

马 滔,马小媛,王周平. 金纳米颗粒在食品抗氧化能力评价中的检测应用[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):282-285.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.102

# 金纳米颗粒在食品抗氧化能力评价中的检测应用

马 滔,马小媛,王周平

(江南大学食品学院,江苏无锡 214122)

**摘要:**选取没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、阿魏酸、香草酸 5 种酚酸化合物和康师傅东方树叶、农夫山泉水溶 C100 这 2 种茶饮料作为还原剂,诱导金纳米颗粒的生长,并利用分光光度计测定所形成金纳米颗粒的吸光度,以评价各试验物质的抗氧化能力。结果表明,5 种酚酸化合物抗氧化能力从强到弱依次为没食子酸 > 咖啡酸 > 原儿茶酸 > 香草酸 > 阿魏酸;2 种茶饮料抗氧化能力从强到弱依次为农夫山泉水溶 C100 > 康师傅东方树叶绿茶。通过与传统清除 2,2-二苯基-1-苦基肼自由基(DPPH·)水平以评价抗氧化能力的方法相比,基于金纳米材料检测抗氧化剂抗氧化能力的方法准确可靠、操作简单、响应迅速,值得推广应用。

**关键词:**金纳米颗粒;抗氧化能力;酚酸化合物;DPPH·

**中图分类号:** TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0282-04

生物体系中的氧化与抗氧化系统失衡会导致氧化应激,具有抗氧化能力的物质能有效抵御氧化应激的有害损伤。食品中的抗氧化剂日益引起人们的关注,对饮食中潜在的抗氧化剂及其抗氧化能力实现简单、可靠、快速的检测变得尤为重要。传统的抗氧化能力检测方法主要包括清除生物体内活性氧/活性氮自由基、清除非生物体内稳定自由基和总还原能力检测等,如检测  $\text{ROO}\cdot$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{ONOO}$ —清除能力等<sup>[1-4]</sup>,这些检测方法大多基于化学试剂和化学反应,在实际应用中存在危害人体健康、破坏生态环境等问题而受到诸多限制。随着纳米科技的兴起与发展,纳米材料以其特有的物理、化学性质在生物学、化学、免疫学等领域展现出广阔的应用前景,纳米材料应用于食品功能评价正快速发展。Jiang 等利用硒化镉量子点(CdSe QDs)的电化学发光效应研发出一种检测  $\text{HO}\cdot$  清除能力的方法<sup>[5]</sup>;Kim 等于 2005 年提出一种利用包埋有辣根过氧化物酶的聚合物小球评价细胞内氧化应激水平的光学纳米传感方法<sup>[6]</sup>。

酚酸是非常重要的天然抗氧化剂,属苯丙素类化合物,多为对羟基苯甲酸和对羟基苯丙烯酸(肉桂酸)的衍生物,如没食子酸( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ )、咖啡酸( $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ )、原儿茶酸( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$ )、阿魏酸( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ )、香草酸( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ )等,广泛存在于植物体内。研究表明,酚酸类成分具有抗血栓、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗病毒、抗菌保肝等多种生物活性。Soobrattee 等采用 Trolox 等价抗氧化能力、铁离子还原抗氧化及次氯酸盐清除能力等抗氧化测定体系,对酚酸的抗氧化进行评定,结果表明,酚酸具有较强的抗氧化能力,是良好的抗氧化剂;对活性氧自由基具有清

除作用,可用 DPPH·法定性测定不同酚酸的抗氧化性能力<sup>[7]</sup>。

本研究采用没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、阿魏酸、香草酸等系列酚酸化合物及东方树叶绿茶、水溶 C100 这 2 种茶饮料诱导金纳米生长,利用金纳米颗粒独特的光学性质,产生规律性变化的紫外-可见-近红外吸收峰,根据吸收峰的变化来比较酚酸化合物及茶饮料的抗氧化能力,并与传统的清除 DPPH·自由基检测方法进行较,以期建立一种基于金纳米材料检测抗氧化剂抗氧化能力的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

UV-1800PC 分光光度计,日本岛津公司生产;DK-S22 电热恒温水浴锅;BS124S 分析天平;透射电子显微镜(TEM)。

### 1.2 试剂与材料

没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、阿魏酸、香草酸、十六烷基三甲基溴化铵( $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$ )、氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )、柠檬酸钠( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )、水合磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ )、十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、维生素 C( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )、2,2-二苯基-1-苦基肼自由基(DPPH·),均购于阿拉丁试剂公司;康师傅东方树叶绿茶、农夫山泉水溶 C100,均购于大型超市。

### 1.3 维生素 C 还原纳米金颗粒标准当量测定

**1.3.1 试验原理** 维生素 C(图 1)能抗坏血病,广泛存在于新鲜水果蔬菜及许多生物中,作为一种高活性物质参与新陈代谢过程,是一种强抗氧化剂,能还原  $\text{Au}(\text{III})$  形成金纳米颗粒。由于金纳米颗粒大小及形貌的变化,使其局域表面等离子共振吸收峰产生规律性变化。因此,可以选择维生素 C 作为标准样剂,并作为当量与其他物质反应结果进行比对。

**1.3.2 试验步骤** 准确称取维生素 C 标准品 17.612 g,溶解定容至 100 mL,摇匀,配制成 1 mol/L 维生素 C 标准液;将标准液分别稀释成 0.000 1,0.001,0.01,0.1,1 mol/L 的样液,分别取 0.5 mL 样液,加入到含有 100  $\mu\text{L}$  10 mmol/L  $\text{AuCl}_4^-$ 、600  $\mu\text{L}$  3.7 mmol/L CTAB,300  $\mu\text{L}$  0.2 mmol/L 柠檬酸钠、3.5 mL 0.12 mol/L pH 值为 8.0 磷酸缓冲液中,混匀;45  $^{\circ}\text{C}$

收稿日期:2014-05-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:21375049);国家科技支撑计划(编号:2012BAK08B01);江苏省科技支撑计划(编号:BE2012614)。

作者简介:马 滔(1992—),女,陕西宝鸡人,从事食品安全检测研究。E-mail:ch\_matao@163.com。

通信作者:马小媛(1983—),女,江苏南京人,博士,副教授,从事食品安全检测研究。E-mail:maxy@jiangnan.edu.cn。

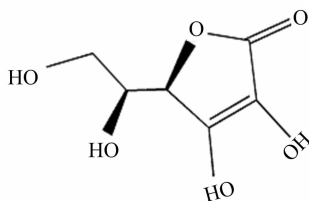


图1 维生素 C 的化学结构式

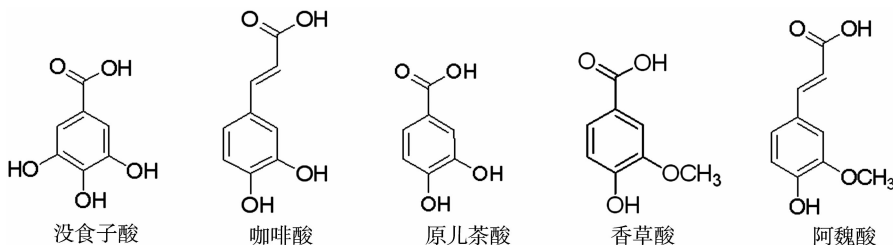


图2 5种酚类化合物的化学结构式

1.4.2 试验步骤 把 100  $\mu\text{L}$  10 mmol/L  $\text{HAuCl}_4$ 、600  $\mu\text{L}$  3.7 mmol/L CTAB 和 300  $\mu\text{L}$  0.2 mmol/L 柠檬酸钠连续加入到 3.5 mL 0.12 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值为 8.0) 中,混匀;取 0.5 mL 0.01 mol/L 试验样品加入混合液中,45  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min;将混合物迅速移出,冷却至室温,均质后测定 350 ~ 700 nm 的紫外吸光度<sup>[9]</sup>。以 0.5 mL 超纯水代替 0.5 mL 待测样品作为对照。

#### 1.5 DPPH·自由基法测定酚类物质抗氧化性

1.5.1 试验原理 DPPH·是一种商业化的非常稳定的自由基,含苯环结构(图3),其乙醇溶液显紫色,在 515 nm 处有强烈的光学吸收,且吸收峰位置相对稳定。抗氧化剂是一种常见的自由基清除剂,清除能力基于抗氧化剂结构上的特性,包括羟基中 O—H 键解离能、抗氧化剂失去电子形成苯氧自由基的键共振解离能及芳环上取代基的空间位阻效应。清除化学反应的方程式为:  $\text{DPPH}\cdot + \text{PheOH} \rightarrow \text{DPPHH} + [\text{PheO}(\text{I})、\text{PhO}(\text{II})、\text{PhO}(\text{III})\cdots]$ ,其中,(I)、(II)、(III)为不同的共振结构,并基于以下理论终止反应:  $\text{DPPH}\cdot + \text{DPPH}\cdot \rightarrow \text{DPPH}-\text{DPPH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot + \text{PheO}\cdot \rightarrow \text{DPPH}-\text{PheO}$ 、 $\text{PheO}\cdot + \text{PheO}\cdot \rightarrow \text{PheO}-\text{PheO}$ ,从而决定各种抗氧化剂清除 DPPH·水平的大小<sup>[10]</sup>。

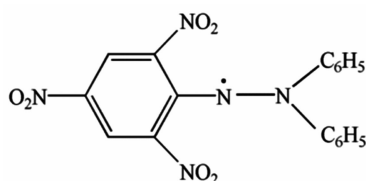


图3 DPPH 化学结构式

1.5.2 试验步骤 称取 0.004 g DPPH·溶于 100 mL 无水乙醇中,得 0.101 4 mmol/L 的 DPPH·乙醇溶液;分别取 0.05 mL 不同浓度的抗氧化剂待测物乙醇溶液加入到 3.95 mL 0.101 4 mmol/L DPPH·乙醇溶液中,用分光光度计每隔一段时间检测其 UV-vis-NIR 吸收光谱并记录,直到反应液的吸光度保持相对稳定、不再变化为止。

## 2 结果与分析

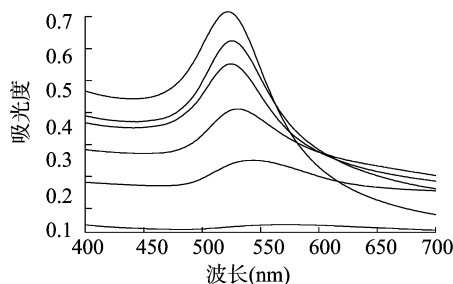
### 2.1 不同浓度维生素 C 诱导金纳米颗粒的生长

水浴 10 min,取出,放至室温,均质后测定 350 ~ 700 nm 的紫外吸收光度。

#### 1.4 酚酸类化合物还原纳米金颗粒

1.4.1 试验原理 酚酸化合物(图2)由于苯环上酚羟基的还原性,在溶液中不需要金种子的催化即能还原  $\text{Au}(\text{III})$  形成金纳米颗粒,其光学吸收强度与酚酸类物质的抗氧化能力呈正相关<sup>[8]</sup>。

由图4可见,不同浓度维生素 C 与氯金酸反应后,在 500 ~ 600 nm 处出现强烈的吸收峰,并且随着浓度的增加,吸收峰强度越来越高,这说明维生素 C 的抗氧化性能力与吸收峰的峰值有相关性。维生素 C 具有较强的还原性,会诱导氯金酸溶液生成金纳米颗粒,并产生特殊光学效应。因待测液浓度均为 0.01 mol/L,所以选择 0.01 mol/L,此时维生素 C 诱导生成金纳米颗粒的最大吸光度作为标准单位,与其他待测液进行比较(图5)。



从上至下维生素 C 浓度依次为 1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0 mol/L

图4 不同浓度维生素 C 诱导金纳米颗粒生长的紫外可见近红外光谱

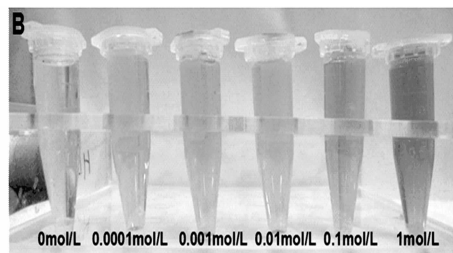
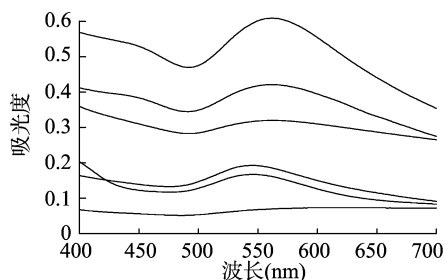


图5 不同溶液浓度维生素 C 反应溶液的颜色

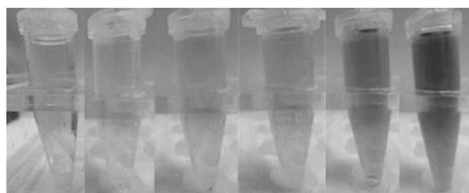
### 2.2 不同酚酸化合物诱导纳米金的生长

由图6可以看出,5种酚酸中,没食子酸紫外吸收峰强度最大,对应的反应溶液颜色也最深,呈深紫红色,其后依次为咖啡酸、原儿茶酸、香草酸和阿魏酸。在弱碱介质下,酚酸形成的相应苯氧自由基的亲核性会影响酚酸抗氧化能力,并通过共振或分子内氢键而稳定。羧酸基团是常见的吸电子基团,能通过降低芳香环的电子密度来稳定苯氧自由基;—CH=CH—COOH连接在苯环上,通过共振提高苯氧自由



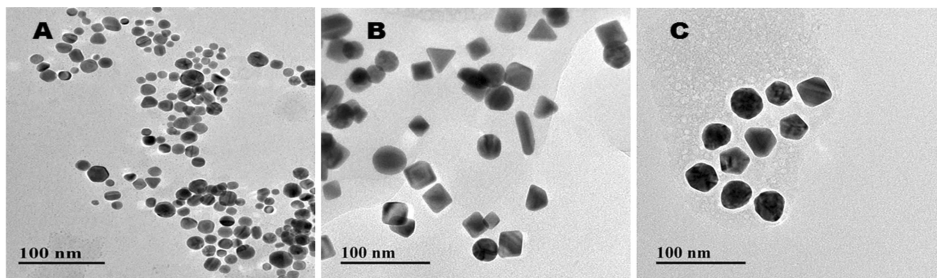
从上至下酚酸种类依次为没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、空白

图6 不同种类酚酸化合物诱导金纳米颗粒生长的紫外可见近红外光谱



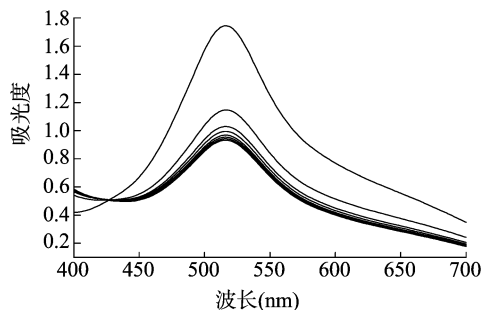
空白 阿魏酸 香草酸 原儿茶酸 咖啡酸 没食子酸

图7 5种酚酸化合物诱导生成金纳米溶液的颜色



A—没食子酸；B—原儿茶酸；C—阿魏酸

图8 3种酚酸化合物还原金纳米颗粒的透射电镜图示



从上至下反应时间依次为0、5、10、15、20、25 min

图9 没食子酸作用下的 DPPH· 自由基吸收光谱随时间变化曲线

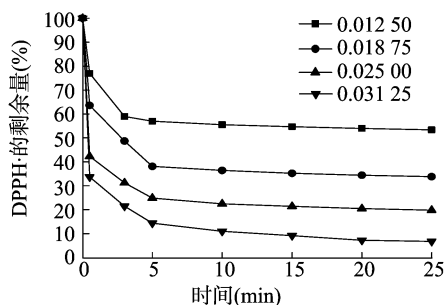


图10 不同浓度没食子酸作用下的 DPPH· 浓度变化动力学曲线

基的稳定性而提高供氢能力<sup>[11]</sup>。根据 5 种酚酸化合物的结构式可知,没食子含有 3 个酚羟基和 1 个羧基,其失电子后结构最为稳定;咖啡酸含 2 个酚羟基和 1 个  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ,原儿茶酸含 2 个酚羟基和 1 个羧基,其酚羟基数量均比没食子酸少,则失氢能力弱于没食子酸;香草酸和阿魏酸都只含有 1 个酚羟基,还原性最弱。把 5 种酚酸物质的最大吸光度与 0.01 mol/L 的维生素 C 进行比对,没食子酸相当于 1.12 倍维生素 C,咖啡酸相当于 0.76 倍维生素 C,香草酸相当于 0.456 倍维生素 C,阿魏酸相当于 0.313 倍维生素 C。

由图 8 可见,没食子酸还原出的金纳米颗粒最多,其次是原儿茶酸,最后是阿魏酸。结合 5 种酚酸物质诱导金纳米颗粒的紫外光谱及结构分析,可知 5 种酚酸物质的抗氧化性能依次为:没食子酸 > 咖啡酸 > 原儿茶酸 > 香草酸 > 阿魏酸。

### 2.3 酚酸化合物对 DPPH· 清除能力的评价

由图 9、图 10 可见,加入抗氧化待测物后的最初几分钟内,峰强度迅速降低,峰位置不变,这表明反应体系内 DPPH· 被部分清除,并且清除速率较快;随着反应的继续进行,峰强度降低的速率逐渐减慢,并保持相对稳定的水平。

以加入反应体系的抗氧化剂与 DPPH· 的相对量(摩尔比)为横坐标,以不同浓度抗氧化剂清除 DPPH· 后反应体系内的剩余 DPPH· 量作为纵坐标作曲线(图 11-A);同样,以加入反应体系的抗氧化剂与 DPPH· 的相对量(摩尔比)为横坐标,以不同浓度抗氧化剂清除 DPPH· 后反应体系达到稳定水平所需要的时间作为纵坐标作曲线(图 11-B)。取剩余量为 50% 时的浓度为  $\text{IC}_{50}$  值,将抗氧化剂浓度为  $\text{IC}_{50}$  值时所对应的反应时间定义为  $T_{\text{IC}_{50}}$ ,将 DPPH· 的清除能力定义为  $\text{AE} = 1/(\text{IC}_{50} T_{\text{IC}_{50}})$ 。 $\text{AE}$  和  $1/\text{IC}_{50}$  可反映抗氧化剂清除 DPPH· 的能力,数值大小反映酚酸化合物清除 DPPH· 能力的强弱。

由表 1 可见,没食子酸清除的 DPPH· 能力最强,其次是咖啡酸、原儿茶酸、水溶 C100、东方树叶绿茶、香草酸,阿魏酸最弱。对 DPPH· 自由基清除能力的检测作为一种传统的抗氧化能力检测法,被广泛用于各种抗氧化剂抗氧化能力的表征,其中, DPPH· 是一种人工合成、稳定的商业自由基,试验操作简单、数据可靠。试验结果表明,5 种酚酸物质对 DPPH· 的清除能力与基于 GNP<sub>s</sub> 生长过程的纳米材料光学检测法所得结果一致。

### 2.4 实际样品诱导纳米金颗粒生长

水溶 C100 中含有维生素 C,东方树叶绿茶中含茶多酚,2 种物质均能够诱导金纳米颗粒生长。由图 12、图 13 可见,以 0.01 mol/L 的维生素 C 作为当量,水溶 C100 相当于 0.587 倍

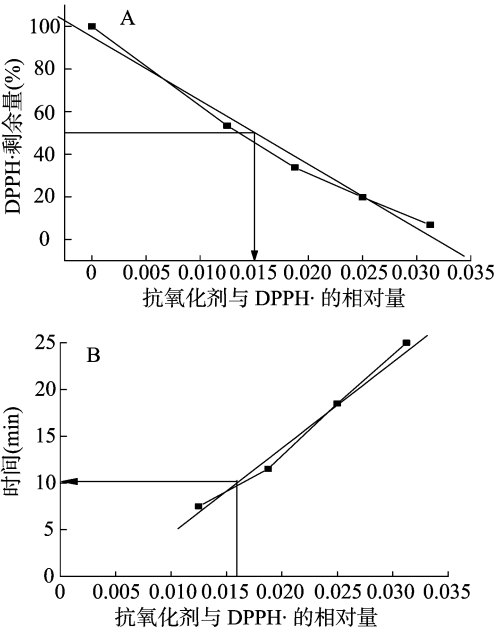


图11 抗氧化剂清除DPPH的能力

表 1 5 种酚酸物质和 2 种茶饮料清除 DPPH· 自由基的能力

物质	IC <sub>50</sub>	1/IC <sub>50</sub>	T <sub>IC50</sub> (min)	AE (mmol/mol)	反应情况
没食子酸	0.015	66.667	10.2	6 600.667	快,迅速
咖啡酸	0.126	7.937	13.4	999.938	快,较迅速
原儿茶酸	0.238	4.200	36.7	114.487	较快,中速
香草酸	48.439	0.020 6	44.1	0.468	慢,低速
阿魏酸	76.316	0.013 1	51.4	0.255	慢,低速
东方树叶	0.289	3.745	38.8	93.529	较快,中速
水溶 C100	0.267	3.460	37.2	96.016	较快,中速

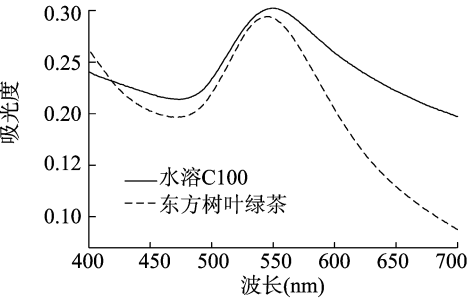
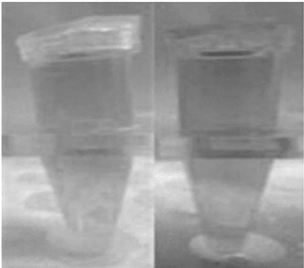


图12 2 种茶饮料诱导金纳米颗粒生长的紫外可见近红外光谱



东方树叶 水溶 C100

图13 2 种茶饮料诱导金纳米颗粒生长溶液的颜色

维生素 C,东方树叶绿茶相当于 0.567 倍维生素 C。由表 1 可见,根据 AE 值,2 种茶饮料还原性从强到弱为水溶 C100 > 东

方树叶绿茶。

3 结论

本试验通过不同浓度的维生素 C 与氯金酸相互作用生成金纳米颗粒,采用分光光度法测定生成金纳米颗粒的吸光度,表明抗氧化剂的抗氧化性与吸光度之间存在着正相关关系。采用相同的方法,用 5 种不同的酚酸化合物和 2 种饮料与氯金酸相互作用,测定其吸光度,以表征 7 种不同物质的抗氧化能力,结果表明,酚酸化合物还原能力从强到弱依次为没食子酸 > 咖啡酸 > 原儿茶酸 > 香草酸 > 阿魏酸,2 种茶饮料抗氧化能力从强到弱依次为水溶 C100 > 东方树叶绿茶。通过与传统清除 DPPH· 水平评价抗氧化能力的方法相比,证实应用金纳米颗粒测定抗氧化剂抗氧化能力的方法可靠、准确、简单、快速,具有广阔的实际应用前景。

参考文献:

[1]Laguette M,Lecomte J,Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation:existing methods,new trends and challenges[J]. Progress in Lipid Research,2007,46(5):244 – 282.

[2]Roginsky V,Lissi E A. Review of methods to determine chain – breaking antioxidant activity in food[J]. Food Chemistry,2005,92(2):235 – 254.

[3]Pazdzioch – Czochra M,Widenska A. Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity[J]. Analytica Chimica Acta,2002,452(2):177 – 184.

[4]Whiteman M,Halliwell B. Protection against peroxynitrite – dependent tyrosine nitration and alpha 1 – antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants[J]. Free Radical Research,1996,25(3):275 – 283.

[5]Jiang H,Ju H X. Electrochemiluminescence sensors for scavengers of hydroxyl radical based on its annihilation in CdSe quantum dots film/peroxide system[J]. Analytical Chemistry,2007,79(17):6690 – 6696.

[6]Kim S H,Kim B,Yadavalli V K,et al. Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress[J]. Analytical Chemistry,2005,77(21):6828 – 6833.

[7]Soobrattee M A,Neeraghen V S,Luximon – Ramma A,et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents:mechanism and actions[J]. Mutation Research,2005,579(1/2):200 – 213.

[8]Robbins R J. Phenolic acids in foods:an overview of analytical methodology[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(10):2866 – 2887.

[9]Ordoudi S A,Tsimidou M Z. Crocin bleaching assay(CBA)in structure – radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(25):9347 – 9356.

[10]Brand – Williams W,Cuvelier M E,Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT – Food Science and Technology,1995,28(1):25 – 30.

[11]Cai Y Z,Luo Q,Corke H. Structure – radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants[J]. Life Sciences,2006,78(25):2872 – 2888.