

文章编号: 1671-0444(2018)01-0053-06

静电纺碳纤维/石墨烯-壳聚糖-纳米金复合膜 对 17β -雌二醇的检测性能

平 婧^{a, b}, 柳建设^{a, b}

(东华大学 a. 环境科学与工程学院; b. 国家环境保护纺织污染防治工程技术中心, 上海 201620)

摘要:以聚苯胺(PANI)为前驱液,利用静电纺丝技术并结合预氧化和碳化处理工艺制备碳纳米纤维(CNFs),将制备的CNFs均匀分散在壳聚糖(CS)、纳米金(AuNPs)复合溶液中,利用Au—S键固定一端修饰了巯基的核酸适配体,构建一种灵敏度高且稳定性好的电化学核酸适配体传感器来检测 17β -雌二醇(E2)。借助透射电镜检测制备的碳纳米纤维和成品石墨烯复合膜的形貌特征,通过循环伏安法表征修饰电极表面的电化学性能。结果表明:在优化的试验条件下,峰电流(I_p)与E2浓度(c)的对数在 $0.1\sim 1\,000.0$ ng/L范围内呈现良好线性关系;与碳纳米纤维体系相比,石墨烯体系检出限更低,但前者具有更好的重现性和稳定性,两者均可用于环境样品中 17β -雌二醇的直接检测。

关键词:静电纺丝;碳纳米纤维;石墨烯;纳米金; 17β -雌二醇

中图分类号:O 657.1

文献标志码:A

Detection Performance of 17β -Estradiol Based on Electrospun Graphene/CNFs, Chitosan and Nano-gold Membrane

PING Jing^{a, b}, LIU Jianshe^{a, b}

(a. College of Environmental Science and Engineering;

b. State Environmental Protection Engineering Center for Pollution Treatment and Control in Textile Industry, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: Carbon nanofiber was prepared by the electrospinning of the polyaniline (PANI) precursor, followed by preoxidation and carbonization. The CNFs were uniformly dispersed in chitosan (CS), nano-gold (AuNPs) composite membrane. The aptamers were immobilized on the AuNPs through Au—S interaction. An electrochemical aptasensor was developed for the detection of 17β -estradiol (E2) which was based on a graphene/CNFs, CS, and AuNPs composite modified glassy carbon electrode. The morphology characteristics of prepared carbon nanofibers and graphenes were detected by transmission electron microscopy (TEM). The electrochemical properties of the modified electrode surface were characterized by cyclic voltammetry. Under the optimized conditions, the peak current response of the proposed aptasensor has good linearity with the logarithm concentration of E2 from $0.1\sim 1\,000.0$ ng/L.

收稿日期:2017-12-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21377033, 51508083);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2232015D3-22);上海市重点学科建设资助项目(B604)

作者简介:平 婧(1988—),女,山东济南人,博士研究生,研究方向为水环境检测及环境电化学生物传感器,E-mail:pj-2011@163.com
柳建设(联系人),男,教授,E-mail:liujianshe@dhu.edu.cn

Compared with CNFs system, GS system has high sensitivity, but CNFs system has excellent reproducibility and stability. Both methods could be used in the determination of E2 in environmental sample.

Key words: electrospinning; carbon nanofiber; graphene; nano-gold; 17 β -estradiol

高压静电纺丝技术是一种快速制备纳米材料的方法^[1-2]。聚合物溶液在高压电场中拉伸,溶剂瞬间挥发迅速固化成纤维^[3-4]。因该方法简便高效,可以通过调控温度、电导率、浓度等参数得到不同形貌规格和功能的纺丝材料,且制备的材料往往具有高比表面积和吸附功能,所以在生化分析领域具有广阔的应用前景^[5-6]。在直流电源条件下,借助注射泵把注射器里的高分子溶液推出,由于静电力克服液滴表面张力,带电液滴在竖直和圆周方向进行拉伸弯曲,在溶剂蒸发过程中,纤维直径迅速降至几十纳米,最后在接收器表面沉积成无纺布,从而得到纤维状纳米材料^[7]。

碳纤维是一种高强度、高模量、低密度的纤维材料。碳纤维制备方法主要包括电弧放电法^[8]、激光消蚀法^[9]、化学气相沉积法^[10]等。将静电纺丝技术制备的纳米纤维材料经过碳化而成的碳纳米纤维,其不仅具有碳材料特性,还具有纺织材料的柔软性且易于加工处理。而静电纺丝技术具有成本低、可量产、制备的纳米纤维形状规整且均匀等特点,得到了研究者的广泛关注^[11-14]。

本文利用静电纺丝技术并结合预氧化和碳化处理工艺制备新型碳纤维材料,并与市面上销售的成品石墨烯进行比较,研究两种不同的碳材料在 17 β -雌二醇(E2)检测分析中的差别。通过比较两种材料的形貌、电化学性能、重现性和稳定性等性能,为新型痕量污染物检测分析方法提供参考,也为碳纳米材料工业化、规模化生产提供新的应用思路。

1 试验部分

1.1 试剂和仪器

E2 适配体由生工生物工程(上海)股份有限公司代合成,其碱基序列^[15]如下所示:

5'-SH-GCT-TCC-AGC-TTA-TTG-AAT-TAC-ACG-CAG-AGG-GTA-GCG-GCT-CTG-CGC-ATT-CAA-TTG-CTG-CGC-GCT-GAA-GCG-CGG-AAG-C-3'

静电纺丝装置为实验室自行组装高压直流电源与恒流注射泵而成,所用仪器如表 1 所示。

表 1 仪器设备

Table 1 Experimental instruments and equipments

| 仪器名称 | 型号 | 厂家或产地 |
|--------------|---------------------|----------------|
| 注射泵 | LSP02-1B 型 | 河北保定兰格恒流泵有限公司 |
| 高压电源 | DW - P503 - 1ACDF 型 | 天津东文高压电源有限公司 |
| 自动比表面、孔隙度分析仪 | ASAP 2020 型 | 美国麦克仪器公司 |
| 高温管式炉 | YFX/100-6C 型 | 上海意丰电炉有限公司 |
| 单道手动可调式移液器 | Top Pette 型 | 大龙医疗设备(上海)有限公司 |

1.2 溶液的配制

聚苯胺(PANI)前驱液配制。称取 0.5278 g 聚苯胺溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,持续搅拌 18 h。

碳纳米纤维(CNFs)-壳聚糖(CS)溶液配制。称取 0.01 g CS 溶于 50 mL 1% 的乙酸溶液中得到 CS 溶液,称取 0.01 g CNFs 加入 10 mL 超纯水后进行超声处理,得到 CNFs 悬浊液。取 5 mL CNFs 悬浊液加入到 10 mL CS 溶液中,置于 4 °C 冰箱中待用。

石墨烯(GS)-壳聚糖(CS)溶液配制。称取 0.01 g GS 加入 10 mL 超纯水后进行超声处理,得到 GS 悬浊液,取 5 mL GS 悬浊液加入到 10 mL CS 溶液中,置于 4 °C 冰箱中待用。

1.3 纳米金的制备

配置 1% 的氯金酸水溶液于 50 mL 超纯水中,得到 0.01 g/mL HAuCl₄ 溶液。在 100 mL 烧杯中加入 50 mL 超纯水,准确移取 0.5 mL HAuCl₄ 溶液注入其中,放入(92 \pm 4)°C 油浴锅中,磁子剧烈搅拌,恒温加热 25~30 min,加入 1.6 mL 的柠檬酸三钠,得到澄清透亮的溶液,4 °C 环境下保存待用^[16]。

1.4 静电纺丝技术制备碳纤维

配制质量分数为 10%、均一半透明黏稠的 PANI 前驱液,设置纺丝电压为 15 kV,接收距离为 15 cm,纺丝速度为 0.5 mL/h,在衬有铝箔的平板接收装置上收集纳米纤维,然后进行预氧化处理。将纳米纤维置于马弗炉中升温至 270 °C,保持 1 h,然

后转至高温管式炉中,高纯氮环境下,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 1 000 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 h,冷却后得到 CNFs。

1.5 碳纤维 CNFs 与石墨烯 GS 传感体系制备

用进样器准确移取 10 μL 的 CNFs-CS 溶液滴于玻碳电极(GCE)表面,在室温下自然晾干。取 10 μL AuNPs 溶液滴涂在电极表面,室温孵化

10 min后,移取 10 μL E2 适配体溶液滴涂其上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 20 min,最后将电极浸泡在 6-巯基己醇(MCH)溶液中 50 min,封闭剩余的活性位点。得到 CNFs-CS-AuNPs 修饰的电极,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。GS 体系采用相同方法处理。

CNFs 和 GS 传感体系制备流程如图 1 所示。

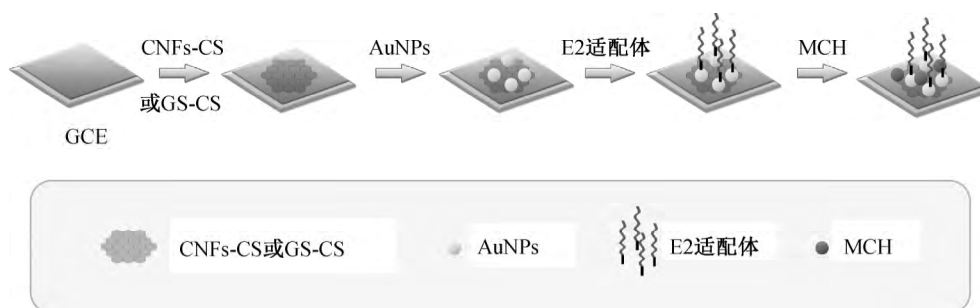


图 1 CNFs 和 GS 传感体系制备流程图

Fig. 1 Preparation process of CNFs and GS system

1.6 测试方法

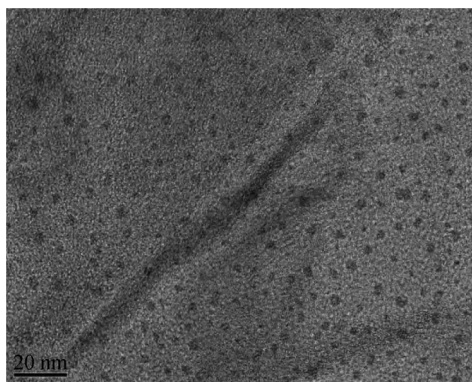
将修饰电极放入用 Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.4)配制的浓度范围为 0.1~1 000.0 ng/L 的 E2 标准溶液中,选择差分脉冲伏安法进行测量,间隔时间为 50 ms,扫描电压为 -0.2~0.6 V,以峰电流 I_p 对 E2 标准溶液浓度绘制标准曲线。

2 结果与讨论

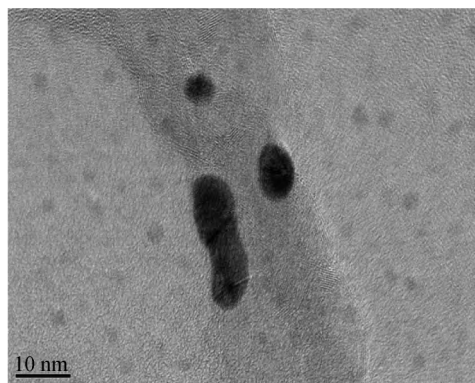
2.1 AuNPs 形态表征

采用透射电镜表征碳纤维-壳聚糖-纳米金(CNFs-CS-AuNPs)与石墨烯-壳聚糖-纳米金(GS-CS-AuNPs)复合膜的表面形貌,如图 2 所示。

由图 2(a)可知,GS 是只有一个碳原子层厚度的、稳定的二维薄膜,借助褶皱保持其自身的稳定



(a)GS-CS-AuNPs



(b)GNFs-CS-AuNPs

图 2 CNFs-CS-AuNPs 和 GS-CS-AuNPs 复合膜的透射电镜图

Fig. 2 TEM images of the CNFs-CS-AuNPs and GS-CS-AuNPs

性。由图 2(b)可知,静电纺丝法制备的 CNFs 形状比较规则,分布均匀,且得到的纳米纤维纯度高,不需要经过额外的提纯过程,在工业中有望实现大量的生产,具有很高的应用价值。

2.2 电化学性能表征

采用循环伏安法表征 CNFs 和 GS 两个传感体系在 0.1 mol/L 的 KCl 和 5 mmol/L 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 测试底液(pH=7.0)中的电活性面积和电子转移速率,所得循环伏安图如图 3 所示。

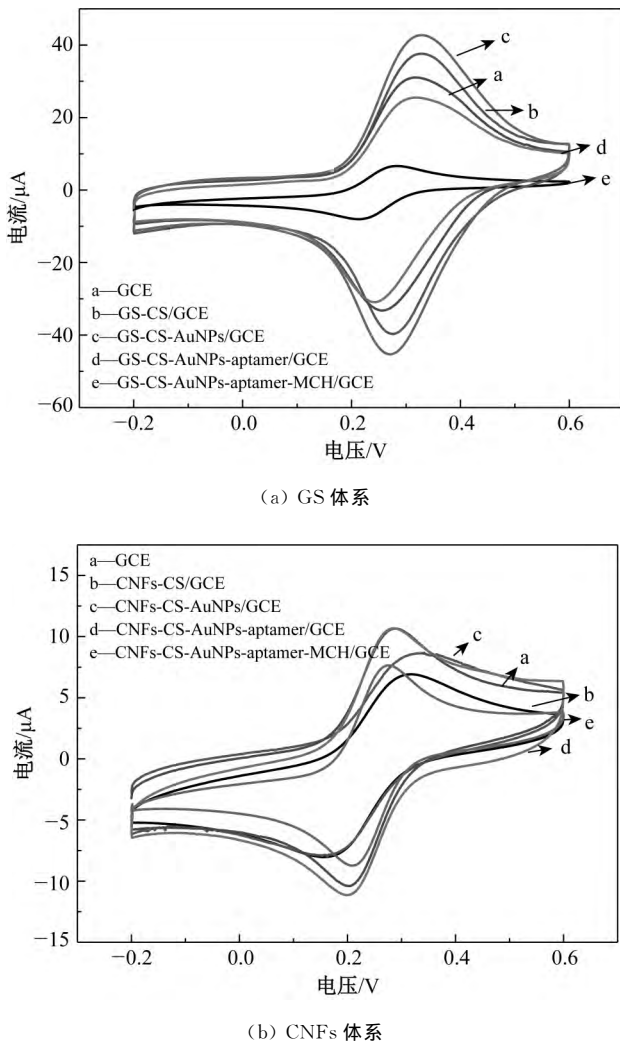


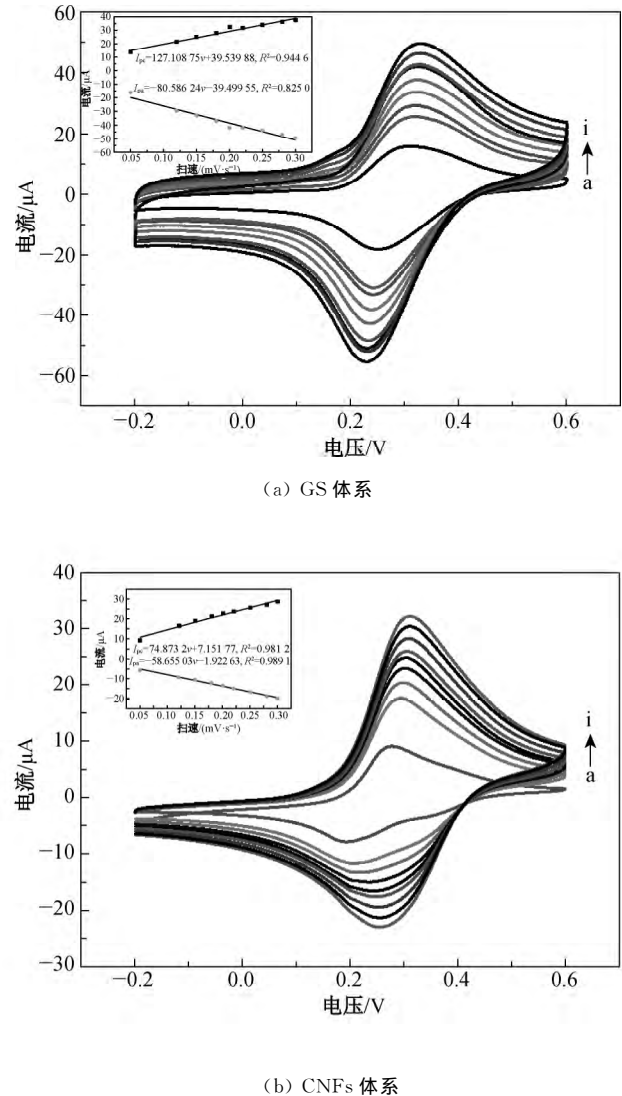
图 3 GS 和 CNFs 体系修饰电极的循环伏安图
Fig. 3 Cyclic voltammograms of GS and CNFs system

根据 Randles-Sevcik 方程计算^[17], GCE、GS-CS/GCE 和 GS-CS-AuNPs/GCE 的电活性面积分别为 0.009 、 0.046 和 0.051 cm^2 , 即 GS-CS/GCE 的活性面积约为 GCE 活性面积的 5 倍, 修饰 AuNPs 后, 电极活性面积进一步增大, 约为 GCE 活性面积的 5.6 倍。这可能是由于, 理论上 GS 的电子迁移率可达 $2 \times 10^5 \text{ cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$ ^[18], 电导率可达 10^6 S/m , 电阻仅为 $31 \Omega/\text{sq}$, 导电性极好^[19]。

根据 Randles-Sevcik 方程计算, GCE、CNFs-CS/GCE 和 CNFs-CS-AuNPs/GCE 的电活性面积分别为 0.012 、 0.024 和 0.025 cm^2 , CNFs-CS/GCE 电极活性面积约为 GCE 活性面积的 2 倍。从增大电极活性面积的角度来看, CNFs 并没有 GS 的电化学性能突出。这可能是由于实际传感器的检测分析会受到孵化时间、反应温度、溶液 pH 等外界因素影响, 进而影响反应物与适配体的结合状态, 需要全面考察传感器的影响因素和性能。

2.3 扫描速度对传感器的影响

GS-CS-AuNPs/GCE 和 CNFs-CS-AuNPs/GCE 电化学核酸适配体传感器在 0.1 mol/L KCl 和 $5 \text{ mmol/L K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的测试底液 ($\text{pH} = 7.0$) 中, 在 $50 \sim 300 \text{ mV}$ 的扫速范围内得到的循环伏安图如图 4 所示。



注: 插图为氧化还原峰电流与扫描速率的依赖关系
图 4 扫速对 GS 和 CNFs 传感体系的影响 (a~i: $50 \sim 300 \text{ mV/s}$)

Fig. 4 Effect of scan rates on cyclic voltammograms of GS and CNFs system (a~i: $50 \sim 300 \text{ mV/s}$)

由图 4(a)可知, GS 传感体系回归方程分别为 $I_{pc} = 127.10875v + 39.53988$, 相关系数 $R^2 = 0.9446$ 和 $I_{pa} = -80.58624v - 39.49955$, $R^2 = 0.8250$ (v 代表扫速)。由图 4(b)可以看出, CNFs 体系氧化还原峰电流与扫速呈良好线性关系, 回归方程分别为 $I_{pc} = 74.8732v + 7.1518$, $R^2 = 0.9812$ 和 $I_{pa} = -58.65503v - 1.9226$, $R^2 = 0.9891$ (v 代表扫速)。

速)。综上所述,两个体系电极反应都受吸附过程控制。

2.4 优化试验条件

2.4.1 pH 值对传感器的影响

采用循环伏安法测量 pH 值对核酸适配体传感器响应值 I_p 的影响,所得结果如图 5 所示。由图 5 可知:当 pH=7.0 时,传感器性能最好,电流响应最大;当 pH>8.5 时,传感器稳定性下降。因此, pH=7.0 的溶液为最佳测试底液。

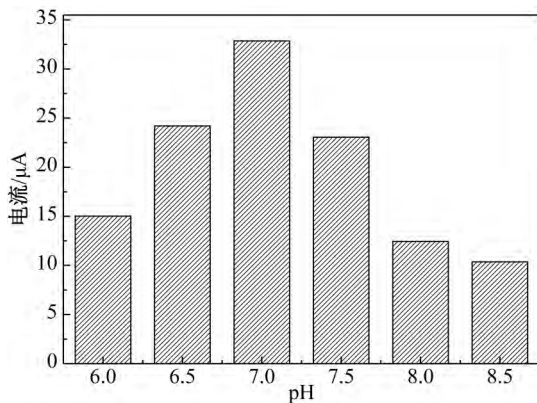


图 5 pH 对核酸适配体传感器响应值 I_p 的影响

Fig. 5 Effects of pH on the aptasensor current response I_p

2.4.2 孵化时间对传感器的影响

电化学核酸适配体传感器中适配体与待测样品孵育时间对反应有影响。将 CNFs 体系的适配体传感器放入 40.0 ng/mL E2 溶液中, 25 °C 条件下分别反应 5、10、15、25、35、45 和 55 min, 利用循环伏安法测定其响应电流的变化如图 6 所示。由图 6 可知, 在 5~20 min 范围内电流随孵育时间的增大而增大, 20 min 后, 电流不再出现明显上升, 说明反应已基本完全。因此, 选取 20 min 为最佳孵育时间。

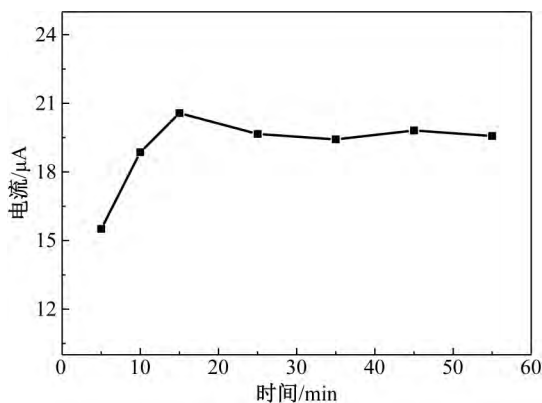
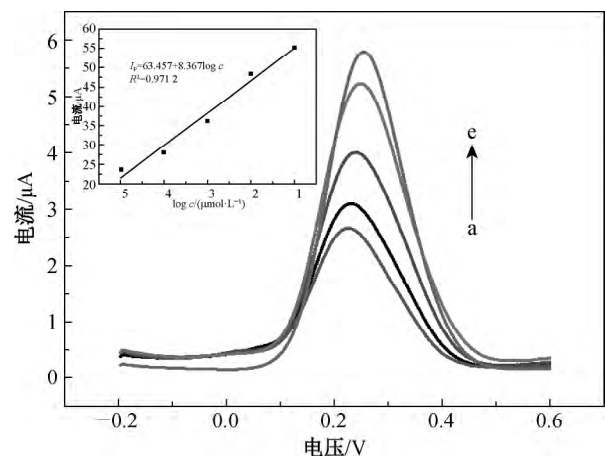


图 6 孵化时间对核酸适配体传感器的影响

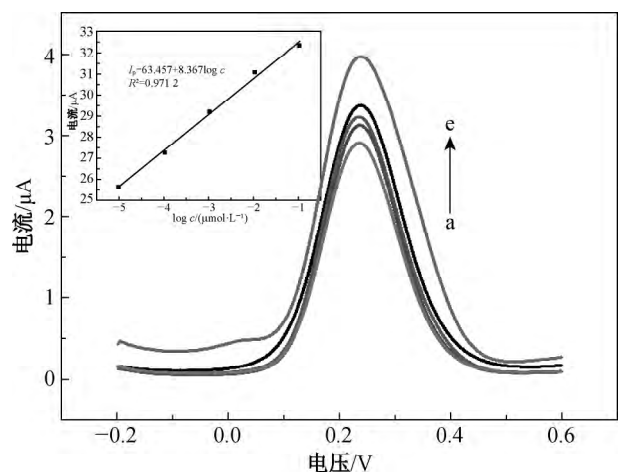
Fig. 6 Effects of incubation time on the aptasensor

2.5 传感器的性能表征

为了考察 GS 和 CNFs 传感体系的电学性能, 将修饰电极放入用 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH=7.4) 配制的浓度范围为 0.1~1 000.0 ng/L 的 E2 标准溶液中, 利用示差脉冲伏安法检测峰电流随 E2 浓度 (a~e: 0.1、1.0、10.0、100.0、1 000.0 ng/L) 的变化情况, 所得结果如图 7 所示。由图 7(a) 可知, GS 体系在优化试验条件下 (pH=7.0, 孵育时间 20 min), 得到 I_p 值与 E2 浓度 c 的线性回归方程为 $I_p = 63.457 + 8.367 \log c$, $R^2 = 0.9712$, 检测限 ($S/N=3$) 为 2.72 ng/L。由图 7(b) 可知, CNFs 体系在优化试验条件下 (pH=7.0, 孵育时间 20 min), 得到 I_p 值与 E2 浓度 c 的线性回归方程为 $I_p = 34.325 + 1.727 \log c$, $R^2 = 0.9938$, 检测限 ($S/N=3$) 为 8.17 ng/L。



(a) GS 体系



(b) CNFs 体系

注: 插图为峰电流与浓度的对应关系

图 7 GS 和 CNFs 传感体系峰电流对 E2 浓度的差分脉冲伏安曲线

Fig. 7 Differential pulse voltammetry to E2 concentration in GS and CNFs system

2.6 传感器的稳定性和重现性

为了考察两个传感体系的重现性和稳定性,测试不同批次制备的 10 支修饰电极,在优化条件下对浓度为 100.0 ng/mL 的 E2 电流响应。试验结果可知,GS 体系和 CNFs 体系的 ΔI 的相对标准偏差(RSD)分别为 3.25%和 2.73%,在优化试验条件下,将修饰电极对浓度为 100.0 ng/mL 的 E2 的电流响应平行测定 7 次,GS 体系和 CNFs 体系的 ΔI 的 RSD 分别为 3.6%和 2.9%,均小于 3.8%。因此表明,两个体系均有较好的重现性,但相对而言,CNFs 体系的重现性更为优秀。

将制备好的适配体传感器置于 4 °C 环境中密闭保存,每隔 2 d 进行重现性测试,CNFs 体系和 GS 体系的峰电流分别为初始值的 93.2%和 91.5%,变化不大。这是由于电极经 GS-CS-AuNPs 以及 CNFs-CS-AuNPs 修饰后,表面积增大,可以固定的适配体数量更多,因而稳定性更好。

3 结 语

本文利用静电纺丝技术制备的纳米纤维经预氧化和碳化处理,制得碳纳米纤维材料,将其应用到核酸适配体传感器检测 17 β -雌二醇(E2)中,并与 GS 传感体系进行电化学性能比较。在优化的试验条件(pH=7.0,孵育时间 20 min)下,两个体系的峰电流 I_p 与 E2 浓度在 0.1~1 000.0 ng/L 浓度范围内呈现良好的线性关系。虽然 GS 体系检出限更低,但在优化条件下,CNFs 体系的重现性和稳定性更加优秀。

参 考 文 献

- [1] 丁文华,武会会,曾泳春. 复合静电纺制备螺旋纳米纤维工艺参数的研究[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2017, 43(2): 180-185.
- [2] 赵稼祥. 纳米碳纤维及其应用[J]. 纤维复合材料, 2003, 20(4):48-50.
- [3] 郑天翔,李想,林金友,等. 静电纺聚砜纤维的制备与吸油性[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2017, 43(3):328-334.
- [4] HEJAZI F, MIRZADEH H, CONTESSI N, et al. Novel class of collector in electrospinning device for the fabrication of 3D nanofibrous structure for large defect load-bearing tissue engineering application[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2017, 105(5): 1535-1548.
- [5] 贺梦玲,李想,林金友,等. 静电纺玉米醇溶蛋白微纳米纤维的性能与形貌调控[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2017, 43(3):316-321.
- [6] 姜莉华,张弘楠,覃小红. 静电纺 PAN 纳米纤维膜强力对含油污水过滤性能的影响[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2016, 42(5):654-662.
- [7] 张悦,吴韶华,张弘楠,等. PAN/SWCNTs 复合纳米纤维纱线的制备及其性能[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2016, 42(3):313-317.
- [8] HAMMEL E, TANG X, TRAMPERT M, et al. Carbon nanofibers for composite applications[J]. Carbon, 2004, 42(5/6): 1153-1158.
- [9] 于作龙. 碳纳米管的批量制备和应用[J]. 中国高校科技与产业化, 2003(6):19-21.
- [10] WARNER S B, BUER A, GRIMLER M, et al. A Fundamental investigation of the formation and properties of electrospun fibers [C]//National Textile Center Annual Report. 1999:1-10.
- [11] ZUSSMAN E, CHEN X, DING W, et al. Mechanical and structural characterization of electrospun PAN-derived carbon nanofibers[J]. Carbon, 2005, 43(10): 2175-2185.
- [12] WANG Y, SERRANO S, SANTIAGO-AVILÉS J J. Raman characterization of carbon nanofibers prepared using electrospinning[J]. Synthetic Metals, 2003, 138(3): 423-427.
- [13] RUTLEDGE S L, SHAW H C, BENAVIDES J. B, et al. Self assembly and correlated properties of electrospun carbon nanofibers[J]. Diamond and Related Materials, 2006, 15(4/5/6/7/8): 1070-1074.
- [14] 孙通,李晓霞,郭宇翔,等. 不同酸掺杂聚苯胺的电化学聚合及性能[J]. 化工进展, 2013, 32(8):1870-1875.
- [15] KIM Y S, JUNG H S, MATSUURA T, et al. Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(11): 2525-2531.
- [16] 平婧,NUANAPA Chaisuwan,柳建设. 一种超灵敏检测 17 β -雌二醇电化学核酸适配体传感器构建方法[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2017, 43(5):668-673.
- [17] 周云,丁辛,胡吉永,等. 化学聚合和电化学聚合对聚吡咯/棉导电织机电性能的影响[J]. 东华大学学报(自然科学版), 2016, 42(6):822-826.
- [18] NOVOSELOV K S, GEIM A K, MOROZOV S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films[J]. Science, 2004, 306(5696): 666-669.
- [19] KIM K S, ZHAO Y, JANG H, et al. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes [J]. Nature, 2009, 457(7230): 706-710.

(责任编辑:杨 静)