基于石墨烯-辣根过氧化物酶修饰电极的过氧化氢传感器

孙颖恩，张秀花，谭允冰，王兰腾，林煦章，朴金花
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510641）

摘要：本文采用 Hurnmers 方法制备了氧化石墨，通过超声波振荡后得到氧化石墨烯并用水合肼进行还原，制得还原石墨烯，结果表明，制备的氧化石墨烯材料的层间距由原料石墨的 0.33 nm 增加到 0.86 nm，结构上出现了含氧基团，还原后的石墨烯某些含氧基团消失。制备了基于石墨烯修饰辣根过氧化物酶（HRP）电极的过氧化氢传感器，该传感器以石墨烯（GR）作为酶的载体，壳聚糖（CS）为粘结剂，硫堇（Th）作为电子传递材料，玻碳电极（GC）为基体，结果显示，石墨烯和硫堇在修饰电极中有协同作用的效果，基于 GR-Th-HRP-CS/GC 修饰电极的过氧化氢传感器，具有良好的检测性能，催化电流与 H_2O_2 浓度的线性范围为 5.0×10^{-5}~1.1×10^{-3} mol/L，检测限为 9.53×10^{-7} mol/L，表观米氏常数 K_m^{app} 为 6.55×10^{-5} mol/L，该传感器具有优越的过氧化氢检测性能，可用于过氧化氢含量检测。

关键词：生物传感器；石墨烯；辣根过氧化物酶；过氧化氢；玻碳电极
文章篇号：1673-9078(2013)12-3046-3052

Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Graphene Modified Horseradish Peroxidase Electrode

SUN Ying-en, ZHANG Xiu-hua, TAN Yun-bing, WANG Lan-teng, LIN Xu-zhang, PIAO Jin-hua
(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Graphite oxide was prepared by Hummers method. Graphene oxide was obtained from ultrasonic oscillation of graphite oxide and then reduced by using hydrazine hydrate to get graphene (GR). The results showed that the prepared graphene oxide enlarged interlamellar spaces compared to graphite which was from 0.33 nm to about 0.86 nm. The structure of graphene oxide contained many oxygen groups which resulted in the increase of interlamellar space and hydrophilism. After reducion, some oxygen groups disappeared. Hydrogen peroxide biosensor based on graphene modified horseradish peroxidase electrode was prepared by using graphene as enzyme carrier, chitosan (CS) as binder, thionine (Th) as electrical mediator and glass carbon (GC) as electrode matrix. Graphene and Th had the synergistic effect on HRP-GR-Th-CS/GC electrode. The cyclic voltammetric experiment results demonstrated that the current response of the biosensor was linear to hydrogen peroxide content ranging from 5.0×10^{-5} to 1.1×10^{-3} mol/L, with detection limit of 1.50×10^{-6} mol/L and apparent Michaelis-Menten constant (K_m^{app}) of 6.55×10^{-5} mol/L. The biosensor has good detection performance especially for hydrogen peroxide thus can be used for detecting hydrogen peroxide content.

Key words:biosensor; graphene; horseradish peroxidase; hydrogen peroxide; glass carbon electrode；

石墨烯是尺寸在十几纳米到几百纳米间的二维纳米材料[1]，由于其特殊的结构使其具有良好的电学、力学和热学性质，在复合材料制备，传感器、燃料电池等能源领域具有重要的应用前景，与目前广泛应用的碳纳米管相比，石墨烯制备成本很低，且易于大规模生产，有望在生物检测方面实现实际应用[2~3]。最常用的氧化石墨烯制备方法是通过化学法[4]将石墨进行氧化，然后通过超声制备氧化石墨烯，氧化石墨烯在结构上含有大量的含氧活性基团，如羰基、羧基、羟基以及环氧基等[5]，破坏了石墨烯的sp2杂化体系，层面内的π键断裂，导电性比石墨烯差了很多[6]，但是氧化石墨烯与许多聚合物具有较好的相容性。为了提高氧化石墨烯的导电性，通常是将氧化石墨烯还原，使之具有导电性，能够广泛的应用于酶生物电极制备等

收稿日期：2013-08-07
基金项目：中国博士后科学基金项目（20080430826）；中国博士后科学基金特别资助项目（200801250）；中央高校基本科研业务费项目（2009ZM0142）；国家大学生创新性实验计划项目（201310561048）
通讯作者：朴金花(1970-)，副研究员，研究方向：电化学食品分析，食品安全检测，生物电化学相关方向

方面。

生物传感器具有专一性、高效性等特点，以酶为基础的生物传感器具有灵敏度高，选择性好，检测过程快速等特点。过氧化氢是酶促反应的中间产物，过氧化氢的测定在食品行业、药物行业以及环境分析等方面都具有重要意义[7]。以酶为基础的过氧化氢传感器具有设备简单、检测快速、成本低等特点[6~8]，广泛的应用于食品分析，生物学检测以及临床诊断等方面，在环境分析方面也得到了广泛的应用。制备酶为基础的传感器的关键在于高催化活性、高稳定性的酶修饰电极的制备，可以通过提高酶的固载量以及改善酶与电极间电子传递来实现。近年来，由于纳米材料具有比表面积大，表面反应活性高，有宏观量子隧道效应等良好的催化性质，被广泛的应用于酶修饰电极的制备中，邹小勇[9]等制备了基于纳米金和硫堇固定酶的过氧化氢生物传感器，在优化条件下，传感器对过氧化氢的检测范围为5.6×10^{-5}~2.6×10^{-3} mol/L，检出限为1.5×10^{-5} mol/L，姚慧[10]等制备的基于碳纳米管固定酶的电化学传感器，制备的酶修饰电极的表观Michaelis-Menten常数K_m^{app}为3.1×10^{-5} mol/L，催化电流和浓度的线性范围为2.5×10^{-5}~1.25×10^{-4} mol/L，本论文以纳米石墨烯作为酶修饰电极的基体制备过氧化氢传感器，期望能够获得较好的成果。为了获得高催化活性的酶修饰电极，一个重要的方面是提高酶和电极基体间的电子传递速率，因为酶表面有一层绝缘的蛋白层，阻碍了电子从反应的活性位传递到电极表面，从而影响了电极的性能，为了提高电子传送速率，在生物传感器中通常加入电子介体[10,11]，比如二茂铁及其衍生物[12]，醌类化合物[13]，锇、钌及其配合物[14]、铁氰酸盐[15]等，硫堇（Thio）也是常使用的电子介体之一，硫堇[11]结构与亚甲基蓝类似，具有良好的电化学活性和静电吸附作用力，是用于酶修饰电极的良好的电子介体[10~11]。以硫堇为电子媒介体的传感器，具有选择性高、灵敏度高、稳定性好和电流响应快及传感器制备简便等特点。

本文将HRP固定在石墨烯（GR）-壳聚糖（CS）修饰的玻碳电极上，构建了HRP-GR-Th-CS/GC修饰电极，利用固定的HRP对H_2O_2的催化还原作用产生的还原电流与H_2O_2浓度的线性关系，实现对H_2O_2的定量检测。该传感器以还原的纳米石墨烯作为HRP的修饰材料，以硫堇作为电子传递介体，克服了酶传感器中电子传递困难以及酶稳定性差的缺点，具有高催化活性、高稳定性、好的重现性等优点。论文中对酶修饰电极的组装、制备条件，工作条件等进行了优化，对传感器的定量分析性能也进行了评价。

1 材料与方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶（HRP，RZ~3.0，250 U/mg，M_W~40000），广州市齐云生物技术公司；壳聚糖（CS），脱乙酰度为90.09%，上海伯奥生物科技有限公司；过氧化氢（H_2O_2，30%），广州市东红化工厂；硫堇（Th），上海试剂站进口分装；石墨粉（含量≥99%），天津市科密欧化学试剂公司；N-N-二甲基甲酰胺（天津富宇精细化工有限公司），高锰酸钾，广州华立颜料化工有限公司；水合联氨（$N_2H_4H_2O$，含量≥50.0%），广州化学试剂厂；其他常规试剂均来自天津市科密欧化学试剂公司，均为分析纯，实验用水为去离子水。

1.2 主要仪器设备

实验中采用扫描电子显微镜（德国，Zeiss SUPRA40），X-射线衍射仪（Shimadzu XD-3A，日本），原位红外光谱仪（德国布鲁克，TENSOR-27）对制备的石墨烯进行结构表征，采用电化学工作站（CHI660）进行电化学性能测试，采用三电极体系，酶修饰的玻碳电极（Ø：3 mm）为工作电极，Ag/AgCl电极为参比电极，铂片电极为辅助电极。电解液是0.2 mol/L磷酸盐缓冲溶液（PBS）。实验室温为（25±1 ℃）。

1.3 实验过程

1.3.1 氧化石墨制备

以天然鳞片石墨为原料，采用 Hummers 法[4]制备氧化石墨。

1.3.2 石墨烯制备

采用氧化-还原法[17]制备石墨烯：称取 100 mg 制备的氧化石墨，加入 50 mL 蒸馏水，配制成 0.2%的氧化石墨溶液。超声分散处理 1 h，得到稳定的棕黄色分散液（氧化石墨超声剥离成氧化石墨烯片层）。加热分散液至 80 ℃并滴加水合肼 2 mL，在水浴锅中反应 4 h，得到均匀稳定且不易发生团聚的石墨烯分散液。将得到的石墨烯分散液真空抽滤，用去离子水和甲醇分别清洗 2~3 次，然后在 60 ℃真空干燥箱中充分干燥，保存备用。

1.3.3 修饰电极的制备

1.3.3.1 玻碳电极处理

按文献[9]的方法对玻碳电极进行预处理。

1.3.3.2 修饰电极制备

将壳聚糖配制成质量分数为 0.2%的乙酸溶液，直接吸取 5 μL 滴于玻碳电极表面，晾干制成 CS/GC 电

极；取 1 mL 0.2%的 CS 溶液与等体积的 5 mg/mL 的 HRP 溶液混合均匀，取 5 μL 混合液滴于处理好的玻碳电极表面，制成 CS-HRP/GC 电极；吸取 1 mL 0.2%的 CS 溶液，与等体积的 5 mmol/L 的硫堇（Th）溶液充分混合均匀，吸取 5 μL 于处理好的玻碳电极上，制成 Th-CS/GC 电极；吸取 1 mL 0.2%的 CS 溶液，与等体积的 5 mmol/L 的硫堇（Th）溶液充分混合均匀，将等体积的 5 mg/mL 的 HRP 溶液与 Th-CS 混合溶液均匀混合，吸取 5 μL 滴于玻碳电极表面，制成 Th-CS-HRP/GC 电极；将 5 mg GR 加入到 5 mL 0.2%的 CS 溶液中，超声处理 2 h 得到 GR-CS 混合液，吸取 5 μL 滴于玻碳电极表面，得到 GR-CS/GC 电极；将等体积的 5 mg/mL 的 HRP 溶液与 GR-CS 混合液均匀混合，吸取 5 μL 滴于玻碳电极表面，制得 GR-CS-HRP/GC 电极；称取 10 mg GR 于试管中，量取 5 mL 0.2%的 CS 溶液和 5 mL 5mmol/L 的 Th 溶液加入试管，超声处理 2 h 得到 GR-Th-CS 混合液，吸取 5 μL 滴于玻碳电极表面，得到 GR-Th-CS/GC 电极；称取 10 mg GR 于试管中，量取 5 mL 0.2%的 CS 溶液和 5 mL 5 mmol/L 的 Th 溶液加入试管，超声处理 2 h 得到 GR-Th-CS 混合液，将等体积的 5 mg/mL 的 HRP 溶液与 GR-Th-CS 混合液均匀混合，吸取 5 μL 滴于玻碳电极表面，GR-Th-CS-HRP/GC 电极。

1.3.4 电化学测试

采用三电极体系，循环伏安法进行测试，评价所制备的过氧化氢传感器的性能。

2 结果与讨论

2.1 石墨烯的制备

为考察石墨烯制备过程中各个阶段的成果，分别对原料石墨，氧化石墨，氧化石墨烯和还原的石墨烯进行了 XRD 图谱分析。图 1 是制备过程中的四种产物的 XRD 图谱，从图中可以看出，原料石墨在 2θ为 26.5°处有明显的衍射峰，该峰是石墨的 002 特征衍射峰，表明原料石墨微晶片层具有高度规整的结构，根据布拉格方程式：$2d\sin\theta=n\lambda$，其中 n 取 1，Cu 靶产生的 X 射线波长为 0.154 nm，带入公式计算，可得原料石墨的层间距为 d=0.33 nm。在氧化石墨和氧化石墨烯样品中，都在 2θ=10°附近出现较强的峰位，该峰对应于氧化石墨的 001 特征衍射峰，从图上可以看出，氧化石墨和氧化石墨烯样品中，石墨的特征峰 2θ=26.5°完全消失，说明石墨被氧化完全，此结果与大量文献中报道的结果相同，表明采用 Hummers 方法成功制备出来氧化石墨,根据布拉格方程式计算得出氧化石墨和氧化石墨烯的层间距为 d=0.86 nm，该数值相比很多文献[18]报道的 0.73 左右稍微大一点，石墨在氧化过程中，氧原子与碳原子间形成共价键，在石墨片层表面插入羟基、羧基等基团，导致氧化石墨层间的间距比石墨大，同时，因为氧化石墨含有大量极性含氧基团，与极性分子较易集合，随着氧化程度的提高，层间距加大[6]，导致氧化石墨亲水性增加。从图中还可以看出，还原后的石墨烯所有衍射峰都消失了，说明氧化石墨烯中的含氧基团都消失了，氧化石墨烯被还原，同时，通过超声也使石墨烯层间完全剥离，使石墨烯恢复很好的导电性能。

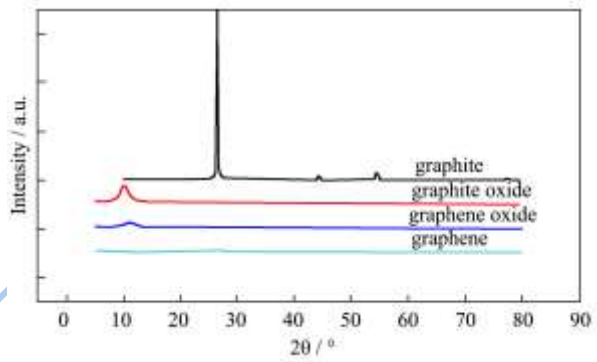


图 1 石墨、氧化石墨、氧化石墨烯和还原石墨烯的 XRD 谱图

Fig.1 XRD patterns of graphite, graphite oxide, graphene oxide and graphene

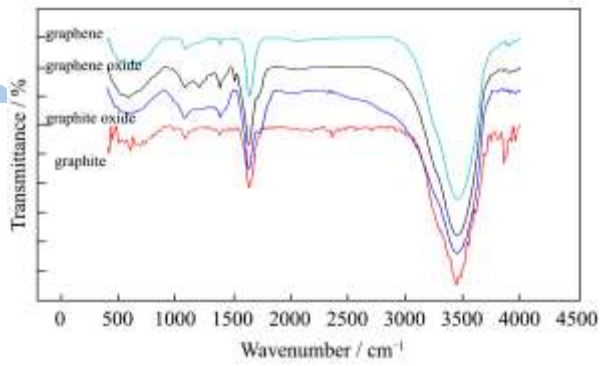
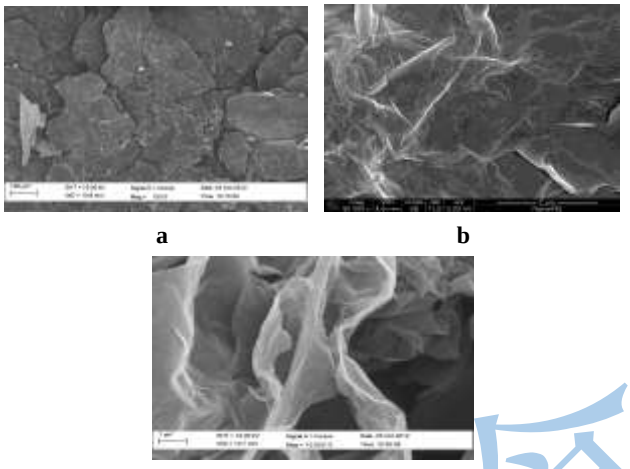


图 2 石墨、氧化石墨、氧化石墨烯和还原石墨烯的 FT-IR 谱图

Fig.2 FT-IR patterns of graphite, graphite oxide, graphene oxide and grapheme

图 2 为原料石墨粉，氧化石墨，氧化石墨烯和还原石墨烯的 FT-IR 谱图，从图上可以看出，在高频区 3450 cm^{-1} 附近的峰，属于羟基的伸缩振动，而 3000~3750 cm^{-1} 范围内出现的较宽的谱峰，来自于材料所吸附的水分子；由于样品吸湿性较强，位于 1622 cm^{-1} 处的峰，对应于水分子中羟基的弯曲振动的吸收谱峰，说明石墨及石墨烯材料中还残留少量的水分，不可能完全干燥[4~5]。1052 cm^{-1} 峰对应 C-O-C 振动峰。在 1480 cm^{-1} 属于羧基的 C-O 键伸缩振动；氧化石墨在 1264 cm^{-1} 位置附近属于表面 C-O-C 伸缩振动。从图中可以看出，石墨氧化后，

极性基团明显增多，除了上述基团外，在 1393 cm^{-1} 处出现明显的 C-OH 峰，在 1726 cm^{-1} 位置出现 C=O 的伸缩振动峰，氧化石墨烯在 1200 cm^{-1} 和 1499 cm^{-1} 处也出现了振动峰，分别对应 C-O-C 键和羧基的 C-O 键伸缩振动[6]，这些含氧基团的存在说明石墨已经被氧化了，且这些极性基团特别是表面羟基的存在，使氧化石墨很容易与水分子形成氢键，进而解释了氧化石墨具有良好亲水性的原因。而还原后的石墨烯，只存在 1052 cm^{-1} 和 1393 cm^{-1} 处振动峰，1052 cm^{-1} 峰为 C-O 键吸收峰，说明氧化石墨烯经过还原后，部分官能团振动引起的吸收峰逐渐减小，某些含氧基团消失，这些说明得到了还原的石墨烯[5~6]，这也是石墨烯还原后导电性增加的原因。



a b c

图 3 SEM 照片

Fig.3 SEM photos

注：a：石墨粉；b：氧化石墨烯；c：石墨烯。

在通常情况下，石墨烯在 SEM 下很难成像，但是由于石墨烯质软，在基底上沉积会形成大量的褶皱，从图 3 石墨粉、氧化石墨烯、石墨烯的 SEM 图片可以看出，原料石墨呈现鳞片状结构，而氧化石墨烯及还原的石墨烯均在片层边缘存在褶皱，呈现薄纱状，氧化石墨上的含氧官能团破坏了 C=C 双键是造成褶皱的主要原因。

2.2 修饰电极电化学行为

2.2.1 不同电极在缓冲溶液中循环伏安（CV）分析

图 4A 为不同电极在 pH 为 6.8 的 PBS 溶液中的循环伏安曲线。从图中可以看出，壳聚糖修饰的玻碳电极没有明显的电流峰值，说明 CS/GC 电极(图 A 中 a)的导电性很差；将 Th 引入到 CS/GC 电极上后，循环伏安曲线上出现出现明显的氧化还原峰，说明 Th 和壳聚糖相容性良好，硫堇在电极表面发生氧化还原反应；而将石墨烯引入到 CS/GC 电极上，循环伏安曲线的基础电流明显增加，说明石墨烯也改善了修饰电极的导电性，但是和 Th-CS/GC 电极相比，曲线的电流没有出现明显的峰值(图 A 中 b 和 c)，这是由于 Th-CS/GC 电极的循环伏安曲线存在硫堇的氧化还原峰电流。从图中还可以看出，当把 Th 和 GR 同时引入到 CS/GC 电极上，修饰电极的导电性能显著增加(图 A 中 d)，循环伏安曲线的峰电流明显增加，表明将硫堇和石墨烯复合制备的修饰电极使电流传导性能极大增加。图 4B 是不同修饰电极复合辣根过氧化物酶之后在 PBS 缓冲溶液中的循环伏安曲线图，从图中可以看出，每个类型的电极在复合了 HRP 之后，氧化还原电流都明显降低，表明每个类型的修饰电极都成功的负载了 HRP，由于 HRP 是生物大分子，阻碍了电子的传递，所以电流值减小。

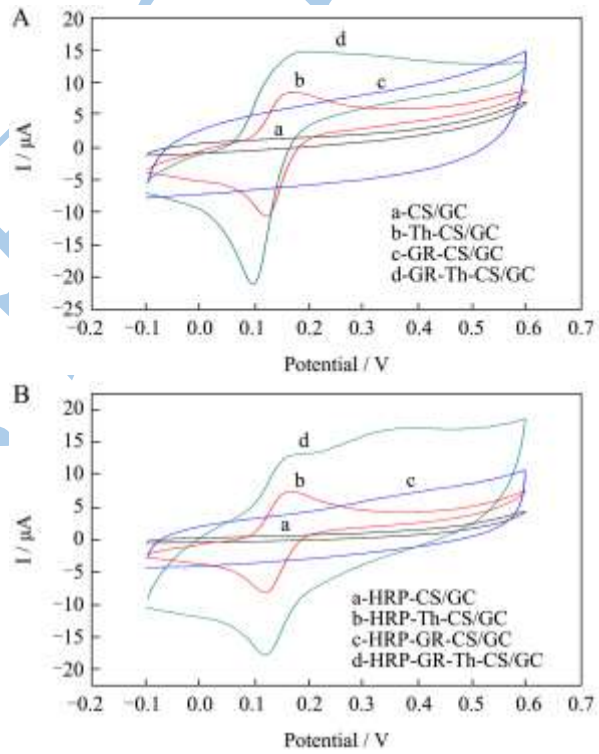


图 4 不同修饰电极在 PBS 缓冲溶液中的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammograms of different modified electrodes in PBS solution

注：A：无酶；B：有酶；扫描速率：50 mV/s。

2.2.2 扫描速率的影响

图5是在pH=6.8的PBS溶液中，HRP-GR-Th-CS/GC电极在不同扫描速率下的循环伏安曲线(图5a)。从图中可以看出：HRP直接电子转移反应的氧化与还原峰电流几乎相等，即Ipa/Ipc≈1，当扫速在0.01~0.20 V/s时，随着扫描速率的增加,其氧化峰电位E_{pa}向负方向移动，还原峰电位E_{pc}向正方向移动,峰电位差ΔE_p从18 mV增加到22.4 mV，式量电位E^0几乎不随扫速的增加而发生

变化，式量电位E^0的平均值为E^0=0.22 V，表明该电极为准可逆电极；从图中还可以看出，氧化还原峰电流均随扫速的增大而增大，峰电流与扫速v之间呈线性关系（图5b）：回归方程分别为：I_{pc}(μA)=399.33v(V/s)+8.109，相关系数为0.9975；I_{pa}(μA)=−330.05v(V/s)-5.54，相关系数为0.9945。说明该电极反应过程是表面电化学过程为控制步骤，而非扩散控制过程。

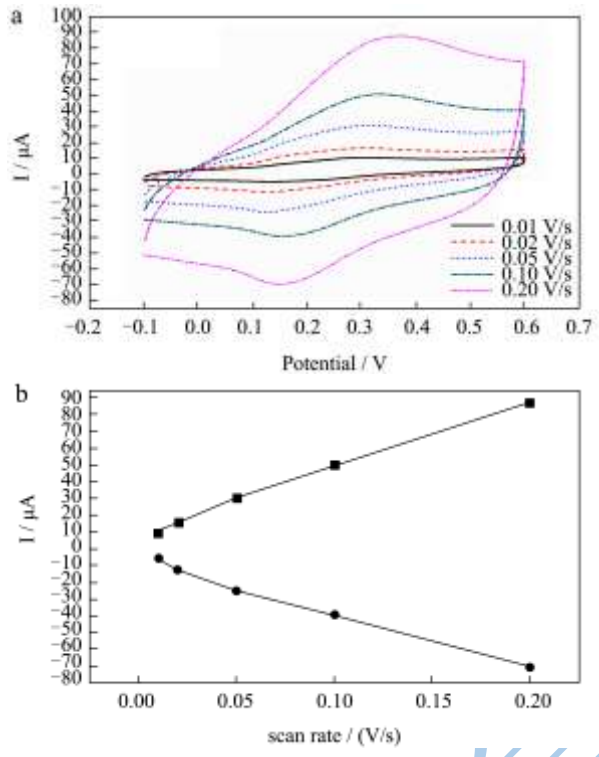


图 5 不同扫描速率下 HRP-GR-Th-CS/GC 电极在 PBS 缓冲溶液（0.2 mol/L）中的循环伏安曲线图

Fig.5 Cyclic voltammograms of HRP-GR-Th-CS/GC electrode under different scan rates in PBS solution (0.2 mol/L)

2.2.3 不同酶修饰电极对过氧化氢的催化氧化分析

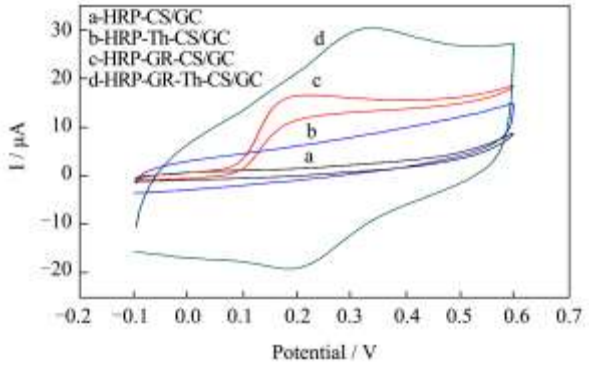


图 6 不同修饰电极在 H_2O_2 溶液中的循环伏安图

Fig.6 Cyclic voltammograms of the different modified electrodes in H_2O_2 solution, H_2O_2 content: 0.1mmol/L, scan rate:50 mV/s, pH=6.8

注：H_2O_2 浓度：0.3 mmol/L，扫描速率：50 mV/s，pH=6.8。

图6为不同酶修饰电极在过氧化氢存在下的循环伏安图，当向pH为6.8的PBS缓冲溶液中加入0.3 mmol/L H_2O_2时，从图中可以看出，与在缓冲溶液中的循环伏安曲线相比，HRP-CS/GC电极没有明显变化，HRP-Th-CS/GC电极的峰值消失，而HRP-GR-CS/GC电极和HRP-GR-Th-CS/GC电极有明显的还原峰，说明含有石墨烯的两个电极对H_2O_2的催化能力较强，有明显的还原峰，其中HRP-GR-Th-CS/GC电极对H_2O_2的催化效果最好，分析原因是由于纳米石墨烯材料有效的负载了HRP，而硫堇起到了有效的电子传递的作用，二者协同作用使电极对H_2O_2的催化能力明显提高。

2.2.4 pH值的影响

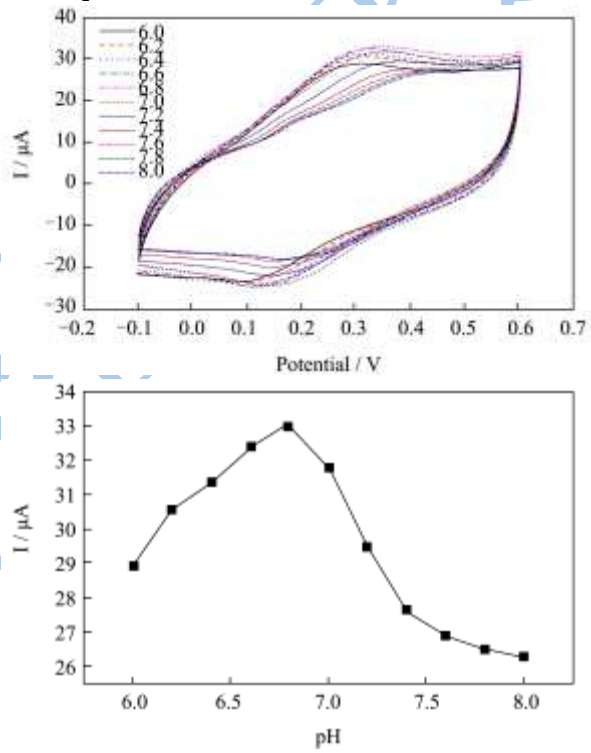


图 7 pH 值对 HRP-GR-Th-CS/GC 电极对过氧化氢催化性能影响

Fig.7 The effect of pH values for catalytic performance of HRP-GR-Th-CS/GC electrode to H_2O_2, scan rate:50 mV/s

注：扫描速率：50 mV/s。

图7是HRP-GR-Th-CS/GC电极在扫描速率为50 mV/s，不同pH值下的循环伏安曲线以及线性关系图，从图中可以看出，当pH值小于6.8时，电极对H_2O_2的响应电流随pH值增加而增大，到pH=6.8时达到最高点，然后随着pH值增加而降低，所以本论文的实验都是在pH为6.8时测定的。

2.2.5 H_2O_2 浓度对 HRP-GR-Th-CS/GC 修饰电极催化性能影响

为考察GR-Th-CS中HRP的生物电催化活性，利用循环伏安法研究了HRP-GR-Th-CS/GC修饰电极对H_2O_2还原反应的影响。

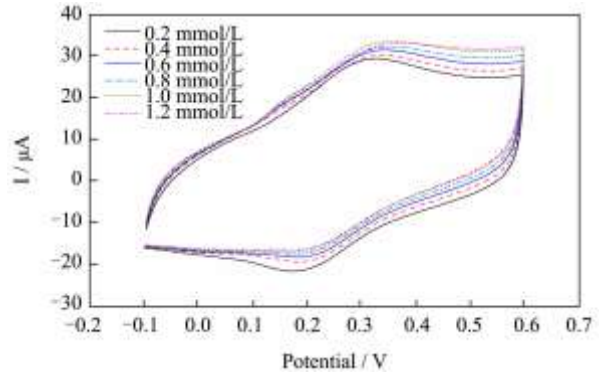


图 8 HRP-GR-Th-CS/GC 电极对不同过氧化氢浓度的循环伏安图

Fig.8 Cyclic voltammograms of HRP-GR-Th-CS/GC electrode to different H_2O_2 content, scan rate:50 mV/s

注：扫描速率：50 mV/s。

图 8 为在 pH 为 6.8，扫描速率为 50 mV/s 时测定的 HRP-GR-Th-CS/GC 修饰电极对不同浓度 H_2O_2 的循环伏安曲线，从图中可以看出，在 H_2O_2 存在情况下，循环伏安曲线上存在明显的氧化还原峰，随着 H_2O_2 浓度增加，还原峰电流明显增加，但是氧化峰电流明显减小，表明 GR-Th-CS 有效地保持了 HRP 对 H_2O_2 的生物电催化活性。H_2O_2 在 5.0×10^{-5}~1.1×10^{-3} mol/L 浓度范围内，峰电流与 H_2O_2 的浓度成良好线性关系，线性方程为 $I(\mu A)=28.60+4.75C(\text{mmol/L})$，相关系数为 0.9986。基于信噪比（S/N）等于 3 的酶电极的检测限为 9.53×10^{-7} mol/L。当 H_2O_2 的浓度高于 1.10×10^{-3} mol/L 时，电极响应达到饱和，这是因为此时酶反应动力学或酶-底物的动力学达到饱和所致。

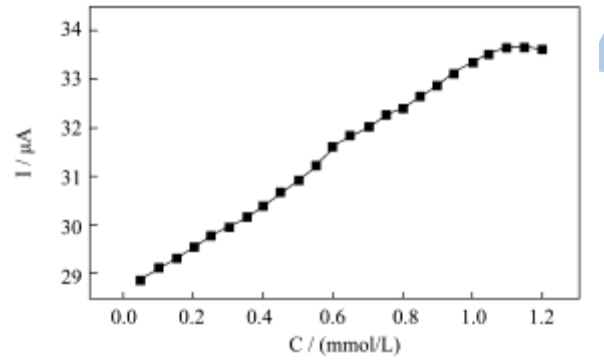


图 9 HRP-GR-Th-CS/GC 电极对过氧化氢的浓度与电流关系曲线

Fig.9 Relationship between H_2O_2 contents and response currents of HRP-GR-Th-CS/GC electrode

注：扫描速率：50 mV/s。

表观米氏常数(K_m^{app})是表征酶反应动力学的重要参数，K_m^{app}越小，表明酶与底物亲和力越大，酶的活性收到抑制的程度越小，本论文采用电化学方法测定了 HRP催化H_2O_2反应的K_m^{app}值，通过Lineweaver-Burk方程[31]算而得：

$$\frac{1}{I_{ss}}=\frac{1}{I_{\max}}+\frac{K_m^{app}}{I_{\max}}\cdot\frac{1}{c}$$

注：其中，I_{ss}为与一定底物浓度对应的传感器的稳态电流；$I_{\max}$为底物饱和条件下测得的最大稳态电流；c为底物浓度。

本实验中依据图9中底物浓度与响应电流间关系，得出K_m^{app}为6.55×10^{-5} mol/L。

3 结论

本论文通过 Hurnmers 方法制备了氧化石墨，并通过超声剥离得到氧化石墨烯，并对其进行还原得到还原石墨烯。用还原的石墨烯制备了基于石墨烯修饰辣根过氧化物酶修饰电极的过氧化氢传感器，在修饰电极中，石墨烯与硫堇复合具有协同作用的效果，提高了辣根过氧化物酶修饰电极的电子传递速率，有效的提高了传感器的性能，该石墨烯基传感器对过氧化氢具有很好的催化活性，对 H_2O_2 检测的线性范围为 5.0×10^{-5}~1.1×10^{-3} mol/L，检测限为 9.53×10^{-7} mol/L，表观米氏常数K_m^{app}为 6.55×10^{-5} mol/L，可以用于过氧化氢含量检测。

参考文献

[1] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. Science, 2004, 306: 666-669

[2] Kim K S, Ahn J H, Kim P, et al. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes [J]. Nature, 2009, 457: 706-710

[3] Dikin D A, Zimney E J, Piner R D, et al. Preparation and characterization of graphene oxide paper [J]. Nature Letters, 2007, 448: 457-460

[4] Stankovich S, Dikin D A, Piner R D, et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide [J]. Carbon., 2007;45:1558-1565

[5] Paci J T, Belytschko T, Schatz G C. Computational studies of the structure,behavior upon heating,and mechanical properties of graphite oxide [J]. J. Phys. Chem. *C*, 2007, 111(49): 18099-18111

[6] McAllister J M, Li J L, Adamson D H, et al. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite [J]. Chem. Mater., 2007, 19(18):4396-4404

[7] 邓春艳,阳明辉.基于硫堇/碳纳米管修饰电极的新型过氧化氢电化学传感器[J].分析测试学报,2012,31(7): 828-832
Deng C Y, Yang M H. A novel amperometric hydrogen peroxide biosensor basedon thionine-carbon nanotube modified glassy carbon electrode [J]. J. Instrument Analysis,

2012, 31(7): 828-832

[8] Xiao Y, Ju H X, Chen H Y. A reagentless hydrogen peroxide sensor based on incorporation of horseradish peroxidase in poly(thionine) film on a monolayer modified electrode [J]. Anal. Chim. Acta., 1999, 391: 299-306

[9] 陈贤光,钱莹,张素娟,等,基于纳米金和硫堇固定酶的过氧化氢生物传感器[J]化学学报,2007,65(4):337-343
CHEN X G, QIAN Y, ZHANG S J, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing enzyme by gold nanoparticles and thionine [J]. Acta Chimi. Sinica, 2007, 65(4): 337-343

[10] 姚慧,董元,刘海杰,等.基于壳聚糖-辣根过氧化物酶-多壁碳纳米管修饰电极的直接电化学研究[J].沈阳化工大学学报, 2011,25(1): 6-1
Yao H, Dong Y, Liu H J, et al., Direct electrochemical study of a GCE modified with HRP/CHIT-MWNTs [J]. J. Shenyang Univ. Chem. Tech., 2011, 25(1): 6-11

[11] Sun J J, Fang H Q, Chen H Y, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on a self-assembled monolayer modified gold electrode for the detection of hydrogen peroxide [J]. Analyst, 1998, 123: 1365-1368

[12] Ruan C M, Yang R, Chen X H, et al. A reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalently binding horseradish peroxidase and thionine using a thiol-modified gold electrode [J]. J. Electroanal Chem., 1998, 455: 121-125

[13] Keiko Y, Takanori O, Masaki T, et al. Highly-sensitive flow injection determination of hydrogen peroxide with a peroxidase-immobilized electrode and its application to clinical chemistry [J]. Anal. Chim. Acta., 2000, 406(2): 201-207

[14] Everett W R, Rechnitz G A. Mediated Bioelectrocatalytic Determination of Organophosphorus Pesticides with a Tyrosinase-Based Oxygen Biosensor [J]. Anal. Chem., 1990, 70: 807-810

[15] Yasuo N, Atsushi O, Shiro Y, et al. Evaluation of osmium (II) complexes as electron transfer mediators accessible f or amperometric glucose sensor [J]. Anal. Science, 2001, 17: 945-950

[16] Wang J, Zhang X, Prakash M. Glucose microsensors based on carbon paste enzyme electrodes modified with cupric hexacyanoferrate [J]. Anal. Chim. Acta., 1999, 395(1/2) :11-16

[17] 肖淑华,沈明,朱沛英,等,水合肼还原氧化石墨烯的研究[J]. 材料开发与应用,2011,26(2):45-50
Xiao S H, Shen M, Zhu P Y, et al. Research on the reduction of graphene oxide with hydrazine hydrate [J]. Develop. Appl. Mater., 2011, 26(2): 45-50

[18] Yang X J, Makita Y, Liu Z H, et al. Novel synthesis of layered graphite oxide bimessite manganese oxide nanocomposite [J]. Chem. Mater., 2003, 15: 1228-1231

更正说明

我刊于 2013 年第 5 期刊发的《宁夏滩羊肉的特征香气成分分析》一文，作者为：李伟，罗瑞明，李亚蕾，杨波。文中在基金项目一栏，标注应为：国家自然科学基金资助项目（31060220）。