

# 基于金钯纳米合金修饰的过氧化氢传感器的研制

朱伟明<sup>1</sup>, 梁新义<sup>1,2,\*</sup>, 庞广昌<sup>1</sup>, 康晓斌<sup>1</sup>, 崔 兰<sup>3</sup>

(1.天津商业大学 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134;

2.天津商业大学理学院, 天津 300134; 3.天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072)

**摘 要:** 研制金钯合金纳米粒子修饰的特异性定量检测食品中过氧化氢残留量的过氧化氢传感器。以比表面积大、生物相容性好、具有优良电催化性能的金钯合金纳米粒子固定辣根过氧化物酶于玻碳电极, 制得过氧化氢传感器电极。通过循环伏安法及交流阻抗法表征电极在组装过程中的电化学特性, 利用计时电流法对传感器性能进行考察。研究表明: 该传感器测定  $\text{H}_2\text{O}_2$  的线性范围为  $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ , 检测限为  $8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ , 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  具有较好的催化还原活性和良好的检出性能。该传感器制作简单、成本低廉、可重复性强, 可用于快速定量检测食品中过氧化氢残留量。

**关键词:** 过氧化氢传感器; 金钯合金纳米粒子; 玻碳电极; 计时电流法

## Development of Hydrogen Peroxide Sensor Modified by Gold-Palladium Nano-Alloys

ZHU Wei-ming<sup>1</sup>, LIANG Xin-yi<sup>1,2,\*</sup>, PANG Guang-chang<sup>1</sup>, KANG Xiao-bin<sup>1</sup>, CUI Lan<sup>3</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2. School of Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

3. School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** A new type of biosensor for detecting hydrogen peroxide in food residues was developed through modification of gold-palladium nano-alloys on the glassy carbon electrode. Due to large surface area, good biocompatibility and excellent catalytic properties of nano particles, the gold-palladium nano-alloy was used to immobilize horseradish peroxidase (HRP) on glassy carbon electrode. The electrochemical properties of electrode surface during each fabrication procedure were characterized by cyclic voltammetry and AC impedance method and the sensor performance of this sensor was evaluated by chronoamperometry. The results revealed that the hydrogen peroxide sensor had a good linear relationship in the range of  $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  for  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the limit of detection was  $8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ . It had better catalytic activity and good detection performance for detecting hydrogen peroxide. Moreover, this hydrogen peroxide sensor proved inexpensive, easy to use and strong repeatability, thus it is applicable for the hydrogen peroxide in food residues.

**Key words:** hydrogen peroxide sensor; gold-palladium nano-alloys; chronoamperometry; AC impedance

中图分类号: TS207.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2012)10-0311-04

过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )具有高效杀菌、氧化漂白作用和易分解、低残留的特点, 很多食品生产企业超量或非法添加过氧化氢, 用来杀灭食品、包装材料及设备容器中的微生物和增加食品的色悦感<sup>[1-2]</sup>。我国食品卫生法规

定食品及保健品中不得有过氧化氢残留。随着社会的进步和生活水平的提高, 关于过氧化氢的残留危害日渐引起人们的关注, 研究表明, 过氧化氢进入人体后直接刺激黏膜组织, 并且通过化学反应导致人体细胞癌变,

收稿日期: 2012-01-19

基金项目: 天津市自然科学基金项目(06YFJMJC12600); 天津市自然科学基金重点项目(10JCZDJC23600);

教育部留学回国人员科研启动基金项目(20071108); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD04A00)

作者简介: 朱伟明(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与贮藏。E-mail: mmc-2000@163.com

\* 通信作者: 梁新义(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为纳米材料的合成、组装及其在催化和食品痕量物质检测中的应用。E-mail: lxyi@tjcu.edu.cn

加速人体的衰老或诱发心血管疾病等<sup>[3-4]</sup>。同时由于传统的过氧化氢检测方法复杂且耗时较长,因此传感器技术用于 $\text{H}_2\text{O}_2$ 检测以其快速、高灵敏度和高选择性引起了学术界的广泛关注<sup>[5-6]</sup>。

纳米金由于其具有大比表面积、独特的“吸电子效应”以及良好的生物相容性而被广泛用于固定辣根过氧化物酶进行 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的检测和催化反应研究<sup>[7-8]</sup>,但其成本高,催化活性较低;而纳米Pd以其廉价和良好的催化性能被用于甲醇、乙醇和甲酸的氧化<sup>[9-10]</sup>及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的还原<sup>[11-12]</sup>等。在研究金钯合金纳米粒子的合成及催化性质的国内外报道中,所合成的金钯合金纳米粒子大多是以负载形式存在的,合成方法与成本都较高,如Xu等<sup>[13]</sup>以金属无机盐为前体,加入一定量的碳粉,在水溶液中超声1h制备得 $\text{Pd}_3\text{Au/C}$ 、 $\text{Pd}_7\text{Au/C}$ 、 $\text{PdAu/C}$ 纳米粒子,Tian等<sup>[14]</sup>将制备好的 $\text{TiO}_2$ 纳米管与金属无机盐前体混合均匀后经紫外照射30min后得到 $\text{TiO}_2$ 纳米管负载的AuPd纳米材料。负载材料的优劣控制着AuPd纳米合金粒子的活性大小,而负载后的AuPd纳米合金粒子颗粒尺寸与形貌难以控制,粒子本身结构与特性难于测试,表现不出纳米系统的优异性能。本实验将合成无任何负载的金钯合金纳米粒子,方法简单而具有独创性,所合成粒子性质稳定、催化活性高,利用它吸附辣根过氧化物酶制备的过氧化氢电极选择性高,成本低廉,可重复性强,用于制备第3代无媒介过氧化氢生物传感器,快速定量检测食品中过氧化氢残留量。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

辣根过氧化物酶(HRP,冰冻保存)、氯金酸( $\text{HAuClO}_4$ ,分析纯)、1-金刚烷甲酸(分析纯) 美国Sigma试剂公司;氯化钯( $\text{PdCl}_2$ ) 天津金海华兴科技发展有限公司; $N,N$ -二甲基甲酰胺(分析纯) 比利时Acros试剂公司;油酸、硼氢化钾(均为分析纯) 天津化学试剂一厂; $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液(体积分数30%) 天津市凯通化学试剂有限公司。实验所用溶液均用0.01mol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS)(pH7.2~7.4)配制,蒸馏水为MilliQ电导水。

Rigaku D/max2500VB+/PC型X-射线粉末衍射仪(XRD)(铜靶,扫描范围为 $20^\circ \sim 90^\circ$ ,扫描速率 $8^\circ/\text{min}$ ) 日本Rigaku公司;TV9761/55MEEDS X射线能谱仪(TEM)、Tecnai G2 F20型场发射透射电子显微镜(HRTEM) 荷兰飞利浦公司;HI670电化学工作站[工作电极为玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)( $\phi = 3\text{mm}$ ),饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极] 上海辰华仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Au-Pd合金纳米粒子的合成及表征

在室温下,取5mL  $N,N$ -二甲基甲酰胺加入圆底烧瓶中,然后分别加入125 $\mu\text{L}$ 的0.162mol/L  $\text{HAuCl}_4$ 溶液,125 $\mu\text{L}$ 的0.162mol/L  $\text{PdCl}_2$ 溶液,磁力搅拌,待溶液澄清透明后,加入1-金刚烷甲酸约0.1600g,搅拌至完全溶解;加入250 $\mu\text{L}$ 油酸,超声1min。在磁力搅拌下将50 $\mu\text{L}$ 硼氢化钾溶液按每毫升水0.1800g的比例缓慢滴加到溶液中,恒速搅拌1h后停止,即得棕黑色Au-Pd纳米颗粒悬浮液。

合成的Au-Pd样品经无水乙醇(4000r/min离心5min)两次洗涤, $N,N$ -二甲基甲酰胺分散溶解后,滴加在超薄碳膜上,自然晾干后以TEM进行高分辨观测及EDS分析;将经无水乙醇离心洗涤的Au-Pd样品在玻片上涂膜,自然干燥后进行XRD测试,扫描范围 $20^\circ \sim 90^\circ$ 。

#### 1.2.2 过氧化氢传感器的制备

将玻碳电极(GC,  $\phi = 3\text{mm}$ )依次在载有1.0、0.3、0.05 $\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$ 颗粒的绒毛垫上抛光处理后,用二次蒸馏水冲洗干净,分别在无水乙醇及超纯水中超声处理各1min,自然晾干后备用。

将合成的Au-Pd样品经乙醇(4000r/min离心5min)两次洗涤后再分散于乙醇中,配制成质量浓度5mg/mL的Au-Pd乙醇溶液,滴加100 $\mu\text{L}$ 于玻碳电极表面,使其均匀铺展,自然晾干后即得Au-Pd/GC电极。

将冻干干燥的HRP配制成质量浓度为50mg/mL(50mg过氧化氢酶溶于1mL超纯水中)的酶溶液,于冰箱中存放( $4^\circ\text{C}$ ),滴加15 $\mu\text{L}$ 酶溶液至Au-Pd/GC电极表面,使其均匀铺展,在冰箱内( $4^\circ\text{C}$ )自然晾干后即得HRP/Au-Pd/GC电极。

#### 1.2.3 过氧化氢传感器的测定

采用三电极系统,以不同修饰阶段的玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极,以0.01mol/L的pH7.2~7.4的PBS缓冲液为测试底液,先进行循环伏安测试,进一步用交流阻抗法( $10^{-2} \sim 10^6\text{Hz}$ )表征电极在自组装过程中的电化学特性。

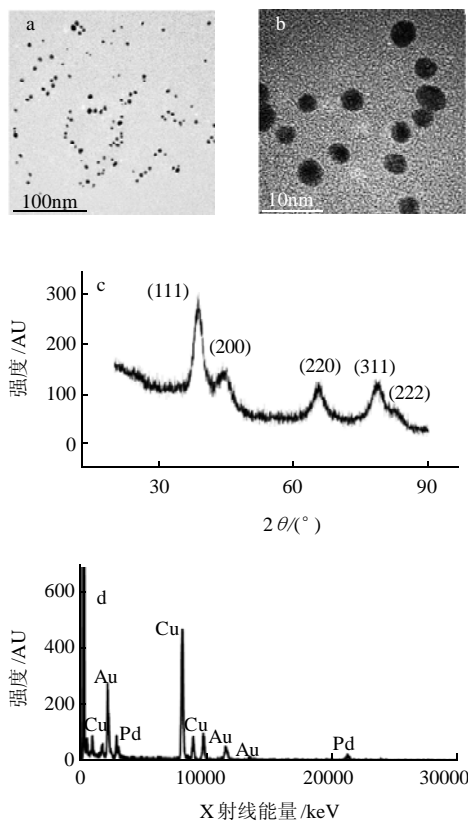
采用计时电流法对传感器性能进行测定,实验在PBS缓冲液中进行,计时电流法测定时,工作电位为0.5V。所有电化学测定实验均在 $25^\circ\text{C}$ 条件下进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 Au-Pd粒子的形貌表征

图1a表明合成的Au-Pd纳米粒子为球形,颗粒大小均匀,粒径分布窄;图1b表明该粒子平均粒径为 $(4.5 \pm 0.5)\text{nm}$ ,表面缺陷较多;图1c表明,衍射峰的 $2\theta$ 角分别为 $38.82^\circ$ 、 $45.16^\circ$ 、 $65.62^\circ$ 、 $78.66^\circ$ 和 $82.08^\circ$ ,分别对应面心立方结构的(111)、(200)、(220)、(311)族和

(222)族,与 Au 的衍射峰(PDF#65-2870)相比, Au-Pd 合金纳米粒子各晶面的  $2\theta$  角均略有增大,说明由原子半径较小的 Pd 随机取代晶格中的 Au 使得晶面间距减小;由 EDS 测试结果(图 1d)表明粒子中原子含量比 Au: Pd 为 71:29。由形貌表征结果显示了本实验合成的金钯合金纳米粒子结构稳定,表面缺陷多,具有较高的催化活性,可用于制备过氧化氢传感器电极。

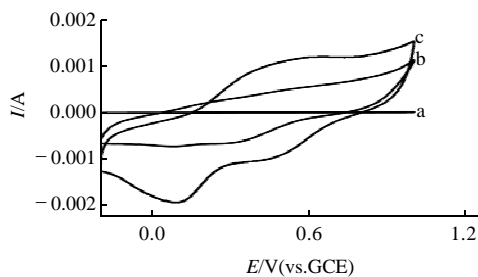


a. TEM 图; b. HRTEM 图; c. XRD 图谱; d. EDS 图谱。

图 1 合成的金钯合金纳米粒子的形貌表征  
Fig.1 Spectra of Au-Pd nano-alloy

## 2.2 电极自组装过程中的电化学特性

### 2.2.1 循环伏安表征



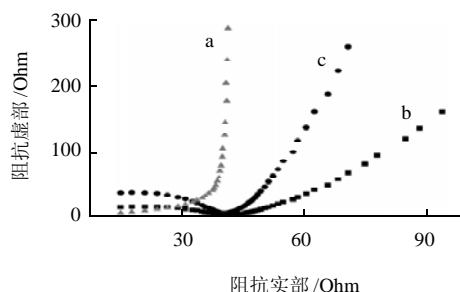
a. GCE; b. Au-Pd/GCE; c. HRP/Au-Pd/GCE。

图 2 玻碳电极不同修饰阶段的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of glassy carbon electrode at different stages of modification

电极每次修饰后,在 7mL  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 PBS 溶液中,以 1.0~ -0.2V 的电位范围, 0.05V/s 的扫描速度进行循环伏安测定,所得循环伏安曲线如图 2 所示。由图可见:未修饰的玻碳电极扫描时接近直线,表明电极表面已处理光滑洁净;当以 Au-Pd 修饰电极后,扫描电流强度明显增加,表明 Au-Pd 已经固定在了玻碳电极表面并发挥了 Au-Pd 合金纳米材料良好的传递电子的作用;纳米电极吸附 HRP 后,扫描曲线在 0.4V 左右出现氧化峰,并且电流强度增大 2 倍,表明 HRP 已经吸附在了纳米粒子表面并发挥了催化氧化作用。

### 2.2.2 交流阻抗表征



a. GC 电极; b. AuPd/GC 电极; c. HRP/AuPd/GC 电极。

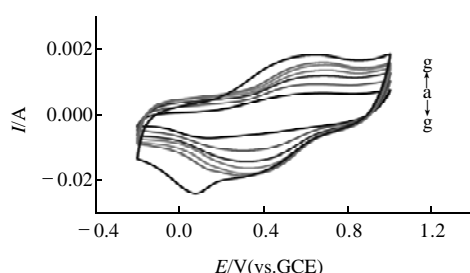
图 3 玻碳电极不同修饰阶段的交流阻抗图

Fig.3 AC impedance plots of glassy carbon electrode at different stages of modification

应用交流阻抗技术表征了电极组装过程。如图 3a 所示,玻碳电极交流阻抗谱在  $40\Omega$  处为一垂直于横轴的直线,表明玻碳电极表面没有发生电化学反应,电荷传递仅受扩散控制;当玻碳电极表面组装纳米 Au-Pd 后(图 3b),高频区出现小的圆弧且直线部分与横轴夹角约为  $4^\circ$ ,说明  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  在电极表面发生氧化还原反应,且电极过程为电化学和扩散联合控制过程<sup>[15]</sup>;当纳米 AuPd 修饰的玻碳电极表面吸附辣根过氧化物酶后交流阻抗曲线在高频区的半圆弧半径明显增大且直线部分与横轴的夹角增大,如图 3c 所示,表明 HRP/Au-Pd/GCE 电极表面电化学反应阻抗增加,电荷扩散阻抗增加,且电极过程同样是电化学和扩散联合控制过程。交流阻抗表征结果同时证明了 HRP/Au-Pd/GC 电极的组装方法是可行的。

### 2.3 过氧化氢传感器性能的测定

图 4 表明,在电压为 1.0V 时电流响应值达到最大,在实验范围内随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加而增加,线性范围为  $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-3}$  mol/L。



a~g.表示在0.01mol/L PBS(pH7.2)中含 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度分别为 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-3}$  mol/L。扫描速率为50 mV/s。

图4 金钯合金纳米粒子修饰的辣根过氧化物酶玻碳电极在不同浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 缓冲液(0.01mol/L PBS, pH7.2)中的循环伏安曲线

Fig.4 CV curves of HRP/Au-Pd/GCE detected in different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$

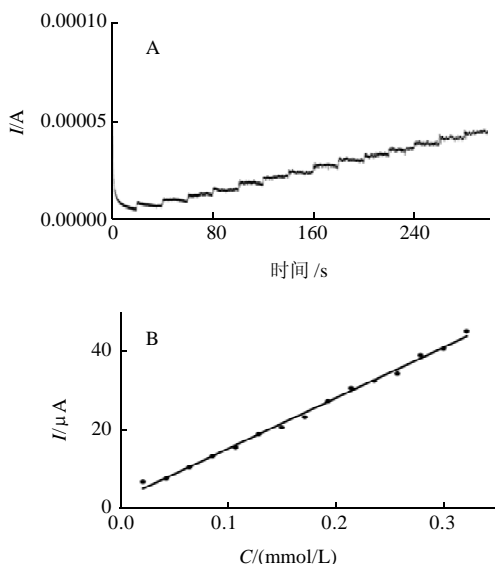


图5 HRP/Au-Pd/GCE检测 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的计时电流响应曲线(A)和线性关系(B)

Fig.5 Electric current response curve (A) and linear curve (B) of HRP/Au-Pd/GCE

在工作电位为0.5V、电磁搅拌条件下向7mL的PBS缓冲溶液中每隔20s注入 $10 \mu\text{L}$   $5 \times 10^{-3}$  mol/L的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液,由图5A可知,响应电流随 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度成阶梯状增加,达到稳态电流时所需时间低于10s。图5B表明,在线性范围内,响应电流与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度呈线性关系( $R^2 = 0.9952$ ),线性回归方程为 $y = 2.7735x + 2.2131$ ,检出限为 $8.0 \times 10^{-7}$  mol/L(检测限公式为 $DL = 3S_b/k$ ,其中 $S_b$ 为标准偏差, $k$ 为斜率, $R_{SN} = 3$ )。表明金钯合金纳米粒子修饰酶生物传感器对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 有良好的检出性能。

#### 2.4 过氧化氢传感器性能的稳定性与重现性

应用循环伏安法,以响应电流值评价HRP/Au-Pd/GCE修饰电极的重现性和稳定性。以HRP/Au-Pd/GCE修饰电极重复15次在浓度为0.005mol/L的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 中测定循环伏安曲线,结果表明,重复15次时与第1次测试相比

其响应电流仅降低了5%,室温放置15d,在放置期间歇性使用,其响应信号稍有变化,但变化量没有超过1%,说明经较长时间放置后该电极的微结构基本没有变化,酶活力得以保持,具有较好的稳定性。同时制备3支电极,分别在 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度为0.005mol/L的溶液中进行测定,3支电极其响应电流的相对标准偏差小于3%,说明该过氧化氢生物传感器具有良好的重现性。HRP/Au-Pd/GCE过氧化氢生物传感器良好的稳定性与重现性表明,合成的AuPd纳米粒子对辣根过氧化物酶有很好的固定作用和保持酶生物活性的作用。

### 3 结论

以金钯合金纳米粒子修饰辣根过氧化物酶制备的过氧化氢传感器具有灵敏度高、检测限低、可重复性好的特点,该传感器制备方法简单,成本低廉,为食品中过氧化氢含量的快速测定提供了新的方法和思路。

#### 参考文献:

- [1] 杜延兵, 裴爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 250-252.
- [2] 范冬梅, 王莉. 分光光度法测定牛百叶中过氧化氢的含量[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2008, 31(1): 89-91.
- [3] GB 2760—1996 食品添加剂使用卫生标准[S].
- [4] 周健洪, 黎晖, 宋述财, 等. 过氧化氢对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响[J]. 广东医学, 2005, 26(9): 1199-1200.
- [5] 王瑞斌. 过氧化氢含量准确测定方法的研究[J]. 化学工程师, 2005, 12(12): 62-64.
- [6] XU Xuan, JIANG Shujuan, HU Zheng. Nitrogen-doped carbon nanotubes: High electrocatalytic activity toward the oxidation of hydrogen peroxide and its application for biosensing[J]. ACS Nano, 2010, 4(7): 4292-4298.
- [7] XU Shiyi, PENG Bo, HAN Xiaozu. A third-generation  $\text{H}_2\text{O}_2$  biosensor based on horseradish peroxidase-labeled Au nanoparticles self-assembled to hollow porous polymeric nanospheres[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(8): 1807-1810.
- [8] YANG Weiwei, LI Yancui, BAI Yu, et al. Hydrogen peroxide biosensor based on myoglobin/colloidal gold nanoparticles immobilized on glassy carbon electrode by a Nafion film[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 115(1): 42-48.
- [9] PAN Wei, ZHANG Xiaokai, MA Houyi. Electrochemical synthesis, voltammetric behavior, and electrocatalytic activity of Pd nanoparticles [J]. Phys Chem C, 2008, 112(22): 2456-2461.
- [10] PANDEY R K, LAKSHMINARAYANAN V. Electro-oxidation of formic acid, methanol, and ethanol on electrodeposited Pd-polyaniline nanofiber films in acidic and alkaline medium[J]. Phys Chem C, 2009, 113(52): 21596-21603.
- [11] 孙丽美, 曹殿学, 王贵领. 纳米Pd上 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的电催化还原反应[J]. 物理化学学报, 2008, 24(2): 323-327.
- [12] 康园园, 于浩, 齐广才. 纳米钯修饰电极在碱性条件下对过氧化氢的测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(5): 484-487.
- [13] XU J B, ZHAO T S, SHEN S Y, et al. Stabilization of the palladium electrocatalyst with alloyed gold for ethanol oxidation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(13): 6490-6500.
- [14] TIAN Min, MONIKA M, CHEN Shuai. Synthesis and electrochemical study of  $\text{TiO}_2$ -supported PdAu nanoparticles[J]. Electrochemistry Communications, 2011, 13(4): 370-373.
- [15] 魏旭, 郝青丽, 陆路德. 巯基修饰单链DNA在纳米金薄膜电极上自组装、杂交和取向的电化学交流阻抗谱[J]. 应用化学, 2010, 27(8): 971-977.