

The Applied Research of Electrochemical Biosensor Based on Electrodeposited CaCO₃-Chitosan Composite Nanomaterials

Hongye Zhao, Liyun Qiao, Junping Wei

Inner Mongolia Inspection and Testing Institute of Petrochemical Industry, Hohhot
Email: lhongye1@163.com

Received: Jun. 21st, 2012; revised: Jul. 4th, 2012; accepted: Jul. 17th, 2012

Abstract: In this paper, a novel electrochemical biosensor was fabricated based on CaCO₃-chitosan composite nanomaterials, which was characterized by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, chronoamperometry and scanning electron microscopy. The electrochemical behaviors of redox protein (enzyme) were studied in details and the new methods for determination of H₂O₂ were developed. These studies enriched the study of biological electroanalytical chemistry, expanding the scope of the application of nanocomposites.

Keywords: Nanocomposite; Electrodeposition; Protein (Enzyme); Biosensor

基于电沉积碳酸钙 - 壳聚糖复合纳米材料的电化学生物传感器的应用研究

赵红叶, 乔丽云, 魏俊平

内蒙古石油化学工业检验检测所, 呼和浩特
Email: lhongye1@163.com

收稿日期: 2012年6月21日; 修回日期: 2012年7月4日; 录用日期: 2012年7月17日

摘要: 本文基于碳酸钙 - 壳聚糖复合纳米材料构建了电化学生物传感器, 采用循环伏安法、电化学阻抗法、计时安培法及扫描电镜技术对其进行了表征, 研究了氧化还原蛋白质(酶)的直接电化学和电催化特性, 建立了检测 H₂O₂ 的新方法。该研究丰富了生物电分析化学的研究内容, 拓展了复合纳米材料的应用范围。

关键词: 复合纳米材料; 电沉积; 蛋白质(酶); 生物传感器

1. 引言

新型性能优越的纳米材料和新颖的生物传感器制备方法对开发第三代有临床应用价值的生物传感器具有重要意义。在各种纳米材料中, 纳米碳酸钙由于其具有比表面积大、表面反应活性高等优点被广泛应用于 H₂O₂ 电化学生物传感器的构建^[1-4]。Shan^[5]等通过滴涂法将纳米碳酸钙, 壳聚糖和牛血红蛋白(Hb)的混合物修饰在玻碳电极表面成功构建了 H₂O₂ 传感器, 实现了 Hb 的直接电子转移并取得了良好的催化效果。Sun 等^[6]采用层层涂布法将 Hb、Nano-CaCO₃

和 Nafion 修饰在离子液体碳糊电极表面, 研究了 Hb 的直接电子转移和对 H₂O₂ 的电催化行为。

一步电沉积法是构建生物传感器新型界面的众多方法之一, 也是目前研究较多、应用较广的一种。该方法操作简单, 并且更容易控制所制备材料的形貌特征和尺寸大小。目前利用壳聚糖的溶解性随 pH 值变化而变化的特性同时将纳米材料共同沉积在电极表面的研究工作还较少。壳聚糖分子结构中带有多个氨基的特性, 使其在一步电沉积法构建电化学生物传感器领域中备受青睐^[7-10]。壳聚糖的 pK_a 为 6.3, 当溶

液的 pH 值小于 6.3 时, 氨基呈质子化, 壳聚糖为水溶形态; 当向工作电极施加电压, 溶液中的水被电解, 电极周围会有微小的氢气气泡产生, 而产生的氢气气泡作为动态的模板可有效的促进纳米材料的形成; 由于氢离子形成氢气离开溶液致使电极周围局部 pH 值升高接近壳聚糖的 pK_a , 使壳聚糖溶解度下降, 使其和纳米碳酸钙共同沉淀在电极表面, 形成碳酸钙-壳聚糖复合纳米材料。

本文拟利用新颖的一步电沉积法构建 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 传感器, 研究 Hb 的直接电化学和电催化行为, 建立检测 H₂O₂ 的新方法。

2. 实验部分

2.1. 试剂和仪器

牛血红蛋白(Hb, M.W. 64500, 美国 sigma 公司), 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐(EMIMBF₄, 纯度 ≥ 98.5%, 兰州化学物理研究所), 石墨粉(光谱纯, 国药集团化学试剂有限公司), 壳聚糖(Chit, M.W.1 × 10⁶, 脱乙酰度 > 90%, 上海源聚生物科技有限责任公司), 氯化钙和碳酸氢铵(CaCl₂, NH₄HCO₃, 天津天大化学试剂厂), 过氧化氢(w/w, 30%, 西安化学试剂厂), 其它试剂均为分析纯。0.1 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)作为支持电解质, 通过加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液或 0.1 mol·L⁻¹ H₃PO₄ 溶液来调节溶液的 pH 值。测试溶液均通高纯氮气 15 min 除氧。所有电化学测量均采用三电极系统: 工作电极为自制修饰电极, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE), 辅助电极为铂丝。测量温度为室温(约 25°C ± 2°C)。

2.2. Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE的构建

2.2.1. 离子液体碳糊电极(CILE)的制备

不同质量比的石墨粉、离子液体和液体石蜡混合, 制备所得的离子液体碳糊电极的性能有所不同。当三者质量比太大时, 石墨粉颗粒之间粘接性较差, 容易粉碎和脱落; 如果质量比太小, 碳糊的机械强度太小且难以成型。本实验最终选用以下的配比: 称取 3.2 g 石墨粉, 量取 300 μL 离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐(EMIMBF₄)和 700 μL 液体石蜡于玛瑙研钵中混合均匀, 将混合均匀的碳糊填入 PVC 管中约 1 cm(Φ = 3 mm), 压实, 尾部插铜线作为导线; 在

称量纸上打磨成镜面, 即制得 CILE。

2.2.2. 壳聚糖溶液的配制

1.0 wt%壳聚糖溶液配制: 配制 100 mL 0.5 wt.% 的醋酸水溶液, 加热至微沸, 准确称取 1 g chit, 将其缓慢加入并不断搅拌使其完全溶解, 用 5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节其 pH 为 5.0 左右, 经砂芯漏斗过滤后置于 4°C 冰箱中备用。

2.2.3. Hb-chit/nanoCaCO₃-chit复合膜修饰CILE的构建

取一定量的 CaCl₂ 和 NH₄HCO₃ 溶解在 10 mL 二次蒸馏水中, 使[Ca²⁺]为 9 mmol·L⁻¹, [CO₃²⁻]为 18 mmol·L⁻¹。用 1 mol·L⁻¹ HCl 将 pH 值调节至 5.0 左右, 然后向该溶液中加入配制好的壳聚糖溶液, 使其浓度为 0.5 mg·mL⁻¹, 再次调节 pH 值于 5.0 左右, 然后将新制备的 CILE 浸入该溶液中于 -1.5 V(vs.SCE) 电位下电沉积 300 s。在该电位下, H⁺ 被还原成 H₂, 该反应导致电极表面局部区域的 pH 值迅速增大, 当 pH 值达到 6.3, 壳聚糖达到溶点, 同时与 CaCO₃ 共同析出在电极表面, 由此即制得 CaCO₃-chit 复合纳米材料(如图 1 所示)。将所制备的电极用二次蒸馏水冲洗晾干之后, 将 5 μL 5 mg·mL⁻¹ Hb 和 0.5 mg·mL⁻¹ 壳聚糖的混合溶液滴涂于 nanoCaCO₃-chit/CILE 表面, 于 4°C 冰箱放置 6 h 得到 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE。

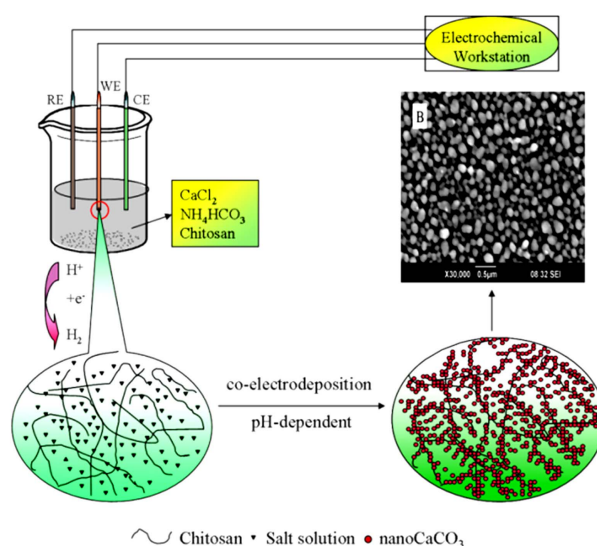


Figure 1. The principle diagram of co-electrodeposition CaCO₃-chit composite nanomaterials
图 1. 电化学共沉积 CaCO₃-chit 复合纳米材料的原理示意图

3. 结果与讨论

3.1. nanoCaCO₃-chit复合纳米材料的表面形貌

用扫描电子显微镜(SEM)对电极表面 CaCO₃-chit 复合纳米材料的形貌进行了研究(图 2)。由图可见,制备的复合纳米材料为球形颗粒,粒子大小约为 100~200 nm,形状规则,排列有序;通过该法制备的复合纳米材料形貌不同于其他方法制备所得,且粒径更小,颗粒分布更均匀^[11-13]。本法制备得到的复合纳米材料与其他方法相比所具有的不同形貌,可能是由于在电沉积过程中粒子的形成速度不同而造成的。

3.2. 不同修饰电极的电化学阻抗

电化学阻抗谱(EIS)可以为电极表面修饰前后阻抗的变化提供信息^[14-16]。图 3 分别为裸 CILE、Hb-chit/CILE 和 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 在 1 mmol·L⁻¹

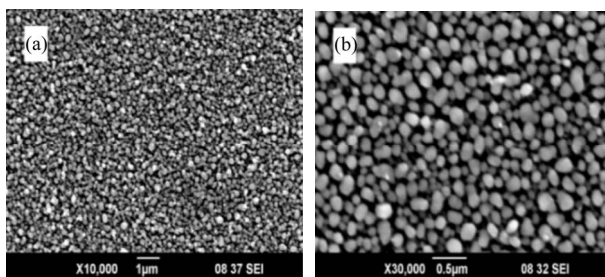


Figure 2. SEM images of spherical structures of CaCO₃-chit composite nanomaterials prepared by the co-electrodeposition with (a) Low magnification; (b) High magnification
图 2. 通过电沉积法制备所得 CaCO₃-chit 复合纳米材料的 SEM 图 (a) 低倍放大图; (b) 高倍放大图

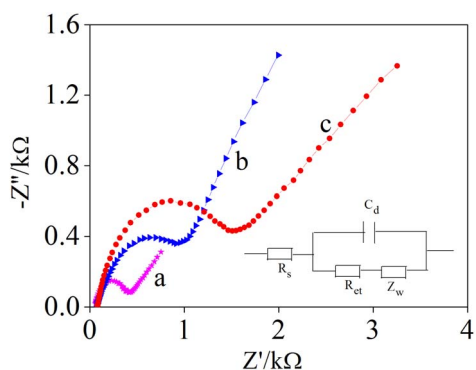


Figure 3. Electrochemical impedance spectroscopy for (a) Bare CILE; (b) Hb-chit/CILE; (c) Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE in a solution of 1 mmol·L⁻¹ Fe(CN)₆^{3-/4-} + 0.1 mol·L⁻¹ KCl as the supporting electrolyte; The frequencies swept from 10⁵ to 10⁻² Hz
图 3. 在 1 mmol·L⁻¹ Fe(CN)₆^{3-/4-} + 0.1 mol·L⁻¹ KCl 溶液中不同修饰电极的 EIS 图 (a) CILE; (b) Hb-chit/CILE; (c) Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE; 频率范围: 10⁵~10⁻² Hz

Fe(CN)₆^{3-/4-} + 0.1 mol·L⁻¹ KCl 溶液中的电化学阻抗图。依据 Randle 和 Ershler 理论^[17],对谱图进行拟合(如图 3 所示的等效电路),计算得其电子传递阻抗(R_{et})分别为 303.5 Ω, 540.5 Ω 和 1166 Ω。表明 chit, nanoCaCO₃-chit 和 Hb 被成功的固定在了 CILE 表面, R_{et} 的逐渐增大是由于壳聚糖, nanoCaCO₃ 和 Hb 三者的导电性能差而抑制了 Fe(CN)₆^{3-/4-} 电对在电极表面的电子传递。

3.3. Hb在Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE上的直接电化学

如图 4 所示,以 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE(曲线 d)为工作电极时,可观察到一对峰形良好、准可逆的氧化还原峰,其峰电位分别为 E_{pa} = -0.228 V 和 E_{pc} = -0.362 V; 式量电位由方程 E⁰ = 1/2(E_{pa} + E_{pc}) 计算得 -0.295 V, 与已报道文献值接近^[18,19]。然而,在裸 CILE(曲线 a), nanoCaCO₃-chit/CILE(曲线 b)和 chit/nanoCaCO₃-chit/CILE(曲线 e)上没有氧化还原峰出现;显然, Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 的电化学响应是由于 Hb 的活性中心进行了氧化还原反应。Hb-chit/CILE(曲线 c)上的 Hb 也出现了一对氧化还原峰,不过峰电流远远小于 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE。这说明 nanoCaCO₃-chit 能给固定在上面的 Hb 提供一个良好的微环境并促进 Hb 与 CILE 之间的电子传递。这可能是由于 nanoCaCO₃-chit 为血红蛋白分子提供了三维的立体取向平台进而使其可与电子供体或电子受

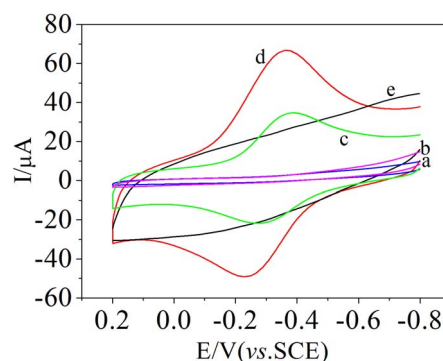


Figure 4. CVs of (a) CILE; (b) nanoCaCO₃-chit/CILE; (c) Hb-chit/CILE; and (d) Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE; (e) chit/nanoCaCO₃-chit/CILE in 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 PBS at scan rate of 0.2 V·s⁻¹
图 4. 在 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 PBS 中不同修饰电极的循环伏安图 (a) CILE; (b) nanoCaCO₃-chit/CILE; (c) Hb-chit/CILE; (d) Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 和 (e) chit/nanoCaCO₃-chit/CILE; 扫速: 0.2 V·s⁻¹

体之间进行电子传递，并有效促进了这一电子转移过程。

3.4. 扫速的影响

考察了在 pH = 7.0 时 0.1 mol·L⁻¹ PBS 缓冲溶液中于不同扫速下，Hb 在 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 上的循环伏安行为(图 5(A))。由图可见，在-0.8~0.2 V 的电位范围内，当以 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 为工作电极时，可观察到一对峰形良好、准可逆的氧化还原峰，随着扫速的增加，Hb 的氧化、还原峰电流都依次增大，且峰电流与扫速呈良好的线性关系(图 5(B))，线性回归方程分别为： $I_{pa}(\mu A) = 1.29 - 32.41v (V \cdot s^{-1})$ ， $r = -0.9988$ ， $I_{pc}(\mu A) = 5.54 + 44.82v (V \cdot s^{-1})$ ， $r = 0.9981$ ，说明 Hb 的电极过程是表面吸附控制过程。

根据公式(1)可求得电极表面具有电活性的 Hb 的表面覆盖度(Γ^*):

$$I_p = n^2 F^2 v A \Gamma^* / 4RT = n F Q v / 4RT \quad (1)$$

$$\lg k_s = \alpha \lg(1-\alpha) + (1-\alpha) \lg \alpha - \lg(RT/nFv) - \alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p / 2.3RT \quad (2)$$

式中 Q 为积分电量，n 为电子转移数，A 为电极面积，F 为法拉第常数。通过对 Hb Fe(III)还原的阴极峰面积进行积分，可求得修饰电极的表面覆盖浓度(Γ^*)为 $1.43 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。该值比单层 Hb 吸附至裸电极表面的理论值大($1.89 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$)^[20]，说明 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 具有较多的表面活性位点。根据

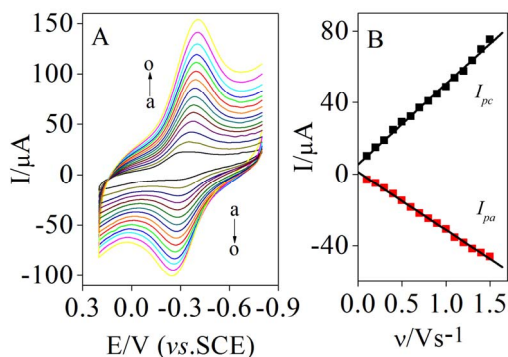


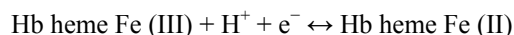
Figure 5. (A) CVs of Hb-chi/nanoCaCO₃-chi/CILE in 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 PBS at different scan rates. Scan rate (from a to o): 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 and 1.5 V·s⁻¹, respectively; (B) The plot of I_p vs v

图 5. (A) 在 0.1 mol·L⁻¹ PBS pH 7.0 PBS 中，不同扫速下 Hb 在 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 上的循环伏安图(由 a 到 o): 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 和 1.5 V·s⁻¹; (B) I_p vs v

I_p - v 的斜率可计算得到电子转移数 n 为 1.03。根据 Laviron^[21](公式 2)关于电极表面反应异相动力学常数的计算方法可以得到 Hb 电子传递速率常数(k_s)为 1.98 s⁻¹，这一数值小于 Hb 固定在 gellan gum/BMIMBF₄ 复合膜上的 $5.66 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ ^[22]，但远远大于文献报道的将 Hb 固定在碳纳米管上的 0.49 s^{-1} ^[23]。

3.5. pH值的影响

考察了溶液 pH 值变化，对 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 的循环伏安行为的影响(图 6(a))。随着溶液 pH 值的增加，该修饰电极的式量电位向负方向移动，而且在 pH 4.91~9.18 范围内均得到了峰形良好、几乎对称的循环伏安曲线。电位与 pH 值呈良好的线性关系(图 6(b))： $E^0 = 0.1012 - 0.0615\text{pH}(n = 6, r = 0.9988)$ 。其中，斜率为 -61.5 mV·pH⁻¹，与一电子一质子反应的理论值(-59.0 mV pH⁻¹)接近，表明 Hb 发生电子传递的同时，还伴随着等量质子的转移；Hb 的氧化还原过程可简单的表示如下^[24,25]：



pH 值对固定在 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 中的 Hb 的氧化还原峰电流具有轻微的影响(图 6(c))，由于中性的 pH 值接近生理环境，并能有效的保持蛋白质的生物活性，所以该实验中选择 pH 7.0 作为最优 pH 以达到最大的灵敏度。另外，由于 chit 的 pK_a 为 6.3，当溶液的 pH 值 > 6.3 时，chit 为非水溶形态，可以保证 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit 复合物很稳定的修饰在电极表面不会脱落；当溶液的 pH < 5.0，其峰形

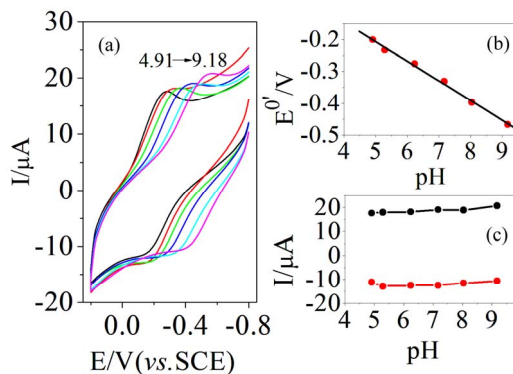


Figure 6. (a) CVs of Hb-chi/nanoCaCO₃-chi/CILE in different pH values of 4.91, 5.29, 6.24, 7.17, 8.04 and 9.18; (b) Plot of E^0 vs pH value; (c) Plot of I vs pH values. Scan rate: 0.2 V·s⁻¹

图 6. (a) Hb 在 Hb-chi/nanoCaCO₃-chit/CILE 上在不同 pH 溶液 (4.91, 5.29, 6.24, 7.17, 8.04 和 9.18)中的循环伏安图; (b) E^0 vs. pH; (c) I vs pH. 扫速: 0.2 V·s⁻¹

开始变差且峰电位差也不断增大。

3.6. Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE上Hb对H₂O₂的电催化行为

为了考察 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 电极上 Hb 的电催化活性, 采用计时安培法研究了 Hb 对 H₂O₂ 的电催化行为(图 7(a))。当依次向不断搅拌的除氧后的 PBS 缓冲溶液(pH 7.0)中加入不同体积的 H₂O₂(0.01 mol·L⁻¹)后, 可以观察到 Hb 的催化还原电流随加入 H₂O₂ 浓度的增大呈阶梯状增加, 达到 95% 的稳定电流响应的的时间小于 3 s, 表明 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 电极对 H₂O₂ 的响应速度很快。Hb 的催化电流与 H₂O₂ 浓度呈线性关系(图 7(b)), 其线性范围为 5.0 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹~1.3 × 10⁻³ mol·L⁻¹, 其线性回归方程为 $I_{ss} = 10.83 + 5.1 \times 10^{-3} C_{H_2O_2}$ (n = 52, r = 0.9994), 检出限为 1.6 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ (S/N = 3)。从其线性斜率 5.15 × 10⁻³ μA·μM⁻¹, 可得其灵敏度为 0.16 A·M⁻¹·cm⁻²。该值远远大于文献报道的 0.06 A·M⁻¹·cm⁻² 和 0.045 A·M⁻¹·cm⁻²[26,27], 略小于 0.6 A·M⁻¹·cm⁻² 和 0.234 A·M⁻¹·cm⁻²[28,29]。该修饰电极高的灵敏度是由于 nanoCaCO₃-chit 复合纳米材料为血红蛋白内部的活性中心提供了优良的生物环境使其能够进行氧化还原反应。

Lineweaver-Burk 方程^[30]可用于求解用于评价酶生物活性的特征动力学参数 K_M^{app} 值:

$$1/I_{ss} = 1/I_{max} + K_M^{app}/(I_{max}C)$$

式中, I_{ss} 为稳态电流; I_{max} 为最大稳态电流; C 为底物浓度。当电流受酶促反应速率控制时, 在一定范围内, 采用双倒数法($1/I_{ss} \sim 1/C$)作图将得到一条直线(图 7(c)), 从其斜率和截距可求得 Hb 催化还原 H₂O₂ 的 K_M^{app} 值为 8.17 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹, 与文献所报道的值相比, 此值要低于 Hb 固定在 SP sephadex 膜中的 1.90 × 10⁻³ mol·L⁻¹[31] 和 Chitt-Aus/cys 膜中的 1.40 × 10⁻³ mol·L⁻¹[32], 表明 nanoCaCO₃-chit 复合膜能够保持 Hb 高的生物活性, 对 H₂O₂ 表现出较强的亲和力。

3.7. 传感器的稳定性及重复性

将 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 于 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.0) 的缓冲溶液中以 0.1 V·s⁻¹ 连续扫描 50 圈, 氧化还原峰电流扫描前后相比几乎没发生变化, 表明所构建的传感器稳定性良好。

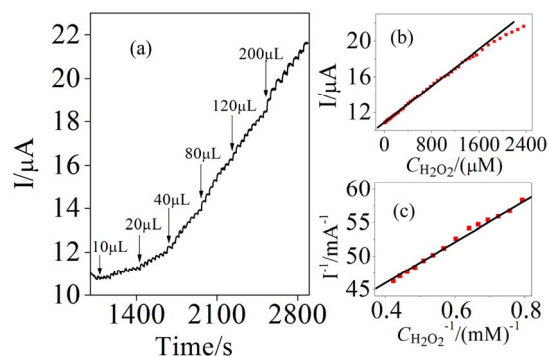


Figure 7. (a) Amperometric response of Hb at the Hb-chi/nanoCaCO₃-chit/CILE when successive added different amounts of H₂O₂ into 20 mL stirring PBS (pH 7.0) at the potential of -0.4 V; (b) I_p vs $C_{H_2O_2}$; (c) I_p^{-1} vs $C_{H_2O_2}^{-1}$

图 7. (a) 连续加入不同浓度 H₂O₂ 时 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 上 Hb 的计时安培电流响应; (b) I_p vs $C_{H_2O_2}$; (c) I_p^{-1} vs $C_{H_2O_2}^{-1}$; 溶液: 20 mL 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.0); 电位: -0.4 V (vs SCE)

在相同 PBS 缓冲溶液中, 用同批构建的 6 支 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 对 1 × 10⁻³ mol·L⁻¹ H₂O₂ 进行测定, 其电流响应的 RSD 为 4.3%, 表明所构建的传感器重复性良好。

用同一支 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE 对 1 × 10⁻³ mol·L⁻¹ H₂O₂ 连续平行测定 14 次, 每天测定一次, 其电流响应的 RSD 为 3.9%, 表明所构建的传感器重复性良好。

4. 结论

本文采用一步电沉积法, 成功地制备出了结构新颖的 nanoCaCO₃-chit 复合纳米材料, 并构建了 Hb-chit/nanoCaCO₃-chit/CILE。研究表明, 在修饰电极上, Hb 发生了快速直接电子转移, 且对 H₂O₂ 表现出良好的电催化作用、较高的检测灵敏度。这一方面可能是因为通过一步电沉积法所制备的 nanoCaCO₃ 的粒径更小, 比表面积大, 分布均匀, 为 Hb 提供了更多的活性位点, 促进其与电极之间的电子传递; 另一方面可能是因为 nanoCaCO₃-chit 复合纳米材料具有良好的生物相容性使 Hb 能够很好的保持其对 H₂O₂ 催化还原的生物活性。该研究为电化学生物传感器的构建提供了一种新途径; 所制备的 nanoCaCO₃-chit 复合纳米材料不仅可以用于生物传感器的研发, 而且有望用于药物筛选、先进材料和生物电子等领域。随着材料科学的发展和新材料的涌现, 不同学科交叉与融合的增强, 特别是传感器设计理念和技术的进步, 电化学生

物传感器的研究与应用必将在疾病诊断、环境污染物的在线监测、食品安全和卫生保健等诸多方面发挥重要作用。

参考文献 (References)

- [1] M. Diaconu, S. C. Litescu and G. L. Radu. Laccase-MWCNT-chitosan biosensor—A new tool for total polyphenolic content evaluation from *in vitro* cultivated plants. *Sensors and Actuators B*, 2010, 145(2): 800-806.
- [2] F. Li, Z. Wang, W. Chen and S. S. Zhang. A simple strategy for one-step construction of bienzyme biosensor by *in-situ* formation of biocomposite film through electrodeposition. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(10): 3030-3035.
- [3] J. M. Gong, L. Y. Wang, K. Zhao and D. D. Song. One-step fabrication of chitosan-hematite nanotubes composite film and its biosensing for hydrogen peroxide. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(1): 123-126.
- [4] X. L. Luo, J. J. Xu, Y. Du and H. Y. Chen. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 2004, 334(2): 284-289.
- [5] D. Shan, S. X. Wang, H. G. Xue and S. Cosnier. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin entrapped in composite matrix based on chitosan and CaCO₃ nanoparticles. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9: 529-534.
- [6] W. Sun, R. F. Gao and K. Jiao. Electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in Nafion/nano-CaCO₃ film on a new ionic liquid BPPF₆ modified carbon paste electrode. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(17): 4560-4567.
- [7] Y. Du, X. L. Luo, J. J. Xu and H. Y. Chen. A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor. *Bioelectrochemistry*, 2007, 70(2): 342-347.
- [8] J. D. Qiu, R. Wang, R. P. Liang and X. H. Xia. Electrochemically deposited nanocomposite film of CS-Fc/Au NPs/GO_x for glucose biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(4): 2920-2925.
- [9] Y. H. Bai, H. Zhang, J. J. Xu and H. Y. Chen. Relationship between nanostructure and electrochemical/biosensing properties of MnO₂ nanomaterials for H₂O₂/Choline. *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112(48): 18984-18990.
- [10] S. George, K. Lee. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin in nafion/carbon nanochip film on glassy carbon electrode. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(47): 15445-15454.
- [11] C. Y. Wang, C. Y. He, Z. Tong, X. X. Liu, B. Y. Ren and F. Zeng. Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 308(1-2): 160-167.
- [12] W. Y. Cai, Q. Xu, X. N. Zhao, J. J. Zhu and H. Y. Chen. Porous gold-nanoparticle-CaCO₃ hybrid material: Preparation, characterization, and application for horseradish peroxidase assembly and direct electrochemistry. *Chemistry of Materials*, 2006, 18: 279-284.
- [13] D. S. Tsekova, B. Escuder and J. F. Miravet. Solid-state polymorphic transition and solvent-free self-assembly in the growth of organic crystalline microfibers. *Crystal Growth & Design*, 2008, 8(1): 11-13.
- [14] Z. Dai, H. Bai and M. Hong. A novel nitrite biosensor based on the direct electron transfer of hemoglobin immobilized on CdS hollow nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23(12): 1869-1873.
- [15] J. Feng, G. Zhao and J. Xu. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. *Analytical Biochemistry*, 2005, 342(2): 280-286.
- [16] L. Wang, E. Wang. Direct electron transfer between cytochrome C and a gold nanoparticles modified electrode. *Electrochemistry Communications*, 2004, 6(1): 49-54.
- [17] M. K. Wang, Y. Shen and Y. Liu. Direct electrochemistry of microperoxidase 11 using carbon nanotube modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005, 578(1): 121-127.
- [18] W. Sun, R. F. Gao, X. Q. Li, D. D. Wang, M. X. Yang and K. Jiao. Fabrication and electrochemical behavior of hemoglobin modified carbon ionic liquid electrode. *Electroanalysis*, 2008, 20(10): 1048-1054.
- [19] D. Shan, S. X. Wang, H. G. Xue and S. Cosnier. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin entrapped in composite matrix based on chitosan and CaCO₃ nanoparticles. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9: 529-534.
- [20] Y. H. Zhang, X. Chen and W. S. Yang. Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized in zirconium phosphate nanosheets film. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2008, B130(2): 682-688.
- [21] E. Laviron. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1979, 101(1): 19-28.
- [22] Y. L. Wen, X. D. Yang, G. H. Hu, S. H. Chen and N. Q. Jia. Direct electrochemistry and biocatalytic activity of hemoglobin entrapped into gellan gum and room temperature ionic liquid composite system. *Electrochimica Acta*, 2008, 54(2): 744-748.
- [23] Y. D. Zhao, Y. H. Bi, W. D. Zhang and Q. M. Luo. The interface behavior of hemoglobin at carbon nanotube and the detection for H₂O₂. *Talanta*, 2005, 65(2): 489-494.
- [24] H. Y. Ma, N. F. Hu and J. F. Rusling. Electroactive myoglobin films grown layer-by-layer with poly(styrenesulfonate) on pyrolytic graphite electrodes. *Langmuir*, 2000, 16(11): 4969-4975.
- [25] W. Sun, R. F. Gao and K. Jiao. Electrochemistry and electrocatalysis of a Nafion/nano-CaCO₃/Hb film modified carbon ionic liquid electrode using BMIMPF₆ as binder. *Electroanalysis*, 2007, 19(13): 1368-1374.
- [26] A. A. Karyakin, E. A. Puganova, I. A. Budashov, I. N. Kurochkin, E. E. Karyakina, V. A. Levchenko, V. N. Matveyenko and S. D. Varfolomeyev. Prussian blue based nanoelectrode arrays for H₂O₂ detection. *Analytical Chemistry*. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(2): 474-478.
- [27] D. Moscone, D. D'Ottavi, D. Compagnone, G. Palleschi and A. Amine. Construction and analytical characterization of Prussian blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(11): 2529-2535.
- [28] A. A. Karyakin, E. K. Elena and Lo. Gorton. Amperometric biosensor for glutamate using Prussian blue-based "artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(7): 1720-1723.
- [29] F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi and D. Moscone. Prussian blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 18(2-3): 165-174.
- [30] R. A. Kamin, G. S. Wilson. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Analytical Chemistry*, 1980, 52(8): 1198-2005.
- [31] C. H. Fan, H. Y. Wang, S. Sun, D. X. Zhu, G. Wagner and G. X. Li. Electron-transfer reactivity and enzymatic activity of hemoglobin in a SP sephadex membrane. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(13): 2850-2854.
- [32] J. J. Feng, G. Zhao, J. J. Xu and H. Y. Chen. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. *Analytical Biochemistry*, 2005, 342(2): 280-286.