

基于 CuZn-ZIF-L/TA 类过氧化物酶的比色传感平台，用于灵敏检测 H₂O₂ 与亚硫酸盐*

邵雨晴¹ 林燕¹ 王金玲¹ 陈艳伟^{*1}

¹ (东北师范大学物理学院 长春 130024)

摘要:

【目的】构建高活性的 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶，实现对 H₂O₂ 和亚硫酸氢根的灵敏比色检测。

【方法】以 CuZn-ZIF-L 为前驱体，利用单宁酸的包覆与刻蚀作用在其表面引入更多活性位点，制备 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶。

【结果】该纳米酶对 H₂O₂ 的检测限为 0.74 μM，对亚硫酸盐的检测限为 1.04 μM。

【局限】本研究未考察该纳米酶在实际食品样品中的基质干扰及长期稳定性。

【结论】单宁酸改性有效优化了 MOF 基纳米酶的配位结构与催化能力，为食品安全中过氧化氢和亚硫酸氢根的比色检测提供了新策略。

关键词：金属-有机框架 纳米酶 比色检测

分类号：TP393

A colorimetric sensing platform based on CuZn-ZIF-L/TA peroxidase-like for the sensitive detection of H₂O₂ and sulfites

Shao Yuqing¹ Lin Yan¹ Wang Jinling¹ Chen Yanwei¹

¹ (Department of Physics, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract:

【Objective】To construct a highly active CuZn-ZIF-L/TA nanoenzyme for the sensitive colorimetric detection of H₂O₂ and bisulfite.

【Methods】Using CuZn-ZIF-L as the precursor, CuZn-ZIF-L/TA nanoenzymes were prepared by introducing additional active sites onto the surface through the coating and etching effects of tannic acid.

【Results】The detection limit of this nanoenzyme for H₂O₂ was 0.74 μM, and for bisulfite was 1.04 μM.

【Limitations】This study did not investigate matrix interference or long-term stability of the nanoenzyme in actual food samples.

【Conclusions】Tannic acid modification effectively optimized the coordination structure and catalytic activity of the MOF-based nanoenzyme, providing a new strategy for the colorimetric detection of hydrogen peroxide and bisulfite in food safety applications.

Keywords: Metal-organic frameworks Nanoenzymes Colorimetric detection

* 本文系国家自然科学基金项目（项目编号：11774048、12574469）的研究成果之一。

1 引言

过氧化氢 (H_2O_2) 是食品加工过程中常见的消毒剂与漂白剂。但依据国家食品安全标准, 在绝大多数食品的最终产品中已不允许检出 H_2O_2 。因此, 快速定量检测 H_2O_2 在食品安全检测中具有重要意义。同时, 亚硫酸盐 ($\text{SO}_3^{2-}/\text{HSO}_3^-$) 作为常见的化学食品防腐剂, 广泛存在于多种食品中, 过量摄入会对人体造成严重的危害。而纳米酶, 尤其是类过氧化物纳米酶对 H_2O_2 存在灵敏响应, 亚硫酸盐的强的还原性则可以关闭类过氧化物酶- H_2O_2 -TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺) 的比色信号。因此, 可以设计一种基于类过氧化物纳米酶的比色传感器, 对其进行简单、灵敏的定量检测。

与高效、特异性但提取成本高昂、对环境因素敏感的天然酶相比, 纳米酶作为具有内在类酶催化活性的纳米材料, 兼具天然酶的高催化效率与纳米材料稳定性好、可规模化制备、成本低廉等优点^[1], 已在生物医学^[2]、生物传感^[3]、食品安全^[4]、抗菌^[5]、农业及环境修复^[6, 7]等方面得到应用。在众多纳米酶中, 金属-有机框架 (Metal-Organic Frameworks, MOFs) 纳米酶因其独特且可精确调控的结构优势脱颖而出^[8]。MOF 材料是由金属离子/簇与有机配体通过配位键自组装形成的晶态多孔材料, 能够模拟天然酶的活性中心, 不仅可以直接作为具有本征类酶活性的纳米酶, 还可以作为众多材料的前驱体, 通过多种策略扩展出性能更卓越的催化材料^[9]。尽管 MOF 材料本身已经可以拥有类酶催化活性, 但其本征活性往往难以满足实际应用需求, 需要通过改性策略进一步提升催化性能。改性的核心在于优化材料的电子结构和表面性质, 增强纳米酶对底物的亲和力, 并提高活性位点的利用效率^[10, 11]。例如, 掺杂过渡金属可在原有的 MOF 结构中引入更多的变价金属、不饱和配位点或氧空位, 这些缺陷往往具有更高的电荷转移效率和更强的底物结合能力, 从而提升催化活性^[12]。而通过在 MOF 的孔道内或表面引入功能性客体, 构建具有协同催化效应的复合材料, 不仅能发挥各组分的本征活性, 还可以实现不同组分之间的性能协同提升, 从而优化反应条件, 增强催化稳定性。

单宁酸 (TA) 富含的邻苯三酚/没食子酰基团使其具备强大的金属离子螯合与还原能力, 可作为高效的电子供体或转移介质, 加速催化循环中的关键电子转移^[13]。其次, 单宁酸可通过多种相互作用在材料表面形成稳定的活性界面层, 这不仅改善了材料的分散性与稳定性, 其自身丰富的酚羟基也提供了额外的催化活性位点。Liang 等人^[14]通过简单的 TA 刻蚀策略开发了层级多孔生物催化 MOF 微反应器, 利用 TA 蚀刻中间孔中酶的重新定向, 降低了酶表面能量, 提高了固定多酶和辅因子依赖酶生物催化反应的催化效率。在这项工作中, 我们展示了 CuZn-ZIF-L/TA 在接近中性的 pH 环境和 45 °C 温度下表现出的良好的类过氧化物酶活性, 以及室温下催化活性相比于 CuZn-ZIF-L 的提升。如图 1 所示, 基于 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶构建了一种传感器, 用于室温检测食品中的 H_2O_2 和亚硫酸盐。该传感器提高了 H_2O_2 检测的准确性, 并拓展了亚硫酸盐检测的测试条件限定范围。CuZn-ZIF-L/TA 可以催化 H_2O_2 形成羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$), 从而氧化底物 TMB 生成蓝色的 oxTMB。基于此, 我们构建了灵敏检测 H_2O_2 的测试平台。此外, 由于亚硫酸盐的强的还原性则可以关闭类过氧化物酶- H_2O_2 -TMB 的比色信号。因此, 可以设计一种基于类过氧化物纳米酶 CuZn-ZIF-L/TA 的比色传感器, 对其进行简单、灵敏的定量检测, 不仅为理解纳米酶与底物的相互作用规律提供了实验依据, 也为食品安全检测领域开发了具有应用潜力的分析工具。

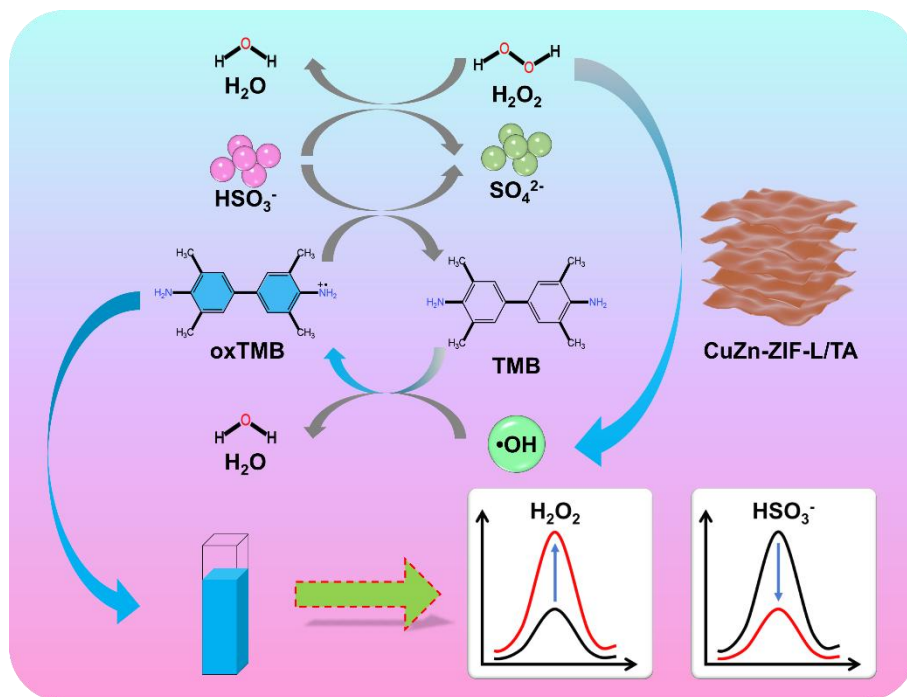


图 1. 基于 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶的比色传感平台示意图，用于对过氧化氢和亚硫酸盐进行灵敏检测

2 实验部分

2.1 CuZn-ZIF-L 及 CuZn-ZIF-L/TA 的制备

CuZn-ZIF-L 的制备：采用化学搅拌法在室温下合成。分别将 0.5355 g 六水合硝酸锌、0.2899 g 三水合硝酸铜和 1.9704 g 2-甲基咪唑溶解于 27 mL、18 mL 和 45 mL 超纯水中，并充分搅拌直至完全溶解。然后将硝酸铜溶液和硝酸锌溶液充分混合，并滴加到 2-甲基咪唑溶液中；将混合物在室温下搅拌 24 小时。随后以 7000 rpm 离心 15 分钟，收集固体并重新溶解在超纯水中，陈化 12 小时。通过离心收集 CuZn-ZIF-L 晶体，洗涤 6 次，在 60 °C 下干燥，备用。

CuZn-ZIF-L/TA 的制备：根据先前报道的方法^[15, 16]，对制备 CuZn-ZIF-L/TA 的具体步骤进行了优化。首先，称取 0.033 g 单宁酸粉末，搅拌 2 分钟以确保完全溶解。随后，称取 0.3 g 合成的 CuZn-ZIF-L 粉末，并将其在 10 mL 超纯水中进行超声分散。在持续搅拌下，将前驱体分散液迅速倒入单宁酸水溶液中。混合后立即发生反应；溶液持续搅拌 12 分钟，期间溶液变为红褐色。反应结束后，以 7000 rpm 离心收集红褐色沉淀。通过超纯水洗涤三次，再用无水乙醇洗涤三次进行溶剂交换。最后，将产物在 60 °C 下干燥，得到 CuZn-ZIF-L/TA 粉末。

2.2 CuZn-ZIF-L/TA 的过氧化物酶样活性及动力学测定

通过 TMB-H₂O₂ 反应测定了 CuZn-ZIF-L/TA 的过氧化物酶样活性。在室温下，将 1,800 μL 醋酸-醋酸钠 (HAc-NaAc) 缓冲液 (pH 6) 与 500 μL CuZn-ZIF-L/TA 分散液 (1 mg/mL) 混合，随后加入 50 μL TMB 溶液 (15 mM) 和 150 μL H₂O₂ (1 M)。室温反应 12 分钟后，使用紫外-可见分光光度计测定 652 nm 处的吸光度。

通过改变 H₂O₂ 浓度，测定了 CuZn-ZIF-L/TA 对 H₂O₂ 的亲合力。在 pH 6、45 °C 条件下，固定 TMB 浓度为 0.2 mM，依次加入上述 HAc-NaAc 缓冲液 (1800 μL)、CuZn-ZIF-L/TA 分散液 (500 μL)、不同浓度的 H₂O₂ 溶液 (100 μL)，以及 5 mM TMB 溶液 (100 μL)。体系中的 H₂O₂ 浓度在 10–100 mM 范围内变化。使用紫外-可见分光光度计记录反应 40 s 后体系

在 652 nm 处的吸光度。数据符合米氏-门腾曲线, 即 $V = V_m[S]/([S] + K_m)$, 其中 V 为初始速率, V_m 为最大反应速率, $[S]$ 为底物浓度, K_m 为米氏-门腾常数。

2.3 CuZn-ZIF-L/TA 的类过氧化物酶性能增强机理

通过完整测试 TMB 和 H_2O_2 的酶动力学, 分析 CuZn-ZIF-L/TA 对两种底物的不同作用机制。在 pH 为 6, 温度为 45 °C 下, 固定 TMB 浓度为 0.2 mM, 扩大酶动力学中 H_2O_2 的浓度变化范围至 10–400 mM, 记录反应 40 s 时体系在 652 nm 处的吸光度, 酶动力学数据在高浓度下表现为底物抑制。

固定 H_2O_2 的浓度为 80 mM, 改变 TMB 的浓度为 0.08–1 mM, 体系反应时间 40 s, 酶动力学曲线符合 Hill 方程。

2.4 H_2O_2 的比色检测

在 H_2O_2 的比色浓度检测实验中, 加入 HAc–NaAc 缓冲液 (1700 μ L, pH 6)、CuZn-ZIF-L/TA (500 μ L, 1 mg/mL)、TMB (200 μ L, 5 mM) 和不同浓度的 H_2O_2 (100 μ L), 在室温下反应 16 分钟, 然后测试显色体系在 500–800 nm 波长范围的吸收光谱。提取 652 nm 处的吸光度, 分析吸光度与 H_2O_2 浓度之间的关系, 并计算出吸光度 (A) 相对于该体系下 TMB 能达到的最大吸光度 (A_0) 的差值 ($A_0 - A$)。再分析 $-\ln(A_0 - A)$ 与 H_2O_2 浓度之间的线性关系。

关于此传感器的选择性, 在相同测试条件下, 用 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、葡萄糖和甘氨酸等不同干扰物替代 H_2O_2 , 分析此传感方法对 H_2O_2 的特异性。

2.5 亚硫酸盐的比色检测

在溶液体系的 pH 为 6 时, 亚硫酸盐通常以 HSO_3^- 的形式存在, 其具有显著的还原性, 可以使 TMB 的显色信号关闭。因此, 向 HAc–NaAc 缓冲液 (1600 μ L, pH 6) 中, 加入 CuZn-ZIF-L/TA 分散液 (500 μ L, 1 mg/mL), 再加入的 H_2O_2 (100 μ L, 1 M) 和 TMB (200 μ L, 5 mM) 溶液, 混合均匀。待体系反应 16 min 后加入不同浓度的 $NaHSO_3$ 溶液, 混匀后测试反应时间为 40 s 时反应体系在 652 nm 处的吸光度。分析该吸光度相对空白样吸光度的差值 ΔA 与 HSO_3^- 的浓度之间的关系, 以 $(\Delta A)^2$ 与 HSO_3^- 浓度之间的线性关系作为定量标准。

对于该传感器的选择性分析, 在相同测试条件下, HSO_3^- 被不同的干扰物替代, 如: Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、葡萄糖和甘氨酸。

3 结果与讨论

3.1 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶的制备与表征

通过图 2 (a) 所示的方法制备了 CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶。图 2 (b) 和 (c) 为 CuZn-ZIF-L 的扫描电镜图像, 可以观察到 CuZn-ZIF-L 的形貌呈现 ZIF-L 材料经典的叶片状纳米片层状态, 尺寸均一, 形状规整。图 2 (d) 和 (e) 为制备的 CuZn-ZIF-L/TA 复合材料的扫描电镜图像。从图中可以清晰地观察到, 经单宁酸修饰后的 CuZn-ZIF-L/TA 在整体形貌上仍较好地保留了原始 CuZn-ZIF-L 材料所具有的典型叶片状纳米片层结构, 整体尺寸依旧可观。图 2 (f) 和 (g) 为 CuZn-ZIF-L/TA 的透射电镜图像。在图 2 (f) 中, 可以清晰地看到前驱体纳米片在局部发生断裂后, 其断面及其周边区域负载了单宁酸, 同时在该区域也呈现出明显的褶皱特征, 与扫描电镜中的观察结果相符。图 2 (g) 中, 左上角颜色较深的部分对应着前驱体 CuZn-ZIF-L 的晶体区域, 而在其外部则明显包裹着一层形貌不规则的物质, 即为单宁酸包覆层。这证实了单宁酸成功包覆于 CuZn-ZIF-L 表面, 且单宁酸的引入及其刻蚀作用使纳米片的边缘和表面形貌发生了一定程度的变化, 呈现出一定的不规则性, 并伴随褶皱现象。这一形貌上的变化, 可以视为单宁酸成功修饰到材料表面的重要标志之一。图 2 (i) 为 CuZn-ZIF-L/TA 的元素分布图。其中 C、N、Cu 和 Zn 元素的分布区域一致, 表明金属元素和配体的配

位关系依然稳定，没有变成金属离子团聚或金属纳米簇小颗粒。此外，O 元素分布与其他元素也一致，说明单宁酸负载得很均匀。

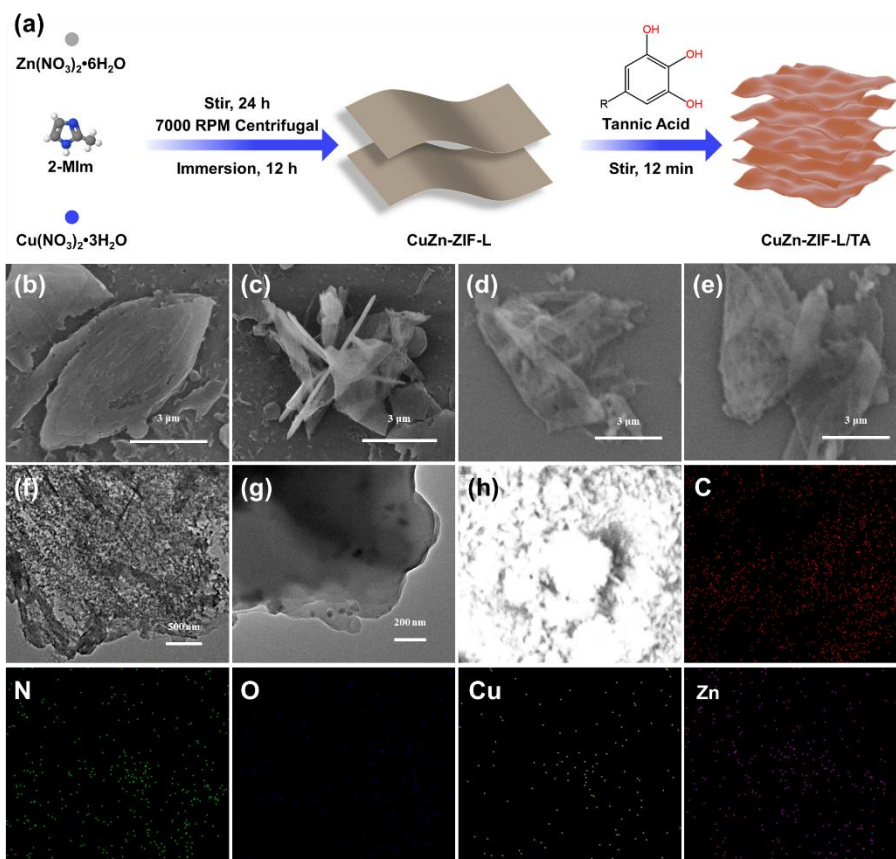


图 2 (a) CuZn-ZIF-L/TA 的制备过程；(b)、(c) CuZn-ZIF-L 的扫描电子显微镜 (SEM) 图像；(d)、(e) CuZn-ZIF-L/TA 的扫描电子显微镜 (SEM) 图像；(f)、(g) CuZn-ZIF-L/TA 的透射电子显微镜 (TEM) 图像；(h) CuZn-ZIF-L/TA 的 C、N、O、Cu 和 Zn 元素映射图

图 3 (a) 为 ZIF-L 模拟谱和 CuZn-ZIF-L、CuZn-ZIF-L/TA 的 XRD 图谱。CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 不仅 XRD 谱的形状相似，相同晶面对应的角度非常接近，而且谱峰位置与模拟结果接近^[17,18]，证明前驱体合成成功且 CuZn-ZIF-L/TA 保持了 CuZn-ZIF-L 原有的结构。图 3 (b) 的傅里叶红外吸收光谱图在波数在低于 800 cm⁻¹、900-1350 cm⁻¹ 及 1350-1500 cm⁻¹ 的红外特征峰分别归属于面外弯曲振动 (δ_{op})、面内弯曲振动 (δ_{ip}) 及整体环伸缩振动 (ν_{ring})^[19]。3680-2760 cm⁻¹ 主要为氢氧键和氮氢键的伸缩振动的叠加。此区间内的杂峰为芳香环 (约 3135 cm⁻¹, $\nu_{(C-H)ar}$) 和脂肪烃 (约 2930 cm⁻¹, $\nu_{(C-H)al}$) 上的 C-H 伸缩振动。表明配体处于多种扭曲的微环境中。1535-1710 cm⁻¹ 范围对应 $\nu_{(C=N)} + \nu_{(C=C)}$ 的叠加模式。由于 ZIF-L 不是高度对称的晶体，前驱体中 2-甲基咪唑存在完全配位、不完全配位和没参与配位三种情况，这些配体引起的红外振动位置相近发生叠加，整体看作一个峰。由于 CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 的红外吸收光谱形状一致，说明单宁酸没有干扰原本 CuZn-ZIF-L 中的金属-咪唑配位结构。

如图 3 (c) 所示，CuZn-ZIF-L 的 Zeta 电位为 -13.36 mV，而经单宁酸修饰后，CuZn-ZIF-L/TA 的 Zeta 电位升至 -5.73 mV。这一正向偏移的现象可归因于单宁酸与材料表面之间的强螯合作用。与此同时，吸附在材料表面的单宁酸分子层将电泳测试中的“剪切面”向外推移。因此测得的 Zeta 电位绝对值下降。而 Zeta 电位正向偏移也进一步表明该材料更有利于结合在水溶液中解离的过氧化

氢，有利于催化活性的提升。两种粉末样品的照片如图 3 (d)所示，CuZn-ZIF-L 样品和 CuZn-ZIF-L/TA 样品均为浅棕色粉末，且 CuZn-ZIF-L/TA 颜色更偏红棕。它们的紫外-可见吸收光谱两条曲线形状十分相似，符合 CuZn-ZIF-L/TA 由 CuZn-ZIF-L 改性而来的事实。它们在 200-800 nm 范围内都存在大量小峰，表明样品存在大量缺陷态，为类过氧化物酶活性提供了活性位点。

CuZn-ZIF-L/TA 与 CuZn-ZIF-L 的 XPS 比较如图 3 (e)-(j)所示，选取了每个元素相同的测试范围进行对比。图 3 (e)为 C 1s 的精细谱，它可以分峰为三个主峰和一个卫星峰。结合能从低到高依次为：咪唑环上的 C-C、C=C 与 C-H 的混合峰 (284.8 eV)；咪唑环特征碳 (N=C-N) 和 C-O 的混合峰 (285.85 eV)；C=O 的特征峰 (288.52 eV)； $\pi \rightarrow \pi^*$ 卫星峰 (291.68 eV)。图 3 (f)为 N 1s 的精细谱，咪唑环存在的 C=N 和 C-N 的混合峰位在 399.18 eV、金属-氮配位键 (Zn-N、Cu-N) 的特征峰在 399.92 eV、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 卫星峰在 406.95 eV。分峰拟合形状与前驱体的情况相近，卫星峰依然明显，说明有少量单宁酸的加入，没有对 CuZn-ZIF-L 基质造成过多影响。图 3 (g)所示，O 1s 呈现两个独立的分峰，其中一个单宁酸中的 C=O 键和金属-羟基氧化物 (Zn-O/Cu-O) 的混合峰 (531.83 eV)，另一个为 C-H 键及单宁酸引入的 C-O 键的峰 (533.09 eV)。图 3 (h)中 CuZn-ZIF-L/TA 的 Cu 2p 的主峰为 933.87 eV ($2p_{3/2}$)、953.54 eV ($2p_{1/2}$)，卫星峰为 941.37 eV、944.09 eV ($2p_{3/2}$)；961.86 eV、963.44 eV ($2p_{1/2}$)。如图 3 (i)为 Zn 2p 的精细谱。两个主峰中 1022.04 eV 对应 Zn 的 $2p_{3/2}$ ，1045.02 eV 对应 Zn 的 $2p_{1/2}$ 。铜离子和锌离子的存在也证明样品成功制备。

由表 1 看出 CuZn-ZIF-L/TA 表面的铜离子比 CuZn-ZIF-L 更多，锌铜比从 18.01 降低到 4.49。单宁酸作为有机大分子，形成的包覆层往往不均匀，在单宁酸的刻蚀与包覆的过程中铜离子被更多的暴露到表面，为增强类过氧化物酶活性提供了可能。

表 1 XPS 分析下的元素含量

样品	计算谱峰	元素含量 (%)	样品	计算谱峰	元素含量 (%)
CuZn- ZIF-L	C 1s	54.07	CuZn- ZIF- L/TA	C 1s	59.49
	N 1s	22.12		N 1s	15.69
	O 1s	6.89		O 1s	15.99
	Cu 2p _{3/2}	0.89		Cu 2p _{3/2}	1.56
	Cu 2p _{1/2}			Cu 2p _{1/2}	
	Zn 2p _{3/2}	16.03		Zn 2p _{3/2}	7.00
	Zn 2p _{1/2}			Zn 2p _{1/2}	

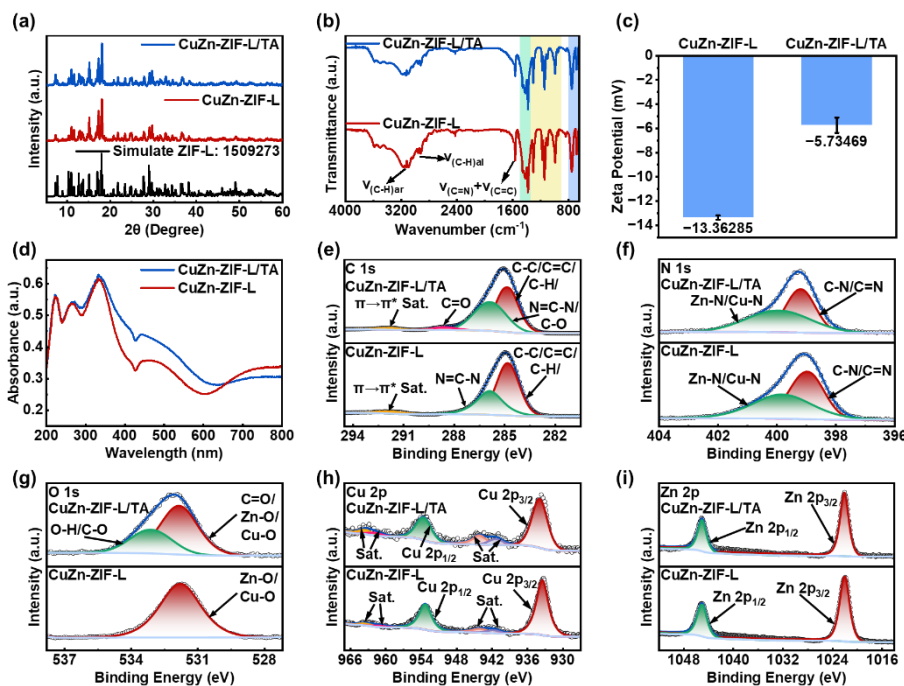


图 3 (a) CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 的 XRD 图谱, 以及 ZIF-L 的模拟 XRD 图谱; (b) CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 的红外光谱; (c) CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 的 zeta 电位曲线; (d) CuZn-ZIF-L 和 CuZn-ZIF-L/TA 的紫外-可见吸收光谱; CuZn-ZIF-L/TA 的 XPS 光谱: (e) C 1s; (f) N 1s; (g) O 1s; (h) Cu 2p; (i) Zn 2p 精细结构。

3.2 CuZn-ZIF-L/TA 的过氧化物酶样活性

CuZn-ZIF-L/TA 具有独特的类过氧化物酶活性。如图 4 (a) 所示, CuZn-ZIF-L/TA 只有在过氧化氢和 TMB 同时存在时才表现出明显的吸收, CuZn-ZIF-L/TA 与 TMB 混合、CuZn-ZIF-L/TA 与 H_2O_2 混合以及 H_2O_2 与 TMB 混合时都不会在 652 nm 处产生明显的吸收。表明只有体系中存在 TMB 且有 TMB 被氧化, 才会在 652 nm 处产生吸收峰。而且没有过氧化氢的参与, 纳米酶自身无法利用溶液中其他成分将 TMB 氧化; 没有纳米酶进行催化的过氧化氢自身也不足以引起 TMB 的明显氧化。因此, 这个纳米酶呈现类过氧化物酶性质。对比负载前后的样品类过氧化物酶活性的变化, 如图 4 (b) 所示, 室温下 CuZn-ZIF-L/TA 的类过氧化物酶活性比 CuZn-ZIF-L 提升了 92.4%。证明在前驱体 CuZn-ZIF-L 上负载单宁酸的策略成功实现了类过氧化物酶性能的飞跃, 为实际应用中获得更高的过氧化氢灵敏度提供了可能。

图 4 (c-d) 为最适条件下的酶动力学测试。计算反应速率并绘制速率与底物浓度之间的散点图, 进行拟合可以得到相应的 Michaelis-Menten 曲线, 图 4 (c)。对 Michaelis-Menten 曲线的横纵坐标取倒数, 可以得到 Lineweaver-Burk 双倒数图, 图 4 (d)。计算得到最适条件下 CuZn-ZIF-L/TA 对 H_2O_2 的 K_m 为 19.38 mM, V_{max} 为 20.42×10^{-8} M/s。与天然辣根过氧化物酶 (HRP) 相比, 虽然 CuZn-ZIF-L/TA 对 H_2O_2 的 K_m 没有达到优于 HRP 的 3.70 mM^[20], 但是数值符合纳米酶的常规特点^[21], 而且 V_{max} 明显高于 HRP 的最大反应速率 8.71×10^{-8} M/s^[20]。这反映了 CuZn-ZIF-L/TA 的一个重要特征: 无需达到底物的饱和浓度就可以实现很高的反应速率。此现象说明 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶对 H_2O_2 的耐受性很强。

上述结果表明, 通过单宁酸的刻蚀与负载策略对 CuZn-ZIF-L 进行功能化修饰, 得到了改性 MOF 纳米酶 CuZn-ZIF-L/TA。此纳米酶构建策略能够显著提升纳米酶的活性, 为其在催化、传感等领域的实际应用奠定了良好基础。

3.3 CuZn-ZIF-L/TA 的过氧化物酶催化机理

图 4 (e)测试了 CuZn-ZIF-L/TA 催化 H_2O_2 产生 $\cdot\text{OH}$ 。CuZn-ZIF-L/TA 在 H_2O_2 和 DMPD 捕获剂都存在时都呈现出了在 3410 G 附近的强度比为 1:2:2:1 的四个 $\cdot\text{OH}$ 的典型特征峰。且由于此纳米酶的 $\cdot\text{OH}$ 产生速率过高,在 $\cdot\text{OH}$ 消耗速率较慢的条件下易产生氧气 (O_2) 气泡,所以测试难以记录最终的稳定状态。这是 $\cdot\text{OH}$ 大爆发的特点,也是其最适条件更加温和的原因。使用异丙醇作为 $\cdot\text{OH}$ 的清除剂,探究 CuZn-ZIF-L/TA 的类过氧化物酶催化作用机理。图 4 (f) 显示,加入异丙醇吸光度与不添加异丙醇孵育的吸光度相比显著下降,残留吸光度仅为不添加异丙醇时的 14.6%。CuZn-ZIF-L/TA 催化 H_2O_2 氧化 TMB 主要由 $\cdot\text{OH}$ 参与反应,即核心催化机理为类芬顿反应。因此,反应方程式(公式 1、公式 2)表达了 CuZn-Im-CS 的类过氧化物酶性质中与 H_2O_2 相互作用的最主要的反应过程。



通过上述分析, CuZn-ZIF-L/TA 催化 H_2O_2 氧化 TMB 的反应过程如图 4 (g) 所示。 H_2O_2 先与 CuZn-ZIF-L/TA 的 Cu^+ 、 Cu^{2+} 等活性位点结合,发生方程式(1)、(2)中的经典反应^[22],产生 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2 和氢离子 (H^+) 与氢氧根 (OH^-),同时铜离子价态的循环变化,可以持续发挥 CuZn-ZIF-L/TA 的类酶性能。 H_2O_2 与 CuZn-ZIF-L/TA 结合产生的 $\cdot\text{OH}$ 分散到溶液中,与还原性 TMB 发生氧化还原反应,TMB 被氧化为蓝色的 oxTMB,产生吸光度信号。在 pH=6 的条件下,纳米酶本身处于类过氧化物酶活性与过氧化氢酶活性并存的状态。而铜基纳米酶往往具备一定的氧化酶活性^[23],产生的少量氧气溶解在溶液中也为 TMB 的氧化提供了另一种可能。

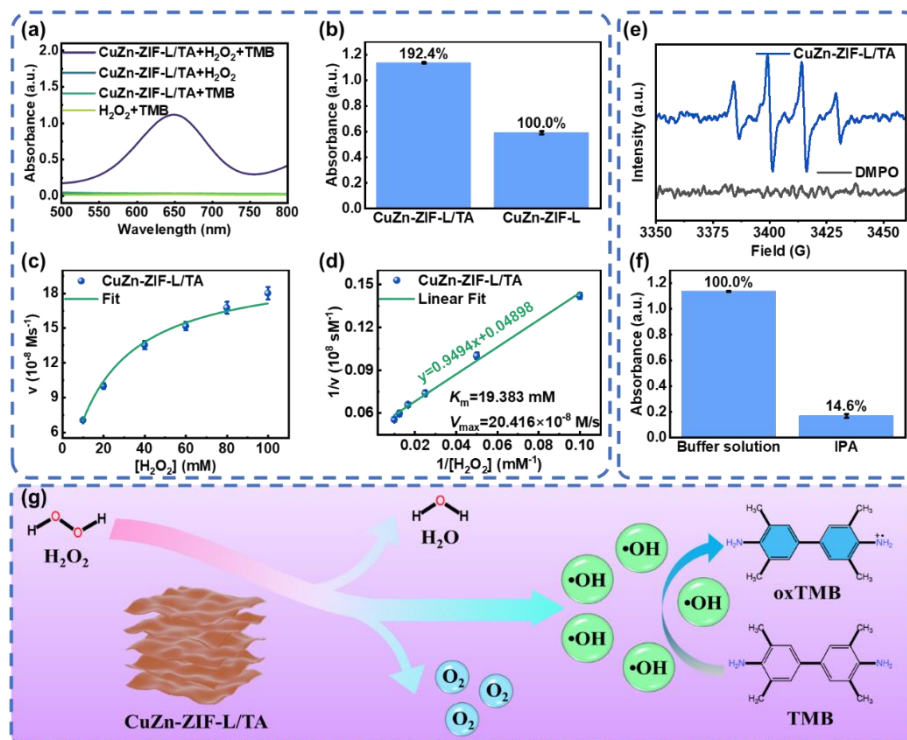


图 4 (a) CuZn-ZIF-L/TA 过氧化物酶样活性的分析; (b) CuZn-ZIF-L/TA 与 CuZn-ZIF-L 过氧化物酶样活性的比较; (c) 最优条件下 CuZn-ZIF-L/TA 酶促反应速率随 H_2O_2 浓度的变化; (d) 初始反应速率与 H_2O_2 浓度之间的双倒数关系; (e) CuZn-ZIF-L/TA 催化过氧化氢生成羟基自由基的 EPR 谱; (f) 异丙醇对羟基自由基的清除效应; (g) CuZn-ZIF-L/TA 的过氧化物酶样催化机理。

3.4 H₂O₂ 的检测

通过上述机理探究可知, CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶的类过氧化物酶活性与 $\cdot\text{OH}$ 产生能力有关, 它强烈依赖 H₂O₂ 的浓度。因此, 设计基于 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶的 H₂O₂ 比色灵敏检测。如图 5 (a) 所示, 以 TMB 作为比色探针对 H₂O₂ 浓度实现响应。随着体系中 H₂O₂ 浓度的不断增加, 体系吸光度逐渐增加。图 5 (b) 中体系在 652 nm 的吸光度随 H₂O₂ 的浓度变化关系符合 $y=y_0+A_1e^{-x/t_1}$ 的函数关系。其中 y_0 对应着 TMB 显色体系可以达到的最大吸光度。在 H₂O₂ 浓度为 40 mM 时, 吸光度为 $A_{\text{max}}=1.36388\pm0.012$, 取其上限为 $A_0=1.37588$ 。分别计算每个数据点的吸光度经函数 $-\ln(A_0-A)$ 变换后的值, 构造检测线性关系的函数, 得到图 5 (c) 的线性方程:

$y=0.12691x-0.28768$, 线性相关系数为 $R^2=0.99937$ 。由公式 $\text{LOD}=\frac{3\sigma}{k}$ 计算检测限,

$\text{LOD}=0.74\ \mu\text{M}$, 线性范围为 0.04–40 mM。检测范围覆盖高浓度和低浓度, 此纳米酶检测效果良好。

考虑到食品中常见的无机盐、有机分子等可能会影响吸光度的测量, 对 H₂O₂ 的检测进行选择实验。如图 5 (d) 所示, Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、葡萄糖、甘氨酸等干扰物质加入后, 吸光度与空白接近, 表明这些物质对纳米酶催化 H₂O₂ 氧化 TMB 的反应干扰很小, 此方法对 H₂O₂ 具有良好的选择性。与表 2 中其他纳米酶相比, 本工作具有较低的检测限和较宽的检测范围, 能为实际的食品安全检测提供快速且灵敏的检测方法

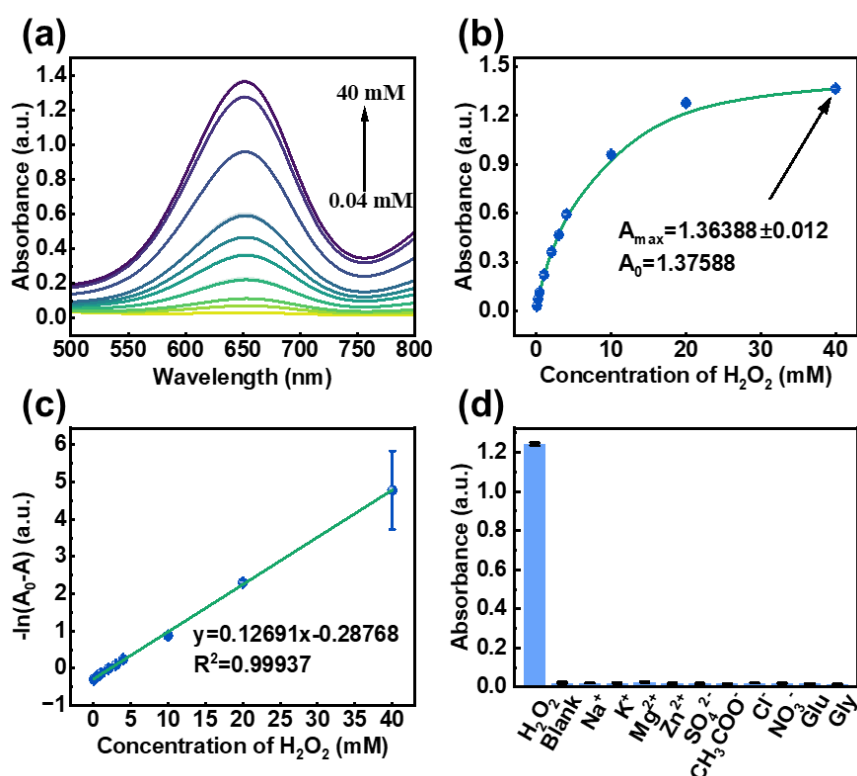


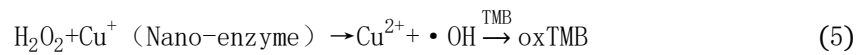
图 5 (a) CuZn-ZIF-L/TA、H₂O₂ 和 TMB 比色体系的吸光度与 H₂O₂ 浓度的关系; (b) 比色体系在 652 nm 处的吸光度与 H₂O₂ 浓度的关系; (c) 比色信号 ($-\ln(A_0-A)$) 与过氧化氢浓度的线性关系; (d) 比色体系对过氧化氢的选择性分析

表 2 不同纳米酶比色法检测 H₂O₂ 的性能对比

样品名称	线性范围 (mM)	检测限 (μM)	参考文献
FeCo-CDs	0.2-1.5	0.77	[24]
CuO-g-C ₃ N ₄	0.002-0.15	1.2	[25]
Fe-N-C SANs	0.01-0.6	4.360	[26]
Fe(COOH) ₂ -PBA	0.001-0.0125	0.705	[27]
MoS ₂ /C-Au ₆₀₀ nanospheres	0.01-0.2	1.82	[28]
Ir _{NCS} @Ti-MOF	0-0.9	14.12	[29]
CA-PAMAM/HRP	0.005-0.5	1.1	[30]
CuZn-ZIF-L/TA	0.04-40	0.74	本工作

3.5 亚硫酸盐的检测

为了灵敏检测亚硫酸盐的浓度，设计了两步法的实验方案。由于酸碱平衡，在 pH 为 6 时，HSO₃⁻/SO₃²⁻主要以 HSO₃⁻的形式存在。所以本文选择 HSO₃⁻作为待测物是合理的。第一步先使纳米酶、H₂O₂ 和 TMB 体系充分反映，达到显色稳定。之后进行第二步，向反应体系中引入亚硫酸氢钠溶液，测试吸光度的变化量。加入亚硫酸氢根之后同时存在着抑制显色部分的反应，和增强显色部分的反应。在反应 200 s 内，吸光度相对平稳，此时发生的反应主要为 HSO₃⁻将蓝色的 oxTMB 还原为无色的 TMB（方程式 3）和 HSO₃⁻消耗部分未完全反应的 H₂O₂（方程式 4）。而增强显色部分的反应（方程式 5）虽然也在发生，但是其贡献会被 HSO₃⁻的还原性作用覆盖掉。



基于上述原理，设计了基于 CuZn-ZIF-L/TA 纳米酶的 HSO₃⁻比色灵敏检测。如图 6 (a) 所示，以 TMB 作为显色探针对 HSO₃⁻ 浓度实现响应。随着体系中 HSO₃⁻ 浓度的不断增加，体系吸光度逐渐降低。图 6 (b) 中体系在 652 nm 的吸光度随 HSO₃⁻ 的浓度变化存在幂函数的关系。对数据进行线性函数的构造，其中 A₀ 对应着 HSO₃⁻ 浓度为 0 时的空白样的吸光度平均值，ΔA 为每个吸光度数据相对于空白样的变化量。在 HSO₃⁻ 浓度为 2-4000 μM 范围内，添加 HSO₃⁻ 的体系吸光度均低于空白，因此可以取 ΔA 的平方 ((ΔA)²) 作为线性关系需要探测的信号。构造 (ΔA)² 与 HSO₃⁻ 浓度的线性关系的函数，得到图 6 (c) 的线性方程：y=0.1773x+0.01448，线性相关系数为 R²=0.98891。由公式 $\text{LOD} = \frac{3\sigma}{k}$ 计算检测限，LOD=1.04 μM，线性范围为 2-4000 μM。

食品中的离子、小分子等可能引起吸光度的偏移，对检测准确性造成影响。如图 6 (d) 所示，Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、SO₄²⁻、CH₃COO⁻、Cl⁻、NO₃⁻、葡萄糖、甘氨酸等干扰物质加入后的吸光度与空白样接近，表明此方法对 HSO₃⁻ 的检测具有良好的选择性。

近年来，纳米酶对亚硫酸盐的比色检测的研究有很多，表 3 中展示了部分其他纳米酶比色检测亚硫酸盐的检测效果。与其他纳米酶相比，本工作设计的利用 CuZn-ZIF-L/TA 的两步法检测 HSO₃⁻ 的方法具有较低的检测限和较宽的检测范围，能为实际食品中亚硫酸盐的检测提供快速灵敏的传感方案。

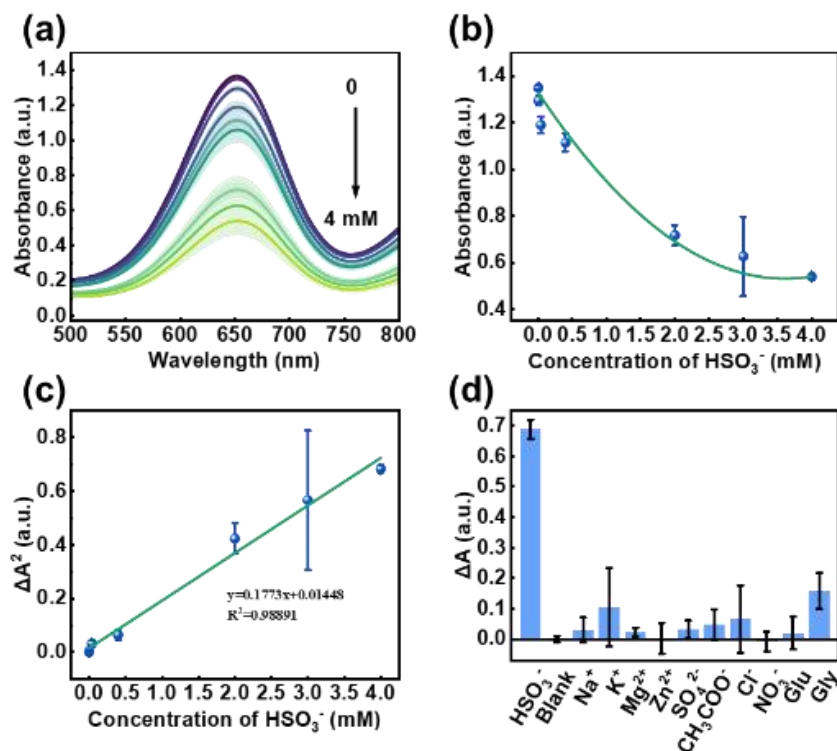


图 6 (a) CuZn-ZIF-L/TA、H₂O₂和 TMB 比色体系的吸光度与 HSO₃⁻浓度的关系；(b) 比色体系在 652 nm 处的吸光度与 HSO₃⁻浓度的关系；(c) 比色信号 (ΔA)² 与 HSO₃⁻和 H₂O₂浓度的线性关系；(d) 比色体系对 HSO₃⁻的选择性分析

表 3 不同纳米酶比色检测亚硫酸盐的性能对比

样品名称	pH	线性范围 (μM)	检测限 (μM)	参考文献
MIL-53(Fe/Mn)	3	6.25-75	0.625	[31]
Alginate-Cu	7	2-100	0.78	[32]
AgNCs	—	125-2000	37.0	[33]
Au@Ag NPs	—	8-18	1.60	[34]
CuZn-ZIF-L/TA	6	2-4000	1.04	本工作

4 结论

本文以 CuZn-ZIF-L 为前驱体，利用单宁酸的包覆和刻蚀作用，在前驱体表面形成更多的活性位点，构建了改性 MOF 纳米酶 CuZn-ZIF-L/TA。探究 CuZn-ZIF-L/TA 的结构、性质和类过氧化物酶活性的催化机理，实现了基于此纳米酶的 H₂O₂ 和亚硫酸盐的灵敏比色检测。对 H₂O₂ 的检测限为 0.74 μM。线性范围为 0.04-40 mM。对亚硫酸盐的检测限为 1.04 μM。线性范围为 2-4000 μM。通过催化机理分析，证实了此改性方法优化了配位结构和纳米酶的催化能力。本章工作在 MOF 基纳米酶材料设计与食品安全中实际的 H₂O₂ 和亚硫酸盐检测方面有积极意义。

参考文献：

[1] Shikuan S, Gonzalez F V, Xiaochuan W, et al. Peroxidase-mimicking nanozymes for rapid detection of infectious diseases[J]. Advanced science, 2026, 0:No. e24259.

-
- [2] Zixing L, Xiaofeng L, Xiaofang C, et al. Fe/MOF based platform for NIR laser induced efficient PDT/PTT of cancer[J]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2023, 11: 1156079.
- [3] Zhengyun W, Yuchen H, Kunqi X, et al. Natural oxidase-mimicking copper-organic frameworks for targeted identification of ascorbate in sensitive sweat sensing[J]. *Nature communications*, 2023, 14(1): 69.
- [4] Biyao D, Quanyong D, Taiqi H, et al. ATP-enhanced PB@MIL-100(Fe) nanozyme enables dual-mode ratiometric colorimetric and smartphone-based hydrogel detection of nitrite in food samples[J]. *Analytica chimica acta*, 2026, 1393: 345192.
- [5] Mohammed A, Yamamah B J, Mazin A A, et al. Synthesis of Cu/Co-hybrid MOF as a multifunctional porous compound in catalytic applications, synthesis of new nanofibers, and antimicrobial and cytotoxicity agents[J]. *Frontiers in materials*, 2023, 10. 1214426.
- [6] Mingxia H, Tianyi Z, Qiushu C, et al. NiCoNC nanoenzyme enhances the performance of insecticides against *Solenopsis invicta* by inhibiting the gene expression of P450[J]. *Chemical engineering journal*, 2023, 474: 145569.
- [7] Wenjie T, Rui X, Jiarui Z, et al. Co(II)-Based metal-organic framework derived CA-CoNiMn-CLDHs with peroxidase-like activity for colorimetric detection of phenol[J]. *Materials*, 2023, 16(18): 6212.
- [8] Xiang H, Songtao Z, Yijian T, et al. Advances in metal-organic framework-based nanozymes and their applications[J]. *Coordination chemistry reviews*, 2021, 449: 214216.
- [9] Mengmeng W, Hongjin Z, Shuangshuang Y, et al. Fabrication of MOF-based nanozyme sensor arrays and their application in disease diagnosis[J]. *Coordination chemistry reviews*, 2025, 532: 216506.
- [10] Xingliang C, Shuojiang L, Yuling H. Recent advances in nanozyme sensors based on metal-organic frameworks and covalent-organic frameworks[J]. *Biosensors*, 2024, 14(11): 520.
- [11] Xie M, Chen S, Chen K, et al. Metal-organic framework-based nanozymes: types, activity regulation and analytical applications[J]. *Analyst*, 2025, 150(14): 3011-3025.
- [12] Kayani F K. Nanozyme based on bimetallic metal-organic frameworks and their applications: A review[J]. *Microchemical journal*, 2025, 208: 112363.
- [13] Yuwei P, Rui Q, Minhui H, et al. The interactions of polyphenols with Fe and their application in Fenton/Fenton-like reactions[J]. *Separation and purification technology*, 2022, 300: 121831.
- [14] Jieying L, Song G, Jian L, et al. Hierarchically porous biocatalytic MOF microreactor as a versatile platform towards enhanced multienzyme and cofactor - dependent biocatalysis[J]. *Angewandte chemie*, 2021, 133(10): 5481-5488.
- [15] Wei Q, Weijian H, Yiman S, et al. TA-etched ZIF-8 nanofillers optimized polyethyleneimine membrane for methanol/dimethyl carbonate separation[J]. *Separation and purification technology*, 2026, 380: 135190.
- [16] Hongcheng H, Wenhui X, Cheng W, et al. Regulating coordinatively unsaturated Co active sites in TA@ZIF-L(Co) via tannic acid for efficient photoelectrochemical water oxidation[J]. *Separation and purification technology*, 2025, 354: 129246.
- [17] Justin N, Sivakumar B, S. T P, et al. XRD and spectroscopic investigations of ZIF-microchannel glass plates composites[J]. *Materials*, 2023, 16(6): 2410.
- [18] Rizhi C, Jianfeng Y, Qinfen G, et al. A two-dimensional zeolitic imidazolate

framework with a cushion-shaped cavity for CO₂ adsorption[J]. Chemical communications, 2013, 49(82): 9500–9502.

[19] Mor J, Utpalla P, Kumar R, et al. Evolution of local structure and pore architecture during zeolitic imidazolate framework-L to zeolitic imidazolate framework-8 phase transformation investigated using raman, extended X-ray absorption, and positron annihilation lifetime spectroscopy[J]. Chemistry of materials, 2023, 35(17): 6626–6636.

[20] Lizeng G, Jie Z, Leng N, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. Nature nanotechnology, 2007, 2(9): 577–583.

[21] Panferov G V, Wang X, Liu J. Characterization of nanozyme kinetics for highly sensitive detection[J]. Analyst, 2024, 149: 2223–2226.

[22] Kun Y, Mengjie L, Huining C, et al. MOF-818 nanozyme-based colorimetric and electrochemical dual-mode smartphone sensing platform for in situ detection of H₂O₂ and H₂S released from living cells[J]. Chemical engineering journal, 2023, 451: 138324.

[23] Xuesong W, Ke L, Qing H, et al. Development of laccase-like nanozymes and the analytical applications in conjunction with emerging sensing technologies[J]. Talanta, 2025, 296: 128524.

[24] Shuangli W, Zhixuan Y, Jianguo Z, et al. Fluorescent nanozyme based on bimetallic Fe/Co-doped carbon dots for dual-mode detection of ascorbic acid and hydrogen peroxide[J]. Analytical chemistry 2025, 97(28): 15320–15328.

[25] Junlun Z, Wei N, Qin W, et al. In situ growth of copper oxide-graphite carbon nitride nanocomposites with peroxidase-mimicking activity for electrocatalytic and colorimetric detection of hydrogen peroxide[J]. Carbon 2018, 129: 29–37.

[26] Wei L, Shuhan C, Haifeng Z, et al. Fe-N-C single atom nanozymes with dual enzyme-mimicking activities for colorimetric detection of hydrogen peroxide and glutathione[J]. Journal of materiomics 2022, 8 (6): 1251–1259.

[27] Yue T, Qian L, Dan Y, et al. Ferrocene derivatives constructed prussian blue analogs for colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose[J]. Biosensors and bioelectronics 2025, 287: 117714.

[28] Haohao S, Yan G, Narisu H, et al. Electronic coupling between molybdenum disulfide and gold nanoparticles to enhance the peroxidase activity for the colorimetric immunoassays of hydrogen peroxide and cancer cells[J]. Journal of colloid and interface science 2020, 578: 366–378.

[29] Shengdong M, Yuting D, Zhenyu X, et al. Ir cluster-anchored MOFs as peroxidase-mimetic nanoreactors for diagnosing hydrogen peroxide-related biomarkers[J]. ACS applied materials & interfaces 2022, 14(51): 56635–56643.

[30] Er E, Yesiltepe O, Yezer I, et al. Peroxidase conjugated electrospun nanofibers as a platform in non-invasive biosensors for colorimetric sensing of hydrogen peroxide[J]. Microchemical journal 2025, 210: 112860.

[31] Xiaoyue Y, Long F, Chaoyun W, et al. Rapid trace detection of sulfite residue in white wine using a multichannel colorimetric nanozyme sensor[J]. Foods 2023, 12(19): 3581.

[32] Gutema F K, Mekonnen L M, Yilma T B, et al. Rapid colorimetric detection of sulfite in red wine using alginate-copper laccase nanozyme with smartphone as an optical readout[J]. ACS measurement science au 2025, 5(1): 145–154.

[33] Villarino N, Lavilla I, Pena-Pereira F, et al. Silver nanocluster-based colorimetric/

fluorimetric dual-mode sensor for the detection of bromide and sulfite in waters and wastewaters[J]. Microchemical journal 2024, 196: 109685.

[34] Yang Z, Xiaojie L, Nuo C, et al. Headspace single-drop microextraction-digital image colorimetry based on Au@Ag nanoparticles for detection of sulfite and sulfide in environmental water samples[J]. Microchimica acta 2025, 192(9): 625.

(通讯作者: 陈艳伟 E-mail: yanweichen@nenu.edu.cn.)

作者贡献声明*:

邵雨晴: 提出研究思路, 设计及进行实验, 论文起草;

林燕, 王金玲: 采集和分析数据;

陈艳伟: 论文设计及最终版本修订。

* 作者贡献可分为以下内容: 1) 研究命题的提出、设计, 包括某个具体观点或方法的提出; 2) 研究过程的实施, 例如进行试验或调查; 3) 数据的获取、提供与分析; 4) 论文起草或最终版本修订。每个研究论文可以根据自己研究活动的特点进一步详细表述作者贡献。有些研究活动可能还涉及其他研究工作和贡献, 可以进一步具体表述。在有多个作者署名的论文中, 在论文最后必须注明每个作者在上述四个方面中的具体贡献。