

金纳米棒比色探针法测定维生素C的初步研究

徐丽萍^{1*}, 璠阿敏¹, 韩博林¹, 王鑫¹, 关桦楠^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 哈尔滨 150076;

2. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 采用金纳米棒作为探针, 构建一套灵敏简单的用于检测维生素C的比色方法。**方法** 采用壳聚糖-三聚磷酸钠复合物作为还原剂和稳定剂制备金纳米棒; 采用紫外-可见分光光度计和透射电子显微镜对其进行表征; 根据金纳米棒的形成原理, 通过金纳米棒的长短径比值下降所造成的溶液颜色的明显变化, 快速检测体系中不同浓度的维生素C。**结果** 当检测体系中出现维生素C时, 颜色由蓝色变为橙色; 在维生素C浓度为1~100 $\mu\text{mol/L}$ 和250~2000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内时, 其浓度与体系吸光度比值(A_{530}/A_{640})呈现明显的线性关系, 相关系数分别为0.9894和0.9843, 检出限为0.067 $\mu\text{mol/L}$ 。**结论** 该体系下制备的金纳米比色探针可以实时快速检测维生素C的含量。

关键词: 金纳米棒; 维生素C; 比色传感; 汞离子

Determination of vitamin C by gold nanorods colorimetric probe

XU Li-Ping^{1*}, NAO A-Min¹, HAN Bo-Lin¹, WANG Xin¹, GUAN Hua-Nan^{1,2}

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a sensitive and simple colorimetric method for determination of vitamin C (Vc) based on the gold nanorods (AuNRs). **Methods** AuNRs were prepared by reducing gold salt with chitosan, in the presence of tripolyphosphate (TPP). Chitosan-TPP was acted as a reducing/stabilizing agent. The obtained AuNRs were characterized with UV-Vis spectroscopy and transmission electron microscopy. The decreased of the aspect ratio (length/width) of AuNRs led to a color change in the presence of vitamin C at different concentrations based on forming gold amalgam. **Results** The color of detection system changed from blue to red in the presence of vitamin C. The absorbance ratio (A_{530}/A_{640}) was linear with the Vc concentration in the range of 1~100 $\mu\text{mol/L}$ and 250~2000 $\mu\text{mol/L}$, with the correlation coefficients of 0.9894 and 0.9843, respectively. The limit of detection was 0.067 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** The reported gold nanoparticles colorimetric probe is suitable for real-time detection of Vc.

KEY WORDS: gold nanorods (AuNRs); vitamin C; colorimetric sensor; mercury ion (Hg^{2+})

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31201376)、中国博士后基金资助项目(2014T70304、2013M531009)、黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z13002)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201376), China Postdoctoral Science Foundation (2014T70304, 2013M531009) and Heilongjiang Postdoctoral Fund (LBH-Z13002)

*通讯作者: 徐丽萍, 教授, 主要研究方向为食品安全与食品营养。E-mail: hebcuedu@163.com

*Corresponding author: XU Li-Ping, Professor, Harbin University of Commerce, No. 138 Tongda Street, Harbin 150076, China. E-mail: hebcuedu@163.com

1 引言

维生素 C(vitamin C, Vc)又名抗坏血酸,是一种水溶性维生素^[1]。自然界中的 Vc 主要以氧化型和还原型存在,是人体生长和维持生理机能必需的营养物质^[2]。由于 Vc 独特的化学性质,使其被广泛用于食品加工领域^[3-5]。目前测定食品中 Vc 含量的检测方法主要有滴定法、光度分析法、电化学法、高效液相色谱法、紫外光谱法、荧光法等^[6-10]。在上述方法中,高效液相色谱法虽然干扰少、准确度高、重现性好,但仪器设备昂贵、操作条件较高;荧光分析法虽然准确度和灵敏度高,但背景干扰较大。因此,探讨一种简便、快速测定 Vc 含量的新方法具有重要意义。金纳米棒(gold nanorods, AuNRs)具有横向和纵向表面等离子共振峰,其独特的物理化学性质及光学性质,使其被广泛应用于药物、金属离子、氨基酸和 DNA 的分析检测以及对抗体分子的特异性识别^[11-13]。金纳米棒体系中如果含有汞离子时, Hg^{2+} 可被还原性物质还原为 Hg^0 , 就会在金纳米棒两端生成金汞齐,从而使得金纳米棒的纵横比降低,其光谱中发生不同程度的蓝移。根据此原理, AuNRs-Hg^{2+} 体系可用于检测具有还原性的物质。本研究中,采用壳聚糖作为还原剂和稳定剂,在三聚磷酸盐存在的体系中制备出合适粒径的棒状金纳米粒子,并利用所制备的金纳米棒测定体系中 Vc 的含量。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

壳聚糖(脱乙酰度 85%)购自于 Sigma-Aldrich 公司。氯金酸、三聚磷酸钠和硝酸银均购自于中国医药集团上海化学试剂公司。硼氢化钠、维生素 C、硝酸汞、氯化钙、氯化钾和醋酸锌购自于上海振兴化工厂。

2.2 仪器与设备

CJJ79-1 磁力搅拌加热器(金坛市梅香仪器有限公司); DZF-150 数显恒温真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司); KQ-100 超声波清洗器(东莞市科桥超声设备有限公司); HT7700 透射电子显微镜(日本日立公司); D8 AdvanceX 射线衍射仪(德国布鲁克 AXS 公司); UV2250 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

2.3 金纳米棒的制备与表征

分别加入 5.0 mL HAuCl_4 水溶液(0.1%, W:V)和 15.0 mL 壳聚糖水溶液(2.5%, W:V, 1%醋酸, V:V)于锥形瓶中,混匀后再加入 5.0 mL 三磷酸钠溶液(0.1 mol/L),在 4 °C 条件下温和搅拌 1 h,取出后,70 °C 条件下加热,待体系颜色由黄色变为深红色时停止加热,制得金种液。

分别取 5 mL HAuCl_4 溶液(1%, W:V)和 10 mL 壳聚糖

溶液(2.5%, W:V, 1%醋酸)于锥形瓶中,再加入 10 mL 0.10 mol/L 的三磷酸钠溶液,混匀后,待溶液立刻变为无色再加入 200 μL 金种液,搅拌,4 °C 条件下静置 24 h,即得 AuNRs。采用紫外-可见分光光度计扫描金纳米粒子探针的吸收光谱,确定最大吸收峰波长。采用透射电子显微镜观察金纳米粒子探针的表观形貌和粒度分布情况。采用 X 射线衍射仪分析所制备的晶体结构。

2.4 比色检测不同浓度的维生素 C

向比色管中依次加入 2.00 mL AuNRs, 400 μL 硝酸汞(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 200 μL 新配制的不同浓度的 Vc 溶液(0、1、10、50、100、250、500、1000 和 2000 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 700 μL 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液(pH=8.50), 定容后,60 °C 水浴下反应 15 min, 冰水冷却 5 min 终止反应。最后观察体系的颜色变化,扫描 AuNRs- Hg^{2+} -Vc 体系的 UV-Vis 吸收光谱。

2.5 比色检测的选择性研究

向比色管中依次加入 2.00 mL AuNRs, 400 μL Hg^{2+} (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 200 μL 新配制的 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Vc 溶液, 700 μL 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液(pH=8.5), 再向体系中添加 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸等食品中常见的离子和有机物质,观察体系中颜色变化,扫描体系的 UV-Vis 吸收光谱,确定检测体系的选择性。

3 结果与讨论

3.1 金纳米棒的表征

本研究采用壳聚糖法制备棒状结构的金纳米粒子。壳聚糖作为阳离子聚电解质可以与阴离子聚电解质三磷酸钠通过静电作用结合形成具有高还原性能的胶体复合物,可以快速还原氯金酸中 Au^{3+} 。与此同时,壳聚糖-三磷酸钠复合物表面具有丰富的氨基,可以固定在其表面作为稳定剂增加金纳米粒子的稳定性。在一定浓度的壳聚糖-氯金酸黄色混合溶液中,壳聚糖自身具有一定的还原性, AuCl_4^- 会被还原 AuCl_2^- , 此时溶液颜色变成无色,伴随三磷酸钠与壳聚糖生成大量具有高还原性复合物,再使得 AuCl_2^- 被还原成为 Au^0 , 并形成晶种,最后让其原位生长得到金纳米棒溶液。这种方法简单易行,通过调节晶种与 Au^{3+} 的比例可控制产物的粒径和形状^[14-16]。分别采用紫外-可见光谱分析和 X 射线衍射分析确定试验中所制备的晶体为金纳米粒子,见图 1。

由图 1A 可知,主要的衍射峰与金粒子结构(111)、(200)、(220)、(311)和(222)的晶面基本符合,没有其它明显的杂质峰,说明所制备的晶体为金纳米粒子。由图 1B 可知,在波长 640 nm 处具有明显的特征吸收峰。根据 Mie 理论,此峰为金纳米颗粒的等离子共振紫外吸收特征峰,此吸收峰的位置、形状与颗粒的大小、形状与分散状态密切相关^[17]。

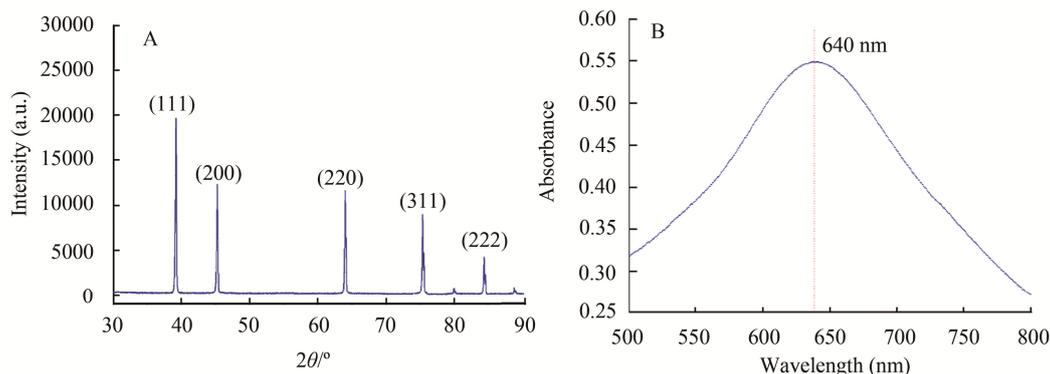


图 1 金纳米粒子的 X 射线衍射分析(A)和紫外-可见光吸收光谱分析(B)
Fig. 1 XRD analysis (A) and ultraviolet-visible absorption spectrum (B) of gold nanoparticles

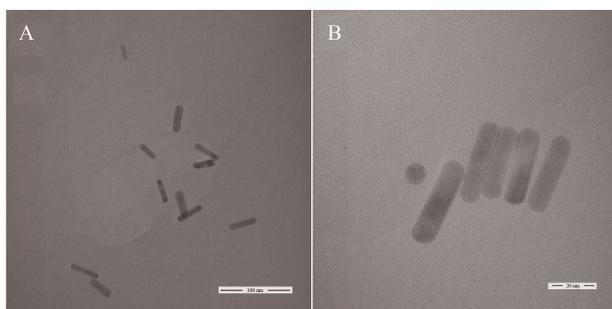


图 2 金纳米棒的透射电子显微镜图片
(A)放大 5000 倍 (B)放大 15000 倍
Fig. 2 Transmission electron microscope images of AuNRs
(A) 5000× (B)15000×

为确定所制备的金纳米粒子的形状, 采用透射电子扫描电镜对其表观形貌进行表征, 结果见图 2。由图 2A 和 B 可知, 壳聚糖法所制得的金纳米粒子为明显的棒状晶体结构, 粒径分布较为均匀, 具有良好的单分散性能, 没有发现团聚的现象, 采用标尺进行计算, 平均长径大小约为 32 ± 0.8 nm, 平均短径为 5.3 ± 0.5 nm, 测定长短径之比约为 6:1。研究表明, 长短径之比越大, AuNRs 的电子跃迁性能越好, 可改善 AuNRs 的表面等离子体共振。此外, 高长短径之比的 AuNRs 具有两个特征荧光吸收峰, 其光性能响应效率比短长径比 AuNRs 更高。

3.2 金纳米棒比色检测不同浓度的维生素 C

基于金纳米棒纵向等离子共振吸收峰的蓝移量和横向等离子共振的红移量与 Vc 浓度的线性关系, 以及溶液明显的颜色变化, 设计出非聚集比色传感器, 检测原理见图 3。图 3 中式(1)所示为, 在 AuNRs-Hg²⁺体系中 Hg²⁺被维生素 C 还原为 Hg⁰, 见图 3 中式(2)和(3)。基于 Hg⁰ 与 Au

之间强的亲和力, 使得 Hg⁰ 与 AuNRs 表面 Au 作用, 从而形成金汞齐 AuHg₂ 与 AuHg₃。由于吸附于 AuNRs 的横向部位的壳聚糖产生的屏蔽效应限制了 Hg⁰ 与其横向部位的 Au 反应, 迫使在 AuNRs 纵向部位生成金汞齐, 从而改变了 AuNRs 的形态。随着金汞齐生成量的增加, AuNRs 长度继续减小, 最终 AuNRs 将转化为近似球型的颗粒, 横向等离子共振吸收峰的发生线性红移, 体系颜色逐渐发生变化。因此, 可依据颜色的改变, 设计非聚集比色传感器测定维 Vc 的含量。

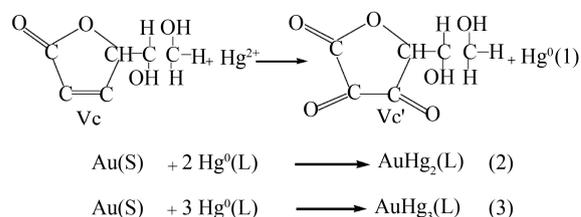


图 3 金汞齐的形成: (1)为 Hg²⁺ 与 Vc 的还原反应;
(2)和(3)为 Au(S)与 Hg⁰ 的反应
Fig. 3 Formation of gold amalgamation: (1) is reducing reaction between Hg²⁺ and Vc; (2) and (3) are reacting equations between Au (s) and Hg⁰

采用传感检测体系对不同浓度的维生素 C 进行直观比色研究, 结果见图 4。结果表明, 当检测体系中没有 Vc 时(对照), 样品颜色为蓝紫色, 当体系中存在 1 μmol/L 的 Vc 时, 颜色开始发生变化, 逐渐变为淡咖啡色; 当维生素 C 浓度继续增加, 颜色逐渐向紫色过渡, 最后变为酒红色。图 4 中体系颜色的变化说明了金纳米棒的形态在逐渐发生变化, 颗粒的纵横比逐渐减小。结果也同时表明了, 该检测体系能够通过直观比色法初步判定维生素 C 的浓度, 且检测过程简单便捷。

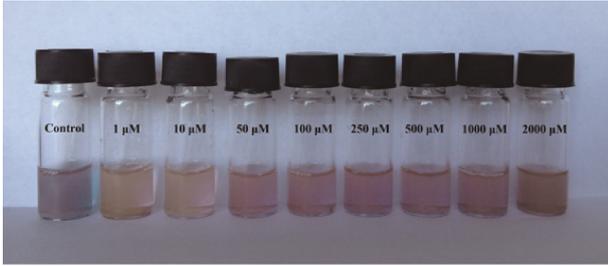


图 4 比色传感检测不同浓度维生素 C

Fig. 4 Colorimetric sensor for different concentrations of vitamin C

比色传感体系检测不同浓度的 Vc 紫外-可见光谱见图 5。从图 5 可知, 伴随着 Vc 浓度的提高, 吸收峰的位置逐渐发生红移, 吸收峰的波长由 640 nm 变为 528 nm 左右, 当体系中的 Vc 的浓度为 1 μmol/L 时, 吸收峰位置出现在波长 580 nm 左右; 当体系中的 Vc 的浓度为 10 μmol/L 时, 吸收峰的位置则出现在波长 570 nm 左右; 当体系中的 Vc 的浓度在 50~500 μmol/L 时, 吸收峰的位置基本维系不变, 在波长 550~560 nm 处; 当浓度继续增加至 1000 μmol/L 时, 吸收峰红移至 530 nm 左右。在这个过程中, 吸收峰的峰值也呈现出逐渐下降的趋势。选择金纳米棒检测 1000 μmol/L 维生素 C 的体系作为模型, 考察金纳米棒粒径和形貌的变化, 结果见图 6。结果表明, 当体系中的 Vc 浓度为 1000 μmol/L 时, 大部分金纳米棒由于 Hg⁰ 在其表面形成金汞齐, 使其由原来的棒状结构逐渐变为近似球形的颗粒式结构, 金纳米棒粒径的纵横比减小, 特征峰波长逐渐发生变化。

整个比色体系是由于金纳米棒的形态发生变化引起的等离子共振的吸收峰发生了红移, 由初始的波长 640 nm 移至 530 nm, 颜色也有蓝紫色逐渐变为粉红色。因此通过考量两个波长所对应的吸光度的比值(A_{530}/A_{640})与 Vc 的线性关系, 可以构建出 Vc 比色检测体系的线性方程, 结果见图 7。由图 7 可知, 在 1~100 μmol/L 和 250~2000 μmol/L 范围内 Vc 浓度与吸光度比值具有较为明显的线性关系, 回归方程分别为 $Y=6.97 \times 10^{-4} X+0.85$ 和 $Y=1.24 \times 10^{-4} X+0.96$, 其中 Y 为吸光度比值, X 为 Vc 浓度(μmol/L)。两个标准曲线的相关系数 R 分别为 0.9894 和 0.9843, 最低检出限为 0.067 μmol/L。

3.3 干扰性研究

比色检测体系的一个重要指标就是检测抗干扰性, 现实样品中往往存在有其他种类的物质, 此类物质会在一定程度上干扰检测体系。本研究选择含有 1 μmol/L 维生素 C 的体系作为参照, 添加 6 种样品中常见的物质用作抗干扰性研究, 分别为 K⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、葡萄糖、蔗糖和柠檬酸, 每种干扰物质的浓度为维生素 C 浓度的 100 倍, 即 100 μmol/L。

由图 8 可知, 体系中的 Vc 浓度为 1 μmol/L 时, 颜色与图 4 中所对应的样品基本一致, 也说明了此体系具有一定的重复性。分别在相同的体系中添加不同的干扰物质,

体系颜色基本没有变化, 说明这些干扰物质对比色传感没有明显的影响。综上所述, 该比色传感检测维生素 C 的体系具备抗干扰性能。

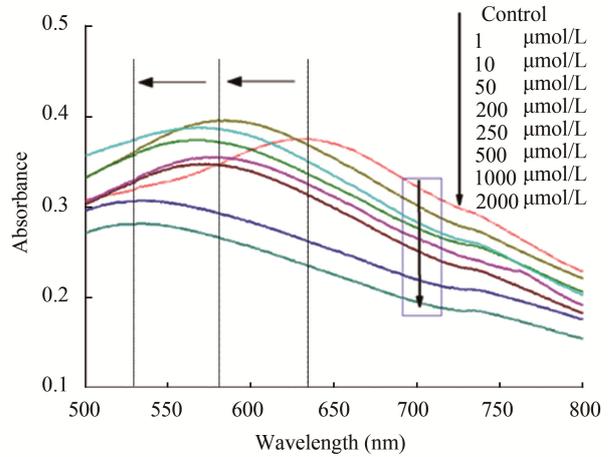


图 5 金纳米棒检测不同浓度维生素 C 的紫外-可见光光谱
Fig. 5 UV-vis spectrum of AuNRs in the presence of vitamin C with different concentrations

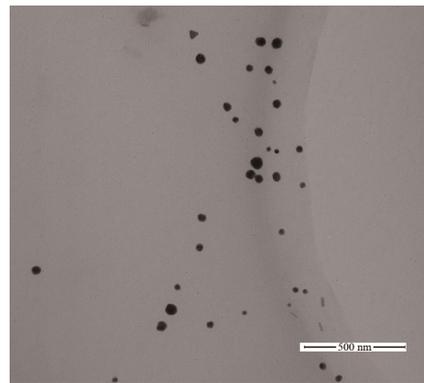


图 6 金纳米棒检测维生素 C(1000 μmol/L)的透射电子显微镜图片
Fig. 6 TEM image of AuNRs in the presence of vitamin C (1000 μmol/L)

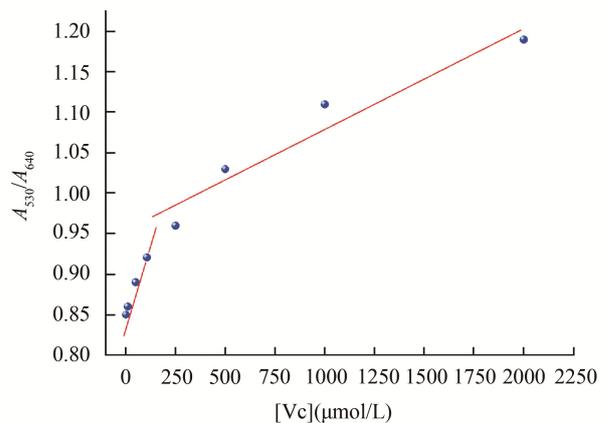


图 7 Vc 浓度与吸光度比值工作曲线: 1~100 μmol/L 和 250~2000 μmol/L 范围内

Fig. 7 Calibration curve of A_{530}/A_{640} against Vc concentrations ranging from 1 to 100 μmol/L and from 250 to 2000 μmol/L



图 8 Vc 比色传感体系的抗干扰性能研究

Fig. 8 Anti-interference ability of colorimetric sensor for vitamin C

4 结 论

本实验采用壳聚糖法制备具有合适粒径的金纳米棒, 通过金纳米棒表面“金汞齐”的生成所产生等离子共振性能的变化, 快速比色检测体系中 Vc 的含量, 此方法简单、快捷且灵敏高效, 具有潜在的应用前景和研究价值。

参考文献

- [1] 王新星, 蒋淑恋, 黄立漳, 等. 一种新的比色法测定维生素 C[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版), 2012, 75(1): 71-75.
Wang XX, Jiang SL, Huang LZ, *et al.* A new colorimetric method for the determination of vitamin C [J]. J Zhangzhou Norm Univ (Nat Sci), 2012, 75(1): 71-75.
- [2] Wang XX, Liu JM, Jiang SL, *et al.* Non-aggregation colorimetric sensor for detecting vitamin C based on surface plasmon resonance of gold nanorods [J]. Sensor Actuat B: Chem, 2013, 182: 205-210.
- [3] Peng J, Ling J, Zhang XQ, *et al.* A rapid, sensitive and selective colorimetric method for detection of ascorbic acid [J]. Sensor Actuat B: Chem, 2015, 221: 708-716.
- [4] 王建国, 王瑞斌. 高锰酸钾滴定法快速测定蔬菜中抗坏血酸含量[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 471-473.
Wang JG, Wan RB. Rapid determination of ascorbic acid in vegetable by potassium permanganate titrimetry [J]. Food Sci, 2008, 29(10): 471-473.
- [5] 羊金梅, 覃超凤, 余瑞林. 分光光度法测定梨和苹果中维生素 C 的含量[J]. 安徽医药, 2005, 9(3): 205-206.
Yang JM, Qing CF, Yu RL, *et al.* The spectrophoto determination for vitamin C in pears and apples [J]. Anhui Med Pharm J, 2005, 9(3): 205-206.
- [6] 耿立威. 西红柿中维生素 C 的分光光度法测定[J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2003, (3): 91-92.
Geng LW. Determination of tomatoes vitamin C by spectrophotometry [J]. Jilin Norm Univ: Nat Sci Ed, 2003(3): 91-92.
- [7] 姚福荣, 任燕. 草莓不同采收时期维生素 C 含量的测定[J]. 毕节学院学报, 2007, (4): 84-88.
Yao FR, Ren Y. Determination of vitamin C in strawberry with different harvest periods [J]. J Bijie Univ, 2007, (4): 84-88.
- [8] Fernandes JCB, Neto GO, Kubota LT. Use of column with modified silica for interfering retention in a FIA spectrophotometric method for direct determination of vitamin C in medicine [J]. Anal Chim Acta, 1998, 366: 11-22.
- [9] 王艳颖, 姜国斌, 胡文忠, 等. 高效液相色谱法测定草莓中维生素 C 含量[J]. 大连大学学报, 2006, 27(2): 45-48.
Wang YY, Jiang GB, Hu WZ, *et al.* Determination of vitamin C in strawberry by high performance liquid chromatography [J]. J Dalian Univ, 2006, 27(2): 45-48.
- [10] Yilmaz S, Sadikoglu M, Saglikoglu G, *et al.* Determination of ascorbic acid in tablet dosage forms and some fruit juices by DPV [J]. Int J Electrochem Sci, 2008, 3: 1534-1542.
- [11] Chandra S, Doran J, McCormack SJ. Two step continuous method to synthesize colloidal spheroid gold nanorods [J]. J Colloid Interf Sci, 2015, 459: 218-223.
- [12] Nikoobakht B, El-sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method [J]. Chem Mater, 2003, 15: 1957-1962.
- [13] 颜小丽, 刘跃, 王健, 等. 银包金纳米棒的形成及维生素 C 的局域等离子体共振吸收位移测定法[J]. 中国科学: 化学, 2011, 41(7): 1170-1176.
Yan XL, Liu Y, Wang J, *et al.* Detection of vitamin C based on the shift of localized surface plasmon resonance absorption of Au nanorods resulting from the formation of Au@Ag core/shell nanorods [J]. Sci Sin Chim, 2011, 41(7): 1170-1176.
- [14] Mohamed MB, Ismail KZ, Link S, *et al.* Thermal reshaping of gold nanorods in micelles [J]. J Phy Chem B, 1998, 102: 9370-9374.
- [15] Rex FE, Hernandez AD. Campiglia, pushing the limits of mercury sensors with gold nanorods [J]. Anal Chem, 2006, 78: 445-451.
- [16] Ghosh SK, Pal T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications [J]. Chem Rev, 2007, 107: 4797-4862.
- [17] Chandrasek G, Mouglin K, Haidara H, *et al.* Shape and size transformation of gold nanorods (GNRs) via oxidation process: a reverse growth mechanism [J]. Appl Surf Sci, 2011, 257: 4175-4179.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



徐丽萍, 教授, 主要研究方向为食品安全与食品营养。

E-mail: hecuedu@163.com