

功能材料

基于 Co-MOFs 衍生物用于 L-Cys 的 比色和智能手机双模检测

高 仪, 刘耀鹏, 储婷婷, 郑 寅*, 黄文胜

(湖北民族大学 化学与环境工程学院, 湖北 恩施 445000)

摘要: 采用室温合成-热解法制备了一种具有类过氧化物酶性质的金属钴有机框架衍生纤维棒状碳材料 (Co-DM)。利用 SEM、TEM、XRD 和 XPS 对其形貌、结构及元素组成进行了表征。通过活性氧捕获实验研究了其催化机理, Co-DM 可催化 H_2O_2 使其释放出超氧阴离子自由基 ($\bullet O_2^-$) 和羟基自由基 ($\bullet OH$), 从而使无色的显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 氧化成蓝色的氧化态产物 (oxTMB), 在 652 nm 处有最大的紫外吸收峰; 而 L-半胱氨酸 (L-Cys) 具有抗氧化性, 能够还原 oxTMB 使蓝色褪色。基于此原理建立了一种检测 L-Cys 的比色检测方法。在 pH=4.0、温度为 40 °C 的最优条件下, L-Cys 的浓度与 652 nm 处的吸光度在 0.1~15.0 $\mu mol/L$ 范围呈线性关系, 检出限 (LOD) 为 0.35 $\mu mol/L$ 。此外, 借助自制的智能手机光学设备和 Color Garb 软件, 通过记录不同浓度 L-Cys 下溶液在白色 (0, 0, 0) 至黑色 (255, 255, 255) 范围内颜色变化的特征值 R (红)、 G (绿)、 B (蓝) 值, 建立了 Co-DM 的相对活性与颜色特征值的定量关系, 检测范围为 0.1~70.0 $\mu mol/L$, LOD 为 0.27 $\mu mol/L$ 。该方法还成功地应用于临床人血清中 L-Cys 的检测, 回收率在 94.0%~101.5% 之间。

关键词: 比色检测; 即时检测; 类过氧化物酶; L-半胱氨酸; 功能材料

中图分类号: R318; O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 02-0364-09

Co-MOFs derivative for dual-mode detection of L-Cys based on colorimetric analysis and smartphone

GAO Yi, LIU Yaopeng, CHU Tingting, ZHENG Yin*, HUANG Wensheng

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China)

Abstract: A metal-cobalt organic framework-derived fibrous rod-like carbon material (Co-DM) with peroxidase-like properties was synthesized via room-temperature synthesis-pyrolysis method. The Co-DM obtained was characterized by SEM, TEM, XRD and XPS then for analyses on morphology, structure and elemental composition, and active oxygen capture experiment was further conducted for investigation of its catalytic mechanism. It was found that H_2O_2 under the catalysis of Co-DM released superoxide anion radicals ($\bullet O_2^-$) and hydroxyl radicals ($\bullet OH$), thus oxidizing the colorless chromogenic substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to blue oxidation state product (oxTMB) with the largest adsorption peak at 652 nm. Since L-cysteine (L-Cys), with antioxidant properties, could reduce oxTMB thus leading the blue color product back to colorless, a colorimetric method for L-Cys detection was accordingly established. Under the optimal conditions of pH=4.0, temperature of 40 °C, the concentration of L-Cys in the range of 0.1~15.0 $\mu mol/L$ showed a linear relationship with absorbance at 652 nm, and the limit of detection (LOD) was 0.35 $\mu mol/L$. In addition, the quantitative relationship between the relative activity of Co-DM and the color characteristic values was established by recording the characteristic values R (red), G

收稿日期: 2023-03-09; 定用日期: 2023-05-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230189

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22066010); 湖北民族大学高水平科研成果校内培育项目 (PY22004); 湖北民族大学硕士研究生科研创新资助项目 (MYK2022030)

作者简介: 高 仪 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: gy13954113528@163.com。联系人: 郑 寅 (1986—), 男, 副教授, E-mail: zhengyin0617@163.com。

(green), and *B* (blue) values of color change in the range of white (0, 0, 0) to black (255, 255, 255) for solutions at different concentrations of L-Cys with the aid of a homemade smartphone optical device and Color Garb software. The detection range was 0.1~70.0 $\mu\text{mol/L}$ and the LOD was 0.27 $\mu\text{mol/L}$. This method was also successfully applied in the detection of L-Cys in clinical human serum, with recovery rate between 94.0%~101.5%.

Key words: colorimetric assay; point-of-care testing; peroxidase-like enzyme; L-cysteine; functional materials

L-半胱氨酸 (L-Cys) 是一种维持机体氧化还原稳态所必需的氨基酸^[1], 是大多数生物肽和蛋白质分子的主要成分^[2], 当其含量发生失衡时会导致严重的人类健康问题, 如胱氨酸病、肝损伤、生长发育问题、心血管疾病等^[3-4]。因此, 建立一种高效、简便的分析方法用于生物、医学领域中对 L-Cys 异常水平的检测至关重要^[5]。

近年来, 已有诸如高效液相色谱^[6]、质谱^[7]、电化学^[8]和比色分析等方法用于 L-Cys 的检测。其中, 比色分析由于快速、灵敏和可视化等优点已成为目前检测 L-Cys 的主要方法。WU 等^[9]设计了一种具有过氧化物酶活性的 DNA-银/铂纳米团簇 (DNA-Ag/PtNCs), 利用 L-Cys 对其类酶活性的抑制作用构建了一种比色传感器, 其对 L-Cys 的检出限为 2.0 nmol/L。CHEN 等^[10]设计了一种以钴-氮/碳-900 (Co-N/C-900) 金属有机框架衍生纳米酶作为氧化酶模拟物用于检测 L-Cys 的比色方法, 其检出限为 33.0 nmol/L。LIU 等^[11]利用功能化氧化石墨烯-灵芝多糖优良的过氧化物酶特性, 成功建立了一种高灵敏度和选择性的比色检测方法, 用于检测痕量 L-Cys, 其检出限约为 16 nmol/L, 线性范围为 1.0~20.0 mmol/L。比色分析法尽管已在检测 L-Cys 方面取得了较好的成效, 但仍依赖于专业的仪器设备在实验室内完成, 这限制了其在实际分析检测中的应用。基于智能手机的即时检测技术 (POCT) 是解决上述问题的有效方案, 通过将微型传感器与智能手机相结合, 实现了比传统比色方法更经济、更灵活、更快速的检测。

近年来, 智能手机作为生物传感器和移动终端, 已在医疗、生物安全^[12]、环境监测^[13]、食品安全领域^[14]具有广泛应用。GUO 等^[15]构建了一种银纳米粒子/氨基功能化的 Zr^{4+} 与二羧酸配体构建的三维多孔金属有机框架材料 (Ag NPs/UiO-66-NH₂) 荧光比率探针, 结合智能手机光学设备实现了对代谢综合症患者葡萄糖和胆固醇的及时检测。CHU 等^[16]将蓝色碳点和橙色金纳米团簇在 Cu^{2+} 的协助下混合, 构建了强大的荧光“关-开”纳米探针, 将此比率荧光传感器与 3D 打印智能手机设备相结合, 用于快速、灵敏、定量和现场测定人血清中的谷胱甘肽。田立

楠^[17]利用金纳米粒子结合 POCT 通过解析三原色光谱实现了对 L-Cys 的检测, 但材料制备成本较高限制了其应用。因此, 选择一种制备简便、成本低廉、具有优异酶活性的纳米酶材料至关重要。

在众多纳米酶材料中, 金属有机框架 (MOFs) 材料因其结构可控、比表面积大、活性位点丰富等优点^[18]已广泛用于比色传感分析中。其中, 以 Co、Ni 和 Zn 为金属中心的 MOFs 材料表现出较好的类过氧化物酶^[19]、类氧化物酶^[20]、类超氧化物歧化酶^[21]等活性, 然而这类 MOFs 材料的常规制备方法是水热法, 水热法存在周期长、能耗高等缺点。与传统水热法合成 Co 基 MOFs 材料相比, 室温合成法^[22]具有制备过程绿色简便、成本低的优势, 并且三乙胺的引入大大降低了合成所需要的时间^[23]。

本文拟通过室温合成-热解法来制备一种具有类过氧化物酶性质的金属钴有机框架衍生纤维棒状碳材料 (Co-DM), 并基于其类酶活性构建一种比色传感器, 将该传感器与智能手机和自制的光学设备相结合, 建立一种可用于现场分析人血清样品中 L-Cys 的智能手机检测平台。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

均苯三甲酸 (H_3BTC)、无水乙醇、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、三乙胺 ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 环己烷 (C_6H_{12})、L-Cys、L-亮氨酸 (L-Leucine)、L-甘氨酸 (L-Glycine)、赖氨酸 (Lysine)、葡萄糖 (Glucose)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、对苯醌、硫脲、对苯二甲酸 (PTA), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; H_2O_2 (质量分数为 30%)、醋酸钠 (CH_3COONa)、冰乙酸 (CH_3COOH)、NaOH, 分析纯, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 实验用水均为超纯水。

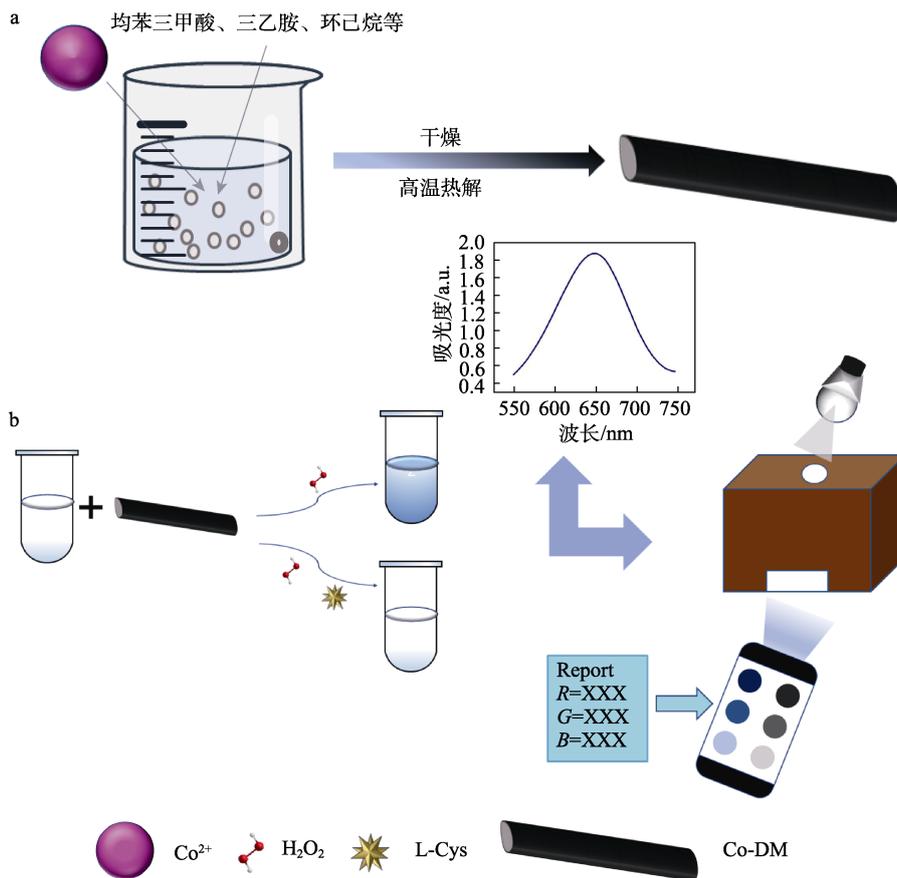
Quanta EG250 型扫描电子显微镜 (SEM)、Tecnai G2 F20 型透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司; XRD-7000 型 X 射线粉末衍射仪 (XRD), UV-2550 型紫外-可见分光光度计、RF-6000 型荧光分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; ESCALAB 250 Xi

型 X 射线光电子能谱仪 (XPS), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; KZ-HQ 型超纯水机, 上海科冶环保设备有限公司。

1.2 材料制备

Co-DM 的制备及 L-Cys 的检测机理示意图如图 1 所示。Co-MOFs 采用室温合成法制备^[24-25]。将 4.0 mmol H₃BTC 溶于 100.0 mL 无水乙醇, 并加入 100.0 mL 超纯水, 向上述混合溶液中加入 6.0 mmol Co(NO₃)₂·6H₂O 超声溶解。将 1.7 mL 三乙胺加入到

20.0 mL 环己烷中形成混合溶液, 将其滴加至上述溶液表面, 可以在两相界面处观察到红色沉淀, 并缓慢沉入底部, 静置后, 收集底部的红色沉淀, 用超纯水和无水乙醇各洗涤 3 次后放于 50 °C 真空干燥箱中干燥 12 h, 得到 Co-MOFs。然后, 将 Co-MOFs 置于马弗炉中于 350 °C 下煅烧 2 h, 得到黑色粉末 Co-MOFs 衍生材料 Co-DM。取 1.0 mg Co-DM 超声分散于 1.0 mL 超纯水中, 超声 3 h, 获得质量浓度为 1.0 g/L 的 Co-DM 分散液。



注: R (红)、G (绿)、B (蓝) 为颜色特征值

图 1 Co-DM 的制备过程 (a) 及 L-Cys 的检测机理示意图 (b)

Fig. 1 Schematic diagram of preparation of Co-DM (a) and detection mechanism of L-Cys (b)

1.3 比色实验方法

1.3.1 Co-DM 的类过氧化物酶性质测试

在 H₂O₂ 存在条件下, 通过 Co-DM 催化氧化显色底物 TMB, 考察其类过氧化物酶活性。向 2000.0 μL 醋酸盐缓冲液 (pH=4.0) 中加入 30.0 μL 10.0 mmol/L TMB (溶剂为无水乙醇)、0.5 μL 体积分数为 30% 的 H₂O₂、30.0 μL 质量浓度为 1.0 g/L 的 Co-DM 分散液, 此混合体系记为 TMB-H₂O₂ 体系, 孵育 1 h 移入石英比色皿中, 放入紫外-可见分光光度计中, 记录紫外-可见吸收光谱。

1.3.2 pH 及孵育温度的优化

在 1.3.1 节 TMB-H₂O₂ 体系中, 首先, 在孵育温

度为 40 °C 时对 Co-DM 反应及检测 L-Cys 时的醋酸盐缓冲液 pH (3.0~8.0) 进行优化; 然后, 在得到的最优 pH 下, 对孵育温度 (10.0~60.0 °C) 进行优化, 确定最优实验条件。

1.3.3 Co-DM 的稳态动力学测试

为了进一步探究 Co-DM 的类过氧化物酶活性, 对 Co-DM 进行了稳态动力学测试。改变 TMB-H₂O₂ 体系中 TMB (0.015~0.22 mmol/L) 或 H₂O₂ (0.1~2.0 mmol/L) 的浓度, 在最优实验条件下孵育 1 min, 收集了体系的动力学数据, 反应动力学参数由式 (1) 和 (2) 计算:

$$v = \frac{v_{\max} \times c}{K_m + c} \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{c} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2)$$

式中: v 为催化反应的初始速率, 1×10^{-8} mol·s/L; v_{\max} 为最大反应速率, 1×10^{-8} mol·s/L; c 为底物 H_2O_2 或 TMB 的浓度, mmol/L; K_m 为米氏常数, mmol/L。

1.3.4 Co-DM 的催化反应机理测试

为了阐明 Co-DM 的催化机理, 利用活性氧自由基捕获剂对催化过程中可能产生的中间体作了鉴定。向 TMB- H_2O_2 体系中加入不同体积 (5.0、10.0、20.0、30.0 μ L) 的对苯醌或硫脲(浓度均为 0.1 mol/L) 于最优实验条件下孵育 1 h, 其中对苯醌为 $\cdot O_2$ 捕获剂, 硫脲为 $\cdot OH$ 捕获剂, 用比色法进行测试, 记录 652 nm 处的吸光度 (A)。TMB- H_2O_2 体系中加入 20 μ L 0.05 mol/L 的 PTA 后于室温下孵育 5 h, 在 315 nm 激发波长下, 发射波长 350~500 nm 范围内, 记录不同体系的荧光光谱, 对可能存在的 $\cdot OH$ 进行研究。

1.3.5 L-Cys 的定量检测

将不同浓度的 L-Cys 分别加入到 TMB- H_2O_2 体系中, 在最优实验条件下记录溶液的紫外-可见吸收光谱。

1.3.6 Co-DM 的抗干扰性、稳定性和重现性测试

为了探究体系的选择性, 考察了 0.1 mol/L 的 L-Leucine、L-Glycine、Lysine、Glucose、 Na^+ 及 Ca^{2+} 对 TMB- H_2O_2 体系检测 L-Cys 的影响。

将 Co-DM 分散液于室温下放置 70 d 后检测 TMB- H_2O_2 体系中的 L-Cys (0.01 mol/L), 以此考察 Co-DM 的稳定性。用平行制备的 7 组 Co-DM 分散液来检测 TMB- H_2O_2 体系中的 L-Cys (0.01 mol/L), 以此考察 Co-DM 的重现性。

1.3.7 实际样品中 L-Cys 的检测

为了探究制备的纳米酶在实际样品中的应用潜力, 将所制备的 Co-DM 用于临床人血清样品中 L-Cys 的检测。采集的血清样品取 1.0 mL 置于 100.0 mL 容量瓶中, 用超纯水进行定容。取 1000.0 μ L 处理过的血清样品、30.0 μ L 10.0 mmol/L TMB、0.5 μ L 体积分数为 30% 的 H_2O_2 和 30.0 μ L 质量浓度为 1.0 g/L 的 Co-DM 加入到 1000.0 μ L 醋酸盐缓冲液 (pH = 4.0) 中, 然后将 10.0 μ L 不同浓度的 L-Cys 加入到上述混合溶液中, 后续步骤与 L-Cys 的定量检测步骤一致, 利用加标回收法^[26]进行实际样品检测。

1.4 POCT 实验方法

1.4.1 智能手机光学设备的搭建

荣耀 20 手机, 测试暗箱 (纸箱, 内部尺寸 30 cm×12 cm×23 cm, 四周粘有 A4 白纸, 底部固定有聚乙烯泡沫制作的支撑底座), 5 W LED 节能灯泡作为光源, 手机摄像头距支撑底座 8 cm, Color Garb 软件。

1.4.2 L-Cys 的定量检测

将孵育后的混合溶液置于 5.0 mL 的 PE 管中, 并放入搭建的测试暗箱中, 利用 Color Garb 软件进行实时成像并采集含有不同浓度 L-Cys 的 TMB- H_2O_2 体系的 R 、 G 、 B , 通过式 (3) 计算 T , 并作图, 其中, R_0 、 G_0 、 B_0 为空白缓冲溶液的颜色特征值。

$$T = \sqrt{(R-R_0)^2 + (G-G_0)^2 + (B-B_0)^2} \quad (3)$$

1.5 结构表征

SEM 测试: 操作电压为 30 kV。TEM 测试: 操作电压为 200 kV。XRD 测试: 操作电压为 40 kV, 电流为 30 mA。XPS 测试: 工作电压为 12 kV, 灯丝电流为 6 mA, 全谱扫描通能为 150 eV, 步长 1 eV, 窄谱扫描通能为 50 eV, 步长 0.1 eV。

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

图 2 为 Co-DM 不同倍数下的 SEM 和 TEM 图。由图 2a 可知, Co-DM 呈纤维棒状。由图 2b 可以明显看到, Co 纳米粒子均匀地分布在棒上^[25]。由图 2c 及图 2d 白色框内 Co 纳米粒子可见, Co 纳米粒子均匀分布在碳表面上。以上结果表明, Co 纳米粒子已成功负载在碳表面。

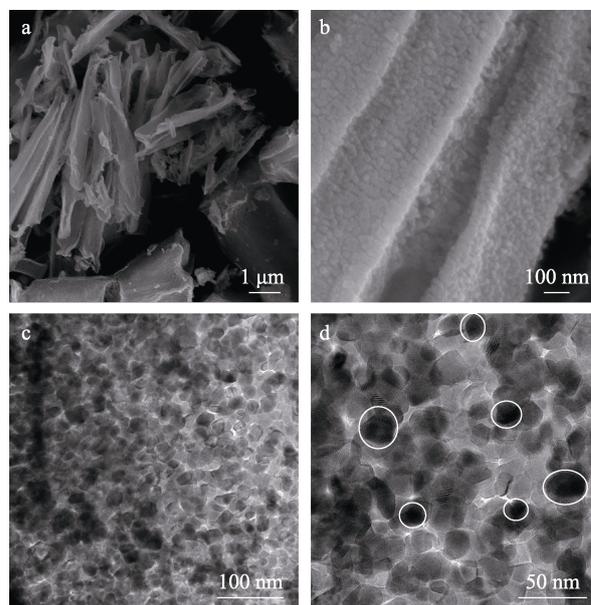


图 2 Co-DM 的 SEM (a, b) 和 TEM (c, d) 图
Fig. 2 SEM (a, b) and TEM (c, d) images of Co-DM

对 Co-MOFs 及 Co-DM 进行了 XRD 测试, 结果如图 3 所示。

由图 3 可见, Co-MOFs 衍射峰清晰且尖锐, 表明制备的 Co-MOFs 具有较好的结晶度, 所有衍射峰位置均与基于 Co-MOFs 单晶 XRD 数据的模拟结果吻合良好^[27], 粉末衍射图中没有其他峰, 说明

Co-MOFs 样品纯度较高^[28]。Co-DM 在 $2\theta=21.0^\circ$ 出现的衍射峰对应于石墨堆叠的(002)晶面,表明材料为非晶态碳,碳主要来源于配体 H_3BTC ^[25], 19.0° 、 31.1° 、 36.8° 、 38.6° 、 44.6° 、 55.7° 、 59.2° 和 65.1° 附近的衍射峰分别对应于 Co_3O_4 的(111)、(220)、(311)、(222)、(400)、(422)、(511)和(440)晶面,这些衍射峰均对应标准卡片 JCPDS No. 43-1003,与 Co-MOFs 相比,并未出现其他峰,说明煅烧后的产物是纯相的立方尖晶石结构 Co_3O_4 ^[29]。

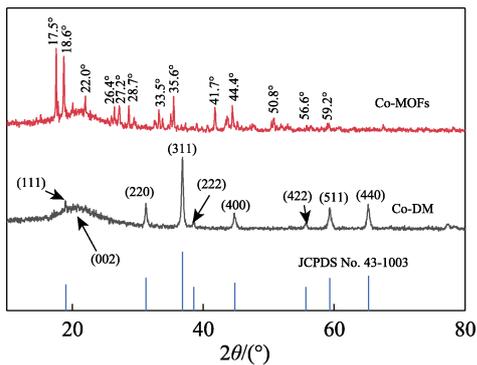


图 3 Co-MOFs 及 Co-DM 的 XRD 谱图
Fig. 3 XRD patterns of Co-MOFs and Co-DM

为了进一步探究 Co-DM 的元素组成及形态,通过 XPS 对 Co-DM 进行了测试,结果如图 4 所示,其中,图 4a 为 Co-DM 的 XPS 谱图,图 4b、c、d 分别为 C 1s、O 1s、Co 2p 的高分辨率 XPS 谱图。

由图 4a 可知, C 1s 结合能出现在 284.96 eV; O 1s 的结合能出现在 530.21 eV; Co 2p 结合能出现在 780.44 和 796.38 eV 左右。

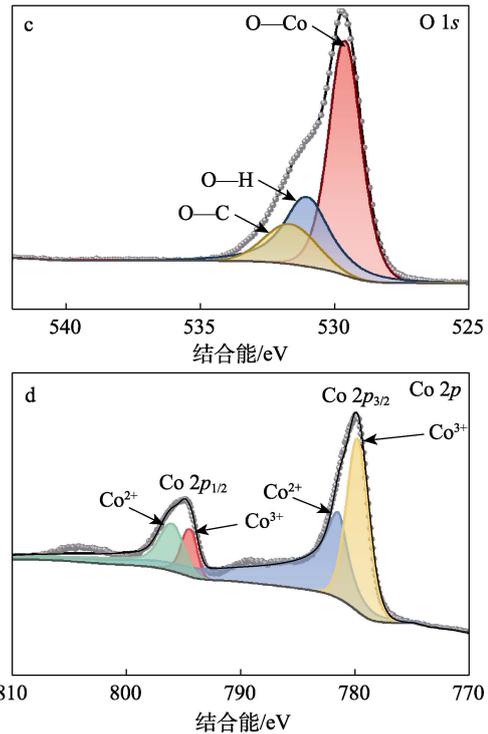
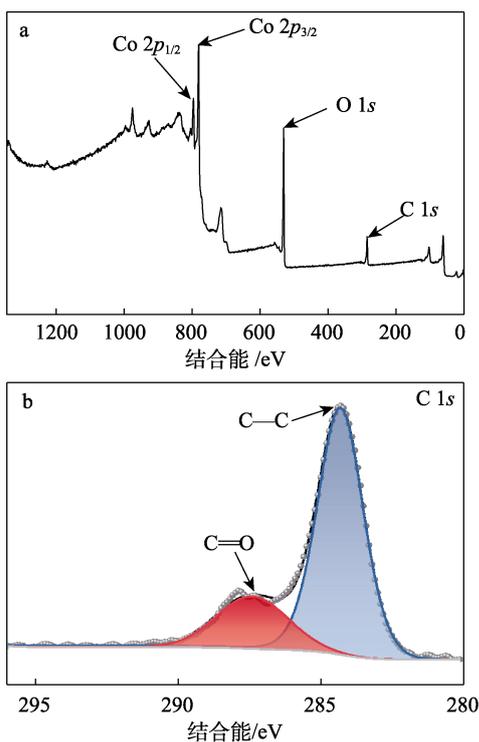


图 4 Co-DM 的 XPS 谱图及 C 1s、O 1s 和 Co 2p 的高分辨率 XPS 谱图

Fig. 4 XPS spectrum as well as high-resolution XPS spectra of C 1s, O 1s and Co 2p of Co-DM

由图 4b 可知, 284.32 和 287.39 eV 左右的结合能分别归属于 C—C 和 C=O。由图 4c 可知, 529.57、530.98 和 531.64 eV 附近的结合能分别归属于 O—Co、O—H 和 O—C。由图 4d 可知, 779.73 和 794.43 eV 处的结合能属于 Co^{3+} , 781.46 和 796.05 eV 处的结合能归属于 Co^{2+} ^[30]。

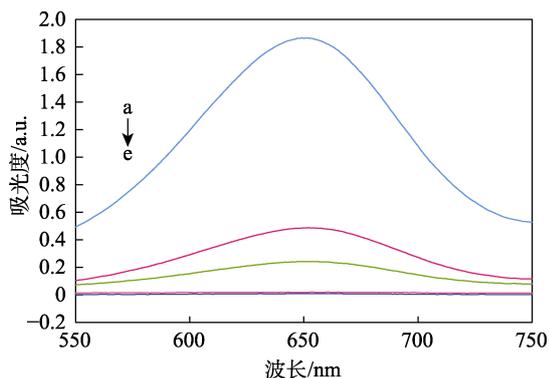
结果说明, Co-DM 中的 Co 元素存在 Co^{2+} 和 Co^{3+} 两种价态, 这与 XRD 结果一致。 Co^{2+} 与 Co^{3+} 的共存能提高 Co-DM 的催化活性^[31]。

2.2 Co-DM 用于比色检测 L-Cys

2.2.1 Co-DM 的类过氧化物酶性质分析

按照 1.3.1 节实验方法, 考察了 Co-DM 是否具有类过氧化物酶性质, 结果如图 5 所示。

由图 5 可知, TMB 及 TMB+Co-DM 体系在 652 nm 处无吸收峰; TMB+ H_2O_2 体系在 652 nm 处有吸收峰, 但吸光度较小; TMB+Co-DM+ H_2O_2 体系在 652 nm 处有明显的吸收峰, 且吸光度较大, 说明添加的 Co-DM 可以促进 H_2O_2 分解出活性氧, 从而加快催化 TMB 生成蓝色氧化态产物(oxTMB), 证实 Co-DM 具有类过氧化物酶活性; 而加入 L-Cys 后的 TMB+Co-DM+ H_2O_2 +L-Cys 体系吸光度明显下降, 可以解释为具有还原性的 L-Cys 能够将 oxTMB 还原, 从而导致 652 nm 处的吸光度降低, 因此, 可以利用 Co-DM 的类过氧化物酶活性对 L-Cys 进行定量检测。



a—TMB+Co-DM+H₂O₂体系; b—TMB+H₂O₂体系; c—TMB+Co-DM+H₂O₂+L-Cys体系; d—TMB+Co-DM体系; e—TMB

图 5 不同 TMB 体系的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 5 UV-Vis absorption spectra of different TMB systems

2.2.2 pH 及孵育温度的优化

与天然酶类似, 纳米酶的活性也受到外界条件的影响, 因此, 按照 1.3.2 节实验方法对 pH 和孵育温度进行了优化, 结果如图 6 所示, 其中, $\Delta A = A - A_0$, A_0 与 A 分别为加入 10 μ L 0.01 mol/L L-Cys 前后体系的吸光度。

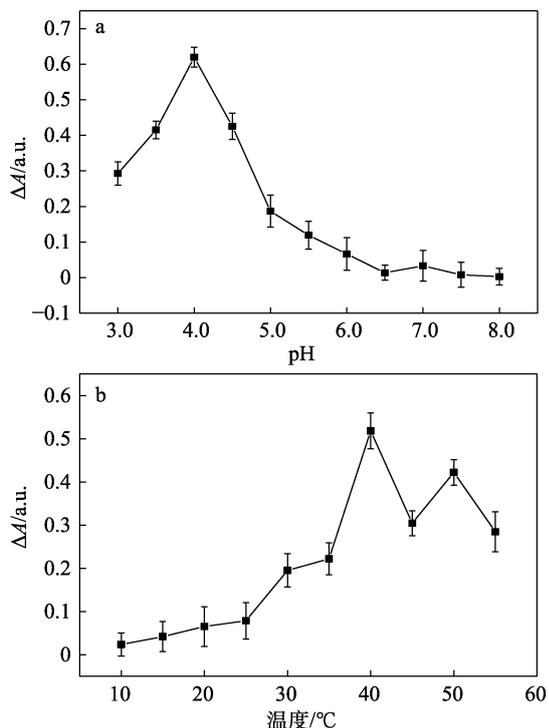


图 6 pH (a)、温度 (b) 对 Co-DM 过氧化物酶活性的影响

Fig. 6 Effects of pH (a), temperature (b) on Co-DM peroxidase-like activity

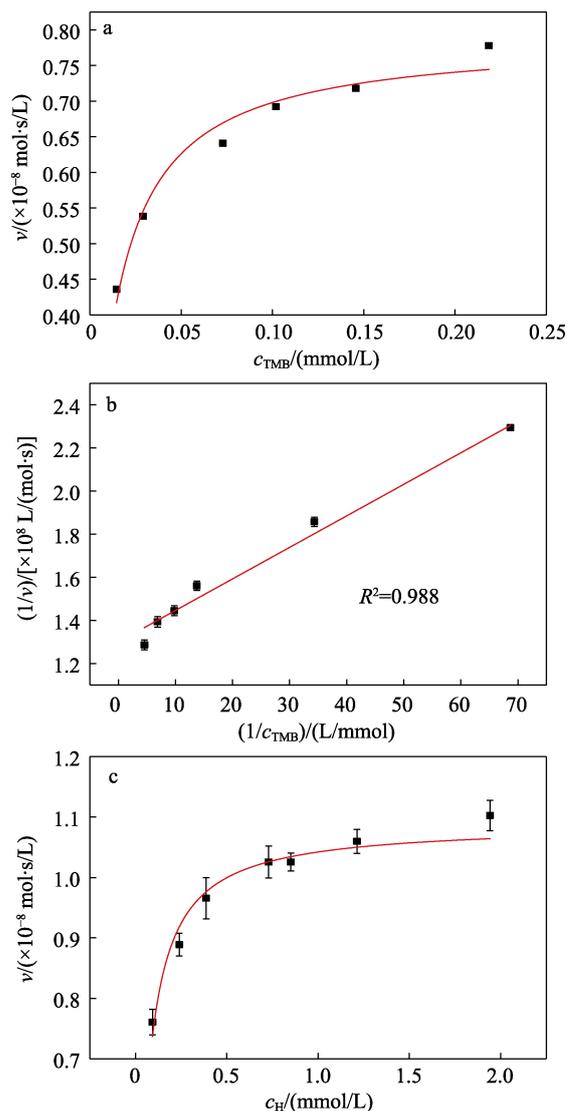
由图 6a 可知, pH 在 3.0~4.0 范围内时, 体系的吸光度随 pH 升高而增加, pH 在 4.0~8.0 范围内, 吸光度随 pH 升高而降低。由图 6b 可知, 孵育温度在

10~40 $^{\circ}$ C 范围内时, 吸光度随温度的升高而增加, 在 40~60 $^{\circ}$ C 时, 吸光度整体呈现下降趋势。因此, 选择 pH=4.0、温度为 40 $^{\circ}$ C 作为实验的最优条件。

2.2.3 Co-DM 的稳态动力学分析

按照 1.3.3 节实验方法, 对 Co-DM 进行了稳态动力学测试, 结果见图 7。

如图 7 所示, Co-DM 的动力学数据可以很好地与 Michaelis-Menten 方程和 Lineweaver-Burk 模型拟合。由式 (2) 及图 7b、d 可知, $1/v$ 与 $1/c$ 之间存在较好的线性关系 ($R^2_{\text{TMB}}=0.988$, $R^2_{\text{H}}=0.981$)。通常, K_m 表示催化剂对底物的亲和力, K_m 越小, 催化剂对底物的亲和力越强^[32]。与已报道的辣根过氧化物酶 (HRP) 和典型的 Fe₃O₄ 纳米酶及仅含 Co²⁺ 或其他形态 Co 的纳米酶相比 (表 1), 以 TMB 或 H₂O₂ 为底物的 Co-DM 的 K_m 均较小, 表明 Co-DM 对 TMB 和 H₂O₂ 的亲和力较高, 这一结果证明了 Co-DM 具有高效的类过氧化物酶活性。



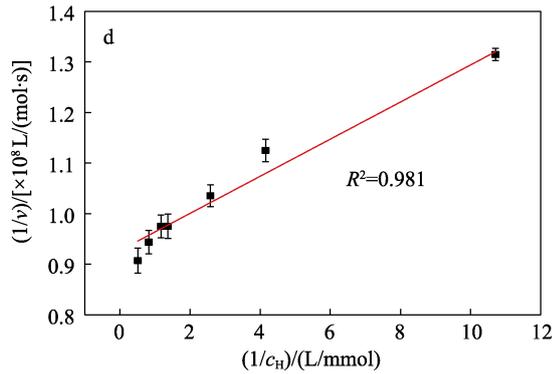


图 7 H₂O₂ 浓度 (c_H) 为 10 mmol/L, TMB 浓度 (0.015~0.22 mmol/L) 变化曲线 (a); 图 a 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线 (b); TMB 浓度为 10 mmol/L, H₂O₂ 浓度 (0.1~2.0 mmol/L) 变化曲线 (c); 图 c 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线 (d)

Fig. 7 Change curves of TMB concentration (0.015~0.22 mmol/L) for H₂O₂ concentration (c_H) of 10 mmol/L (a); Lineweaver-Burk double inverse plot of Fig. a (b); Change curves of H₂O₂ concentration (0.1~2.0 mmol/L) for TMB concentration of 10 mmol/L (c); Lineweaver-Burk double inverse plot of Fig. c (d)

表 1 Co-DM 及不同模拟过氧化物酶材料对 TMB 或 H₂O₂ 的动力学参数

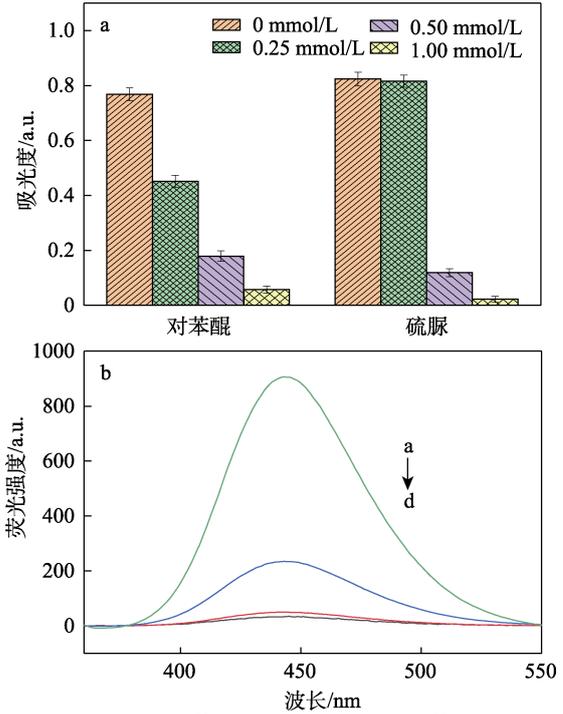
Table 1 Kinetic parameters of TMB or H₂O₂ by Co-DM and different simulated peroxidase materials

催化剂	$K_m/$ (mmol/L)		$v_{max}/$ ($\times 10^{-8}$ mol·s/L)		参考文献
	TMB	H ₂ O ₂	TMB	H ₂ O ₂	
C-confined CoO _x NPs ^①	0.710	54.65	36.80	21.70	[33]
CoNCN ^②	0.530	—	32.40	—	[34]
Co ₃ O ₄ GNs ^③	0.120	245.00	33.20	28.50	[35]
Fe ₃ O ₄ 纳米粒子	0.098	154.00	3.44	9.78	[36]
HRP ^④	0.434	3.70	10.00	8.71	[36]
Co-DM	0.012	0.042	0.77	1.08	本文

①为碳约束混合氧化钴纳米粒子; ②为钴氮共掺杂多孔碳纳米片; ③为 Co₃O₄ 刺花状纳米结构; ④为辣根过氧化物酶; “—”代表未给出。

2.2.4 Co-DM 的催化反应机理探究

为了进一步阐明 Co-DM 的催化机理,按照 1.3.4 节实验方法,对 TMB-H₂O₂ 体系中的活性氧类型进行研究,结果如图 8 所示。由图 8a 可知,随着对苯醌浓度的增加, TMB-H₂O₂ 体系的吸光度有明显降低,这验证了催化过程中·O₂ 的存在,同时随着硫脲浓度的增加, TMB-H₂O₂ 体系的吸光度也有降低,确定了·OH 的存在。由图 8b 可知,PTA+H₂O₂ 与 PTA 体系的荧光强度较弱; PTA+Co-DM+H₂O₂ 体系的荧光强度远大于 PTA+Co-DM 体系的荧光强度,这也表明·OH 在催化过程中存在^[37]。结果表明,催化过程存在的中间体为·O₂ 和·OH。



a—PTA+Co-DM+H₂O₂ 体系; b—PTA+Co-DM 体系; c—PTA+H₂O₂ 体系; d—PTA 体系

图 8 含 10 mmol/L H₂O₂ 和质量浓度为 1 g/L Co-DM 的体系在醋酸缓冲溶液 (pH = 4.0) 中和不同活性氧捕获剂的反应 (a); 不同反应体系的荧光光谱 (b)

Fig. 8 System containing 10 mmol/L H₂O₂ and mass concentration of 1 g/L Co-DM reacted with different reactive oxygen traps in an acetic acid buffer solution (pH = 4.0) (a); Fluorescence spectra of different reaction systems (b)

2.2.5 L-Cys 的定量检测

按照 1.3.5 节实验方法,对 L-Cys 进行定量检测。图 9 为添加不同浓度 L-Cys (0.1~15.0 μmol/L) 体系的紫外-可见吸收光谱。

由图 9 可知,随着 L-Cys 浓度的增加,体系在 652 nm 处的吸光度明显降低,该处的吸光度与 L-Cys 浓度呈现较好的线性关系,线性回归方程为 $A=0.043c+0.015$ ($R^2=0.998$),检出范围为 0.1~15.0 μmol/L, LOD 为 0.35 μmol/L。

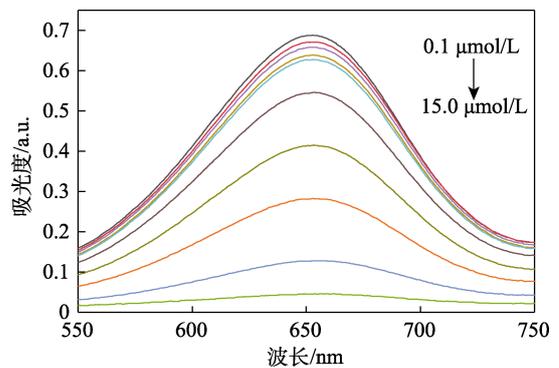


图 9 加入不同浓度 L-Cys 后体系的 UV-Vis 吸收光谱
Fig. 9 UV-Vis absorption spectra of the systems after adding L-Cys with different concentrations

2.3 抗干扰性、稳定性及重现性

为了探究 TMB-H₂O₂ 体系的选择性, 按照 1.3.6 节实验方法, 研究了 Co-DM 对几种浓度较高的干扰物的响应。结果发现, 加入 0.01 mol/L 的 L-Cys 后, Co-DM 的相对催化活性较高, 相比之下, 即使干扰物的浓度高得多, 它们的影响也可以忽略不计。另外, 还探究了 Co-DM 的稳定性和重现性。由结果可知, 在室温下放置 70 d 后, Co-DM 的相对催化活性均 >95%, 说明其存储稳定性较好。其次, 相同批次及不同批次 Co-DM 催化活性差异较小, 相对标准偏差 (RSD) 均 <5%, 表明催化剂的重现性较好。

2.4 实际样品检测

为了评估 TMB-H₂O₂ 体系在实际样品中的应用, 将开发的 Co-DM 按照 1.3.7 节实验方法对临床血清样品中的 L-Cys 进行了定量检测, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 所有样品的回收率在 96.0%~101.5% 之间, RSD 均 <5%。结果表明, Co-DM 在实际样品中检测 L-Cys 有一定应用潜力。

2.5 Co-DM 用于 POCT 检测 L-Cys

此外, 按照 1.4.2 节实验方法, 对 L-Cys 实现了即时检测, 结果如图 10 所示。

由图 10 可知, 随着 L-Cys 浓度 (0.1~70 μmol/L) 的增加, Co-DM 的相对活性 [T_0/T , T_0 为 TMB-H₂O₂ 体系中 L-Cys 浓度为 0 μmol/L 时, 通过式 (3) 计算所得] 降低, 并且 Co-DM 的相对活性与 L-Cys 浓度呈现较好的线性关系, 线性方程为 $y = -2.38c + 197.86$ ($R^2 = 0.994$) (y 为相对活性, c 为 L-Cys 浓度, μmol/L); 检出范围为 0.1~70.0 μmol/L, LOD 为 0.27 μmol/L。

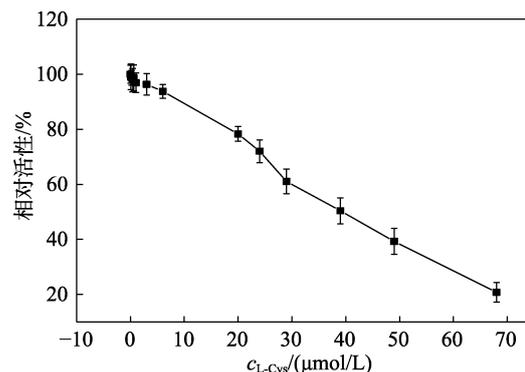


图 10 体系的相对活性随 L-Cys 浓度的变化

Fig. 10 Change of relative activity of the system with L-Cys concentration

与目前其他文献报道的比色和 POCT 技术检测 L-Cys 的检出范围和检出限相比, 本方案具有较宽的检出范围和较低的检出限, 具有较好的优越性, 结果见表 3。

表 3 近年来报道的测定 L-Cys 的分析方法的性能比较
Table 3 Performance comparison of analytical methods for the determination of L-Cys reported in recent years

催化剂	方法	检出范围/(μmol/L)	检出限/(μmol/L)	参考文献
2D Co ₃ S ₄ ^①	比色	0.2~100.0	2.70	[38]
CeO ₂ /CoO NCs ^②	比色	5.0~10.0	3.71	[39]
g-C ₃ N ₄ /AuNPs ^③	POCT	0~40.0	9.60	[40]
Sm-2 _n ^④	POCT	0~130.0	5.70	[41]
Co-DM	比色	0.1~15.0	0.35	本文
	POCT	0.1~70.0	0.27	

①为 2D Co₃S₄ 纳米薄片; ②为花状 CeO₂/CoO *p-n* 异质结纳米复合材料; ③为类石墨相氮化碳/金纳米粒子; ④为钐大环配合物。

表 2 实际样品中 L-Cys 的检测结果

Table 2 Test results of L-Cys in the actual sample

样品编号	比色				POCT			
	加入浓度/(μmol/L)	测试值/(μmol/L)	回收率/%	RSD/%	加入浓度/(μmol/L)	测试值/(μmol/L)	回收率/%	RSD/%
1	0.1	0.096	96.0	3.2	0.1	0.094	94.0	3.1
2	1.0	0.990	99.7	2.1	15.0	15.230	101.5	4.3
3	8.0	8.050	100.6	2.4	50.0	49.500	99.0	3.7

3 结论

通过室温合成-热解法成功地制备了 Co-DM, 材料中 Co²⁺ 与 Co³⁺ 的共存可以提供更多的活性位点, 从而使 Co-DM 具有优异的过氧化物酶活性, 基于其酶活性建立了比色测定 L-Cys 的方法, 检出范围为 0.1~15.0 μmol/L, LOD 为 0.35 μmol/L, 并具有良好的稳定性。将 Co-DM 用于临床血清样品中的 L-Cys 的定量检测, 所有样品的回收率在 94.0%~101.5% 之间, RSD 均 <5%。此外, 还利用智能手机

结合自制的光学设备实现了对 L-Cys 的便携、快速检测, 检出范围为 0.1~70.0 μmol/L, LOD 为 0.27 μmol/L。本文建立的智能手机辅助检测 L-Cys 的方法具有材料制备绿色、环保, 检测方式快速、便携等优点, 拓展了纳米酶的合成技术, 为便携化学传感器的开发提供了新思路。

参考文献:

- [1] JIANG X Q, HUANG J B, CHEN T Y, *et al.* Synthesis of hemicellulose/deep eutectic solvent based carbon quantum dots for ultrasensitive detection of Ag⁺ and L-cysteine with "off-on" pattern [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153:

- 412-420.
- [2] BAMDAD F, KHORRAM F, SAMET M, *et al.* Spectrophotometric determination of L-cysteine by using polyvinylpyrrolidone-stabilized silver nanoparticles in the presence of barium ions[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 161: 52.
- [3] FAN H Z, ZHANG M, BHANDARI B, *et al.* Food waste as a carbon source in carbon quantum dots technology and their applications in food safety detection[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 95: 86-96.
- [4] XUE Z H, XIONG L L, PENG H, *et al.* A selective colorimetric sensing strategy for cysteine based on an indicator-displacement mechanism[J]. *New Journal of Chemistry*, 2013, 46: 4324-4330.
- [5] LIU L R, ZHU G B, ZENG W, *et al.* Silicon quantum dot-coated onto gold nanoparticles as an optical probe for colorimetric and fluorometric determination of cysteine[J]. *Microchim Acta*, 2019, 186: 98.
- [6] ZHANG W B, LI P L, GENG Q Q, *et al.* Simultaneous determination of glutathione, cysteine, homocysteine, and cysteinyl glycine in biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(25): 5845-5852.
- [7] KÜSTER A, TEA I, SWEETEN S, *et al.* Simultaneous determination of glutathione and cysteine concentrations and 2H enrichments in microvolumes of neonatal blood using gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390(5): 1403-1412.
- [8] LEE P T, THOMSON J E, KARINA A, *et al.* Selective electrochemical determination of cysteine with a cyclotricatechylene modified carbon electrode[J]. *Analyst*, 2015, 140(1): 236-242.
- [9] WU L L, WANG L Y, XIE Z J, *et al.* Colorimetric assay of l-cysteine based on peroxidase-mimicking DNA-Ag/Pt nanoclusters[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 235: 110-116.
- [10] CHEN J, HU S, CAI Y L, *et al.* Co-N/C-900 metal-organic framework-derived nanozyme as a H₂O₂-free oxidase mimic for the colorimetric sensing of l-cysteine[J]. *Analyst*, 2020, 147: 915-922.
- [11] LIU C, ZHAO Y M, XU D, *et al.* A green and facile approach to a graphene-based peroxidase-like nanozyme and its application in sensitive colorimetric detection of L-cysteine[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413: 4013-4022.
- [12] CHEN Y H, YAO Y, CHEN T Y, *et al.* Application of smartphone-based spectroscopy to biosample analysis: A review[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 172: 112788.
- [13] XING Y P, ZHU Q, ZHOU X H, *et al.* A dual-functional smartphone-based sensor for colorimetric and chemiluminescent detection: A case study for fluoride concentration mapping[J]. *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 2020, 319: 128254.
- [14] FAN Y J, LI J W, GUO Y P, *et al.* Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review[J]. *Measurement*, 2021, 171: 108829.
- [15] GUO L, SHEN S, YU Y L, *et al.* A smartphone optical device for point-of-care testing of glucose and cholesterol using Ag NPs/U₂O₃-NH₂-based ratiometric fluorescent probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93: 16240-16247.
- [16] CHU S Y, WANG H Q, DU Y X, *et al.* A portable smartphone platform integrated with nanoprobe-based fluorescent paper strip: Visual monitoring glutathione in human serum for health prognosis [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(22): 8175-8183.
- [17] TIAN L N (田立楠). Application of digitalisation of three-primary colour on smartphones to analytical chemistry[D]. Baoding: Hebei University (河北大学), 2015.
- [18] ZHA Q Q, LI M X, LIU Z H, *et al.* Hierarchical Co, Fe-MOF-74/Co/carbon cloth hybrid electrode: Simple construction and enhanced catalytic performance in full water splitting[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2020, 8(32): 12025-12035.
- [19] WAN H M, WANG Y F, CHEN J, *et al.* 2D Co-MOF nanosheet-based nanozyme with ultrahigh peroxidase catalytic activity for detection of biomolecules in human serum samples[J]. *Mikrochim Acta*, 2021, 188(4): 130.
- [20] ZHANG L, QIAO C F, CAI X Y, *et al.* Srocolorimetry-guided pore-microenvironment optimization to improve sensitivity of Ni-MOF electrochemical biosensor for chiral galantamine[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 426(15): 130730.
- [21] REN Q H, WEI F H, CHEN H L, *et al.* Preparation of Zn-MOFs by microwave-assisted ball milling for removal of tetracycline hydrochloride and Congo red from wastewater[J]. *Green Processing and Synthesis*, 2021, 10(1): 125-133.
- [22] DAI S, TISSOT A, SERRE C. Metal-organic frameworks: From ambient green synthesis to applications[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2021, 94(11): 2623-2636.
- [23] JIA H N, YAO N, CONG H J. Rapid synthesis of Co-based metal-organic framework nanoparticle at room temperature for efficient oxygen evolution reaction[J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2021, 37(11): 2011-2019.
- [24] LU L Y, CHEN J B, HUANG L S, *et al.* Hydroquinone and catechol metal-organic framework nanoparticle at room temperature for graphene composites[J]. *Journal of Analytical Science*, 2022, 36(6): 801-808.
- [25] LU H S (鲁海胜). Synthesis and electrocatalytic properties of metal-organic frameworks (Co, Fe) and their derivatives[D]. Hefei: University of Science and Technology of China (中国科学技术大学), 2018.
- [26] ZHANG B W, JAOUHARI A E, WU X R, *et al.* Synthesis and characterization of PEDOT-MC decorated Ag NPs for voltammetric detection of rutin in real samples[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2022, 877(15): 114632.
- [27] RAMACHAN D R, ZHAO C H, LUO D, *et al.* Morphology-dependent electrochemical properties of cobalt-based metal organic frameworks for supercapacitor electrode materials[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 267: 170-180.
- [28] YU G L, SUN L, MUHAMMAD F, *et al.* Cobalt-based metal organic framework as precursor to achieve superior catalytic activity for aerobic epoxidation of styrene[J]. *RSC Advances*, 2014, 4: 38804-38811.
- [29] SONG S S (宋珊珊). Synthesis of morphology controllable cobalt oxide and research catalytic properties[D]. Harbin: Harbin Engineering University (哈尔滨工程大学), 2012.
- [30] LYU L L (吕林林). Preparation and electrochemical properties of derivative electrode materials based on Co-MOF[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology (西南科技大学), 2021.
- [31] LI J N, LIU T T, DAHLGREN R A, *et al.* N, S-co-doped carbon/Co_{1-x}S nanocomposite with dual-enzyme activities for a smartphone-based colorimetric assay of total cholesterol in human serum[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1204: 339703.
- [32] GUPTA P K, SON S E, SEONG G H, *et al.* L-Cysteine-mediated self-assembled PtRu derived bimetallic metal-carbon hybrid: An excellent peroxidase mimics for colorimetric and fluorometric detection of hydrogen peroxide and cholesterol[J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2021, 8: 2101115.
- [33] SONG H W, LI X, PENG Y X, *et al.* Colorimetric evaluation of the hydroxyl radical scavenging ability of antioxidants using carbon-confined CoO_x as a highly active peroxidase mimic[J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(6): 354.
- [34] LI Y (李英). Two-dimensional MOF-derived cobalt-based carbon nanozymes and their analytical applications[D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2022.
- [35] YIN J F, CAO H Q, LU Y X. Self-assembly into magnetic Co₃O₄ complex nanostructures as peroxidase[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22: 527-534.
- [36] GAO L Z, ZHUANG J, NIE L, *et al.* Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(9): 577-583.
- [37] ISHIBASHI K I, FUJISHIMA A, WATANABE T, *et al.* Quantum yields of active oxidative species formed on TiO₂ photocatalyst[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2000, 134(1/2): 139-142.
- [38] HASHMI S, SINGH M, WEERATHUNGE P, *et al.* Cobalt sulfide nanosheets as peroxidase mimics for colorimetric detection of L-cysteine[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, 4(12): 13352-13362.
- [39] LIAN J J, LIU P, JIN C Q, *et al.* Flower-like CeO₂/CoO *p-n* heterojunctioned nanocomposites with enhanced peroxidase-mimicking activity for L-cysteine sensing[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(47): 17540-17550.
- [40] LI Y R, LIU G, JI D Z, *et al.* Smartphone-based label-free photoelectrochemical sensing of cysteine with cadmium ion chelation[J]. *Analyst*, 2022, 147: 1403-1409.
- [41] HUANG Y, SHEN Y J, CHEN T T, *et al.* Specific detection and determination of cysteine by a luminescent samarium macrocycle-based fluorescent probe platform[J]. *New Journal of Chemistry*, 2021, 45: 2366-2369.