

分析化学综合实验：基于纳米酶和智能手机的维生素C比色检测

王力伟, 马光冉, 汪莉, 许富刚*

江西师范大学化学化工学院, 化学国家级实验教学示范中心, 南昌 330022

摘要: 将中国科学家首创的纳米酶和常用的智能手机结合设计了一个比色分析实验。该实验设计思路是将科学前沿、课程思政与本科实验结合, 使得学生在掌握知识技能同时, 了解科学前沿领域, 增强文化自信, 培养科学严谨、敢于创新的优秀品质, 助力实验教学全面育人。该实验不依赖大型贵重仪器, 可操作性强, 灵活度高, 适宜作为高年级分析化学综合实验或化学综合实验。

关键词: 化学实验; 教学改革; 课程思政; 科教融合

中图分类号: G64; O6

A Comprehensive Analytical Chemistry Experiment: Colorimetric Detection of Vitamin C Using Nanozyme and Smartphone

Liwei Wang, Guangran Ma, Li Wang, Fugang Xu^{1,*}

National Experimental Teaching Demonstration Center for Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China.

Abstract: This experiment introduces a novel colorimetric analysis leveraging nanozymes developed by Chinese scientists in conjunction with widely accessible smartphones. It is designed to intertwine cutting-edge scientific advancements with ideological education within the chemistry curriculum, enabling students to acquire knowledge and skills while gaining insights into leading scientific fields. This approach not only bolsters cultural confidence and fosters a spirit of rigorous scientific inquiry and innovation but also enriches the overall educational impact of laboratory teaching. Without the need for expensive, sophisticated equipment, the experiment offers robust operability and flexibility, making it an ideal component of advanced analytical chemistry or comprehensive chemistry courses.

Key Words: Chemistry experiment; Teaching reform; Course ideology and politics; Science-education integration

化学实验教学是培养学生分析问题、解决实际问题能力, 提升其创新思维的重要途径。近年来, 为顺应国家对创新性、复合型、应用型人才的要求, 对接“双一流”高校建设, 传统化学实验教学内容也进行了改革^[1-3]。其中, 把国际前沿研究成果融入本科实验课堂教学, 被认为是培养大学生实践探索能力和创新能力, 培养理性科学思维模式的重要措施^[4-6]。然而笔者调研文献发现有两方面的问题: 一方面, 多数新型实验操作较复杂, 占用课时较长(大于16课时); 实验条件要求高, 依赖大型贵重仪器, 学生参与度不高, 实验可实施推广性较差^[4-6]。另一方面, 加强高校“课程思政”建设, 已经成为全面落实立德树人根本任务的重要方式与实践内容^[7]。然而文献报道的创新实验大部

收稿: 2023-12-27; 录用: 2024-02-26; 网络发表: 2024-03-20

*通讯作者, Email: fgxu@jxnu.edu.cn

基金资助: 江西师范大学课程思政教改项目(JXSDJG2036); 江西省教育厅课程思政教改项目(JXJG-22-2-1)

分都是探讨实验本身的原理与操作, 对学生的教还仅仅停留在知识、技能层面, 忽略了价值观方面的开发, 相关的“课程思政”建设没有配套跟上, 育人效果不够全面。

如何设计开发既涉及科学研究前沿、不依赖大型仪器、操作灵活易于实现的新型大学化学实验, 同时又具有典型课程思政育人元素值得探索。基于笔者前期实践, 本文开发了基于纳米酶和智能手机相结合比色检测维生素C的分析化学综合实验, 以期为同类院校化学实验内容的开放提供参考。

1 本实验的知识背景

纳米酶, 英文名称Nanozyme, 是一大类具有类似生物酶催化活性的功能纳米材料的统称^[8], 是中国科学家阎锡蕴院士及其同事于2007年在世界上首次发现的, 也由中国科学家正式命名为纳米酶。相比于天然酶, 纳米酶稳定性高, 环境耐受性强, 易于制备及规模化生产, 成本低廉, 并有望作为酶的代替品, 当前已在分析传感、环境处理、疾病诊疗、绿色合成、新能源等方面展现出巨大的应用前景。2022年纳米酶被国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)评为十大化学新兴技术, 已经成为新的研究热点^[8]。

比色法是利用颜色的变化来对分析物进行定性或半定量分析的方法, 其具有低成本, 无需昂贵设备、易于实现等优势^[9,10]。纳米酶可以催化相应比色底物的变色反应, 分析物存在会影响纳米酶活性或变色反应程度, 因而纳米酶被广泛用于比色分析^[10]。智能手机拍照便捷, 结合颜色识别应用软件App可以较精准地识别颜色编码, 利用其做检测器比人眼更精准, 比光谱仪更便捷更易于实施。

2 实验部分

2.1 实验目的

1、了解比色法及纳米酶的概念及其特点; 2、制备CoOOH纳米片并探究其类酶活性; 3、掌握纳米酶法测定维生素C的原理及操作要领; 4、熟悉文献查阅方法, 体验智能手机的比色检测应用。

2.2 实验原理

本实验制备的CoOOH具有类氧化酶活性。CoOOH在氧气存在下可将无色的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)氧化成蓝色的TMB-ox; 维生素C(Vc)具有较强的还原性, 其可将蓝色的TMB-ox还原成无色的TMB。Vc量越多, 反应后溶液蓝色就越浅。

智能手机具有拍照和图像识别处理能力。三原色体系中, 每种颜色都有相应的RGB值。利用智能手机拍摄上述比色反应后溶液的照片, 通过图像处理软件识取相应RGB值。颜色的变化导致RGB值的变化。在适当待测物Vc浓度范围内, RGB值与Vc浓度具有直接线性相关性。因此可以利用纳米酶结合智能手机代替光谱仪实现对Vc的较准确的定量分析。

2.3 实验试剂及仪器

试剂: 氯化钴CoCl₂, 氢氧化钠NaOH, 次氯酸钠溶液NaClO (5%水溶液), 盐酸, 过氧化氢H₂O₂, 醋酸CH₃COOH, 醋酸钠CH₃COONa, 四甲基联苯胺(TMB)皆购自上海阿拉丁试剂公司。TMB配制成10 mmol·L⁻¹溶液, H₂O₂配制成0.1 mmol·L⁻¹溶液备用。醋酸-醋酸钠加入HCl或NaOH配制成pH 2-7的缓冲溶液备用。实验用水为去离子水(电阻率大于18.2 MΩ·cm)。

仪器: 紫外可见光谱仪(U-3900H, 日本日立公司), 台式高速离心机(DL-500, 湖南湘仪仪器有限公司), 智能手机, LED灯, 2 mL、5 mL离心管若干, 10 mL烧杯若干。1000 μL、100 μL量程微量移液器各2支, 可供20人(2人一组实验)轮流使用。

2.4 实验步骤

2.4.1 CoOOH的合成

① 在小烧杯中, 剧烈搅拌下(500转/分)将0.5 mL的1 mol·L⁻¹的NaOH溶液匀速加入到2 mL的10 mmol·L⁻¹的CoCl₂溶液中, 搅拌2分钟, 观察溶液颜色变化: 淡红色→蓝色→淡黄色。

② 在上述体系中加入0.1 mL的NaClO溶液, 继续剧烈搅拌10分钟, 溶液变为黑色。

③ 调节体系pH值, 在搅拌下加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液至 $\text{pH} = 7.3$ 左右(大概加 0.5 mL – 0.6 mL)。

最终将产物悬浮液(3 mL 左右)转移到 5 mL 离心管中, 离心5分钟(8000 转/分), 得到黑色沉淀物用水稀释至 10 mL (浓度约 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 放好备用。也可将产物提前一次课制备好, 烘干后在本节配置成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 悬浊液备用。

2.4.2 CoOOH类氧化酶活性的测试

取5支 2 mL 离心管, 编号为1–5, 按表1组合在 0.7 mL $\text{pH} = 4.0$ 的NaAc-HAc缓冲溶液中分别加入不同的反应物, 最后去离子水调节各管中总反应物体积为 1 mL 。5分钟后观察溶液颜色变化, 并用智能手机拍照, 取 0.2 mL 各离心管中产物溶液用紫外光谱仪记录吸光度值。

表1 编号1–5比色体系各组分的用量和气体氛围

编号	TMB/mL	CoOOH/mL	H ₂ O ₂ /mL	缓冲溶液/mL	H ₂ O/mL	气体氛围
1	0.1			0.7	0.2	空气
2		0.1		0.7	0.2	空气
3	0.1		0.1	0.7	0.1	空气
4	0.1	0.1		0.7	0.1	空气
5	0.1	0.1	0.1	0.7		空气

另取3支 2 mL 离心管, 编号为6–8, 按照表2组合分别加入不同反应物, 5分钟后反应溶液用智能手机拍照, 取 0.2 mL 各离心管中产物溶液用紫外光谱仪记录吸光度值。正常反应即空气氛围。氮气、氧气氛围需事先将各反应物溶液通入氮气或氧气15分钟达到气体饱和, 然后再混合各溶液。

表2 编号6–8比色体系各组分的用量和气体氛围

编号	TMB/mL	CoOOH/mL	缓冲溶液/mL	气体氛围
6	0.1	0.1	0.8	空气
7	0.1	0.1	0.8	氮气
8	0.1	0.1	0.8	氧气

2.4.3 温度和溶液pH对类酶活性的影响

考察温度的影响: 取7只 $500 \mu\text{L}$ 的离心管, 依次加入 $20 \mu\text{L}$ 的CoOOH分散液, $160 \mu\text{L}$ 的NaAc-HAc缓冲溶液, 依次放在 0 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 的烧杯中孵化20分钟, 然后加入 $20 \mu\text{L}$ TMB溶液, 静置5分钟后取出拍照, 并用紫外可见光谱仪测试 650 nm 处吸光度。

考察pH的影响: 同样取6支 $500 \mu\text{L}$ 的离心管, 分别加入 $20 \mu\text{L}$ CoOOH分散液, 然后依次加入 $160 \mu\text{L}$ 的 $\text{pH} = 2$ 到 $\text{pH} = 7$ 的缓冲溶液, 孵化20分钟后, 向离心管中加入 $20 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMB溶液, 静置5分钟后, 智能手机拍照并用紫外光谱仪测试 650 nm 处吸光度。

2.4.4 智能手机比色检测抗坏血酸(Vc)标准溶液(色阶制作)

① 反应溶液的配制: 首先吸取 $200 \mu\text{L}$ CoOOH分散液加入到 1.6 mL 的NaAc-HAc缓冲溶液中($\text{pH} = 4$), 然后加入 $200 \mu\text{L}$ TMB溶液, 摇匀静置 15 – 20 分钟至蓝色不再加深即可, 得到混合体系A。将混合体系A平均分装转移到10孔酶标条中。用移液枪吸取 $20 \mu\text{L}$ 不同浓度的Vc溶液($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共10个不同浓度)加入到10孔酶标条的体系A中, 轻微摇匀, 待颜色不再变化后, 得到一系列的混合体系B, 体系B中Vc浓度依次为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图5为不同Vc浓度的混合体系B显色拍照图像。

② 色阶图像的制作: 将装有一系列混合体系B的酶标条放入到自制的比色拍照箱的中心位置,

利用智能手机从相同角度相同距离(样品与拍照孔或光源孔的直线距离)拍摄酶标条溶液照片。拍照箱是为了减少外部光线变化对拍摄效果的影响,可以加入固定光源,在固定位置拍照,拍照时使用智能手机自带原始拍摄功能进行拍摄,保持手机相机紧贴拍摄口,控制拍摄距离为10 cm,此处示例拍摄的手机型号为iPhone 13, iOS系统版本为16.6。参考如下图1。

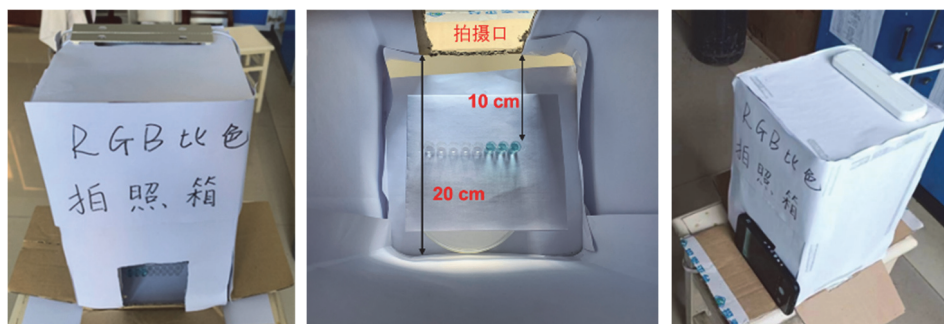


图1 色阶制作所用的拍照箱的实物照片及拍摄方式

③ 将拍摄的色阶图像原图用手机颜色识别应用软件如color picker或者QQ软件拾取RGB值。以QQ为例,色阶原图发送到电脑QQ软件,使用快捷功能(Ctrl+Alt+A),移动鼠标到照片中每管酶标条的上中下三个位置摄取RGB值,将三组数据平均处理,得到不同Vc浓度体系的平均RGB数值,相关具体数值参考表3。利用Origin软件对数据处理,绘制一定范围内的Vc浓度值与255-R值的标准曲线,如图6所示。

2.4.5 实际样品检测

(1) 湖水中Vc测定:用湖水代替去离子水配制不同浓度Vc溶液,而后移取不同浓度Vc溶液(0, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),加入到上述的体系A中,采用2.4.4步骤拍照,处理数据,利用2.4.4建立的标准曲线计算湖水样品中Vc的浓度,计算回收率。

(2) Vc片中Vc含量的测定:将药店买来的Vc片捣碎碾磨成粉末,称取一定量的粉末溶解在去离子水中,超声分散,并且离心收集上清液,通过标示含量配制大概浓度0–200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Vc溶液,然后按照(1)方法进行测定,换算Vc含量。

3 主要实验参考结果

3.1 CoOOH纳米酶制备

从下图2可以看出CoOOH纳米酶的整个制备过程颜色变化较明显,学生能够通过颜色改变判断材料制备是否成功。

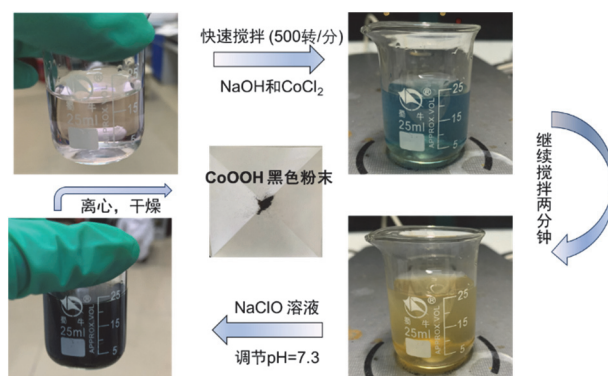


图2 CoOOH纳米酶制备过程及不同阶段溶液或产物的典型颜色变化

3.2 CoOOH纳米酶活性测试

从下图3a结果可以看出：1–3号管溶液颜色未变化，仍为无色，吸光度值接近0；4、5号管溶液颜色改变为蓝色，吸光度值较大接近1；4号和5号溶液的颜色及吸光度值也非常接近，所以加H₂O₂与不加H₂O₂结果类似，故初步得到结论：CoOOH主要呈现出类氧化酶活性。

图3b结果可以看出：通入氮气后产物溶液蓝色很浅，吸光度低；通入氧气后产物溶液颜色最深，吸光度最高；空气饱和的产物溶液蓝色和吸光度值介于前两者之间。这表明：气体氛围影响CoOOH的类酶活性：氮气显著降低其催化活性，氧气会增强其催化活性。综合上述对比实验进一步说明CoOOH具有类氧化酶活性。

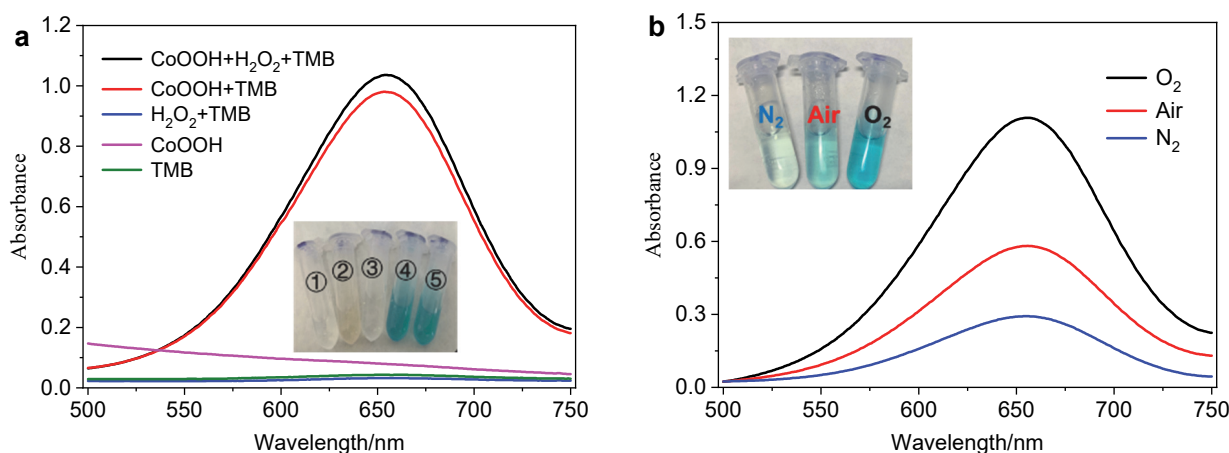


图3 (a) 空气氛围下，不同反应物参与反应所得产物的紫外可见光谱；
(b) 不同气体氛围下CoOOH + TMB反应产物紫外可见吸收光谱

3.3 pH和温度的影响

从图4结果看出，CoOOH纳米酶的活性会受到温度和酸度影响，在pH 3–6和20–60 °C范围内具有较高的酶活性。相比于生物酶来说，CoOOH纳米酶的环境耐受性更好，这也是纳米酶的优势之一。

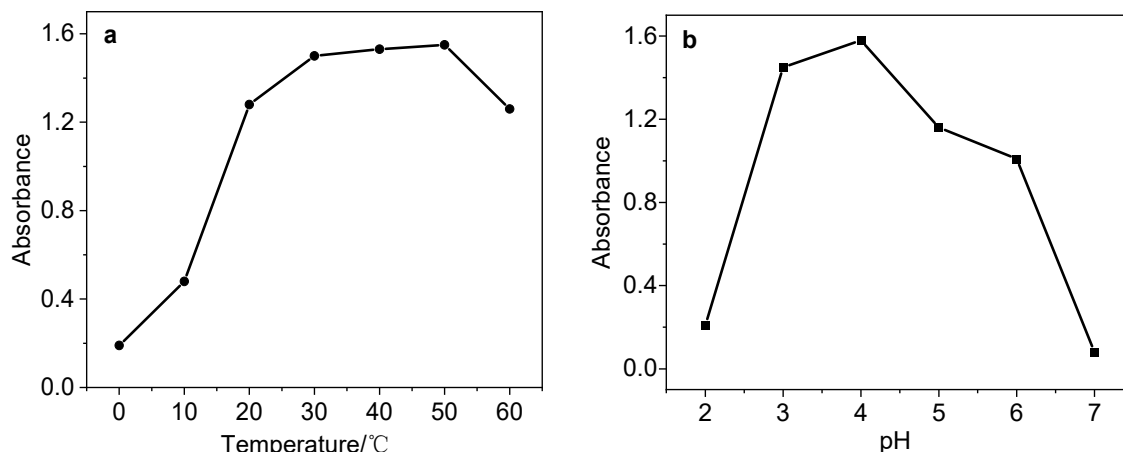


图4 (a) 不同反应温度或(b)溶液pH下，CoOOH-TMB反应产物在650 nm处吸光度值变化
反应时间5分钟，TMB浓度： $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，CoOOH浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

3.4 智能手机比色检测Vc

3.4.1 不同浓度梯度Vc比色结果：色阶图片

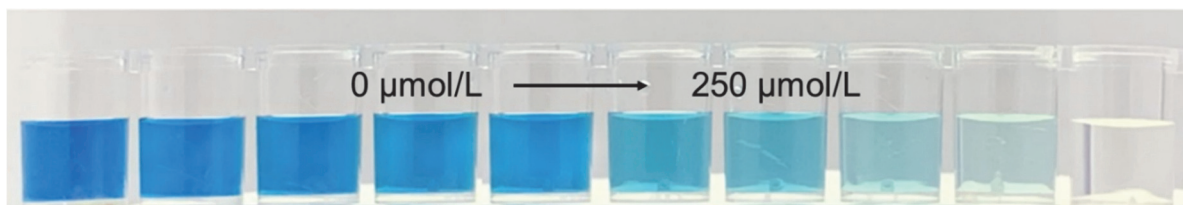


图5 CoOOH + TMB反应后加入不同浓度Vc标准溶液后所得到的溶液的颜色照片

3.4.2 数据处理

(1) 不同浓度梯度Vc对应RGB值。

表3 从图5利用QQ软件读取相应图片RGB值及其255-G, 255-R值列表

Vc浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	R	G	B	255-R	255-G
0	3	132	220	252	123
40	7	135	213	248	120
80	11	138	208	244	117
110	15	142	204	240	113
140	20	145	204	235	110
160	66	165	201	189	90
180	111	181	205	144	74
200	148	198	202	107	57
220	181	200	197	74	55
250	221	211	207	34	44

(2) 不同浓度梯度Vc与255-R值线性关系图。

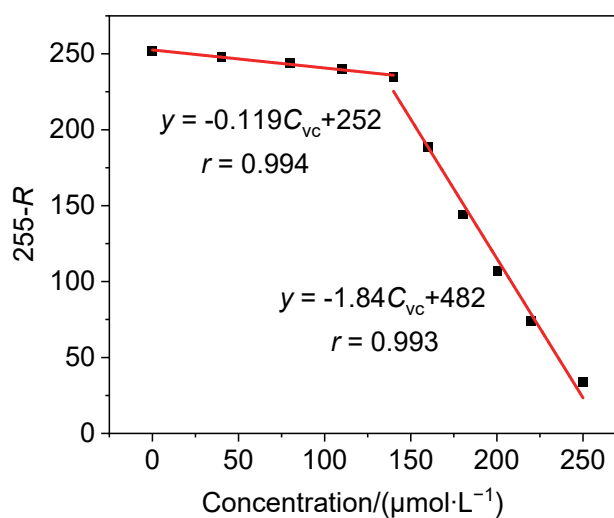


图6 基于表3数据绘制的RGB值(255-R)与Vc浓度的对应关系

3.5 实际样品检测结果

表4显示该方法测定湖水中掺入的Vc, 回收率91.6%–101.6%; 用于片剂中Vc含量测定, 其结果与标识值较为接近。这表明该方法可以用于不同实际样品中Vc含量的测定, 具有一定实用性。

表4 本方法用于检测湖水中的Vc和两种Vc片中Vc含量结果

样品	加入值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测量值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%	相对标准偏差/%, $n=3$	Vc含量/mg
Vc-湖水	0	0	–	–	–
	50	45.82	91.64	5.42	–
	100	100.84	100.84	7.36	–
	200	203.26	101.63	4.74	–
Vc片剂1 (100 mg)	100	103.61	103.61	4.53	104.26
	200	197.28	98.64	7.06	99.13
Vc片剂2 (213 mg)	100	92.44	92.44	3.35	198.34
	200	196.21	98.11	5.96	210.28

4 实验安排和教学建议

实验总体内容包含三个部分: 文献调研, 实验实施, 讨论与报告。

(1) 课前文献调研。

查阅文献, 了解纳米酶概念、特性、应用领域; 了解智能手机在比色分析中的应用注意事项; 理解基于图像RGB值定量分析的数据处理方法; 理解实验的总体设计、主要原理及操作规范。

(2) 课上实施实验。

主要包括材料制备, 纳米酶活性确认以及比色检测Vc。共计8学时。1人一组或2人一组进行实验。1–4学时: 制备CoOOH纳米酶, 表征其活性, 探讨温度、酸度对其响应活性的影响。5–8学时: 制备显色色阶, 完成智能手机比色检测标准Vc溶液及实际Vc样品检测。

在教师指导下, 学生自主或合作完成实验全过程。教师对学生遇到的问题予以引导, 启发学生思考继而通过探究得到解答。

纳米酶材料结构表征为选做, 可以安排在课外在研究生协助下完成。将温度、酸度对纳米酶活性的考察作为灵活调节模块, 时间充足(8课时)可以组织相应实验考察, 如果时间有限(4–6课时)可以省去此模块, 直接制备纳米酶材料后探索色阶卡制备和Vc检测。

(3) 课后撰写报告。

查阅文献, 确定数据处理方法, 分析数据结果; 分组探讨影响实验结果准确度的因素, 提出可能的改进建议, 完成报告。通过课堂及课后讨论, 培养学生分析问题能力及反思能力。

当前, 将纳米酶与生物酶结合可以发展不同的传感方法检测多种分析物, 因此本实验可以灵活拓展至多种实际样品中目标分析物的测试, 具有很强的可拓展性。

5 育人价值

本实验结合了最新科研成果和课程思政, 除了学习前沿的知识技能, 在价值观引领、激励创新方面也具有较好的育人价值, 符合全面育人目标要求。

知识技能: 通过文献调研培养学生信息获取和加工能力; 通过设计对照实验培养其科学探究思维, 了解科学探究模式; 制作测试用的暗盒锻炼其动手动脑解决问题能力, 提高实验兴趣; 对实验结果处理锻炼其数据处理及加工能力和科学严谨态度; 将纳米酶前沿科研课题引入本科生实验有利于学生了解前沿科研进展, 提高认知水平。

价值观引领: (1) 文化自信和民族自豪感: 中国科学家在世界上首次发现纳米酶并创立了纳米酶术语及标准化, 创制全球首个纳米酶产品, 主编了首部Nanozymology纳米酶学英文专著, 在55个国家的420多个参与纳米酶的研究机构中, 中国科学家一直处于引领地位。这一创新性成果有利于强化学生的文化自信和民族自豪感。(2) 科学严谨、实事求是: 纳米酶的发现源于阎锡蕴团队一次“异常”的免疫隐性对照实验现象: 没有链接过氧化物酶磁性粒子也使得酶底物变色。阎锡蕴团队没有忽视这一在传统科学认知中是“不应该”的现象, 经过严谨实验反复验证, 最终发现了纳米酶。与此发现类似, 科学史上很多的发现都是源于一次次“异常”或“失败”的实验, 实事求是记录, 科学严谨论证十分必要、重要, 否则就可能与重大的科学发现失之交臂。

激励创新: 纳米酶发现之前, 科学界认为简单无机材料不可能具有类酶活性, 因而都是构造有机材料来模拟酶活性。阎锡蕴教授团队的发现改变了以往视其为惰性物质的传统观念, 表明全无机材料也具有类有机生物酶的活性, 突破了科学界的固有认知, 是敢于质疑, 勇于创新的典型案例。此外, 实验内容主要利用智能手机作为检测器, 这对于启发学生利用身边的电子设备发展新颖简便的分析方法、培养创新意识具有很好的示范意义。

两学期的大二本科实验运行表明该实验可行性强, 学生参与热情高。通过实验, 学生初步建立了“查阅资料-材料制备-表征测试-分析应用”的科研逻辑思维模式; 通过查阅文献及实验解决问题的自主学习能力和创新实践能力显著提高; 对前沿科学研究的认识更加全面, 兴趣大大提升。

6 结语

本文基于科研反哺教学的理念, 结合作者科研及实验教学经验, 将基于纳米酶和智能手机的比色分析法检测维生素C转化为本科生综合性实验教学项目。该实验难度适中, 易于实施, 内容新颖, 创新性和综合性强, 内容灵活, 可拓展性强; 通过实验有利于学生了解科研前沿, 激发探索兴趣, 从而较好地培养学生的综合素质和实践创新能力。同时, 实验所用纳米酶是中国科学家的世界性前沿原创成果, 包含丰富的课程思政育人元素, 可将知识技能与价值观引领良好融合, 有力促进实验课程的全面育人效果。

参 考 文 献

- [1] 陈芳, 王宏, 刘敏, 王楠, 朱丽华. 大学化学, **2023**, 38 (5), 26.
- [2] 柴成文, 樊红霞, 王琛, 袁文霞. 大学化学, **2023**, 38 (3), 64.
- [3] 陈怀侠, 葛伊莉, 王升富, 张修华, 黄建林. 化学教育(中英文), **2022**, 43 (8), 61.
- [4] 谢锦桂, 管华, 温祖标, 邓志红, 钟声亮. 大学化学, **2023**, 38 (2), 83.
- [5] 杜春燕. 化学教育(中英文), **2020**, 41 (15), 49.
- [6] 张自品, 赵祖志. 大学化学, **2023**, 38 (8), 240.
- [7] 宦双燕, 王玉枝. 大学化学, **2022**, 37 (10), 2201006.
- [8] 范克龙, 高利增, 魏辉, 江冰, 王大吉, 张若飞, 贺久洋, 孟祥芹, 王卓然, 樊慧真, 等. 化学进展, **2023**, 35 (1), 1.
- [9] 吴昊天, 王广发, 窦新存. 分析测试学报, **2021**, 40 (4), 468.
- [10] 邢硕晖, 李亚城, 卿志和. 化学传感器, **2020**, 40 (3), 9.