



论文

二氧化铈纳米微粒过氧化物酶活性及其在葡萄糖检测中的应用

石文兵^{①②}, 刘希东^③, 张小丹^①, 黄玉明^{①*}^① 发光与实时分析教育部重点实验室; 西南大学化学化工学院, 重庆 400715^② 无机特种功能材料重庆市重点实验室; 长江师范学院化学化工学院, 重庆 408100^③ 重庆文理学院材料与化工学院, 重庆 402160

*通讯作者, E-mail: yuminghuang2000@yahoo.com

收稿日期: 2013-11-20; 接受日期: 2013-12-10; 网络版发表日期: 2014-02-14

doi: 10.1360/N032013-00060

摘要 合成了一种稳定和水溶性的聚丙烯酸修饰 CeO₂ NPs, 利用动态光散射(DLS)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)和 X 射线光电子能谱(XPS)进行表征. 结果表明, CeO₂ NPs 能够催化 H₂O₂ 氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)发生显色反应, 表现出过氧化物模拟酶催化活性. 利用 Raman 和顺磁共振(EPR)光谱技术研究了其催化机理. 基于 CeO₂ NPs 催化 TMB 变色反应对 H₂O₂ 浓度的依赖性和葡萄糖氧化酶能够催化溶解氧氧化葡萄糖产生 H₂O₂ 的原理, 构建了一种简单、灵敏、选择性高的测定血清中葡萄糖的检测方法. 在优化条件下, 测定葡萄糖的线性范围为 0.5~10 mmol/L, 检出限(3 σ)为 0.1 mmol/L. 对 1.0 mmol/L 葡萄糖进行 11 次平行测定, 其相对标准偏差为 2.4%. 该方法已成功用于血清样品中葡萄糖的测定.

关键词

模拟酶

二氧化铈纳米微粒

过氧化物模拟酶

葡萄糖

1 引言

葡萄糖是糖尿病诊断的一项重要生化指标^[1]. 糖尿病是由于血液中的葡萄糖不能得到有效利用, 从而在血液中积累并导致一些并发症, 如失明、肾脏病、心脏病及神经损伤等. 迄今尚无治愈糖尿病的有效方法. 因此, 准确检测血液中葡萄糖含量对于糖尿病的治疗和控制非常必要. 目前, 各种方法如酶法^[2~4]、比色法^[5, 6]和色谱法^[7, 8]等已广泛用于葡萄糖测定. 在这些方法中, 由于选择性好, 酶法已得到更广泛应用. 然而, 天然酶不稳定, 而且价格昂贵、制备复杂.

近年来, 纳米材料模拟酶的研究已引起了广泛关注. 文献已报道了不同的纳米材料模拟酶, 如纳米

Fe₃O₄^[9]、V₂O₅ 纳米线^[10]、多孔铂碳纳米管^[11]、纳米 Co₃O₄^[12]、单壁碳纳米管^[13]、氧化石墨烯^[14]、碳点^[15]、TiO₂ 纳米管阵列^[16]、Fe-Co 双金属合金纳米微粒^[17]和铁氧体纳米微粒^[18]等. 有趣的是, 一些纳米微粒具有多种模拟酶特性, 例如, 铁铂纳米微粒同时具有过氧化氢模拟酶和过氧化物模拟酶活性^[19]; Au@Pt 纳米结构同时具有氧化物模拟酶、过氧化物模拟酶和过氧化氢模拟酶活性^[20]; 在金纳米棒上合成的 AuPt 纳米合金既有氧化物模拟酶活性, 又有亚铁氧化模拟酶活性^[21].

作为一种多功能材料, 二氧化铈纳米粒子(CeO₂ NPs)受到了广泛关注. 其已在燃料电池、气体传感器、化学机械抛光、辐射防护、自由基清除、激光诱导视网膜保护、减轻脊髓损伤、抗氧化和预防心血管

疾病等方面得到应用^[22-28]。CeO₂ 纳米粒子具有超氧化物歧化模拟酶^[29, 30]、氧化物模拟酶^[31]和过氧化氢模拟酶特性^[32]。但鲜见其在生化分析中的应用, 而且 CeO₂ 纳米粒子作为过氧化物模拟酶的催化机理尚需进一步研究。另外, 尽管目前已有不同纳米材料过氧化物模拟酶的报道, 但能够用于临床样品中葡萄糖测定的却不多^[16, 17]。为此, 本文合成了聚丙烯酸(PAA)修饰的 CeO₂ NPs, 探讨了其过氧化物模拟酶特性, 并利用顺磁共振技术和拉曼光谱技术探讨了其催化机理。结果表明, CeO₂ NPs 具有过氧化物模拟酶催化活性, 能够快速催化 H₂O₂ 氧化 TMB 显色, 基于此, 构建了一种简单、廉价和选择性高的比色分析新方法以测定血样中的葡萄糖。相关结果将为拓宽纳米材料模拟酶在生化分析中的应用奠定基础。

2 实验部分

2.1 试剂

所有化学品均为分析纯, 水为去离子水。3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、辣根过氧化物酶(HRP, EC1.11.1.17, 300 U/mg)、葡萄糖氧化酶(GOD, EC 1.1.3.4.47, 200 U/mg)和 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)购自 Sigma 公司, 保存于冰箱中(4℃)备用; 硝酸铈(III)、PAA、氨水(30%)、H₂O₂ (30%)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸、葡萄糖、果糖、乳糖和麦芽糖等均购自国药集团化学试剂有限公司(上海, 中国); 超滤管(截留分子量为 30 和 5 kDa)购自 Millipore 公司(Billerica, MA01821, 美国); 透析袋(截留分子量为 8000~14000 Da)购自上海绿鸟科技发展有限公司(上海, 中国); 血样来自重庆市某医院。

2.2 仪器

UV-2450 型 UV-Vis 分光光度计(岛津, 日本); TPS-7000 型 ICP 单道扫描原子发射光谱仪(北京谱析通用仪器有限责任公司, 北京, 中国); Zetasizer Nano ZS90 型电位仪(Malvern, 英国); XSAM-800 型 X 射线光电子能谱仪(KRATOS, 英国); 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 170SX, Madison, WI, 美国); 电子顺磁共振(EPR)光谱仪器(ESP300E, Bruker, 德国); 拉曼光谱仪(RFS100/S, Bruker, 德国); TGL-20M 高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司, 长沙, 中国)。

2.3 实验方法

2.3.1 CeO₂ NPs 的合成及表征

CeO₂ NPs 的制备按文献方法进行^[31], 具体步骤为: 将 5 mL Ce³⁺ (1.0 mol/L)与 10 mL PAA (0.05 mol/L)混合后, 在搅拌条件下逐滴加入到 30 mL 浓氨水(30%)中, 继续搅拌 24 h。将所得溶液于 4000 r/min 离心 30 min 后, 上层清液用截留分子量为 30 kDa 的超滤管进行超滤, 再用透析袋透析 2 d 即得 CeO₂ NPs, 其浓度用铈元素含量(ICP 单道扫描原子发射光谱仪测定)表示为 2.6 mg/mL。CeO₂ NPs 的 ζ 电位用 Zeta 电位仪测定。其水合粒径用动态光散射技术(DLS)测定, 元素价态组成用 X 射线光电子能谱(XPS)技术分析, 其表面基团用红外光谱法测定。

2.3.2 顺磁共振测定

室温下, 在 1 mL 塑料管中加入 200 μ L 柠檬酸缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 4.0)、10 μ L 3% H₂O₂、20 μ L DMPO (0.2 mol/L)和适量去离子水配成总体积为 330 μ L 测试样品。取适量样品转入石英毛细管中, 将其置于顺磁共振仪的样品仓中, 用紫外灯在 355 nm 波长下照射(0.55 W) 7 min 后测定。顺磁共振仪工作条件为: X-波段微波桥(接收器增益, 1×10^5 ; 振幅调制, 2 G; 微波功率, 10 mW; 调制频率, 100 kHz)。

2.3.3 拉曼光谱测定

拉曼光谱测定在 RFS 100/S 型傅里叶变换拉曼光谱仪上完成。测定前 CeO₂ NPs 于 200℃时干燥 5 h。H₂O₂ 处理的 CeO₂ NPs 由如下方法获得: 将 0.2 mL 30% H₂O₂ 加入到 100 mL 1.0 g/L CeO₂ NPs 中, 剧烈搅拌 1 h 后, 离心分离、洗涤, 于 50℃下干燥即得。

2.3.4 稳态动力学

实验条件如下: CeO₂ NPs 浓度为 6.6 μ g/mL, 反应介质为 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH 4.0), 反应温度为 35℃。相对于底物 TMB, 固定 H₂O₂ 浓度为 50 mmol/L, 改变 TMB 浓度, 测定反应体系最初 5 min 的吸光度(652 nm), 每隔 1 min 测定 1 次。相对于底物 H₂O₂, 固定 TMB 浓度为 0.8 mmol/L, 改变 H₂O₂ 浓度, 测定反应体系最初 5 min 的吸光度, 每隔 1 min 测定 1 次。通过 Lineweaver-Burk 公式 $1/v = K_m/V_{max}(1/C + 1/K_m)$ 计算米氏常数(K_m), 其中 v 代表初始反应速度,

$V_{\max}$ 代表最大反应速度, C 代表底物浓度.

2.3.5 葡萄糖的测定

葡萄糖标准曲线测定步骤: (1) 将 0.1 mL 1 mg/mL GO_x 和 0.1 mL 不同浓度的葡萄糖溶液加入到 0.5 mL 磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH 7.0)中, 37°C 孵育 30 min; (2) 将 0.7 mL 孵育液和 0.1 mL TMB (5.0 mmol/L), 0.2 mL CeO_2 NPs (330 $\mu\text{g/mL}$)和 9.0 mL 柠檬酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 3.5)混合, 用于葡萄糖标准曲线测定.

血样中葡萄糖的测定: 用 5 kDa 的超滤管对血清超滤 30 min 后, 取 1.0 mL 上层清液加入 1.0 mL 磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH 7.0)和 0.1 mL GOD (1.0 mg/mL)混合液中, 将得到的混合液于 37°C 下孵育 30 min 后, 向其中加入 0.1 mL TMB (5 mmol/L), 0.2 mL CeO_2 NPs (330 $\mu\text{g/mL}$)和 7.6 mL 柠檬酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 3.5), 然后将混合液于 35°C 下孵育 30 min 后测定葡萄糖含量. 干扰试验时, 用 5.0 mmol/L 麦芽糖、乳糖和果糖代替葡萄糖.

3 结果与讨论

3.1 CeO_2 NPs 的表征

DLS 结果(图 S1, 见网络版)表明, 纳米微粒的平均水合粒径为 5 nm, 与文献值相符^[31]. XPS 结果(图 1)表明, 在 CeO_2 NPs 中同时含有 Ce^{3+} (885.0 和 903.5 eV)和 Ce^{4+} (882.1、898.0、900.5 和 916.4 eV), 与文献相吻合^[23, 29]. IR 结果(图 2)表明, PPA 修饰的 CeO_2 NPs 在 3400 cm^{-1} (O-H)和 1600 cm^{-1} (C=O)附近有特征峰, 说明 PPA 已成功修饰于 CeO_2 NPs 表面. 另外, 根据 XPS 结果, 碳、氧和铈元素的含量分别为 55.74%、36.69%和 7.54%, 表明 CeO_2 NPs 中有大量碳元素存在, 进一步证明 PPA 存在于 CeO_2 NPs 表面. CeO_2 NPs 的 ζ 电位为 -22.8 ± 1.8 mV, 表明其很稳定^[33].

3.2 CeO_2 NPs 的过氧化物模拟酶特性

选择 TMB 为反应底物研究 CeO_2 NPs 的过氧化物模拟酶特性, 该底物是许多生化测试中 HRP 的典型底物, 已用于考察各种纳米微粒的过氧化物模拟酶特性^[9, 14-18]. 从图 3(a)可知, H_2O_2 氧化 TMB 变色很弱(No. 1), CeO_2 NPs 能使 TMB 发生显色变化(No. 2), 这是因为 CeO_2 NPs 具有氧化物模拟酶活性, 能催化

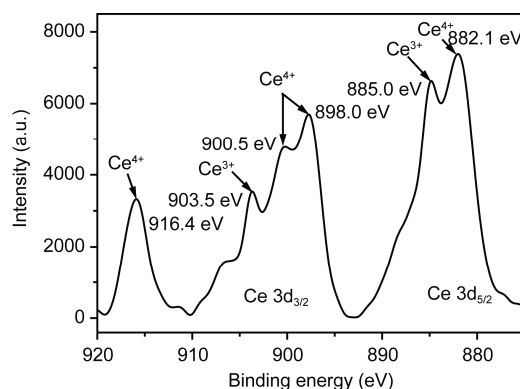


图 1 PAA 修饰的 CeO_2 NPs 的 XPS 图谱. 在 875~895 eV 间的峰值对应 $\text{Ce } 3d_{5/2}$, 在 895~910 eV 间的峰值对应 $\text{Ce } 3d_{3/2}$

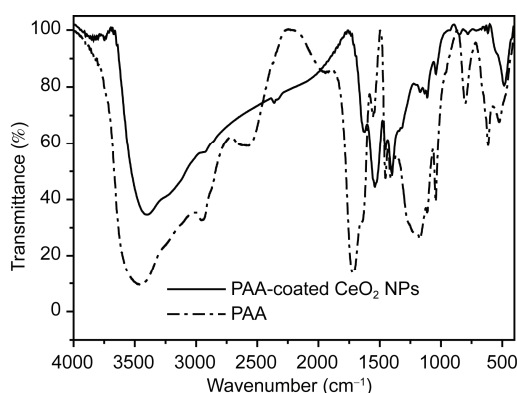


图 2 PPA 和 PPA 修饰的 CeO_2 NPs 的 FT-IR 图谱

O_2 氧化 TMB 显色^[31]. 当 H_2O_2 加入 TMB 和 CeO_2 NPs 混合液中时, 蓝色加深(No. 3), 并且加入 2.0 mol/L H_2SO_4 时蓝色变成黄色(No. 4), 表明 CeO_2 NPs 具有过氧化物模拟酶特性. 其催化显色示意图如图 3(b)所示. 另外, Ce^{3+} (6.6 $\mu\text{g/mL}$)、 Ce^{4+} (6.6 $\mu\text{g/mL}$)和 CeO_2 NPs (0.026 mg/mL)上层澄清离心液对 H_2O_2 氧化 TMB 变色的催化效果很弱(图 S2, 见网络版), 进一步证明催化效果来自 CeO_2 NPs 本身. 为探讨 CeO_2 NPs 的过氧化物酶活性, 改变其中一个底物浓度而固定另一底物浓度, 得到系列反应初速度. 结果表明, CeO_2 NPs 的催化行为符合典型米氏动力学模型(图 3(c, d)). 利用 Lineweaver-Burk plots 法, 得到催化剂的米氏常数(K_m)和最大反应速度($V_{\max}$). 从表 1 可见, 以 H_2O_2 为底物时, CeO_2 NPs 的 K_m 比 HRP 大, 这与达到最佳催化效果时 CeO_2 NPs 所需 H_2O_2 浓度比 HRP 所需 H_2O_2 浓度大的结果相一致, 表明 CeO_2 NPs 能够耐受高浓度 H_2O_2 . 当以 TMB 为底物时, CeO_2 NPs 的 K_m 比 HRP 小, 表明 CeO_2 NPs 与 TMB 的亲合力比 HRP

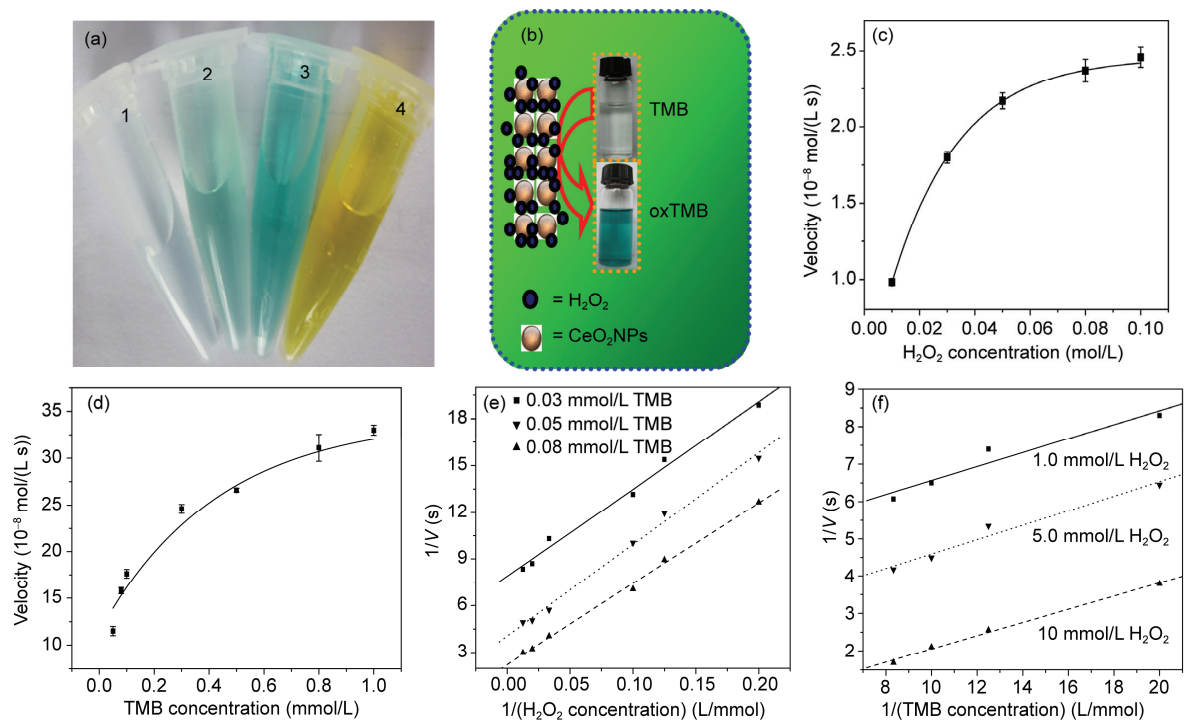


图3 (a) 不同体系的显色照片: (1) 5.0 mmol/L H_2O_2 + 50 $\mu\text{mol/L}$ TMB; (2) 6.6 $\mu\text{g/mL}$ CeO_2 NPs + 50 $\mu\text{mol/L}$ TMB; (3) 5.0 mmol/L H_2O_2 + 6.6 $\mu\text{g/mL}$ CeO_2 NPs + 50 $\mu\text{mol/L}$ TMB; (4) 5.0 mmol/L H_2O_2 + 6.6 $\mu\text{g/mL}$ CeO_2 NPs + 50 $\mu\text{mol/L}$ TMB + 2.0 mol/L H_2SO_4 . 所有反应均在 pH 4.0 (0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液) 和 35 $^\circ\text{C}$ 下进行; (b) CeO_2 NPs 的催化显色示意图; (c, d) 稳态动力学试验, 反应速度(v)的测定. 6.6 $\mu\text{g/mL}$ CeO_2 NPs, pH 4.0 (0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液), 温度 35 $^\circ\text{C}$; (c) TMB 浓度固定为 0.5 mmol/L, 改变 H_2O_2 的浓度; (d) H_2O_2 的浓度固定为 5.0 mmol/L, 改变 TMB 浓度; (e, f) CeO_2 NPs 催化 H_2O_2 -TMB 双倒数曲线

表1 CeO_2 NPs 与 HRP 的动力学参数(K_m 和 $V_{\max}$)比较

催化剂	底物	K_m (mmol/L) ^{a)}	$V_{\max}$ ($10^{-8} \text{ mol/(L s)}$) ^{a)}
CeO_2 NPs	TMB	0.094 ± 0.0095	33.5 ± 1.45
CeO_2 NPs	H_2O_2	15.31 ± 2.94	2.56 ± 0.20
HRP	TMB	0.157 ± 0.015	4.6 ± 0.137
HRP	H_2O_2	0.332 ± 0.005	3.3 ± 0.021

a) 平均值 $\pm$ 标准偏差($n = 3$)

与 TMB 的亲合力大. 双倒数曲线(图 3(e, f))结果表明, CeO_2 NPs 的催化行为符合乒乓机理, 即 CeO_2 NPs 首先与第一个底物结合, 发生反应, 在与第二个底物反应之前释放第一个产物.

3.3 反应条件优化

酶催化活性依赖于反应条件, 如 pH、温度和底物浓度. 考察了 pH (1~12)、温度(25~60 $^\circ\text{C}$)、 H_2O_2 浓度 (0.1~100 mmol/L) 和 CeO_2 NPs 浓度 (0.66~26.4 $\mu\text{g/mL}$) 对 CeO_2 NPs 催化活性的影响, 同时与 HRP 相

比较. 实验结果(图 S3, 见网络版)表明, 与 HRP 相似, CeO_2 NPs 的催化活性也依赖于反应条件. CeO_2 NPs 的催化活性对温度和 pH 的依赖性与 HRP 相似(图 S3(a, b)), 最优 pH 为 4.0, 最优反应温度为 35 $^\circ\text{C}$, 这是天然酶通常需要的温度. CeO_2 NPs 的催化活性随 H_2O_2 浓度升高而增加, 但当 H_2O_2 浓度超过 50 mmol/L 时, 其催化活性降低(图 S3(c)). 可能原因是 H_2O_2 将 CeO_2 NPs 表面的 Ce^{3+} 氧化成 Ce^{4+} [30]. 当 H_2O_2 浓度为 3.0 mmol/L 时, HRP 的催化活性最大, 为 CeO_2 NPs 所需 H_2O_2 最佳浓度的 1/15 左右, 表明 CeO_2 NPs

能够耐受更高浓度的 H_2O_2 . CeO_2 NPs 浓度对催化活性的影响实验表明, CeO_2 NPs 的催化活性随其浓度增加而增加(图 S3(d)), 实验选择 $6.6 \mu\text{g/mL}$ 作为 CeO_2 NPs 最佳浓度.

3.4 可能的催化机理

CeO_2 NPs 的催化活性来源于其独特的氧空位结构^[29, 30], 研究表明, CeO_2 NPs 催化 H_2O_2 产生 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ ^[34, 35]. 另外, 在催化反应过程中, H_2O_2 与 CeO_2 NPs 表面的 Ce^{3+} 位点作用形成过氧化物^[35]. 为了证明二氧化铈纳米微粒催化 H_2O_2 氧化 TMB 过程中活性氧形态的产生, 试验了 $\text{O}_2\cdot^-/\text{HO}_2\cdot$ 自由基捕获剂(对苯二醌)和 $\text{OH}\cdot$ 自由基捕获剂(叔丁醇)对 CeO_2 NPs 催化活性的影响, 结果表明, 在对苯二醌(2.0 mmol/L)和叔丁醇(600 mmol/L)存在下, CeO_2 NPs 的催化活性分别降低了 48.9% 和 12.9% (图 S4, 见网络版), 表明在上述催化过程中的确产生了 $\text{O}_2\cdot^-/\text{HO}_2\cdot$ 和 $\text{OH}\cdot$. Raman 光谱结果表明, H_2O_2 处理后的 CeO_2 NPs 在 830 和 880 cm^{-1} 处有吸收(图 4(a)), 表明在 CeO_2 NPs 表面生成了活性物质^[35-37]. 用 EPR 进一步探索反应过程中 CeO_2 NPs 的作用, 结果表明, 加入 CeO_2 NPs 后, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{DMPO}$ 体系的 EPR 信号强度降低, 随着 CeO_2 NPs 浓度增加, EPR 信号强度急剧下降(图 4(b)). 这些结果表明, CeO_2 NPs 确实能够催化 H_2O_2 氧化 TMB. 综上所述, 在催化反应过程中, H_2O_2 与 CeO_2 NPs 表面的 Ce^{3+} 位点作用形成活性过氧化物, 进一步生成 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$,

这些活性物质将 TMB 氧化产生更蓝的显色反应.

3.5 生化分析应用

在优化条件下(35°C , $\text{pH } 4.0$, $6.6 \mu\text{g/mL}$ CeO_2 NPs), 测定了 H_2O_2 浓度与 652 nm 处吸光度的关系, 在一定 H_2O_2 浓度范围内, 吸光度与 H_2O_2 浓度成正比. 图 S5(a) (见网络版)为 H_2O_2 的响应曲线, 线性范围为 $0.5\sim 10 \text{ mmol/L}$, 检出限为 0.1 mmol/L . 在葡萄糖氧化酶催化下, 葡萄糖能够被溶解氧氧化生成 H_2O_2 和葡萄糖酸. 因此, 当将比色法与葡萄糖氧化酶催化溶解氧氧化葡萄糖的反应相结合即可测定葡萄糖含量. 图 S5(b)为葡萄糖的响应曲线, 其线性范围为 $0.5\sim 10 \text{ mmol/L}$, 检出限为 0.1 mmol/L . 通常情况下, 健康人和糖尿病人的血糖浓度范围分别为 $3.0\sim 8.0$ 和 $9.0\sim 40 \text{ mmol/L}$ ^[38]. 因此, 本法可用于血糖浓度测定. 另外, 即使葡萄糖的类似物如果糖、乳糖和麦芽糖等浓度高达 5 mmol/L , 也不会干扰葡萄糖的测定(图 S6(a, b)), 说明本法具有很高的选择性. 将本法应用于血清中葡萄糖的测定, 其结果与血糖仪的测定值相吻合(表 2).

表 2 血清中葡萄糖含量的测定结果

样品	本法值(mmol/L) $\pm \text{SD}^{\text{a}}$	血糖仪值(mmol/L) $\pm \text{SD}^{\text{b}}$
血清 1	5.52 ± 0.11	5.42 ± 0.14
血清 2	6.08 ± 0.16	6.24 ± 0.12
血清 3	6.72 ± 0.20	6.62 ± 0.10

a) 3 次测定值; b) 实验室临床分析, 重庆市第九人民医院

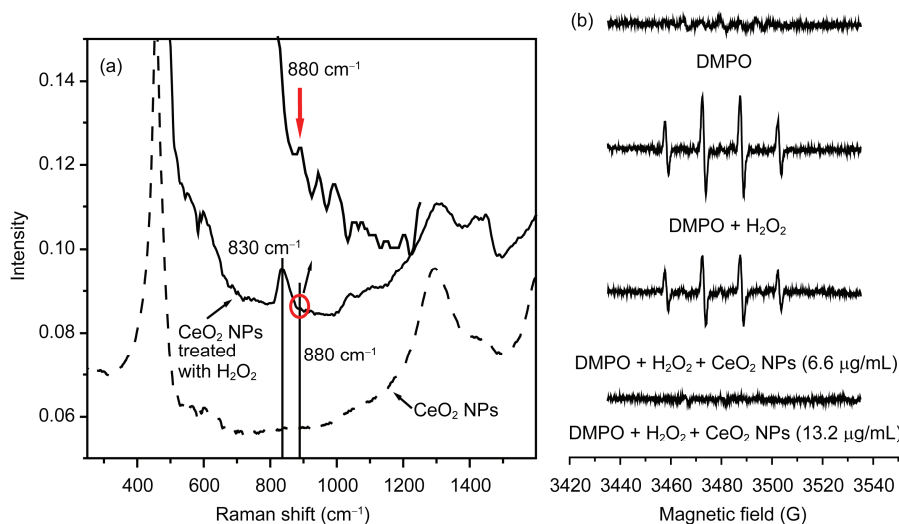


图 4 (a) H_2O_2 处理前后 CeO_2 NPs 的 Raman 谱图; (b) CeO_2 NPs 对 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ 体系产生羟基自由基的影响

4 结论

成功合成了一种稳定和水溶性的 PPA 修饰的 CeO₂ NPs, 发现其能够快速催化 H₂O₂ 氧化 TMB 显色; 与 HRP 类似, 其催化活性依赖于 pH、温度和 H₂O₂ 浓度, 而且 CeO₂ NPs 的催化活性对温度和 pH 的依赖性与 HRP 非常相似, 另外, 还能够耐受更高浓度的

H₂O₂. 这些特性表明, CeO₂ NPs 具有过氧化物模拟酶催化特性. 根据 TMB 显色反应与 H₂O₂ 浓度的线性关系, 结合葡萄糖氧化酶催化溶解氧氧化葡萄糖产生 H₂O₂, 构建了一种简单、廉价和选择性高的比色分析新方法测定血样中的葡萄糖, 并且成功用于临床样品中葡萄糖的测定, 相关结果将为拓宽纳米材料模拟酶在生化分析中的应用奠定基础.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21075099, 21275021)、中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2013C114)、重庆市科委基础与前沿研究项目(cstc2013jcyjA00032)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Norhammar A, Tenerz A, Nilsson G, Hamsten A, Efendic S, Ryden L, Malmberg K. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: A prospective study. *Lancet*, 2002, 359: 2140–2144
- 2 Lan D, Li B, Zhang Z. Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 934–938
- 3 Moon B-U, Koster S, Wientjes KJC, Kwapiszewski RM, Schoonen AJM, Westerink BHC, Verpoorte E. An enzymatic microreactor based on chaotic micromixing for enhanced amperometric detection in a continuous glucose monitoring application. *Anal Chem*, 2010, 82: 6756–6763
- 4 Radhakumary C, Sreenivasan K. Naked eye detection of glucose in urine using glucose oxidase immobilized gold nanoparticles. *Anal Chem*, 2011, 83: 2829–2833
- 5 Jiang Y, Zhao H, Lin Y, Zhu N, Ma Y, Mao L. Colorimetric detection of glucose in rat brain using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 4800–4804
- 6 Honda M, Kataoka K, Seki T, Takeoka Y. Confined stimuli-responsive polymer gel in inverse opal polymer membrane for colorimetric glucose sensor. *Langmuir*, 2009, 25: 8349–8356
- 7 Prendergast JL, Sniegowski LT, Welch MJ, Phinney KW. Modifications to the NIST reference measurement procedure (RMP) for the determination of serum glucose by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 1779–1785
- 8 Wahjudi PN, Patterson ME, Lim S, Yee JK, Mao CS, Lee WNP. Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Biochem*, 2010, 43: 198–207
- 9 Gao LZ, Zhuang J, Nie L, Zhang JB, Zhang Y, Gu N, Wang TH, Feng J, Yang DL, Perrett S, Yan X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 577–583
- 10 André R, Natálio F, Humanes M, Leppin J, Heinze K, Wever R, Schröder H-C, Müller WEG, Tremel W. V₂O₅ nanowires with an intrinsic peroxidase-like activity. *Adv Funct Mater*, 2010, 21: 501–509
- 11 Cai K, Lv Z, Chen K, Huang L, Wang J, Shao F, Wang Y, Han H. Aqueous synthesis of porous platinum nanotubes at room temperature and their intrinsic peroxidase-like activity. *Chem Commun*, 2013, 49: 6024–6026
- 12 Mu J, Wang Y, Zhao M, Zhang L. Intrinsic peroxidase-like activity and catalase-like activity of Co₃O₄ nanoparticles. *Chem Commun*, 2012, 48: 2540–2542
- 13 Song YJ, Wang XH, Zhao C, Qu KG, Ren JS, Qu XG. Label-free colorimetric detection of single nucleotide polymorphism by using single-walled carbon nanotube intrinsic peroxidase-like activity. *Chem-Eur J*, 2010, 16: 3617–3621
- 14 Song YJ, Qu KG, Zhao C, Ren JS, Qu XG. Graphene oxide: Intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection. *Adv Mater*, 2010, 22: 2206–2210
- 15 Shi W, Wang Q, Long Y, Cheng Z, Chen S, Zheng H, Huang Y. Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. *Chem Commun*, 2011, 47: 6695–6697
- 16 Zhang L, Han L, Hu P, Wang L, Dong S. TiO₂ nanotube arrays: Intrinsic peroxidase mimetics. *Chem Commun*, 2013, 49: 10480–10482
- 17 Chen Y, Cao H, Shi W, Liu H, Huang Y. Fe-Co bimetallic alloy nanoparticles as a highly active peroxidase mimetic and its application in biosensing. *Chem Commun*, 2013, 49: 5013–5015

- 18 石文兵, 张小丹, 何少慧, 李建, 黄玉明. 化学发光法快速筛选纳米颗粒模拟酶. 中国科学: 化学, 2013, 43: 1591–1598
- 19 Fan J, Yin JJ, Ning B, Wu XC, Hu Y, Ferrari M, Anderson GJ, Wei JY, Zhao YL, Nie GJ. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritineplatinum nanoparticles. *Biomaterials*, 2011, 32: 1611–1618
- 20 He WW, Liu Y, Yuan JS, Yin JJ, Wu XC, Hu XN, Zhang K, Liu JB, Chen CY, Ji YL, Guo YT. Au@Pt nanostructures as oxidase and peroxidase mimetics for use in immunoassays. *Biomaterials*, 2011, 32: 1139–1147
- 21 Zhang K, Hu X, Liu J, Yin J-J, Hou S, Wen T, He W, Ji Y, Guo Y, Wang Q, Wu X. Formation of PdPt alloy nanodots on gold nanorods: Tuning oxidase-like activities via composition. *Langmuir*, 2011, 27: 2796–2803
- 22 Juarez R, Concepcion P, Corma A, Garcia H. Ceria nanoparticles as heterogeneous catalyst for CO₂ fixation by omega-aminoalcohols. *Chem Commun*, 2010, 46: 4181–4183
- 23 Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett*, 2005, 5: 2573–2577
- 24 Stefanik TS, Tuller HL. Ceria-based gas sensors. *J Eur Ceram Soc*, 2001, 21: 1967–1970
- 25 Karakoti A, Singh S, Dowding JM, Seal S, Self WT. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 4422–4432
- 26 Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nano*, 2006, 1: 142–150
- 27 Das M, Patil S, Bhargava N, Kang JF, Riedel LM, Seal S, Hickman JJ. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*, 2007, 28: 1918–1925
- 28 Perez JM, Asati A, Nath S, Kaittanis C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small*, 2008, 4: 552–556
- 29 Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun*, 2007: 1056–1058
- 30 Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*, 2008, 29: 2705–2709
- 31 Asati A, Santra S, Kaittanis C, Nath S, Perez JM. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 2308–2312
- 32 Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, King JES, Seal S, Self WT. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun*, 2010, 46: 2736–2738
- 33 El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 1260–1266
- 34 Heckert EG, Seal S, Self WT. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 5014–5019
- 35 Ji P, Wang L, Chen F, Zhang J. Ce³⁺-centric organic pollutant elimination by CeO₂ in the presence of H₂O₂. *ChemCatChem*, 2010, 2: 1552–1554
- 36 Guzman J, Carrettin S, Corma A. Spectroscopic evidence for the supply of reactive oxygen during CO oxidation catalyzed by gold supported on nanocrystalline CeO₂. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 3286–3287
- 37 Pushkarev VV, Kovalchuk VI, d'Itri JL. Probing defect sites on the CeO₂ surface with dioxygen. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 5341–5348
- 38 Xu Y, Pehrsson PE, Chen L, Zhang R, Zhao W. Double-stranded dna single-walled carbon nanotube hybrids for optical hydrogen peroxide and glucose sensing. *J Phys Chem C*, 2007, 111: 8638–8643

Intrinsic peroxidase-like activity exhibited by cerium oxide nanoparticles and their application to glucose detection

SHI WenBing^{1,2}, LIU XiDong³, ZHANG XiaoDan¹, HUANG YuMing^{1*}

1 The Key Laboratory of Luminescence and Real-time Analysis, Ministry of Education; College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Key Laboratory of Inorganic Special Functional Materials; College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China

3 College of Materials and Chemical Engineering, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160, China

*Corresponding author (email: yuminghuang2000@yahoo.com)

Abstract: In this paper, the stable and good water-soluble polyacrylic acid functioned cerium oxide nanoparticles (CeO₂ NPs) were successfully synthesized and characterized by dynamic light scattering (DLS), FT-IR and XPS. The experimental results indicated that the prepared CeO₂ NPs exhibit intrinsic peroxidase-like activity, which can catalyze the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of H₂O₂ to produce blue reaction. Electron paramagnetic resonance (EPR) and Raman techniques were used to investigate the catalytic mechanism. On the basis of H₂O₂ concentration-dependent peroxidase-like activity of CeO₂ NPs, a simple, low cost and selectively colorimetric method was constructed for sensing of glucose. Under the optimal conditions, the linear range for the determination of glucose was 0.5–10 mmol/L with a limit of detection (LOD, 3 σ) of 0.1 mmol/L. The RSD was 2.4% for 1.0 mmol/L glucose ($n = 11$). The proposed method has been successfully used for determination of glucose in serum samples.

Keywords: enzyme mimic, cerium oxide nanoparticles, peroxidase mimetics, glucose