

# 基于 $\text{Fe}^{3+}$ 催化荧光增强的抗坏血酸检测

牛 静<sup>1</sup>, 胡 鹏<sup>1</sup>, 柳 准<sup>1</sup>, 李淑芳<sup>2</sup>, 马 莹<sup>2</sup>, 贾 斌<sup>2\*</sup>

(1. 黄淮学院化学化工系, 驻马店 463000; 2. 河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002)

**摘 要:** **目的** 建立了一种基于  $\text{Fe}^{3+}$  催化的荧光增强的传感平台用于抗坏血酸的灵敏检测。**方法** 抗坏血酸可以和邻苯二胺反应生成一种具有  $\pi$  键共轭结构的氮杂环的荧光化合物, 从而实现检测抗坏血酸;  $\text{Fe}^{3+}$  能够加速上述反应的进程。**结果** 在 0.2~1.7 mmol/L 浓度范围内, 体系荧光信号和抗坏血酸浓度成线性关系, 相关系数  $r=0.997$ , 检测限为 0.35  $\mu\text{mol/L}$ 。此外, 常见的干扰物不影响抗坏血酸的选择性测定。**结论** 该方法具有较高的灵敏度, 低廉的成本和简便的操作步骤, 并且易于实现定量分析。

**关键词:** 抗坏血酸; 邻苯二胺; 荧光响应

## The determination of ascorbic acid based on the fluorescence enhancement catalyzed by $\text{Fe}^{3+}$

NIU Jing<sup>1</sup>, HU Peng<sup>1</sup>, LIU Zhun<sup>1</sup>, LI Shu-Fang<sup>2</sup>, MA Ying<sup>2</sup>, JIA Bin<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China;

2. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**ABSTRACT: Objective** To construct a fluorescence sensing platform for sensitive detection of ascorbic acid based on the catalysis of  $\text{Fe}^{3+}$ . **Methods** Ascorbic acid can react with o-phenylenediamine to form a N-heterocyclic fluorescent compound with large conjugated p-bond structure, while  $\text{Fe}^{3+}$  can accelerate the reaction, which could realize the detection of ascorbic acid successfully. **Results** The fluorescence value was linearly dependent on the concentration of ascorbic acid in the range of 0.2~1.7 mmol/L with the correlation coefficient of 0.997, and the limit of detection was 0.35  $\mu\text{mol/L}$ . In addition, the common interference had no effect on the selective determination of ascorbic acid. **Conclusion** The proposed method is sensitive, costless and simple, which can be readily applied to acquire quantitative information.

**KEY WORDS:** ascorbic acid; o-phenylenediamine; fluorescent response

## 1 引 言

抗坏血酸(ascorbic acid, AA)是体内胶原蛋白生物合成不可或缺的成分, 同时也是脯氨酸和赖氨酸羟化酶的辅

因子。作为一种天然抗氧化剂, 它能高效的去除体内的自由基进而延缓衰老。大量研究表明 AA 对很多老年性疾病有预防作用, 例如动脉粥样硬化、癌症、神经组织退化以及眼部疾病<sup>[1,2]</sup>。然而, 有文献报道在过渡金属离子铜或铁

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估项目(2016)、河南省重点科技攻关项目(152102110135)、河南省高等学校重点项目(16A150015)、

**Fund:** Supported by the Project of Risk Assessment of Agro-product Quality and Safety (2016), Scientific and Technological Project of Henan Province of China (152102110135), and the Key Projects of Colleges in Henan (16A150015)

\*通讯作者: 贾斌, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全监测与检测技术研究。E-mail: jiabin854@163.com

\*Corresponding author: JIA Bin, Associate Researcher, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Henan Academy of Agricultural Science, No. 116, Huayuan Road, Jinshui District, Zhengzhou 450002, China. E-mail: jiabin854@163.com

存在时, AA 对组织的过氧化有着促进作用<sup>[3-5]</sup>。因此, 这些小分子的异常代谢将严重威胁我们的健康。鉴于 AA 分子对人类健康的深远影响, 设计和构建性能优良的检测手段用于这些小分子的监测显得非常重要。目前为止, 很多方法已经被开发出来用于 AA 的检测, 其中电化学检测是主要的方法之一<sup>[6]</sup>。然而这类方法常常因 AA 的氧化电位和多巴胺以及尿酸的氧化电位相近而导致选择性不高<sup>[7]</sup>。除此之外, 其他诸如化学发光<sup>[8]</sup>、高效液相色谱<sup>[9]</sup>、毛细管电泳<sup>[10]</sup>、流动注射<sup>[11]</sup>以及比色<sup>[12]</sup>等检测方法也有报道, 但是这些方法在样品制备、分析时间和分析成本方面的不足限制了它们的推广应用。因此, 开发一种简便而有效的 AA 分析技术在医学诊断等方面具有非常重要的现实意义。

近年来, 荧光法由于具有简单、方便以及灵敏度高等优点而受到科研工作者的重视<sup>[13]</sup>。借助于 DNA 酶、量子点、金纳米簇等功能材料, 许多 AA 荧光的检测方法被开发出来<sup>[14-20]</sup>。然而当前荧光检测 AA 大都基于荧光猝灭的检测机制, 易受到外界环境和其它猝灭物的影响而产生假阳性信号, 且灵敏度也较低。因此, 有必要开发一种低成本、信号增强的荧光检测方法对血清或者血浆中的 AA 实现定量检测。

本研究建立了一种基于  $\text{Fe}^{3+}$  催化的荧光法用于 AA 的灵敏检测。不同于现有的检测技术, 此方法具有较高的灵敏度、低廉的成本和简便的操作步骤, 且易于实现定量分析。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Cary 500 紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司); Fluoromax-4 分光光度计(日本 HORIBA Scientific 公司); 所有测量均在室温下操作。

实验中所用试剂均购自北京鼎国生物技术有限公司。如无特殊说明, 所用试剂均为分析纯且使用时未经进一步纯化。每次实验所用 1 mol/L 的 AA 溶液均为新制, 放置 4 °C 冰箱内保存。

### 2.2 实验方法

AA 检测: 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.0, 460  $\mu\text{L}$ ),  $\text{FeCl}_3$  (5  $\mu\text{L}$ ), EDTA (5  $\mu\text{L}$ ), OPDA (10  $\mu\text{L}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (88 mmol/L, 10  $\mu\text{L}$ ) 和 10  $\mu\text{L}$  不同浓度的 AA 溶液在离心管内混合, 混合液在 37 °C 下孵育 200 s。于 467 nm 的激发波长下记录 480~650 nm 之间的荧光光谱。

## 3 结果与分析

### 3.1 信号产生机制

AA 在水溶液中有 2 种同分异构体: 醇式和酮式。其酮式异构体可以和邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPDA)反应生成一种氮杂环的化合物, 这种杂环化合物具有大的  $\pi$

键共轭结构, 在 350 nm 左右有紫外吸收(图 1A), 在 500 nm (图 1B)处产生最大荧光发射,  $\text{Fe}^{3+}$  通过诱导 AA 自由基的生成可加速上述反应的进程<sup>[21-23]</sup>。生成的 AA 自由基易歧化成 AA 和脱氢 AA, 后者能快速地 and OPDA 反应生成杂环荧光物质。基于上述实验现象, 本研究构建了一种简便的传感体系用于 AA 的灵敏检测(见图 2)。

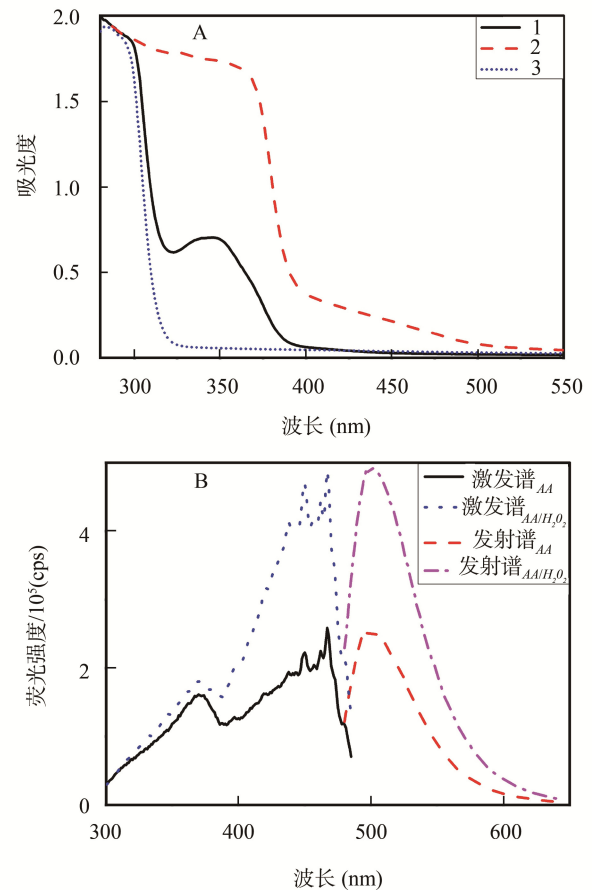


图1 紫外-可见吸收光谱图

(A): 1.AA/OPDA; 2. $\text{H}_2\text{O}_2$ /AA/ $\text{Fe}^{3+}$ /EDTA/OPDA; 3.OPDA 和荧光光谱(B)表征

Fig. 1 Spectrum chart of ultraviolet visible(UV-Vis) (A) 1.AA/OPDA; 2. $\text{H}_2\text{O}_2$ /AA/ $\text{Fe}^{3+}$ /EDTA/OPDA; 3.OPDA and fluorescence (B) characterization.

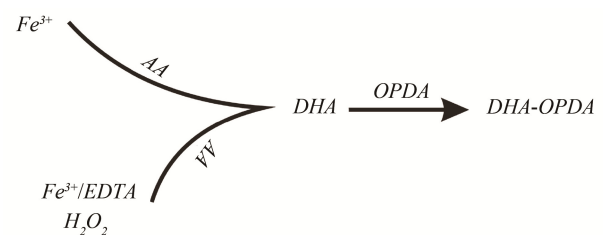


图2 抗坏血酸的检测原理

Fig. 2 Detection mechanism of AA

### 3.2 反应时间优化

以 500 nm 处的荧光发射强度为依据对反应所需的时间进行优化。实验结果如图 3A 所示, 催化反应开始后, 随着时间的延长体系荧光强度迅速增强, 一定时间以后趋向平缓, 即反应已达到平衡。图 3B 给出了催化反应在加入目标前后的荧光比值, 由图可知反应在进行到 200 s 时信噪比达到最大, 进一步延长反应时间并不能提高检测的灵敏度。综合考虑, 将反应时间定为 200 s。

### 3.3 方法的线性范围及检出限

通过加入不同浓度的 AA, 考察了所提出检测方法的定量分析性能。图 4A 给出了 AA 浓度在 0~1.7 mmol/L 之间变化时的荧光响应, 随着浓度的增加, 体系在 500 nm 处的

荧光信号明显增强, 表明荧光强度和 AA 浓度之间的相关性。图 4B 为 AA 的定量分析校正曲线, 在 0.2~1.7 mmol/L 之间, 体系荧光信号和 AA 浓度成线性关系, 线性方程为  $F=5.20 \times 10^8 C - 7.38 \times 10^4$  ( $F$  为 500 nm 处的荧光强度,  $C$  为 AA 浓度), 相关系数  $r=0.997$ , 检测限为 0.35  $\mu\text{mol/L}$ , 这与之前已报道的检测方法相当<sup>[24-27]</sup>。

### 3.4 选择性考察

在 2% 的血清样本中考察了常见干扰物对 AA 检测的影响。如图 5 所示, 尽管干扰物浓度大于目标分子的浓度, 只有 AA 存在时才能引起体系荧光信号的显著改变, 而在加入干扰物后其荧光响应和空白相比差别不大。结果表明, 检测体系的荧光是由 AA 特异引起的, 从而证明该方法对 AA 有良好的选择性。

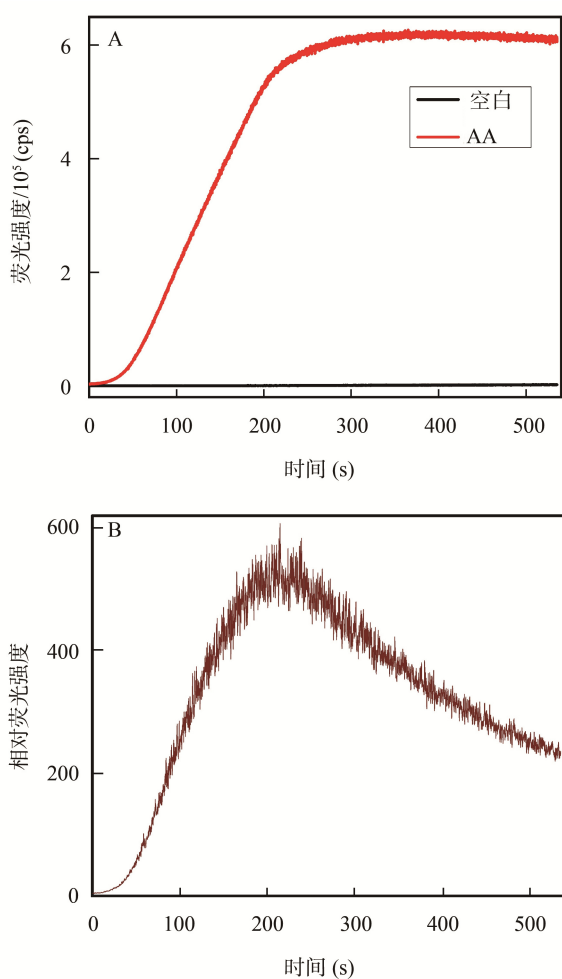


图 3 反应时间对体系荧光响应的影响

(A) 荧光强度随反应时间的变化 ( $\lambda_{em}=500\text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}=467\text{ nm}$ , AA 浓度为 2 mmol/L); (B) 目标加入前后荧光响应的比值

Fig. 3 The effect of reaction time on the system of fluorescence response

The effect of reaction time on the fluorescence intensity ( $\lambda_{em}=500\text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}=467\text{ nm}$ , addition of AA (2 mmol/L)); (B) the ratio between the fluorescence of the target and blank.

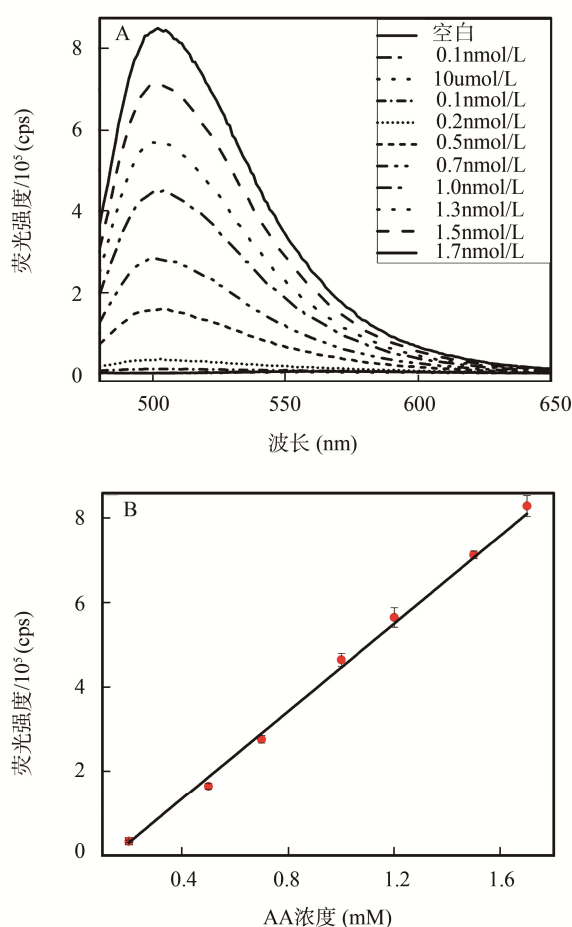


图 4 AA 浓度对体系荧光响应的影响

(A) 加入不同浓度的 AA 体系的荧光发射光谱 (B) 荧光响应和 AA 浓度之间的线性校正曲线

Fig. 4 The effect of concentration of AA on the system of fluorescence response

(A) The fluorescence emission spectra of the system adding various concentrations of AA. (B) The linear calibration curve between fluorescence response and AA concentration

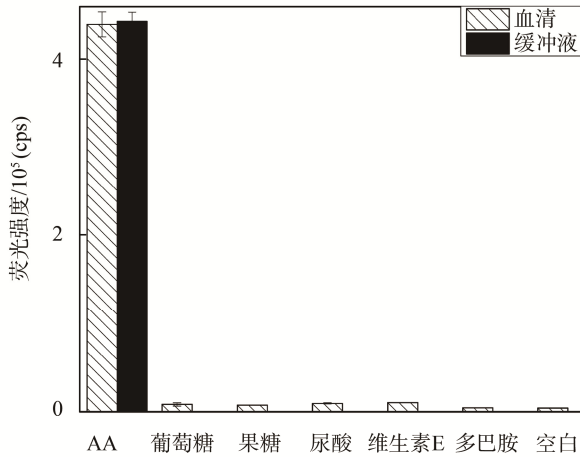


图5 2%的人血清样本中的选择性分析。

备注: 所用试剂终浓度分别为 AA 1.0 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, 果糖 10 mmol/L, 尿酸 2.6 mmol/L, 维生素 E 10 mmol/L 和多巴胺 10 mmol/L。2%人血清作为空白对照( $n=3$ )

Fig. 5 Selectivity of the proposed method to the interferents in human serum samples (2%).

Note: The concentration of AA, glucose, fructose, UA (uric acid), VE, and DA (dopamine) were 1.0, 10, 10, 2.6, 10, and 10 mmol/L respectively. Used Human serum (2%) as a control sample( $n=3$ )

### 3.5 实际样品测定

为了测试该方法的实用性, 我们在人血清样本中做了 AA 的实际样检测, 将 0.20~1.50 mmol/L 浓度的 AA 分别加入到 2%的人血清中并测试其荧光响应。如图 6 所示, 在人血清中, 体系的荧光响应和在磷酸盐缓冲液中的响应差别不大, 表明该方法可以用于 AA 的实际样本分析。

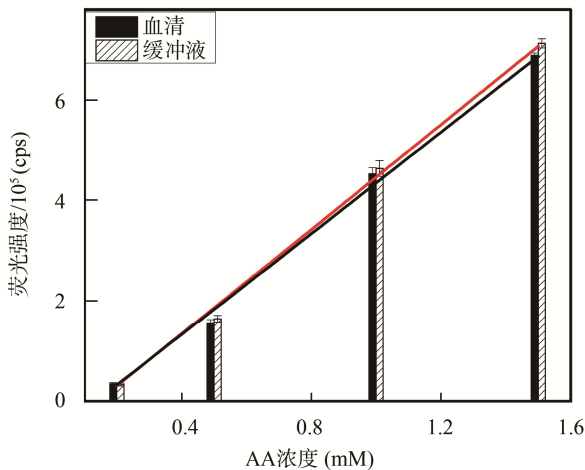


图6 不同浓度的 AA 在磷酸盐缓冲液和稀释的人血清样本中的分析

Fig. 6 The analysis of AA with different concentration in diluted serum samples (2%) and PB buffer

## 4 结论

本研究建立了一种基于  $\text{Fe}^{3+}$ 催化的荧光传感体系进行抗坏血酸的检测。该方法具有简单、快速等优点, 实现了被测物的灵敏检测。此外, 该方法呈现出良好的重现性和可靠性以及可扩展性, 有望在食品分析领域广泛应用。

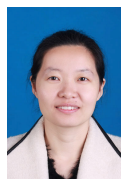
### 参考文献

- [1] Martin, A, Mayer J. Antioxidant vitamins E and C and risk of alzheimer's disease [J]. Nutr Rev, 2003, 61: 69-73.
- [2] Padayatty SJ, Katz A, Wang YH, *et al.* Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention [J]. J Am Coll Nutr, 2003, 22: 18-35.
- [3] Halliwell, B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo [J]. Free Radical Res, 1996, 25: 439-454.
- [4] Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid [J]. Radiat Res, 1996, 145: 532-541.
- [5] Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, *et al.* Vitamin C exhibits pro-oxidant properties [J]. Nature, 1998, 392: 559-559.
- [6] Qi SP, Zhao B, Tang HQ, *et al.* Determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by a novel electrochemical sensor based on pristine graphene [J]. Electrochim Acta, 2015, 161: 395-402.
- [7] Sun CL, Chang CT, Lee HH, *et al.* Microwave-assisted synthesis of a core-shell MWCNT/GONR heterostructure for the electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. ACS Nano, 2011, 5: 7788-7795.
- [8] Agater IB, Jewsbury RA. Determination of plasma ascorbic acid by HPLC: method and stability studies [J]. Euro J Pharm Sci, 1995, 3: 231-239.
- [9] Gioia MG, Andreatta P, Boschetti S, *et al.* Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48: 331-339.
- [10] Wu T, Guan Y, Ye J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Food Chem, 2007, 100: 1573-1579.
- [11] Fan J, Ye C, Feng S, *et al.* Flow injection kinetic spectrophotometric determination of ascorbic acid based on an inhibiting effect [J]. Talanta, 1999, 50: 893-898.
- [12] Zhang YF, Li BX, Xu CL. Visual detection of ascorbic acid via alkyne-azide click reaction using gold nanoparticles as a colorimetric probe [J]. Analyst, 2010, 135: 1579-1584.
- [13] Ma BL, Zeng F, Zheng FY, *et al.* A fluorescence turn-on sensor for iodide based on a T-Hg-T complex [J]. Chem Eur J, 2011, 17: 14844-14850.
- [14] Malashikhina N, Pavlov V. DNA-decorated nanoparticles as nanosensors for rapid detection of ascorbic acid [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 33: 241-246.
- [15] Chen YJ, Yan XP. Chemical redox modulation of the surface chemistry of CdTe quantum dots for probing ascorbic acid in biological fluids [J]. Small, 2009, 5: 2012-2018.
- [16] Li J, Cai XY, Ding YP, *et al.* Synthesis of Mn-doped CdTe quantum dots and their application as a fluorescence probe for ascorbic acid determination [J]. Anal Methods, 2013, 5: 6748-6754.

- [17] Wang XX, Wu P, Hou XD, *et al.* An ascorbic acid sensor based on protein-modified Au nanoclusters [J]. *Analyst*, 2013, 138: 229–233.
- [18] Park HW, Alam SM, Lee SH, *et al.* Optical ascorbic acid sensor based on the fluorescence quenching of silver nanoparticles [J]. *Luminescence*, 2009, 24: 367–371.
- [19] Mi CC, Wang TT, Zeng P, *et al.* Determination of ascorbic acid via luminescence quenching of  $\text{LaF}_3\text{:Ce}$ , Tb nanoparticles synthesized through a microwave-assisted solvothermal method [J]. *Anal Methods*, 2013, 5: 1463–1468.
- [20] Ishii K, Kubo K, Sakurada T, *et al.* Phthalocyanine-based fluorescence probes for detecting ascorbic acid: phthalocyaninosilicon covalently linked to TEMPO radicals [J]. *Chem Commun*, 2011, 47: 4932–4934.
- [21] Ihara H, Shino Y, Aoki Y, *et al.* A simple and rapid method for the routine assay of total ascorbic acid in serum and plasma using ascorbate oxidase and o-phenylenediamine [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2000, 46: 321–324.
- [22] Wu X, Diao YX, Sun CX, *et al.* Fluorimetric determination of ascorbic acid with o-phenylenediamine [J]. *Talanta*, 2003, 59: 95–99.
- [23] Tulley R. New Enzymatic Method for the Analysis of Vitamin C in Plasma and Automation on the Beckman CX5 [J]. *Clin Chem*, 1992, 38: 1070–1070.
- [24] Nezhad MR, Tashkhourian J, Khodaveisi J, *et al.* Simultaneous colorimetric determination of dopamine and ascorbic acid based on the surface plasmon resonance band of colloidal silver nanoparticles using artificial neural networks [J]. *Anal Methods*, 2010, 2: 1263–1269.
- [25] Zhou M, Zhai Y, Dong S. Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 5603–5613.
- [26] Wen D, Guo S, Dong S, *et al.* Ultrathin Pd nanowire as a highly active electrode material for sensitive and selective detection of ascorbic acid [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 1056–1061.
- [27] Sun D, Zhao Q, Tan F, *et al.* Simultaneous detection of dopamine, uric acid, and ascorbic acid using  $\text{SnO}_2$  nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/carbon paste electrode [J]. *Anal Methods*, 2012, 4: 3283.

(责任编辑: 姚菲)

## 作者简介



牛 静, 讲师, 主要研究方向为生物传感和纳米分析。  
E-mail: niujing827@126.com



贾 斌, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全监测与检测技术研究。  
E-mail: jiabin854@163.com