

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810101788.X

[51] Int. Cl.

B01J 23/74 (2006.01)

G01N 21/75 (2006.01)

G01N 31/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101530798A

[22] 申请日 2008.3.12

[21] 申请号 200810101788.X

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 阎锡蕴 庄洁 高利增 杨东玲
冯静

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

[54] 发明名称

检测过氧化氢含量的新试剂和新方法

[57] 摘要

本发明提出磁性纳米材料模拟酶的新概念，并利用磁性纳米材料的这种新特征建立了检测过氧化氢含量的新方法。该方法包括：在氢供体存在的条件下，将磁性纳米材料作为催化剂，催化过氧化氢和氢供体的反应，导致氢供体生成有色或发光产物，从而检测样品中过氧化氢的含量。这种新型催化剂和新方法可以被广泛的应用于食品、环境和卫生等各个领域。与传统酶催化剂比较，磁性纳米材料模拟酶具有易制备、成本低、稳定和可重复利用等多种优越性。

1. Fe_3O_4 磁性纳米材料用作催化剂的用途，其用于催化过氧化氢产生自由基。

2 一种测定过氧化氢含量的方法，包括：在氢供体存在的条件下，将 Fe_3O_4 磁性纳米材料作为催化剂，催化过氧化氢和氢供体的反应，导致氢供体生成有色或发光产物，通过测定生成的有色或发光产物而确定过氧化氢含量。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的氢供体是 3,3,5,5-四甲基联苯胺(TMB)。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述的 3,3,5,5-四甲基联苯胺的浓度在 0-816 μM 。

5. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的过氧化氢和氢供体的反应是在 pH 3.5-5.5、25~55 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行的。

6. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述的 Fe_3O_4 磁性纳米材料的浓度在 0-1.44 mM。

7. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：检测的过氧化氢含量的线性范围为 0-7 $\times 10^{-5}$ M。

8. 根据权利要求 2 所述的方法，其用于检测食品、环境大气、工业制品和卫生消毒用品中的过氧化氢含量。

9. 一种回收用于检测样品中过氧化氢含量的磁性纳米材料的方法，该方法包括通过使用磁铁或离心回收磁性纳米材料。

检测过氧化氢含量的新试剂和新方法

技术领域

本发明涉及磁性纳米材料的新用途，具体的说，磁性纳米材料可以作为催化剂，检测样品中的过氧化氢含量。这种新型催化剂和新方法可以应用于食品、环境、卫生和工业生产等多种领域。

背景技术

过氧化氢由于具有很强的氧化性和漂白性，被广泛应用于食品、环境和卫生等各个领域，因而检测各类样品中过氧化氢的含量具有重要的意义。在食品卫生领域，过氧化氢被广泛的用作食品的消毒剂和漂白剂，食品中过氧化氢残留过高会对人体造成伤害，造成消化道损伤、导致癌变、诱导心血管疾病；在环境领域，大气中过氧化氢的含量是评价环境状况的重要指标。

目前检测过氧化氢含量的方法很多，包括滴定法(参见，K.Zhang,*Talanta*,51,179(2000))，荧光分光光度法(参见，J.Li,*Anal. Chem*,72,5338(2000))，化学发光法(参见，S.Hanaoka,*Anal.Chim.Acta*,426,57(2001))，电化学法(参见，M.Khayyami, *J.Electroanal.Chem.*407,247(1996))等。

辣根过氧化物酶(HRP)是一种被广泛应用的过氧化物酶试剂。这种酶含有正铁原卟啉(血红素)，能利用过氧化氢(H_2O_2)氧化氢供体(DH₂,多为无色的还原型染料)，通过反应可生成有色的氧化型染料(D)。利用其催化特性，HRP及其模拟酶已被广泛应用于测定食品或环境样品中过氧化氢的含量(参见，J.Li, *Talanta*,41,1999(1994); C.Fan, *Analyst*,126,1086(2001)和 B.Li, *Sens. and Actuators B*,72,115(2001))。

磁性纳米材料指具有磁响应性的纳米材料，在生物医学和电子等方面应用前景广泛。在生物医药领域磁性纳米材料通常被用于：(1) 生物样品

的快速分离和纯化。通常把探针分子(DNA或蛋白质)偶联到磁性纳米材料表面,利用生物分子的特异识别功能和纳米材料的磁性分离功能,制备亲和层析用于生物样品的快速分离和高效纯化(参见, J. M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **301**, 1884 (2003); Q. A. Pankhurst¹, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R167 (2003); 和 I. Safarik, M. Safarikova, *Biomagn Res Technol.* **2**, 7 (2004)); (2) 药物运输。磁性纳米材料表面通过化学修饰后,使材料表面的电荷发生改变,或者特定的化学基团,可以将药物分子(或基因)结合在材料表面,利用外加磁场的导向,可以将药物或外源基因向特定的部位进行输送,从而实现药物或基因的靶向运输(参见, J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv Drug Del Rev* **55**, 329 (2003); 和 N. Morishita, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* **334**, 1121 (2005)); (3) 肿瘤靶向热疗。磁性纳米材料可以用于肿瘤的治疗,通过药物靶向和磁靶向把磁性纳米颗粒集中在肿瘤部位,在外加磁场的作用下,磁性纳米颗粒可以产生高热,杀死肿瘤部位的细胞,实现肿瘤治疗的目的(参见, A. Ito, *et al.*, *Cancer Lett.* **212**, 167 (2004); 和 F. Sonvico, *et al.*, *Bioconjug Chem.* **16**, 1181 (2005))。上述磁性纳米材料的应用都是利用了纳米材料的磁性特征。

发明内容

本发明提供一种 Fe_3O_4 磁性纳米材料的新用途,其用作催化过氧化氢产生自由基的催化剂,还提供采用该催化剂测定过氧化氢含量的方法。

根据本发明的第一方面,提供 Fe_3O_4 磁性纳米材料用作催化剂的用途,其用于催化过氧化氢产生自由基。

根据本发明的第二方面,提供一种测定过氧化氢含量的方法,该方法包括:在氢供体存在的条件下,将 Fe_3O_4 磁性纳米材料作为催化剂,催化过氧化氢和氢供体的反应,导致氢供体生成有色或发光产物,从而测定过氧化氢含量。

本发明是利用磁性纳米材料在氢供体存在的条件下,催化过氧化氢和氢供体的反应,导致氢供体生成有色或发光产物的原理,提出利用磁性纳米材料作为辣根过氧化物酶(HRP)的模拟酶测定样品中的过氧化氢含量。

与 HRP 相比, 磁性纳米材料具有一下优点: (1) 磁性纳米材料易于制备, 成本低廉; (2) 磁性纳米材料耐高温, 耐酸碱, 不易失活; (3) 磁性纳米材料不仅具有催化活性, 而且具有磁响应性, 这些物理特征, 赋予了磁性纳米材料具有靶向、催化和分离等多功能; 和 (4) 可重复利用。

附图说明

图 1 是显示 Fe_3O_4 磁性纳米材料作为测量过氧化氢含量的催化剂的图;
图 2 是用于确定 Fe_3O_4 磁性纳米材料催化 H_2O_2 反应的最适 pH 的图;
图 3 是用于确定 Fe_3O_4 磁性纳米材料催化 H_2O_2 反应的最适温度的图;
图 4 是用于确定 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 的最适底物浓度的图;
图 5 是有用于确定 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 的最适酶浓度的图;
图 6 是显示 Fe_3O_4 磁性纳米材料的回收与再生的图;
图 7 是用于确定 Fe_3O_4 磁性纳米材料催化 H_2O_2 的线性检测范围的图;

具体实施例方式

下面通过具体实施例进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用用于限制本发明的范围。

实施例一、 Fe_3O_4 磁性纳米材料的合成

试剂: 磁性纳米颗粒合成材料, 七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)和氨水均购自北京化学试剂公司。使用的磁性纳米材料是由水热法合成的 Fe_3O_4 磁性纳米材料(参见, W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Hong, J. C. Hung, Y. C. Chen, C. Y. Hong, *J. Magn. Magn. Mater.* **283**, 210 (2004))。

方法: 将七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)以摩尔比 1:2 混合, 反应液的起始 pH 值用 3.5 M 的氨水调节至 pH=10-11。水热处理过程为 4 hr, 处理温度 80-100 °C, 然后进行过滤、洗涤, 将沉淀物自然晾干; 最后, 将所得粉末用干燥箱在 120 °C 下脱水 6 hr, 研磨得到实验样品。

结果: Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为 30 nm, 均一性好。

实施例二、 Fe_3O_4 磁性纳米材料可检测过氧化氢的含量

试剂: 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为 30 nm。

方法: 取一定量的待检测样品, 以3,3,5,5-四甲基联苯胺(TMB)为氢供体底物, 磁性纳米材料为催化剂, 37 °C反应一定时间, 读取652 nm的吸收值, 利用标准加入法, 计算样品中过氧化氢的含量。具体操作如下:

取 20 μg Fe_3O_4 磁性纳米颗粒(相当于 2.7×10^8 个 Fe_3O_4 磁性颗粒)和 0.5 ng HRP(相当于 6×10^9 个 HRP 分子), 分别溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液, 磁性纳米颗粒体系中加入 0.5 μl 的 30% H_2O_2 , HRP 反应体系中加入 0.25 μl 的 3% H_2O_2 , 然后加入 10 μl 的 10 mg/ml 的 TMB(溶于 DMSO), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 2 hr, 反应温度 37 °C。

结果: 2.7×10^8 个磁性颗粒的催化效率与 6×10^9 个 HRP 分子的催化效率基本相当(图1), 在 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化的反应中, 652 nm 的吸光值在 100 分钟左右达到最大值。

实施例三、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 的最适反应 pH

试剂: 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为 30 nm。

方法: 取 20 μg Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液, 加入 0.5 μl 的 30% H_2O_2 , 然后加入的 10 μl 的 10 mg/ml 的 TMB(溶于 DMSO), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 600 s, 反应温度 37 °C。0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH): 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5, 11.5。

结果: 以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率,

即可得到反应初速度 v ，然后以 pH 为横坐标，以相对反应活性为纵坐标作图，发现磁性纳米颗粒催化反应，缓冲液最适 pH 在 3.5-5.5 之间(图 2)，当 pH 低于 3 或高于 6 时，反应受到抑制。

实施例四、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 的最适反应温度

试剂：3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB)，辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg)，购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为 30 nm。

方法：取 20 μg Fe_3O_4 磁性纳米颗粒，溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH3.5)，加入 0.5 μl 的 30% H_2O_2 ，然后加入 10 μl 的 10 mg/ml 的 TMB，日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值，时间扫描 600 s。处理温度($^\circ\text{C}$)：25，30，35，40，45，50，55。

结果：以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图，计算其斜率，即可得到反应初速度 v ，然后以温度为横坐标，以相对反应活性为纵坐标作图，发现磁性纳米颗粒最适温度为 37 $^\circ\text{C}$ (图 3)。

实施例五、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 的最适底物浓度

试剂：3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB)，辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg)，购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为 30 nm。

方法：取 20 μg Fe_3O_4 磁性纳米颗粒，溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 3.5)，加入 0.5 μl ，30 % H_2O_2 ，然后加入适量的 10 mg/ml 的 TMB(溶于二甲亚砜)，日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值，时间扫描 600 s，反应温度 37 $^\circ\text{C}$ 。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化，加入 TMB 浓度梯度：0-816 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

结果：以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图，计算其斜率，即可得到反应初速度 v ，然后加入 TMB 量换算成的摩尔浓度为横坐标，以相对反应活性为纵坐标作图，磁性纳米颗粒对 TMB 的最适浓度为 816

μM , 在 TMB 低于 $816 \mu\text{M}$ 时催化反应速度较低, 当 TMB 浓度为 $816 \mu\text{M}$ 时催化反应速率达到最大 (图 4)。

实施例六、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化 H_2O_2 的最适酶浓度

试剂: 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为30 nm。

方法: 取一定量的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 溶于 $500 \mu\text{l}$ 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 3.5), 加入 $0.5 \mu\text{l}$, 30% H_2O_2 , 然后加入 $10 \mu\text{l}$ 的 10 mg/ml 的 TMB(溶于 DMSO), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 600 s , 反应温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒催化, 加入磁性纳米颗粒(MNPs)的浓度梯度: $0\text{-}2.16 \mu\text{M}$ 。

结果: 以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率, 即可得到反应初速度 v , 然后加入 MNPs 量换算成的摩尔浓度为横坐标, 以反应初速度 v 为纵坐标作图, 磁性纳米颗粒(MNPs)的最适浓度为 1.44 mM , 在 MNPs 低于 1.44 mM 时催化反应速度较低, 当 MNPs 浓度为 1.44 mM 时催化反应速率达到最大 (图 5)。

实施例七、 Fe_3O_4 磁性纳米材料的回收与再利用

试剂: 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及 Fe_3O_4 磁性纳米材料合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 纳米粒子直径30 nm。

方法: 取 $20 \mu\text{g}$ Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 溶于 $500 \mu\text{l}$ 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 3.5), 加入 $0.5 \mu\text{l}$ 的 30% H_2O_2 , 然后加入 $10 \mu\text{l}$ 的 10 mg/ml 的 TMB(溶于 DMSO), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 600 s , 反应温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。用磁铁 (或 12000rpm 离心 1 分钟) 将磁性纳米材料吸附并回收。回收的磁性纳米材料使用去离子水超声清洗 2 次, 每次 2 分钟。再生的磁性纳米材料重新用于反应。

结果: 以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率, 即可得到反应初速度 v , 然后以首次催化反应的初速度为 100%, 计算回收、再生之后的磁性纳米材料的催化效率变化。回收、再生之后的磁性纳米材料仍然具有很高的催化活性, 回收次数可达 3 次以上 (图 6)。

实施例八、 Fe_3O_4 磁性纳米材料催化 H_2O_2 的线性范围检测

试剂: 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及 Fe_3O_4 磁性纳米材料合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 纳米粒子直径 30 nm。

方法: 在每个反应体系中, 取 20 μg Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 3.5), 加入不同量的 30% H_2O_2 , 加入 10 μl 的 TMB 溶液(10 mg/ml, 溶于 DMSO), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 600 s, 反应温度 37 $^\circ\text{C}$, 加入过氧化氢的浓度为 $0-10^{-4}$ M。

结果: 以反应最初 20 秒内 652nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率, 即可得到反应初速度 v , 然后以 H_2O_2 的摩尔浓度为横坐标, 以相对反应活性为纵坐标作图, 测定检测过氧化氢含量的线性范围为 $0-7 \times 10^{-5}$ M (图 7)。

实施例九、 Fe_3O_4 磁性纳米材料催化检测雨水中的过氧化氢含量

试剂: 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H_2O_2 和醋酸钠以及 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒大小直径为 30 nm。

方法: 在每个反应体系中, 取 20 μg Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 溶于 500 μl 雨水中, 加入 10 μl TMB 溶液(10 mg/ml, 溶于 DMSO), 利用标准加入法, 分别加入 0 μM 或 2.9 μM 的 30% H_2O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 反应 2 hr, 检测不同反应体系在 652 nm 的吸收值。

结果: 利用标准加入法, 根据不同反应体系在 652 nm 的吸收值, 计算雨水中过氧化氢的含量 (表一)。

表一 测定雨水中过氧化氢的含量

样品 ^a	样品中 H ₂ O ₂ 含量 ^b (μM)	标准 H ₂ O ₂ 加入量 (μM)	标准 H ₂ O ₂ 测定值 (μM)	回收率 ^c (%)
样品 1	5.2($\pm 2.9\%$)	2.9	2.8	96
样品 2	2.8($\pm 3.2\%$)	2.9	3	97

注：a. 雨水取自北京, 中国科学院生物物理研究所院内, 两次样品分别在不同天采集。

b. 样品中过氧化氢的含量为 3 次测量的平均值。

c. 在测定样品的同时, 于同一样品中加入一定量的标准物质进行测定, 将其测定结果扣除样品的测定值, 以计算回收率。回收率可以反映测试结果的准确度。

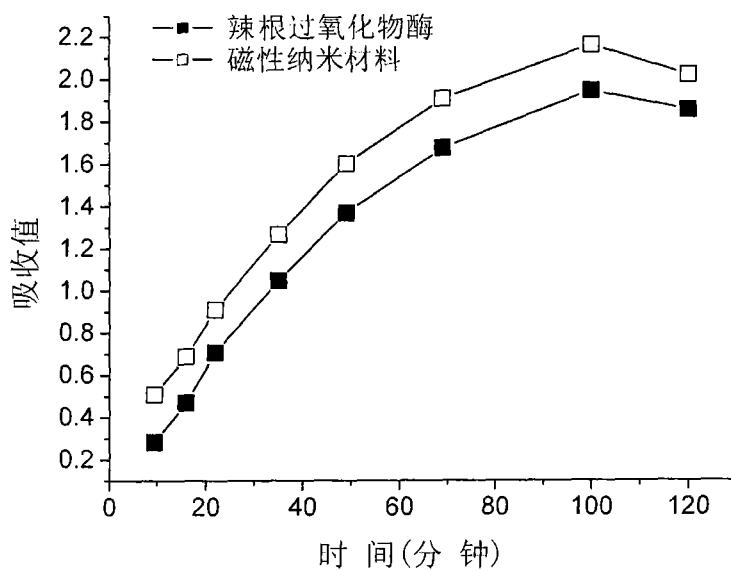


图 1

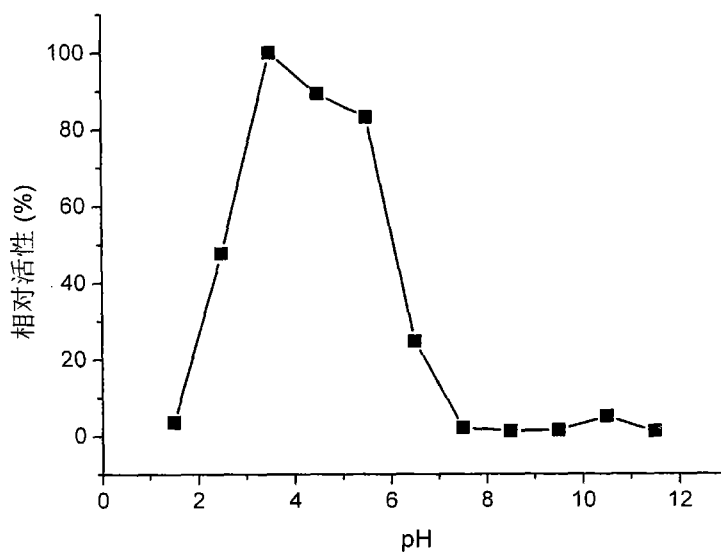


图 2

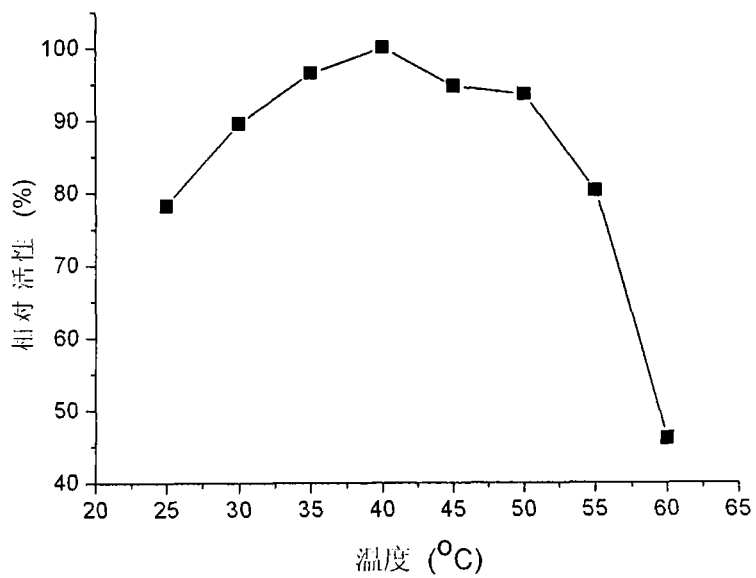


图 3

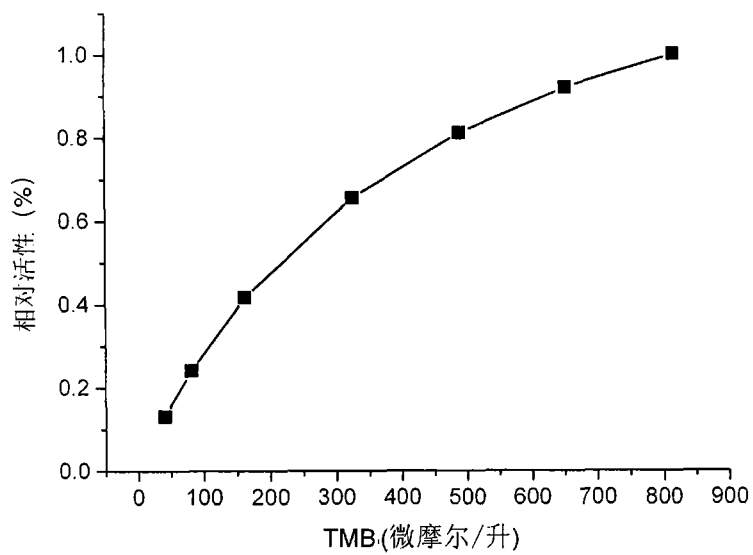


图 4

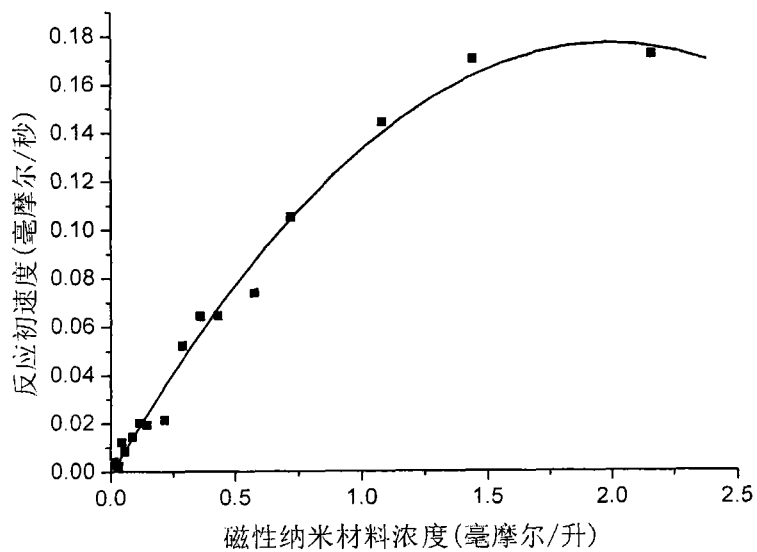


图 5

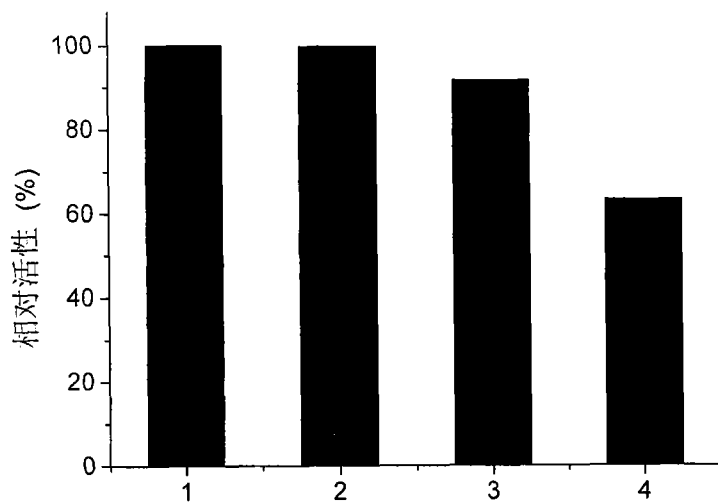


图 6

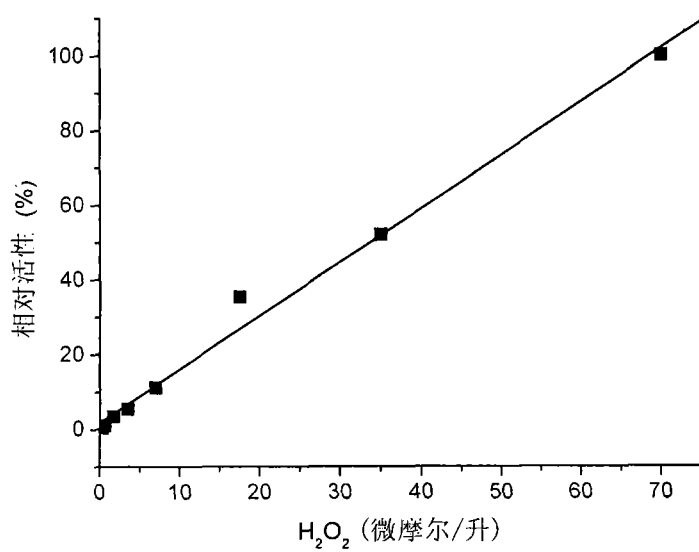


图 7