基于金属有机骨架的固定化氯过氧化物酶的制备和性能评价

赵睿南^a 胡满成^{a,b} 李淑妮^{a,b} 翟全国^{a,b} 蒋育澄^{*,a,b}

(^a 陕西师范大学化学化工学院 西安 710119)

(^b 陕西师范大学大分子科学陕西省重点实验室 西安 710119)

摘要 30 °C 水相体系中“一锅法”快速制备固定化氯过氧化物酶(CPO@ZIF-8), 在构筑金属有机沸石咪唑骨架结构(ZIF-8)的同时将氯过氧化物酶(CPO)固定在其三维纳米孔道中. 温和的条件为固定化酶制备过程中酶活性的保持提供了前提. 结构和性能表征说明酶分子的引入并不改变 ZIF-8 材料的孔道结构, 同时酶分子在 CPO@ZIF-8 中呈现出在整体骨架材料中的嵌入式均匀分布. 与先构筑 ZIF-8 骨架材料, 然后通过表面吸附来固定酶分子的方法相比, 通过将酶分子引入整体骨架材料中不仅提高了酶的固载量, 更主要的是利用 ZIF-8 材料的高比表面积提高了固定化 CPO 的催化效率, 同时基于三维孔道提供的刚性屏蔽环境有效改善了 CPO 在极端反应条件下的热稳定性、酸碱稳定性和对有机溶剂的耐受性.

关键词 氯过氧化物酶; 金属有机框架; 固定化酶; 酶催化; 稳定性

Immobilization of Chloroperoxidase in Metal Organic Framework and Its Catalytic Performance

Zhao, Ruinan^a Hu, Mancheng^{a,b} Li, Shuni^{a,b} Zhai, Quanguo^{a,b} Jiang, Yucheng^{*,a,b}

(^a School of Chemistry & Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119)

(^b Key Laboratory of Macromolecular Science of Shaanxi Province, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119)

Abstract A rapid and efficient preparation of CPO@ZIF-8 by “one pot” method at 30 °C in aqueous solution is presented in this paper. The structure of zeolitic imidazolate frameworks (ZIF-8) was constructed while chloroperoxidase (CPO) was incorporated into the channel. Mild reaction conditions ensure maintaining the enzyme activity in the preparation of immobilized CPO. The synthesis of CPO@ZIF-8 was performed by mixing zinc nitrate solution and polyvinylpyrrolidone solution (PVP, M_w : 10000, 10 mg/mL, 400 μ L), chloroperoxidase (CPO) (0.214 mmol/L, 500 μ L) and 2-methylimidazole (1.25 mol/L, 25 mL) and stirring for 15 min at 30 °C, followed by washing and centrifuging for 3 cycles at 4 °C for 8 min. The structure of CPO@ZIF-8 was characterized by scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD), indicating that the incorporation of enzyme molecules did not affect the crystal structure of ZIF-8. To further confirm the incorporation of enzyme into ZIF-8, CPO was labeled by fluorescent probes fluorescein isothiocyanate (FITC) and subjected to the same procedure to synthesize the FITC-CPO@ZIF-8. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) proved that CPO was distributed evenly and embedded in the whole framework of CPO@ZIF-8. Compared with the method of preparing ZIF-8 firstly, and then immobilizing enzyme molecule by physical adsorption, the immobilization efficiency of enzyme was enhanced by introducing the enzyme into the whole framework, moreover, the catalytic efficiency of the immobilized CPO was increased due to high specific surface area of ZIF-8. The catalytic performance of the CPO@ZIF-8 was evaluated by the conversion rate of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS). The rigid shielding environment provided by the three-dimensional channel of ZIF-8 effectively improved the thermal stability, pH stability, and tolerance to organic solvents of the CPO@ZIF-8 under harsh reaction conditions compared with the free enzyme. When incubated at 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C and 90 °C for 1 h, 97.1%, 87.8%, 80.2%, 68.1% and 41.5% of the activity of CPO@ZIF-8 were reserved. When incubated at 50 °C, 60 °C, 70 °C and 80 °C for 3 h, there were still 91.4%, 77.8%, 64.7% and 50.3% of the activity remained. The tolerance of CPO@ZIF-8 to organic solvent DMF, methanol and methyl cyanide was enhanced to 30%~40%.

Keywords chloroperoxidase; metal-organic frameworks; immobilized enzyme; enzyme catalysis; stability

* E-mail: jyc@snnu.edu.cn

Received November 9, 2016; published February 5, 2017.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21176150).

项目受国家自然科学基金(No. 21176150)资助.

1 引言

酶是一种重要的生物催化剂, 酶催化反应条件温和(接近室温、大气压及生理 pH)、催化效率高, 专一选择性好. 尤其是与传统的有机合成相比, 酶促合成中通常无需官能团的保护/活化, 能够提供污染小、能耗低的绿色合成途径. 然而游离酶在高温高压、强酸强碱、有机溶剂体系中的稳定性低以及难以从反应体系中回收等缺点限制了它的工业化应用^[1]. 通过将酶固定在固相载体上制备固定化酶是提高其在极端反应条件下的操作稳定性及实现重复使用的有效途径^[2~4].

金属有机骨架材料(MOFs)作为一种无机-有机纳米晶体材料, 因其具有多孔骨架结构, 比表面积大, 化学稳定性好, 热稳定性好等优势, 近年来开始成为新型的固相载体材料用于酶的固定化而备受青睐, 这也为 MOFs 材料的应用开辟了新的领域^[5,6].

近年来文献报道的使用 MOFs 材料固定酶的方法主要是先合成 MOFs, 然后通过吸附、包埋、共价结合等手段将酶分子包覆在材料表面. 吸附法^[7,8]和包埋法^[9~11]要求 MOFs 材料的孔径和笼径比较大, 需要合成成长链配体才能形成孔径与酶分子尺寸大小相匹配的 MOFs 材料, 配体的设计与合成是这种方法的难点所在; 共价结合^[12~15]要求 MOFs 材料表面要有可以与酶形成共价键的基团, 基团活化步骤繁琐, 并且共价强相互作用可能导致酶分子表面构象发生改变而降低其活性, 同时该方法中关注点在于 MOFs 材料表面的酶固定化位点, 而没有考虑合理地利用 MOFs 材料内部的整体孔道结构.

近年来出现了通过“一锅法”在 MOFs 材料中包埋酶的新思路^[16~18]. 本文选用能够在常温下水相中快速合成的沸石咪唑骨架材料 ZIF-8 作为酶固定化的固相载体, 将酶与形成 ZIF-8 材料的原料液直接混合, 在晶胞骨架形成的同时将酶分子引入“孔道”中, 这样既因为狭小的“窗口孔径”保持酶分子不泄露, 又可因孔道骨架的屏蔽而提高其稳定性. 酶分子选用氯过氧化物酶(CPO), CPO 因同时具有过氧化物酶、过氧化氢酶和细胞色素 P-450 的活性中心结构特点而具有多种多样的催化活性, 包括小分子烯烃环氧化、饱和碳原子的氯化、磺化氧化、过氧化、羟基化等^[19], 目前被认为是过氧化物酶家族中催化活性最广泛的酶之一, 因此 CPO 的应用范围非常广, 尤其是在不对称有机合成^[20,21]以及环境污染降解^[22,23]等方面的应用引人注目.

将 2-甲基咪唑, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及氯过氧化物酶(CPO)溶液混合, 通过“一锅法”在 30 °C 条件下水相合成 CPO@ZIF-8, 将 CPO 固载到了自组装形成的 ZIF-8 材料中. 对 CPO@ZIF-8 的结构及 CPO 在 ZIF-8 中的分布方式进行了表征, 证实了 CPO 被引入了 ZIF-8 中. 以 CPO 催化 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)发生过氧化反应为模型反应, 讨论并对比了游离 CPO 和 CPO@ZIF-8 的热稳定

性、酸碱稳定性及对有机溶剂的耐受性.

2 结果与讨论

2.1 CPO@ZIF-8 的结构表征

2.1.1 扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)分析

图 1a, 图 1b 分别为 ZIF-8 材料和“一锅法”制备的 CPO@ZIF-8 的扫描电镜图; 图 1c 为 CPO@ZIF-8 的透射电镜图. 通过对比可以发现, ZIF-8 和 CPO@ZIF-8 均呈现直径约为 400 nm 的表面光滑、尺寸均一的微球, 与文献报道的 ZIF-8 材料的形貌基本相同^[24], 表明氯过氧化物酶的引入没有改变 ZIF-8 的形貌.

图 1 ZIF-8 的扫描电镜图(a), CPO@ZIF-8 的扫描电镜图(b)和 CPO@ZIF-8 的透射电镜图(c)

Figure 1 SEM images of the ZIF-8 (a) and CPO@ZIF-8 (b), and TEM image of the CPO@ZIF-8 (c)

2.1.2 X 射线粉末衍射分析(XRD)

图 2 显示 CPO@ZIF-8 及 ZIF-8 的 XRD 图与根据 PDF 标准卡数据做出的 ZIF-8 的 XRD 模拟图图形一致,

图 2 CPO@ZIF-8、ZIF-8 和 Simulate ZIF-8 的 XRD 谱图

Figure 2 XRD patterns of particles CPO@ZIF-8, ZIF-8 and Simulate ZIF-8

衍射峰位相同,也与文献报道的特征衍射峰相符($2\theta=7.4^\circ$ 、 12.7° 、 18.0°)^[25].说明在常温下水相中能够得到具有高结晶度的沸石咪唑骨架结构材料,同时 CPO 的引入不会影响 ZIF-8 骨架的形成.

2.1.3 激光共聚焦显微镜分析(CLSM)

图3显示以异硫氰酸荧光素(FITC)标记CPO制备的 FITC-CPO@ZIF-8 的激光共聚焦图像,图中可见均匀分布的绿色荧光斑点,由于 ZIF-8 材料自身不是荧光材料,故所观察到的荧光信号来自于引入 ZIF-8 的 FITC-CPO. 实验结果证实 CPO 被固载到了 ZIF-8 材料的整体骨架结构中.

图3 FITC-CPO@ZIF-8 激光共聚焦显微镜图
Figure 3 Confocal microscopy image of the FITC-CPO@ZIF-8

2.1.4 热重分析(TGA)

图4为 CPO@ZIF-8 和 ZIF-8 的热重分析图. 热重曲线显示整个失重过程基本为三个阶段: 第一个阶段的失重出现在 $0\sim 200^\circ\text{C}$, 失重比例约为 12%, 失重成分可以归属为 CPO@ZIF-8 或 ZIF-8 孔道中部分残留的水分子和其他的一些有机小分子的分解; 第二个阶段的失重出现在 $200\sim 400^\circ\text{C}$, 两条热重曲线有明显差别, ZIF-8 在这个温度区间内失重比例较小, 而 CPO@ZIF-8 的热重曲线上有明显的强降落, 在这一温度范围内失重比例约 10%, 可以归属为 CPO@ZIF-8 中部分蛋白质的分解.

图4 CPO@ZIF-8 和 ZIF-8 的热重曲线
Figure 4 TGA curves of CPO@ZIF-8 and ZIF-8

第三个阶段的失重在 $400\sim 600^\circ\text{C}$, 失重比例较大, 可以认为是 MOF 材料在高温下结构坍塌, 材料分解造成的. CPO@ZIF-8 热重曲线的失重特征表明酶分子在 ZIF-8 材料中的存在.

2.1.5 CPO@ZIF-8 的催化活性

CPO 催化的 ABTS 的过氧化被选作模型反应用来检测 CPO@ZIF-8 的催化性能^[26-28]. 无色的 ABTS 经 CPO 催化、 H_2O_2 氧化后发生过氧化反应生成蓝绿色的 $\text{ABTS}^{+\cdot}$, 相应地在 415 nm 处产生特征吸收峰.

图5 CPO 催化 ABTS 生成 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 的过氧化反应
Figure 5 Peroxidation of ABTS

图6a表明 ZIF-8 材料对 ABTS 的过氧化反应没有催化作用, 而图6b则明确显示了 CPO@ZIF-8 的过氧化活性. 实验结果不仅证实了 CPO 在 ZIF-8 材料中的存在, 而且说明 CPO@ZIF-8 的制备过程并没有导致酶蛋白分子的变性失活, 这主要得益于温和的制备条件.

图6 CPO@ZIF-8 和 ZIF-8 催化 ABTS 实验结果对比
Figure 6 The catalytic activity test of CPO@ZIF-8 and ZIF-8

为了进一步验证 CPO 在 ZIF-8 中的存在方式——即 CPO 是吸附在 ZIF-8 表面, 还是进入了 ZIF-8 骨架中, 本文还制备了 CPO on ZIF-8, 即先制备 ZIF-8 材料, 再通过物理吸附使 CPO 固载到 ZIF-8 材料上. 由于 ZIF-8 的孔道骨架呈现“肚大口小”的笼状结构, 窗口不足 0.5 nm, CPO 分子无法通过窗口进入笼中, 故物理吸附法制备的 CPO on ZIF-8 中酶分子只能包覆在 ZIF-8 材料表面. 将两种固定化 CPO 分别用于 ABTS 的酶促过氧化反应中, 实验结果如图7, 当两种固定化酶中酶含量相同时, 反应 1 h 后 CPO on ZIF-8 对 ABTS 的转化率约为 31.8%, 而采用“一锅法”构筑的 CPO@ZIF-8 对 ABTS 的转化率可以达到 68.5%. 催化性能的差别反映了固定化酶结构的差异, 从而可以证实“一锅法”制备的 CPO@ZIF-8 中酶分子的分布不同于 CPO on ZIF-8, 不

是吸附在 ZIF-8 表面, 而是通过进入“笼”中均匀分布在整体骨架结构内.

图 7 CPO on ZIF-8、CPO@ZIF-8 对 ABTS 的转化率

Figure 7 The conversion rate (%) of ABTS by CPO on ZIF-8 and CPO@ZIF-8

2.2 CPO@ZIF-8 的操作稳定性

2.2.1 CPO@ZIF-8 的热稳定性

有机反应通常需要在高于室温的条件下进行, 且反应时间较长. 这样的反应环境对酶分子保持活性十分不利. 虽然在高温条件下的短时间内, 酶促反应仍能获得较高产率, 但高温引起的酶蛋白分子的变性失活现象十分严重, 为此, 在短反应时间内讨论酶作用于底物的最适温度, 并不具有实际意义. 本文将 CPO@ZIF-8 和游离 CPO 在 20~100 °C 的温度区间内不同温度下放置 3 h 检测其相对活性. 图 8 结果表明, 游离 CPO 的最佳反应温度接近常温(约 30 °C), 而 CPO@ZIF-8 的最佳反应温度则升高至 40 °C 附近. 以最佳反应温度下的活性为标准, 考察不同温度下酶的相对活性, 发现温度升至 50 °C 时, 游离 CPO 已基本失活, 而 CPO@ZIF-8 在 70 °C 时仍能保持约 60.7% 的催化活性. 参考文献^[17,18], 上述反应中控制 CPO@ZIF-8 与游离 CPO 中所含 CPO 含量相同.

图 8 温度对 CPO 和 CPO@ZIF-8 催化活性的影响

Figure 8 Effects of temperature on the activity of CPO and CPO@ZIF-8

图 9 显示 CPO@ZIF-8 和游离 CPO 在 50 °C 下放置

不同时间的残余活性. 游离 CPO 放置 90 min 后仅剩约 20.3% 的催化活性, 而 CPO@ZIF-8 在 50 °C 时催化活性随放置时间的延长下降的十分缓慢, 180 min 后仍保留约 91.4% 的催化活性.

图 9 CPO 和 CPO@ZIF-8 在 50 °C 温度下温浴 3 h 的热稳定性

Figure 9 The thermal stability of CPO and CPO@ZIF-8 warm bathed at 50 °C during 3 h

图 10 为 CPO@ZIF-8 在不同温度下放置 0 至 180 min 后残余活性的考察结果. 经过 1 h, CPO@ZIF-8 在 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 的较高温度下仍保留约 97.1%、87.8%、80.2%、68.1%、41.5% 的催化活性; 而经过 3 h 后, CPO@ZIF-8 在 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 时仍可保持 91.4%、77.8%、64.7%、50.3% 的催化活性.

图 10 CPO@ZIF-8 在 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 下温浴 3 h 后的热稳定性

Figure 10 The thermal stability of CPO@ZIF-8 warm bathed at different temperatures during 3 h

以上结果说明 ZIF-8 的骨架网络可为包埋于其中的酶分子提供了一个刚性屏蔽环境, 降低了温度升高导致的酶热变性失活程度.

2.2.2 CPO@ZIF-8 的酸碱稳定性

酶分子的适宜 pH 范围通常较窄. CPO 主要在 pH 5 左右的弱酸性环境中储存, pH < 5 时随 pH 的减小稳定性逐渐降低, 尤其是 pH > 6 时在短时间内 CPO 就会迅

速失活. 本文中将 CPO@ZIF-8 在 pH=3、5、7 时放置 1 h 后以 TEM 和 XRD 对其进行表征, 发现 ZIF-8 骨架并没有发生坍塌(如图 S1、图 S2, 支持信息), 说明在酸性环境中 CPO@ZIF-8 可以稳定存在. 同时将 CPO 催化、 H_2O_2 氧化 ABTS 的反应置于 pH 3.0~7.0 的环境中进行时, 图 11 显示反应的最佳 pH 为 5.0. 但在不是最佳 pH 的其它点, CPO@ZIF-8 的催化效率总是高于游离 CPO, 这说明了 ZIF-8 的孔道骨架可以“稀释”pH 偏离最佳值给反应带来的不利影响.

图 11 pH 对 CPO 和 CPO@ZIF-8 催化活性的影响

Figure 11 Effects of pH on the activity of free CPO and CPO@ZIF-8

2.2.3 CPO@ZIF-8 对有机溶剂的耐受性

酶催化反应大多是在水溶液中进行的, 受有机底物水溶性的制约, 产率往往较低, 通常需要加入有机溶剂作为共溶剂改善有机底物在反应体系中的溶解性. 然而大多数酶是亲水性的, 有机溶剂会使酶分子表面的水化层被破坏而导致活性受损, 甚至完全失活.

图 12 显示引入一定比例的有机溶剂 DMF(a)、甲醇(b)、乙腈(c)时, 游离 CPO 和 CPO@ZIF-8 在不同配比的有机溶剂-水混合体系中温育 1 h 后的残余活性. 随着 DMF、甲醇、乙腈体积分数的增加, 游离 CPO 和 CPO@ZIF-8 的催化活性均逐渐下降, 对有机溶剂的耐受极限是 30%~40%. 但与游离 CPO 相比, 在有机溶剂体积分数相同时, CPO@ZIF-8 对有机溶剂的耐受性明显提高. 这可归因于 ZIF-8 的通道对有机溶剂接近酶分子形成了屏障, 因而降低了 CPO 表面的亲水层被破坏的程度.

2.3 CPO@ZIF-8 的催化活性及应用

在最佳反应条件下反应 30 min, CPO@ZIF-8 催化 ABTS 的转化率是 54.19%, 而游离 CPO 催化 ABTS 的转化率是 61.67%. 固定化酶制备过程中酶会部分失活, 并且 ZIF-8 的骨架会对酶产生屏蔽导致活性降低, 但以上结果表明整体来看 CPO@ZIF-8 中大部分酶活性得以保留.

基于 CPO 的氧化活性, 将 CPO@ZIF-8 应用于染料结晶紫的脱色降解反应中, 如图 13, 图 14 所示, ZIF-8

固定化 CPO 不仅脱色较快, 而且发色团基本被破坏.

图 12 有机溶剂对 CPO 和 CPO@ZIF-8 催化活性的影响: (a) DMF; (b) 甲醇; (c) 乙腈

Figure 12 Effects of organic solvent on the activity of free CPO and CPO@ZIF-8: (a) DMF; (b) methanol; (c) methyl cyanide

图 13 CPO@ZIF-8 脱色降解结晶紫

Figure 13 Decolorization and degradation of crystal violet by CPO@ZIF-8

图 14 结晶紫降解的紫外可见光谱图

Figure 14 UV/Vis absorbance spectra of crystal violet during the decolorization process by CPO-H₂O₂ oxidation

3 结论

通过“一锅法”在室温水相的温和条件下制备了固定化氯过氧化物酶 CPO@ZIF-8。酶分子通过“包埋”于孔道中而均匀分布在 ZIF-8 的金属有机骨架网络中。与先构筑 ZIF-8 骨架材料, 然后通过表面吸附来固定酶分子的方法相比, 通过将酶分子引入整体骨架材料中不仅提高了酶的固载量, 更主要的是利用材料的高比表面积提高了固定化酶的催化效率, 同时基于三维孔道提供的刚性屏蔽环境有效改善了酶在极端反应条件下的热稳定性和对有机溶剂的耐受性。

4 实验部分

4.1 CPO@ZIF-8 的制备

100 mL 烧杯中加入 400 μ L 聚乙烯吡咯烷酮溶液 (PVP, M_w : 10000, 10 mg/mL) 和 500 μ L CPO 溶液 (0.214 mmol/L), 混合均匀, 再加入 2 mL Zn(NO₃)₂·6H₂O 溶液 (0.31 mol/L) 和 25 mL 2-甲基咪唑溶液 (1.25 mol/L), 混合均匀后在 30 $^{\circ}$ C 时搅拌 15 min, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 8 min, 除去上层液体, 固体用纯水洗涤, 除去游离的 CPO。共洗涤离心三次, 之后将得到的固体 30 $^{\circ}$ C 真空干燥 10 h, 得到 CPO@ZIF-8。

4.2 CPO@ZIF-8 的荧光标记

1 mL CPO 分散在 10 mL 磷酸缓冲溶液 (pH=5) 中, 加入 5 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐 (EDC), 2.5 mg *N*-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐 (NHS), 混合均匀后搅拌 1 h, 再加入 63 μ g 异硫氰酸荧光素 (FITC), 4 $^{\circ}$ C 下避光搅拌 4 h。用透析袋 (截留范围 8000~14400) 透析 24 h 除去残留的 NHS、EDC 和 FITC。

用 FITC-CPO 代替 4.1 节合成步骤中的 CPO 制备 FITC-CPO@ZIF-8, 并用于激光共聚焦显微镜测试。

4.3 CPO 催化 ABTS 过氧化

以 CPO 催化 ABTS 发生过氧化反应生成稳定的蓝

绿色 ABTS^{•+} 阳离子自由基为模型反应来考察 CPO@ZIF-8 微反应器的过氧化活性。

ABTS 底物浓度-吸光度标准曲线可以看出, 体系加入的 ABTS 最终浓度在 50~500 μ mol/L 范围内 ABTS^{•+} 在 415 nm 处的紫外吸光度值与底物 ABTS 浓度呈线性关系, 标准曲线方程为 $Y=0.00149X+0.13603$, 线性相关系数 0.9914。因此, 我们以 ABTS 终浓度为 466.7 μ mol/L 进行催化性能研究。

2 mL 离心管中依次加入一定量不同 pH 的磷酸缓冲溶液, 70 μ L ABTS (0.01 mol/L), 10 μ L (0.05 μ mol/L) 游离 CPO 溶液或等量于游离酶的 CPO@ZIF-8, 一定量的 H₂O₂, 摇匀后, 30 $^{\circ}$ C 时恒温摇床中充分震荡 20 min 后取出, 离心 2 min, 以安捷伦 Cary60 紫外-可见分光光度计测定上层反应液在 415 nm 处吸光度值, 根据其摩尔吸光系数 ϵ 计算转化率。

$$\text{转化率(Conversion rate)} = \frac{A_{\text{(实测值)}}}{\epsilon_{415 \text{ nm}} \times b \times C_{\text{ABTS}}} \times 100\%$$

4.4 CPO@ZIF-8 催化活性研究

4.4.1 热稳定性

将水浴锅温度调到所需温度 (20~100 $^{\circ}$ C), 待水温达到所需温度时, 将放置在离心管中的一定量 CPO 和含有等量 CPO 的 CPO@ZIF-8 置于水浴中温浴 0~180 min, 每隔一段时间取出温浴过的 CPO 和 CPO@ZIF-8 参照 4.3 节方法催化 ABTS 过氧化反应。以某一温度下的过氧化活性相对于最佳温度下的 (即游离 CPO: 30 $^{\circ}$ C; CPO@ZIF-8: 40 $^{\circ}$ C) 相对活性对时间作图, 比较 CPO 和 CPO@ZIF-8 的热稳定性。

4.4.2 酸碱稳定性

在 pH (3.0~7.0) 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液中, 在游离 CPO 及 CPO@ZIF-8 中 CPO 含量一致的前提下, 通过考察 ABTS 的转化率比较 CPO 和 CPO@ZIF-8 的酸碱耐受性 (底物浓度: 466.7 μ mol/L; H₂O₂ 浓度: 0.1 mmol/L; 温度: 30 $^{\circ}$ C)。

4.4.3 有机溶剂耐受性

在 pH 5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液中引入不同体积分数的 DMF、甲醇、乙腈溶液, 在游离 CPO 及 CPO@ZIF-8 中 CPO 含量一致的前提下, 孵育 1 h 后以 CPO 和 CPO@ZIF-8 的残余活性考察其对有机溶剂的耐受性。

4.4.4 结晶紫脱色

2 mL 离心管中加入 20 mg CPO@ZIF-8, 1370 μ L pH = 4 PBS 缓冲, 100 μ L 0.1 mmol/L 结晶紫溶液以及 30 μ L H₂O₂, 反应 30 min 后, 以安捷伦 Cary60 紫外-可见分光光度计测定上层反应液在 583 nm 处吸光度值。

References

- [1] Sheldon, R. A.; van Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223.
- [2] Zucca, P.; Sanjust, E. *Molecules* **2014**, *19*, 14139.
- [3] Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453.
- [4] Huang, W. G.; Sun, H. F.; Zhang, S. J. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*(6), 518. (in Chinese). (黄文光, 孙洪飞, 张淑娟, 化学学报, **2016**, *74*(6), 518.)
- [5] Wu, X.; Hou, M.; Ge, J. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 5077.
- [6] Mehta, J.; Bhardwaj, N.; Bhardwaj, S. K.; Kim, K.-H.; Deep, A. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *322*, 30.
- [7] Lykourinou, V.; Chen, Y.; Wang, X. S.; Meng, L.; Hoang, T.; Ming, L. J.; Musselman, R. L.; Ma, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10382.
- [8] Liu, W. L.; Yang, N. S.; Chen, Y. T.; Lirio, S.; Wu, C. Y.; Lin, C. H.; Huang, H. Y. *Chemistry* **2015**, *21*, 115.
- [9] Chen, Y.; Lykourinou, V.; Vetromile, C.; Hoang, T.; Ming, L. J.; Larsen, R. W.; Ma, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13188.
- [10] Li, P.; Moon, S. Y.; Guelta, M. A.; Harvey, S. P.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8052.
- [11] Feng, D.; Liu, T. F.; Su, J.; Bosch, M.; Wei, Z.; Wan, W.; Yuan, D.; Chen, Y. P.; Wang, X.; Wang, K.; Lian, X.; Gu, Z. Y.; Park, J.; Zou, X.; Zhou, H. C. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5979.
- [12] Jung, S.; Kim, Y.; Kim, S. J.; Kwon, T. H.; Huh, S.; Park, S. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 290.
- [13] Wang, X.; Makal, T. A.; Zhou, H.-C. *Aust. J. Chem.* **2014**, *67*, 1629.
- [14] Liu, W. L.; Wu, C. Y.; Chen, C. Y.; Singco, B.; Lin, C. H.; Huang, H. Y. *Chemistry* **2014**, *20*, 8923.
- [15] Liu, W.-L.; Lo, S.-H.; Singco, B.; Yang, C.-C.; Huang, H.-Y.; Lin, C.-H. *J. Mater. Chem.* **2013**, *1*, 928.
- [16] Nadar, S. S.; Rathod, V. K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 511.
- [17] Wang, X. L.; Ge, J.; Yang, C.; Hou, M.; Liu, Z. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13408.
- [18] Lyu, F. J.; Zhang, Y. F.; Zare, R.; Ge, J.; Liu, Z. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 5761.
- [19] Manoj, K. M.; Hager, L. P. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2997.
- [20] Wang, L. M.; Wu, J. Y.; Jiang, Y. C.; Hu, M. C.; Li, S. N.; Zhai, Q. G. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 465 (in Chinese). (汪丽敏, 吴金跃, 蒋育澄, 胡满成, 李淑妮, 翟全国, 化学学报, **2012**, *70*, 465.)
- [21] Águila, S.; Vazquez-Duhalt, R.; Tinoco, R.; Rivera, M.; Pecchi, G.; Alderete, J. B. *Green Chem.* **2008**, *10*, 647.
- [22] Liu, L. X.; Zhang, J.; Tan, Y.; Jiang, Y. C.; Hu, M. C.; Li, S. N.; Zhai, Q. G. *Chem. Eng. J.* **2014**, *244*, 9.
- [23] Muñoz-Guerrero, F. A.; Águila, S.; Vazquez-Duhalt, R.; Campos, C. H.; Torres, C. C.; Alderete, J. B. *Catal. Commun.* **2016**, *77*, 52.
- [24] Liu, M. M.; Lv, W. M.; Shi, X. F.; Fan, B. B.; Li, R. F. *Chinese J. Inorg. Chem.* **2014**, *30*, 579 (in Chinese). (刘明明, 吕文苗, 史秀锋, 范彬彬, 李瑞丰, 无机化学学报, **2014**, *30*, 579.)
- [25] Jian, M.; Liu, B.; Liu, R.; Qu, J.; Wang, H.; Zhang, X. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 48433.
- [26] Reszka, K. J.; Britigan, B. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *466*, 164.
- [27] Manoj, k. m.; Baburaj, A.; Ephraim, B.; Pappachan, F.; Maviliparambathu, P. P.; Vijayan, U. K.; Narayanan, S. V.; Periasamy, K.; George, E. A.; Mathew, L. T. *PloS one* **2010**, *5*, 5.
- [28] Manoj, K. M.; Hager, L. P. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2997.

(Cheng, B.)