

# 二硫化钼负载纳米金粒子修饰电极测定酱油中 曲酸

陈威风, 田雪, 刘志景, 胡平, 崔丽伟, 潘春梅\*

(河南牧业经济学院食品与生物工程学院, 郑州 450046)

**摘要: 目的** 建立二硫化钼负载纳米金粒子(MoS<sub>2</sub>/gold nanoparticles, MoS<sub>2</sub>/AuNPs)修饰电极快速测定酱油中曲酸的方法。**方法** 采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备纳米金颗粒, 采用恒电位沉积法制备二硫化钼负载纳米金粒子的修饰电极。研究曲酸在不同修饰电极上的电化学行为, 探讨缓冲溶液类型、pH、MoS<sub>2</sub>用量和沉积时间对曲酸电化行为的影响。**结果** 在5~500 μmol/L范围内, 曲酸浓度与峰电流呈现良好的线性关系, 回归方程为  $i_{pa}(\mu A)=0.00952C(\mu mol/L)-0.21898$ ,  $r^2=0.99345$ 。检出限为3.9 μmol/L, 回收率为97.2%~105.5%, 相对标准偏差小于8.0%。**结论** 本方法所构建的修饰电极具有较好的抗干扰性、重现性和稳定性, 适用于酱油样品中曲酸的分析。

**关键词:** 酱油; 曲酸; 差分脉冲伏安法; 二硫化钼; 纳米金; 修饰电极

## Determination of kojic acid in soy sauce by MoS<sub>2</sub>/Au nanoparticles modified electrode

CHEN Wei-Feng, TIAN Xue, LIU Zhi-Jing, HU Ping, CUI Li-Wei, PAN Chun-Mei\*

(School of Food and Biological Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for rapid determination of kojic acid in soy sauce by MoS<sub>2</sub>/gold nanoparticles (MoS<sub>2</sub>/AuNPs) modified electrode. **Methods** The gold nanoparticles were prepared by reducing chloroauric acid by sodium citrate, and the modified electrode with gold nanoparticles loaded on MoS<sub>2</sub> was prepared by the constant potential deposition method. The electrochemical characteristics of kojic acid on different modified electrodes was explored, and the effects of buffer solution type, pH, amount of MoS<sub>2</sub> and deposition time on the electrochemical behavior of kojic acid were discussed. **Results** The kojic acid concentration and peak current showed a good linear relationship in the range of 5-500 μmol/L and the regression equation was  $i_{pa}(\mu A)=0.00952C(\mu mol/L)-0.21898$ ,  $r^2=0.99345$ . The limit of detection was 3.9 μmol/L, the recoveries were 97.2%-105.5%, and the relative standard deviations were less than 8.0%. **Conclusion** The modified electrode constructed by this method has good anti-interference, reproducibility and stability, and is suitable for the analysis of kojic acid in soy sauce samples.

**KEY WORDS:** soy sauce; kojic acid; differential pulse voltammetry; MoS<sub>2</sub>; gold nanoparticles; modified electrode

基金项目: 河南省科技攻关项目(182102110303、202102110058)

Fund: Supported by the Project of the Department of Education of Henan Province (182102110303, 202102110058)

\*通信作者: 潘春梅, 博士, 教授, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: pancm7570@163.com

\*Corresponding author: PAN Chun-Mei, Ph.D, Professor, Henan University of Animal Husbandry and Economy, No.6, Longzi North Road, Zhengdong New District, Zhengzhou 450046, China. E-mail: pancm7570@163.com

## 0 引言

曲酸(kojic acid)最早由日本的斋藤在 1907 年用米曲霉酿造酱油时发现, 其化学名称为 5-羟基-2-羟甲基-1,4-吡喃酮<sup>[1-2]</sup>。曲酸是一种有机酸, 主要存在于豆瓣酱、酱油等酿造食品中, 是曲霉菌的主要代谢物之一, 在多种曲霉发酵的产品中都可以检测到<sup>[3-5]</sup>。曲酸由于具有较好的抗菌和抗氧化能力, 故可作为防腐剂、保鲜剂、抗氧化剂用于食品生产加工过程中<sup>[6-7]</sup>。随着研究人员对曲酸的认识不断加深, 有研究<sup>[8]</sup>指出过量的曲酸会对人体甲状腺造成损害, 甚至引起癌变, 故早在 2017 年, 曲酸被世界卫生组织国际癌症研究机构列为 3 类致癌物, 因此建立一种曲酸快速定量测定方法意义重大。

现有的曲酸测定方法主要有以下几种: 比色法<sup>[9-10]</sup>、气相色谱法<sup>[11-12]</sup>、近红外光谱<sup>[13-14]</sup>、高效液相色谱法<sup>[15-20]</sup>、电化学方法和生物传感器法等<sup>[8,21-23]</sup>。虽然上述各类方法可以实现曲酸的定量测定, 但存在一定的局限性, 例如, 需要昂贵的仪器、样品前处理复杂、需要专门的技术人员等。生物传感器法具有检测速率快的特点, 为了提高传感器的灵敏度, 常常在电极表面负载一些二维纳米材料, 如二硫化钼(MoS<sub>2</sub>)、石墨烯等, 三维纳米材料, 如铂、金等纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)<sup>[21-22]</sup>。本研究采用 MoS<sub>2</sub> 负载 AuNPs 的修饰电极用于酱油中曲酸的定量测定, 以期建立一个快速、稳定、准确的曲酸定量分析方法, 为测定酱油中曲酸含量提供新思路。

## 1 材料及方法

### 1.1 仪器与试剂

CHI660E 电化学工作站[采用三电极体系, 玻碳电极(glass carbon electrode, GCE)或其修饰电极为工作电极( $\phi=3$  mm), 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝为对电极, 上海辰华仪器有限公司]; AE224 分析天平(上海舜宇有限公司); KQ-200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); UPR-II-5/10T 超纯水仪(西安优普仪器设备有限公司)。

氯金酸(99.99%, 美国 Sigma 公司); 二硫化钼(XF134, 江苏先锋纳米材料有限公司); 曲酸(分析纯, 上海麦克林生化有限公司); 所用其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为二次蒸馏水, 酱油购自于当地超市。

### 1.2 纳米金的制备

根据文献<sup>[23]</sup>, 采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法合成 AuNPs。先在 250 mL 的三口烧瓶加入 98 mL 超纯水和 1 mL 1% (*m:m*) 氯金酸溶液, 设置加热温度为 120 °C, 待溶液沸腾后, 将 1 mL 1% (*m:m*) 柠檬酸钠溶液快速加入三口烧瓶内, 保持溶液沸腾 15 min, 当溶液颜色变成深红

色时停止加热, 继续搅拌自然冷却至室温, 随后放置于 4 °C 条件下冷藏备用。

### 1.3 AuNPs/MoS<sub>2</sub>/GCE 的制备

分别用 0.10、0.05  $\mu\text{m}$  的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粉末在麂皮上对玻碳电极进行打磨, 抛光至镜面, 依次用超纯水、无水乙醇超声冲洗电极表面, 自然晾干, 将 4  $\mu\text{L}$  二硫化钼溶液滴涂在电极表面, 37 °C 孵育 15 min, 制得 MoS<sub>2</sub>/GCE, 随后将修饰电极置于含有 5 mL 纳米金的小烧杯中, 采用电沉积法, 设置电压为 -0.2 V, 时间为 200 s, 即得 AuNPs/MoS<sub>2</sub>/GCE。

### 1.4 样品预处理

选取发酵类食品酱油作为样品, 真空抽滤泵抽滤酱油过滤, 取 1 mL 酱油样品, 加入 20 mL pH=4.4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液、1 mL 0.03 mol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液、0.1 mL 质量分数为 1% 的亚硫酸钠和 19 mL 的超纯水制得待测液。

### 1.5 测定方法

采用三电极体系, 将修饰电极置于含有不同浓度曲酸的 pH=4.4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中, 采用差分脉冲伏安法, 设置电位范围为 0.8~1.2 V, 扫描速度为 100 mV/s, 记录曲酸氧化峰峰电流, 每次测试后, 用二次蒸馏水冲洗电极表面数次, 即可进行下一次测定。

## 2 结果与分析

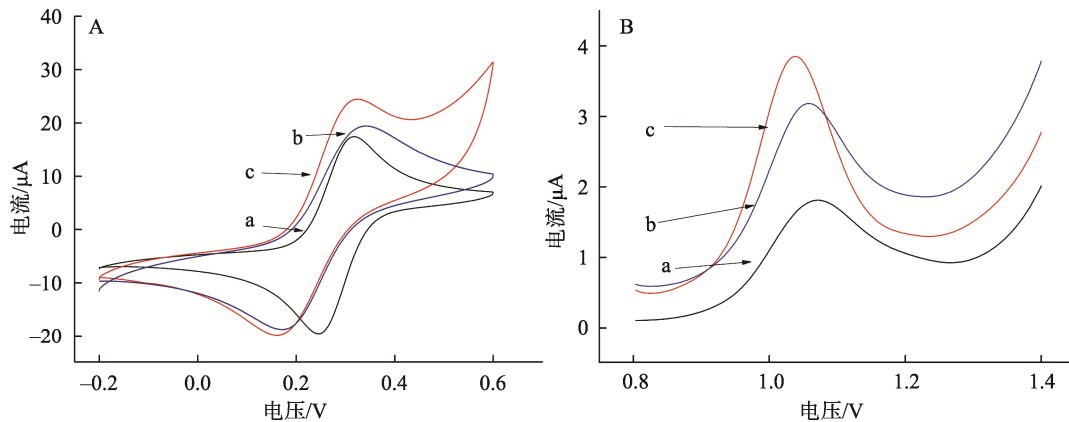
### 2.1 AuNPs/MoS<sub>2</sub>/GCE 的电化学表征

为了考察修饰电极的成功制备, 将不同的修饰电极置于铁氰化钾溶液中, 记录其循环伏安曲线, 如图 1A 所示, 从图中可以看出, 当裸电极表面修饰 MoS<sub>2</sub> 后, 峰电流与裸电极相比明显增强。当继续修饰纳米金后, 峰电流得到进一步增强, 这是由于 MoS<sub>2</sub> 具有较大的表面积, 纳米金作为贵金属纳米粒子能够有效地加快电子传递速率所致。将不同修饰电极置于曲酸溶液中, 记录其差分脉冲曲线, 如图 1 所示, 从图中可以看出, 电极表面依次修饰石墨烯和纳米金后, 曲酸氧化峰峰电流不断增加, 与在铁氰化钾溶液中实验结果一致, 说明 AuNPs/MoS<sub>2</sub>/GCE 成功制备, 可用于曲酸的定量测定。

### 2.2 实验条件的优化

#### 2.2.1 缓冲液类型对曲酸测定的影响

为了探讨缓冲溶液类型对曲酸测定的影响, 配制了同一曲酸浓度(200  $\mu\text{mol/L}$ )、酸度(pH 5.0)的醋酸-醋酸钠、磷酸二氢钾-氢氧化钠、磷酸氢二钠-柠檬酸、柠檬酸-氢氧化钠-盐酸、柠檬酸-柠檬酸钠溶液。测定曲酸氧化峰峰电流, 结果如图 2 所示, 当曲酸在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中氧化峰电流较大, 故实验选择最佳缓冲液类型为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。



注: a: GCE; b: MoS<sub>2</sub>/GCE; c: AuNPs/MoS<sub>2</sub>/GCE。

图 1 不同修饰电极在 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]溶液中的循环伏安曲线(A)和在曲酸溶液中的差分脉冲曲线(B)

Fig.1 Cyclic voltammetric curves (A) of different modified electrodes in K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] solution and differential pulse curves (B) in kojic acid solution

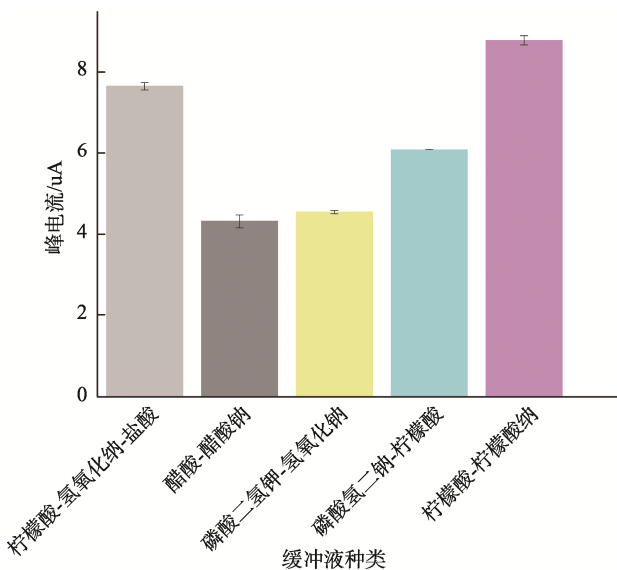


图 2 不同类型缓冲液对曲酸氧化峰峰电流值的影响( $n=3$ )

Fig.2 Effects of different types of buffer on the oxidation peak and current values of kojic acid ( $n=3$ )

### 2.2.2 pH 对曲酸测定的影响

由于氧化过程涉及到质子的参与,因此测定底液 pH 对电极反应的影响较大。本研究探讨了不同 pH (3.6、4.0、4.4、5.0、5.6、6.0)的缓冲液对曲酸氧化峰峰电流的影响程度不同,配制不同 pH 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,测定曲酸氧化峰峰电流,平行测定 3 次,结果显示,随着 pH 的增加,峰电流呈现先增后减的趋势,当 pH 为 4.4 时,氧化峰电流最大,因此,最佳缓冲液 pH 为 4.4。

### 2.2.3 MoS<sub>2</sub> 修饰量对曲酸测定的影响

MoS<sub>2</sub> 作为电极修饰材料,可以有效的提高电子传递速率,其用量的多少直接影响峰电流的大小,故实验对不同二硫化钼的滴涂量(2、4、6、8、10 μL)进行优化,平行

测定 3 次,结果显示,随着滴涂量的增加,氧化峰峰电流呈现上升趋势,当滴涂量为 4 μL 时,峰电流最大,随后增加滴涂量,溶液峰电流变化不明显,呈现稳定趋势,这可能是由于电极表面修饰量已达到饱和,进一步增加滴涂量,反而增大了电子传递阻率所致。故选取 4 μL 作为二硫化钼的最佳滴涂量。

### 2.2.4 纳米金的沉积时间对曲酸测定的影响

沉积时间直接关系到沉积量。采用恒电位沉积法探讨纳米金不同沉积时间(50、100、150、200、250、300 s)对曲酸氧化峰峰电流的影响,平行测定 3 次,结果表明,随着富集时间的增大,电化学传感器的响应也随之增大,但沉积时间超过 200 s 时,电流响应值反而下降,这可能时由于电极表面沉积的粒子达到了饱和状态,当电极表面形成的膜达到一定厚度时,传感器对曲酸的响应会随着沉积量的增加而减小,故选择沉积时间为 200 s。

## 2.3 工作曲线及检出限

在最佳实验条件下,配制一系列浓度梯度的曲酸标准溶液,记录其差分脉冲伏安曲线,平行测定 3 次,如图 3A 所示,将曲酸浓度与其对应氧化峰峰电流做线性回归分析,发现,当曲酸浓度在 5~500 μmol/L 范围内,其浓度与峰电流呈现良好的线性关系,如图 3B 所示,相关性方程为:  $i_{pa}(\mu A)=0.00952C(\mu mol/L)-0.21898$ ,  $r^2=0.99345$ ,检出限为 3.9 μmol/L ( $S/N=3$ ),方法灵敏度高。

## 2.4 重现性、稳定性、干扰性

在相同条件下制备的 5 个修饰电极分别对 170 μmol/L 曲酸溶液进行测定,测得峰电流的相对偏差为 5.3%。同一个修饰电极平行测定 10 次,相对标准偏差小于 4.1%。将修饰电极保存于 4 °C 下,7 d 后再对 170 μmol/L 的曲酸溶液测定,电流响应为初始响应值的 89%,表明此电极有良好

的重现性和稳定性。

此外, 在 20  $\mu\text{mol/L}$  的曲酸溶液中, 考察了一些可能共存的小分子化合物对曲酸测定的影响。结果表明, 50 倍的氯化镁、氧化锌、碳酸钠、磷酸氢二钾、硫酸铜对于曲酸的测定无显著影响(电流信号变化小于 5%), 表明所构建的修饰电极具有良好的抗干扰能力。

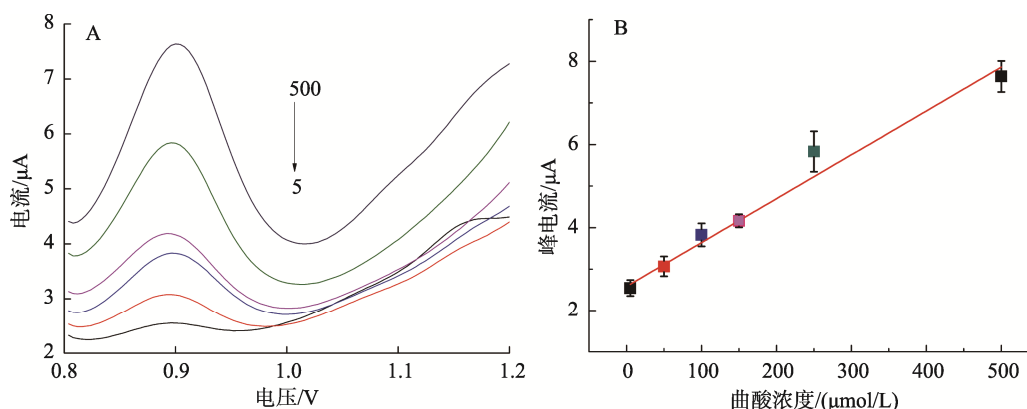


图 3 不同浓度曲酸的差分脉冲曲线(A)及曲酸浓度与峰电流的线性拟合曲线(B)

Fig.3 Differential pulse curves of kojic acid with different concentrations (A) and linear fitting curves of kojic acid concentrations and peak current (B)

表 1 样品中曲酸含量的测定( $n=3$ )

Table 1 Determination of kojic acid content in samples ( $n=3$ )

样品	样品测定值/ $(\mu\text{mol/L})$	加入的标准量/ $(\mu\text{mol/L})$	加标测定值/ $(\mu\text{mol/L})$	回收率/%	RSD/%
酱油	25.058	50	73.682	97.2	7.91
		60	88.359	105.5	6.12
		70	96.058	101.4	5.59

### 3 结论

本研究用二硫化钼和纳米金制备了修饰电极, 优化了制备过程和酱油中曲酸测定条件, 在最佳实验条件下, 用 AuNPs/MoS<sub>2</sub>/GCE 对曲酸含量进行差分脉冲伏安法测定。曲酸在 5~500  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内与其氧化峰电流表现出良好的线性响应, 样品加标回收率为 97.2%~105.5%。所建方法具有较高的灵敏度, 重现性和稳定性良好, 抗干扰能力强, 可用于酱油样品中曲酸的测定。

### 参考文献

- [1] CHAUDHARY A. Recent advances in the exploitation of kojic acid in multicomponent reactions [J]. *Curr Org Chem*, 2020, 24(14): 1643–1662.
- [2] MAHMOUD AE, IBRAHIM A, MAYER P. Zn(ii) and Cd(ii) thiosemicarbazones for stimulation/inhibition of kojic acid biosynthesis from *Aspergillus flavus* and the fungal defense behavior against the metal complexes' excesses [J]. *J Biol Inor Chem*, 2020, 25: 797–809.
- [3] BULEANDRA MR, ABINCA AA, TACHE F, et al. Rapid voltammetric detection of kojic acid at a multi-walled carbon nanotubes screen-printed electrode [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2017, 241: 406–412.
- [4] MONTAZERI M, EMAMI S, HASGARIAN O, et al. In vitro and in vivo evaluation of kojic acid against *Toxoplasma gondii* in experimental models of acute toxoplasmosis [J]. *Exp Parasitol*, 2019, 200: 7–12.
- [5] XIN RW, HUI MC, XUE-WEI GAO, et al. Intercalation assembly of kojic acid into Zn-Ti layered double hydroxide with antibacterial and whitening performances [J]. *Chin Chem Lett*, 2019, 30(4): 919–923.
- [6] 李敏波, 张琪, 张芳, 等. 超声波-曲酸复合处理对鲜切紫薯多酚氧化酶活性的影响[J]. *保鲜与加工*, 2020, 20(5): 9–15.
- [7] LI MB, ZHANG Q, ZHANG F, et al. Effects of ultrasonic-kojic acid combined treatment on polyphenol oxidase activities in fresh-cut purple sweet potato [J]. *Storage Process*, 2020, 20(5): 9–15.
- [8] WANG RF, HU XY, AGYEKUMWAA AK, et al. Synergistic effect of kojic acid and tea polyphenols on bacterial inhibition and quality maintenance of refrigerated sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets [J]. *LWT*, 2021, 137: 110452.
- [9] 邵东旭, 马心英, 信明浩, 等. 聚 L-瓜氨酸修饰电极电化学测定食品中曲酸[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(3): 276–280.
- [10] SHAO DX, MA XY, XIN MH, et al. Poly L-citrulline electrode electrochemical determination of kojic acid in food [J]. *Food Ferment Ind*,

- 2020, 46(3): 276–280.
- [9] 张理珉, 程立忠, 陆和生. 三氯化铁比色法测定曲酸含量方法的改进[J]. 生物技术, 2000, (3): 1, 50.  
ZHANG LM, CHENG LZ, LU HS. Improvement of curic acid content by iron trichloride [J]. Biotechnology, 2000, (3): 1, 50.
- [10] 丁洪斌. 142-曲酸霜制剂曲酸含量的测定[J]. 中国美容医学, 1998, (3): 161.  
DING HB. 142-Preparation of curvature acid cream for the determination of curvature acid content [J]. Chin J Aesthet Med, 1998, (3): 161.
- [11] SZULEJKO JE, KIM KH, BROWN R, *et al.* Review of progress in solvent-extraction techniques for the determination of polyaromatic hydrocarbons as airborne pollutants [J]. Trend Anal Chem, 2014, 61: 40–48.
- [12] 陈柯星, 郑申西, 林捷, 等. 食品中曲酸的气相色谱分析方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 1991–1993.  
CHEN KX, ZHENG SX, LIN J, *et al.* Study on the gas chromatographic analysis method of sulfuric acid in food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(14): 1991–1993.
- [13] 李迎凯. 近红外光谱分析技术在食品分析检测中的应用探究[J]. 食品安全导刊, 2021, (3): 172, 174.  
LI YK. Application of near-infrared spectroscopy in food analysis and detection [J]. Chin Food Saf Magaz, 2021, (3): 172, 174.
- [14] 赵昕, 张任, 王伟, 等. 基于近红外光谱快速定量检测面粉中曲酸的方法建立[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 249–255.  
ZHAO X, ZHANG R, WANG W, *et al.* Quantitative detection of sulfuric acid in flour by near-infrared spectrum [J]. Food Sci, 2018, 39(8): 249–255.
- [15] 徐文, 何义娟, 张鹏, 等. 高效液相色谱手性冠醚固定相的制备研究[J]. 化学试剂, 2020, 42(3): 254–258.  
XU W, HE YJ, ZHANG P, *et al.* Study on the preparation of the chiral crown ether fixed phase of high performance liquid chromatography [J]. Chem Reagents, 2020, 42(3): 254–258.
- [16] 晏龙, 张学忠, 谭建林, 等. HPLC 法测定面粉中曲酸和过氧化苯甲酰的含量[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(3): 115–117.  
YAN L, ZHANG XZ, TAN JL, *et al.* The content of peric acid and benzoyl peroxide in flour was determined by HPLC method [J]. Food Res Dev, 2015, 36(3): 115–117.
- [17] 余诗雨, 刘育坚, 杨怡, 等. 曲酸的液相色谱分离方法研究及其在化妆品分析中的应用[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(9): 1724–1727.  
YU SY, LIU YJ, YANG Y, *et al.* Study on the liquid chromatography separation method of the sulfuric acid and its application in the cosmetics analysis [J]. Chem Res Appl, 2020, 32(9): 1724–1727.
- [18] 王硕, 孙灵利, 刘焯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定小麦制品中 4 种交链孢霉毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 35–40.  
WANG S, SUN LL, LIU Y, *et al.* Spectrometry simultaneous determination of thiourea, kojic acid, thiabendazole, thiazazole and tetracycline in flour by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2019, 31(1): 35–40.
- [19] 张东方. 高效液相色谱法测定面粉中曲酸的不确定度评定[J]. 海峡药学, 2017, 29(12): 79–82.  
ZHANG DF. Uncertainty evaluation for determination of kojic acid in flour by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2017, 29(12): 79–82.
- [20] OLA A, SUGI Y, SOA C, *et al.* Analysis of production kojic acid from endophytic fungi *Aspergillus flavus* isolated from *Annona squamosa* leaves using an OSMAC approach [J]. Iop Conf Ser Mater Sci Eng, 2020, 823: 12003.
- [21] AVAZPOUR S, PARDAKHTY A, NABATIAN E, *et al.* Economical approach for determination of kojic acid by nanostructured ionic liquid-based carbon paste sensor [J]. Bionanoscience, 2020, 10(1): 502–511.
- [22] ELINSON MN, RYZHKOVA YE, KRYMOV SK, *et al.* Electrochemically induced multicomponent 'one-pot' assembling benzaldehydes, N,n'-dimethylbarbituric acid, and kojic acid [J]. Monatshefte Fur Chem, 2020, 151(4): 1–7.
- [23] 陈威风, 陈薇, 蔡颖, 等. 基于核酸适配体结合纳米金模拟酶用于单增李斯特菌的快速检测[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 176–180.  
CHEN WF, CHEN W, CAI Y, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nucleic acid aptamer combined with nano-enzyme [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(3): 176–180.

(责任编辑: 李磅礴 郑 丽)

## 作者简介



陈威风, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: zhuimeng860209@163.com



潘春梅, 博士, 教授, 主要研究方向为食品微生物。  
E-mail: pancm7570@163.com