评述

功能化石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用研究

张玲^{①②}, 张谦^{③*}^① 沈阳师范大学化学化工学院, 沈阳 110034^② 沈阳师范大学能源与环境催化研究所, 沈阳 110034^③ 辽宁大学化学学院, 沈阳 110036

*通讯作者, E-mail: zhangqianlnu@gmail.com

收稿日期: 2015-11-15; 接受日期: 2015-11-27; 网络版发表日期: 2016-06-07

国家自然科学基金(编号: 21203126)、辽宁省高等学校优秀人才支持计划(编号: LJQ2013112)、辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(编号: LJQ2014003)资助项目

摘要 石墨烯因具有大的比表面积、完整的 π - π 共轭结构及良好的生物相容性和优良的导电性能等特性, 受到电化学研究者们的广泛关注. 然而, 在应用过程中, 本征态石墨烯存在水溶性差、与介质的相互作用较弱、易团聚等问题. 通过使用非共价、共价、氮掺杂修饰的方法对石墨烯进行功能化, 较好地改善了这一问题, 扩展了石墨烯在电化学领域的应用. 自 2009 年首次将功能化石墨烯应用于第三代电化学生物传感器的研究以来, 近几年相关研究呈增多的态势. 本文系统总结了自 2009 年以来, 功能化石墨烯作为新型电极修饰材料在第三代电化学生物传感器研究中的相关工作, 并阐述了其在该领域发展中遇到的问题.

关键词 石墨烯, 功能化, 氧化还原蛋白质, 第三代电化学生物传感器

1 引言

石墨烯(graphene, Gr)的命名来自英文单词 graphite(石墨)和词缀 ene (烯类结尾)的组合. 石墨烯, 是碳的同素异形体之一. 依照国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)定义, graphene 为单层石墨烯, 是指由一层以苯环结构(即六角形蜂巢结构)周期性紧密堆积的碳原子构成的一种二维碳材料^[1-3]. 其中, 每个碳原子均以 sp^2 杂化与相邻碳原子形成共价键, 并贡献剩余一个 p 轨道上的电子形成离域 π 键, 其理论

模型与电镜表征如图 1 所示. 石墨烯的这种晶格结构, 使得碳原子之间的连接非常柔韧且利于电子传导, 与其他碳材料相比, 石墨烯具有优异的力学特征和无可比拟的导电性能、独特的能带结构和优良的热学特征. 自 2004 年 Geim 和 Novoselov 首次发现二维石墨烯晶体以来, 石墨烯迅速成为各科研领域研究的热点材料. 其中, 石墨烯的高导电率、大比表面积、良好的生物相容性和低成本等优点受到电化学研究工作者的极大关注^[4-9]. 例如, 在 0.1 M 的 pH 7 PBS 缓冲溶液中对石墨烯修饰电极的电化

引用格式: 张玲, 张谦. 功能化石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用研究. 中国科学: 化学, 2016, 46: 745-758
Zhang L, Zhang Q. The applications of functionalized graphene in the third generation biosensor. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 745-758, doi: 10.1360/N032015-00223

图 1 (a) 石墨烯平面模型; (b) 石墨烯的透射电子显微镜(TEM)表征; (c) 石墨烯扫描电子显微镜(SEM)表征(图中石墨烯使用化学还原法制备)^[3]

学性质进行测试, 并与常规的石墨电极、玻碳电极以及金刚石电极进行对比, 发现石墨烯修饰电极具有更小的电阻和较宽的电位窗^[5-7]。此外, 研究工作者还发现, 石墨烯修饰电极对酶的电子转移有非常好的促进作用, 且对 H_2O_2 、 O_2 、 NADH 及 TNT 等电活性小分子具有良好的催化性能^[8,10]。

第三代电化学生物传感器是基于氧化还原蛋白质的直接电子转移开展起来的研究。该研究对探索生命体内大分子的电子传递过程, 了解生命体的能量转换和物质代谢具有重要的理论指导意义, 对研制电分析装置及生物燃料电池也具有一定的应用价值。根据氧化还原中心的不同, 氧化还原蛋白质可以分为两大类: 一类是以血红素为中心的蛋白质, 如血红蛋白(Hb)、肌红蛋白(Mb)、细胞色素 C (Cyt.c)、辣根过氧化物酶(HRP)、微过氧化物酶(MP-11)、过氧化氢酶(catalase)等; 一类是以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为中心的酶, 包括葡萄糖氧化酶(GOx), 肌氨酸氧化酶(SOX), 胆固醇氧化酶(ChOx)等。由于这些氧化还原蛋白质的电活性中心一般被疏水性的生物分子所包裹, 很难将酶的活性中心与外界电极连接起来, 因此电子迁移速率不高, 在传统电极表面难以探测其直接电化学。此外, 在氧化还原蛋白质的固载方面, 还存在其生物活性难以保持等问题。因此, 采用合适的固载材料、适当的方法固定氧化还原蛋白质, 使之在电极表面具有良好取向(氧化还原中心适当裸露但不致变性)有利于实现蛋白质与电极之间产生直接快速电子转移。石墨烯优良的导电性、大的比表面积、较好的生物相容性, 使电化学工作者认为将其应

用于第三代电化学生物传感器的研究是非常有前途的。例如, Alwarappan 等^[11]将石墨烯分散到二甲基甲酰胺(DMF)溶液中, 通过滴涂的方式制备了石墨烯修饰电极, 研究发现, 溶液中的 Cyt.c 在该电极表面具有明显的直接电子转移行为。他们对该行为的机理进行了分析, 并指出石墨烯的边缘缺陷能够促进 Cyt.c 与石墨烯电极之间的反应。利用氧化石墨烯在水溶液中优良的分散性, 通过制备氧化石墨烯修饰电极, 然后再电还原, 可以得到导电性提高的石墨烯修饰电极, 这种方法制备的酶修饰电极也能够有效促进酶的直接电子转移^[12-15]。

尽管石墨烯在促进氧化还原蛋白质的直接电子转移方面具有光明的前景, 然而, 石墨烯相互间存在较强的范德华作用力使其不能在溶剂中稳定分散, 与其他材料的相容性也不好, 容易再次层叠在一起难以打开, 这些问题严重影响了其在传感器应用方面的可操作性。针对这一难题, 科研人员利用石墨烯在制备过程中表面产生的缺陷和基团, 通过非共价、共价或掺杂等方法对石墨烯进行了修饰, 修饰基团的引入使石墨烯表面的某些性质发生改变, 变得更易操作, 稳定性更强, 即通过石墨烯的功能化, 有效扩展了石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用。

需要提及的是, 石墨烯的功能化对传感器性能的改善具有两面性: 一方面, 功能基团的引入极大地改善了石墨烯的分散性及其与其他组分的相容性, 为各种酶的固载提供了有效的接触面和多样的组合方式, 丰富了石墨烯基第三代电化学生物传感器的构建种类; 另一方面, 在制备功能化石墨烯的同时, 石墨烯的功能化极大地影响了本征态石墨烯的物理化学性质。例如, 利用共价修饰法制备的功能化石墨烯, 破坏了石墨烯的完美结构, 将结构中 C 的 sp^2 杂化变为 sp^3 杂化, 降低了石墨烯的导电能力等相关性能。因此, 在考察石墨烯基第三代电化学生物传感器性能的时候, 除了要考虑构筑方法对电极性能改善的作用, 同时, 也应该系统考虑功能化石墨烯的制备方法这一因素对传感器性能产生的影响。本文将 2009 年(功能化石墨烯首次被应用于第三代电化学生物传感器)以来的相关文献进行了总结, 在介绍石墨烯制备及功能化方法的基础上, 根据石墨烯功能化方法的不同(非共价修饰法、共价修饰法及杂原子掺杂法), 将石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用研究分为 3 方面进行阐述。

2 石墨烯的功能化及其在第三代电化学学生物传感器中的应用

2.1 石墨烯的制备

石墨烯的制备方法决定了石墨烯的品质(缺陷的多少). 石墨烯最初的制备方法是通过机械剥离的方式从高定向的热解石墨中进行分离而来的. 该方法的产量非常小, 仅适用于小范围的基础研究. 石墨烯在各领域应用的重要性催生了其大批量制备的必要性. 目前, 大批量制备石墨烯的方法主要可分为两大类, 即化学气相沉积法和石墨剥离法.

化学气相沉积法是指在高温下, 由烃类气体在 Ni 或 Cu 的表面生成碳化物, 然后冷却至室温制备石墨烯薄膜的方法. 该方法尽管可以实现石墨烯的批量生产, 但存在成本高、操作要求苛刻等缺点. 而且, 在制备过程中, 由于需要利用腐蚀剂去除金属基底, 因此易造成石墨烯的形态缺陷, 并出现石墨烯被部分残留腐蚀溶液中的金属离子污染等问题.

除了化学气相沉积法, 石墨剥离法也是大批量制备石墨烯的方法之一. 利用石墨剥离法制备石墨烯的手段众多, 如超声剥离法、热膨胀剥离法、还原氧化石墨烯法等. 通过文献查阅可知, 应用于第三代电化学生物传感器的石墨烯, 其制备方法主要采用后者, 即还原氧化石墨烯法. 该方法的具体途径是先制备氧化石墨烯, 再经强还原剂还原来获取石墨烯. 其中, 还原石墨烯法以基于 hummer 法的液相化学还原法最为经典. 该方法的优点是成本低、高效, 但也存在一定缺点, 即不易获得较为纯净的石墨烯, 常得到有缺陷晶格的石墨烯片层. 目前, 该方法被应用的范围最广, 它受到青睐的主要原因在于, 在制备石墨烯的过程中, 生成的中间产物——氧化石墨烯, 其表面含有羟基、羧基、环氧基等含氧官能团, 不仅有利于提高石墨烯材料在溶剂中的分散性, 而且以其为前驱体, 易于制备功能化的石墨烯^[16].

2.2 功能化石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用

非共价修饰、共价修饰及杂原子掺杂是石墨烯进行功能化的 3 种主要方式. 迄今为止, 已有多种功能化石墨烯应用于第三代电化学生物传感器的研究. 其中, 多以制备石墨烯与其他修饰物质(如有机小分子、聚合物、氧化物、碳纳米材料、金属纳米粒子等)

的杂化体系为主.

2.2.1 非共价修饰石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用

石墨烯的非共价修饰是指利用石墨烯与修饰分子之间的 π - π 堆积、疏水作用、离子键、氢键等相互作用来实现石墨烯表面功能团的引入. 通常采用的方式为物理吸附和聚合物包覆. 非共价修饰的方式由于没有破坏石墨烯表面的初始 π 结构, 因此可以最大程度地保持石墨烯的结构和性质. 修饰后的石墨烯具有良好的分散性、稳定性及后续与酶复合的可操作性.

以基于 π - π 堆积和疏水作用为例, 使用苝、茈等具有芳香结构的小分子及其衍生物^[17,18], 可有效实现石墨烯的功能化, 并应用于直接电化学的研究. 例如, Zhang 等^[17]使用茈丁酸(PTCA)对石墨烯进行功能化, 并使用 FTIR 和 UV-Vis 对该复合物进行了表征, 光谱结果表明, 相对于未功能化的石墨烯, PTCA-graphene 的光谱中不仅出现了 PTCA 的特征峰, 而且 C=O 及 C=C 的峰位还出现了的偏移. 这说明, PTCA 被有效地修饰到石墨烯表面, 而且 PTCA 分子的共轭环与石墨烯表面的共轭部分之间存在着相互作用. PTC 与石墨烯的有效复合, 为 graphene 表面引入了较多的-COOH, 有效改善了初始态石墨烯易团聚、不易分散的缺点, 表现出良好的水溶性和稳定性. 同时, 茈丁酸的存在为 Cyt.c 的固载提供众多静电位点, 通过混合方式可有效固载 Cyt.c, 制备修饰电极. 与非功能化石墨烯修饰电极相比, 固载于 PTCA-graphene 修饰电极上的 Cyt.c 具有更显著的直接电子转移响应(更大的氧化还原电流和更窄的峰位差), 该结果表明, 茈丁酸功能化石墨烯对于实现 Cyt.c 的直接电子转移具有重要作用, 具有“良好基底”和“电子导线”的双重作用. 有研究表明, 咪唑基离子液体与石墨烯之间存在 π - π 和阳离子- π 的相互作用, 能较好地吸附在石墨烯表面. Gholivand 等^[19]利用水合肼还原了氧化石墨烯和离子液体的混合物, 制备了石墨烯-离子液体复合物(Gr-IL), 并将胆固醇氧化酶(ChOx)和过氧化氢酶(CAT)共同固载到 Gr-IL 修饰电极表面制备了双酶胆固醇高敏感传感器(ChOx/CAT/Gr-IL/GC). 循环伏安研究表明, ChOx 和 CAT 在 Gr、Gr-IL 修饰电极上均能实现酶与电极表面的直接电子转移. 对比循环伏安曲线发现, 相对于 Gr 电极, Gr-IL 修饰电极对

ChOx 和 CAT 的电子转移具有明显的促进作用, 表现为循环伏安曲线上酶的氧化-还原电流的增加. 此外, 交流阻抗图谱研究表明, 由离子液体功能化石墨烯构建的修饰电极具有更小的电子转移阻抗, 说明离子液体在电子转移动力学方面发挥了重要的作用. 使用 ChOx/CAT/Gr-IL/ GC 对胆固醇浓度进行检测, 研究发现该电极对胆固醇具有响应灵敏、重现性好、干扰少等特点. 对人血清样品中游离胆固醇的检测表现出优异的分析性能.

基于疏水作用, 使用表面活性剂也可实现石墨烯的非共价功能化, 并将其应用于直接电化学的研究^[20-23]. 表面活性剂与石墨烯之间的疏水作用主要体现在水溶液中, 表面活性剂疏水端的长烷基链与石墨烯的惰性表面之间有效结合, 从而在石墨烯表面引入了表面活性剂极性端的亲水性. 例如, Liao、Zeng 等分别报道了使用溴化十六烷基三甲铵(CTAB)^[20]、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)^[23]制备表面活性剂修饰化石墨烯, 并固载 heme 蛋白应用于直接电化学和 H₂O₂ 电催化的研究工作. 在上述体系中, CTAB 和 SDBS 均能够起到快速分散石墨烯, 为固载蛋白质提供有效界面的作用^[20]. 磷脂是具有两亲性的生物小分子, 其疏水的烃基链和亲水的极性基团各处于分子的两端. Zhang 等^[22]利用磷脂(POPG)的烃基链通过疏水作用吸附于石墨烯表面, 从而使石墨烯表面呈现出极性端的负电性, 并与水亲和. 基于静电相互作用, 上述带负电荷的磷脂修饰化石墨烯, 在 pH 5.7 的 PBS 水溶液中, 可以有效固载带有正电荷的辣根过氧化物酶(HRP, 等电点为 8.9), 实现 HRP/POPG-Gr/GC 修饰电极的构筑及 HRP 的直接电化学. 石墨烯的磷脂非共价功能化不仅提高了石墨烯的分散性, 而且为石墨烯固载酶提供了有效的亲和界面, 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.

除了有机小分子外, 具有聚电解质性质的聚合物^[14,24-32], 如聚乙烯吡咯烷酮^[24]、聚(3,4-二乙氧基噻吩)^[25]、聚合离子液体^[32]、壳聚糖^[27,28,30]、Nafion^[29]等也常用来作为石墨烯的分散剂或成膜剂, 与石墨烯复合成稳定性优良, 分散性好的石墨烯材料, 用于第三代电化学生物传感器研究. 例如, 2009 年, 在修饰化石墨烯首次被用于生物传感器的研究中, Shan 等^[24]使用了聚乙烯吡咯烷酮修饰化石墨烯(PEDOT-protected graphene)固载葡萄糖氧化酶用于制备葡萄

糖传感器. PEDOT 与石墨烯之间存在非共价弱相互作用力, 修饰后的石墨烯在聚乙烯亚胺修饰化离子液体(PFIL)中具有良好的分散性. 通过对比发现, 以 PFIL 为成膜剂制备得到的石墨烯修饰电极具有比 PFIL 修饰电极、石墨修饰电极更好的 O₂ 和 H₂O₂ 催化还原性能. 这说明石墨烯能够起到促进电子转移的作用. 固载葡萄糖氧化酶后的修饰化石墨烯电极(PEDOT-protected graphene-GOx-PFIL)表现出良好的生物相容性, 促进了葡萄糖氧化酶的直接电子转移, 对葡萄糖的检测范围为 2~14 mM, 涵盖了人体内葡萄糖的含量, 如图 2 所示. Chen 等^[32]制备了聚合离子液体——聚(1-乙烯基-3-乙基咪唑鎓)溴化物(PIL), 并使用此聚合物制备了聚合离子液体功能化石墨烯(PIL-Gr). 作为石墨烯的分散剂, 聚合离子液体的引入不仅使材料兼具了聚合物和离子液体的特点, 如良好的成膜性、良好的离子导电性及热稳定性、良好的生物相容性及亲水性等特性, 而且石墨烯的存在也为材料本身提供了更大的比表面积. 以该复合物制备修饰电极并吸附 Cyt.c 可应用于 NO 的检测. 循环伏安研究结果表明, 吸附于 PIL 和 PIL-Gr 电极表面的 Cyt.c 均具有良好的直接电子转移信号. 相对于 PIL 修饰电极, Cyt.c 在 PIL-Gr 电极表面的氧化还原电流表现出明显的扩增现象, 该结果同时也体现了石墨烯聚合离子液体功能化的优势. 以 Cyt.c/PIL-Gr/BPG 电极对 NO 进行检测, 检测性能具有响应快、线性范围宽、检测限低、稳定性及重现性好等特点^[32]. 此外, 利用聚合物与石墨烯之间较强烈的非共价键作用, 还可以通过自组装的方法制备修饰电极应用于第三代电化学传感器研究. 例如, 聚赖氨酸是一种极易溶于水、具有生物相容性的聚合物, 其等电点较高, 在弱酸和中性条件下带正电荷. 氧化石墨烯表面具有丰富的含氧基团, 这些含氧官能团在水溶液中能够去质子化, 使石墨烯表面带负电. Hua 等^[14]利用二者之间的离子键, 将聚赖氨酸修饰电极浸入氧化石墨烯分散液, 制备了氧化石墨烯-聚赖氨酸修饰电极, 再辅以电化学还原处理, 继而通过滴涂葡萄糖氧化酶, 制备了葡萄糖氧化酶-还原氧化石墨烯-聚赖氨酸修饰电极, 固定在电极表面的酶具有显著的直接电子转移行为, 并对葡萄糖具有良好的线性响应.

除了有机小分子和聚合物, 生物大分子 DNA 也被研究者们尝试用于修饰石墨烯, 并应用于第三代电化学生物传感器的研究^[33,34]. 张等^[33]基于 DNA

图2 (a) 石墨烯-PFIL 电极(虚线)、graphite-GOx-PFIL (点线)、PEDOT-protected graphene-GOx-PFIL (实线)在 N_2 饱和 PBS 溶液中的循环伏安曲线; (b) PEDOT-protected graphene-GOx-PFIL 电极在饱和氧气条件下对 GOD 的催化还原循环伏安曲线^[24] (网络版彩图)

与石墨烯之间的氢键、离子键等多重相互作用,首次将二者进行有效结合制备了单链 DNA-Gr-HRP 修饰电极. 固载的 HRP 表现出良好的直接电子转移行为及对 H_2O_2 的高效催化,这主要得益于石墨烯的高导电性与 DNA 的良好生物相容性.

综上所述,使用有机小分子、聚合物、生物大分子等有机物非共价修饰石墨烯,可充分利用有机修饰物的特点改善石墨烯的分散性能,增强复合物的生物相容性,并利用石墨烯的高导电性促进酶与电极的直接电子转移,进而改善第三代生物传感器的性能. 在此基础上,还可以引入多种无机纳米材料(如氧化物/硫化物^[30,35-41]、金属纳米粒子^[42-51]、碳纳米材料^[52-56])与非共价修饰石墨烯复合,借助不同组分的协同作用,进一步改善石墨烯的电学、电化性质,拓展和增强石墨烯在第三代电化学生物传感器

中的应用. 例如, Feng 等^[42]利用具有良好电子导电性和强离子特性的聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA),制备了 Au 纳米粒子/聚二烯丙基二甲基氯化铵修饰化石墨烯(PDDA-Gr)复合材料. X-射线衍射(XRD)结果表明, PDDA 通过非共价方式吸附在石墨烯上, PDDA 对石墨烯的修饰化不仅改善了石墨烯的分散性,而且为石墨烯的表面提供了正电荷. Au 纳米粒子通过静电组装到 PDDA-Gr 电极表面(AuNPs/PDDA-Gr),通过特异性吸附 Hb,制备了 Hb/AuNPs/PDDA-Gr 修饰电极, Au 纳米粒子的引入为 Hb 提供了更多的吸附位点, Hb 在 AuNPs/PDDA-Gr 电极表面的覆盖率达到了理论单层覆盖率的 200 倍. 尽管 Hb 在 PDDA-Gr 电极表面也能够实现直接电子转移,但固载于 AuNPs/PDDA-Gr 电极表面 Hb 表现出更显著的直接电子转移信号,并对 H_2O_2 催化表现出优异的检测性能,如检测范围宽、检测限低、灵敏度高、响应快等特点. Zhang 等^[46]以壳聚糖为石墨烯的分散剂和稳定剂,制备了壳聚糖修饰化石墨烯(Gr-CS),修饰后的石墨烯表面具有大量的正电荷($-NH_3^+$),在水溶液中的分散性明显增强. 通过层层组装技术将 Hb、Au 纳米粒子、Gr-CS 进行了复合,制备了 Hb/Au/Gr-CS 电极. Au/Gr-CS 基底对 Hb 的电子转移起到明显的扩增作用,主要表现为相对于无 Au 修饰的 Gr-CS 电极, $[Fe(CN)_6]^{3-}/4-$ 在 Au/Gr-CS 电极表面的反应电阻更小, Hb 在 Au/Gr-CS 电极表面的氧化还原电流增加. 由于该电极将壳聚糖的生物相容性,金纳米粒子和石墨烯的导电性等特性进行了良好的结合,该电极表现出较以往 Hb-聚丙烯腈/GCE、Hb/Au/SBA-15/GCE、Hb/硅酸镁锂/CS/GCE 等 Hb 基复合电极更低的 H_2O_2 检测下限. 除了 Au 纳米粒子, Ag、Pt 等金属纳米粒子也常被用于构建类似的具有直接电化学信号扩增作用的石墨烯基复合电极^[50,57]. Sun 等^[35]将石墨烯与二氧化钛悬浮液进行混和,并利用简单的滴涂方式制备了 Nafion/石墨烯-二氧化钛-Hb (Nafion-Gr-TiO₂-Hb)复合电极,石墨烯与二氧化钛复合物的生物相容性使 Hb 保持了良好的生物活性, TiO₂ 纳米棒的加入,增强了 Hb 与电极之间的电子转移,相对于固载于 Nafion 或石墨烯基电极上的 Hb, Gr-TiO₂-Hb 电极上 Hb 的氧化还原电流最大,并对三氯乙酸表现出良好的电化学催化还原性能. 孙等^[56]将石墨烯、碳纳米管、Hb 进行简单的混合,通过滴涂方式将混合物修饰到离子液体碳电极表面,以 Nafion 为成膜剂制备

了 Nafion/Hb/石墨烯-碳纳米管/离子液体碳糊电极. 与 Nafion/Hb/碳纳米管/离子液体碳糊电极、Nafion/Hb/石墨烯/离子液体碳糊电极的电化学性质比, 含有石墨烯组分的 Nafion/Hb/石墨烯-碳纳米管/离子液体碳糊电极具有更显著的直接电化学响应. 这是因为碳纳米管与石墨烯的混合物组成了一个三维网状结构, 增加了电极的比表面积, 增强了电极的导电性. 该结果也体现了石墨烯与碳纳米管复合后的协同效应. 固载的 Hb 对三氯乙酸、 H_2O_2 、 NaNO_2 都具有良好的电化学催化还原作用. 其中, 对过氧化氢的响应线性范围为: 0.1~516 mM, 检测限低至 34.9 nM.

2.2.2 共价修饰石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用

石墨烯的共价修饰是指利用石墨烯或氧化石墨烯的反应位点通过共价反应将官能团连接于石墨烯表面的方法. 其中, 石墨烯边缘保留着的羧基(化学法对氧化石墨烯还原后, 环氧及羟基等基团被还原而片层边缘的羧基等不能被还原)^[32], 氧化石墨烯表面富含着的羧基、羟基和环氧基等含氧基团, 都是共价修饰石墨烯的反应位点^[58]. 对于前者而言, 由于石墨烯边缘的羧基数量较少, 直接进行功能化的效果并不理想, 通常需要经过处理, 增加羧基密度, 再进行功能化. 氧化石墨烯表面含氧功能团丰富, 反应活性强, 因此以氧化石墨烯为前体, 制备共价修饰氧化石墨烯, 再进一步处理得到功能化石墨烯成为最常用方法. 此外, 石墨烯和氧化石墨烯上还可以利用其共轭结构中的双键进行加成反应^[59]. 按石墨烯及氧化石墨烯表面的官能团种类不同, 可将石墨烯的共价修饰途径分为 3 大类: (1) 羧基功能化. 羧基具有很强的反应活性, 其中, 基于氧化石墨烯上羧基与氨基之间的酰胺化、羧基与羟基之间的酯化反应是实现石墨烯共价修饰的常用反应. (2) 环氧基功能化. 利用氧化石墨烯表面的环氧基团的开环反应引入官能团, 也是进行石墨烯共价修饰的途径之一. (3) 碳骨架功能化, 即利用石墨烯的共轭结构中的双键进行加成反应的方法.

经过共价修饰的石墨烯, 本身的 π 结构被破坏, 因此导致石墨烯自身的优势性能(如导电性)下降. 尽管如此, 共价修饰法作为能够有效解决石墨烯分散性的有效方式, 也被研究者们应用于构建第三代电化学生物传感器的研究.

氧化石墨烯作为化学氧化-剥离方法制备石墨烯的一个重要中间衍生物, 也可视为功能化的石墨烯^[16,60]. 氧化石墨烯通过化学氧化在表面及边缘引入高活性官能团, 如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{O}-$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 等含氧官能团, 这些官能团的存在一方面增加其亲水性, 另一方面也破坏了石墨烯的大 π 共轭结构, 降低了石墨烯的导电性. 氧化石墨烯由于其导电性不佳, 在构建电化学传感器的过程中通常将其进行化学还原或者电化学还原以修复其共轭结构. 还有部分研究者以氧化石墨烯为基底, 将其与金属纳米粒子或碳纳米管结合, 制备石墨烯基复合物/酶电极, 基于不同材料的协同作用, 研究其对酶的直接电子转移的促进作用^[52,61]. 例如, 张等^[52]利用氧化石墨烯与碳纳米管之间的 π - π 作用, 制备了水溶性良好的氧化石墨烯-碳纳米管复合物, 基于复合物与 HRP 之间的静电作用, 通过自组装的方式制备了酶电极并实现了酶与电极之间直接电子转移. 紫外光谱结果表明, 固载后的 HRP 保持了活性, 并对 H_2O_2 和 NaNO_2 都具有良好的电化学催化还原性能.

鉴于石墨烯表面的缺陷和含氧基团具有的化学和电化学反应活性, 电化学工作者使用电化学技术对共价修饰化石墨烯电极进行还原, 可实现石墨烯共轭结构的部分修复, 进而提高了石墨烯基第三代生物传感器的性能. 例如, Ye 等^[62]使用羧酸化石墨烯固载葡萄糖氧化酶构建了葡萄糖传感器. 其中, 羧酸化石墨烯修饰电极经过循环伏安扫描的还原处理后, 有效减少了石墨烯表面含氧基团的数量. 使用交流阻抗技术进行表征, 可知电还原后的羧酸化石墨烯修饰电极的导电性明显提高, 如图 3 所示. 活化后的羧基通过自组装的方式可有效固载葡萄糖氧化酶, 并能够实现酶与电极之间的直接电子转移. 该酶电极对葡萄糖的检测范围为 2~18 mM. 由于该检测范围涵盖了人体内葡萄糖的正常含量 4.4~6.6 mM, 因此, 该电极具有潜在的实际应用价值. 此外, Manjunatha 等^[63]报道了使用羧酸化石墨烯共价固载胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶制备双酶传感器的研究工作. 循环伏安研究表明, 功能化石墨烯促进了酶与电极之间的直接电子转移, 该双酶传感器对游离胆固醇和总胆固醇都具有灵敏检测性能.

Li 等^[58]成功制备了 1,3-二(4-氨基-1-吡啶鎓)丙烷四氟硼酸盐(DAPPT)离子液体, 并以其作为改性剂共价修饰到石墨烯表面, 继而通过戊二醛的交联反应

将血红蛋白固定到电极表面, 实现了酶的直接电化学. 该方法利用了氧化石墨烯表面环氧基团的反应性, 利用氨基与环氧基团在碱性条件下的开环反应, 实现了氧化石墨烯的离子液体修饰化, 在 NaBH_4 的还原作用下, 制备得到了离子液体修饰化石墨烯. 通过该方法制备的酶电极对过氧化氢的检测具有检测范围宽($0.45\sim 760\ \mu\text{M}$)、检测限低($0.08\ \mu\text{M}$)等特点.

最近很多文献报道, 芳基重氮盐的活性很高, 通过简单机械搅拌或者电化学还原就可以使其与碳材料之间形成 C-C 键. 例如, 张等^[64]使用芳基重氮盐修饰石墨烯制备了水溶性的磺酸化石墨烯, 并利用修饰化石墨烯与酶之间的静电力实现了对 HRP 的固载, 固载后的 HRP 能够实现直接电子转移并对 H_2O_2 、 NaNO_2 表现出优良的电催化性能. 与芳基重氮盐相比, 自由基具有更高的化学活性. 单体小分子在形成聚合物时往往会生成含有自由基的中间体. 自由基可以引发石墨烯 C 骨架上 π 键的断裂, 继而修饰到石墨烯表面. 目前, 已有较多研究者利用这种方法进行修饰电极制备并应用于第三代电化学生物传感器研究^[65,66]. 例如, Wang 等^[65]在氧化石墨烯存在条件下, 以 FeCl_3 为引发剂, 以 PSS 为掺杂剂, 引发 EDOT 进行聚合. 得到的复合物经水合肼还原, 可制备 PEDOT 修饰的石墨烯复合材料, 由于掺杂的 PSS 提供了负电荷, 调控合适的 pH, 可静电吸附固载 Cyt.c. 实验表明, 该修饰电极能够实现 Cyt.c 的直接电子转移, 并对过氧化氢具有线性响应.

在此基础上, 将共价修饰石墨烯与纳米粒子结合, 可以进一步增强酶的直接电子转移能力, 发挥各组分的协同作用^[67-71]. Zhang 等^[71]通过羧酸化石墨烯与壳聚糖之间的共价键作用, 使用原位还原法制备了金纳米粒子/壳聚糖-石墨烯纳米复合材料(AuNPs/Chit-Gr). 并通过静电相互作用固载葡萄糖氧化酶(GOx). 该酶修饰电极不仅可成功地实现 GOx 与电极间的直接电子转移, 还对葡萄糖表现出良好的催化性能. 这种集金属纳米粒子、生物相容性高分子以及石墨烯为一体的纳米复合物的构筑为无媒介体电化学生物传感器的研究提供了一个良好的平台. Xu 等^[68]报道了在石墨烯共存条件下, 通过苯胺的原位聚合制备葡萄糖氧化酶-石墨烯/聚苯胺/Au 纳米粒子修饰电极的研究工作. 较石墨烯电极、聚苯胺电极以及石墨烯/聚苯胺电极, 石墨烯/聚苯胺/Au 纳米粒子电极对酶显示出更优良的生物相容性和对电子转移

图3 裸碳电极(a)、羧酸化石墨烯电极(b)、电化学还原后的羧酸化石墨烯电极(c)以及电还原羧酸化石墨烯-GOx 电极(d)在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中的交流阻抗谱图^[62]

更好的促进作用. 该电极对葡萄糖响应的线性范围为 $4.0\ \mu\text{M}\sim 1.12\ \text{mM}$.

2.2.3 杂原子掺杂石墨烯的制备及其在第三代电化学生物传感器中的应用

杂原子掺杂石墨烯是指改变石墨烯的电子结构, 通过 N、S、B 等元素的替位掺杂形成的石墨烯材料. 研究表明, 掺杂后的石墨烯材料不仅能够保持石墨烯固有的物理化学性质, 而且还具有新的催化性质^[72,73]. 掺杂石墨烯的主要制备方法有两种, 即原位生长法和后处理法. 原位生长法是指杂原子在石墨烯生长的同时掺杂进入石墨烯的结构中. 其中, 化学气相沉积(CVD)是实现杂原子原位生长的一种有效的方法. 例如, 以 NH_3 和 CH_4 分别作为氮源和碳源, 使用气态的 NH_3 、 H_2 、 CH_4 、Ar 混合物作为反应物, 采用 CVD 法可合成 N 掺杂石墨烯, 其中, N 以吡啶 N 和吡咯 N 的形式嵌入到石墨烯的六元环中^[50]. 后处理法是指通过化学或物理方法将含有杂原子的物质与石墨烯材料混合, 然后在热处理过程中将杂原子引入石墨烯框架结构中的方法. 例如, Ma 等^[74]将吡咯小分子与还原石墨烯混合, 以过硫酸铵作氧化剂引发吡咯聚合, 最后在 Ar 气氛中, 经热处理混合物, 即可得到 N 掺杂的石墨烯复合物.

2010 年, 李景虹研究组^[75]发表了关于使用后处理法制备 N 掺杂石墨烯修饰电极用于直接电化学的研究, 具体步骤为: 以 Hummers-Offeman 法为基础制

备石墨烯, 将壳聚糖与石墨烯进行混合, 并用上述混合液滴涂电极, 然后将得到的修饰电极经过等离子体工艺处理, 最后, 通过电极在酶溶液中的浸泡实现电极表面葡萄糖氧化酶的固载. 结果表明, 葡萄糖氧化酶与电极表面实现了良好的直接电子转移, 而且该电极对葡萄糖有良好线性响应, 线性范围为 0.1~1.1 mM, 在干扰存在条件下, 该电极对葡萄糖的检测下限低至 0.01 mM. 电极搁置 3 d 后再使用, 发现信号仅减低了 4%. 该研究同时指出, 等离子体处理工艺也适用于其他 N 掺杂碳材料的制备.

此外, 付磊研究组^[76]于 2015 年以 CH_4 和 NH_3 分别为 C 源和 N 源, 使用 CVD 原位生长法制备了三维 N 掺杂石墨烯, 相对于二维的石墨烯材料, 三维 N 掺杂石墨烯具有高电导率、大孔隙度和可控氮掺杂的特点. 该工作以壳聚糖为有效黏结剂, 通过三维 N 掺杂石墨烯与壳聚糖的混合, 制备了修饰电极. 通过上述电极在酶溶液中的浸泡和吸附, 制备了石墨烯基酶电极. 结果表明, 固载在电极表面的葡萄糖氧化酶具有良好的直接电化学行为, 能够有效催化还原葡萄糖, 检测范围具有两段线性响应特征. 其中, 酶电极对葡萄糖的低浓度响应范围为 0.1~0.9 mM, 灵敏度为 $226.24 \mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$, 较以往报道过的大部分葡萄糖传感器, 灵敏度至少高出 1 个数量级. 结果表明, 传感器灵敏度的改善主要是由于三维石墨烯的特殊结构极大地促进了电子传递和物质传输.

2015 年, 杨占军教授^[77]首次将 N 掺杂石墨烯与铂纳米粒子相结合, 制备了一种高效铂纳米颗粒修饰的氮掺杂的石墨烯(PtNPs@NG)纳米复合材料, 并用于第三代葡萄糖传感器的构建. 该研究者首先以聚吡咯为 N 的引入源, 经热处理制备了 N 掺杂石墨烯. 在此基础上, 将 N 掺杂石墨烯与铂纳米粒子混合搅拌, 从而实现铂纳米粒子在 N 掺杂石墨烯上的吸附. 葡萄糖氧化酶通过混合的方式与上述纳米复合物形成滴涂液, 制备修饰电极, 并用 Nafion 进行固定得到葡萄糖氧化酶/铂纳米粒子@石墨烯($\text{GOx/PtNPs@NG/Nafion/GCE}$)修饰电极. 电化学研究结果表明, 葡萄糖氧化酶在电极表面实现了快速的直接电子转移, 阴极与阳极的标准电势电位差仅为 40 mV, 酶分子的表面覆盖度很大, 为 $3.87 \times 10^{-11} \text{ mol}/\text{cm}^2$, 优于其他纳米粒子-葡萄糖氧化酶修饰电极, 该覆盖度是其在裸电极表面覆盖度($2.86 \times 10^{-12} \text{ mol}/\text{cm}^2$)的 13 倍左右. 将 $\text{GOx/PtNPs@NG/Nafion/GCE}$ 电极用于葡

萄糖检测, 发现该电极对葡萄糖的响应灵敏度很高, 达到 $20.31 \text{ mA}/(\text{M cm}^2)$, 且线性响应的范围为 0.005~1.1 mM. 在 AA、UA 等干扰存在条件下, 电极对葡萄糖的检测信号几乎不受影响. 放置两周后, 电极信号仅减少了原来的 2.1%. 将电极用于人体血清中葡萄糖含量测定, 并将结果与酶催化分光光度结果进行比较, 两方法之间的标准偏差为 7.1%.

由于掺杂石墨烯的制备通常需要特殊的装置和苛刻的条件, 因此将 N 掺杂石墨烯应用于第三代电化学生物传感器的研究报道目前还很少, 而且研究内容主要关于葡萄糖的检测. 从上述研究实例可以看出, N 掺杂石墨烯基传感器对葡萄糖的检测范围较窄, 但检测浓度下限较低, 低于共价修饰石墨烯及非共价修饰石墨烯基葡萄糖传感器.

2.2.4 功能化石墨烯对传感器性能影响

石墨烯由于表面化学稳定性高, 因此呈现出表面惰性、疏水性、与其他介质的相互作用较弱等特性, 使得石墨烯在构建第三代电化学生物传感器的实际应用过程中会出现石墨烯片层的团聚、与酶复合性差等问题. 研究表明, 通过非共价键修饰、共价键修饰及杂原子掺杂的方式将石墨烯进行功能化可有效改善石墨烯在溶剂中的分散性, 提高石墨烯与生物分子之间的复合程度. 由于石墨烯功能化方法的多样性, 石墨烯构建第三代电化学生物传感器的方式也灵活多变. 为了更好地比较功能化石墨烯对传感器性能的影响, 我们根据固载的氧化还原蛋白质电子转移中心的不同, 分别选取研究最多的葡萄糖氧化酶 GOx (FAD 为电子转移中心) 和血红蛋白 Hb (血红素为电子转移中心) 为代表, 对比考察了检测对象分别为葡萄糖(GOD)和过氧化氢时, 传感器的相关性能, 如线性检测范围、检测限、灵敏度和稳定性等(表 1).

通过表 1 对比可以发现, 在石墨烯基 Hb 传感器的构筑中, 石墨烯功能化方式多为非共价修饰法. 以壳聚糖为分散液, 直接使用化学还原法制备的石墨烯构筑的 Hb 传感器对 H_2O_2 的检测性能并不是很好, 线性范围仅处于 6.5~230 μM . 而使用离子液体非共价修饰化石墨烯或引入金属纳米粒子、碳纳米管及氧化物后的复合石墨烯基 Hb 电极对 H_2O_2 的检测性能有所提高. 其中, 石墨烯分别与 Au、 TiO_2 、ZnO 纳米粒子形成的复合电极对 H_2O_2 的检测上限影响显著, 超过了 1000 μM ^[30,42,78]. 就检测限而言, 使用石墨烯-

表 1 不同方法构筑的石墨烯基 Hb 传感器: 功能化石墨烯特征及其电化学检测 H_2O_2 性能指标对比^{a)}

功能化石墨烯的不同形式	酶修饰电极及 石墨烯功能化方式/酶的固载方式	线性检测范围 检测限	灵敏度 ($\mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$)	稳定性	参考 文献	检测方法 参数 E (V)
肼还原氧化石墨烯制备 石墨烯	Hb-Gr-chitosan/GCE 非共价修饰石墨烯/混合	6.5~230 μM 0.51 μM	—	14 d 以后电极信号为初始 信号的 80.1%	[27]	It, -0.4
1,3-二(4-氨基-1-吡啶鎓)丙 烷四氟硼(DAPPT)共价修饰 的石墨烯	Gr-DAPPT-Hb-chit 共价修饰石墨烯/吸附	0.45~760 μM 0.08 μM	—	4 $^{\circ}\text{C}$, 4 周后, 电极信号保持 初始信号的 90.5%	[58]	It, -0.35
经壳聚糖分散的石墨烯	Hb/Au/Gr-CS/GCE 非共价修饰石墨烯/自组装(特异 性吸附)	2~935 μM 0.35 μM	347.1	0 $^{\circ}\text{C}$, 1 个月后, 电极信号保 持初始信号的 94%	[46]	It, -0.385
购买的石墨烯	Nafion/Hb-Gr-MWCNT/CILE 非共价修饰石墨烯/混合	0.1~516 μM 0.0349 μM	—	4 $^{\circ}\text{C}$, 14 d, 1 个月后, 电极 信号分别保持初始信号的 96.8% 和 93.7%	[56]	CV
原位生长法制备氧化石墨烯- Fe_3O_4 复合物, 后经肼还原	Hb- Fe_3O_4 -Gr/CCE (碳陶瓷电极) 非共价修饰石墨烯/混合	1.50~585 μM 0.5 μM	—	4 $^{\circ}\text{C}$, 2 周后, 电极信号是 初始信号的 95%	[37]	It, -0.3
PDDA 非共价修饰石墨烯	Hb/AuNPs/PDDA-Gr/GCE 非共价修饰石墨烯/自组装(特异 性吸附)	6~1010 μM 0.39 μM	369.2	—	[42]	It, -0.4
水热法制备 TiO_2 -石墨烯 复合材料	Hb/Chit-[bmim]PF ₆ -TiO ₂ -Gr 非共价修饰石墨烯/滴涂	1~1170 μM —	—	4 $^{\circ}\text{C}$, 20 d 后, 电极信号 保持初始信号的 95%	[30]	It, -0.3
电化学沉积 (Hb 与 G-ZnO 复合物的 悬浊液为沉积液)	Hb/Gr-ZnO/Au 非共价修饰石墨烯/混合	1.8~2300 μM —	—	5 d、两周、1 个月后, 电 极信号分别是初始信号 的 97.0%、92% 和 83%	[78]	It, -0.3

a) 由于引用的文献中对血红蛋白和葡萄糖氧化酶的简写不一致, 为了表达地更清楚, 统一了各简写的含义: Hb, 血红蛋白; GOx, 葡萄糖氧化酶; Gr, 石墨烯; ERCGr, 电化学还原的石墨烯; GO, 氧化石墨烯

碳纳米管复合物固载 Hb 制备的修饰电极对 H_2O_2 的检测响应灵敏, 最低检测浓度低至 0.0349 μM 。以上研究表明, 非共价修饰法是制备石墨烯基 Hb 传感器的常用方法, 这是因为使用非共价修饰法进行石墨烯功能化, 可以最大限度地保持石墨烯的共轭结构。此外, 纳米粒子与石墨烯的协同作用对改善传感器性能非常有利。

表 1 和表 2 列出了采用不同方法构筑的石墨烯基葡萄糖氧化酶修饰电极对葡萄糖的检测指标, 通过对比发现, N 掺杂石墨烯基酶电极对葡萄糖的检测具有范围较窄、检出限低、对低浓度葡萄糖响应灵敏的特点, 其中检测范围一般为 0.005~1.1 mM。使用 Hummers-Offeman 法及热剥离法制备的石墨烯基酶电极对葡萄糖的响应范围较宽, 通常为 0.1~15 mM^[31,79,80]。石墨烯复合电极固载葡萄糖氧化酶对葡萄糖的检测浓度通常为 0.1~20 mM^[24,41,66]。其中, 聚合离子液体修饰化石墨烯基酶电极对葡萄糖检测表现出更好的性能, 如宽的线性检测范围(0.8~20 mM)、更高的灵敏度(767 $\mu\text{A}/(\text{mM cm}^2)$)^[66]。使用电化学方法还原

氧化石墨烯也是制备石墨烯基酶电极的一种途径, 且对葡萄糖的检测范围也较宽^[13,62]。例如, Unnikrishnan 等^[13]将氧化石墨烯与葡萄糖氧化酶混合物通过滴涂方式制备修饰电极, 在负电位范围内对修饰电极进行反复扫描后, 发现不仅氧化石墨烯还原为石墨烯, 且葡萄糖氧化酶在无偶联剂存在条件下, 还可以与氧化石墨烯表面的基团进行共价反应。用上述电极对葡萄糖进行检测, 线性范围为达到 0.1~27 mM, 优于化学还原法制备的石墨烯基葡萄糖氧化酶传感器的检测性能。

由于构建石墨烯基第三代生物传感器的方法不同, 电极表面的石墨烯浓度不同, 以及石墨烯功能化方式不同, 因此具体筛选出哪种构建方法最好, 哪种功能化方法最佳, 在目前的文献综述中是不可能实现的。但通过目前的文献总结可知, 以 N 掺杂石墨烯为基底的酶修饰电极对葡萄糖的检测范围较窄, 对低浓度葡萄糖响应灵敏, 适合于低浓度葡萄糖的测定。与非共价修饰石墨烯构筑酶电极的方法相比^[24,79], 共价修饰的石墨烯通常与具有离子或电子

表2 不同方法构筑的石墨烯基 GOx 传感器: 功能化石墨烯特征及其电化学检测 GOD 性能指标对比^{a)}

功能化石墨烯的不同形式	酶修饰电极及 石墨烯功能化方式/酶的固 载方式	线性检测范围 检测限	灵敏度 ($\mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$)	稳定性	参考 文献	检测方法 及参数 E (V)
N 掺杂石墨烯(NG)	GOx-NG-chit N 掺杂/吸附	0.1~1.1 mM 0.01 mM	—	3 d 后, 保持了初始信号的 96%	[75]	It, -0.15
CVD 原位生长法制备了三维 N 掺杂石墨烯(3D-NG)	3D-NG/CS/GOx N 掺杂/吸附	0.1~0.9 mM 0.9~1.7 mM	226.24 108.94	—	[76]	CV
N 掺杂石墨烯(NG)	GOx/PtNPs@NG/Nafion N 掺杂/混合	0.005~1.1 mM 0.002 mM	20.31	4℃, 2 周, 1 个月后, 电极信 号分别保持了初始信号的 97.9%和 92%	[77]	It, -0.33
Hummers-Offeman 法制备氧化 石墨, 脘还原制备石墨烯	GOx-Gr/GC 非共价修饰石墨烯/吸附	0.1~10 mM 10±2 μM	110±3	4℃, PBS 溶液保存, 隔 1~2 d 检测, 电极信号基本 保持不变	[79]	CV
Hummers-Offeman 法制备氧化 石墨, 脘还原制备石墨烯	Nafion-Gr-GOx/Au 非共价修饰石墨烯/滴涂	2~14 mM 0.04 mM	21.9	—	[80]	CV
化学氧化法制备氧化石墨烯, 后经热膨胀剥离成带有羧基 和羟基功能团的石墨烯	GOx-Gr-chitosan/GCE 羧酸化、羟基修饰石墨烯/ 滴涂	0.08~12 mM 0.02 mM	37.93	4℃, PBS 溶液保存, 1 周后, 电极信号保持初始信号的 95%	[31]	CV
在聚合离子液体共存条件下 还原氧化石墨烯(Hummers- Offeman 法), 制备聚合离子液 体修饰的石墨烯	GOx/poly(ViBuIm ⁺ Br ⁻)-Gr/ GC 共价修饰/吸附	0.8~20 mM —	767	4℃, PBS 溶液保存, 2 周后, 电极信号保持初始信号的 92%	[66]	CV
利用聚乙烯吡咯烷酮修饰的 石墨烯, 并与聚乙烯亚胺功能 化离子液体(PFIL)混合制备 电极	G-GOx-PFIL (G 指 PVP-protected graphene) 非共价修饰/吸附	2~14 mM —	—	3 d, 1 周后后, 电极信号保 持初始信号的 96.2%和 95.1%	[24]	CV
经壳聚糖分散石墨烯(石墨烯 为热膨胀剥离法制备)	GOx/PtFGS/chitosan 羟基、环氧基团修饰石墨烯/ 滴涂	Sub- μM ~5 mM 0.6 μM	—	1 周后, 电极信号保持初始 信号的 86%	[81]	It, 0.4
使用氧化石墨烯滴涂电极, 电 沉积氧化锆, 同时氧化石墨烯 被还原	GOx-PLL/RGO-ZrO ₂ 非共价修饰石墨烯/静电 吸附	0.29~14 mM 0.13±0.021 mM	11.65±0.17	4℃, PBS 溶液保存, 1 个月 后, 电极信号保持初始信 号的 94.4%	[41]	DPV
电极经循环伏安扫描, 将氧化 石墨烯还原成石墨烯	GCE/RGO-GOx 共价修饰石墨烯/混合	0.1~27 mM —	1.85	4℃, PBS 溶液保存, 20 d, 50 d 后, 电极信号保持初 始信号的 93.4%和 81%	[13]	It, -0.44
羧酸化石墨烯为购买的样品	ERCGr-GOx/GCE 共价修饰石墨烯/自组装 ERCGr——电还原的羧酸化 石墨烯	2~18 mM 0.02 mM	7	4℃, 2 周, 1 个月后, 电极信 号分别保持初始信号 95.4%和 92%	[62]	CV

a) 由于引用的文献中对血红蛋白和葡萄糖氧化酶的简写不一致, 为了表达地更清楚, 统一了各简写的含义: Hb, 血红蛋白; GOx, 葡萄糖氧化酶; Gr, 石墨烯; ERCGr, 电化学还原的石墨烯; GO, 氧化石墨烯

导电性的聚合离子液体^[66]、金属纳米粒子^[81]进行复合来构建第三代电化学生物传感器. 这种杂化体系一方面可以利用材料的协同作用促进固载酶的直接电子转移, 另一方面导电材料的引入也部分补偿了石墨烯因共价修饰化而下降的导电性. 在构筑石墨烯基酶传感器时, 使用电化学方法对功能化石墨烯进行还原, 可有效改善传感器性能. 研究表明, 使用该方法

构筑的传感器具有灵敏, 高效等优势.

2.3 讨论

本文在简单介绍石墨烯的制备及功能化方法基础上, 详细阐述了近年来功能化石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用研究及发展动态. 目前的研究表明, 石墨烯的独特结构和优良性能, 使得石墨烯基酶

生物传感器具有诸如灵敏度高、选择性好以及稳定性好等优异性能。然而,在石墨烯基酶生物传感器的进一步发展过程中仍存在问题亟待解决,有很大的发展空间。

在材料方面,已有研究表明,作为电极修饰材料,石墨烯共轭结构的修复会增加修饰电极的导电性,导电性的提高进而会极大提高传感器的性能^[13]。然而,在具体的石墨烯基传感器的构筑过程中,石墨烯导电性能提高与石墨烯缺乏活性位点的“惰性”表面是相互关联的^[82]。如何平衡石墨烯的导电性与功能化程度、如何将高质量石墨烯引入到电化学传感器中是未来研究的关注点与难点,需要后续系统的研究。

在理论研究方面,关于酶的直接电子转移机理一直存在质疑,石墨烯为第三代电化学生物传感器的电子转移机理研究提供了新的模型。但相关理论研究较少,仍有待深入。例如,Alwarappan^[83]以葡萄糖氧化酶为模型,比较了包含不同层数的石墨烯(单层、少层和多层)基酶修饰电极对分析检测葡萄糖的影响。实验结果表明,不同层数的石墨烯导电性不同,但对酶的固载量基本一致,且对葡萄糖的检测能力基本相同。尽管他们在该研究中用TEM手段展现了不同层数石墨烯结构的差别,但是,如何解决电极修饰过程中,单层石墨烯在水溶液中的分散性,避免单层石墨烯因团聚形成多层石墨烯、如何保证石墨烯修饰到电极表面以后仍然具有良好单层结构,文章中并没有做详细介绍。将制备材料的特征等同于电极表面石墨烯的特征,值得商榷。此外,Liang等^[84]研究了氧气(葡萄糖氧化酶的天然介质)对石墨烯基葡萄糖氧化酶电极对葡萄糖的催化性能的影响。研究表明,在无氧气存在条件下,尽管固载的GOx与电极表面存在直接电子转移信号,但GOx对GOD并无催化作用;对于相同的葡萄糖氧化酶分子,酶的直接电子转移行为和酶的催化行为不能同时存在,如图4所示。该问题的提出对构建基于直接电化学的生物传感器和生物燃料电池的研究提出了挑战。

此外,在应用方面,关于直接电化学的研究多停留于对过氧化氢、葡萄糖等配制溶液的检测层面,对实际样品的检测较少,对构建催化性能可重现的器件

图4 吸附于电化学还原石墨烯修饰电极表面的葡萄糖氧化酶电子转移示意图^[84](网络版彩图)

研究几乎是空白。可以说,目前的研究距离真正意义上的传感器的研究还有差距,第三代电化学生物传感器的研究任重而道远。

3 总结及展望

研究者们通过使用非共价、共价、掺杂修饰的方法对石墨烯进行功能化,扩展了石墨烯在第三代电化学生物传感器中的应用。研究表明,功能化石墨烯对促进氧化还原蛋白质与电极之间的直接电子转移具有非常积极的作用。通过在体系中引入金属纳米粒子、氧化物,可以利用各组分之间的协同作用进一步改善传感器的性能。其中,利用电化学方法还原氧化石墨烯制备石墨烯基修饰电极在改善传感器性能方面表现出一定的优势。然而,石墨烯基酶电极在应用中仍面临巨大挑战,其电子转移机理仍待进一步研究。随着对功能化石墨烯研究的广泛深入,研究者们定会对这一挑战给出科学性解答,从而为实现石墨烯的实际应用奠定科学和技术基础。

参考文献

- Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Zhang DJ, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA. *Science*, 2004, 306: 666–669
- Wang Y, Zhang S, Li Z, Wang J, Engelhard MH, Li J, Lin Y. *J Mater Chem*, 2011, 21: 5319–5325
- Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. *Electroanalysis*, 2010, 22: 1027–1036
- Chen D, Tang L, Li J. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 3157–3180

- 5 McCreery RL. *Chem Rev*, 2008, 108: 2646–2687
- 6 Niwa O, Jia J, Sato Y. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7144–7145
- 7 Zhou M, Zhai Y, Dong S. *Anal Chem*, 2009, 81: 5603–5613
- 8 Tang LH, Wang Y, Li YM, Feng H, Lu J, Li J. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 2782–2789
- 9 Ci S, Cai P, Wen Z, Li J. *Sci China Mater*, 2015, 58: 496–509
- 10 Liu Y, Liu Y, Feng H, Wu Y, Joshi L, Zeng X, Li J. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35: 63–68
- 11 Alwarappan S, Joshi RK, Ram MK, Kumar A. *Appl Phys Lett*, 2010, 96: 263702
- 12 Cui M, Xu B, Hu C, Shao HB, Qu L. *Electrochim Acta*, 2013, 98: 48–53
- 13 Unnikrishnan B, Palanisamy S, Chen SM. *Biosens Bioelectron*, 2013, 39: 70–75
- 14 Hua L, Wu X, Wang R. *Analyst*, 2012, 137: 5716–5719
- 15 Sun W, Hou F, Gong S, Han L, Wang W, Shi F, Xi J, Wang X, Li G. *Sensor Actuat B*, 2015, 219: 331–337
- 16 Chen D, Li J. *Chem Rev*, 2012, 112: 6027–6053
- 17 Zhang N, Lv X, Ma W, Hu Y, Li F, Han D, Niu L. *Talanta*, 2013, 107: 195–202
- 18 Zhou X, Huang X, Liu L, Bai X, Shi H. *RSC Adv*, 2013, 3: 18036–18043
- 19 Gholivand MB, Khodadadian M. *Biosens Bioelectron*, 2014, 53: 472–478
- 20 Liao HG, Wu H, Wang J, Liu J, Jiang YX, Sun SG, Lin Y. *Electroanal*, 2010, 22: 2297–2302
- 21 Wen W, Chen W, Ren QQ, Hu XY, Xiong HY, Zhang XH, Wang SF, Zhao YD. *Sensor Actuat B*, 2012, 166–167: 444–450
- 22 Zhang Q, Wu S, Zhang L, Mao H, Liu D, Liu Y, Zeng X, Song X, Li J. *Acta Chim Sinica*, 2014, 72: 388–394
- 23 Zeng Q, Cheng J, Tang L, Liu X, Liu Y, Li J, Jiang J. *Adv Funct Mater*, 2010, 20: 3366–3372
- 24 Shan C, Yang H, Song J, Han D, Ivaska A, Niu L. *Anal Chem*, 2009, 81: 2378–2382
- 25 Wisitsoraat A, Pakapongpan S, Sriprachuabwong C, Phokharatkul D, Sritongkham P, Lomas T, Tuantranont A. *J Electroanal Chem*, 2013, 704: 208–213
- 26 Liu K, Zhang J, Yang G, Wang C, Zhu JJ. *Electrochem Commun*, 2010, 12: 402–405
- 27 Xu H, Dai H, Chen G. *Talanta*, 2010, 81: 334–338
- 28 Zhou Y, Liu S, Jiang HJ, Yang H, Chen HY. *Electroanal*, 2010, 22: 1323–1328
- 29 Guo C, Sun H, Zhao XS. *Sensor Actuat B*, 2012, 164: 82–89
- 30 Sun JY, Huang KJ, Zhao SF, Fan Y, Wu ZW. *Bioelectrochemistry*, 2011, 82: 125–130
- 31 Kang X, Wang J, Wu H, Aksay IA, Liu J, Lin Y. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 901–905
- 32 Chen H, Zhao G. *J Solid State Electr*, 2012, 16: 3289–3297
- 33 Zhang Q, Qiao Y, Hao F, Zhang L, Wu S, Li Y, Li J, Song XM. *Chem Eur J*, 2010, 16: 8133–8139
- 34 Sun W, Guo Y, Li T, Ju X, Lou J, Ruan C. *Electrochim Acta*, 2012, 75: 381–386
- 35 Sun W, Guo Y, Ju X, Zhang Y, Wang X, Sun Z. *Biosens Bioelectron*, 2013, 42: 207–213
- 36 Cai CJ, Xu MW, Bao SJ, Lei C, Jia DZ. *RSC Adv*, 2012, 2: 8172–8178
- 37 He Y, Sheng Q, Zheng J, Wang M, Liu B. *Electrochim Acta*, 2011, 56: 2471–2476
- 38 Song H, Ni Y, Kokot S. *Biosens Bioelectron*, 2014, 56: 137–143
- 39 Xu CX, Huang KJ, Chen XM, Xiong XQ. *J Solid State Electrochem*, 2012, 16: 3747–3752
- 40 Dey RS, Raj CR. *RSC Adv*, 2013, 3: 25858–25864
- 41 Vilian ATE, Chen SM, Alib MA, Al-hemaid FMA. *RSC Adv*, 2014, 4: 30358–30367
- 42 Feng Q, Liu K, Fu J, Zhang Y, Zheng Z, Wang C, Du Y, Ye W. *Electrochim Acta*, 2012, 60: 304–308
- 43 Deng K, Xiang Y, Zhang L, Chen Q, Fu W. *Anal Chim Acta*, 2013, 759: 61–65
- 44 Song Y, Liu H, Wan L, Wang Y, Hou H, Wang L. *Electroanal*, 2013, 25: 1400–1409
- 45 Cao X, Ye Y, Li Y, Xu X, Yu J, Liu S. *J Electroanal Chem*, 2013, 697: 10–14
- 46 Zhang L, Han G, Liu Y, Tang J, Tang W. *Sensor Actuat B*, 2014, 197: 164–171
- 47 Tabrizi MA, Varkani JN. *Sensor Actuat B*, 2014, 202: 475–482
- 48 Palanisamy S, Karuppiiah C, Chen SM. *Colloid Surface B*, 2014, 114: 164–169
- 49 Luo Z, Yuwen L, Han Y, Tian J, Zhu X, Weng L, Wang L. *Biosens Bioelectron*, 2012, 36: 179–185
- 50 Zhou Y, Meng X, Xu Z, Fu Y, Ai S. *Electrochimica Acta*, 2012, 71: 294–301
- 51 Wang T, Liu J, Ren J, Wang J, Wang E. *Talanta*, 2015, 143: 438–441
- 52 Zhang Q, Yang S, Zhang J, Zhang L, Kang P, Li J, Xu J, Zhou H, Song XM. *Nanotechnology*, 2011, 22: 494010–494017

- 53 Dinesh B, Mani V, Saraswathi R, Chen SM. *RSC Adv*, 2014, 4: 28229–28237
- 54 Sun X, Gong Z, Cao Y, Wang X. *Nano-Micro Lett*, 2013, 5: 47–56
- 55 Mani V, Devadas B, Chen SM. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41: 309–315
- 56 Sun W, Cao L, Deng Y, Gong S, Shi F, Li G, Sun Z. *Anal Chim Acta*, 2013, 781: 41–47
- 57 Sun A, Sheng Q, Zheng J. *Appl Biochem Biotech*, 2012, 166: 764–773
- 58 Li R, Liu C, Ma M, Wang Z, Zhan G, Li B, Wang X, Fang H, Zhang H, Li C. *Electrochim Acta*, 2013, 95: 71–79
- 59 Sun W, Hou F, Gong S. *Sensor Actuat B*, 2015, 219: 331–337
- 60 Wang Y, Li Z, Li J, Lin Y. *Trends Biotech*, 2011, 29: 205–212
- 61 Yu C, Wang L, Li W, Zhu C, Bao N, Gu H. *Sensor Actuat B*, 2015, 211: 17–24
- 62 Liang B, Fang L, Yang G, Hu Y, Guo X, Ye X. *Biosens Bioelectron*, 2013, 43: 131–136
- 63 Manjunatha R, Suresh GS, Melo JS, D'Souza SF, Venkatesha TV. *Talanta*, 2012, 99: 302–309
- 64 Zhang Q, Qiao Y, Zhang L, Wu S, Zhou H, Xu J, Song XM. *Electroanal*, 2011, 23: 900–906
- 65 Wang GX, Qian Y, Cao XX, Xia XH. *Electrochem Commun*, 2012, 20: 1–3
- 66 Zhang Q, Wu S, Zhang L, Lu J, Verproot F, Liu Y, Xing Z, Li J, Song XM. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 2632–2637
- 67 Yagatla AK, Minb J, Choa S. *J Electrochem Soc*, 2014, 161: 133–140
- 68 Xu Q, Gu SX, Jin L, Zhou Y, Yang Z, Wang W, Hu X. *Sensor Actuat B*, 2014, 190: 562–569
- 69 Li SJ, Chen TW, Xia N, Hou YL, Du JJ, Liu L. *J Solid State Electr*, 2013, 17: 2487–2494
- 70 Bai L, Yan B, Chai Y, Yuan R, Yuan Y, Xie S, Jiang L, He Y. *Analyst*, 2013, 138: 6595–6599
- 71 Zhang Q, Wu S, He M, Zhang L, Liu Y, Li J, Song X. *Acta Chim Sin*, 2012, 70: 2213–2219
- 72 Singh AK, Iqbal MW, Singh VK. *J Mater Chem*, 2012, 22: 15168–15174
- 73 Wehling T, Novoselov K, Morozov S, Vdovin EE, Katsnelson MI, Geim AK, Lichtenstein AI. *Nano Lett*, 2008, 8: 173–177
- 74 Ma Y, Zhang L, Li J, Ni H, Li M, Zhang J, Feng X, Fan Q, Hu Z, Huang W. *Chinese Sci Bull*, 2011, 56: 3583–3589
- 75 Wang Y, Shao Y, Matson DW, Li JH, Lin YH. *ACS Nano*, 2010, 4: 1790–1798
- 76 Guo J, Zhang T, Hu C, Fu L. *Nanoscale*, 2015, 7: 1290–1295
- 77 Yang Z, Cao Y, Li J, Jian Z, Zhang Y, Hu X. *Anal Chim Acta*, 2015, 871: 35–42
- 78 Xu J, Liu C, Wu Z. *Microchim Acta*, 2011, 172: 425–430
- 79 Wu P, Shao Q, Hu Y, Jin J, Yin Y, Zhang H, Cai C. *Electrochim Acta*, 2010, 55: 8606–8614
- 80 Hui J, Cui J, Xu G, Adeloju SB, Wu Y. *Mater Lett*, 2013, 108: 88–91
- 81 Wang Y, Tang L, Li Z, Lin Y, Li J. *Nature Protocol*, 2014, 9: 1944–1955
- 82 Carbone M, Gorton L, Antiochia R. *Electroanal*, 2015, 27: 16–31
- 83 Alwarappan S, Boyapalle S, Kumar A, Li CZ, Mohapatra S. *J Phys Chem C*, 2012, 116: 6556–6559
- 84 Liang B, Guo X, Fang L, Hu Y, Yang G, Zhu Q, Wei J, Ye X. *Electrochem Commun*, 2015, 50: 1–5

The applications of functionalized graphene in the third generation biosensor

Ling Zhang^{1,2}, Qian Zhang^{3*}

¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenyang Normal University of China, Shenyang 110034, China

² Institute of Catalysis for Energy and Environment, Shenyang Normal University of China, Shenyang 110034, China

³ College of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, China

*Corresponding author (email: zhangqianlnu@gmail.com)

Abstract: Graphene has attracted considerable attentions from electrochemical researchers due to its large specific surface area, integrated π - π conjugated structure and good biocompatibility and excellent electrical properties. However, intrinsic graphenes cannot be dispersed in most of solvents, weakly interact with the media and easily integrated, which greatly hampers their researches and potential utilities. In order to solve these problems, the methods of non-covalent, covalent modification and nitrogen-doped were applied to functionalize graphene. The synthesis of functionalized graphene extends the application of graphene in field of electrochemistry. Functionalized graphene was firstly applied in the third generation electrochemical biosensors since 2009 and the correlative reports increased in recent years. This review summarized the researches of functionalized graphene as novel modified electrode materials in the third-generation biosensors since 2009. Also, the related problems encountered in the development of the third-generation biosensor were also discussed.

Keywords: graphene, founctionalization, redox protein, the third generation biosensor

doi: 10.1360/N032015-00223