

组分可调的PdRh双金属纳米酶用于亚硝酸盐精准高效比色传感

唐玉玺^{1,2}, 杨启², 直鑫鹏^{1,2}, 陈梦媛², 刘思源², 李嘉昌²,
刘梓洋², 贾会敏², 仝玉萍¹, 何伟伟²

(1. 华北水利水电大学材料学院, 郑州 450045;

2. 河南省微纳能量储存与转换材料重点实验室,

许昌学院化工与材料学院表面微纳材料研究所, 许昌 461000)

摘要 采用无模板一锅水热法, 通过调控钯(Pd)与铑(Rh)摩尔比, 制备了系列PdRh双金属纳米酶(Pd₃Rh, PdRh和PdRh₃), 并研究了其类过氧化物酶(POD-like)及类氧化酶(OXD-like)活性. 结果表明, 双金属纳米酶的催化活性比单金属纳米酶(Pd和Rh)更高, 且表现出明显的组分依赖性. 其中, PdRh₃和PdRh分别表现出最强的POD-like和OXD-like活性. 酶促动力学分析表明, PdRh₃纳米酶以3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和H₂O₂为底物的米氏常数(K_m)分别为15.65和381.99 μmol/L, 对应的最大反应速率(v_{max})分别为8.40×10⁻⁸和11.01×10⁻⁸ mol/(L·s). 此外, PdRh₃纳米酶的POD-like活性表现出pH依赖性, 在pH=5时活性最佳. 在此条件下, 开发了基于PdRh₃纳米酶的比色传感体系, 根据445和652 nm处吸光度比值(A_{445 nm}/A_{652 nm})与亚硝酸根离子(NO₂⁻)浓度的线性关系, 实现了对溶液中亚硝酸盐浓度的快速定量检测. 结果表明, 在pH=5的缓冲溶液和纯水中, 该体系检出限分别为0.467和30.523 μmol/L, 且在多种盐离子干扰下特异性良好, 在生物传感中具有较大应用潜力.

关键词 纳米酶; 组分调控; 类酶活性; 亚硝酸盐检测

中图分类号 O614.82

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240341

Component-tunable PdRh Bimetallic Nanozyme for Ultra-sensitive Colorimetric Detection of Nitrite

TANG Yuxi^{1,2}, YANG Qi^{2*}, ZHI Xinpeng^{1,2}, CHEN Mengyuan², LIU Siyuan²,
LI Jiachang², LIU Ziyang², JIA Huimin², TONG Yuping^{1*}, HE Weiwei²

(1. School of Materials Science and Engineering, North China University of

Water Resources and Electric Power, Zhengzhou 450045, China;

2. Key Laboratory of Micro-Nano Materials for Energy Storage and Conversion of Henan Province,

Institute of Surface Micro and Nano Materials, College of Chemical and Materials Engineering,

Xuchang University, Xuchang 461000, China)

Abstract A series of bimetallic nanozymes (Pd₃Rh, PdRh, PdRh₃) was prepared using one-pot hydrothermal method by adjusting the ratio of palladium (Pd) to rhodium (Rh). The peroxidase-like (POD-like) and oxidase-like (OXD-like) activities of nanozymes were tested. The results showed that the catalytic activity of bimetallic nanozymes was significantly enhanced compared to that of single metallic nanozymes (Pd, Rh). The POD-like and OXD-like

收稿日期: 2024-07-05. 网络首发日期: 2024-08-15.

联系人简介: 杨启, 男, 博士, 讲师, 主要从事纳米催化材料设计与生物应用方面的研究. E-mail: yangq@xcu.edu.cn

仝玉萍, 女, 博士, 教授, 主要从事纳米催化材料设计与生物应用方面的研究. E-mail: yptong_zz@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 62274141)和河南省科技攻关项目(批准号: 242102230074)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.62274141) and the Key Scientific and Technological Project of Henan Province, China(No.242102230074).

activities exhibited obvious component dependence, and PdRh₃ and PdRh nanozyme showed the strongest POD-like and OXD-like activity, respectively. The analysis of enzymatic kinetics showed that the Michaelis-Menten constant (K_m) of PdRh₃ nanozyme with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and H₂O₂ as substrates are 15.65 and 381.99 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The corresponding maximum velocity (v_{max}) reach 8.40×10^{-8} and 11.01×10^{-8} $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$. In addition, the POD-like activity of PdRh₃ nanozyme was pH-dependent, and the optimized activity was obtained at pH=5. A colorimetric sensing system was developed based on PdRh₃ nanozyme, which realized the rapid quantitative detection of nitrite concentration in solution according to the fitting relationship between the absorbance ratio ($A_{445 \text{ nm}}/A_{652 \text{ nm}}$) and the concentration of nitrite ion (NO_2^-). The limit of detection (LOD) in pH=5 buffer and pure water are 0.467 and 30.523 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and the system has a good specificity under the interference of various salt ions, demonstrating great application potential in biosensing.

Keywords Nanozymes; Component regulation; Enzyme-like activity; Nitrite detection

纳米酶作为新兴纳米催化材料,自2007年^[1]问世以来,引发了学界的广泛关注与研究,多种类型纳米材料的类酶活性被相继报道^[2,3].与天然酶相比,纳米酶兼有无机材料特性和类酶催化活性,具有稳定性高、成本低、制备方便、活性可调和环境要求低等优点.在化工、临床医学、食品安全、环境监测和农业生产等领域展现出广阔的应用前景^[4-7].目前,已开发的纳米酶包括金属纳米酶^[8]、碳基纳米酶^[9]和金属氧化物纳米酶^[5]等.其中,贵金属基纳米酶因具有特殊电子结构和优良催化活性,在药物递送及生物传感领域得到了广泛应用.如,Zhang等^[10]开发了聚乙烯吡咯烷酮包覆的超小铂(Pt)纳米颗粒,可作为多酶模拟物(过氧化氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶)用于治疗急性肾损伤;He等^[11]制备了一种新型钯(Pd)纳米酶,并建立了检测碘离子的高灵敏度比色传感器;Miao等^[12]报道了聚乙二醇(PEG)包裹的超小铑(Rh)纳米点(Rh-PEG NDs),作为一种金属纳米酶具有活性氧和氮物种(RONS)清除能力及光热活性,可用于结肠疾病中的抗炎和抗肿瘤治疗;Cui等^[13]合成了具有类氧化酶活性的铱(Ir)纳米颗粒(Ir NPs),可应用于溶解氧的比色法测定.鉴于单元贵金属纳米酶研究与应用趋于成熟,合金纳米酶设计已成为提升催化效能的新途径.将两种贵金属元素融合构建二元合金纳米酶,可改变单元金属的空间结构、电子结构及表面物化性质,通过调整纳米颗粒的尺寸与表面电荷分布,实现对纳米酶催化活性的调控,从而使其在多催化级联的超灵敏传感体系构建中具有显著优势^[14-16].钯(Pd)和铑(Rh)作为铂系贵金属,均具有优良的催化活性,且二者均为面心立方结构,组分比可调节范围较大,非常适合构建组分诱导的多活性纳米催化材料.近期,PdRh二元合金纳米材料在电催化领域的优异表现被陆续报道^[17,18],其高催化活性与稳定性源于Pd和Rh结合后的电子结构变化及活性位点优化.但在类酶催化领域,PdRh二元合金纳米材料的活性机制与应用研究尚未见报道.

亚硝酸盐广泛存在于腌制肉制品、烟熏食品和蔬菜中^[19,20],过多摄入可能导致肠胃不适和缺氧等后果^[21,22].更为严重的是,亚硝酸盐在胃酸环境下可与蛋白质分解产物仲胺结合,生成具有致癌性的亚硝胺.因此,长期大量摄入亚硝酸盐会增加患癌风险^[23].为了确保食品安全,亚硝酸盐的添加量与摄入量必须严格控制,因此,开发高效灵敏且方便快捷的亚硝酸盐检测方法十分必要.纳米酶的比色传感具有酶促反应精度高、响应快和特异性高等优点,近年来已成为亚硝酸盐检测领域研究热点.Wang等^[24]合成了具有类氧化酶活性的Mn-doped N-rich carbon dots(Mn-CDs),并将其应用于亚硝酸盐的比率比色检测;Adegoke等^[25]报道了AuNP-CeO₂ NP@GO纳米酶,并将其应用于亚硝酸盐的比色检测;Pan等^[26]制备了一种Cu-MOFs纳米酶,可应用于亚硝酸盐的比色检测.开发具有更高催化活性、特异性及稳定性的新型纳米酶,是进一步提升检测精度与效能的关键.鉴于合金纳米酶的优良催化特性,通过调整组元结合与组分配比设计出二元合金纳米酶,并应用于亚硝酸盐的精准高效检测迫切且必要.

本文设计了组分变化的PdRh二元合金纳米酶(Binary alloy nanozymes, BANs),采用一锅水热法实现了系列材料的可控合成.对不同组分PdRh BANs的类过氧化物酶(POD-like)与类氧化物酶(OXD-like)活性进行了对比,并分析了其催化活性的组分依赖性的产生机制.PdRh₃作为POD-like活性

最佳的材料,在H₂O₂存在下可快速催化无色3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)反应生成蓝色的氧化态TMB(TMBox),亚硝酸根(NO₂⁻)可诱导TMBox发生重氮化反应,不仅降低了TMBox在652 nm处的信号,而且在445 nm处产生了重氮化TMBox的新信号,由A_{445 nm}/A_{652 nm}与亚硝酸盐浓度的线性拟合关系,可实现对亚硝酸盐的快速定量检测.该体系为开发新型纳米酶提供了新策略,也为双元合金纳米酶的构筑及其生物传感应用提供了理论基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,纯度98%)、谷氨酸(GLU,纯度99%)、亮氨酸(LEU,纯度99%)、组氨酸(HIS,纯度99%)葡萄糖(纯度99%)和尿酸(UA,纯度99%),上海麦克林生化科技有限公司;玉米淀粉(一级),石家庄凯泽食品有限公司;四氯钯酸钾(K₂PdCl₄,纯度98%)、六氯铑酸钾(K₃RhCl₆,纯度99%)、过氧化氢(质量分数30%)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄,分析纯)、柠檬酸(C₆H₈O₇,分析纯)、亚硝酸钠(NaNO₂,分析纯)、无水硫酸钠(Na₂SO₄,分析纯)、氯化钠(NaCl,分析纯)、碳酸氢钠(NaHCO₃,分析纯)、氯化钙(CaCl₂,分析纯)、氯化钾(KCl,分析纯)、硝酸钠(NaNO₃,分析纯)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP,优级纯),国药集团化学试剂有限公司;无水硫酸镁(MgSO₄,分析纯),科密欧化学试剂有限公司.

H1850型离心机,湖南湘仪实验室仪器有限公司;D8-Advance型X射线粉末衍射仪(XRD),德国布鲁克公司;Cary-5000型紫外-可见吸收光谱仪(UV-Vis),美国安捷伦科技有限公司;DHG-9023A型鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;JEM 2100f型透射电子显微镜(TEM),美国FEI公司;ESCALAB 250Xi型X射线光电子能谱仪(XPS),美国赛默飞仪器公司.

1.2 实验过程

1.2.1 PdRh纳米颗粒的合成 称量110 mg PVP加入至反应釜内,加入1.65 mL去离子水,超声溶解PVP,分别将5种不同组成的金属盐溶液[4 mL(或3 mL) 5 mmol/L K₃RhCl₆溶液+1 mL 5 mmol/L K₂PdCl₄溶液, 2 mL 5 mmol/L K₃RhCl₆溶液+2 mL 5 mmol/L K₂PdCl₄溶液, 1 mL 5 mmol/L K₃RhCl₆溶液+3 mL 5 mmol/L K₂PdCl₄溶液和4 mL 5 mmol/L K₂PdCl₄溶液]加入至上述溶液中,超声分散均匀后转移至烘箱中,于200 °C反应6 h得到组分比不同的PdRh(Rh, PdRh₃, PdRh, Pd₃Rh和Pd)纳米颗粒.反应结束后,用去离子水多次洗涤纳米颗粒,并将其分散定容为2 mL溶液备用.

1.2.2 PdRh纳米颗粒的结构表征 采用XRD对不同组分比的PdRh纳米颗粒进行了物相和结构分析;采用TEM表征了其微观结构及元素分布;采用XPS分析Pd_{3d}和Rh_{3d}轨道,以研究不同PdRh纳米颗粒中元素的存在形式及价态.

1.2.3 PdRh纳米颗粒类氧化物酶(OXD-like)与类过氧化物酶(POD-like)活性的评价 OXD-like活性评价:向3 mL去离子水中加入20 μL 20 mmol/L TMB溶液,再加入20 μL稀释10倍后的PdRh纳米颗粒溶液,反应10 min后用UV-Vis测定吸光度. POD-like活性评价:向3 mL去离子水中分别加入20 μL 20 mmol/L TMB溶液和20 μL 100 mmol/L H₂O₂溶液,再加入20 μL稀释10倍后的PdRh纳米颗粒溶液,反应10 min后测定吸光度.通过对比Rh, PdRh₃, PdRh, Pd₃Rh和Pd 5种纳米颗粒的OXD-like活性及POD-like活性,分析其组分诱导的催化活性响应.筛选出POD-like活性最优者应用于亚硝酸盐比色检测体系的构建.

1.2.4 PdRh₃纳米颗粒酶促动力学分析 PdRh₃纳米酶表现出最优的POD-like活性,对其进行了酶促动力学分析.将不同浓度的底物(TMB和H₂O₂)分别加入至POD-like活性测试体系中,采用UV-Vis的动力学模式测定652 nm处的吸光度(A_{652 nm}),测定时间为5 min.根据Michaelis-Menten方程计算反应动力学参数:

$$1/v = (K_m/v_{max}) \times (1/[S]) + 1/v_{max} \quad (1)$$

式中: v [mol/(L·s)] 为反应初始速度; v_{max} [mol/(L·s)] 为最大反应速度; $[S]$ (mol/L) 为底物浓度; K_m

(mol/L)为米氏常数.

1.2.5 基于PdRh₃纳米酶的亚硝酸盐比色检测 在POD-like活性测试体系中,用不同pH值的缓冲溶液代替去离子水,以评价PdRh₃纳米酶的pH依赖性. PdRh₃纳米酶在pH=5的缓冲溶液中表现出最高的POD-like活性,因此,选择在pH=5的缓冲溶液中构建亚硝酸盐检测体系. 分别取20 μL 20 mmol/L TMB溶液和20 μL 100 mmol/L H₂O₂溶液,加入至2.7 mL缓冲溶液中,再加入20 μL稀释10倍的PdRh₃纳米酶溶液,反应10 min. 分别加入300 μL不同浓度的NaNO₂溶液(0~30 mmol/L)至上述PdRh₃纳米酶溶液中,反应10 min后测试445和652 nm处的吸光度. 对于0~1 mmol/L的低浓度NaNO₂溶液,将TMB用量增加至40 μL并将亚硝酸盐反应时间延长至20 min. 通过拟合445和652 nm处的吸光度比值($A_{445\text{ nm}}/A_{652\text{ nm}}$)与亚硝酸根离子(NO₂⁻)浓度数据得到线性关系曲线. 随后,采用上述方法,在10 mmol/L干扰物(K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, HCO₃⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, GLU, 葡萄糖, UA, LEU, HIS和玉米淀粉)与5 mmol/L NO₂⁻共存条件下,测试了该检测体系的选择性.

2 结果与讨论

2.1 PdRh 纳米颗粒的成分及结构表征

2.1.1 TEM 表征 TEM分析结果表明, PdRh纳米颗粒呈近似球形, 粒径为5~8 nm [图1(A)和图2(B)]. 这是因为合成过程中热力学和动力学因素的共同调控作用使纳米颗粒趋向表面能最小化生长, 进而形成了稳定的三维球体形态. 值得注意的是, 随着Rh元素含量逐步增加, PdRh BANs(111)晶面

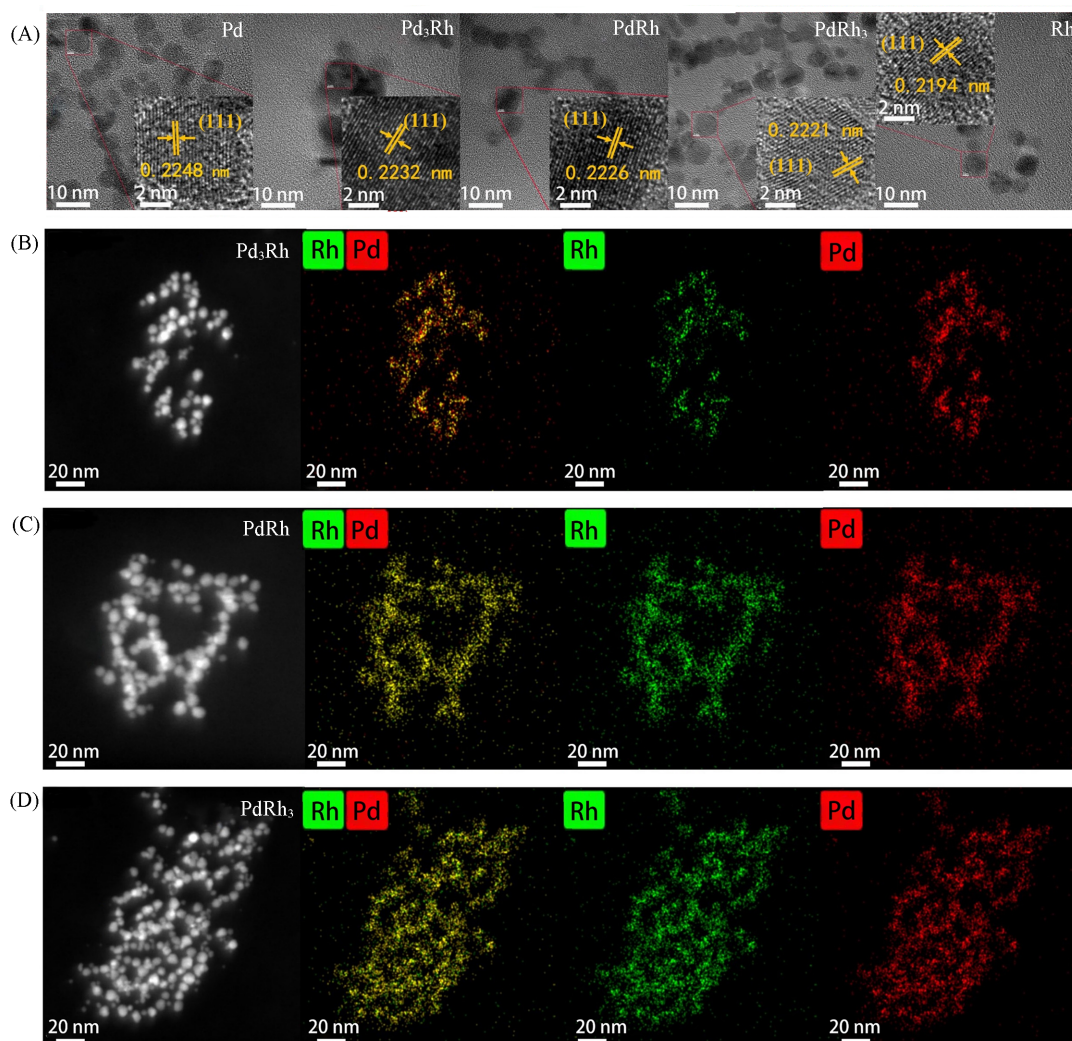


Fig. 1 TEM images of PdRh BANs(A) and mappings of Pd₃Rh(B), PdRh(C) and PdRh₃(D)

间距介于纯Pd(111)晶面间距(0.225 nm)与纯Rh(111)晶面间距(0.219 nm)之间,呈规律性递减趋势[图1(A)和图2(C)].这一趋势反映了组分诱导的合金纳米颗粒几何构型的演变过程,同时可能对其电子结构产生影响.根据Hammer-Nørskov反应模型,在具有较大晶格常数的元素(如Pd)中添加晶格常数较小的元素(如Rh),将导致晶格结构趋于紧密,元素能带彼此间交互作用增强,*d*波段重叠更充分,*d*带范围展宽,*d*带中心下移^[27].这种下移趋势将使纳米颗粒表面与催化反应底物或中间体吸附能减小,亲和力降低,最终影响其催化活性^[28,29].采用TEM对PdRh BANs表面元素的分布进行了解析.如图1(B)~(D)所示,在Pd₃Rh, PdRh和PdRh₃ 3种纳米颗粒中, Pd和Rh元素分布均匀,表明催化界面处原子弥散占位,活性位点暴露更充分,有利于其催化效能提升.

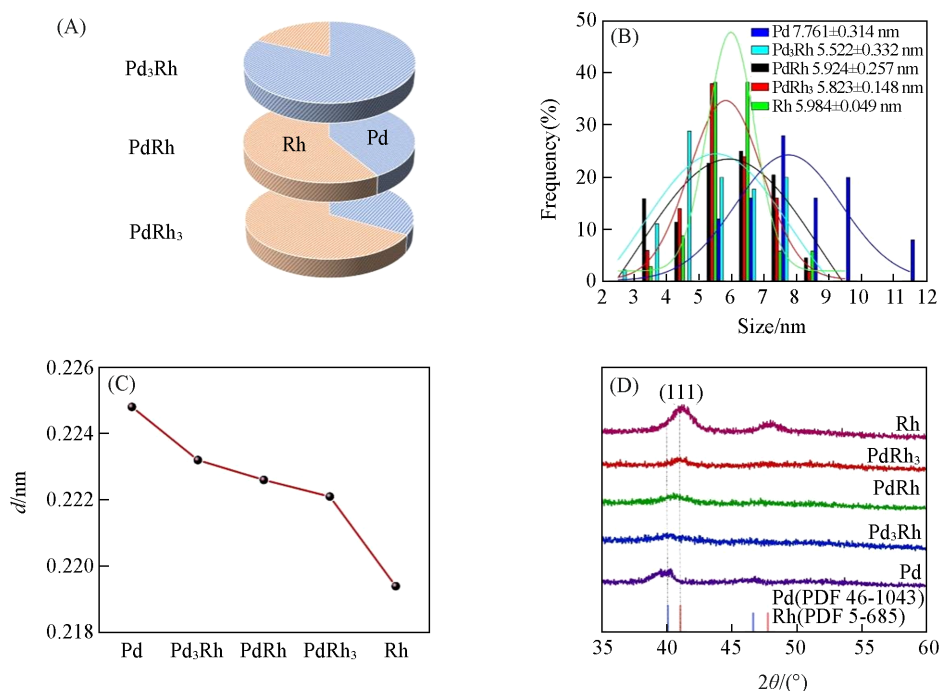


Fig. 2 ICP-MS and XRD characterization of PdRh BANs

(A) Atomic ratio of PdRh BANs; (B) grain size distribution of PdRh BANs; (C) interplanar spacing of PdRh BANs; (D) XRD patterns of PdRh BANs.

2.1.2 电感耦合等离子质谱(ICP-MS)及XRD分析 ICP-MS分析表明, Pd₃Rh中Pd与Rh的原子比为66.82:33.18, PdRh中为58.61:41.39, 而PdRh₃中为18.07:81.93[图2(A)]. XRD分析结果如图2(D)所示, 制备的单质Pd和单质Rh纳米颗粒(111)晶面峰位与对应标准卡片(Pd-PDF 46-1043和Rh-PDF 5-685)吻合. 同时, 3种不同组分比的PdRh BANs(Pd₃Rh, PdRh和PdRh₃)对应晶面衍射峰位于Pd和Rh单质峰位之间, 且随Rh含量增加向高角区位移. 上述结果也表明, Pd₃Rh, PdRh和PdRh₃ BANs的(111)晶面间距逐渐减小, 与图2(A)结果一致, 进一步证明通过调节PdRh BANs组分比可实现对几何构型的调节. 此外, 各组分PdRh BANs衍射峰均出现了明显宽化, 这与合金颗粒的纳米级尺寸相关.

2.1.3 XPS分析 XPS分析结果如图3(A)所示, 在5种PdRh BANs的谱图中, 均可见C_{1s}, O_{1s}和N_{1s}特征峰, 这可能是在离心洗涤过程中PVP未被完全去除所致. 由图3(B)可见, 各种纳米颗粒中的Pd元素均为0价^[30]. 单质Pd的Pd_{3d_{3/2}}和Pd_{3d_{5/2}}特征峰分别在340.16和334.87 eV处. 此外, 随着Rh含量的逐步增加, Pd_{3d}特征峰强度呈逐渐减弱的趋势, 表明Pd元素的组分比降低. 几种纳米颗粒中的Rh元素为0价^[31], 如图3(C)所示, 单质Rh的Rh_{3d_{3/2}}和Rh_{3d_{5/2}}特征峰分别位于311.53和306.69 eV处. 由图3(B)和(C)可见, 在Pd₃Rh, PdRh和PdRh₃中, 与单质Pd相比, Pd_{3d_{3/2}}和Pd_{3d_{5/2}}的特征峰发生了蓝移, 与单质Rh相比, Rh_{3d_{3/2}}和Rh_{3d_{5/2}}特征峰发生了红移. 上述结果表明, 形成PdRh合金后, 电子由Rh元素向Pd元素

转移,进一步证明了Pd与Rh的合金化以及组分比调节可实现对PdRh BANs 电子结构的调控。

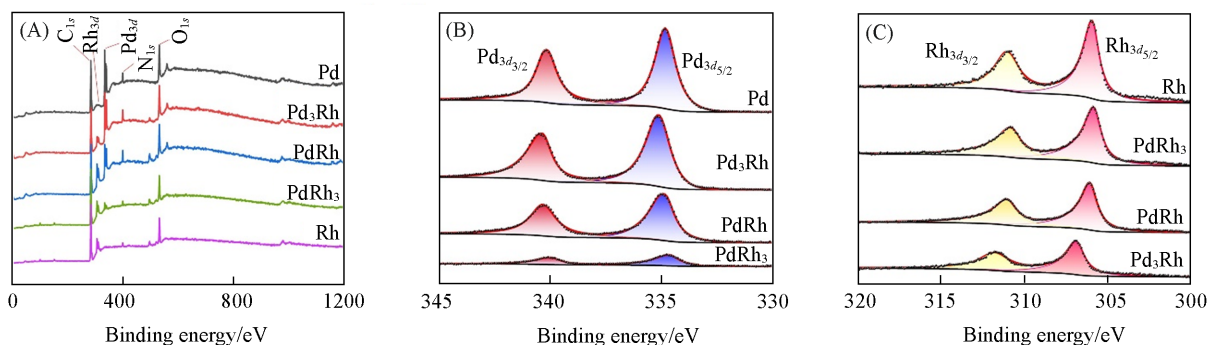


Fig. 3 XPS characterization of PdRh BANs

(A) Survey spectra; (B) Pd_{3d} spectra; (C) Rh_{3d} spectra.

2.2 PdRh 纳米颗粒的 OXD-like 与 POD-like 活性评价

2.2.1 PdRh 纳米颗粒的 OXD-like 活性 氧化酶是以氧气为电子受体,催化底物氧化的一种酶^[32]. 除天然氧化酶外,当金属尺寸减小至纳米尺度时,其可表现出类似的氧化酶活性^[33]. 对 OXD-like 活性的评价,以 TMB 为显色底物,分别加入 5 种 PdRh BANs,室温下可将 TMB 氧化,生成 TMB_{ox} 蓝色底物. 在相同的测试条件下,5 种 PdRh BANs 催化氧化 TMB 后,652 nm 处的吸光度值排序为 PdRh > PdRh₃ > Rh > Pd₃Rh > Pd [图 4(A)]. 可见, PdRh 具有最佳的 OXD-like 活性. 值得注意的是,随着 Pd 与 Rh 组分比的调节,其对应的 OXD-like 活性呈“火山峰”变化趋势——当 Pd 与 Rh 组分比约为 1:1 时,其 OXD-like 活性达到峰值.

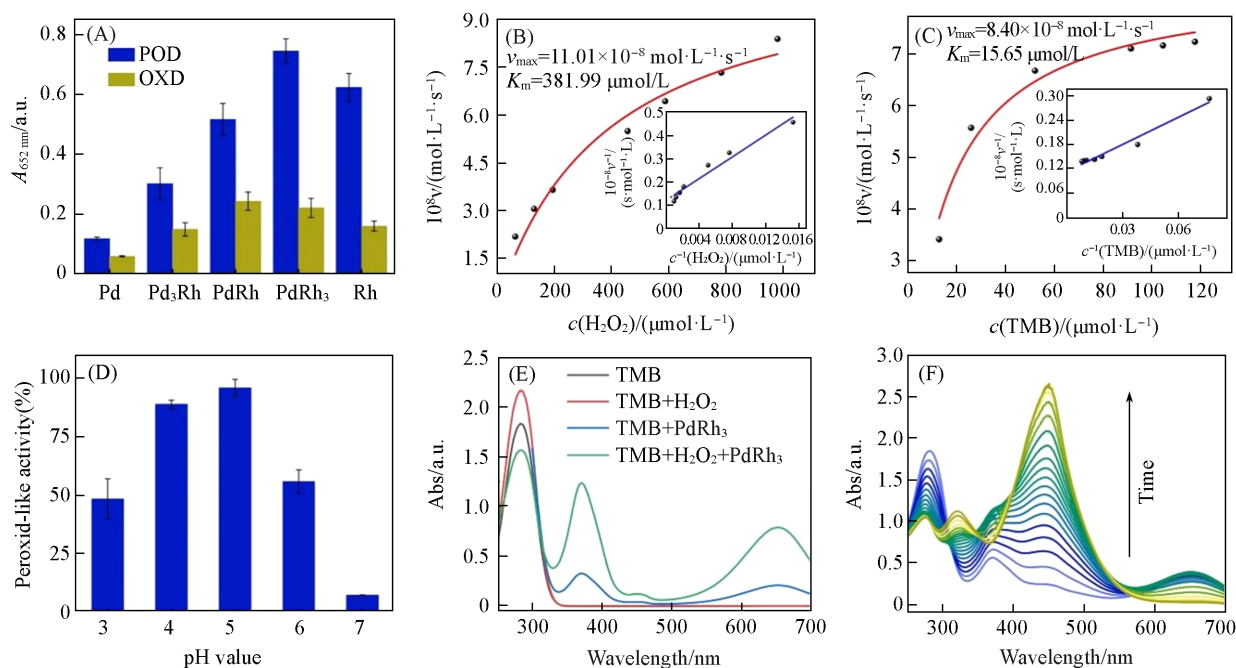


Fig. 4 Evaluation of enzyme-like activity of PdRh BANs

(A) Comparison of PdRh BANs OXD-like enzyme and peroxidase-like enzyme activity; (B, C) the double reciprocal plot of the Michaelis-Menten equation of PdRh₃ BANs with H₂O₂ (B) and TMB (C) as substrates (the illustrations are double reciprocal graphs); (D) the POD-like activity of the PdRh₃ BANs at different pH values; (E) TMB_{ox} curves of different systems; (F) the change curve of TMB after adding nitrite.

2.2.2 PdRh 纳米颗粒的 POD-like 活性 过氧化物酶是一种广泛存在的氧化还原酶,其能够催化过氧化氢(H₂O₂)及其它还原性底物^[34]. 大部分金属纳米颗粒不仅是优秀的氧化物模拟酶,而且具有过氧化

物模拟酶特性^[35]. 对 POD-like 活性的评价, 以 TMB 为显色底物, 使用一定浓度的 H₂O₂ 分别与 5 种 PdRh BANs 联合催化 TMB, 室温下可观察到无色 TMB 被快速氧化生成蓝色 TMB_{ox}. 与 OXD-like 活性类似, 随 Rh 组分增加, POD-like 活性呈“火山峰”变化趋势. 在相同实验条件下, 5 种 PdRh BANs 的 POD-like 活性顺序为 PdRh₃ > Rh > PdRh > Pd₃Rh > Pd. 当 Pd 与 Rh 组分比约为 1:3 时, 其 POD-like 活性处于峰值[图 4(A)]. 可见, 当满足特定的组分比条件时, OXD-like 与 POD-like 活性均可通过合金化达到有效强化. 对于 OXD-like 活性, PdRh BANs 可与水溶液中的溶解氧发生反应, 以其作为电子受体, 实现对 TMB 的有效氧化反应^[5]. 而对于 POD-like 活性, 由于 H₂O₂ 的介入, 催化路径发生了显著变化. 在此体系中, PdRh BANs 能够催化 H₂O₂ 裂解形成双羟基自由基(·OH)吸附结构. 随后 2 个·OH 基团从纳米酶表面脱附, 与 TMB 发生氧化反应^[31]. 因此, OXD-like 与 POD-like 活性分别与 O₂ 和·OH 在 PdRh BANs 表面的吸附能密切相关. 组分调节后, 通过电子结构的改变可调整 *d* 带中心位置, 使 O₂ 和·OH 吸附能分别位于各自的“窗口区间”(较高活性对应的吸附能范围), 以达到活性调控效果. 由实验结果可知, OXD-like 与 POD-like 活性对应的“窗口区间”具有差异. 后者比前者的吸附能“窗口区间”向更低(更负)方向偏移, 中间体(·OH)的脱附可能是其催化反应的“决速步”, 这与 Shen 等^[36]报道的金属纳米颗粒类酶催化活性理论计算结果一致.

2.3 PdRh₃ 纳米颗粒的酶促动力学分析

选取 POD-like 活性最佳的 PdRh₃ 进行了酶促动力学分析. 以 TMB 和 H₂O₂ 为底物, 其浓度分别为 0~120 和 0~1000 μmol/L, PdRh₃ BANs 的浓度保持恒定(取 20 μL 稀释 10 倍后的 PdRh₃ 模拟酶溶液), 由初始反应速率与 TMB 和 H₂O₂ 浓度关系得到米氏方程曲线, 如图 4(B)和(C)所示, 以 TMB 和 H₂O₂ 为底物的米氏常数(*K_m*)分别为 15.65 和 381.99 μmol/L, 对应的最大反应速率(*v_{max}*)分别为 8.40×10⁻⁸ 和 11.01×10⁻⁸ mol/(L·s). 前者的 *K_m* 较低, 说明该材料对 TMB 的亲合力更强.

2.4 基于 PdRh₃ 纳米酶的亚硝酸盐比色检测

基于 PdRh₃ 纳米酶组分调控的优异 POD-like 活性, 将其应用于亚硝酸盐比色检测中. 为了选择最佳检测环境, 对 PdRh₃ 纳米酶的 pH 依赖性进行了评价, 结果如图 4(D)所示. 在 pH=5 时, PdRh₃ 纳米酶的 POD-like 活性最佳. 在此条件下, PdRh₃ 纳米酶催化氧化 TMB 吸光度曲线如图 4(E)所示. 图 4(F)表明, 在该体系中加入 30 mmol/L 亚硝酸盐后, 随着时间增加, 445 nm 处的吸光度逐渐增大, 652 nm 处吸光度呈先缓慢上升后迅速下降的趋势. 这说明亚硝酸盐与 TMB 发生了重氮化反应, 生成了 445 nm 处的重氮化峰, 同时抑制了 652 nm 处的特征峰, 通过建立两者吸光度比值(*A_{445 nm}*/*A_{652 nm}*)与亚硝酸盐浓度关系, 实现了亚硝酸盐的特异性检测. 在 pH=5 条件下, 检测了体系中分别加入 300 μL 不同浓度亚硝酸盐(0~30 mmol/L)溶液的 UV-Vis 光谱. 如图 5(A)所示, 随着亚硝酸盐浓度增大, 溶液由蓝色变为绿色再变为黄色. 由吸光度曲线可见, 445 nm 处的峰值逐渐增大, 652 nm 处的峰值先微弱增加, 后在亚硝酸盐浓度达到 27 mmol/L 时迅速下降. 当亚硝酸盐浓度为 0~30 mmol/L 时, *A_{445 nm}*/*A_{652 nm}* 与亚硝酸盐浓度呈良好的线性关系, 拟合方程为 $y=0.135+0.071x$ ($R^2=0.994$), 检测限 (LOD, S/N=3) 为 0.142 mmol/L. 为了得到低浓度溶液的精确测试结果, 通过延长反应时间和加大 TMB 浓度, 实现了对检测过程的优化, 结果如图 5(C)所示. 当亚硝酸盐浓度为 0~1 mmol/L 时, 拟合结果为 $y=0.1173+0.9405x$ ($R^2=0.999$), LOD(S/N=3) 为 0.467 μmol/L. 为了进一步提升检测便捷性, 对纯水中亚硝酸盐检测的可能性进行了探索. 将缓冲液体系换为水, 并按照上述步骤进行实验. 如图 5(E)和(F)所示, 在 0~30 mmol/L 时存在两段线性关系, 在 0~10.106 mmol/L 范围内, 拟合结果为 $y=0.109+0.0615x$ ($R^2=0.995$); 在 10.106~30 mmol/L 范围内, 拟合结果为 $y=0.582+0.0147x$ ($R^2=0.970$), LOD(S/N=3) 为 0.242 mmol/L [图 5(E)]. 在 0~1 mmol/L 范围内, 拟合结果为 $y=0.1017+0.3725x$ ($R^2=0.995$), LOD(S/N=3) 为 30.523 μmol/L. 与 pH=5 相比, 尽管检测灵敏度降低和检测限升高, 但达到了良好的检测效果. 此外, 如表 1 所示, PdRh₃ 纳米酶在亚硝酸盐检测方面, 比其它材料展现出更高的灵敏度.

除了灵敏度外, 选择性也是影响检测的一个重要因素. 实验中评估了该检测体系在高浓度干扰物(10 mmol/L)存在时对亚硝酸盐(5 mmol/L)的选择性. 如图 5(D)所示, 使用了 14 种干扰离子或分子

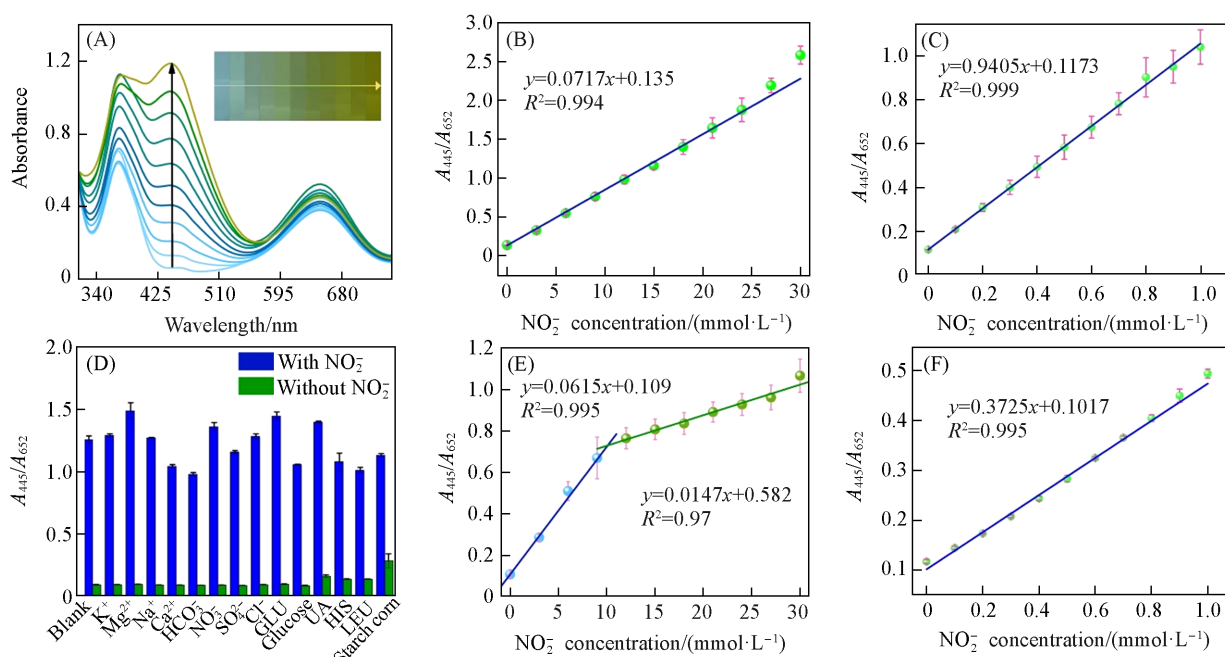


Fig. 5 Quantitative detection of nitrite

(A) The change of TMB curve after adding different concentrations of nitrite (the illustration is the color change diagram of the system); different concentrations of nitrite were detected in buffer with pH=5, 0~30 mmol/L (B) and 0~1 mmol/L (C); (D) nitrite specific detection; different concentrations of nitrite were detected in water with 0~30 mmol/L (E) and 0~1 mmol/L (F).

Table 1 Performance comparison of the ratiometric colorimetric method with previously reported approaches for nitrite detection

Detection mode	Material	LOD/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
Electrochemical	Ag-SO ₃ -NU-902	9.1	[37]
Electrochemical	AuNPs/UiO-66-NH ₂ /rGO	3.7	[38]
Fluorometric	CDs	21.2	[39]
Colorimetry	AuNPs	21.7	[40]
Colorimetry	AuNPs-CeO ₂ NP@GO	4.6	[25]
Colorimetry	Cu-MOFs	8.5	[26]
Ratiometric colorimetry	PdRh ₃ BANS	0.467	This work

(K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, HCO₃⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, GLU, 葡萄糖, UA, LEU, HIS 和玉米淀粉). 结果显示, 当存在亚硝酸根离子(NO₂⁻)时, $A_{445\text{ nm}}/A_{652\text{ nm}}$ 值与干扰项对应值之间存在显著差异, 表明该体系对亚硝酸盐的检测具有较好的特异性. 基于PdRh₃双金属纳米酶的亚硝酸盐比色传感体系具有灵敏度高、特异性好和pH值条件包容性强等特点, 且催化剂用量较小, 有利于降低检测成本. 比色传感的优势使其检测结果便于可视化输出, 如, 通过与智能手机联用建立“色度-目标物含量”的对应关系, 从而实现快速定量分析. 与国标检测方法^[41]相比, 比色传感法对设备、环境和检测人员专业素质等条件依赖性较低, 在搭建便捷、高效和低成本的即时检测(Point-of-care testing, POCT)平台方面具有较大开发潜力.

3 结 论

采用绿色且无模板水热法, 通过调整Pd和Rh元素组分比, 制备了系列PdRh二元合金纳米颗粒. 通过类酶活性的对比与评价, 筛选出POD-like活性最优的PdRh₃纳米酶, 并应用于亚硝酸盐的比色传感检测, 该体系灵敏度高、特异性强且pH条件包容性强, 有望成为便捷、低价且高效的检测方法. PdRh₃纳米酶优异的POD-like活性可能来自于组分调节诱导的电子结构改变, 使其d带中心调整至合理位置, 并使关键反应物和中间体的吸附能处于“窗口区间”, 在热力学与动力学上实现了吸附与脱附的良好匹配, 从而具有较高的催化效能. 本文不仅为精准高效亚硝酸盐比色传感平台的构筑提供了有

效策略, 而且为新型合金纳米酶的开发及活性调控提供了思路.

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., Yan X. Y., *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2(9), 577—583
- [2] Wu J. J. X., Wang X. Y., Wang Q., Lou Z. P., Li S. R., Zhu Y. Y., Qin L., Wei H., *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48(4), 1004—1076
- [3] Huang Y. Y., Ren J. S., Qu X. G., *Chem. Rev.*, **2019**, 119(6), 4357—4412
- [4] Zhao J., Gong J. W., Wei J. N., Yang Q., Li G. J., Tong Y. P., He W. W., *J. Colloid Interface Sci.*, **2022**, 618, 11—21
- [5] Liu Q. W., Zhang A. M., Wang R. H., Zhang Q., Cui D. X., *Nano Micro Lett.*, **2021**, 13(1), 154
- [6] Ren Y. P., Zhou X. L., Gao X. J., Si J. J., Ren W. H., Li C. X., Yang Q., Zhou Y. L., Bai F., He W. W., *Nano Today*, **2024**, 55, 102202
- [7] Liu Q., Ren Y. P., Jia H. M., Yuan H., Tong Y. P., Kotha S., Mao X. B., Huang Y. W., Chen C. Y., Zheng Z., Wang L. M., He W. W., *ACS Nano*, **2023**, 17, 22527—22538
- [8] Yang Q., Mao Y. Y., Liu Q., He W. W., *Rare Met.*, **2023**, 42(9), 2928—2948
- [9] Ding H., Hu B., Zhang B., Zhang H., Yan X. Y., Nie G. H., Liang M. M., *Nano Res.*, **2021**, 14(3), 570—583
- [10] Zhang D. Y., Liu H. K., Younis M. R., Lei S., Chen Y., Jing L., Qu J. L., Peng H., *Chem. Eng. J.*, **2021**, 409, 127371
- [11] He S. B., Chen F. Q., Xiu L. F., Hua P. P., Hao H., D., Ai L. L., Wei C., Guo L. H., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, 412(2), 499—506
- [12] Miao Z. H., Jiang S. S., Ding M. L., Sun S. Y., Ma Y., Younis M. R., He G., Wang G. J., Lin J., Cao Z., Huang P., Zha Z. B., *Nano Lett.*, **2020**, 20(5), 3079—3089
- [13] Cui M. L., Zhao Y., Wang C., Song Q. J., *Microchim. Acta*, **2017**, 184(9), 3113—3119
- [14] Luo L., Liu J., Liu Y. N., Chen H. Y., Zhang Y. Y., Liu M. L., Yao S. Z., *Food Chem.*, **2024**, 430, 137062
- [15] Chen F. X., Song T. L., *Front. Chem.*, **2022**, 10, 854516
- [16] Meng X. Q., Fan H. Z., Chen L., Jiuyang He., Hong C. Y., Xie J. Y., Hou Y. Y., Wang K. D., Gao X. F., Gao L. Z., Yan X. Y., Fan K. L., *Nat. Commun.*, **2024**, 15, 1626
- [17] Shang H. Y., Xu H., Jin L. J., Chen C. Y., Wang C., Song T. X., Du Y. K., *J. Colloid Interface Sci.*, **2019**, 556, 360—365
- [18] Hu Q. Y., Luo L. M., Zhang R. H., Chen D., Guo Y. F., Zhan W., Zhou X. W., *J. Alloys Compd.*, **2020**, 818, 152886
- [19] Wójciak K. M., Stasiak D. M., Keška P., *Sustainability*, **2019**, 11(14), 3795
- [20] Ko Y. M., Park J. H., Yoon K. S. J., *J. Sci. Food Agric.*, **2017**, 97(6), 1774—1783
- [21] Hameed A., Nazir S., Rehman J. U., Ahmad N., Hussain A., Alam I., Nazir A., Tahir M. B., *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **2021**, 27(6), 1509—1522
- [22] Thomsen A. M. L., Liew Z., Riis A. H., Stayner L. T., Ramlau-Hansen C. H., Sigsgaard T., Olsen J., *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, **2019**, 28(9), 1204—1210
- [23] Moazeni M., Heidari Z., Golipour S., Ghaisari L., Sillanpää M., Ebrahimi A., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2020**, 27(36), 45568—45580
- [24] Wang M. Z., Zhu H. J., Liu B. X., Hu P. W., Pan J. M., Niu X. H., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, 14(39), 44762—44771
- [25] Adegoke O., Zolotovskaya S., Abdolvand A., Daeid N. N., *Talanta*, **2021**, 224, 121875
- [26] Pan Y. X., Jiang J., Kan X. W., *Analyst*, **2023**, 148(19), 4869—4876
- [27] Hammer B., Nørskov J. K., *Adv. Catal.*, **2000**, 45, 71—129
- [28] Mao Y. Y., Jia F. M., Jing T. Y., Li T. T., Jia H. M., He W. W., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2021**, 9(1), 569—579
- [29] Zhi X. P., Yang Q., Zhang X. G., Zhang H. B., Gao Y., Zhang L. L., Tong Y. P., Hei W. W., *Food Chem.*, **2024**, 445, 138788
- [30] Brun M., Berthet A., Bertolini J. C., *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.*, **1999**, 104(1—3), 55—60
- [31] Abe Y., Kato K., Kawamura M., Sasaki K., *Surf. Sci. Spectra*, **2001**, 8(2), 117—125
- [32] Chong Y., Liu Q., Ge C. C., *Nano Today*, **2021**, 37, 101076
- [33] Shen X. M., Liu W. Q., Gao X. J., Lu Z. H., Wu X. C., Gao X. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(50), 15882—15891
- [34] Wang X. Y., Wei H., *Chin. J. Anal. Chem.*, **2023**, 51(5), 666—680(王小宇, 魏辉. 分析化学, **2023**, 51(5), 666—680)
- [35] Pietrzak M., Ivanova P., *Sens. Actuators B Chem.*, **2021**, 336, 129736
- [36] Shen X. M., Wang Z. Z., Gao X. J., Gao X. F., *Adv. Mater.*, **2024**, 36(10), 2211151
- [37] Wang Y. C., Chen Y. C., Chuang W. S., Li J. H., Wang Y. S., Chuang C. H., Chen C. Y., Kung C. W., *ACS Appl. Nano Mater.*, **2020**, 3(9), 9440—9448
- [38] Chen J., Li S. Y., Xu F. H., Zhang Q., *Electroanalysis*, **2022**, 34(4), 701—708
- [39] Gan L. L., Su Q., Chen Z. B., Yang X. M., *Appl. Surf. Sci.*, **2020**, 530, 147269
- [40] Daniel W. L., Han M. S., Lee J. S., Mirkin C. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(18), 6362—6363
- [41] GB 5009.3-2016, *National Food Safety Standard Determination of Moisture in Food*, Standards Press of China, Beijing, **2016**(中国国家标准化管理委员会, GB 5009.3-2016, 食品安全国家标准食品中水分的测定, 北京: 中国标准出版社, **2016**)

(Ed.: X, N, K)