

熊 俐,曹新志,王凌云,等. Folin - Ciocalteu 法检测菜籽多酚含量的优化研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):255 - 257.

Folin - Ciocalteu 法检测菜籽多酚含量的优化研究

熊 俐,曹新志,王凌云,李 丽,谷良富

(四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000)

摘要:为了建立快速、准确地测定菜籽多酚含量的方法,以单宁酸为标准品,研究了 Folin - Ciocalteu 比色法测定菜籽多酚含量的适宜条件。结果表明,在显色试剂 2.5 mL、饱和 Na_2CO_3 溶液 4 mL、反应温度 40 ℃、反应时间 50 min、比色波长 757 nm 的条件下,菜籽多酚浓度在 2 ~ 20 mg/L 范围内与吸光度呈良好的线性关系;Folin - Ciocalteu 法的稳定性试验、精密度试验、重现性试验、回收率试验的相对标准偏差(RSD)分别为 0.419%、1.295%、2.30%、1.49%,表明该法能够快速、准确地测定菜籽多酚含量。

关键词:菜籽;多酚;Folin - Ciocalteu 比色法;检测条件

中图分类号:TS201.2;O657.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002 - 1302(2014)03 - 0255 - 03

多酚广泛存在于植物体中,是一类复杂的酚类次生代谢产物,具有多元酚结构,对活性氧等自由基有较强的捕捉能力,因此具有很强的抗氧化性和清除自由基的能力^[1]。菜籽中含有 1.5% ~ 3% 的多酚类物质,其多酚含量是其他油料种子中的 10 ~ 30 倍。研究证实,菜籽多酚具有抗肿瘤、降血糖、抑菌、抗氧化、清除自由基等生理功能和生物活性^[2],具有广阔的开发前景。测定多酚的常用方法有高锰酸钾滴定法^[3]、香草醛法^[4]、Folin - 酚法^[2]和铁氰化钾分光光度法^[5]等。其中,高锰酸钾滴定法的滴定终点较难观察,测定灵敏度较低;香草醛法和铁氰化钾分光光度法对测定条件要求严格,稳定性较差,干扰因素较多,易出现沉淀;而 Folin - 酚比色法在测定多酚化合物时能在很大程度上克服以上缺点。Folin - 酚法包括 Folin - Denis 法(F - D 法)和 Folin - Ciocalteu 法(F - C 法)。F - C 法是 F - D 法的改进方法,它在 F - D 法显色剂中加入锂盐,克服了 F - D 法显色剂的不稳定性,较之更为灵敏^[6]。郑仕宏等^[7]、何志勇等^[8]、刘丽香等^[9]的研究结果表明,不同植物中 Folin - Ciocalteu 法比色条件的选择差异较大,适宜的显色剂、碱液含量及比例各不相同,显色时间和温度有很大差别,测定波长也不同。

国内常用 F - D 法测定菜籽及其加工品中的多酚含量,较少见用 F - C 法检测菜籽多酚含量的报道,更没有对其反应条件进行过探索。本试验采用 Folin - Ciocalteu 法测定菜籽多酚的含量,探讨最适显色条件和比色条件,同时对其稳定性、精密度、重现性、回收率等展开研究,以期建立起一种简便、快速、稳定、准确的检测菜籽多酚含量的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料 菜籽购于四川省自贡市灯杆坝农贸市场,用面

条压片机将其碾压破碎成片状,60 ℃干燥 2 ~ 3 h,备用。

1.1.2 药品 乙醇、没食子酸标准品、单宁酸标准品、钨酸钠、钼酸钠、浓磷酸、浓盐酸、硫酸锂、碳酸钠等,均为分析纯。

1.1.3 仪器 UV1000 型紫外 - 可见分光光度计,DK - 98 - 11A 型数显恒温水浴锅,AR1140 型电子分析天平,MT - 12.5C 型面条压片机,DHG - 9070B 型鼓风干燥箱等。

1.2 试验方法

1.2.1 菜籽多酚提取液的制备 参考张晓丽等的研究^[10]来制备菜籽多酚提取液。

1.2.2 Folin - Ciocalteu 法显色剂的配制 在回流装置内加入 50 g 钨酸钠、12.5 g 钼酸钠、350 mL 蒸馏水、25 mL 浓磷酸及 50 mL 浓盐酸,充分混匀,以小火回流 10 h,再加入 75 g 硫酸锂、25 mL 蒸馏水、数滴溴水,然后开口继续沸腾 15 min,至溴水完全挥发为止,冷却后定容 500 mL,过滤,滤液呈绿色,存于棕色瓶中。使用时加入 1 倍体积的蒸馏水,使酸的浓度为 1 mol/L,置于冰箱中保存。

1.2.3 标准品溶液的配制 分别称取 25.0 mg 没食子酸和单宁酸,用 70% 乙醇完全溶解,定容至 25 mL 容量瓶中,配制浓度为 1.0 mg/mL 的没食子酸标液和单宁酸标液。

1.2.4 Folin - Ciocalteu 法检测流程 精确吸取一定量的待测样品,放入 25 mL 容量瓶内,加 10 mL 70% 乙醇,摇匀,加入一定量的显色剂和一定量的饱和 Na_2CO_3 溶液,并用 70% 乙醇定容至 25 mL,在一定温度下避光反应一定时间后,以 70% 乙醇为空白对照,在一定波长下测定吸光度。

1.2.5 Folin - Ciocalteu 法检测条件研究

1.2.5.1 比色波长和标准品的研究 取没食子酸标液、单宁酸标液和菜籽提取液的稀释液各 0.5 mL,分别与 2 mL 显色试剂和 4.5 mL 饱和 Na_2CO_3 溶液混合均匀,用 70% 乙醇定容,室温避光放置 1 h,用紫外 - 可见分光光度计在 200 ~ 900 nm 波长范围内测定吸光度,得到没食子酸、单宁酸和菜籽提取液的吸收光谱,以此确定最适宜的标准物和比色波长。

1.2.5.2 显色时间的研究 取单宁酸标液 0.5 mL,显色试剂与饱和碳酸钠溶液分别为 2.0、4.5 mL,比色波长为 757 nm,35 ℃条件下研究反应时间(10、20、30、40、50、60、70、80 min)对吸光度的影响。

收稿日期:2013 - 07 - 11

基金项目:四川理工学院大学生创新基金(编号: CX20130406)。

作者简介:熊 俐(1976—),女,四川泸县人,硕士,实验师,主要从事食品科学研究。Tel: (0813) 5505922; E - mail: guihuazhen@126.com。

1.2.5.3 反应温度的研究 研究不同反应温度(20、25、30、35、40、45、50 ℃)对吸光度的影响,反应时间为 50 min,其他条件同“1.2.5.2”节所述。

1.2.5.4 饱和 Na_2CO_3 溶液添加量的研究 研究饱和 Na_2CO_3 溶液添加量(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL)对吸光度的影响,反应温度为 40 ℃,其他条件同“1.2.5.3”节所述。

1.2.5.5 Folin - Ciocalteu 显色剂用量的研究 研究显色剂用量(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL)对吸光度的影响,饱和 Na_2CO_3 溶液添加量为 4 mL,其他条件同“1.2.5.4”节所述。

1.2.6 标准曲线的绘制 精确吸取 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 mL 单宁酸标准溶液,按照前期试验确定的适宜条件进行显色反应,检测吸光度。以吸光度为纵坐标(y)、单宁酸浓度(mg/L)为横坐标(x)绘制标准曲线。

1.2.7 Folin - Ciocalteu 比色方法评价

1.2.7.1 稳定性试验 取菜籽提取液进行显色反应,反应完全(50 min)后在 30 ℃ 下避光放置 0、15、30、45、60、90、120 min 后测定吸光度,根据吸光度的变化评价该比色法在一段时间内的稳定性。

1.2.7.2 精密度试验 从同一份菜籽提取液中取 6 份样本进行 Folin - Ciocalteu 比色法检测,计算各样本中的多酚含量(mg/g),以分析结果的相对标准偏差评价该比色方法的精密度。

1.2.7.3 重现性试验 从同一份菜籽原料中取 5 份样品,分别进行多酚提取,然后利用 Folin - Ciocalteu 比色法检测各提取液的多酚含量(mg/g),并计算结果的相对标准偏差,以评价该比色方法的重现性。

1.2.7.4 加标回收试验 往菜籽提取液中加入不同量的单宁酸,分别测定其多酚含量,并计算其回收率和相对标准偏差,以评价该比色方法的准确度和可靠性。

2 结果与分析

2.1 Folin - Ciocalteu 法检测条件研究

2.1.1 比色波长和标准品 由图 1 可知,没食子酸、单宁酸和菜籽提取液与 Folin - Ciocalteu 试剂反应显色后,均在 730 ~ 770 nm 范围内有一明显吸收峰。其中,没食子酸在 736 nm 处吸收最强,单宁酸在 762 nm 处吸收最强,菜籽提取液在 757 nm 处吸收最强。因此本试验以单宁酸为标准品,以 757 nm 为菜籽多酚比色测定的波长。

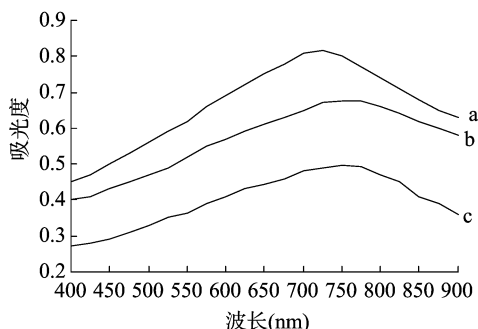


图1 没食子酸(a)、单宁酸(b)和菜籽提取液(c)的吸收光谱

2.1.2 显色时间 由图 2 可知,10 ~ 40 min 时,吸光度随反应时间的延长而快速增加,50 min 后显色反应完全并趋于稳定,因此确定 50 min 为显色反应时间。

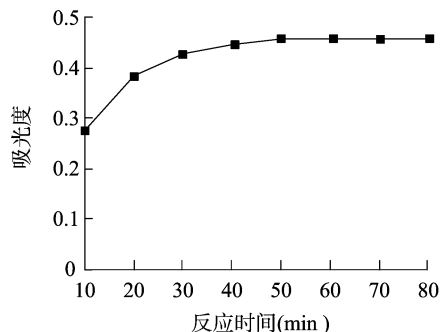


图2 显色时间对吸光度的影响

2.1.3 反应温度 由图 3 可知,反应温度在 20 ~ 35 ℃ 时,吸光度快速增加,40 ℃ 时吸光度达到最高,为 0.476,之后吸光度随温度升高而下降,因此确定显色反应温度为 40 ℃。研究结果说明反应温度能影响比色效果,温度过低或过高均不利于多酚显色。

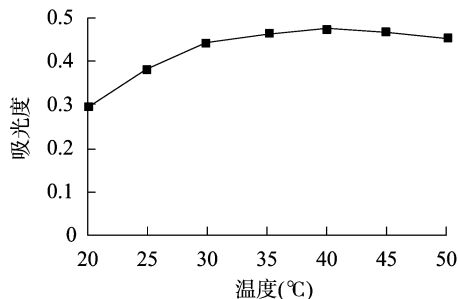


图3 反应温度对吸光度的影响

2.1.4 饱和 Na_2CO_3 溶液添加量 由图 4 可知,饱和 Na_2CO_3 溶液添加量在 1 ~ 4 mL 时,随着添加量增加,吸光度逐渐增加,4 mL 时达到最大值,为 0.496,之后吸光度随 Na_2CO_3 溶液添加量的增加而降低,因此确定显色反应体系中加入饱和 Na_2CO_3 溶液的体积为 4 mL。研究结果说明 Folin - Ciocalteu 显色剂与酚类化合物的反应必须在碱性条件下才可以显色,显色反应对 Na_2CO_3 用量有相当的依赖性。

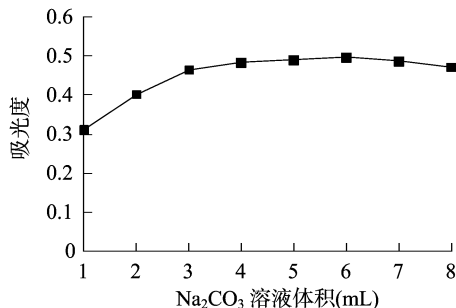


图4 Na_2CO_3 溶液添加量对吸光度的影响

2.1.5 Folin - Ciocalteu 显色剂用量 由图 5 可知,当 Folin - Ciocalteu 试剂添加量在 0.5 ~ 2.5 mL 时,随着显色剂用量增加,吸光度逐渐增加至 0.502,之后吸光度趋于稳定,因此确定 Folin - Ciocalteu 比色法显色剂用量为 2.5 mL。

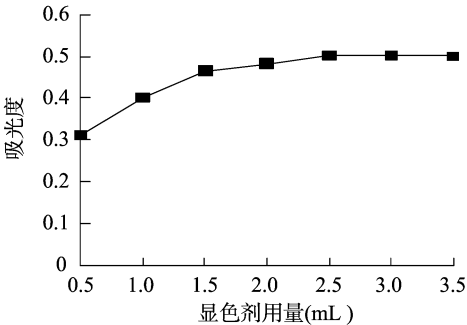


图5 显色剂用量对吸光度的影响

2.2 标准曲线的绘制

以单宁酸为标准品制作标准曲线(图6),回归方程为 $y=0.0814x+0.0311$, x 表示单宁酸浓度(mg/L), y 表示吸光度,相关系数 r^2 为 0.9979,表明单宁酸质量浓度在 2~20 mg/L 范围内与其吸光度呈现良好的线性关系,符合朗伯比尔定律,该方程可用于多酚的定量测定。

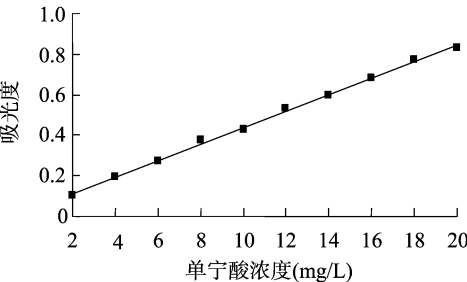


图6 单宁酸标准曲线

2.3 Folin-Ciocalteu 比色方法评价

2.3.1 稳定性试验 对 Folin-Ciocalteu 法测定菜籽多酚进行稳定性试验,显色反应体系水浴 50 min 后,避光放置 0、15、30、45、60、90、120 min,测定的吸光度分别为 0.495、0.495、0.493、0.493、0.492、0.492、0.489。研究发现,随着时间延长,吸光度有下降趋势,但幅度不大,其相对偏差(RSD)为 0.419%,表明 120 min 内溶液稳定性良好。

2.3.2 精密度试验 从同一份菜籽提取液中取 6 份样本进行 Folin-Ciocalteu 比色法检测,计算各样本中的多酚含量分别为 22.78、23.56、22.99、22.76、23.2、23.0 mg/g,其相对偏差(RSD)为 1.295%,表明该方法具有较高的精密度,能满足菜籽多酚样品分析的要求。

2.3.3 重现性试验 从同一份菜籽原料中取 5 份样品,分别提取其多酚,然后利用 Folin-Ciocalteu 比色法检测各提取液的多酚含量,分别为 23.20、23.56、22.78、23.31、22.45 mg/g,其相对偏差(RSD)为 2.30%,表明该方法重现性较好。

2.3.4 加标回收试验 由表 1 可知,6 次加标回收试验的最低回收率为 97.7%,最高回收率为 102.1%,平均回收率为 99.55%,回收率相对标准偏差(RSD)为 1.49%,表明本研究所建立的 Folin-Ciocalteu 检测法准确可靠,完全可用于菜籽多酚含量的测定。

表 1 菜籽多酚提取加标回收率试验结果

加标量 (mg/L)	总酚检测含量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
0	23.048	100.0	
1	24.044	99.6	
2	25.002	97.7	
3	26.110	102.1	
4	26.990	98.6	
5	28.013	99.3	
平均		99.55	1.49

3 结论

本研究采用 Folin-Ciocalteu 比色法测菜籽多酚含量,以单宁酸为标准品,确定最佳的显色条件为 Folin-Ciocalteu 显色剂 2.5 mL、饱和 Na_2CO_3 溶液 4 mL、反应温度 40℃、反应时间 50 min、比色测定波长 757 nm。标准曲线的线性回归方程为 $y=0.0814x+0.0311$,相关系数 r^2 为 0.9979,且单宁酸质量浓度在 2~20 mg/L 范围内与其吸光度呈现良好的线性关系。该法的稳定性试验、精密度试验、重现性试验、回收率试验的相对标准偏差(RSD)分别为 0.419%、1.295%、2.30%、1.49%,表明本研究建立起的 Folin-Ciocalteu 比色法能快速、准确地测定菜籽多酚含量。

参考文献:

[1]张清安,范学辉.多酚类物质抗氧化活性评价方法研究进展[J].食品与发酵工业,2011,37(11):169-172.

[2]陈萌,杨涓,刘昌盛,等.菜籽多酚的制备、检测及其在加工过程中的变化研究进展[J].中国油料作物学报,2013,35(1):102-103.

[3]王文杰.高锰酸钾滴定法测定茶多酚有关用剂的特性研究[J].福建茶叶,2002(1):15-17.

[4]李春阳,许时婴,王璋.低浓度香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J].食品工业科技,2004(6):128-130.

[5]肖纯,张凯农,阳长敏,等.铁氰化钾分光光度法测定单宁的适用性[J].华北农学报,1996,11(2):127-130.

[6]Singleton V L,Orthofer R,Lamuela-Raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Methods in Enzymology,1999,299:152-178.

[7]郑仕宏,张海德,何双,等. Folin-Ciocalteu 法测定槟榔中多酚含量的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2009,29(6):165-169.

[8]何志勇,夏文水. Folin-Ciocalteu 比色法测定橄榄中多酚含量的研究[J]. 林产化学与工业,2006,26(4):15-18.

[9]刘丽香,Tangy L,梁兴飞,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定苦丁茶中多酚含量[J]. 茶叶科学,2008,28(2):101-106.

[10]张晓丽,曾晓雄,李春阳. 菜籽多酚提取工艺的优化[J]. 食品与机械,2012,28(2):142-146.