团体标准

《抗氧化性能光电化学测定方法及检测仪器》

编制说明

广州市标准化促进会

2022年9月

《抗氧化性能光电化学测定方法及检测仪器》

编制说明

一、标准制定的必要性

目前国内外基于生物抗氧化剂的研究总体状态是缺乏统一的方法，更缺乏标准化的传感器及分析仪器设备。如今虽然已有一些测定食品中化合物的抗氧化能力和效率的方法，如光学法、电化学法以及传统的色谱-质谱法等。然而上述方法普遍存在仪器价格昂贵、操作复杂、抗干扰性差、有色物质严重影响测试结果等缺点。虽然基于以上几种检测原理已有一些研究工作发表，但到目为止国际上所开发的相关市售试剂盒及仪器产品，并能够应用于实际检测需求的还寥寥无几。长期以来针对如何评价食品体系抗氧化能力或总体抗氧化容量还没有正式的国家、行业或地方标准，企业和相关部门无法统一各项技术要求，相关产品的市场一度出现混乱。因此简便、快速、准确的食品抗氧化容量分析方法一直以来是分析工作者所致力追求的目标。

本文件基于光电化学原理的抗氧化容量检测技术及所开发的分析仪器有别于国际上现有的设备和检测原理，是具有原始创新性的仪器产品。光电化学技术继承了光学和电化学的优点，在低背景、低电位甚至开路电位（外施加电位为0V）下，将光源输入信号与检测信号完全分离，已被广泛应用于生物分子分析、能源和环境保护等领域。该技术中，利用构建的半导体及复合材料通过光催化法产

生含氧自由基，可有效模拟人体内源自由基环境，方法简便、易于控制，且自由基可以多次重复产生，易于传感器的制备和商品化仪器研制。通过对半导体带隙的调控和功能化设计，可使光生空穴（及其激发的自由基）呈现不同的氧化态而实现对体系内所含抗氧化剂物种氧化还原电位的有效匹配，同时对体系中的非抗氧化剂物种氧化还原电位不匹配。

本文件检测方法稳定，无需复杂样品前处理、分析测试过程简便快捷、响应迅速、仪器检测灵敏度高、抗干扰能力强，尤其是可针对有色被测体系进行分析测试，这一功能这是国际上其他同类仪器产品不能比拟的。以食品体系抗氧化容量分析研究为例，可使用没食子酸（GA）或维生素C（VC）作为抗氧化剂等价物衡量体系中总的抗氧化营养素含量水平，所测试结果与文献报道的光谱法、电化学法等具备可比性。可应用于水溶性以及油溶性生物抗氧化剂检测分析，如天然蔬果、果汁、红酒、茶叶、食用油等食品体系，还拓展到中药、化妆品等领域的检测。

二、标准编制原则及依据

1 按照 GB/T 1.1－2020《标准化工作导则　第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》要求进行编写。

2 参照相关法律、法规和规定，在编制过程中着重考虑了科学性、适用性和可操作性。

三、主要试验情况

1. 化学试剂

三氯化钛($TiCl_3$)、对苯二甲酸(TA)、没食子酸(GA)、芦丁(RT)、槲皮素(QR)和DPPH购买自Alfa。抗坏血酸(AA)、谷胱甘肽(GSH)、咖啡酸(CA)、儿茶素(CT)、漆黄素(FT)、水溶性维生素(TROLOX)、半胱氨酸(Cys)、葡萄糖、果糖和10%的Folin-Ciocalteu (F-C)试剂购买自sigma。所有购买的试剂直接使用未进行进一步纯化。0.1 mol·L^{-1}的PBS (pH=7.4)中NaH_2PO_4/ Na_2HPO_4的摩尔比例为 81:19，同时含有10 mmol·L^{-1}的氯化钠。

2. 光电化学的测定

首先分别使用NaOH (1 mol·L^{-1})和H_2O_2 (30 %)溶液将ITO电极超声清洗，然后使用丙酮和二次水冲洗干净并室温干燥。100 μL的ug-C_3N_4/TiO_2 (1 mg·mL^{-1})悬浊液滴涂到洗涤后的ITO电极室温干燥，获得ug-C_3N_4/TiO_2 (1 mg·mL^{-1})修饰的电极。TiO_2和bg-C_3N_4/TiO_2修饰电极的制备方法同ug-C_3N_4/TiO_2相似，仅仅将TiO_2和bg-C_3N_4/TiO_2取代ug-C_3N_4/TiO_2材料。SEM对ug-C_3N_4/TiO_2修饰的ITO电极断面扫描显示，修饰层的厚度大约为400 nm。

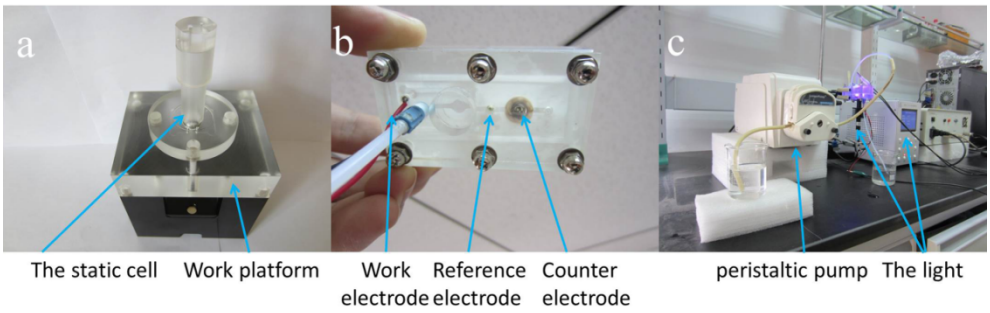

图1. 静止光电池 (a)，流动光电池 (b)，流动光电检测全装置(c)

光电测定过程如下：首先如图1（c）所示将流动光电化学平台固定好，然后将PBS和加样的PBS溶液在流动泵的辅助下以2 $r \cdot min^{-1}$的速度流经样品池，为了避免颜色干扰，LED光源从修饰的ITO电极背后照射，电极表面获取能量为73.89 $mW \cdot cm^{-2}$。每个样品测定三次最后取平均值。当样品被测定时，光电流遵从如下规则进行收集$I = I_{smpale} - I_{blank}$。（$I_{blank}$：为未加样品时的光电流，：$I_{smpale}$为加样后的光电流）。

将四种商用茶叶和四种商用咖啡样品分别作如下处理：每种茶叶分别称取0.5 g，然后加入50 ml的沸水，30 min后过滤。0.25 g的不同品牌的咖啡加入到25 mL的沸水中，3 min后过滤。处理完的滤液放入4 °C冰箱保存，限三天内使用，测定前将滤液使用一定量的PBS稀释。

3. 抗氧化剂抗氧化容量的测定

在0 V的电位下，使用薄层光电流动池我们首先对九种标准的抗氧化剂的抗氧化容量进行测定，九种抗氧化剂都显现出了良好的光电响应。抗氧化剂的测定结果如表1。

表1. 九种抗氧化剂的线性方程，相关系数 (r^2)，氧化还原电位，离子势，抗氧化容量[a]，测定浓度范围

Antioxidants	Linear equation	Linearity range ($\mu mol\ L^{-1}$)	R^2	E (V)	IP(kal mol^{-1})	Antioxidant capacity
Quercetin		9.90~111.10	0.992	0.300	161.89	3.150
Gallic acid		5.00~74.44	0.956	0.217	179.65	3.170
Caffeic acid		15.00~193.31	0.993	0.374	175.72	4.099
Catechin		24.96~192.31	0.992	0.394	166.27	5.195
Fisetin		29.56~181.82	0.983	0.189	266.27	3.375
Rutin		24.88~192.31	0.973	0.447	165.12	1.571

Trolox	73.85~348.84	0.997	0.356	-6.73	0.117
Ascorbic acid	25.00~243.09	0.970	0.365	182.64	0.629
Glutathione	9.65~400.00	0.996	---	179.64	0.039

注释：a抗氧化容量取值为个抗氧化剂线性方程的斜率值；---：未检出。

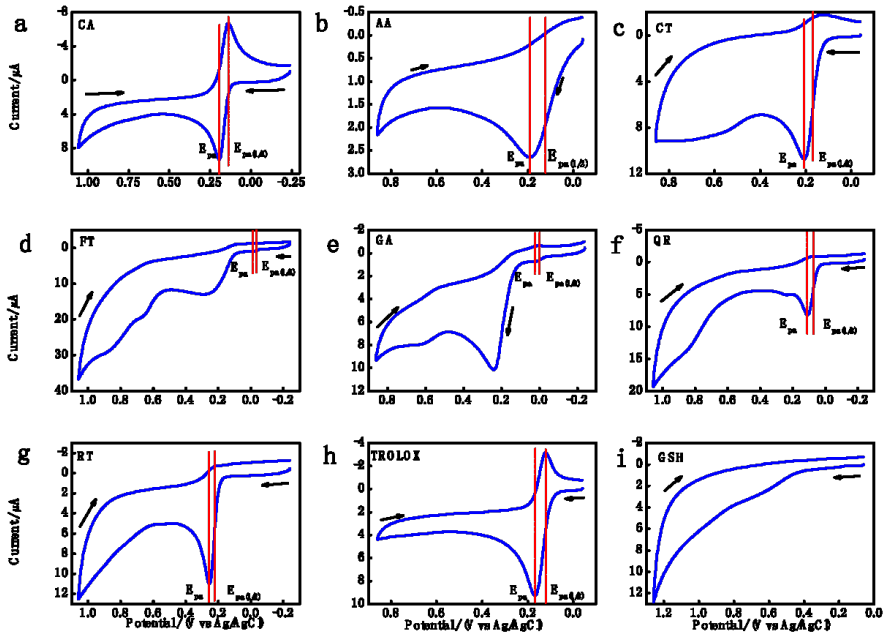

图2. 九种抗氧化剂的循环伏安图（抗氧化剂的浓度为0.5 mm•L^{-1}, v=100 mV•s^{-1}）

如图2所示，相比TR、AA 和GSH，CT、CA、FT、GA、QR和RT表现出较强的抗氧化能力。由上面的分析可知基于ug-C_3N_4/TiO_2催化剂的光电化学平台原理为单电子转移机理，即抗氧化能力越强，就具备越强的失电子能力。为了研究不同的抗氧化剂具备不同的抗氧化能力的原因，我们在理论和实验两方面进行探索。抗氧化剂的离子势是一个表示抗氧化剂抗氧化能力的重要指标，使用B3LYP/6-311G (d,p)的方法对九种抗氧化剂的离子势进行计算，结果如图2所示，酚类催化剂CT、CA、FT、GA、QR和RT的离子势较低，这与他们较强的抗氧化能力是相对应的。这同样能够从半胱氨酸 (187.95 kcal•mol^{-1})和葡萄糖 (191.17 kcal•mol^{-1})的离子势结果可以对比说明，

因为两者具有较高的离子势，其不容易反应进而不影响实际样品的检测。然而，GA和TR与上面的推断有些不一致。氧化还原电位是另一个代表抗氧化剂抗氧化能力的重要指标，氧化还原电位越低抗氧化能力就越强。如图2所示，GA具备较低的氧化还原电位，同时表现出相对较高的抗氧化能力。相比GSH，其它的酚类抗氧化剂也显现出较低的氧化还原电位和较高的抗氧化能力。另外需要注意的是，分子结构在光电化学反应中具有重要的作用，理论分析认为酚类苯环上的羟基位置和数目强烈影响酚类的抗氧化能力。相比TR，CT、FT、QR和RT苯环上具有两个邻位的羟基从而表现出较强的抗氧化能力。抗氧化剂和催化剂的接触难易程度是另一个决定抗氧化剂反应程度的重要因素， ug-C_3N_4具有类似苯环的结构，所以具有苯环的酚类更容易通过π-π作用力与催化剂接近而反应，故而表现出较强的抗氧化能力。综上所述，相比TR、AA尤其GSH，酚类抗氧化剂表现出较强的抗氧化能力，这也与其它研究者的光学方法测定结果相一致。

4.实际样品测定

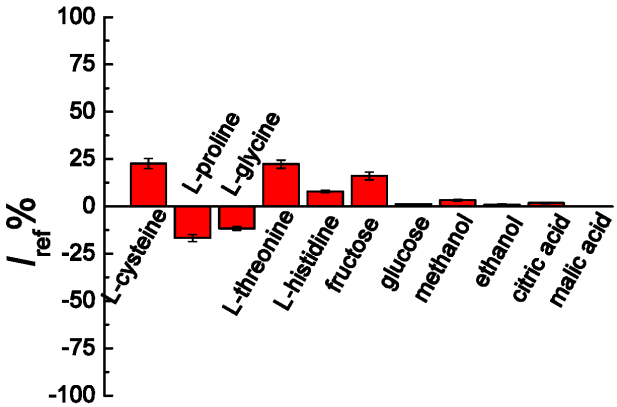

图3 以25 μmol•L^{-1} GA为样品，食品中常见干扰物质在抗氧剂抗氧化容量测定时对测定结果

的影响。（25 mmol•L^{-1}的L-脯氨酸，L-甘氨酸，L-组氨酸，乙醇, 甲醇，12.5 mmol•L^{-1}的L-苏氨酸，果糖，葡萄糖，L-柠檬酸，L-苹果酸和0.5 mmol•L^{-1} L-半胱氨酸在0.1 mol•L^{-1}PBS (pH=7.4)和0 V以及420 nm光照的情况下进行测定）

为了进行实际样品的检测，我们首先对食品中常见的干扰物质进行测定。结果如图3 所示，在25 μmol•L^{-1} GA存在的情况下，1000倍的脯氨酸、甘氨酸、组氨酸、乙醇、甲醇，500倍的苏氨酸、果糖、葡萄糖、柠檬酸、苹果酸和20倍的半胱氨酸不影响测定。这进一步说明该光电平台能够用于复杂的实际样品测定。对市场上购买的四种品牌的咖啡和茶叶进行抗氧化容量的检测。结果如表2所示，测定结果与两种光学方法结果相一致，相比Folin-Ciocalteu方法，四种咖啡的结果普遍偏低，这是因为咖啡颜色的干扰的缘故，而光电化学薄层流动平台光照在ITO修饰电极背面，这样很好地克服了有色样品的干扰，测定结果更准确。

表2 三种不同的方法对四种品牌的茶叶和四种品牌的咖啡检测结果比较

Practical Samples	Photoelectroche-mical Sensor (mg·g^{-1} GA)	Folin-Ciocalteu Method (mg·g^{-1} GA)	DPPH Method (mg·g^{-1} TROLOX)
T_1	72.212 ± 0.612	62.190 ± 0.426	163.610 ± 0.925
T_2	95.860 ± 0.536	88.610 ± 0.731	227.880 ± 0.834
T_3	21.010 ± 0.214	23.270 ± 0.198	113.600 ± 0.736
T_4	30.570 ± 0.165	34.960 ± 0.767	132.560 ± 0.961
C_1	3.334 ± 0.068	9.020 ± 0.213	14.740 ± 0.346
C_2	3.759 ± 0.086	9.645 ± 0.324	15.490 ± 0.425
C_3	1.937 ± 0.034	5.520 ± 0.228	6.890 ± 0.123
C_4	2.353 ± 0.056	6.830 ± 0.621	9.682 ± 0.456

注释：每种样品测量三次取平均值。

5.结论

使用一种简便的方法合成高性能的光电材料ug-C_3N_4/TiO_2，使用这种光电材料成功设计了薄层光电化学流动池，并用于抗氧化剂抗氧化容量的检测。它克服了传统方法的三个主要缺点：1)色谱方法仅仅测定抗氧化剂的浓度而非容量；2)光谱方法容易受到有色物质的干扰；3)传统电化学方法产物容易吸附在电极上而影响下一步测定。光电化学方法还表现出响应迅速、灵敏度高、稳定性好和进样量少等优势。同时通过实验测定和理论分析证明，光电化学检测为单电子转移的机理。实际样品测定结果与参照光谱方法一致，通过光电化学平台用于抗氧化剂抗氧化容量的测定。

四、项目背景及工作情况

（一）任务来源

本标准于2021年10月由广东鼎诚电子科技有限公司提出，中国国际科技促进会标准化工作委员会确定立项。

（二）标准起草单位

本标准的主要起草单位是广东鼎诚电子科技有限公司、广州市标准化促进会、广州大学、广东诺驰化工有限公司、广州市凯闻食品发展有限公司参与起草。

（三）标准研制过程及相关工作计划

1、成立标准编制组

为保证标准编制工作的顺利进行，2022年6月，广州市标准化促进会及广州大学等单位成立标准编制组，明确人员分工以及工作进度等。

2、资料收集

2022年6月，编制小组搜集光电化学检测抗氧化性能相关资料，包括相关法律法规、国家行业标准等，以及相关研究论文，并总结广州大学光电化学抗氧化性能团队相关的试验数据。

3、标准起草阶段

2022年6月-7月，根据已有资料，提炼总结前期研究和试验结果，确定标准初稿。

4、标准研讨、验证阶段

2022年7月，标准初稿确定后，先后通过多次的组内研讨，组织相关专家进行研讨，形成了标准征求意见稿。

五、标准制定的基本原则

1、科学性

本标准遵循科学规律，以事实为依据，所有操作规范要求和数据指标均以科学实验验证为基础。

2、适用性

标准的编制应充分考虑抗氧化性能光电化学测定方法及检测仪器的实际情况，标准发布后应适用基于超薄g-C3N4/TiO2的光电化学平台对水溶性以及油溶性体系抗氧化剂的抗氧化性能检测分析。

3、可操作性

标准编写充分考虑试验操作的需求，条理清晰、内容详实，具备可操作性。

六、标准主要内容

本标准内容包括：抗氧化性能光电化学测定方法及检测仪器

及检测仪器的范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、原理、试剂或材料、仪器设备、抗氧化性能测定等。

1、范围

本章主要规定了本标准的内容范围和适用范围。

2、规范性引用文件

本章主要列出了正文中引用的国家标准。

3、术语和定义

本章对本文件相关术语进行了定义。

4、缩略语

本章列出了本文件中相关缩略语及相应中文名称。

5、原理

本章列出了光电化学测定抗氧化性能原理。

6、试剂或材料

本章列出了本文件通过光电化学测定抗氧化性能使用的相关试剂。

7、仪器设备

本章列出了本文件通过光电化学测定抗氧化性能使用的材料表征仪器设备和光电检测设备。

8、抗氧化性能测定

本章包括：实验步骤（待测抗氧化剂分析标准品、待测实际样品、光电半导体材料等样品制备和固定光电检测池、流动光电检测池光电检测试验）、试验数据处理等内容。

七、与有关法律法规和强制性标准的关系

遵守和符合相关法律法规和强制性标准要求。规范性引用文件包括：

GB/T 6682　分析实验室用水规格和试验方法

八、分歧的处理依据和结果

本标准在标准编制、标准研讨中没有涉及重大分歧意见。

九、后续贯彻措施

1、积极宣传。组织相关企业等开展培训宣传工作，对标准内容进行解读。

2、后续跟踪。一是定期组织收集标准执行情况和效果，及时组织对标准进行论证，并根据实际情况提出对标准进行修订、废止或继续使用的建议。

标准编制组

2022年9月