及发生的电极反应等诸多因素相关.因此,通过对颗粒或电极进行化学修饰或预处理等,改变颗粒黏性、电极表面状态及反应中的电子转移过程,可更加深刻地理解颗粒在电极表面的碰撞行为.

2.1.3 检测对象

基于电催化电流放大原理可实现多种单颗粒的电化学分析与检测.除了可检测贵金属纳米颗粒外^[32,33,37-43],该方法已被应用于其他种类材质的单颗粒检测,包括金属氧化物^[44]、过渡金属二硫化物^[45]等.近来Eriksson等将这一原理应用到了酶分子的检测,他们利用漆酶对氧气的催化还原能力,巧妙地实现了单个漆酶分子的检测^[46].基于电催化电流放大原理实现单颗粒分析的研究状况见表1.

表1 基于电催化电流放大原理实现单颗粒分析

颗粒	电极	研究对象	氧化还原指示反应	响应模式
Pt NP ^[32]	C UME Au UME	单颗粒检测; 电极材料及其修饰	肼氧化	峰
Pt NP ^[33]	Au UME C UME	颗粒尺寸分布; 电极材料及其预处理	肼氧化	阶梯
Pt NP ^[37]	Au UME	DNA 检测	肼氧化	阶梯
Pt NP ^[38]	Au UME Pt UME	颗粒碰撞频率(磁场)	肼氧化	阶梯
Au NP-SWCNT ^[39]	Pt NE	颗粒碰撞产生的区域放大效应	FcMeOH 氧化	阶梯
Pt NP ^[40]	Au UME	颗粒尺寸分布及其动力学特征(OCP)	肼氧化	阶梯
Ag NP, Au NP ^[41]	C UME	单颗粒的电子转移动力学	质子还原	峰
Pt NP ^[42]	TiO ₂ /Pt UME	电子隧道效应	Fe(CN) ₆ ³⁻ 还原	阶梯
Pt NP ^[43]	C UME	单颗粒检测的电化学特征信息(FSCV)	肼氧化	峰
TiO ₂ NP ^[44]	Pt UME	半导体颗粒的光电响应检测; 催化机理探讨	甲醇氧化	阶梯
MoS ₂ , WS ₂ , MoSe ₂ , WSe ₂ NP ^[45]	SPE	颗粒浓度; 颗粒的双功能表现	质子还原	峰
漆酶 ^[46]	Au UME	催化活性及催化机理	氧还原	峰

2.2 区域扩散阻塞(area and diffusion blocking)

2.2.1 检测原理

2004年, Lemay等^[47]提出了利用区域扩散阻塞原理, 实现单绝缘颗粒乳胶小球在金微电极上碰撞的时间分辨检测. 如图4所示, 在一定的电位下, 溶液中具有电化学活性的物质可在电极表面发生扩散限制的氧化或还原反应. 当绝缘颗粒到达电极表面时, 会阻碍电化学活性物质向电极表面的扩散, 进而导致其扩散流量减小. 若绝缘颗粒不可逆地吸附在电极表面, 则会产生减小的扩散限制的稳态阶梯状电流响应, 从而实现绝缘单颗粒的碰撞检测.

2.2.2 定量模型

根据Stokes-Einstein方程^[48]和圆盘电极半球面扩散下的扩散通量表达式^[49], 可得到球形颗粒与电极间发生碰撞的预期频率 f_s , 其满足式(5):

$$f_s = 4D_s C_s r_e \quad (5)$$

式中 D_s 为颗粒扩散系数, C_s 为颗粒浓度, r_e 为电极半径.

若实验中观察到的颗粒碰撞频率大于估算的预期碰撞频率, 则可能是颗粒电泳迁移造成的. 因官能团的存在或其他原因, 导致颗粒表面带有一定电性的电荷. 溶液中电化学活性物质在电极表面发生氧化或还原反应, 形成电场, 带电颗粒从而在此电场的驱动下迁移至电极表面. 若实验中发现颗粒的到达率与电化学活性物质产生的氧化或还原电流成正比, 则能恰

好说明颗粒主要因迁移作用到达电极, 而不是扩散作用. 迁移作用下, 颗粒的到达率 J_{mig} 可以用式(6)近似估算^[47]:

$$J_{\text{mig}} = \frac{1}{\Delta t} \approx \frac{IC_s}{eC_e} \frac{u_s}{u_+ + u_-} \quad (6)$$

式中 I 为电活性物质产生的氧化或还原电流, e 为元电荷, C_s 为颗粒浓度, C_e 为电解质溶液浓度, u_s 为颗粒的迁移率, u_+ 、 u_- 分别为电解质溶液中阴阳离子的迁移率. 从表达式中也可以看出, 颗粒的到达率与电解质的浓度成反比. 综合已报道的对带负电绝缘单颗粒碰撞检测的实验结果来看^[47,50], 记录的计时电流曲线中大部分为减小的阶梯状电流响应, 但也有少量呈增大的阶梯状电流响应产生, 这可能是颗粒从电极表面脱附造成的. 然而, 对颗粒密堆积后的电极逐步施加可形成反向电流的电极电位, 并不会导致颗粒的脱附^[50]. 这一发现表明, 颗粒与电极表面间的相互吸引作用显著, 即发生不可逆吸附. 一般认为, 产生的阶梯状电流的大小与颗粒尺寸、电极表面积、氧化还原介质浓度、颗粒在电极上的吸附位置以及电极表面覆盖程度等有关.

2.2.3 检测对象

该方法近年来得到了更加深入的研究. 除了检测乳胶球^[47]、硅胶球、聚苯乙烯球、羧化聚苯乙烯球^[50]等硬性绝缘颗粒, Bard等利用此原理实现了乳滴^[51]、囊泡/脂质体^[52]以及部分生物大分子, 如蛋白质、DNA^[53],

图4 (a) 利用区域扩散阻塞原理实现绝缘单颗粒检测的原理示意图; (b) 计时电流图的示意图. 溶液中的电化学活性物质在电极上发生扩散限制的氧化或还原反应, 绝缘单颗粒在电极表面的不可逆吸附导致减小的稳态阶梯状电流响应(网络版彩图)

病毒、抗体^[54]等软性物质的分析检测. 基于区域扩散阻塞原理实现单颗粒分析的研究总结见表2.

2.3 颗粒直接电解(direct electrolysis)

2.3.1 检测原理

Compton等针对具有电化学活性的颗粒, 提出了利用颗粒直接电解的原理, 实现单颗粒在电极表面的碰撞检测^[55]. 如图5所示, 当本身具有电化学活性的颗粒与施加一定电位的电极发生碰撞时, 颗粒会在电极表面发生直接电化学反应, 如直接氧化或还原反应等, 产生响应电流. 该方法一般可用来研究颗粒浓度、尺寸分布以及团聚情况等.

2.3.2 定量模型

对于可直接电解的硬性颗粒, 假设其呈球形, 并在与电极相互作用的过程中反应完全, 产生的最大电荷量 $Q_{\max}$ 满足式(7):

$$Q_{\max} = \frac{4\pi F \rho r_0^3}{3A_r} \quad (7)$$

图5 利用颗粒直接电解原理实现单颗粒检测的原理示意图(网络版彩图)

表2 基于区域扩散阻塞原理实现单颗粒分析

颗粒	电极	研究对象	氧化还原指示反应
乳胶球 ^[47]	Au UME	绝缘颗粒的检测	FcMeOH氧化
硅胶球 聚苯乙烯球 羧化聚苯乙烯球 ^[50]	Pt UME	不同种类绝缘颗粒的检测及比较	FcMeOH氧化
乳滴 ^[51]	Au UME	软性颗粒的检测	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化
囊泡/脂质体 ^[52]	Pt UME	软性颗粒的检测	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化
蛋白质, DNA ^[53]	Pt UME	不同种类非电化学活性生物; 大分子的检测及比较	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化
病毒, 抗体 ^[54]	Pt UME	病毒及其与特异性抗体结合后的分析检测	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化

式中 F 为法拉第常数, ρ 为体积密度, r_0 为颗粒半径, A_r 为相对原子质量.

根据式(7)以及实验中颗粒与电极相互作用过程中产生的电荷量, 求得颗粒半径并进行相关统计后, 即可得到颗粒的尺寸分布. 另外, 颗粒的浓度可以通过其与电极相互作用的频率计算, 而颗粒团聚情况可以根据单颗粒所包含的原子数目以及碰撞过程中产生的电荷量进行确定.

该原理还可用于包裹有电化学活性物质的软性颗粒检测. 颗粒的扩散系数可根据Stokes-Einstein方程^[48], 即式(8)进行估算:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_0} \quad (8)$$

式中 k_B 为玻尔兹曼常数, T 为热力学温度, η 为分散相溶液黏度, r_0 为颗粒半径.

峰形电流响应频率 f_0 满足式(9):

$$f_0 = 4D_0 C_0 r_e \quad (9)$$

式中 C_0 为颗粒浓度, r_e 为电极半径.

颗粒中包裹的电化学活性物质在电极上发生反应, 产生的最大电荷量 $Q_{\max}$ 满足式(10):

$$Q_{\max} = \frac{4\pi F C_{\text{redox}} r_0^3}{3} \quad (10)$$

式中 F 为法拉第常数, C_{redox} 为颗粒中包裹的电化学活性物质的浓度, r_0 为颗粒半径. 与可直接电解的硬性颗粒的情况相似, 根据式(10)可以得到包裹有电化学活性物质的软性颗粒的尺寸分布.

2.3.3 检测对象

该方法可实现多种具有电化学活性的单颗粒分

析和检测. 除了检测单质金属^[55-59]、具有核壳结构的金属^[60]、金属氧化物^[61-63]以及过渡金属二硫化物外^[45], 碳材料^[64]或有机物^[65]等其他硬性颗粒也可利用此方法进行检测. 而像胶束^[66], 包裹有电活性物质的乳滴^[51]、囊泡/脂质体^[52,67-69]等之类的软性颗粒, 根据此原理, 亦可实现单颗粒的检测. 基于颗粒直接电解原理实现单颗粒分析的研究总结见表3.

Ewing等^[68]利用颗粒直接电解原理, 实现了牛肾上腺提取的单个嗜铬细胞囊泡中儿茶酚胺含量的测定. 他们对囊泡与电极间吸附/破裂过程中的化学动力学特征进行了研究, 认为单个囊泡(86%)在直径33 μm 的圆盘状碳微电极上吸附并破裂, 释放其中的儿茶酚胺并发生氧化, 产生峰形响应电流. 与细胞中囊泡释放时的情况相比, 实验的统计结果表明, 囊泡胞吐过程中并未完全释放儿茶酚胺. 值得一提的是, 他们还将具有纳米级锥形尖端的碳纤维微电极, 插入单个PC12细胞中, 实现了单个纳米级囊泡中具有电活性的神经递质总量的电化学测定, 并率先称此为细胞内囊泡的电化学计数^[69]. 他们认为, 活细胞中的囊泡在电

极表面发生裂解, 释放具有电活性的神经递质并发生氧化, 产生峰形的电流响应. 实验结果表明, 胞吐过程中只释放部分的神经递质, 这从而也支持了囊泡在正常的胞吐过程中, 并不是打开所有的通道, 导致囊泡中相关成分不完全释放的假设.

3 电阻-脉冲分析(resistive-pulse analysis)

3.1 检测原理

传统库勒计数器(Coulter-counter), 又称为电阻-脉冲计数器, 是Coulter于1953年发明的一种用于分析微米尺度物体, 如细菌、细胞和颗粒的仪器. 传统库勒计数器包含两个隔室, 中间由直径2~20 μm 的孔隔开^[70,71]. 溶液中的颗粒在外加电压或压力驱动下穿过孔口. 两根Ag/AgCl电极放置在孔口两边用于记录颗粒穿过孔口时离子电流的变化. 背景电流值决定于支持电解质浓度、外加电压以及孔的形貌. 颗粒进入孔口, 占据其等体积的电解质所在空间, 引起孔内电阻

表3 基于颗粒直接电解原理实现单颗粒分析

颗粒	电极	研究对象	氧化还原指示反应
Ag NP ^[55]	C UME	颗粒尺寸分布	Ag 氧化
Au NP ^[56]	CFE	颗粒尺寸分布	Au 氧化
Ag NP (Ti ⁺) ^[57]	C UME	UPD	Ti ⁺ 还原
Cu NP ^[58]	CFE	电荷转移动力学	Cu 氧化
Ag NP (NTP) ^[59]	C UME	标记颗粒的非固定化检测	NTP 还原
Au核Ag壳NP ^[60]	CFE	多成分壳核结构颗粒的定量分析	Au, Ag 氧化
Fe ₃ O ₄ NP ^[61]	CFE	颗粒尺寸分布	Fe ₃ O ₄ 氧化及还原
CeO ₂ NP ^[62]	Pt UME	颗粒的抗氧化活性	CeO ₂ 还原
ZnO NP ^[63]	Hg UME	尺寸分布	ZnO 还原
MoS ₂ , WS ₂ , MoSe ₂ , WSe ₂ NP ^[45]	SPE	尺寸分布; 颗粒双功能表现评估	MoS ₂ , WS ₂ , MoSe ₂ , WSe ₂ 氧化
C ₆₀ NP ^[64]	Au UME	尺寸分布	C ₆₀ 还原
靛蓝 NP ^[65]	CFE	尺寸分布	靛蓝 还原
胶束 ^[66]	C UME	尺寸分布及定量检测	Br ⁻ 氧化
乳滴 ^[51]	Au UME	尺寸分布; 峰形电流形成机理讨论及模拟	Fc 氧化
囊泡/脂质 ^[52]	Pt UME	人工软性颗粒尺寸分布及膜通透性考察	Fe(CN) ₆ ⁴⁻ 氧化
囊泡/脂质体 ^[67] (商品)	C UME	人工软性颗粒尺寸分布及其中电活性; 物质的定量分析检测	Vitamin C 氧化
囊泡/脂质体 ^[68] (牛肾上腺提取)	C UME	生命体系中软性颗粒的尺寸分布及其中电活性物质的定量检测	儿茶酚胺 氧化
囊泡/脂质体 ^[69] (细胞)	CFE	活细胞内单个囊泡中电活性神经递质的定量检测	电活性神经递质 氧化

瞬间增大, 进而导致电流衰减. 这一电流衰减变化产生的脉冲信号可以通过两根 Ag/AgCl 电极记录的电流-时间曲线观察到. 对于绝缘性颗粒, 脉冲的振幅和该颗粒体积呈现正比例关系, 脉冲的频率与溶液中颗粒的浓度成正比, 脉冲持续的时间和颗粒携带电荷量及迁移率有关. 该电阻-脉冲技术由于设备简单、免标记、对单个颗粒分析敏感等优点在实际中得到了推广和应用. 随着纳米加工技术的发展, 科学家们通过降低孔口直径可以检测纳米尺寸的颗粒. 1977 年, DeBlois 等^[72-74]发展了此技术, 并首次实现了纳米颗粒的分析检测. 他们利用塑料薄膜蚀刻所得亚微米孔, 检测了直径约 60 nm 的病毒和 90 nm 的聚苯乙烯微球. 随后, Crooks 等^[75-77]在 Si_3N_4 和聚二甲硅氧烷薄膜上插入多壁碳纳米管(直径~130 nm), 发展了纳米-库勒计数器的方法, 如图 6(a) 所示. 在施加电压(E_M)的条件下, 携带负电荷的纳米颗粒在电场力驱动下穿过碳纳米管, 并产生与此过程相对应的电流响应. 图 6(b~d) 表示不同外加电压 E_M 下的电流-时间响应曲线. 每一个脉冲或电流降变化反应了单个颗粒穿过纳米通道的过程. 根据电阻-脉冲信号的频率, 通过估算圆柱状通道内电场分布和颗粒平均的电泳速度, 可计算出溶液中粒子浓度数量级为 10^{11} 个/mL. 纳米通道的圆柱状形貌有助于增加颗粒穿孔时间, 便于通过增大孔的长度来提高时间分辨率. 然而, 圆柱状通道带来的敏感区域增大和电场在整个管内均匀分布等因素也使得检测限降低和信号频率降低. 该研究进一步促进了库勒计数法在颗粒分析中的应用, 也催生了电阻-脉冲原理分

析单纳米颗粒的再次兴起.

颗粒穿孔产生的信号频率与其在纳米孔口处所受力的大小有关, 其中包括熵力、电泳力、压力等. 对于圆柱形纳米孔, 其自身较大的欧姆电阻导致很大部分电压降落在整个孔内, 孔口电场分布非常微弱. 为了增加颗粒检测的敏感程度, 研究者用锥形纳米孔替代了圆柱形孔^[78-84]. White 等^[85]通过有限元模拟方法发现了锥形纳米孔口处的电场强度可达 10^5 V/m 数量级, 如图 7 所示. 孔口处产生的更大的电压降对穿孔频率有着重要的影响. White 等^[86]研究发现, 两种不同尺寸的聚苯乙烯微粒在施加 200 mV 偏压下穿过锥形纳米孔的穿孔频率和颗粒浓度之间存在线性关系. 在 10^{11} 个/mL 浓度下, 信号频率约为 100 s^{-1} , 是 Crooks 等采用圆柱形纳米孔得出的频率为 1.5 s^{-1} 的 60 倍. 相较于碰撞原理检测单颗粒的方法, 电阻-脉冲分析原理也有其独特的优势, 如: (1) 灵敏度高, 通过调控纳米孔的孔径, 可以提高检测的灵敏度; (2) 纳米孔孔径调控相对方便, 可低至几纳米, 而对于电极来讲则很难达到; (3) 无纳米颗粒的化学沉积, 可适用于长时间的检测而不用担心电极界面的污染或颗粒在界面的堆积问题; (4) 对颗粒是否导电, 是否具有电活性没有要求, 可检测颗粒范围更广.

3.2 固态纳米孔

人们受细胞膜上离子通道的启发, 制备了多种人工固态纳米通道, 用于纳米颗粒和生物大分子, 如蛋白质与 DNA 等的检测^[87-96]. 固态纳米孔具备如下优点:

图 6 (a) 电场驱动的单纳米颗粒的电阻-脉冲技术分析示意图; (b~d) 在不同外加电场下的电流-时间响应曲线^[76] (网络版彩图)

图7 有限元方法模拟的锥形纳米孔内电势和电场在整体区域(a)和沿对称轴(b)的分布图^[85] (网络版彩图)

(1) 更加经久耐用, 有较好的机械、化学和热稳定性; (2) 在亚纳米尺度可对孔的大小和形状进行精确调控; (3) 可制备高密度纳米孔阵列, 便于与其他电或光学方法联用. 鉴于不同的基底和形貌具有各自特殊的分析性能, 下文将对不同纳米孔独特的检测优势进行逐一分析. 目前, 已成功用于纳米颗粒检测的纳米孔主要包括: (1) 采用径迹蚀刻技术在聚合物薄膜上制备形成的聚合物膜纳米孔, 如聚对苯二甲酸乙二酯(PET) (图8(a))^[97-99]、聚碳酸酯(PC)和聚酰亚胺(PI)^[100]纳米孔 (图8(b))等, 其中PET纳米孔应用最为广泛; (2) 将通过化学蚀刻方法得到的锥形金属丝尖端熔封到玻璃管内形成的玻璃纳米孔 (图8(c))和激光拉制仪程序化拉制的玻璃纳米管 (图8(d))^[101-107].

3.2.1 聚合物膜纳米孔

聚合物仿生纳米孔具有良好的生物兼容性, 而且孔内表面的活性有机基团能够作为多种分子的结合位点, 极大地促进了对纳米通道进行功能化修饰的研究. 径迹刻蚀技术适用于多种聚合物材质, 是一种经典制备纳米孔道的技术. 利用高能重离子穿透聚合物膜(PET和PI)产生潜在径迹, 继而化学刻蚀该区域可以得到纳米孔. 纳米孔的几何形貌受刻蚀条件的控制, 通过改变实验条件, 可得到圆柱形、锥形和双锥形等不同形状的纳米孔^[108]. Siwy课题组^[109]研究了分散于1.0 M KCl溶液中直径分别为220、330和410 nm的聚苯乙烯微粒在电场作用下, 穿过孔径约870 nm的圆柱形PET纳米孔过程中电流的变化. 由于孔径不均一, 颗粒在进入孔内后产生能够反映每一处孔壁形貌状态的电流响应信号. 相比于传统电阻-脉冲技术, 该方法有如下优势: (1) 可用于分析颗粒是否吸附在孔壁上; (2) 可用来确认单个纳米颗粒是否已经完全穿

过了纳米孔; (3) 可分析多个颗粒同时在孔内存在的情况, 有助于高浓度分析物的快速检测; (4) 可用于区分体积和电荷量相同而形貌不同的颗粒. 接着, 他们研究了直径为410 nm的球形颗粒和230 nm×590 nm及210 nm×1950 nm的棒状颗粒, 分别穿过孔径不均一的直径平均为770 nm柱状纳米孔时的电流响应. 从实验结果可以看出, 电阻-脉冲信号对纳米颗粒的形状和长度有明显的依赖性, 同时纳米孔沿着中心轴孔径的不均一性也增强了该种纳米孔对颗粒形状的分辨能力^[110]. 另外, 通过调控膜两边电压平衡流体静压力, 观测颗粒穿孔的随机行为. 利用颗粒在孔内停留时间长达40 s的过程中局部扩散速率的值, 可求出颗粒在溶液中的扩散系数^[111]. 此外, 该课题组^[112]还研究了聚苯乙烯微粒穿孔过程产生的电阻脉冲信号的振幅与所加偏压大小和极性之间的关系. 他们发现, 电中性的

图8 不同材质和方法制备的纳米孔光学成像照片. (a) PET纳米孔SEM图^[97]; (b) PI纳米孔SEM图^[97]; (c) 玻璃纳米孔光学显微镜成像图^[101]; (d) 玻璃纳米管SEM图^[107]

颗粒从孔底部往尖端运动时产生的脉冲振幅大于反方向下所产生的振幅, 而携带负电荷的颗粒正好表现出与之相反的方向依赖性, 而且从尖端向底部运动时尺寸会变得更大. 他们认为, 这是孔内离子分布对电压的依赖性引起的, 在其中一种电压极性下纳米孔尖端形成了离子损耗区域, 导致颗粒穿过时引起较强的电阻脉冲信号. Zhou等^[113]利用径迹刻蚀技术得到的直径40 nm的PET纳米孔, 对B型肝炎病毒进行了测定, 他们成功区分了 $T=3$ (直径31 nm)和 $T=4$ (直径36 nm)两种尺寸非常相近的衣壳蛋白多聚体.

3.2.2 玻璃纳米孔/管

玻璃纳米孔/管由于其在水体系和非水体系优良稳定性以及尺寸方便调控(从几十微米到几纳米)等优势, 被广泛用于单颗粒分析^[114,115]. White课题组^[101]在2007年首次通过化学刻蚀金属微丝, 并将尖端熔封于玻璃管内后将其抽离的方法, 制备得到了嵌在玻璃管一端厚度为25~50 μm 的单个锥形纳米孔. 该课题组^[86]利用所制备的纳米孔, 研究了半径分别为160和80 nm的聚苯乙烯微粒在电场驱动下穿过孔半径为250 nm的纳米孔过程中的电流变化. 他们发现, 单个颗粒穿孔引起的电流变化呈不对称脉冲形式, 信号产生的频率与微粒浓度呈良好的线性关系(在 $10^7 \sim 10^{11}$ 个/mL范围内). 他们还发现, 在施加外压的驱动下, 半径120 nm的聚苯乙烯微粒穿过半径为210 nm的纳米孔内, 电流响应信号表现为非对称三角波电阻-脉冲, 如图9所示. 玻璃纳米孔内壁所带电荷和形状的不对称性导致颗粒被捕获时电流先陡然下降再缓慢上升, 而被释放

的时候则表现为先缓慢下降再快速上升的趋势. 施加-2~-160 mmHg的负压, 观察到的颗粒穿孔频率与施加压力大小呈线性关系^[116]. 另外, 如果改变施加压力的方向, 可以观测到颗粒的运动方向发生反转. 通过信号的转变(从图9曲线(a)到曲线(a')), 可以有效地分析出颗粒被孔捕获和释放的过程^[117]. 随后, 研究者又发展了一种通过自动压力装置, 来精确控制单个纳米颗粒被孔捕获和释放的方法^[118]. 此方法极大地避免了电阻-脉冲分析技术中由颗粒扩散、颗粒不完美的球形形貌和电子噪音等因素可能引起的颗粒尺寸的偏差. 对30和60 nm Au纳米颗粒的检测中, 分辨率可高达0.3 nm.

玻璃纳米管是使用商品化的激光拉制仪程序化拉制玻璃毛细管而制成的, 其管径和形状可以通过改变加热温度、时间、拉力等参数进行调控, 最小管径可达几纳米. 1997年Bard等^[119]利用P-2000激光拉制仪, 拉制了管径小至几纳米的玻璃纳米管, 并将其用于玻璃管整流等基本性质的研究^[120~122]. Terejnszky等^[123]利用同样的设备, 制备了孔径约为800 nm的石英玻璃纳米孔, 并在含0.05%曲拉通(Triton X-100)的1 M KCl溶液中, 对纳米管径进行了进一步表征. 在高的支持电解质浓度下, 玻璃管内壁电荷几乎被屏蔽, 所以纳米管电阻如式(11)所示:

$$R_{\text{t}}^{\text{pipet}} = \frac{1}{\sigma} \int_{x=0}^l \frac{1}{A(x)} dx = \frac{4l}{\pi d_{\text{tip}} \sigma (d_{\text{tip}} + 2 \tan(\alpha) l)} \quad (11)$$

式中 σ 为溶液电导率, $A(x)$ 为管口横切面积, x 为沿着管中心轴的坐标, α 为管尖端半锥角, d_{tip} 为管口直径, l 为

图9 半径为120 nm的聚苯乙烯微球被半径210 nm的玻璃纳米孔捕获和释放过程示意图及对应的电流响应曲线^[116] (网络版彩图)

尖端长度. 因为玻璃纳米管的尖端长度一般比管径大至少2个数量级, 所以式(11)可以写成:

$$\lim_{l \rightarrow \infty} R_l^{\text{pipet}} = R^{\text{pipet}} = \frac{2}{\pi d_{\text{tip}} \sigma \tan(\alpha)} \quad (12)$$

除了纳米管本身的电阻外, 管外部电阻也需要考虑在内, 所以整个体系的电阻如式(13)所示:

$$R = R^{\text{pipet}} + R^{\text{access}} = \frac{2}{\pi d_{\text{tip}} \sigma \tan(\alpha)} + \frac{1}{2 d_{\text{tip}} \sigma} \quad (13)$$

式中 R^{access} 代表接入电阻.

由式(13)可以计算出不同管尖端半锥角(α)和电阻 R 时玻璃纳米管的口径. 由于颗粒穿孔过程中电流变化值和颗粒与管尖端敏感区域的体积成正比, 所以可以通过这种方法计算出颗粒的尺寸大小. 他们计算得出的颗粒尺寸分布与SEM表征结果非常吻合.

3.3 信号分析

电阻-脉冲分析不仅可以提供关于纳米颗粒本身的尺寸、形貌、电荷量和化学性质, 还可以反映玻璃管本身的形貌和颗粒所处周围环境的状态. 由于软、硬颗粒在穿孔过程中状态变化和信号响应有差别, 所以下面分别对两类颗粒穿孔所产生信号进行分析.

3.3.1 硬性颗粒

从早期的花粉、病毒、细胞等到最近的金属纳米颗粒、有机聚合物颗粒、多肽、蛋白质和DNA等物质的分析检测, 电阻-脉冲原理扮演着重要的角色. 通过分析电阻-脉冲信号, 可以得出颗粒的浓度、携带电荷量、形貌尺寸以及其与孔之间化学和物理作用等具体信息. Lan等^[86]研究了不同浓度的半径160和80 nm颗粒分别穿过半径250和240 nm纳米孔过程中产生脉冲信号频率的变化规律, 发现在恒定电压下, 颗粒穿孔频率与其浓度之间存在线性关系, 检测浓度可从 10^7 到 10^{11} 个/mL, 跨越4个数量级.

单个颗粒的表面电荷密度或 ζ -电势可以从分析其电迁移率得到. Ito等^[124]在忽略了纳米颗粒穿过碳纳米管过程中电渗流产生贡献的情况下, 利用Helmholtz-Smoluchowshi方程, 计算了颗粒表面所带的电荷密度. 而后, Firmkes等^[125]发展了一种在电泳和电渗流同时存在情况下可用于计算粒子 ζ -电势的模型. Kozak等^[126]和Vogel等^[127]分别报道了在更复杂的条件下如压力、

电泳和电渗流均存在时, 计算颗粒表面电荷密度的方法. Kozak等提出了一种理论模型, 来描述电流-时间响应与3种力(压力、电泳和电渗流)之间的关系. 由于这3种力均与单个颗粒的 ζ -电势和尺寸相关, 因此, 颗粒的 ζ -电势和尺寸也可以从与实验所得信号相符的理论模型中同时得出^[126]. 与此略有不同的是, Vogel等^[127]研究了纳米颗粒平均 ζ -电势与颗粒通量之间的关系. 他们考虑到纳米颗粒的通量和颗粒在管口附近区域的浓度与速度成正比, 在纳米孔形貌已知的情况下, 推导出了压力引起的通量与总通量之间的关系. 进一步, 通过调节压力, 控制没有颗粒进入孔口, 利用这一特殊情况下的总通量值, 计算出颗粒的 ζ -电势.

另外, 纳米颗粒尺寸分布可以通过阻塞的电流值(Δi)与基准电流(i_0)的比值($\Delta i/i_0$)得出. 根据DeBlois等的研究结果^[72-74], $\Delta i/i_0$ 与颗粒半径的3次方成正比, 说明了此方法具有较高的颗粒尺寸分辨率. Ito^[75]、Petrossian^[128]、White^[86]、Fraikin^[129]和Tsutsui^[130]等也通过实验, 证实了利用电阻-脉冲原理区分不同尺寸的聚苯乙烯微粒是可行的. 此外, Fraikin等和Ito等还将实验结果与DLS和TEM结果进行了对比, 他们发现, 电阻-脉冲分析方法适合于对混合尺寸颗粒的高分辨率分析. 尽管该方法具有上文所述的优点, 但是其在检测小尺寸颗粒方面仍存在不足. 例如, White等在研究聚苯乙烯微球穿过半径230 nm纳米孔过程中, 发现了颗粒半径从160 nm变为80 nm时, $\Delta i/i_0$ 的值从约3%降至0.5%, 仅比背景噪音略大. 最近, Roberts、Willmott、Vogel、Platt及其合作者^[131-135]先后发现, 通过利用尺寸可调的纳米孔, 可以拓宽颗粒粒径的检测范围. 他们通过调节施加在纳米孔薄膜上的水平压力, 制备了不同孔径大小的纳米孔, 达到了筛选不同尺寸的纳米颗粒的目的.

3.3.2 软性物质

软性物质穿孔行为由于其可变形性, 相比硬性纳米颗粒表现更为复杂. White^[136]和Siwy^[109]课题组分别研究了软性颗粒(如凝胶微粒和多层脂质体)穿孔和形变过程. White等采用电阻-脉冲技术分析了压力驱动下多层脂质体穿过纳米孔的行为, 并探究了温度、脂质体尺寸以及孔尺寸对脂质体穿孔行为的影响. Chen等^[137]利用人工制备的孔径小至14~72 nm的玻璃纳米管系统研究了小尺寸的单层磷脂囊泡(SUVs, 直径50~60

nm) 穿孔过程的动力学行为. 凝胶微粒是作为另一种重要的可变形颗粒, 由交叉偶联的聚合物网状结构和内部溶剂共同构成. 为了维持内外渗透压的平衡, 其形状会随着外部刺激(如盐浓度和 pH 改变)而发生变化. White^[138]和 Siwy^[139]课题组分别研究了自身携带负电荷、在中性和碱性 pH 下丙烯酸去质子化而呈现导电性的聚异丙烯凝胶微粒. White 等发现在相对低的盐浓度溶液中电流信号表现为先升高后轻微降低, 他们认为这是由于凝胶微粒在进入孔口的过程中, 由于其电导率高于本体溶液, 电流升高. 当凝胶微粒挤过纳米孔时, 其发生退溶胀或脱水, 使得微球内所含离子量降低, 从而导致电流降低. 当凝胶微粒穿过纳米孔后, 其恢复溶胀, 电导率回到较高状态. Siwy 等在研究电渗流驱动的凝胶微粒穿过纳米孔的实验中也观测到了相似的电流脉冲模式. 他们认为这可能是因为两方面的原因: (1) 电渗流诱导的沿着纳米孔的压力分布导致了孔口处凝胶微粒的变形和脱水; (2) 孔口强电场诱导下凝胶微粒发生极化, 产生离子消耗区域.

此外, 电阻-脉冲分析对尺寸的敏感性也使其可以用来检测蛋白质的不同构象和大小. 例如, Talaga 等^[140]利用 SiN_x 纳米孔检测到了牛 β -乳球蛋白变体 a 完全折叠、半折叠和完全展开 3 种不同的状态. Zhou 等^[113]利用锥形的聚对苯二甲酸乙二酯薄膜纳米孔, 成功区分了直径 31 nm T3 和直径 36 nm T4 两种 B 型肝炎病毒衣壳蛋白. 同时, 此项技术还可以用于分辨不同的细胞. Liu 等^[141]发现, 在内壁生长聚吡咯-寡聚脱氧核苷酸(ODN)薄膜后的微米管可以捕获表面由互补 ODN 修饰过的聚苯乙烯微球, 而修饰了非互补 ODN 的聚苯乙烯微球因无法被捕获而顺利穿过管口. 另外, 他们分别将结合了 anti-CD19 和 anti-CD90 抗体的互补链修饰在孔内壁, 来选择性识别大鼠脾细胞中的淋巴 B 细胞和 T 细胞.

4 电化学联用技术(combined with other techniques)

除了上述方法, 人们最近还提出了一种新的研究单颗粒电化学的方法, 即将单个纳米颗粒固定在超微电极上. Chen 等^[142]发展了一种在碳超微电极上电活性面积为 1 nm² 大小的地方电沉积单个金属 Pt 纳米颗粒的方法. 利用这种方法沉积的 Pt 颗粒, 他们进一步研究了单纳米颗粒的电催化行为. Zhang 等^[143]通过将

Pt 纳米电极经过硅烷修饰后, 浸入分散有 Au 纳米颗粒的溶液中, 成功地将单个 Au 颗粒固定到纳米电极上. 相比于电沉积, 这种方法所固定的纳米颗粒的尺寸更容易控制.

近年来, 电化学与其他技术联用也是发展单个纳米颗粒分析新方法的途径之一. Tao 等^[144,145]利用电化学与表面等离子体共振(SPR)联用技术, 实现了单个病毒和硅纳米球的检测. 利用同样的联用技术, 他们研究了单个 Au 纳米颗粒的电化学催化过程. Meier 等^[146]将扫描隧道显微镜(STM)和电化学方法联用, 研究了单个 Pd 纳米颗粒催化析氢反应的性能. Long 等^[147]将电化学与荧光联用, 建立了单颗粒穿孔追踪技术, 如图 10 所示. 负载了 Rhod-DPA 的 Au 纳米颗粒穿过纳米孔通道后, 与池另一端溶液中的 Cu²⁺ 发生相互作用, 进而引起其散射光谱峰发生位移. 他们利用这一现象, 确认了单个纳米颗粒的穿孔行为, 也为单个颗粒的追踪技术提供了一种新的方法. Yukimoto 等^[148]将电化学方法与荧光成像技术联用, 同步观测到了颗粒穿孔过程中电流信号和光学信号, 这从实验上证明了电流脉冲信号确实是由于纳米颗粒的穿孔行为引起的, 进一步确认

图 10 单个纳米颗粒穿过固态纳米孔后发生的等离子体共振能量转移示意^[147] (网络版彩图)

了单个纳米颗粒的穿孔行为。

5 总结与展望

随着科技和社会的发展,单颗粒的分析与检测变得越发重要。电化学方法和技术为单颗粒的分析与检测带来了新的机遇。多年的研究表明,通过颗粒在超微电极表面碰撞行为的研究,可获得纳米颗粒的尺寸、形貌、聚集状态及动力学等与其功能和性质密切相关的物理化学性质,为单颗粒检测和表征提供了新思路和方法。而电阻-脉冲分析方法不仅可以提供纳米颗粒尺寸、浓度、电荷密度和 ζ 电势等本征性质,而

且还可以实现对可变形的软性物质的分析与检测。更重要的是,利用该方法可以实现病毒和囊泡等生物物质的分析,在生物医学和神经生理学等领域具有重要的意义。然而,需要指出的是,单颗粒电化学分析的研究目前尚处于起步阶段,还存在一系列的关键科学和技术问题急需解决。例如,如何进一步加强对于检测过程的精准描述,如何完善超微电极和纳米孔的可控高重现性制备,如何提高单颗粒纳米碰撞检测的重现性和分辨率,以及如何通过电化学手段分辨电化学晶面及构效关系等。这些问题的解决必将极大推进单颗粒电化学分析的发展,促进电分析化学与纳米科学、生物医学、能源科学等多学科交叉与融合。

参考文献

- 1 Mu Y, Liang H, Hu J, Jiang L, Wan L. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 22212–22216
- 2 Pan ZW, Dai ZR, Wang ZL. *Science*, 2001, 291: 1947–1949
- 3 Song S, Liang Z, Zhang J, Wang L, Li G, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 8670–8674
- 4 Guo S, Dong S, Wang E. *Adv Mater*, 2010, 22: 1269–1272
- 5 Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MKJ. *Clinica Chim Acta*, 2010, 411: 1841–1848
- 6 Chang PR, Jian R, Yu J, Ma X. *Food Chem*, 2010, 120: 736–740
- 7 Du J, Wang S, You H, Zhao X. *Environ Toxicol Phar*, 2013, 36: 451–462
- 8 Guo YG, Hu JS, Wan LJ. *Adv Mater*, 2008, 20: 2878–2887
- 9 Gao MR, Xu YF, Jiang J, Yu SH. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 2986–3017
- 10 Peng X, Peng L, Wu C, Xie Y. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 3303–3323
- 11 Chen C, Geng J, Pu F, Yang X, Ren J, Qu X. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 882–886
- 12 Guo S, Li D, Zhang L, Li J, Wang E. *Biomaterials*, 2009, 30: 1881–1889
- 13 Edwards MA, German SR, Dick JE, Bard AJ, White HS. *ACS Nano*, 2015, 9: 12274–12282
- 14 Sambur JB, Chen P. *Annu Rev Phys Chem*, 2014, 65: 395–422
- 15 Wang W, Tao N. *Anal Chem*, 2014, 86: 2–14
- 16 Ringe E, Sharma B, Henry AI, Marks LD, Van Duyne RP. *Phys Chem Chem Phys*, 2013, 15: 4110–4129
- 17 Liu Y, Ling J, Huang CZ. *Chem Commun*, 2011, 47: 8121–8123
- 18 Jing C, Gu Z, Ying YL, Li DW, Zhang L, Long YT. *Anal Chem*, 2012, 84: 4284–4291
- 19 Ament I, Prasad J, Henkel A, Schmachtel S, Sönnichsen C. *Nano Lett*, 2012, 12: 1092–1095
- 20 Han G, Xing Z, Dong Y, Zhang S, Zhang X. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 3462–3465
- 21 Rakcheev D, Philippe A, Schaumann GE. *Anal Chem*, 2013, 85: 10643–10647
- 22 Ding C, Zhu A, Tian Y. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 20–30
- 23 Song S, Qin Y, He Y, Huang Q, Fan C, Chen HY. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 4234–4243
- 24 Zhou J, Wang Q, Zhang C. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 2056–2059
- 25 Gao X, Wang T, Wu B, Chen J, Chen J, Yue Y, Dai N, Chen H, Jiang X. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377: 35–40
- 26 Zhao LJ, Qian RC, Ma W, Tian H, Long YT. *Anal Chem*, 2016
- 27 Kleijn SEF, Lai SCS, Koper MTM, Unwin PR. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 3558–3586
- 28 Oja SM, Wood M, Zhang B. *Anal Chem*, 2013, 85: 473–486
- 29 Heyrovsky M, Jirkovsky J. *Langmuir*, 1995, 11: 4288–4292
- 30 Heyrovsky M, Jirkovsky J, Mueller BR. *Langmuir*, 1995, 11: 4293–4299
- 31 Heyrovsky M, Jirkovsky J, Struplova-Bartackova M. *Langmuir*, 1995, 11: 4309–4312

- 32 Xiao X, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 9610–9612
- 33 Xiao X, Fan FRF, Zhou J, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 16669–16677
- 34 Bobbert PA, Wind MM, Vlieger J. *Physica A*, 1987, 141: 58–72
- 35 Kwon SJ, Zhou H, Fan FRF, Vorobyev V, Zhang B, Bard AJ. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13: 5394–5402
- 36 Kwon SJ, Fan FRF, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 13165–13167
- 37 Kwon SJ, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 10777–10779
- 38 Park JH, Boika A, Park HS, Lee HC, Bard AJ. *J Phys Chem C*, 2013, 117: 6651–6657
- 39 Park JH, Thorgaard SN, Zhang B, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 5258–5261
- 40 Zhou H, Park JH, Fan FRF, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 13212–13215
- 41 Kahk JM, Rees NV, Pillay J, Tshikhudo R, Vilakazi S, Compton RG. *Nano Today*, 2012, 7: 174–179
- 42 Kim J, Kim BK, Cho SK, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 8173–8176
- 43 Guo Z, Percival SJ, Zhang B. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 8879–8882
- 44 Fernando A, Parajuli S, Alpuche-Aviles MA. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 10894–10897
- 45 Lim CS, Tan SM, Sofer Z, Pumera M. *ACS Nano*, 2015, 9: 8474–8483
- 46 Sekretaryova AN, Vagin MY, Turner APF, Eriksson M. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 2504–2507
- 47 Quinn BM, Van't Ho PG, Lemay SG. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 8360–8361
- 48 Cussler EL. *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*. Cambridge: Cambridge University Press, 2009
- 49 Bard AJ, Faulkner LR, Leddy J, Zoski CG. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. New York: Wiley, 1980
- 50 Boika A, Thorgaard SN, Bard AJ. *J Phys Chem B*, 2013, 117: 4371–4380
- 51 Kim BK, Boika A, Kim J, Dick JE, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 4849–4852
- 52 Lebègue E, Anderson CM, Dick JE, Webb LJ, Bard AJ. *Langmuir*, 2015, 31: 11734–11739
- 53 Dick JE, Renault C, Bard AJ. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 8376–8379
- 54 Dick JE, Hiltnerbrand AT, Boika A, Upton JW, Bard AJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 5303–5308
- 55 Zhou YG, Rees NV, Compton RG. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 4219–4221
- 56 Zhou YG, Rees NV, Pillay J, Tshikhudo R, Vilakazi S, Compton RG. *Chem Commun*, 2012, 48: 224–226
- 57 Zhou YG, Rees NV, Compton RG. *ChemPhysChem*, 2011, 12: 2085–2087
- 58 Haddou B, Rees NV, Compton RG. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14: 13612–13617
- 59 Zhou YG, Rees NV, Compton RG. *Chem Commun*, 2012, 48: 2510–2512
- 60 Holt LR, Plowman BJ, Young NP, Tschulik K, Compton RG. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 397–400
- 61 Tschulik K, Haddou B, Omanović D, Rees NV, Compton RG. *Nano Res*, 2013, 6: 836–841
- 62 Sardesai NP, Andreescu D, Andreescu S. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 16770–16773
- 63 Perera N, Karunathilake N, Chhetri P, Alpuche-Aviles MA. *Anal Chem*, 2015, 87: 777–784
- 64 Stuart EJE, Tschulik K, Batchelor-McAuley C, Compton RG. *ACS Nano*, 2014, 8: 7648–7654
- 65 Cheng W, Zhou XF, Compton RG. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 25: 12980–12982
- 66 Toh HS, Compton RG. *Chem Sci*, 2015, 6: 5053–5058
- 67 Cheng W, Compton RG. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 13928–13930
- 68 Dunevall J, Fathali H, Najafinobar N, Lovric J, Wigström J, Cans AS, Ewing AG. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 4344–4346
- 69 Li X, Majdi S, Dunevall J, Fathali H, Ewing AG. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 11978–11982
- 70 Coulter WH. Means of counting particles suspended in a fluid. U.S. Patent, 2656508.P, 1953-10-20
- 71 Wales M, Wilson JN. *Rev Sci Instrum*, 1961, 32: 1132–1136
- 72 DeBlois RW, Wesley RKA. *J Virol*, 1977, 23: 227–33
- 73 DeBlois RW, Bean CP, Wesley RKA. *J Colloid Interf Sci*, 1977, 61: 323–335
- 74 DeBlois RW, Bean CP. *Rev Sci Instrum*, 1970, 41: 909–916
- 75 Ito T, Sun L, Henriquez RR, Crooks RM. *Acc Chem Res*, 2004, 37: 937–945
- 76 Sun L, Crooks RM. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 12340–12345
- 77 Ito T, Sun L, Bevan MA, Crooks RM. *Langmuir*, 2004, 20: 6940–6945
- 78 Guo W, Tian Y, Jiang L. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 2834–2846
- 79 Zhang Z, Kong XY, Xiao K, Liu Q, Xie G, Li P, Ma J, Tian Y, Wen L, Jiang L. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 14765–14772
- 80 Zhang L, Zhang K, Liu G, Liu M, Liu Y, Li J. *Anal Chem*, 2015, 87: 5677–5682
- 81 Jiang Y, Guo W. *Sci Bull*, 2015, 60: 491–502

- 82 Zhang LX, Cai SL, Zheng YB, Cao XH, Li YQ. *Adv Funct Mater*, 2011, 21: 2103–2107
- 83 Yang L, Zhai Q, Li G, Jiang H, Han L, Wang J, Wang E. *Chem Commun*, 2013, 49: 11415–11417
- 84 Kang X, Gu LQ, Cheley S, Bayley H. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 1495–1499
- 85 Lee S, Zhang Y, White HS, Harrell CC, Martin CR. *Anal Chem*, 2004, 76: 6108–6115
- 86 Lan WJ, Holden DA, Zhang B, White HS. *Anal Chem*, 2011, 83: 3840–3847
- 87 Liu N, Yang Z, Lou X, Wei B, Zhang J, Gao P, Hou R, Xia F. *Anal Chem*, 2015, 87: 4037–4041
- 88 Yang C, Liu L, Zeng T, Yang D, Yao Z, Zhao Y, Wu HC. *Anal Chem*, 2013, 85: 7302–7307
- 89 Wen S, Zeng T, Liu L, Zhao K, Zhao Y, Liu X, Wu HC. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 18312–18317
- 90 Yao F, Zhang Y, Wei Y, Kang X. *Chem Commun*, 2014, 50: 13853–13856
- 91 Jiang Y, Liu N, Guo W, Xia F, Jiang L. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 15395–15401
- 92 Xia F, Guo W, Mao Y, Hou X, Xue J, Xia H, Wang L, Song Y, Ji H, Ouyang Q, Wang Y, Jiang L. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 8345–8350
- 93 Li CY, Wu ZQ, Yuan CG, Wang K, Xia XH. *Anal Chem*, 2015, 87: 8194–8202
- 94 Yu J, Zhang L, Xu X, Liu S. *Anal Chem*, 2014, 86: 10741–10748
- 95 Guo W, Hong F, Liu N, Huang J, Wang B, Duan R, Lou X, Xia F. *Adv Mater*, 2015, 27: 2090–2095
- 96 Yao F, Duan J, Wang Y, Zhang Y, Guo Y, Guo H, Kang X. *Anal Chem*, 2015, 87: 338–342
- 97 Siwy ZS, Powell MR, Kalman E, Astumian RD, Eisenberg RS. *Nano Lett*, 2006, 6: 473–477
- 98 Meng Z, Jiang C, Li X, Zhai J. *ACS Appl Mater Interf*, 2014, 6: 3794–3798
- 99 Wang L, Guo W, Xie YB, Wang XW, Xue JM, Wang YG. *Radiat Meas*, 2009, 44: 1119–1122
- 100 Ali M, Schiedt B, Healy K, Neumann R, Ensinger W. *Nanotechnology*, 2008, 19: 085713
- 101 Zhang B, Galusha J, Shiozawa PG, Wang G, Bergren AJ, Jones RM, White RJ, Ervin EN, Cauley CC, White HS. *Anal Chem*, 2007, 79: 4778–4787
- 102 Liu S, Dong Y, Zhao W, Xie X, Ji T, Yin X, Liu Y, Liang Z, Momotenko D, Liang D, Girault HH, Shao Y. *Anal Chem*, 2012, 84: 5565–5573
- 103 Yin X, Zhang S, Dong Y, Liu S, Gu J, Chen Y, Zhang X, Zhang X, Shao Y. *Anal Chem*, 2015, 87: 9070–9077
- 104 Hu H, Xie S, Meng X, Jing P, Zhang M, Shen L, Zhu Z, Li M, Zhuang Q, Shao Y. *Anal Chem*, 2006, 78: 7034–7039
- 105 Li GX, Zhang ZX, Lin XQ. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38: 1698–1702
- 106 Li GX, Lin XQ. *Chin Chem Lett*, 2010, 21: 1115–1118
- 107 Rees NV, Li T, He X, Yu P, Mao L. *Electroanalysis*, 2015, 27: 879–883
- 108 Fleischer RL, Price PB, Walker RM. *Nuclear Tracks in Solids: Principles and Applications*. Berkeley: California University Press, 1975
- 109 Pevarnik M, Healy K, Toimil-Molares ME, Morrison A, Létant SE, Siwy ZS. *ACS Nano*, 2012, 6: 7295–7302
- 110 Qiu Y, Hinkle P, Yang C, Bakker HE, Schiel M, Wang H, Melnikov D, Gracheva M, Toimil-Molares ME, Imhof A, Siwy ZS. *ACS Nano*, 2015, 9: 4390–4397
- 111 Schiel M, Siwy ZS. *J Phys Chem C*, 2014, 118: 19214–19223
- 112 Qiu Y, Vlassioulak I, Chen Y, Siwy ZS. *Anal Chem*, 2016, 88: 4917–4925
- 113 Zhou K, Li L, Tan Z, Zlotnick A, Jacobson SC. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 1618–1621
- 114 Ma QL, Xia H, Zhang ST, Qin DD, Devaramani S, Shan DL, Lu XQ. *RSC Adv*, 2016, 6: 12249–12255
- 115 Tang Z, Liang Z, Lu B, Li J, Hu R, Zhao Q, Yu D. *Nanoscale*, 2015, 7: 13207–13214
- 116 Lan WJ, Holden DA, Liu J, White HS. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 18445–18452
- 117 Lan WJ, White HS. *ACS Nano*, 2012, 6: 1757–1765
- 118 German SR, Hurd TS, White HS, Mega TL. *ACS Nano*, 2015, 9: 7186–7194
- 119 Wei C, Bard AJ, Feldberg SW. *Anal Chem*, 1997, 69: 4627–4633
- 120 Zhang LX, Cao XH, Zheng YB, Li YQ. *Electrochem Commun*, 2010, 12: 1249–1252
- 121 Hou X, Liu Y, Dong H, Yang F, Li L, Jiang L. *Adv Mater*, 2010, 22: 2440–2443
- 122 Lin L, Yan J, Li J. *Anal Chem*, 2014, 86: 10546–10551
- 123 Terejanský P, Makra I, Fürjes P, Gyurcsányi RE. *Anal Chem*, 2014, 86: 4688–4697
- 124 Ito T, Sun L, Crooks RM. *Anal Chem*, 2003, 75: 2399–2406
- 125 Firnkes M, Pedone D, Knezevic J, Döblinger M, Rant U. *Nano Lett*, 2010, 10: 2162–2167
- 126 Kozak D, Anderson W, Vogel R, Chen S, Antaw F, Trau M. *ACS Nano*, 2012, 6: 6990–6997
- 127 Vogel R, Anderson W, Eldridge J, Glossop B, Willmott G. *Anal Chem*, 2012, 84: 3125–3131
- 128 Petrossian L, Wilk SJ, Joshi P, Goodnick SM, Thornton TJ. *J Phys: Conf Ser*, 2008, 109: 012028
- 129 Fraikin JL, Teesalu T, McKenney CM, Ruoslahti E, Cleland AN. *Nat Nanotech*, 2011, 6: 308–313
- 130 Tsutsui M, Hongo S, He Y, Taniguchi M, Gemma N, Kawai T. *ACS Nano*, 2012, 6: 3499–3505

- 131 Roberts GS, Kozak D, Anderson W, Broom MF, Vogel R, Trau M. *Small*, 2010, 6: 2653–2658
- 132 Willmott GR, Vogel R, Yu SSC, Groenewegen LG, Roberts GS, Kozak D, Anderson W, Trau M. *J Phys: Condens Matter*, 2010, 22: 454116
- 133 Willmott GR, Parry BET. *J Appl Phys*, 2011, 109: 094307–094307
- 134 Vogel R, Willmott G, Kozak D, Roberts GS, Anderson W, Groenewegen L, Glossop B, Barnett A, Turner A, Trau M. *Anal Chem*, 2011, 83: 3499–3506
- 135 Platt M, Willmott GR, Lee GU. *Small*, 2012, 8: 2436–2444
- 136 Holden DA, Watkins JJ, White HS. *Langmuir*, 2012, 28: 7572–7577
- 137 Chen L, He H, Jin Y. *Anal Chem*, 2015, 87: 522–529
- 138 Holden DA, Hendrickson GR, Lan WJ, Lyon LA, White HS. *Soft Matter*, 2011, 7: 8035–8040
- 139 Pevarnik M, Schiel M, Yoshimatsu K, Vlassiuk IV, Kwon JS, Shea KJ, Siwy ZS. *ACS Nano*, 2013, 7: 3720–3728
- 140 Talaga DS, Li J. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 9287–9297
- 141 Liu J, Bombera R, Leroy L, Roupioz Y, Baganizi DR, Marche PN, Haguet V, Mailley P, Livache T, Wanunu M. *PLOS ONE*, 2013, 8: e57717
- 142 Chen S, Kucernak A. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 3262–3276
- 143 Li Y, Cox JT, Zhang B. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 3047–3054
- 144 Shan X, Patel U, Wang S, Iglesias R, Tao N. *Science*, 2010, 327: 1363–1366
- 145 Shan X, Díez-Pérez I, Wang L, Wiktor P, Gu Y, Zhang L, Wang W, Lu J, Wang S, Gong Q, Li J, Tao N. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 668–672
- 146 Meier J, Friedrich KA, Stimming U. *Faraday Discuss*, 2002, 121: 365–372
- 147 Cao Y, Lin Y, Qian RC, Ying YL, Si W, Sha J, Chen Y, Long YT. *Chem Commun*, 2016, 52: 5230–5233
- 148 Yukimoto N, Tsutsui M, He Y, Shintaku H, Tanaka S, Kawano S, Kawai T, Taniguchi M. *Sci Rep*, 2013, 3: 1855

Electrochemical analysis of single particles

Ting Li^{1,3}, Yang Liu^{1,2}, Yanan Jiang¹, Jianhua Wang², Ping Yu^{1,3*}, Lanqun Mao^{1,3*}

¹ Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, CAS Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

² Research Center for Analytical Sciences, College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding authors (email: yuping@iccas.ac.cn; lqmao@iccas.ac.cn)

Abstract: Nanoparticles (NPs) have attracted much more attention over the past two decades because of their various applications in both fundamental aspects and industrial applications. In this context, development of new techniques to detect and study single NP behavior is of significant importance because the function of NP is closely related to its size, morphology, surface charge density and chemical properties. Electrochemical techniques have made a great contribution to investigating on the single nanoparticle properties (e.g., surface charge, geometry, and surface chemistry) over the past ten years. This review focuses on the recent progress on single particles analysis with electrochemical techniques that are classified into three categories based on the detection principles, i.e., nanoparticle-microelectrode collision, resistive-pulse analysis and other electrochemical-based methods.

Keywords: single particles, electrochemistry, collision, resistive-pulse

doi: [10.1360/N032016-00094](https://doi.org/10.1360/N032016-00094)