

固酶卟吩衍生物功能化氧化石墨烯电催化氧还原性能 综合性物理化学实验设计*

蔡燕军 张咪 曾涵** 关明

(储能与光电催化材料重点实验室 新疆师范大学化学化工学院 新疆乌鲁木齐 830054)

摘要 针对当前物理化学实验教学实践中存在的内容陈旧、技术和测试手段单一以及教学目标与研究前沿热点脱节等缺陷,提出新的学科交叉性物理化学实验,以替换现行的技术单一的验证性实验。通过此实验的开设,培养学生综合运用光谱学和电化学技术评估酶分子与载体各基元间相互作用对固酶石墨烯复合物电子迁移以及电催化效能的影响,并掌握相关理论要点和数据处理方法。该实验与光电化学传感器研究前沿密切相关,实施难度较低且具有可操作性。该实验目的在于分析和评估固酶电极的直接电化学反应行为和电催化氧还原性能。

关键词 氧化石墨烯 漆酶 综合性实验 电催化性能 双氧水还原

DOI: 10.13884/j.1003-3807hxjy.2023110042

1 纳米电化学器件研究与实验改革关联

纳米电化学器件的制备和构效关系研究是当前物理化学的研究热点与前沿。氧化石墨烯(GO)作为高性能电化学器件基质材料的候选者^[1-4],与其他纳米材料复合可扩展GO的功能和提升其电催化/电化学传感效能^[5-10]。将具有良好光敏性和低电子离域能的卟吩及其衍生物功能化GO并进而固载酶分子,可利用输入光信号调控此固酶复合物的电化学反应行为和电催化效能,同时可以检测具有特定结构的靶标物种^[11-14]。现行物理化学实验课程教学存在诸多缺陷:验证性实验比例较高,技术手段单一,教学内容与研究热点/前沿严重脱节,缺乏挑战性和创新性,学生实验热情不高。将研究热点/前沿相关技术与理论引入教学实践,实现2者的有机融合是提高本科人才培养质量的有效途径,也是当前国家人才培养战略提出的必然要求^[15-17]。本文设计综合性实验固载漆酶(Lac)的卟吩衍生物功能化GO基电极电催化氧还原性能,以取代现行实验蔗糖酶米氏常数的测定。本实验探究GO纳米复合物各基元与固酶分子间相互作用对电催化反应相关步骤动力学的影响,如图1所示。该实验具有显著的学科交叉性,显著提高了实验教学内容的高阶性和挑战性,使学生能够深度浸入式体

会科学研究前沿相关实验技术,掌握相关技能。此实验的开设还利于增强学生的团队合作意识,培养独立求真务实的科学研究精神和正确的科学研究价值观。

2 实验教学目标 and 实验前期准备

2.1 实验教学目标

本综合性实验开设目的在于:(1)加深对米氏常数 K_M 、检测限 L_D 、检测灵敏度 S_T 以及与电催化/电化学传感性能相关的传质、传荷和化学反应步骤动力学参数物理意义的理解,掌握其测定和计算方法;(2)了解表征、分析及测试固载氧化还原酶的GO复合物结构和物理化学特性的光谱学和电化学技术;(3)学会使用Origin软件处理实验数据并作图的方法,评估固酶GO复合物基电极对溶解氧的传感性能,学会固酶电极传感性能相关各步骤动力学参数的估算方法。

2.2 实验试剂和仪器

Lac(相对分子质量:68 000)以及GO购自美国sigma化学试剂有限公司;中-四(4-羧基苯基)卟吩(Tcpp)购自麦克林试剂有限公司。氧化铟锡电极(ITO)由珠海凯为光电科技有限公司提供。作为基底电极的玻碳电极(GCE,直径:3.0 mm)、作为参比电极的Ag/AgCl(饱和KCl)

投稿:2023-11-08;录用:2024-08-13

* 新疆维吾尔自治区二〇二二年第二批创新环境(人才、基地)建设专项——自然科学基金面上项目(2022D01A209);新疆师范大学青年拔尖项目(XJNUQB2022-27);新疆维吾尔自治区第一批“天山英才”教育教学名师培养计划;新疆维吾尔自治区2022年度高校本科教育教学研究和改革项目;教育部产学研合作协同育人项目(220901282083133);新疆维吾尔自治区2022年度高校本科教育教学研究和改革项目(XJGXPTJG-202224)

** 通信联系人, E-mail: zenghan1289@163.com

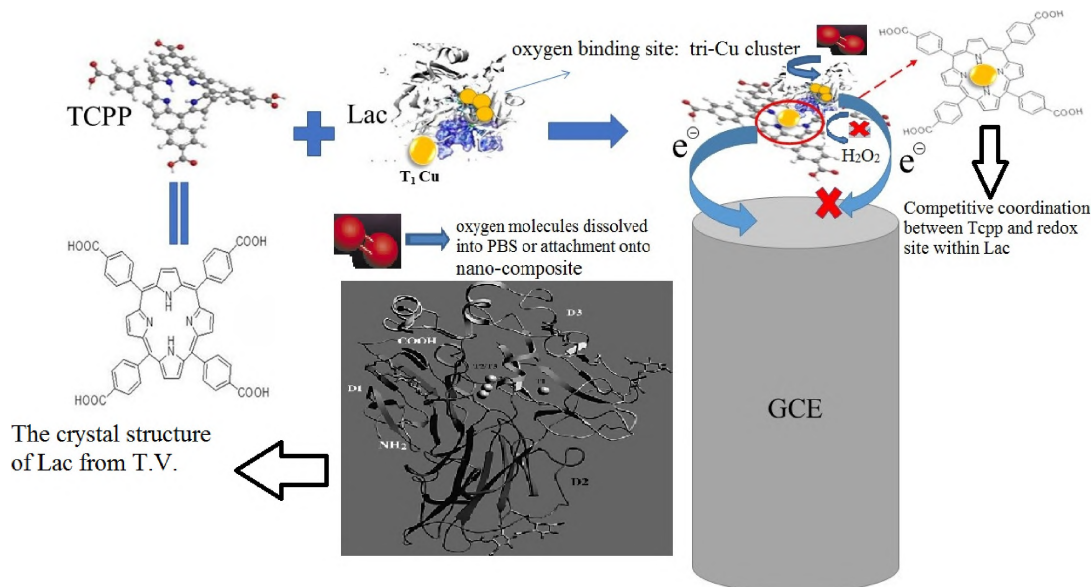


Fig. 1 Illustration scheme to the catalytic oxygen reduction mechanism of the electrode on the basis of graphene oxide with redox protein immobilization as well as the mutual interaction between integrated enzyme and element of nano-composite

图 1 固载氧化还原蛋白质的氧化石墨烯基电极催化氧还原机制和酶-纳米复合物基元间相互作用示意图

电极以及作为对电极的铂丝电极均购自天津艾达恒晟工贸有限公司。

D2PHASER 型 X 射线粉末衍射仪, Cu-K α 靶作为辐射源, 波长: 0.154 nm, 管电压: 30.0 kV, 管电流: 10.0 mA。Cary Eclipse 型分子荧光光谱仪, 激发波长: 280.0 nm, 狭缝宽度: 5.0 nm, 石英比色皿光程: 1.0 cm, 波长扫描范围: 200.0~600.0 nm, 购自美国 Varian 公司。CHI-660E 型电化学工作站购自上海辰华仪器有限公司。

3 实验教学环节简述

3.1 实验原理和基本步骤

吡吩功能化氧化石墨烯的制备工序如文献^[18]所述, 本文不再赘叙。通过传统滴涂法, 加入成膜剂覆盖基底电极表面的固酶纳米复合物, 制备固载氧化还原蛋白的氧化石墨烯纳米复合物基电极。制备电极记为 Lac/GO-Tcpp/GC 和 Lac/GO-Tcpp/ITO。按照相似的制作工艺, 但排除了加入 Lac 分子的操作步骤即可制得对比电极 GO-TCPP/GC 和 GO-TCPP/ITO。

采用石墨炉原子吸收光谱法 (GFAAS), 利用文献^[19]给出公式计算吡吩功能化 GO 对 Lac 的担载量和评估剪切力存在条件下固载 Lac 的 GO 复合物薄膜力学强度。

以 X 射线粉末衍射谱 (XRD) 表征固载 Lac 的纳米复合物晶面参数。利用布拉格方程获取固酶纳米复合物的晶面参数和晶面间距。以发射荧光光谱 (FRS) 研究固载 Lac 分子与纳米复合物各基元

间相互作用。测定恒定浓度 Lac ($0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和不同含量 Tcpp 的分散相组成体系的 FRS 谱图。 F_0 、 F 以及 $[Q]$ 分别代表荧光猝灭剂吡吩衍生物不存在和一定浓度荧光猝灭剂存在时体系的荧光强度, 以及荧光猝灭剂的浓度。定量测出酶-载体基元结合强度 (即结合常数 K), 以文献^[20]给出公式定量计算荧光猝灭速率常数 K_q 以及相互作用结合位点数 N , 进而判断荧光猝灭机理。

所有电化学实验均是在带恒温水浴夹套的常规三电极玻璃电解池中进行, 以固载的 GO 纳米复合物涂覆的 GCE 作为研究电极, 电解液为 N_2 饱和的 PBS。文中所提到的电位如无特别说明, 都是相对于标准氢电极 (NHE) 的数值。以循环伏安法 (CV) 研究电极直接电化学行为。以 CV 和交流阻抗谱 (EIS) 评估和分析酶-载体各组成基元间相互作用对固酶电极导电性能的影响。测定固酶 GO 复合物基电极和对比电极在除氧且不含电子介体的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的稳态 i - E 关系曲线。

利用 Laviron 方程计算固酶纳米复合物电极上发生氧化还原反应涉及的电子数 n 和电子迁移系数 α 。继而按照文献^[21-22]给出公式计算固酶 GO 复合物基电极在表面控制型电子迁移过程中的表现异相电子迁移速率常数 k_s 。根据不同电位扫描速率下固酶电极在电解液中扫描所得 CV 中主要氧化/还原峰的积分面积 A_T , 对 V , n , A_s 和法拉第常数 F 归一化, 可计算固酶纳米复合物基电极表面电活性物种的表现覆盖率 Γ 。

以微分脉冲伏安法(DPV)研判固酶电极上电化学反应的机制并对相关电活性物种的氧化还原性能进行比较。线性扫描伏安法(LSV)和计时电流法(CA)评估固酶电极对底物的电催化性能。溶解氧气浓度($244.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)系在乌鲁木齐当地大气压(92.8 kPa)和春夏之际的室温($24.3 \pm 0.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$)下采用Clark型氧电极(购自英国Hansatech公司)测定,结合碘量法进行标定。在不同时刻通过移液枪向溶液中加入不同体积的空气饱和PBS,计算不同时刻体系中氧气的浓度。估算固酶电极对溶解氧分子的 K_M ,确定电极对底物的检测限。测定浸泡于氧气饱和的PBS($\text{pH}=4.4$)中的固酶纳米复合物基ITO电极在“开”与“关”状态切换时的光电转化电流-测试时间关系线,评估固酶电极电催化效能对光的敏感性。

3.2 实验教学效果分析

3.2.1 固酶GO复合物基电极的制备

这部分实验环节存在的主要问题是,学生对加入成膜剂的量和合理调配固酶纳米复合物的组分比例掌握不到位,导致制备的固酶Lac基电极或者力学稳定性差,导致催化活性丧失,或者加入成膜剂过多,表面薄膜层电阻过大,观察不到固酶基电极直接电子迁移的信号。

3.2.2 固酶Lac的GO复合物理化性质表征

固酶纳米复合物XRD测试这个实验的结果分析需要给学生分享相关文献和参考教材,指引学生找到GO和有机染料分子的XRD标准卡,在借鉴文献分析处理数据和晶面参数解析方法的基础上,确定GO重要衍射峰对应的晶面并计算出相应的晶面间距。从这几届本科班级的实验报告和期末操作测试结果来看,学生不但掌握了相关解析方法,部分学生甚至对功能化基团修饰GO后,衍射峰发生的变化能够提出合理解释。

对于Tcpp与Lac共混体系的FRS谱图测定这个实验,需要通过社交媒体向学生分享相关文献和参考教材,引导学生了解和掌握静态猝灭和动态猝灭的定义,2者之间的区别,以及如何判定具体的猝灭模式。同时通过和仪器分析学科的理论 and 实验联动的方式,启发学生进一步掌握荧光猝灭的机制(如光致电子转移(PET))模式。近几届学生的评教反馈结果表明,此实验教学培养了学生的学科交联意识,提升了物理化学实验内容的高阶性和挑战度,缩短了学生与高新技术和学科研究前沿的距离,满足了学生成就感和求知欲,收到了良好的教学效果。

3.2.3 固酶电极的电化学行为、电催化和光电转化性能研究与评估

固酶Lac的GO基纳米复合物的导电性能测试这一实验环节,可通过课前发布预习思考题+共享教材/参考文献、阻抗数据软件图文攻略以及课后分组讨论等师生互动模式,将相关数据处理和分析的方法传授给学生。从近年学生的实验报告和期末实验测试反馈来看,学生对于等效电路图的绘制和EIS数据处理/分析等知识和技能要点掌握不够扎实。这可归因于学生先行课程学习基础薄弱以及相关理论和实验技能学习难度较大,不易于掌握等主观因素。通过课前布置一些科普性的课程资源和综述文献精读,加大EIS和CV等电化学测试技术的基本理论和术语介绍力度,继而通过课前/课后知识测试和阶段性考核等举措,可达到改善和巩固学习效果的目的。

电化学测试这一部分,包括绘制固酶GO纳米复合物基电极在电解液中以不同扫速下得到的CV曲线,记录其置于不同pH的PBS中获得相应的CV以及测绘该电极在弱酸电解液中正向和负向扫描所得的DPV曲线,这些实验依据的相关理论与物化理论课程的电化学章节知识点有密切关联。近几届教学实践表明,学生对这部分知识掌握相对较好,通过自学课后布置的课外阅读文献和CV法图文攻略等方式,能够自觉运用相关知识和技能研究工作电极上不同类型电化学反应并测定相关动力学参数:表观异相电子迁移速率 k_{het} 、固酶纳米复合物基电极上发生电化学反应涉及的得失质子数和扩散系数 D_a 等。但是反馈也表明,由于学生对杂环化合物性质认识不够深入,在教师不给予引导或提示的情况下,难以绘制电极上合理的电子迁移和质子得失示意图。这表明需要夯实学生先行课有机化学和分析化学的基础,在此基础上培养学生运用学过的知识分析新科学问题、设计解决问题的能力。此外教学反馈还表明:学生学习深度还不够,解决新的复杂问题的能力还较为薄弱,知识路径依赖性较强,尚需通过有效改变学生的思维方式和学习习惯来进一步改善教学效果。

采用CV法评估固酶电极催化底物还原性能以及使用计时电流技术评定固酶电极对底物传感性能这2个实验可通过课前分享的经典文献解读和课后的实验数据分组讨论等方式,引导学生思考这2个技术方法的联系和区别,通过计算和对比2种方法所得检测限、灵敏度和米氏常数等重要参数值的方式,加深学生对不同方法的基本原理的了解,并学

会分析测定相同参数存在差异的原因。从教学反馈效果和学生评教汇总情况来看,学生基本掌握了利用这 2 种电化学技术评估固酶电极对底物传感性能的方法,对 2 种技术的基本原理有了初步的认识,对后续的毕业论文写作和硕士阶段的研究工作起到了积极的推动作用。从实验整体设计而言,此实验的设置对毕业论文相关工作的开展以及科研论文的阅读有显著的促进和推动作用,较好地达到了提升教学内容高阶性、创新性和挑战度的目标。此综合性实验涉及的主要测试表征设备如图 2 所示,包括固酶电极导电性能和直接电子迁移动力学评估和分析所需电化学测试平台和固酶纳米复合物理化特性表征所需的光谱学测试仪器。

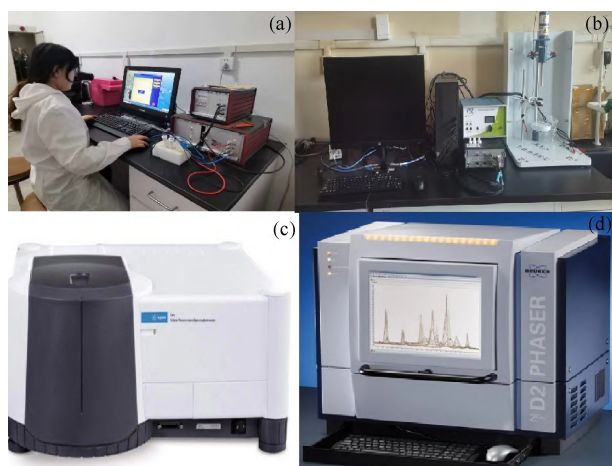


Fig. 2 EIS spectrum for the evaluation in the electrical conductivity of the basal electrode capped by GO based nano-complex with Lac entrapment (a); The electrochemical testing platform for the determination in the related parameters of the direct electron shuttle dynamics for Lac based electrode with CV/LSV/CA techniques (b); FRS (c) instrument for the characterization in the mutual interactions between redox enzyme and the component of nano-complex on the basis of Tcpp surface tailored GO composite with Lac anchoring and XRD (d) apparatus for the investigation in the physicochemical feature of GO based nano-composite

图 2 评估固载 Lac 的 GO 纳米复合物基电极导电性能的 EIS 谱 (a), 固酶电极直接电子迁移动力学参数的 CV/LSV/CA 技术所需要的电化学测试平台 (b); 表征固载 Lac 的 Tcpp 修饰 GO 纳米复合物中酶-复合物基元间相互作用所用 FRS (c) 及复合物理化特性所需 XRD (d) 仪器设备

4 实验教学方案

4.1 课时安排和教学改革成本

本综合性实验依次分 3 个教学周进行。固酶电极的制备是此综合性实验的第 1 部分,于第 1 教学周内完成,需要 2 个学时(4 节小课,每个小课按照 45 min 计算);固酶 GO 复合物结构和理化性质

表征实验,除 GFAAS 由教师操作演示之外,其他的光谱学和电化学实验均由学生分组独立操作完成,循环实验,共需 2 个学时,安排在第 2 个教学周中;固酶纳米复合物基电极电化学行为、电催化性能和光电转化效能表征和测试部分则放在第 3 个教学周,按照使用技术方法分为 4 个小组,循环实验,共需 2 个学时。

实验教学中相关药品和耗材均来自本科教学实验室库存和研究实验室提供的专用药品;结构表征和性能测试设备均来自于依托单位,机时费和测试费均有优惠。此实验实施费用大约为 460 元/次(一次一个教学班,每班按照 24 人计算),因此从实验开设成本来看,在依托单位耐受范围内。

4.2 教学效果评估、反馈和反思

本综合性实验的效果考核和评估通过将背景知识考查、先行课程知识测试和实验技能考核、数据处理分析和制图软件 Chemdraw/Chemwindow 和 Origin/Excel 使用能力评估结合的方式进行。具体的考核方式包括课堂口头提问、课后线上分组讨论和评析提交的实验报告、上交的实验教学内容思维导图和催化机制/电子迁移过程示意图评析以及课后线上进行的综合性实验单元测验等。

教学效果反馈表明:学生的学习积极性和知识综合运用能力上有显著的提升,对于网络搜索引擎的运用和线上文献数据库的分析总结能力也有大幅度的提高。学生对课程改革的评价多数持肯定态度,对课程教学效果评分较之前有一定程度的升高(平均分从 78.4 分升到 83.8 分)。但是此实验也有一些需要改善的环节:过长的实验周期和众多的实验技术,学生在感到新鲜的同时也会有严重的不适应感和无力感。因此本教研团队计划未来对这一实验进行必要的减法,仅保留电化学测试传感器的制备和其对底物的传感性能影响评估部分作为实验主体。

5 结语

先进仿生智能电化学器件研究是近期的研究热点与前沿。设计一个与此研究领域相关的、多学科交叉的综合性实验——固酶纳米复合物基电极制备与电催化性能评估,可有效提高学生对实验的参与度,全面提升学生综合素质和科学素养。此实验制备了固载 Lac 的光敏基团功能化 GO 基电极,分析了纳米复合物各组元与 Lac 分子间相互作用的协同效应对固载 Lac 的 GO 复合物结构参数、直接电化学行为、电催化性能和光电转化效能的影响。本文阐释了此综合性实验在教学实践中的可行性和必要性。此综合性实验的教学实践表明:相关实验教学

改革能有效激发学生对科学前沿问题的热情,同时
培育学生的团队合作意识和创新精神。

参 考 文 献

- [1] Koushanpour A, Guz N, Gamella M, et al. *Ecs Journal of Solid State Science and Technology*, 2016, 5 (8): M3037
- [2] Liu S, Tian J Q, Wang L, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26 (11): 4491–4496
- [3] Albishri H M, Abd El-Hady D. *Talanta*, 2019, 200: 107–114
- [4] Abraham S, Ciobota V, Srivastava S, et al. *Anal. Methods*, 2014, 6 (17): 6711–6720
- [5] Jacob A G, Wahab R A, Mahat N A. *Enzyme Microb. Technol.*, 2021, 148: 109807
- [6] Sun W S, Yu S R, Liu J W, et al. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2021, 16 (2): 210220
- [7] Wang C F, Sun X Y, Su M, et al. *Analyst*, 2020, 145 (5): 1550–1562
- [8] Campos A M, Raymundo-Pereira P A, Cincotto F H, et al. *J. Solid State Electrochem.*, 2016, 20 (9): 2503–2507
- [9] Huang Y, Li J, Yang Y X, et al. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2019, 26 (27): 28328–28340
- [10] Li Z H, Cui R J, Tian C H, et al. *J. Solid State Electrochem.*, 2017, 21 (12): 3675–3681
- [11] Zhou X H, Huang X R, Liu L H, et al. *RSC Advances*, 2013, 3 (39): 18036–18043
- [12] Liu H, Guo K, Lv J, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 238: 249–256
- [13] 梁巍. 基于石墨烯的氧还原电催化剂的理论计算研究. 武汉: 武汉大学博士学位论文, 2014: 35
- [14] Zeng H, Yang Y, Zhao S X, et al. *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2017, 27 (5): 1162–1176
- [15] 中国高等教育学会. 中国高等教育学会理科教育专业委员会 2021 年全体理事单位会议暨理科人才培养线上论坛顺利召开 [EB/OL]. (2021-12-21) [2023-11-08]. <https://3g.163.com/dy/article/GROU57BE0516RJ0M.html>
- [16] 刘敏, 冯清. *大学化学*, 2019, 34 (11): 88–92
- [17] 景大雷, 潘昀路. *化学教育(中英文)*, 2018, 39 (6): 55–60
- [18] 牛丽娟. 石墨烯-卟啉复合材料制备及其氧化还原性能的研究. 郑州: 河南大学硕士学位论文, 2018: 40–41
- [19] 杨阳, 霍文珊, 周政, 等. *无机化学学报*, 2016, 32 (12): 2117–2128
- [20] 毛慧, 蔡炳峰, 赵波, 等. *应用化学*, 2009, 26 (11): 1332–1335
- [21] Shleev S, Christenson A, Serezhenkov V, et al. *Biochem. J.*, 2005, 385: 745–754
- [22] 郑卫. 碳纳米管生物界面的构筑及其电化学性质的研究. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学博士学位论文, 2006

Design of Comprehensive Physicochemical Experiment: Electrocatalytic Reduction of Oxygen on Porphine Derivative Functionalized Graphene Oxide with Enzyme Entrapment

CAI Yan-Jun ZHANG Mi ZENG Han** GUAN Ming

(Key Laboratory of Energy Storage and Photoelectrocatalytic Materials, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract Some objections such as the obsolete contents, unitary experimental techniques, indigent evaluation means and the deviation of didactical targets from the frontier and the hotspots of the current scientific research could be identified in the current teaching of physicochemical experiment. It should be the focus of the present pedagogical reformation in the experimental curriculum. The novel and interdisciplinary item of physicochemical experiment is proposed in the article to substitute the out-dated and confirmatory content of the present-day course with the monotonous spectrometric means. The implementation of the comprehensive experiment is intended to cultivate the students with the capability to evaluate the impact of the mutual interactions between incorporated enzyme molecules and elements within the protein matrix on the charge shuttle dynamics and the electro-catalytic efficiency of graphene based composite with protein entrapment in virtue of the spectrometric and electrochemical techniques. Such actualization of the synthetical experiment would impel the students to master the key points of the related theory and the data proceeding methods. The content of the proposed experimental item is relative fairly to the research frontier of the photo-electrochemical sensor. The enforcement difficulty in the experimental reformation is relatively low. The execution of the experimental reformation indicates its palpable feasibility in the ordinary colleges and universities. The intention of such experimental innovation is proposed to explore and the estimate the direct electrochemical behavior and the electro-catalytic performance on oxygen reduction of laccase based electrode with porphine derivative functionalized graphene oxide as enzyme supporter.

Keywords graphene oxide; laccase; comprehensive experiment; electro-catalytic performance; hydrogen peroxide reduction