

基于Cu-N-C纳米酶的比色分析法快速检测泡椒猪皮中的过氧化氢

岳晓月, 郝辰旭, 闫曙亮, 符龙, 赵电波

Development of a Cu-N-C Nanozyme-based Colorimetric Sensor for Rapid Hydrogen Peroxide Detection in Pork Skin with Pickled Pepper

YUE Xiaoyue, HAO Chenxu, YAN Shuliang, FU Long, and ZHAO Dianbo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060453>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

一种新型过氧化氢传感器的构建及其在牛奶中的应用

Construction of a Novel Hydrogen Peroxide Sensor and Its Application in Milk

食品工业科技. 2020, 41(22): 253-259 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020082>

竹木筷中过氧化氢在食品模拟物中迁移量的测定及其迁移规律的研究

Determination of Hydrogen Peroxide Migration Amount from Bamboo and Wooden Chopsticks to Food Simulants and Its Migration Law

食品工业科技. 2021, 42(18): 57-63 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010084>

过氧化氢对鲜湿粉条中优势腐败菌阿氏芽孢杆菌的抑菌活性及机制

Antibacterial Activity and Mechanism of Hydrogen Peroxide against the Dominant Strain *Bacillus aryabhattai* in Fresh and Wet Vermicelli

食品工业科技. 2024, 45(21): 111-120 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010127>

两种常用适配体的纳米金比色法快速检测牛奶中黄曲霉毒素M₁的评价研究

Evaluation of Gold Nanoparticles Colorimetric Sensing Based on Two Commonly Aptamer for Rapid Detecting Aflatoxin M₁ in Milk

食品工业科技. 2024, 45(8): 284-292 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050332>

微波辅助过氧化氢半干法降解魔芋葡甘聚糖工艺优化及其特性研究

Optimization of Microwave-assisted Semidry Degradation of Konjac Glucomannan with Hydrogen Peroxide and Its Characteristics

食品工业科技. 2024, 45(23): 189-197 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010366>

超声辅助碱性过氧化氢法提取溪蜜柚幼果纤维素的工艺优化及结构表征

Optimization of Ultrasonic Assisted Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction and Structural Characterization of Cellulose from Young Fruit of Guanxi Honey Pomelo

食品工业科技. 2022, 43(8): 249-257 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080287>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

岳晓月, 郝辰旭, 闫曙亮, 等. 基于 Cu-N-C 纳米酶的比色分析法快速检测泡椒猪皮中的过氧化氢 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 275–283. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060453

YUE Xiaoyue, HAO Chenxu, YAN Shuliang, et al. Development of a Cu-N-C Nanozyme-based Colorimetric Sensor for Rapid Hydrogen Peroxide Detection in Pork Skin with Pickled Pepper[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 275–283. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060453

· 分析检测 ·

基于 Cu-N-C 纳米酶的比色分析法快速检测泡椒猪皮中的过氧化氢

岳晓月^{1,2,3}, 郝辰旭¹, 闫曙亮¹, 符龙¹, 赵电波^{1,2,3,*}

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450001;

2. 冷链食品加工与安全控制教育部重点实验室, 河南郑州 450001;

3. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南郑州 450001)

摘要: 为构建一种新型的快速检测过氧化氢的比色传感器, 采用热处理法将单原子 Cu 分散固定在超薄的氮化二维碳膜上, 得到 Cu-N-C 纳米酶。通过 TEM、XPS、XRD、FT-IR 表征该纳米酶, 并将基于此纳米酶的比色传感器应用于泡椒猪皮中过氧化氢的快速检测。结果表明: Cu-N-C 纳米酶具有良好的过氧化物酶活性, 可以催化 H₂O₂ 分解产生羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$), 将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 氧化生成 oxTMB, 呈现明显的蓝色。基于 Cu-N-C 纳米酶构建的比色传感器用于 H₂O₂ 检测, 检测限为 0.81 $\mu\text{mol/L}$, 检测范围为 1~1000 $\mu\text{mol/L}$, 具有良好的选择性, 检测结果与国标方法基本相同, 能够应用于泡椒猪皮中 H₂O₂ 的快速检测。该方法具有简便、灵敏及成本低等优势, 能够实现 H₂O₂ 的快速检测, 具有良好的市场前景。

关键词: 泡椒猪皮, 过氧化氢, 快速检测, 比色法, 纳米酶

中图分类号: TS251.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)12-0275-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060453



本文网刊:

Development of a Cu-N-C Nanozyme-based Colorimetric Sensor for Rapid Hydrogen Peroxide Detection in Pork Skin with Pickled Pepper

YUE Xiaoyue^{1,2,3}, HAO Chenxu¹, YAN Shuliang¹, FU Long¹, ZHAO Dianbo^{1,2,3,*}

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Key Laboratory of Cold Chain Food Processing and Safety Control, Ministry of Education, Zhengzhou 450001, China;

3. Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: To develop a novel colorimetric sensor for the rapid detection of hydrogen peroxide, single-atom Cu was immobilized on an ultrathin, nitrogenated two-dimensional carbon matrix via a thermal method, yielding a Cu-N-C nanozyme. This nanozyme was then characterized using transmission electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy. The colorimetric sensor based on this nanozyme was used for the rapid detection of hydrogen peroxide in pork skin with pickled pepper. The results revealed that the Cu-N-C nanozyme exhibited excellent peroxidase activity, catalyzing the decomposition of H₂O₂ to generate hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$). These radicals were capable of oxidizing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to oxTMB, resulting in a distinct blue color. The colorimetric sensor based on Cu-N-C nanozyme was used for H₂O₂ detection with good selectivity, showing a good linear relationship in the range of 1~1000 $\mu\text{mol/L}$ with a detection limit of 0.81 $\mu\text{mol/L}$. The detection results obtained by the developed sensor closely matched those obtained using national standard

收稿日期: 2024-07-02

基金项目: 河南省重点研发与推广专项科技攻关项目 (232102111061)。

作者简介: 岳晓月 (1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: yuexiaoyue1020@163.com。

* 通信作者: 赵电波 (1975-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 肉品加工与质量安全控制, E-mail: zhaodb212@163.com。

methods, indicating its effectiveness and suitability for the rapid detection of H_2O_2 in pork skin with pickled pepper. The proposed method has the advantages of simplicity, sensitivity and low cost, which can achieve the rapid detection of H_2O_2 , showing a promising market prospect.

Key words: pork skin with pickled pepper; hydrogen peroxide (H_2O_2); rapid detection; colorimetric method; nanozyme

过氧化氢(Hydrogen Peroxide, H_2O_2)是一种重要的加工助剂,广泛用于食品中的漂白^[1]、防腐^[2]、杀菌^[3]等。但是不规范使用过氧化氢,可能会在食品中造成过氧化氢残留,进而污染食品。如果误食过量过氧化氢残留的食品,会导致人体发生氧化应激反应产生大量自由基,从而诱发细胞损伤、癌症以及各种神经系统疾病,如阿尔茨海默症、帕金森病和亨廷顿病^[4-7],对人体健康造成严重威胁。因此,世界各国对食品中 H_2O_2 的残留量有严格的规定。联合国粮食及农业组织规定,在牛奶中 H_2O_2 的残留量不得高于 0.25%^[8]。美国食品药品监督管理局(FDA)规定,在包装食品中 H_2O_2 残留量必须低于 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[9]。日本厚生省强制要求 H_2O_2 必须分解或从最终产品中去除^[10]。我国在 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[11] 中规定 H_2O_2 作为食品加工助剂,可以在各类食品加工过程中使用,一般应在制成最终成品前除去,无法完全除去的,应尽可能降低其残留量。为了避免 H_2O_2 被食品生产厂家违规使用,有许多研究人员开发了可以检测 H_2O_2 含量的方法,包括化学滴定分析法^[12]、近红外分析法^[13]、高效液相色谱^[14]、电化学^[15]、化学发光法^[16]等。其中,以化学分析法和仪器分析法为代表的传统过氧化氢检测方法存在仪器体积大、耗时长、需要专业人员操作等弊端,难以对食品样品进行现场即时检测。因此,建立一种现场快速定量检测食品中 H_2O_2 含量的分析方法具有重要意义。

催化剂的性能与暴露的活性位点成正比关系,传统纳米酶通常表现出固体或颗粒形态,容易损失活性位点^[17],而单原子纳米酶能最大限度地暴露出丰富的单原子金属活性中心,提高原子暴露率,从而增加活性位点的数量^[18],具有极高的催化活性、稳定性、选择性和 100% 的原子利用率。Yan 等^[19]利用原子层沉积技术合成 $\text{Pd}_1/\text{石墨烯}$,使孤立的 Pd 单原子分散在石墨烯载体上,在 1,3-丁二烯的选择性加氢反应中,单原子 $\text{Pd}_1/\text{石墨烯}$ 催化剂在 50 $^\circ\text{C}$ 左右的温和反应条件下表现出对丁烯约 100% 的选择性,转化率为 95%。Li 等^[20]将分离的单个 Pt 原子锚定在 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 上得到 Pt-CN ,具有高分散性和稳定性,可以实现 Pt 原子的最大利用率,并显著增强光催化 H_2 演化活性,催化活性远高于 Pt 纳米颗粒和 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 。因此,本研究将单个分离的 Cu 原子锚定在超薄氮化碳纳米片上,得到 Cu-N-C 纳米酶。通过第一性原理密度泛函理论(DFT)计算表明,单原子 Cu 对 O_2 和 -OOH 表现出良好的吸附能,可以改善 O-O 键的拉伸,具有加速活性位点上氧化还原过程的作用。与

Pt/C 催化剂相比,Cu-N-C 纳米酶具有超薄纳米片结构、丰富的单原子 Cu 活性位点、最大的 Cu 原子暴露量以及对 O_2 和 -OOH 的良好吸附协同作用等优点,表现出优异的催化活性和稳定性。由于 H_2O_2 常在泡发类产品中用于漂白和消毒,尤其是在泡椒凤爪中检测出 H_2O_2 的研究报告屡见不鲜^[21],但有关其他泡椒食品的研究较少,而选择泡椒猪皮作为检测对象是因为其吸水性和脂肪含量能够显著影响 H_2O_2 的残留和检测,这使得泡椒猪皮成为检测 H_2O_2 残留的合适样本。因此,本研究决定采用单原子纳米酶来构建比色传感器用于检测泡椒猪皮中的 H_2O_2 。

在本研究中,以乙酸铜、L-谷氨酸和三甲基-1,3,5-苯三甲酸为原料,使用简单的液相沉积方法合成了用作前体的无氮 Cu-MOF,在 800 $^\circ\text{C}$ 的氩气氛下将前体与双氰胺的混合物进行热处理,然后进行氧饱和酸处理以去除独立的金属残留物,便成功制备了单原子 Cu 掺杂的 Cu-N-C(图 1A)。Cu-N-C 具有过氧化物酶活性,可以催化 H_2O_2 分解产生自由基,催化 TMB 氧化发生颜色反应(图 1B),在 652 nm 处具有吸收峰。基于 Cu-N-C 建立比色传感器,可以快速灵敏和选择性地检测泡椒猪皮中的 H_2O_2 含量。

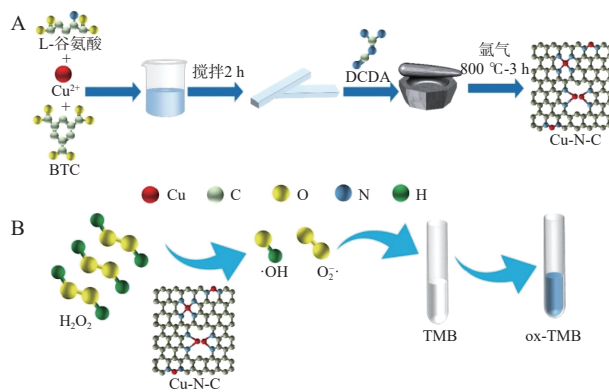


图1 Cu-N-C 纳米酶的制备和 H_2O_2 比色分析示意图

Fig.1 Schematic diagram for synthesis and colorimetric analysis of H_2O_2 based on Cu-N-C nanozyme

注: A. 基于 Cu-N-C 纳米酶的制备; B. 基于 Cu-N-C 纳米酶比色分析法快速检测 H_2O_2 原理示意图。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

一水合乙酸铜(II)(Copper(II) acetate monohydrate, $\text{Cu}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、L-谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu)和双氰胺(dicyandiamide, DCDA) 生工生物工程上海(股份)有限公司; 三甲基-1,3,5-苯三甲酸(1,3,5-benzenetricarboxylic acid, BTC) 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙酸钠 天津市科密欧化学试剂有限公司; 乙酸和无水乙醇 天津市富宇精细化工有限公司; 甲醇 天津市大茂化学试剂厂; 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide, DMPO)、2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮盐酸盐 (2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinone hydrochloride, TEMP) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 泡椒猪皮 当地的丹尼斯超市, 品牌为“傻女婿”; 本实验所用试剂均为分析纯。

S3000 超声波清洗机 郑州睿科生化科技有限公司; *Tecan Spark 20M 多功能酶标仪 瑞士 TECAN 集团公司; SIGMA 3K15 台式高速冷冻离心机 德国 SIGMA 公司; HWET-智能磁力搅拌器 巩义市予华仪器有限责任公司; VORTEX GENIE-2 漩涡混均仪 美国 Scientific Industries 公司; DHG-9076A 电热鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; LE438 型 pH 计、ME 204 电子天平 梅特勒-托利多(上海)有限公司; ZEISS GeminiSEM 300 扫描电子显微镜(SEM) 德国卡尔·蔡司股份公司; FEI Talos-F200S 透射电子显微镜(TEM)、Thermo Scientific K-Alpha X 射线光电子能谱仪(XPS) 美国赛默飞世尔科技公司; Vertex 70 傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR) 美国 Bruker 公司; Rigaku D/MAX-2600 X 射线衍射仪(XRD) 日本 Rigaku 公司; GR.TF80/11 真空管式气氛炉 上海贵尔机械设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Cu-N-C 纳米酶的合成与表征

1.2.1.1 Cu-N-C 纳米酶的合成 参考 Zhu 等^[22]的方法, 本文采用热处理法合成 Cu-N-C。在 500 mL 去离子水中加入 2.092 g $\text{Cu}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 0.771 g L-谷氨酸, 搅拌溶解得到溶液 A。在 450 mL 水和 50 mL 乙醇的混合溶液中加入 1.160 g 三甲基-1,3,5-苯三甲酸(BTC), 搅拌溶解得到溶液 B。将溶液 A 与溶液 B 混合, 常温搅拌 2 h, 得到蓝色沉淀, 用去离子水洗涤, 并在 40 °C 的电热鼓风干燥箱中干燥得到蓝色固体粉末。将 0.1 g 蓝色固体粉末与 1.0 g 双氰胺研磨混匀, 在 800 °C 的氩气气氛中以 3 °C/min 的降温速率退火 3 h。冷却至室温后, 用氧气饱和的质量分数 5% 的 HCl 溶液连续浸泡产物 4 h, 以除去独立的金属残留物。之后将溶液以 8000 r/min 离心, 用去离子水洗涤后在 40 °C 的电热鼓风干燥箱中干燥得到材料 Cu-N-C。

1.2.1.2 透射电镜(TEM)表征 将 1 mg 纳米酶分散于 1 mL 无水乙醇中, 超声 30 min, 取 10 μL 溶液滴于有碳膜的铜网上, 置于 40 °C 干燥箱中烘干, 之后在 FEI 透射电子显微镜下进行表征。

1.2.1.3 X 射线光电子能谱(XPS)测试 将 20 mg

Cu-N-C 纳米酶放于干燥箱中烘干, 用研钵研磨成细粉, 将粉末粘在双面碳导电胶的样品台上, 用 X 射线光电子能谱仪进行测试。

1.2.1.4 X 射线衍射(XRD)测试 将 Cu-N-C 纳米酶干燥后用研钵研磨成细粉末, 将粉末铺平在 XRD 用的玻璃皿中, 于 X 射线粉末衍射仪下进行表征。

1.2.1.5 红外光谱(FT-IR)测试 将样品与 KCr 以 1:200 的比例混合并烘干, 采用压片法将其制成圆片, 使用 Vertex 70 傅里叶变换红外光谱仪对圆片进行测试(波数范围 0~4000 cm^{-1})。

1.2.2 Cu-N-C 纳米酶的过氧化物酶活性和稳态动力学 Cu-N-C 纳米酶具有良好的过氧化物酶活性, 能催化 H_2O_2 分解产生羟基自由基·OH 和超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 再将无色的 TMB 氧化为蓝色的 oxTMB, 在 652 nm 处出现吸收峰。酶稳态动力学方法借鉴了 Liu 等^[23]的研究, 具体的操作步骤如下。首先, 将 100 μL 1 mg/mL Cu-N-C 溶液和 100 μL 20 mmol/L TMB 溶液加入到 300 μL (0.2 mol/L, pH3) 的 HAc-NaAc 缓冲液中, 再加入 100 μL 10 mmol/L H_2O_2 溶液, 混合均匀, 室温下孵育 15 min, 检测并记录 652 nm 处的吸光度。通过比较在 652 nm 处的紫外吸收强度, 来探究 Cu-N-C 纳米酶催化 TMB 的最佳条件, 再通过改变 TMB 浓度来研究 Cu-N-C 的稳态动力学参数 K_m 和 V_{\max} 。

1.2.3 H_2O_2 的比色检测 对于 H_2O_2 的比色检测, 同样参照了 Liu 等^[23]的方法, 具体操作如下。将 100 μL 1 mg/mL Cu-N-C 溶液、100 μL 20 mmol/L TMB 溶液和 500 μL 不同浓度的 H_2O_2 标准溶液依次加入到 300 μL (0.2 mol/L, pH3) 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中, 室温下孵育 15 min, 记录溶液在 652 nm 处的吸光度。

1.2.4 样品中 H_2O_2 的检测 选择泡椒猪皮作为实际样品分析对象, 分析其 H_2O_2 的残留量, 样品前处理参考 GB 5009.226-2016《食品安全国家标准 食品中过氧化氢残留量的测定》^[24], 具体操作如下。取 10.00 g 粉碎均匀的样品溶于水, 转移至 100 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 0.220 g/mL 乙酸锌溶液和 5 mL 0.106 g/mL 亚铁氰化钾溶液, 加水定容, 摇匀, 浸泡 30 min, 用滤纸过滤, 得到样品提取液。之后的操作同实验 1.2.3 部分, 将 H_2O_2 标准溶液替换为样品提取液即可。

1.3 数据处理

本文利用 Origin、Excel 软件进行数据处理并作图, 利用 Advantage 和 MDI jade 软件分别对 XPS 和 XRD 数据进行处理并导出结果数据。

2 结果与分析

2.1 Cu-N-C 的表征

使用透射电子显微镜(TEM)和暗场扫描透射电

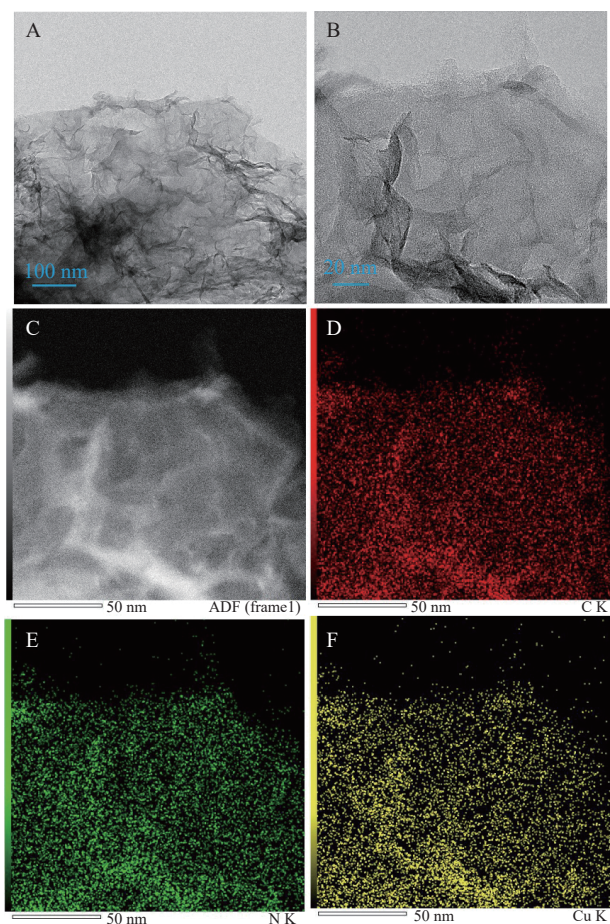


图2 Cu-N-C纳米酶的形貌表征

Fig.2 Morphological characterization of Cu-N-C nanozyme
 注: A与B为不同放大倍数下Cu-N-C的TEM图像(A图放大倍数: 50000, B图放大倍数: 200000); C为暗场扫描透射电子显微镜(STEM, 放大倍数: 120000); D~F分别为C、N、Cu元素映射图像(红色: C; 绿色: N; 黄色: Cu)。

子显微镜(STEM)研究 Cu-N-C 纳米酶的形态和结构组成。如图 2A 和图 2B 是 Cu-N-C 的 TEM 图像, 显示了其二维超薄纳米片结构, 其中单个黑点是单个 Cu 原子。图 2C 是 Cu-N-C 的 STEM 图像, 表明单个 Cu 原子均匀分布在 Cu-N-C 中, 而不是在纳米颗粒或团簇中。图 2D~图 2F 是 Cu-N-C 中 C、N、Cu 三种元素的映射图像, 表明 C、N、Cu 元素是均匀地分布在 Cu-N-C 中, 其中 C、N、Cu 的原子数比为 23.32:7.11:1。上述研究初步表明该材料成功合成。

利用 X 射线光电子能谱(XPS)研究了 Cu-N-C 的化学组成。如图 3A 所示, Cu-N-C 的 XPS 总图谱在 284.76、397.19 和 933.94 eV 附近有三个峰, 分别为 C1s、N1s 和 Cu2p, 表明 C、N 和 Cu 元素在 Cu-N-C 中共存。如图 3B 所示, 在 C1s 图谱中只有一个峰, 表明 Cu-N-C 中 C 只以一种形式存在。如图 3C 所示, N1s 图谱中在 398.07、400.04 和 403.08 eV 附近有三个峰, 这些峰可分别归因于吡啶 N、石墨 N 和氧化 N^[22]。其中, 高比例的吡啶 N 位点有利于与单原子金属配位^[25]。如图 3D 所示, Cu2p 图谱中在 931.82、934.52 和 951.94 eV 附近有三个峰, 其中, 以 931.82 eV 和 934.52 eV 为中心的峰归属于 Cu2p_{3/2} 能级的贡献, 以 951.94 eV 为中心的峰归属于 Cu2p_{1/2} 能级的贡献。Cu2p_{3/2} 能级在 931.82 eV 和 934.52 eV 处有两个峰, 这表明 Cu 在 Cu-N-C 中存在两种化学态, 分别为 Cu⁺和 Cu²⁺^[26], 两种价态铜离子的存在有效提高了 Cu-N-C 纳米酶过氧化物酶活性。

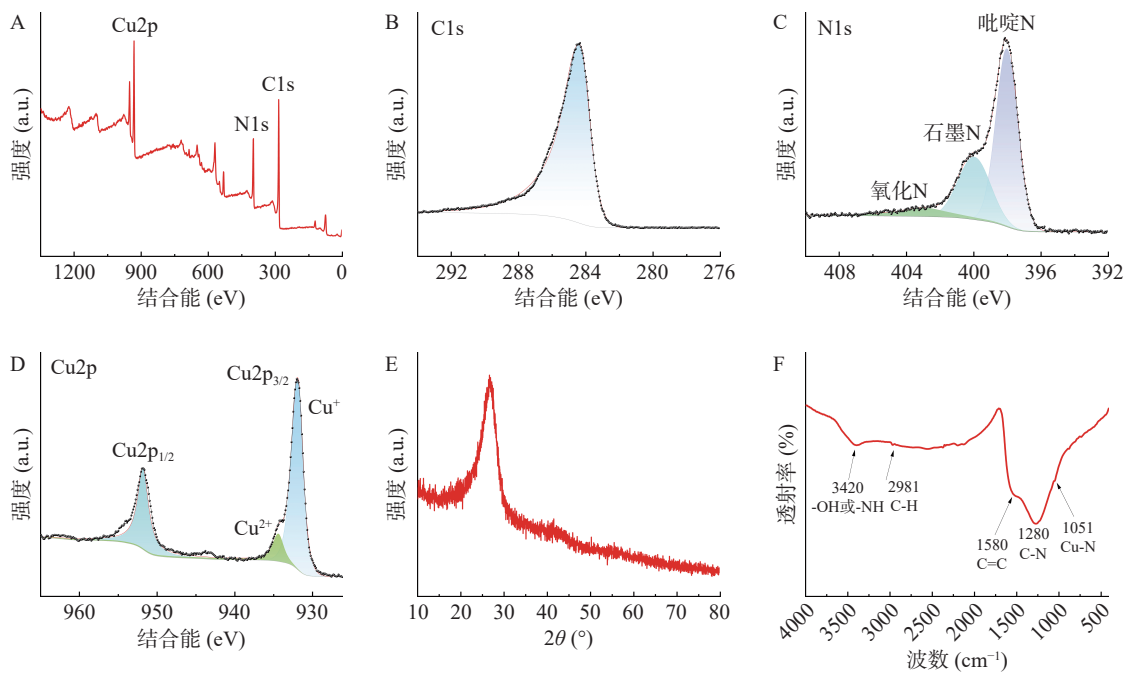


图3 Cu-N-C纳米酶的结构表征

Fig.3 Structural characterization of Cu-N-C nanozyme

注: A: Cu-N-C 的 XPS 总图谱; B: C1s 区域的 XPS 图谱; C: N1s 区域的 XPS 图谱; D: Cu2p 区域的 XPS 图谱; E: Cu-N-C 的 XRD 图谱; F: Cu-N-C 的 FT-IR 图谱。

通过 X 射线衍射(XRD)进一步研究了 Cu-N-C 的晶体结构。如图 3E 所示, Cu-N-C 显示出低结晶度, 在 26.71°附近有一个唯一的弱宽峰, 归属于石墨碳的(002)面, 与上述 XPS 的结果相符合。在 XRD 图谱中没有归属于 Cu 的 XRD 峰, 这表明 Cu 可能以单原子形式存在。

使用傅立叶变换红外(FT-IR)图谱以进一步识别 Cu-N-C 的结构信息。如图 3F 所示, Cu-N-C 纳米酶在 3420 cm^{-1} 附近的 FT-IR 光谱对应于-OH 键或-NH 键的振动峰, 位于 2981 cm^{-1} 和 1580 cm^{-1} 处的吸收峰分别归属于 C-H 键和 C=C 键的拉伸振动, 1280 cm^{-1} 附近的峰有助于 C-N 键的拉伸振动, 1018 cm^{-1} 处的 FT-IR 光谱带对应于 Cu-N 拉伸振动^[27], 这进一步证实了 Cu-N-C 纳米酶的成功制备。

2.2 Cu-N-C 纳米酶的过氧化物酶活性和稳态动力学

在 H_2O_2 存在的情况下, 通过 Cu-N-C 与底物 TMB 的反应来验证 Cu-N-C 的过氧化物酶活性。如图 4A 所示, 在不添加 H_2O_2 的情况下, Cu-N-C 很难直接氧化 TMB。相反, Cu-N-C 能够在 H_2O_2 的帮助下将无色 TMB 氧化为蓝色 oxTMB, 并在 652 nm 处出现吸收峰, 表明 Cu-N-C 具有过氧化物酶活性。为了探究 Cu-N-C 过氧化物酶活性的最佳条件, 通过改变 H_2O_2 体积、Cu-N-C 浓度、TMB 浓度、反应体系 pH 或时间等因素条件, 来探究 Cu-N-C 过氧化物酶活性的最佳条件。如图 4B 所示, 固定 H_2O_2 浓度 (10 mmol/L) 和溶液总体积 (1 mL), 改变加入 H_2O_2 的体积, 结果显示 652 nm 处吸光度随着加入 H_2O_2 体积的增大而增大, 在 H_2O_2 体积为 500 μL 时, 吸光度基本不再变化。如图 4C 所示, 652 nm 处

吸光度随着 Cu-N-C 浓度的升高而增大, 在 Cu-N-C 浓度为 1.4 mg/mL 时, 吸光度达到最大。但在实际研究中发现, 当 Cu-N-C 浓度达到 1.0 mg/mL 时就已经可以满足测试需求, 因此基于绿色环保原则和实际实验需求, 选择 1.0 mg/mL 作为 Cu-N-C 纳米酶的最佳浓度。如图 4D 所示, 652 nm 处吸光度随着 TMB 浓度的增加而持续上升。考虑到 TMB 价格比较昂贵, 秉承经济节约的理念, 选择 20 mmol/L 作为 TMB 的最佳浓度, 以满足实验要求。如图 4E 所示, 随着反应体系 pH 的升高, 652 nm 处吸光度先升高, 再逐渐降低。在 pH3 时, 吸光度达到最大。如图 4F 所示, 随着时间延长, 652 nm 处吸光度一直增大。为了提高检测效率, 所以选择孵育时间为 15 min。因此, 最终选择 pH3, H_2O_2 体积为 500 μL , Cu-N-C 浓度为 1 mg/mL, TMB 浓度为 20 mmol/L, 时间为 15 min 作为反应体系的最佳条件, 后续实验均会在此条件下进行。

为了评估 Cu-N-C 的催化活性, 通过改变 TMB 或 H_2O_2 浓度, 获得了典型的米氏曲线如图 5A 和图 5C 所示。通过双倒数作图获得 Cu-N-C 的最大反应速率 V_{\max} 和米氏常数 K_m 。 K_m 表示底物与酶的亲合力大小, 越低的 K_m 表明酶和底物之间有越强的亲合力。如图 5B 所示, Cu-N-C 对 TMB 的双倒数方程为 $V^{-1}=0.14669 \times [\text{TMB}]^{-1}+0.47345$, 计算得出 Cu-N-C 对 TMB 的米氏常数 K_m 为 0.310 mmol/L, 最大反应速率 V_{\max} 为 2.112×10^{-8} mol/(L·s)。图 5D 显示, Cu-N-C 对 H_2O_2 双倒数方程为 $V^{-1}=0.04258 \times [\text{H}_2\text{O}_2]^{-1}+0.07492$, 算得 Cu-N-C 对 H_2O_2 的米氏常数 K_m 为 0.568 mmol/L, 最大反应速率 V_{\max} 为 $13.348 \times$

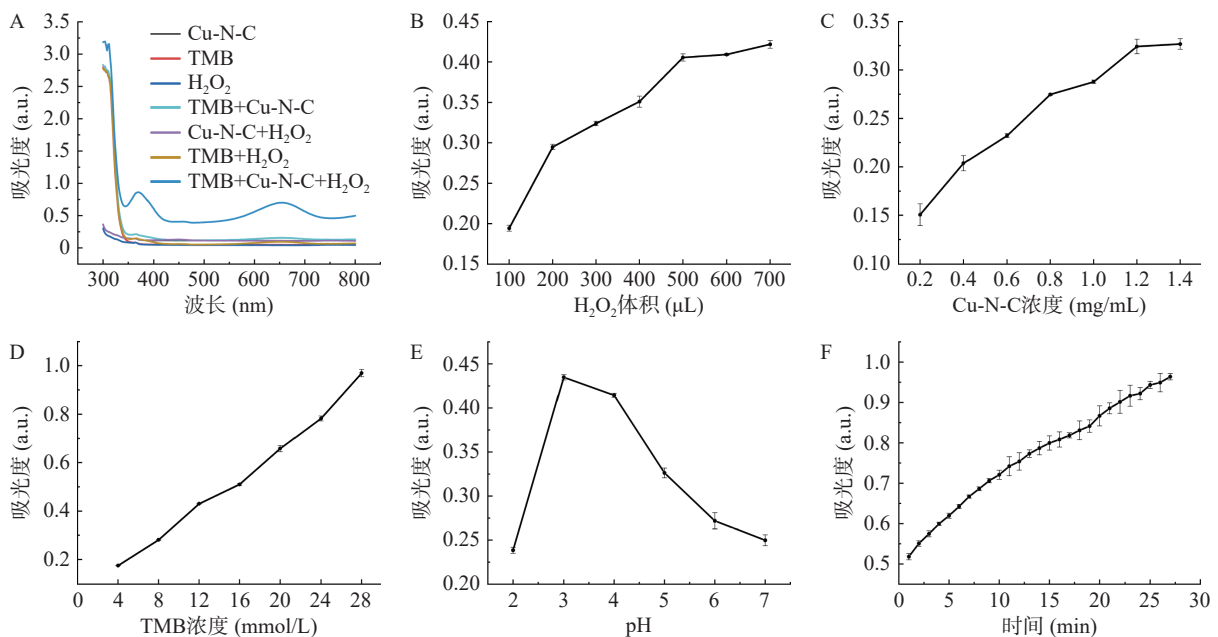


图 4 不同因素对 Cu-N-C 过氧化物酶活性的影响

Fig.4 Effect of different factors on the peroxidase activity of Cu-N-C

注: A: 不同溶液的紫外-可见吸收光谱; B: H_2O_2 体积; C: Cu-N-C 浓度; D: TMB 浓度; E: pH; F: 时间对 Cu-N-C 过氧化物酶 (POD) 活性的影响。

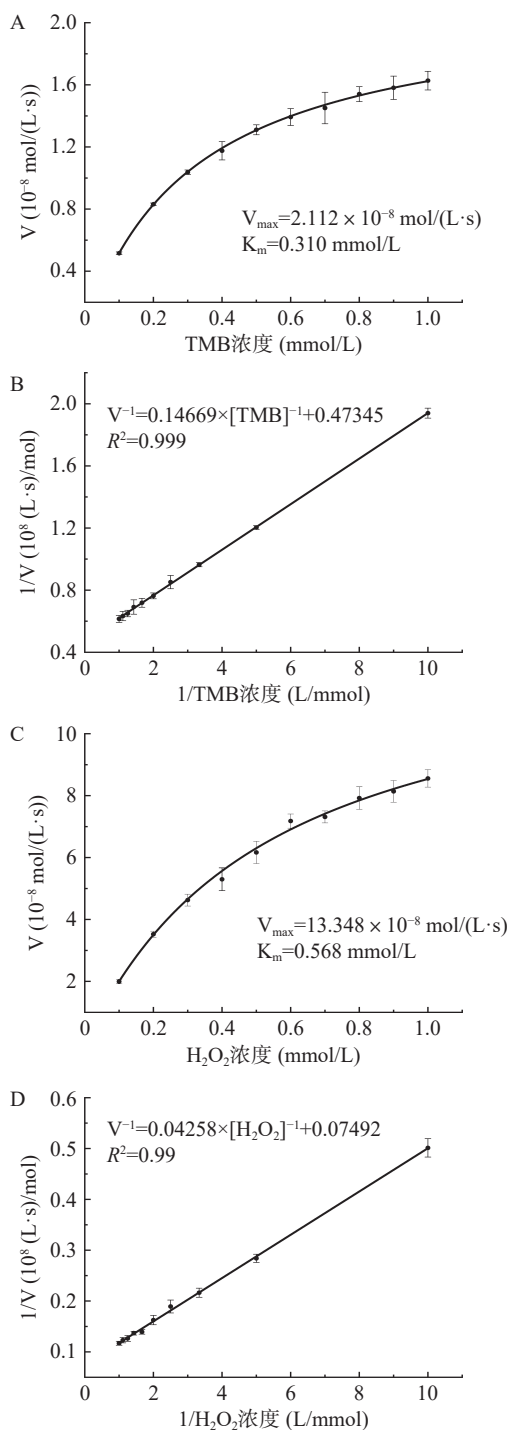


图5 Cu-N-C对TMB和H₂O₂的酶稳态动力学分析

Fig.5 Enzyme steady-state kinetic analysis of Cu-N-C on TMB and H₂O₂

注: A: Cu-N-C对TMB的米氏方程曲线; B: TMB的双倒数曲线; C: Cu-N-C对H₂O₂的米氏方程曲线; D: H₂O₂的双倒数曲线。

10⁻⁸ mol/(L·s)。

如表1所示,将本研究中的Cu-N-C纳米酶与辣根过氧化物酶(HRP)和其他研究中合成的过氧化物纳米酶材料作比较,Cu-N-C对TMB和H₂O₂的K_m低于HRP和多种过氧化物纳米酶,表明Cu-N-C对TMB和H₂O₂两种底物表现出更好的亲和力。同时,Cu-N-C对TMB和H₂O₂的V_{max}高于多种过

氧化物纳米酶,表明Cu-N-C具有良好的催化效率。这可能归功于Cu-N-C纳米酶丰富的单原子Cu活性位点以及最大的Cu原子暴露量,从而能对O₂和-OOH有更好的吸附协同作用,因而表现出优秀的催化活性。

表1 Cu-N-C和其他过氧化物纳米酶的稳态动力学参数
Table 1 Steady state kinetic parameters of Cu-N-C and other peroxidase nanozymes

材料	K _m (mmol/L)		V _{max} (10 ⁻⁸ mol/(L·s))		参考文献
	TMB	H ₂ O ₂	TMB	H ₂ O ₂	
HRP	0.434	3.70	10.00	8.71	[28]
PPy NPs	0.293	0.184	2.992	3.645	[29]
Au/Co ₃ O ₄ -CeO _x NCs	0.122	0.272	0.8	0.4	[23]
Au-NCs	3.59	16.71	0.861	1.302	[30]
Fe-PTs	0.38	18	5.28	1.32	[31]
Mo-CDs	0.245	0.176	3.20	4.76	[32]
Cu-N-C	0.310	0.568	2.112	13.348	本文

2.3 H₂O₂的比色检测

在最佳的实验条件下,以合成的Cu-N-C纳米酶为基础,研究H₂O₂比色传感器的检测性能。如图6A和图6B所示,随着H₂O₂浓度的增加,比色传感器的颜色会逐渐加深,相对应的652 nm处的吸光度(A₆₅₂)也会随之增加,且H₂O₂浓度和A₆₅₂之间呈现良好的线性关系。如图6C所示,线性响应范围为1~1000 μmol/L,线性方程为A₆₅₂=0.00283×[H₂O₂]+0.41654, R²=0.99,检测限LOD为0.81 μmol/L。在表2中,将本研究的H₂O₂比色传感器与其他研究相比,基于Cu-N-C构建的H₂O₂比色传感器具有较好的检测范围和较低检测限,优于多数其他比色传感器,表明Cu-N-C纳米酶具有极好的过氧化物酶活性,这也是因为单原子纳米酶具有更优异的催化活

表2 基于Cu-N-C的H₂O₂比色传感器与其他H₂O₂比色传感器的检测性能比较

Table 2 Comparison of detection performance between H₂O₂ colorimetric sensor based on Cu-N-C and other H₂O₂ colorimetric sensors

纳米材料	信号模式	检测范围(μmol/L)	检测限(μmol/L)	参考文献
SiO ₂ -Ag NPs	比色检测	0.1~1×10 ³	10	[33]
VO ₂ NFs	比色检测	25~1×10 ⁴	18	[34]
VO ₂ NSs	比色检测	488~6.25×10 ⁴	266	[34]
VO ₂ NRs	比色检测	488~1.5625×10 ⁴	410	[34]
FeS NSs	比色检测	5~150	0.19	[35]
Ag NPs	比色检测	0.2~32	0.09	[36]
R-Co ₃ O ₄ NPs	比色检测	1~30	0.43	[37]
Co ₃ O ₄ -MMT NPs	比色检测	10~100	8.7	[38]
Ce-MOF	比色检测	4×10 ³ ~1.6×10 ⁴	10	[39]
Fe ₃ O ₄ -Fe ⁰ /Fe ₃ C	比色检测	/	6.71×10 ⁻⁵	[40]
Fe ^{II} /Fe ^{III} LDHNS	比色检测	0.1~50	0.05	[41]
CoMoO ₄	比色检测	/	0.27	[42]
Fe-Ag ₂ S NCs	比色检测	10~150	7.82	[43]
Cu-N-C	比色检测	1~1000	0.81	本文

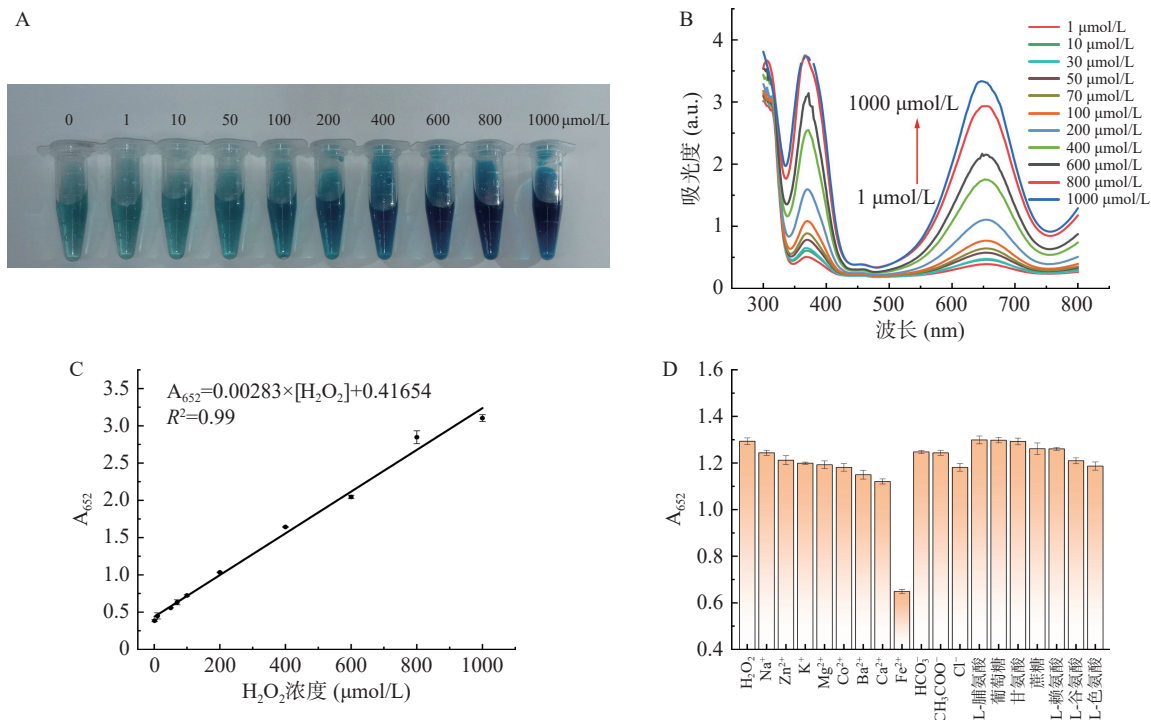


图 6 H₂O₂ 的检测曲线和抗干扰实验

Fig.6 Detection curve and anti-interference experiment of H₂O₂

注: A: 添加不同浓度 H₂O₂ 的传感器颜色照片; B: 添加不同浓度 H₂O₂ 的紫外-可见吸收光谱; C: H₂O₂ 线性标准曲线; D: 不同干扰项(浓度为 1 mg/mL)对 H₂O₂ 吸光度的影响。

性、选择性和原子利用率。

此外, 为了进一步确定 H₂O₂ 比色传感器的选择性, 选择一些常见的离子, 包括金属离子(Na⁺、Zn²⁺、K⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺和 Fe²⁺) 和阴离子(HCO₃⁻、CH₃COO⁻和 Cl⁻), 以及一些常见的物质(包括 L-脯氨酸、葡萄糖、甘氨酸、蔗糖、L-赖氨酸、L-谷氨酸和 L-色氨酸), 进行对照实验。如图 6D 所示, Fe²⁺ 具有还原性, 会将 oxTMB 还原, 从而抑制传感器的显色。而 Na⁺、Zn²⁺、K⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺、HCO₃⁻、CH₃COO⁻ 和 Cl⁻、L-脯氨酸、葡萄糖、甘氨酸、蔗糖、L-赖氨酸、L-谷氨酸和 L-色氨酸这些干扰物质对 H₂O₂ 的吸光度影响不大, 基本上不会干扰 H₂O₂ 的比色, 这说明基于 Cu-N-C 构建的比色传感器对 H₂O₂ 具有良好的选择性。

2.4 确定比色传感机制

为了研究 Cu-N-C 作为类过氧化物酶在比色传感器中的酶活性, 进行了电子顺磁共振(EPR)实验, 以确定 Cu-N-C 所产生自由基的种类。在 EPR 中, 需要用到自由基捕获剂 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)和 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮盐酸盐(TEMP)。其中, DMPO 的水溶液(100 mmol/L)和甲醇溶液(100 mmol/L)可以分别用于捕获 ·OH 和 O₂⁻ [44], TEMP 的水溶液(100 mmol/L)可以用于捕获 ¹O₂。在 5 mg Cu-N-C 中分别加入 1 mL DMPO 的水溶液(100 mmol/L)、甲醇溶液(100 mmol/L)和 TEMP 的水溶液(100 mmol/L), 摇晃 5 min。得到的 EPR 峰如图 7 所示, 在 DMPO 的水溶液中出现

1:2:2:1 的典型 EPR 峰, 证明了溶液中 ·OH 的存在。在 DMPO 的甲醇溶液中, 检测到明显的特征信号, 证明了溶液中 O₂⁻ 的存在。在 TEMP 的水溶液中, 没有出现 1:1:1 三重态峰值信号, 证明了溶液中不存在 ¹O₂。因此, 可以推测在反应过程中, Cu-N-C 会催化分解 H₂O₂, 产生 ·OH 和 O₂⁻, 这两种自由基会氧化 TMB 生成蓝色的 oxTMB, 使 652 nm 处的吸光度出现信号峰。

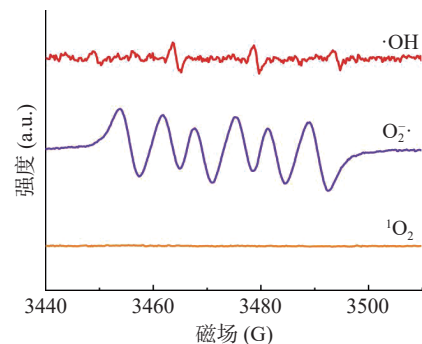


图 7 Cu-N-C 的 EPR 图谱
Fig.7 EPR spectra of Cu-N-C

2.5 泡椒猪皮中 H₂O₂ 的检测

为了验证基于 Cu-N-C 的 H₂O₂ 比色传感器的有效性和可靠性, 选择泡椒猪皮作为实际样品分析对象, 使用比色传感器检测泡椒猪皮中的 H₂O₂ 的含量。用标准添加法测定泡椒猪皮中 H₂O₂ (0、50、100、150 μmol/L) 的含量, 同时用碘量法(参照 GB 5009.226-2016《食品安全国家标准 食品中过氧化氢

表3 泡椒猪皮样品中 H₂O₂ 测定的分析结果Table 3 Analysis results of H₂O₂ determination in pork skin with pickled pepper

样品	加标(μmol/L)	比色检测			碘量法		
		检测(μmol/L)	回收率(%)	相对标准偏差(% , n=3)	检测(μmol/L)	回收率(%)	相对标准偏差(% , n=3)
泡椒猪皮	0	64.39	92.46	2.25	69.64	—	7.77
	50	112.66	94.17	3.56	110.20	92.11	2.60
	100	164.24	96.82	2.14	158.63	93.51	2.14
	150	206.82	94.16	1.37	206.12	93.85	1.33

残留量的测定》^[24]进行验证。两种方法的结果如表3所示。基于比色法,实际样品中 H₂O₂ 的回收率为 92.46%~96.82%,相对标准偏差小于 3.56%。基于碘量法, H₂O₂ 的回收率为 92.11%~93.85%,相对标准偏差小于 7.77%。比色检测和碘量法检测的结果基本相同,表明该比色传感器具有较高的准确性,在检测泡椒猪皮等样品中 H₂O₂ 的含量方面具有很好的潜力。

3 结论

本研究采用热处理法制备 Cu-N-C 纳米酶,该纳米酶具有良好的类过氧化物酶活性,可以催化 H₂O₂ 氧化分解产生羟基自由基(·OH)和超氧阴离子自由基(O₂^{·-}),进而将无色 TMB 氧化为蓝色产物 oxTMB。基于上述原理,成功构建了 H₂O₂ 比色传感器,用于快速检测泡椒猪皮中的 H₂O₂,线性范围为 1~1000 μmol/L,检测限为 0.81 μmol/L, H₂O₂ 的回收率为 92.46%~96.82%,相对标准偏差小于 3.56%。基于碘量法, H₂O₂ 的回收率为 92.11%~93.85%,相对标准偏差小于 7.77%。结果表明,本研究建立的基于 Cu-N-C 纳米酶的比色检测方法具有快速、灵敏度高、选择性好、稳定性好的优点,在环境和食品分析领域具有潜在的应用,可以为未来高性能的比色传感器的开发提供参考。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 柯燕娜,葛宇,赵琴.鸡爪中过氧化氢残留量的影响因素研究和检测方法比较[J].*食品安全质量检测学报*,2018,9(11):2821-2824. [KE Yanna, GE Yu, ZHAO Qin. Study on the influencing factors of hydrogen peroxide residue in chicken claws and comparison of detection methods[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2018, 9(11): 2821-2824.]
- [2] MAKSUK C, TINALA C, SOMBOOT W, et al. Rapid determination of hydrogen peroxide in milk with non-enzymatic amperometric sensor based on porous gold modified screen-printed electrode in online dialysis system[J]. *Electroanalysis*, 2023, 35(2): e202100691.
- [3] 林倩,张菊,王晓芳,等.食品级过氧化氢的应用及其净化技术[J].*食品科学*,2006,27(10):626-629. [LIN Qian, ZHANG Ju, WANG Xiaofang, et al. Application of food grade hydrogen peroxide and its purification technology[J]. *Food Science*, 2006, 27(10): 626-629.]
- [4] DICKINSON B C, CHANG C J. A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living

cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(30): 9638-9.

[5] ROBERTS R A, SMITH R A, SAFE S, et al. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species[J]. *Toxicology*, 2010, 276(2): 85-94.

[6] DOMANSKYI A, PARLATO R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(3): 504.

[7] LIN M T, BEAL M F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 787-795.

[8] ZHU Xiang, NIU Xiangheng, ZHAO Hongli, et al. Doping ionic liquid into Prussian blue-multiwalled carbon nanotubes modified screen-printed electrode to enhance the nonenzymatic H₂O₂ sensing performance[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 195: 274-280.

[9] ÖZKAN M, KIRCA A, CEMEROĞLU B. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices[J]. *Food Chemistry*, 2004, 88(4): 591-597.

[10] ABBAS M E, LUO Wei, ZHU Lihua, et al. Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(1): 327-331.

[11] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760-2014[S]. 北京: 质检出版社, 2014. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard - standards for food additives: GB 2760-2014[S]. Beijing: Quality Publishing House, 2014.]

[12] 彭忠勇,曹永民.自动电位滴定仪在双氧水装置在线分析中的应用[J].*石化技术*,2018,25(9):330. [PENG Zhongyong, CAO Yongmin. Application of automatic potentiometric titrator in on-line analysis of hydrogen peroxide plant[J]. *Petrochemical Technology*, 2018, 25(9): 330.]

[13] WANG Sheng, ZHANG Yu, WANG Tianran, et al. A near-infrared fluorescent probe based on the hemicyanine skeleton for the detection of hydrogen peroxide *in vivo*[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 266: 120435.

[14] IVANOVA A S, MERKULEVA A D, ANDREEV S V, et al. Method for determination of hydrogen peroxide in adulterated milk using high performance liquid chromatography[J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 431-436.

[15] LIU Zhijun, WANG Li, LIU Pengfei, et al. Rapid, ultrasensitive and non-enzyme electrochemiluminescence detection of hydrogen peroxide in food based on the ssDNA/g-C₃N₄ nanosheets hybrid[J]. *Food Chemistry*, 2021, 357: 129753.

[16] NEMATI A, CHAICHI M J, LAKOURAJ M M, et al. A bioluminescent earthworm luciferase mimetic MIL-101(Cr)-MOF for enhanced luciferin chemiluminescence and H₂O₂ sensing[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2023, 437: 114332.

[17] LIU Ruili, WU Dongqing, FENG Xinling, et al. Nitrogen-doped ordered mesoporous graphitic arrays with high electrocatalytic activity for oxygen reduction[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49(14): 2565-2569.

- [18] ZHU Chengzhou, FU Shaofang, SHI Qiurong, et al. Single-atom electrocatalysts[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2017, 56(45): 13944–13960.
- [19] YAN Huan, CHENG Hao, YI Hong, et al. Single-atom Pd₁ graphene catalyst achieved by atomic layer deposition: remarkable performance in selective hydrogenation of 1, 3-butadiene[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(33): 10484–10487.
- [20] LI Xiaogang, BI Wentuan, ZHANG Lei, et al. Single-atom Pt as Co-catalyst for enhanced photocatalytic H₂ evolution[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(12): 2427–2431.
- [21] 安莎, 谢锋, 李荣华, 等. 泡椒凤爪中残留过氧化氢检测结果分析[J]. *贵州科学*, 2014, 32(3): 94–96. [AN Sha, XIE Feng, LI Ronghua, et al. Analysis of the results of hydrogen peroxide residue in pickled pepper phoenix claws[J]. *Guizhou Science*, 2014, 32(3): 94–96.]
- [22] ZHU Tonghe, CHEN Qiongsan, LIAO Peng, et al. Single-atom Cu catalysts for enhanced electrocatalytic nitrate reduction with significant alleviation of nitrite production[J]. *Small*, 2020, 16(49): 2004526.
- [23] LIU Hao, DING Yanan, YANG Baochan, et al. Colorimetric and ultrasensitive detection of H₂O₂ based on Au/Co₃O₄-CeO_x nanocomposites with enhanced peroxidase-like performance[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2018, 271: 336–345.
- [24] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中过氧化氢残留量的测定: GB 5009.226-2016[S]. 北京: 质检出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-determination of hydrogen peroxide residues in foods: GB 5009.226-2016[S]. Beijing: Quality Publishing House, 2016.]
- [25] HAN Guokang, ZHENG Yu, ZHANG Xue, et al. High loading single-atom Cu dispersed on graphene for efficient oxygen reduction reaction[J]. *Nano Energy*, 2019, 66: 104088.
- [26] QU Yunteng, LI Zhijun, CHEN Wenxing, et al. Direct transformation of bulk copper into copper single sites via emitting and trapping of atoms[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1(10): 781–786.
- [27] LIN Zhen, ZHENG Linlin, YAO Wengsong, et al. A facile route for constructing Cu-N-C peroxidase mimics[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(37): 8599–8606.
- [28] KIM M S, LEE J, KIM H S, et al. Heme cofactor - resembling Fe-N single site embedded graphene as nanozymes to selectively detect H₂O₂ with high sensitivity[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(1): 1905410.
- [29] HONG Chengyi, ZHANG Xiaoxia, WU Chenyue, et al. On-site colorimetric detection of cholesterol based on polypyrrole nanoparticles[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(49): 54426–54432.
- [30] HU Lianzhe, LIAO Hong, FENG Lingyan, et al. Accelerating the peroxidase-like activity of gold nanoclusters at neutral pH for colorimetric detection of heparin and heparinase activity[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(10): 6247–6252.
- [31] ZHU Hengjia, LIU Bangxiang, WANG Mengzhu, et al. Amorphous Fe-containing phosphotungstates featuring efficient peroxidase-like activity at neutral pH: Toward portable swabs for pesticide detection with tandem catalytic amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(10): 4776–4785.
- [32] LU Wenjing, GUO Yanjiao, YUE Yongfang, et al. Smartphone-assisted colorimetric sensing platform based on molybdenum-doped carbon dots nanozyme for visual monitoring of ampicillin[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 468: 143615.
- [33] ZHANG Zhikun, LIU Qingqing, LIU Yumin, et al. Colorimetric H₂O₂ detection using Ag-nanoparticle-decorated silica microspheres[J]. *Nano*, 2020, 15(1): 2050009.
- [34] TIAN Rui, SUN Jianheng, QI Yanfei, et al. Influence of VO₂ nanoparticle morphology on the colorimetric assay of H₂O₂ and glucose[J]. *Nanomaterials*, 2017, 7(11): 347.
- [35] DUAN Yefan, LI Qi, HE Panpan, et al. Ultrathin FeS nanosheets with high chemodynamic activity for sensitive colorimetric detection of H₂O₂ and glutathione[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(6): 3217–3220.
- [36] ZONG Chenghua, LI Bo, WANG Jing, et al. Visual and colorimetric determination of H₂O₂ and glucose based on citrate-promoted H₂O₂ sculpturing of silver nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(3): 199.
- [37] LU Jitao, ZHANG Haowen, LI Sheng, et al. Oxygen-vacancy-enhanced peroxidase-like activity of reduced Co₃O₄ nanocomposites for the colorimetric detection of H₂O₂ and glucose[J]. *Inorganic Chemistry*, 2020, 59(5): 3152–3159.
- [38] ZHU Xixi, CHEN Wei, WU Kaili, et al. A colorimetric sensor of H₂O₂ based on Co₃O₄-montmorillonite nanocomposites with peroxidase activity[J]. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42(2): 1501–1509.
- [39] WEI Xiuxia, LI Yongli, QI Shuyan, et al. Ce-MOF nanosphere as colorimetric sensor with high oxidase mimicking activity for sensitive detection of H₂O₂[J]. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2022, 32(9): 3595–3600.
- [40] BAYE A F, NGUYEN H T, KIM H. Fe⁰/Fe₃C-assisted Fe₃O₄ redox sites as robust peroxidase mimics for colorimetric detection of H₂O₂[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2023, 377: 133097.
- [41] PONLAKHET K, JARUJAMRUS P, AMATATONGCHAI M, et al. Fe^{II}/Fe^{III} layered double hydroxide nanosheets (Fe^{II}Fe^{III} LDHNS) as an enzyme mimic for colorimetric detection of H₂O₂[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11(37): 4785–4794.
- [42] WANG Zhe, JU Peng, ZHANG Yu, et al. CoMoO₄ nanobelts as efficient peroxidase mimics for the colorimetric determination of H₂O₂[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(8): 424.
- [43] DING Yanan, LIU Hao, GAO Linna, et al. Fe-doped Ag₂S with excellent peroxidase-like activity for colorimetric determination of H₂O₂[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2019, 785: 1189–1197.
- [44] GE Jia, YANG Like, LI Zhaohui, et al. A colorimetric smartphone-based platform for pesticides detection using Fe-N/C single-atom nanozyme as oxidase mimetics[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 436: 129199.