

石墨烯-聚多巴胺纳米复合材料制备过氧化氢生物传感器

郑龙珍* 李引弟 熊乐艳 刘文 刘强 韩奎 杨绍明 夏坚

(华东交通大学化学化工系,南昌 330013)

摘要 通过合成具有仿生功能的石墨烯-聚多巴胺纳米材料,将其与辣根过氧化物酶组装到电极表面,以对苯二酚为电子媒介体制备 H_2O_2 传感器。此修饰电极对 H_2O_2 具有良好的电催化活性,检测的线性范围为 $5.0 \times 10^{-7} \sim 3.3 \times 10^{-4}$ mol/L; 线性回归方程为 $Y = 29.69x + 0.04577$, 相关系数为 $R = 0.9995$; 检出限为 3.7×10^{-7} mol/L ($S/N = 3$)。

关键词 聚多巴胺; 石墨烯; 对苯二酚; 辣根过氧化物酶; 过氧化氢

1 引言

纳米材料由于具有良好的导电性及生物相容性,已经被广泛应用于生物传感器的制备中^[1-4]。2004年,Geim等首次发现二维晶体石墨烯(GR)的存在。由于其独特的电学、光学及催化性能,被广泛应用于生物传感器及电催化领域^[5-6]。结构完整的石墨烯是由不含任何不稳定键的苯六元环组合而成的二维晶体,表面呈惰性使其具较高的化学稳定性。与其它溶剂的相互作用较弱,同时石墨烯的片与片之间有较强的范德华力,容易聚集,这给石墨烯的研究和应用造成了极大的困难。因此,对其进行有效的功能化修饰非常重要^[7-9]。

聚多巴胺是贝壳、蚌等生物分泌的粘性蛋白的主要成分,具有极强的粘附性,能稳定地固定在各种基质上^[10,11]。Lee等^[12]以多巴胺(DA)为单体,通过简单的自聚合反应在各种基质表面形成了仿生聚多巴胺膜(PDA),该聚多巴胺膜不仅具有良好的粘附性,同时保持了原有单体良好的生物相容性。聚多巴胺薄膜被广泛地应用于对Au和Pt纳米颗粒、碳纳米管、石墨烯氧化物的表面修饰^[13-15]。

多巴胺特有的还原性可以作为氧化石墨烯(GO)的还原剂。聚多巴胺良好的粘附性和生物相容性又可以作为石墨烯的保护剂。本研究利用聚多巴胺膜对基底极强的结合力及其良好的生物活性,通过一步反应法合成具有仿生功能的石墨烯-聚多巴胺(GR-PDA)纳米复合材料,并将其引入过氧化氢传感器的制备中,实现了对过氧化氢的快速、灵敏检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Chi660a 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司); Lambda 35 紫外光谱仪(PerkinElmer公司); 78-2 双向磁力加热搅拌器(金坛市新航仪器厂); SK1200H 超声波清洗器(上海科学超声仪器有限公司); AJ-IIIa 原子力显微镜(上海爱建纳米科技发展有限公司)。

盐酸多巴胺(CP阿拉丁试剂); 辣根过氧化物酶(≥ 250 U/mg 上海三杰生物技术有限公司); 对苯二酚(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); H_2O_2 (分析纯,汕头西陇化工有限公司); 石墨粉(汕头西陇化工有限公司)。

2.2 GR-PDA 仿生材料的制备

通过改进的 Hummers 方法^[16-18]制备 GO。

GR-PDA 仿生材料的制备^[13]: 10 mg GO 加入到 20 mL, 磷酸盐缓冲液(pH = 8.0)中, 搅拌下通 N_2

2011-03-31 收稿; 2011-06-21 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 20965003, 21163007, 21165009), 江西省科技支撑计划(No. 2010BGA01800), 教育部科学技术研究重点项目(No. 210112)和教育部留学回国人员科研启动基金资助

* E-mail: zhenglongzhen@tsinghua.org.cn

10 min 加入 5 mg 盐酸多巴胺, 冰水浴下超声 10 min, 60 °C 下强烈搅拌 24 h, 反应过程用紫外可见光谱监测。冷却后离心, 反应混合物用蒸馏水洗涤 3 次, 重新分散到 20 mL 蒸馏水中, 得到 0.5 g/L 黑色悬浮液。

2.3 HRP 酶的固定

取上述 0.5 g/L GR-PDA 悬浮液 120 μ L, 与 40 μ L 2 g/L HRP 混合, 超声 10 min, 在冰箱 4 °C 里放置 12 h, 使其达到平衡状态。

2.4 修饰电极的制备

电极预处理: 玻碳电极分别用 0.3 和 0.05 μ m 的 Al_2O_3 粉抛光, 依次用无水乙醇和蒸馏水超声洗涤 10 min, 氮气吹干待用。分别取 5 μ L 的 HRP/GR-PDA, HRP/GO, HRP 溶液, 滴加到电极表面, 于 4 °C 冰箱中过夜自然干燥, 然后取 5 μ L 0.1% Nafion 溶液滴加到电极上, 置于 4 °C 冰箱中干燥, 即可得到所需的生物传感器。

2.5 实验方法

采用三电极体系, 以 GC 或修饰 GC 电极为工作电极, 铂电极为对电极, $Ag/AgCl$ (饱和 KCl) 电极为参比电极。在 0.5 mol/L KCl + 2 mmol/L $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 溶液中进行交流阻抗 (IMP) 扫描, 采用循环伏安 (CV) 和电流-时间法 ($i-t$) 在含有 0.2 mmol/L 对苯二酚 (HQ) 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲底液 (PBS, pH = 7.0) 中研究传感器的催化性能及其稳定性。

3 结果与讨论

3.1 紫外可见光谱

采用紫外-可见吸收光谱对多巴胺还原氧化石墨烯过程进行监测, 结果如图 1 所示: 氧化石墨烯的吸收峰位于 230 和 300 nm 处。随着还原反应的进行, 氧化石墨烯的吸收峰消失, 在 263 nm 处出现了一个新的吸收峰, 可归为石墨烯的吸收峰^[6, 13]。随着反应时间的延长, 吸光度值逐渐增大, 且溶液逐渐由浑浊变得澄清, 说明多巴胺与氧化石墨烯发生反应; 在将氧化石墨烯还原成石墨烯的同时, 氧化石墨烯作为氧化剂又将多巴胺氧化聚合生成聚多巴胺, 得到了 GR-PDA 纳米复合材料。在石墨烯表面沉积的聚多巴胺由于其表面大量的亲水基团又极大地提高了石墨烯的水溶性。

3.2 原子力显微镜表征

对合成的 GR-PDA 纳米复合材料进行了 AFM 表征。如图 2 所示, GO 片层厚度为 0.60 nm; GO 被

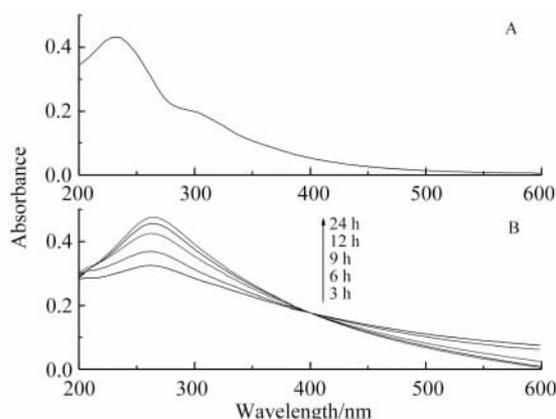


图 1 GO (A) 和反应时间分别为 3, 6, 9, 12 和 24 h 的 GR-PDA (B) 的紫外可见吸收光谱

Fig. 1 UV-vis absorption spectra of graphene oxide (GO) (A) and graphene-polydopamine (GR-PDA) (B)

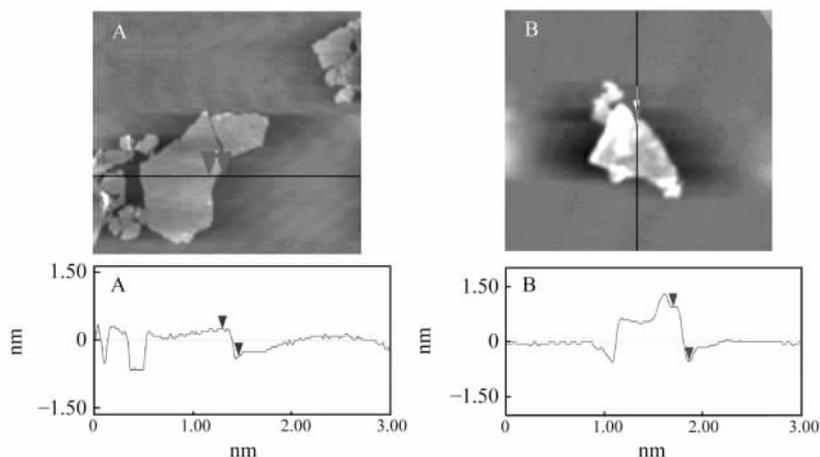


图 2 GO (A) 和 GR-PDA (B) 在 AFM 下的片层结构形貌图

Fig. 2 AFM images of GO (A) and GR-PDA (B) on mica

多巴胺还原生成 GR,同时多巴胺被 GO 氧化聚合生成 PDA,得到的 GR-PDA 片层厚度增大为 1.46 nm,表明聚多巴胺薄膜均匀地覆盖在石墨烯的表面。

3.3 交流阻抗图

图3是几种修饰电极在 0.5 mol/L KCl + 2 mmol/L $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 溶液中的交流阻抗图。根据 Nyquist 图中的半圆直径可以求出电极的电子传递电阻^[19]。由图3可知,裸玻碳电极阻抗为 40 Ω ;当在玻碳电极表面修饰一层 HRP/Nafion 膜后,电极的阻抗增大到 2700 Ω ;当用 GO/HRP/Nafion 膜修饰电极时,电极的阻抗减小到 1200 Ω ;当用 GR-PDA/HRP/Nafion 膜修饰电极时,电极的阻抗减小到 300 Ω 。说明聚多巴胺仿生功能化的石墨烯具有良好的导电性,能提高电子的传递速率,可应用于传感器的构建中。

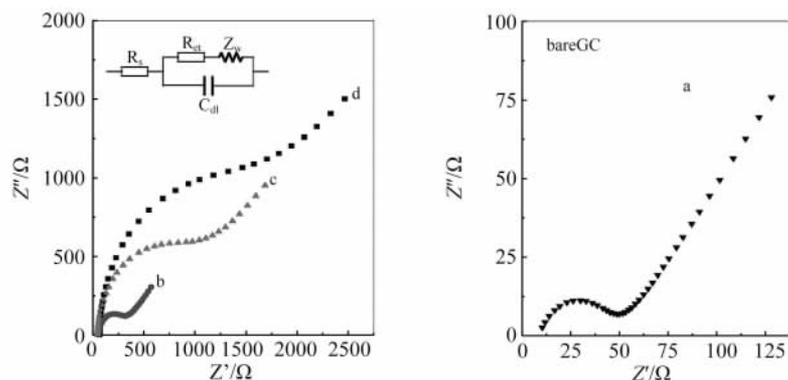


图3 不同修饰电极在 0.5 mol/L KCl + 2 mmol/L $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 溶液中的交流阻抗图

Fig.3 Nyquist plots of bare GCE (a), GCE/GR-PDA/HRP/Nafion (b), GCE/GO/HRP/Nafion (c), GCE/HRP/Nafion (d) electrodes in 0.5 mol/L KCl + 2 mmol/L $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ aqueous solution

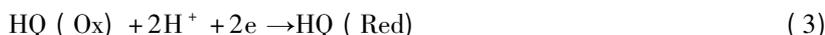
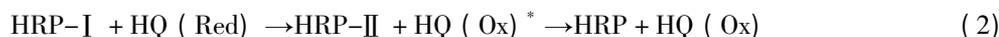
进一步考察 GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 电极在不同扫速下的电化学行为,研究了其峰电流与扫速关系,发现电流与扫速的平方根呈线性关系,表明修饰电极反应受表面扩散控制。

3.4 循环伏安法表征

图4A比较了 H_2O_2 在 GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 和 GCE/HRP/Nafion 电极上的循环伏安曲线,发现使用石墨烯修饰的电极对 H_2O_2 的电催化还原峰电流明显大于未使用石墨烯修饰的电极,且还原峰电位正移了 85 mV,表明该石墨烯修饰电极对 H_2O_2 有很强的电催化活性,并且可以有效减少其它物质的干扰。图4B为 GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 电极在 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L H_2O_2 溶液中的循环伏安图。

3.5 电极过程的机理

以 HQ 为媒介体的过氧化氢生物传感器的催化过程原理如下:



HQ(Ox) 被还原为 HQ(Red), 从而形成还原电流。

石墨烯表面存在大量类似于断层的结构缺陷,能提供较多的反应活性位点,同时由于其优良的导电性能,又能促进酶活性中心与电极间的电子转移过程。因此聚多巴胺-石墨烯复合材料既具有石墨烯的优良的电催化性能,又表现出良好的生物相容性。其对过氧化氢表现出良好的电催化活性,使过氧化氢能够在较正的电位下发生电催化还原反应。

3.6 不同修饰电极的电化学性质比较

图5比较了3种不同修饰电极对 H_2O_2 的 $i-t$ 响应曲线,发现聚多巴胺仿生功能化的石墨烯修饰电极对 H_2O_2 的响应电流明显增大。石墨烯由于其巨大的比表面积及优良的导电性能能够为 HRP 活性中

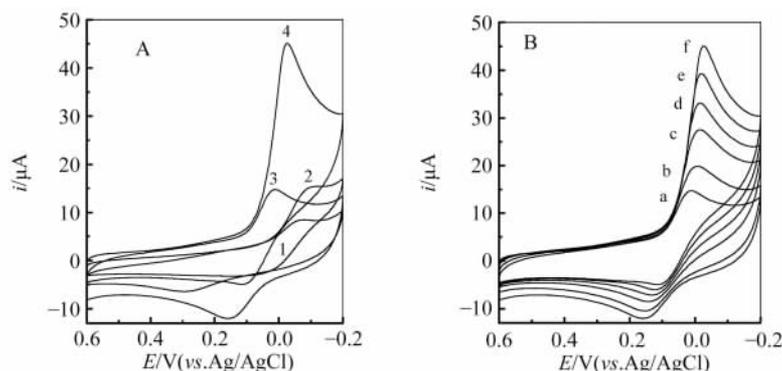


图 4 (A) GCE/HRP/Nafion 电极(线 1 和线 2)与 GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 电极(线 3 和线 4)在不含 H_2O_2 (线 1 和线 3)和含有 $1.0 \text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ 的 PBS 溶液(线 2 和线 4)中的 CV 曲线; (B) GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 电极在含有 0 (a), 0.2 (b), 0.4 (c), 0.6 (d), 0.8 (e), 1.0 (f) $\text{mmol/L H}_2\text{O}_2$ 的 PBS 溶液中的 CV 曲线

Fig. 4 (A) CVs of GCE/HRP/Nafion (line 1 and line 2) and GCE/GR-PDA/HRP/Nafion (line 3 and line 4) in the absence (line 1 and line 3) and presence (line 2 and line 4) of $1.0 \text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ in 0.1 mol/L PBS solution. (B) CVs of GCE/GR-PDA/HRP/Nafion in 0.1 mol/L PBS solutions containing 0 (a), 0.2 (b), 0.4 (c), 0.6 (d), 0.8 (e), 1.0 (f) $\text{mmol/L H}_2\text{O}_2$. Scan rate, 100 mV/s , the substrate solution containing $0.2 \text{ mmol/L hydroquinone (HQ)}$

心与电极表面的电子传递提供快速通道,同时由于聚多巴胺膜的生物相容性能有效保护 HRP 的生物活性。因此,GR-PDA 复合材料能极大地促进酶活性中心与电极间的电子传递速率,对 H_2O_2 有很强的电催化活性,提高检测的灵敏度。

3.7 $i-t$ 曲线法检测 H_2O_2 的浓度

在 0 V 恒定电位下,连续加入不同浓度的 H_2O_2 ,考察 GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 修饰电极对 H_2O_2 的电流响应。如图 6 所示,传感器对 H_2O_2 有快速灵敏的响应,响应电流在 5 s 内达到稳态电流的 95% 。在 $5.0 \times 10^{-7} \sim 3.3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内,响应电流与 H_2O_2 浓度呈线性关系,线性回归方程为 $Y = 29.69x + 0.04577$,灵敏度为 $0.42 \text{ A} (\text{mol/L})^{-1} \text{ cm}^{-2}$, $R = 0.9995$,检出限 ($S/N = 3$) 为 $3.7 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。

3.8 传感器抗干扰性研究

在最佳的实验条件下,且 H_2O_2 浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 时,加入 4 倍浓度的抗坏血酸、L-半胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸对实验结果均不产生明显干扰,说明此传感器对 H_2O_2 具有良好的选择性。

3.9 传感器的重现性和稳定性

采用此电极平行测定 $1.0 \text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ 10 次,相对标准偏差为 2.8% 。将修饰电极置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中考察其稳定性,每隔 7 d 测定一次, 28 d 后仍保留响应电流的 70% 左右,表明此电极具有较好的稳定性。

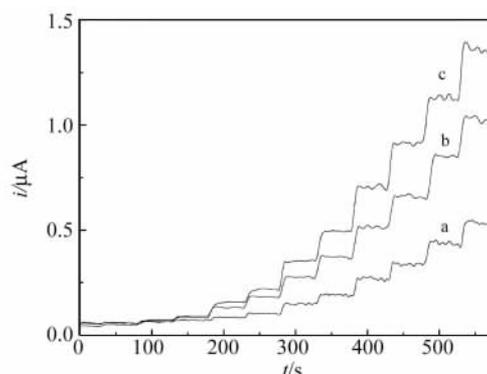


图 5 GCE/HRP/Nafion (a), GCE/GO/HRP/Nafion (b), GCE/GR-PDA/HRP/Nafion (c) 对 H_2O_2 的 $i-t$ 响应曲线,工作电位: 0 V

Fig. 5 Chronoamperometric responses for GCE/HRP/Nafion (a), GCE/GO/HRP/Nafion (b), GCE/GR-PDA/HRP/Nafion (c) upon subsequent additions of H_2O_2 in PBS solution. Potential applied: 0 V

References

- 1 WANG Mei-Fang, ZHANG Wei, FANG Bin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, *38*(1): 125 ~ 128

- 汪美芳, 张伟, 方宾. 分析化学, **2010**, 38(1): 125~128
- 2 Willner I, Willner B, Katz E. *Bioelectrochemistry*, **2007**, 70(1): 2~11
- 3 Pandey P, Datta M, Malhotra B D. *Anal. Lett.*, **2008**, 41(2): 159~209
- 4 Valentini F, Palleschi G. *Anal. Lett.*, **2008**, 41(4): 479~520
- 5 Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, Jiang D, Zhang Y, Dubonos S V, Grigorieva I V, Firsov A A. *Science*, **2004**, 306(5696): 666~669
- 6 Shan C S, Yang H F, Han D X, Zhang Q X, Ivaska A, Niu L. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25(5): 1070~1074
- 7 HUYao-Juan, JIN Juan, ZHANG Hui, WU Ping, CAI Chen-Xin. *Acta Phys. Chim. Sin.*, **2010**, 26(8): 2073~2086
- 胡耀娟, 金娟, 张卉, 吴萍, 蔡称心. 物理化学学报, **2010**, 26(8): 2073~2086
- 8 Wang G. X, Shen X P, Wang B, Yao J, Park J. *Carbon*, **2009**, 47(5): 1359~1364
- 9 Zhu C Z, Guo S J, Fang Y X, Dong S J. *ACS Nano*, **2010**, 4(4): 2429~2437
- 10 Lee H, Rho J, Messersmith P B. *Adv. Mater.*, **2009**, 21(4): 431~434
- 11 Dalsin J L, Hu B H, Lee B P, Messersmith P B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(14): 4253~4258
- 12 Lee H, Dellatore S M, Miller W M, Messersmith P B. *Science*, **2007**, 318(5489): 426~430
- 13 Fu Y C, Li P H, Xie Q J, Xu X H, Lei L H, Chen C, Zou C, Deng W F, Yao S Z. *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, 19(11): 1784~1791
- 14 Fei B, Qian B T, Yang Z Y, Wang R H, Liu W C, Mak C L, Xin J H. *Carbon*, **2008**, 46(13): 1795~1797
- 15 Xu L Q, Yang W J, Neoh K G, Kang E T, Fu G D. *Macromolecules*, **2010**, 43(20): 8336~8339
- 16 Tung V C, Allen M J, Yang Y, Kaner R B. *Nat. Nanotech.*, **2009**, 4(1): 25~29
- 17 Hummers W, Offeman R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80(6): 1339
- 18 Kovtyukhova N I, Ollivier P J, Martin B R, Mallouk T E, Chizhik S A, Buzaneva E V, Gorchinskiy A D. *Chem. Mater.*, **1999**, 11(3): 771~778
- 19 Zheng L Z, Yao X, Li J H. *Curr. Anal. Chem.*, **2006**, 2(3): 279~296

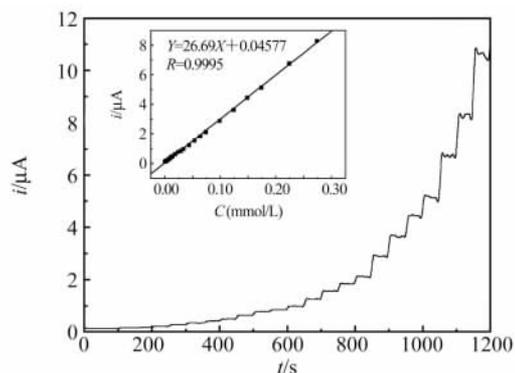


图6 GCE/GR-PDA/HRP/Nafion 修饰电极对 H_2O_2 的 $i-t$ 响应曲线, 工作电位: 0 V。

Fig.6 Chronoamperometric responses to H_2O_2 additions on GCE/GR-PDA/HRP/Nafion. Potential applied: 0 V

Preparation of H_2O_2 Biosensor Based on Graphene-polydopamine Nanomaterials

ZHENG Long-Zhen*, LI Yin-Di, XIONG Le-Yan, LIU Wen, LIU Qiang, HAN Kui, YANG Shao-Ming, XIA Jian
(Department of Chemistry and Chemical Engineering, East China Jiao Tong University, Nanchang 330013)

Abstract A novel graphene-polydopamine nanomaterial with biomimetic functions was synthesized. The graphene-polydopamine nanomaterial was applied in the fabrication of H_2O_2 biosensors by using hydroquinone as electron mediator. The modified electrode exhibited good electrocatalytic activity to H_2O_2 . The linear range was from 5.0×10^{-7} to 3.3×10^{-4} mol/L with a detection limit of 3.7×10^{-7} mol/L ($S/N=3$) and the linear correlation coefficient was 0.9995.

Keywords Polydopamine; Graphene; Hydroquinone; Horseradish peroxidase; Hydrogen peroxide

(Received 31 March 2011; accepted 21 June 2011)