



(21) 申请号 202310593226.6

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2023.05.24

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116586112 A

(56) 对比文件

CN 115651965 A, 2023.01.31

CN 109354634 A, 2019.02.19

(43) 申请公布日 2023.08.15

(73) 专利权人 合肥工业大学

地址 230000 安徽省合肥市屯溪路193号

张志伟. “MnO₂基类氧化酶活性材料制备及双模检测研究”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2023, (第2期), 第5页第2段, 第6页第2段, 第7页第2段, 第35页第3段至第36页第1段.

(72) 发明人 操小栋 叶永康 王婷婷

(74) 专利代理机构 郑州豫乾知识产权代理事务所(普通合伙) 41161

专利代理师 高娇娜

审查员 刘志芳

(51) Int. Cl.

B01J 31/06 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶及其制备和应用

(57) 摘要

一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶及其制备和应用, 涉及纳米酶制备技术领域, 包括如下步骤: (1) 配置高碘酸钠水溶液, 然后将配置好的高碘酸钠溶液缓慢倒入壳聚糖溶液中, 将反应混合物在37~50℃避光搅拌, 之后加入无水乙醇终止反应并沉淀粗产物, 随后, 粗产品依次在氯化钠溶液和去离子水中进行透析来纯化产物; (2) 将乙酸锰和步骤(1)中制备的双醛壳聚糖配置成水溶液进行磁搅拌混合, 室温磁搅拌后加入氢氧化钠水溶液, 继续在室温下持续剧烈的磁搅拌后冲洗三次分散到超纯水中。本发明的合成的DAC/MnO₂纳米酶具有优异的类过氧化氢酶催化活性和类氧化酶催化活性, 丰富了纳米酶的种类, 且可用于过氧化氢的定量检测, 对过氧化氢具有良好的选择性。

1. 一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶, 其特征在于, 以乙酸锰和双醛壳聚糖为原料制备形成;

双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 制备双醛壳聚糖: 称取壳聚糖溶解在乙酸盐缓冲液中配置壳聚糖乙酸溶液, 配置高碘酸钠水溶液, 然后将配置好的高碘酸钠溶液缓慢倒入壳聚糖溶液中, 将反应混合物在37~50°C避光搅拌, 之后加入无水乙醇终止反应并沉淀粗产物, 随后, 粗产品依次在氯化钠溶液和去离子水中进行透析来纯化产物;

(2) 制备DAC/MnO₂纳米酶: 将乙酸锰和步骤(1)中制备的双醛壳聚糖配置成水溶液进行第一次磁搅拌混合, 室温磁搅拌后加入氢氧化钠水溶液, 继续在室温下持续剧烈的第二次磁搅拌, 之后冲洗三次分散到超纯水中;

步骤(1)中乙酸盐缓冲液pH为4.4~4.6, 避光搅拌时间为24~45 h;

步骤(2)中, 第一次磁搅拌时间为30~45 min, 第二次磁搅拌时间为12~16 h。

2. 根据权利要求1所述的一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶, 其特征在于, 步骤(1)中, 配成的壳聚糖乙酸溶液浓度为15 mg/mL; 配成高碘酸钠水溶液的浓度为0.05 g/mL; 无水乙醇的体积为800~950 mL, 终止反应时间2~3 h; 透析时间为36~48 h。

3. 根据权利要求1所述的一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶, 其特征在于, 步骤(2)中所述乙酸锰的浓度为100 mM, 体积为1~1.5 mL; 双醛壳聚糖体积为5 mL, 浓度为0.1~1 mg/mL; 氢氧化钠的浓度为70 mM, 体积为4.6~5.2 mL。

4. 权利要求1所述的双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用, 其特征在于, 通过制备的DAC/MnO₂纳米酶对过氧化氢进行检测: 取DAC/MnO₂纳米酶, 加入PBS缓冲液、过氧化氢和显色底物, 显色后, 加入硫酸溶液终止反应, 使用紫外分光光度计读取450 nm波长下吸光度值。

5. 根据权利要求4所述的双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用, 其特征在于, 所述DAC/MnO₂纳米酶的浓度0.5~2.5 mg/mL; 所述过氧化氢的浓度为2~10 mg/mL; 所述显色底物为3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺, 所述显色底物浓度为0.5~2.5 mg/mL。

6. 根据权利要求4所述的双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用, 其特征在于, 所述DAC/MnO₂纳米酶催化反应温度为25~60°C, 所述PBS缓冲液pH为5~7。

7. 权利要求1所述的双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用, 其特征在于, DAC/MnO₂纳米酶应用于血液中葡萄糖、抗坏血酸的定量测量。

8. 权利要求1所述的双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用, 其特征在于, DAC/MnO₂纳米酶应用于人血清中的谷胱甘肽的定量测量。

9. 权利要求1所述的双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用, 其特征在于, 采用DAC/MnO₂纳米酶偶联抗体、DNA生物探针, 并应用于电化学、生物传感器领域。

一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米酶制备技术领域,具体涉及一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶及其制备和应用。

背景技术

[0002] 过氧化氢(H_2O_2)俗称双氧水,是一种具有强氧化性、腐蚀性的无色透明液体。过氧化氢作为一种重要的化工产品,不仅在医药、食品、国防、纺织品、纸浆漂白、化学产品的合成以及环保等领域中广泛应用,而且在人体代谢中起着至关重要的作用。然而,过量的 H_2O_2 其分解生成的活性自由基在人体内的过量的产生和积累会对人体产生危害,从而导致细胞严重损伤,甚至引发一些危险的疾病。因此,建立一种简单、准确的 H_2O_2 快速检测方法具有重要的意义和必要性。

[0003] 目前,已经开发了多种用于测定 H_2O_2 的分析技术,例如常规滴定法、分光光度法、高效液相色谱法、比色法、电化学法等。常规滴定法中的碘量法是工厂实践中最广泛用于检测漂白过程中过氧化氢含量的方法,该方法操作简单,但灵敏度较低,干扰因素多,且终点色变不明显。电化学方法和色谱法的应用需要特殊设备,难以推广使用。其中,基于辣根过氧化物酶(HRP)比色法检测由于其操作简易、反应快、成本低、灵敏度高等优点,在实际的样品诊断中有很好的应用前景,引起了人们广泛的关注。然而,HRP作为一种天然酶,它的固有缺点让它在一些应用受到了限制。因此,为了克服这些问题,研究者们为开发与HRP性质相似的纳米酶这方面做出了很多的努力。

[0004] 纳米酶是指具有天然酶活性的纳米材料。作为一种新型的模拟酶,纳米酶既具有纳米材料的独特性质,又能模拟天然酶的高效催化功能。与天然酶相比,纳米酶成本低,耐受性强,稳定性高,易于长期储存,大规模生产等。

[0005] 到目前为止,已报道有多种纳米材料如金属类、金属氧化物类、金属硫化物类、金属有机框架类和碳基纳米材料具有天然酶的催化活性。其中,二氧化锰作为重要过渡金属氧化物不仅具有优异的光学性能和类酶活性,更重要的是,二氧化锰对还原性生物分子如谷胱甘肽、过氧化氢等具有良好的氧化活性。然而,纳米二氧化锰虽然具有特殊的优点,但由于纳米二氧化锰在几乎所有溶剂中的不溶性限制了其应用。因此,有必要开发新型二氧化锰纳米酶材料,丰富纳米酶的种类,为过氧化氢的检测提供更多的选择。

发明内容

[0006] 基于以上不足,本发明提出一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶。

[0007] 具体技术方案如下:双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶以乙酸锰和双醛壳聚糖为原料制备形成。

[0008] 另一技术方案:一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的制备方法,包括如下步骤:

[0009] (1) 制备双醛壳聚糖:称取壳聚糖溶解在乙酸盐缓冲液中配置壳聚糖乙酸溶液,配置高碘酸钠水溶液,然后将配置好的高碘酸钠溶液缓慢倒入壳聚糖溶液中,将反应混合物

在37~50℃避光搅拌,之后加入无水乙醇终止反应并沉淀粗产物,随后,粗产品依次在氯化钠溶液和去离子水中进行透析来纯化产物;

[0010] (2) 制备DAC/MnO₂纳米酶:将乙酸锰和步骤(1)中制备的双醛壳聚糖配置成水溶液进行第一次磁搅拌混合,室温磁搅拌后加入氢氧化钠水溶液,继续在室温下持续剧烈的第二次磁搅拌,之后冲洗三次分散到超纯水中。

[0011] 3根据权利要求2所述的一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的制备方法,其特征在于,步骤(1)中乙酸盐缓冲液pH为4.4~4.6;配成的壳聚糖乙酸溶液浓度为15mg/mL;配成高碘酸钠水溶液的浓度为0.05g/mL;避光搅拌时间为24~45h;无水乙醇的体积为800~950mL,终止反应时间2~3h;透析时间为36~48h。

[0012] 优选地,步骤(2)中所述乙酸锰的浓度为100mM,体积为1~1.5mL;双醛壳聚糖体积为5mL,浓度为1mg/mL;氢氧化钠的浓度为70mM,体积为4.6~5.2mL,第一次磁搅拌时间为30~45min,第二次磁搅拌时间为12~16h。

[0013] 另一技术方案:双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶的应用,通过制备的DAC/MnO₂纳米酶对过氧化氢进行检测:取DAC/MnO₂纳米酶,加入PBS缓冲液、过氧化氢和显色底物,显色后,加入硫酸溶液终止反应,使用紫外分光光度计读取450nm波长下吸光度值。

[0014] 优选地,反应体系中纳DAC/MnO₂纳米酶的浓度0.5~2.5mg/mL;所述过氧化氢的浓度为2~10mg/mL;所述显色底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺,所述显色底物浓度为0.5~2.5mg/mL。

[0015] 优选地,所述DAC/MnO₂纳米酶催化反应温度为25~60℃,所述PBS缓冲液pH为5~7。

[0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0017] (1):本发明的制备方法工艺简单、反应条件温和、方便快捷;

[0018] (2):本发明的方法制备得到的DAC/MnO₂具有优异的类过氧化氢酶催化活性和类氧化酶催化活性,丰富了纳米酶的种类;

[0019] (3):本发明的方法制备得到的DAC/MnO₂可用于过氧化氢的定量检测,合成的纳米材料在检测过氧化氢中具有很好的灵敏度和较低的检出限,对过氧化氢具有良好的选择性,可实现低成本、快速、简单检测;

[0020] (4):本发明的方法制备得到的DAC/MnO₂作为一种新型纳米酶,极具应用前景,例如可以应用于血液中葡萄糖、抗坏血酸的定量测量;应用于人血清中的谷胱甘肽的定量测量;应用于DAC/MnO₂纳米酶偶联抗体、DNA等生物探针。

附图说明

[0021] 图1为DAC/MnO₂制备过程中添加DAC的量对过氧化酶活性的影响;

[0022] 图2为低浓度和高浓度DAC添加量制备DAC/MnO₂对比图;

[0023] 图3为反应条件对DAC/MnO₂类酶催化活性的影响:(a)缓冲液的pH;(b)温度;(c)H₂O₂的浓度;(d)TMB的浓度;

[0024] 图4为DAC/MnO₂对(a)不同浓度的TMB和(b)H₂O₂时间吸光度曲线图;(c)TMB和(d)H₂O₂的Michaelis-Menten图;

[0025] 图5为H₂O₂检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0026] 下面对发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0027] 实施例1:一种双醛壳聚糖二氧化锰纳米酶,其制备方法包括如下步骤:

[0028] (1) 制备双醛壳聚糖:称取壳聚糖溶解在pH为4.4~4.6的乙酸盐缓冲液中配成的壳聚糖乙酸溶液浓度为15mg/mL;配置浓度为0.05g/mL的高碘酸钠水溶液,然后将配置好的高碘酸钠溶液缓慢倒入壳聚糖溶液中,将反应混合物在37~50℃避光搅拌24~45h,之后加入800~950mL的无水乙醇终止反应2~3h并沉淀粗产物,随后,粗产品依次在氯化钠溶液(0.2mol/L)和去离子水中进行透析36~48h来纯化产物;

[0029] (2) 制备DAC/MnO₂纳米酶:将浓度为100mM、体积为1~1.5mL的乙酸锰和步骤(1)中制备的双醛壳聚糖配置成水溶液进行第一次磁搅拌30~45min,室温磁搅拌后加入浓度为70mM、体积为4.6~5.2mL的氢氧化钠水溶液,继续在室温下持续剧烈的第二次磁搅拌12~16h,之后冲洗三次分散到超纯水中,其中双醛壳聚糖体积为5mL,浓度为0.1~1mg/mL。

[0030] DAC/MnO₂纳米酶对过氧化氢进行检测:取DAC/MnO₂纳米酶,加入PBS缓冲液、过氧化氢和显色底物,显色后,加入硫酸溶液终止反应,使用紫外分光光度计读取450nm波长下吸光度值。其中,反应体系中纳DAC/MnO₂纳米酶的浓度0.5~2.5mg/mL;过氧化氢的浓度为2~10mg/mL;显色底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),显色底物浓度为0.5~2.5mg/mL;DAC/MnO₂纳米酶催化反应温度为25~60℃,PBS缓冲液pH为5~7。

[0031] 实施例2:本实施例中双醛壳聚糖(DAC)的制备方法与实施例1中DAC的制备方法相同。

[0032] DAC/MnO₂纳米酶的制备:将浓度为100mM、体积为1~1.5mL的乙酸锰和步骤(1)中制备的双醛壳聚糖配置成水溶液进行第一次磁搅拌30min,室温磁搅拌后加入浓度为70mM、体积为5mL的氢氧化钠水溶液反应5min,继续在室温下持续剧烈的第二次磁搅拌12h,之后冲洗三次分散到超纯水中。其中做了三组对照,三组对照实验中,双醛壳聚糖体积为5mL,浓度分别为(1mg/mL、0.5mg/mL、0.1mg/mL)。

[0033] 纳米酶探究过氧化酶活性实验:分别取三组对照实验中制备的制备所得的纳米酶10μL、350μL的PBS缓冲液(pH为6)、20μL的H₂O₂(浓度为10mM)和2μL的TMB(浓度为2mM),显色2min后,加入100μL的H₂SO₄(浓度为2mol/L)终止反应,使用紫外分光光度计读取450nm波长下吸光度值。

[0034] 如图1所示,在低浓度范围内,随着双醛壳聚糖的增加,其类过氧化酶的活性逐渐增大,原因可能是因为低浓度的双醛壳聚糖以单体形式可以在大块二氧化锰上进行强吸附,从而有效地剥离二氧化锰纳米片,然而高浓度的双醛壳聚糖聚集,不能在大块二氧化锰上进行强吸附,从而导致二氧化锰纳米片的无效剥离,如图2所示。因此在制备材料时选择加入1mg/mL双醛壳聚糖。

[0035] 实施例3:不同pH对DAC/MnO₂的类过氧化酶催化活性的影响:配制了磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液)和乙酸-乙酸钠缓冲液,pH值分别设置为(4、5、6、7、8)。同时固定其它的条件:DAC/MnO₂的浓度为1mg/mL,催化反应温度为35℃,H₂O₂的浓度为10mM,TMB的浓度为2mM,进行过氧化酶催化氧化反应。反应时加入10μL的DAC/MnO₂溶液,350μL的PBS缓冲液,20μL的H₂O₂

和20 μ L的TMB,显色2min后,加入100 μ L的H₂SO₄ (2mol/L) 终止其反应依次测定其吸光度。

[0036] 如图3(a)所示,适当的缓冲液pH值可以提高纳米酶的催化活性,DAC/MnO₂的催化活性在弱酸性条件下具有活性,在pH=6时具有最大的催化活性。较高的温度会导致的过氧化物样活性失活。

[0037] 不同温度对DAC/MnO₂类过氧化物酶催化活性的影响:温度设计分别为(25,30,35,40,45,50 $^{\circ}$ C),固定PBS缓冲液pH值为6,其他的与实施例3一致,进行了过氧化物酶催化氧化反应。

[0038] 如图3(b)所示,随着温度的升高,DAC/MnO₂的类过氧化物活性先升高后急剧下降,35 $^{\circ}$ C催化性能最佳。

[0039] 不同过氧化氢浓度对DAC/MnO₂类过氧化物酶催化活性的影响:过氧化氢浓度设定分别为(2、4、6、8、10mM),固定PBS缓冲液pH值为6,其他的与实施例3一致,进行了过氧化物酶催化氧化反应。

[0040] 如图3(c)所示,H₂O₂的最佳浓度分别为4mM。

[0041] 不同TMB浓度对DAC/MnO₂类过氧化物酶催化活性的影响:TMB浓度设定分别为(0.5、1、1.5、2、2.5mM),固定PBS缓冲液pH值为6,其他的与实施例3一致,进行了过氧化物酶催化氧化反应。

[0042] 如图3(d)所示,TMB的最佳浓度为1.5mM。

[0043] 实施例4:将H₂O₂的浓度固定为1.5mM,并准备了一系列不同浓度的TMB(0.04mM-2mM)。反应期间,取10 μ L的DAC/MnO₂ (1mg/mL) 溶液,20 μ L的H₂O₂溶液和20 μ L的TMB,450 μ L的PBS缓冲液(pH为6)。以相同的时间间隔对反应进行取样,并通过UV-Vis分光光度计在652nm处测定吸光度。

[0044] 在其他实验条件不变的情况下,将TMB的浓度固定为4mM,将H₂O₂的浓度从0.004mM依次增加到0.4mM,重复相同的实验步骤。

[0045] 如图4(a)所示,当固定H₂O₂浓度时,DAC/MnO₂类过氧化物酶的反应速率随着TMB浓度的增加而逐渐增加,但是当TMB浓度增加到一定程度时,反应速率的增加速度变慢并逐渐趋于平稳。其次,如图4(b)所示,当TMB浓度固定时,DAC/MnO₂类过氧化物酶的反应速率随着H₂O₂的增加而逐渐增加。同样,当H₂O₂的浓度增加到一定程度时,反应速率也开始逐渐减慢,最后趋于平稳。通过使用Lineweaver-Bur双倒数模型拟合曲线中的数据,可以得到直线,如图4(c)和4(d)所示。

[0046] 通过直线上的截距和斜率计算了DAC/MnO₂氧化TMB和H₂O₂动力学参数K_m,分别为0.0776mmol/L和7.722 μ mol/L。K_m值是酶的特征常数之一,它只和酶的性质有关,一般情况下,不同的酶其K_m值也不相同。K_m值表示的是酶和底物之间的亲和程度,K_m值越大,表示酶和底物之间的亲和度越小,K_m值越小,亲和度越大。与天然辣根过氧化物酶的K_m相比(氧化TMB的K_m为0.434)想接近,这些结果表明,DAC/MnO₂材料可用作人工过氧化物酶的研究,并具有有意的酶活性。

[0047] 实施例5:将350 μ L的PBS缓冲液(pH=6),20 μ L的TMB溶液(2mM),20 μ L不同浓度的H₂O₂并以不同的浓度依次增加,将其添加到10 μ L的1mg/mL的DAC/MnO₂溶液中。显色2min后,加入10 μ L的H₂SO₄ (2mol/L) 终止反应。将所得的溶液通过紫外可见分光光度计在450nm下进行吸收光谱的测量。

[0048] 如图5所示,在450nm处的吸光度随着 H_2O_2 浓度从 $5\mu M$ 增加到 $500\mu M$,吸光度强度与 H_2O_2 浓度在 $4\mu M$ 到 $400\mu M$ 范围内呈良好的线性关系,相关系数为0.997,检出限为 $11\mu M$ 。检测限由 $LOD=KS_0/S$ 确定,其中K是根据所需置信水平选择的数值因子, S_0 是空白测量的标准偏差($n=11, K=3$),S是校准曲线的斜率。

[0049] 表1为现有技术中的检测过氧化氢与本申请检测过氧化氢相比较

[0050]

材料	方法	线性范围 ($\mu mol/L$)	检出限 ($\mu mol/L$)
MoS_2 -PPy	比色法	50-2000	45.0
MoS_2 -rGO	荧光法	60-700	25.0
DA-AgNPs	比色法	30-70	3000
CNP	比色法	1-40	20
CoS	比色法	50-800	20
Meso- CeO_2/C	电化学法	250-5000	1300
NiS/MMT/GO	比色法	10-100	9.73
本方法	比色法	4-400	11

[0051] 根据表1的结果可知,本方法制备的纳米酶在检测过氧化氢中具有很好的灵敏度和较低的检出限。

[0052] 综上所述,本发明的制备方法工艺简单、反应条件温和、方便快捷;制备得到的DAC/ MnO_2 具有优异的类过氧化氢酶催化活性和类氧化酶催化活性,丰富了纳米酶的种类;且DAC/ MnO_2 可用于过氧化氢的定量检测,合成的纳米材料在检测过氧化氢中具有很好的灵敏度和较低的检出限,对过氧化氢具有良好的选择性,可实现低成本、快速、简单检测。

[0053] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围。

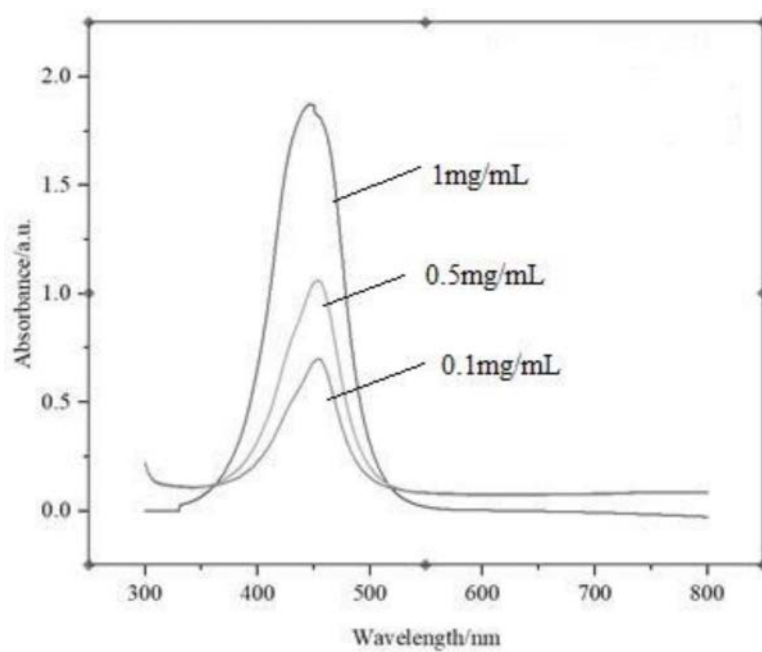


图1

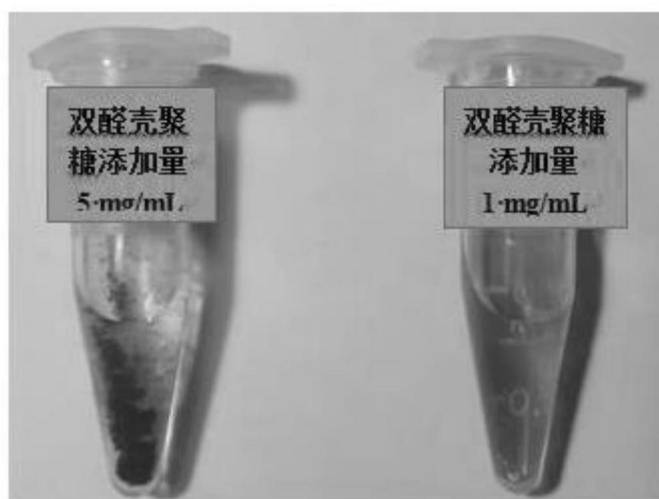


图2

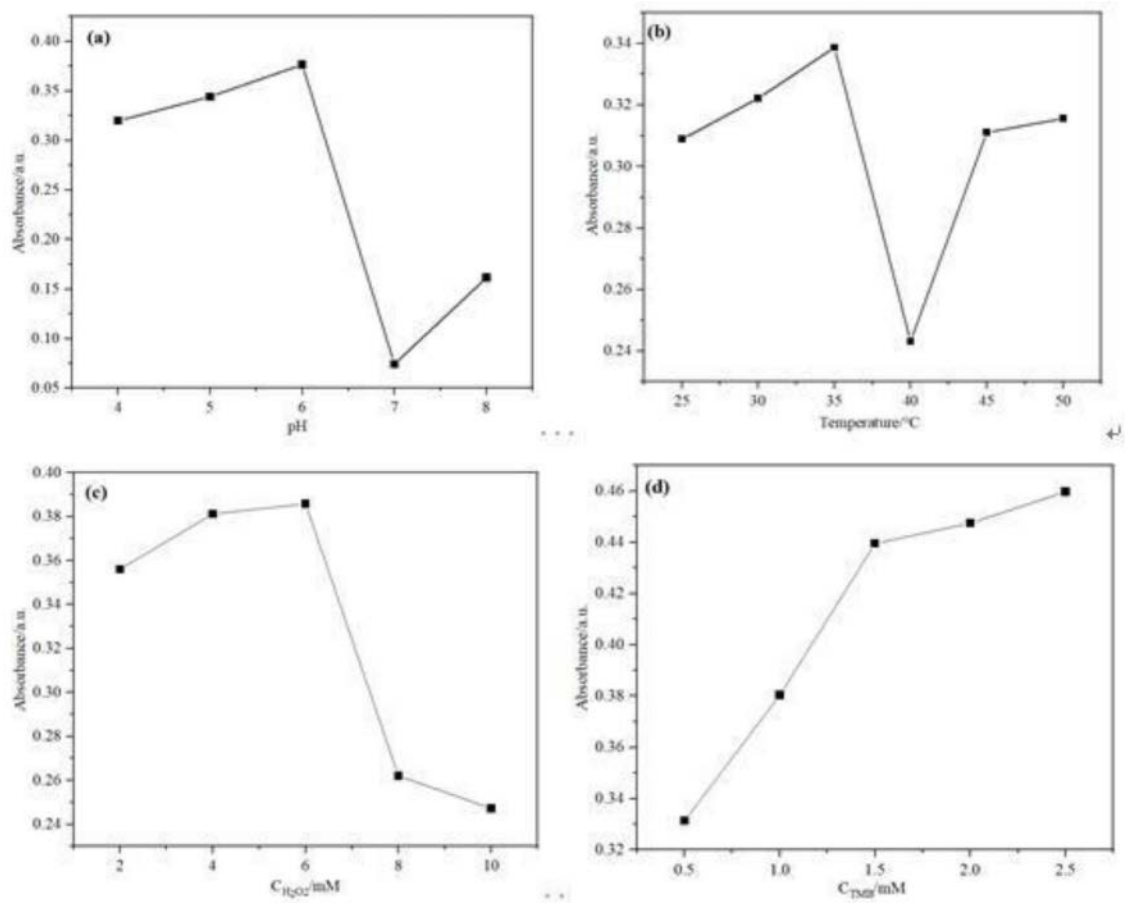


图3

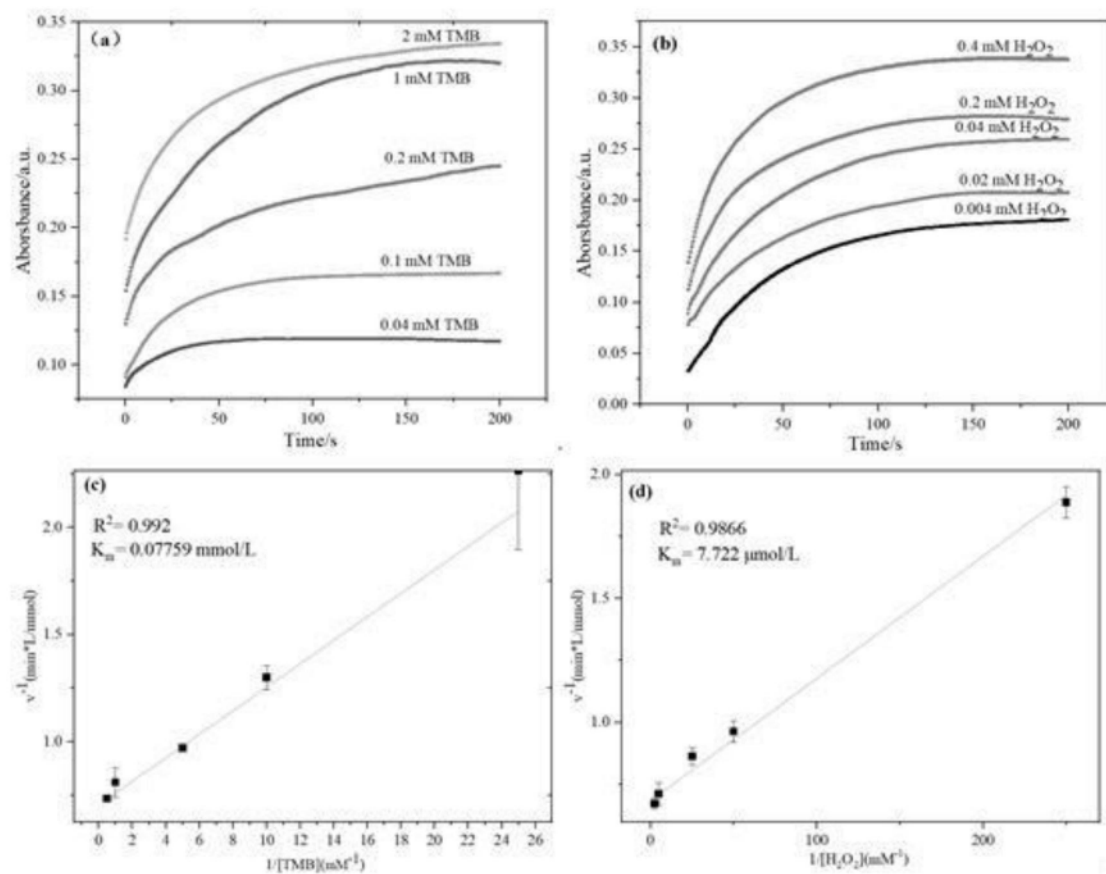


图4

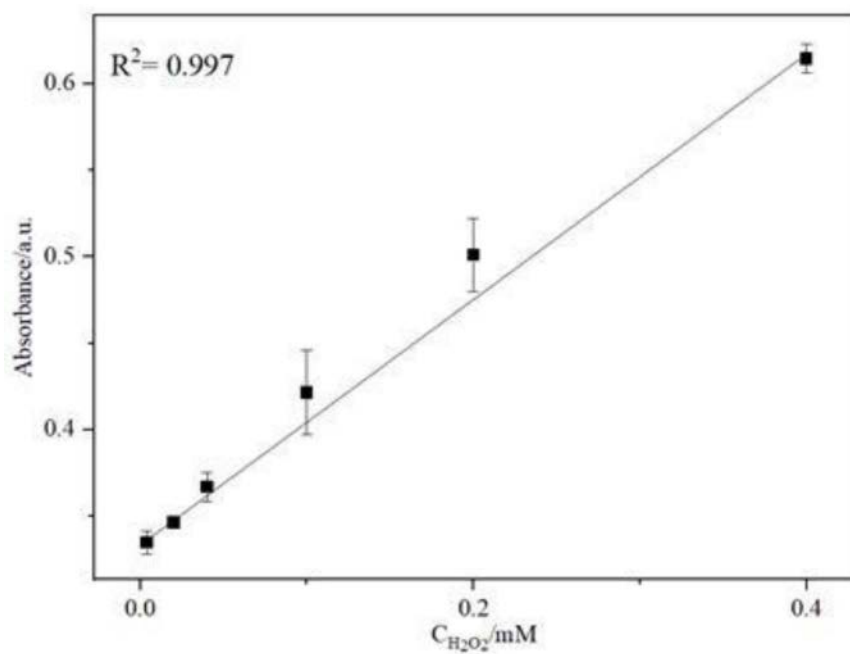


图5