

氮掺杂碳载钌金属原子纳米酶用于黄嘌呤氧化酶活性分析及其抑制剂的比色检测

刘全艺^{1,2} 房琦^{1,2} 魏辉^{*3} 杜衍^{*1,2}

¹(中国科学院长春应用化学研究所, 电分析化学国家重点实验室, 长春 130022)

²(中国科学技术大学应用化学与工程学院, 合肥 230026)

³(南京大学现代工程与应用科学学院, 江苏省功能材料设计原理与应用技术重点实验室, 南京 210023)

摘要 开发了一种基于氮掺杂碳载钌金属原子(Ru/NC)纳米酶的黄嘌呤氧化酶活性以及抑制剂(XOI)的比色检测方法。采用主客体策略,以沸石咪唑框架-8(ZIF-8)为主体分子、乙酰丙酮钌(Ru(acac)₃)为客体分子,制备了具备优异类过氧化物酶(POD)活性的Ru/NC纳米酶。基于其类酶催化活性构筑了用于H₂O₂检测及黄嘌呤氧化酶(XO)活性分析的可视化方法。在优化的实验条件下,检测H₂O₂的线性范围为10~500 μmol/L,检出限为4.8 μmol/L (3σ); XO活性分析的线性范围为1~7 mU/mL,检出限为0.69 mU/mL (3σ)。基于此开发了一种筛选XOI的有效方法,此方法具有成本低、便捷且可视化的优势。

关键词 纳米酶; 比色分析; 过氧化氢; 黄嘌呤氧化酶; 黄嘌呤氧化酶抑制剂

痛风性关节炎是一种全球性流行病,患病率通常在1%~4%之间,主要是由于嘌呤代谢的紊乱,使过量的尿酸结晶沉积在关节腔内而导致的^[1]。人体内的黄嘌呤氧化酶(XO, EC 1.17.3.2)是一种同源二聚体酶,是参与体内嘌呤代谢调控的关键酶,广泛存在于肝脏、肾脏和乳腺等多种器官中^[2]。XO能够催化次黄嘌呤(Hypoxanthine)逐步氧化为尿酸(Uric acid),同时,氧气(O₂)被还原为过氧化氢(H₂O₂)或其它活性氧物种(ROS)^[3]。XO在嘌呤代谢中产生的ROS可以引起细胞氧化损伤,对大脑、心脏和肾脏等重要器官造成严重损害。目前,由嘌呤和尿酸代谢平衡紊乱引起的代谢性疾病已逐渐成为全球公共卫生领域中不可忽视的问题^[4]。

XO是公认的治疗痛风性关节炎的有效靶标之一,目前,已有多种黄嘌呤氧化酶抑制剂(XOI)被应用于痛风的临床治疗。这些抑制剂可与XO竞争性地作用于底物黄嘌呤,从而显著降低尿酸和H₂O₂的生成,可用于痛风的治疗。此外,XOI在改善心脏功能、保护脑神经和缓解疼痛等方面也具有积极的治疗效果^[5]。然而,目前已知的XOI种类相对有限,且存在超敏反应综合征和肾毒性等严重副作用^[6-7]。因此,迫切需要研发更安全和高效的XOI,而开发新型的XOI检测与筛选方法也具有重要的基础研究和临床应用价值。

纳米酶是一类具有类酶催化活性的纳米材料^[8],与天然酶相比,具有稳定性高、合成简便、成本低、易进行表面修饰和催化性能可调控等优势,已广泛应用于生物医学、分析化学、食品工程和环境监测及治理等多个领域^[9]。此外,纳米酶也被应用于酶活性分析及其抑制剂筛选。Jiang等^[10]采用贵金属原位析出策略制备了具有优异类过氧化物酶(POD)活性的纳米酶,并将其应用于碱性磷酸酶活性监测。Wu等^[11]利用具有类氧化酶活性的铁单原子纳米酶,实现了对乙酰胆碱脂酶活性监测及其抑制剂筛选。上述研究表明,具有良好类酶活性是将纳米酶应用于酶活性筛选的基础。近年来,氮掺杂碳载金属原子纳米酶因具有类似于天然酶的配位结构和高原子效率,表现出优异的类酶活性^[12]。在众多载体负载型

2023-10-10 收稿; 2023-10-20 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 21874129, 22322410)、吉林省科技厅重点研发项目(No. 20210204126YY)、长春市科技局市院合作项目(No. 22SH13)和吉林省发改委省预算内基本建设资金项目(No. 2023C042-5)资助。

* E-mail: weihui@nju.edu.cn; duyan@ciac.ac.cn.

金属原子纳米酶中,铁原子和铜原子被广泛用于模拟 POD 活性,而含贵金属钌的纳米酶^[13]的研究较少。

本研究开发了一种基于氮掺杂碳载钌金属原子(Ru/NC)纳米酶的比色方法,用于 XOI 的检测和筛选。以沸石咪唑框架-8(ZIF-8)为主体分子、乙酰丙酮钌($\text{Ru}(\text{acac})_3$)为客体分子,采用主客体策略成功制备了具有优异类 POD 活性的 Ru/NC 纳米酶。在 H_2O_2 存在的条件下, Ru/NC 纳米酶可催化显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)由无色转变为蓝色产物(TMB_{ox})。基于 Ru/NC 纳米酶优异类 POD 活性构建了比色传感器,对 XO 催化过程中产生的 H_2O_2 进行检测,从而间接分析 XO 的活性。在此基础上,开发了快速可视化的 XOI 检测与筛选方法,为筛选痛风性关节炎等疾病的治疗药物提供了新思路。实验原理示意图见图 1。

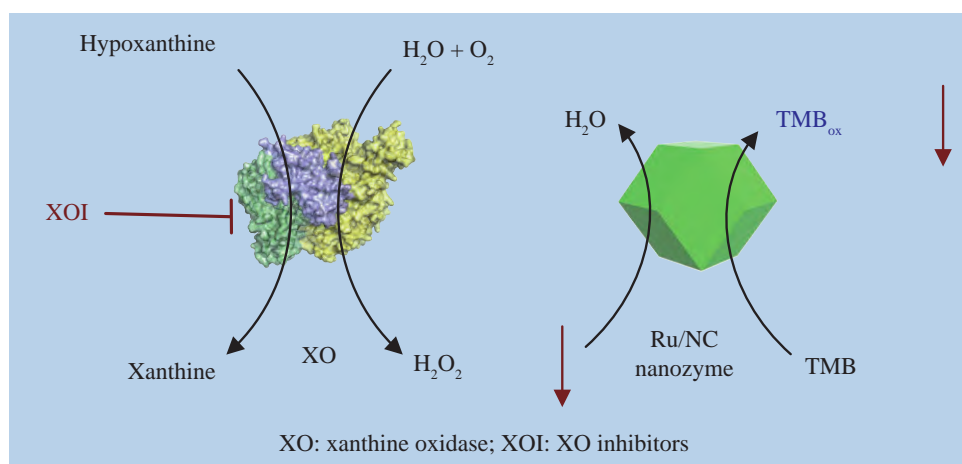


图1 氮掺杂碳载钌金属原子(Ru/NC)纳米酶用于黄嘌呤氧化酶(XO)活性分析及黄嘌呤氧化酶抑制剂(XOI)检测的示意图

Fig.1 Schematic diagram of xanthine oxidase (XO) activity analysis and xanthine oxidase inhibitors (XOI) detection using nitrogen-doped carbon-supported ruthenium metal atom (Ru/NC) nanozyme

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Quanta 200 扫描电子显微镜(SEM,荷兰 FEI 公司); JEM-2100 透射电子显微镜(TEM,日本 JEOL 公司); 配置双相差校正器的 Titan3 G2 60-300 高角度环形暗场扫描透射电子显微镜(HAADF-STEM)及能量色散光谱仪(EDX)(荷兰 FEI 公司); D8 advance X 射线衍射仪(XRD,德国 Bruker 公司); PHI 5000 Versa X 射线光电子能谱仪(XPS,日本 Ulvac-Phi 公司); THZ-98 AB 恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司); SparkTM 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Nanodrop 紫外可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司); 101A-1E 鼓风干燥箱(上海精宏实验仪器有限公司)。

$\text{Ru}(\text{acac})_3$ 、2-甲基咪唑、TMB、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、对苯二甲酸(TA)和黄嘌呤(上海阿拉丁试剂公司); $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 H_2O_2 (30%)、邻苯二胺(OPD)和甲醇(上海国药试剂公司); 别嘌呤(上海麦克林试剂公司); XO(美国 Sigma-Aldrich 公司)。所用试剂纯度至少为分析纯; 实验用水为超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.2 实验方法

1.2.1 Ru/NC 的合成

参考文献[14]报道的方法,采用主客体策略制备 Ru/NC 纳米酶。将 $3.6 \text{ mmol Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $0.225 \text{ mmol Ru}(\text{acac})_3$ 依次溶于 15 mL 甲醇中; 将此混合溶液缓慢加入到溶有 2-甲基咪唑(14.2 mmol)的 10 mL 甲醇中; 剧烈搅拌 5 min 后,于室温下静置 20 h ; 产物用甲醇多次洗涤后,在真空烘箱中于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥过夜,即得到 $\text{Ru}(\text{acac})_3 @ \text{ZIF-8}$ 前体。在氩气气氛中,将 $\text{Ru}(\text{acac})_3 @ \text{ZIF-8}$ 前体以 $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 $900 \text{ }^\circ\text{C}$,煅烧 3 h ; 冷却至室温,收集 Ru/NC 黑色粉末,用于后续类酶活性测试。作为对照,在

不添加 $\text{Ru}(\text{acac})_3$ 的情况下,通过煅烧 ZIF-8 前体制得 NC 样品。

1.2.2 Ru/NC 的类酶活性测试及催化机理探究

分别以 TMB、ABTS 和 OPD 作为显色底物,考察 Ru/NC 的类 POD 活性。将 H_2O_2 (100 μL , 10 mmol/L)、显色底物 (100 μL , 5 mmol/L) 和 Ru/NC 纳米酶 (10 μL , 1 mg/mL) 依次加入到 790 μL NaAc-HAc 缓冲液 (0.2 mol/L, pH 4.5) 中,混合均匀后孵育 200 s,采用紫外可见分光光度计测定反应体系的吸收光谱。

1.2.3 Ru/NC 的类酶活性机理探究

将 H_2O_2 (100 μL , 10 mmol/L)、TA (100 μL , 8 mmol/L) 和 Ru/NC 纳米酶 (10 μL , 1 mg/mL) 依次加入到 790 μL NaAc-HAc 缓冲液 (0.2 mol/L, pH 4.5) 中,混合均匀,避光孵育 20 min,在 315 nm 激发波长下测试混合液的荧光发射光谱。

1.2.4 比色法检测 H_2O_2

将 Ru/NC 纳米酶 (10 μL , 1 mg/mL)、TMB (100 μL , 5 mmol/L) 和 100 μL 不同浓度的 H_2O_2 溶液依次加入到 790 μL NaAc-HAc 缓冲液 (0.2 mol/L, pH 4.5) 中,充分混合,在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 200 s,采用酶标仪测定混合溶液的吸收光谱,并记录溶液在 652 nm 处的吸光度。

1.2.5 比色法分析 XO 活性

将 100 μL 不同浓度的 XO (0~10 mU/mL) 和 100 μL 次黄嘌呤 (0.1 mol/L) 加入到 800 μL 水中,充分混合,在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min; 取 100 μL 反应液,按 1.2.4 节的方法,采用 Ru/NC 纳米酶进行 H_2O_2 的比色检测。

1.2.6 比色法检测 XO

将 100 μL 不同浓度的别嘌呤 (0~25 mmol/L) 和 100 μL XO (0.1 mol/L) 加入到 800 μL 水中,混合均匀,在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min; 加入 100 μL 黄嘌呤 (0.1 mol/L),继续孵育 20 min 后,按照 1.2.5 节的方法进行 XO 活性分析。别嘌呤对 XO 的抑制率 (Inhibition rate, IR) 通过式 (1) 计算:

$$\text{IR}(\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

其中, A 和 A_0 分别为抑制剂存在和不存在时,显色体系在 652 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 Ru/NC 纳米酶的制备与结构表征

将 Ru 金属以原子形式负载于碳骨架上,为避免发生团聚,采用金属有机框架 (MOF) 限域的主客体策略合成了 Ru/NC^[15]。选择 ZIF-8 作为基体,在组装过程中,将 $\text{Ru}(\text{acac})_3$ 客体分子嵌入其空腔。如图 2A 所示, $\text{Ru}(\text{acac})_3$ 并未对 ZIF-8 的结晶过程产生影响, $\text{Ru}(\text{acac})_3@ZIF-8$ 主客体分子被成功制备。随后,在 900 $^\circ\text{C}$ 热处理 3 h 的过程中,主体分子碳化会产生大量氮配位点,充当锚定位点,有效防止 Ru 原子聚集^[16]。热处理后,材料的 SEM 和 TEM 图像分别如图 2A 和图 2B 所示,所制备的 Ru/NC 仍维持 $\text{Ru}(\text{acac})_3@ZIF-8$ 前驱体的菱形十二面体结构 (2B 插图中示意图),且碳骨架的平均尺寸约为 240 nm。为确认 Ru 原子的负载情况,采用 HAADF-STEM 进行观察。如图 2C 所示, Ru 原子随机分散在氮掺杂碳骨架中,且并未发生团聚现象。EDX 结果 (图 2D) 显示, Ru、N 和 C 元素均匀分布,证明 Ru/NC 成功合成^[17]。

在 Ru/NC 的 XRD 谱图 (图 2E) 中,位于 26 $^\circ$ 和 42 $^\circ$ 处的特征峰分别归属于碳骨架的 (002) 和 (100)/(101) 面,证明发生了碳化^[16]。此外,在 Ru/NC 的 XRD 谱图中不存在 Ru 纳米粒子的特征峰,证明 Ru 原子之间并未成键,而是与 N 之间发生了配位 (图 2E 插图),与 HAADF-STEM 的结果一致^[18]。在 XPS 全谱 (图 2F) 中,可以观察到 Ru 3p、C 1s、N 1s 和 O 1s 的特征峰,证明 Ru/NC 中存在这些元素。同时,高分辨 Ru 3p 谱 (图 2G) 在 462.5 eV 处出现了 Ru 3p_{3/2} 峰,在 485.0 eV 处出现了 Ru 3p_{1/2} 峰,证明 Ru 被成功掺杂到结构中^[19]。但是,由于菱形十二面体框架的壳层较厚,导致 Ru 3p 的光电子信号较弱,无法对其价态进行精准分析^[20]。

2.2 Ru/NC 的类 POD 活性考察

具备类 POD 活性的纳米酶可以催化 H_2O_2 氧化 ABTS、TMB 或 OPD 等还原性显色底物^[21]。因此,选用这 3 种典型的显色底物考察 Ru/NC 的类酶活性。如图 3A 所示, ABTS 的颜色由无色逐渐变为绿色 (曲线 a),在约 415 nm 处出现特征吸收峰; OPD 被氧化生成了黄色产物,在约 450 nm 处呈现明显的吸收峰

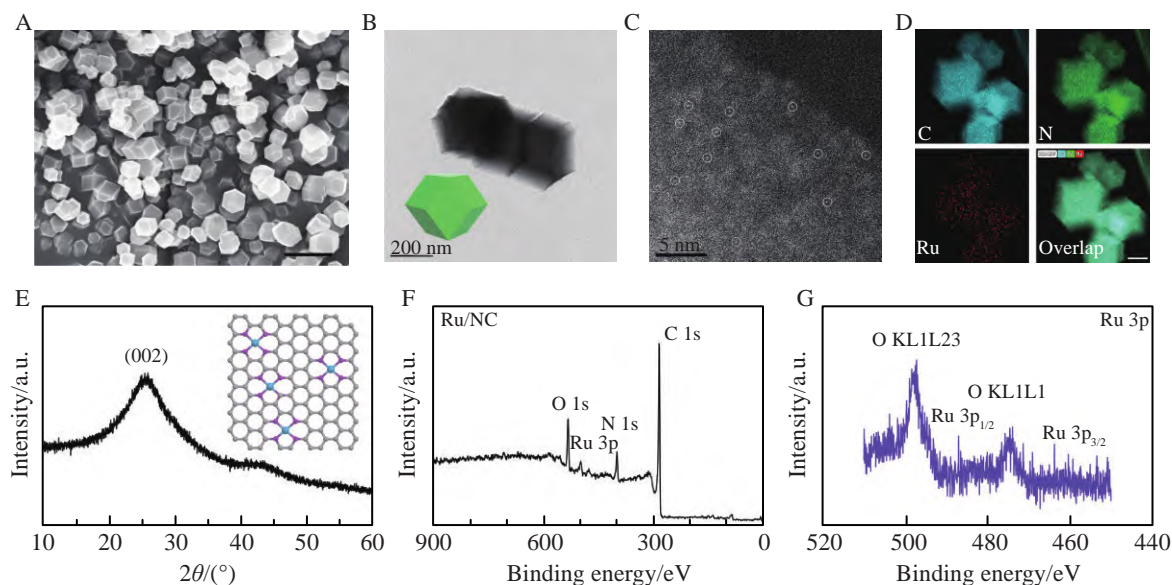


图2 Ru/CN 纳米酶的特征: (A) $\text{Ru}(\text{acac})_3@ZIF-8$ 的扫描电子显微镜(SEM)图像(标尺: 500 nm); (B) Ru/CN 的透射电镜(TEM)图像,插图(绿色)为结构示意图; (C) Ru/CN 的高角度环形暗场扫描透射电子显微镜(HAADF-STEM)图像(白圈代表 Ru 原子)及其中(D) C、N 和 Ru 的能量色散(EDX)元素分布图像(标尺: 200 nm); Ru/CN 的(E) X-射线衍射(XRD)图谱、(F) X-射线光电子能谱(XPS)全谱及(G) Ru 3p XPS 谱图

Fig.2 Characterization of Ru/CN nanozyme: (A) Representative scanning electron microscopy (SEM) image of $\text{Ru}(\text{acac})_3@ZIF-8$ (Scale bar: 500 nm); (B) Transmission electron microscopy (TEM) image of Ru/CN, inset (Green) is schematic illustration of its structure; (C) High angle angular dark field-scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM) image (White circles represent Ru atoms) and (D) elemental distribution images of C, N, and Ru of Ru/CN by energy dispersive X-ray analysis (EDX), scale bar is 200 nm; (E) X-ray diffraction (XRD) pattern, (F) X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) survey spectrum, and (G) Ru 3p XPS spectrum of Ru/CN

(曲线 b); TMB 被氧化为蓝色产物,在约 652 nm 处出现出强烈的吸收峰(曲线 c)。上述结果表明, Ru/CN 具有类 POD 活性,能够催化 H_2O_2 氧化还原性底物显色^[22]。

为进一步阐明 Ru/CN 发挥类 POD 活性的机制,对未掺杂 Ru 原子的 NC 样品的催化活性进行了考察。如图 3B 所示,在相同的测试条件下,相对于 Ru/CN(曲线 a), NC(曲线 b)表现出较弱的类 POD 活性,表明 Ru/CN 中负载的 Ru 原子可作为催化过程中的主要活性位点而发挥作用。由于对苯二甲酸(TA)能够与羟自由基($\cdot\text{OH}$)发生反应,生成具有荧光的羟化产物 2-羟基对苯二甲酸(TAOH),因此,采用 TA 作为荧光探针可检测催化过程中的中间产物^[23]。如图 3C 所示,在 315 nm 波长的荧光激发下,在单独的 TA(曲线 a)和 TA 与 Ru/CN 的混合液(曲线 b)中均未检测到明显的荧光信号,而 H_2O_2 与 TA 的混合体系在约 435 nm 处出现荧光发射峰(曲线 c),说明 H_2O_2 的自发分解对 TA 有微弱的氧化作用。在向含有 TA 和 H_2O_2 的反应液中加入 Ru/CN 后,从反应体系中观察到较强的荧光发射信号,说明 Ru 位点能够催化 H_2O_2 分解生成 $\cdot\text{OH}$ 。为验证 $\cdot\text{OH}$ 在催化反应中的作用,引入了 $\cdot\text{OH}$ 的特异性清除剂异丙醇^[24]。如图 3D 所示,相较于未加入异丙醇(曲线 b),加入异丙醇后, Ru/CN 纳米酶的活性显著降低(曲线 a),进一步证明 $\cdot\text{OH}$ 是发挥类 POD 活性的主要中间体^[25]。

2.3 比色实验条件的优化

为提高传感检测效率,对影响 Ru/CN、 H_2O_2 和 TMB 之间显色反应的条件进行了优化,包括体系的 pH 值、反应温度、TMB 浓度、Ru/CN 用量以及反应时间^[26]。进行 pH 值和温度优化时,将活性最优时体系在 652 nm 处的最大吸光度设定为 100%,将其它条件下的吸光度值相对于该值进行比例计算,记为相对活性。在 pH 3.0~6.0 范围内, Ru/CN 的催化活性随 pH 值增高而先增强后减弱,最优 pH 值为 4.5(图 4A)。在 20~50 °C 温度范围内,随着温度升高, Ru/CN 的活性逐渐增大,在 50 °C 时活性最强(图 4B)。

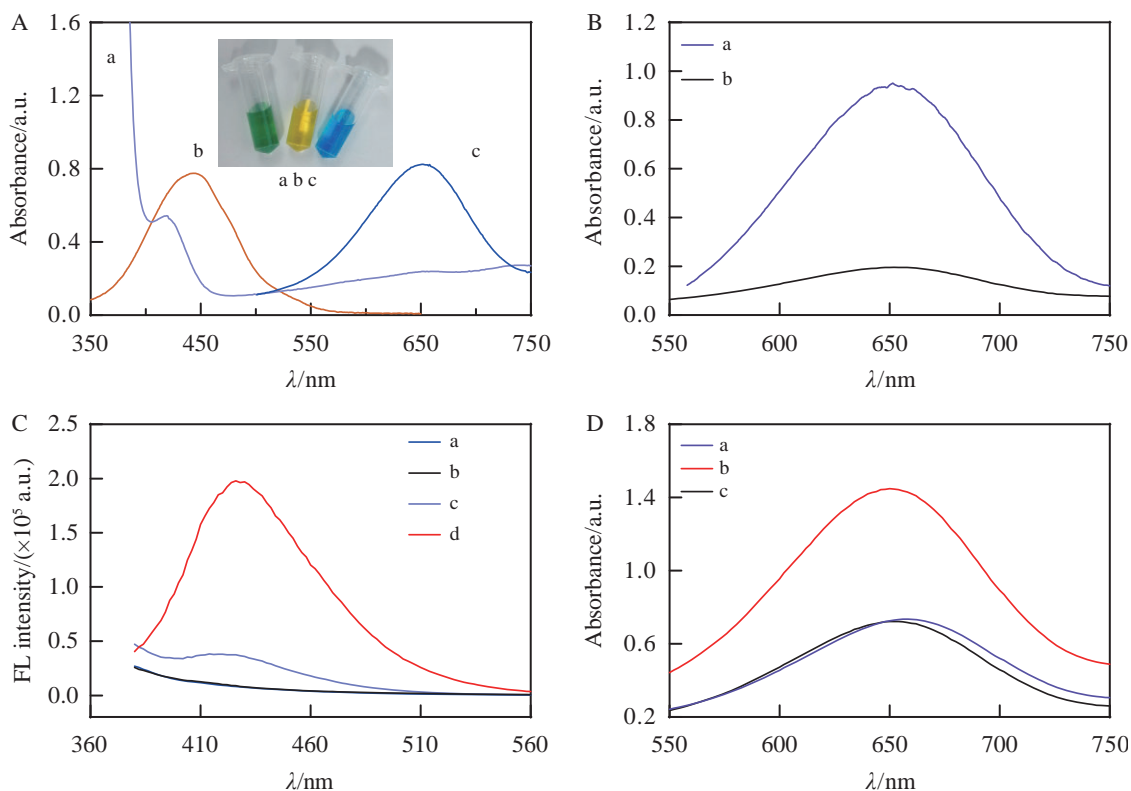


图3 Ru/NC 纳米酶的类过氧化物酶(POD)活性: (A) Ru/NC 纳米酶催化 H_2O_2 与不同显色底物 (a, ABTS; b, OPD; c, TMB) 反应后的吸收光谱及数码照片(插图); (B) Ru/NC 与 NC 的活性对比 (a, Ru/NC; b, NC); (C) TA 探针在不同条件下 (a, TA; b, TA + Ru/NC; c, TA + H_2O_2 ; d, TA + Ru/NC + H_2O_2) 的荧光发射光谱; (D) 加入异丙醇后反应体系的吸光度变化 (a, Ru/NC + H_2O_2 + TMB + 异丙醇; b, Ru/NC + H_2O_2 + TMB; c, Ru/NC + TMB)

Fig.3 Peroxidase (POD)-like activity of Ru/NC nanozyme: (A) Absorption spectra and digital photographs (inset) of Ru/NC nanozyme catalyzing reactions of different chromogenic substrates (a, ABTS; b, OPD; c, TMB) in the presence of H_2O_2 ; (B) POD-like activity comparison between Ru/NC and NC (a, Ru/NC; b, NC); (C) Fluorescence spectra of TA probe under different conditions (a, TA; b, TA + Ru/NC; c, TA + H_2O_2 ; d, TA + Ru/NC + H_2O_2); (D) Absorbance changes in the reaction system after addition of isopropanol (a, Ru/NC + H_2O_2 + TMB + isopropanol; b, Ru/NC + H_2O_2 + TMB; c, Ru/NC + TMB)

ABTS: 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)); TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine); OPD: 邻苯二胺(*o*-Phenylenediamine); TA: 对苯二甲酸(Terephthalic acid)

随着温度升至 $80\text{ }^\circ\text{C}$, Ru/NC 的活性逐渐降低。这可能是由于温度升高使得催化中间体在活性位点吸附,发生催化剂中毒,导致 Ru/NC 的催化活性降低^[27]。考虑到与人体环境相近的情况,选择在生理温度 ($37\text{ }^\circ\text{C}$) 进行检测; 如果综合考检测成本和便利性,也可以选择室温下进行比色检测。

如图 4C 所示,随着 TMB 浓度升高,体系在 652 nm 处的吸光度逐渐增大,当 TMB 浓度高于 0.5 mmol/L 后,吸光度的增速减缓。因此,选择 TMB 的浓度为 0.5 mmol/L 。在反应初期,3 种浓度下反应体系在 652 nm 处的吸光度随时间延长而迅速上升,随着反应的进行,吸光度增速逐渐减缓(图 4D)。为实现快速检测并节约时间,选择 200 s 作为检测时间。当 Ru/NC 纳米酶的浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,吸光度值过大,不利于线性拟合,因此选择 Ru/CN 浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

综上,最优的显色反应条件为: NaAc-HAc 缓冲液($\text{pH } 4.5$), 0.5 mmol/L TMB, $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ Ru/NC, 反应时间为 200 s 。

2.4 Ru/NC 用于 H_2O_2 比色检测及 XO 活性分析

如图 5A 所示, XO 能够催化次黄嘌呤向黄嘌呤(Xanthine)转化,同时 O_2 被还原为 H_2O_2 ; 在 XO 催化作用下,黄嘌呤继续转化为尿酸,在生成 H_2O_2 的同时,有超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)伴随产生^[2]。因此,为验证

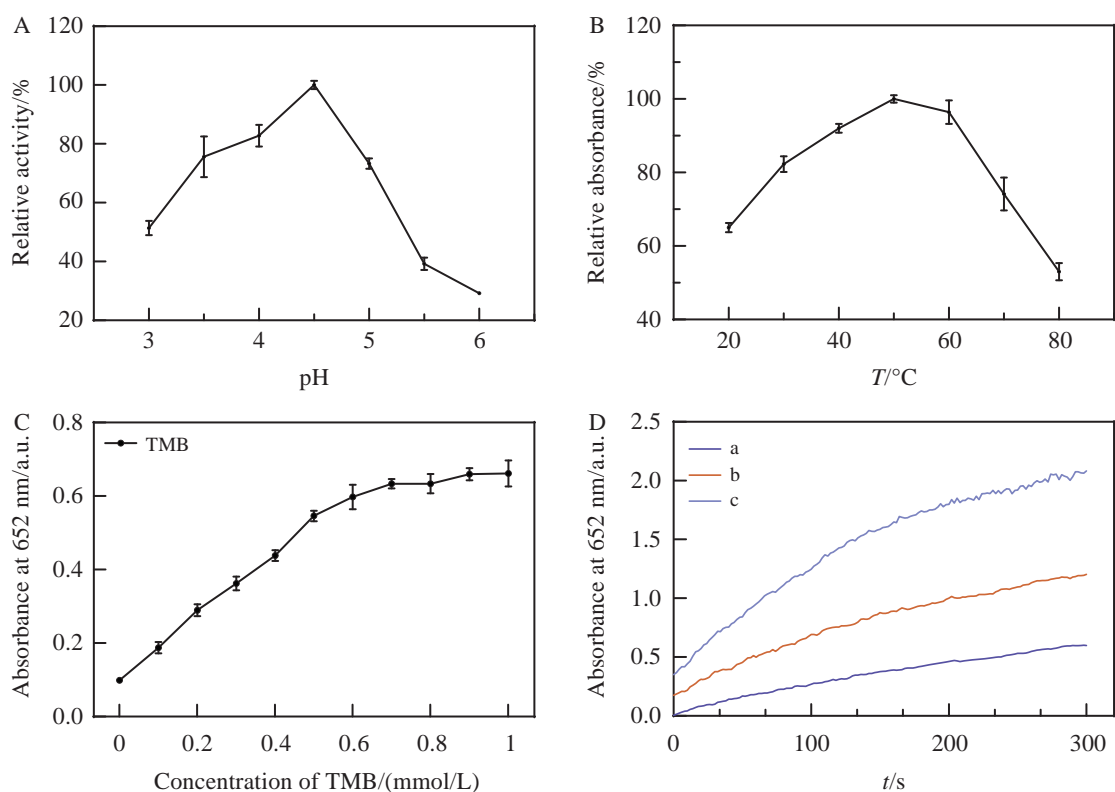


图4 显色反应条件的优化: Ru/NC 纳米酶在不同(A)pH 值及(B)温度范围内的相对活性; (C)反应体系在 652 nm 处的吸光度与 TMB 浓度之间的关系; (D)不同浓度的 Ru/NC(a, 20 μg/mL; b, 10 μg/mL; c, 5 μg/mL)的反应动力学曲线

Fig.4 Optimization of the colorimetric reaction conditions: Relative activity of Ru/NC nanozyme at various pH values (A) and temperatures (B); (C) Relationship between absorbance at 652 nm and TMB concentration in the reaction system; (D) Reaction kinetics curves of different concentrations of Ru/NC nanozyme (a, 20 μg/mL; b, 10 μg/mL; c, 5 μg/mL)

Ru/NC 用于 XO 活性分析及 XO 检测的可行性,首先进行了 XO 催化产物 H_2O_2 的检测。在最优条件下,测试了 Ru/NC 与 TMB 比色检测体系在 652 nm 处的吸光度随 H_2O_2 浓度变化的关系。如图 5B 所示,652 nm 处的吸光度值随 H_2O_2 浓度的增加而增大,在 10~500 μmol/L 浓度范围内, H_2O_2 浓度与 652 nm 处吸光度呈线性关系,线性方程为 $y=0.0013x+0.0723$ ($R^2=0.98$),检出限(3σ)为 4.8 μmol/L。

基于 Ru/NC 对 H_2O_2 的检测,进行 XO 活性分析。考虑到 XO 在催化黄嘌呤的反应中会产生 $\bullet O_2$,为避免其对检测过程的影响,选择次黄嘌呤作为反应底物^[3]。如图 5C 所示, XO 的活性在 0~10 mU/mL 范围内逐渐增大时,显色体系的吸光度随之升高,表明 Ru/NC 可成功检测 XO 催化次黄嘌呤反应产生的 H_2O_2 。Ru/NC 纳米酶对 XO 活性分析的线性范围为 1~7 mU/mL,线性回归方程为 $y=0.066x+0.016$ ($R^2=0.94$),检出限(3σ)为 0.69 mU/mL。

进一步评估了 XO 活性分析体系的选择性和抗干扰性能,选择典型的生物分子牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(Lys)、葡萄糖(Glu)和 Na^+ 作为干扰物质。如图 5E 所示,当体系中存在 XO 时,会引起检测体系在 652 nm 处的吸光度变化。当其它干扰物质单独存在时,并未引起检测体系颜色显著变化,证明此 XO 活性检测策略具有优异的选择性。当这些干扰物质与 XO 共存时,体系吸光度的变化与 XO 单独存在时相当,表明这些干扰物对 XO 的检测没有明显影响,证明此 XO 活性分析策略具有良好的抗干扰能力,这可归因于 XO 对次黄嘌呤的特异性识别能力^[28]。

2.5 Ru/NC 用于比色法检测 XO

对 Ru/NC 纳米酶用于 XO 检测的可行性进行验证,选择典型的 XO 别嘌呤为模型进行研究^[29]。如图 6A 所示,当不存在别嘌呤时, XO 能够催化次黄嘌呤的氧化反应而产生 H_2O_2 ,在 Ru/NC 纳米酶的催化

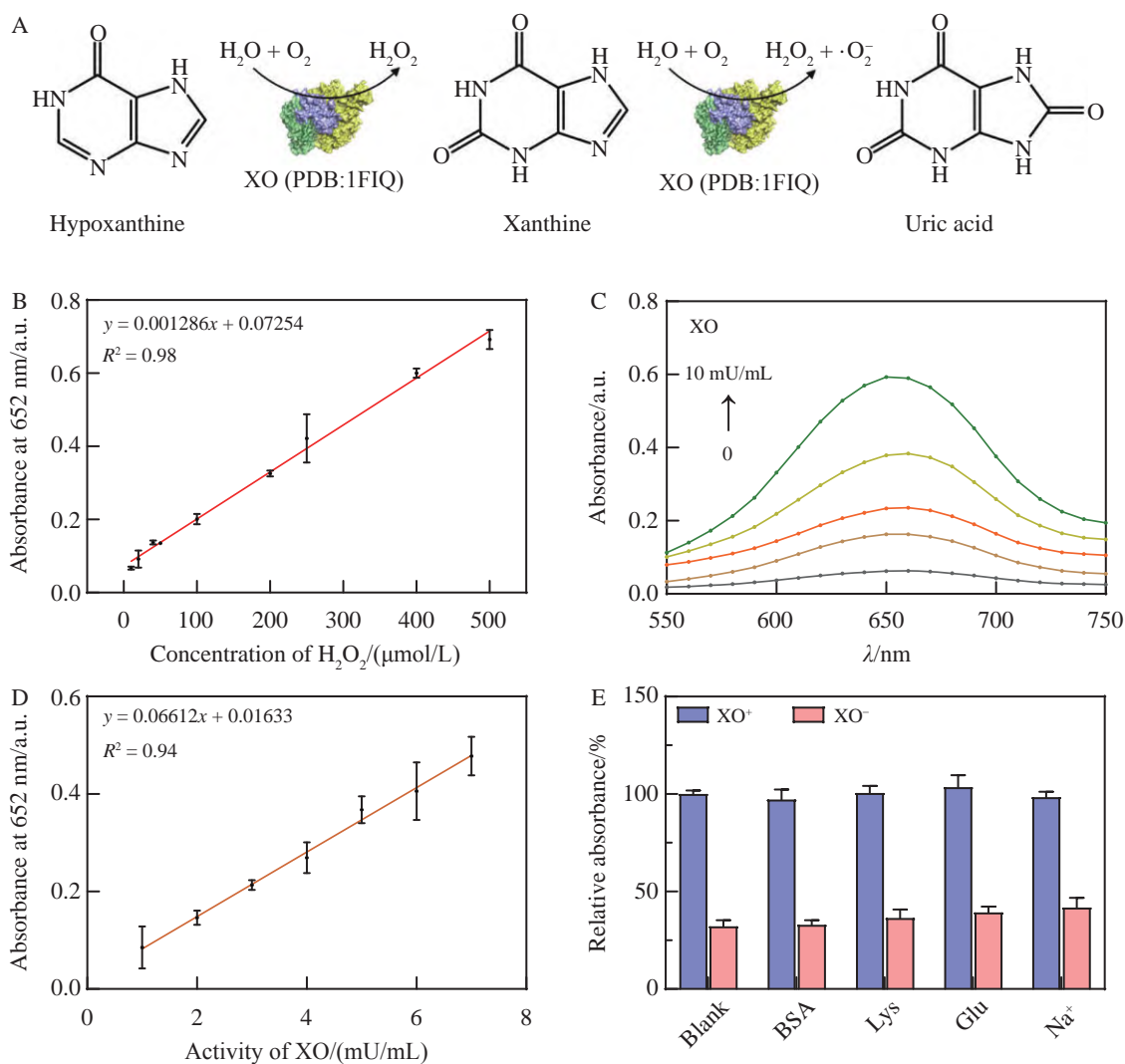


图5 基于 Ru/NC 纳米酶的 XO 活性分析: (A) XO 以次黄嘌呤或黄嘌呤为催化底物生成 H_2O_2 的反应; (B) 显色体系在 652 nm 处的吸光度变化与 H_2O_2 浓度的线性关系; Ru/NC 纳米酶对不同活性 XO 分析的 (C) 吸收光谱图及 (D) 线性关系曲线; (E) XO 分析方法的选择性和抗干扰性评价 (Blank, 空白对照; BSA, 牛血清白蛋白; Lys, 溶菌酶; Glu, 葡萄糖)

Fig.5 Analysis of XO activity based on Ru/NC nanozyme: (A) Reaction in which XO catalyzes hypoxanthine or xanthine to produce H_2O_2 ; (B) Linear relationship between the absorbance changes at 652 nm in colorimetric system and the H_2O_2 concentration; (C) Absorption spectra and (D) linear relationship curves of Ru/NC nanozyme for XO activity analysis; (E) Selectivity and interference evaluation of the developed XO analysis method (Blank, blank control; BSA, bovine serum albumin; Lys, lysozyme; Glu, glucose)

作用下,产生的 H_2O_2 可以引发后续的显色反应,将 TMB 氧化为蓝色产物(曲线 a);当存在别嘌呤时,基于 Ru/NC 纳米酶的显色体系在 652 nm 处的吸光度降低(曲线 b),这说明存在少量别嘌呤时, XO 催化黄嘌呤的氧化反应受到抑制,生成的 H_2O_2 相应减少;当体系中存在过量的别嘌呤时, XO 的活性被完全抑制,显色体系不发生颜色改变(曲线 c)。上述结果初步证实采用 Ru/NC 纳米酶进行 XO 检测具有可行性^[30]。

在 37 °C 条件下,分别将不同浓度(0~25 mmol)的别嘌呤与 XO 共孵育,然后采用基于 Ru/NC 纳米酶的方法分析 XO 的活性。如图 6B 所示,显色体系在 652 nm 处的吸光度随别嘌呤浓度增加而逐渐降低,测得的半数抑制浓度(IC_{50})为 5.75 mmol/L,与文献[31]报道的数值一致,证明本方法具有良好的准确性。同时,本方法具有成本低、操作简便和可视化检测等优势,在筛选新型 XO 用于痛风性关节炎等疾病诊断和治疗中具有良好的应用潜力。

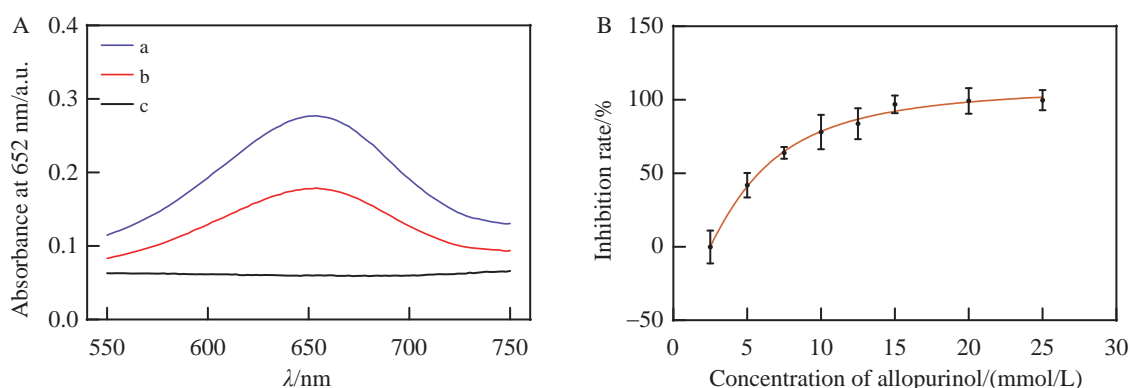


图6 基于 Ru/NC 纳米酶的 XO 别嘌呤醇的检测: (A) XO 与不同浓度别嘌呤醇(a, 0 mmol/L; b, 7.5 mmol/L; c, 25 mmol/L)共孵育后的活性分析; (B) 别嘌呤醇对 XO 活性的抑制曲线

Fig.6 Detection of XO inhibition by allopurinol based on Ru/NC nanozyme: (A) Activity analysis of XO after incubation with different concentrations of allopurinol (a, 0 mmol/L; b, 7.5 mmol/L; c, 25 mmol/L); (B) Inhibition curve of allopurinol on XO activity

3 结论

采用主客体策略制备了具有优异类 POD 活性的 Ru/NC 纳米酶,其中负载的 Ru 金属位点可以催化 H_2O_2 分解产生 $\cdot OH$ 中间物质,氧化还原性显色底物。基于此,建立了比色检测 H_2O_2 的有效方法,其线性范围为 $10\sim 500\ \mu mol/L$,检出限为 $4.8\ \mu mol/L$ 。通过检测 XO 催化次黄嘌呤产生的 H_2O_2 ,实现了对 XO 活性的分析,线性范围为 $1\sim 7\ mU/mL$,检出限为 $0.69\ mU/mL$ 。基于此体系构建了一种用于筛选 XO 的比色法,并通过对典型 XO 分子别嘌呤醇的检测,验证了本方法的准确性。本研究为治疗痛风性关节炎等疾病的新颖药物的筛选提供了新思路。

References

- [1] DALBETH N, CHOI H K, JOOSTEN L A B, KHANNA P P, MATSUO H, PEREZ-RUIZ F, STAMP L K. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2019, 5(1): 69.
- [2] RIBEIRO P M G, FERNANDES H S, MAIA L B, SOUSA S F, MOURA J J G, CERQUEIRA N M F S A. *Inorg. Chem. Front.*, 2021, 8(2): 405-416.
- [3] KELLEY E E, KHOO N K H, HUNDLEY N J, MALIK U Z, FREEMAN B A, TARPEY M M. *Free Radicals Biol. Med.*, 2010, 48(4): 493-498.
- [4] DEHLIN M, JACOBSSON L, RODDY E. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2020, 16(7): 380-390.
- [5] SCHLESINGER N, BRUNETTI L. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2020, 50(3): 444-450.
- [6] STAMP L K, CHAPMAN P T. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2020, 34(4): 101501.
- [7] MURRELL G A C, RAPEPORT W G. *Clin. Pharmacokinet.*, 1986, 11(5): 343-353.
- [8] WEI H, WANG E. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42(14): 6060-6093.
- [9] WU J, WANG X, WANG Q, LOU Z, LI S, ZHU Y, QIN L, WEI H. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48(4): 1004-1076.
- [10] JIANG X, WANG X, LIN A, WEI H. *Anal. Chem.*, 2021, 93(14): 5954-5962.
- [11] WU Y, JIAO L, LUO X, XU W, WEI X, WANG H, YAN H, GU W, XU B Z, DU D, LIN Y, ZHU C. *Small*, 2019, 15(43): e1903108.
- [12] SHEN L, YE D, ZHAO H, ZHANG J. *Anal. Chem.*, 2021, 93(3): 1221-1231.
- [13] PENG C, PANG R, LI J, WANG E. *Adv. Mater.*, 2023: e2211724.
- [14] GENG Z, LIU Y, KONG X, LI P, LI K, LIU Z, DU J, SHU M, SI R, ZENG J. *Adv. Mater.*, 2018, 30(40): e1803498.
- [15] JI S, CHEN Y, WANG X, ZHANG Z, WANG D, LI Y. *Chem. Rev.*, 2020, 120(21): 11900-11955.
- [16] LI Z, CHEN Y, JI S, TANG Y, CHEN W, LI A, ZHAO J, XIONG Y, WU Y, GONG Y, YAO T, LIU W, ZHENG L, DONG J, WANG Y, ZHUANG Z, XING W, HE C T, PENG C, CHEONG W C, LI Q, ZHANG M, CHEN Z, FU N, GAO X, ZHU W, WAN J, ZHANG J, GU L, WEI S, HU P, LUO J, LI J, CHEN C, PENG Q, DUAN X, HUANG Y, CHEN X M, WANG D, LI Y. *Nat. Chem.*, 2020, 12(8): 764-772.
- [17] XIAO M, GAO L, WANG Y, WANG X, ZHU J, JIN Z, LIU C, CHEN H, LI G, GE J, HE Q, WU Z, CHEN Z, XING W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 141(50): 19800-19806.

- [18] QIN J, LIU H, ZOU P, ZHANG R, WANG C, XIN H L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144(5): 2197-2207.
- [19] XU G, ZHANG Y, FU Y, GUO Q. *ACS Catal.*, 2017, 7(2): 1158-1169.
- [20] XIONG Y, DONG J, HUANG Z Q, XIN P, CHEN W, WANG Y, LI Z, JIN Z, XING W, ZHUANG Z, YE J, WEI X, CAO R, GU L, SUN S, ZHUANG L, CHEN X, YANG H, CHEN C, PENG Q, CHANG C R, WANG D, LI Y. *Nat. Nanotechnol.*, 2020, 15(5): 390-397.
- [21] JIANG B, DUAN D, GAO L, ZHOU M, FAN K, TANG Y, XI J, BI Y, TONG Z, GAO G F, XIE N, TANG A, NIE G, LIANG M, YAN X. *Nat. Protoc.*, 2018, 13(7): 1506-1520.
- [22] GAO L, ZHUANG J, NIE L, ZHANG J, ZHANG Y, GU N, WANG T, FENG J, YANG D, PERRETT S, YAN X. *Nat. Nanotechnol.*, 2007, 2(9): 577-583.
- [23] JIAO L, XU W, YAN H, WU Y, LIU C, DU D, LIN Y, ZHU C. *Anal. Chem.*, 2019, 91(18): 11994-11999.
- [24] JIAO L, WU J, ZHONG H, ZHANG Y, XU W, WU Y, CHEN Y, YAN H, ZHANG Q, GU W, GU L, BECKMAN S P, HUANG L, ZHU C. *ACS Catal.*, 2020, 10(11): 6422-6429.
- [25] LIU Y, ZHOU M, CAO W, WANG X, WANG Q, LI S, WEI H. *Anal. Chem.*, 2019, 91(13): 8170-8175.
- [26] ZHOU Chen-Yu, FANG Qi, ZHANG Yu, DU Yan. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(6): 982-991.
周晨雨, 房琦, 张玉, 杜衍. *分析化学*, 2021, 49(6): 982-991.
- [27] CHEN X, SU B, CAI Z, CHEN X, OYAMA M. *Sens. Actuators, B*, 2014, 201: 286-292.
- [28] WANG Y, XUE Y, ZHAO Q, WANG S, SUN J, YANG X. *Anal. Chem.*, 2022, 94(47): 16345-16352.
- [29] REES F, HUI M, DOHERTY M. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2014, 10(5): 271-283.
- [30] SU L, XIONG Y, YANG H, ZHANG P, YE F. *J. Mater. Chem. B*, 2016, 4(1): 128-134.
- [31] AGRAWAL N, ARYA M, KUSHWAH P. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2023, 102(5): 1293-1307.

Nitrogen-doped Carbon-supported Ruthenium Metal Atom Nanozyme for Colorimetric Determination of Xanthine Oxidase Inhibitors

LIU Quan-Yi^{1,2}, FANG Qi^{1,2}, WEI Hui^{*3}, DU Yan^{*1,2}

¹(State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

²(School of Applied Chemistry and Engineering, University of Science & Technology of China, Hefei 230026, China)

³(Jiangsu Key Laboratory of Artificial Functional Materials, College of Engineering and Applied Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract A colorimetric detection method for xanthine oxidase activity and its inhibitors (XOI) based on nitrogen-doped carbon-supported ruthenium metal atom (Ru/NC) nanozyme was developed. Through a host-guest strategy, Ru/NC nanozyme with excellent peroxidase-like activity was prepared using zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) as the host molecule and ruthenium acetylacetonate (Ru(acac)₃) as the guest molecule. Based on its peroxidase-like catalytic activity, the visual method for detection of hydrogen peroxide (H₂O₂) and analysis of xanthine oxidase (XO) activity were developed. Under optimized experimental conditions, the linear detection range for H₂O₂ was 10–500 μmol/L, with a detection limit of 4.8 μmol/L (3σ); for XO activity analysis, the linear range was 1–7 mU/mL, with a detection limit of 0.69 mU/mL (3σ). Furthermore, an effective method for screening XOI was developed, which had the advantages of low cost, simplicity, and visualization.

Keywords Nanozyme; Colorimetric analysis; Hydrogen peroxide; Xanthine oxidase; Xanthine oxidase inhibitor

(Received 2023-10-10; accepted 2023-10-20)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21874129, 22322410), the Key Research and Development Projects of Jilin Scientific and Technological Development Program (No. 202102041266YY), the Cooperation Funding of Changchun with Chinese Academy of Sciences (No. 22SH13) and the Capital Construction Fund Projects within the Budget of Jilin Province (No. 2023C042-5).