



Classified Index:

U.D.C:

A Dissertation for the Degree of M. Eng

**Studies on the preparation and properties
of functionalized carbon nanotubes**

Candidate: Zhao Haiyan

Supervisor: Prof. Zheng Wei

Academic Degree Applied for: Master of Engineering

Specialty: Materialogy

Date of Submission: December, 2009

Date of Oral Examination: March, 2010

University: Harbin Engineering University

哈尔滨工程大学 学位论文原创性声明

本人郑重声明：本论文的所有工作，是在导师的指导下，由作者本人独立完成的。有关观点、方法、数据和文献的引用已在文中指出，并与参考文献相对应。除文中已注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经公开发表的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者（签字）：赵海燕

日期：2010年3月1日

哈尔滨工程大学 学位论文授权使用声明

本人完全了解学校保护知识产权的有关规定，即研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权属于哈尔滨工程大学。哈尔滨工程大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件。本人允许哈尔滨工程大学将论文的部分或全部内容编入有关数据库进行检索，可采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文，可以公布论文的全部内容。同时本人保证毕业后结合学位论文研究课题再撰写的论文一律注明作者第一署名单位为哈尔滨工程大学。涉密学位论文待解密后适用本声明。

本论文（在授予学位后即可 在授予学位12个月后 解密后）由哈尔滨工程大学送交有关部门进行保存、汇编等。

作者（签字）：赵海燕

导师（签字）：郑卫

日期：2010年3月1日

2010年3月1日

摘要

自 1991 年发现碳纳米管以来,其特殊的结构,优异的物理、机械以及电化学性质备受科学家们广泛的关注。而碳纳米管卓越的电化学性质在新一代生物电化学传感器领域里具有十分诱人的前景。

众所周知,碳纳米管易聚集、难分散的特点使它的应用受到了极大的限制,在本论文中,为了改善碳纳米管的分散性,我们使用功能化的方法改善其分散性。首先,我们采用天然的生物高分子材料——海藻酸钠对碳纳米管进行非共价功能化。功能化的碳纳米管在水中能够形成黑色、均匀的悬浊液,并且在固体表面形成三维立体网状结构,有效增加了基体的面积。同时,在海藻酸钠-碳纳米管复合膜上的血红蛋白能够保持它的原始构象。固定在该复合膜上的血红蛋白能够实现较快的直接电子转移,电子转移速率常数 k_s 为 $(9.54 \pm 0.883) \text{ s}^{-1}$,而且对过氧化氢的电化学还原具有良好的生物电催化活性,以此构筑的生物传感器具有一定的应用可能性。

其次,我们在碳纳米管的缺陷处引入羧基,采用原位水热合成法制备碳纳米管-羟基磷灰石(MWNTs-HA)复合物。碳纳米管-羟基磷灰石复合物具有较好的分散性,能够在固体基底上形成均匀、三维多孔的立体网状结构。固定在此复合物上的血红蛋白能够保持其原始构象,而且血红蛋白能够较容易的实现直接电子转移,电子转移速率常数为 $(5.05 \pm 0.41) \text{ s}^{-1}$,同时对过氧化氢和三氯乙酸有较好的电化学催化活性。

我们进一步研究了葡萄糖氧化酶和漆酶在碳纳米管-羟基磷灰石上的直接电子转移。并以葡萄糖氧化酶催化葡萄糖为阳极,以漆酶催化氧气还原为阴极构筑了新型生物燃料电池。

关键词: 海藻酸钠-碳纳米管; 碳纳米管-羟基磷灰石; 生物电化学; 生物传感器

Abstract

Since their discovery in 1991, carbon nanotubes (MWNTs) have captured the imagination of scientists world-wide due to their unique structural, physical chemistry properties and electronic properties. The remarkable electrochemistry properties of MWNTs are useful for the electrochemical sensors.

As well known, the applications of MWNTs have been limited due to the properties of MWNTs which tend to aggregate and difficultly separate in most solvents. In this work, in order to improve the dispersion of MWNTs, we have tried to chemically functionalize the MWNTs. First, the noncovalence functionalization of MWNTs with sodium alginate (SA), the functionalized MWNTs could form stable uniformly dispersed black water solution, and form uniform three-dimensional reticular structure on the solid substrate and increase the surface area of substrate. The SA-MWNTs composite film retained the similar structure of hemoglobin (Hb), and the Hb entrapped in the composite film could achieved the direct electron transfer between Hb and SA-MWNTs modified electrode, with the electron transfer rate constant of $(9.54 \pm 0.883) \text{ s}^{-1}$. The Hb adsorbed onto the composite film had excellent bioelectrocatalytic activity to the reduction of hydrogen peroxide. The biosensor constructed in this way has much possibility in usage.

We intentionally introduced carboxyl group and synthesized hydroxyapatite (HA) by self-assembly method via an aqueous solution reaction. It is found that the MWNTs-HA could form stable uniformly dispersed black water solution, and form uniform three-dimensional reticular structure on the solid substrate. The MWNTs-HA composite film retained the similar structure of hemoglobin (Hb), and the Hb entrapped in the composite film could achieved the direct electron transfer between Hb and MWNTs-HA modified electrode, with the electron

transfer rate constant of $(5.05 \pm 0.41) \text{ s}^{-1}$. The Hb adsorbed onto the composite film had excellent bioelectrocatalytic activity to the reduction of hydrogen peroxide and TCA.

We further studied direct electron transfer of glucose oxidase and laccase on the MWNTs-HA composite film, and prepared a novel (MWNTs-HA) nanocomposite-based compartment-less glucose/O₂ biofuel cell with the glucose oxygen as the anodic biocatalysts and the laccase as the cathodic biocatalysts. It is important for the new biofull cell.

Keywords: Sodium alginate-carbon nanotube; Carbon nanotube-hydroxyapatite; Bioelectrochemistry; Biosensors

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 碳纳米管概述	1
1.1.1 碳纳米管的结构性质	1
1.1.2 碳纳米管的电化学性质	4
1.2 碳纳米管功能化方法	4
1.2.1 共价功能化	5
1.2.2 非共价功能化	7
1.3 碳纳米管在生物传感器中的应用	8
1.4 本论文选题背景及主要研究内容	9
第 2 章 实验方法	11
2.1 实验材料与仪器	11
2.1.1 实验材料	11
2.1.2 实验仪器	12
2.2 样品制备	13
2.2.1 电极的预处理	13
2.2.2 Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极的制备	13
2.2.3 碳纳米管-羟基磷灰石 (MWNTs-HA) 的制备	13
2.2.4 Hb/MWNTs-HA/GC 修饰电极的制备	14
2.2.5 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极的制备	14
2.2.6 漆酶的纯化	14
2.2.7 La/ MWNTs-HA/GC 修饰电极的制备	15
2.2.8 红外样品的制备	15
2.2.9 紫外样品的制备	15
2.3 本章小结	15
第 3 章 Hb/SA-MWNTs 生物传感器的研究	17

3.1 引言	17
3.2 SA-MWNTs 复合膜的表征	18
3.2.1 形貌和结构	18
3.2.2 电化学性能表征	20
3.3 Hb/SA-MWNTs 复合膜的性能表征	22
3.3.1 光谱表征	22
3.3.2 电化学性能研究	24
3.3.3 pH 的影响	28
3.3.4 Hb/SA-MWNTs/GC 对 H ₂ O ₂ 的电催化研究	29
3.4 本章小结	33
第 4 章 Hb/MWNTs-HA 生物传感器的性能研究	34
4.1 引言	34
4.2 MWNTs-HA 复合膜的表征	34
4.2.1 MWNTs-HA 的结构和形貌	34
4.2.2 MWNTs-HA 的电化学性能研究	37
4.3 Hb/MWNTs-HA 复合膜的表征	39
4.3.1 光谱表征	39
4.3.2 Hb/MWNTs-HA 的电化学性能研究	41
4.3.3 pH 的影响	44
4.3.4 Hb/MWNTs-HA 对 H ₂ O ₂ 的电催化研究	45
4.4 本章小结	49
第 5 章 MWNTs-HA 生物燃料电池的性能研究	51
5.1 引言	51
5.2 GOD/MWNTs-HA 复合膜的表征	52
5.2.1 GOD/MWNTs-HA 的光谱表征	52
5.2.2 GOD/MWNTs-HA 的电化学性能研究	53
5.2.3 pH 对 GOD/MWNTs-HA 的影响	56

5.2.4 GOD/MWNTs-HA 对葡萄糖催化性能研究	58
5.3 La/MWNTs-HA 的电化学性能研究.....	60
5.4 生物燃料电池性能研究.....	62
5.5 本章小结	63
结 论	64
参考文献	65
攻读硕士学位期间发表的论文和取得的科研成果	75
致 谢	76

第1章 绪论

1.1 碳纳米管概述

1991年,日本 NEC 公司的 S.Iijima 博士^[1]在用高分辨隧道电子显微镜观察氢气直流电弧放电后的阴极碳棒时,首次发现了一种碳原子组成的同轴多层的中空管,即碳纳米管(MWNTs)。碳纳米管具有独特的结构特征,以及奇异的力学、电学和磁学等性质,这些特殊的性质使碳纳米管广泛应用于诸多领域。因此碳纳米管受到全球物理、化学及材料等科学界的广泛关注,成为各个学科的研究热点。

1.1.1 碳纳米管的结构性质

碳纳米管是富勒碳家族的一个重要成员,晶形碳的另一种同素异性体,又称巴基管。理想的碳纳米管可看成是石墨烯片卷成的无缝、中空管的管体,既具有典型的层状中空结构特征^[2],且碳纳米管的直径很小,长径比较大,故可视为准一维纳米材料。虽然碳纳米管可看作是石墨烯片卷成的直径为纳米尺度的圆桶,但它的性质和结构却与石墨有很大差异。石墨是由 sp^2 杂化的碳原子形成的二维平面结构,而碳纳米管的管壁碳原子是以 sp^2 杂化为主的混合杂化态结构,与 sp^2 杂化的石墨和 sp^3 杂化的金刚石不同,碳纳米管的结构可以看成是石墨的六角形网格结构发生一定的弯曲而形成的空间拓扑结构,其中可形成一定的 sp^3 杂化键^[3]。而且,通过原子力显微镜和扫描隧道显微镜发现,在碳纳米管 sp^2 杂化网格中存在 sp^3 线性缺陷,采用从头算的方法,可以证明这类结构在碳纳米管中可以稳定存在。总之,碳纳米管中碳原子所形成的 σ 键会发生弯曲, σ 键具有部分 p 轨道特征, π 键具有部分 s 轨道特征,形成的化学键同时具有 sp^2 和 sp^3 混合杂化状态特征,但以 sp^2 杂化为主。

根据组成石墨烯片层数的不同,可将碳纳米管分为单壁碳纳米管(SWNTs)和多壁碳纳米管(MWNTs)。单壁碳纳米管是由单层石墨烯片绕合而

成的，结构具有较好的对称性与单一性，如图 1.1 所示。单壁碳纳米管还可看成是石墨烯平面在圆柱体上的映射，而且在映射过程中石墨烯层中的六边形保持不变，因此在映射时石墨烯片层中六角形网格和碳纳米管轴之间可能会出现夹角。根据碳纳米管中六边形沿轴向的不同取向可以将其分为锯齿型、扶手椅型和螺旋型三种，如图 1.2 所示。单壁碳纳米管的电学性能和力学性能根据结构的不同其性质也有所差异，扶手椅型单壁碳纳米管主要呈现为金属性，而锯齿型和螺旋型为半导体性或者金属性^[4]。

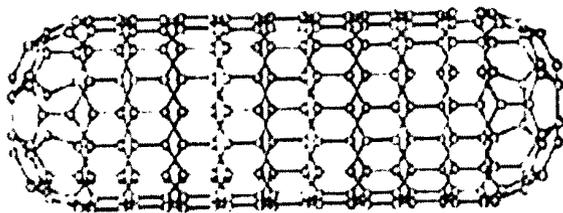


图 1.1 单壁碳纳米管

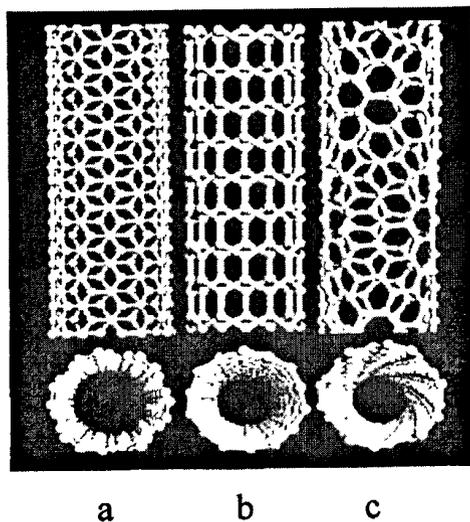


图 1.2 三种类型的单壁碳纳米管 (a) 扶手型 (b) 锯齿型 (c) 螺旋型

单壁碳纳米管的管径分布范围小，一般在 0.4-2.5 nm 之间，而长度可达几微米，端帽是由适当数目和位置的五元环和七元环构成。单壁碳纳米管间

存在较强的分子间作用力，容易聚集形成管束和管束环，形成类似于平面六角型的二维晶体结构^[5,6]，如图 1.3 所示。

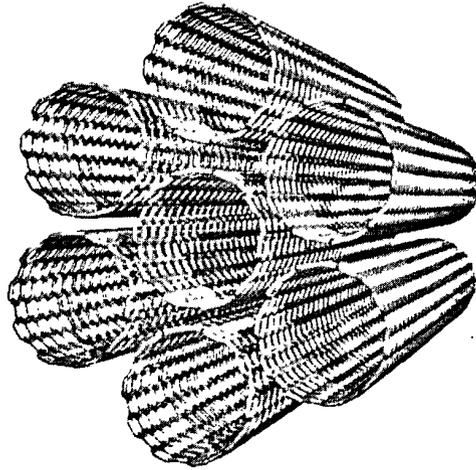


图 1.3 单壁碳纳米管管束

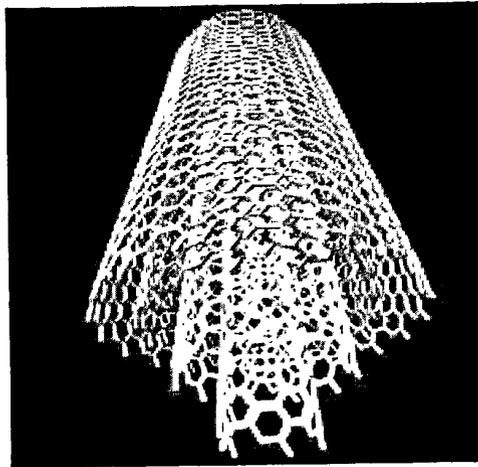


图 1.4 多壁碳纳米管

理想的多壁碳纳米管可以看成是不同直径的单层管同轴套构而成，其层数可以从二层到几十层，层与层之间主要存在范德华力，如图 1.4 所示。与石墨相比，多壁碳纳米管层间距略大，一般为 0.34 nm，而且层数越少层间距越大。多壁碳纳米管的实际结构比理论模型要复杂得多，在实际制备过程

中发现，碳纳米管的直径并不均匀，也不完全是直的，会出现 L、T、Y 型管等各种形状。

1.1.2 碳纳米管的电化学性质

碳纳米管主要由 sp^2 杂化的碳原子形成管壁，可形成高度离域化的 π 电子共轭体系，由于碳纳米管的端部存在五元环的缺陷以及由缺陷引起的维度弯曲，所以碳纳米管表面和端口碳原子具有比其它的石墨变体更大的反应活性。此外，将碳纳米管经酸氧化处理后，可以在其表面和端部引入大量含氧官能团和表面缺陷，为电化学反应提供更多的活性位点，这就大大提高了碳纳米管修饰电极的电化学反应活性。而且，碳纳米管管壁上高度离域化的 π 电子共轭体系，为发生加成反应提供了可能，而 π 电子共轭体系也可与其它的 π 电子体系发生 π - π 相互作用，形成非共价结合的复合物^[7,8]。碳纳米管还具有很大的比表面，为电化学反应提供了充足的反应场所。

碳纳米管具有如此众多的优异性能，因此在开发相关纳米器件、研制新型材料等方面都有着很大的现实意义。比如利用碳纳米管制备纳米复合材料，有希望制备出轻质、高强度，同时兼具功能特性的新型纳米复合材料。而在电化学领域，碳纳米管也将以优异的电催化性能为纳米科学研究开拓出更为广阔的应用领域。

1.2 碳纳米管功能化方法

凭借其独特的结构和特性，碳纳米管在多个领域具有潜在的应用前景，但在实际操作过程中，尚有许多亟待解决的问题。由于碳纳米管的表面能高，容易发生团聚；且与其他物质的浸润性很差，几乎不溶于任何溶剂，在使用过程中很难分散，这些问题极大的限制了碳纳米管的应用。要充分发挥碳纳米管的优越特性，必须使碳纳米管在溶剂中均匀的分散，为解决这一关键问题，众多研究者提出了对碳纳米管进行功能化的策略，以达到分散的目的。从目前的研究来看，碳纳米管的功能化主要分为共价功能化和非共价功能化两种方法，研究者针对这两种功能化方法进行了深入的研究。

1.2.1 共价功能化

碳纳米管最容易发生化学反应的区域是在碳纳米管的端部和管壁表面的五元环、七元环、 sp^3 杂化位置的缺陷以及碳纳米管晶格的空位缺陷，在这些缺陷处可以引入碳纳米管的共价功能基团，而引入的共价功能基团不但可以明显改善碳纳米管在有机溶剂和水溶液中的分散性，而且这些功能基团还可与其它的物质进行进一步的化学结合，使碳纳米管具有特殊的化学性质。因此对碳纳米管进行共价功能化引起了科学家的极大兴趣，也使得碳纳米管在纳米材料的舞台上更加活跃。

最初的共价功能化是对碳纳米管进行酸化氧化，在碳纳米管的缺陷位点、碳纳米管的端部以及在碳纳米管的晶格空位缺陷处连上-COOH 官能团，如图 1.5 所示。试验结果表明，这种共价功能化后的碳纳米管在水中有较好的分散性^[9]。

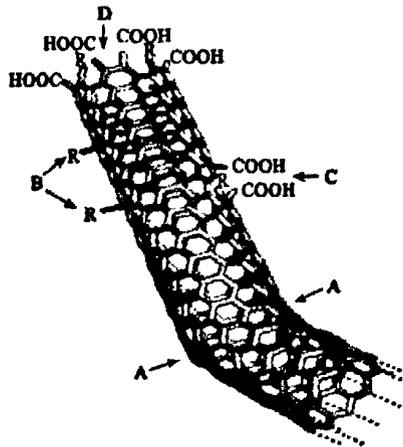


图 1.5 碳纳米管表面缺陷

Yang 等先对碳纳米管进行酸化处理后，在碳纳米管的侧壁引入官能团，再对带有官能团的碳纳米管进行共价功能化，最后得到了 Pd/f-MWNTs，如图 1.6 所示。试验结果表明在不使用表面活性剂的情况下，此物质在水中有较好的分散性^[10]。

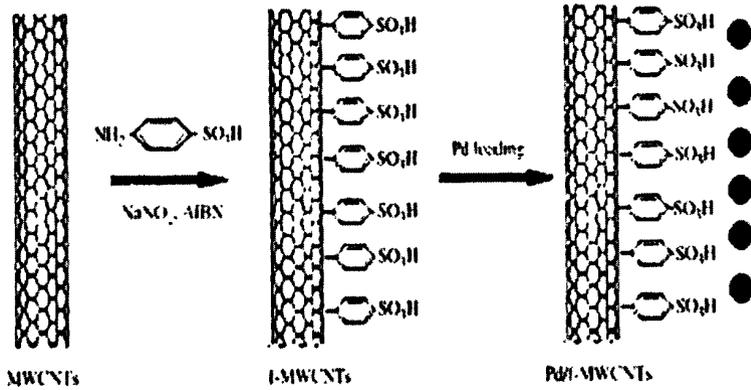


图 1.6 碳纳米管共价功能化示意图

Peng 等研究了碳纳米管与过氧化琥珀酰反应。首先在碳纳米管的管壁缺陷处引入羧基的烷基自由基，得到了羧基功能化的碳纳米管，如图 1.7 所示。然后将带有羧基烷基自由基的碳纳米管与各种二元胺反应，将其转化成氨基功能化的碳纳米管^[11]。

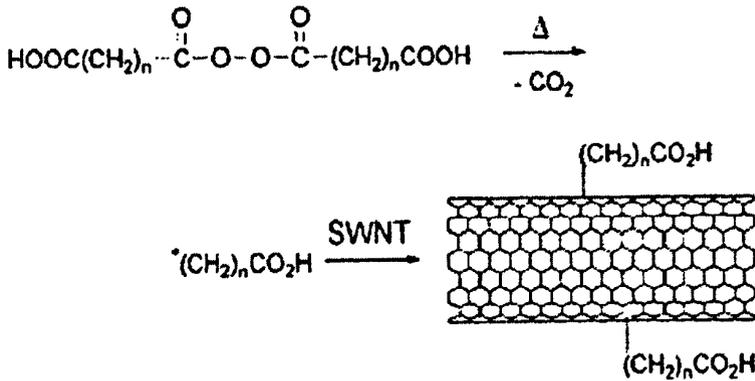


图 1.7 碳纳米管共价功能化示意图

Chen 等先将 SWNTs 氧化，然后再与 SOCl_2 反应，最后再与十八胺反应，使碳纳米管的管壁连接上长的脂肪链，此共价功能化后的碳纳米管在有机溶剂中有较好的分散性^[12]。

1.2.2 非共价功能化

碳纳米管侧壁碳原子的 sp^2 杂化主要是高度离域化的 π 键，这些 π 电子可以与其它物质通过 π - π 非共价键作用结合，而不改变碳纳米管本身的结构。因此与共价功能化相比，非共价功能化不会破坏碳纳米管本身的良好性质，同时还可以提高碳纳米管的分散性。

Smalley 等人将线性聚合物聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和磺化聚苯乙烯(PSS)通过 π - π 相互作用，将其分子链包裹到单壁碳纳米管的管壁上，如图 1.8 所示。实验结果表明，聚合物分子均匀、紧密的包裹在碳纳米管的管壁上，使得功能化后的碳管在水溶液中有较好的分散性^[13]。

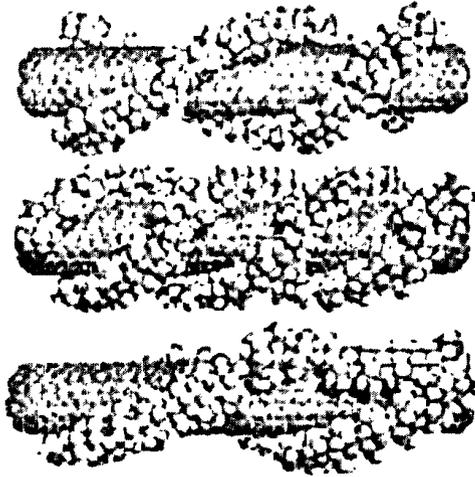


图1.8 聚乙烯基吡咯烷酮螺旋包裹碳纳米管示意图

Huang 等使用电化学沉积法，将聚苯胺包裹在碳纳米管管壁上。研究表明，此非共价功能化的碳纳米管能够溶于丙酮、四氢呋喃、N、N-二甲基甲酰胺等溶剂中。同时发现，聚苯胺分子与碳纳米管管壁之间的相互作用力为 π - π 相互作用^[14]。

Hu 等人使用刚果红(Congo red)通过 π - π 相互作用对单壁碳纳米管进行非共价功能化。试验结果表明，功能化后的碳纳米管在水溶液中有较好的分散性^[15]。Takuya 等人先将烯类单体(macromer)聚合成共聚物 MGP，再制备

PDMS-MGP 聚合物，然后对碳纳米管进行非共价功能化，如图 1.9 所示。结果表明，PDMS-MGP 和碳纳米管通过 π - π 相互作用结合在一起，功能化后的碳纳米管在三氯甲烷和正己烷中有较好的分散性^[16]。

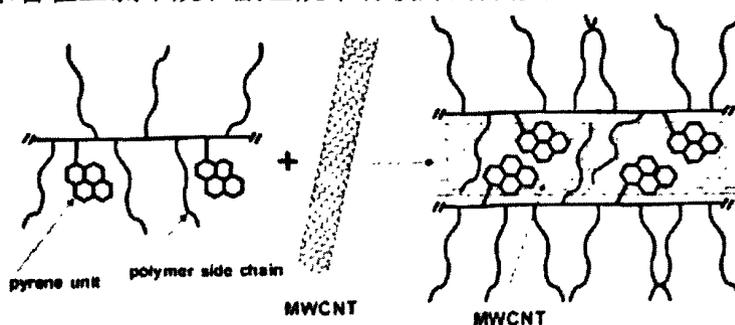


图 1.9 共聚物非共价功能化碳纳米管示意图

1.3 碳纳米管在生物传感器中的应用

自从发现碳纳米管以来，碳纳米管特殊的电化学性能就得到了人们广泛的关注，目前碳纳米管的修饰电极已经成为构建纳米生物传感器和纳米生物燃料电池研究领域的重要分支之一。

碳纳米管对生物分子活性中心的电子传递具有促进作用。Zhang 等人用纯化后的碳纳米管组装 1-乙基-3-甲基溴化咪唑翁，吸附血红蛋白制备成生物传感器，组装的碳纳米管界面不仅保持了血红蛋白的生物活性，并且能够实现血红蛋白在电极上的直接电子转移^[17]。Rahman 等人使用碳纳米管修饰电极制备了葡萄糖氧化酶的生物传感器，试验结果表明，修饰电极对葡萄糖检测的最低检测限只有 $1.3 \pm 0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，而且可以成功的应用于血清中葡萄糖的检测^[18]。Dong 等人利用层层组装技术将碳纳米管和赖氨酸通过静电作用力组装成多层复合膜，以此构筑了漆酶(La)为燃料的生物燃料电池阴极和脱氢酶(GDH)为燃料的生物燃料电池阳极，试验结果表明，此生物燃料电池的最大功率密度可达 $329 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ^[19]。

碳纳米管特殊的电化学活性、高的比表面以及高的导电性能使碳纳米管作为一种很好的电极材料在传感器制备中具有独特而广阔的应用前景。表

1.1 列举了碳纳米管作为修饰电极在传感器方面的研究。

表 1.1 碳纳米管在传感器方面的应用研究

修饰电极	检测物	参考文献
MWNTs/GC	H ₂ O ₂	[20]
(PDDA-MWNTs) ₅ /GC	CySH	[21]
PAA/MWNTs/GC	NADH	[8]
OH-MWNTs/PRN/GC	AA、UA、DA	[22]
PVIOs/MWNTs/SPE	AA	[23]
PPyox/MWNTs/GC	AA、UA、Uitrite、Dopamine	[24]
nPt/MWNTs/GC	Estriol、estrone、estradiol、serum	[25]
MWNTs/CFME	NO/fish liver	[26]

1.4 本论文选题背景及主要研究内容

碳纳米管因其独特的结构和性质被用作传感器的电极材料时，不仅可将纳米材料本身的物理、化学特性引入传感器，还可使传感器具有碳纳米管本身独特的优异性能，比如比表面积大、催化效率高、表面带有较多的功能基团，因此碳纳米管是一种理想的电极材料。基于碳纳米管的优越特性，我们的兴趣主要集中在碳纳米管的功能化及其在生物电化学传感器和生物燃料电池方面的研究。本论文的主要研究内容包括以下几个方面：

(1)利用天然的生物医用高分子材料海藻酸钠(SA)对碳纳米管(MWNTs)进行非共价功能化，以此构筑 Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极。探讨 SA-MWNTs 界面对 Hb 与电极之间的直接电子转移及蛋白质的活性的影响，同时研究 Hb/ SA-MWNT /GC 对 H₂O₂ 的催化。

(2)制备碳纳米管(MWNTs)-羟基磷灰石(HA)复合物，构筑 Hb/MWNTs-HA/GC 修饰电极。探讨 MWNTs-HA 对 Hb 与电极之间的直接电子转移及蛋

白质的活性的影响，研究该生物传感器对 H_2O_2 和 TCA 的催化性能。

(3)以 MWNTs-HA 为界面，固定葡萄糖氧化酶(GOD)，探讨 GOD 与电极之间的直接电子转移过程及蛋白质的活性，并以此作为生物燃料电池的阳极。同时制备生物燃料电池阴极 La/MWNTs-HA/GC，组装成隔膜型生物燃料电池，进一步探讨其性能。

第2章 实验方法

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 实验材料

实验中所用到的主要化学试剂详见表 2.1。

表 2.1 主要试剂

试剂名称	纯度	试剂厂家
海藻酸钠(SA)	分析纯	北京化学药品有限公司
多壁碳纳米管(MWNTs)	直径 10-30 nm	深圳纳米港有限公司
血红蛋白(Hb)	分子量 68000	Sigma 公司
葡萄糖氧化酶(GOD)	50 kU·g ⁻¹	Sigma 公司
漆酶(La)	57kD	Sigma 公司
牛血清蛋白(BSA)	生化试剂	Sigma 公司
2,2-连氨基二双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)	分析纯	Sigma 公司
过氧化氢(H ₂ O ₂)	30 wt.%	天津化学品有限公司
D-葡萄糖	分析纯	天津化学品有限公司
二茂铁甲酸	分析纯	上海茂剂化学药品公司
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	分析纯	哈尔滨市新春化工厂
硫酸胺	分析纯	哈尔滨市新春化工厂
三氯乙酸(TCA)	分析纯	哈尔滨市新春化工厂

2.1.2 实验仪器

实验所用小型仪器见表 2.2

表 2.2 实验所用小型仪器

仪器名称	厂家
TGL-16C 型离心机	上海安亭科学仪器厂
SK3300H 型超声仪	上海科导超声仪器有限公司
DZF-6050 型真空干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
冷冻干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
SHZ-958 型循环水式多用真空泵	巩义市英峪予华仪器厂
CP2245 电子天平	赛多利斯
Orion410A+型酸度剂	美国热电公司
恒温加热磁力搅拌器	上海振荣科学仪器有限公司

本试验使用电化学工作站 CHI650C 进行电化学性能的测量, 所有电化学试验均采用三电极体系。以修饰玻璃碳电极(GC)作为工作电极, 铂丝作为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。试验所需电解液为浓度 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钾缓冲溶液(PBS, pH=6.0 或 7.0), 电化学试验均在室温下进行($18\pm 2^\circ\text{C}$)。

红外光谱(FTIR)采用 PE Spectrum100 红外分光光度计进行测量。

紫外-可见吸收光谱(UV-vis)试验采用 UV-2250 型紫外分光光度计进行测量。

扫描电子显微镜(SEM)采用 Hitachi S4300-F 显微镜 (Hitachi Inc., Tokyo, Japan), 加速电压为 15 kV。

X 射线衍射分析在 PANalytical 公司的 X'pert Pro 多功能 X 衍射仪上进行。试验条件为 Co 靶 K_α 衍射, 管电压 40 KV, 管电流 40 mA, 扫速为

2°/min。

2.2 样品制备

2.2.1 电极的预处理

玻璃碳电极(GC, 直径 3 mm), 购买于天津艾达科技发展有限公司。首先用粒度 0.3 μm 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉在抛光布上进行打磨抛光, 然后在去离子水中进行超声清洗两次, 每次约 3~4 分钟, 最后用去离子水彻底冲洗。

2.2.2 Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极的制备

将一定量的碳纳米管(MWNTs)分散在去离子水中, 经过超声, 形成浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的悬浊液。然后向其中加入浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的海藻酸钠(SA)溶液, 继续超声 20 min 后得到均匀的黑色悬浊液(SA-MWNTs), 此悬浊液至少能稳定的存在两周。用微量注射器吸取 4 μL SA-MWNTs 悬浊液滴加在抛光清洗好的 GC 电极表面, 置于室温下自然晾干, 形成 SA-MWNTs/GC 修饰电极。

将制备好的 SA-MWNTs/GC 电极浸入浓度为 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Hb 溶液中, 并置于 4°C 冰箱中分别浸泡 4 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h 后, 将其取出并用去离子水冲洗, 以除去未吸附的 Hb, 从而得到 Hb 不同吸附量的 Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极。电极在不使用时可将其置于 4°C 冰箱中保存。

2.2.3 碳纳米管-羟基磷灰石 (MWNTs-HA) 的制备

据文献^[27]报道, 采用稀酸回流可制备带有羧基(-COOH)的碳纳米管。本试验的具体过程如下: 首先将 50 mg 多壁碳纳米管加入到 100 mL 浓度为 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HNO_3 溶液中, 此溶液封口后超声 1 h, 然后在 80°C 下回流 10h, 最后用去离子水多次洗涤、过滤, 并在真空干燥箱内干燥 24 h, 以待备用。

将干燥的碳纳米管 20 mg 加入到 5 mL 蒸馏水中超声 30 min, 使其变为黑色悬浊液, 然后将 CaCl_2 逐滴加入此溶液中使 CaCl_2 浓度为 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,

搅拌 1 h 后, 将 5 mL 浓度为 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2HPO_4 溶液逐滴加入到此溶液中, 剧烈搅拌 1 h, 然后静置沉淀 12 h。所得沉淀物进行多次洗涤、过滤, 以除去未反应的物质, 最后在 40°C 下真空干燥 24 h, 得到 MWNTs-HA 粉末。

2.2.4 Hb/MWNTs-HA/GC 修饰电极的制备

将一定量的 MWNTs-HA 分散到蒸馏水中, 连续超声约 1 h, 得到浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黑色悬浊液, 用微量注射器吸取 $10 \mu\text{L}$ 悬浊液滴加在抛光清洗好的 GC 电极表面, 置于室温下晾干, 形成 MWNTs-HA/GC 修饰电极。

将制备好的 MWNTs-HA/GC 电极浸入浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hb 溶液中, 浸泡 24 h 后得到 Hb/MWNTs-HA/GC 修饰电极。电极在不使用时可置于 4°C 中保存。

2.2.5 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极的制备

将制备好的 MWNTs-HA/GC 电极浸入浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖氧化酶 (GOD) 中, 并在 4°C 冰箱中浸泡 12 h, 即可得到 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极。电极在不使用时可置于 4°C 中保存。

2.2.6 漆酶的纯化

将透析袋浸泡在浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 溶液中, 放置 30 min 后更换新鲜的 EDTA 溶液重新浸泡, 反复进行三次, 每次浸泡 30 min。将浸泡后的透析袋放入去离子水中加热至 80°C , 并保温 0.5 h, 最后用去离子水冲洗。将 40 mg 漆酶 (La) 加入到 0.5 mL 磷酸缓冲溶液中 ($\text{pH}=6.0$), 漆酶溶解后将混合液转移到透析袋中, 并将此透析袋浸泡到 $\text{pH}=6.0$ 的磷酸缓冲溶液中进行搅拌, 1 h 后更换新鲜的缓冲溶液, 并将其放入冰箱中继续透析 24 h。最后将透析袋中的溶液移入离心管中, 并向此溶液中加入适量的硫酸铵使其浓度达到饱和 (0°C 时其饱和溶解度为 $361 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 产生的悬浊液在 5000 rpm 下离心 5 min, 移走上层清液, 沉淀物用尽量少的磷酸缓冲溶液 ($\text{pH}=6.0$) 溶解, 再向其中加入饱和的硫酸铵, 再次离心沉淀,

除去上清液。得到的沉淀用尽量少的磷酸缓冲溶液(pH=6.0)溶解，并将此溶液转移到透析管中，在 8000 rpm 下离心 5 min，进行透析浓缩，最终得到的漆酶溶液(浓度没有标定)存在 4℃的冰箱中。

2.2.7 La/MWNTs-HA/GC 修饰电极的制备

用微量注射器先后吸取 8 μL 漆酶 (La)溶液和 2 μL 浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白(BSA)溶液，得到 La-BSA 混合液，将其滴涂到 MWNTs-HA/GC 电极表面，并用 2 μL 浓度为 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的戊二醛进行交联，修饰电极在室温下干燥，即可得到 La/MWNTs-HA/GC 修饰电极。该电极不使用时，可将其放在 4℃下保存。

2.2.8 红外样品的制备

分别将 SA 溶液，MWNTs，MWNTs-COOH 和 MWNTs-HA 的悬浊液，Hb 和 GOD 溶液均匀涂在干净的玻璃片上，晾干成膜后，从玻璃片上刮下少许和 KBr 混合压片后进行红外测试。

对于 Hb/SA-MWNTs，首先将 SA-MWNTs 溶液均匀涂在干净的玻璃片上，然后将血红蛋白溶液滴到此溶液上，晾干成膜后从玻璃片上刮下少许和 KBr 混合压片后进行红外测试。Hb/MWNTs-HA 和 GOD/MWNTs-HA 红外样品的制备方法同上。

2.2.9 紫外样品的制备

分别将 SA-MWNTs 悬浊液，Hb 溶液，Hb 和 SA-MWNTs 的混合溶液，均匀涂在干净的石英玻璃上，在空气中晾干后进行紫外测定。制备 MWNTs-HA 和 Hb/MWNTs-HA，GOD/MWNTs-HA 的紫外样品时方法同上。

2.3 本章小结

本章详细介绍了制备 SA-MWNTs、MWNTs-HA 复合膜的过程，并以此为界面制备了 Hb/SA-MWNTs/GC、Hb/MWNTs-HA/GC、GOD/MWNTs-

HA/GC、La/MWNTs-HA/GC 修饰电极。同时还介绍了红外和紫外样品的制备和表征方法。

第3章 Hb/SA-MWNTs 生物传感器的研究

3.1 引言

海藻酸钠又称褐藻酸钠，是一类从褐藻类的细胞壁中提取出来的天然多糖，主要化学成分为甘露糖醛酸和古洛糖醛酸，亲水性极强，溶于水后成为半透明的粘稠胶体溶液并带有腥味，其分子式如图 3.1 所示。海藻酸钠具有很好的溶胶-凝胶特性，优良的生物相容性、无毒副作用，以及可控的生物降解性、无抗原体等特征，已被广泛应用于工业、农业和医药等众多领域中。

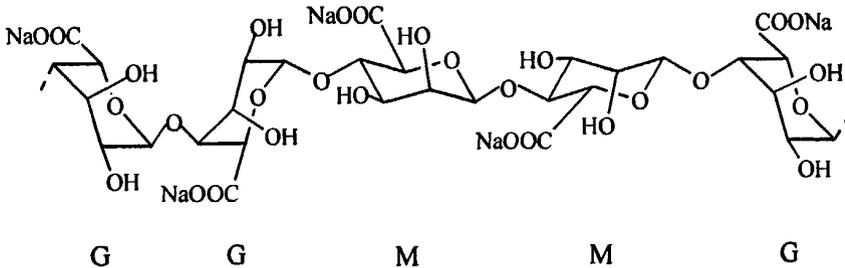


图 3.1 海藻酸钠分子式

碳纳米管管壁的 sp^2 杂化使管壁上形成大 π 键共轭体系，可与其它的 π 电子体系发生 π - π 作用，形成非共价结合的复合物，而碳纳米管本身的结构并没有被破坏，同时又可以有效改善碳纳米管的亲水性。因此我们将利用海藻酸钠对碳纳米管进行非共价功能化，在改善碳纳米管在水中分散性的同时，依靠 SA 很好的生物相容性来进一步提高碳纳米管的生物相容性，使其能够为用于制备新一代生物传感器提供良好的基础。

血红蛋白由四个亚基构成，分别为两个 α 亚基和两个 β 亚基。每个亚基由一条肽链和一个血红素分子构成，而亚铁血红素基团位于血红蛋白表面各亚基的裂隙空穴中，是血红蛋白的活性中心，其结构如图 3.2 所示。血红蛋白作为高等生物体内运载氧的蛋白质，在生物体内尤为重要。为了更深入的研究血红蛋白在生物体内的机制，人们开始关注血红蛋白在电极上的直接电子转移，但是在研究血红蛋白的直接电子转移时发现血红蛋白很难在裸

电极上实现直接的电子转移。据文献报道^[28]这主要是因为血红蛋白的活性中心被深埋在肽链内部，与电极的距离较远，且血红蛋白在电极表面上的吸附固定较易使其失去活性。因此如何实现血红蛋白在裸电极上的直接电子转移成为研究的热点。

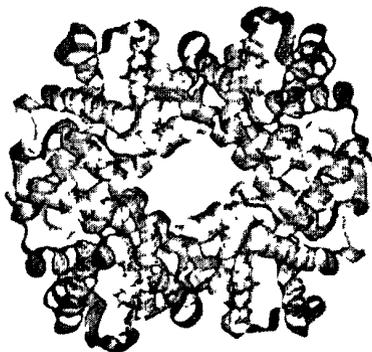


图 3.2 血红蛋白结构

本章使用海藻酸钠非共价功能碳纳米管作为血红蛋白的固定界面，研究血红蛋白的直接电化学和电催化行为，它的研究对了解蛋白质在生命体内的电子转移机制和生理作用具有重要意义，而且为开发新型生物传感器提供了重要的理论基础。

3.2 SA-MWNTs 复合膜的表征

3.2.1 形貌和结构

碳纳米管表面有较强的范德华力，且表面能较高，容易发生团聚，几乎不溶于任何溶剂^[29]。图 3.3(a) 表明，没有经过任何功能化的碳纳米管水溶液超声 1 h 后静置，碳纳米管立刻开始团聚，几分钟后出现明显的分层现象。而用生物大分子海藻酸钠非共价功能化的碳纳米管超声 30 min 后，其水溶液变为均一的、深黑色的悬浊液，并且此悬浊液在静置两周以后，仍然没有看到明显的分层现象，如图 3.3(b) 所示。据文献报道，生物大分子通过 π - π 键可以包裹在碳纳米管的侧壁^[30]，以提高碳纳米管在水中的分散性。因此我们认为海藻酸钠这样的生物大分子是通过 π - π 键缠绕在碳纳米管的侧壁从而

改善了它的分散性。同时海藻酸钠是天然的生物大分子材料，具有较好的生物相容性，利用海藻酸钠对 MWNTs 进行非共价功能化，有利于更好的提高 MWNTs 的生物相容性，为制作生物传感器奠定了有利的基础。

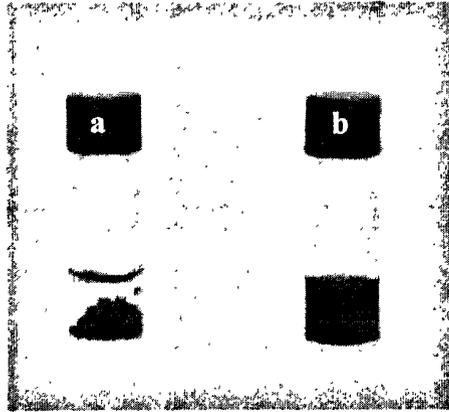


图 3.3 碳纳米管在不同溶剂中的分散照片 (a) H₂O (b) SA

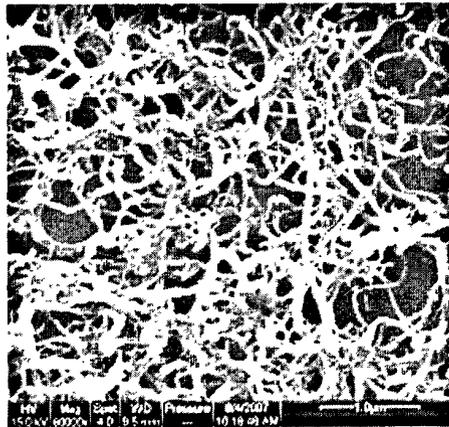


图 3.4 SA-MWNTs 复合物的 SEM 图

此外，我们采用扫描电镜(SEM)表征了 SA-MWNTs 复合膜的表面形貌，结果如图 3.4 所示。由图中可以看出，经过 SA 非共价功能化的碳纳米管能够均匀地分散在固体基底上，并形成均匀的、多孔的三维立体结构，大大增加了基底的有效面积。

同时我们还采用红外光谱对SA和SA-MWNTs进行了表征，结果如图 3.5所示。从图中我们可以看到，对于SA，其 1680 cm^{-1} 处为羧基O-C-O的非对称伸缩振动峰， 1416 cm^{-1} 处为羧基C-O-C的对称伸缩振动峰， 1031 cm^{-1} 对

应于C-H的伸缩振动峰^[31,32]。我们在SA-MWNTs的红外光谱图上也观察到了SA特征吸收峰，但是同SA的特征吸收峰相比，当SA吸附在MWNTs上，其位于1416 cm⁻¹处的特征吸收峰分裂成1401 cm⁻¹和1455 cm⁻¹两个特征吸收峰，表明SA和MWNTs之间可能存在电荷转移相互作用，这可能与MWNTs的电子和结构性质以及SA的分子结构紧密相关。

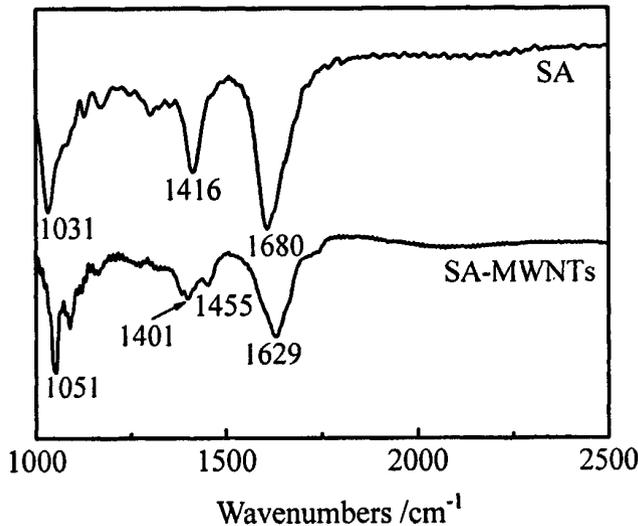


图 3.5 SA 和 SA-MWNTs 的红外光谱

3.2.2 电化学性能表征

$K_3[Fe(CN)_6]^{3-}/K_3[Fe(CN)_6]^{4-}$ 是电化学中经常用于分析电化学反应过程的氧化还原对，可以用来研究功能化碳纳米管电极的界面电子转移性质。图 3.6 是 SA-MWNTs 复合膜在 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} K_3[Fe(CN)_6] + 0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} KCl$ 溶液中的循环伏安曲线图，扫描速度依次为 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400、500 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 。从图 3.6 中可以观察到铁氰化钾的氧化峰电流与还原峰电流几乎相等，当扫描速度为 $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时，峰电位分别为 $E_{pc}=0.15 \text{ V}(\text{vs. SCE})$, $E_{pa}=0.21 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ ，峰电位差为 $\Delta E_p=60 \text{ mV}$ ，而且随着扫描速度的增加，氧化峰和还原峰的峰电流在逐渐增大，且氧化峰电位向正方向移动，还原峰电位向负方向移动，峰电位差值 ΔE_p 逐渐增大。图 3.7 为铁氰化

钾氧化峰电流和还原峰电流与扫描速度的关系，由图可知峰电流与扫描速度的平方根呈线性关系，说明铁氰化钾在 SA-MWNTs 复合膜界面上的氧化还原过程是受扩散过程控制的。

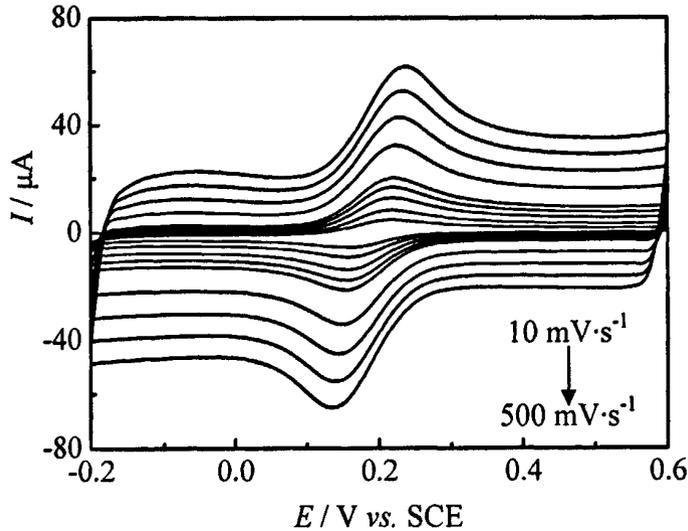


图 3.6 SA-MWNTs/GC 电极在含有 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 的 $1.0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中不同扫描速度下的循环伏安曲线

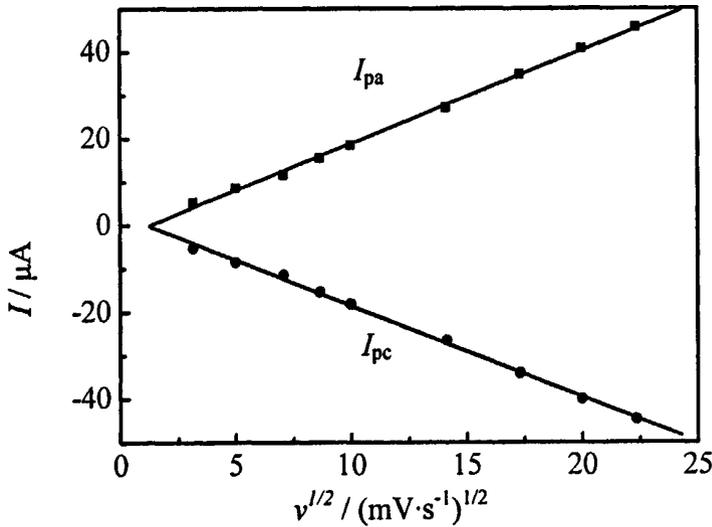


图 3.7 扫描速度与峰电流的关系

3.3 Hb/SA-MWNTs 复合膜的性能表征

3.3.1 光谱表征

蛋白质结构中的酰胺 I 和酰胺 II 基团的红外吸收光谱能够提供多肽链二级结构的信息，同时为蛋白质的变性提供依据。其中酰胺 I($1700-1600\text{ cm}^{-1}$)是由血红蛋白中的肽链骨架上的 C-O 伸缩振动引起的，而酰胺 II($1600-1500\text{ cm}^{-1}$)是由血红蛋白中的肽链骨架上的 N-H 键弯曲振动和 C-N 键的伸缩振动引起的^[31]。因此我们采用红外光谱研究了吸附在 SA-MWNTs 复合膜上 Hb 的结构，结果如图 3.8 所示。从图中可以看出，天然 Hb 的酰胺 I 和酰胺 II 对应的红外特征吸收峰分别位于 1655 cm^{-1} 和 1541 cm^{-1} 处，而 Hb 固定在 SA-MWNTs 复合膜后，其红外特征吸收峰为 1655 cm^{-1} 和 1535 cm^{-1} ，与天然 Hb 的结果非常类似，表明 Hb 在复合膜中保持了其天然的二级结构。

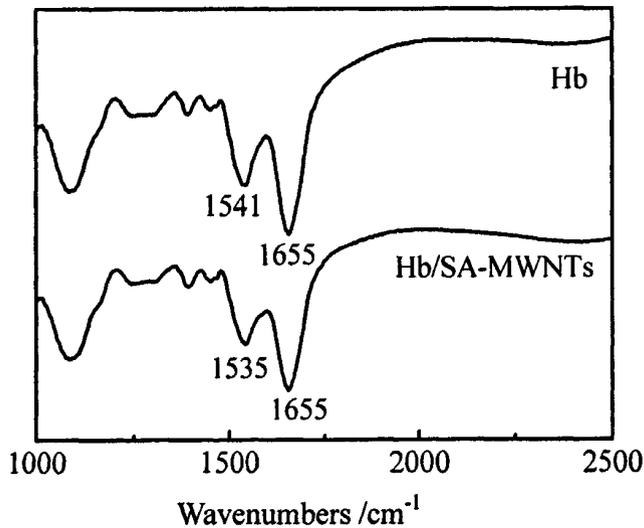


图 3.8 Hb 和 Hb/SA-MWNTs 的红外光谱

在紫外-可见吸收光谱中，血红素铁的索瑞吸收带(Soret band)的位置和强度可以提供有关血红素蛋白质的相关信息^[34]。图 3.9 为 Hb、Hb/SA-

MWNTs 和 SA-MWNTs 的紫外-可见吸收光谱。从图中可以看出,天然 Hb 的紫外特征吸收峰位于 410 nm 处,而固定在 SA-MWNTs 复合膜上的 Hb 紫外特征吸收峰位于 412 nm 处,与 Hb 的特征吸收峰相比,仅移动了 2 nm,因此我们认为 Hb 固定在 SA-MWNTs 复合膜上仍然能够保持其活性,这可能是由于生物大分子海藻酸钠具有很好的生物相容性,利用海藻酸钠对碳纳米管进行非共价功能后,形成的 SA-MWNTs 复合膜具有很好的生物相容性,为 Hb 提供了一个良好的微环境。同时,我们从图中还可以看到,SA-MWNTs 复合膜在 410 nm 左右没有任何特征吸收峰。另外,我们还利用紫外-可见吸收光谱研究吸附时间与 Hb 吸附量之间的关系。从图 3.10 中可以看出,随着 SA-MWNTs 复合膜在 Hb 溶液中浸泡时间的延长,Hb 特征吸收峰的强度在逐渐增加,表明 Hb 在复合膜表面中的吸附量在逐渐增大,这与后面的电化学性能表征的结果非常类似。

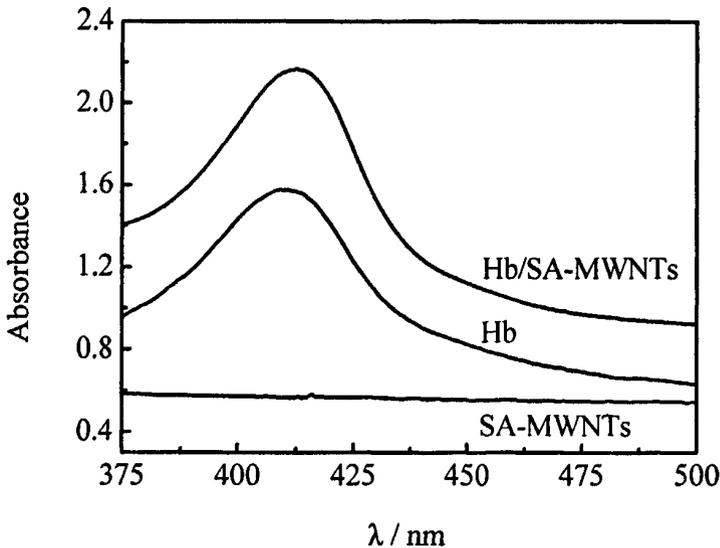


图 3.9 Hb、Hb/SA-MWNTs 和 SA-MWNTs 的紫外-可见吸收光谱

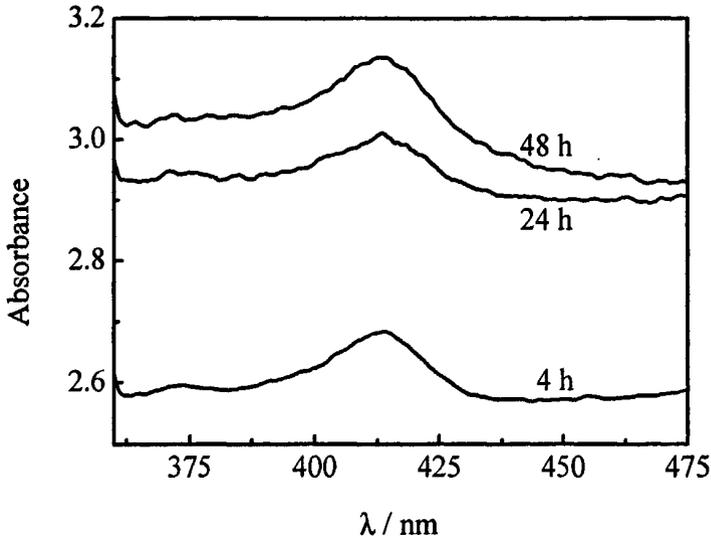


图 3.10 SA-MWNTs 复合膜在 Hb 中浸泡不同时间的紫外-可见吸收光谱

3.3.2 电化学性能研究

将 SA-MWNTs/GC 浸泡在浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Hb 中不同时间后，形成的 Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极在 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液(PBS, pH 7.0)中 N_2 饱和状态下的循环伏安曲线如图 3.11 所示，扫描速度为 $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从图中可以看出，在 SA-MWNTs/GC 上没有观察到任何氧化还原峰，但是，在相同的实验条件下，在 Hb/SA-MWNTs/GC 上出现一对非常明显的氧化还原峰，其峰电位分别为 $E_{\text{pa}}=-0.32 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ ， $E_{\text{pc}}=-0.39 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ 。式量电位 $E^0=-0.355 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ ，这个电位值非常接近于 Hb 中亚铁血红素辅基电活性中心 Fe(III)/Fe(II) 氧化还原对用电势法测得的电位($-0.30 \text{ V}\sim-0.45 \text{ V}$)，并且与其它文献报道的 Hb 式量电位值非常接近，如表 3.1 所示。同时，从图中我们还可以看出，其氧化峰与还原峰的电位差为 $\Delta E_p=70 \text{ mV}$ ，这表明 SA-MWNTs 复合膜大大提高了 Hb 与 GC 之间的直接电子传递。这可能是由于 SA-MWNTs 复合膜具有良好的生物相容性，形成的三维网络结构能够提供 Hb 一个良好的吸附环境，保持 Hb 的活性，从而促进了 Hb 与电

极之间的直接电子传递。

此外，从图 3.11 中还以观察到 Hb/SA-MWNTs/GC 的峰电流随着电极在 Hb 中浸泡时间的延长而逐渐增大，这表明随着吸附时间的增加，Hb 在 SA-MWNTs 复合膜的界面上吸附量增多，这个结果与我们紫外-可见吸收光谱的结果相一致。但是当浸泡时间达到 48 h 后，峰电流不再增加，表面 Hb 在 SA-MWNTs 复合膜上的吸附量达到饱和，因此在本研究中我们采用修饰电极在 Hb 中的浸泡时间为 48 h。

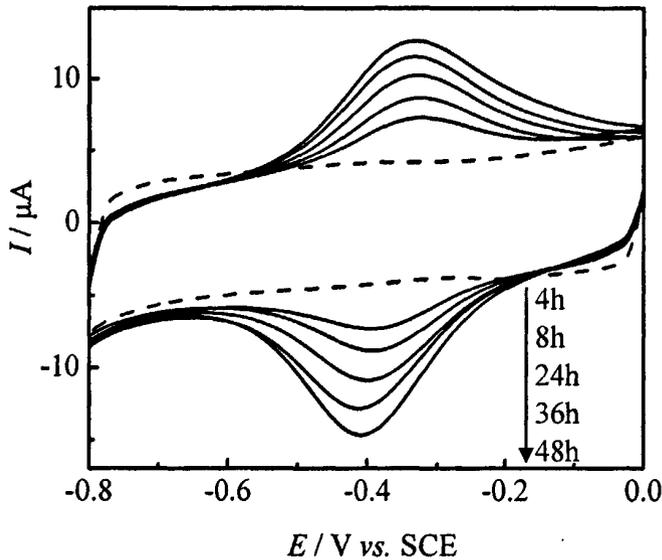


图 3.11 SA-MWNTs (虚线) 和 SA-MWNTs/GC 浸泡在 Hb 中不同时间 (实线) 的循环伏安曲线

表 3.1 Hb 不同电极上的 $E^{0'}$

电极	pH	$E^{0'}/V$	参考文献
Hb/SA-MWNTs	7.0	-0.355(SCE)	本文中
Hb/clay	7.0	-0.347(SCE)	[35]
Hb-CHT/nano CaCO ₃	7.0	-0.375(SCE)	[36]
Hb/gelatin-MWNTs	7.0	-0.35(SCE)	[7]
Chit/{UND/Hb} ₃	7.0	-0.34 (SCE)	[37]
Hb/TiO ₂ -NTs	7.0	-0.34(SCE)	[38]

图 3.12 是 Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极在 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液中不同扫描速度的循环伏安曲线，扫描速度依此为 100、200、300、400、500、600、700、800、900 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从图中可以看出，随着扫描速度的增加，氧化峰电位和还原峰电位分别向正方向和负方向移动，同时峰电流也在逐渐增大，而峰电位差 ΔE_p 的增加却比较缓慢，并且由图 3.13 可知，氧化还原峰电流 I_p 与扫描速度 v ($v < 900 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) 呈线性关系，说明 Hb 在 SA-MWNTs 界面上的氧化还原过程是受表面过程控制的。

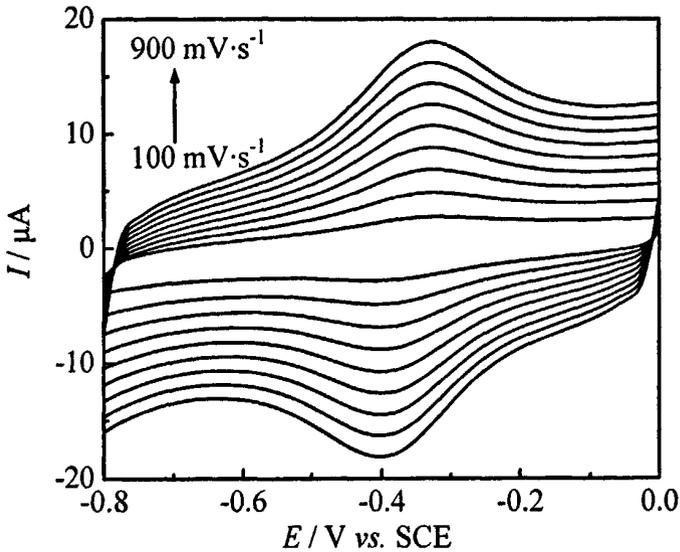


图 3.12 Hb/SA-MWNTs 修饰电极在不同扫描速度下的循环伏安曲线

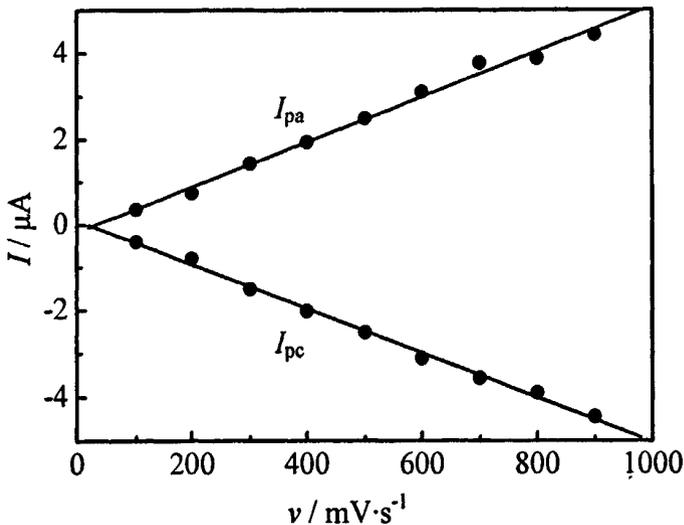


图 3.13 峰电流与扫描速度的关系

Hb 在 SA-MWNTs 复合膜上的表面覆盖度 Γ 可以根据 Faraday 方程(3-1) 计算:

$$Q = nFA\Gamma \quad (3-1)$$

式中: Q ——电量;

F ——法拉第常数, 值为 $96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$;

n ——电子转移数, 值为1;

A ——GC 的表面积, 0.007065 cm^2 。

因此我们计算出 Hb 在 SA-MWNTs 复合膜上表面覆盖度 Γ 为 $(3.98 \pm 0.249) \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

我们在研究峰电位和扫描速度的关系时发现, 当 $v > 2000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, $\Delta E_p > 200 \text{ mV}$, 此时电极反应变得不可逆。我们可以根据峰电位和扫描速度的关系, 利用Laviron方程^[39](3-2)、(3-3)、(3-4)可以计算出Hb在SA-MWNTs 复合膜修饰电极表面直接电子传递的速率常数 k_s 。

$$E_{p,c} = E^{0'} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{RTk_s}{\alpha nF} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln v \quad (3-2)$$

$$E_{p,a} = E^{0'} - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{RTk_s}{(1-\alpha)nF} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln v \quad (3-3)$$

$$\Delta E_p = \frac{RT}{\alpha(1-\alpha)nF} \ln v + \frac{RT}{\alpha(1-\alpha)nF} \left\{ \alpha \ln(1-\alpha) + (1-\alpha) \ln \alpha - \ln \frac{RT}{nF} - \ln k_s \right\} \quad (3-4)$$

式中: R ——摩尔气体常数, 值为 $8.3145 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$;

F ——法拉第常数, 值为 $96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$;

n ——电子转移数, 值为1;

T ——开氏温度, 值为 298 K ;

v ——扫描速度, 单位为 V/s ;

ΔE_p ——峰间距, 单位为 V ;

E_{pc} ——阴极峰电位, 单位为 V ;

E_{pa} ——阳极峰电位, 单位为 V ;

α ——电子传递系数;

k_s ——电子转移速率常数，单位为 s^{-1} ；

我们计算出的 k_s 值为 $(9.54 \pm 0.883) s^{-1}$ ，这个值要明显大于一些文献中报道的值，如表 3.2 所示。这表明 Hb 在 SA-MWNTs 界面上的电子转移速率较快，这可能是因为 SA-MWNTs 能够为 Hb 提供一个良好的微环境，同时使 Hb 保持了一个有利的朝向，大大缩短了固定在 SA-MWNTs 界面上的 Hb 内部的活性基团和 GC 之间的距离，从而加快了它们之间的电子传递速率^[40]。因此，SA-MWNTs 可用来制备高灵敏度的生物传感器。

表 3.2 Hb 在不同电极上的 k_s 值

电极	$k_s(s^{-1})$	参考文献
Hb/nano-CdS	0.291	[41]
Hb/CHT/nano-CaCO ₃	1.8	[36]
Hb/MWNT-DDAB	2.41	[42]
Hb/MWNTs	0.062	[43]
Hb/meso-Al ₃ O ₂	3.17	[44]

3.3.3 pH 的影响

众所周知，酶或蛋白质固定在带电荷的界面上时常会导致其电活性的 pH 值发生一定的移动，因此我们研究了溶液 pH 对蛋白质或酶的电化学性质的影响。图 3.14 是 Hb/SA-MWNTs/GC 电极在不同 pH 值的 $0.10 mol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线。从图中我们可以看出，随着缓冲溶液 pH 值的增加，Hb 的氧化还原峰电位向着负方向移动，并且在 pH5.0 到 pH9.0 范围内，Hb 的式量电位 E^0 、氧化峰电位 E_{pa} 和还原峰电位 E_{pc} 与缓冲溶液的 pH 值之间呈线性关系，如图 3.15 所示。从图中可以看出，它们的斜率分别为 $-44.80 mV \cdot pH^{-1}$ ， $-43.83 mV \cdot pH^{-1}$ 和 $-45.77 mV \cdot pH^{-1}$ ，这些值要比一个电子和一个质子反应的理论值 $-57.6 mV \cdot pH^{-1}$ ($25^\circ C$) 小^[45]，这可能是由于血红蛋白中的活性基团血红素周围氨基酸的质子化不是一个简单的过程，而是受血

红素轴配位基团和水合铁离子的质子化作用的共同影响^[46]。

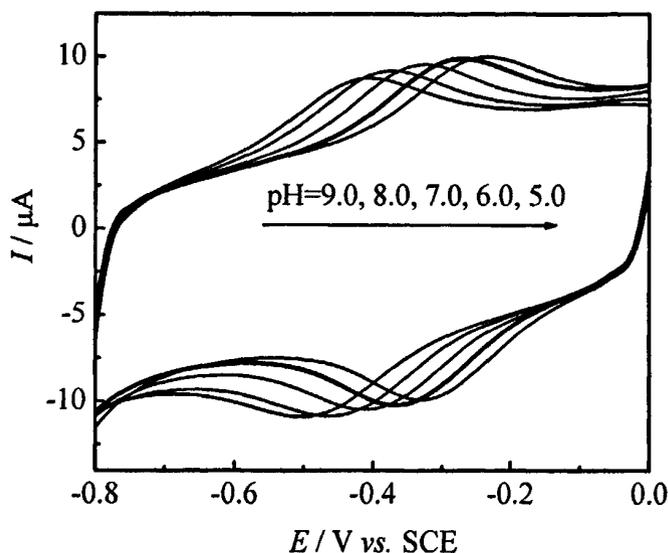


图 3.14 Hb/SA-MWNTs 在不同 pH 值缓冲液中的循环伏安曲线

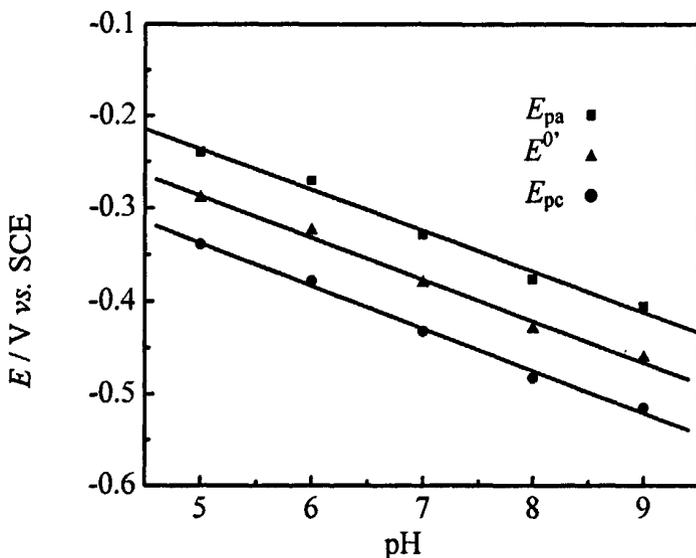


图 3.15 峰电位和 pH 的关系

3.3.4 Hb/SA-MWNTs/GC 对 H_2O_2 的电催化研究

过氧化氢广泛应用于饮用水处理、纺织品漂白、造纸工业、食品工业、医药工业以及家用洗涤剂制造等各个领域，但是过量的过氧化氢会对生物体

产生严重危害，因此如何快速有效的检测过氧化氢就显的尤为重要。与传统的 KMnO_4 滴定分析法相比，电化学检测是快速灵敏的检测手段，其中酶生物传感器的检测法以灵敏度高、成本低廉而受到人们广泛的关注^[47]。

图3.16为Hb/SA-MWNTs/GC电极对不同浓度的 H_2O_2 在 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液氮气饱和状态下的循环伏安曲线。由图可知，当在溶液中加入 H_2O_2 后，在 -0.40 V (vs. SCE)附近的还原峰电流明显增加，同时伴随着氧化峰电流减小，这是一个典型的电催化还原 H_2O_2 的特征，并且随着溶液中 H_2O_2 浓度的增加，还原峰电流逐渐增大，并伴随有氧化峰电流逐渐消失，这表明此电极对 H_2O_2 有很好的电化学催化活性，其中Hb催化 H_2O_2 电化学还原的反应方程式如下^[48]：

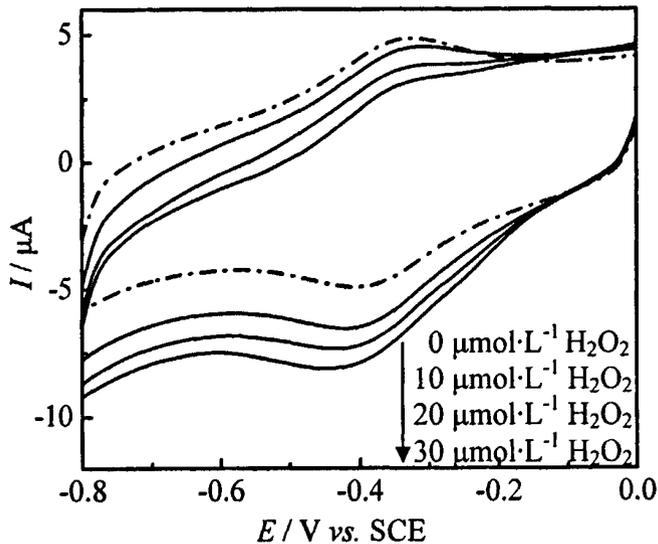


图 3.16 Hb/SA-MWNTs/GC 电极对 H_2O_2 催化的循环伏安曲线

图3.17是Hb/SA-MWNTs/GC电极在 -0.4 V (vs. SCE)处的计时电流曲线。

从图中可以看出，每当向溶液中加入 H_2O_2 时，其还原电流都在增加，并且当每次增加 H_2O_2 约10 s后，响应电流值可达到稳定状态，说明此电极对 H_2O_2 的催化有较高的灵敏度。

图 3.17 中的插图 A 是 H_2O_2 的浓度与电流增加的关系图。由图可知，当 H_2O_2 的浓度在 $40\text{--}200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内时，浓度与电流变化 ΔI 呈线性关系，其线性方程为 $\Delta I/\text{nA} = 42.86 + 15.87C/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，($R = 0.995$)。根据线性方程，在信噪比为 3 时，可计算出 H_2O_2 浓度的最低检测限为 $16.41 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当 H_2O_2 浓度大于 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，电流增加相对平缓，出现了一个平台，表现出酶电极典型的 Michaelis-Menten 动力学特征，根据 Lineweaver-Burk 方程^[49] (3-8)作图得到图 3.17 中的插图 B，

$$1/I_{ss} = (1/I_{\max}) + (K_m^{\text{app}}/I_{\max}c) \quad (3-8)$$

式中： I_{ss} ——加入 H_2O_2 浓度后的稳定电流；

I_{\max} ——为 H_2O_2 浓度达到饱和时的最大电流；

c ——为 H_2O_2 浓度；

K_m^{app} ——为米氏常数。

根据该图的直线斜率和截距，我们计算出 $K_m^{\text{app}} = 0.533 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，该米氏常数与其它纳米材料的米氏常数相比较小，如表 3.3 所示，所以此生物传感器的灵敏度比较高。

为了进一步证明此生物传感器具有一定的应用前景，我们用制备的 Hb/SA-MWNTs/GC 生物传感器测量了三种不同品牌的医用消毒水中 H_2O_2 的浓度，测量时需将样品中 H_2O_2 浓度稀释到生物传感器的线性范围内，根据检测的电流和线性方程，计算出样品中 H_2O_2 浓度如表 3.4 所示。同时，为了检验生物传感器的可靠性，对比了采用滴定高锰酸钾的方法得到的结果。从表 3.4 中可以看出，Hb/SA-MWNTs/GC 生物传感器具有很好的可靠性及有效性。

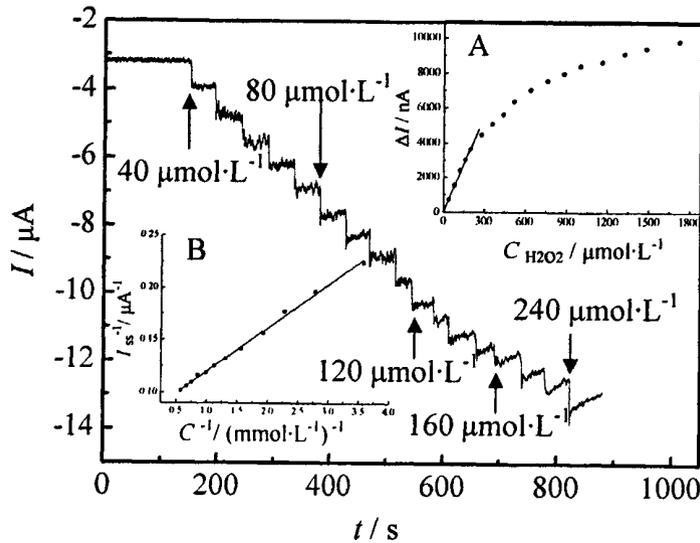


图 3.17 Hb/SA-MWNTs/GC 电极对 H_2O_2 响应的时间-电流曲线

表 3.3 Hb 在不同电极上的 K_m^{app} 值

电极	K_m^{app} ($mmol \cdot L^{-1}$)	参考文献
Hb/MWNTs	0.675	[43]
PVA/Hb/MWNTs/CILE	0.928	[50]
Nafion-Hb/MWNTs	41	[51]
Hb/IL/CILE	7.5	[52]
Hb/TritonX-100	4.27	[53]

表 3.4 两种方法对 H_2O_2 的检测 ($n = 5$)

样品	H_2O_2 生物传感器 ($mmol \cdot L^{-1}$)	$KMnO_4$ 滴定 ($mmol \cdot L^{-1}$)
1	0.65 ± 0.099	0.635
2	0.92 ± 0.054	0.925
3	0.71 ± 0.073	0.726

另外，我们还考察了生物传感器 Hb/SA-MWNTs/GC 的稳定性，将此生物传感器放在磷酸缓冲溶液中，在 $4^\circ C$ 下储存三周后，发现此传感器对 H_2O_2 的响应为最初的 90%，检测 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的 H_2O_2 时，其相对误差限为

2.48%，所以此传感器的稳定性较好。

3.4 本章小结

本章利用海藻酸钠非共价功能化碳纳米管固定 Hb，制备了 Hb/SA-MWNTs/GC 复合膜修饰电极，对 Hb 的生物活性和 Hb/SA-MCNTs/GC 的电化学性质进行了研究，得出以下结论：

(1) SEM 实验结果表明，经 SA 功能化的碳纳米管在水溶液中具有很好的分散性，能够在固体基底上形成均匀、三维多孔的立体网状结构，从而增大基底的有效面积。

(2) 红外光谱和紫外-可见光谱研究表明，Hb 固定在 SA-MWNTs 复合膜上基本能够保持其原始构象。

(3) 电化学研究表明，吸附在 SA-MWNTs 复合膜中的 Hb 在 -0.355 V(vs. SCE)附近出现了一对可逆的氧化还原峰，为血红素基团中 Fe(III)/Fe(II) 氧化还原电对的特征峰，电活性 Hb 的表面覆盖度可达 $(3.98 \pm 0.249) \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，并且电子转移速率常数 k_s 为 $(9.54 \pm 0.883) \text{ s}^{-1}$ ，大大加快了 Hb 与电极之间的电子传递速率。

(4) 同时，Hb/SA-MWNTs/GC 修饰电极对 H_2O_2 具有良好的生物电催化活性，作为 H_2O_2 生物传感器应用具有一定的可靠性和有效性。因此，这种功能化的碳纳米管能够为纳米生物传感器的研究提供基础。

第4章 Hb/MWNTs-HA 生物传感器的性能研究

4.1 引言

羟基磷灰石 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) 是一种最常见的生物活性材料, 羟基磷灰石具有与人体骨组织相似的无机成分, 含有人体所必需的钙和磷元素, 且不含其它有害元素, 是生物相容性较好的生物材料, 被广泛应用于骨组织工程的研究中。为此, 在本章中我们采用原位水热合成的方法制备碳纳米管-羟基磷灰石(MWNTs-HA)复合物, 希望借助 HA 来改善 MWNTs 的生物相容性, 以此来构筑一个具有良好生物相容性的界面, 能够有助于促进蛋白质的电子转移, 开拓发展新型生物传感器的途径。

4.2 MWNTs-HA 复合膜的表征

4.2.1 MWNTs-HA 的结构和形貌

首先我们采用红外光谱研究了 MWNTs-HA 复合物的结构。图 4.1 为 MWNTs、MWNTs-HA 和 HA 的红外光谱图。从 MWNTs 的红外光谱图中我们可以看出, 碳纳米管经过硝酸处理后出现了三个明显的特征吸收峰, 其中在 1732 cm^{-1} 处的特征吸收峰主要是由于碳纳米管表面的羧基 C=O 伸缩振动引起的, 表明经过硝酸处理后, 碳纳米管表面已经带有部分的羧基官能团^[54], 位于 2858 cm^{-1} 和 2919 cm^{-1} 处的特征吸收峰主要是由于 C-H 键的对称和反对称伸缩振动引起的^[55]。在 MWNTs-HA 的红外光谱中, 分别在 601 cm^{-1} 、 728 cm^{-1} 、 1034 cm^{-1} 、 1108 cm^{-1} 处出现了明显的特征吸收峰, 这些特征峰分别对应于 HA 中磷酸根的 $\nu_4(\text{P-O})$ 的特征峰、 $\nu_2(\text{OPO})$ 的特征峰以及 $\nu_3(\text{P-O})$ 的非对称伸缩峰^[56,57], 如图中 HA 的红外光谱。同时我们在 3440 cm^{-1} 处观察到了 HA 中的羟基(-OH)特征峰, 这些结果表明 HA 成功的组装在碳纳米管的表面上。

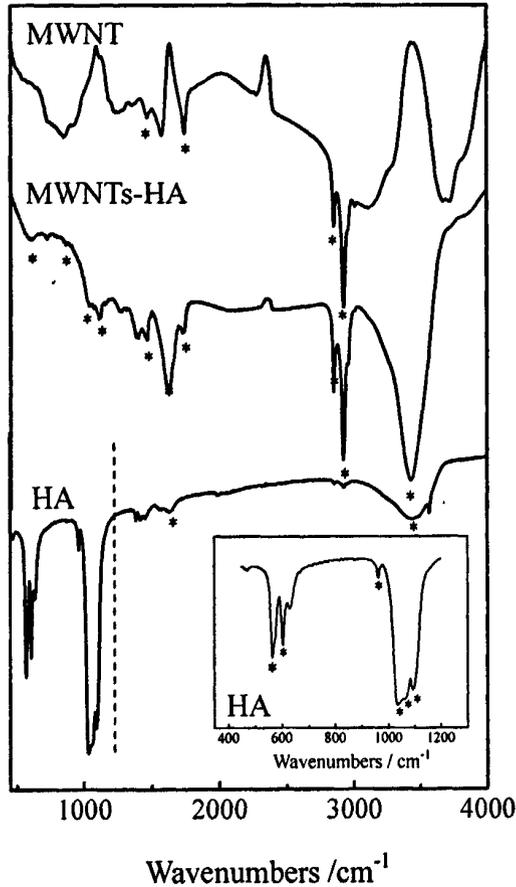


图 4.1 MWNTs、MWNTs-HA 和 HA 的红外光谱

为了进一步确定羟基磷灰石的晶体结构，我们采用 X 射线衍射仪测定了 MWNTs 和 MWNTs-HA 的 XRD 图谱，如图 4.2 和图 4.3 所示。从图 4.2 中我们可以看出，碳纳米管在 26.0° 、 42.8° 和 53.8° 处出现了明显的衍射峰，它们分别对应于六边形石墨的(002)、(100)和(004)相，而且，从衍射峰的强度可以看出，碳纳米管中的石墨主要是以(002)相的结构存在。而对于 MWNTs-HA 的 XRD 图谱(图 4.3)，我们可以看出，出现了很多衍射峰，根据 PDF 卡片 34-0010 的对照，我们可以确定其中 21° 、 23° 、 26° 、 29° 、 30° 、 31° 、 34° 、 40° 、 48° 和 50° 处的衍射峰分别对应为羟基磷灰石的(200)、(111)、(002)、(210)、(034)、(211)、(202)、(310)、(213)、(321)和

(004)的晶相。此外，在 XRD 谱图中没有发现 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的衍射峰，说明此反应较完全。

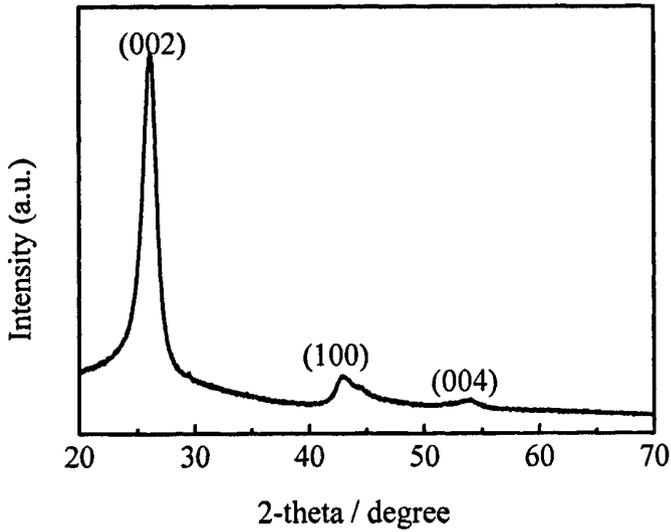


图 4.2 MWNTs 的 XRD 图

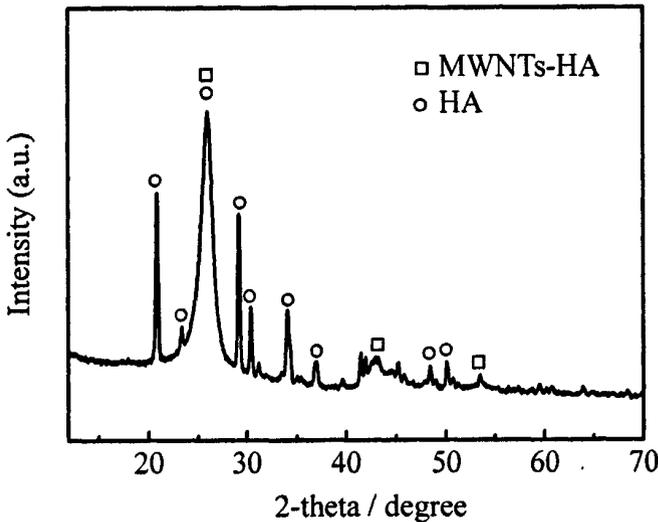


图 4.3 MWNTs-HA 的 XRD 图

我们采用扫描电子显微镜表征了 MWNTs-HA 薄膜的表面形貌。结果如图 4.4 所示。从图中我们可以看到，碳纳米管的外表面比较粗糙，在

MWNTs-HA 的外壁明显有一些物质生成，而且生长羟基磷灰石以后的碳纳米管直径增大，这也进一步说明在碳纳米管外壁上有一些物质生成。我们从扫描的图片中可以看出，同 MWNTs 相比，MWNTs-HA 在固体基底上的分散性还是比较均匀的，这可能是因为 HA 可以破坏碳纳米管表面的范德华力，同时形成的三维网状结构可以大大增大蛋白质或酶的吸附量，提高具有活性的蛋白质或酶的百分含量。这也是目前纳米材料在生物电子器件被广泛关注的一个显著优点。

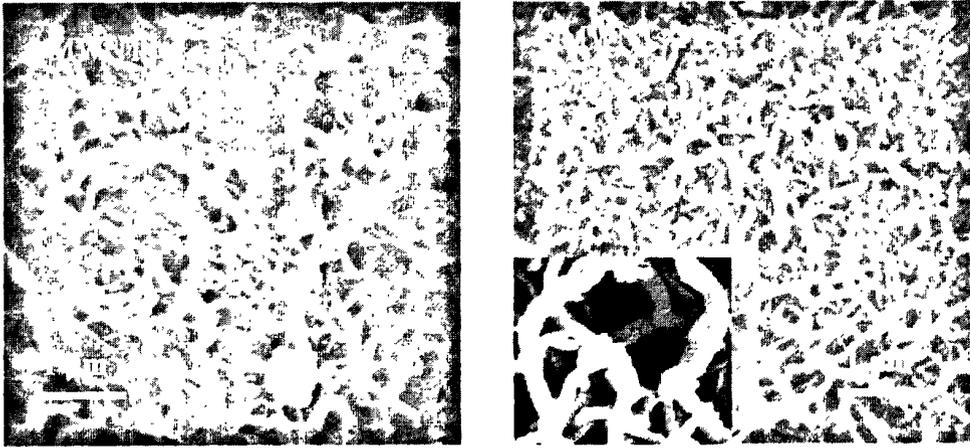


图 4.4 MWNTs 和 MWNTs-HA 的 SEM 图

4.2.2 MWNTs-HA 的电化学性能研究

由于 HA 是一种电绝缘性的陶瓷材料，大量 HA 在 MWNTs 表面的生成可能会影响 MWNTs 的电化学性质，为此我们利用 $K_3[Fe(CN)_6]^{3-}/K_3[Fe(CN)_6]^{4-}$ 来研究 MWNTs-HA 的界面电子转移性质。图 4.5 是 MWNTs-HA 膜在 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} K_3[Fe(CN)_6] + 0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} KCl$ 溶液中的循环伏安曲线图，扫描速度依次为 10、30、50、70、90 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由图 4.5 可以观察到，随着扫描速度的增加，氧化峰和还原峰的电流在逐渐增大，氧化峰电位向正方向移动，还原峰电位向负方向移动，同时峰电位差值 ΔE_p 也在逐渐增大，在扫描速度为 $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时， $\Delta E_p = 60 \text{ mV}$ 。图 4.6 为铁氰化钾氧化峰电流和还原峰电流与扫描速度的关系，从中可以看出其氧化峰电流和还原峰电流几乎相

等，且峰电流与扫描速度的平方根呈线性关系，说明铁氰化钾在 MWNTs-HA 复合膜界面上的氧化还原过程是受扩散过程控制的。

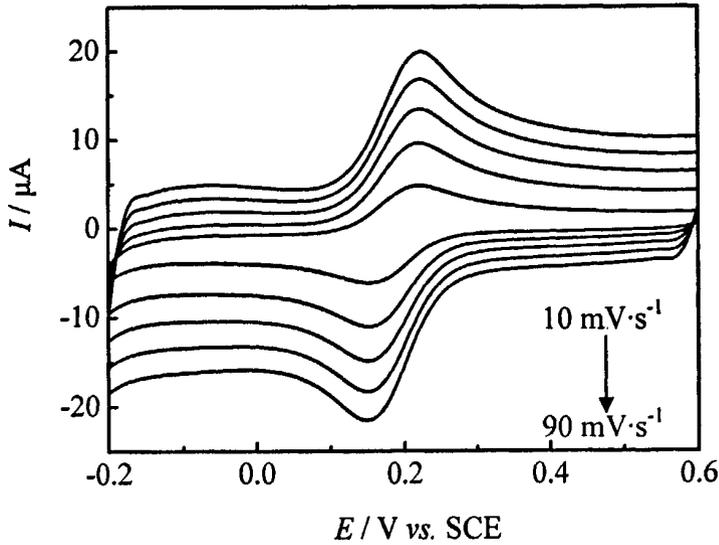


图 4.5 MWNTs-HA/GC 电极在含有 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 的 $1.0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中不同扫描速度下的循环伏安曲线

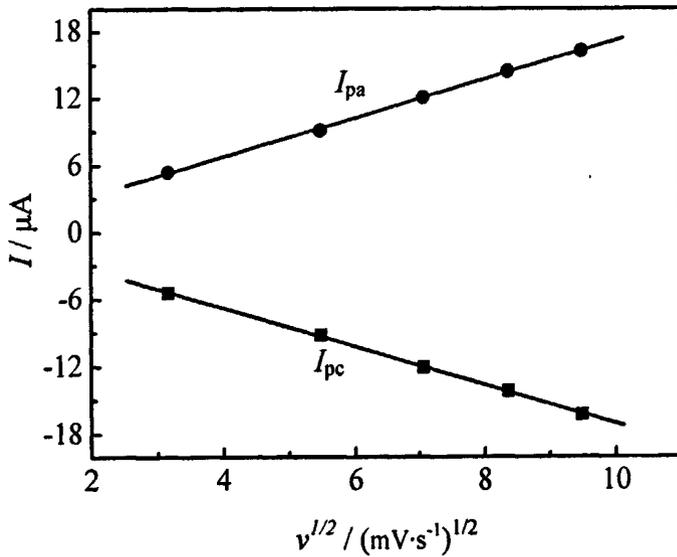


图 4.6 扫描速度与峰电流的关系

同时，我们还采用了交流阻抗法对 MWNTs-HA 复合膜的电化学行为进行了表征，结果如图 4.7 所示，实验所用频率为 1 Hz~100000 Hz。从图中可以看到，MWNTs-HA 修饰电极在所研究的范围内的阻抗是一条直线，而 GC 在相同的条件下测量出现较大的半圆形。根据尼亏斯图，其半圆越大，电阻越大，为此我们可以确认制备 MWNTs-HA 复合膜电阻率小， $K_3[Fe(CN)_6]$ 在此复合膜界面上的电子传递速度快^[58]。因此 MWNTs-HA 可被用于做为电极材料构筑电子传递界面。

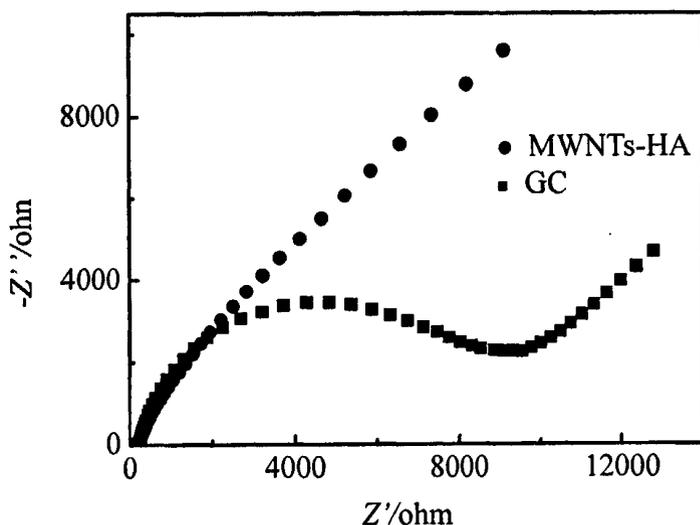


图 4.7 MWNTs-HA/GC 和 GC 在含有 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 的 $1.0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中的的交流阻抗图谱

4.3 Hb/MWNTs-HA 复合膜的表征

4.3.1 光谱表征

我们采用红外光谱表征了 Hb 以及固定在 MWNTs-HA 复合膜上 Hb 的生物活性，结果如图 4.8 所示。正如上章所提到的蛋白质结构中的酰胺 I 和酰胺 II 基团的红外吸收带提供蛋白质多肽链二级结构的信息，为蛋白质的变性提供依据^[39]。从图中我们可以明显的看到，固定在 MWNTs-HA 复合膜

上的 Hb 的酰胺 I 和酰胺 II 特征吸收峰分别位于 1653 cm^{-1} 和 1548 cm^{-1} 处, 与天然的 Hb 的酰胺 I 和酰胺 II 特征吸收峰(1653 cm^{-1} 和 1542 cm^{-1})非常相似, 这表明 Hb 固定在 MWNTs-HA 复合膜上基本上保持了其原有的结构。

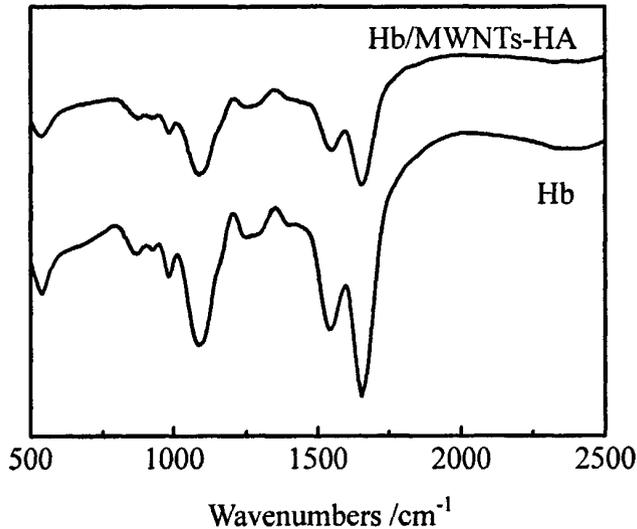


图 4.8 Hb 和 Hb/MWNTs-HA 的红外光谱

同时, 我们还采用紫外-可见吸收光谱来表征 Hb 的活性, 血红素蛋白质中的 Fe^{3+} 吸收峰的位置变化可以提供血红素蛋白质的二级结构信息, 这为表征蛋白质的活性提供依据^[34], 结果如图 4.9 所示。从图中可以看出, 天然 Hb 的紫外特征吸收峰为 411 nm , Hb 固定在 MWNTs-HA 复合膜上的紫外吸收带为 413 nm , 与天然 Hb 的特征吸收峰相比, 仅发生了 2 nm 的移动, 这一研究结果非常类似其他文献的报道。因此我们认为 Hb 固定在 MWNTs-HA 复合膜基本上保持了原有的二级结构。

红外和紫外光谱的研究结果表明, MWNTs-HA 复合物能够为 Hb 的固定提供一个良好的微环境, 使其保持其原有结构而不变性。因此, MWNTs-HA 复合物非常有利于构筑生物界面。

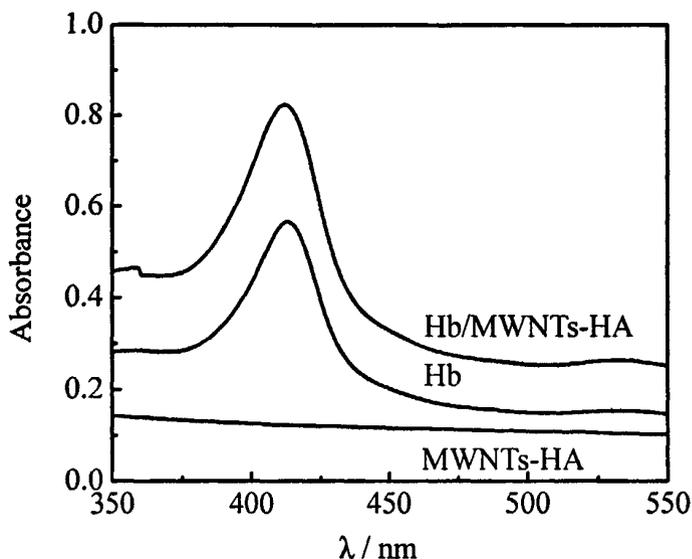


图 4.9 Hb、Hb/MWNTs-HA 和 MWNTs-HA 的紫外-可见吸收光谱

4.3.2 Hb/MWNTs-HA 的电化学性能研究

图 4.10 为 Hb/MWNTs-HA 和 MWNTs-HA 修饰 GC 电极在 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液(PBS, pH 7.0)氮气饱和状态下的循环伏安曲线, 扫描速度为 $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从图中可以看出, 对于 MWNTs-HA/GC, 我们没有观察到任何氧化还原峰, 而在相同的条件下, 在 Hb/MWNTs-HA/GC 上我们观察到了一对非常明显的氧化还原峰, 峰电位分别为 $E_{pa}=-0.30 \text{ V}(\text{vs.SCE})$, $E_{pc}=-0.37 \text{ V}(\text{vs.SCE})$, 峰电位差 $\Delta E_p=70 \text{ mV}$, 式量电位 $E^{0'}=-0.335 \text{ V}(\text{vs.SCE})$, 这个值与文献报道的 Hb 在其它复合膜上的研究结果非常相似, 如表 4.1 所示, 这些结果表明 Hb 在 MWNTs-HA 界面上能够实现与电极的直接电子转移, 这可能是由于 MWNTs-HA 复合膜形成的三维网络结构能够使 Hb 固定时形成一个有利于活性中心与电极之间的电子传递的固定方向, 大大缩短了电子传递的距离。

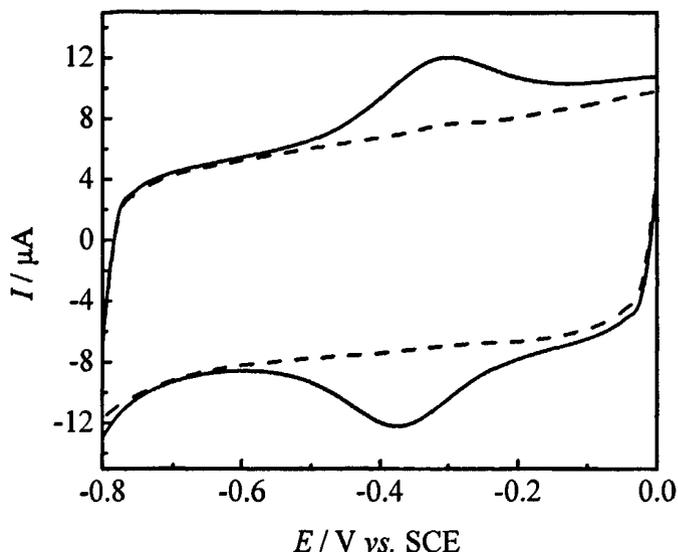


图 4.10 Hb/MWNTs-HA (实线) 和 MWNTs-HA (虚线) 的循环伏安曲线

表 4.1 Hb 不同电极上的 E^0

电极	pH	E^0 / V	参考文献
Hb/MWNTs-HA	7.0	-0.335(SCE)	本文中
Hb/SA-MWNTs	7.0	-0.355(SCE)	本文中
Hb-Ag	7.0	-0.346(SCE)	[59]
Hb/LDH-SDS	7.0	-0.34(SCE)	[60]
Hb/IL	7.0	-0.368(SCE)	[61]

图 4.11 是 Hb/MWNTs-HA/GC 在 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH7.0 氮气饱和磷酸缓冲溶液中不同扫描速度的循环伏安曲线，扫描速度分别为 100、200、300、400、500、600、700、800 和 $900 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。由图知，随着扫描速度的增加，氧化峰电位和还原峰电位分别向正方向和负方向移动，同时氧化还原峰电流也在逐渐增大，而峰电位差 ΔE_p 却增加缓慢。Hb 在 MWNTs-HA/GC 界面上所发生反应的氧化峰电流和还原峰电流几乎相等，且氧化还原峰电流 I_p 与扫描速度 $v(v < 900 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1})$ 呈线性关系，如图 4.12 所示，这表明 Hb 在 MWNTs-HA 界面上的电子传递过程是受表面过程控制的。

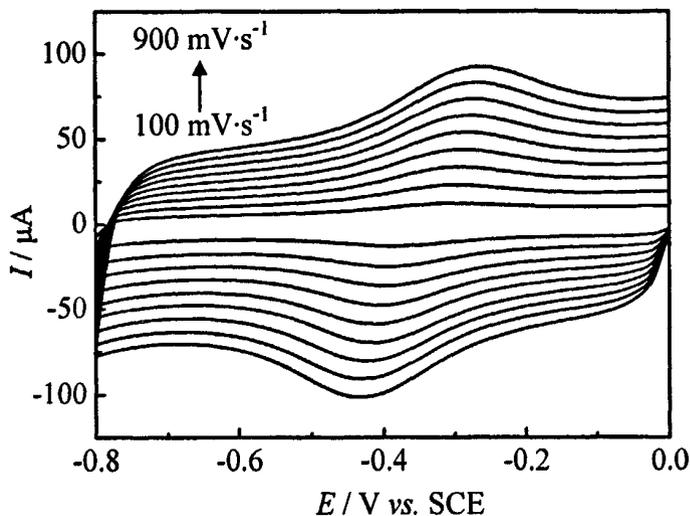


图 4.11 Hb/MWNTs-HA 修饰电极在不同扫描速度下的循环伏安曲线

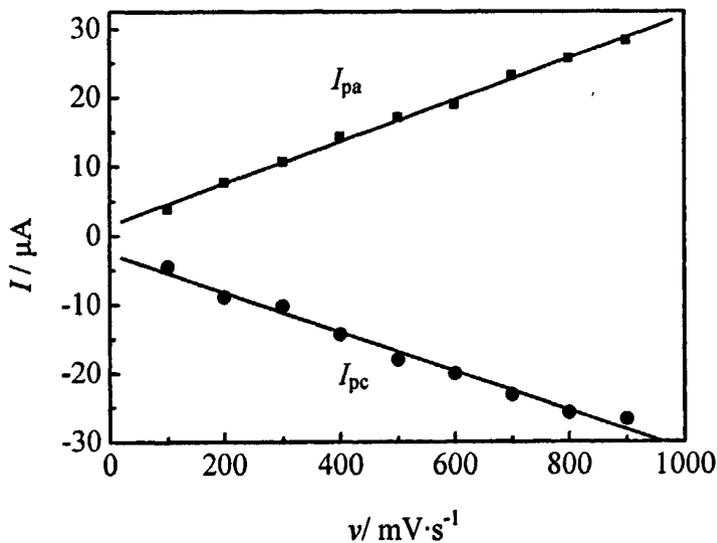


图 4.12 峰电流与扫描速度的关系

Hb 在 MWNTs-HA 复合膜上的表面覆盖度 Γ 可以根据 Faraday 方程(3-1) 计算, 我们计算出电活性 Hb 的表面覆盖度 Γ 为 $(9.25 \pm 0.69) \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。此外, 我们在研究峰电位和扫描速度的关系时发现, 当 $\nu > 2000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,

$\Delta E_p > 200$ mV, 此时电极反应变的不可逆。根据峰电位和扫描速度的关系, 利用 Laviron^[39]方程(3-2)、(3-3)和(3-4)计算 Hb 在 MWNTs-HA 复合膜界面上的直接电子传递速率常数 $k_s = (5.05 \pm 0.41) \text{ s}^{-1}$, 这个值要大于 Hb 在其它纳米材料界面上的转移速率常数, 如表 4.2 所示。表明 Hb 在 MWNTs-HA 界面上的电子转移速度较快, 可用来制备高灵敏度的生物传感器。

表4.2 Hb在不同电极上的 k_s 值

电极	$k_s(\text{s}^{-1})$	参考文献
Hb/TiO ₂ /GC	1.9	[62]
Hb/MWNTs/GC	1.02	[17]
Hb/SnO ₂ /GC	0.53	[63]
Polymer-Hb-MWNTs	0.9	[64]
Polymer-Hb-DMWNTs	0.4	[65]
Hb/a-ZrP	1.85	[66]

4.3.3 pH 的影响

pH 值可以影响蛋白质活性, 因此可以通过改变 pH 值来研究蛋白质最适宜的环境。图 4.13 为 Hb/MWNTs-HA/GC 在不同 pH 值 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线。从图中可以看出, 随着缓冲溶液 pH 值的增加, 血红蛋白的氧化还原峰电位向负方向移动, 并且在 pH 5.0 到 pH 9.0 范围内, Hb 的式量电位 E^0 、氧化峰电位 E_{pa} 和还原峰电位 E_{pc} 均与缓冲溶液的 pH 之间呈线性关系, 如图 4.13 所示, 其斜率分别为 $-37.50 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$, $-36.82 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ 和 $-38.17 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ 。这些值要比一个电子和一个质子反应的理论值 $-57.6 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ 小^[49], 原因可能是血红素周围氨基酸的质子化不是一个简单的过程, 而是受血红素轴配位基团和水合铁离子的质子化作用的共同影响^[46]。而且, 从图中我们还可以看到, 当 pH 增到到 9.0 时, 其峰电流略有下降, 这可能是由于 pH 增大导致少量 Hb 失去活性, 造成电活性 Hb 的数量减少。

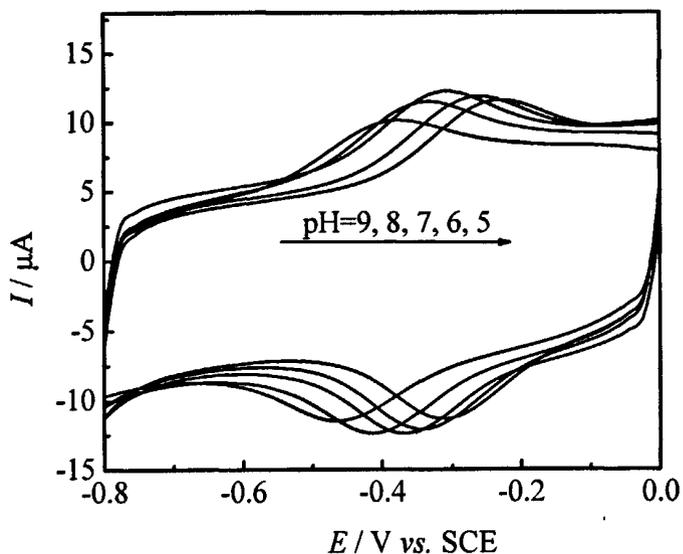


图 4.13 Hb/MWNTs-HA 在不同 pH 值缓冲液中的循环伏安曲线

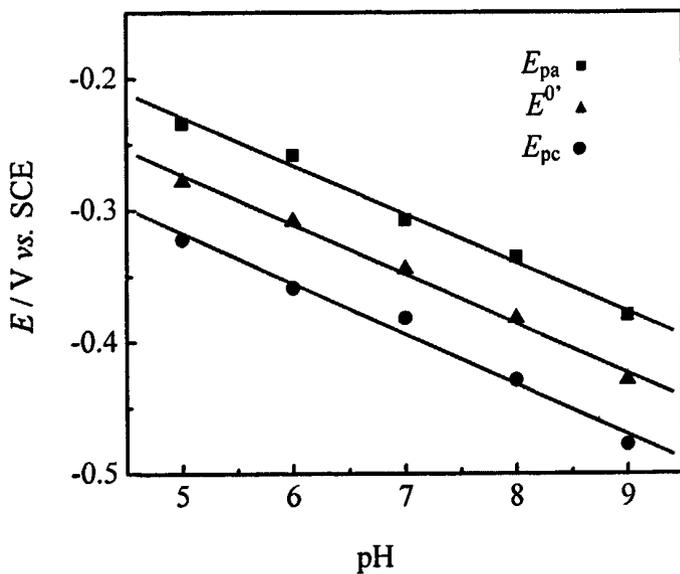


图 4.14 峰电位与 pH 的关系图

4.3.4 Hb/MWNTs-HA 对 H_2O_2 的电催化研究

H_2O_2 是许多氧化酶催化反应产物，因此在化学、环境保护、生物学、

工业等领域检测 H_2O_2 是非常重要的。图 4.15 为 Hb/MWNTs-HA/GC 在含有不同浓度 H_2O_2 的 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线。从图中可以看出，当在磷酸缓冲溶液中加入 H_2O_2 后，循环伏安曲线发生了明显变化，其中在 -0.38 V (vs. SCE)附近的还原峰电流明显增加，同时伴随着氧化峰电流减小，这是一个典型的电催化还原 H_2O_2 的特征。并且随着缓冲溶液中 H_2O_2 浓度的增加，还原峰电流逐渐增大，并伴随有氧化峰电流逐渐消失。以上实验结果表明，固定在 MWNTs-HA 复合膜上的 Hb 可以有效的催化 H_2O_2 电催化还原。

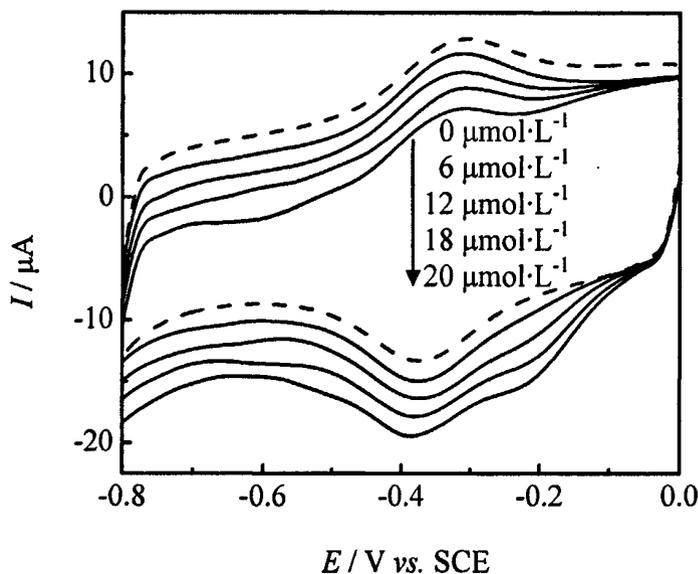


图 4.15 Hb/MWNTs-HA/GC 电极响应对 H_2O_2 催化的循环伏安曲线

图 4.16 是 Hb/MWNTs-HA/GC 对 H_2O_2 浓度的安培响应曲线图。由图可知，当缓冲溶液中加入一定浓度的 H_2O_2 时，还原电流迅速增大，并在 5s 内达到稳定，表明该修饰电极对 H_2O_2 响应速度较快。

图 4.17 是 Hb/MWNTs-HA/GC 对 H_2O_2 浓度与响应电流之间的关系曲线图。从图中可以观察到， H_2O_2 的浓度在 $0.5\text{--}2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内，其浓度与

电流 ΔI 呈线性关系, 线性方程为 $\Delta I/\text{nA} = -0.305 + 3.965C/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ($R = 0.999$), 由线性方程可以计算出, 信噪比为 3 ($S/N=3$) 时 H_2O_2 浓度的最低检测限为 $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当 H_2O_2 浓度大于 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 电流增加相对平缓, 出现电流响应平台, 表现出酶电极典型的 Michaelis-Menten 动力学特征^[49]。

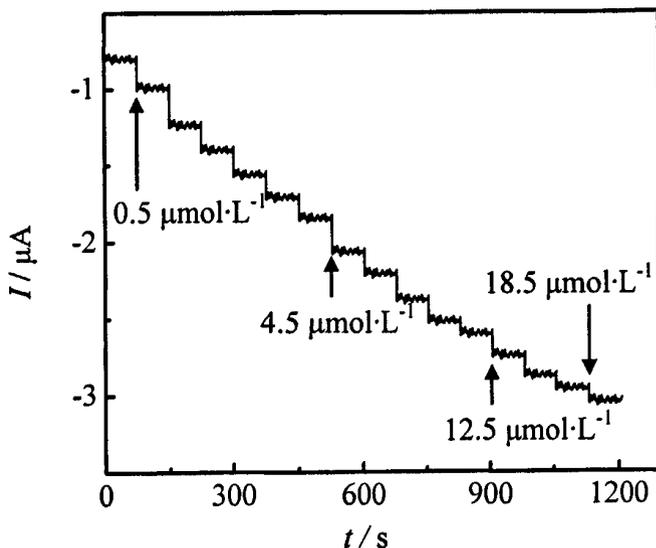


图 4.16 Hb/MWNTs-HA/GC 电极对 H_2O_2 响应的时间-电流曲线

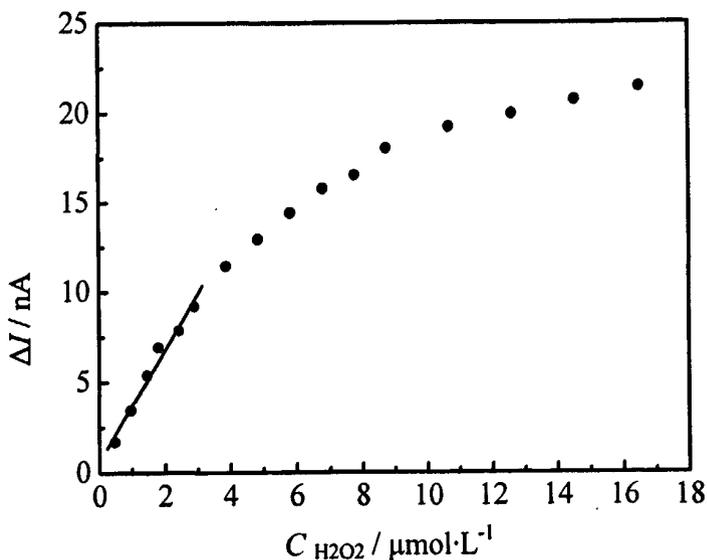


图 4.17 Hb/MWNTs-HA/GC 电极响应电流与 H_2O_2 浓度的关系

图 4.18 是 Hb/MWNTs-HA/GC 修饰电极在 H_2O_2 浓度大于 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 Michaelis-Menten 曲线图。由公式(3-8)计算出 $K_m^{\text{app}}=7.339 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，与其它的纳米材料相比，此米氏常数较小，如表 3.3 所示，所以此生物传感器的灵敏度比较高。

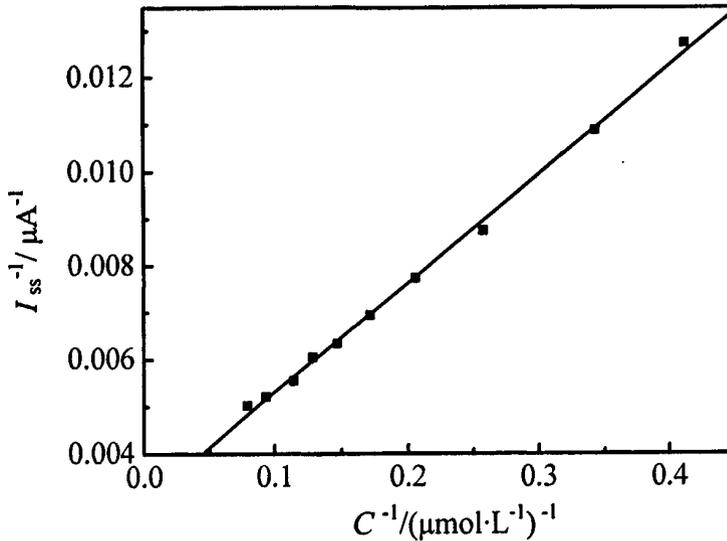


图 4.18 Hb/MWNTs-HA/GC 电极对 H_2O_2 响应的 Michaelis-Menten 曲线图

表 4.3 Hb 在不同电极上的 K_m^{app} 值

电极	K_m^{app} ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	参考文献
Polymer-Hb-MWNTs	0.14	[64]
Polymer-Hb-DMWNTs	0.22	[65]
Hb/a-ZrP	0.123	[66]
$\text{C}_{16}\text{-C}_4\text{-C}_{16}\text{-OMIMPF}_6/\text{Hb}$	0.245	[67]
Hb/GNPs/Hb/MWNTs	0.26	[68]
Hb-Nafion-CNF	0.051	[69]

另外，我们还考察了 Hb/MWNTs-HA 对 TCA 的电化学催化还原，结果如图 4.19 所示。从图中可以看出，在磷酸缓冲溶液中加入 TCA 后，Hb/MWNTs-HA/GC 电极在 $-0.38 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ 附近的还原峰电流明显增加，同

时伴随着氧化峰电流减小, 并且随着溶液中 TCA 浓度的增加, 还原峰电流逐渐增大, 并伴随有氧化峰电流逐渐消失。这些结果表明, 固定在 MWNTs-HA 复合膜上的 Hb 还可以有效的催化 TCA 电化学还原。

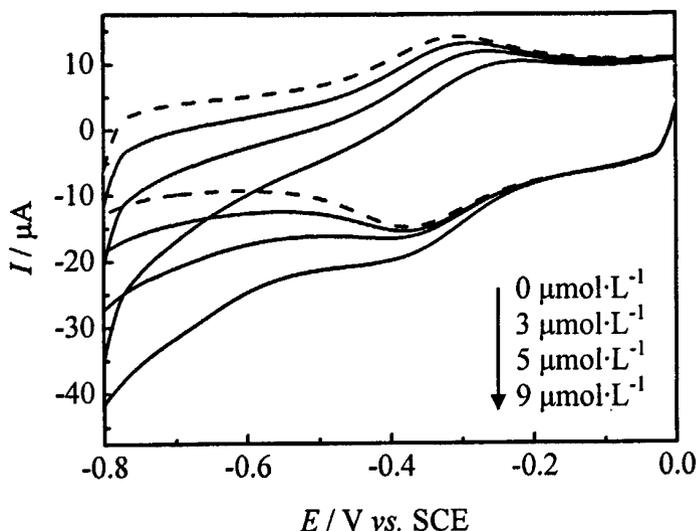


图 4.19 Hb/MWNTs-HA/GC 电极对 TCA 催化还原的循环伏安曲线

4.4 本章小结

本章采用原位水热合成的方法在碳纳米管表面组装了 HA, 利用 MWNTs-HA 构筑了 Hb/MWNTs-HA 生物传感器, 并对其性能进行了研究, 得出以下结论:

(1) XRD、SEM 和 FT-IR 实验结果表明, 采用原位水热合成法可将 HA 成功的组装在 MWNTs 表面, 同时 MWNTs-HA 能够在固体基底上形成均匀、三维多孔的立体网状结构, 这种结构性质对于电化学器件的研究具有重要的意义。

(2) 红外光谱和紫外-可见光谱研究表明, Hb 吸附在 MWNTs-HA 复合膜后基本上能够保持其原始构象。

(3) 电化学研究表明, MWNTs-HA 复合膜界面有利于实现 Hb 与电极之间的直接电子传递。其中电活性 Hb 的表面覆盖度可达 $(9.25 \pm 0.69) \times 10^{-10}$

$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, 电子转移速率常数 k_s 为 $(5.05\pm 0.41)\text{ s}^{-1}$ 。

(4) 同时, Hb/MWNTs-HA 修饰电极对 H_2O_2 和 TCA 具有良好的生物电催化活性。因此, 这种纳米复合材料能够为纳米生物传感器的研究提供一定的基础。

第5章 MWNTs-HA 生物燃料电池的性能研究

5.1 引言

生物燃料电池技术是基于生物催化剂（如酶和微生物）将化学能转化为电能的能源转换技术。生物燃料电池因其原料来源广泛、无污染等特点，得到了广泛的关注。对生物燃料电池来说，有较高的输出电位，较大的输出电流以及较大的功率密度是必须考虑的关键因素。而生物燃料电池的核心问题是生物电化学技术，生物燃料电池的两极本质上可以认为是两个电化学传感器，因此电化学传感器对生物燃料电池的性能起着关键作用。

漆酶是一种最简单的多铜过氧化物酶，具有较强的氧化还原能力，一般含有 4 个铜原子，这 4 个铜原子是漆酶的活性中心，结构如图 5.1 所示^[70]。漆酶能催化氧气还原成水，同时能作为一些有机化合物的催化剂。由于漆酶可以催化氧气四电子还原成水，因此可以被用来制备生物燃料电池的阴极生物催化剂。但是由于漆酶的氧化还原中心结构比较复杂，难以与电极之间进行直接电子转移，所以选择合适的界面材料，实现漆酶的直接电子转移成为研究的热点。



图 5.1 漆酶结构

葡萄糖氧化酶(GOD)是一个具有刚性结构的氧化还原酶，由两条相同的多肽链组成的二聚体分子，每条肽链中包含一个氧化还原中心-黄素腺嘌呤二核苷酸 (FADH)^[71]，而且可以专一的催化 β -D 型葡萄糖氧化生成葡萄糖酸

和过氧化氢，是葡萄糖专一的高效催化酶。因此利用葡萄糖氧化酶对葡萄糖的催化氧化可以用来制备生物燃料电池的阳极生物催化剂。

本章中我们以 MWNTs-HA 复合膜为界面，分别固定漆酶做为生物燃料电池的阴极，固定葡萄糖氧化酶为生物燃料电池的阳极，研究漆酶和葡萄糖氧化酶在 MWNTs-HA 界面上的直接电子转移。并以此构筑隔膜生物燃料电池，对生物燃料电池的性能进行研究。

5.2 GOD/MWNTs-HA 复合膜的表征

5.2.1 GOD/MWNTs-HA 的光谱表征

我们首先采用红外光谱来表征 GOD 在 MWNTs-HA 界面上的生物活性，结果如图 5.2 所示。由图可以观察到，GOD 固定在 MWNTs-HA 复合膜上，其酰胺 I 和酰胺 II 带的特征吸收峰分别位于 1655 cm^{-1} 和 1547 cm^{-1} ，与天然 GOD 的酰胺 I 和酰胺 II 带的特征吸收峰位置非常相似，其分别位于 1656 cm^{-1} 和 1544 cm^{-1} 处，这表明固定在复合膜上的 GOD 仍然保持了其原始的结构。

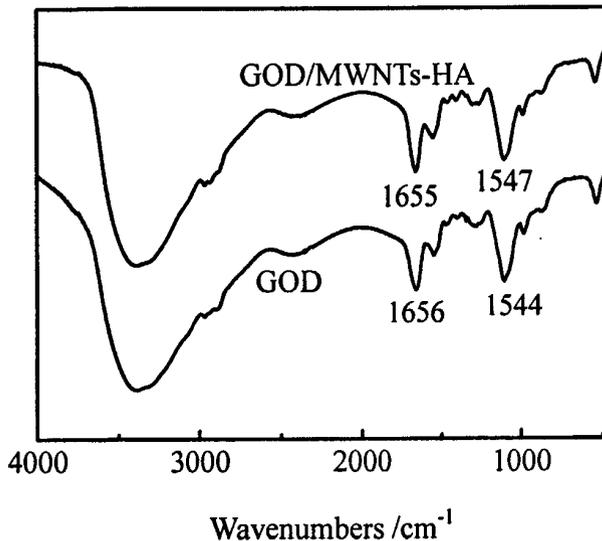


图 5.2 GOD 和 GOD/MWNTs-HA 的红外光谱

此外,我们还使用紫外-可见光谱来表征GOD的生物活性,如图5.3所示。从图中可以观察到,天然的GOD分别在277 nm、360 nm和470 nm处有三个不同的紫外特征吸收峰,其中277 nm处的特征吸收峰主要是由于GOD中的氨基酸引起的,而位于360 nm和470 nm处的特征吸收峰主要是由于GOD中的黄素腺嘌呤引起的^[72,73]。当GOD固定在MWNTs-HA复合膜上,可以明显观察到位于276 nm和450 nm处的紫外特征吸收峰,与天然的GOD相比,响应的特征吸收峰仅发生了很小的移动,因此我们认为GOD仍然保持了原有的结构。其中位于360 nm处的特征吸收峰在GOD/MWNTs-HA的紫外-可见光谱中没有观察到,这可能是由于该紫外光谱仪在360 nm处发生光源转换而影响了该处特征峰的观察。

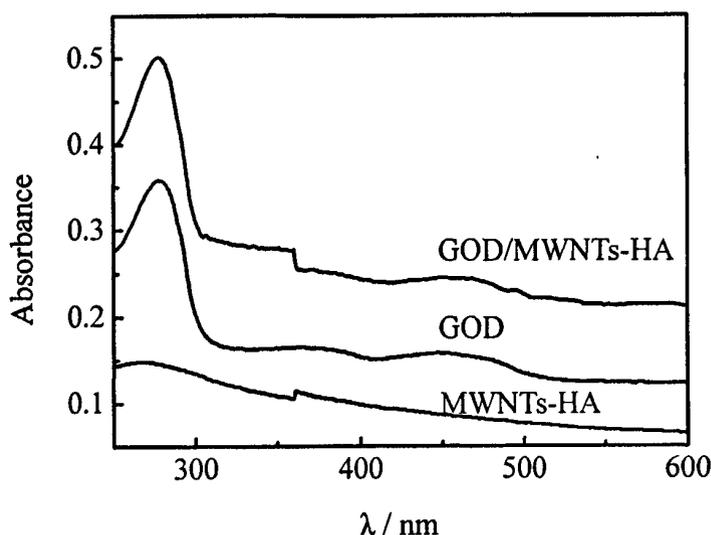


图 5.3 MWNTs-HA、GOD 和 GOD/MWNTs-HA 的紫外-可见吸收光谱

5.2.2 GOD/MWNTs-HA 的电化学性能研究

图 5.4 为 MWNTs-HA/GC 和 GOD/MWNTs-HA/GC 在 $0.10\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液(PBS, pH7.0)中氮气饱和状态下的循环伏安曲线,扫描速度为 $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从图中可以观察到,在 MWNTs-HA/GC 上没有观察到任何氧化还原峰,相同的条件下,在 GOD/MWNTs-HA/GC 上却观察到了一对明显

的、稳定的、几乎可逆的氧化还原峰。其峰电位分别为 $E_{pa}=-0.42$ V (vs.SCE), $E_{pc}=-0.50$ V(vs.SCE), 峰电位差为 $\Delta E_p=80$ mV, 式量电位 $E^0 = -0.46$ V(vs.SCE), 这个值非常接近文献报道中 GOD 的电活性中心 FAD/FADH₂ 的式量电位, 如表 5.1 所示。以上结果表明, MWNTs-HA 能够促进 GOD 与电极直接的电子传递, 这可能是由于 MWNTs-HA 复合膜所形成的三维网络结构能够缩短 GOD 活性中心与电极之间的距离, 促进 GOD 与电极之间的电子传递。

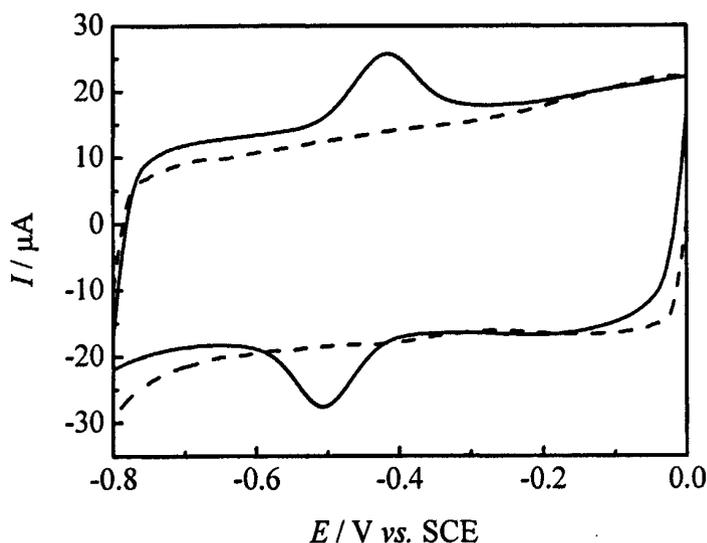


图 5.4 MWNTs-HA/GC (虚线) 和 GOD/MWNTs-HA/GC (实线) 的循环伏安曲线

表 5.1 GOD 不同电极上的 E^0

电极	pH	E^0 / V	参考文献
GOD/MWNT-HA/GC	7.0	-0.46(SCE)	本文中
Nafion/GOD-SBA-15/GC	7.0	-0.436(SCE)	[73]
Nafion/GOD/MWNTs/GC	6.9	0.464(SCE)	[74]
GOD/3D-CMM/GC	7.0	-0.445(SCE)	[75]
GOD /NiO/GC	7.0	-0.42(SCE)	[76]

图 5.5 是 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极在 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氮气饱和的磷酸缓冲溶液中不同扫描速度的循环伏安曲线, 扫描速度依次为 20、40、60、80、100、120、140、160、180、200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。由图可见, 随着扫描速度的增加, 氧化峰电位和还原峰电位分别向正方向和负方向移动, 同时峰电流也在逐渐增大, 而峰电位差 ΔE_p 增加却比较缓慢。由图 5.6 可知, 氧化还原峰电流 I_p 与扫描速度 ν ($\nu < 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) 呈线性关系, 表明 GOD 在 MWNTs-HA 界面上的电子传递过程是受表面过程控制的。

我们根据 Faraday 方程(3-1)计算出电活性 GOD 在 MWNTs-HA 复合膜上的表面覆盖度 Γ 为 $(1.76\pm 0.15)\times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。此外, 我们在研究峰电位和扫描速度的关系时发现, 当 $\nu > 900 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, $\Delta E_p > 200 \text{ mV}$, 此时电极反应的不可逆。根据峰电位和扫描速度的关系, 利用 Laviron^[39]方程(3-2)、(3-3)和(3-4)计算 GOD 在 MWNTs-HA 复合膜界面上的直接电子传递速率常数 $k_s = (2.40\pm 0.15) \text{ s}^{-1}$, 这个值要大于一些文献中报道的值, 如表 5.2 所示。表明 GOD 在 MWNTs-HA 界面上的电子转移速度较快, 可用来制备高灵敏度的生物传感器。

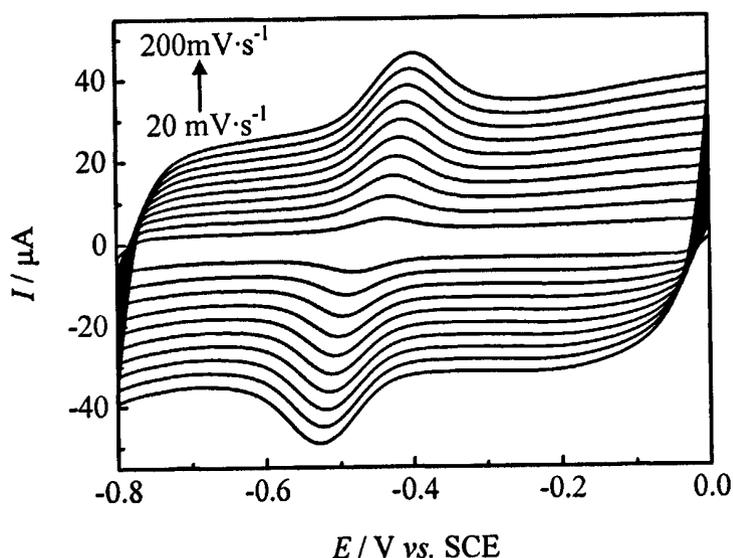


图 5.5 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极在不同扫描速度下的循环伏安曲线

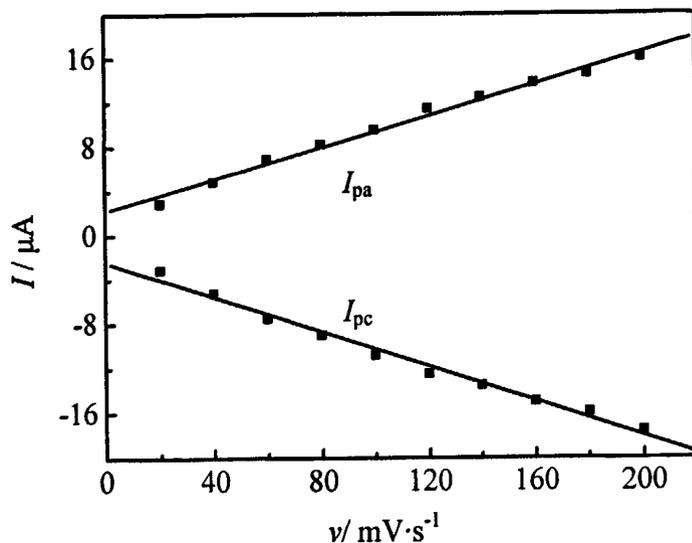


图 5.6 峰电流与扫速的关系

表 5.2 GOD 在不同电极上的 k_s 值

电极	$k_s(s^{-1})$	参考文献
GOD/Ni-MWNT	1.53 ± 0.45	[74]
GOD/Ni/Gold	1.30	[77]
GOD/IL-Gold-IL-SWNTs	2.12	[78]
CS-GOD-CdS/ACNTs-Pt _{nano}	1.79	[79]
Nafion-PLL-GOD	2.0	[80]

5.2.3 pH 对 GOD/MWNTs-HA 的影响

图 5.7 为 GOD/MWNTs-HA/GC 电极在氮气饱和的 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同 pH 值磷酸缓冲溶液中的循环伏安曲线，扫速为 $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从图中可以看出，随着缓冲溶液 pH 的增加，GOD 的氧化还原峰电位向负方向移动，并且在 pH5.0 增加到 pH8.0 范围内，GOD 的式量电位 E^0 、氧化峰电位 E_{pa} 和还原峰电位 E_{pc} 均与缓冲溶液的 pH 之间呈线性关系，如图 5.8 所示，其中式量电位 E^0 的斜率为 $-57.0 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ ，该值与理论值的可逆($2e^-+2H^+$)反应斜率-

$58.5 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ (22°C) 很接近^[79], 因此 GOD 的电化学反应涉及 $2e^-$ 和 2H^+ , 如公式(5-1):

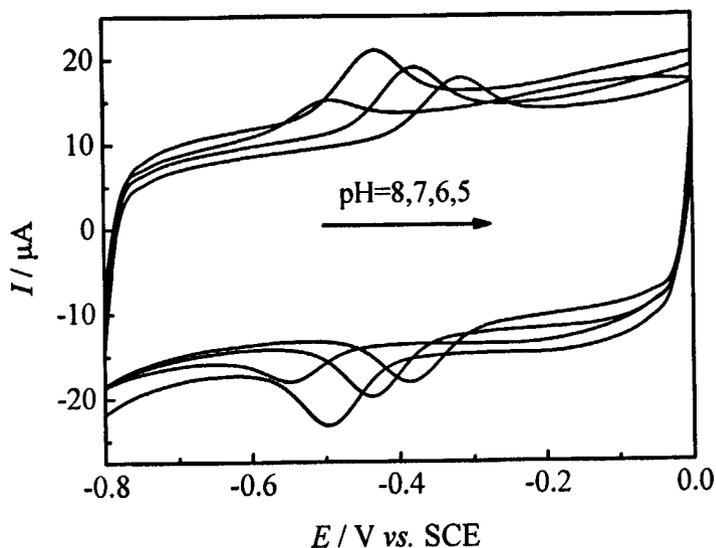
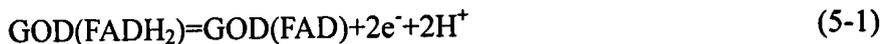


图 5.7 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极在不同 pH 值缓冲液中的循环伏安曲线

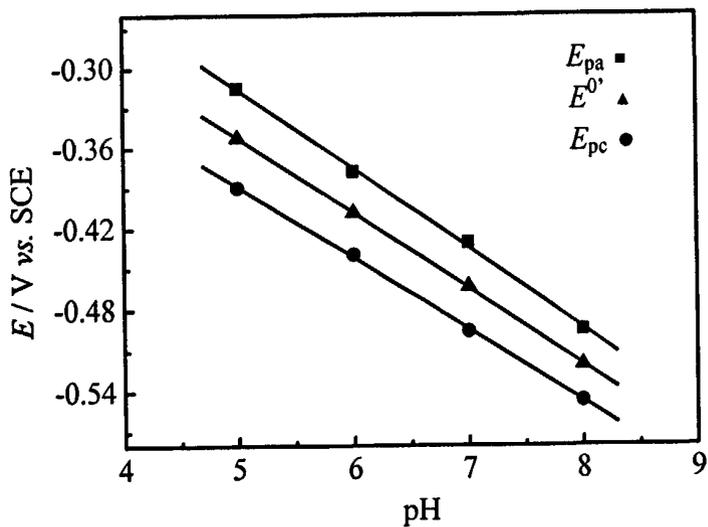


图 5.8 峰电位与 pH 的关系图

另外,从图 5.7 中我们还可以看到,在 pH 7.0 的缓冲溶液中,其氧化还原峰电流最大,表明 GOD 在 pH 7.0 的条件下电化学活性最大。所以本研究中的电化学实验采用 pH 7.0 的缓冲溶液作为电解液。

5.2.4 GOD/MWNTs-HA 对葡萄糖催化性能研究

GOD 对于葡萄糖的氧化反应具有高度的转移性,我们使用二茂铁甲酸为媒介体,研究了 GOD 对葡萄糖的电化学催化行为,图 5.9 为 GOD/MWNTs-HA 在含有 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二茂铁甲酸和不同浓度葡萄糖缓冲溶液中的循环伏安曲线。从图中可以观察到,当葡萄糖的浓度为 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在 $0.3 \text{ V}(\text{vs.SCE})$ 左右出现一对氧化还原峰,归属于二茂铁甲酸在电极表面的氧化还原反应。当加入葡萄糖后,氧化峰电流随着葡萄糖浓度的增大而增加,还原峰电流几乎消失,因此二茂铁甲酸可以作为一种很有效的媒介体促进 GOD 对葡萄糖的催化。

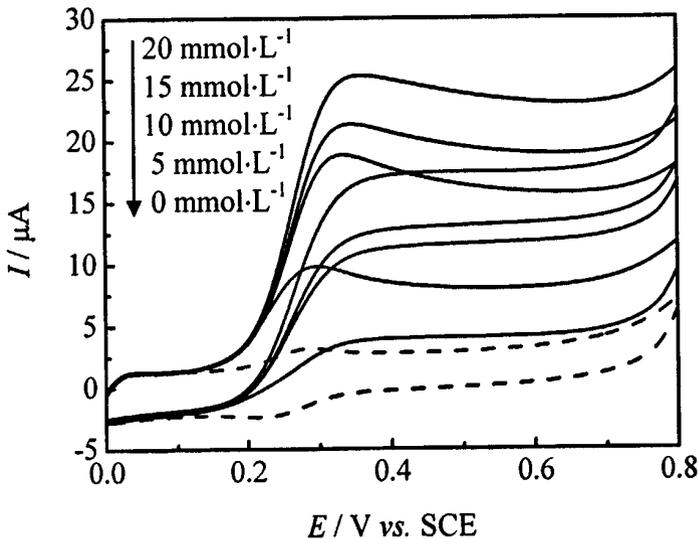


图 5.9 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极在不同浓度的葡萄糖中的循环伏安曲线

图 5.10 为 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极在含有 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二茂铁甲酸中葡萄糖浓度为 $10\text{-}110 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,通过循环伏安法测定的葡萄糖

浓度与响应电流的校准曲线。从图中可以观察到，在葡萄糖浓度为 10-50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内，随着葡萄糖浓度的增加，传感器的响应电流也逐渐增加，其响应电流与葡萄糖浓度呈现出良好的线性关系，其线性方程为 $\Delta I / \text{nA} = -0.796 + 0.107C / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R=0.998$)，根据此方程我们计算出信噪比为 3($S/N=3$)

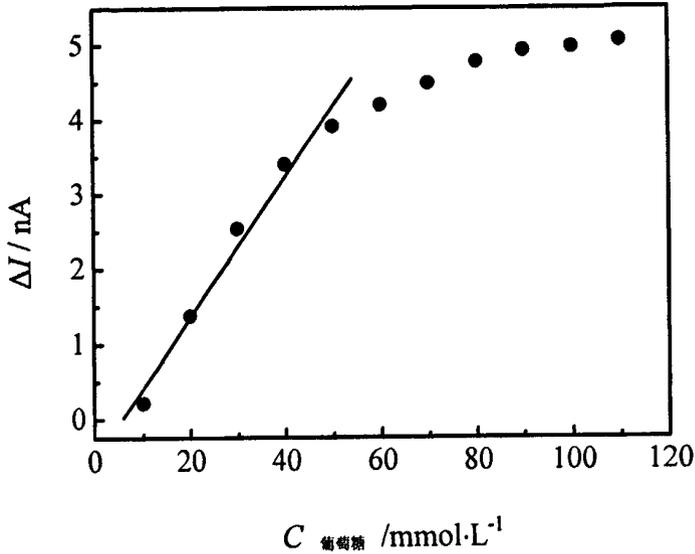


图 5.10 GOD/MWNTs-HA/GC 电极响应电流与葡萄糖浓度的校正曲线

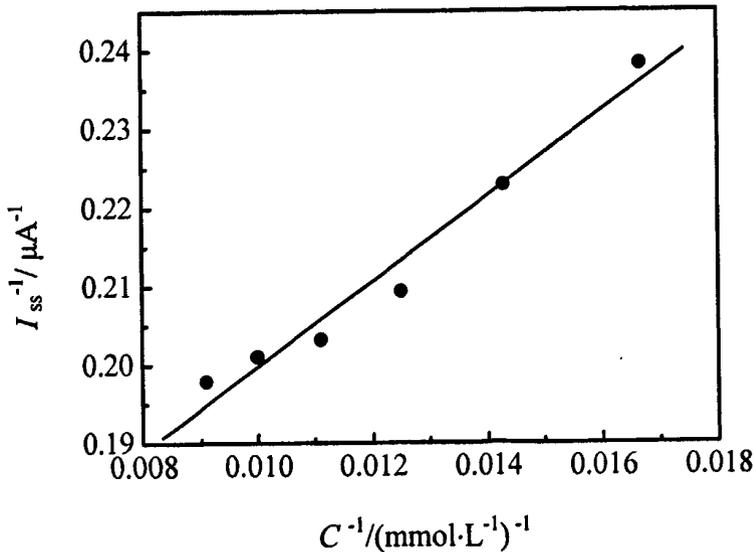


图 5.11 GOD/MWNTs-HA/GC 电极对葡萄糖催化的 Michaelis-Menten 曲线图

时的葡萄糖检测下限为 $3.14 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当葡萄糖浓度大于 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，电流增加缓慢，出现了一个响应平台，表现出酶电极典型的 Michaelis-Menten 动力学特征^[49]。图 5.11 为葡萄糖浓度在 $60\text{-}110 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内，GOD/MWNTs-HA/GC 电极对葡萄糖催化氧化的 Michaelis-Menten 曲线图。由公式(3-8)计算出 K_m^{app} 为 $38.54 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，这一数值与其它文献报道的数值相比相对较高，如表 5.3 所示，这可能是由于电极与酶的活性中心距离较远而造成的^[33,81]。

表 5.3 GOD 在不同电极上的 K_m^{app} 值

电极	K_m^{app} ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	参考文献
GOD/IL-Gold-IL-SWNTs	0.022	[78]
CS-GOD-CdS/ACNTs-Pt _{nano}	11.86	[79]
Nafion-PLL-GOD	2.0	[80]
Nafion-CNTs-CdTe-GOD	0.651	[82]
Nafion-MWNTs	9.8	[18]

5.3 La/MWNTs-HA 的电化学性能研究

由于 La 的活性中心结构比较复杂，采用循环伏安法无法观察到 La 在 MWNTs-HA 界面上的直接电子转移，如图 5.12 中虚线所示，La/MWNTs-HA/GC 电极在 N_2 饱和溶液中没有任何氧化还原峰出现。为此我们采用差分脉冲法研究了 La 在 MWNTs-HA 界面上的直接电化学，如图 5.13 所示。从图中可以看出，MWNTs-HA/GC 修饰电极没有出现任何氧化还原峰，而 La/MWNTs-HA/GC 修饰电极在式电位为 $+0.52 \text{ V}(\text{vs.SCE})$ 处出现一对较小的氧化还原峰，这个式电位非常接近于漆酶活性中心内部 T1 铜原子的式量电位 $+0.54 \text{ V}^{[70]}$ (vs.SCE)，这表明 La 在 MWNTs-HA 修饰电极上能够实现直接电子转移^[83]。

漆酶催化氧气的还原可以作为生物燃料电池阴极的催化剂，因此我们考察了漆酶对氧气的电催化还原，如图 5.12 实线所示。在空气条件下，从

+0.58 V(vs. SCE)开始还原峰电流明显增大, 表明在 MWNTs-HA 复合膜上的漆酶对氧气的还原有较好的电催化活性, 而在氮气饱和气氛下没有观察到任何氧化还原峰。因此, 此电极对于发展生物燃料电池的阴极具有重要意义。

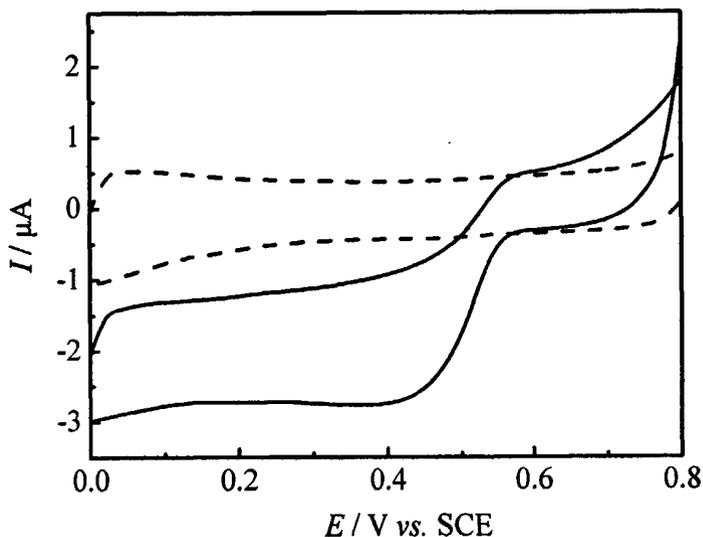


图 5.12 La/MWNTs-HA/GC 在 N_2 饱和 (虚线) 和空气饱和 (实线) 溶液中的循环伏安曲线

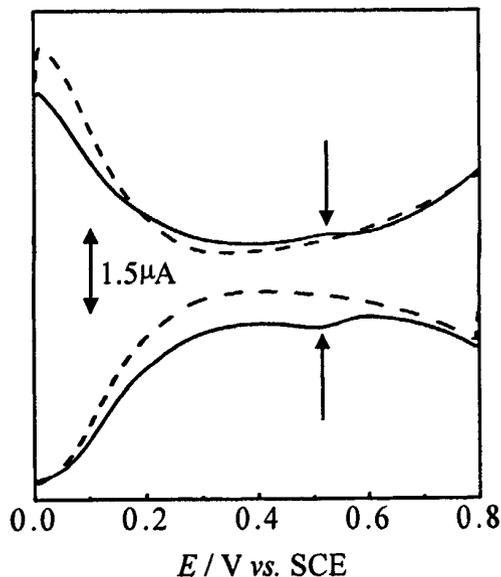


图 5.13 La/MWNTs-HA/GC (实线) 和 MWNTs-HA/GC (虚线) 在氮气饱和气氛中的差分脉冲图

5.4 生物燃料电池性能研究

我们以 GOD/MWNTs-HA/GC 修饰电极催化葡萄糖为阳极，以 La/MWNTs-HA/GC 修饰电极催化氧气为阴极构筑了生物燃料电池。图 5.14 为生物燃料电池阴极和阳极的极化曲线。对于阳极，在 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖存在的情况下，大约在 $+0.15 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ 左右开始出现氧化峰电流，氧化电流在 $+0.31 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ 处达到平台，最大电流密度可达到 $150 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。而阴极大约在 $+0.58 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ 处开始出现对氧气催化的还原电流，并且在 $+0.4 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ 左右达到平台，电流密度最大为 $100 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

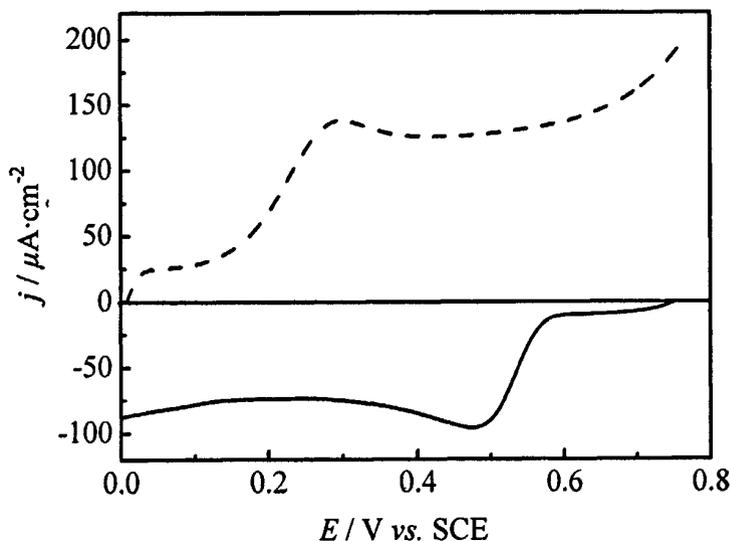


图 5.14 La/MWNTs-HA/GC (实线) 和 GOD/MWNTs-HA/GC (虚线) 的极化曲线

最后我们对生物燃料电池的性能做了研究，图 5.15 为生物燃料电池的极化曲线和输出功率。在室温下此生物燃料电池的开路电位为 $+0.58 \text{ V}(\text{vs. SCE})$ ，最大功率密度为 $15.8 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ，这个值相对比较小，我们认为这可能是由于受到电池阴极性能的限制。因此如何更进一步地提高此生物燃料电池的性能，还有待更深入的研究。

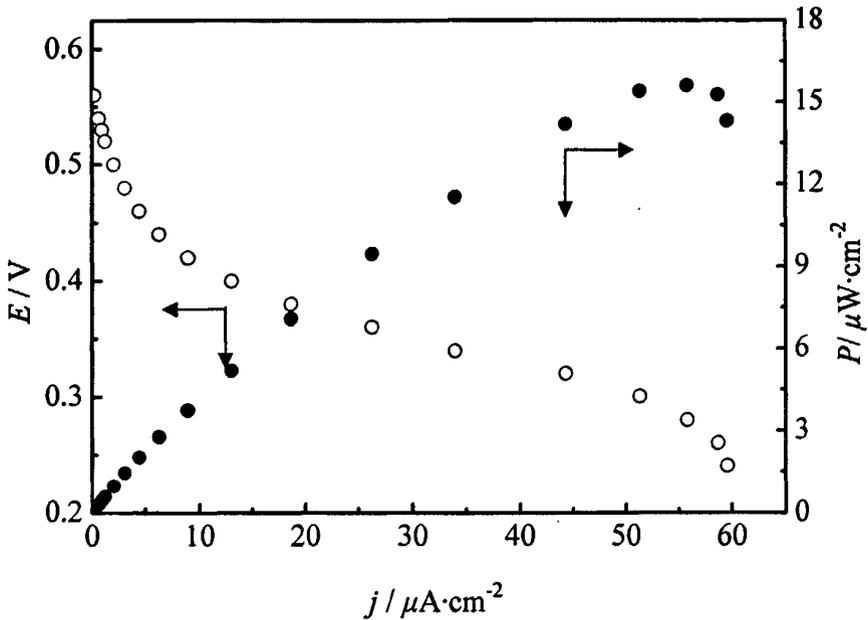


图 5.15 葡萄糖/氧气生物燃料电池的极化曲线和性能曲线

5.5 本章小结

本章制备了 GOD/MWNTs-HA 和 La/MWNTs-HA 修饰电极，对 GOD 的生物活性及修饰电极的电化学性能进行了深入的研究，以此为基础构筑生物燃料电池进行研究，得出以下结论：

(1) 红外光谱和紫外-可见光谱研究表明，GOD 吸附在 MWNTs-HA 复合膜上基本能够保持原始构象。

(2) 电化学研究表明，吸附在 MWNTs-HA 复合膜中的 GOD 在 -0.46 V (vs. SCE) 附近出现了一对可逆的氧化还原峰，为 GOD 电活性中心 FAD/FADH₂ 氧化还原电对的特征峰，电活性 GOD 的表面覆盖度可达 $(1.76 \pm 0.15) \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，表观电子转移速率常数 k_s 为 $(2.40 \pm 0.15) \text{ s}^{-1}$ 。

(3) 交联在 MWNTs-HA 复合膜上的 La 实现了其直接的电子转移，同时对氧气有较好的催化性能。

(4) 制备了葡萄糖/氧气生物燃料电池，开路电位为 +0.58 V (vs. SCE)，在输出电位为 +0.28 V (vs. SCE) 时，其最大输出功率为 $15.8 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

结 论

本论文以碳纳米管为基础, 分别制备了 SA-MWNTs 和 MWNTs-HA 复合膜, 并构筑了 Hb/SA-MWNTs/GC、Hb/MWNTs-HA/GC、GOD/MWNTs-HA/GC、La/MWNTs-HA/GC 电极, 研究了不同酶在不同界面上的生物活性及其生物电化学性质。同时还构筑了生物燃料电池, 并研究了其性能。主要得出以下结论:

(1) 海藻酸钠非共价功能化的碳纳米管在水溶液中有很好的分散性, 可形成均一稳定的悬浊液, 同时在固体基底上能够形成均匀的、三维多孔网状结构。血红蛋白在 SA-MWNTs 复合膜上仍能保持它的生物活性。同时, 血红蛋白在 SA-MWNTs 复合膜上能够实现直接电子转移, 具有较高的电子转移速率。而且复合膜中的血红蛋白对 H_2O_2 具有良好的生物电催化性能。Hb/SA-MWNTs 做为 H_2O_2 的生物传感器可应用于实物消毒水的检测, 结果具有一定的可靠性。

(2) 利用原位水热合成法制备了 MWNTs-HA 复合膜, 血红蛋白在 MWNTs-HA 复合膜上仍能保持生物活性, 而且血红蛋白在 MWNTs-HA 复合膜上能够实现直接电子转移, 具有较高的电子转移速率。同时 Hb/MWNTs-HA/GC 修饰电极对 H_2O_2 和 TCA 具有良好的生物电催化性能。制备的 Hb/MWNTs-HA/GC 做为 H_2O_2 生物传感器具有很高的灵敏度及稳定性。

(3) 以 MWNTs-HA 复合膜为界面, 分别固定 GOD 和 La, 构筑了隔膜型葡萄糖/氧气生物燃料电池, 其开路电位+0.58 V(vs. SCE), 在电位为 +0.28 V(vs. SCE)时, 最大输出功率可达 $15.8 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 为研究新型的生物燃料电池奠定了基础。

参考文献

- [1] Iijima S. Helical microtubues of graphitic carbon. *Nature*. 1991, 354(7): 56-58P
- [2] Gommans H H, Alldredge J W, Tashiro H, Park J, Magnuson J, Rinzler A G. Fibers of aligned single-walled carbon nanotubes: Polarized raman spectroscopy. *Journal of Applied Physics*. 2000, 88: 2509-2514P
- [3] Henning T H, Salama F. Carbon in the universe. *Science*. 1998, 282: 2204-2210P
- [4] Raychowdhury A, Roy K. Modeling of metallic carbon-nanotube interconnects for circuit simulations and a comparison with Cu interconnects for scaled technologies. *Ieee Transactions Computer-Aided Design*. 2006, 25(1): 58-65P
- [5] 李峰. 有机物催化热解法制备单壁碳纳米管及物理性能. 博士论文. 沈阳. 中国科学院金属研究所. 2001
- [6] Thess A, Lee R, Nikolaec P, Dai H, Petit P, Robert J, Xu C, Lee Y H, Kim S G, Rinzler A G, Colbert D T, Scuseria G E, Tomanek D, Fischer J E, Smalley R E. Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science*. 1996, 273: 483-487P
- [7] Zheng W, Zheng Y F. Gelatin-functionalized carbon nanotubes for the bioelectrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications*. 2007, 9: 1619-1623P
- [8] Liu A H, Watanabe T, Honma I, Wang J, Zhou H S. Effect poly(acrylicacid)-encapsulated multiwalled carbon nanotubes aqueous dispersion and its application for NADH sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 22: 694-699P
- [9] Odom T H, Huang J L, Kim P, Lieber C M. Structure and electronic properties of carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B*. 2000, 104:

2794-2809P

- [10] Yang S D, Zhang X G, Mi H Y, Ye X G. Pd nanoparticles supported on functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and electrooxidation for formic acid. *Journal of Power Sources*. 2008, 175: 26-32P
- [11] Peng H Q, Alemany L B, Margrave J L, Khabashesku V N. Sidewall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*. 2003, 125(49): 5174-5182P
- [12] Chen J, Hamm M A, Hu H, Rao A M, Eklund P C, Hadon R C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science*. 1998, 282: 95-98P
- [13] O'Connell M J, Boul P, Ericson L M, Huffman C, Wang Y H, Haroz E, Kuper C, Tour J, Ausman K D, Smalley R E. Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chemical Physics Letters*. 2001, 342(3): 265-271P
- [14] Fu K F, Huang W J, Liu Y, Riddle L A, Carroll D L, Sun Y P. Defunctionalization of functionalized carbon nanotubes. *Nano Letters*. 2001, 1: 439-441P
- [15] Hu C G, Chen Z L, Shen A G, Shen X C, Li J, Hu S H. Water-soluble single-walled carbon nanotubes via noncovalent functionalization by a rigid, planar and conjugated diazo dye. *Carbon*. 2006, 44: 428-434P
- [16] Morishita T, Matsushita M, Katagiri Y, Fukumori K. Synthesis and properties of macromer-grafted polymers for noncovalent functionalization of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*. 2009, 47: 2716-2726P
- [17] Zhang R Y, Wang X M, Shiu K, Accelerated direct electrochemistry of hemoglobin based on hemoglobin-carbon nanotube (Hb-CNT) assembly. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007, 316: 517-522P
- [18] Rahman M M, Umar A, Sawada K. Development of amperometric glucose

- biosensor based on glucose oxidase co-immobilized with multi-walled carbon nanotubes at low potential. *Sensors and Actuators B*. 2009, 137: 327–333P
- [19] Liu D, Li S, Wang Y Z, Wang T, Chen H J, Dong S J. Multilayer structured carbon nanotubes/poly-L-lysine/laccase composite cathode for glucose/O₂ biofuel cell. *Electrochemistry Communications*. 2008, 10: 1012-1015P
- [20] Tkac J, Ruzgas T. Dispersion of single walled carbon nanotubes, Comparison of different dispersing strategies for preparation of modified electrodes toward hydrogen peroxide detection. *Electrochemistry Communications*. 2006, 8: 899-903P
- [21] Chen X, Yi Y, Ding M Y. Electrocatalytic oxidation and sensitive detection of cysteine at layer-by-layer assembled carbon nanotube-modified electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 557: 52-56P
- [22] Yogeswaran U, Chen S M. Separation and concentration effect of f-MWCNTs on electrocatalytic responses of ascorbic acid, dopamine and uric acid at f-MWCNTs incorporated with poly (neutral red) composite films. *Electrochimica Acta*. 2007, 52: 5985-5996P
- [23] Sha Y F, Qian L, Ma Y, Bai H X, Yang X R. Multilayer films of carbon nanotubes and redox polymer on screen-printed carbon electrodes for electrocatalysis of ascorbic acid. *Talanta*. 2006, 70: 556-560P
- [24] Li Y X, Wang P, Wang L, Lin X Q. Overoxidized polypyrrole film directed single-walled carbon nanotubes immobilization on glassy carbon electrode and its sensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22: 3120-3125P
- [25] Lin X Q, Li Y X. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 22: 253-259P
- [26] Wang Y Z, Li Q, Hu S S. A multiwall carbon nanotubes film-modified carbon

- fiber ultramicroelectrode for the determination of nitric oxide radical in liver mitochondria. *Bioelectrochemistry*. 2005, 65: 135-142P
- [27] Aryal S, Remant B K , Dharmaraj N, Kim K W, Kim H Y. Synthesis and characterization of hydroxyapatite using carbon nanotubes as a nano-matrix. *Scripta Materialia*. 2006, 54: 131-135P
- [28] Liu H H, Zou G L. Electrochemical investigation of immobilized hemoglobin: Redox chemistry and enzymatic catalysis. *Biochemican and Biophysical Methods*. 2006, 68: 87-99P
- [29] Zheng W, Li Q F, Su L, Yan Y M, Zhang J, Mao L Q. Direct felectrochemistry of multi-copper oxidases at carbon nanotubes noncovalently Functionalized with gellulose derivatives. *Electroanalysis*. 2006. 18: 587-594P
- [30] Hirsch A. Functionalization of single-Walled carbon nanotubes. *Angewandti Chemie Internationsl Edition*. 2002, 41(11): 1853-1859P
- [31] Carlos P, Waldo A M, Natalia D, Roberto S, Alberto G, Julio S R. Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. *Biomaterials*. 1999, 20: 1869-1878P
- [32] David L, Betty M, Miriam R, Francesco C. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*. 2008, 343: 308-316P
- [33] Kauppinen J K, Moffate D J, Mantsch H H, Lameron D G. Fourier self-deconvolution: A method for resolving intrinsically overlapped bands. *Applied Spectroscopy*. 1981, 35: 271-276P
- [34] Hugc T, Anders E. Spectrophotometric, magnetic and titrimetric studies on the heme-linked groups in myoglobin. *Acta Chemica scandinavica*. 1951, 5: 823-848P
- [35] Liu H Y, Hu N F. Heme protein-gluten films: voltammetric studies and their

- electrocatalytic properties. 2003, 481(1): 91-99P
- [36]Shan D, Wang S X, Xue H G, Cosnier S. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin entrapped in composite matrix based on chitosan and CaCO_3 nanoparticles. *Electrochemistry Communications*. 2007, 9: 529-534P
- [37]Zhu J T, Shi C G, Xu J J, Chen H Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on undoped nanocrystalline diamond modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*. 2007, 71: 243-248P
- [38]Zheng W, Zheng Y F, Jin K W, Wang N. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized in TiO_2 nanotube films. *Talanta*. 2008, 74: 1414-1419P
- [39]Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1979, 101: 19-28P
- [40]Zhang H, Hu N F. Conductive effect of gold nanoparticles encapsulated inside polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on electrochemistry of myoglobin (Mb) in $\{\text{PAMAM-Au/Mb}\}_n$ layer-by-layer films. *The journal of physical chemistry B*. 2007, 111(35): 10583-10590P
- [41]Sun W, Wang D D, Li G C, Zhai Z Q, Zhao R J, Jiao K. Direct electron transfer of hemoglobin in a CdS nanorods and Nafion composite film on carbon ionic liquid electrode. *Electrochimica Acta*. 2008, 53: 8217-8221P
- [42]Li Y P, Cao H B, Zhang Y. Reductive dehalogenation of haloacetic acids by hemoglobin-loaded carbon nanotube electrode. *Water Research*. 2007, 41(1): 197-205P
- [43]Zhao Y D, Bi Y H, Zhang W D, Luo Q M. The interface behavior of hemoglobin at carbon nanotube and the detection for H_2O_2 . *Talanta*. 2005, 65: 489-494P

- [44] Yu J J, Ma J R, Zhao F Q, Zeng B Z. Direct electron-transfer and electrochemical catalysis of hemoglobin immobilized on mesoporous Al₂O₃. *Electrochimica Acta*. 2007, 53: 1995-2001P
- [45] Yamazaki I, Araiso T, Hayashi Y. Analysis of Acid-Base properties of peroxidase and myoglobin. *Advances in Biophysics*. 1978, 11(2): 249-281P
- [46] Niwa K, Furukawa M, Niki K. IR reflectance studies of electron transfer promoters for cytochrome c on a gold electrode. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. 1988, 245(12): 275-285P
- [47] Razola S S, Ruiz L B, Diez M N, Mark H B, Kauffmann J M. Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002, 17: 921-928P
- [48] Xiao H Y, Yu A M, Chen H Y. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteamine-modified gold electrode. *Analytical Biochemistry*. 2000, 278: 22-28P
- [49] Kamin R A, Wilson G S. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized layer. *Analytical chemistry*. 1980, 52(12):1198-1205.
- [50] Sun W, Li X Q, Wang Y, Zhao R J, Jiao K. Electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on multi-walled carbon nanotubes modified carbon ionic liquid electrode with hydrophilic EMIMBF₄ as modifier. *Electrochimica Acta*. 2009, 54: 4141-4148P
- [51] Cai C X, Chen J. Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of hemoglobin at a carbon nanotube electrode. *Analytical Biochemistry*. 2004, 325: 285-292P
- [52] Afsaneh S, Norouz M, Omran M, Mohsen S. Direct electrochemistry of hemoglobin and its electrocatalytic effect based on its direct immobilization

- on carbon ionic liquid electrode. *Electrochemistry Communications*. 2008, 10: 420-423P
- [53]Liu X J, Xu Y, Ma X, Li G X. A third-generation hydrogen peroxide biosensor fabricated with hemoglobin and Triton X-100. *Sensors and Actuators B*. 2005, 106: 284-288P
- [54]Feng L, Li H, Li F, Shi Z, Gu Z. Functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic molecules and their Langmuir-Blodgett films. *Carbon*. 2003, 41: 2385-2391P
- [55]Kumar M K, Reddy A L M, Ramaprabhu S. Exfoliated single-walled carbon nanotube-based hydrogen sensor. *Sensors and Actuators B*. 2008, 130: 653-660P
- [56]Bhatnagar V M. X-ray and infrared studies of lead apatites. *Canadian journal of chemistry*. 1971, 49: 662-663P
- [57]Bhattarai S R, Aryal S, Bahadur K C , Bhattarai N, Hwang P H, Yi H K, Kim H Y. Carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite for DNA complexation. *Materials Science and Engineering: C*. 2008, 28: 64-69P
- [58]查全性.电极过程动力学导论.北京.科学出版社.2004
- [59]Xu Y X, Hu Ch G, Hu Sh Sh. A hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin in Hb-Ag sol films. *Sensors and Actuators B*. 2008,130: 816-822P
- [60]Li M G, Chen S H, Ni F, Wang Y L, Wang L. Layered double hydroxides functionalized with anionic surfactant: Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin. *Electrochimica Acta*. 2008, 53: 7255-7260P
- [61]Wen Y L, Yang X D, Hu G H, Chen S H, Jia N Q. Direct electrochemistry and biocatalytic activity of hemoglobin entrapped into gellan gum and room temperature ionic liquid composite system. *Electrochimica Acta*. 2008, 54: 744-748P

- [62] Jia N Q, Wen Y L, Yang G F, Lian Q, Xu Ch J, Shen H B. Direct electrochemistry and enzymatic activity of hemoglobin immobilized in ordered mesoporous titanium oxide matrix. *Electrochemistry Communications*. 2008, 10: 774-777P
- [63] Topoglidis E, Astuti Y, Duriaux F, Gratzel M, Durrant J R. Direct electrochemistry and nitric oxide interaction of heme proteins adsorbed on nanocrystalline tin oxide electrodes. *Langmuir*. 2003, 19: 6894-6900P
- [64] Chen L, Lu G X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hybrid film assembled by polyelectrolyte-surfactant polymer; carbon nanotubes and hemoglobin. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2006, 597: 51-59P
- [65] Chen L, Lu G X. Novel amperometric biosensor based on composite film assembled by polyelectrolyte-surfactant polymer, carbon nanotubes and hemoglobin. *Sensors and Actuators B*. 2007, 121: 423-429P
- [66] Liu Y G, Lu C L, Hou W H, Zhu J J. Direct electron transfer of hemoglobin in layered α -zirconium phosphate with a high thermal stability. *Analytical Biochemistry*. 2008, 375: 27-34P
- [67] Li J W, Liu L H, Yan R, Xiao M Y, Liu L Q, Zhao F Q, Zeng B Z. Enhanced direct electron transfer reactivity of hemoglobin in cationic gemini surfactant-room temperature ionic liquid composite film on glassy carbon electrodes. *Electrochimica Acta*. 2008, 53: 4591-4598P
- [68] Chen S H, Yuan R, Chai Y Q, Zhang L Y, Wang N, Li X L. Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22: 1268-1274P
- [69] Lu X B, Zhou J H, W L, Liu Q, Li J H. Carbon nanofiber-based composites for the construction of mediator-free biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008, 23: 1236-1243P

- [70] Shleev S, Tkac J, Christenson A, Ruzgas T, Yaropolov A I, Whittaker J W, Gorton L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, 20: 2517-2554P
- [71] Hecht H J, Kalisz H M, Hendle J, Schmid R D, Schomburg D. Crystal Structure of glucose oxidase from aspergillus niger refined at 2-3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1993, 229: 153P
- [72] Bennett E P, Vincent M. Purification and properties of the glucose oxidase from aspergillus niger. *The journal of biological chemistry*. 1965, 240: 2209-2215P
- [73] Wang K Q, Yang H, Zhu L, Liao J H, Lu T H, Xing W, Xing Sh Y, Lv Q. Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by nafion and ordered mesoporous silica-SBA-15. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, 58: 194-198P
- [74] Cai C X, Chen J. Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes. *Analytical Biochemistry*. 2004, 332: 75-83P
- [75] You C P, Xu X, Tian B Z, Kong J L, Zhao D Y, Liu B H. Electrochemistry and biosensing of glucose oxidase based on mesoporous carbons with different spatially ordered dimensions. *Talanta*. 2009, 78: 705-710P
- [76] Salimi A, Sharifi E, Noorbakhsh A, Soltanian S. Immobilization of glucose oxidase on electrodeposited nickel oxide nanoparticles: Direct electron transfer and electrocatalytic activity. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22: 3146-3153P
- [77] Zhao S, Zhang K, Bai Y, Yang W W, Sun C Q. Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis. *Bioelectrochemistry*. 2006, 69: 158-163P

- [78] Gao R F, Zheng J B. Amine-terminated ionic liquid functionalized carbon nanotube-gold nanoparticles for investigating the direct electron transfer of glucose oxidase. *Electrochemistry Communications*. 2009, 11: 608-611P
- [79] Yang J, Zhang R Y, Xu Y, He P G, Fang Y Z. Direct electrochemistry study of glucose oxidase on Pt nanoparticle-modified aligned carbon nanotubes electrode by the assistance of chitosan-CdS and its biosensing for glucose. *Electrochemistry Communications*. 2008, 10: 1889-1892P
- [80] Wang D, Chen L W. Facile direct electron transfer in glucose oxidase modified electrodes. *Electrochimica Acta*. 2009, 54: 4316-4320P
- [81] Wen D, Liu Y, Yang G C, Dong S J. Electrochemistry of glucose oxidase immobilized on the carbon nanotube wrapped by polyelectrolyte. *Electrochimica Acta*. 2007, 52: 5312-5317P
- [82] Liu Q, Lu X B, Li J, Yao X, Li J H. Direct electrochemistry of glucose oxidase and electrochemical biosensing of glucose on quantum dots/carbon nanotubes electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22: 3203-3209P
- [83] Lee C W, Gray H B, Anson F C, Malmström B G. Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal laccase A. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1984, 172: 289-300P

攻读硕士学位期间发表的论文和取得的科研成果

- [1] H.Y. Zhao, W. Zheng, Z.X. Meng, H.M. Zhou, X.X. Xu, Z.Li, Y.F.Zheng. Bioelectrochemistry of hemoglobin immobilized on a sodium alginate-multiwall carbon nanotubes composite film. Biosensors and Bioelectronics. 2009, 24: 2352-2357P
- [2] H.Y. Zhao, H.M. Zhou, J.X. Zhang, W. Zheng, Y.F. Zheng. Carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite: A novel platform for glucose/O₂ biofuel cell. Biosensors and Bioelectronics. 2009, 25: 463-468P
- [3] H.Y. Zhao, X.X. Xu, J.X. Zhang, W. Zheng, Y.F. Zheng. Carbon nanotube-hydroxyapatite-hemoglobin nanocomposites with high bioelectrocatalytic activity. Bioelectrochemistry. 2010, in press
- [4] W. Zheng, H.Y. Zhao, H.M. Zhou, X.X. Xu, M.H. Ding, Y.F. Zheng. Electrochemistry of bilirubin oxidase at carbon nanotubes. Journal of Solid State Electrochemistry. 2010, 14: 249-254P

致 谢

本文是在我的导师郑卫教授的指导下完成的，整个论文的试验、测试和修改过程中郑卫教授倾注了极大的心力，给予我悉心的指导和有力的支持，导师扎实的理论基础、严谨求实的治学态度和精益求精的工作作风使我受益匪浅。郑卫教授不仅在学习上给予我悉心指导，在生活上也给予我无微不至的关怀，在此我对导师致以最衷心的感谢，作为学生，我只能竭尽心力做好此文作为回报。

感谢郑玉峰教授、李莉教授在学习上和生活上给我的热情帮助，他们广博的学识、严谨的学风、敏锐的科研洞察力和一丝不苟的科研精神让我钦佩不已，这些将使我受益终生。

感谢实验室的丁明惠老师，周惠敏老师等师长在实验测试过程中给予我的悉心指导和无私帮助。

感谢章建兴、马超、李兆清、杜灵根、王勇、王建军、王伟同学等在论文实验过程中给予我的多方帮助，有你们的支持才使我的论文工作得以顺利完成。

最后，感谢我的家人在生活上和精神上给予我的无微不至的关怀和鼓励，正是有了他们的默默支持，我才能在求学和科研道路上不畏挫折，勇往直前。