



FRAP 分光光度法测定饮品中还原性物质的实验教学设计

宿 艳, 杨 成, 张洪一, 王润泽, 李 朔, 刘昕圆

(大连理工大学 基础化学实验中心, 大连 116024)

摘要: 邻二氮菲分光光度法测定微量铁是经典的仪器分析实验, 但其涉及的知识点和实验操作技能有限, 无法满足新时期人才培养的需求。该文介绍了利用铁离子还原/抗氧化能力法(FRAP 法)评价饮品中还原性物质含量实验, 通过绘制吸收曲线和标准工作曲线等实验环节, 全面提高学生综合运用各种分析方法和实验操作技术的能力, 培养学生创新思维能力和处理实际问题能力, 帮助学生深刻体会分析化学在人类生活中的实际应用, 为学生将来从事科研工作奠定坚实的基础。

关键词: 分光光度法; 还原性物质测定; 维生素 C; 酶标仪

中图分类号: O652.1

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20200045

The Experimental Teaching Design for the Determination of Reducing Substances in Beverages by FRAP Spectrophotometry

SU Yan, YANG Cheng, ZHANG Hongyi, WANG Runze, LI Shuo, LIU Xinyuan

(Experiment Center of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Despite that the determination of trace iron by o-phenanthroline spectrophotometry is a classical instrumental analysis experiment, it fails to meet the demands of talent training in the new era due to limited knowledge and operation skills. This paper introduces the experiment of using Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) to evaluate the content of reducing substances in beverages. Drawing absorption curve and standard working curve and other experiment links are conducive to improving the abilities of students to comprehensively use various analytical methods and experimental operation technology, cultivating their innovative thinking and ability to deal with practical problems, providing a better understanding of the practical application of analytical chemistry in human life, and laying a solid foundation for their scientific research in the future.

Key words: spectrophotometry; determination of reducing substances; vitamin C; microplate reader

根据教育部《关于实施基础学科拔尖学生培养计划 2.0 的意见》, 大连理工大学制定了基础学科拔尖学生培养计划, 构建具有大工特质、中国特色、世界水平的基础学科拔尖人才培养体系。作为一门重要的基础必修课程, 我校分析化学实验课程以传统的验证性实验为主, 在加深学生对各种分析方法的理 解, 培养学生扎实的基本操作技能等方面起到了至关重要的作用。但是, 在培养学生的创造性思维和主动学习、探索式学习等方面存在明显不足, 学生的学习热情和自主探索精

神严重缺失, 与创新人才的培养目标背道而驰, 难以适应新形势下对人才培养的要求, 因此迫切需要增加一些可供学生选做的研究性实验项目^[1-4]。

邻二氮菲分光光度法测定微量铁的实验是经典的仪器分析实验, 国内高校多采用该实验进行分光光度法的授课。但是该实验存在以下问题: 涵盖知识点较少; 涉及到的实验基本操作覆盖面较小; 分析对象、选用手段、采用设备没有体现与时俱进的特点; 实验学时安排的可控性不够灵活, 无法满足新时期学生创新实践能力培养的需

收稿日期: 2020-02-06; 修回日期: 2020-04-03

基金项目: 大连理工大学教育教学改革一般项目(YB2019023)。

作者简介: 宿艳(1975-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事分析化学实验教学、纳米光电催化材料方面的研究工作。

通信作者: 杨成(1979-), 男, 博士, 副教授, 主要从事分析化学教学及基于核酸适配体生物传感器方面的研究工作。E-mail: yangcheng@dlut.edu.cn

求。因此,研发设计一些新的实验项目,既可以满足对分光光度法实验教学的需求,使学生掌握该分析方法及相应的实验操作基本技能;同时又能让学生在过程中,深刻体会分析方法在人类生活、环境保护和工业生产中的实际应用^[5-8]。

随着亚健康人群的增加,人们开始关注饮品中维生素 C、茶多酚等抗氧化物质对人的生理健康的作用^[9-10]。物质还原性定量测定的方法有很多,如 FRAP 法、ABTS 自由基法、CURAP 法、DPPH 自由基法、ORAC 法等,上述方法已经成为当今社会物质还原性定量测定的主要评价方法^[11-14]。FRAP 法是 ferric ion reducing antioxidant power 的缩写,即“铁离子还原/抗氧化能力法”,是重要的评价标准之一^[12-15],该方法是在低 pH 条件下,通过三价铁离子氧化样品中的还原性物质得到亚铁离子,利用亚铁离子与 TPTZ(tripyridyltriazine, 三吡啶基三嗪)生成蓝紫色复合物来测量样品的抗氧化能力,广泛应用于食品与保健品的抗氧化能力分析中。具有灵敏度高,选择性好,与生理环境相似,线性范围宽,仪器结构简单等特点。

1 实验部分

1.1 实验原理

饮品中的还原性物质可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 生成的 Fe^{2+} 与 TPTZ(2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪)配合,生成有色配合物,在可见光区通过光度测定,可以得到还原性物质的含量。TPTZ 与 Fe^{2+} 的配合物为蓝紫色,最大吸收波长为 626 nm,摩尔吸光系数 $k_{626} = 1.6 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。由于 Fe^{3+} 与 TPTZ 的配合物为无色,在可见光区无吸收峰,因此不影响 Fe^{2+} 与 TPTZ 配合物的光度测量。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器

ReadMax 1900 型光吸收全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)、超声清洗台、玻璃比色皿、1 mL 移液枪、100 μL 移液枪、20 μL 移液枪、容量瓶、量筒、离心管、96 孔透明微孔板。

1.2.2 主要试剂

2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪(简称为 TPTZ,阿拉丁);无水三氯化铁(分析纯,天津大茂化学试剂厂);硫酸亚铁铵(分析纯,天津大茂化学试剂厂);维生素 C(分析纯,生工生物工程(上海)股份

有限公司); $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,国药集团化学试剂有限公司)

1.2.3 溶液配制

1) FRAP 工作液 A 液(TPTZ 溶液 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取 40 mg TPTZ 溶于 100 mL $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液中,超声助溶。

2) FRAP 工作液 B 液(Fe^{3+} 溶液 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取 40 mg 无水三氯化铁溶于 100 mL $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液中。

3) 铁标准溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新配置): 准确称取 392.1 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于少量去离子水,转移至 100 mL 容量瓶中,定容。

4) 维生素 C 标准溶液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新配置): 准确称取 176.1 mg 抗坏血酸溶于少量去离子水,转移至 100 mL 容量瓶中,定容。

2 实验步骤

具体的实验方案如图 1 所示。

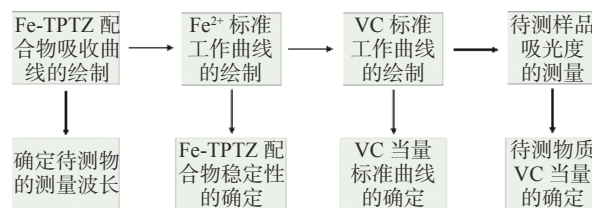


图 1 实验流程图

2.1 绘制吸收曲线并选择测量波长

用移液枪准确移取 20 μL 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁标准溶液于 1 cm 比色皿中,再加入 FRAP 工作液 A、B 液各 1 mL,摇匀。以去离子水作为参比溶液,在 450~800 nm 范围内,进行光谱扫描,得到吸收曲线。本实验中选用吸收曲线的峰值波长作为测量波长。

2.2 Fe^{2+} 标准曲线的绘制

用移液枪分别移取 0、20、40、60、80、100 μL 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁标准溶液于 6 个 1.5 mL 离心管中,再依次加入 1 000、980、960、940、920、900 μL 的去离子水,摇匀。移取上述溶液 20 μL 分别于酶标板的 6 个孔中,再依次加入 FRAP 工作液 B 液和 A 液各 90 μL (其光程为 0.67 cm),于摇床上摇匀 10 min。在选定的波长下测定各标准溶液的吸光度,平行测定三组,绘制标准曲线。

2.3 维生素 C 标准曲线的绘制

用移液枪分别移取 0、20、40、60、80、100 μL 的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 维生素 C 标准溶液于 6 个 1.5 mL 容量瓶,再分别加入 1000、980、960、940、920、900 μL 的去离子水,摇匀。移取上述溶液各 20 μL 于酶标板的 6 个孔中,再分别加入 FRAP 工作液 B 液和 A 液各 90 μL ,于摇床上摇匀 10 min。在选定的波长下测定各标准溶液的吸光度,平行测定三组,绘制标准曲线。

2.4 饮品中还原性物质含量测定

将各种饮品待测样稀释 10 倍,取稀释后的待测样 20 μL 于酶标板中,再分别加入 FRAP 工作液 B 液和 A 液各 90 μL ,于摇床上摇匀 10 min。在选定的波长下测定各标准溶液的吸光度,平行测定三组。

3 实验结果与讨论

3.1 配合物测量波长的确定

如图 2 所示为 Fe^{2+} -TPTZ 配合物在 400~800 nm 范围内的吸收曲线,由图可见此配合物的最大吸光度在 626 nm 处,由于在此处测量时可获得较高的灵敏度,因此本实验选择 626 nm 作为定量分析的测定波长。

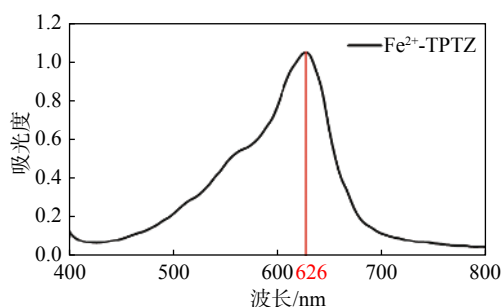


图 2 Fe^{2+} -TPTZ 的吸收曲线

3.2 配合物摩尔吸光系数的确定

如图 3 所示为 Fe^{2+} 的标准工作曲线,经计算得到 Fe^{2+} -TPTZ 的摩尔吸光系数约为 1.6×10^4 ,大于 10^4 ,为中高灵敏度,表明该方法测定配合物的灵敏度很高。通过摩尔吸光系数的测定,可以帮助学生更为深入的理解朗伯比尔定律,也就是摩尔吸光系数越大表明吸光物质对某波长光的吸光能力越强,采用分光光度法测量物质浓度时的灵敏度也就越高。

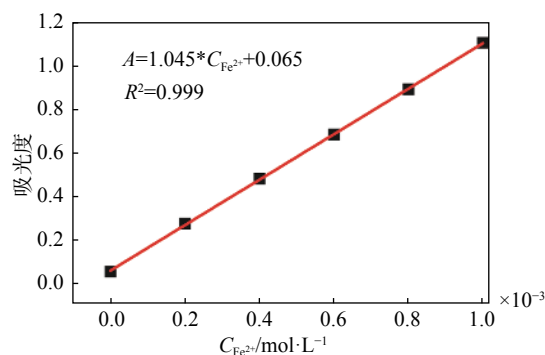


图 3 Fe^{2+} -TPTZ 的标准工作曲线

3.3 Fe^{2+} 标准曲线与维生素 C 当量标准曲线的建立

还原性物质的评价方法通常有 Fe 当量和维生素 C 当量两种,本文分别建立 Fe^{2+} 当量和维生素 C 当量的标准工作曲线如图 4 所示。绘制标准曲线的 Fe^{2+} 和维生素 C 的浓度均为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,每个样品平行测量三组数据,取平均值。以吸光度值作为纵坐标,浓度作为横坐标,作图,由结果可知 1 mol 的 VC 相当于 1.6 mol 的铁。计算回归方程及 R^2 值,为保证标准曲线具有较好的线性相关性, R^2 应大于 0.995。由于本实验采用酶标仪测量吸光度,因此所有样品的吸光度测定可在几十秒之内快速完成,有效提高了测试速度,且避免了紫外可见分光光度计繁琐的操作。

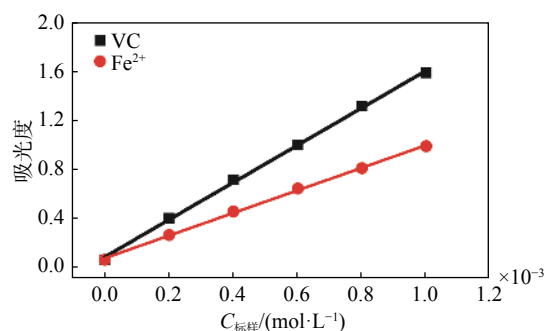


图 4 Fe^{2+} 和 VC 的当量标准曲线

3.4 不同饮品中还原性物质的测定

如图 5 所示,本文选择饮料 A、饮料 B、饮料 C、饮料 D、饮料 E 和饮料 F 共 6 种市售饮品,测得吸光度后,分别将其带入 Fe^{2+} 当量和维生素 C 当量标线的回归方程,经换算获得待测饮品母液中还原性物质的 VC 当量。实验结果表明,饮料 E 和饮料 F 这两种人为添加维生素 C 的饮品中所含的 VC 当量相对较大,表明饮品中含有相对较高的还原性物质。

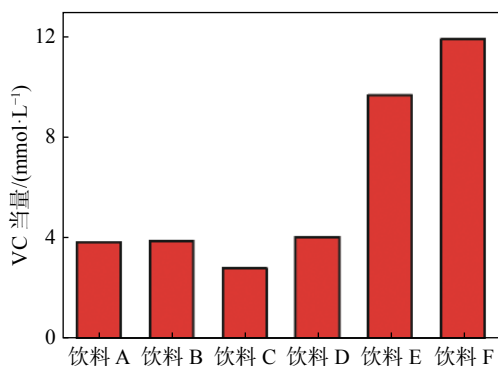
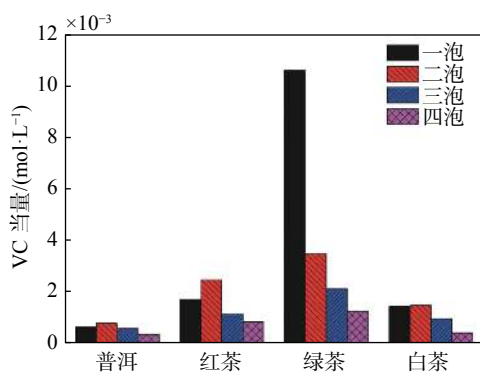


图 5 几种常见市售饮品的 VC 含量

此外, 本文还研究了普洱茶、红茶、绿茶、白茶 4 种茶叶的还原性物质的浸出与浸泡次数的关系, 结果如图 6 所示。由图可知, 绿茶含有的还原性物质最多, 但随着浸泡次数的增加绿茶还原性物质的浓度衰减较快, 普洱茶含有的还原性物质最少。本实验结果可以有效指导人们日常饮茶、泡茶, 提高了学生做实验的兴趣。



实验条件: 1 g 茶叶, 100 mL 热水, 每次浸泡 1 min

图 6 几种常见茶叶的还原性物质含量与浸泡次数关系

4 结束语

本文将饮品中还原性物质测定实验应用在本科实验教学中, 通过本实验可以使学生会综合运用分光光度法、氧化还原反应、配合物理论等各种分析方法和实验技术, 知识点涵盖更全面; 可以使学生掌握酶标仪使用、比色皿使用、移液枪使用、容量瓶使用等各种分析化学实验基本操作技能; 可以使学生具备合理选择实验方法处理实际问题的能力, 开阔学生的科研视野, 培养学生的创新思维和能力, 为学生将来从事科研工作奠定坚实的基础, 满足新时期素质教育的需要。

参考文献

- [1] 丁玉祥. 学生自主创新实验的意义、价值与实践路径[J]. *实验教学与仪器*, 2019, 36(5): 3-6.
- [2] 张立春, 吕弋, 衣晓凤, 等. 在化学综合创新实验教学中引入科学研究的探索[J]. *实验技术与管理*, 2019, 36(12): 191-196.
- [3] 霍冀川, 雷洪, 胡程耀, 等. “趣味化学实验”课程建设与实践[J]. *中国大学教学*, 2013(1): 64-67.
- [4] 李秀红, 李文辉, 任家骏, 等. 新工科背景下“机械设计课程设计”教学改革[J]. *实验科学与技术*, 2018, 16(3): 132-134.
- [5] 付广艳, 李荣广, 张金萍, 等. 基于应用型人才培养的课程体系构建与课程建设[J]. *化工高等教育*, 2019, 36(1): 57-59.
- [6] 冯仁蔚, 李小明, 付玉, 等. “双一流”建设背景下高校本科教育质量保障的新要求[J]. *教育现代化*, 2019, 6(51): 99-103.
- [7] 周晓清, 李宏, 叶安胜. 任务驱动式项目案例教学法在课程教学改革中的探索与实践[J]. *实验科学与技术*, 2018, 16(4): 101-106.
- [8] 李佛生, 汪红, 熊莉, 等. 基于生物实验教学中心的创新创业教育探索[J]. *实验科学与技术*, 2019, 17(4): 125-128.
- [9] GULCIN I. Antioxidant activity of food constituents: an overview[J]. *Archives of Toxicology*, 2012, 86(3): 345-391.
- [10] LÓPEZ-ALARCÓN C, DENICOLA A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 763: 1-10.
- [11] 杨涛, 吴辉辉, 徐青, 等. 抗氧化性能评价ORAC法及最新研究进展[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(7): 352-355.
- [12] BERKER K I, GÜÇLÜ K, TOR İ, et al. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents[J]. *Talanta*, 2007, 72(3): 1157-1165.
- [13] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(3): 247-252.
- [14] SHIVAKUMAR A, YOGENDRA K M. Critical Review on the Analytical Mechanistic Steps in the Evaluation of Antioxidant Activity[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2018, 48(3): 214-236.
- [15] BENZIE I F F, STRAIN J J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.