

分析测试

负载普鲁士蓝的 CoOOH 纳米片 用于抗氧化活性检测的研究

王青, 刘学*, 孙亚娟, 杨成

(江南大学化学与材料工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要:为寻找一种方便、稳定、快速的途径来评估抗氧化剂的抗氧化能力,采用一种简单、经济的方法制备负载普鲁士蓝(PB)的羟基氧化钴纳米片(PB-CoOOH NFs)。以对苯二甲酸(TA)为荧光探针研究了PB-CoOOH NFs酶促反应的机制,基于PB-CoOOH NFs/TMB/H₂O₂体系对10种常见的抗氧化剂进行了抗氧化活性测定(TMB为3,3',5,5'-四甲基联苯胺)。结果表明,CoOOH纳米片的过氧化物模拟酶活性随着普鲁士蓝的引入而增强。相比天然酶(HRP),PB-CoOOH NFs具有更小的K_m值,对底物的亲和力更高。在一定浓度范围内,10种抗氧化剂测得的吸光度差与浓度呈良好的线性关系,相关系数(R²)均大于0.994,检出限为0.082~0.315 μmol/L,与其他检测抗氧化活性的方法相比灵敏度更高。

关键词:普鲁士蓝;羟基氧化钴;过氧化物模拟酶;抗氧化剂;抗氧化活性

中图分类号:TQ658

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2023)02-0234-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.02.044

CoOOH nanoflakes loaded with Prussian blue for detection of antioxidative activity

WANG Qing, LIU Xue*, SUN Ya-juan, YANG Cheng

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

Abstract:In order to seek for a convenient, stable and rapid way to evaluate the antioxidative capacity of antioxidant, Prussian blue (PB) loaded cobalt oxyhydroxide nanoflakes (PB-CoOOH NFs) are prepared through a simple and economical method. The mechanism of enzymatic reaction of PB-CoOOH NFs is investigated with terephthalic acid (TA) as a fluorescent probe. The antioxidative activity of 10 kinds of common antioxidants are determined based on PB-CoOOH NFs/TMB/H₂O₂ system (TMB is 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). The results show that the peroxidase-mimicking activity of CoOOH can be enhanced with the addition of PB. Compared with natural enzymes (HRP), PB-CoOOH NFs has smaller K_m value and higher affinity for substrates. The measured absorbance differences of the 10 kinds of antioxidants show a good linearity with their concentrations in a certain concentration range, and the correlation coefficients (R²) are all greater than 0.994. The detection limits range from 0.082 to 0.315 μmol·L⁻¹, showing a more sensitivity than other methods for the detection of antioxidative activity.

Key words:Prussian blue; cobalt oxyhydroxide; peroxidase mimetic enzyme; antioxidant; antioxidative activity

抗氧化剂可以保护身体免受因活性氧(ROS)过量产生而引起的氧化损伤^[1]。一般情况下,抗氧化剂的添加量需要根据其抗氧化能力来决定。因此,开发一种方便、稳定、快速的途径来评估抗氧化剂的抗氧化能力是非常必要的。目前,有许多方法用于测定抗氧化活性,包括 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、ABTS(2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、ORAC(氧自由基吸收能力)、FRAP(铁还原抗氧化能力)^[2-3]。基于纳米粒子也可用于测定抗氧化能力,纳米酶(定义为具有类似酶特性

的纳米材料)在检测抗氧化剂和评估抗氧化行为方面具有巨大潜力^[4-7]。

羟基氧化钴纳米薄片(CoOOH NFs)表现出类似过氧化物酶的活性,可有效地催化发色底物的转化^[8-9]。Jin等^[9]设计了一种使用胆碱氧化酶/CoOOH系统的比色纸基传感器,CoOOH NFs作为模拟酶催化H₂O₂氧化TMB,实现了对乙酰胆碱酯酶的快速检测。

普鲁士蓝与(PB)Fe₃O₄结构相似,已被证明是一种极好的纳米酶,活性甚至可以超过天然酶

收稿日期:2022-03-02;修回日期:2022-11-30

基金项目:国家自然科学基金项目(51903108)

作者简介:王青(1997-),女,硕士生;刘学(1983-),男,博士,副教授,研究方向为天然活性物的开发,通讯联系人,xueliu@jiangnan.edu.cn。

HRP。而PB呈现的蓝色及其在水溶液中的分散性差阻碍了其在比色分析中的应用^[10-11]。

本文中制备了负载PB的CoOOH纳米片,建立了一种以PB-CoOOH NFs为模拟酶快速测定抗氧化能力的方法,在此基础上对10种常见抗氧化剂进行抗氧化能力的测定。

1 仪器与试剂

数显电子分析天平,上海天平仪器厂生产;集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司生产;数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司生产;离心机,德国Eppendorf公司生产;电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏仪器设备有限公司生产;pH计,瑞士METTLER TOLEDO公司生产;多功能微孔板酶标仪,美国BioTek公司生产;X射线衍射仪,德国Bruker AXS公司生产;透射电子显微镜,美国FEI公司生产。

FeCl₃·6H₂O、K₃[Fe(CN)₆]、NaClO,购自上海泰坦科技股份有限公司;CoCl₂·6H₂O、NaOH、30% H₂O₂、抗坏血酸,购自国药集团化学试剂有限公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺、没食子酸、对苯二甲酸,购自上海阿达玛斯试剂有限公司;水溶性维生素E(Trolox)、儿茶素、咖啡酸、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;槲皮素,购自上海麦克林生化科技有限公司;表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),购自上海创赛科技有限公司;阿魏酸、芦丁,购自北京伊诺凯科技有限公司。

2 实验方法

2.1 CoOOH NFs 与 PB-CoOOH NFs 的制备

CoOOH NFs 参考了之前文献报道的合成方法,稍做修改^[8]。将600 μL NaOH溶液(1.0 mol/L)与2 mL CoCl₂溶液(10 mmol/L)混合,超声10 min,加入适量NaClO溶液到上述溶液中,超声20 min后,用超纯水离心洗涤沉淀3次,烘干后备用,所得产物分散在超纯水中。

PB NPs 在CoOOH上的负载参考了Vázquez-González等^[12]的方法,做了一定的修改。在搅拌条件下将15 μL柠檬酸溶液(1 mol/L)和300 μL FeCl₃溶液(0.1 mol/L)加入到30 mL CoOOH(66 μg/mL)溶液中,加热至60℃。随后,滴加30 mL K₄[Fe(CN)₆]溶液(1 mmol/L)。磁力搅拌

5 min,自然冷却至室温。用超纯水离心洗涤沉淀3次,烘干后备用,将所得产物再分散在超纯水中。

2.2 PB-CoOOH NFs 的过氧化物模拟酶活性

160 μL NaAc-HAc缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.0)、10 μL TMB溶液(2 mmol/L)、10 μL H₂O₂溶液(0.2 mol/L)和10 μL PB-CoOOH溶液(15 μg/mL)依次加入96孔板,充分反应后,利用酶标仪对整个体系的吸收光谱进行扫描。

2.3 PB-CoOOH NFs 的稳态动力学研究

分别固定H₂O₂(2 mmol/L)和TMB(2 mmol/L)底物的浓度,测定纳米酶对另一不同浓度底物的稳态动力学曲线。160 μL NaAc-HAc缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.0)、10 μL TMB溶液、10 μL H₂O₂溶液和10 μL PB-CoOOH溶液(15 μg/mL)依次加入96孔板,立即使用酶标仪对体系进行时间驱动扫描,在653 nm处每隔1 min测定反应初始10 min内的吸光度。

2.4 抗氧化活性检测及机理研究

选用对苯二甲酸(TA)作为荧光探针捕捉羟基自由基^[13]。具体步骤为,将10 μL纳米酶溶液(15 μg/mL)、20 μL TA溶液(2 mmol/L)和10 μL H₂O₂溶液(0.2 mol/L)在160 μL NaAc-HAc缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.0)中室温反应15 min,设置激发波长为315 nm,然后通过酶标仪测定荧光强度。

抗氧化活性检测:160 μL NaAc-HAc缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.0)、10 μL TMB溶液(2 mmol/L)、10 μL H₂O₂溶液(0.2 mol/L)、10 μL不同浓度的抗氧化剂溶液和10 μL PB-CoOOH溶液(15 μg/mL)依次加入96孔板,室温下反应20 min,用酶标仪测定吸光度。

3 结果与分析

3.1 PB-CoOOH NFs 的表征

图1(a)为所制备的CoOOH的XRD衍射图。在20.24°、38.89°和50.58°处出现的衍射峰分别对

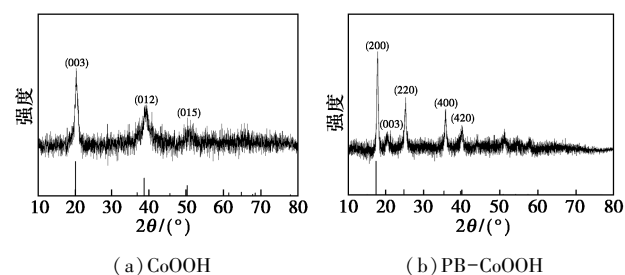
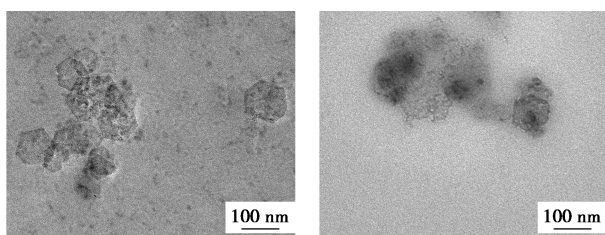


图1 CoOOH和PB-CoOOH的XRD衍射图

应于 CoOOH (JCPDS 编号为 73-0497) 的 (003)、(012) 和 (015) 晶面。如图 1(b) 所示, 负载 PB 后, 在 17.50°、24.84°、35.42° 和 39.76° 处检测到新的衍射峰, 与 PB (JCPDS 编号为 73-0687) 的 (200)、(220)、(400) 和 (420) 晶面一致。

采用透射电子显微镜对合成材料的形态进行了表征。图 2(a) 显示出 CoOOH 为薄层片状结构, 形貌为六边形纳米片, 与文献报道的结构符合^[8]。图 2(b) 则显示了 PB 纳米粒子负载在 CoOOH 纳米片上。

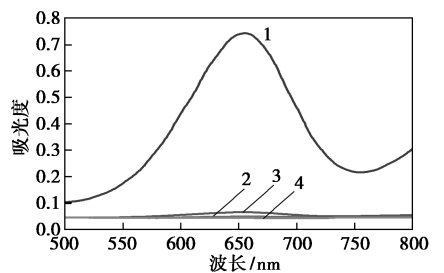


(a) CoOOH NFs (b) PB-CoOOH NFs

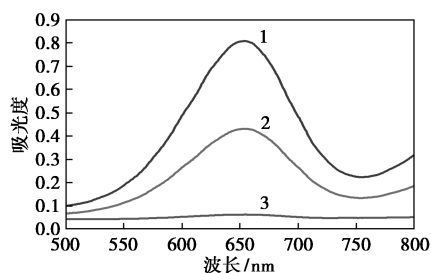
图 2 CoOOH NFs 和 PB-CoOOH NFs 的 TEM 图

3.2 PB-CoOOH NFs 的过氧化物模拟酶活性

PB-CoOOH NFs 的过氧化物酶样活性实验结果见图 3。由图 3(a) 可知, TMB 底物在 PB-CoOOH NFs 的催化下被 H₂O₂ 迅速氧化为蓝色产物 TMB_{ox}, 在 653 nm 处显示出特征吸收峰。而在 PB-CoOOH NFs/



1—TMB/H₂O₂/PB-CoOOH; 2—TMB/PB-CoOOH;
3—TMB/H₂O₂; 4—TMB



1—TMB/H₂O₂/PB-CoOOH; 2—TMB/H₂O₂/PB;
3—TMB/H₂O₂/CoOOH

图 3 不同反应体系的紫外-可见光谱

H₂O₂/TMB 体系中缺少 H₂O₂、TMB 或 PB-CoOOH NFs 的对照实验中, 吸光度没有明显增加。另外, 如图 3(b) 所示, 不同催化剂体系在 653 nm 处特征吸收峰的吸光度差异明显。PB-CoOOH NFs 在 653 nm 处的吸光度远大于 CoOOH NFs 和 PB NFs 的吸光度, 表现出过氧化物模拟酶活性增强。

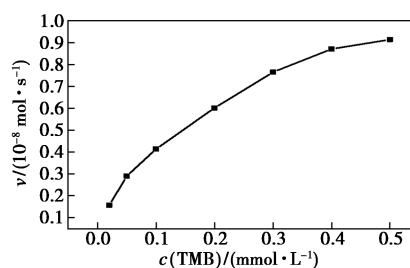
3.3 PB-CoOOH NFs 的稳态动力学研究

为了进一步比较 PB-CoOOH NFs 的过氧化物酶样活性, 采用酶动力学理论和方法, 保持 TMB 或 H₂O₂ 浓度不变的条件下, 改变另一底物浓度来测量反应的稳态动力学参数, 初始速度对 TMB 和 H₂O₂ 浓度的关系符合 Michaelis-Menten 模型。动力学参数 Michaelis-Menten 常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max}) 可由 Lineweaver-Burk 拟合方程获得, 方程如下:

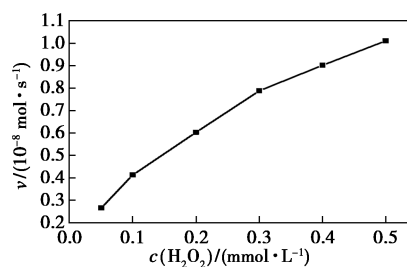
$$1/\nu = (K_m/V_{max})(1/[S] + 1/K_m)$$

式中, ν 为初始速度; K_m 为 Michaelis-Menten 常数; V_{max} 为最大反应速度; $[S]$ 为底物的浓度。

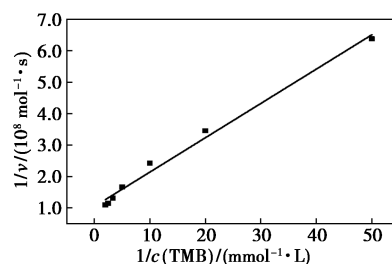
如图 4(a) 和 (b) 所示, 随着底物浓度的增加, 催化初速度逐渐提高, 并在高浓度渐渐趋于饱和, 符合 Michaelis-Menten 方程模型。由图 4(c) 可知, 在



(a)



(b)



(c)

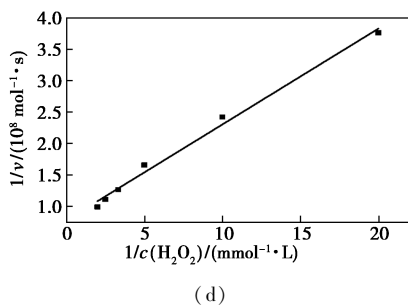


图4 PB-CoOOH NFs 模拟过氧化物酶的
稳态动力学研究

双倒数曲线图中,催化初速度和 TMB 浓度呈现出良好的线性关系。

表1将PB-CoOOH NFs、CoOOH NFs的 K_m 和 V_{max} 值与HRP^[7]进行了比较。已知 K_m 是酶对底物的亲和力的指标, K_m 值越低代表亲和力越强。与HRP相比,以TMB和 H_2O_2 为底物的PB-CoOOH NFs的 K_m 值较低,表明PB-CoOOH NFs对2种底物都具有更高的亲和力。与CoOOH NFs相比,PB-CoOOH NFs的 K_m 值显著降低,这表明负载PB NPs后催化剂的亲和力大大提高。

表1 比较PB-CoOOH、CoOOH和HRP之间的
Michaelis-Menten常数(K_m)和最大反应速率(V_{max})

催化剂	$K_m/(mmol \cdot L^{-1})$		$V_{max}/(10^{-8} mol \cdot s^{-1})$	
	TMB	H_2O_2	TMB	H_2O_2
PB-CoOOH	0.105	0.196	1.046	0.779
CoOOH	0.146	0.253	1.301	0.946
HRP	0.275	0.214	1.240	2.460

3.4 抗氧化活性检测机理研究

与 Fe_3O_4 NPs和HRP类似,PB-CoOOH NFs/ TMB/H_2O_2 的反应符合乒乓机制。为了验证这一过程,选用TA作为荧光探针,TA本身没有荧光,但与

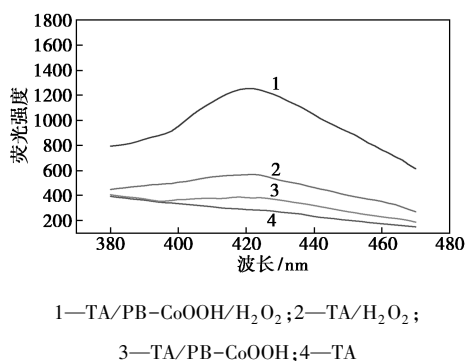


图5 TA、PB-CoOOH和 H_2O_2 不同组合的
荧光光谱

$\cdot OH$ 反应后会形成荧光物质,在425 nm左右产生独特的荧光。

如图5所示,在 H_2O_2 中添加PB-CoOOH NFs后,荧光强度显著增加,说明该体系中产生了足够的 $\cdot OH$ 与TA反应生成荧光物质,表明了PB-CoOOH NFs过氧化物酶反应中羟基自由基的产生过程。

3.5 抗氧化剂的检测分析

采用PB-CoOOH NFs/ TMB/H_2O_2 体系测定10种不同抗氧化剂的抗氧化活性,结果如表2所示。从表2得知,PB-CoOOH NFs/ TMB/H_2O_2 测定法可用于检测常见的抗氧化剂,检出限为0.082~0.315 $\mu mol/L$,比其他的抗氧化活性测定法灵敏度更高^[14-16]。

表2 PB-CoOOH NFs/ TMB/H_2O_2 测定法
对不同抗氧化剂的分析结果

抗氧化剂	线性方程	线性范围/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	R^2	LOD/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	LOQ/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
没食子酸	$A = 5.75 \times 10^4 C + 0.0638$	1~20	0.998	0.096	0.320
槲皮素	$A = 5.40 \times 10^4 C - 0.0024$	2~20	0.999	0.102	0.340
咖啡酸	$A = 6.06 \times 10^4 C + 0.0213$	1~20	0.998	0.091	0.303
儿茶素	$A = 2.48 \times 10^4 C + 0.0275$	2~20	0.996	0.222	0.741
Trolox	$A = 2.96 \times 10^4 C + 0.0658$	1~20	0.999	0.186	0.621
阿魏酸	$A = 5.60 \times 10^4 C - 0.0267$	2~20	0.995	0.098	0.328
芦丁	$A = 1.75 \times 10^4 C + 0.0020$	5~50	0.995	0.315	1.050
抗坏血酸	$A = 2.66 \times 10^4 C + 0.0128$	5~100	0.996	0.207	0.691
BHT	$A = 2.37 \times 10^4 C + 0.0259$	2~25	0.998	0.233	0.775
EGCG	$A = 6.69 \times 10^4 C + 0.0398$	1~10	0.997	0.082	0.275

为了进一步比较不同类型纳米酶的性能,将PB-CoOOH与其他类型的纳米酶关于检测抗坏血酸的结果进行了比较^[17-21]。与表3中其他纳米酶检测抗坏血酸的结果相比,本方法的灵敏度更佳。

表3 不同类型纳米酶关于检测抗坏血酸的结果比较

纳米酶	线性范围/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	LOD/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
FeMnzyme ^[17]	8~56	0.880
Co-POP ^[18]	20~400	1.600
CuFe ₂ O ₄ @PPy ^[19]	0~20	0.500
PAN-CuO ^[20]	1~180	0.560
Pal@Co ₃ O ₄ ^[21]	1~60	0.700
PB-CoOOH	5~100	0.207

4 结论

制备了一种新型的纳米材料 PB-CoOOH NFs。由于 PB 和 CoOOH 具有协同效应, PB-CoOOH NFs 的过氧化物酶模拟活性增强。与天然酶 HRP 相比, PB-CoOOH NFs 对 H₂O₂ 和 TMB 2 种底物具有更高的亲和力, 催化效率高。通过抗氧化剂抑制纳米酶的过氧化物酶反应, 成功地测定了常见抗氧化剂的羟基自由基清除能力。利用 PB-CoOOH NFs 比色测定抗氧化能力具有较低的检测限和稳定性。此方法简单、快速、灵敏度高, 利用 PB-CoOOH NFs 以及过氧化物酶反应, 为筛选和评估天然抗氧化剂提供了一种高效便捷的途径。

参考文献

- [1] Pisoschi A M, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 97: 55-74.
- [2] 王荣, 罗倩, 冯怡. DPPH、ABTS 和 FRAP 微量法测定山奈酚的抗氧化能力[J]. *广州化工*, 2021, 49(3): 58-59, 63.
- [3] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数 (ORAC) 测定原理及应用[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(8): 1015-1021.
- [4] Wu J J X, Wang X Y, Wang Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II)[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(4): 1004-1076.
- [5] Deng H H, Lin X L, Liu Y H, et al. Chitosan-stabilized platinum nanoparticles as effective oxidase mimics for colorimetric detection of acid phosphatase[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(29): 10292-10300.
- [6] Ge S G, Liu W Y, Liu H Y, et al. Colorimetric detection of the flux of hydrogen peroxide released from living cells based on the high peroxidase-like catalytic performance of porous PtPd nanorods[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 71: 456-462.
- [7] Mu J S, Wang Y, Zhao M, et al. Intrinsic peroxidase-like activity and catalase-like activity of Co₃O₄ nanoparticles [J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(19): 2540-2542.
- [8] Wen S H, Zhong X L, Wu Y D, et al. Colorimetric assay conversion to highly sensitive electrochemical assay for bimodal detection of arsenate based on cobalt oxyhydroxide nanozyme via arsenate absorption[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(10): 6487-6497.
- [9] Jin R, Xing Z H, Kong D S, et al. Sensitive colorimetric sensor for point-of-care detection of acetylcholinesterase using cobalt oxyhydroxide nanoflakes[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(8): 1230-1237.
- [10] Fan S N, Jiang X X, Yang M H, et al. Sensitive colorimetric assay for the determination of alkaline phosphatase activity utilizing nanozyme based on copper nanoparticle-modified Prussian blue [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(15): 3955-3963.
- [11] Zhou D D, Wang C S, Luo J J, et al. C₃N₄ nanosheet-supported Prussian Blue nanoparticles as a peroxidase mimic: Colorimetric enzymatic determination of lactate[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(11): 735.
- [12] Vázquez-González M, Torrente-Rodríguez R M, Kozell A, et al. Mimicking peroxidase activities with Prussian Blue nanoparticles and their cyanometalate structural analogues[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(8): 4958-4963.
- [13] Barreto J C, Smith G S, Strobel N H P, et al. Terephthalic acid: A dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro[J]. *Life Sciences*, 1995, 56(4): 89-96.
- [14] Begic N, Bener M, Apak R. Development of a green synthesized silver nanoparticle-based antioxidant capacity method using carob extract[J]. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 2021, 11(3): 381-394.
- [15] Phansi P, Tumma P, Thuankhunthod C, et al. Development of a digital microscope spectrophotometric system for determination of the antioxidant activity and total phenolic content in teas[J]. *Analytical Letters*, 2021, 54(17): 2727-2735.
- [16] Morosanova M A, Chaikun K V, Morosanova E I. Silica and silica-titanium xerogels doped with iron (III) for total antioxidant capacity determination[J]. *Materials*, 2021, 14(8): 2019.
- [17] Han Y R, Luo L P, Zhang L, et al. Oxidase-like Fe-Mn bimetallic nanozymes for colorimetric detection of ascorbic acid in kiwi fruit [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112821.
- [18] Guo D, Li C, Liu G Y, et al. Oxidase mimetic activity of a metalloporphyrin-containing porous organic polymer and its applications for colorimetric detection of both ascorbic acid and glutathione [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9(15): 5412-5421.
- [19] Zhu W D, Cheng Y, Wang C, et al. Fiber-in-tube design of a CuFe₂O₄ @ conducting polymer with synergistically enhanced peroxidase-like activity for total antioxidant capacity assays [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9(44): 14811-14820.
- [20] Zheng X F, Lian Q, Zhou L Y, et al. Peroxidase mimicking of binary polyacrylonitrile-CuO nanoflowers and the application in colorimetric detection of H₂O₂ and ascorbic acid [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9(20): 7030-7043.
- [21] Chen P, Zhong H, Li X R, et al. Palygorskite @ Co₃O₄ nanocomposites as efficient peroxidase mimics for colorimetric detection of H₂O₂ and ascorbic acid [J]. *Applied Clay Science*, 2021, 209: 106109. ■

欢迎订阅《现代化工》杂志, 邮发代号 82—67。