

Folin-Ciocalteus 法测定槟榔中多酚含量的研究

郑仕宏¹, 张海德², 何双¹, 周文化¹, 李忠海¹

(1 中南林业科技大学 食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 2 海南大学食品学院, 海南 儋州 571737)

摘 要: 采用Folin-Ciocalteu 比色法研究了槟榔多酚的定量测定方法, 并测定新鲜槟榔、槟榔烟果、槟榔籽中多酚含量。结果表明: 槟榔多酚提取液在加入Folin-Ciocalteus 显色剂2.0 mL、10% Na₂CO₃ 溶液 10 mL, 反应时间150 min、温度40℃的条件下进行反应, 并于730 nm处测定其吸光值, 多酚质量浓度在0~2.8 mg/L 范围内与吸光值有良好的线性关系。根据拟合的线性回归方程进行槟榔多酚的定量测定, 新鲜槟榔、槟榔烟果、槟榔籽中多酚含量分别为15.47±0.08 g/100 g、7.23±0.06 g/100 g、5.27±0.05 g/100 g。

关键词: 食品工程; 食品化学; 槟榔; 多酚; 比色法

中图分类号: TS287

文献标志码: A

Determination of Polyphenol Content in *Areca catechu* By Using Folin-Ciocalteu Colormetry

ZHENG Shi-hong¹, ZHANG Hai-de², HE Shuang¹, ZHOU Wen-hua¹, LI Zhong-hai¹

(1. School of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China;

2. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Danzhou 571737, Hainan, China)

Abstract: A quantitative determination method of polyphenol in *Areca catechu* was studied by using Folin-Ciocalteu colorimetry, and polyphenol content in fresh betel nuts, smoked betel nut, betel nut seed were determined. The results show that under the conditions of Folin-Ciocalteu reagent of 2.0 mL, 10% Na₂CO₃ solution 10 mL, reaction continue time of 150 min at 40℃, and determining absorption value at 730 nm, the mass concentrations of *Areca catechu* polyphenol in the interval of 0~28 mg·L⁻¹ were linearly related to the absorption values of *Areca catechu* polyphenol extract. According to the fitted linear regression equation, the quantitative determination of *Areca catechu* polyphenol was made, and polyphenol content of fresh betel nuts, smoked betel nut, betel nut seed were (15.47±0.08) g/100 g, (7.23±0.06) g/100 g, (5.27±0.05) g/100 g, respectively.

Key words: food engineering; food chemistry; *Areca catechu*; polyphenol; colorimetry

槟榔是棕榈科Palmae 植物槟榔 *Areca catechu* Linn. 的干燥成熟种子^[1]。我国海南、台湾是槟榔主要的种植区, 广东、广西、云南、福建也有少量种植, 槟榔种植业是我国热带、亚热带地区仅次于橡胶的第二大产业^[2]。槟榔全身是宝, 是世界三大口腔嗜好之一(香烟、口香糖、槟榔), 全世界约有6亿人食用槟榔嚼块^[3]。目前, 海南槟榔99%以上是以鲜果或干果供应湖南槟榔加工企业加工槟榔嚼块^[4]。近年来, 国内外有关槟榔中功能成分的研究较多, 主要集中在槟榔碱等方面的研究, 但对酚类物质的研究比较少。目前已从槟榔中检测出了缩合单宁、水解单宁、非单宁黄烷和简单多酚物质^[5], 这些化合物具有抗氧化、清除自由基、抗透明质酸等活性^[6]。国外测定了槟榔中总酚的含量, 发现槟榔的不同部位和不同加工产品的槟榔中总酚含量差异较大^[7]。

测定多酚的常用方法有高锰酸钾滴定法、香草醛法、Folin-酚法(包括Folin-Denis 法和Folin-Ciocalteus 法)和铁氰化钾分光光度法(PB 法)等^[8-14]。其中, 高锰酸钾滴定法, 滴定终点较难观察, 测定灵敏度较低^[9]。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^[11, 13, 14]。Folin-酚法灵

收稿日期: 2009-04-09

基金项目: 国家科技支撑计划(2007BAD76B03)。

作者简介: 郑仕宏(1963-), 女, 湖南安乡人, 副教授, 主要从事农产品贮藏保鲜、食品加工研究。

灵敏度较高,简便易行.国内常用Folin-Denis法测定植物及其加工品中的多酚含量,如红枣^[16]等,由于槟榔多酚多集中在槟榔果仁中,质地坚硬且主要为缩合鞣质,与槟榔碱结合存在.本研究采用Folin-Ciocalteus法对椰鲜果、槟榔烟果和槟榔籽中的酚类化合物进行了定量测定,Folin-Ciocalteus法是Folin-Denis法的改进方法,它是在Folin-Denis法显色剂中加入锂盐,克服了Folin-Denis法显色剂的不稳定性,较之更为灵敏^[15].采用Folin-Ciocalteus法测定槟榔在加工过程中酚的变化简便易行,显色灵敏、范围宽且稳定,具有很好的精密度和准确度,适合槟榔中多酚的测定.

1 材料与方法

1.1 实验材料、仪器与试剂

材料:新鲜槟榔果实、槟榔烟果、槟榔果核,由湘潭槟榔厂提供,产地海南.

仪器:UV-2100分光光度计,上海分析仪器总厂.

试剂:没食子酸标准品,中国药品生物制品检定所;钨酸钠、钼酸钠、浓磷酸、浓盐酸、硫酸锂均为分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 Folin-Ciocalteu 显色剂的配制

按参考文献[8]的方法,在1 000 mL的磨口回流装置内加入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,使得溴水完全挥发为止,冷却后定容500 mL,过滤,滤液呈绿色,置于棕色试剂瓶中保存.使用时加入1倍体积的蒸馏水,使酸的浓度为1 mol/L,此液为应用液,置于冰箱中可以长期保存.

1.2.2 槟榔多酚提取液制备及标准品溶液配制

将槟榔鲜果、槟榔烟果、槟榔果核在45℃烘干,粉碎并过60目筛.将8 g粉碎的槟榔样品粉末放置于伟林氏搅切器中,用30 mL 80%的丙酮在25℃避光的条件下提取1 h,共提取3次,合并三次提取液并用80%的丙酮定容到100 mL^[9].

精确称取0.140 g的干燥没食子酸,用80%的丙酮溶解,定容至1 000 mL的容量瓶中,配成140 mg/L的标准溶液^[10].

1.2.3 测定波长的选择

取槟榔酚提取液和没食子酸溶液各1 mL,用80%的丙酮稀释至适当浓度,分别与各比色试剂混合均匀并用80%的丙酮定容至25 mL,室温避光放置一段时间后,以空白为对照,用分光光度计在200~900 nm波长范围内测定吸光值,绘制呈色化合物的吸收曲线,以选择测定波长^[11].

1.2.4 显色时间和温度的确定^[12]

取没食子酸标准溶液0.5 mL,先加入1 mL Folin-Ciocalteu显色剂,混匀后分别加入10 mL的10% Na_2CO_3 溶液,并定容至25 mL,分别放置在20、25、30、35、40、45、50℃水浴中,避光反应120 min后测吸光值,测定在不同温度下显色反应后溶液的吸光值,以考察反应温度对比色效果的影响.

取没食子酸标准溶液0.5 mL,先加入1 mL Folin-Ciocalteu显色剂,混匀后分别加入10 mL的10% Na_2CO_3 溶液,并定容至25 mL,测定其分别反应10、30、60、90、120、150、180、240 min后测定其吸光值,以测定反应时间对比色效果的影响,确定比色体系显色反应完全所需要的时间.

1.2.5 比色体系中各试剂用量的确定^[13]

取没食子酸标准溶液0.5 mL,分别加入0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL Folin-Ciocalteu显色剂,混匀后分别加入10 mL 10% Na_2CO_3 溶液,并定容至25 mL,显色后测定其吸光值,以确定Folin-Ciocalteu显色剂的用量.

10% Na_2CO_3 溶液含量的影响:取没食子酸标准溶液0.5 mL,先加入Folin-Ciocalteu显色剂,混匀后分别加入1、2、4、6、8、10、12 mL 10% Na_2CO_3 溶液,并定容至25 mL,显色后测定其吸光值,以测定碱溶液用量对比色效果的影响.

1.2.6 标准曲线的绘制

精密吸取0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4和0.5 mL 没食子酸标准溶液,放入25 mL 容量瓶内,加10 mL 80%的丙酮,摇匀,按上述确定的方法分别加入显色剂和碳酸钠,并用80%的丙酮稀释至25 mL,避光反应后,以80%的丙酮为空白,测定吸光值,以吸光值为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线^[14].

1.2.7 Folin-Ciocalteu 比色方法评价^[15]

稳定性试验:取一槟榔提取样品液按上述处理及测定方法,分别在样品液与显色剂反应完全(150 min)后的不同时间段内测定其吸光值,以评价该分析方法在一段时间内的稳定性.

重现性试验:取同一槟榔样品6份,依上述制备及分析方法,分别测定其多酚含量,并计算测定结果的相对标准偏差,以评价该方法的重现性.

精密度试验:采用Folin-Ciocalteu 比色法对槟榔同一样品测定6次,并计算测定结果的相对标准偏差,以评价该方法的精密度.

加标回收试验:在样品溶液中加入不同量的没食子酸标准溶液,分别测定其多酚含量,并计算其回收率,以评价该分析方法的准确性和可靠性.

1.2.8 槟榔总酚含量的测定

取上述槟榔酚提取液50 μL 于25 mL 容量瓶中,加10 mL 80%的丙酮,摇匀,按上述确定的方法分别加入显色剂和碳酸钠,并用80%的丙酮稀释至25 mL,避光反应后,以80%的丙酮为空白,测定吸光值.

2 结果与讨论

2.1 最大吸收光谱的测定

从图1吸收曲线可知,没食子酸标准溶液与Folin-Ciocalteu 试剂反应显色后在730 nm 处吸收最强,而从图2可知,槟榔酚提取物在640~735 nm 范围内吸光度明显较高,其中在730nm 处吸收最强,因此选730 nm 作为测定波长.

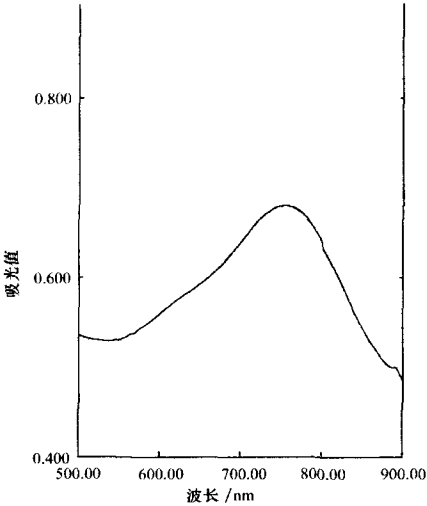


图1 没食子酸溶液的吸收光谱
Fig.1 Spectra of gallic acid

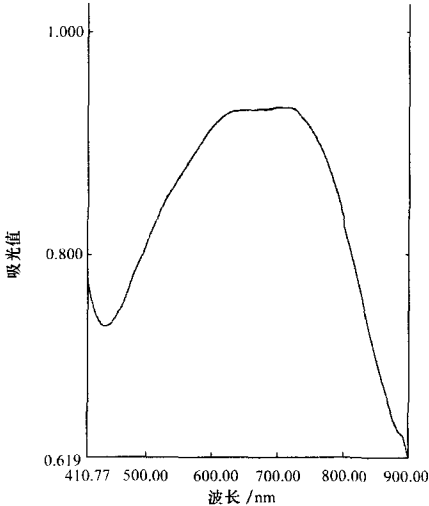


图2 槟榔酚提取物的吸收光谱
Fig.2 Spectra of Areca catechu polyphenol

2.2 Folin-Ciocalteu 比色温度和时间的确定

显色反应温度影响比色效果,结果见表1. 温度过低或过高均不利于多酚显色,在35~40℃时显色反应最完

全,本实验确定显色反应温度为40℃.

多酚与显色剂反应需要一定时间.从表1可知,120 min内显色反应迅速,150 min后显色反应完全并趋于稳定,确定150 min为比色反应时间.

2.3 显色剂和碳酸钠用量的确定

显色剂的用量会对比色效果产生影响.由表2可以看出,当显色剂的加入量达到2.0 mL时,显色效果最好.

表1 不同温度和时间对比色效果的影响
Table 1 Effects of temperature and time on absorbency

反应条件	吸光值
温度/℃	20
	0.436
	25
	0.454
	30
	0.471
	35
	0.485
时间/min	40
	0.489
	45
	0.482
	50
	0.471
	10
	0.304
	30
	0.419
	60
	0.456
	90
	0.476
	120
	0.489
	150
	0.495
	180
	0.496
	240
	0.496

表2 显色剂和碳酸钠用量对比色效果的影响
Table 2 Effects of dosage of reagent and sodium carbonate on absorbency

反应条件	吸光值
Folin-Ciocalteu 添加量/mL	1
	0.204
	2
	0.318
	4
	0.434
	6
	0.494
10% Na ₂ CO ₃ 添加量/mL	8
	0.501
	10
	0.515
	12
	0.516
	0.5
	0.424
	1.0
	0.476
	1.5
	0.487
	2.0
	0.503
	2.5
	0.502
	3.0
	0.499

Folin-Ciocalteu 显色剂与酚类化合物反应后必须在碱性条件下才可以显色,比色体系中Na₂CO₃溶液是显色的支持介质.由表2可知,显色反应对Na₂CO₃用量有相当的依赖性,当碱加入量达到10 mL以后体系显色反应才较为完全,所以确定加入10% Na₂CO₃溶液的体积为10 mL^[16].

2.4 标准曲线的绘制

按上述确定的方法制作标准曲线,由图3可以看出,回归方程为 $y=0.170\ 2x+0.060\ 4$,相关系数 R^2 为0.991 9, x 表示浓度(mg/L), y 表示吸光度,表明没食子酸质量浓度在0~2.8 mg/L范围内与其吸光值呈现良好的线性关系,符合朗伯比尔定律,该方程可用于槟榔多酚的定量测定.

2.5 稳定性试验

对Folin-Ciocalteu 比色法测定新鲜槟榔多酚进行稳定性试验,水浴150 min后,避光下放置0、0.5、1、2、3、4和5 h后测定的吸光值分别为0.483、0.485、0.486、0.487、0.489、0.492、0.492.结果表明,该方法在体系反应完全后放置5 h内测定值仍比较稳定,其相对标准偏差(k_{RSD})为0.71%.

2.6 重现性试验

Folin-Ciocalteu 比色法测定新鲜槟榔多酚的重现性试验测得的6个样品中,多酚质量分数分别为15.52%、15.35%、15.71%、15.23%、14.99%和15.67%.结果表明,该方法重现性较好, k_{RSD} 为1.79%.

2.7 精密度试验

对该测定方法的精密度进行评价,对新鲜槟榔6次测定的多酚值(以100 g样品计)分别为15.52、15.36、15.58、15.50、15.46和15.41 g,其 k_{RSD} 为0.51%,显示该方法具有较高的精密度,完全能满足样品分析的要求.

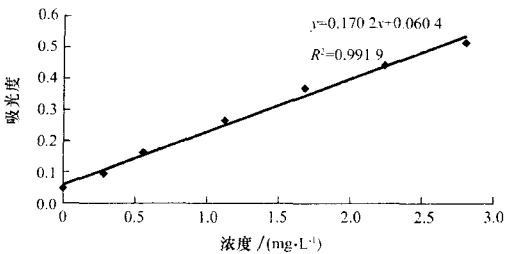


图3 没食子酸工作曲线
Fig. 3 Standard curve of gallic acid

2.8 加标回收试验

按上述确定的方法进行加标回收试验. 由表3可知,6次加标回收试验的最低回收率为95.0%,最高回收率为106.5%,平均回收率为98.5%,其 k_{RSD} 为3.86%. 结果表明该方法准确可靠,完全可用于槟榔多酚含量的测定.

2.9 槟榔总酚含量的测定

由表4可以看出,加工后的槟榔总酚含量下降,而槟榔籽含酚类物质最少. 这是因为槟榔在加工过程中酚的部分流失,这可能是因为酚在热处理过程中不稳定所造成的.

3 结论

采用Folin-Ciocalteu 比色法测定槟榔中的多酚含量,以没食子酸为对照品,确定最佳的比色条件为Folin-Ciocalteu 显色剂2.0 mL、10% Na_2CO_3 10 mL、显色温度40℃、反应时间150 min,比色测定波长730 nm. 其线性回归方程为 $y=0.170\ 2x+0.060\ 4$,相关系数 R^2 为0.991 9,且没食子酸质量浓度在0~2.8 mg/L 范围内与其吸光值呈现良好的线性关系. 线性回归方程定量测定槟榔多酚的方法具有操作简单、方便、稳定性好、精密度高、准确可靠等优点. 通过对三种槟榔的总酚含量的测定可知,未加工的槟榔、加工后的槟榔及槟榔的不同部位的酚含量不同,新鲜槟榔、槟榔烟果、槟榔籽中多酚含量分别为 (15.47 ± 0.08) g/100 g、 (7.23 ± 0.06) g/100 g、 (5.27 ± 0.05) g/100 g.

参考文献:

[1] 李忠海,钟海雁,郑锦星,等. 槟榔提取物在小白鼠体内的抑菌作用[J]. 食品与机械,2007(10):81—83.

[1] Li Zhong-hai, Zhong Hai-yan, Zheng Jin-xing, et al. The study on antimicrobial effect of areca nut in mice in vivo[J]. Food and machinery, 2007,(10):81—83.

[2] 黄永华. 槟榔有效化学成分分析测定[J]. 食品与机械,2002(3):38—39.

[2] Huang Yong-hua. Determination of efficient components in betel nut[J]. Food and machinery,2002,(3):38—39.

[3] 曾 琪,李忠海,袁列江,等. 槟榔生物碱的研究现状及展望[J]. 食品与机械,2006,(11):158—161.

[3] Zeng Qi, Li Zhong-hai, Yuan Lie-jiang, et al. Review on the actuality and prospect of areca alkabiads[J]. Food and machinery, 2006(11): 158—161.

[4] 颜 聃,李 彦. 食用槟榔的加工工艺研究[J]. 食品与机械,2003(11):34—35.

[4] Yan Dan, Li Yan. Study on the processing technique of edible areca[J]. Food and machinery,2007(11): 81—83.

[5] Wang H K, Lee W H. Separation Characteristics and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit[J]. J. Agric. Food Chem. ,1996,44 (11):2014—2019.

[6] Lee K K, Choi J D. The effects of *Areca catechu* L. extract on anti-inflammation and anti-melanogenesis[J]. International Journal of Cosmetic Science,1999,21(4):275—284.

[7] Wang C K, Lee W H, Peng C H. Contents of Phenolics and Alkaloids in *Areca catechu* Linn. during Maturation[J]. J. Agric. Food Chem. ,1997,45(4):1185—1188.

[8] 全月澳,周厚基. 果树营养诊断法[M]. 北京:农业出版社,1982.

[9] 刘秀影. 用分光光度法测定果汁中单宁的含量[J]. 软饮料工业,1997(1):43.

[10] 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.

[11] 孙 芸,谷文英. 硫酸—香草醛法测定葡萄籽原花青素含量[J]. 食品与发酵工业,2003(9):43—46.

[12] 路新华,鲁小明. 果酒及饮料中单宁含量测定[J]. 中国卫生检验杂志,1997,7(5):307.

[13] 董万超,宋润刚,李昌禹,等. 山葡萄及杂交后代浆果单宁含量测定[J]. 特产研究,2001(4):38—44.

[14] 肖 纯,张凯农,阳长敏. 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.

[15] 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.

[16] 石 碧,狄 莹. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社,2000.

表3 槟榔多酚加标回收试验结果

Table 3 Results of recovery of added standard *Areca catechu* polyphenol

样品号	加入标样质量/g	测得样品总酚含量/g	回收率/%
1	0	1.238	100
2	0.10	1.338	100.2
3	0.50	1.770	106.5
4	1.00	2.243	95.5
5	1.50	2.671	95.6
6	2.00	3.205	98.3
7	2.50	3.612	95.0
8	3.00	4.139	96.7

表4 槟榔中总酚的含量测定结果($n=6$)

Table 4 Results of polyphenol content in *Areca catechu*

样品名称	总酚含量/(100 g)
新鲜槟榔	15.47 ± 0.08
槟榔烟果	7.23 ± 0.06
槟榔籽	5.27 ± 0.05