磷脂修饰化的石墨烯纳米复合物的制备及其直接电化学研究

张谦^{a,b,†} 吴抒遥^{a,b,‡} 张玲^c 茆卉^{a,b} 刘大亮^{a,b}

刘洋^d 曾向群^e 宋溪明^{*,a,b} 李景虹^{*,d}

(^a 辽宁大学绿色合成与先进材料制备化学辽宁省重点实验室 沈阳 110036)

(^b 辽宁大学化学学院 沈阳 110036)

(^c 沈阳师范大学化学与生命科学学院 沈阳 110034)

(^d 清华大学化学系 北京 100084)

(^e 奥克兰大学化学系 罗切斯特市 美国)

摘要 通过非共价键修饰方法制备了兼具良好生物相容性和导电性的磷脂 1-棕榈酰-2-油酰甘油-3-磷酸钠-石墨烯 (POPG-GP) 纳米复合物, 并利用 TEM, FT-IR, UV-vis, zeta 电位等对其形貌和结构进行了表征. 由于 POPG-GP 纳米复合物在水溶液中呈现出较为明显的负电性, 因此, 可通过静电自组装方法将辣根过氧化物酶(HRP)进一步组装到 POPG-GP 修饰的玻碳(POPG-GP/GC)电极上, 构筑 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极. 电化学实验结果表明, POPG-GP 纳米复合物能够有效实现 HRP 与修饰电极之间的直接电子转移. 此外, 固载在修饰电极表面的 HRP 对底物 H₂O₂ 还表现出良好的电催化活性. HRP/POPG-GP/GC 修饰电极对 H₂O₂ 的检测线性范围为 3.5~210 μmol/L, 最低检出限为 1.17 μmol/L (*S/N*=3), 灵敏度为 356.6 mA·cm⁻²·M⁻¹, *K_m* 值为 0.45 mmol/L.

关键词 石墨烯; 磷脂; 纳米复合物; 辣根过氧化物酶; 直接电化学

Biocompatible Phospholipid Modified Graphene Nanocomposite for Direct Electrochemistry of Redox Enzyme

Zhang, Qian^{a,b,†} Wu, Shuyao^{a,b,‡} Zhang, Ling^c Mao, Hui^{a,b} Liu, Daliang^{a,b}
Liu, Yang^d Zeng, Xiangqun^e Song, Ximing^{*,a,b} Li, Jinghong^{*,d}

(^a Liaoning Provincial Key Laboratory for Green Synthesis and Preparative Chemistry of Advanced Materials, Liaoning University, Shenyang 110036)

(^b College of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036)

(^c College of Chemistry and Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034)

(^d Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

(^e Department of Chemistry, Oakland University, Rochester USA)

Abstract A novel lipid based carbonaceous nanocomposite, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (POPG) modified graphene (GP) (POPG-GP), was designed and synthesized by a non-covalent method. The nanocomposite was endowed with excellent properties of the two independent components, such as the biocompatibility of POPG and the outstanding electric properties of graphene. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra, ultraviolet-visible (UV-vis) absorption spectra, transmission electron microscopy (TEM) were utilized to characterize the structure, morphology and surface property of the as synthesized POPG-GP. It has been found that the modification of POPG on GP could not only assist the dispersion of graphene in aqueous solution, but also endow it with negatively charged, which was favorable for the further immobilization of model enzyme via self-assembly. Based on the electrostatic interaction, the positively charged horseradish peroxidase (HRP) could be immobilized onto the surface of POPG-GP to form HRP/POPG-GP/GC electrode. UV-vis and FT-IR spectroscopies were used to monitor the assembly process and demonstrated that HRP had been immobilized without denaturation. The HRP/POPG-GP/GC electrode could commendably realize the direct electron transfer (DET) between electrode and redox enzyme with good electrochemical performance. Moreover, such modified electrode also

* E-mail: jhli@mail.tsinghua.edu.cn, songlab@lnu.edu.cn ‡为共同第一作者

Received August 30, 2013; published November 3, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21235004, 21128005, 51273087, 21071070, 21203126, 21005046, 51203072, 20901035), the Financial Supports from the Program for Liaoning Innovative Research Team in University (No. LT2011001), the Natural Science Foundation of Liaoning Province (Nos. 201202088, LJQ2013112), the Research Fund for the Doctoral Program of Liaoning Province (No. 20131042), the Foundation for Young Scholars of Liaoning University (Nos. 2012LDQN08, 2012LDQN07), College students' innovative entrepreneurial training program (No. X201210140036) and the Foundation of 211 Project for Innovative Talents Training, Liaoning University.

项目受国家自然科学基金(Nos. 21235004, 21128005, 51273087, 21071070, 21203126, 21005046, 51203072, 20901035)、辽宁省高等学校创新团队基金(No. LT2011001)、辽宁省自然科学基金(Nos. 201202088, LJQ2013112)、辽宁省博士科研启动基金项目(No. 20131042)、辽宁大学青年科研基金(Nos. 2012LDQN08, 2012LDQN07)、辽宁大学创新创业训练计划项目(No. X201210140036)和辽宁大学创新人才培养基金资助。

showed good electrocatalytic response toward the detection of H_2O_2 with high sensitivity, wide linear range, excellent stability and reproducibility. The linear response range for the HRP/POPG-GP/GC was $3.5\sim 210\ \mu\text{mol/L}$ ($R=0.999$). The detection limit and the sensitivity of the HRP/POPG-GP/GC electrode was calculated to be $1.17\ \mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$) and $356.6\ \text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-1}$, respectively. The apparent Michaelis-Menten constant K_m was estimated to be $0.45\ \text{mmol/L}$, indicating a high affinity of HRP to H_2O_2 on POPG-GP. The experiment results demonstrated that POPG-GP not only provided a biocompatible microenvironment for the immobilized HRP, but also supplied a necessary pathway for its direct electron transfer. Therefore, such biocompatible nanocomposite had potential applications in the field of biosensors.

Keywords graphene; phospholipid; nanocomposite; horseradish peroxidase; direct electrochemistry

1 引言

利用电化学方法研究生物氧化还原酶的直接电子转移, 对了解生命体的能量转换和物质代谢、生物大分子的结构与物理化学性质的关系、以及探索其在生命体内的电子传递过程的机理和生理作用都具有重要的理论指导意义^[1,2]. 然而, 由于大部分氧化还原酶在电极表面会产生强烈的吸附, 从而使其构象发生改变, 甚至失去生物活性, 进而抑制了它们在电极上的电子传递^[3~5]. 而且, 酶的电活性中心往往被多肽链包围, 从而阻碍了其在电极表面的直接电子转移^[5~8]. 因此, 为了实现氧化还原酶在电极表面发生可逆或准可逆的直接电子转移反应, 选择合适的酶固载方法和材料甚为重要.

作为二维的碳基纳米材料, 石墨烯具有比表面积大、导电性好等诸多优良特性^[9,10]. 作为电极材料, 石墨烯已在电化学领域, 尤其是生物电化学领域受到了高度的关注, 并得到了广泛应用^[11,12]. 近期研究表明, 石墨烯良好的电学性质可有效地促进氧化还原酶或蛋白质与电极间的直接电子传输, 并提高生物传感器的性能. 然而, 由于石墨烯片层间存在较强的范德华力和 π - π 相互作用, 易发生不可逆的团聚, 从而丧失其单层二维纳米片的结构特性^[13,14]. 此外, 石墨烯的表面还呈现一定的疏水性, 这一方面使其难以有效分散在极性或非极性的溶剂中, 另一方面还妨碍了其与水溶性生物大分子的进一步作用, 限制了石墨烯在生物电化学中的应用. 近期研究表明, 通过对石墨烯进行适宜的功能化修饰, 不但可提高其溶解性以及在不同基质中的分散性, 还可由此为石墨烯引入特定的功能性组分, 赋予石墨烯更为独特的性质.

磷脂(Phospholipid)是分子结构中含有磷酸的脂质(lipid). 作为生物膜的重要组成部分, 磷脂具有极好的生物相容性, 并已被广泛地应用于酶固载, 仿生材料和 DNA 转染等诸多生物相关的研究领域. Dayani 等^[15]利用共价修饰方法将 1,2-二硬脂酸-3-磷脂酰乙醇胺(DPPE)修饰于碳纳米管表面, 制备了新型碳基纳米材料. 研究表明, 脂质分子的表面修饰不仅可有效提高碳基材料的生物相容性, 还能改善其不同极性溶剂中的分散性. 然而目前此类相关研究仍较为有限, 尤其对于二维的石墨烯而言, 其与脂质的相互作用以及应用方面的相关研究鲜有报道.

本文首次将具有良好生物相容性的磷脂 1-棕榈酰-

2-油酰甘油-3-磷酸钠(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), POPG)与石墨烯通过非共价修饰方法复合, 制备了兼具良好生物相容性和较好导电性的石墨烯纳米复合物(POPG-GP). 在此基础上, 利用 POPG-GP 复合物的表面电荷性质, 通过静电组装方法实现了辣根过氧化物酶(HRP)在复合物上的固载, 并构建了 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极. 该修饰电极不仅能够较好实现固载的 HRP 与电极表面间的直接电子传输, 还对 H_2O_2 表现出优良的电催化性能.

2 结果与讨论

2.1 POPG-GP 纳米复合物的制备及其修饰电极的构筑

图 1 为 POPG-GP 纳米复合物的制备及其修饰电极构筑过程的示意图. 首先, 通过 Hummers 方法^[16]制备氧化石墨烯(GO). 进而, 在 POPG 水溶液中, 利用 $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 还原 GO. 由图 1 可知, POPG 分子具有两亲性, 其疏水的烃基链和亲水的极性基团各处于分子的两端. 因此在还原过程中, POPG 的烃基链会通过疏水作用吸附于石墨烯表面, 而极性基团则朝向外侧, 与水亲和. 这种非共价表面修饰不但可使原位生成的石墨烯表现出较好的水溶性, 还使其在水溶液中呈现负电荷特性. 由于辣根过氧化物酶(HRP)的等电点为 8.9 ^[17], 其在 pH 值低于等电点的水溶液中呈现正电荷. 基于此, 在 pH 5.7 的 PBS 中, HRP 即可通过静电吸附的相互作用负载于 POPG-GP 表面, 实现 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的构筑. 这种基于自组装构建修饰电极的方法可以使酶在温和条件下固载到石墨烯的表面, 从而有效地保持固载酶的天然结构和生物电活性.

2.2 POPG-GP 复合材料的形貌表征

图 2A 为 POPG-GP 纳米复合物的 TEM 图. 从图中可以清晰地观察到 POPG-GP 呈明显的薄纱状且带有褶皱、蜷曲的片状结构. 图 2B 为 POPG-GP 纳米复合物在水中分散液的照片. 由图可知, 由于 POPG 的表面修饰, 石墨烯呈现出较好的水溶性, 从而能够在水中形成均一的黑色分散液. POPG 修饰化的石墨烯分散液较为稳定, 放置 3 个月无明显沉降产生.

图 2C 为 POPG-GP 纳米复合物在 pH 5.7 的 PBS 中的 zeta 电位图. 测试结果表明 POPG-GP 纳米复合物在

图1 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极构筑过程示意图

Figure 1 Fabrication of HRP/POPG-GP/GC electrode and the direct electron transfer between HRP and glassy carbon (GC) electrode

图2 (A) POPG-GP 的 TEM 图, (B) POPG-GP 分散在水中的照片和 (C) POPG-GP 在 PBS (pH 5.7) 中的 zeta 电位图

Figure 2 (A) TEM image, (B) photo and (C) zeta potential image of POPG-GP

PBS 中呈现出较强的电负性, 其 zeta 电位值约为 -32.9 mV. 石墨烯表面的这种电荷性质不但可使纳米片间存在较强的静电排斥作用, 从而有效防止石墨烯片间的不可逆聚集, 而且还为其进一步通过静电吸附方法固载氧化还原酶提供了条件.

2.3 POPG-GP 复合材料光谱表征

图 3 为 GO (a) 和 POPG-GP (b) 在溶液中的 UV-vis 光谱图. 由图可知, GO 的特征吸收峰位于 231 nm (图

3a), 而 POPG-GP 的特征吸收峰则红移到 267 nm 处(图 3b). 这种红移现象的产生是由于水合肼的还原过程促使氧化石墨烯恢复了部分 π - π 键, 从而扩大了其共轭体系所造成的.

图3 (a) GO 和 (b) POPG-GP 水溶液的 UV-vis 图

Figure 3 UV-vis absorption spectra of (a) GO and (b) POPG-GP in water

2.4 HRP/POPG-GP 纳米复合物的光谱表征

图 4 分别为 POPG-GP (a), HRP/POPG-GP (b), HRP (c) 的 FT-IR 光谱谱图. 由曲线 a 可观察到 POPG-GP 的谱图中分别存在 1627 cm^{-1} 处石墨烯 C=C 的伸缩振动峰和 1735 cm^{-1} 处修饰磷脂的 C=O 的伸缩振动峰. 而在 HRP/POPG-GP 的谱图中, 不但可观察到与 POPG-GP 类似的特征吸收峰, 还可观察到 HRP 的酰胺 I 带 (1650 cm^{-1}) 和酰胺 II 带 (1543 cm^{-1}) 的特征吸收峰. 这些固载酶的特征吸收峰与 HRP 谱图中的特征吸收峰(图 4c) 基本一致. HRP/POPG-GP 在 1650 cm^{-1} 处的吸收带较 HRP

的有所展宽,这是由于 POPG-GP 与 HRP 的特征吸收峰互相重叠所致.由此可知,固载于 POPG-GP 上的 HRP 有效保持了其固有的二级结构.

图4 (a) POPG-GP, (b) HRP/POPG-GP 和(c) HRP 的 FT-IR 图
Figure 4 FT-IR spectra of (a) POPG-GP, (b) HRP/POPG-GP and (c) HRP

图5为 POPG-GP (a), HRP/POPG-GP (b)和 HRP (c) 在 PBS 中的 UV-vis 光谱图.由曲线 a 可知, POPG-GP(图 5a)在 350~500 nm 的检测范围内没有明显的特征吸收峰.而当其在 pH 5.7 的 PBS 中与 HRP 相互作用后,其 UV-vis 谱图中(图 5b)在 403 nm 处出现了明显的吸收峰.这与 HRP(图 5c)谱图中的 Soret 带的特征吸收峰完全一致.由此可说明,一方面 POPG 的表面修饰有效促进了酶在石墨烯表面的负载;另一方面,由于固载条件较为温和,而且石墨烯纳米复合物具有较好的生物相容性,固载的 HRP 的生物活性得到了很好地保持.

图5 (a) POPG-GP, (b) HRP/POPG-GP 和(c) HRP 在 0.1 mol/L PBS (pH 5.7)中的 UV-vis 图
Figure 5 UV-vis absorption spectra of (a) POPG-GP, (b) HRP/POPG-GP and (c) HRP in 0.1 mol/L PBS (pH 5.7)

2.5 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的直接电化学性质

图6为 HRP/POPG-GP/GC 和 POPG-GP/GC 修饰电极(内插图)在 0.1 mol/L PBS (pH 5.7)中的循环伏安曲线.图6内插图中,没有观察到 POPG-GP/GC 修饰电极氧化

还原峰的出现,说明 POPG-GP 在扫描范围内没有电化学活性.而 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的循环伏安图中可观察到一对明显且可逆的氧化还原峰.其氧化峰(E_{pa})电位为 -0.211 V, 还原峰电位(E_{pc})为 -0.320 V, 式量电位为 $E^0 = -0.266$ V. 这是由固载酶的 HRP- Fe^{III}/Fe^{II} 电对在修饰电极表面发生了直接电子转移而产生的,与文献报道的 HRP 修饰电极的检测结果基本一致^[18].由以上分析可知,由于 POPG-GP 纳米复合物兼具较好的生物相容性和导电性,因此可有效促进负载 HRP 与玻碳(GC)电极表面间的直接电子转移.

图6 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极在 N_2 饱和的 0.1 mol/L PBS (pH 5.7) 中的循环伏安图, 扫速: $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. 内插图: POPG-GP/GC 修饰电极
Figure 6 Cyclic voltammograms of POPG-GP/GC (Inset) and HRP/POPG-GP/GC electrodes in N_2 -saturated 0.1 mol/L PBS (pH 5.7). Scan rate, $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

利用循环伏安还考察了 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的氧化还原峰电流与扫速间的相关性.图7为修饰电极在不同扫速下的循环伏安图.如图所示,当扫速增加时,其氧化峰电流和还原峰电流同时增加.根据法拉第方程 $Q = nFA\Gamma^*$ (Q : 反应消耗的电量,可由积分 HRP 的还原峰面积得到, n 和 F 分别为转移的电子数和法拉第常数, A 为电极的几何面积, Γ^* 为电极表面电活性 HRP 的表面覆盖度),可推算电化学活性的 HRP 在修饰电极的 Γ^* 约为 $3.62 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$. 由于 HRP 最大表面单层覆盖度的理论值为 $2.0 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ^[19], 因此可说明 HRP 是以多层的状态负载于修饰电极上的.这是由 POPG-GP 纳米复合物具有的较大比表面积以及较好导电性所造成的.图7内插图为 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极在不同扫速时氧化还原峰电流相对扫速的线性关系图.由图可知,扫速从 100 到 $800 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的范围内,修饰电极的峰电流与扫速成正比,并且呈现出较好的线性关系,说明电极反应为表面控制过程.

2.6 pH 值对 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的电化学行为的影响

酶的生物活性只有在较为温和的条件下才能够得以较好的保持.在影响酶生物活性的诸多条件中,溶液

图7 HRP/POPG-GP/GC修饰电极在0.1 mol/L PBS (pH 5.7) 中, 不同扫速下的循环伏安曲线, 从a到h: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. 内插图: 氧化还原峰电流相对扫速的线性图

Figure 7 Cyclic voltammograms of HRP/POPG-GP/GC electrode at scan rates of 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 and 800 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (from a to h) in 0.1 mol/L PBS (pH 5.7), respectively; Plots of oxidation peak current (●) and reduction peak current (■) vs. scan rate (Inset)

的pH值是一个重要的因素. 溶液pH值的改变会直接影响酶活性中心催化基团的解离, 从而影响酶与底物之间的结合. 只有在适宜的pH条件下, 酶反应才可达到最大的速度. 基于此, 本文考察了溶液pH值对HRP/POPG-GP/GC修饰电极电化学行为的影响. 图8A为HRP/POPG-GP/GC修饰电极的还原峰电流与溶液pH值间的关系图. 由图可知, 修饰电极在溶液pH值为5.7时呈现出最大还原峰电流响应. 此外, 由图8B还可观察到HRP/POPG-GP/GC修饰电极的式电位与溶液pH值之间存在较好的线性关系, 其斜率为 -44.9 mV/pH . 该结果表明固载于修饰电极表面的HRP的电子传输为质子耦合过程^[20].

2.7 HRP/POPG-GP/GC修饰电极的电化学催化性能

图9A为HRP/POPG-GP/GC修饰电极在0.1 mol/L PBS (pH 5.7)中对不同浓度 H_2O_2 电化学催化的循环伏安图. 由图可知, 在无氧的情况下, 当缓冲溶液中加入 H_2O_2 后, 修饰电极的循环伏安曲线发生了显著的变化. 其位于 -0.3 V 附近的还原峰电流明显增加, 而氧化峰电流则明显减小. 随着 H_2O_2 浓度的逐渐增大, 修饰电极的催化还原峰电流逐渐增大, 氧化峰电流逐渐消失, 说明在HRP/POPG-GP/GC修饰电极上, 固载的HRP不仅能够实现直接电子转移, 而且还对 H_2O_2 的还原表现出良好的电化学催化活性. HRP对 H_2O_2 催化过程的机理如下所示^[21]:

图9B是HRP/POPG-GP/GC修饰电极的催化电流与 H_2O_2 浓度之间的线性关系曲线. 从图中可以观察到 H_2O_2 浓度在 $3.5 \sim 210 \mu\text{mol/L}$ 范围内与阴极峰电流表现

图8 (A) HRP/POPG-GP/GC修饰电极在pH 4.0~6.5的PBS中的循环伏安曲线峰电流与pH值关系图, 扫速: $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (B) 式电位 E^0 与pH值的关系图

Figure 8 (A) The influence of pH on the response of the HRP/POPG-GP/GC electrode in 0.1 mol/L PBS. Scan rate, $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (B) the dependence of the formal potential of the HRP/POPG-GP/GC electrode vs. pH

出良好的线性关系, 其线性回归方程为: $y = 0.033x + 0.059$ ($R = 0.999$, $n = 12$), y 和 x 分别代表还原峰电流(μA)和 H_2O_2 的浓度($\mu\text{mol/L}$). 经对比, 该修饰电极的催化线性范围比已报道的其它类型HRP修饰电极的相关值宽很多^[22]. 根据线性方程可知, HRP/POPG-GP/GC修饰电极对 H_2O_2 检测的灵敏度和最低检测限分别为 $356.6 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-1}$ 和 $1.17 \mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$). 此外, 由图9B还可观察到随着 H_2O_2 浓度的增加, 修饰电极的催化电流与 H_2O_2 浓度间的线性关系出现了一个平台, 该现象符合酶催化的Michaelis-Menten反应特征. 根据Lineweaver-Burk方程($1/I_{ss} = 1/I_{max} + K_m/(I_{max}C)$) (I_{ss} , 稳态响应电流; I_{max} , 底物饱和时最大稳态电流; C , 底物浓度; K_m , 表观米氏常数)可知^[23], 固载酶的 K_m 为 0.45 mmol/L , 远小于已报道的HRP修饰电极上的 K_m 值^[24,25]. 较小的 K_m 表明固载于POPG-GP上的HRP与底物 H_2O_2 间存在较好的亲和力, 使修饰电极表现出较好的电化学催化性能.

2.8 HRP/POPG-GP/GC修饰电极的重复性和稳定性

通过循环伏安法对HRP/POPG-GP/GC修饰电极的重复性和稳定性进行了考察. 由5支相同的玻碳电极所制备的HRP/POPG-GP/GC修饰电极, 分别对 $30 \mu\text{mol/L}$

图9 (A) HRP/POPG-GP/GC 修饰电极在 0.1 mol/L PBS (pH 5.7) 中, 对 H_2O_2 催化的循环伏安曲线, 扫速: $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. H_2O_2 的浓度: (a) 0, (b) 3.5, (c) 7, (d) 10.5, (e) 14, (f) 28, (g) 42, (h) 56, (i) 70, (j) 105, (k) 140, (l) 175 和 (m) 210 $\mu\text{mol/L}$; (B) 还原峰电流与 H_2O_2 浓度的校准曲线
Figure 9 (A) Cyclic voltammograms of HRP/POPG-GP/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 5.7) containing (a) 0, (b) 3.5, (c) 7, (d) 10.5, (e) 14, (f) 28, (g) 42, (h) 56, (i) 70, (j) 105, (k) 140, (l) 175, and (m) 210 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Scan rate, $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (B) Plots of the electrocatalytic current (ΔI) vs. H_2O_2 concentration

H_2O_2 的循环伏安测试结果可知, 修饰电极的电流响应值的相对标准偏差为 3.2%, 说明了该修饰电极具有较好的重现性。

为了研究 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的稳定性, 分别将修饰电极浸泡在 pH 5.7 的 PBS 中放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存 12 h 以及 7 d 后考察其对 30 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 循环伏安的检测。如图 10 所示, 修饰电极在放置 12 h 以及 7 天后, 其循环伏安曲线的阴极峰电流均没有明显变化。该结果表明 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极对 H_2O_2 的电催化具有较好的稳定性, 这可归因于 POPG-GP 纳米复合材料良好的生物相容性。

3 结论

本文首次利用非共价键修饰方法制备了 POPG-GP 纳米复合物, 并进一步利用静电自组装的方法实现了 HRP 在纳米复合物上的固载, 构筑了 HRP/POPG-GP/

图10 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极放置 12 h 和 7 d 后, 在 0.1 mol/L PBS (pH 5.7) 中, 对 30 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 催化的循环伏安曲线, 扫速: $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Figure 10 Cyclic voltammograms of HRP/POPG-GP/GC electrode in 0.1 mol/L PBS (pH 5.7) with 30 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 after stored for 12 h (a) and for 7 days (b). Scan rate, $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

GC 修饰电极。由于 POPG-GP 纳米复合物兼具较好的生物相容性和导电性, 固载的 HRP 不但可以保持其天然的结构, 还可实现与玻碳电极表面间的直接电子转移。此外, HRP/POPG-GP/GC 修饰电极还对 H_2O_2 的电化学催化表现出较好的性能, 因此有望被应用于生物传感器及燃料电池等领域。

4 实验部分

4.1 试剂

1-棕榈酰-2-油酰甘油-3-磷酸钠(POPG)(日本 NOF 公司), 辣根过氧化物酶(HRP)(Sigma 公司), 水合肼($\text{NH}_2\text{-NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$)、铁氰化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司), 30%过氧化氢(H_2O_2)(天津市博迪化工有限公司), 其它试剂均为分析纯。本实验用水为超纯水。

4.2 POPG-GP 纳米复合材料的制备

氧化石墨烯(GO)采用 Hummers 法制备^[16]。将 4 mg GO 分散到 4 mL 水中, 加入 8 mg POPG, 漩涡混合, 使 POPG 均匀分散到 GO 溶液中, 然后加入 28 μL 水合肼。80 $^{\circ}\text{C}$ 下, 反应 4 h 得到黑色均一的溶液。将产物用 0.22 μm 的滤膜过滤, 用水洗涤溶液至中性, 最后将制得的 POPG-GP 配成 0.1 mg/mL 的水溶液。

4.3 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极的制备

将直径为 3 mm 的玻碳电极进行预处理: 首先, 将电极放到抛光布上用粒径分别为 1.0, 0.3, 0.05 μm Al_2O_3 粉末进行抛光, 蒸馏水冲洗, 然后分别用丙酮、乙醇、超纯水超声清洗。最后用高纯氮气吹干, 室温下放置备用。

取 5 μL 0.1 mg/mL 的 POPG-GP 纳米复合物滴涂于玻碳电极表面, 室温下干燥成膜。然后, 将修饰电极浸入到用 0.1 mol/L (pH 5.7) PBS 配制的 HRP (5 mg/mL) 溶

液中, 4 °C下放置约 24 h, 最终得到 HRP/POPG-GP/GC 修饰电极.

4.4 仪器设备

石墨烯基纳米复合材料利用 H-800 透射电镜显微镜 (TEM)(日本 Hitachi 公司), L35-900 紫外可见光谱仪 (UV-vis)(美国 Perkin-Elmer 公司), Spectrum One 红外光谱仪 (FT-IR)(美国 Perkin-Elmer 公司), Nano ZS 纳米粒度及 zeta 电位分析仪(英国 Malvern 公司)进行表征.

电化学实验利用 BAS100B 电化学工作站(美国 Bioanalytical Systems 公司)进行表征. 本实验电化学测试采用三电极体系: 铂丝电极为对电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, POPG-GP/GC 或 HRP/POPG-GP/GC 电极为工作电极. 测试底液为 8 mL pH 5.7 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液(PBS), 通入高纯氮气 30 min, 以除去溶液中的溶解氧. 若无特殊说明, 在实验过程中测试杯内一直保持氮气饱和氛围.

References

- [1] Kang, X.; Wang, J.; Wu, H.; Aksay, I. A.; Liu, J.; Lin, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 901.
- [2] Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Xu, Z.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 984.
- [3] Chen, H.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1811.
- [4] Lu, X.; Hu, J.; Yao, X.; Wang, Z.; Li, J. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 975.
- [5] Dai, Z.; Ju, H. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2004**, *20*, 1262. (戴志晖, 鞠焜先, 物理化学学报, **2004**, *20*, 1262.)
- [6] Lu, X.; Zhang, Q.; Zhang, L.; Li, J. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 874.
- [7] Zhang, Q.; Wu, S.; Zhang, L.; Lu, J.; Verproot, F.; Liu, Y.; Xing, Z.; Li, J.; Song, X.-M. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2632.
- [8] Cai, C.; Chen, J. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 335. (蔡称心, 陈静, 化学学报, **2004**, *62*, 335.)
- [9] Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Katsnelson, M. I.; Grigorieva, I. V.; Dubonos, S. V.; Firsov, A. A. *Nature* **2005**, *438*, 197.
- [10] Li, D.; Muller, M. B.; Gilje, S.; Kaner, R. B.; Wallace, G. G. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 101.
- [11] Zhang, Q.; Yang, S.; Zhang, J.; Kang, P.; Li, J.; Xu, J.; Zhou, H.; Song, X.-M. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 494010.
- [12] Zhang, Q.; Wu, S.; He, M.; Zhang, L.; Liu, Y.; Li, J.; Song, X.-M. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 2213. (张谦, 吴抒遥, 何茂伟, 张玲, 刘洋, 李景虹, 宋溪明, 化学学报, **2012**, *70*, 2213.)
- [13] Niyogi, S.; Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; McWilliams, J. L.; Hamon, M. A.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7720.
- [14] Yang, H.; Zhang, Q.; Shan, C.; Li, F.; Han, D.; Niu, L. *Langmuir* **2010**, *26*, 6708.
- [15] Dayani, Y.; Malmstadt, N. *Langmuir* **2012**, *28*, 8174.
- [16] Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1339.
- [17] Wang, Z.; Li, M.; Su, P.; Zhang, Y.; Shen, Y.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 306.
- [18] Li, J.; Dong, S. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *431*, 19.
- [19] Zhang, L.; Zhang, Q.; Lu, X.; Li, J. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 102.
- [20] Bond, A. M.; Braun, R. D. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 528C.
- [21] Zhang, Q.; Qiao, Y.; Hao, F.; Zhang, L.; Wu, S.; Li, Y.; Li, J.; Song, X. M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8133.
- [22] Mohammed, E.; Ignacio, N.-R.; Manuel, D.; Maria, P. H.-A.; Dolores, B.-M.; Jose, L. H.-H. C. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 7131.
- [23] Kamin, R. A.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1198.
- [24] Zhao, X.; Mai, Z.; Kang, X.; Zou, X. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1032.
- [25] Zhou, K.; Zhu, Y.; Yang, X.; Luo, J.; Li, C.; Luan, S. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 3055.

(Lu, Y.)