

## 金纳米酶催化过氧化氢分解反应的米氏常数的测定

戴煜\*, 孙雪婷, 吴昊屿, 李乃竹, 程国娥, 张孝进, 夏帆\*

中国地质大学(武汉)材料与化学学院, 武汉 430078

**摘要:** 近年来, 金纳米粒子被发现具有纳米酶特性, 可以模拟天然过氧化物酶催化过氧化氢分解。本实验选用明胶还原制备金纳米粒子, 通过紫外-可见分光光度法测定金纳米粒子催化过氧化氢分解反应的米氏常数。将科学前沿概念“纳米酶”设计成适合本科生的物理化学动力学实验, 既可锻炼学生的综合能力, 又能激发学生对化学实验的兴趣与民族自豪感。

**关键词:** 纳米酶; 金纳米粒子; 过氧化氢分解; 米氏常数; 物理化学实验

**中图分类号:** G64; O6

## Determination of the Michaelis Constant for Gold Nanozyme-Catalyzed Decomposition of Hydrogen Peroxide

Yu Dai\*, Xueting Sun, Haoyu Wu, Naizhu Li, Guoe Cheng, Xiaojin Zhang, Fan Xia\*

Faculty of Materials Science and Chemistry, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China.

**Abstract:** In recent years, gold nanoparticles (AuNPs) have been identified as possessing nanozyme properties, enabling them to mimic the catalytic activity of natural peroxidases in the decomposition of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). In this study, AuNPs were synthesized using gelatin as a reducing agent, and the Michaelis constant for the AuNP-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide was determined using UV-Vis spectroscopy. Integrating the innovative concept of “nanozyme” into a physical chemistry kinetics experiment designed for undergraduate students not only enhances their comprehensive skills but also fosters their interest in chemical experimentation and instills a sense of national pride.

**Key Words:** Nanozyme; Gold nanoparticle; Hydrogen peroxide decomposition; Michaelis constant; Physical chemistry experiment

物理化学课程在化学反应动力学章节详细探讨了酶催化反应的机理与动力学特征, “酶的米氏常数测定”是物理化学动力学经典实验, 但实验中所使用的天然酶稳定性差、易失活、不能重复使用。自2007年中国科学家发现 $Fe_3O_4$ 纳米颗粒具有类酶活性以来<sup>[1]</sup>, 纳米酶因具有催化活性高、成本低、反应条件温和、稳定性好、适合大规模生产等优点, 正成为天然酶的潜在替代品。十几年来纳米酶研究取得了快速发展, 我国纳米酶研究处于世界领跑地位。纳米酶是一类自身蕴含酶学特性的纳米材料<sup>[2]</sup>。在“酶的米氏常数测定”实验中使用纳米酶, 可避免天然酶的缺点并有助于提升学生的科学前沿认知<sup>[3,4]</sup>。近年来, 研究发现金纳米粒子具有多种类酶活性, 如过氧化物酶、氧化酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等<sup>[5-7]</sup>。因此, 设计了“金纳米酶的米氏常数测定”实验, 应用于本科生教学。

收稿: 2024-07-11; 录用: 2024-09-14; 网络发表: 2024-11-18

\*通讯作者, Emails: yudai@cug.edu.cn(戴煜); xiafan@cug.edu.cn(夏帆)

基金资助: 湖北本科高校省级教学改革研究项目(2023134); 中国地质大学(武汉)教学改革研究项目(2022006)

本实验将科学前沿“纳米酶”设计成物理化学教学实验，具有“设计新”“思路新”“视角新”的特点。设计新：将科学前沿概念“纳米酶”设计成一个物理化学动力学基础实验，避免了目前教材中使用“天然酶”难以制备与存储的问题。思路新：本实验融合了交叉学科相关知识点，传授给本科生无机材料的制备、酶催化反应、米氏常数测定等知识，提升了学生自主创新、动手实践、数据处理能力。视角新：纳米酶由中国科学家发现并命名，是我国科学家开创的新领域，开展此实验有利于拓宽学生知识面，引领学生瞄准科研前沿，有利于激发学生的科研兴趣，提升民族自豪感。

## 1 实验目的

- (1) 了解纳米酶和金纳米粒子的性质，掌握化学动力学方程的特征；
- (2) 掌握紫外-可见分光光度计的基本操作与原理；
- (3) 制备金纳米颗粒，设计类酶活性的测定方法，绘制曲线并计算相关参数；
- (4) 熟练查阅文献，了解科学前沿，具备勇于探索、刻苦钻研的科研素质。

## 2 实验原理

金纳米粒子(AuNPs)具有过氧化物酶的活性，它可以催化酸性介质中的过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )分解为 $\cdot\text{OH}$ ，从而促进3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)氧化显现蓝色(图1)。同时，TMB氧化后的产物oxTMB在652 nm处有特征吸收峰，通过反应颜色变化及特征吸收峰强度，可定性、定量判断纳米酶的催化活性。通过优化，本实验的最佳条件选择为常温(25 °C)、常压(101 kPa)、15 min孵化时间、pH = 3.7缓冲溶液。

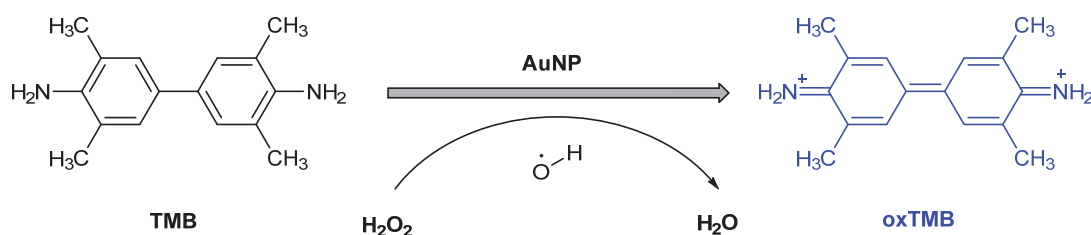


图1 AuNPs催化TMB氧化原理图

TMB氧化为一级反应，反应的速率方程微分式表示为：

$$\frac{dc}{dt} = kc \quad (1)$$

上式积分可得：

$$\ln \frac{c_0}{c_t} = kt \quad (2)$$

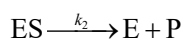
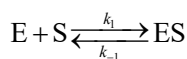
式中， $c_0$ 为TMB的初始浓度， $c_t$ 为 $t$ 时刻TMB浓度， $t$ 为时间， $k$ 为反应速率常数。

对于TMB的氧化产物oxTMB，利用朗伯-比尔定律(即公式(3))，根据测得的oxTMB吸光度计算其浓度 $c$ 。

$$c = \frac{A}{\epsilon b} \quad (3)$$

其中oxTMB的摩尔吸收系数 $\epsilon$ 为 $39000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ， $b = 1 \text{ cm}$ 。

酶催化反应的机理比较复杂，其中具有代表性的是Michaelis等提出的机理。他们认为，酶(E)与底物(S)先形成中间化合物ES，中间化合物再进一步分解为产物(P)，并释放出酶(E)，整个反应的速率步是第二步。



反应速率为： $r = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$ ，根据稳态近似法可以得到 $[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} = \frac{[E][S]}{K_M}$ ，式中 $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ 为米氏常数。米氏常数 $K_M$ 的意义是酶促反应速度 $r$ 达到反应最大速度一半时的底物浓度，反映了酶和底物亲和力的大小。 $K_M$ 越小，酶和底物的亲和力越大，酶的催化效果越好，反之亦然。

因此，可以通过改变过氧化氢浓度( $[S]$ )来测定动力学参数。

反应速率通过oxTMB浓度变化与反应时间的比值得到，动力学参数可以通过米氏方程的双倒数曲线(即公式(5))得到。以 $1/r$ 对 $1/[S]$ 作图，从斜率和截距求出 $K_M$ 和 $r_m$ 。其中 $r$ 是初速度， $[S]$ 是底物的浓度， $K_M$ 是米氏常数以及 $r_m$ 是反应的最大速度。

$$r = \frac{r_m[S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{K_M}{r_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{r_m} \quad (5)$$

### 3 仪器与试剂

仪器：万分之一电子天平(ME204, 梅特勒托利多, 瑞士)、磁力加热搅拌器(85-2, 予华仪器, 河南巩义)、冰箱、紫外-可见分光光度计(UV-2600, 岛津, 日本)、移液器(Eppendorf, 德国)。

试剂：冰醋酸(阿拉丁,  $\geq 99.7\%$ )、醋酸钠(阿拉丁,  $\geq 99\%$ )、TMB(阿拉丁,  $\geq 98\%$ )、30%  $H_2O_2$ 溶液(国药,  $\geq 30.0\%$ )、氯金酸(伊诺凯,  $\geq 99\%$ )、明胶(Sigma-Aldrich,  $\geq 95\%$ )、盐酸(国药, 36.0%–38.0%)、氢氧化钠(国药,  $\geq 96.0\%$ )、超纯水(电阻率为18.2 M $\Omega$ .cm)。

## 4 实验内容

### 4.1 溶液配制

按照表1配制相关溶液。

表1 溶液配制具体要求

| 溶液                    | 体积/mL | 浓度                       | 称取质量/移取体积                   |
|-----------------------|-------|--------------------------|-----------------------------|
| HAc溶液                 | 45    | 0.2 mol·L <sup>-1</sup>  | 515 $\mu$ L冰醋酸              |
| NaAc溶液                | 5     | 0.2 mol·L <sup>-1</sup>  | 0.1361 g醋酸钠                 |
| TMB溶液                 | 50    | 0.7 mmol·L <sup>-1</sup> | 0.0084 g TMB                |
| 氯金酸溶液                 | 10    | 0.05 mol·L <sup>-1</sup> | 0.17 g氯金酸                   |
| pH = 3.7 HAc-NaAc缓冲溶液 | 50    | 0.2 mol·L <sup>-1</sup>  | 45 mL HAc溶液、<br>5 mL NaAc溶液 |

① 本实验所有操作均在常温(25 °C)、常压(101 kPa)条件下进行；② 称取质量时用到的天平均为万分之一电子天平；

③ NaAc溶液、HAc溶液以及 $H_2O_2$ 溶液的配制过程中均使用的是超纯水；

④ TMB溶液是由TMB固体溶解于缓冲溶液中制得的，所以缓冲溶液配制时需要配制两份

### 4.2 AuNPs的制备

用明胶作为还原剂与稳定剂制备AuNPs。0.4 g的明胶溶液加入到100 mL水溶液中(明胶最终浓度为0.4%，质量百分比)，用盐酸与氢氧化钠调节溶液酸性至pH=4，加热搅拌混合溶液至80 °C，然后迅速加入470  $\mu\text{L}$ 的氯金酸溶液(氯金酸最终浓度为0.008%)。混合溶液在80 °C下连续搅拌，溶液呈红色，表明Au(III)离子已经被还原，获得了明胶修饰的AuNPs溶液。溶液降温后置于4 °C冰箱避光保存。

实验过程中观察溶液的颜色变化，并测定溶液1、2、3 h时的紫外-可见光谱图。

#### 4.3 纳米酶催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解反应一级反应速率常数、米氏常数测定

取500  $\mu\text{L}$  TMB溶液，50  $\mu\text{L}$  Au溶液、100  $\mu\text{L}$ 过氧化氢溶液混合，观察溶液在15 min内的颜色变化，并测定溶液在1、2、5、10、15 min时的紫外-可见光谱图。

根据依次稀释原则，分别取TMB溶液500  $\mu\text{L}$ 、AuNPs溶液50  $\mu\text{L}$ 、依次降低 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量，再依次加入缓冲溶液至溶液总体积为650  $\mu\text{L}$ 。测定反应系统2 min时的紫外-可见光谱图。

## 5 结果与讨论

### 5.1 AuNPs的制备

混合溶液在80 °C下连续搅拌，在1、1.5、2、3 h时观察到溶液呈红色，如图2a所示，表明Au(III)离子在1 h时已经被还原。如图2b所示，AuNPs溶液在不同时间的紫外-可见光谱图可以观测到AuNPs在520 nm处的特征峰，并且峰强随时间变化不明显，说明在1 h时，Au已经被还原。我们后期选用的催化剂均使用1 h制备的AuNPs样品，放置在4 °C冰箱保存1个月内，经过反复测试，发现Au纳米溶胶没有变性，催化性能可重复，稳定性良好，实验可重复。

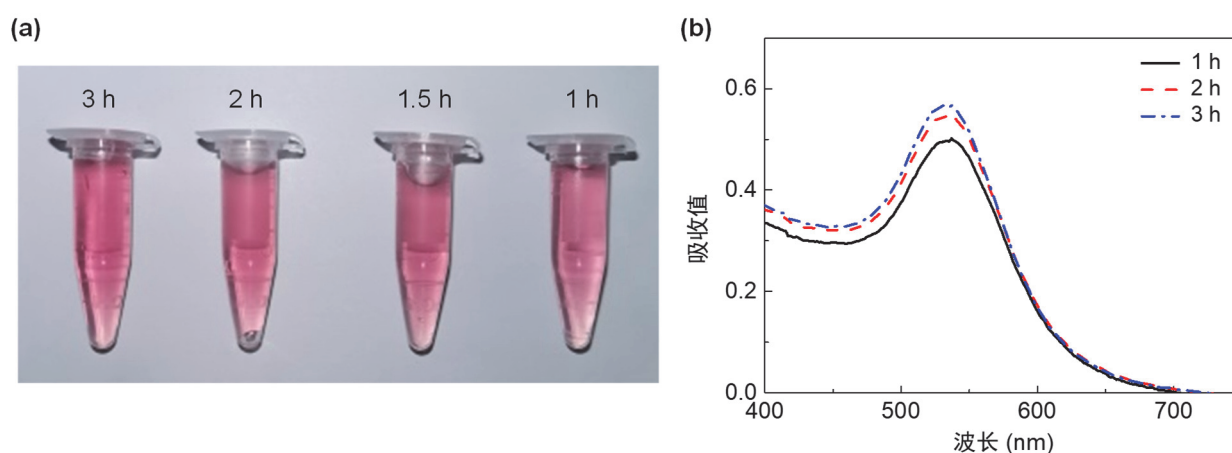


图2 (a) AuNPs颜色变化图；(b) AuNPs紫外-可见光谱图

### 5.2 AuNPs催化反应动力学研究及反应速率常数的测定

AuNPs催化体系在1、2、5、10、15 min的紫外-可见光谱图如图3a所示，通过读取oxTMB在652 nm处的特征吸收峰改变情况，根据朗伯-比尔定律，求出不同时间下产物的浓度，绘制如图3b所示的 $\ln(c_0/c_t)-t$ 图，线性拟合，直线斜率即为AuNPs催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解的反应速率常数(一级反应)  $k = 0.00321 \text{ min}^{-1}$ 。

### 5.3 AuNPs催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解反应的米氏常数的测定

对AuNPs的亲和能力进行进一步探究，测定过氧化氢底物的米氏常数，绘制如图4所示 $1/r-1/[S]$ 图，可以看出AuNPs对底物是具有一定的亲和能力的。

通过表2中AuNPs与天然过氧化物酶催化反应米氏常数的比较，可以看出AuNPs的米氏常数大于天然过氧化物酶催化反应的米氏常数，说明这种纳米酶对底物的亲和能力没有天然过氧化物酶的强。

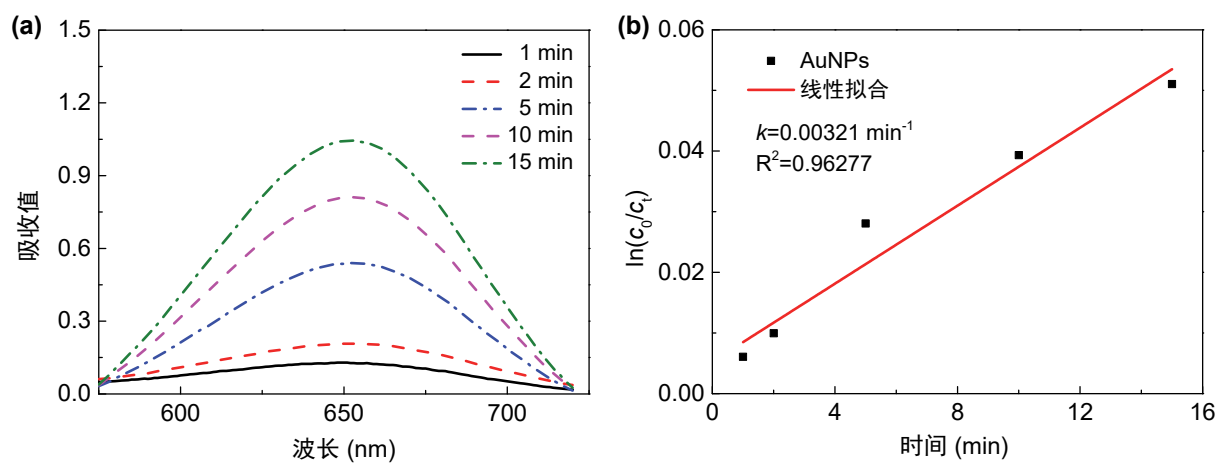
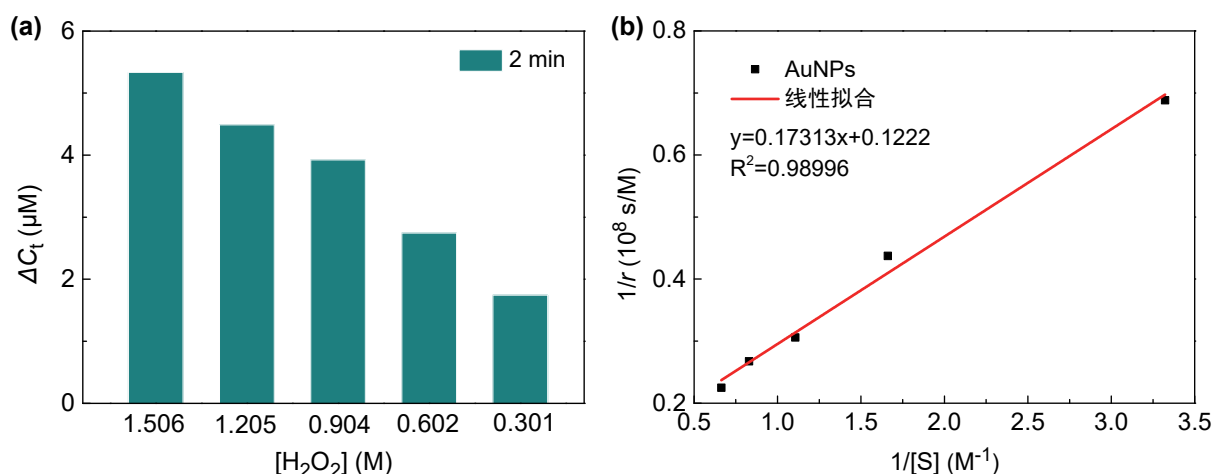

 图3 (a) oxTMB特征吸收峰; (b)  $\ln(c_0/c_1)$ - $t$ 图

 图4 (a)  $[S]$ - $t$ 图; (b)  $1/r$ - $1/[S]$ 图

 表2 不同催化剂下的 $K_M$ 和 $r_{max}$ 

| 催化剂                | 底物                     | 酶催化反应公式  | $K_M/\text{mM}$   | $r_{max}/(10^{-8}\cdot\text{M}\cdot\text{s}^{-1})$ |
|--------------------|------------------------|--|-------------------|--|
| AuNPs              | $\text{H}_2\text{O}_2$ | $1/r = 0.17313 \times 10^8/[s] + 0.1222 \times 10^8$ | $1.4 \times 10^3$ | 8.18   |
| HRP <sup>[8]</sup> | $\text{H}_2\text{O}_2$ | /  | 0.52              | 1.82   |

## 6 教学安排

本实验教学设计分为四部分。第一部分，实验预习阶段，由教师引导，进行文献调研，学生优化反应条件，拟定实验合成方案，开启科研探索，并选定TMB、AuNPs、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 这3个变量，设计出多组正交实验及动力学数据测量方案；第二部分，实验进行阶段，按照溶液配制具体要求表配制溶液，选用明胶还原氯金酸制备明胶修饰的AuNPs，以 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解为反应模型，使用紫外-可见分光光度计测量样品特征，进行催化动力学研究；第三部分，数据处理阶段，据朗伯比尔定律进行浓度与峰值的换算，计算一级反应速率常数，计算反应米氏常数，进行数据处理与分析；第四部分，书写实验报告，实验结束后，学生在统一发放的实验报告纸上书写实验报告，由实验指导教师批改。

本实验教学组织形式为室内实验，每2人一组，集中讲解，分小组进行实验操作、数据处理、结

果讨论。根据试行经验,本实验用时适中,从预习阶段到实验过程再到后期数据分析所需时间符合本科教学实验用时要求;操作简便,本科生可独立完成,实验结果可靠,重现性高;现象直观,具有颜色变化以及紫外-可见吸收峰峰值变化;所需试剂安全无毒,使用的仪器均为常规设备,经济可行,适合在本科教学实验中进行推广。

## 7 结语

本实验将科学研究中常用的金纳米粒子作为纳米酶引入化学实验教学中,可以极大地激发学生的学习兴趣 and 求知欲望,让学生重视实验课程,珍惜动手实践的每一分钟时间。将科学前沿“纳米酶”应用到本科实验中,有利于拓宽学生知识面,激发学生的兴趣与民族自豪感。

## 参 考 文 献

- [1] Gao, L. Z.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J. B.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T. H.; Feng, J.; Yang, D. L.; Perrett, S.; *et al. Nat. Nanotech.* **2007**, *2*, 577.
- [2] 高利增, 阎锡蕴. 生物化学与生物物理进展, **2013**, *40* (10), 892.
- [3] 刘梦婷, 杨树芬, 薛雨, 臧嘉妍, 苏权燕, 郑兴焯, 曹秋娥, 周川华. 大学化学, **2023**, *38* (9), 163.
- [4] 王力伟, 马光冉, 汪莉, 许富刚. 大学化学, **2024**, *39* (8), 255.
- [5] Lin, Y. H.; Ren, J. S.; Qu, X. G. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 4200.
- [6] Lou-Franco, J.; Das, B.; Elliott, C.; Cao, C. *Nano-Micro Lett.* **2021**, *13*, 10.
- [7] Jimenez-Falcao, S.; Méndez-Arriaga, J. M.; García-Almodóvar, V.; García-Valdivia, A. A.; Gómez-Ruiz, S. *Catalysts* **2023**, *13*, 13.
- [8] Liu, L.; Shi, Y.; Yang, Y. F.; Li, M. L.; Long, Y. J.; Huang, Y. M.; Zheng, H. Z. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13912.