DOI:10.20038/j.cnki.mra.2024.000023

AgVO3类氧化酶对槲皮素的信号增强型比色传感研究

吴芸芸,杨秀双,刘文峰,秦冬冬*,陶春兰,耿新华

(广州大学化学化工学院/广州大学分析科学技术研究中心/广州市传感材料与器件重点实验室/广东省高校光电材料与传感器件重点实验室/广东省光电传感材料与器件工程技术研究中心,广东广州 510006)

摘要:目前,纳米酶的设计合成及比色传感应用是分析化学领域的研究热点,开发一种具有高活性、良好稳定性、不依赖过氧化氢的单一类氧化酶活性材料是实现高效比色传感的关键。采用适合大规模制备的溶液共沉淀法,合成了长度为 10—20 μ m、直径为 100—200 nm 的 $AgVO_3$ 纳米棒 $(AgVO_3NRs)$ 。研究发现, $AgVO_3NRs$ 能催化无色的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 氧化生成蓝色产物 ox TMB。机理研究发现, $AgVO_3NRs$ 显示单一且高效的类氧化酶活性,并对不同底物具有广谱性。以 TMB 为底物时,底物诱导活化材料表面吸附的化学氧,并将其转化为超氧自由基 $(\cdot O_2^-)$ 。超氧自由基作为电子受体,将底物 TMB 氧化并触发显色反应,该过程近似为一级反应。当有槲皮素存在时,TMB 的氧化得到促进,ox TMB 浓度增加导致其吸光度显著上升,蓝色加深。基于该过程,构建了一种具有信号增强型"关-开"模式的槲皮素比色传感检测系统,即 $AgVO_3NRs+TMB+$ 槲皮素。研究结果表明,在 25 \mathbb{C} 下、缓冲溶液 pH=4 条件下,槲皮素(浓度在 0—1.0 μ mol·1.0 1.82

关键词:纳米酶;类氧化酶;AgVO3;纳米棒;槲皮素;自由基;信号增强;比色传感器

中图分类号:R966

文献标志码: A

文章编号:1673-9981(2024)05-0750-12

引文格式:吴芸芸,杨秀双,刘文峰,等. $AgVO_3$ 类氧化酶对槲皮素的信号增强型比色传感研究[J]. 材料研究与应用,2024,18 (5):750-761.

WU Yunyun, YANG Xiushuang, LIU Wenfeng, et al. A Signal-Intensified Colorimetric Sensor for Quercetin with AgVO₃ Nanozyme[J]. Materials Research and Application, 2024, 18(5):750-761.

0 引言

槲皮素(Quercetin),又称洋葱素或槲黄素,是黄酮类化合物家族中具有重要药用价值的成分,也是一种重要的膳食抗氧化剂[1]。槲皮素存在于多种食物中,如水果、蔬菜、茶、酒及其他饮食补充物中,具有抗氧化、抗发炎、抗过敏的功效,对健康有益,也是让蔬果成为超级食物的关键[2]。然而,过多地使用槲皮素易发生反酸,导致身体发生炎症,出现关节疼痛的不适症状,如果严重还有可能会损坏 DNA,影响身体健康[3]。此外,不恰当地使用槲皮素还可能导致消化不良,如胃肠功能紊乱及腹部胀气、反酸等不良反应[4]。因此,槲皮素的定量分析,对了解其

生物活性及在食品营养、生命健康和医学领域的合理应用具有非常重要的意义。目前,槲皮素的定量检测主要依赖于高效液相色谱法(HPLC)[5]。该法具有高效、高灵敏度、高分离度等优点,能够准确测定复杂样品中槲皮素的含量。近年来,随着科学技术的不断进步,一些新的定量检测方法也逐渐应用于槲皮素的测定,如核磁共振氢谱法、毛细管电泳法等,这些仪器分析方法在某些方面具有独特的优势,但是也存在设备成本高、操作复杂、需要专业人员操作,以及对于复杂样本的预处理过程较为繁琐等缺点[6-7]。因此,开发一种简单快捷的化学分析法尤为重要。

收稿日期:2024-03-30

基金项目:广东省自然科学基金项目(2023A1515010623);广州市市校企联合资助项目(202201020154)

作者简介:吴芸芸,硕士研究生,研究方向为纳米酶及传感应用。E-mail:1576687552@qq.com。

通信作者:秦冬冬,博士,教授,研究方向为光电化学及纳米酶传感。E-mail:ccqindd@gzhu.edu.cn。

天然酶是生物体内催化生化反应的关键物质, 具有高效、专一的催化特性。然而,天然酶稳定性 差、提纯成本高,限制了其在检测领域中的应用[8]。 纳米酶作为模拟天然酶活性的纳米材料,具有稳定 性高、成本低及催化效率高的优点,可以适用于各种 复杂环境[9]。在检测领域中,纳米酶能够实现对目 标物质的高灵敏、快速检测,为疾病诊断、环境监测 等提供了有力工具[10]。因此,纳米酶在分析检测方 面具有广阔的应用前景和重要的研究价值。金纳米 团簇(AuNCs)纳米酶可以模拟 TMB-H₂O₂系统中 过氧化物酶催化活性[11],从而能特异而准确地检测 药物[12]。研究发现[13],木瓜蛋白酶保护的AuNCs (P@AuNCs)可模拟过氧化物酶活性,实现对多巴 胺的比色传感定量分析。信号增强的传感模式,得 益于多巴胺对该酶催化反应过程的显著促进作用。 水热法制备的HSF@AuNCs也可通过类似的过氧 化物酶活性模拟过程[14-15],实现对四环素的特异性 比色传感检测。贵金属材料一般具有较高的过氧化 物酶活性,但是稳定性差且高化学活性H₂O₂的存在 会引发复杂体系中活性物质的副反应,从而造成一 定的背景干扰和实际操作流程的不便。因此,发展 具有不依赖 H₂O₂的单一类氧化酶活性纳米材料,对 于纳米酶在化学比色传感领域中的应用具有重要 意义。

无机化合物具有种类繁多、制备简单、原料易得、表面组成和结构可调等特点,是新兴纳米酶材料的理想候选者。钒作为一种常见的过渡金属元素^[16],其丰富的氧化态为高活性纳米酶的制备提供了先决条件^[17-18]。在已报道的纳米酶当中,其中就有含钒类氧化酶应用于构建比色传感体系,如BiVO₄^[19]、CeVO₄^[20]、Co₂V₂O₇^[21]。本文合成了一种具有类氧化酶活性的AgVO₃NRs,详细研究了其酶催化反应条件和机理,测定了反应动力学曲线。在有不同还原性物质存在时,该酶促反应体系可表现出信号增强和信号淬灭两种模式。利用槲皮素的信号增强效应,建立了AgVO₃NRs+TMB+槲皮素的传感平台,检出限为11.82 nmol·L⁻¹。该项研究有助于新型酶纳米材料的开发和先进分析方法的建立。

1 实验部分

1.1 实验药品

实验原料包括:硝酸银(AgNO₃),购自广州化

学试剂厂;偏钒酸铵(NH₄VO₃)、邻苯二胺(OPD)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、槲皮素($C_{15}H_{10}O_7$),均购自上海麦克林生化科技有限公司;叔丁醇(TBA),购自天津大茂化学试剂厂;对苯醌(PBQ),购自国药集团化学试剂有限公司;叠氮化钠(NaN₃),购自天津市福晨化学试剂厂;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。以上试剂均为分析纯,使用前没有经过任何处理。

1.2 AgVO₃NRs合成

取 100 mL 烧杯,加入 50 mL 的 H_2O ,再加 0.058 5 g(0.05 mol·L⁻¹)的偏钒酸铵,配制成 A液。 另取 100 mL 烧杯,加入 50 mL 的 H_2O ,再加 0.085 g (0.05 mol·L⁻¹)硝酸银,配制成 B液。 用胶头滴管同时把 A液和 B液滴(体积比 1:1)加到同一个空烧杯中混合,同时磁力搅拌,观察到有淡黄色沉淀生成时在室温下继续搅拌反应 2 h。将所得溶液在转速 8 000 r·min⁻¹下离心 3 min,随后分别用水、乙醇洗涤固体 3次。把洗涤干净的固体放置于 60 ℃的烘箱 中烘干 24 h,即得到 $AgVO_3NRs$ 淡黄色固体粉末。

1.3 AgVO₃ NRs类氧化酶活性测试

1.3.1 溶液的配制

不同 pH 值的缓冲液 NaAc-HAc 的配制:在 100 mL的水中加入醋酸(HAc)和醋酸钠(NaAc), 通过精确调整二者的加入量,获得所需的不同 pH 值缓冲溶液。

TMB溶液(15 mmol·L⁻¹)的配制:称量7.2 mg的 TMB粉末,将其溶解于2 mL的乙醇(EtOH)中,待其完全溶解,获得所需的 TMB溶液。ABTS溶液(15 mmol·L⁻¹)配制:称量16.5 mg的 ABTS粉末,将其溶解于2 mL的H₂O中,待其完全溶解,获得所需的 ABTS溶液。OPD溶液(15 mmol·L⁻¹)配制:称量3.2 mg的 OPD粉末,将其溶解于2 mL的EtOH中,待其完全溶解,获得所需的 OPD溶液。DA溶液(15 mmol·L⁻¹)配制:称量5.7 mg的 DA粉末,将其溶解于2 mL的H₂O中,待其完全溶解,获得所需的 DA溶液。以上4种底物的溶液配制好后,保存在4°C的冰箱中避免光照以确保稳定性,方便后续实验使用。

 $AgVO_3NRs$ 溶液 $(3 mg \cdot mL^{-1})$ 的制备: 称量 6 mg的 $AgVO_3NRs$ 粉末,并将其分散在 2 mL 的

 H_2O 中,在常温下超声处理 30 min,以确保 $AgVO_3NRs$ 粉末在水中均匀分散。每次实验前,需 要摇晃溶液以保证其均匀性,然后再进行取用。

1.3.2 AgVO₃ NRs类氧化酶活性测定

通过紫外-可见分光光度计,监测样品在 652 nm 处的吸收变化,以评价样品的类氧化酶活性。在典型的类氧化酶实验中,将 40 μ L 的 AgVO₃ NRs 悬液 (浓度为 3 mg·mL⁻¹)加入到 3 mL 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中,经充分摇匀混合后,将其加入 TMB 溶液 (浓度为 0.15 mmol·L⁻¹)中,确保再次混合均匀。随后,将混合液置于 25 ℃环境下反应 35 min,检测其在波长 652 nm 处的吸收情况。

1.3.3 AgVO₃ NRs 对不同底物的类氧化酶活性 测定

利用紫外-可见分光光度计,监测样品在652 nm波长处的吸收变化,以评估并确定最适合样品的类氧化酶底物。将 $40~\mu L$ 的 $AgVO_3~NRs$ 悬液 $(3~mg\cdot mL^{-1})$ 加入到分别含有 $0.15~mmol\cdot L^{-1}$ 的 TMB、OPD、ABTS和 DA 的 3~mL 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中。在温度 25~C下反应 5~min,检测 652~nm 处的吸光度。

1.3.4 稳态动力学测试

在 AgVO₃ NRs(40 μg·mL⁻¹)存在的 NaAc-HAc 缓冲液 (pH=4)中,改变 TMB的浓度为 0.05-0.35 mmol·L⁻¹,在温度 25 ℃、反应时间为 25 min 条 件下,测试样品的吸光度。根据朗伯-比尔定律 (Beer-Lambert law)和米氏方程(Michaelis-Menten equation),对实验数据进行了深入分析。通过计算 得出米氏常数 (K_m) 和最大初始反应速率 (V_{max}) 这两 个关键参数,绘制出类氧化酶活性 Michaelis-Menten 曲线。其中: 朗伯-比尔定律 A=Kbc, 式中 A代表吸光度、K为摩尔吸收系数、b为吸收层厚度 (比色皿的厚度)、c为吸光物质的浓度;米氏方程 $1/v = K_{\rm m} + [S]/(V_{\rm max}[S]) = 1/V_{\rm max} + (K_{\rm m}/V_{\rm max}) \times$ (1/[S]),式中 K_m 为米氏常数(代表 AgVO₃NRs 与 底物的亲和力)、 V_{max} 为底物浓度饱和时监测到的最 大反应速率、[S]为底物的不同浓度、v为初始反应 速度。

1.4 AgVO₃ NRs催化氧化TMB实验

1.4.1 溶解氧测试

测试溶解氧时,分别进行两组对照实验。两组

实验采用相同方法,不同之处在于反应前是否对pH=4的 NaAc-HAc 缓冲液进行脱气处理。脱气处理是通过鼓泡的方式,让氮气在溶液中持续冒泡 30 min,以有效去除溶液中溶解的氧气。溶解氧测试时,分别向经脱气处理和未脱气处理的 NaAc-HAc 缓冲液中加入 $AgVO_3NRs$ 溶液 $(40~\mu g\cdot mL^{-1})$ 和 TMB 溶液 $(0.15~mmol\cdot L^{-1})$,然后在室温条件下反应 5~min,待反应结束后检测体系在 652~nm 处的吸光度。

1.4.2 活性氧种类测试

活性氧种类测试时,先将 $AgVO_3NRs$ 和 TMB 在 3 mL 的缓冲溶液中混合,然后分别快速加入 30 μ L 的 NaN_3 (1.0 mol·L⁻¹)、120 μ L 的 PBQ (0.25 mol·L⁻¹) 和 3 μ L 的 TBA,待反应 5 min 后,记录各溶液在 652 nm 处的吸收情况。

1.4.3 槲皮素比色传感体系的构建

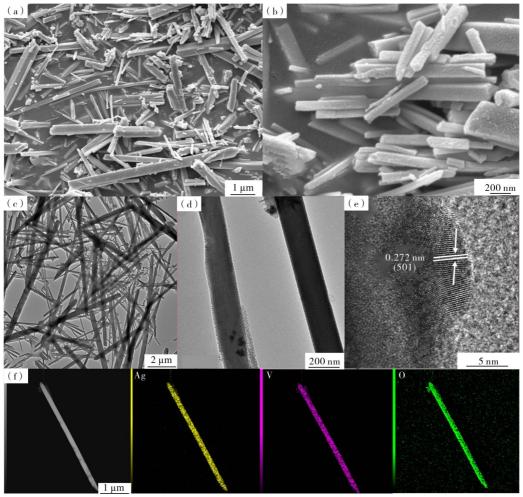
为了评估类氧化酶反应系统对槲皮素的传感性能,构建槲皮素比色传感体系。首先,在3 mL的NaAc-HAc缓冲溶液(pH=4)中加入40 μ L的AgVO3(3 mg·mL⁻¹)NRs和30 μ L的TMB(15 mmol·L⁻¹)溶液,随后分别加入不同浓度(0—1 μ mol·L⁻¹)的槲皮素。然后,在温度25°C的条件下进行反应,待反应5 min后,记录混合溶液在652 nm处的吸收值。最后,通过绘制溶液在652 nm处的吸收与分析物浓度(槲皮素)之间的关系曲线,得到相应的工作曲线。每个浓度测3个平行样品,通过计算得到标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 AgVO₃纳米棒的表征

2.1.1 扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜 (TEM)表征

图 1 为 AgVO₃ NRs 的扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)照片。从图 1(a—d)可以观察到,合成的 AgVO₃ NRs 呈棒状结构,长度为10—20 µm、直径为 100—200 nm,样品形貌的均一性较高,没有其他不规则的聚集态形貌产生。说明,所选合成方法和条件对 AgVO₃一维结晶结构的生长较为有利。从图 1(e)高分辨率 TEM 图,可以观察到(501)晶面的晶格条纹,对应的晶面间距为0.272 nm。从图 1(f)透射电镜能谱可见,样品中只含有 Ag、V和 O元素,且这 3种元素在样品表面分布均匀。



(a—b)—SEM 图;(c—d)—TEM 图像;(e)—高分辨率 TEM 图像;(f)—元素扫描 TEM 图。 (a—b)—SEM maps;(c—d)—TEM maps;(e)—high-resolution TEM image;(f)—TEM element mapping.

图 1 AgVO₃ NRs 的 SEM 和 TEM 表征图

Figure 1 Characterization of AgVO₃ NRs with SEM and TEM

2.1.2 X射线粉末衍射(XRD)表征

为了进一步证明所合成的纳米材料是 $AgVO_3$,对样品进行了 X 射线粉末衍射 (XRD) 分析 (见图 2)。从图 2 可见,在 2θ 值分别为 12.51° 、 18.87° 、

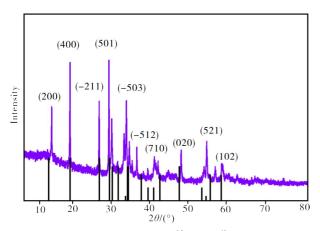


图 2 AgVO₃ NRs 的 XRD 谱图 Figure 2 XRD spectra of AgVO₃ NRs

 27.65° 、 30.69° 、 31.47° 、 36.34° 、 38.49° 、 48.12° 、 56.72° 和 59.06° 处出现了衍射峰,分别对应于(200)、(400)、(-211)、(501)、(-503)、(-512)、(710)、(020)、(521)和(102)晶面,其中位于 12.51° 和 18.87° 处的衍射峰较强。这一结果与 β 相 AgVO₃的标准卡片(JCPDS No. 19-1151)及文献[17]报道数值相符,较强的衍射信号代表 AgVO₃具有较高的结晶度,且为单一的 β 相,表明一维纳米棒的生长方向可能为[100]。相较于水热等晶体材料制备方法,温和的常温常压反应条件,更适合一维材料取向性生长所需要的晶核缓慢形成与晶体缓慢生长的理想条件[221]。

2.1.3 傅里叶红外光谱(FT-IR)

利用傅里叶红外光谱(FT-IR)对样品分子结构及内部组成进行分析,结果如图 3 所示。从图 3 可见,在 $500-1~000~cm^{-1}$ 范围内的特征峰对应于V—O—V键的对称和非对称拉伸振动,在 $652.52~cm^{-1}$ 处的信号峰为 $AgVO_3$ 中 V—O—V的对称拉伸振动吸

收峰,在774.16 cm⁻¹处的峰对应 $AgVO_3$ 中 V-O-V 的不对称拉伸振动吸收峰,在930.92 cm⁻¹处的峰归 因于 VO_3 基团的对称拉伸振动。这些红外吸收峰与 文献 [23-24] 中报道的 β 相 $AgVO_3$ 的信号一致。另外,在1644.48 和3483.14 cm⁻¹处的信号峰为 $AgVO_3$ 中 H_2O 的弯曲振动吸收峰,表明样品表面有吸附水存在。

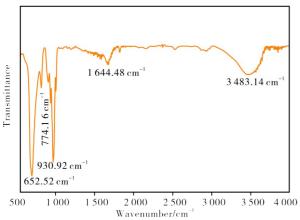


图 3 AgVO₃ NRs的红外光谱图 Figure 3 Infrared spectra of AgVO₃ NRs

2.1.4 拉曼光谱(RS)

拉曼光谱(RS)是分析样品的分子结构、结晶度及分子相互作用的有力工具。图 4 为 $AgVO_3NRs$ 的 拉曼光谱图。从图 4 可见, $AgVO_3NRs$ 在 525. 22、873. 94 和 919. 43 cm⁻¹处出现 3 个较强的的峰,前两个峰对应 V-O-V 的对称弯曲振动,而 919. 43 cm⁻¹处的峰对应 V-O-Ag或 O-V-O 的对称拉伸吸收峰。这一结果与文献 [25-27] 中 $AgVO_3$ 拉曼光谱特征峰的结果相一致。通过对 $AgVO_3NRs$ 的形貌、尺寸、结构、组成及结晶度的表征发现,所合成的材料为具有一维棒状形貌的 β 相 $AgVO_3$ 结晶物。

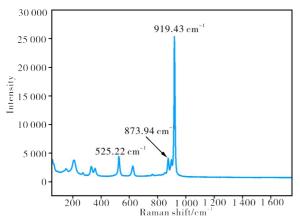


图 4 AgVO₃ NRs的拉曼光谱图 Figure 4 Raman spectra of AgVO₃ NRs

2.2 AgVO₃纳米棒类氧化酶活性的研究

2.2.1 AgVO₃NRs的类酶活性种类研究

无机材料纳米酶活性多数表现为类过氧化物酶活性,少数可同时具有类过氧化物酶活性和类氧化酶活性。为了评估 $AgVO_3NRs$ 的类酶活性种类,分别 在 无 H_2O_2 和 有 H_2O_2 存 在 的 情 况 下,测 试 $AgVO_3NRs$ 对 TMB 酶促反应活性,结果如图 5 所示。从图 5 可见,两种体系反应 5 min后,未加 H_2O_2 时 $AgVO_3NRs$ 可将 TMB 氧化,而有 H_2O_2 存在时体系 在 652 nm 处 的 吸 光 度 几 乎 不 变 。 说 明, $AgVO_3NRs$ 具有单一的类氧化酶活性,没有类过氧化物酶活性, H_2O_2 的存在不能加速其对 TMB 的催化过程[19]。

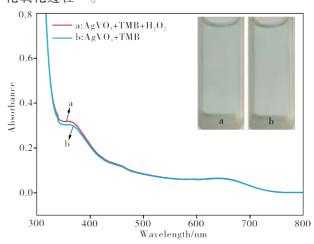


图 5 AgVO₃ NRs+TMB的紫外吸收光谱图 Figure 5 UV absorption spectra of AgVO₃ NRs+TMB 2.2.2 AgVO₃ NRs对不同底物的活性研究

纳米酶的显色底物除了 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)外,还有 OPD(1,2-苯二胺)、ABTS(2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)和 DA(2-(3,4-二羟基苯基)乙胺)。催化剂可对 1 种或多种底物显示活性,为了研究 AgVO₃ NRs 对不同底物的类氧化酶活性,测试了材料在相同条件下对 4 种底物的酶促反应活性,结果如图 6 所示。从图 6 可见,AgVO₃ NRs 能催化 TMB、OPD、ABTS和 DA 底物发生氧化显色反应,能将 TMB 氧化成蓝色的oxTMB(λ =652 nm)、OPD氧化成黄色oxOPD(λ =450 nm)、ABTS氧化成绿色oxABT(λ =420 nm)、DA 氧 化成 oxDA (λ =480 nm)。结果表明,AgVO₃ NRs 可以对多种底物表现出明显的类氧化酶活性,而并非特异性催化,揭示了纳米酶活性具有广谱性。

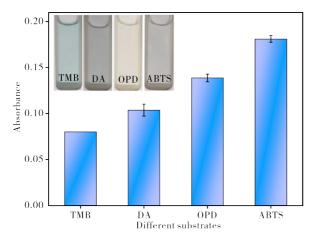


图 6 AgVO₃ NRs 对 4 种不同底物的广谱酶活性 Figure 6 The broad-spectrum enzymatic activity of AgVO₃ NRs against four different substrates

2.2.3 AgVO₃NRs+TMB体系的最优反应条件

为了获得 $AgVO_3NRs+TMB$ 体系的最优反应条件,分别研究了 pH 值、反应时间、反应温度、催化剂 $AgVO_3NRs$ 的浓度、显色底物 TMB 的浓度对催化效率的影响 [28]。图 7为 $AgVO_3NRs$ (40 $\mu g \cdot mL^{-1}$)+TMB (0. 15 $mmol \cdot L^{-1}$)体系与影响因素的关系。与天然酶类似, $AgVO_3NRs$ 类氧化酶活性也受溶液 pH 的影响,结果如图 7(a)所示。从图 7(a)可见,当溶液 pH 值在 2—6 范围内,吸光度呈先增加后降低的趋势。当 pH=4 且体系为蓝色时吸光度(λ =652 nm)最高,

pH值低于或高于此值的吸光度显著下降。吸光度 越高说明反应进行越彻底,催化效率越高。蓝色及 652 nm 处的显著紫外-可见吸收,均表明 TMB 的氧化 是典型的单电子转移过程。图7(b)为AgVO₃NRs+ TMB体系在652 nm处的吸光度随反应时间的变化 曲线。从图 7(b)可见,随着反应时间的延长,溶液 的吸光度也随之逐渐增大,但每个测试点所增加的 吸光度约为 0.03。因此,为了确保 AgVO₃ NRs 较 高催化活性,以及实验的准确性和操作的便捷性, 后续实验选择吸光度较为显著的时间 5 min 作为反 应时间。从图 7(c-d)可以看出,随着 AgVO₃ NRs (5—80 μ g·mL⁻¹)或 TMB (0.025—0.4 mmol·L⁻¹) 浓度的增加, AgVO₃ NRs和TMB的吸光度增加, 催 化效率显著提高。吸光度越高反应速度越快,提供 的活性位点越多。在接下来的实验中,AgVO₃NRs 的浓度固定为 40 μg·mL⁻¹、TMB 的浓度为 0.15 mmol·L⁻¹。众所周知,温度对酶活性具有显著的影 响。不同纳米酶的反应机理及酶活性种类不同, 维持其最优活性所需的温度也不同。图7(e)为 AgVO₃NRs+TMB体系在不同温度下的催化活性。 从图 7(e)可见, AgVO₃NRs在35℃时溶液在652 nm 处的吸光度值最大,当温度高于35℃时活性发生衰 减,在70℃时活性衰减至55%。表明,当温度35℃时 AgVO₃NRs类氧化酶活性最高。

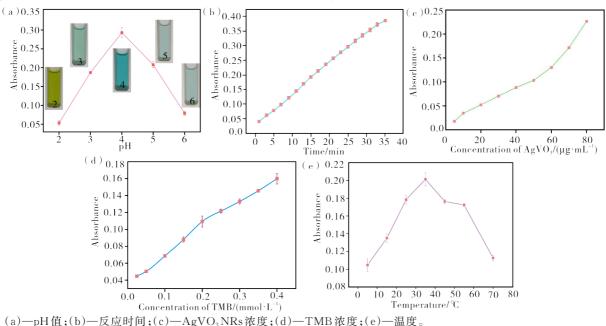


图 7 AgVO₃NRs+TMB体系与影响因素的关系曲线

(a)—pH;(b)—reaction time;(c)—concentration of AgVO₃ NRs;(d)—concentration of TMB;(e)—temperatures.

Figure 7 Influence of various parameters on the activity of AgVO₃ NRs+TMB system

2.2.4 AgVO₃NRs的酶促反应稳态动力学过程 为了深入了解AgVO₃NRs的酶促反应稳态动 力学过程,绘制了AgVO₃NRs+TMB体系米氏动力学曲线和朗伯-比尔双倒数曲线图(见图8)。从图

8(a)米氏动力学曲线可以看出, $AgVO_3NRs+TMB$ 体系的反应速率与 TMB浓度为线性关系。由此可知, $AgVO_3NRs$ 催化氧化 TMB的反应是一级反应 [29-31]。从图 8(b) $AgVO_3NRs+TMB$ 体系的朗伯 - 比尔双倒数曲线可见,在一定浓度范围内, $AgVO_3NRs$ 对 TMB 的 催 化 氧 化 反 应 遵 循 Michaelis-Menten 方程。在此基础上,可计算得到 $AgVO_3NRs$ 纳米酶催化 TMB 反应的两个重要动力学参数 K_m 和 V_m ,二者分别为 0.476 5 $mmol\cdot L^{-1}$ 和 3.362 5×10^{-8} $(mol\cdot L^{-1})\cdot s^{-1}$ 。 K_m 是酶促反应的特

征常数,与酶的浓度无关。一般情况下, K_m 可以表示酶与底物的亲和力,其值越大,酶与底物的亲和力越低[20,32,33]。对于 $AgVO_3NRs+TMB$ 体系而言,TMB 的 K_m 小于 CoFe-LDHs (5. 40 mmol· L^{-1})[34]、CdTe QDs-GOx (2. 20 mmol· L^{-1})[35] 和 TA-NCDs (0. 61 mmol· L^{-1})[36]等已报道的类氧化酶。表明, $AgVO_3NRs$ 对 TMB 的亲和力比较优异。对于 $AgVO_3NRs+TMB$ 体系而言,TMB 的 V_m 与酶的浓度成正比。进一步证明, $AgVO_3NRs$ 催化氧化TMB的反应是一级反应。

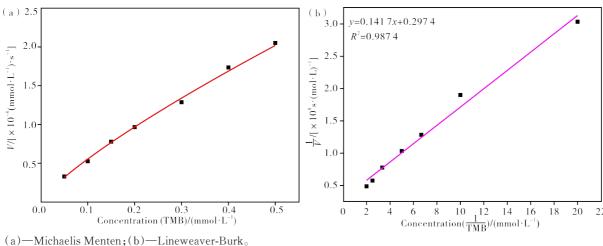


图 8 AgVO₃ NRs在TMB存在下催化酶促反应的 Michaelis Menten 图和 Lineweaver-Burk 曲线 Figure 8 Michaelis Menten plots and Lineweaver-Burk curves of the enzymatic reactions catalyzed by AgVO₃ NRs in the presence of TMB

2.2.5 AgVO₃NRs类酶活性的稳定性及重现性

 $AgVO_3NRs$ 纳米酶是结晶态材料,稳定性是决定纳米酶性能及应用潜力的重要指标。为了评价 $AgVO_3NRs$ 纳米酶的稳定性,测试了 $AgVO_3NRs$ 在 pH 值为 4 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中浸泡不同时间后的催化活性,结果如图 9 所示。从图 9 可见,在

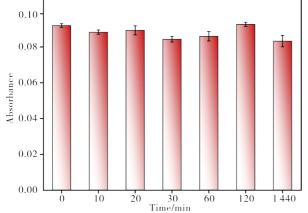
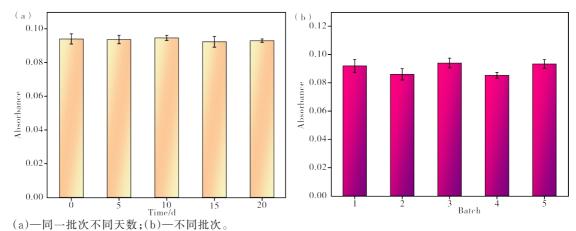


图 9 AgVO₃ NRs在缓冲液中浸泡不同时间后的催化性能 Figure 9 Catalytic properties of AgVO₃ NRs after immersion in buffer for different times

 $24 h 之内,溶液的吸光度没有明显变化。说明, <math>AgVO_3NRs$ 的氧化酶活性在 pH=4 的中等酸度环境下能保持较长时间。表明, $AgVO_3NRs$ 纳米酶在酸性环境下表现得比大多数的天然酶稳定^[37]。

AgVO₃NRs类氧化酶活性的稳定性,是评估该类氧化酶优劣的一个重要指标。因此,对同一批合成的 AgVO₃NRs测试了在不同保存时间下的反应活性,结果如图 10 所示。从图 10 (a)可见,保存不同天数后,样品在 652 nm 处的吸光度基本不变,该纳米酶在室温下保存 20 d后的催化活性仍然能保持 97%。表明,其稳定性是非常优异的。此外,还对不同合成批次的 AgVO₃NRs 的活性进行了详细对比。从图 10 (b)可见,5种批次 AgVO₃NRs 的类 OXD活性基本维持在同一水平。综上所述,无论是从纳米材料的可控合成角度,还是从材料在不同条件下维持酶 促反应活性方面分析,均表明所合成的 AgVO₃NRs 纳米酶具有良好的制备重现性和酶活性稳定性。



(a)—different days of storage within the same batch; (b)—different synthetic batches.

图 10 不同合成批次以及同一批次不同天数的 AgVO。NRs+TMB 体系的吸光度

Figure 10 Absorbance of $AgVO_3 NRs+TMB$ system with the $AgVO_3 NRs$ at different synthetic batches and different days of storage within the same batch

2.2.6 AgVO₃NRs+TMB反应体系的催化机理

一般而言,纳米酶催化底物发生氧化还原反应的中间物种为活性氧,活性氧大多来自于溶液当中的溶解氧。为了明确 $AgVO_3NRs+TMB$ 反应体系的催化机理,对类 OXD 纳米酶 $AgVO_3NRs$ 催化氧化 TMB 过程中活性氧的可能来源进行了验证分析,结果如图 11 所示。从图 11 可见,相比通 N_2 除去溶解 O_2 的反应体系与含 O_2 的反应体系,两体系的吸光度几乎没有变化,溶液颜色也比较接近。结果表明,溶液中溶解的氧气不参与体系的催化氧化过程,对 $AgVO_3NRs+TMB$ 反应体系不存在影响。

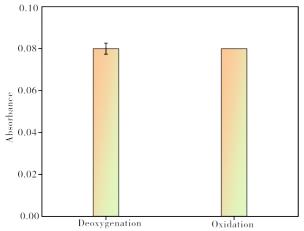


图 11 AgVO₃NRs+TMB体系在空气和氮气中反应 5 min 后 652 nm 处吸光度对比图

Figure 11 Comparison of absorbance at 652 nm after 5 min of reaction of AgVO₃NRs+TMB system in air and nitrogen

为了研究 $AgVO_3NRs$ 在催化氧化过程中所起作用的活性氧物种类型,将作为 $\cdot O_2$ 清除剂的对苯醌(PBQ)、作为 $\cdot O_2$ 清除剂的叠氮化钠(NaN_3)和作为 $\cdot OH$ 清除剂的叔丁醇(TBA)分别单独加入

AgVO₃ NRs+TMB反应体系中^[38-39]。在反应体系中平行加入这 3 种自由基消除剂后,与空白组的紫外吸光度进行比较,结果如图 12 所示。从图 12 可见,与空白体系相比,加入 PBQ后体系的紫外吸光度明显地降低,而加入 NaN₃和 TBA 后溶液的吸光度都略微增大。吸光度与 AgVO₃ NRs 活性成正比,吸光度越高 AgVO₃ NRs 活性越高。 当加入 PBQ后,AgVO₃ NRs 活性随之减弱,说明在 AgVO₃ NRs 氧化 TMB的过程中有·O₂—的参与,而 NaN₃和 TBA的加入对 AgVO₃ NRs 活性的影响可忽略不计,表明 1 O₂和·OH很可能未参与 AgVO₃ NRs类氧化酶催化过程^[40-42]。这是因为·O₂—作为最常见的氧活性物

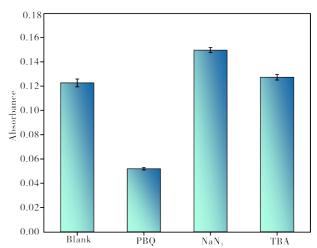


图 12 AgVO₃ NRs+TMB 体系在 PBQ (0.01 mol·L⁻¹)、NaN₃ (0.01 mol·L⁻¹)和 TBA(1 mL·L⁻¹)存在下反应 5 min后652 nm处吸光度对比图

Figure 12 Comparison of absorbance at 652 nm after 5 min of reaction of AgVO $_3$ NRs+TMB system in the presence of PBQ (0.01 mol-L $^{-1}$), NaN $_3$ (0.01 mol-L $^{-1}$), and TBA (1 mL-L $^{-1}$)

种,可以迅速从 TMB 中夺取电子,从而催化氧化 TMB 变 色 的 类 氧 化 酶 反 应 。 由 此 可 见,在 $AgVO_3NRs$ 催化氧化 TMB 的过程中, 1O_2 和·OH 并 未参与,而· O_2 ⁻发挥了关键性的作用。

超氧自由基(·O₂-)是类氧化酶的中间产物,他 的形成和电子转移过程对纳米酶的类氧化酶活性有 着重要的影响,而底物 TMB的氧化也是一个电子转 移过程[43-44]。通过前面的除氧实验对比发现,溶液中 的溶解氧在AgVO₃NRs+TMB体系中不起催化氧 化作用,而是起化学吸附氧的作用。AgVO₃NRs作 为一种具有高比表面积的亲水性双金属氧化物,展 现出了对溶液中氧分子的出色化学吸附能力。材料 表面的氧分子在受到表面态和缺陷位点的激活作用 后,转化为·O₂-活性氧物质,而·O₂-会通过迅速的 电荷转移过程,从吸附在材料表面或靠近其表面的 底物分子中捕获一个或两个电子,进而将底物氧化 成氧化态,并伴随着显色现象的发生。这一系列的 化学过程,不仅揭示了钒酸银纳米棒在催化领域中 的应用潜力,而且也为其在氧化反应和显色反应中 起到的重要作用提供了科学依据,也证明了·O2⁻参 与了AgVO₃NRs催化TMB的氧化反应。基于这一 催化机制,如果在反应体系中引入一种能够比底物 更为高效地与·O₂-发生反应的物质,将显著增 加·O₂ 的生成量,从而有望通过增强 TMB 的显色 效果来构建一种新型的比色传感体系。

2.3 槲皮素比色传感体系的构建

通过 AgVO₃ NRs+TMB 体系对谷胱甘肽、二氢白藜芦醇、柚皮素、多巴胺、槲皮素的紫外吸光度测试,结果如图 13 所示。从图 13 可见: 当谷胱甘肽

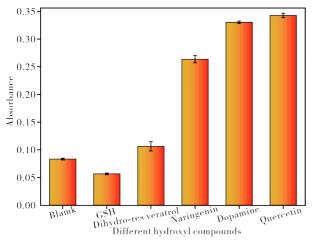


图 13 AgVO₃NRs+TMB体系在不同多羟基化合物加入 后的紫外吸光度对比图

Figure 13 Comparison of UV absorbance of AgVO₃ NRs+TMB system after addition of different polyhydroxy compounds

加入 AgVO₃ NRs+TMB 体系中时,体系吸光度相比空白组降低;而当加入二氢白藜芦醇、柚皮素、多巴胺、槲皮素时,体系的吸光度大幅度增高。这是因为谷胱甘肽的加入抑制了 TMB 的氧化,而二氢白藜芦醇、柚皮素、多巴胺、槲皮素的加入促进了oxTMB的生成。

由于AgVO₃NRs+TMB体系的吸光度信号较 弱,而引入多羟基化合物后能诱导信号增强,可明显 地观察到溶液颜色发生了变化,这一现象有利于构 建快捷、响应灵敏的检测体系。在所选取的多羟基 化合物中,槲皮素的促进效果最为显著,因此以 AgVO₃NRs+TMB体系为基础,构建了一种针对 槲皮素的比色传感器。在AgVO₃NRs+TMB体系 中分别依次加入不同浓度 0-1.0 μmol·L⁻¹的槲皮 素,检测其吸光度,结果如图14所示。从图14可见, 槲皮素浓度与吸光度呈线性关系。在652 nm 处的 吸光度,随着槲皮素的浓度的增加而增大,表明槲皮 素的加入促进了TMB氧化。AgVO3NRs+TMB 体系对于槲皮素具有较好的响应,检出限比较低 $(11.82 \text{ nmol}\cdot L^{-1})$ 、线性范围良好 $(0-1.0 \mu \text{mol}\cdot L^{-1})$, 意味着该比色传感体系在分析检测领域中有着巨大 的应用潜力。

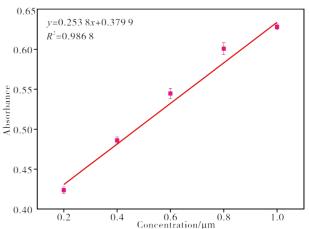


图 14 AgVO₃ NRs+TMB 传感系统对不同浓度槲皮素的响应标准曲线

Figure 14 Standard curves of the AgVO₃ NRs+TMB sensing system in response to different concentrations of EGCG

3 结论

通过简单的共沉淀合成法合成了具有类氧化酶活性的 $AgVO_3NRs$ 。棒状的 $AgVO_3$ 具有较大的比表面积,使得其拥有更多的活性位点或表面缺陷,从而使活化吸附在其表面的化学氧分子转化成 $\cdot O_2^-$ 。经过仔细筛选,发现槲皮素的引入显著地促进了oxTMB 的生成,反应体系在 652 nm 处的吸光度增

加。基于槲皮素对 TMB 氧化的促进作用,开发了 $AgVO_3NRs+TMB$ 检测槲皮素的信号增强型比色传感方法,该传感方法具有良好的分析检测能力,检出限为 $11.82~\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,线性范围是 $0-1.0~\text{\mumol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。表明,钒酸银纳米棒是一种具有优势的类氧化酶,其在化学分析、食品检测及生物医学领域中有巨大的应用潜力。

参考文献:

- [1] ZOU H, YE H, KAMARAJ R, et al. A review on pharmacological activities and synergistic effect of quercetin with small molecule agents [J]. Phytomedicine, 2021, 92: 153736.
- [2] XU D, HU M J, WANG Y Q, et al. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application [J]. Molecules, 2019, 24 (6): 1123.
- [3] KAWABATA K, MUKAI R, ISHISAKA A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability [J]. Food & Function, 2015, 6 (5): 1399-1417.
- [4] HAIY, ZHANGY, LIANGY, et al. Advance on the absorption, metabolism, and efficacy exertion of quercetin and its important derivatives [J]. Food Frontiers, 2020, 1 (4): 420-434.
- [5] KADIAN S, MANIK G. Sulfur doped graphene quantum dots as a potential sensitive fluorescent probe for the detection of quercetin [J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126457.
- [6] ŞENOCAK A, KÖKSOY B, DEMIRBAŞ E, et al. 3D SWCNTs-coumarin hybrid material for ultrasensitive determination of quercetin antioxidant capacity [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 267: 165-173.
- [7] FAN Y, YAO J, HUANG M, et al. Non-conjugated polymer dots for fluorometric and colorimetric dualmode detection of quercetin [J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129962.
- [8] GAO N, XU J, LI X, et al. Colorimetric sensing of biomarkers based on the enzyme-mimetic activity of metal nanoclusters [J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 465: 142817.
- [9] DONG H, FAN Y, ZHANG W, et al. Catalytic mechanisms of nanozymes and their applications in biomedicine [J]. Bioconjugate Chemistry, 2019, 30 (5): 1273-1296.
- [10] CHONG Y, LIU Q, GE C. Advances in oxidase-mimicking nanozymes: Classification, activity regulation and biomedical applications [J]. Nano Today, 2021, 37: 101076.

- [11] LI S, DING H, CHANG J, et al. Bimetallic oxide nanozyme-mediated depletion of glutathione to boost oxidative stress for combined nanocatalytic therapy [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2022, 623: 787-798.
- [12] TSUCHIYA M, KANEKIYO Y. Colorimetric sensing of polyhydroxy compounds by an inclusion complex of boronic acid-modified amylose [J]. Analyst, 2011, 136 (12): 2521-2526.
- [13] GONG F, YANG N, WANG Y, et al. Oxygen-deficient bimetallic oxide FeWO_x nanosheets as peroxidase-like nanozyme for sensing cancer via photoacoustic imaging [J]. Small, 2020, 16 (46): e2003496.
- [14] GONG F, CHENG L, YANG N, et al. ultrasmall oxygen-deficient bimetallic oxide MnWO_x nanoparticles for depletion of endogenous GSH and enhanced sonodynamic cancer therapy [J]. Advanced Materials, 2019, 31(23): e1900730.
- [15] TONG Z, SHA J, LIU D, et al. An Unprecedented FeMo₆@Ce-Uio-66 nanocomposite with cascade enzyme-mimic activity as colorimetric sensing platform [J]. Chemistry, 2022, 28(22): e202104213.
- [16] 李春凤,陈荔丝,吴芸芸,等.超长 α -Ag_sVO₄纳米线类氧化酶活性及传感应用研究[J].材料研究与应用,2022,16(3):409-417.
- [17] LI S, CHEN Z, YANG F, et al. The age of vanadium-based nanozymes: Synthesis, catalytic mechanisms, regulation and biomedical applications [J]. Chinese Chemical Letters, 2024, 35 (4): 108793.
- [18] DE MELO MONTEIRO A P, DIAS HOLTZ R, CARNEIRO FONSECA L, et al. Nano silver vanadate AgVO₃: Synthesis, new functionalities and applications [J]. The Chemical Record, 2018, 18 (7-8): 973-985.
- [19] LICF, WUYY, CHENLS, et al. Oxygen vacancyrich amorphous BiVO₄ nanoparticles for colorimetric sensing [J]. ACS Applied Nano Materials, 2023, 6 (2): 1009-1018.
- [20] YANG H G, ZHA J Q, ZHANG P, et al. Fabrication of CeVO₄ as nanozyme for facile colorimetric discrimination of hydroquinone from resorcinol and catechol [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2017, 247: 469-478.
- [21] ZHANG X, HANG, ZHANG R, et al. $\text{Co}_2\text{V}_2\text{O}_7$ particles with intrinsic multienzyme mimetic activities as an effective bioplatform for ultrasensitive fluorometric and colorimetric biosensing [J]. ACS Applied Bio Materials, 2020, 3(3): 1469-1480.
- [22] AYAAD D M, ABDELAAL M Y A,

- ABOELKHEIR A M, et al. Performance enhancement of chitosan filled silver vanadate nanorods [J]. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2019, 29(3): 901-907.
- [23] ZHANG S, JIANG Y, BAI H, et al. Cable-like β-AgVO₃@PPy nanowires as novel anode materials for lithium-ion batteries [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2020, 124(36): 19467-19475.
- [24] PUDUKUDY M, JIA Q, WANG H, et al. Influence of synthesis parameters on the crystalline, structural, textural, optical and photocatalytic properties of α and β polymorphs of AgVO₃ nanorods [J]. Materials Science in Semiconductor Processing, 2020, 107: 104824.
- [25] SINGH D P, POLYCHRONOPOULOU K, REBHOLZ C, et al. Room temperature synthesis and high temperature frictional study of silver vanadate nanorods [J]. Nanotechnology, 2010, 21 (32): 325601.
- [26] DE OLIVEIRA R C, ASSIS M, TEIXEIRA M M, et al. An Experimental and computational study of β-AgVO₃: Optical properties and formation of Ag nanoparticles [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2016, 120 (22): 12254-12264.
- [27] QIAOLIANG BAO S B, LI Changming, QI Xiang, et al. Lithium insertion in channel-structured-AgVO₃: In situ raman study and computer simulation [J]. Chemistry of Materials, 2007, 19: 5965-5972.
- [28] FENG M, LI X, ZHANG X, et al. Recent advances in the development and analytical applications of oxidase-like nanozymes [J]. TRAC Trends in Analytical Chemistry, 2023, 166: 117220.
- [29] LISQ, WANGLT, ZHANGXD, et al. A Co, N co-doped hierarchically porous carbon hybrid as a highly efficient oxidase mimetic for glutathione detection [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2018, 264: 312-319.
- [30] ZHUANG Y, ZHANG X, CHEN Q, et al. Co₃O₄/CuO hollow nanocage hybrids with high oxidase-like activity for biosensing of dopamine [J]. Materials Science & Engineering C, 2019, 94: 858-866.
- [31] WANG Y, YANG L, LIU Y, et al. Colorimetric determination of dopamine by exploiting the enhanced oxidase mimicking activity of hierarchical NiCo₂S₄-rGO composites [J]. Mikrochimica Acta, 2018, 185 (10): 496.
- [32] YANG Z, MA F, ZHU Y, et al. A facile synthesis of $CuFe_2O_4/Cu_9S_8/PPy$ ternary nanotubes as peroxidase mimics for the sensitive colorimetric detection of H_2O_2 and dopamine [J]. Dalton Transactions, 2017, 46

- (34): 11171-11179.
- [33] LIAN J, LIU P, JIN C, et al. Flower-like CeO₂/CoO p-n heterojuncted nanocomposites with enhanced peroxidase-mimicking activity for l-cysteine sensing [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(47): 17540-17550.
- [34] MEI X, HU T, WANG H, et al. Highly dispersed nano-enzyme triggered intracellular catalytic reaction toward cancer specific therapy [J]. Biomaterials, 2020, 258: 120257.
- [35] QASEMI S, GHAEMY M. Novel superabsorbent biosensor nanohydrogel based on gum tragacanth polysaccharide for optical detection of glucose [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 901-908.
- [36] WANG H, ZHANG M, WEI K, et al. Pyrrolic nitrogen dominated the carbon dot mimic oxidase activity [J]. Carbon, 2021, 179: 692-700.
- [37] HUANG Y, REN J, QU X. Nanozymes: Classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications [J]. Chemical Reviews, 2019, 119 (6): 4357-4412.
- [38] KIM HY, AHN JK, KIM MI, et al. Rapid and labelfree, electrochemical DNA detection utilizing the oxidase-mimicking activity of cerium oxide nanoparticles [J]. Electrochemistry Communications, 2019, 99: 5-10.
- [39] BULBUL G, HAYAT A, ANDREESCU S. SSDNA-functionalized nanoceria: A redox-active aptaswitch for biomolecular recognition [J]. Advanced Healthcare Materials, 2016, 5(7): 822-828.
- [40] LUO Q, TIAN M, LUO F, et al. Multicolor biosensor for trypsin detection based on the regulation of the peroxidase activity of bovine serum albumin-coated gold nanoclusters and etching of gold nanobipyramids [J]. Analytical Chemistry, 2023, 95 (4): 2390-2397.
- [41] ZHAO Y, LI H, LOPEZ A, et al. Promotion and Inhibition of the oxidase-mimicking activity of nanoceria by phosphate, polyphosphate, and DNA [J]. Chembiochem, 2020, 21(15): 2178-2186.
- [42] LIU W, TIAN J, MAO C, et al. Sulfur vacancy promoted peroxidase-like activity of magnetic greigite Fe₃S₄ for colorimetric detection of serum glucose [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1127: 246-255.
- [43] PAUTLER R, KELLY E Y, HUANG P J, et al. Attaching DNA to nanoceria: regulating oxidase activity and fluorescence quenching [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013, 5(15): 6820-6825.
- [44] ZHANG X, QIAO J, LIU W, et al. Boosting the

peroxidase-like activity of gold nanoclusters for the colorimetric detection of oxytetracycline in rat serum [J]. Analyst, 2021, 146 (16): 5061-5066.

A Signal-Intensified Colorimetric Sensor for Quercetin with AgVO₃ Nanozyme

WU Yunyun, YANG Xiushuang, LIU Wenfeng, QIN Dongdong*, TAO Chunlan, GENG Xinhua (Center for Advanced Analytical Science/Guangzhou Key Laboratory of Sensing Materials and Devices/Guangdong University Key Laboratory of Photoelectric Materials and Devices/Guangdong Engineering Technology Research Center for Photoelectric Sensing Materials and Devices/School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The design, synthesis, and colorimetric sensing applications of nanozymes are currently a research hotspot in the field of analytical chemistry. Developing a single oxidase-like active material with high activity, good stability, and independence from hydrogen peroxide is key to achieving efficient colorimetric sensing. Here, we synthesized AgVO₃ nanorods (AgVO₃ NRs) with a length of 10—20 μm and a diameter of 100—200 nm using a solution coprecipitation method suitable for largescale preparation. The study found that these AgVO3 NRs can catalyze the oxidation of colorless 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to produce a blue product, oxTMB. Mechanistic studies revealed that these AgVO₃ NRs exhibit a single and efficient oxidase-like activity with broad substrate specificity. When TMB is used as the substrate, the substrate induces the activation of chemically adsorbed oxygen on the material surface and converts it into superoxide radicals (${}^{\bullet}O^{2-}$). As an electron acceptor, the superoxide radicals oxidize the substrate TMB, triggering a colorimetric reaction, which is approximately a firstorder reaction. In the presence of quercetin, the oxidation of TMB is promoted, and the increase in oxTMB concentration leads to a significant increase in its absorbance and a deeper blue color. Based on this process, we constructed a signalenhanced "off-on" mode quercetin colorimetric sensing detection system: AgVO₃ NRs+TMB+quercetin. In a buffer solution with pH=4 at 25 °C, the concentration of quercetin in the range of 0 -1 μmol·L⁻¹ showed a good linear relationship with the absorbance of oxTMB at 652 nm, with a detection limit of 11.82 nmol·L⁻¹. The research results show that AgVO₃ NRs are a high-performance oxidase-like material that can achieve colorimetric detection of the polyphenolic compound quercetin, revealing its potential applications in chemical analysis and detection, food safety, and biomedicine.

Keywords: nanozymes; oxidase-like; AgVO3; nanorods; quercetin; free radicals; signal-intensified; colorimetric sensor

(学术编辑:罗永皓)