

研究报告

水溶性有机溶剂对 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子过氧化物酶样活性的影响

吴琦, 容杰, 单志, 陈惠, 杨婉身

四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014

摘要: 采用化学共沉淀法合成 10 nm 的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子(MNPs)。以辣根过氧化物酶(HRP)为对照, 研究了四氢呋喃、1,4-二氧六环、丙酮、N,N-二甲基酰胺、甲醇和二甲基亚砷等 6 种水溶性有机溶剂对 Fe₃O₄ MNPs 过氧化物酶样活性的影响。结果表明, 在有机溶剂浓度(V/V)为 30%~75%时, Fe₃O₄ MNPs 相对酶活力迅速下降至近于完全失活。在 15%有机溶液中, Fe₃O₄ MNPs 的最适反应温度多为 50°C, 最适反应 pH 在 3.6 左右。经 15%有机溶液处理后的水相反应酶活显示, Fe₃O₄ MNPs 表现出对有机溶剂较强的热稳定性和 pH 稳定性, 且对 75%有机溶液也具有良好的稳定性。以上多数性质均优于相同条件下的 HRP 组, 表明 Fe₃O₄ MNPs 是一种比 HRP 对水溶性有机溶剂更稳定的过氧化物酶。由于 Fe₃O₄ MNPs 具有易制备、成本低、易于磁分离和可循环使用的特点, 因此其具有替代 HRP 用于有机催化的应用潜力。

关键词: Fe₃O₄ 磁性纳米粒子, 水溶性有机溶剂, 过氧化物酶

Effects of aqueous-organic solvents on peroxidase mimetic activity of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles

Qi Wu, Jie Rong, Zhi Shan, Hui Chen, and Wanshen Yang

College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: We prepared Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs) with the size of 10 nm by chemical coprecipitation. The effects of six aqueous-organic solvents, including tetrahydrofuran, dioxane, acetone, N, N-Dimethylformamide, methylalcohol, and Dimethyl Sulfoxide, on peroxidase mimetic activity of Fe₃O₄ MNPs were studied and compared with that of horseradish peroxidase (HRP). The relative activity of Fe₃O₄ MNPs dropped sharply as the elevation of organic solvent concentration increased from 30% to 75% (V/V). In 15% organic solutions, the optimum activity of Fe₃O₄ MNPs was observed around 50°C, under pH 3.6. After being treated at different temperatures and pH in 15% organic solutions, even under 75% concentration, Fe₃O₄ MNPs still preserved most of the activity when reacting in aqueous phase. The catalytic performances of Fe₃O₄ MNPs under given conditions were generally more superior to that of HRP. For it costs lower and it is easy to be prepared and segregated magnetically for recycle, to use the magnetic nanoparticles as a substitution for HRP has potential to be applied into organic catalysis.

Keywords: Fe₃O₄ magnetic nanoparticles, aqueous-organic solvent, peroxidase

1984年Zaks和Klibanov^[1]首次阐述了酶在有机介质中的催化条件和特点。此后, 对酶在非水介质中

催化特性的研究迅速发展。酶的非水介质催化可使在水相中较难进行的化学反应(如酯化、转酯和肽合

Received: September 24, 2009; Accepted: November 2, 2009

Corresponding author: Qi Wu. Tel: +86-835-2886126; Fax: +86-835-2886136; E-mail: wuqiwig@yahoo.cn
Zhi Shan. E-mail: zhis@tom.com

成等)在有机相中变得容易,有助于解决有机合成中面临的光学活性化合物合成和拆分等难题,并实现糖和类固醇的选择性酰化和功能高分子的合成^[2]。属于过氧化物酶类的辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)能够以过氧化氢作为电子受体,专一催化酚及苯胺类物质的过氧化反应,从而成为催化合成高分子聚合物应用较多的一种酶^[3-5]。但由于酶在有机相反应中存在的共有问题,如有机溶剂的极性和浓度、pH和反应温度等,均对化学本质为蛋白质的HRP的结构产生不利影响,从而降低HRP在有机相中的稳定性和催化效率。因此,有机相中酶活性的改善,成为酶化工领域研究的热点之一。

随着纳米技术的迅速发展,磁性纳米粒子(Magnetic nanoparticles, MNPs)得到广泛研究和关注。Fe₃O₄ MNPs因其生物相容性和化学稳定性,已在磁共振成像、磁热疗、生物分子固定化、分离纯化和控制药物释放等领域得到广泛研究和应用,是最具代表性的新型纳米材料之一^[6]。过去人们认为Fe₃O₄是生物学惰性的,在体内不易发生反应。但2007年,Gao等^[7]首次发现氧化铁纳米粒子具有类似过氧化物酶的催化活性,并就其替代HRP在酶联免疫分析中的可行性进行了分析。基于该发现,Zhang等^[8-9]将其用于含酚废水的处理和酸雨中H₂O₂的检测,Wei等^[10]则将其用于H₂O₂和葡萄糖的检测。在以上应用中,Fe₃O₄ MNPs在稳定性及可回收性上均优于HRP。

作为一种生物酶,HRP价格昂贵,容易失活且不易回收,这大大限制了其在有机反应、有机介质催化和有机废水处理中的应用。而具有类似催化性质的Fe₃O₄ MNPs具有稳定性高、易于从反应体系中磁分离、可回收利用等优点,且成本低廉、合成简单、可大量制备,无论在生物学分析还是工业应用中都不失为理想的HRP替代品。本研究以HRP作为对照,以3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)为底物,研究了多种水溶性有机溶剂中Fe₃O₄ MNPs的过氧化物酶催化活性及其稳定性,为Fe₃O₄ MNPs在有机催化方面的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)购自上海楷洋生

物科技有限公司;HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司;四氢喹啉、1,4-二氧六环、丙酮、N,N-二甲基酰胺、甲醇、二甲亚砜、H₂O₂、FeCl₃·7H₂O、FeSO₄·6H₂O 和 NaOH 等由成都科龙化工试剂厂生产,均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 MNP 的合成

Fe₃O₄ MNPs 的合成参照单志等^[11]的方法,过程如下:在N₂保护下,取20 mL 0.5 mol/L FeSO₄·6H₂O 和 33 mL 0.5 mol/L FeCl₃·7H₂O 混合后加入到100 mL 4 mol/L NaOH 中,63°C、300 r/min 搅拌反应60 min。反应完毕,将其冷却至室温,并用蒸馏水洗至中性。取少量纳米磁性粒子滴到涂炭铜网上进行电镜检测(JEM-2100 F)。

1.2.2 有机溶剂浓度对 Fe₃O₄ MNPs 酶活性的影响

以四氢喹啉、1,4-二氧六环、丙酮、N,N-二甲基酰胺、甲醇和二甲亚砜等6种水溶性有机溶剂为有机成分,分别在pH 3.6 的0%、15%、30%、45%、60%和75%浓度(V/V)下进行以下酶催反应。100 μg Fe₃O₄ MNPs 与终浓度为2%的H₂O₂和500 μmol/L TMB,40°C反应5 min后进行磁分离,移出上清液,加入100 μL的2 mol/L硫酸溶液终止反应,于452 nm下测定吸光度,计算相对酶活。6 ng HRP与终浓度0.2%的H₂O₂和500 μmol/L的TMB在Fe₃O₄ MNPs相同条件下进行反应后,加入100 μL的2 mol/L硫酸溶液终止反应,于452 nm下测定吸光度,计算相对酶活。

1.2.3 反应温度及 pH 对有机溶液中 Fe₃O₄ MNPs 酶活性的影响

在15%的上述6种有机溶液和pH 3.6条件下,分别于4°C、20°C、30°C、40°C、50°C、60°C和70°C进行酶促反应,测定Fe₃O₄ MNPs和HRP的最适反应温度。在15%的上述6种有机溶液和40°C条件下,分别在pH 2.2~12进行酶促反应,测定Fe₃O₄ MNPs和HRP的最适反应pH。不同pH缓冲溶液如下:pH 2.2~3.0(0.2 mol/L Na₂HPO₄-0.1 mol/L 柠檬酸),pH 3.6~5.0(0.2 mol/L NaAC-0.1 mol/L HAC),pH 6.0~8.0(0.2 mol/L Na₂HPO₄-0.2 mol/L NaH₂PO₄),pH 9(0.05 mol/L Tris-HCl),pH 10.0~11.0(0.025 mol/L NaHCO₃-0.1 mol/L NaOH)和pH 12(0.05 mol/L Na₂HPO₄-0.1 mol/L NaOH)。

1.2.4 有机溶液温度及 pH 对 Fe_3O_4 MNPs 稳定性的影响

将 Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 在浓度为 15% 的上述有机溶液 (pH 3.6) 中, 分别于 4°C、20°C、30°C、40°C、50°C、60°C 和 70°C 下处理 2 h 后, 按 1.2.3 的反应体系在不含有有机溶剂的 pH 3.6 水相体系中 40°C 反应 5 min, 测定二者酶活。

将 Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 在浓度为 15% 的上述有机溶液中, 分别于 pH 2.2~12.0 下室温 (20°C) 处理 2 h 后, 按 1.2.3 的反应体系在不含有有机溶剂的 pH 3.6 水相体系中 40°C 反应 5 min, 测定二者酶活。

1.2.5 高浓度有机溶液对 Fe_3O_4 MNPs 稳定性的影响

在室温 (20°C) 下, 将 Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 在 75% 的上述有机溶液中分别处理 2 h 后, 按 1.2.3 的反应体系在不含有有机溶剂的 pH 3.6 水相体系中 40°C 反应 5 min, 测定二者酶活。

2 结果与分析

2.1 Fe_3O_4 MNPs 的合成与检测

水相合成 Fe_3O_4 MNPs 的透射电镜图像见图 1。由图 1 可以看出, 制备的 Fe_3O_4 MNPs 为大小较均匀、直径 10 nm 左右的球体。

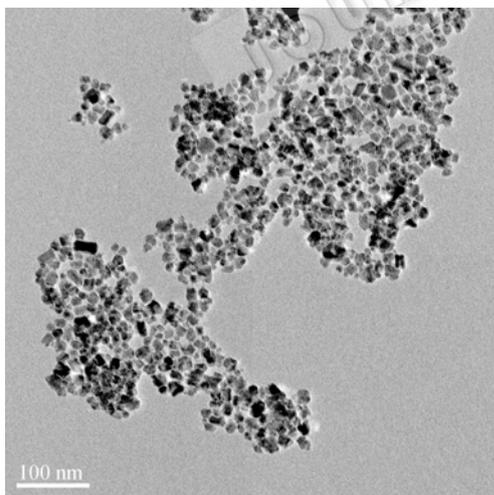


图 1 Fe_3O_4 MNPs 的透射电镜图像 (TEM)

Fig. 1 TEM image of Fe_3O_4 MNPs.

2.2 有机溶剂浓度对 Fe_3O_4 MNPs 酶活性的影响

四氢呋喃、1,4-二氧六环、丙酮、N,N-二甲基酰胺、甲醇和二甲亚砜等 6 种水溶性有机溶剂浓度对

Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 酶活性见图 2。结果显示, 在各种不同浓度有机溶液中, Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 催化活性随有机溶剂浓度变化的趋势相似, 即相对酶活力均随有机溶剂浓度的增加而降低, 但 HRP 相对酶活力均高于 Fe_3O_4 MNPs。在 30% 有机溶剂浓度以上时, Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 酶活力迅速下降; 在 75% 有机溶剂浓度时, 所有酶活接近完全失活。其中, 四氢呋喃和二甲亚砜对 Fe_3O_4 MNPs 的酶活力影响最为剧烈, 当其浓度为 30% 时, MNPs 已接近完全失活。而对 HRP 酶活影响最大的是四氢呋喃。从极性来看, 极性较弱的四氢呋喃和极性较强的二甲亚砜均对 Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 影响较大, 而中间极性的影响相对较小。

2.3 反应温度对有机溶液中 Fe_3O_4 MNPs 酶活性的影响

选择对 Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 影响较小的 15% 有机溶剂浓度, 测定温度对酶活的影响, 结果见图 3。结果表明, 除二氧六环中 Fe_3O_4 MNPs 的最适反应温度为 40°C 外, 在其余有机溶液中均为 50°C。而 HRP 在丙酮中最适反应温度为 40°C, 在 N,N-二甲基酰胺中为 50°C, 在其余有机溶液中均为 20°C~30°C, 较 MNPs 低 20°C~30°C。从相对酶活来看, 除丙酮和 N,N-二甲基酰胺外的各有机溶液外, Fe_3O_4 MNPs 在高温段比 HRP 表现出较高的相对酶活, 而在低温段则相反, 暗示 Fe_3O_4 MNPs 可能具有良好的热稳定性。特别是在四氢呋喃和二甲亚砜中 60°C 和 70°C 时, Fe_3O_4 MNPs 仍然具有较高的酶催化活性, 而 HRP 近于完全失活。而有机溶剂极性对二者的温度曲线未见规律性影响。

2.4 反应 pH 对有机溶液中 Fe_3O_4 MNPs 酶活性的影响

选择对 Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 影响较小的 15% 有机溶剂浓度, 测定 pH 对酶活的影响, 结果见图 4。结果表明, 在 pH 2.2~12 条件下, Fe_3O_4 MNPs 和 HRP 在各有机溶液中的酶活随 pH 变化的趋势相似, 其最适反应 pH 均在 3.6 左右。在 pH 3.6 的四氢呋喃、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺和甲醇溶液中, Fe_3O_4 MNPs 均显示出比 HRP 更高的相对催化活性, 暗示 Fe_3O_4 MNPs 的耐酸性较强。在 pH 4 的四氢呋喃中, Fe_3O_4 MNPs 活性迅速丧失, 而 HRP 的相对酶活在 26.22% 以上; 而在 12 > pH 4 的二甲亚砜中,

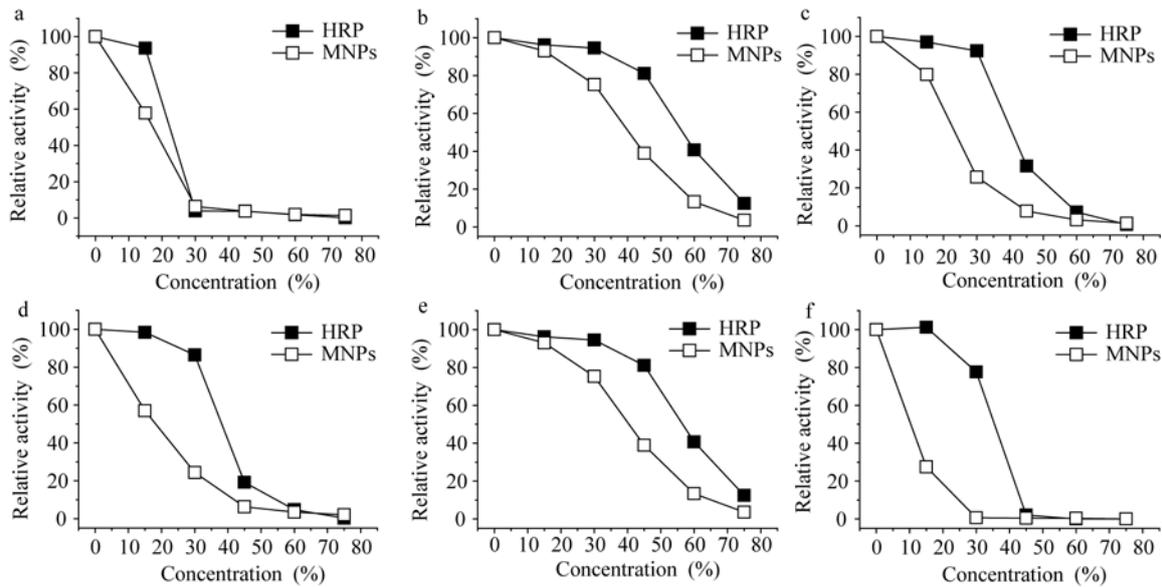


图 2 有机溶剂浓度对 Fe₃O₄ MNPs 酶活性的影响

Fig. 2 Effects of organic concentration on the activity of Fe₃O₄ MNPs. (a) Tetrahydrofuran. (b) Dioxane. (c) Acetone. (d) N,N-dimethyl formamide. (e) Methanol. (f) Dimethyl sulfoxide.

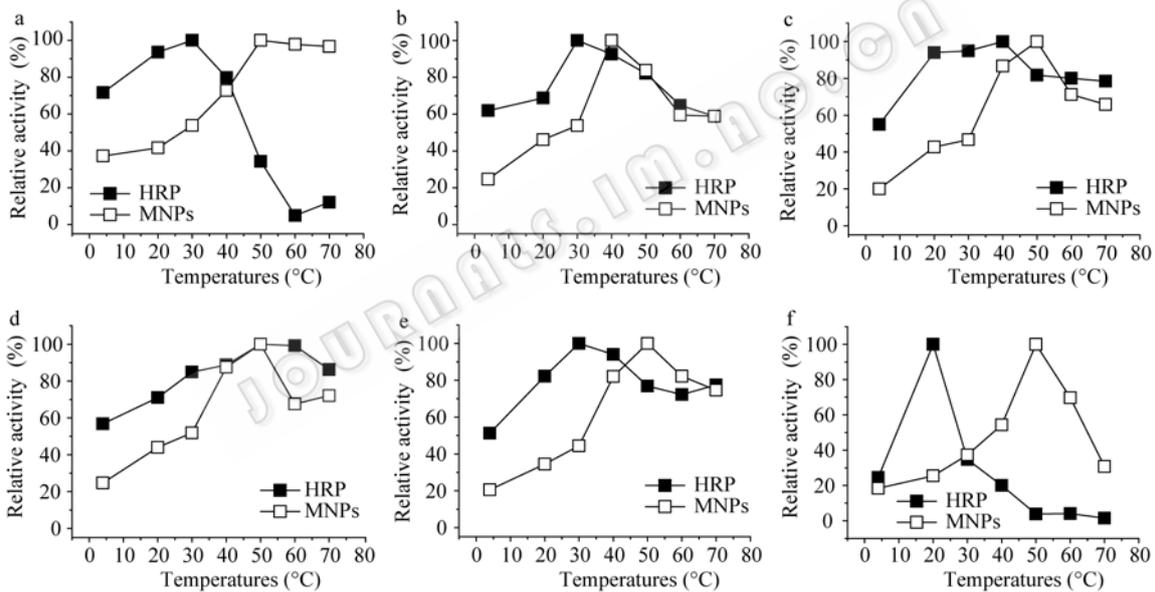


图 3 反应温度对有机溶液中 Fe₃O₄ MNPs 酶活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the activity of Fe₃O₄ MNPs in aqueous organic solutions. (a) Tetrahydrofuran. (b) Dioxane. (c) Acetone. (d) N,N-dimethyl formamide. (e) Methanol. (f) Dimethyl sulfoxide.

Fe₃O₄ MNPs 比 HRP 的相对酶活平均高近 20%。可见, 极性较弱的四氢呋喃对 Fe₃O₄ MNPs 影响较大, 而极性较强的二甲亚砜对 HRP 影响较大。而在 pH 5 的其他溶液中, Fe₃O₄ MNPs 和 HRP 的酶活均迅速降低至近于完全失活, 表明中间极性有机溶剂对二者影响相似。

2.5 有机溶液温度对 Fe₃O₄ MNPs 稳定性的影响

用 15% 有机溶液不同温度下处理 Fe₃O₄ MNPs

和 HRP, 在水相测定其酶催活性, 结果见图 5。结果表明, Fe₃O₄ MNPs 基本未受有机溶液处理温度影响, 除 1,4-二氧六环经 70°C 处理后相对酶活略低于 70% 外, 其余温度处理的相对酶活均在 90% 左右及以上, 显示 Fe₃O₄ MNPs 在有机溶液中具有很强的热稳定性。而 HRP 在处理温度高于 30°C 后, 相对酶活力迅速下降, 并在 70°C 处理后近于完全失活, 显示

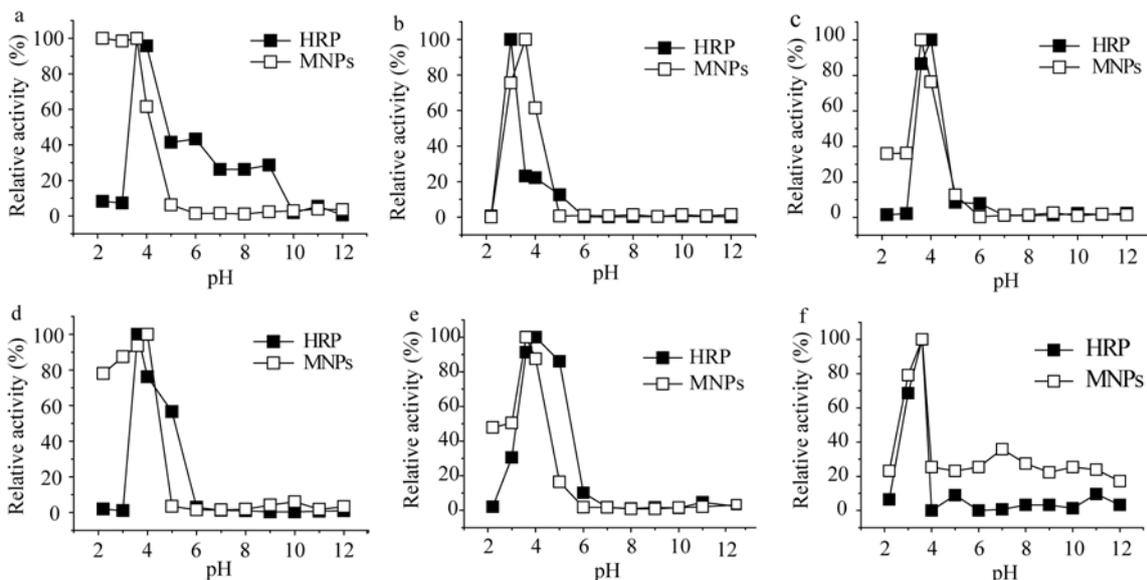


图 4 反应 pH 对有机溶液中 Fe₃O₄ MNPs 酶活性的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity of Fe₃O₄ MNPs in aqueous organic solutions. (a) Tetrahydrofuran. (b) Dioxane. (c) Acetone. (d) N,N-dimethyl formamide. (e) Methanol. (f) Dimethyl sulfoxide.

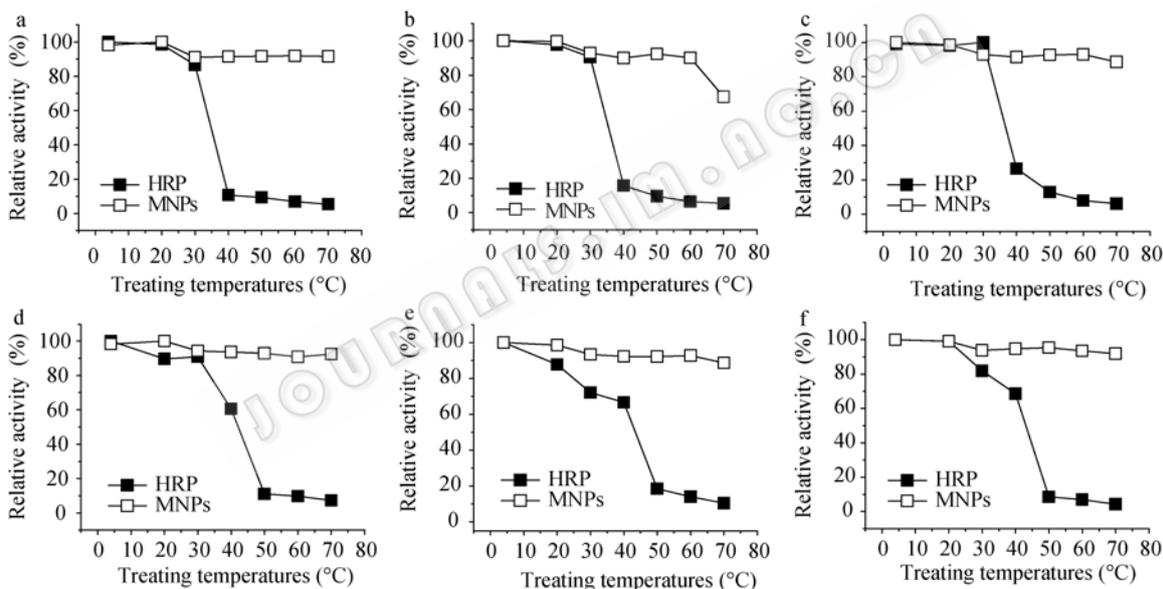


图 5 有机溶液处理温度对 Fe₃O₄ MNPs 稳定性的影响

Fig. 5 Effects of treatment temperature of organic solutions on the stability of Fe₃O₄ MNPs. (a) Tetrahydrofuran. (b) Dioxane. (c) Acetone. (d) N,N-dimethyl formamide. (e) Methanol. (f) Dimethyl sulfoxide.

HRP 在有机溶液中的热稳定性较差。此外，有机溶剂极性对二者在有机溶液中的温度稳定性未见规律性影响。

2.6 有机溶液 pH 对 Fe₃O₄ MNPs 稳定性的影响

经在 15% 有机溶液中做不同 pH 处理后的 Fe₃O₄ MNPs 和 HRP 在水相测定其酶催化活性，结果见图 6。

结果表明，Fe₃O₄ MNPs 相对酶活均在 60% 以上。在 pH 4 处理条件下，Fe₃O₄ MNPs 比 HRP 的相对酶活高 20%~70%；在 pH 11 处理条件下，Fe₃O₄ MNPs 比 HRP 的相对酶活高 20%~60%，表明 Fe₃O₄ MNPs 比 HRP 具有更强的有机溶液 pH 稳定性。此外，有机溶剂极性对二者在有机溶液中的 pH 稳定性未见规律性影响。

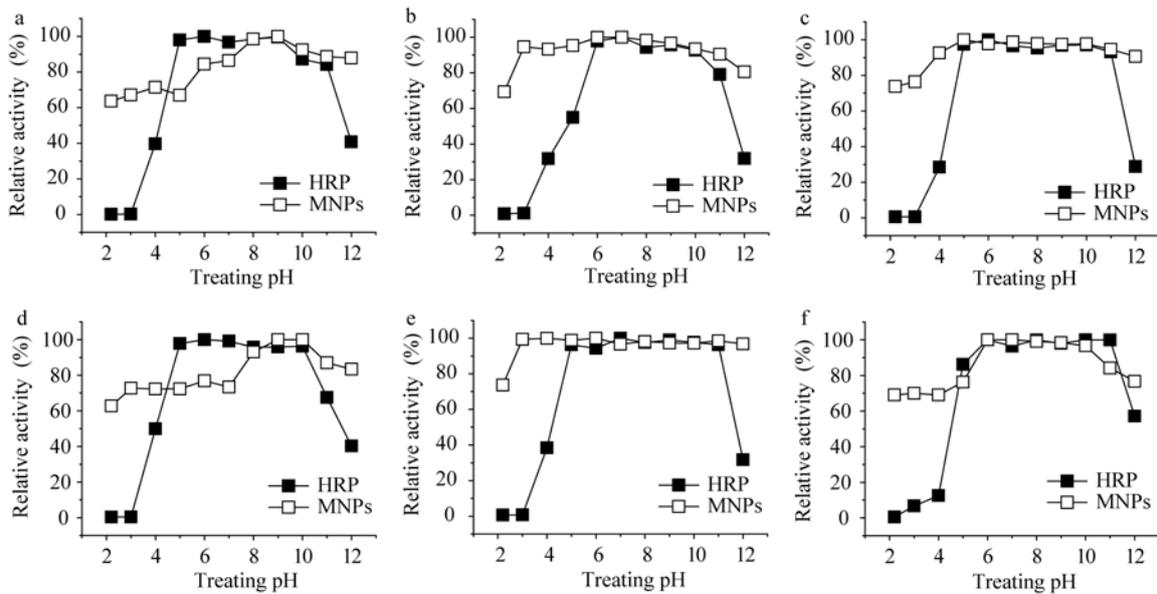


图 6 有机溶液 pH 对 Fe₃O₄ MNPs 稳定性的影响

Fig. 6 Effects of treatment pH of organic solutions on the stability of Fe₃O₄ MNPs. (a) Tetrahydrofuran. (b) Dioxane. (c) Acetone. (d) N, N-dimethyl formamide. (e) Methanol. (f) Dimethyl sulfoxide.

2.7 高浓度有机溶液对 Fe₃O₄ MNPs 稳定性的影响

经 75%有机溶液处理后的 Fe₃O₄ MNPs 和 HRP 在水相中的剩余酶活见图 7。结果表明, 高浓度的四氢呋喃、丙酮和甲醇在室温下未对 Fe₃O₄ MNPs 和 HRP 造成明显影响, 剩余酶活均在 90%以上; 而经二氧六环、N,N-二甲基酰胺和二甲亚砷处理后的 Fe₃O₄ MNPs 剩余酶活力为 97.64%、94.6%和 93.92%, 远高于 HRP 的 40.07%、64.71%和 14.69%。图 8 以 75% 二甲亚砷处理组为例, 证明处理后的 Fe₃O₄ MNPs 比 HRP 具有更高剩余酶催活性, 反应体系颜色差异明显。由于所有处理组的 MNPs 剩余酶活力均在 91%以上, 显示其对高浓度水溶性有机溶液具有较强的稳定性。

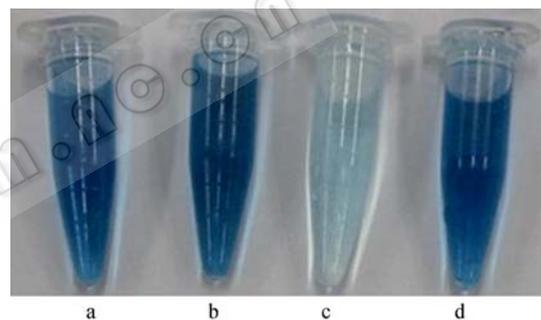


图 8 经 75%二甲亚砷处理后 Fe₃O₄ MNPs 的稳定性

Fig. 8 Stability of Fe₃O₄ MNPs after treatment in 75% dimethyl sulfoxide. (a) MNPs treated. (b) MNPs CK. (c) HRP treated. (d) HRP CK.

3 讨论

随着非水介质中酶催化机制的研究, 使得酶的应用面逐渐向有机化工, 特别是制药行业扩展。酶不仅可用于有机合成, 也可以用于某些有机废水的无害化处理。但由于酶在非水介质特别是有机介质中的稳定性欠佳, 限制了其应用。就 HRP 而言, 尽管在有机介质中可催化聚合反应^[12], 也可用于含酚废水的处理^[13], 但有机成分浓度和体系 pH 均可引起酶结构不稳定, 导致酶活损失。而 Fe₃O₄ MNPs 过氧化物酶活性的发现, 无疑为磁性纳米材料在有机催化方面的应用开辟新的领域。本研究表明, 与 HRP 相比, Fe₃O₄ MNPs 在 15%的四氢呋喃、1,4-二氧

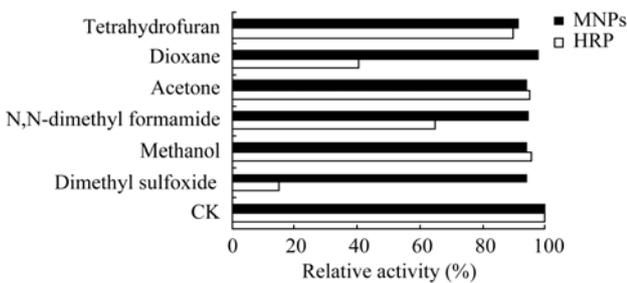


图 7 高浓度有机溶液对 Fe₃O₄ MNPs 稳定性的影响

Fig. 7 Stability of Fe₃O₄ MNPs in high concentration organic solutions.

六环、丙酮、N,N-二甲基酰胺、甲醇和二甲基亚砷溶液中,其最适反应 pH 受有机溶剂影响小,最适反应温度更高,且温度稳定性更好。此外,在有机溶剂浓度、反应 pH 和 pH 稳定性试验中,Fe₃O₄ MNPs 和 HRP 的催化活性与有机溶剂极性有一定相关性;而在反应温度和热稳定性试验中,二者的催化活性变化与有机溶剂极性没有明显相关性。可见,有机溶剂浓度和 pH 条件是二者的主要影响因素。

已有的研究表明 HRP 及 Fe₃O₄ MNPs 的过氧化物酶活性均依赖于 Fe²⁺ 的存在,均符合乒乓催化机制^[7]。Fe₃O₄ MNPs 的催化活性还依赖于其纳米尺度,而 HRP 的催化活性则依赖于其正确的蛋白空间结构和关键氨基酸的存在^[14-16]。生物酶暴露于高浓度有机溶液、高温和极端 pH 环境中时,常产生不可逆的酶蛋白变性而失活。对于 Fe₃O₄ MNPs,有机溶剂则可能是通过破坏其表面催化微环境导致其催化活性降低或失活。然而,Fe₃O₄ MNPs 为无机材料,整个颗粒结构具有刚性,其表面性质相对稳定,对环境条件变化的耐受性较强,且与仅有一个金属活性中心的 HRP 相比其表面存在更多的 Fe²⁺^[7]。因此,移除相应不利因素后,Fe₃O₄ MNPs 更易恢复原有酶活,显示出良好的稳定性。

Fe₃O₄ MNPs 易制备,成本低廉,容易磁性回收,可反复使用,对环境友好^[8],而且其在有机溶液中的诸多性质明显优于 HRP。这些特点为 Fe₃O₄ MNPs 替代 HRP 用于有机催化展示了良好的应用前景,具有重要的潜在开发价值。

本研究根据 HRP 有机介质催化特点而选择了 6 种极性较强的有机溶剂^[17],反应体系为有机溶剂的水溶液,并非完全有机相催化。进一步发现,在有机相中合成的油酸包覆的疏水性 Fe₃O₄ MNPs,在非极性有机溶剂中也表现出过氧化物酶催化活性。该发现对 Fe₃O₄ MNPs 催化机理的揭示有重要价值。由于油酸包覆的 Fe₃O₄ MNPs 能更好地分散到多种有疏水性有机溶剂中去,这种性质能否很好地解决有机催化生产的关键与瓶颈,还有待深入研究。

REFERENCES

- [1] Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, 1984, **224**(4654): 1249–1251.

- [2] Luo GM, Cao SG, Zhang J. *Enzyme Engineering*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 139–206.
罗贵民, 曹淑桂, 张今. *酶工程*. 北京: 化学工业出版社, 2004: 139–206.
- [3] Ayyagari MS, Marx KA, Tripathy SK, *et al.* Controlled free-radical polymerization of phenol derivatives by enzyme-catalyzed reactions in organic solvents. *Macromolecules*, 1995, **28**(15): 5192–5197.
- [4] Akkara JA, Senecal KJ, Kaplan DL. Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane. *J Polym Sci Pol Chem*, 1991, **29**(11): 1561–1574.
- [5] Berglund J, Pascher T, Winkler JR, *et al.* Photoinduced oxidation of horseradish peroxidase. *J Am Chem Soc*, 1997, **119**(10): 2464–2469.
- [6] Laurent S, Forge D, Port M, *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 2008, **108**(6): 2064–2110.
- [7] Gao L, Zhuang J, Nie L, *et al.* Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(9): 577–583.
- [8] Zhang J, Zhuang J, Gao L, *et al.* Decomposing phenol by the hidden talent of ferromagnetic nanoparticles. *Chemosphere*, 2008, **73**(9): 1524–1528.
- [9] Zhuang J, Zhang J, Gao L, *et al.* A novel application of iron oxide nanoparticles for detection of hydrogen peroxide in acid rain. *Mater Lett*, 2008, **62**(24): 3972–3974.
- [10] Wei H, Wang E. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their application in H₂O₂ and glucose detection. *Anal Chem*, 2008, **80**(6): 2250–2254.
- [11] Shan Z, Yang WS, Zhang X, *et al.* Preparation and characterization of carboxyl-group functionalized superparamagnetic nanoparticles and the potential for bio-applications. *J Braz Chem Soc*, 2007, **18**(7): 1329–1335.
- [12] Won K, Kim YH, An ES, *et al.* Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of cardanol in the presence of redox mediators. *Biomacromolecules*, 2004, **5**(1): 1–4.
- [13] Wagner M, Nicell JM. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Sci Technol*, 2001, **43**(2): 253–260.
- [14] Li DJ, Hu SY, Zou GL. Progress of the mimetic enzyme of horseradish peroxidase. *Amino Acids Biotic Resour*, 2003, **25**(4): 43–47.
李得加, 胡绍云, 邹国林. 辣根过氧化物酶模拟酶研究进展. *氨基酸和生物资源*, 2003, **25**(4): 43–47.
- [15] Ator MA, David SK, Ortiz de Montellano PR. Structure and catalytic mechanism of horseradish peroxidase. *Regiospecific meso* alkylation of the prosthetic heme group by alkylhydrazines. *J Biol Chem*, 1987, **262**(31): 14954–14960.
- [16] Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, *et al.* Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**(12): 1032–1038.
- [17] Wang TL. The chemical modification of horseradish peroxidase. Guangzhou: Zhongshan University, 2004: 27–36.
王腾利. 辣根过氧化物酶的化学修饰及其应用. 广州: 中山大学, 2004: 27–36.