

橄榄多酚含量测定方法的比较

谢倩, 王威, 陈清西*

(福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002)

摘要: 采用酒石酸铁法、福林酚试剂法和紫外分光光度法3种方法测定橄榄多酚类物质含量。结果表明: 3种方法检出限及定量限的顺序为: 紫外分光光度法<福林酚试剂法<酒石酸铁法, 且3者存在显著性差异($P<0.05$)。3种方法回收率顺序为: 酒石酸铁法>福林酚试剂法>紫外分光光度法, 但差异不显著($P>0.05$), 这3种方法都具有良好的重复性。利用福林酚试剂法与紫外分光光度法测得的多酚含量显著高于酒石酸铁法($P<0.01$), 其中福林酚试剂法测得的多酚含量略高于紫外分光光度法, 但差异不显著($P>0.05$)。同时, 各方法测得的多酚含量存在良好的线性关系。实验证明紫外分光光度法灵敏度高、重复性好, 且操作简单、快速、经济, 是一种较理想的测定橄榄多酚的方法。

关键词: 橄榄; 多酚; 酒石酸铁法; 福林酚试剂法; 紫外分光光度法

Comparative Study on Three Different Methods for the Determination of Total Phenolics in Chinese Olive

XIE Qian, WANG Wei, CHEN Qing-xi*

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Three analytical methods (ferrous tartrate colorimetry, Folin-phenol reagent method and UV spectrophotometry) were compared for the determination of total phenolics in Chinese olive in this study. The results showed the three methods followed the decreasing order: UV spectrophotometry < Folin-phenol reagent method < ferrous tartrate colorimetry by detection limit and quantitation limit with a significant difference among them ($P < 0.05$), and ferrous tartrate colorimetry > Folin-phenol reagent method > UV spectrophotometry by recovery with the difference being not significant. All these three methods had good repeatability. The polyphenol content determined by Folin-phenol reagent method and UV spectrophotometry was significantly higher than that determined by ferrous tartrate colorimetry ($P < 0.01$), and the polyphenol content determined by Folin-phenol reagent method was slightly higher than that determined by UV spectrophotometry, with the difference being not significant ($P > 0.05$). At the same time, there was a good linear relationship of total polyphenol contents determined by two of them. In comparison two other methods, UV spectrophotometry proved more suitable for the determination of total phenolics in Chinese olive, thanks to its high sensitivity, good repeatability, simplicity, rapidity, accuracy and economy.

Key words: Chinese olive; phenolics; ferrous tartrate colorimetry; Folin-phenol reagent method; UV spectrophotometry

中图分类号: S667.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 08-0204-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201408040

酚类化合物是含有一个或多个羟基、拥有一个共同芳香环的化合物^[1]。多酚类物质是橄榄中的重要功效成分, 橄榄的许多药理作用及苦涩味都与其有关, 具有抗癌、抗衰老、抗氧化、抗辐射、抑菌等功能^[2-9]。近年来, 橄榄多酚已得到越来越多的研究。目前, 测定多酚的方法主要有酒石酸铁法、福林酚试剂法、紫外分光光度法等^[10-11], 如利用酒石酸铁法测定橄榄^[2]、茶^[12]、枣核^[13]中植物多酚的含量;

利用福林酚试剂法测定橄榄^[14]、桃^[15]、茶^[16]、铁皮石斛^[16]、苹果^[17]中植物多酚的含量; 用紫外分光光度法测定冬枣^[18]中植物多酚的含量。这3种方法由于反应原理不同, 所测得的多酚含量有所差异, 但目前还未见有关这3种方法测定多酚含量的比较研究。因此, 本实验以橄榄为材料, 运用这3种方法分析其多酚含量, 比较3种方法测定结果的差异性, 为多酚含量测定提供理论指导和技术参考。

收稿日期: 2013-07-04

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2012D085); “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD07B01); 福州市科技计划项目(2009-N-55)

作者简介: 谢倩(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为果树生理与生态。E-mail: xieq0416@163.com

*通信作者: 陈清西(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为园艺植物栽培生理。E-mail: cqx0246@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

橄榄于2012年10月20日采于福建省闽侯县上岐,露天栽培,6个品种(系)作为供试材料,分别为‘马坑22’、‘檀头23’、‘唐举3号’、‘本地实生’、‘马坑2代’、‘马坑16’。

硫酸亚铁、酒石酸钾钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、碳酸钠、福林酚、乙醇、石油醚(均为分析纯)、没食子酸 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

BS214D电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; Allegra™ 64型高速冷冻离心机 美国Beckman Coulter公司; U-1810紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; FW177中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; KQ-600DE型数控超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司; LGJ-S24型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 多酚提取

选择无畸形、无病虫害的果实,以蒸馏水冲洗干净并去核,真空干燥,干燥果肉用多功能粉碎机研磨成粉末,过40目筛,于-40℃保存备用。选择‘马坑22’作为多酚不同方法的比较研究。

参照林玉芳^[2]的超声辅助法。称取0.5 g橄榄粉末,加入石油醚(30~60℃)脱脂、去除色素,然后加入40%乙醇,料液比1:30(g/mL),并搅拌,超声处理20 min,超声功率300 W,取上清液,提取2次,合并2次提取液连同残渣倒入离心管,常温条件下10 000 r/min离心10 min,取上清液待测。

1.3.2 多酚含量测定

没食子酸溶液配制:精确称取没食子酸500 mg,溶于双蒸水,定容至100 mL作为母液,再分别吸取0.5、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mL于25 mL容量瓶中,用双蒸水定容,制备成质量浓度分别为0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL的没食子酸标准液。

酒石酸铁法测定多酚含量:参照林玉芳^[2]的方法进行测定。准确吸取160 μL没食子酸标准液,加入酒石酸铁800 μL,加磷酸缓冲液(pH 7.5)至4 mL,用双蒸水作参比,在540 nm波长处测其吸光度,绘制标准曲线。测定样品的吸光度并计算其多酚含量,重复3次。

福林酚试剂法测定多酚含量:取上述没食子酸标准溶液1 mL于10 mL容量瓶中,定容后制备成质量浓度分别为0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL的没食子酸标准液。参照何志勇等^[14]的方法进行测定。准确吸取1 mL没食子酸标准液,加入到25 mL容量瓶中,加10 mL

蒸馏水摇匀后,再加入1.5 mL福林酚试剂,充分摇匀30 s,静置不超过8 min,加入6 mL 10% Na₂CO₃,混匀后加水定容,摇匀,然后在30℃避光反应2 h,用双蒸水作参比,于765 nm波长处测其吸光度,绘制标准曲线。将橄榄多酚提取液稀释20倍后,测定其吸光度并计算多酚含量,重复3次。

紫外分光光度法测定多酚含量:分别各取0.1 mL没食子酸标准溶液于10 mL容量瓶中,定容后制备成质量浓度分别为0.001、0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 mg/mL的没食子酸标准液,在190~450 nm波长处进行光谱扫描,重复5次,选取246 nm波长处的吸光度,绘制标准曲线。将橄榄多酚提取液稀释100倍,测定其吸光度并计算多酚含量,重复3次。

1.3.3 方法的检出限和定量限

精确称取0.5 g橄榄样品12份,参照1.3.1节提取多酚,参照1.3.2节测定多酚含量。按式(1)、(2)计算检出限CL与定量限CD^[19-20]:

$$CL=ks/m \quad (1)$$

$$CD=k's/m' \quad (2)$$

式中: k 为置信因子,取值3; s 为空白样品吸光度的标准偏差; m 、 m' 为标准曲线斜率; k' 为置信因子,取值10。

1.3.4 方法的精密度和加标回收率

准确称取4份相同橄榄样品,1份作基准,参照1.3.1节提取多酚,参照1.3.2节测定多酚含量。3份加入已知量的标样,平行测定6次。

1.3.5 橄榄多酚含量计算

$$\text{橄榄多酚含量}/\% = \frac{C \times V_1 \times N}{W \times 1000} \times 100 \quad (3)$$

式中: C 为提取液中多酚含量/(mg/mL); V_1 为提取液体积/mL; N 为稀释倍数; m 为样品质量/g。

1.4 统计分析

实验数据采用Excel 2007与SPSS 13.0软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

3种测定方法的标准曲线见表1。

表1 3种多酚测定方法标准曲线

Table 1 Calibration curves for the determination of total phenolics with three different methods

方法	线性范围/(mg/mL)	标准曲线	相关系数(r)
酒石酸铁法	0.10~2.5	$y=0.708 6x+0.001 59$	0.997 5
福林酚试剂法	0.01~0.25	$y=4.384 2x+0.078 8$	0.998 0
紫外分光光度法	0.001~0.025	$y=32.31 0x+0.031 2$	0.996 5

2.2 检出限和定量限

表2 检出限和定量限

Table 2 Detection limits and quantitation limits

方法	s	检出限/(mg/mL)	定量限/(mg/mL)
酒石酸铁法	0.003 5	0.014 82	0.049 39
福林酚试剂法	0.000 73	0.000 50	0.001 67
紫外分光光度法	0.000 82	0.000 08	0.000 25

由表2可知, 3种方法检出限及定量限顺序为: 紫外分光光度法<福林酚试剂法<酒石酸铁法, 且3者存在显著性差异($P<0.05$)。说明紫外分光光度法检测橄榄多酚的灵敏度较高, 其次为福林酚试剂法、酒石酸铁法。

2.3 加标回收率和精密度

表3 加标回收和精密度试验结果 ($n=6$)Table 3 Results of spiked recovery and precision tests ($n=6$)

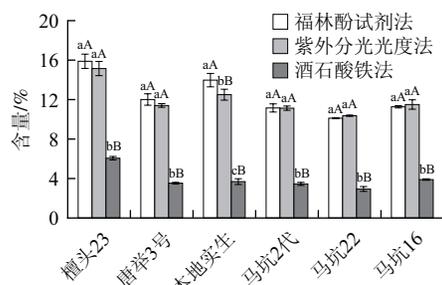
方法	重复	加标量/(mg/mL)	测出量/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	平均相对标准差/%
酒石酸铁法	1	0.500	0.461 5	92.30	94.30 ^a	3.64
	2	0.500	0.487 2	97.43		
	3	0.500	0.474 0	94.80		
福林酚试剂法	1	0.025	0.022 8	91.33	92.00 ^a	5.34
	2	0.025	0.023 8	95.33		
	3	0.025	0.022 3	89.33		
紫外分光光度法	1	0.005	0.004 7	94.67	90.89 ^a	1.61
	2	0.005	0.004 6	91.00		
	3	0.005	0.004 4	87.00		

注: 相同肩标字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平下差异不显著。

由表3可知, 酒石酸铁法的回收率在92.30%~97.43%之间, 平均回收率为94.30%; 福林酚试剂法的回收率在89.33%~95.33%之间, 平均回收率为92.00%; 紫外分光光度法的回收率在87.00%~94.67%之间, 平均回收率为90.89%。3种方法回收率: 酒石酸铁法>福林酚试剂法>紫外分光光度法, 但差异不显著($P>0.05$)。

平均相对偏差分别为3.64% (酒石酸铁法)、5.34% (福林酚试剂法)、1.61% (紫外分光光度法)。紫外分光光度法的重复性较好, 其次为酒石酸铁法、福林酚试剂法。

2.4 不同方法测定橄榄多酚含量



小写字母不同表示0.05水平下差异显著;
大写字母不同表示0.01水平下差异显著。

图1 不同方法测定橄榄多酚含量 ($n=3$)Fig.1 Determination of phenolics content in Chinese olive with different methods ($n=3$)

由图1可知, 福林酚试剂法与紫外分光光度法的测定结果差异不显著($P>0.05$), 相较于福林酚试剂法, 紫外分光光度法测得的多酚含量平均下降0.360%。酒石酸铁法测得的含量明显低于福林酚试剂法与紫外分光光度法, 分别平均下降了8.446%、8.087%, 酒石酸铁法与福林酚试剂法及紫外分光光度法测得的多酚含量存在极显著的差异($P<0.01$)。对不同橄榄品种(品系)用这3种方法测得的多酚含量进行相关回归分析, 发现具有一定的相关回归关系, 说明3种测定方法可行。

2.5 线性回归分析结果

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方法	来源	平方和	自由度	均方和	F	P
福林酚试剂法与紫外分光光度法	回归分析	69.86	1	69.860	148.433	0.000
	残差	7.530	16	0.471		
	总计	77.39	17			
福林酚试剂法与酒石酸铁法	回归分析	53.871	1	53.871	36.649	0.000
	残差	23.519	16	1.470		
	总计	77.390	17			
紫外分光光度法与酒石酸铁法	回归分析	41.889	1	41.889	89.930	0.000
	残差	7.453	16	0.466		
	总计	49.342	17			

利用方差分析表做回归系数的显著性检验, 由表4可知, P 值均小于0.05%, 可认为回归系数不为零, 3个回归方程式均有意义。

表5 回归系数分析

Table 5 Regression coefficient analysis

方法	来源	非标准化系数		标准化回归系数	t	P
		回归系数	标准误差			
福林酚试剂法与紫外分光光度法	常数	-1.884	1.184		-1.592	0.131
	紫外分光光度法	1.190	0.098	0.950	12.183	0.000
福林酚试剂法与酒石酸铁法	常数	5.810	1.126		5.162	0.000
	酒石酸铁法	1.677	0.277	0.834	6.054	0.000
紫外分光光度法与酒石酸铁法	常数	6.193	0.634		9.775	0.000
	酒石酸铁法	1.479	0.156	0.921	9.483	0.000

由表5可知, 福林酚试剂法与紫外分光光度法回归系数的 P 值为0.000, 因此认为该回归系数有显著意义。回归方程为: y (福林酚试剂法) = $-1.884 + 1.190x$ (紫外分光光度法), 回归系数0.950。

福林酚试剂法与酒石酸铁法回归系数的 P 值为0.000, 因此认为该回归系数显著有意义。回归方程为: y (福林酚试剂法) = $5.810 + 1.677x$ (酒石酸铁法), 回归系数0.834, 方程的拟合性较差。

紫外分光光度法与酒石酸铁法回归系数 P 值为0.000, 因此认为该回归系数显著有意义。回归方程为: y (紫外分光光度法) = $6.193 + 1.479x$ (酒石酸铁法), 回归系数0.921。

综上所述,福林酚试剂法与紫外分光光度计法、紫外分光光度计法与酒石酸铁法均存在良好的线性关系。虽然福林酚试剂法与酒石酸铁法的回归方程及回归系数有显著意义,但其回归系数较低、方程的拟合性较差。

3 讨论

实验发现3种方法的回收率中,酒石酸铁法>福林酚试剂法>紫外分光光度法,但不存在显著性差异($P>0.05$),其中紫外分光光度法较其他2种方法的灵敏度更高、重复性较好,酒石酸铁法的回收率、重复性均比福林酚试剂好,但福林酚试剂法的灵敏度比酒石酸铁法高。因此认为,紫外分光光度法是3种方法中最佳方法。

采用3种方法测定6个橄榄品种(系)多酚含量,结果表明3种方法测定的多酚含量存在差异,可能是以下原因造成的:1)酒石酸铁法是测多酚类物质的总含量,是利用 Fe^{2+} 与多酚类物质络合形成蓝色物质,在540 nm波长处有最大吸收峰^[21];福林酚试剂法是利用酚羟基被高价钨氧化后形成蓝色物质,在765 nm波长处有最大吸收峰^[21]的原理进行测定;紫外分光光度法是根据酚类物质在紫外区有吸收光谱的原理,直接通过光谱扫描测定多酚含量^[22]。其中,紫外分光光度法测定的不仅是所有酚类物质的含量,还包括带有酚羟基基团的物质^[19];福林酚试剂法测得的除了多酚类物质,也包括含有酚羟基基团的物质及具有还原能力的抗坏血酸^[23];此外,由于橄榄多酚类化合物组成的特异性,因此福林酚试剂法测得的多酚含量略高于紫外分光光度计法,实验结果也符合上述关系。酒石酸铁法测得的仅是多酚类物质,且不同多酚类化合物对酒石酸铁的呈色能力不同^[24],根据张妙芬^[25]报道,酒石酸铁与酯型儿茶素呈色较强,与非酯型儿茶素呈色较弱。橄榄中多酚类化合物多样且不同多酚化合物间含量差异较大,因此测得的结果会有偏差,使酒石酸法测得的结果低于其他2种方法,实验结果符合上述关系。2)可能与不同测定方法所对应的最佳提取工艺条件有关。本研究中3种测定方法均采用相同的提取方法,但李伟等^[26]对余甘子多酚类物质的提取工艺及测定方法比较中指出,不同测定方法的最佳提取工艺不同,其测定结果也有所不同。

目前,福林酚试剂法、紫外分光光度法是常用的多酚含量测定方法,酒石酸铁法则在茶多酚测定上应用的较多。本实验比较了这3种方法,认为紫外分光光度法为较佳方法,该方法灵敏度更高、重复性较好,且操作简单、快速、经济,是一种较理想的测橄榄多酚含量的方法。

参考文献:

- [1] 张上隆,陈昆松.果实品质形成与调控的分子生理[M].北京:中国农业出版社,2007:1-21;208-211.
- [2] 林玉芳.福建橄榄(*Canarium album* (Lour.) Raeusch.)若干功能成分和品质相关指标的研究[D].福州:福建农林大学,2012:4-5;7-8;26.
- [3] 张亮亮,杨志伟,林益明.橄榄多酚抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2008,29(4):57-59.
- [4] SHON M Y, CHOI S D, KAHNG G G, et al. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(4): 659-666.
- [5] 郭新竹,宁正祥.天然酚类化合物及其保健作用[J].食品工业,2002,23(3):28-29.
- [6] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用[M].北京:学苑出版社,1997:350.
- [7] 常强,苏明华,陈清西.橄榄化学成分与药理活性研究进展[J].热带作物学报,2013,34(8):1610-1616.
- [8] YANG D P, KONG D X, ZHANG H Y. Multiple pharmacological effects of olive oil phenols[J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1269-1271.
- [9] JEMAI H, BOUAZIZ M, FKI I, et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves[J]. Chemico-Biological Interactions, 2008, 176(2): 88-98.
- [10] 吴晓青,陈丹,邱红鑫,等.芙蓉李中总多酚含量测定方法的优选[J].中国中医药科技,2011,18(2):131-133.
- [11] 何莎莉,王钊. Folin-Ciocalteu 比色法测定保健品中多酚总量[J].分析化学,2009,37(增刊1):385.
- [12] 王丽珠,吴棣.酒石酸亚铁分光光度法测定茶多酚[J].光谱实验室,1997,14(3):52-54.
- [13] 郝会芳,王艳辉,苗笑阳,等.枣核中多酚物质提取条件的初步研究[J].华北农学报,2008,22(增刊2):48-52.
- [14] 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.
- [15] 严娟,蔡志翔,张斌斌,等.桃果肉总酚提取和测定方法的研究[J].江苏农业学报,2013,29(3):642-647.
- [16] 游见明,曹新志.福林酚法测定茶树中茶多酚的分布水平[J].湖北农业科学,2013,52(10):2417-2419.
- [17] 王皎,高颖,赵艳敏,等.测定不同品种苹果果皮和果肉中总多酚的含量[J].食品研究与开发,2013,34(20):87-89.
- [18] YAN J, LI J, ZHAO H, et al. Effects of oligochitosan on postharvest Alternaria rot, storage quality, and defense responses in Chinese jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) fruit[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(5): 783-788.
- [19] 卜彦花,周娜娜,王春悦,等.福林酚试剂法和紫外分光光度法测定冬枣多酚含量的比较研究[J].中国农学通报,2012,28(1):212-217.
- [20] 田强兵.分析化学中检出限和测定下限的探讨[J].化学分析计量,2007,16(3):72-73.
- [21] 黄皓,涂云飞,孙艳娟.两种方法测定茶叶中茶多酚含量的比较[J].中国茶叶加工,2009,29(2):43-44.
- [22] 张丽莹.紫外分光光度法测定水中酚[J].光谱实验室,2006,23(4):890-892.
- [23] ROBBINS R J, BEAN S R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1038(1): 97-105.
- [24] 陈惠衡,施玲,刘芳,等.酒石酸铁比色法和 Folin-Denis 法测定茶多酚的比较[J].中华预防医学杂志,2009,42(4):272-274.
- [25] 张妙芬.茶叶中茶多酚含量测定方法的研究[J].化学工程与装备,2012,41(5):152-154.
- [26] 李伟,程超,莫开菊,等.零余子多酚类物质的提取工艺及测定方法比较[J].食品科学,2007,28(8):152-156.