DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.140737

## 新型石墨烯-壳聚糖/二茂铁衍生物/细胞色素 c 修饰电极的制备及其用于亚硝酸钠的检测研究

## 黄娜 刘美玲<sup>\*</sup> 邓建辉 王林萍 张友玉<sup>\*</sup> 姚守拙

(湖南师范大学化学生物学及中药分析教育部重点实验室,长沙 410081)

摘 要 具有共轭结构的分子导线是构筑分子电子器件的重要组成单元,而含有二茂铁单元的该类化合物 具有良好的电化学性质,被广泛研究。基于此,本实验通过 Sonogashira 交叉偶联等反应合成了一种新型二茂 铁乙炔衍生物(Fc-NH<sub>2</sub>),并经红外(IR)、核磁共振(<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR)、质谱(MS)和循环伏安(CV)等方法 表征。利用 Fc-NH<sub>2</sub> 与石墨烯-壳聚糖(GH-CS)之间的相互作用制备了 GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub> 复合物,并成功用于细 胞色素 c(Cyte)的固定,得到 GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cyte 修饰电极。研究表明,GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE 在-0.2 V 附近出现一对峰,对应于 Cyte 的可逆氧化还原峰。此电极对 NaNO<sub>2</sub> 有良好的电催化作用,在  $1 \times 10^{-7} \sim 1.5 \times$  $10^{-4}$  mol/L 范围内,NaNO<sub>2</sub> 浓度与氧化峰电流呈良好的线性关系,检测限低至  $4 \times 10^{-8}$  mol/L。此修饰电极不但 可以实现细胞色素 c 的直接电化学,也可以用于定量检测 NaNO<sub>2</sub>。

关键词 二茂铁乙炔衍生物;细胞色素 c;石墨烯;亚硝酸盐;电催化

1 引 言

亚硝酸盐是一种工业用盐,同时也是食品添加剂<sup>[1]</sup>,起着色、防腐作用,广泛用于熟肉类、灌肠类和 罐头等动物性食品中,但用量受到严格限制。亚硝酸盐可以与胺类物质形成致癌物亚硝胺<sup>[2]</sup>。摄入过 量的亚硝酸盐可使血液中的低铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,失去运输氧的能力而引起组织缺氧性 损害。由于亚硝酸盐潜在的危害,定量分析亚硝酸盐尤为重要。目前,定量检测亚硝酸盐的方法主要有 电化学传感法<sup>[3]</sup>、质谱法<sup>[4]</sup>、光谱法<sup>[2,5]</sup>、色谱法<sup>[6]</sup>、比色法<sup>[7]</sup>等。电化学方法简单、廉价、分析迅速、检 测灵敏度和选择性高,是相对简单有效的方法之一。最近,许多研究者成功构建了不同的化学修饰电 极,用于亚硝酸盐的高灵敏传感检测<sup>[8,9]</sup>,但是发展更可靠、更灵敏的分析检测亚硝酸盐的电化学传感 器,仍然是近期亚硝酸盐研究的热点之一。

由于 NO<sub>2</sub> 在裸电极表面直接发生还原或氧化的电位很高,干扰物多<sup>[10]</sup>,因此,电化学检测亚硝酸盐的关键是降低亚硝酸盐氧化还原的过电位,通常认为采用某些无机、有机或者有机金属化合物(如铁卟啉和酞花菁<sup>[11]</sup>等)修饰电极可以实现。二茂铁及其衍生物是常用的小分子电子媒介体,热稳定性好, 电化学活性高,常用于构建高灵敏的化学/生物传感器。但该类传感器中的电子媒介体会发生部分溶解 或扩散而离开电极表面导致媒介体流失,从而影响传感器的稳定性和使用寿命。因此,如何将二茂铁改 性以获得结构特殊的衍生物并固定于电极表面,且保持其活性和稳定性,是研究者极其关注的问题。

石墨烯(GH) 是由单层碳原子通过共价键结合而成的具有规则六方对称的理想二维晶体,是继富 勒烯(C<sub>0</sub>) 和碳纳米管(CNT) 之后的又一种碳质新材料,是构建其它维数碳质材料的基本结构单元<sup>[12]</sup>。 由于石墨烯具有很大的共轭结构,可与共轭分子发生 *π-π* 堆积作用。如果将二茂铁与一个共轭结构相 连,制备一种新型二茂铁衍生物,就可以实现二茂铁在石墨烯材料表面的有效固定。

在修饰电极上固定细胞色素 e(Cyte) 或血红素等,不但可实现它们与电极表面的电荷传输,同时也可用于电催化检测过氧化氢、超氧自由基阴离子<sup>[13]</sup>、抗坏血酸和 *L*-半胱氨酸<sup>[14]</sup>等。研究表明,采用电子媒介体有助于促进 Cyte 与电极表面的电子转移<sup>[15]</sup>。因此,使用一种新的电子媒介体,并采用有效的方法构建 Cyte 化学修饰电极,可以实现 Cyte 的直接电化学,同时可用于双重放大检测某些小分子。

<sup>2014-08-26</sup> 收稿; 2014-12-25 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 21305042, 21275051, 21375037) 和湖南省自然科学基金(Nos. 14JJ4030, 13JJ2020) 资助、湖南大学化 学生物传感与计量国家重点实验室开放课题(No. 2013013) 和湖南省高校科技创新团队资助(湘教通 2012[318 号]

<sup>\*</sup> E-mail: liumeilingww@126.com; Zhangyy@hunnu.edu.cn

基于此,本实验合成了一种氨基封端的二茂铁乙炔衍生物,结合石墨烯和二茂铁的优良性质,一锅 法合成石墨烯-二茂铁乙炔胺(GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>)复合物,并构建一种新型亚硝酸盐传感器。此二茂铁衍 生物含有苯乙炔单元、氨基和二茂铁等基团,其中的苯乙炔基和氨基可以与石墨烯非共价或共价键合形 成稳定的复合物,从而将二茂铁电子媒介体固定在电极表面,不仅可以有效克服电子媒介体的泄漏,还 可大大改善传感界面上的电子传递。Cyte 可有效固定在该复合物表面,实现其直接氧化还原,同时,制 备的传感器对 NO<sup>2</sup> 具有良好的催化氧化效果,据此可建立定量检测亚硝酸盐的有效方法。

#### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

UV-2450 型紫外分光光度计(UV,日本岛津公司)、Nicolet 670 红外光谱仪(IR,美国 Nicolet 公司)、 F-4500 型荧光光谱仪(FL,日本日立公司)、Bruker-500 型高分辨核磁共振谱仪(CDCl<sub>3</sub> 为溶剂,TMS 为 内标)、Nicolet 670 傅立叶变换红外光谱仪(KBr 压片,美国尼高力公司)、扫描电子显微镜(Quanta200, 美国 FEI 公司)、Hitachi-600 透射电子显微镜(TEM,日本 Hitachi 公司)。CHI 660C 电化学工作站(上海 CHI 公司),采用三电极系统:修饰的玻碳电极、碳棒电极和饱和甘汞电极分别作为工作电极、对电极和 参比电极。玻碳电极使用前先用金相砂纸抛光,再依次用 1.0,0.3 和 0.05 μm 的 A1<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 悬浊液在麂皮 上抛光,最后分别用 HNO<sub>3</sub>(1:1,V/V)、无水乙醇和二次蒸馏水超声清洗,然后置于室温下干燥备用。

壳聚糖(美国 Sigma 公司),用醋酸溶解,配制成 0.5%(w/w) 水溶液; Cytc (分析纯,美国 Sigma 公司); 亚硝酸钠(分析纯,北京化学试剂有限公司); 四氢呋喃、二异丙胺使用前均用钠回流重蒸,进行无水处理。其它试剂均为分析纯,未经任何处理直接使用。二茂铁衍生物(Fc-NH<sub>2</sub>)和石墨烯均自行合成,具体合成步骤见文献[16]。0.1 mol/L pH 7.0的 PBS( $0.1 \text{ mol/L NaH}_2PO_4 + 0.1 \text{ mol/L Na}_2HPO_4$ ) 用超纯水(经美国 Milli Q 纯水仪处理)配制。

#### 2.2 实验步骤

2.2.1 石墨烯及 Fc-NH<sub>2</sub> 的合成与表征 石墨烯氧化物由天然石墨片合成,具体步骤参见文献[17]。 主要合成步骤如下: 取 500 mg 天然石墨片与 20 mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 混合,不断搅拌下,在 15 min 内加 入 1.75 g KMnO<sub>4</sub>。将混合物加热至 35 °C,继续搅拌 2 h。冰浴冷却反应液至 3 ~4 °C,缓慢加入 23 mL 去离子水,在冰水浴中搅拌反应。由温度计监控冰水浴的温度,确保温度低于 7 °C。待温度稳定后,继 续加入 270 mL 水稀释反应液。反应液以 300 r/min 搅拌,逐滴加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液除去多余的 KMnO<sub>4</sub>。将 反应液过滤,用 10% HCl 溶液洗涤,在空气中干燥后,再真空室温干燥 24 h。水洗,并用 0.2  $\mu$ m 的微孔 尼龙网过滤后,部分还原的石墨烯氧化物再分散于 75 g 水中,超声。将 2 g 水合肼溶于 5 g 水中,再加 入到石墨烯氧化物的水溶液中,反应混合液保持 100 °C,并不断搅拌,持续反应 24 h。过滤,充分水洗, 得石墨烯(GH)。其结构和组成经红外、紫外、透射电子显微镜等表征<sup>[16]</sup>。

Fc-NH<sub>2</sub>的合成如图 1 所示: 氮气保护下 在 100 mL 的单口烧瓶中依次加入 126 mg (6×10<sup>-4</sup> mol/L) 二茂铁乙炔(实验室合成)<sup>[16]</sup>、131 mg (6×10<sup>-4</sup> mol/L) 对碘苯胺(参考文献 [18]合成)、21 mg Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、6 mg CuI 再加入 24 mL THF 和 8 mL 二异丙胺 搅拌溶解 ,于 55 ℃加热回流反应 20 h 薄层色谱跟踪反应进程 旋转蒸发除去溶剂 残余物用 30 mL 二氯甲烷溶解 ,水洗 ,无水硫酸钠干燥 , 硅胶柱层析分离纯化(石油醚为洗脱剂)得 153.5 mg 褐色固体 ,产率 85%;<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,500 MHz) δ: 4.23 (s,2H),4.25 (s,5H),4.50 (s,2H),6.55 (s,2H),7.39 (d,2H, J=8.5 Hz),7.60 (d, 2H,J=8.5 Hz);<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>,126 MHz) δ: 68.53,69.91,70.17,71.22,85.93,86.44, 112.65,114.96,132.75,146.77; IR (cm<sup>-1</sup>): 3440,3358,2924,2853,2197,1701,1622,1604, 1519,1408,1289,1102,1027,823; MS *m/z*: 301 (M<sup>+</sup>,100%)。将产物溶于乙腈 加入高氯酸锂作为电 解质 将玻碳电极置于其中 在 0.4 V 附近有一对可逆的氧化还原峰 对应于二茂铁的氧化还原<sup>116</sup>。 **2.2.2** 修饰电极的制备、表征与应用研究 将片状壳聚糖用醋酸溶液搅拌溶解 ,调至 pH 5.0,配 成 0.5% (*w/w*)的 CS 溶液 备用。将 1 mg GH 溶于 1 mL 上述 CS 溶液中 配成 1 mg/mL 的石墨烯溶液。 用乙醇溶解 Fc-NH<sub>2</sub> 配成 1×10<sup>-3</sup> mol/L 溶液。取适量 Fc-NH<sub>2</sub> 溶液与石墨烯溶液 超声混合 10 min 振荡过



图示1  $Fc-NH_2$ 的合成路线图

Scheme 1 Synthesis route of ferrocene-terminated phenylethynyamiline (Fc-NH2)

夜 以使石墨烯和 Fc-NH<sub>2</sub> 充分混匀 形成稳定的复合物。取适量复合物 ,加入 Cyte 的 PBS 溶液 ,振荡混合 搅拌过夜。取适量的混合液滴于干净的玻碳电极表面 ,自然风干 ,得 GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE(具体 见图 1A) 备用。为对比研究 同法制备了 GH-CS/Cyte/GCE 和 GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/GCE 修饰电极。

TEM, UV 和 IR 等用于考察石墨烯及其复合物的形貌。探讨不同的修饰电极在 PBS 中的循环伏安 (CV) 曲线以表征其电化学性质,并考察扫速的影响。在  $2 \times 10^{-3}$  mol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 中进行 电化学阻抗测试,考察修饰电极的电子传递性能。CV 法考察不同修饰电极对 NaNO<sub>2</sub> 的电化学响应; 对 NaNO<sub>2</sub> 检测条件进行优化,并探讨最优条件下修饰电极对 NaNO<sub>2</sub> 检测的线性范围。计时安培实验在搅 拌下进行,施加电压为 700 mV。实际样品检测操作如下:将超市购买的葡萄汁饮料经直接过滤后,稀释 10 倍再采用标准加入法进行检测。所有测试电解质溶液实验前均通入高纯氮气除氧 15 min。实验温 度 20 °C。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 修饰电极的表征

图 1A 是修饰电极的制备过程。将 GH 先溶于 CS 溶液,再加入 Fc-NH<sub>2</sub>,其与 GH 通过 *π-π* 堆积或 者氢键作用等形成复合物。由 TEM 图(图 1B)可知,石墨烯/Fc-NH<sub>2</sub>呈现清晰的片状结构,表明石墨烯 可分散在二茂铁衍生物溶液中。



图 1 (a) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE 的制备过程 (b) GH/Fc-NH<sub>2</sub> 的透射电子显微镜图

Fig. 1 (a) Preparation of GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE and (b) TEM image of GH/Fc-NH<sub>2</sub>

GH: Graphene; CS: Chitosan; Fe-NH2: Ferrocene-terminated phenylethynyaniline; Cytc: Cytochrome C.

通过 UV 和 FTIR 光谱进一步确认 GH 与 Fc-NH<sub>2</sub> 复合物的形成,且排除壳聚糖的影响。由 GH,Fc-NH<sub>2</sub>和 GH/Fc-NH<sub>2</sub>的紫外光谱图(图 2A)可知,石墨烯的紫外峰位于 278 nm 处,而 Fc-NH<sub>2</sub>有 两个紫外吸收峰,分别位于 260 和 305 nm 附近。对于 GH/Fc-NH<sub>2</sub> 纳米复合物,在 270 nm 附近出现一 个紫外吸收峰。相对于石墨烯的特征吸收峰,复合物中石墨烯的峰强度有所增强,且发生一定的蓝移。

这些现象可能是由于石墨烯与 Fe-NH<sub>2</sub> 发生  $\pi$ - $\pi$  堆积作用形成了复合物所致。这也可以由红外光谱进 一步证实。比较 GH/Fe-NH<sub>2</sub> 的红外光谱图与 Fe-NH<sub>2</sub> 和 GH 的红外光谱(图 2B),复合物在 2926, 1406,1082 和 810 cm<sup>-1</sup> 处出现了二茂铁的特征峰,同时氨基和炔键的峰清晰可见,分别位于 3430 和 2218 cm<sup>-1</sup> 处。另外,复合物中 Fe-NH<sub>2</sub> 的炔键由 2210 cm<sup>-1</sup> 移至 2218 cm<sup>-1</sup>,氨基的位置也发生移动,表 明石墨烯和 Fe-NH<sub>2</sub> 发生了作用<sup>[16]</sup>。在 1635 及 1117 cm<sup>-1</sup> 处的 GH 峰分别移至 1620 和 1082 cm<sup>-1</sup> 处, 也证明 Fe-NH<sub>2</sub> 与 GH 间的  $\pi$ - $\pi$  堆积作用。



图 2 Fc-NH<sub>2</sub>(a) GH (b) 和 GH/Fc-NH<sub>2</sub>(c) 的(A) 紫外和(B) 红外图

Fig. 2 UV (A) and IR (B) spectra of (a) Fc-NH2 (b) GH and (c) GH/Fc-NH2

图 3A 是修饰电极在 0.1 mol/L PBS( pH 7.0) 中扫描的 CV 曲线。在 $-0.7 \sim 0.3$  V 范围内,裸玻碳 电极和 GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub>/GCE 上都没有任何氧化峰(若将电位范围扩大,在 0.4 V 附近会出现二茂铁的 氧化峰),而 GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE 在-0.2 V 附近有一对氧化还原峰,对应于细胞色素 e 的氧化还 原。这说明 GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub> 可以作为 Cyte 的固定基底,同时有助于实现 Cyte 与电极之间的电子传递。 值得注意的是,这里的 GH-CS 不但可以增大电极的表面积,同时能为 Fe-NH<sub>2</sub> 的固定提供结合位点。另 一方面,文献报道表明氨基可以与 Cyte ( pI 10) 的赖氨酸残基进一步作用,稳定地固定在电极表面<sup>[10]</sup>。 因此,GH/CS/Fe-NH<sub>2</sub> 修饰电极可为 Cyte 提供更多的结合位点,从而固定更多 Cyte 分子,同时又可以实现 Cyte 的直接氧化还原。

图 3B 是在不同扫速下 ,GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE 在 0.1 mol/L PBS( pH 7.0) 中扫描的 CV 曲线。 随着扫速增加 ,氧化还原峰电流增大 同时峰电位也发生移动。在 0.05 ~ 0.5 V/s 内 ,峰电流与扫速成 正比 表明固定在电极表面的 Cyt c 的氧化还原过程主要是表面控制过程。

由各种修饰电极在 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>中的 Nyquist 图(图4A)可知,裸玻碳电极的阻抗  $R_{\rm et}$  约 为 90 Ω; 而固定 GH-CS 后,修饰电极的  $R_{\rm et}$  迅速减小至 15 Ω,这是由于 GH-CS 良好的导电性使得电荷 传输电阻减小,促进了电子传递。当修饰电极继续固定上 Fc-NH<sub>2</sub> 或者 Cyte 后  $R_{\rm et}$ 都较 GH-CS 修饰电 极大,这是由于 Fc-NH<sub>2</sub> 是一种带有苯环的有机分子,其导电性不佳,从而在一定程度上影响电荷传输, 而加入 Cyte 对电荷传输电阻影响很小。对于 GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE,其  $R_{\rm et}$  几乎为一条直线,也表 明 GH-CS ,Fc-NH<sub>2</sub> 和 Cyte 都已成功固定于电极表面,且三者协同下有利于电荷传输。

3.2 修饰电极对 NaNO<sub>2</sub> 的催化氧化

图 4B 是不同修饰电极在  $1 \times 10^{-4}$  mol/L NaNO<sub>2</sub> 溶液中的 CV 曲线。NaNO<sub>2</sub> 在裸玻碳电极上的氧化 峰在 0.85 V 附近,且峰电流很小。在 GH-CS 修饰电极上几乎无峰,但电容电流明显增大。在 GH-CS/ Fe-NH<sub>2</sub>/GCE 上有较大的氧化峰电流 同时峰电位负移至 0.65 V 附近。在 GH-CS/Cyte/GCE 上的峰电 位也位于 0.65 V 附近,但氧化峰电流增强,而在 GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE 上峰电流进一步增大,峰形 更明显。这说明,GH-CS 有助于 NaNO<sub>2</sub> 的电子传递,但对 NaNO<sub>2</sub> 的催化作用不大。Fe-NH<sub>2</sub> 作为良好的 电子媒介体,其自身的氧化还原可以加快体系的电子传递,对 NaNO<sub>2</sub> 有一定的催化作用。而 Cyte 在 NaNO<sub>2</sub> 氧化过程中也起到催化作用,传统基于 Cyte 的传感器,通常可以用于检测与过氧化氢相关的分 析物以及 NaNO<sub>3</sub> 相关机理如下<sup>[10]</sup>:



图 3 (A)(a) 裸玻碳电极,(b) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/GCE,(c) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE 在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线 扫速 50 mV/s. (B) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE 在 0.1 mol/L PBS(pH 7.0) 中不 同扫速下的循环伏安曲线 扫速 50 ~ 500 mV/s

Fig. 3 (A) CVs of (a) bare GC electrode , (b)  $GH-CS/Fc-NH_2/GCE$  , (c)  $GH-CS/Fc-NH_2/Cytc/GCE$  in 0.1 mol/L PBS( pH 7.0) solution at the scan rate of 50 mV/s. (B) CVs of  $GH-CS/Fc-NH_2/Cytc/GCE$  at different scan rates (50 ~ 500 mV/s from a-h) in 0.1 mol/L PBS( pH 7.0)



图 4 (A) 修饰电极在含 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的  $2 \times 10^{-3}$  mol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)  $_6$ /K<sub>4</sub>Fe(CN)  $_6$  中的 Nyquist 图。条件: pH=7; 振幅  $\rho$ . 005; 电位  $\rho$ . 18 V. (B) (a) GCE, (b) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/GCE, (c) GH-CS/GCE, (d) GH-CS/ Cyte/GCE (*E*) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE 在  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的 NaNO<sub>2</sub> 中的循环伏安曲线。条件: pH=7; 电位 范围-0.7 ~ 0.3 V 扫速(a ~ b) 50 mV/s.

Fig. 4 (A) Nyquist plots of EIS for modified electrodes in  $2 \times 10^{-3}$  mol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> containing 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. pH = 7, the amplitude: 0.005, the potential: 0.18 V. (B) CVs of (a) bare GCE, (b) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/GCE and (c) GH-CS /GCE, (d) GH-CS/Cytc/GCE (E) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE in  $1 \times 10^{-4}$  mol/L NaNO<sub>2</sub> in pH = 7.0 between -0.7 ~ 0.3 V at scan rate of 50 mV/s.

$$Fe^{2+}-Cytc \longrightarrow Fe^{3+}-Cytc + e^{-}$$

$$Fe^{3+}-Cytc \longrightarrow [Fe^{4+}-Cytc] + 2e^{-}$$

$$[Fe^{4+}-Cytc] \cdot NO_{2}^{-}+H_{2}O \longrightarrow Fe^{2+}-Cytc + NO_{3}^{-}+2H^{+}$$

这里 Cyte 中的 Fe<sup>2+</sup>在较低的电位下氧化成 Fe<sup>3+</sup>的 Cyte ,在较高电位下继续氧化成高铁自由基 ,而 此状态有很高的活性 ,可以将 NO<sub>2</sub> 氧化成 NO<sub>3</sub> 。加入 Fe-NH<sub>2</sub> 后 ,二茂铁衍生物一方面有利于电子的传 递并加快 Cyte 的催化反应 ,另一方面其自身在 0.4 V 左右氧化也可以催化 NO<sup>-</sup> 氧化成 NO<sub>3</sub> 。因此 ,在 Cyte 和 Fe-NH<sub>2</sub> 的协同作用下 ,NO<sub>2</sub> 在 GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub> /Cyte/GCE 上的氧化峰电流最大。

由图 5 可知,当 pH=7(图 5A),GH 与 Fc-NH<sub>2</sub>的质量比为 5:1(图 5B),GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>复合物的体 积为 5 μL(图 5C)时,NaNO<sub>2</sub>的氧化峰电流最高。图 5D 是在最优化条件下,GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc 修饰 电极在不同浓度的 NaNO<sub>2</sub>存在下的 CV 曲线。随着 NaNO<sub>2</sub>浓度增加,氧化峰电流逐渐增大,表明此修 饰电极可用于 NaNO<sub>2</sub> 的检测。计时安培法是常用于获得分析物检测线性范围的方法,因此对检测电位 也进行了优化,发现当检测电位为 0.7 V 时,响应电流最大,因此计时安培法中采用电位为 0.7 V。

在最优条件下,在搅拌的 PBS 中不断加入如图 6A 所示浓度的 NaNO<sub>2</sub> 溶液时,修饰电极对 NaNO<sub>2</sub> 的响应非常快,且响应电流随浓度明显增大,在5s 内基本达到稳态电流。在此条件下,得到的浓度校正曲线如图 6B 所示,由此可知,在检测条件下,可得到两条直线:当 NaNO<sub>2</sub> 浓度在 0.1×10<sup>-6</sup> ~ 5.2×10<sup>-6</sup> mol/L 和 5.2×10<sup>-6</sup> ~ 150 ×10<sup>-6</sup> mol/L 时,峰电流和浓度呈良好的线性关系,线性相关系数分别为 0.992 和 0.996。传感器的检测范围达  $1 \times 10^{-7} ~ 1.5 \times 10^{-4}$  mol/L,根据 3 倍信噪比计算出检测限为  $4 \times 10^{-8}$  mol/L,比文献报道基于酶传感检测亚硝酸的传感器的检测限 50 nmol/L<sup>[19]</sup>或 100 nmol/L<sup>[20]</sup>更优。因此,该传感器有望用于实际样品中 NaNO<sub>2</sub> 的灵敏检测。



图 5 (A) pH,(B) GH-CS 与 Fc-NH<sub>2</sub> 的比例,(C) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub> 的体积对 NaNO<sub>2</sub> 检测的影 响;(D) GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE 在不同浓度的 NaNO<sub>2</sub>(0,0.05,0.1 和 0.2 mmoL/L) 溶液中的循环伏安 图 扫描范围-0.2~1.1 V 扫速 50 mV/s

Fig. 5 Effect of (A) pH value (2,4,4,6,8,10, from a to f), (B) ratio of GH-CS to  $Fc-NH_2$ (4,6,8,10, 20,30, from a to f), (C) volume of GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub> composite on the current response (2,4,5,6,8,10 mL, from a to f), inset: peak currents *vs* (A) pH, (B) ratio of GH-CS to Fc-NH<sub>2</sub>, (C) volumes of GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub> composite. (D) CVs of GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE in different concentrations of NaNO<sub>2</sub> (0, 0.05, 0.1, 0.2 mmo/L, from a to d) at scan rate of 50mV/s from 0.2 V to 1.1 V

考察了电极的稳定性和重现性,通过 5 次独立的实验发现,测定标准偏差小于 3.5%,表明其重现 性良好。同时 将电极制备好保存在 4 <sup>°</sup>C 的冰箱中,1 周后响应约为原来的 96%,3 周后电流响应约是 原来的 93%,说明此修饰电极具有良好的稳定性。在  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L NaNO}_2$  溶液中加入  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  的 K<sup>+</sup> Na<sup>+</sup> Mg<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup> Zn<sup>2+</sup> F<sup>-</sup> Cl<sup>-</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 均没有干扰。此外,100 倍的多巴胺 和 200 倍的抗坏血酸亦无干扰。

将制备的修饰电极用于实际样品中 NaNO<sub>2</sub> 的检测。实验中葡萄汁样品经过滤稀释与 PBS 溶液混 合后采用标准加入法检测其中的 NaNO<sub>2</sub> 结果见表 1。回收率在 99.1% ~103.4% 之间 3 次测量的相 对标准偏差小于 3.8% 表明制备的修饰电极可以用于实际样品中 NaNO<sub>2</sub> 的检测。



图 6 GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub>/Cyte/GCE 在连续加入不同浓度的 NaNO<sub>2</sub> 时的 i+t 曲线 ,电位 0.7 V; (B) 氧化电流 与 NaNO<sub>2</sub> 浓度的关系曲线

Fig. 6 (A) Typical current-time curve of  $GH-CS/Fc-NH_2/Cytc/GCE$  upon the successive addition of different concentrations of  $NaNO_2$  into gently stirred 0.1 mol/L PBS. Applied potential 0.7 V. (B) Linear relationship between the ampermetric current response and concentrations of  $NaNO_2$ 

综上所述 本实验利用设计 合成的新型的二茂铁乙炔衍生 物与石墨烯结合 ,制备稳定的纳 米复合物(GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>),该 化合物成功作为 Cyte 的固定基 底 不但固定了大量 Cyte ,同时 可实现其与电极表面的直接电

| 表1    | 葡 | 萄汁饮料中的 $\operatorname{NaNO}_2$ 的测定            |
|-------|---|-----------------------------------------------|
| Table | 1 | Determination of NaNO2 in grape juice samples |

| 2 0 1 5 1    |                             |                           |                                             |                 |                            |  |  |  |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------------|-----------------|----------------------------|--|--|--|
| 样品<br>Sample | 原始值<br>Detected<br>(μmol/L) | 加入量<br>Added<br>( µmol/L) | 测得值<br>Founded <sup>a</sup><br>(µmol/L,n=3) | RSD<br>(%, n=3) | 回收率<br>Recovery<br>(%,n=3) |  |  |  |
| Sample 1     | 3.15                        | 5.0                       | 8.18                                        | 2.1             | 100.4                      |  |  |  |
| Sample 2     | 3.32                        | 15.0                      | 18.95                                       | 3.8             | 103.4                      |  |  |  |
| Sample 3     | 3.45                        | 35.0                      | 38.10                                       | 3.2             | 99.1                       |  |  |  |
|              |                             |                           |                                             |                 |                            |  |  |  |

子传递。实验表明,GH-CS/Fe-NH<sub>2</sub>/Cyte 修饰电极对 NaNO<sub>2</sub> 有良好的电催化作用,检测线性范围宽,检测限低。制备的修饰电极简单,利用了二茂铁和 Cyte 对 NaNO<sub>2</sub> 的催化作用,二者的协同作用使电化学催化检测 NaNO<sub>2</sub> 的效果最优。因此,结合碳纳米材料与电子媒介体用于固定蛋白质或其它生物分子,有望用于其它电化学/生物传感领域的放大检测。

#### References

- 1 Cammack R , Joannou C L , Cui X , Martinez C , Maraj S R , Hughes M N. Biochim. Bioph. Acta , 1999 , 1411: 475-488
- 2 Ximenes M I N , Rath S , Reyes F G R. Talanta , 2000 , 51: 49-58
- 3 Cui L , Zhu J , Meng X , Yin H , Pan X , Ai S. Sensors and Actuators B , 2012 , 161(1): 641-647
- 4 Pagliano E , Meija J , Mester Z. Anal. Chim. Acta , 2014 , 824: 36-41
- 5 Dunham A J , Barkley R M , Sievers R E. Anal. Chem. , 1995 , 67(1): 220-224
- 6 Nilsson K F., Lundgren M, Agvald P, Adding L C, Linnarsson D, Gustafsson L E. Biochem. Pharmacol., 2011, 82(3): 248-259
- 7 Xiao N , Yu C. Anal. Chem. , 2011 , 82(9): 3659-3663
- 8 Qin C , Wang W , Chen C , Bu L , Wang T , Su X , Xie Q , Yao S. Sensors and Actuators B , 2013 , 181: 375-381
- 9 Li X R , Kong F Y , Liu J , Liang T M , Xu J J , Chen H Y. Advanced Functional Material , 2012 , 22: 1981–1986
- 10 Welch C M , Hyde M E , Banks C E , Compton R G. Anal. Sci. , 2005 , 21: 1421-1430
- 11 Cui L , Pu T , Liu Y , He X. Electrochim. Acta , 2013 , 88: 559-564
- 12 Geim A K, Novoselov K S. Nature Material , 2007, 6: 183-191
- 13 Ding S , Wei W , Zhao G. Electrochem. Commun. , 2007 , 9: 2202-2206
- 14 Shie J , Yogeswaran U , Chen S. Talanta , 2008 , 74: 1659-1669
- 15 Koh W C A , Rahman M A , Choe E S , Lee D K , Shim Y B. Biosens. Bioelectron. ,2008 , 23: 1374-1381
- 16 Liu M , Wang L , Deng J , Chen Q , Li Y , Zhang Y , Li H , Yao S. Analyst , 2012 , 137(19): 4577-4583
- 17 Hummers W S , Offeman R E. J. Am. Chem. Soc. , 1958 , 80: 1339-1339

- 18 Dreyse P , Isaacs M , Calfumán K , Cáceres C , Aliaga A , Aguirre M J , Villagra D. Electrochim. Acta , 2011 , 56(14): 5230-5237
- 19 Serraa A S , Jorgea S R , Silveira C M , Mouraa J J G , Jubeteb E , Ochotecob E , Cabãnerob G , Grandeb H , Almeidaa M G. Anal. Chim. Acta , 2011 , 693: 41-46
- 20 Madasamy T, Pandiaraj M, Balamurugan M, Bhargava K, KumarSethy N, Karunakaran C. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 52: 209–215

# Fabrication of New GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc Modified Electrode and Its Application in Detection of Nitrite

HUANG Na, LIU Mei-Ling<sup>\*</sup>, DENG Jian-Hui, WANG Lin-Ping, ZHANG You-Yu<sup>\*</sup>, YAO Shou-Zhuo (Key Laboratory of Chemical Biology & Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract** Highly conjugated linear molecular wires are one of the basic elements for constructing molecular electronic devices. Among these conjugated compounds , ferrocene-terminated compounds as well as their derivatives have been widely studied because of their ideal electrochemical activity. Based on these , a new ferrocene-terminated phenylethynyaniline ( $Fc-NH_2$ ) was synthesized by Sonogashira cross coupling reaction. The structure of the target compound was identified by infrared (IR) , nuclear magnetic resonance (NMR) , mass spectra (MS) and cyclic voltammetry (CV). Combined the graphene-chitosan (GH-CS) and Fc-NH<sub>2</sub> , a new composite of GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub> was prepared and then used for immobilization of Cytc to prepare the GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc/GCE. It was found from the CV result that a pair of peaks near -0. 2 V appeared which can be attributed to Cytc. The GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub>/Cytc modified GCE showed good catalysis towards NaNO<sub>2</sub> , and good linear relationship was found in the range of  $1 \times 10^{-7} - 1.5 \times 10^{-4}$  mol/L and the determination limit was bellow  $4 \times 10^{-8}$  mol/L. Therefore , cytochrome c (Cytc) can be immobilized on the GH-CS/Fc-NH<sub>2</sub> and the direct electron transfer can be realized between the electrode and solution and shows good prospect for detection of NaNO<sub>2</sub>.

**Keywords** Ferrocene-terminated phenylethynyamine; Cytochrome C; Graphene , Sodium nitrite; Electrocatalysis

(Received 26 August 2014; accepted 25 December 2014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21305042, 21275051, 21375037), the Science and Technology Department of Hunan Province (Nos. 14JJ4030, 13JJ2020), and the Aid Program for Science and Technology Innovative Research Team in Higher Educational Institutions of Hunan Province. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics (2013013) and the Aid Program for Science and Technology Innovative Research Team in Higher Educational Institutions of Hunan Province.