多壁碳纳米管负载 Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面吸附增强过氧化酶的催化活性

高云燕^{1,*} 李海霞¹ 欧植泽^{1,*} 郝平¹ 李嫒² 杨国强³

(¹西北工业大学理学院, 空间应用物理与化学教育部重点实验室, 西安 710072; ²中国科学院理化技术研究所, 光化学转换与功能材料重点实验室, 北京 100190; ³中国科学院化学研究所, 光化学重点实验室, 北京 100190)

摘要: 采用共沉淀法制备了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子, 将其负载于氨基吡啶修饰多壁碳纳米管(MWCNT-AP)上, 得到具有良好的分散性和超顺磁性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物. 通过傅里叶变换红外(FT-IR)光谱、X射线衍射(XRD)和磁滞回线测量等方法对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物进行了表征. 扫描电镜(TEM)结果表明: Fe_3O_4 磁性纳米粒子多集中于碳纳米管 MWCNT-AP 的端部, 形成的复合物在极性溶剂中具有良好的分散性和超顺磁性; 辣根过氧化酶(HRP)可通过物理作用吸附于 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物表面. 酸性条件下(pH 4.0), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物使 HRP 的最大反应速率($v_{\max}$)提高了 3 倍.

关键词: 碳纳米管; 磁性纳米粒子; 过氧化酶; 纳米复合物; 超顺磁性
中图分类号: O648

Enhancing the Catalytic Activity of Peroxidase by Adsorption onto Fe_3O_4 Magnetic Nanoparticle/Multiwalled Carbon Nanotube Composite Surfaces

GAO Yun-Yan^{1,*} LI Hai-Xia¹ OU Zhi-Ze^{1,*} HAO Ping¹ LI Yi² YANG Guo-Qiang³

(¹Ministry of Education Key Laboratory of Space, Applied Physics and Chemistry, School of Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, P. R. China; ²Key Laboratory of Photochemical Conversion and Optoelectronic Materials, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, P. R. China; ³Key Laboratory of Photochemistry, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, P. R. China)

Abstract: Fe_3O_4 magnetic nanoparticles were prepared by co-precipitation and supported on the surface of aminopyridine-grafted multiwalled carbon nanotubes (MWCNT-AP), affording a superparamagnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite with good dispersity. The $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composites were characterized by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), and hysteresis curve measurements. Transmission electron microscopy (TEM) experimental results suggest that the Fe_3O_4 nanoparticles are mainly adsorbed on the tips of the MWCNT-AP. UV-Vis absorption and fluorescence results demonstrate that horseradish peroxidase (HRP) can be physically adsorbed onto the surfaces of the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite. Under acidic conditions (pH 4.0), the maximum reaction rate ($v_{\max}$) value of the HRP increases 3-fold after interaction with $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$.

Received: April 10, 2011; Revised: June 29, 2011; Published on Web: August 11, 2011.

*Corresponding authors. GAO Yun-Yan, Email: gaoyunyan@nwpu.edu.cn. OU Zhi-Ze, Email: ouzhize@nwpu.edu.cn; Tel: +86-29-88431677.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (21073143), Chunhui Project from the Ministry of Education of China (Z2009-1-71002, Z2009-1-71006), and Northwestern Polytechnical University Foundation for Fundamental Research, China (JC200822, JC20100239).

国家自然科学基金(21073143), 教育部春晖计划基金(Z2009-1-71002, Z2009-1-71006)及西北工业大学基础研究基金(JC200822, JC20100239)资助项目

Key Words: Carbon nanotube; Magnetic nanoparticle; Peroxidase; Nanocomposite; Superparamagnetic property

1 引言

磁性纳米粒子是一种新型纳米功能材料,具有良好的生物相容性和特殊的磁性能,能与细胞、酶、蛋白质及核酸等生物分子作用,在多种生物医学领域具有潜在的应用前景。¹⁻³ 磁性纳米颗粒表面负载过氧化酶得到的复合材料既具有磁性纳米颗粒的优点,又具有酶的催化活性,可用于生物催化和生物分离。⁴⁻⁶ 过氧化酶具有价格低廉、易于提取、适用范围广的特点,作为催化剂在酶联免疫技术和组织化学技术等具有广泛用途。^{7,8} 过氧化酶负载于具有合适粒径和磁性能的磁性纳米粒子表面后,其催化活性可大幅增强。⁹ 将磁性纳米粒子与HRP抗体进行共价连接,能够提高检测灵敏度。¹⁰ 由于 Fe_3O_4 磁性纳米粒子磁偶极间的相互吸引作用,导致纳米颗粒极易团聚,对纳米颗粒进行表面修饰,可改善磁性纳米粒子的分散性及其胶体溶液的稳定性,并引入新的功能。

碳纳米管作为一种新型的吸附材料,具有比表面积大、吸附容量大的优点,将磁性纳米粒子负载于碳纳米管表面或填充于碳纳米管内部,可以制备出具有特殊性能的纳米复合材料。¹¹⁻¹⁴ 通过层层自组装或液相共沉淀方法制备的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子/碳纳米管复合材料具有超顺磁性、分散性良好的优点,^{15,16} 可应用于有机染料吸附、模拟氧化酶催化氧化酚类化合物、气体吸附等领域。¹⁷⁻¹⁹ 近年来,将生物酶负载于纳米粒子/碳纳米管表面,形成的纳米复合材料具有良好生物活性,引起了人们的广泛关注。²⁰⁻²² 碳纳米管和磁性纳米粒子都对生物酶具有很好的吸附作用,^{23,24} 但是磁性纳米粒子/碳纳米管复合物与酶的相互作用及其对酶催化活性的影响的研究还较少。²⁵

氨基吡啶修饰碳纳米管(MWCNT-AP)在水溶液中具有良好的分散性,可吸附HRP及其底物,能有效提高HRP的催化活性。²⁶ 本文采用共沉淀法合成了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,以MWCNT-AP作为载体,制备得到了 Fe_3O_4 /MWCNT-AP纳米复合物。研究了在HRP最佳活性条件下(pH 4.0),^{27,28} Fe_3O_4 /MWCNT-AP纳米复合物与HRP的相互作用及其对HRP催化活性的影响。

2 实验部分

2.1 主要试剂和仪器

2-氨基吡啶修饰多壁碳纳米管为实验室自制,按照文献合成。²⁶ 辣根过氧化酶购自Sigma公司,美国;氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、亚硫酸钠(Na_2SO_3)、氯化钠(NaCl)、25%氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、磷酸氢二钠(NaH_2PO_4)、柠檬酸、过氧化氢(H_2O_2)、无水乙醇均为国药集团化学试剂有限公司分析纯试剂,使用前未经进一步处理。所有有机溶剂均经过无水处理,使用前重蒸。水溶液采用二次蒸馏水配制,所用缓冲溶液均为柠檬酸-磷酸缓冲溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.0)。

HRP溶液的浓度通过紫外-可见吸收光谱仪检测其在403 nm处的吸收求得($\epsilon_{403}=9.4 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。²⁹ H_2O_2 的浓度通过紫外-可见吸收光谱仪检测其在240 nm处的吸收求得($\epsilon_{240}=43.6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。³⁰

所用仪器: Hitachi U-3010紫外-可见吸收光谱仪,日本; Bruker傅里叶红外光谱仪,美国; H-800扫描电镜,日本; Bio-Tek Synergy HT型多功能酶标仪,美国; PANalytical X'Pert PRO X射线衍射仪,荷兰; MPMS-XL-7型超导量子干涉磁测量系统,美国。

2.2 磁性纳米粒子及碳管负载磁性纳米粒子复合物的制备

采用共沉淀方法制备 Fe_3O_4 磁性纳米粒子。¹⁷ 称取12.98 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.048 mol)溶解于100 mL二次蒸馏水中,转入500 mL三口烧瓶中。将2.02 g Na_2SO_3 (0.016 mol)溶解于50 mL二次蒸馏水中,转入滴液漏斗中;在 N_2 保护和快速磁力搅拌条件下,缓慢滴加到三口烧瓶中,溶液逐渐由红褐色变为黄色。待 Na_2SO_3 滴加完毕,将40 mL 15%氨水溶液迅速加入反应液中,快速升温至60 °C,反应1 h,生成大量黑色 Fe_3O_4 粒子。停止加热, N_2 保护和室温条件下继续搅拌2 h。在永久磁场中磁分离生成的 Fe_3O_4 粒子,先后用无水乙醇、NaCl溶液和二次蒸馏水洗涤数次,直至溶液呈中性。最后置于二次蒸馏水中待用(0.5%, w)。

将之前制备的MWCNT-AP溶于重蒸的DMF溶液中待用(0.1%, w)。分别取1 mL Fe_3O_4 磁性纳米粒子(0.5%, w)和MWCNT-AP(0.1%, w)溶液均匀混

合, 室温静置 2 h 以上, 即得 Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物。

2.3 Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物的紫外-可见吸收光谱测定

将 Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物样品在缓冲溶液中超声分散 20 min, 测定 280–700 nm 范围内的紫外可见吸收光谱。然后在比色皿的底部放置一块钕铁硼永久磁铁, 测定不同静置时间条件下外加磁场对 Fe₃O₄/MWCNT-AP 吸收光谱的影响。

2.4 Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物与 HRP 相互作用的紫外-可见吸收光谱测定

在 10 mL 容量瓶中依次加入 1.4 mL HRP 的柠檬酸-磷酸缓冲溶液 (50 μmol·L⁻¹), 100 μL Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物的水溶液 (Fe₃O₄ 与 MWCNT-AP 的质量比为 5:1, [Fe₃O₄]=1.25 g·L⁻¹, [MWCNT-AP]=0.25 g·L⁻¹), 用柠檬酸-磷酸缓冲溶液定容至 10 mL 后摇匀, 室温静置 3 h。采用 1 cm 石英比色皿, 测定溶液在 200–700 nm 波长范围内的紫外-可见吸收光谱。

2.5 Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物与 HRP 相互作用的荧光光谱测定

在 10 mL 容量瓶中依次加入 0.2 mL 的 HRP 溶液 (50 μmol·L⁻¹), 12–96 μL Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物的水溶液 ([Fe₃O₄]=1.25 g·L⁻¹, [MWCNT-AP]=0.25 g·L⁻¹), 用柠檬酸-磷酸缓冲溶液定容至 10 mL 后摇匀, 室温静置 3 h。采用 1 cm 比色皿, 以 295 nm 为激发波长, 扫描 305–550 nm 波长范围内的荧光光谱, 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm。

2.6 过氧化酶(HRP)的酶反应动力学参数测定

在过氧化氢存在的条件下, HRP 催化氧化 TMB 的反应为双底物反应。HRP 首先与 H₂O₂ 反应生成氧化态为 +5 的 HRP 中间体, 该中间体能与 TMB 反应, 得到两个电子后被还原成 HRP。而 TMB 则氧化成为具有醌式结构的偶联氧化产物 (TMB_{ox}) (图 1)。本实验采用 TMB 作为色原底物, 根据 TMB 偶联产物的颜色变化测定 HRP 的反应动力学参数。³¹ 在 96 孔板中依次加入 50 μL TMB 溶液 (1.5 mmol·L⁻¹), 50 μL

不同浓度的 H₂O₂ 溶液, 使 H₂O₂ 在 150 μL 反应体系中的浓度分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 μmol·L⁻¹, 最后加入 50 μL HRP 溶液 (3 nmol·L⁻¹), 混匀后, 于室温条件 (25 °C) 下利用酶标仪测定各反应体系在 650 nm 处的吸光度。根据 TMB 的联苯胺氧化产物在 650 nm 处的吸光度的变化 ($\epsilon_{655}=3.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),³² 可以计算出不同 H₂O₂ 浓度条件下的反应速率 v , 根据米氏方程 (公式 (1)), 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法可计算出 HRP 的最大反应速率 ($v_{\max}$) 及表观米氏常数 (K_m) 值。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{[H_2O_2] \cdot v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (1)$$

根据实验要求, TMB 的吸附实验条件为 TMB (1.5 mmol·L⁻¹) 分别与 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒 (7.5 μg·mL⁻¹)、MWCNT-AP (1.5 μg·mL⁻¹) 或 Fe₃O₄/MWCNT-AP 复合物 (Fe₃O₄ 为 7.5 μg·mL⁻¹, MWCNT-AP 为 1.5 μg·mL⁻¹) 共混, 室温避光静置 3 h 后, 用于酶反应活性测定。

3 结果与讨论

3.1 红外光谱分析

共沉淀方法是制备 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的经典方法之一, 选用 NH₃·H₂O 等碱性沉淀剂进行共沉淀, 通过控制工艺条件, 可得到性能优良的磁性 Fe₃O₄ 纳米粒子。^{33,34} 其反应方程式 (公式 (2, 3)) 为:

Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的红外特征吸收光谱为 Fe—O 键的特征吸收峰 (559 cm⁻¹) 和羟基 OH 伸缩振动吸收峰 (3415 cm⁻¹) (图 2(a)), 与文献结果一致。³⁵ MWCNT-AP 的红外吸收光谱的特征吸收峰为 C=O 伸缩振动吸收峰 (1627 cm⁻¹)、—NH 的弯曲振动峰 (1573 cm⁻¹) 及 N—H 的伸缩振动峰 (3329 cm⁻¹) (图 2(b))。而 MWCNT-AP 负载 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子后, 既可观察到 Fe₃O₄ 颗粒中 Fe—O 键的特征吸收峰 (559 cm⁻¹), 还可明显观察 MWCNT-AP 结构中的 C=O 特征峰在 (1628 cm⁻¹) (图 2(c)),³⁶ 同时羟基 OH 伸缩振动吸收

图 1 HRP 酶催化氧化 TMB 的反应

Fig.1 Catalytic oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of HRP

图2 (a) Fe_3O_4 磁性纳米粒子, (b) MWCNT-AP和(c) Fe_3O_4 /MWCNT-AP复合物的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of (a) MWCNT-AP, (b) Fe_3O_4 nanoparticles, and (c) Fe_3O_4 /MWCNT-AP composite

峰(3421 cm^{-1})较单独的MWCNT-AP和 Fe_3O_4 发生位移,由此可以说明 Fe_3O_4 磁性纳米粒子已经成功负载在MWCNT-AP上.

3.2 透射电镜分析

将少量 Fe_3O_4 磁性纳米粒子或 Fe_3O_4 /MWCNT-AP复合物样品在无水乙醇中超声分散30 min.取少量分散液滴在铜网上,静置、自然晾干后,进行透射

电镜分析. Fe_3O_4 磁性纳米粒子的形貌如图3(a)所示,可以看出化学共沉淀方法制备的 Fe_3O_4 纳米粒子主要为球形结构,具有团聚现象.^{37,38}对比高分辨率的TEM图(图3(b)),可以看到TEM图像中磁性纳米粒子的粒径分布均匀,直径约为5–10 nm.

图4(a)为 Fe_3O_4 /MWCNT-AP复合物的TEM图.高分辨TEM图(图4(b))说明 Fe_3O_4 磁性纳米粒子主要负载于MWCNT-AP的端部,且粒子形貌完整,大小较为均匀,分散性明显改善.这可能是MWCNT-AP的化学修饰基团主要位于端部,端部的 $-\text{COOH}$ 和氨基吡啶基团与 Fe_3O_4 纳米粒子具有较强的配位相互作用或氢键相互作用,从而使得 Fe_3O_4 在MWCNT-AP端部的分布较多.^{39,40}对比未经负载磁性纳米粒子的碳纳米管TEM图(图4(c)),说明负载磁性纳米粒子后,氨基修饰碳纳米管之间的簇集也受到了抑制.

利用能量色散X射线能量散射谱仪(EDS)对负载 Fe_3O_4 /MWCNT-AP复合物进行了X射线成分分析,得到EDS谱(图5).可以看出谱图中存在Fe、C和O三种元素,进一步表明 Fe_3O_4 磁性纳米粒子已成功地负载于碳纳米管表面.

图3 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的(a)透射电镜扫描图及(b)高分辨透射电镜扫描图

Fig.3 (a) TEM images and (b) high-resolution TEM images of Fe_3O_4 nanoparticles

图4 Fe_3O_4 /MWCNT-AP复合物的(a)透射电镜扫描图、(b)高分辨透射电镜扫描图和(c) MWCNT-AP的透射电镜扫描图

Fig.4 (a) TEM images, (b) high-resolution TEM images of Fe_3O_4 /MWCNT-AP composite and (c) TEM images of MWCNT-AP

图5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的能量散射谱(EDS)
Fig.5 Energy dispersive spectrum (EDS) of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite

3.3 X射线衍射(XRD)分析

图 6(a)中 MWCNT-AP 在 $2\theta=26.4^\circ$ 处的宽衍射峰对应于 MWCNT-AP 晶面的 Bragg 石墨晶型特征峰。⁴¹ 在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的 XRD 图谱主要有五个特征衍射峰, 分别位于 30.2° 、 35.6° 、 43.3° 、 57.4° 及 62.8° , 属于立方晶系 Fe_3O_4 的特征衍射峰(图 6(b)).⁴² 在 XRD 图谱中未能检测到 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的特征峰($2\theta=53.7^\circ$, 68.2°),⁴³ 说明制备的铁氧化物主要为具有磁性的 Fe_3O_4 . $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物表现出明显的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的特征衍射峰(图 6(c)), 表明碳纳米管的存在没有影响 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的晶体结构. 同时 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物中未能检测到碳纳米管的特征衍射峰, 可能是与磁性纳米粒子作用后碳纳米管之间的簇集受到了抑制,⁴⁴ 与图 4(b)的透射电镜结果相符.

3.4 磁性能分析

图 7 显示了在室温下 Fe_3O_4 磁性纳米粒子和

图6 (a) MWCNT-AP, (b) Fe_3O_4 磁性纳米粒子和
(c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的 XRD 谱图

Fig.6 XRD patterns of (a) MWCNT-AP, (b) Fe_3O_4 nanoparticles, and (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite

图7 Fe_3O_4 磁性纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的磁滞回线

Fig.7 Magnetic hysteresis loop of Fe_3O_4 nanoparticles and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的磁滞回线, 二者均无剩磁和矫顽力, 表现为超顺磁性。⁴⁵ 其中 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的饱和磁化强度(M_s)值为 $68.8 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$, 而 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的饱和磁化强度(M_s)值为 $62.6 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$.

对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的缓冲溶液施加外加磁场后, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物在紫外-可见吸收光区的吸收随着外加磁场施加时间的延长而逐渐降低(图 8). 图 8 中的插图显示, 施加外加磁场 10 min 后, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物主要位于比色皿底部, 其上清液接近无色, 比相同浓度条件下的 MWCNT-AP 溶液颜色要浅得多. 而外加磁场对 MWCNT-AP 溶液的吸收光谱没有影响, 这进一步

图8 施加外加磁场 0 min (a), 5 min (b), 10 min (c) 后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 紫外-可见吸收光谱

Fig.8 UV-Vis spectra of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ with external magnetic field for 0 min (a), 5 min (b), 10 min (c)

A: absorbance; $[\text{Fe}_3\text{O}_4]=12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{MWCNT-AP}]=2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Inset images: (1) MWCNT-AP; (2) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ complex without external magnetic field; (3) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ complex with external magnetic field for 10 min

图9 (a) HRP(点线), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物(虚线)及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物与 HRP 混合溶液(实线)在柠檬酸-磷酸缓冲溶液中($\text{pH}=4.0$)的紫外-可见吸收光谱; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物与 HRP 相互作用的吸收谱

Fig.9 (a) Absorption spectra of native HRP (dotted line), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite (dashed line), and the mixture solution of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite and HRP (solid line) in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ citric acid-PBS buffer ($\text{pH}=4.0$); (b) absorption spectra for the interaction between HRP and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$

$[\text{HRP}]=7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{MWCNT-AP}]=2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{Fe}_3\text{O}_4]=12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

说明在缓冲溶液中 Fe_3O_4 与 MWCNT-AP 能形成稳定的复合物。¹⁷⁻¹⁹

3.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物与 HRP 相互作用的光谱

利用紫外-可见吸收光谱研究了 $\text{pH}=4.0$ 时 HRP 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物之间的相互作用(图9)。HRP 在 648、498、403 和 275 nm 处共有 4 个吸收峰, 其中 648、498、403 nm 的吸收峰分别为血红素卟啉环的 α 带、 β 带和 γ 带(Soret 带)的吸收;⁴⁶ 275 nm 处的吸收峰可归属为 HRP 中酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基的吸收(图 9(a))。加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 后, HRP 保持了相关的吸收峰, 且未发现峰位有红移或蓝移现象。

根据公式(4)可以得到 HRP 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 相互作用的紫外-可见吸收浓度(A)差。

$$\Delta A = A_{\text{HRP/MWCNT-AP/Fe}_3\text{O}_4} - A_{\text{HRP}} - A_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}} \quad (4)$$

从 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 与 HRP 相互作用的紫外-可见吸收差谱(图 9(b))可以看出, HRP 在 270–300 nm 区间存在明显的负吸收峰, 即存在减色效应, 这可能是由于 Fe_3O_4 与 HRP 结合后, 改变了色氨酸、酪氨酸等芳香环氨基酸残基的疏水环境。⁴⁷ 也说明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 与 HRP 在基态条件下具有较强的相互作用。

色氨酸的荧光强度和荧光发射峰峰位对所处环境极性非常敏感。采用 295 nm 选择性激发色氨酸时, HRP 在柠檬酸-磷酸缓冲溶液中的荧光发射峰位于 384 nm (图 10), 与中性环境条件下色氨酸的荧光发射峰(342 nm)相比明显红移,⁴⁸ 这可能是酸性条件

下蛋白质的构象变化所引起。⁴⁹ 加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物溶液后, HRP 的色氨酸荧光发射峰逐渐蓝移, 且强度升高。当 Fe_3O_4 和 MWCNT-AP 的浓度分别达到 $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其荧光峰蓝移至 370 nm, 且荧光强度提高了 2.8 倍。色氨酸荧光峰蓝移和荧光强度升高, 说明色氨酸所处蛋白质微环境的疏水性增加, 极性降低。^{50,51} 上述结果表明, 加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物对 HRP 构象有较大的影响。

3.6 对 HRP 酶反应动力学的影响

Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面能够吸附 HRP, 且能够大幅促进 HRP 的酶催化活性。⁹ 本文利用化学共沉淀法合成的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子及其 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物与 HRP 具有较强的相互作用。利用 TMB

图10 加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物对 HRP ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 荧光光谱的影响

Fig.10 Fluorescence spectra changes of HRP ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) upon addition of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ complex
 $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$

图 11 MWCNT-AP ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、 Fe_3O_4 ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 存在条件下 HRP 的(a)反应动力学曲线和(b) Lineweaver-Burke 曲线

Fig.11 (a) Kinetic curves of the reaction and (b) Lineweaver-Burke plots of HRP in the absence or in the presence of Fe_3O_4 ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), MWCNT-AP ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) or $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ pH=4.0

表 1 Fe_3O_4 磁性纳米粒子, MWCNT-AP 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物存在条件下 HRP 的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of HRP in the presence of Fe_3O_4 nanoparticles, MWCNT-AP or $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite

Catalyst	$10^3 K_m / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$10^3 v_{\max} / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$10^{-2} K_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$10^7 K_{\text{cat}} / K_m / (\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
HRP	7.33	7.98	7.98	1.09
HRP+MWCNT-AP ^a	4.28	4.76	4.76	1.11
HRP+ Fe_3O_4 ^b	10.4	12.2	12.2	1.17
HRP+ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ ^c	24.2	31.8	31.8	1.21

^aTMB is incubated with MWCNT-AP before use. ^bTMB is incubated with Fe_3O_4 nanoparticles before use. ^cTMB is incubated with $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ composite before use. $[\text{HRP}] = 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{TMB}] = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{Fe}_3\text{O}_4] = 2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $[\text{MWCNT-AP}] = 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH=4.0

显色反应进行了一系列动力学实验, 定量研究了 MWCNT-AP、 Fe_3O_4 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物对 HRP 催化能力的影响。

在一定 H_2O_2 浓度 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下, MWCNT-AP、 Fe_3O_4 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物对 HRP 催化氧化 TMB 的反应速率具有不同的影响(图 11(a)), 其中 Fe_3O_4 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物均表现出增强 HRP 催化活性的特点。以反应速率的倒数 v^{-1} 对 H_2O_2 浓度的倒数 $[\text{H}_2\text{O}_2]^{-1}$ 作图(图 11(b)), 结果具有良好的线性关系 ($R > 0.99$), 说明 HRP 在酸性条件下 (pH 4.0) 催化氧化 TMB 的过程严格遵守米氏方程。根据公式(1)可分别计算出 Fe_3O_4 、MWCNT-AP 或 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物存在条件下的 HRP 酶动力学参数(表 1)。加入 Fe_3O_4 、MWCNT-AP 或 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物后, HRP 的 K_{cat} 和 K_m 同时发生变化, 说明这些纳米材料的加入改变了 HRP 的空间构象, 从而影响酶的生物活性。^{52,53} 但是 HRP 的催化效率和底物专一性常数 K_{cat}/K_m 在加入纳米材料前后变化不大, 表明加入纳米材料的加入可以改变化学反应的速率, 而对酶催化反应的平衡点影响不大。

文献²⁶报道, 在酸性条件 pH=4.0 时 HRP 表现出

最佳的催化活性, 此时 HRP 的最大反应速率 $v_{\max}$ 为 $7.98 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 是 pH=7.0 时 $v_{\max}$ ($2.003 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 的 3.9 倍。相同实验条件下, 将 TMB 预先吸附于 MWCNT-AP 表面后, 反应的 $v_{\max}$ 比在 pH 7.0 条件时 $v_{\max}$ ($5.328 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 有所下降, 可能是 HRP 与纳米材料作用后其最佳 pH 范围发生了改变。⁵⁴ 而将 TMB 预先吸附于 Fe_3O_4 磁性纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物表面后, 反应的 $v_{\max}$ 分别提高了 0.53 和 3 倍。文献报道 Fe_3O_4 磁性纳米粒子在高浓度 H_2O_2 条件下能模拟 HRP 酶的生物活性,³¹ 但在我们的实验条件下, 即低浓度 H_2O_2 条件下, Fe_3O_4 磁性纳米粒子未表现出催化 H_2O_2 氧化 TMB 活性。说明 HRP 的活性增强主要来源于 HRP 与 Fe_3O_4 磁性纳米粒子或 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物的相互作用。

天然酶独特的高催化活性源自于它们能够把底物吸附到其活性中心周围, 并就近反应。⁵⁵ Fe_3O_4 磁性纳米粒子与 HRP 及其底物 TMB 具有较强相互作用, 可增强 HRP 的催化活性。^{9,23,24} 同时 HRP 的酶催化反应过程中, 色原底物 TMB 氧化产物的生成涉及到自由基对的结合, 磁性纳米粒子等外加磁场对自由基对的结合速率有较大影响, 可进一步提高 HRP 催

化活性.^{9,56,57} 碳纳米管所具有较大的比表面积更有利于TMB的吸附,而且碳纳米管负载 Fe_3O_4 磁性纳米粒子后改善了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的分散性,能够吸附更多的TMB到HRP血红素辅基的边缘;结合MWCNT-AP优良的电子转移能力,从而促进HRP进一步氧化TMB.^{58,59} 因此碳纳米管负载 Fe_3O_4 磁性纳米粒子形成的复合物 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 对HRP的催化活性影响比单独的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子要大很多.

4 结 论

采用共沉淀法制备了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,将 Fe_3O_4 磁性纳米粒子负载于MWCNT-AP得到分散性良好的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物,所得到的纳米粒子具有良好的超顺磁性.红外及XRD光谱结果表明, Fe_3O_4 磁性纳米粒子负载于碳纳米管表面.透射电镜结果进一步表明, Fe_3O_4 磁性纳米粒子多集中于碳纳米管MWCNT-AP的端部.紫外-可见吸收光谱说明辣根过氧化物酶(HRP)能够与 Fe_3O_4 磁性纳米粒子及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物发生相互作用,荧光光谱结果进一步表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物对HRP的构象具有较大影响.酶动力学实验结果表明pH=4.0时, Fe_3O_4 磁性纳米粒子及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNT-AP}$ 复合物能使HRP的酶催化反应最大速率($v_{\max}$)显著提高.

References

- Scarberry, K. E.; Dickerson, E. B.; McDonald, J. F.; Zhang, Z. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10258.
- Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2161.
- Polyak, B.; Fishbein, I.; Chorny, M.; Alferiev, I.; Williams, D.; Yellen, B.; Friedman, G.; Levy, R. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 698.
- Yang, H. H.; Zhang, S. Q.; Chen, X. L.; Zhuang, Z. X.; Xu, J. G.; Wang, X. R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1316.
- Hu, A. G.; Yee, G. T.; Lin, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12486.
- Tsang, S. C.; Caps, V.; Paraskevas, I.; Chadwick, D.; Thompson, T. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 5645.
- Allen, B. L.; Kotchey, G. P.; Chen, Y.; Yanamala, N. V. K.; Klein-Seetharaman, J.; Kagan, V. E.; Star, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17194.
- Yu, X.; Munge, B.; Patel, V.; Jensen, G.; Bhirde, A.; Gong, J. D.; Kim, S. N.; Gillespie, J.; Gutkind, J. S.; Papadimitrakopoulos, F.; Rusling, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11199.
- Chalkias, N. G.; Kahawong, P.; Giannelis, E. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2910.
- Tang, D.; Yuan, R.; Chai, Y. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1582.
- Qu, L. T.; Dai, L.; Osawa, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5523.
- Su, X. Z.; Xiao, D. T.; Zhou, G. Y. *Mat. Rev.* **2009**, *23*, 82. [苏秀芝, 肖定寿, 周国玉. 材料导报, **2009**, *23*, 82.]
- Kuang, Q.; Li, S. F.; Xie, Z. X.; Lin, S. C.; Zhang, X. H.; Xie, S. Y.; Huang, R. B.; Zhang, L. S. *Carbon* **2006**, *44*, 1166.
- Yi, D. K.; Lee, S. S.; Ying, J. Y. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2459.
- Wan, J. Q.; Cai, W.; Feng, J. T.; Meng, X. X.; Liu, E. Z. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1188.
- Correa-Duarte, M. A.; Grzelczak, M.; Maceira, V. S.; Giersig, M.; Liz-Marzan, L. M.; Farle, M.; Karl, S.; Diaz, R. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19060.
- Zuo, X. L.; Peng, C.; Huang, Q.; Song, S. P.; Wang, L. H.; Li, D.; Fan, C. H. *Nano Res.* **2009**, *2*, 617.
- Wang, B.; Gong, J. L.; Yang, C. P.; Zeng, G. M.; Zhou, W. J. *China Environ. Sci.* **2008**, *28*, 1009. [王 彬, 龚继来, 杨春平, 曾光明, 周雯婧. 中国环境科学, **2008**, *28*, 1009.]
- Lee, P. L.; Chiu, Y. K.; Sun, Y. C.; Ling, Y. C. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 2362.
- Xu, S. X.; Wu, J. S.; Zhang, Y.; Qi, H. L.; Zhang, C. X. *J. Instru. Anal.* **2008**, *27*, 1099. [许淑霞, 吴金生, 张 勇, 漆红兰, 张成孝. 分析测试学报, **2008**, *27*, 1099.]
- Chauhan, N.; Pundir, C. S. *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 97.
- Kwon, K. Y.; Yang, S. B.; Kong, B. S.; Kim, J.; Jung, H. T. *Carbon* **2010**, *48*, 4504.
- Wang, Z. G.; Wang, Y.; Xu, H.; Li, G.; Xu, Z. K. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 2955.
- Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2007**, *46*, 1222.
- Lai, G. S.; Zhang, H. L.; Han, D. Y. *Microchim. Acta* **2009**, *165*, 159.
- Hao, P.; Gao, Y. Y.; Ou, Z. Z.; Li, Y.; Wang, Z. L.; Wang, X. S. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2011**, *27*, 233. [郝 平, 高云燕, 欧植泽, 李 嫻, 王中丽, 王雪松. 物理化学学报, **2011**, *27*, 233.]
- Pinna, M. C.; Bauduin, P.; Touraud, D.; Monduzzi, M.; Ninham, B. W.; Kunz, W. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16511.
- Mahiuddin, S.; Renoncourt, A.; Bauduin, P.; Touraud, D.; Kunz, W. *Langmuir* **2005**, *21*, 5259.
- Shannon, L. M.; Kay, E.; Lew, J. Y. *J. Biol. Chem.* **1996**, *241*, 2166.
- Beers, R. F.; Sizer, I. W. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133.
- Gao, L. Z.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J. B.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T. H.; Feng, J.; Yang, D. L.; Perrett, S.; Yan, X. Y. *Nat. Nanotech.* **2007**, *2*, 577.
- Joseph, P. D.; Eling, T.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3669.
- Ge, S.; Shi, X. Y.; Sun, K.; Li, C. P.; Uher, C.; Baker, J. R.; Banaszak Holl, M. M.; Orr, B. G. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13593.

- (34) An, L.; Li, Z. Q.; Xu, N.; Xu, W.; Chen, X. F.; Yang, B. *Chem. J. Chin. Univ.* **2005**, 26, 366. [安 丽, 李兆强, 徐 妮, 徐 妮, 陈欣芳, 杨 柏. 高等学校化学学报, **2005**, 26, 366.]
- (35) Waldron, R. D. *Phys. Rev.* **1955**, 99, 1727.
- (36) Millan, A.; Palacio, F.; Falqui, A.; Snoeck, E.; Serin, V.; Bhattacharjee, A.; Ksenofontov, V.; Gütllich, P.; Gibert, I. *Acta Mater.* **2007**, 55, 2201.
- (37) Ge, J.; Hu, Y.; Biasini, M.; Beyermann, W. P.; Yin, Y. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2007**, 46, 4342.
- (38) Gao, L.; Wu, J.; Lyle, S.; Zehr, K.; Cao, L.; Gao, D. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 17357.
- (39) Bruce, I. J.; Sen, T. *Langmuir* **2005**, 21, 7029.
- (40) Gao, J. H.; Gu, H. W.; Xu, B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 1097.
- (41) Kim, I. T.; Nunnery, G. A.; Jacob, K.; Schwartz, J.; Liu, X. T.; Tannenbaum, R. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 6944.
- (42) Sun, Z. Y.; Liu, Z. M.; Wang, Y.; Han, B. X.; Du, J. M.; Zhang, J. L. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 4497.
- (43) Legodi, M. A.; Waal, D. *Dyes Pigm.* **2007**, 74, 161.
- (44) Gao, Y. Y.; Ou, Z. Z.; Yang, G. Q.; Wang, X. S.; Zhang, Z. B.; Li, S. M. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2009**, 25, 74. [高云燕, 欧植泽, 杨国强, 王雪松, 张智斌, 礼嵩明. 物理化学学报, **2009**, 25, 74.]
- (45) Panczyk, T.; Warzocha, T. P. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 19155.
- (46) Renganathan, V.; Gold, M. H. *Biochemistry* **1986**, 25, 1626.
- (47) Zhao, X. C.; Liu, R. T.; Chi, Z. X.; Teng, Y.; Qin, P. F. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 5625.
- (48) Gao, Y. Y.; Liu, L. H.; Ou, Z. Z.; Li, Y.; Yang, G. Q.; Wang, X. S. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2010**, 26, 495. [高云燕, 刘丽华, 欧植泽, 李 嫒, 杨国强, 王雪松. 物理化学学报, **2010**, 26, 495]
- (49) Kirby, E. P.; Steiner, R. F. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 6300.
- (50) Ghisla, S.; Massey, V.; Lhoste, J. M.; Mayhew, S. *Biochemistry* **1974**, 13, 589.
- (51) Itzhaki, L. S.; Evans, P. A.; Dobson, C. M.; Radford, S. E. *Biochemistry* **1994**, 33, 5212.
- (52) Glettenberg, M.; Niemeyer, C. M.; *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 969.
- (53) Lee, D. J.; Kim, S. S.; Lee, M. Y. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 33, 312.
- (54) Bhatia, R. B.; Brinker C. J. *Chem. Mater.* **2000**, 12, 2434.
- (55) Ringe, D.; Petsko, G. A. *Science* **2008**, 320, 1428.
- (56) Moller, A. C.; Lunding, A.; Olsen, L. F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 3443.
- (57) Taraban, M. B.; Leshina, T. V.; Anderson, M. A.; Grissom, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5768.
- (58) McDonald, T. J.; Svedruzic, D.; Kim, Y. H.; Blackburn, J. L.; Zhang, S. B.; King, P. W.; Heben, M. J. *Nano Lett.* **2007**, 7, 3528.
- (59) Veitch, N. C.; Smith A. T. *Adv. Inorg. Chem.* **2001**, 51, 107.