

基于聚N-异丙基丙烯酰胺微凝胶构建 温敏性智能人工碲酶

陆俊俏¹, 杭迅¹, 刘琳琳¹, 郭保胜², 石山¹, 李佳锡^{1*}

(1. 沈阳化工大学材料科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110142; 2. 中科微分科技发展(北京)有限公司, 北京 101111)

摘要: 研究设计合成了含碲醚催化活性中心的N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)/甲基丙烯酸(MAA)共聚微凝胶(PNIPAM-MAA-Te), 利用微凝胶骨架的负温度刺激响应性构建出温敏性智能人工碲酶。PNIPAM-MAA-Te在3-羧基-4-硝基苯硫酚(TNB)/过氧化氢(H₂O₂)亲水体系与对硝基苯硫酚(NBT)/枯基过氧化氢(CUOOH)疏水体系中表现出了智能催化活性。催化活性测定表明:PNIPAM-MAA-Te在亲水体系中pH值为6、温度为25℃条件下表现出最高比活力(0.046±0.040) μmol/(min·μmol);在疏水体系中pH值为6、温度为65℃条件下表现出最高比活力(0.45±0.01) μmol/(min·μmol);在疏水体系中其催化活性更高,酶促反应动力学曲线表明其催化方式为乒乓机制,二级反应速率常数可达到10⁰ L/(mol·min)数量级。研究结果拓展了智能微凝胶在生命体内外的潜在应用。

关键词: 聚N-异丙基丙烯酰胺;人工碲酶;温度敏感性;催化

中图分类号: TQ311

文献标志码: A

文章编号: 1005-3360(2026)01-0013-07

DOI: 10.15925/j.cnki.issn1005-3360.2026.01.003

Construction of Temperature-sensitive Intelligent Artificial Tellurium Enzyme Based on Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel

LU Junqiao¹, HANG Xun¹, LIU Linlin¹, GUO Baosheng², SHI Shan¹, LI Jiaxi^{1*}

(1. School of Materials Science and Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;

2. SinoMicroScience and Technology Development (Beijing) Company Limited, Beijing 101111, China)

Abstract: The study was designed to synthesize a N-isopropylacrylamide (NIPAM)/methacrylic acid (MAA) copolymer microgel (PNIPAM-MAA-Te) containing a tellurium ether catalytic active center. Utilizing the negative temperature-responsive nature of the microgel framework, a temperature-sensitive smart artificial tellurium enzyme was constructed. PNIPAM-MAA-Te exhibited intelligent catalytic activity in both the hydrophilic system of 3-carboxy-4-nitrophenyl thiol (TNB)/hydrogen peroxide (H₂O₂) and the hydrophobic system of 4-nitrophenyl thiol (NBT)/cumyl peroxide (CUOOH). The catalytic activity measurements indicated that PNIPAM-MAA-Te achieved its highest specific activity of (0.046±0.040) μmol/(min·μmol) under the conditions of pH 6 and 25 °C in the hydrophilic system, and (0.45±0.01) μmol/(min·μmol) under the conditions of pH 6 and 65 °C in the hydrophobic system. Its catalytic activity was higher in the hydrophobic system. The enzyme kinetics curves revealed a ping-pong mechanism for catalysis, with a second-order reaction rate constant reaching the order of magnitude of 10⁰ L/(mol·min). The research findings expanded the potential applications of smart microgels both *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: PNIPAM; Artificial tellurium enzyme; Temperature sensitivity; Catalysis

近年来,智能微凝胶一直是智能聚合物材料的研究热点^[1-2]。对温度刺激发生响应的智能微凝胶(温敏性凝胶)

会在外界环境温度达到体积相转变温度(VPTT)时发生体相转变,这一特性使其作为药物载体在输送及可控释放

收稿日期 Submitted date 2025-02-16; 修回日期 Revised date 2025-03-15; 录用日期 Accepted date 2025-04-10

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究青年项目(LJKQ20222422)

*联系人, jiaxili@syuct.edu.cn

引用本文: 陆俊俏, 杭迅, 刘琳琳, 等. 基于聚N-异丙基丙烯酰胺微凝胶构建温敏性智能人工碲酶[J]. 塑料科技, 2026, 54(1): 13-19.

Citation: LU J Q, HANG X, LIU L L, et al. Construction of temperature-sensitive intelligent artificial tellurium enzyme based on poly(N-isopropylacrylamide) microgel[J]. Plastics Science and Technology, 2026, 54(1): 13-19.

领域有极好的研究前景^[3]。交联结构聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)的PNIPAM来形成的微凝胶也具有温度响应,是目前研究较多的温度刺激响应性微凝胶^[4-5]。SHI等^[6-7]将PNIPAM和不同单体共聚,从而赋予其更多性能。众多研究人员也合成了具有特殊功能的智能微凝胶^[8-15]。为了在医学检测试剂的载体中得到更好的应用,要提高温敏性凝胶的生物亲和性,降低单体合成对人体产生的致畸变和致癌可能性。如DOU等^[16]和HU等^[17]将CdTe量子点引入丙烯酸和耐高温的羟丙基纤维素为单体合成的温敏性微凝胶,调节聚乙二醇侧链长度,合成VPTT在人体生理温度范围的温敏性微凝胶。

VPTT在人体生理温度附近的温敏性微凝胶很适用于生命体^[18-22]。受此启发,期望将催化中心修饰于PNIPAM的骨架内,从而构建出温敏性可控智能人工催化体系,来模拟天然酶在生物体内的可控催化性能^[22-26]。本研究将具有抗氧化活性的有机碲化合物作为催化中心并修饰于N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)/甲基丙烯酸(MAA)共聚微凝胶的骨架,期望构建出温敏性智能人工碲酶微凝胶,进而拓展智能微凝胶在生命体内外的潜在应用。

1 实验部分

1.1 主要原料

三乙胺、过硫酸钾(KPS)、2-溴乙胺氢溴酸盐、MAA、碲粉、硼氢化钠、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC),分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS),分析纯,天津阿法埃莎化学有限公司;枯基过氧化氢(CUOOH),质量分数80%,北京百灵威科技有限公司;对硝基苯磺酚(NBT),质量分数99%,北京百灵威科技有限公司;碳酸钠、无水硫酸钠,二氯甲烷,分析纯,天津市大茂化学试剂厂;N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM),分析纯,东京化成工业株式会社;过氧化氢(H₂O₂),分析纯,安徽泽升科技有限公司。

1.2 仪器与设备

数显型磁力搅拌器,C-MAGHS7digital,广州仪科实验技术有限公司;旋转蒸发仪,N-1300,上海爱朗仪器有限公司;傅里叶变换红外光谱仪(FIIR),NEXUS470,美国热电尼高力公司;紫外可见分光光度计,SHIMADZU2450,日本岛津公司;扫描电子显微镜(SEM),JXA-840,日本电子株式会社;核磁共振仪,BRUKERAM-500,德国Bruker公司;冷冻干燥机,HC-3018R,安徽中科中佳仪器有限公司;动态光散射(DLS),NanolinkSZ901,珠海真理光学仪器有限公司。

1.3 样品制备

1.3.1 乙胺双碲醚(化合物I)的合成及表征

将碲粉(4.210 g, 33 mmol)和硼氢化钠(1.135 g, 30 mmol)置于圆底烧瓶1中,用N₂脱氧15 min,再加入脱氧水40 mL,加热至75 °C,混合液体开始冒泡后停止加热;30 min后,碲完全反应生成Na₂Te₂。与此同时,于圆底烧瓶2中将2-溴乙胺氢溴酸盐(6.15 g, 30 mmol)和30 mL 碳

酸钠(6.36 g, 60 mmol)用去离子水溶解,N₂脱氧15 min后全部注入圆底烧瓶1中,室温搅拌12 h。减压抽滤并除去残渣,用50 mL蒸馏水将液体转移至分液漏斗中,用二氯甲烷(9×500 mL)萃取,并用无水硫酸钠干燥。最后,通过蒸发除去溶剂,得到1.5 g黄色粉状固体I,产率为15%。其核磁共振氢谱(¹H NMR, 500 MHz, CDCl₃)显示化学位移为4.44(t, 4H)和3.63(t, 4H)。核磁共振碳谱(¹³C NMR, 125 MHz, CDCl₃)显示化学位移为65.10和40.75。电喷雾质谱(ESI-MS)显示分子离子峰质荷比为344.9[M+H]⁺。图1为化合物I的合成路线。

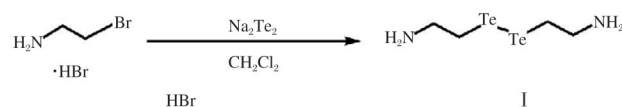


图1 化合物I的合成路线

Fig.1 Synthesis route for compound I

1.3.2 PNIPAM-MAA-Te微凝胶的制备

PNIPAM-MAA-Te微凝胶是通过无皂乳液聚合法将PNIPAM和MAA单体共聚而成。利用EDC活化PNIPAM-MAA微凝胶,并将双碲催化中心引入其骨架中,从而构建出含有碲元素的PNIPAM微凝胶,即PNIPAM-MAA-Te微凝胶。图2为PNIPAM-MAA-Te微凝胶的合成路线。

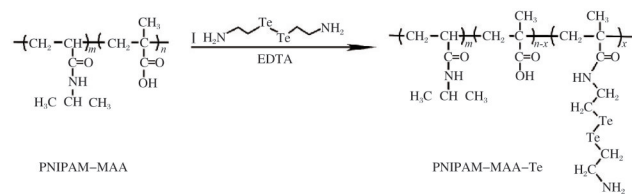


图2 PNIPAM-MAA-Te微凝胶的合成路线

Fig.2 Schematic route of PNIPAM-MAA-Te microgels

PNIPAM-MAA的制备:将2.0 g NIPAM、0.2 g BIS和0.1 g KPS完全溶解于蒸馏水中后,置于500 mL三口烧瓶中。随后,加入稀释于蒸馏水中的0.4 g MAA(共用水300 mL),开始反应。通入N₂脱氧30 min后,密封瓶口,在70 °C下反应10 h。反应结束后,通过透析纯化,保存产物待用。

PNIPAM-MAA-Te的制备:称0.687 g的化合物I(2 mmol)与0.38 g的EDC(2 mmol)于10 mL蒸馏水中充分溶解,将溶解完的化合物I水溶液与10 mL固含量为1.1%的PNIPAM-MAA微凝胶乳液(0.2 mmol)在100 mL烧瓶中反应,开启搅拌(速度约250 r/min),加入EDC水溶液,将体系调pH值为6左右,室温中反应4 h。

1.4 性能测试与表征

催化性质测试:本文采用直接测定法测定反应体系底物的消耗来测定PNIPAM-MAA-Te微凝胶的所有催化活性。将测试方法中天然催化底物替换成反应底物TNB和NBT,分别选用了TNB/H₂O₂亲水体系和NBT/CUOOH疏

水体系,对其进行催化活性的测试。

使用1 cm宽度的比色皿进行测定,活性测定总体积500 μL ,依次加入50 μL 浓度为1.0 mmol/L的TNB/NBT溶液,350 μL pH值为6~8、浓度为200.0 mmol/L的PBS缓冲液,50 μL 浓度为40 $\mu\text{mol/L}$ 的PNIPAM-MAA-Te乳液,在25、37、50、65 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下保温1 min后,加入50 μL 浓度为2.5 mmol/L的 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CuOOH}$ 溶液(溶于1.0 mmol/L的KCl去离子水中,难溶底物用10%体积比的甲醇助溶),启动反应。通过监测TNB/NBT底物在410 nm处紫外-可见光谱中吸光度的降低值,计算体系中TNB被 H_2O_2 氧化以及NBT被CuOOH氧化的反应速率。以缓冲液代替PNIPAM-MAA-Te微凝胶作为对照组。比活力的定义为:每分钟氧化1 μmol 反应底物TNB/NBT所需的PNIPAM-MAA-Te微凝胶的量[$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\mu\text{mol})$]。

FTIR测试:波数范围500~4 000 cm^{-1} 。

SEM测试:将PNIPAM-MAA-Te微凝胶通过离心洗涤成中性,冷冻干燥为固体粉末,迅速真空喷金处理,在10 kV加速电压下观察SEM的微观形貌。

EDS测试:采集时间为300 s。

2 结果与讨论

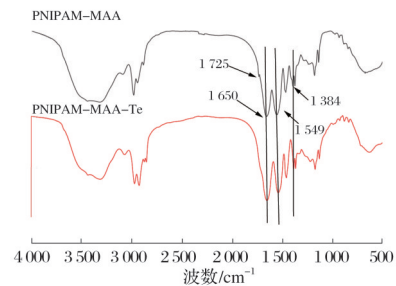
2.1 PNIPAM-MAA-Te微凝胶的表征

图3为微凝胶的表征及其温度敏感性。从图3a可以看出,FTIR图谱中两者均出现1 384、1 549、1 650 cm^{-1} 处的吸收峰,分别对应 $-\text{CH}_3$ 弯曲振动、酰胺II带(N—H弯曲和C—N伸缩振动)、酰胺I带(C=O伸缩振动)。在PNIPAM-MAA微凝胶的FTIR谱图中有1 725 cm^{-1} 处的肩峰,对应的是MAA单元中的C=O伸缩振动,而在PNIPAM-MAA-Te微凝胶的FTIR谱图中1 725 cm^{-1} 处的肩峰消失。这说明含羧基的PNIPAM的微凝胶,即PNIPAM-MAA微凝胶制备成功。

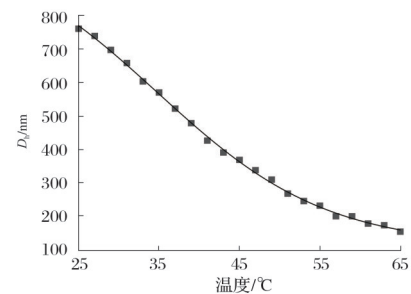
为了进一步探索粒径大小及其热响应性能,将这两种微凝胶离心并分散到pH值为7的缓冲溶液中,用DLS测量25~65 $^{\circ}\text{C}$ 升降温过程的微凝胶尺寸,并做出 Boltzmann 拟合曲线。从图3b和3c可以看出,PNIPAM-MAA和PNIPAM-MAA-Te微凝胶在25、65 $^{\circ}\text{C}$ 时的流体力学直径(D_h)分别为761.5、155.1 nm和739.8、146.4 nm;VPTT分别为35 $^{\circ}\text{C}$ 和34.1 $^{\circ}\text{C}$;两者的粒径差不多大,且随着温度的升高, D_h 均有一个显著的减小的趋势,证明了两种微凝胶都有温度敏感性。测试PNIPAM-MAA-Te微凝胶的稳定性,在25~65 $^{\circ}\text{C}$ 的3个循环升降温过程中,用DLS测量微凝胶的粒径及粒径分布。从图3d可以看出,反复升降温过程中粒径和粒径分布基本不变,证明这是个反复可逆的过程,说明PNIPAM-MAA-Te微凝胶具有一定的稳定性。

为了证明双碲催化中心成功引入聚合成的PNIPAM微凝胶的骨架中,成功合成了PNIPAM-MAA-Te微凝胶,对PNIPAM-MAA-Te进行了外观、SEM、EDS测试。图4为微凝胶形貌、SEM和EDS照片。从图4a可以看出,左边的

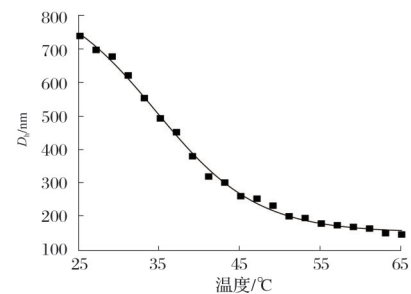
黄色乳液是PNIPAM-MAA-Te微凝胶,右边的白色乳液是PNIPAM-MAA微凝胶。将PNIPAM-MAA-Te冷冻干燥之后进行扫描电镜和能谱测试。从图4c可以看出,PNIPAM-MAA-Te微凝胶紧密分布其中,由于冻干过程材料表面低温形成冰晶将微凝胶聚集,形成了直径大约为300 nm的微凝胶聚集体。从图4b和图4d可以看出,在微凝胶之中,检测到了碲元素的信号。



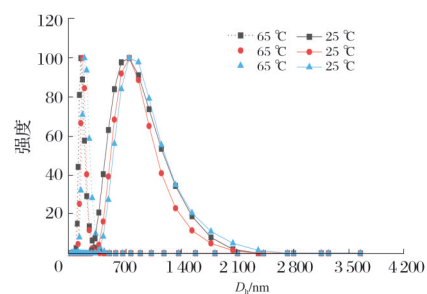
(a) PNIPAM-MAA和PNIPAM-MAA-Te微凝胶FTIR谱图



(b) PNIPAM-MAA粒径与温度的关系曲线



(c) PNIPAM-MAA-Te粒径与温度的关系曲线



(d) PNIPAM-MAA-Te在25~65 $^{\circ}\text{C}$ 3个循环升降温过程中的粒径分布

图3 微凝胶的表征及其温度敏感性

Fig.3 Characterization of microgels and their temperature sensitivity

综上所述,双碲催化中心成功引入聚合成的PNIPAM微凝胶的骨架中,成功合成了具有温敏性的PNIPAM-MAA-Te微凝胶。

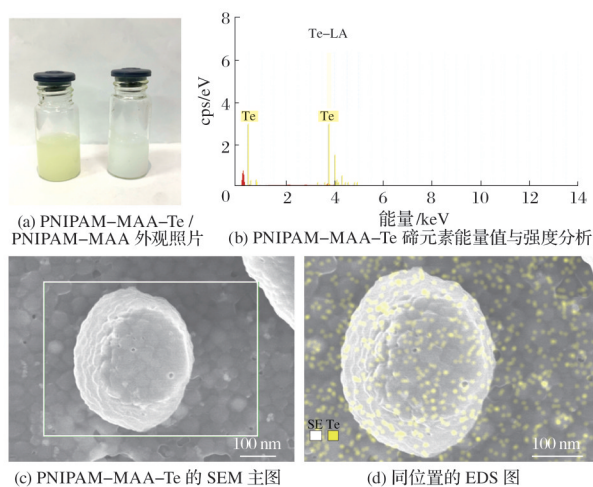


图4 微凝胶形貌、SEM和EDS照片

Fig.4 Morphology, SEM and EDS images of micro gel

2.2 PNIPAM-MAA-Te催化性质的研究

2.2.1 PNIPAM-MAA-Te比活性的测定

图5为不同体系中PNIPAM-MAA-Te浓度对催化曲线的影响。在25℃温度下,控制体系pH值为6时,固定反应中底物TNB浓度和氢过氧化物 H_2O_2 浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$ 和250 $\mu\text{mol/L}$,加入浓度分别为 $a=0$ $\mu\text{mol/L}$ 、 $b=40$ $\mu\text{mol/L}$ 、 $c=80$ $\mu\text{mol/L}$ 、 $d=120$ $\mu\text{mol/L}$ 的PNIPAM-MAA-Te微凝胶,测算比活力。在TNB/ H_2O_2 的亲水体系中微凝胶在温度为25℃、pH值为6条件下比活力为 $(4.58 \times 10^{-2} \pm 0.04)$ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ 。从图5a可以看出,浓度为40、80、120 $\mu\text{mol/L}$ 的微凝胶的3条比活力曲线的斜率与未加微凝胶的曲线a斜率的差值呈线性增大,这表明pH值为6时在此底物浓度范围内随着微凝胶的浓度的增加其酶催化曲线的斜率也随之变大,符合经典酶促反应规律。

为了进一步表征PNIPAM-MAA-Te微凝胶的比活力,将亲水底物TNB换成疏水底物NBT,亲水过氧化物 H_2O_2 换成疏水过氧化物 $CUOOH$,然后进行测试。在25℃时,控制体系的pH值为6,在体系固定反应中的底物NBT和氢过氧化物 $CUOOH$ 的浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$,加入浓度分别为 $a=0$ $\mu\text{mol/L}$ 、 $b=10$ $\mu\text{mol/L}$ 、 $c=20$ $\mu\text{mol/L}$ 、 $d=40$ $\mu\text{mol/L}$ 的PNIPAM-MAA-Te微凝胶,测算其比活力。通过计算,在NBT和 $CUOOH$ 疏水体系中PNIPAM-MAA-Te比活力为 $(1.30 \times 10^{-1} \pm 0.01)$ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ 。从图5b可以看出,同TNB/ H_2O_2 亲水体系一样,pH值为6时,在此底物浓度范围内,酶催化曲线的斜率随着PNIPAM-MAA-Te微凝胶的浓度的增加而变大,这也符合经典酶促反应规律。在温度为25℃、pH值为6条件下,NBT/ $CUOOH$ 疏水体系的比活力大于TNB/ H_2O_2 亲水体系比活力值,差一个数量级。推测是因为PNIPAM-MAA-Te微凝胶的PNIPAM微凝胶骨架内部含有一定量的疏水结构,与底物之间有疏水相互作用,在NBT/ $CUOOH$ 疏水体系中疏水相互作用更强,故PNIPAM-MAA-Te微凝胶的催化中心活性更高。

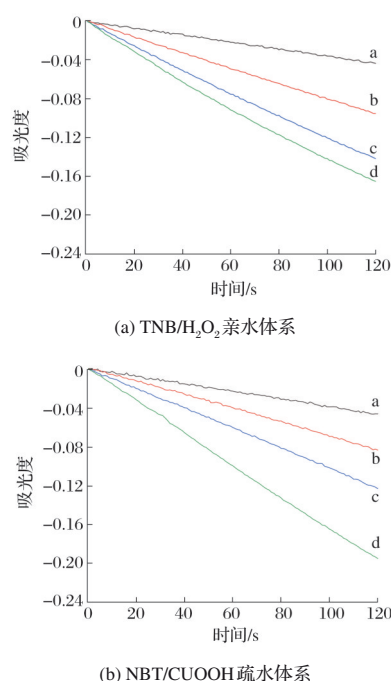


图5 不同体系中PNIPAM-MAA-Te浓度对催化曲线的影响

Fig.5 Effect of PNIPAM-MAA-Te concentration on catalytic curves in different systems

2.2.2 PNIPAM-MAA-Te的最适温度和pH值

图6为25℃时PNIPAM-MAA-Te在不同体系中的催化活性。从图6a可以看出,TNB/ H_2O_2 亲水体系PNIPAM-MAA-Te在pH值为6、7、8时的比活力分别为 (0.046 ± 0.040) 、 (0.019 ± 0.030) 、 (0.013 ± 0.020) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ 。从图6b可以看出,NBT/ $CUOOH$ 疏水体系PNIPAM-MAA-Te在pH值为6、7、8时的比活力分别为 (0.13 ± 0.01) 、 (0.10 ± 0.02) 、 (0.048 ± 0.010) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ 。发现NBT/ $CUOOH$ 疏水体系与TNB/ H_2O_2 亲水体系比活力相差一个数量级,两个体系都展现出最大的活性,最适pH值为6。这是因为当pH值为6时,体系为弱酸性,底物TNB和NBT的羧基带负电荷,而PNIPAM-MAA-Te的胺基所带正电荷,这两者存在静电相互作用,电荷间的引力增强了酶与底物的结合能力,故在pH值为6时其活性最高,而随着pH值的增大,PNIPAM-MAA-Te的胺基逐渐去质子化,底物与其之间的静电相互作用变弱,故随着pH值的增大,催化活性反而降低。

图7为pH值为6时PNIPAM-MAA-Te在不同体系中和不同温度下的催化活性。从图7a可以看出,在TNB/ H_2O_2 亲水体系中,温度分别为25、37、50、65℃时PNIPAM-MAA-Te的比活力分别为 (0.046 ± 0.040) 、 (0.037 ± 0.040) 、 (0.032 ± 0.020) 、 (0.022 ± 0.020) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ 。从图7b可以看出,在NBT/ $CUOOH$ 疏水体系中,温度分别为25、37、50、65℃时PNIPAM-MAA-Te的比活力分别为 (0.13 ± 0.01) 、 (0.14 ± 0.02) 、 (0.22 ± 0.02) 、 (0.45 ± 0.01) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ 。在亲水体系中,PNIPAM-MAA-Te在25℃时活性最高,为最适温度环境;在疏水体系中,PNIPAM-MAA-Te在65℃时

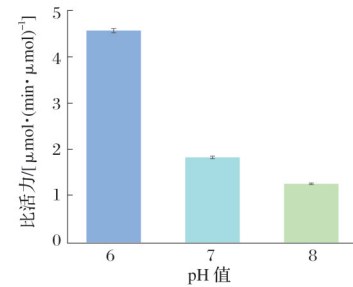
活性最高,为最适温度环境。原因可能是PNIPAM-MAA-Te微凝胶的PNIPAM微凝胶骨架本身的温度负响应。温度升高导致PNIPAM-MAA-Te微凝胶收缩,内部环境变成疏水状态,在亲水环境中限制了底物TNB与碲催化中心之间的接触,特别是更加靠近微凝胶中心的地方,以至于温度升高反而导致反应速率的降低。而疏水环境中,疏水底物NBT则不受此影响,即温度越高反应速率升高。从图7c可以看出,其比活力分别为 (0.45 ± 0.01) 、 (0.37 ± 0.02) 、 (0.33 ± 0.02) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\mu\text{mol})$, 65 °C时PNIPAM-MAA-Te的最佳pH值还是6。综上所述,TNB/ H_2O_2 亲水体系中pH值为6且温度为25 °C为最适环境,NBT/ CUOOH 疏水体系中pH值为6且温度为65 °C为最适环境。

2.3 PNIPAM-MAA-Te催化机理与动力学研究

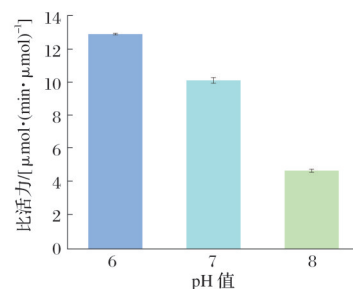
2.3.1 亲水体系的催化双倒数曲线测定

为了研究PNIPAM-MAA-Te的催化机理,对酶促反应动力学进行详细测定。固定酶浓度始终为 $40\mu\text{mol/L}$,在25 °C和65 °C时分别将亲水过氧化物底物 H_2O_2 的浓度控制为125、250、500 $\mu\text{mol/L}$,测定亲水还原性底物TNB的浓度分别为100、67、50、40 $\mu\text{mol/L}$ 时PNIPAM-MAA-Te的活性,以催化速率的倒数 (E_0/V_0) 对 $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 和 $[\text{TNB}]$ 的倒数 $(1/[\text{H}_2\text{O}_2])$ 和 $(1/[\text{TNB}])$ 作图。图8为pH值为6时不同温度下PNIPAM-MAA-Te催化TNB还原 H_2O_2 双倒数曲线。从

图8可以看出,在pH值为6、温度为25 °C和65 °C时,均得到相互平行的直线。这种线性关系证实了PNIPAM-MAA-Te在不同温度下的催化特性。



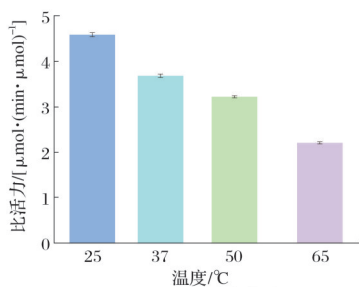
(a) TNB/ H_2O_2 亲水体系



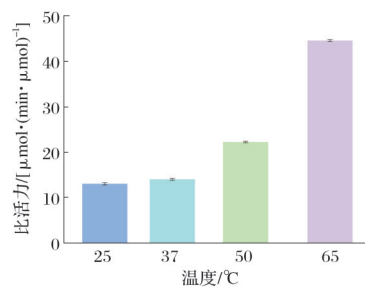
(b) NBT/ CUOOH 疏水体系

图6 25 °C时PNIPAM-MAA-Te在不同体系中的催化活性

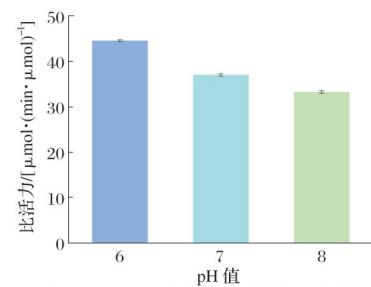
Fig.6 Catalytic activity of PNIPAM-MAA-Te in different systems at 25 °C



(a) TNB/ H_2O_2 亲水体系



(b) NBT/ CUOOH 疏水体系



(c) 65 °C时NBT/ CUOOH 疏水体系在不同pH值下的催化活性

图7 pH值为6时PNIPAM-MAA-Te在不同体系中和不同温度下的催化活性

Fig.7 Catalytic activity of PNIPAM-MAA-Te in different systems and at different temperatures when the pH value was 6

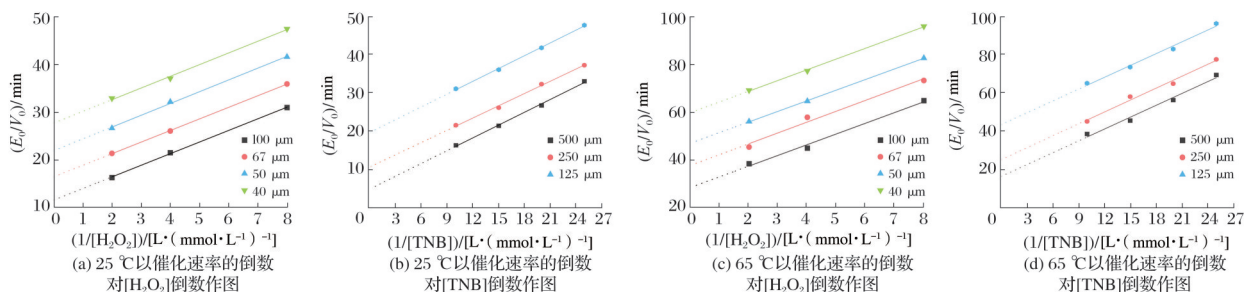


图8 pH值为6时不同温度下PNIPAM-MAA-Te催化TNB还原 H_2O_2 双倒数曲线

Fig.8 Double inverse curves of H_2O_2 reduced by TNB catalyzed by PNIPAM MAA-Te at different temperatures when the pH value was 6

2.3.2 疏水体系催化双倒数曲线测定

25 °C时固定酶浓度始终为 $20\mu\text{mol/L}$,在65 °C时固定同样的酶浓度始终为 $10\mu\text{mol/L}$,方法与亲水体系一致,将体系中亲水过氧化物 H_2O_2 替换成疏水过氧化物 CUOOH ,亲

水还原性底物TNB替换成疏水还原性底物NBT,测试浓度一致,以催化速率的倒数对 $[\text{CUOOH}]$ 和 $[\text{NBT}]$ 的倒数作图。图9为pH值为6时不同温度下PNIPAM-MAA-Te催化NBT还原 CUOOH 双倒数曲线。从图9可以看出,在

pH 值为 6 且温度分别为 25 °C 和 65 °C 时, 所得曲线均为相

互平行的直线。

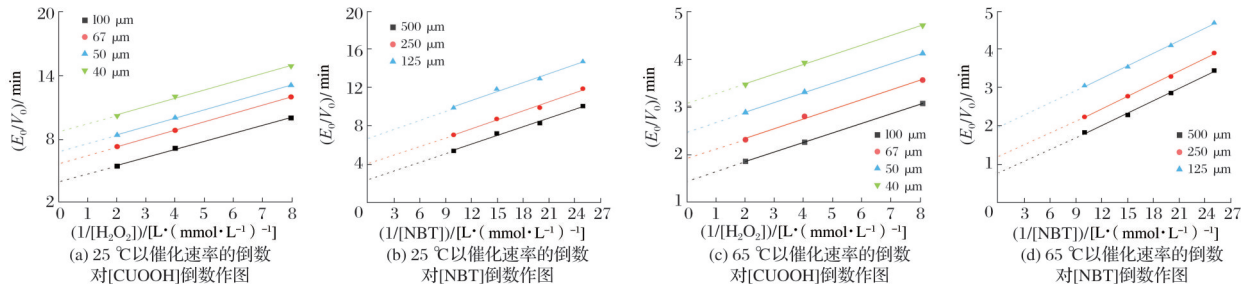


图9 pH 值为 6 时不同温度下 PNIPAM-MAA-Te 催化 NBT 还原 CUOOH 双倒数曲线

Fig.9 Double inverse curves of CUOOH reduced by NBT catalyzed by PNIPAM-MAA Te at different temperatures when the pH value was 6

2.3.3 PNIPAM-MAA-Te 催化机制的分析

当 pH 值为 6 时, PNIPAM-MAA-Te 催化 TNB 还原 H₂O₂ 以及催化 NBT 还原 CUOOH 的双倒数曲线均为互相平行的直线, 从而推测其催化机制是采取乒乓机制^[23]。ENGMAN 等^[24]通过对大量碲化合物的催化过程分析, 推测碲元素是以氧化态(RTeOH)形式进入催化循环的。图 10 为 PNIPAM-MAA-Te 的催化机制。

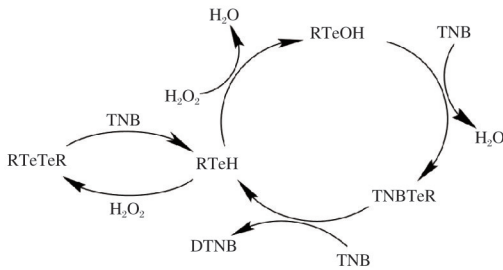


图 10 PNIPAM-MAA-Te 的催化机制

Fig.10 Catalytic mechanism of PNIPAM-MAA-Te

2.3.4 PNIPAM-MAA-Te 促反应动力学参数分析

催化 TNB 与 H₂O₂ 的相关稳态动力学方程为:

$$\frac{v_0}{[E_0]} = \frac{K_{cat} [TNB] [H_2O_2]}{K_{mTNB} [H_2O_2] + K_{mH_2O_2} [TNB] + [TNB] [H_2O_2]} \quad (1)$$

式(1)中: v_0 为反应初始速率, mol/(L·s); $[E_0]$ 为模拟酶初始浓度, mol/L; K_{cat} 为催化常数, 反映中间复合物(ES)解离为游离酶与产物的速率, s⁻¹; K_{mTNB} 和 $K_{mH_2O_2}$ 分别为亲水还原性底物 TNB 与亲水过氧化物 H₂O₂ 的米氏平衡常数。

米氏常数的物理意义可理解为酶促反应速率达到最大值 50% 时对应的底物浓度阈值, 通常能表现出酶与底物

$$\frac{v_0}{[E_0]} = \frac{K_{cat} [NBT] [CUOOH]}{K_{mNBT} [CUOOH] + K_{mCUOOH} [NBT] + [NBT] [CUOOH]} \quad (2)$$

表 2 为疏水体系中 PNIPAM-MAA-Te 的表现动力学参数。从表 2 可以看出, NBT/CUOOH 疏水体系中, 其二级反应速率常数(K_{cat}/K_m)在 10⁰ L/(mol·min) 数量级; NBT 浓度不同时, pH 值为 6 的 PNIPAM-MAA-Te 在 65 °C 时的 K_{cat} 基本大于 25 °C 时的 K_{cat} ; 65 °C 时的 K_m 小于 25 °C 时的 K_m ; 65 °C 的 K_{cat}/K_m 大于 25 °C。以上结果表明, NBT/CUOOH 疏水体系中当 pH 值为 6、温度为 65 °C 时, PNIPAM-MAA-Te 具有更高的催化效率及更强的底物结合能力, 与 2.2.2

之间的亲和力。二级反应速率常数(K_{cat}/K_m)又称酶底物亲和力和常数, 反映酶与底物结合的是否紧密, 也说明反应的催化效率快慢。表 1 为亲水体系中 PNIPAM-MAA-Te 的表现动力学参数。从表 1 可以看出, 催化效能指标 K_{cat}/K_m 分布于 10⁻¹~10⁰ L/(mol·min) 区间, 其量级验证了体系的催化活性特征。TNB 浓度不同时, PNIPAM-MAA-Te 25 °C 的 K_{cat} 大于 65 °C; 25 °C 时的 K_{cat}/K_m 大于 65 °C。以上结果表明, TNB/H₂O₂ 亲水体系中, pH 值为 6、温度为 25 °C 时, PNIPAM-MAA-Te 具有更高的催化效率及更强的底物结合能力, 与 2.2.2 的结论一致, 即亲水体系的最适温度为 25 °C, 最佳 pH 值为 6。

表 1 亲水体系中 PNIPAM-MAA-Te 的表现动力学参数

Tab.1 Apparent kinetic parameters of PNIPAM-MAA-Te in hydrophilic system

条件	[TNB]/(mmol·L ⁻¹)	K_{cat}/min^{-1}	$K_{mH_2O_2}/(10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$(K_{cat}/K_{mH_2O_2})/[L \cdot (\text{mol} \cdot \text{min})^{-1}]$
pH 值=6, t=25 °C	0.100	0.086 2	2.101	0.410 5
	0.067	0.060 7	1.476	0.411 4
	0.050	0.036 0	1.125	0.404 7
	0.040	0.036 0	0.884	0.408 0
pH 值=6, t=65 °C	0.100	0.034 8	1.559	0.223 4
	0.067	0.026 3	1.192	0.221 0
	0.050	0.021 2	0.938	0.225 5
	0.040	0.016 7	0.747	0.223 1

催化 NBT 与 CUOOH 的相关稳态动力学方程为:

结论一致, 疏水体系的最适温度为 65 °C, 最佳 pH 值为 6。

本研究在不同温度条件下对 PNIPAM-MAA-Te 微凝胶的催化性能进行深入分析。在低温 25 °C 时, 微球膨胀, 更亲水, 利于底物与活性中心 Te 结合, TNB/H₂O₂ 亲水体系的催化效率最高; 而高温 65 °C 时, 微球收缩, 球内状态变成疏水后, NBT/CUOOH 疏水体系的催化效率最高。整体的二级反应速率常数是疏水体系大于亲水体系, 推测是因为 TNB 只是相比 NBT 更亲水, 结构中还是有刚性基团

苯环存在,故疏水体系的催化效率也高。

表2 疏水体系中PNIPAM-MAA-Te的表现动力学参数

Tab.2 Apparent kinetic parameters of PNIPAM-MAA-Te in hydrophobic system

条件	[TNB]/ (mmol·L ⁻¹)	K_{cat} / min ⁻¹	K_{mCuOOH} / (10 ⁻¹ mol·L ⁻¹)	$(K_{cat}/K_{mCuOOH})/$ [L·(mol·min) ⁻¹]
pH值=6, $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$	0.100	0.224 6	1.840	1.340 4
	0.067	0.174 2	1.349	1.290 7
	0.050	0.145 7	1.127	1.292 5
pH值=6, $t=65\text{ }^{\circ}\text{C}$	0.040	0.114 3	0.876	1.303 7
	0.100	0.697 1	1.412	4.937 3
	0.067	0.522 9	1.077	4.853 0
	0.050	0.406 2	0.835	4.862 6
	0.040	0.326 8	0.670	4.878 5

3 结论

以NIPAM和MAA为单体制备PNIPAM-MAA微凝胶,利用EDC将PNIPAM-MAA中的羧基活化并与含有两个氨基的有机碲化合物反应,构建PNIPAM-MAA-Te微凝胶,其在25 °C和65 °C时的 D_h 分别为739.8 nm和146.4 nm,随着温度的升高而不断收缩,表现出典型的温度负响应,VPTT为34.1 °C。

亲水性酶学性质测试体系中,以TNB和H₂O₂为酶促反应底物。随着温度的升高,PNIPAM-MAA-Te的内部环境逐渐变成疏水状态,与亲水性底物的结合能力逐渐减弱,比活力也不断减低,因而在温度为25 °C时表现出最高比活力(0.046±0.04) μmol/(min·μmol);催化双倒数曲线均为互相平行的直线,从而推测其催化机制为乒乓机制,二级反应速率常数在10⁻¹ L/(mol·min)数量级。

在疏水性酶学性质测试体系中,以NBT和CuOOH为酶促反应底物,随着温度的升高PNIPAM-MAA-Te与疏水性底物的结合能力增强,比活力也不断升高。在65 °C时表现出最高比活力(0.45±0.01) μmol/(min·μmol),酶促反应动力学曲线表明其催化方式为乒乓机制,二级反应速率常数在10⁰ L/(mol·min)数量级。

本文利用无皂乳液聚合法合成了具有温度响应的且有催化性能的人工碲酶微凝胶,可在生命体pH值范围内实现催化活性,拓展智能微凝胶在生命体内外的潜在应用。

参考文献

[1] 陆晨, 查刘生. 智能纳米水凝胶的刺激响应性研究进展[J]. 功能高分子学报, 2012, 25(2): 211-220.

[2] THOME J B, VINE G J, SNOWDEN M J, et al. Microgel applications and commercial considerations[J]. Colloid Polymer Science, 2011, 289(5/6): 625-646.

[3] 潘春跃, 于典, 隆清德, 等. NIPAAm系共聚温敏凝胶的溶胀与释药性能[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2007(5): 906-911.

[4] 顾婷, 刘晓云, 赵辉鹏, 等. 自交联法合成相转变温度范围窄的聚(N-异丙基丙烯酰胺)水凝胶微球[J]. 合成技术及应用, 2007(1): 4-8.

[5] 顾婷, 查刘生. 相转变温度范围窄的聚(N-异丙基丙烯酰胺)温敏性微凝胶[J]. 功能高分子学报, 2007(3): 286-291.

[6] SHI S, ZHANG L, WANG T, et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-Au hybrid microgels[J]. Soft Matter, 2013, 9: 10966.

[7] SHI S, WANG Q M, WANG T, et al. Thermo-, pH-, and light-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)-Au hybrid microgels prepared by the *in situ* reduction method based on Au-thiol chemistry[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(25): 7177-7186.

[8] 刘阳, 尹玉利, 贺艳. 聚N-异丙基丙烯酰胺温敏水凝胶的研究与应用进展[J]. 高分子通报, 2019(7): 13-19.

[9] 张传梅, 付建伟, 庄银凤, 等. 温敏性水凝胶作为固定化酶载体的研究[J]. 河南科学, 2006(5): 683-686.

[10] 徐彦芹, 刘敏, 吴芳, 等. 综合化学实验-温度/pH响应凝胶PNIPAM/CMCS的制备及性能分析[J]. 科学技术创新, 2022(29): 1-4.

[11] 尼萌. 丙烯酸/丙烯酰胺共聚成聚丙烯酰胺的研究[J]. 炼油与化工, 2022, 33(3): 26-29.

[12] 项佳音, 杨洪军, 熊欣, 等. 常见温度敏感型原位凝胶载体的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(2): 252-257.

[13] 吕青芸, 沈勇, 王黎明, 等. 温敏型聚合物PNIPAM的改性及应用研究进展[J]. 合成化学, 2019(5): 400-405.

[14] 翟子卓, 杨秘涵, 张普敦. 交联剂和温度对聚(N-异丙基丙烯酰胺)水凝胶热致行为的影响[J]. 当代化工, 2023(10): 2334-2340.

[15] 吴英, 王书芳, 李雨露, 等. 聚N-异丙基丙烯酰胺/聚丙烯酸水凝胶的制备及性能研究[J]. 山东化工, 2024, 53(1): 38-41.

[16] DOU H J, YANG W H, TAO K, et al. Thermal sensitive microgels with stable and reversible photoluminescence based on covalently bonded quantum dots[J]. Langmuir, 2010, 26(7): 5022-5027.

[17] HU Z B, CAI T, CHI C L. Thermoresponsive oligo(ethylene glycol)-methacrylate- based polymers and microgels[J]. Soft Matter, 2010, 6(10): 2115-2123.

[18] PAN T Z, LIU Y, SUN H C, et al. Reversible switch of a selenium-containing antioxidant system regulated by protein assembly[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(17): 9735-9740.

[19] WANG L W, QU X N, XIE Y, et al. Study of 8 types of glutathione peroxidase mimics based on β-cyclodextrin[J]. Catalysts, 2017, 7(10): 289.

[20] ANGELI A, CARTA F, DONNINI S, et al. Selenolesterase enzyme activity of carbonic anhydrases[J]. Chemical Communications, 2020, 56(32): 4444-4447.

[21] 安绍杰, 许洪峰, 李思, 等. 利用分子机器的组装与分解构建pH敏感性谷胱甘肽过氧化物人工酶[J]. 化学学报, 2022, 73(8): 3669-3678.

[22] LI J X, WANG Z R, ZHOU J, et al. Construction of self-assembled vesicle nanoenzyme using cucurbit [8] uril-based supra-amphiphiles[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018, 558: 95-102.

[23] LI J X, SI C Y, SUN H C, et al. Reversible pH-controlled switching of an artificial antioxidant selenoenzyme based on pseudorotaxane formation and dissociation[J]. Chemical Communications, 2015, 51(49): 9987-9990.

[24] ENGMAN L, STERN D, COTGREAVE I A, et al. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a proton NMR method [J]. Journal of the American Chemical Society, 1992, 114(25): 9737-9743.

[25] 李明昊, 王玲, 许远航, 等. PNIPAM和PNIPAM-PEI微凝胶的合成、表征及作为皮克林乳液乳化剂的研究[J]. 塑料科技, 2025, 53(1): 103-108.

[26] 许远航, 莫婷, 李明昊, 等. N,N'-双(丙烯酰胺)脒交联聚(N-异丙基丙烯酰胺)的合成、表征及其降解性能研究[J]. 塑料科技, 2024, 52(12): 8-12.