材料研究与应用　2025,19(3):546-553
Materials Research and Application
http://mra.ijournals.cn
Email:clyjyyy@gdinm.com

DOI:10.20038/j.cnki.mra.2025.000317

基于Os-Ir纳米复合材料的过氧化物酶模拟活性快速灵敏比色检测抗坏血酸

钟颖颖,杨俊松,叶翼俐,骆锦怡,汪洪武*
(肇庆学院,广东 肇庆 526061)

摘要: 抗坏血酸在维护人体健康、预防疾病等方面扮演着不可或缺的角色,准确测定食品、保健品等中抗坏血酸含量至关重要。近年来,研究者们致力于开发基于纳米酶的简单、快速、高灵敏度的抗坏血酸检测方法。然而,目前还未有关于Os-Ir纳米酶及其应用于抗坏血酸检测的研究报道。因此,为丰富纳米酶种类,采用还原法合成了粒径约为34 nm且形态均一的球状Os-Ir纳米复合物,并将其用于抗坏血酸检测,开发出一种新的、简单、有效、准确、快速检测抗坏血酸的方法。结果表明,Os-Ir纳米复合物具有优异的过氧化物酶模拟活性,其米氏常数(K_m)为2.98 mmol·L^{-1}、最大反应速率(V_{max})为5.62 mmol·L^{-1}min^{-1}。在此基础上,通过实验确定了Os-Ir纳米酶用于抗坏血酸检测的最佳传感条件,如反应体系pH值5.5、反应温度40 ℃、Os-Ir纳米酶的原液稀释倍数256倍、反应时间5 min。在最优检测条件下,所开发的基于Os-Ir纳米酶的抗坏血酸检测方法获得了较宽的检测范围(0—147.06 μmol·L^{-1})和较高的检测灵敏度(检测限为0.31 μmol·L^{-1}、定量限为1.03 μmol·L^{-1})。通过在3款不同饮料中进行加标回收实验验证了所开发方法在实际样品检测中具有相当的可靠性和可行性,其中回收率为95.15%—103.22%、相对标准偏差为1.92%—8.60%,均在可接受标准范围内。研究开发的基于Os-Ir纳米酶的比色检测方法对抗坏血酸实现了简单、便捷、快速、灵敏的检测,在食品监制、生物医药等领域中具有较高的潜在应用价值。

关键词: Os-Ir纳米酶;过氧化物酶模拟活性;抗坏血酸;比色检测;灵敏;快速;准确;饮料
中图分类号: O652.1　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1673-9981(2025)03-0546-08

引文格式: 钟颖颖,杨俊松,叶翼俐,等. 基于Os-Ir纳米复合材料的过氧化物酶模拟活性快速灵敏比色检测抗坏血酸[J]. 材料研究与应用,2025,19(3):546-553.
ZHONG Yingying, YANG Junsong, YE Yili, et al. Rapid and Sensitive Colorimetric Detection of Ascorbic Acid Based on Os-Ir Nanocomposite with Peroxidase-Mimicking Activity[J]. Materials Research and Application, 2025, 19(3): 546-553.

0 引言

抗坏血酸在维护人体健康、预防疾病等方面扮演着不可或缺的角色,例如其能够促进胶原蛋白的合成[1],清除自由基[2],预防肿瘤和心血管病[3],增强免疫力[4]等。由于人体无法合成抗坏血酸[5],只能从通过摄食富含维生素的果蔬、保健品等中获得,长期缺乏抗坏血酸会导致人体免疫系统功能降低[6]。但是,摄入过量的抗坏血酸也会对身体产生伤害,例如会导致胃痉挛、尿结石等。因此,通过简单、快速、有效、准确的方法测定食品、保健品等中抗坏血酸含量至关重要。

传统的抗坏血酸的检测有很多,如高效液相色谱(HPLC)法[4]、紫外-可见分光光度法[5]、电化学分析法[6]、碘量法、滴定法等。但是,这些方法存在如检测成本高、耗时、灵敏度不足、重现性差等缺点,因此研究者们致力于开发基于纳米酶的更简单、快速、高灵敏度的抗坏血酸检测方法[7-14]。Huang等[12]通过油浴热解工艺合成了具有较高过氧化物酶模拟活性的铁掺杂碳量子点(Fe-CQDs),并基于其开发了一种抗坏血酸比色测定法,此法对抗坏血酸的检测

收稿日期: 2024-08-01
基金项目: 广东省区域联合基金-青年基金项目(2023A1515110754);2024肇庆学院高层次项目(504/2024012220);广东省教育厅科研项目(2020ZDZX2045)
作者简介: 钟颖颖,博士,讲师,研究方向为纳米酶的设计、合成及其在分析检测中的应用。E-mail:2023020054@zqu.edu.cn。
通信作者: 汪洪武,博士,教授,研究方向为食品营养与健康、食品安全检测。E-mail:hwwang@zqu.edu.cn。

范围为1—120 μmol·L^{-1},检测限为0.435 μmol·L^{-1}。Lian等[13]合成了具有明显的过氧化物酶模拟活性的Ag@Co_3O_4层状复合材料,并将其用于抗坏血酸的检测中,检测限为0.59 μmol·L^{-1},线性范围2—60 μmol·L^{-1}。

锇(Os)、铱(Ir)作为铂族元素,已被用于开发具有酶模拟活性的纳米酶,并在疾病治疗、免疫分析和污染物降解等领域得到了应用[15-18]。例如,Li等[16]研究发现,制备的MnO_2/IrO_2纳米颗粒具有过氧化物酶模拟活性,可以催化肿瘤中H_2O_2的分解而产生O_2,缓解肿瘤的缺氧状态,从而提高肿瘤的光动力治疗效率。Pan等[17]运用一锅法制备了具有过氧化物酶模拟活性的Os纳米酶,并将其与抗叶酸抗体偶联构建了一种用于叶酸高灵敏度、高特异性检测的双功能免疫分析方法,最低检测限为4.03 ng·mL^{-1}。Tang等[14]采用一锅法合成了一种具有过氧化物模拟活性的柠檬酸盐功能化的Os纳米粒子,并将其成功应用于酚类污染物的高级氧化降解中。

目前,还未有关于Os-Ir复合金属纳米酶的研究报道。为了丰富纳米酶种类,将开发新型的Os、Ir复合纳米酶,进而开发用于抗坏血酸快速检测的比色方法有较大的研究意义和实际应用价值。本研究采用一锅还原法制备Os-Ir纳米复合物,同时探究其酶模拟活性。将所制备的优化Os-Ir纳米酶用于抗坏血酸检测,在最佳检测条件下测定抗坏血酸的检测范围、检测限和定量限,将所开发的检测方法应用于含抗坏血酸的实际样品的检测中,通过测定加标回收率和相对标准偏差(RSD),以验证所开发方法在实际应用中的可行性及可靠性。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

实验所用材料包括:一水合柠檬酸,上海安谱实验科技股份有限公司生产;甘氨酸、六氯铱酸钾(K_2OsCl_6)、柠檬酸、30%过氧化氢(H_2O_2),上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产;L-抗坏血酸、3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)、三氯化铱水合物($IrCl_3·H_2O$),上海麦克林生化科技有限公司生产;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP),天津大茂试剂厂生产,且均为分析纯;饮料,购于肇庆学院昌大昌超市。

1.2 实验仪器

实验所用仪器包括:LC-LX-H165A高速离心机、LC-MSB-S磁力搅拌器、LC-WB-6水浴锅,上海力辰邦西仪器科技有限公司制造;QBSCANY-2021酶标仪,南京德铁生物科技有限公司制造;KX-1613T超声波清洗机,北京科玺世纪科技有限公司制造;ATY124电子天平,日本岛津公司制造;PHS-3C pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司制造;HT7700透射电子显微镜,日本日立公司制造;D8 ADVANCE X射线衍射仪,德国布鲁克公司制造。

1.3 Os-Ir纳米酶的制备与表征

参考文献[19]中的方法制备Os-Ir纳米酶。首先,将50 μL的K_2OsCl_6(20 mmol·L^{-1})水溶液、50 μL的$IrCl_3·H_2O$(40 mmol·L^{-1})水溶液、6 mg的甘氨酸粉末、15 mg的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、900 mL的H_2O加入到1.5 mL的离心管中,涡旋10 min使溶液充分混匀。然后,在60 ℃水浴锅中预热5 min,再加入100 μL(1.5 mol·L^{-1})L-抗坏血酸溶液,随后继续涡旋1 min,在60 ℃水浴锅中反应2 h。最后,在25 ℃,12 000 r·min^{-1}下离心20 min,并用去离子水洗涤3次,得到Os-Ir纳米酶原液。通过酶标仪、TEM、XRD对Os-Ir纳米酶进行表征。

1.4 Os-Ir纳米酶过氧化物酶模拟活性验证

过氧化物酶能催化H_2O_2氧化TMB生成在650 nm左右有特征吸收峰的蓝色产物oxTMB。为验证在Os-Ir纳米酶是否具有过氧化物酶模拟活性,设定4组试样,分别为Os-Ir(稀释倍数为256倍,10 μL)+ TMB(208 μmol·L^{-1},150 μL)+ H_2O(50 μL)、Os-Ir(稀释倍数为256倍,10 μL)+ TMB(208 μmol·L^{-1},150 μL)+ H_2O_2(50 μL,30%)、H_2O(10 μL)+ TMB(208 μmol·L^{-1},150 μL)+ H_2O_2(50 μL,30%)和Os-Ir(稀释倍数为256倍,10 μL)+ H_2O(200 μL),并将4组试样在40 ℃条件下反应5 min,随后用酶标仪在450—800 nm范围内测定4组试样的紫外吸收光谱。

1.5 Os-Ir纳米酶稳态动力学研究

为了进一步探究Os-Ir纳米酶的酶模拟催化活性,进行了稳态动力学研究。将150 μL不同浓度的TMB溶液(208、104、52、26、13、6.5 μmol·L^{-1})和10 μL稀释倍数为256倍的Os-Ir纳米酶溶液加入96孔板中,在40 ℃、pH值为5条件下反应5 min后,用酶标仪在650 nm处测定体系的吸光值。将不添加TMB溶液的组设为空白组。根据Lambert-Beer定律(见式(1))计算反应时间内产生的oxTMB的浓

度(μmol·L^{-1})。式(1)中:A为体系吸光度;ε为吸光物质的摩尔吸光系数(L·mol^{-1}·cm^{-1}),oxTMB的摩尔吸光系数是3.9×10^4 L·mol^{-1}·cm^{-1};c为产生的oxTMB浓度(μmol·L^{-1});b为吸收层的厚度(cm),体系凹液面处至96孔板顶部为0.3 cm。

$$A=\varepsilon bc \tag{1}$$

单位时间内产生的oxTMB的量,即初始速度V_0(mmol·L^{-1}·min^{-1})通过oxTMB浓度除反应时间得到。通过式(2)得到$\frac{1}{V_0}$和$\frac{1}{[S]}$的双倒数线图,根据曲线截距和斜率求得最大反应速度V_{max}(mmol·L^{-1}·min^{-1})和米氏常数K_m(mmol·L^{-1})。式(2)中$[S]$为底物浓度,mmol·L^{-1}。

$$\frac{1}{V_0}=\frac{K_m}{V_{max}}\cdot\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}} \tag{2}$$

1.6 抗坏血酸检测条件的优化

为了得到最优的抗坏血酸检测条件,对Os-Ir纳米酶浓度、反应温度、反应时间、pH值4个因素进行优化。将150 μL的浓度为208 μmol·L^{-1}的TMB溶液和10 μL一定浓度的Os-Ir纳米酶溶液(原液稀释0、2、4、8、16、32、64、128、256,512、1 024、2 048倍)加入96孔板中,在一定温度(25、30、35、40、45、50、55、60、65 ℃)和反应时间(0、2、5、10、15、20 min)及反应体系的pH值(2、4、5.5、6、8、10)下,用酶标仪在650 nm处测定反应体系的吸光值,空白组不添加TMB溶液。以吸光值作为纵坐标,以Os-Ir纳米酶浓度、反应温度、反应时间、体系pH值做为横坐标进行做图,找出最佳的Os-Ir纳米酶溶液稀释倍数、反应时间、反应温度和pH值。

1.7 抗坏血酸的检测范围、检测限和定量限测定

为了评估Os-Ir纳米酶用于抗坏血酸检测的灵敏度,对抗坏血酸的检测限(Limit of detection,LOD)、定量限(Limit of quantitation,LOQ)和线性检测范围进行了测定。将10 μL原液稀释256倍的Os-Ir纳米酶溶液和10 μL不同浓度的抗坏血酸(0、0.29、0.57、1.15、2.3、4.6、9.19、18.38、36.76、73.53、147.06、294.12、588.24 μmol·L^{-1})及150 μL的浓度为208 μmol·L^{-1}的TMB溶液加入96孔板中,在反应体系pH值为5.5、温度为40 ℃条件下反应5 min,用酶标仪在650 nm处测定体系吸光值,空白组不加TMB溶液。以抗坏血酸浓度为横坐标、吸光值为纵坐标,用Origin软件进行线性拟合。当信噪比(S/N)为3时,通过式(3)计算获得检测限。当信噪比(S/N)为10时,通过式(4)计算获得定量限。式中LOD为检测限(μmol·L^{-1}),LOQ为定量限(μmol·L^{-1}),SD为空白组多次测量信号的标准偏差(μmol·L^{-1}),m为拟合曲线的斜率。

$$\mathrm{LOD}=3\times\frac{\mathrm{SD}}{m} \tag{3}$$

$$\mathrm{LOQ}=10\times\frac{\mathrm{SD}}{m} \tag{4}$$

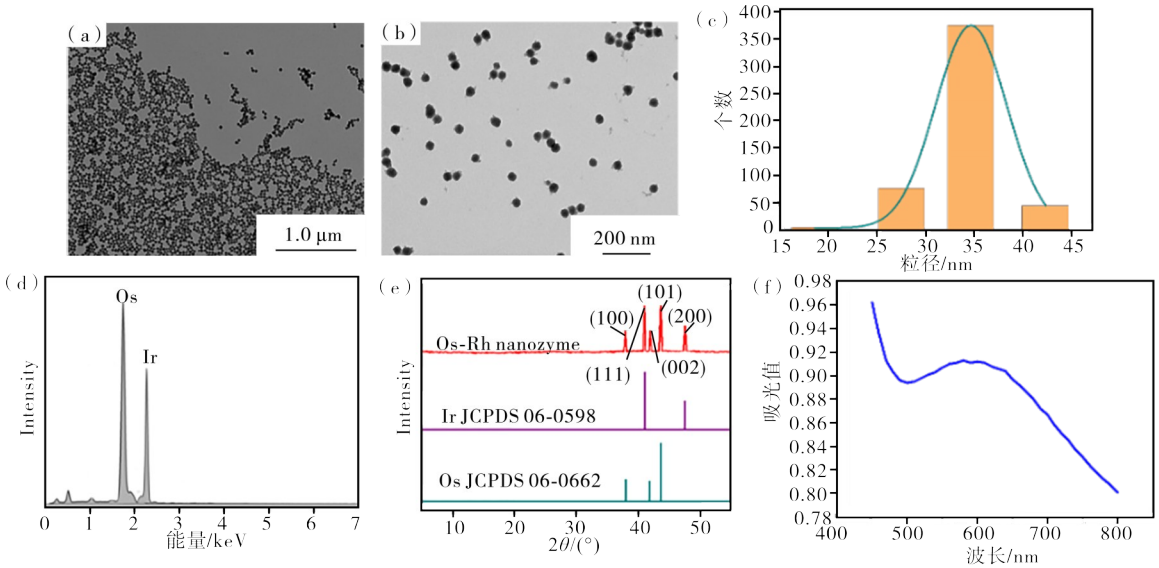
1.8 实际样品加标回收检测

为验证所开发的基于Os-Ir纳米酶的比色检测方法在实际应用中检测抗坏血酸的可行性和可靠性,进行了加标回收实验。首先分别将3款饮料(维他命、水溶C和QOQ酷儿)用水稀释20倍,并用滤纸和0.22 μm滤膜过滤得到饮料稀释液。称取一定量的抗坏血酸分别加入到上述所得的3款饮料稀释液中,得到加标浓度分别为800、400和0 μmol·L^{-1}的抗坏血酸加标回收液。在96孔板中加入10 μL稀释256倍的Os-Ir纳米酶液、10 μL上述配置的抗坏血酸加标回收液和150 μL浓度为208 μmol·L^{-1} TMB溶液,在40 ℃下反应5 min,在650 nm下用酶标仪测定体系吸光度值。将测得的吸光值代入抗坏血酸的检测范围、检测限和定量限的线性拟合曲线,以计算加标回收率和相对标准偏差(RSD)。

2 结果与讨论

2.1 Os-Ir纳米酶的表征

为了验证Os-Ir纳米酶的成功合成,使用透射电子显微镜对Os-Ir纳米酶的形貌和EDS元素图谱进行观察和分析,使用Image J软件对Os-Ir纳米酶的粒径进行统计,使用酶标仪测定了Os-Ir纳米酶的光学特性,使用X-射线衍射仪测定了Os-Ir纳米酶的XRD图谱,结果如图1所示。从图1(a—b)可见,Os-Ir纳米酶为均一球形,具有较好的分散性。从图1(c)可见,Os-Ir纳米酶的平均粒径约为34 nm。从图1(d)可见,Os-Ir纳米酶只含Os和Ir元素组成。此外,从图1(e)可见,Os-Ir纳米酶在38.0°、40.7°、41.8°、43.6°和47.3°处均出现了衍射峰,分别对应于fcc Os的(100)、(002)和(101)(JCPDS 06-0662),以及fcc Ir的(111)和(200)(JCPDS 06-0598)。从图1(f)可见,Os-Ir纳米酶在600 nm左右处有一个特征峰。上述结果表明,Os-Ir纳米酶的成功制备。



(a—b)—Os-Ir纳米酶的TEM图;(c)—Os-Ir纳米酶的粒径分布图;(d)—Os-Ir纳米酶的EDS能谱图;(e)—Os-Ir纳米酶的XRD图谱;(f)—Os-Ir复合纳米酶的紫外可见吸收光谱图。

(a—b)—TEM images of Os-Ir nanozyme; (c)—particle size distribution of Os-Ir nanozyme; (d)—EDS spectra of Os-Ir nanozyme; (e)—XRD spectra of Os-Ir nanozyme; (f)—UV visible absorption spectra of Os-Ir nanozyme.

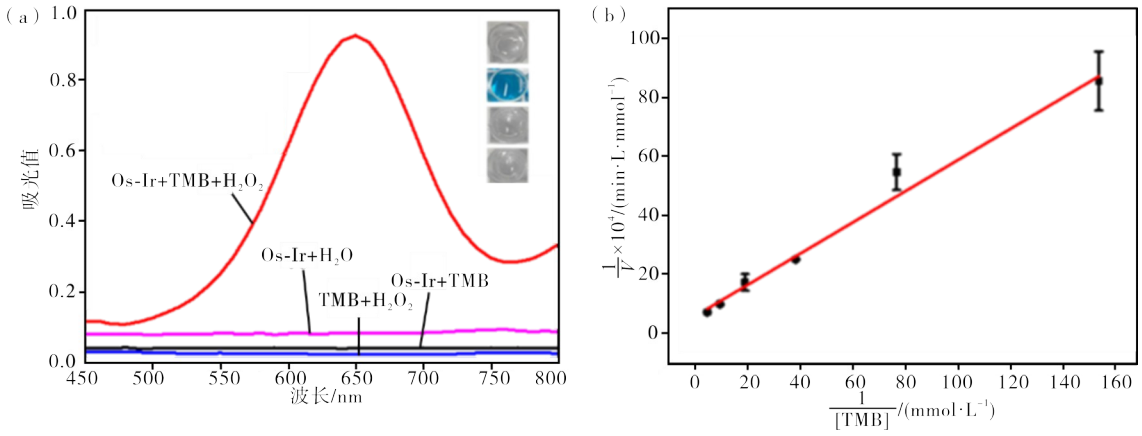
图1 Os-Ir复合纳米酶的表征结果

Figure 1 The characterization results of Os-Ir nanozyme

2.2 Os-Ir纳米酶的过氧化物酶模拟活性探究

为探究Os-Ir纳米酶是否具有过氧化物酶模拟活性,比较了几种组合在650 nm处的吸光度值,结果如图2所示。从图2(a)可以发现,组合Os-Ir+TMB、TMB+H_2O_2和Os-Ir+H_2O均不变色,且吸光值趋近于0。其中,组合Os-Ir+TMB不显色,说明Os-Ir纳米酶不具备氧化酶模拟活性;组合TMB+H_2O_2不显色,说明TMB不能被H_2O_2单独氧化成oxTMB;组合Os-Ir+H_2O不显色,说明Os-Ir纳米酶本身不具备显色能力。在TMB+H_2O_2体系中加入Os-Ir纳米酶溶液后,溶液立即变蓝,并在650 nm处具有明显的吸收峰,这说明TMB被氧化成oxTMB,证明Os-Ir纳米酶具有过氧化物酶模拟活性。

为了进一步探究Os-Ir纳米酶的过氧化物酶模拟活性,对其进行了稳态动力学研究,测定了其在不同TMB浓度下的动力学参数(K_m和V_{max}),结果如图2(b)和表1所示。其中:K_m是米氏常数,其值反应了底物和酶的关系,其值越小表示纳米酶对底物的亲和力越大;V_{max}是最大反应速率,其值越大表示酶的催化活性越强。从图2(b)可见,Os-Ir纳米酶的K_m为2.98 mmol·L^{-1}、V_{max}为5.62 mmol·L^{-1}·min^{-1}。由表1可见,Os-Ir纳米酶的K_m值和V_{max}值要分别小于和大于许多其他文献报道的具有过氧化物酶模拟活性的纳米材料的K_m值和V_{max}值。表明,所开发的Os-Ir纳米酶对TMB具有较高亲和催化活性。



(a)—Os-Ir纳米酶的过氧化物酶活性;(b)—双倒数曲线图。

(a)—peroxidase-mimicking activity of Os-Ir nanozyme;(b)—double reciprocal curve chart.

图2 Os-Ir纳米酶的过氧化物酶活性测定结果

Figure 2 The detection results of peroxidase-mimicking activity of Os-Ir nanozyme

表1 不同纳米材料 K_m 和 V_{max} 的比较

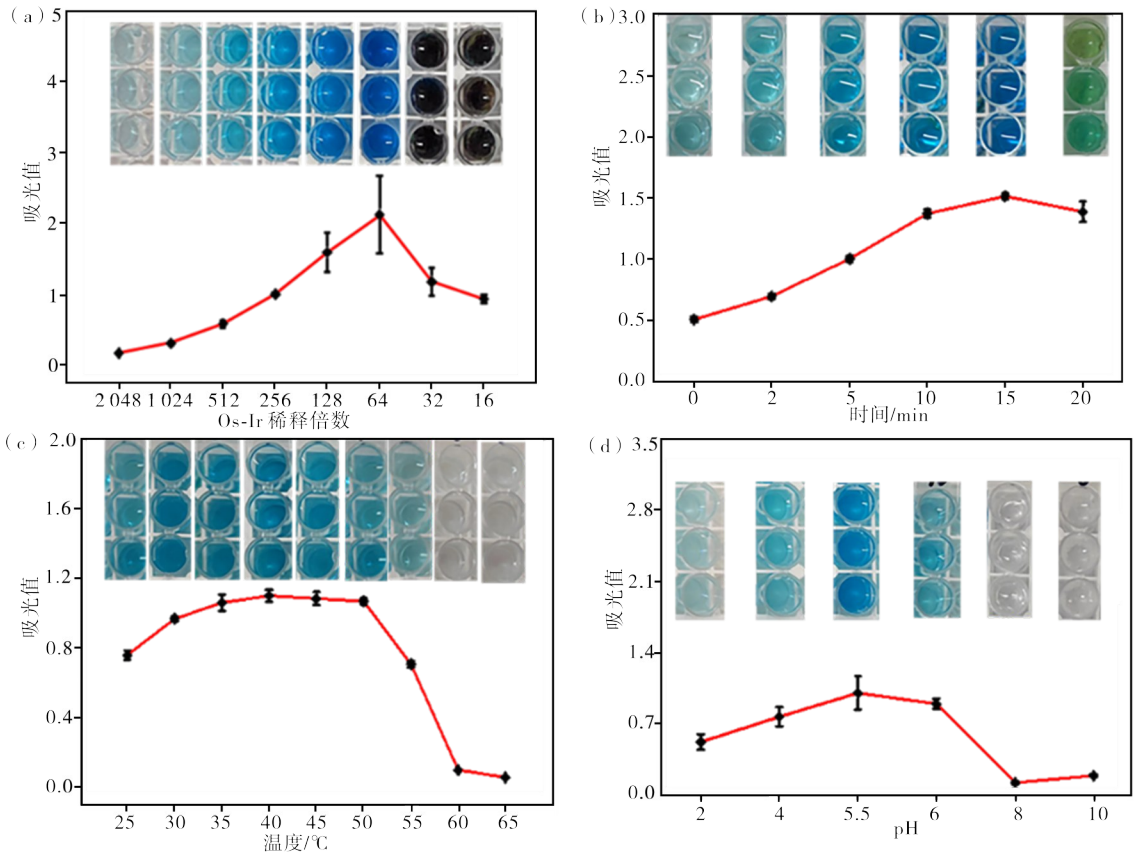
Table 1 Comparison of K_m and V_{max} in different nanomaterials

纳米材料	K_m/(mmol·L^{-1})	V_{max}/(mmol·L^{-1}·min^{-1})	参考文献
Os-Ir	2.98	5.62	本文
$Cu(OH)_2SCs^a$	2.45	44.83×10^{-5}	[15]
$Cu_{2/3}Zn_{1/3}O$ PNPs	0.10	3.79×10^{-5}	[16]
$Fe_2(MoO_4)_3$-F	1.13	3.73×10^{-5}	[17]
CuO-Au纳米合金	3.54	11.10×10^{-5}	[18]
CoNPs	5.09	9.98×10^{-5}	[19]
β-CD-CuNCs	0.54	434×10^{-5}	[20]

2.3 抗坏血酸检测条件的优化

为更精确、快速的检测抗坏血酸，对Os-Ir纳米酶浓度、反应温度、反应时间、pH值4个因素进行了优化，结果如图3所示。基于吸光值为0.8—1.2时常位于检测仪器的线性响应区域内，可以获得较好的信噪比，在此范围内检测方法具有较高的灵敏度。因此，选择体系吸光值为0.8—1.2所对应的Os-Ir纳米酶浓度、反应温度、反应时间和pH值为最佳检测条件。

从图3(a)可见，随着稀释倍数的减小(Os-Ir纳米酶浓度增大)，反应体系的吸光值先增大后减小，当Os-Ir纳米酶液稀释到64倍时体系吸光度值达到最大约为2.12。当稀释倍数小于64时，反应体系会变成黄褐色甚至黑色，体系吸光值反而降低，这可能是体系中Os-Ir纳米酶过量导致TMB过度氧化的缘故。当Os-Ir纳米酶液稀释256倍时，反应体系的吸光值在最佳吸光度0.8—1.2范围内，因此选择256作为最佳稀释倍数。从图3(b)可见，在Os-Ir纳米酶液稀释256倍条件下，随着反应时间的延长，反应体系的吸光值先增大后减小，在反应时间为15 min



(a)—Os-Ir原液稀释倍数；(b)—反应时间；(c)—反应温度；(d)—体系pH值。

(a)—Os-Ir dilution rate; (b)—reaction time; (c)—reaction temperature; (d)—system pH value.

图3 抗坏血酸检测条件的优化结果

Figure 3 Optimization results of ascorbic acid detection conditions

时,体系吸光度值达到最大约为1.52。当反应时间大于15 min后,反应体系从深蓝色变成黄绿色,体系吸光值降低,这可能是反应时间过长导致TMB过氧化的缘故。当反应时间为5 min时,体系的吸光值在1.01左右,因此选择5 min作为最佳反应时间。从图3(c)可见,在Os-Ir纳米酶液稀释256倍、反应时间为5 min的条件下,在温度50 ℃之前,温度对Os-Ir纳米酶的活性影响不太大,在温度40 ℃时反应体系具有最大的吸光值约为1.10,且在最佳吸光度范围内。因此,选择40 ℃作为最佳反应温度。当温度高于50 ℃后体系吸光值呈断崖式下降,65 ℃时体系吸光值趋近于0。这可能是因为温度太高导致体系中的H_2O_2自动分解产生H_2O和O_2,体系中H_2O_2浓度降低,从而使Os-Ir纳米酶催化H_2O_2产生的羟基自由基(HO·)含量减少,最终导致体系中的TMB不能被氧化,故吸光度值趋近于0。从图3(d)可见,在Os-Ir纳米酶液稀释256倍、反应时间为5 min、反应温度为40 ℃的条件下,pH值对Os-Ir纳米酶的活性影响较大,随着体系pH值的增大,反应体系吸光值先逐渐增大后减小,在体系pH值为5.5时,反应体系的吸光值最大约为1.00,且在最佳吸光度范围内。因此,pH值为5.5被认为是最佳的反应体系pH值。综上所述,抗坏血酸的最佳检测条件为Os-Ir纳米酶液的稀释倍数为256倍、反应时间为5 min、反应温度为40 ℃和反应体系pH值为5.5。

2.4 抗坏血酸检测范围、检测限、定量限的测定

在最优检测条件下对抗坏血酸的检测限、定量限及检测范围进行测定,以评估基于Os-Ir纳米酶开发的比色法用于抗坏血酸检测的灵敏度,结果如图4和表2所示。从图4可见,随着抗坏血酸浓度的增加,系统吸光值逐步降低。这是因为在H_2O_2存在下,Os-Ir纳米酶可将TMB(无色)氧化为具有特定吸收波长的产物oxTMB(蓝色),而当加入抗坏血酸时,抗坏血酸会将体系中的蓝色oxTMB还原为无色TMB,相应的在650 nm处的吸光度也随之降低[20]。当抗坏血酸浓度为0—147.06 μmol·L^{-1}时,抗坏血酸的线性响应曲线显示出了较好的线性相关性,线性相关系数R^2为0.99,且该线性相关性可通过方程$y=-0.006\,51x+0.686\,21$表述。此外,通过计算可得抗坏血酸的定量限约为1.03 μmol·L^{-1}、检测限约为0.31 μmol·L^{-1},该结果低于其他文献(见表2)报道结果。由此可以看出,开发的基于Os-Ir纳米酶的比色检测法用于抗坏血酸检测具备较高的灵敏度。

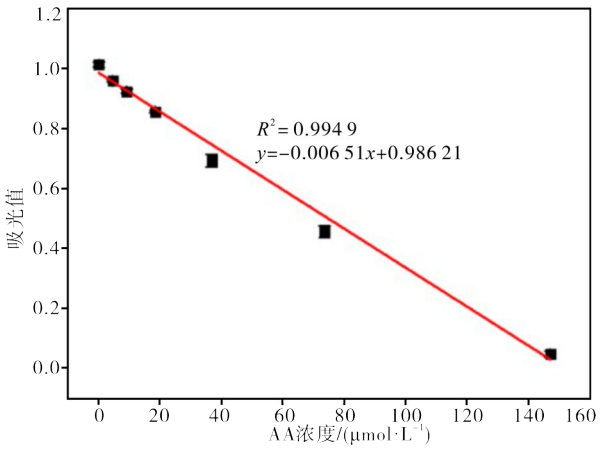


图4 抗坏血酸的线性响应曲线

Figure 4 Liner response curve of ascorbic acid

表2 不同纳米酶用于抗坏血酸检测的检测限和检测范围比较

Table 2 Comparison of detection limits and ranges of ascorbic acid using different nanozyme materials

材料	检测范围/(μmol·L^{-1})	检测限/(μmol·L^{-1})	参考文献
Os-Ir	0—147	0.31	本文
CoTMPyP/Ti_5NbO_{14}	220—2 110	28.00	[10]
Fe-CQDs	1—120	0.44	[11]
Ag@Co_3O_4	2—60	0.59	[13]
IrO_2@MnO_2	0—312	1.42	[21]
Fe-CuO	5—50	4.66	[22]
MoS_2/PEDOT/GC	20—140	5.83	[23]

2.5 实际样品加标回收检测

为检验所开发方法在实际应用中的可行性和可靠性,使用该检测方法对抗坏血酸进行了实际样品加标回收检测试验。实际样品为3种含抗坏血酸的饮料,分别为维他命、水溶C和QOO酷儿,均购自肇庆学院第二饭堂一楼便利店。最终实验结果列于表3。由表3可知:所有样品的加标回收率范围为95.15%—103.22%,均在可接受标准范围(95%—105%)内;相对标准偏差(RSD)范围为1.92%—8.60%,小于可接受标准10%。这进一步证实,所开发的基于Os-Ir纳米酶的比色检测方法在实际样品检测抗坏血酸的可行性及潜力。

表3 便利店购得的饮料中测定抗坏血酸(AA)的加标回收率

Table 3 Determination of AA spiked recovery rate in beverages purchased from convenience stores

样品	加标AA浓度/($\mu mol \cdot L^{-1}$)	测得的AA总浓度/($\mu mol \cdot L^{-1}$)	扣除样品背景后的AA浓度/($\mu mol \cdot L^{-1}$)	回收率/%	相对标准偏差RSD/%
维他命	0.00	4.88±0.15	—	—	—
	23.53	27.27±1.24	22.38±1.37	95.15±5.86	6.16
	47.06	50.26±1.71	45.38±1.56	96.43±3.31	3.44
水溶C	0.00	1.18±0.43	—	—	—
	23.53	25.01±0.56	23.83±0.89	101.31±3.78	3.73
	47.06	49.75±2.61	48.57±2.54	103. 22±5.40	5.23
QOO酷儿	0.00	1.09±0.17	—	—	—
	23.53	24.50±1.92	23.41±2.01	99.49±8.56	8.60
	47.06	48.49±1.07	47.39±0.91	100.70±1.94	1.92

3 结论

本研究制备了一种具有良好分散性的球状Os-Ir纳米酶,探究了其酶模拟活性。结果表明,Os-Ir纳米酶具有优异的过氧化物酶模拟活性,K_m=2.98 mmol·L^{-1}、V_{max}=5.62 μmol·L^{-1}·min^{-1}。同时,优化了Os-Ir纳米酶用于抗坏血酸检测的条件,获得最佳检测条件为Os-Ir纳米酶液的稀释倍数为256倍、反应时间为5 min、反应温度为40 ℃、反应体系pH值为5.5。在优化条件下构建了基于Os-Ir纳米酶的用于抗坏血酸灵敏检测的比色检测方法,测得抗坏血酸的检测范围为0—147.06 μmol·L^{-1},检测限为0.31 μmol·L^{-1},定量限为1.03 μmol·L^{-1}。将所开发方法用于实际样品的加标回收检测,以验证该方法在实际应用中的可行性和可靠性,最终测得加标回收率范围为95.15%—103.22%,RSD范围为1.92%—8.60%。总的来说,该开发的基于Os-Ir纳米酶的比色检测方法对抗坏血酸实现了简单、便捷、快速、灵敏的检测,在食品监制、医药等领域表现出可观的潜在应用价值。

参考文献:

[1] 高彤彤,晏志勇.抗坏血酸和胶原蛋白的皮肤吸收速率及其对老化肌肤的作用[J].宜春学院学报,2014,36(6):20-21.

[2] 李向荣.抗氧化剂和自由基与血清白蛋白相互作用的微量热和谱学研究[D].新乡:河南师范大学,2014.

[3] 李梦杰,王志青,仝涛.甜菜根关键活性成分及其生物功能研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(2):343-350.

[4] 龚秋豪,杭佳瑶,覃敏,等.高效液相色谱法测定忧遁草中维生素C含量[J].湖北医药学院学报,2024,43(1):57-60.

[5] 代甜甜,陈晓靓,吴娜怡郁,等.分光光度法快速测定鲜果刺梨Vc的含量[J].广州化工,2017,45(24):99-100.

[6] 解丹萍,殷博文,张晓春,等.基于N-ZnO纳米材料光电化学传感器检测抗坏血酸[J].化学研究,2024,35(3):225-230.

[7] 杨阳,刘光勤,杨思龙,等.基于Ce-BDC的氧化物酶活性检测果汁中抗坏血酸的比色方法研究[J].分析测试学报,2021,40(5):678-683.

[8] WANG Jiangning, SU Ping, LI Di, et al. Fabrication of CeO_2/rGO nanocomposites with oxidase-like activity and their application in colorimetric sensing of ascorbic acid [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2017, 33(4): 540-545.

[9] CHEN Jing, GE Jia, ZHANG Lin, et al. Reduced graphene oxide nanosheets functionalized with poly (styrene sulfonate) as a peroxidase mimetic in a colorimetric assay for ascorbic acid [J]. Microchimica Acta, 2016, 183 (6):1847-1853.

[10] FAN Zichun, ZHAO Bo, WU Shining, et al. Construction of cobalt porphyrin/tantalum molybdate nanocomposite for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid and dopamine [J]. Journal of Materials Research, 2021, 36: 916-924.

[11] ZHANG Wenzhi, LAN Yuxin, CHAI Dongfeng, et al. A novel "on-off" colorimetric sensor for ascorbic acid and hydrogen peroxide based on peroxidase activity of CeO_2/Co_3O_4 hollow nanocubes [J]. Journal of Molecular Structure, 2024, 1302: 137507.

[12] HUANG Xiaotong, JIANG Mingxia, ZENG Hui, et al. Autogenous iron-based peroxidase-like nanozyme from paper mill sludge for ascorbic acid detection [J]. Materials Today Communications, 2023, 36: 106775.

[13] LIAN Qi, CHEN Li, PENG Guirong, et al. Preparation of the layered structure Ag@Co_3O_4 composites as peroxidase memetic for colorimetric detection of ascorbic acid [J]. Chemical Physics, 2023, 570: 111895.

[14] 李春凤,陈荔丝,吴芸芸,等. 超长 α-Ag_3VO_4纳米线类氧化酶活性及传感应用研究[J]. 材料研究与应用,2022,16(3):409-417.
[15] 金广夏. 铱纳米颗粒模拟酶性质的表面调控及应用[D]. 无锡:江南大学,2022.
[16] LI Jinfeng, ZHOU Chunhua, ZHANG Jing, et al. Photo-induced tumor therapy using MnO_2/IrO_2-PVP nano-enzyme with TME-responsive behaviors [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 205: 111852.
[17] 潘俊康. 基于双功能锇(Os)纳米酶构建的叶酸免疫分析方法的研究[D]. 广州:广东工业大学,2022.
[18] TANG Chao, FANG Tianjiao, CHEN Shaokun, et al. Citrate-functionalized osmium nanoparticles with peroxidase-like specific activity for highly efficient degradation of phenolic pollutants [J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 464: 142726.
[19] MVANGO S, MASHAZI P. Synthesis, characterization of copper oxide-gold nanoalloys and their peroxidase-like activity towards colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose [J]. Biomaterials Advances, 2019, 96: 814-823.
[20] 崔玛琳. 贵金属铱纳米材料的制备、性质及其在分析检测领域的应用研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
[21] 杨俊松,钟颖颖,余倩. IrO_2@MnO_2纳米酶的制备及用于抗坏血酸的检测[J]. 广东工业大学学报,2022,39(2):130-136.
[22] YAN Boyu, YANG Ying, XIE Yinyun, et al. Fe doping enhances the peroxidase-like activity of CuO for ascorbic acid sensing [J]. Chemistry, 2023, 5(2): 1302-1316.
[23] LI Ying, LIN Hechun, PENG Hui, et al. A glassy carbon electrode modified with MoS nanosheets and poly (3, 4-ethylenedi-oxythiophene) for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. Microchimica Acta, 2016, 183: 2517-2523.

Rapid and Sensitive Colorimetric Detection of Ascorbic Acid Based on Os-Ir Nanocomposite with Peroxidase-Mimicking Activity

ZHONG Yingying, YANG Junsong, YE Yili, LUO Jinyi, WANG Hongwu*
(Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: Ascorbic acid plays an indispensable role in the maintenance of human health and prevention of diseases. The accurate determination of ascorbic acid in food, health products, etc. is crucial. In recent years, researchers have been working on the development of simple, rapid, and highly sensitive nanozyme-based assays for ascorbic acid. However, there is currently no research report on Os-Ir nanozyme and its use for ascorbic acid detection. Therefore, to enrich the variety of nanozymes and develop a new, simple, effective, accurate and rapid method for the detection of ascorbic acid, a uniform spherical shaped Os-Ir nanocomposite with a particle size of about 34 nm was synthesized by reduction method in this work. The nanocomposite was experimentally demonstrated to possess excellent peroxidase-mimicking activity with the Michaelis constant (K_m) of 2.98 mmol·L^{-1} and the maximum reaction rate (V_{max}) of 5.62 mmol·L^{-1}·min^{-1}. On this basis, the optimal sensing conditions of Os-Ir nanozyme for ascorbic acid detection were determined, including pH 5.5 of reaction system, reaction temperature of 40 ℃, 256-fold dilution of Os-Ir nanozyme stock solution, and reaction time of 5 min. Under these conditions, the developed Os-Ir nanozyme-based ascorbic acid assay obtained wide detection range (0—147.06 μmol·L^{-1}) and high detection sensitivity, with the limit of detection of 0.31 μmol·L^{-1} and the limit of quantification of 1.03 μmol·L^{-1}. Finally, the spiked recovery experiments in three different beverages verified that the developed method possessed reliability and feasibility in actual sample detection. The measured recovery rate range was 95.15% to 103.22% and the relative standard deviation was 1.92% to 8.60%. In conclusion, the colorimetric method based on Os-Ir nanozyme achieved simple, convenient, rapid and sensitive detection of ascorbic acid, and possessed potential applications in the fields of food supervision and biomedicine.

Keywords: Os-Ir nanozyme; peroxidase-mimicking activity; ascorbic acid; colorimetric detection; sensitive; rapid; accurate; beverage