

2019-12-28

## Electrochemical Sensor Based on Magnetic Electrode Modified with Magnetic Molecularly Imprinted Nanoparticles Immobilized Hemoglobin for Determination of Hydrogen Peroxide

Yang YUAN

Jia-xin WANG

Yu-hua CAO

*School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China,;*  
yuhuacao64@gmail.com

---

### Recommended Citation

Yang YUAN, Jia-xin WANG, Yu-hua CAO. Electrochemical Sensor Based on Magnetic Electrode Modified with Magnetic Molecularly Imprinted Nanoparticles Immobilized Hemoglobin for Determination of Hydrogen Peroxide[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2019 , 25(6): 757-763.

DOI: 10.13208/j.electrochem.180704

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol25/iss6/13>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

DOI: 10.13208/j.electrochem.180704

Artical ID:1006-3471(2019)06-0757-07

Cite this: *J. Electrochem.* 2019, 25(6): 757-763

Http://electrochem.xmu.edu.cn

# 磁性印迹纳米粒子固定血红蛋白 修饰磁性电极构建过氧化氢传感器

袁 洋, 王佳新, 曹玉华\*

(江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 采用表面印迹技术, 以磁性二氧化硅纳米粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  NPs)作为载体、血红蛋白(Hb)为模板分子、正硅酸乙酯(TEOS)为印迹聚合物单体, 制备了 Hb 印迹  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  的磁性印迹纳米粒子(MMIPs NPs). MMIPs NPs 具有磁性内核和血红蛋白印迹壳层的核壳结构, 可以富集并固定 Hb. 使用壳聚糖将 MMIPs NPs 固定于磁性电极表面, 构建血红蛋白类酶生物传感器, 研究了 Hb 对过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的催化活性. MMIPs NPs 相比于磁性非印迹纳米粒子(MNIPS NPs), 催化电流增加了 14.3%. 采用磁性电极, MMIPs NPs、Hb 和  $\text{O}_2$  的顺磁性使得该类酶生物传感器对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化电流增加了 60.0%. 血红蛋白类酶生物传感器电流响应与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度在  $25 \sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  间呈线性关系, 检出限为  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $S/N=3$ ), 表明该类酶传感器对  $\text{H}_2\text{O}_2$  具有良好的催化性能.

**关键词:** 血红蛋白; 类酶传感器; 过氧化氢; 磁性印迹纳米粒子; 磁性电极

**中图分类号:** O646.5

**文献标识码:** A

过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )是一种重要的活性氧, 在活细胞内具有多种生理和病理效应<sup>[1-2]</sup>. 对植物的激素应答、生长发育等调控过程起重要作用<sup>[3-4]</sup>. 此外  $\text{H}_2\text{O}_2$  也是重要的化工产品, 具有漂白、消毒杀菌的作用, 在造纸行业、纺织行业、食品卫生行业等其他领域得到广泛的应用<sup>[5-7]</sup>. 因此, 准确检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量是十分有必要的.

分光光度法<sup>[8-9]</sup>、色谱法<sup>[10-11]</sup>、化学发光法<sup>[12-14]</sup>、荧光法<sup>[15]</sup>、碘量法等均可用于  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测. 碘量法运用最广泛, 常用于测定漂白过程中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量, 虽然操作简单但灵敏度低且干扰因素多; 色谱法等仪器分析方法操作复杂, 且设备昂贵; 电化学分析法具有操作简单、选择性好、灵敏度高且成本低等优点, 在一定程度上得到广泛应用. Cheng 等<sup>[16]</sup>合成了沸石咪唑啉骨架-8(ZIF-8), 利用金属有机骨架(MOF)的介孔和微孔通道来固定细胞色素 C(Cyt c), Cyt c 具有类酶性质, 可以电化学催化  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 以类酶制作生物传感器检测  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 虽然灵敏度高, 但是常规纳米粒子载体昂贵, 不易生产使用<sup>[17]</sup>. He 等<sup>[18]</sup>通过化学沉淀法制备了磁铁矿-石墨烯( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -GE), 并将血红蛋白(Hb)固定在用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -GE 修饰的电

极表面, 从而制备了用于还原  $\text{H}_2\text{O}_2$  的生物传感器, 证明了 Hb 有类似于过氧化氢酶的作用, 在外加磁场作用下, Hb 对于  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化还原具有增敏的效果.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -GE 的制备需要用肼化学还原, 操作较为复杂, 产量较低. 而  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  NPs 制备方法简单, 具有更好的生物相容性, 且  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  NPs 具有磁性内核, 在外加磁场的的作用下, 可以使具有顺磁性的 Hb 的电活性中心更加的裸露, 从而加快了电子向磁性电极表面的转移. 此外, 利用蛋白质分子印迹技术可以在粒子表面进行印迹, 得到特异性更强、识别位点更多的纳米粒子, 可以富集和固定 Hb.

本文用血红蛋白印迹  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  NPs 来固定 Hb, 修饰在磁性玻碳电极上检测  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 该粒子形貌规整, 有良好的生物相容性, 有利于保持 Hb 的生物活性并使其活性位点裸露在电极表面, 其次印迹纳米粒子, 有很多的印迹位点, 能够增加 Hb 的吸附量, 进一步提高传感器的灵敏度. 由于磁性印迹纳米粒子(MMIPs NPs)的表面有硅羟基, 当 pH 大于 3.0 时, MMIPs NPs 带负电, 壳聚糖(CS)带正电荷, MMIPs NPs 和 CS 之间靠静电吸附的作用相

结合,在玻碳电极表面先滴涂上 CS 可以更好地固定 MMIPs NPs,提高了电极稳定性,并提供了更好的生物微环境. Hb 以及  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解产生的  $\text{O}_2$  的顺磁性,所使用的磁性印迹纳米粒子与磁性玻碳电极对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的测定均对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化还原具有增敏的作用.

## 1 实验

### 1.1 仪器与试剂

CHI810B 电化学工作站(上海辰华仪器公司); Epsilon 电化学工作站(美国 BAS 公司);JP-1200Y 超声波细胞粉碎仪(无锡久平仪器有限公司);SHZ-82 水浴恒温振荡器(金坛市医疗仪器厂). 电化学测试中使用三电极体系,其中铂电极为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,工作电极为直径 4 mm 的带有可拆卸的磁芯玻碳电极(武汉高士瑞联科技公司).

血红蛋白(Hb)、十二烷基硫酸钠(SDS)、油酸(OA)、四乙氧基硅烷(TEOS)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP),所有有机溶剂和无机盐均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司). 壳聚糖溶液( $\text{CS}$ ,  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )由 0.2 g CS 溶于 1%的乙酸超声 30 min 所制备. 磷酸盐缓冲溶液(PBS,  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 6.0)是通过混合  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液并加入  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl 和  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 来制备. 所有溶液均用超纯水( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )制备.

### 1.2 MMIPs NPs 的制备

根据作者课题组报道的 MMIPs NPs 的合成方法<sup>[9]</sup>,略有改动. 首先,利用共沉淀法制备磁性油酸包铁纳米粒子(OA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs),然后将 0.45 g OA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs 分散到 2.5 mL 环己烷中形成油相,与含 0.125 g SDS 的 50 mL 水溶液混合,预乳化 10 min 之后,在冰水浴的环境下,用超声波细胞粉碎仪将乳液超声 90 s 形成细乳液,并转移至 100 mL 的三口烧瓶中,加热至  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ,搅拌( $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )过夜. 磁性分离后,取 0.05 g 磁性物质加入到 3 mL 的 PVP( $0.067 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )超声 5 min 后得 PVP 修饰的磁性纳米簇,然后加入到已经预水解 30 min 的 Stöber 体系(20 mL 乙醇,1 mL 氨水,0.3 mL TEOS)中反应 5 min,再加入 10 mg 模板分子 Hb 继续搅拌 40 min. 反应结束后,磁性分离,用超纯水、乙醇多次洗涤,再用 SDS(0.1%, W/V)和乙酸(3%, V/V)的混合液多次洗脱模板,直至洗脱液在 406 nm 处检测不到 Hb 的紫外吸收峰,最后用超纯水反

复洗涤去除洗脱剂,即可得 MMIPs NPs,烘干后质量为 19.4 mg. 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下,将 MMIPs NPs 保存在 5 mL 超纯水中,得到  $3.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MMIPs NPs.

### 1.3 传感器的制备

将裸玻碳电极用氧化铝粉末进行抛光打磨,抛光后用超纯水、乙醇超声清洗、吹干备用. 取  $8 \text{ }\mu\text{L}$  的 CS 溶液滴涂在电极上,室温下晾干备用. 再取  $10 \text{ }\mu\text{L}$  的 MMIPs NPs 滴涂至干燥的玻碳电极表面,在室温下干燥,得到 MMIPs NPs 修饰的电极. 将该电极浸泡于  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  Hb 溶液中振荡吸附 1 h,取出后用 PBS 溶液冲洗,即得印迹磁性纳米粒子固定血红蛋白磁性电极(Hb/MMIPs NPs/MGCE),取出电极的磁芯可得到 Hb/MMIPs NPs/GCE(非磁性电极). 使用不同粒子滴涂在电极上待干后吸附血红蛋白,可得到非印迹磁性纳米粒子固定血红蛋白磁性电极(Hb/MNIPs NPs/MGCE)、二氧化硅纳米粒子固定血红蛋白磁性电极(Hb/ $\text{SiO}_2$  NPs/MGCE).

### 1.4 电化学测试条件

循环伏安法(CV)的测试条件:扫描范围  $-0.8 \text{ V} \sim 0.0 \text{ V}$ ,扫描速率  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . 差分脉冲伏安法(DPV)的测试条件:初始电压为  $-100 \text{ mV}$ ,终止电压为  $-600 \text{ mV}$ ,脉冲振幅  $50 \text{ mV}$ ,脉冲宽度  $50 \text{ ms}$ ,脉冲周期  $200 \text{ ms}$ . 实验前通氮气 20 min 除氧,并在实验过程中保持氮气的氛围.

### 1.5 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的测定

取  $50 \text{ }\mu\text{L}$   $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  于 5 mL 的容量瓶,用超纯水定容,得到  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液. 将三电极置于 40 mL pH 6.0( $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 PBS 缓冲溶液中,通氮气 20 min 后密封. 分别取  $10 \text{ }\mu\text{L}$ 、 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 、 $30 \text{ }\mu\text{L}$ 、 $40 \text{ }\mu\text{L}$ 、 $50 \text{ }\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  储备液于 PBS 缓冲溶液中得到  $25 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $75 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $125 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  等不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  试液,进行 DPV 测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 MMIPs NPs 的表征

图 1(A)是 MMIPs NPs 的透射电镜(TEM)照片,如图所示,MMIPs NPs 粒子呈球形且具有非常明显的核壳结构,分散性较好且无明显团聚现象. 其中,粒子中间黑色区域为磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,包围的透明部分为  $\text{SiO}_2$  印迹壳层. 图 1(B)为 TEM 照片的粒径统计直方图,MMIPs NPs 的平均粒径  $163 \text{ nm}$  ( $\text{RSD} = 4.2\%$ ,  $n = 100$ ),印迹薄层大约  $18 \text{ nm}$ .

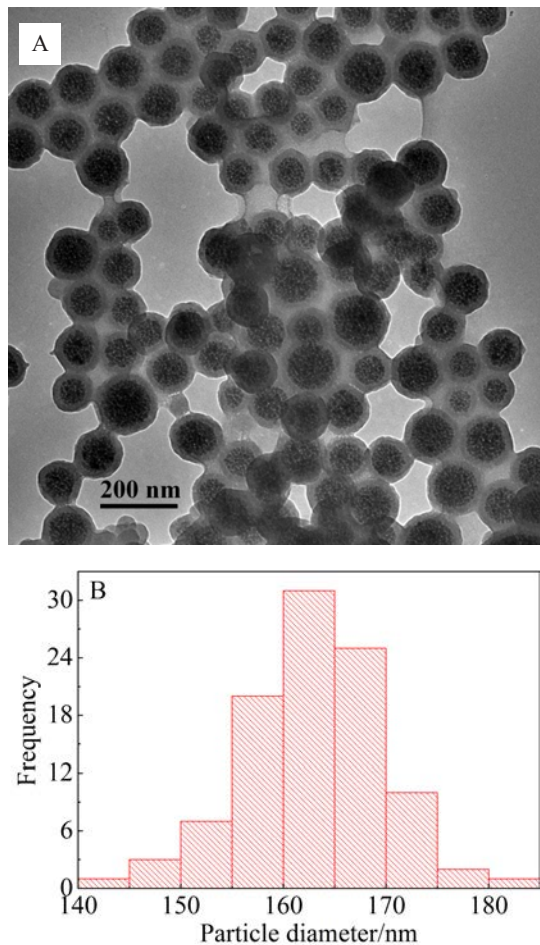


图 1 MMIPs NPs 的 TEM(A)及 TEM 照片的粒径统计直方图(B)

Fig. 1 TEM photograph of MMIPs NPs (A) and granularity histogram based on TEM (B)

## 2.2 不同修饰电极对 $H_2O_2$ 的电化学响应

图 2 是  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  在 Hb/MMIPs NPs/MGCE (a)、Hb/MNIPs NPs/MGCE (b)、Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/MGCE (c)、Hb/MMIPs NPs/GCE (d)、Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/GCE (e)、MGCE (f)、GCE (g) 上的 DPV 响应图。表 1 列出了不同的 Hb 修饰电极对  $H_2O_2$  进行 DPV 测定的响应电流。

如图 2 所示,  $H_2O_2$  在  $-0.26 \text{ V}$  左右处出现还原峰, Hb/MMIPs NPs/MGCE 的 DPV 响应电流最大,  $I = 1.6 \mu\text{A}$ , 说明印迹纳米粒子很好地固定了血红蛋白并且保持了其良好的生物活性。相比于 Hb/MNIPs, NPs/MGCE 上的还原峰电流 ( $I = 1.4 \mu\text{A}$ ), 增加了 14.3%, 表明了 MMIPs NPs 比 MNIPs NPs 表面有更多的印迹空穴, 具有更多的吸附位点, 从而可以吸附固定更多的 Hb, 进一步提高了电极的灵敏度。

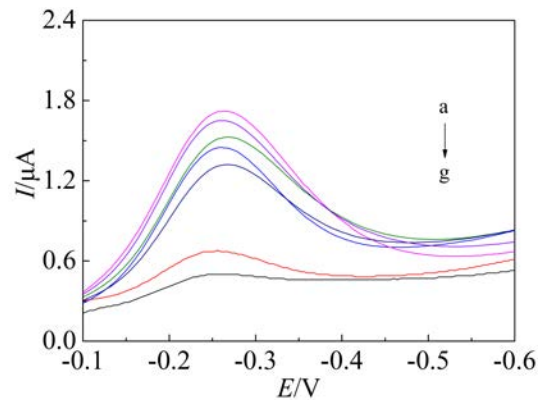


图 2  $H_2O_2$  在 Hb/MMIPs NPs/MGCE (a), Hb/MNIPs NPs/MGCE (b), Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/MGCE (c), Hb/MMIPs NPs/GCE (d), Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/GCE (e), MGCE (f), GCE (g) 的 DPV 曲线图; DPV 测试条件: 初始电压  $-100 \text{ mV}$ , 终止电压  $-600 \text{ mV}$ , 脉冲振幅  $50 \text{ mV}$ , 脉冲宽度  $50 \text{ ms}$ , 脉冲周期  $200 \text{ ms}$ , 扫描频率  $8 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 6.0 的磷酸盐缓冲溶液;  $H_2O_2$  的浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 2 DPVs of  $H_2O_2$  on Hb/MMIPs NPs/MGCE (a), Hb/MNIPs NPs/MGCE (b), Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/MGCE (c), Hb/MMIPs NPs/GCE (d), Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/GCE (e), MGCE (f), GCE (g); The DPV conditions: the initial voltage was  $-100 \text{ mV}$ , termination voltage was  $-600 \text{ mV}$ , pulse amplitude was  $50 \text{ mV}$ , pulse width was  $50 \text{ ms}$ , pulse period was  $200 \text{ ms}$ ; buffer solution:  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 6.0);  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ .

增加外界磁场, Hb/MMIPs NPs/MGCE 电流相比于在 Hb/MMIPs NPs/GCE 上的峰电流 ( $I = 1.0 \mu\text{A}$ ) 增加了 60.0%, 这是因为 Hb 和  $H_2O_2$  分解产生的  $O_2$  具有顺磁性, 超顺磁性的纳米粒子在磁场作用下对检测  $H_2O_2$  具有增敏作用。

为了证明纳米粒子、Hb、 $O_2$  三者顺磁性的共同作用, 分别设置了对照实验。MGCE (f) 和 GCE (g) 分别为裸玻碳电极加磁 ( $I = 0.28 \mu\text{A}$ ) 与不加磁 ( $I = 0.25 \mu\text{A}$ ), 磁场的加入使得  $O_2$  的还原电流增加了 12%, 由于  $H_2O_2$  产生的  $O_2$  的顺磁性, 磁性电极对  $H_2O_2$  的测定具有增敏的效果。Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/MGCE (c) ( $I = 1.3 \mu\text{A}$ ) 比 Hb/SiO<sub>2</sub> NPs/GCE (e) ( $I = 0.89 \mu\text{A}$ ) 大了 40.06%, SiO<sub>2</sub> NPs 不具有磁性, 但其吸附的血红蛋白有顺磁性, 在外加磁场的的作用下, Hb 对双氧水的催化还原具有增敏效果。

## 2.3 分散液体积对 $H_2O_2$ 催化电流的影响

分散液的体积是影响 Hb 吸附效率以及修饰



表 1 不同 Hb 修饰电极对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 DPV 响应电流  
Tab. 1 DPV peak current of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on different Hb modified electrodes

Hb modified electrode	MMIPs NPs		MNIPs NPs		$\text{SiO}_2$		Bare	
	MGCE	GCE	MGCE	GCE	MGCE	GCE	MGCE	GCE
$I/\mu\text{A}$	1.6	1.0	1.4	0.93	1.3	0.89	0.28	0.25

电极性能的重要因素. 如图 3 所示, 当分散液体积为  $10 \mu\text{L}$  时,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  响应电流达到最大. 当分散液体积小于  $10 \mu\text{L}$  时, 电极表面固定的血红蛋白较少. 当分散液体积大于  $10 \mu\text{L}$  时, 电极表面过多的粒子阻碍了电子转移, 使得传感器灵敏度降低, 故最佳分散液体积为  $10 \mu\text{L}$ .

#### 2.4 缓冲液 pH 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 催化电流的影响

不同 pH 条件会影响血红蛋白对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的催化性能. 在催化过程中血红蛋白会与  $\text{H}_2\text{O}_2$  形成一个以还原态的铁为中心的中间体( $\text{HbFe(IV)=O}$ ), 该中间体很不稳定<sup>[20]</sup>. pH 是影响血红蛋白催化活性的重要因素, 不同 pH 对中间体转化速率的影响不同. 图 4 是缓冲溶液 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 条件下,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的峰电流图. 如图 4 所示, 当缓冲溶液 pH 为 6.0 时, 血红蛋白对  $\text{H}_2\text{O}_2$  具有最佳的催化活性.

#### 2.5 响应时间对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 催化电流的影响

响应时间是传感器的重要参数. 图 5 为不同响应时间下测得的  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 峰电流. 随着时间的增加, 电流一直增加, 直到 3 min 后响应

电流基本不变, 故可认定 3 min 为该体系的最佳响应时间.

#### 2.6 扫描速率对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 催化电流的影响

$\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度为  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  在  $50 \sim 400 \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  的扫描速率下进行循环伏安扫描, 如图 6(A) 为扫描速率与峰电流的关系图, 其还原电流随扫描速率的增加而增加. 图 6(B) 为扫描速率与电流的线性

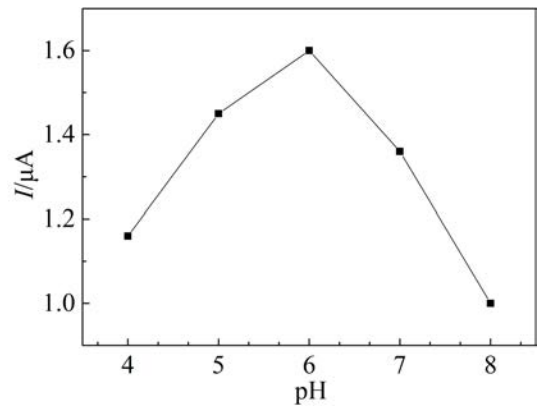


图 4 缓冲液 pH 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  催化电流的影响 (DPV 条件同图 2)

Fig. 4 Effect of buffer pH on the catalytic current of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (The DPV conditions were the same as in Fig. 2.)

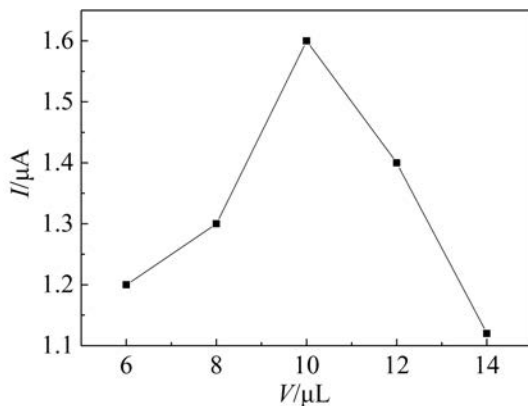


图 3 分散液体积对  $\text{H}_2\text{O}_2$  催化电流的影响 (DPV 测定条件同图 2)

Fig. 3 Effect of MMIPs NPs dispersion volume on the catalytic current of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (The DPV conditions were the same as in Fig. 2.)

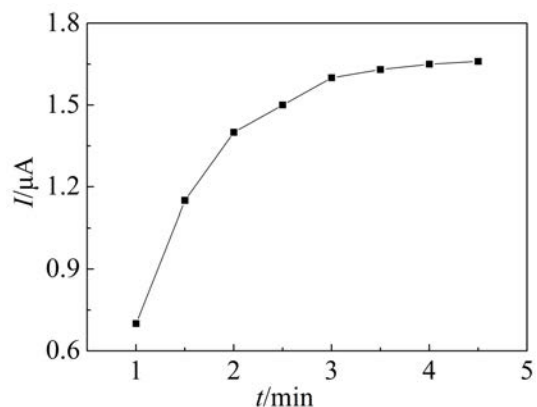


图 5 响应时间对  $\text{H}_2\text{O}_2$  催化电流的影响 (DPV 条件同图 2)

Fig. 5 Effect of response time on the catalytic current of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (The DPV conditions were the same as in Fig. 2.)

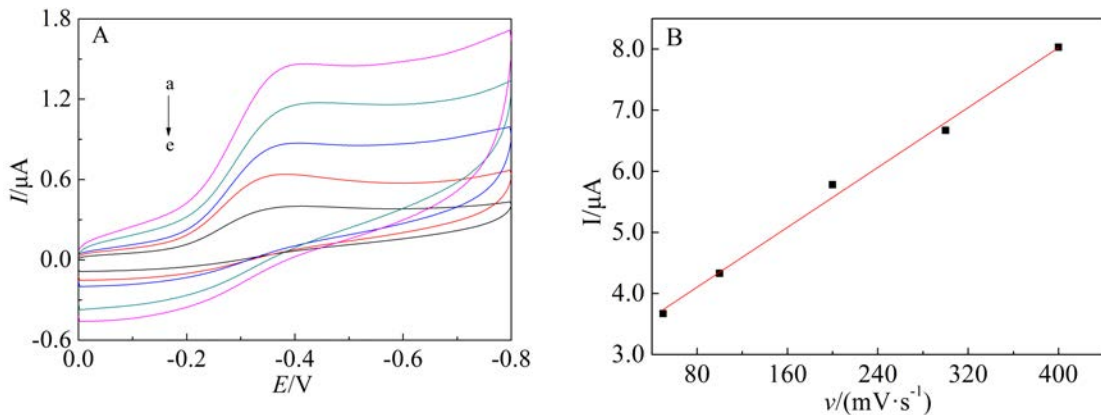


图 6 不同扫描速率的 CV 图(A)及其扫描速率与电流的线性曲线(B).扫描速率分别为 50、100、200、300、400  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; CV 测试条件:扫描范围: -0.8 V ~ 0.0 V,  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2$ ,  $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{PBS}(\text{pH}\ 6.0)$  缓冲溶液

Fig. 6 CV curves at different scan rates (A) and the linear relationship between peak current and scan rate (B). Scan rates (a-e): 50, 100, 200, 300, 400  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . The CV conditions:  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2$ , scan range: from 0 V to -0.8 V, buffer solution:  $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{PBS}(\text{pH}\ 6.0)$ .

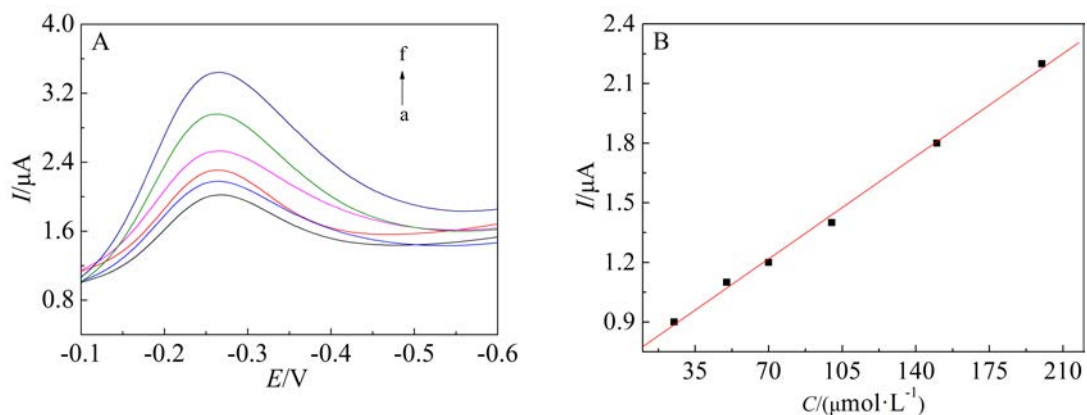


图 7 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  在 Hb/MMIPs NPs/MGCE 电极上的 DPV 图,  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度分别为(a-f): 25、50、75、100、150、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (A) 及 Hb/MMIPs NPs/MGCE 电极上响应电流与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度线性曲线(B); DPV 测试条件同图 2

Fig. 7 DPVs of the Hb/MMIPs NPs/MGCE in different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Concentrations of Hb (a-f): 25, 50, 75, 100, 150, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (A), the calibration curve of response current on Hb/MMIPs NPs/MGCE vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration (B). The DPV conditions were the same as in Fig. 2.

曲线,其线性方程为  $I_p(\mu\text{A}) = 0.013\nu(\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}) + 3.12$ ,  $R=0.997$ ,表明电极表面电化学反应受吸附控制<sup>[21]</sup>.

## 2.7 线性范围

在氮气氛围下向缓冲溶液中注射不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,充分震荡,静置等待 3 min 测定其响应峰电流.如图 7 所示,响应电流随  $\text{H}_2\text{O}_2$  加入量的增加而增加,且响应电流与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度在 25 ~ 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内呈线性关系,线性方程为  $I_p(\mu\text{A}) = 0.00737 C(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) + 0.702$ ,线性相关系数  $R=0.998$ ,检出限为 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $S/N=3$ ).表 2 将 Hb/MMIPs NPs/MGCE 修饰电极对  $\text{H}_2\text{O}_2$  测定的分析性能和文

献报道的部分过氧化氢生物传感器进行了比较,外加磁场的加入使得该类酶传感器的灵敏度得到明显提高.

## 2.8 稳定性和重现性

在  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,用 3 支 Hb/MMIPs NPs/MGCE 电极在相同的最优条件下进行电化学测试,电化学响应电流的相对标准偏差为 1.8%,说明用 Hb/MMIPs NPs 修饰的电极具有良好的重现性.将该电极放在 PBS (pH 6.0) 中在 4  $^{\circ}\text{C}$  的条件下保存 7 d 后,按照相同的方法进行 DPV 扫描,结果发现  $\text{H}_2\text{O}_2$  的还原峰电流只比初始

表 2 不同的 Hb 修饰电极对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 测定的性能比较Tab. 2 Comparison in the properties of different Hb modified electrodes for detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Hb modified electrode	Linear range/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Detection limit/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Reference
Hb/polyaniline/multiwall carbon nanotubes/starch/CPE	100 ~ 5000	32	[22]
Hb/sodiumalginate MWCNTs/GCE	40 ~ 200	16.41	[23]
Hb/ triacetone triperoxide/CPE	19.58 ~ 117.45	5.53	[24]
Hb/Au-zirconium phosphate nanocomposite/ GCE	15 ~ 480	7.4	[25]
Hb/MMIPs NPs/MGCE	25 ~ 200	3	This work

电流降低了 3.6%,说明用 Hb/MMIPsNPs 修饰的电极具有较好的稳定性.

### 3 结 论

本文利用细乳液法和分子印迹技术合成了 MMIPs NPs,在玻碳电极表面用 CS 来固定 MMIPs NPs,MMIPs NPs 再吸附 Hb, 制备得到了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生物传感器. MMIPs NPs 具有明显的核壳结构,形貌规整,生物相容性良好,且较好地固定了 Hb 并保持了 Hb 的催化活性.由于使用的磁性印迹纳米粒子和加磁电极可以使 Hb 活性中心裸露,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解产生的 O<sub>2</sub> 以及 Hb 都具有顺磁性,使得该传感器对催化还原 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有增敏的效果.其操作简单,快速,重现性较好,可以实现对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的测定.

### 参考文献(References):

- [1] Lin V S, Lippert A R, Chang C J. Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent H<sub>2</sub>S production[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(18): 7131-7135.
- [2] Miller E W, Chang C J. Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2007, 11(6): 620-625.
- [3] Tian Y C, Fan M, Qin Z X, et al. Hydrogen peroxide positively regulates brassinosteroid signaling through oxidation of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 transcription factor[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1063.
- [4] Wu P(吴萍), Cai C X(蔡称心). Horseradish peroxidase-attapulgite clay nanocomposites: Fabrication and application to sensing the extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released from cells [J]. Journal of Electrochemistry(电化学), 2014, 20(3): 260-265.
- [5] Liu H Y, Weng L Y, Yang C. A review on nanomaterial-based electrochemical sensors for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S and NO inside cells or released by cells[J]. Microchimica Acta, 2017, 184(5): 1267-1283.
- [6] Yagati A K, Choi J. Protein based electrochemical biosensors for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection towards clinical diagnostics[J]. Electroanalysis, 2014, 26(6): 1259-1276.
- [7] Zhang S Y(张思宇), Wang H J(王会娟), Li S F(李书芳), et al. Carbon composite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles based electrochemical sensor for hydrogen peroxide detection[J]. Journal of Electrochemistry(电化学), 2018, 24(3): 279-284.
- [8] Zhang Q(张倩), Fu S Y(付时雨), Li H L(李海龙), et al. A rapid method for the determination of hydrogen peroxide concentration[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2104, 34(3): 767-770.
- [9] Raja S, Ramesh V, Thivaharan V. Green biosynthesis of silver nanoparticles using Calliandra haematocephala, leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2017, 10(2): 253-261.
- [10] Ding J, Zhong Q, Zhang S L, et al. Simultaneous removal of NO<sub>x</sub> and SO<sub>2</sub> from coal-fired flue gas by catalytic oxidation-removal process with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 243(5): 176-182.
- [11] Motaghd R M, Ge L, Jiang H, et al. A facile photoelectrochemical sensor for high sensitive ROS and AA detection based on graphitic carbon nitride nanosheets[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 107: 54-61.
- [12] Qu P(瞿鹏), Li B X(李保新), Zhang Z J(章竹君). Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for hydrogen peroxide determination in water samples[J]. Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(10): 1240-1243.
- [13] Jo E J, Mun H, Kim S J, et al. Detection of ochratoxin A

- (OTA) in coffee using chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) aptasensor[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 1102-1107.
- [14] Zangheri M, Cevenini L, Anfossi L, et al. A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 64: 63-68.
- [15] Zhang L S, Wong G T F. Optimal conditions and sample storage for the determination of  $H_2O_2$  in marine waters by the scopoletin-horseradish peroxidase fluorometric method[J]. *Talanta*, 1999, 48(5): 1031-1038.
- [16] Zhang C, Wang X R, Hou M, et al. Immobilization on metal-organic framework engenders high sensitivity for enzymatic electrochemical detection[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(16): 13831-13836.
- [17] Li L M, Du Z F, Liu S A, et al. A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on  $MnO_2$ /graphene oxide nanocomposite[J]. *Talanta*, 2010, 82(5): 1637-1641.
- [18] He Y P, Sheng Q L, Zheng J B, et al. Magnetite-graphene for the direct electrochemistry of hemoglobin and its biosensing application[J]. *Electrochimica Acta*, 2011, 56(5): 2471-2476.
- [19] Sun B H, Ni X J, Cao Y H, et al. Electrochemical sensor based on magnetic molecularly imprinted nanoparticles modified magnetic electrode for determination of Hb[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 91: 354-358.
- [20] Nagababu E, Rifkind J M. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(40): 12503-12511.
- [21] Sun J Y, Huang K J, Zhao S F, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on chitosan-room temperature ionic liquid- $TiO_2$ -graphene nanocomposite film modified electrode[J]. *Bioelectrochemistry*, 2011, 82(2): 125-130.
- [22] Gautam V, Singh K P, Yadav V L. Polyaniline/multiwall carbon nanotubes/starch nanocomposite material and hemoglobin modified carbon paste electrode for hydrogen peroxide and glucose biosensing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 1124-1132.
- [23] Zhao H Y, Zheng W, Meng Z X, et al. Bioelectrochemistry of hemoglobin immobilized on a sodium alginate-multiwall carbon nanotubes composite film[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24(8): 2352-2357.
- [24] Jian F F, Qiao Y B, Zhuang R R. Direct electrochemistry of hemoglobin in TATP film: Application in biological sensor[J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2007, 124(2): 413-420.
- [25] Feng J J, Xu J J, Chen H Y. Synergistic effect of zirconium phosphate and Au nanoparticles on direct electron transfer of hemoglobin on glassy carbon electrode[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005, 585(1): 44-50.

## Electrochemical Sensor Based on Magnetic Electrode Modified with Magnetic Molecularly Imprinted Nanoparticles Immobilized Hemoglobin for Determination of Hydrogen Peroxide

YUAN Yang, WANG Jia-xin, CAO Yu-hua\*

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China.)

**Abstract:** In this work, the surface-imprinted technique was used to prepare magnetic hemoglobin (Hb) imprinted nanoparticles, using  $Fe_3O_4@SiO_2$  NPs as the carrier, Hb as the template molecule, and tetraethyl orthosilicate (TEOS) as the imprinted polymer monomer. The nanoparticles had a core-shell structure, with magnetic  $Fe_3O_4$  NPs as the core and Hb imprinted polymers as the shell. Therefore, Hb could be concentrated and fixed on the surface of the magnetic imprinted nanoparticles (MMIPs NPs). Furthermore, MMIPs NPs were immobilized with chitosan (CS) on the surface of a magnetic electrode to constitute Hb enzyme-like biosensor to catalyze the reduction of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Compared with magnetic non-imprinted polymer nanoparticles (MNIPs NPs), the MMIPs NPs biosensor enhanced the response by 14.3%. Notably, an introduction of a magnetic field made the biosensor more sensitive owing to the paramagnetism of MNIPs NPs, Hb and  $O_2$  molecules. The reduction current of  $H_2O_2$  on Hb/MMIPs NPs modified magnetic glassy carbon electrode increased by 60.0%. Under the optimum condition, the linear detection range of  $H_2O_2$  was 25 ~ 200  $\mu mol \cdot L^{-1}$  with the detection limit of 3  $\mu mol \cdot L^{-1}$  ( $S/N = 3$ ), which showed that Hb enzyme-like biosensor had a good catalytic performance for  $H_2O_2$ .

**Key words:** hemoglobin; enzyme-like biosensor; hydrogen peroxide; magnetic imprinted nanoparticles; magnetic electrode