

## 巯基化改性壳聚糖在电化学生物传感器制备中的应用\*

王凯丽 宋晓光 公维田 隋卫平 李国宝\*\*

(山东省高校化学传感分析重点实验室 济南大学化学化工学院 济南 250022)

**摘要** 以壳聚糖、*N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC)为原料,以1-羟基苯并三唑(HOBt)和1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDAC)为缩合剂,合成功能化壳聚糖衍生物巯基壳聚糖(CHS-NAC).用红外光谱(FTIR)、核磁共振(<sup>1</sup>H-NMR)及X射线衍射(XRD)对其结构进行表征,用Ellman's试剂通过标准曲线法测得巯基含量.利用CHS-NAC的黏附性,通过层层吸附的方法将CHS-NAC、纳米金及细胞色素c分别修饰到玻碳电极(GC)上,通过扫描电子显微镜(SEM)对修饰电极表面的形貌进行了观察,采用循环伏安和电化学阻抗研究了不同修饰膜电极的电化学行为,及扫描速率对细胞色素c修饰电极的影响,并开展了对过氧化氢的电催化分析.实验结果表明,CHS-NAC能高效地将纳米金及细胞色素c固定在电极表面,并能有效发挥纳米金辅助转移电子及细胞色素c对过氧化氢催化的能力.

**关键词** 巯基壳聚糖, 纳米金, 修饰电极, 循环伏安, 细胞色素c, 过氧化氢

电极上吸附蛋白质的研究引起了广泛的关注.细胞色素c作为一种氧化还原蛋白质,其氧化还原中心是一个由多肽链包围的血红素辅基<sup>[1,2]</sup>,由于其在生命体内担负着电子传递的功能,因而研究其在电极上的直接电化学对于理解和认识生命体内的电子转移机制具有重要意义<sup>[3]</sup>.但细胞色素c的分子量较大,结构复杂,电活性中心深埋于多肽链内部,与电极表面距离较远,很难与电极直接交换电子;同时,蛋白质的吸附变性也会阻碍细胞色素c与电极之间的直接电子转移.因此,细胞色素c在一般固体电极上很难实现直接电子转移.为了能有效地实现细胞色素c在电极表面的电子转移,需要在电极表面修饰一层或在溶液中加入一种促进细胞色素c直接进行电子转移的媒介物质<sup>[4]</sup>.壳聚糖是一种天然的聚阳离子高分子化合物,是一种直链氨基多糖<sup>[5]</sup>,具有较强的络合、吸附能力,作为生物分子固定载体,因具有原料易得、机械性能好、化学性能稳定、固定效率高等优点,近年来在生物传感器中用作酶、抗体等生物大分子固定材料的研究日益增多<sup>[6-9]</sup>.但壳聚糖溶解性较差,需要在弱酸性条件下才能溶解<sup>[10]</sup>,而且壳聚糖在固定某些生物活性分子时,通常需采用戊二醛作交联剂,利用形

成的壳聚糖交联网络固定化酶<sup>[11,12]</sup>.然而戊二醛含有细胞毒素<sup>[13]</sup>,会使酶部分失活,降低生物活性,缩短保存周期;为了克服上述不足,改性壳聚糖<sup>[14,15]</sup>逐渐引起了研究者的关注.在壳聚糖分子上接入巯基基团后可直接溶于水中,而且具有更强的生物黏附性<sup>[16]</sup>.且其黏附性与巯基含量及pH值有关.巯基含量增加,黏附性增强;pH值升高,巯基壳聚糖内部形成二硫键数量增多,黏附能力降低<sup>[17]</sup>.在生物传感器的制备中引入纳米材料,可提高传感器的电流响应灵敏度,为生物传感器的发展提供了有效的途径.由于纳米粒子具有大的比表面积,且具有良好的稳定性和表面吸附能力以及表面效应、宏观量子隧道效应、光学效应等<sup>[18]</sup>,因此可以在增加酶的吸附量和稳定性的同时提高酶的催化活性.纳米金溶胶也叫做胶体金,是指金的微小颗粒直径在1~100 nm之间,它的表面活性点多,吸附能力强,表面反应活性高,对生物分子如蛋白质、DNA、酶、抗体等具有较强的亲和性,而且具有很好的生物相容性,可在酶的氧化还原中心与电极之间传递电子<sup>[19,20]</sup>,使电流响应灵敏度得到大幅度的提高,且不会改变被吸附物质的性质,鉴于纳米金粒子良好的固定生物分子的能力,并与生物分子有相当好的相容性,可用

\* 2012-08-09 收稿,2012-09-05 修稿;山东省国际科技合作计划项目(基金号 2012GHZ20205)、山东省自然科学基金(基金号 ZR2009BM039)和济南大学博士基金(基金号 XBS1204)资助项目.

\*\* 通讯联系人,E-mail: chm\_ligh@ujn.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12244

于纳米复合膜的制备, 用来保持生物分子的活性, 从而用于生物传感器构造的研究<sup>[21]</sup>.

本研究对壳聚糖进行巯基化改性, 并充分利用壳聚糖的黏附性将纳米金、细胞色素 c 修饰到电极表面, 以制备稳定的细胞色素 c 修饰电极. 通过研究修饰电极的循环伏安曲线和交流阻抗曲线, 考察其电化学行为, 从而为巯基壳聚糖在用作生物传感器固定载体材料方面的应用奠定实验基础.

## 1 实验部分

### 1.1 实验试剂

壳聚糖 (CHS) (分子量 500000), 济南海得贝海洋生物工程有限公司; *N*-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸), 阿拉丁

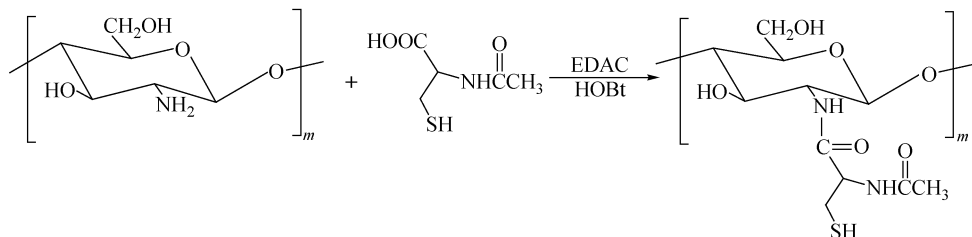


Fig. 1 Schematic illustration for the preparation of CHS-NAC

精确称取 0.1980 g 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)溶于 50 mL 50 mmol/L 的磷酸氢二钠溶液中配制 Ellman's 试剂, 用于测定巯基的含量. 配制 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 NAC 标准液, 分别移取不同体积的标准液到试管中, 分别向各试管内加入 0.50 mL Ellman's 试剂, 用 pH = 8.0 的磷酸缓冲溶液定容到 5 mL, 混匀后在 402 nm 的波长下测吸光度, 做出标准曲线  $Y = 0.4476X + 3.029$  (相关系数  $R = 0.9996$ ). 再用同样的方法, 称取 10 mg CHS-NAC, 加入 0.50 mL Ellman's 试剂, 用磷酸缓冲溶液定容到 5 mL, 超声振荡 2 h 后在 402 nm 的波长下测吸光度, 根据标准曲线计算出 CHS-NAC 样品的巯基含量为  $4.311 \times 10^{-4}$  mol/g.

### 1.3 CHS-NAC 的结构表征

#### 1.3.1 FTIR 测定

采用 NEXUS-470 型傅立叶变换红外光谱仪 (美国 PE 公司) 进行测试, 工作条件为  $E > 10$  V, KBr 压片法, 在  $400 \sim 4000$   $\text{cm}^{-1}$  的中红外区扫描.

#### 1.3.2 $^1\text{H-NMR}$ 测定

取适量样品溶解于  $\text{D}_2\text{O}$  中, 采用 400 兆核磁共振仪 (瑞士布鲁克拜厄斯宾有限公司), 以 TMS

试剂 (中国) 有限公司; 1-羟基苯并三氮唑 (HOBt)、氯金酸, 国药集团化学试剂有限公司; 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDAC), 萨思化学技术 (上海) 有限公司; 细胞色素 c, Sigma 公司, 其他试剂均为市售分析纯产品.

### 1.2 CHS-NAC 的合成及巯基含量的测定

CHS-NAC 的合成路线如图 1 所示. 称取 0.50 g 壳聚糖, 0.35 g HOBt 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 40 mL 蒸馏水, 搅拌均匀后加入适量 NAC, 再将一定量的 EDAC 溶解于 5 mL 蒸馏水后加入烧瓶, 用 1 mol/L NaOH 将反应液 pH 调至 5 左右, 室温磁力搅拌下反应 3 h. 随后, 用无水乙醇将产品析出, 抽滤, 再用无水乙醇洗涤抽滤 3 次, 50  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥, 4  $^{\circ}\text{C}$  下冷藏保存.

为内标, 磁场强度 299.95 MHz, 记录  $^1\text{H-NMR}$  谱图.

#### 1.3.3 XRD 测定

取约 0.3 g CHS 和 CHS-NAC 样品, 用 D8 ADVANCE 型 X 射线衍射仪 (德国布鲁克 AXS 有限公司), 扫描范围为  $10^{\circ} \sim 80^{\circ}$ , 扫描速度为  $10$  ( $^{\circ}$ )/min, 时间设定为 30 min, 电压为 40 kV, 电流为 25 mA, 测其 XRD 谱图.

### 1.4 电极的修饰及表面形貌表征

首先, 将玻碳电极分别用 0.5  $\mu\text{m}$  和 0.05  $\mu\text{m}$  的氧化铝悬浊液打磨抛光. 然后, 将抛光好的电极依次用蒸馏水冲洗干净并超声 5 min, 无水乙醇中超声 5 min, 最后用二次蒸馏水超声洗涤 5 min, 晾干备用. 用微量注射器吸取 8  $\mu\text{L}$  CHS-NAC 溶液滴加到电极表面并晾干, 所得电极记为 CHS-ANC/GC. 随后, 将晾干的 CHS-ANC/GC 电极在二次蒸馏水中浸泡 5 ~ 10 s 后, 接着浸入按文献 [22] 制备好的纳米金溶液中, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜, 所得电极记为 Nano-Au/CHS-ANC/GC. 最后, 将 Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极取出在二次蒸馏水中浸泡 5 ~ 10 s, 晾干, 再浸入细胞色素 c 溶液

中 30 h, 所得电极记为 Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC.

将修饰好的 CHS-ANC/GC、Nano-Au/CHS-ANC/GC、Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极通过 FEI QUANTA FEG250 型场发射扫描电镜 (SEM, EDS) (美国 FEI 公司) 观察其表面形貌.

### 1.5 基于巯基壳聚糖的细胞色素 c 修饰电极的电化学测试

循环伏安测试采用 LK2005 电化学分析仪 (天津兰力科化学电子高技术有限公司) 进行, 交流阻抗实验采用德国 ZAHNER 公司生产的电化学工作站进行. 测量所用电解质溶液为浓度 0.1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$  配置的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 为进一步降低充电电流效应, 在 PBS 缓冲溶液中添加适量的 KCl 电解质. 移取 10 mL PBS 缓冲溶液 ( $\text{pH} = 6.86$ ) 于电化学池中, 连接电化学分析仪, 设定实验参数: 初始电位为 0 V, 开关电位 1 为  $-0.2$  V, 开关电位 2 为 0.6 V, 扫描速率为 0.05 V/s, 灵敏度选择 10  $\mu\text{A}$ , 滤波参数选择 50 Hz. 分别在 PBS 缓冲溶液 ( $\text{pH} = 6.86$ )、5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} + 0.1$  mol/L KCl + 0.1 mol/L PBS ( $\text{pH} = 6.86$ ) 溶液中依次进行空白 GC 电极、CHS-ANC/GC 电极、Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极、Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极的循环伏安和交流阻抗测试, 并记录各电极的电化学谱图.

## 2 结果与讨论

### 2.1 CHS-NAC 的表征

图 2 分别为 CHS、CHS-NAC 的红外光谱图. 对于原料 CHS, 3445  $\text{cm}^{-1}$  处的强吸收峰是  $-\text{OH}$  和  $-\text{NH}$  的特征吸收峰部分重叠的结果, 1169 和 1079  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰分别是  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  和伯羟基的伸缩振动吸收峰; 1602  $\text{cm}^{-1}$  处是伯胺  $\text{N}-\text{H}$  面内弯曲振动强吸收峰. 对于产物 CHS-NAC, 在 1525  $\text{cm}^{-1}$  附近处出现了一个吸收峰, 此为酰胺键的特征吸收峰, 说明 NAC 的羧基与壳聚糖的氨基进行了反应; 同时 1602  $\text{cm}^{-1}$  处伯胺  $\text{N}-\text{H}$  面内弯曲振动强吸收峰依然存在, 这说明壳聚糖的氨基只有一小部分与 NAC 的羧基发生反应. 与 CHS 的红外光谱图比较, 在 2500  $\text{cm}^{-1}$  附近处出现了比较微弱的吸收峰, 此为 NAC 上巯基的吸收峰, 进一步说明 NAC 已接到 CHS 分子上. 从 CHS 与 CHS-NAC 的  $^1\text{H-NMR}$  谱图 (图 3) 也可见, 在  $\delta = 2.75 \sim$

4.44 间的吸收峰分别对应 CHS 六元环上 H 的位移, 而图 3 (b) 中  $\delta = 2.05$  处为 NAC 中  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{NH}$  和  $-\text{SH}$  基团中氢的化学位移, 说明 CHS-NAC 化合物中含有巯基基团, 从而进一步证明 NAC 已接到 CHS 分子上.

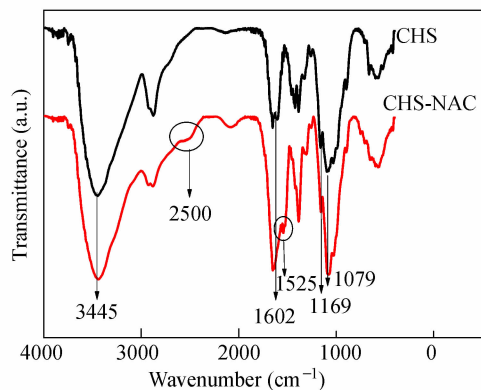


Fig. 2 FTIR spectra of CHS and CHS-NAC

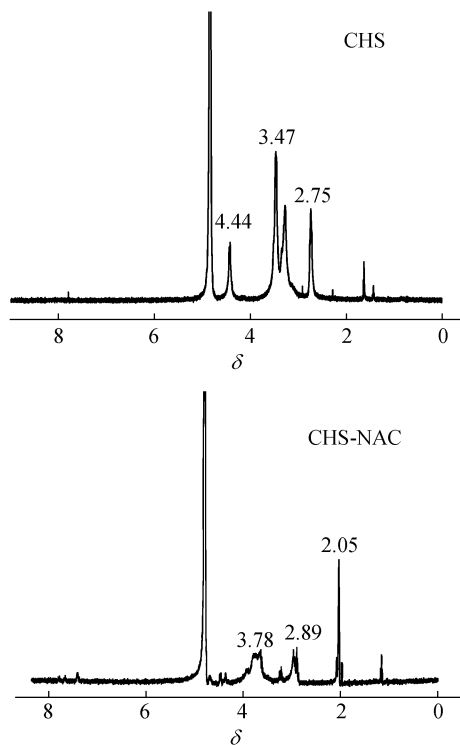


Fig. 3  $^1\text{H-NMR}$  spectra of CHS and CHS-NAC

图 4 为 CHS、CHS-NAC 的粉末 X 射线衍射图谱. 如图 4 所示, 曲线 a 在 15 ~ 22 处有比较强烈的衍射峰, 这主要是由于壳聚糖的二维晶体结构造成的<sup>[23]</sup>, 其主要峰产生的原因是壳聚糖分子上的游离氨基和其内部的氢键. 而相对于曲线 a, 曲线 b 衍射曲线则比较平缓, 没有强烈的衍射峰产生, 峰面积也随之变宽, 这表明 CHS-NAC 相对于

CHS 有着较小的晶体度. 这主要是由巯基基团的取代反应造成游离氨基含量减少, 壳聚糖内部氢键也随之减少, 破坏了壳聚糖原有的晶体结构, 造成晶体度降低所致. 而前人已证明, 晶体结构是影响物质吸附能力的一种比较重要的因素<sup>[24]</sup>, 相关研究表明晶体度的降低可以增强吸附剂的吸附能力<sup>[25]</sup>. 本实验证明, 巯基化壳聚糖的晶体度小于壳聚糖, 说明 CHS-NAC 有着作为高性能吸附剂的前景.

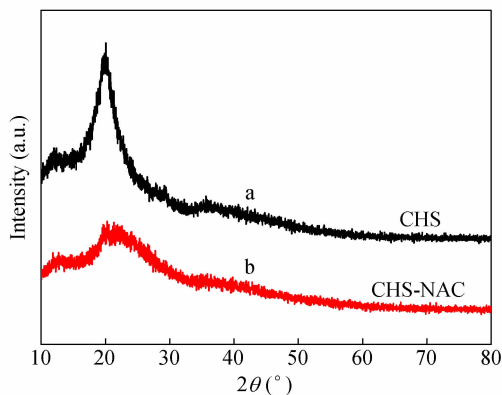


Fig. 4 XRD spectra of CHS (a) and CHS-NAC (b)

## 2.2 基于巯基壳聚糖的细胞色素 c 修饰电极的电化学行为

### 2.2.1 修饰电极的循环伏安行为

将各步骤所得电极在 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液 (pH = 6.86) 中, 于 -0.4 ~ 0.6 V 电位区间内进行循环伏安测试, 其曲线如图 5 所示. 从图中可看出, 空白 GC 电极、CHS-ANC/GC 电极、Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极对应的循环伏安曲线上均没有氧化还原峰出现, 只是背景电流 (即充电电流) 有所变化, 这种变化主要是由电极表面修饰物的不同引起的. 当空白 GC 电极修饰上巯基壳聚糖后, 充电电流明显减少, 这是由于巯基壳聚糖本身不导电, 阻碍电子的传递, 导致充电电容降低所致; 当进一步修饰上纳米金后, 与 CHS-ANC/GC 电极相比, 充电电流略有升高, 说明纳米金增强了修饰电极的导电性, 但由于巯基壳聚糖的存在, 充电电流仍小于空白 GC 电极; 而在 Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 修饰电极对应曲线上, 充电电流进一步降低, 且出现了一对可逆的氧化还原峰, 对应的氧化还原峰电位分别为  $E_{p,a} = 0.243$  V,  $E_{p,c} = 0.152$  V. 说明细胞色素 c 已经成功修饰到玻碳电极上, 并且产生了细胞色素 c 因氧化还原反应所致的法拉第电流. 而在保持其它

修饰物不变, 将巯基壳聚糖更换为未改性的壳聚糖后, 所得修饰电极上却没有出现细胞色素 c 的氧化还原峰 (见图 5 内插图), 这是由壳聚糖对纳米金和细胞色素 c 的吸附固定能力不强造成的, 这说明壳聚糖本身在不添加交联剂的情况下很难在电极表面上固定细胞色素 c. 可见, 在 Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 修饰电极的制备过程中, 巯基壳聚糖起着非常关键的作用, 利用其巯基能很好的固定纳米金, 而纳米金带有负电荷, 可进一步吸附固定带正电荷的细胞色素 c, 同时利用巯基壳聚糖的生物黏附性进一步将细胞色素 c 固定在电极表面的修饰层上. 由于纳米金良好的导电性, 使得细胞色素 c 电子传递得以有效的进行, 从而获得了细胞色素 c 准可逆的氧化还原峰.

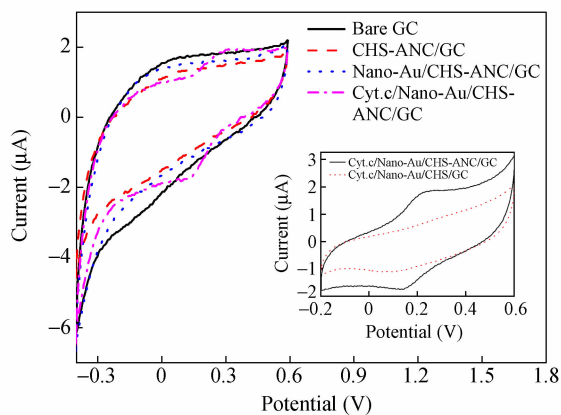


Fig. 5 Cyclic voltammograms of modified electrodes  
Inset: cyclic voltammograms of Cyt. c/Nano-Au/CHS/GC and Cyt. c/nano-Au/CHS-ANC/GC modified electrodes

为了进一步研究电极修饰后的电化学行为, 还考察了不同修饰电极在电化学探针铁氰化钾溶液中的交流阻抗图和循环伏安图. 交流阻抗法是一种以小振幅的正弦波电位 (或电流) 为扰动信号的电化学测量方法, 以不同频率的小幅值正弦波扰动信号作用于电极系统, 由电极系统的响应与扰动信号之间的关系得到电极阻抗, 推测电极的等效电路, 进而可以分析电极系统包含的动力学过程及其机理. 电化学阻抗谱已被广泛应用于腐蚀、电沉积和高分子膜等各种电化学体系.

图 6 (a) 为不同修饰电极在 5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} + 0.1$  mol/L KCl + 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液 (pH = 6.86) 中的交流阻抗谱图. 图中半圆弧直径的大小反映了电极表面的阻抗情况, 这种阻力受电极表面的氧化还原探针电子转移动力

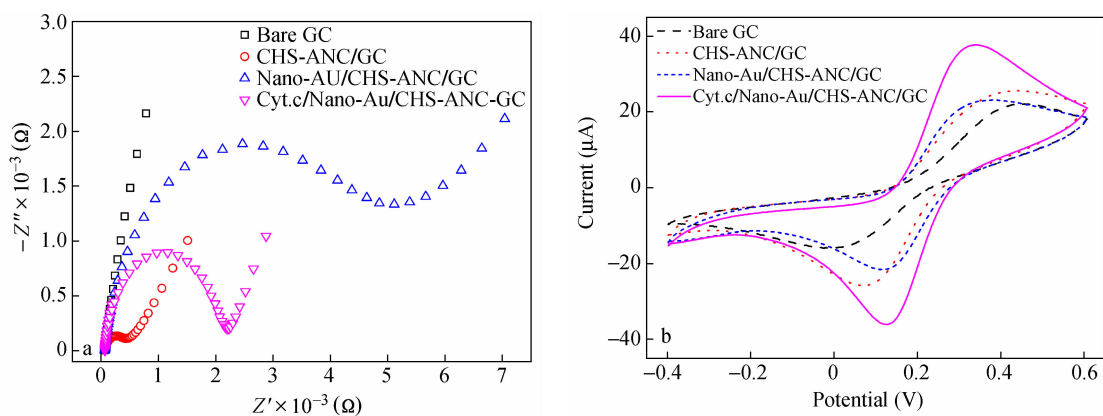


Fig. 6 Impedance spectra (a) and cyclic voltammograms (b) of different modified electrodes

学控制<sup>[26]</sup>. 从图中可见, 空白 GC 电极的交流阻抗谱图在整个扫描频率范围内基本上为一条直线, 说明这一步是扩散控制过程, 空白 GC 电极对氧化还原探针有非常小的电子转移阻抗. 而表面修饰了巯基壳聚糖的 CHS-ANC/GC 电极的阻抗曲线在高频区产生了一直径较小的圆弧, 这是由于不导电的巯基壳聚糖阻碍了探针  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  的电子转移; 当继续修饰上带负电荷的纳米金后, 圆弧直径进一步变大, 这是由于带负电荷的纳米金, 与溶液中的探针  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  产生静电排斥作用, 使  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  离子难以接近电极表面, 导致电极的电子交换反应更加困难, 使 Nano-Au/CHS-ANC/GC 修饰电极的电化学阻抗值明显增加<sup>[27]</sup>. 与 Nano-Au/CHS-ANC/GC 修饰电极的阻抗曲线相比, 当在 Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极上进一步修饰细胞色素 c 后, 因细胞色素 c 带正电荷, 能够吸引溶液中带负电荷的探针  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , 使得圆弧直径变小, 阻抗值明显降低. 通过不同修饰阶段电极交流阻抗谱图的变化, 可清楚的看出, 各修饰物均已成功修饰

到电极表面, 各修饰电极交流阻抗值的变化与修饰物的特性一致. 从图 6(b) 中空白 GC 电极、CHS-ANC/GC 电极、Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极、Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极相对应的循环伏安曲线的变化亦可看出, 巯基壳聚糖、纳米金和细胞色素 c 均已成功修饰到电极表面.

通过对 CHS-ANC/GC, Nano-Au/CHS-ANC/GC, Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 电极表面进行扫描电子显微镜 (SEM) 观察, CHS-ANC 在电极表面修饰一层薄膜后, 放大 5000 倍时呈凹凸不平的表面, 当放大  $1 \times 10^5$  倍时呈现为较平整光滑的表面, 如图 7(a) 所示. 当继续吸附胶体金后, 可明显看见在 CHS-ANC 表面上附着的纳米金颗粒, 如图 7(b) 所示, 当放大  $1 \times 10^5$  倍时可清晰观察到尺寸分布较为均匀的纳米金颗粒; 而当进一步吸附细胞色素 c 后, 在  $1 \times 10^5$  倍下观察 (见图 7(c)), 大部分纳米金颗粒表面被细胞色素 c 所覆盖. 通过 SEM 图像, 不仅进一步证实了巯基壳聚糖、纳米金和细胞色素 c 3 种修饰物质的存在, 而且进一步明确了三者电极表面的分布形态.

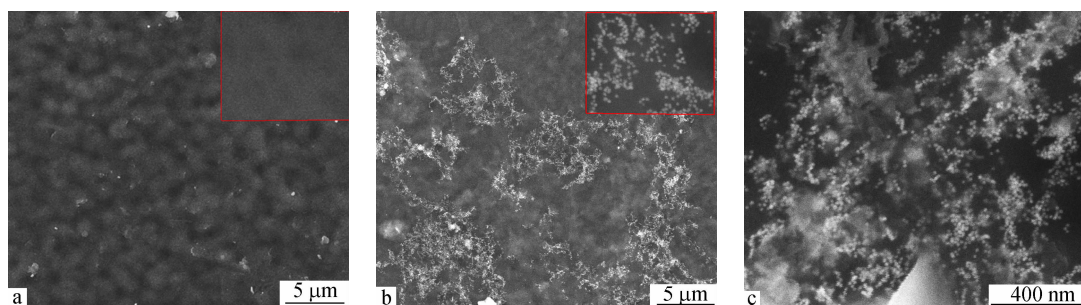


Fig. 7 The morphology of (a) CHS-ANC (b) Nano-Au/CHS-ANC and (c) Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC modified on glassy carbon electrodes

实验还考察了扫描速率对 Cyt. c/Nano-Au/CHS-ANC/GC 修饰电极的影响。在 PBS 缓冲溶液 (pH = 6.86) 中, 在 20 ~ 100 mV/s 的范围内, 改变扫描速率进行循环伏安扫描, 结果如图 8 (a) 所示。细胞色素 c 的氧化还原峰电位基本不变, 氧化峰电位  $E_{p,a} = 0.243$  V, 还原峰电位  $E_{p,c} = 0.152$

V, 而氧化还原峰电流随扫描速率的增加而增大。由图 8 (b) 可看出氧化还原峰电流分别与扫描速率呈线性关系, 其线性回归方程分别为  $i_{p,a} = 23.55v + 0.6453$  (相关系数  $R = 0.9993$ ),  $i_{p,c} = -22.34v - 0.3453$  (相关系数  $R = -0.9991$ ), 说明这是一个由电极表面反应控制的过程。

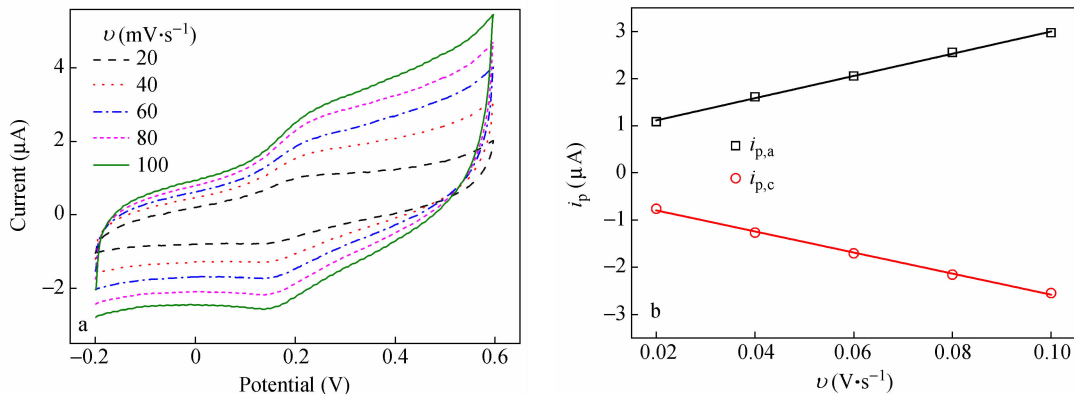


Fig. 8 Cyclic voltammograms of Cyt. c/Nano-Au/ANC-CHS/GC modified electrode at different scanning rates (a) and the relationship between redox peak currents and the scan rates (b)

### 2.2.2 Cyt. c/Nano-Au/CHS-NAC/GC 修饰电极对过氧化氢的电催化作用

Cyt. c/Nano-Au/CHS-NAC/GC 修饰电极对过氧化氢的电催化循环伏安曲线如图 9 所示。由图中可观察到, 随着过氧化氢浓度的增加, 其电催化还原峰电流也增加, 在电势扫描区间内无明显的氧化电流峰。实验结果表明固定在巯基壳聚糖-纳米金复合膜中的细胞色素 c 不仅可以进行有效的直接电子转移, 而且还能保持细胞色素 c 对过氧化氢电催化还原活性。细胞色素 c 对过氧化氢有明显的电催化作用, 并且在过氧化氢的响应浓度范围  $2.50 \times 10^{-5} \sim 3.50 \times 10^{-4}$  mol/L 内, 其还原峰电流与浓度的线性关系为  $i_{p,c} = -6.379 \times 10^3 c$  ( $H_2O_2$ ) - 6.891 (相关系数  $R = 0.9993$ )。

## 3 结论

本研究合成了巯基取代度为  $4.311 \times 10^{-4}$  mol/g 的功能化壳聚糖衍生物 CHS-NAC。将 CHS-NAC、纳米金、细胞色素 c 等材料通过层层吸附组装的方法制备成细胞色素 c 修饰电极, 该电极稳定性较好, 且对过氧化氢表现出很好的电催化作

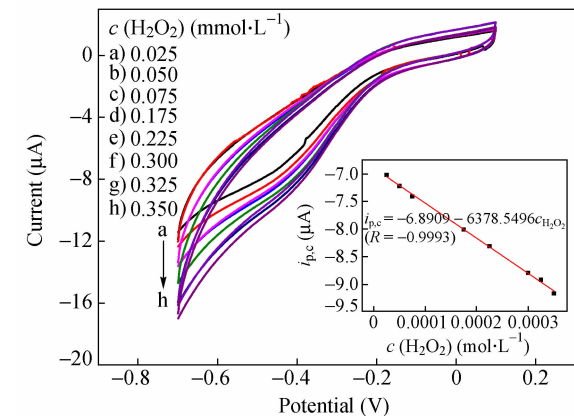


Fig. 9 Cyclic voltammograms of cytochrome c modified gold electrodes in PBS solution with different hydrogen peroxide concentrations

Inset: The relationship between anodic peak currents and concentration

用。借助巯基壳聚糖的吸附性以及纳米金的导电性和生物相容性, 有利于电极表面的电子转移, 对生物传感器的研究奠定了重要的实验基础。此改性的巯基壳聚糖有望在免疫传感器的构建中得以应用, 从而可以避免有毒交联剂的使用。后续工作正在进行中。

## REFERENCES

- 1 Zhang Ya(张亚),Zheng Jianbin(郑建斌). Acta Chim Sinica(化学学报),2011,69(16):1903~1908
- 2 Xu Jiming(徐继明),Li Wei(李伟),Yin Qifan(尹起范),Zhu Yulan(朱玉兰). Chemical Research and Application(化学研究与应用),2007,19(4):370~373
- 3 Bai Linshan(白林山),Han Rui(韩睿),Lv Dandan(吕丹丹). Journal of Anhui University of Technology(安徽工业大学学报(自然科学版)),2011,28(3):375~379
- 4 Qu Jianying(屈建莹),Chen Wenjing(陈文静),Wang Yu(王钰),Zhu Lili(朱莉莉). Journal of Analytical Science(分析科学学报),2011,27(3):363~366
- 5 Aranaz I,Harris R,Heras A. Current Organic Chemistry,2010,14(1):308~330
- 6 Shao M L,Bai H J,Gou H L,Xu J J,Chen H Y. Langmuir,2009,25(5):3089~3095
- 7 Tang J,Tang D P,Li Q F,Su B L,Qiu B,Chen G N. Analytica Chimica Acta,2011,697(1-2):16~22
- 8 Lai G S,Yan F,Wu J,Leng C,Ju H X. Anal Chem,2011,83(7):2726~2732
- 9 Xu S J,Liu Y,Wang T H,Li J H. Anal Chem,2011,83(10):3817~3823
- 10 Hu Yintao(胡印滔),Li Meihua(李梅华),Li Mingchun(李明春). Chemical Industry and Engineering Progress(化工进展),2011,30(10):2228~2234
- 11 Zhu Jingtuo(祝敬妥),Zhang Hui(张卉),Xu Jingjuan(徐静娟),Chen Hongyuan(陈洪渊). Journal of Analytical Science(分析科学学报),2009,25(1):1~5
- 12 Liang Kezhong(梁克中). Chemical Research and Application(化学研究与应用),2010,22(12):1520~1525
- 13 Liu Y,Li Y,Liu S,Li J,Yao S. Biomater,2004,25(26):5725~5733
- 14 Huang H,Yang X. Colloids Surf A:Physicochem Eng Aspects,2003,226(1-3):77~86
- 15 Pozzo A D,Vanini L F M,Guerrini M,Benedittis A,Muzzarelli R A A. Carbohydrate Polym,2000,42(1):201~206
- 16 Wang Xin(王鑫),Wu Zhongming(毋中明),Zhang Xinge(张新歌),Zheng Chao(郑超),Wang Zhen(王镇),Li Zhaoxing(李朝兴). Chem J Chinese U(高等学校化学学报),2008,29(4):851~857
- 17 Lv Lin(吕霖),Zhou Jianping(周建平),Zhang Yong(张勇). Chinese New Drug Journal(中国新药杂志),2007,16(16):1250~1254
- 18 Zhang Yan(张雁),Kang Tanfang(康天放),Lu Liping(鲁理平),Liu Tongsheng(刘桐坤),Cheng Shuiyuan(程水源). Environmental Science(环境科学),2011,32(4):1127~1132
- 19 Kang X B,Pang G C,Liang X Y,Wang M,Liu J,Zhu W M. Electrochimica Acta,2012,62(1):327~334
- 20 Zheng Haixia(郑海霞),Huang Boneng(黄博能),Hu Junman(胡君曼),Gong Yan(龚葵). Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis(北京大学学报(自然科学版)),2011,47(5):777~782
- 21 John Lin Z P, Ji W H, Daksha D K, Shum L Y. J Pharm Biomed Anal,2003,33(1):101~108
- 22 Zheng Yu(郑瑜),Lin Xiangqin(林翔钦). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学),2008,36(5):604~608
- 23 Dung P M,Milas M,Rinaudo M,Desbriers J. Carbohydr Polym,1994,24(3):209~214
- 24 Sankaramakrishnan N,Sanghi R. Carbohydr Polym,2006,66(2):160~167
- 25 Sun Gangzheng(孙刚正). Preparation,Characteristics Evaluation of Oleoyl-arboxymethyl Chitosan as a Coagulation Agent(羧甲基油酞壳聚糖的制备、性质及其对含油废水絮凝机理的研究). Doctoral Dissertation of China Ocean University(中国海洋大学博士学位论文). 2010
- 26 Chen S H,Yuan R,Chai Y Q. Biosens Bioelectron,2007,22(7):1268~1274
- 27 Luo Qimei(罗启枚),Wang Huixian(王辉宪),Xu Xinyu(徐新宇),Li Yantao(李彦涛),Huang Jun(黄俊),Liu Dengyou(刘登友). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报),2011,30(7):780~783

## THE APPLICATION OF THIOLATED CHITOSAN IN CONSTRUCTION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR

Kai-li Wang, Xiao-guang Song, Wei-tian Gong, Wei-ping Sui, Guo-bao Li

(*Key Laboratory of Chemical Sensing & Analysis in Universities of Shandong,*

*School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022*)

**Abstract** A functionalized chitosan derivative named sulfhydryl chitosan (CHS-NAC) was synthesised from chitosan (CHS) and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), with 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) as condensation agents. The structure of CHS-NAC was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray diffraction (XRD). The content of thiol-group of CHS-NAC was measured to be  $4.311 \times 10^{-4}$  mol/g through calibration curve taking use of Ellman's reagent. A layer of CHS-NAC film was modified onto the surface of glassy carbon electrodes by dispensing 8  $\mu$ L CHS-NAC solution. With the adhesive function of CHS-NAC modified film, gold nanoparticles and cytochrome *c* were modified onto the surface of glassy carbon electrode respectively. The electrochemical behaviors of these different modified electrodes were studied by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectra. The surface morphology of modified electrodes was characterized by scanning electron microscope (SEM). The influence of scan rate on the cytochrome *c* modified electrodes was also studied. Results showed that in low scan rate, electrochemical behavior was controlled by the surface process. The electrochemical catalytic analysis for hydrogen peroxide was carried out by using the cytochrome *c* modified electrode. Results showed that gold nanoparticles and cytochrome *c* can be fixed on the surface of glassy carbon electrode very well by CHS-NAC, and gold nanoparticles can effectively promote electron transfer of cytochrome *c* and the ability to electrochemically catalyze hydrogen peroxide.

**Keywords** Sulfhydryl chitosan, Gold-nanoparticle, Modified electrode, Cyclic voltammetry, Cytochrome *c*, Hydrogen peroxide