

文章编号:1001-6880(2015)6-1056-08

响应面法优化火棘总酚含量测定方法

张 焕¹,董光耀¹,舒 畅¹,王俊杰¹,陈西喆²,鄢又玉^{1*}¹武汉轻工大学生物与制药工程学院,武汉 430023; ²湖北神农蜂语生物产业有限公司,十堰 442000

摘要:通过响应面优化建立了福林酚比色法检测火棘总酚含量的定量方法。考察了福林酚试剂的浓度(mol/L)及用量、Na₂CO₃溶液的浓度(g/L)及用量、水浴时间及温度、待测液体系的pH值及乙醇浓度等因素对火棘总酚含量测定的影响。在单因素试验的基础上,进一步通过Box-Behnken设计优化火棘总酚的检测条件。结果表明,火棘总酚的最适检测条件为:1 mL适宜浓度的火棘总酚提取物,加入0.4 mol/L福林酚试剂5 mL,漩涡混匀后,加入170 g/L Na₂CO₃溶液1 mL,混匀后于34 ℃水浴反应40 min,冰水中快速冷却,室温条件下于765 nm波长测吸光度。该方法具有极好的重复性及重现性,1 h内检测稳定性高,回收率高达99.95%,测定时可忽略待测液体系pH及乙醇浓度的影响。该方法可推广应用到其它植物总酚含量的检测。

关键词:火棘;总酚;福林酚比色法;响应面优化

中图分类号:TS209

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.022

Optimization of Content Determination Method of Total Polyphenols from *Pyracantha fortuneana* by Response Surface Methodology

ZHANG Huan¹, DONG Guang-yao¹, SHU Chang¹, WANG jun-jie¹, CHEN Xi-zhe², YAN You-yu^{1*}¹College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Hubei Wuhan 430023, China;²Hubei Shennong Honey Bio-Tech. Co., Ltd., Hubei Shiyan 442000, China

Abstract: A quantitative determination of total polyphenols from *Pyracantha fortuneana* were optimized by Folin-Ciocalteu colorimetry with Response surface methodology. The effect of concentration of Folin-Ciocalteu reagent (mol/L) and its addition amount (mL), concentration of Na₂CO₃ solution (g/L) and its addition amount (mL), incubation time and temperature, pH and concentration of ethanol of the solution system on the total polyphenols measurement was investigated thoroughly. On the basis of single factor experiment, the detection conditions of polyphenols from *P. fortuneana* were further optimized by Box-Behnken design. The results showed the optimal condition for detection was as follows: 5 mL of 0.4 mol/L Folin-Ciocalteu reagent was added into 1 mL suitable concentration of polyphenols extracts from *P. fortuneana*, after vortex mixing, 1 mL of 170 g/L Na₂CO₃ solution was added and mixed, then placing in 34 ℃ water bath and reacting for 40 min, then rapidly cooling with ice water, finally measuring absorbance at the wavelength of 765 nm under room temperature. The developed method had good repeatability and reproducibility, as well as high stability within 1 h and high recovery rate of 99.95%. It was almost not affected by the pH of solution system and the concentration of ethanol in extracts. This method can be applied to detect total polyphenols from other plant sources.

Key words: *Pyracantha fortuneana*; total polyphenols; Folin-ciocalteu colorimetry; response surface optimization

火棘[*Pyracantha fortuneana* (Maxim.) Li]为常绿灌木或小乔木,主产于川、滇、黔、陕、鄂、湘、粤、桂、闽、浙、皖、苏等我国南方山区及丘陵地带,资源极其丰富,目前已被国家卫生部批准作为食品新资源食用果品^[1]。其果实富含多酚成分^[2,3],植物多酚具有抗氧化^[4]、抗肿瘤,延缓衰老、免疫调节^[5,6]

等多种生物活性。

目前用于植物多酚的含量检测方法较多,主要有分光光度法^[7]、近红外光谱法^[8]以及色谱法^[9,10]等。其中分光光度法因对设备的要求不高,操作简单而得到最广泛应用。主要包括酒石酸亚铁比色法^[11]、福林酚比色法^[12]和高锰酸钾滴定法^[13]等,其中福林酚法应用最为广泛。但不同资料所报道的用于总酚测定的福林酚比色法检测条件却存在很大的差异^[12,14-19],主要表现在:①最大检测波长不一致,

有以 680、725、740、750、760、765、780 nm 等为测定波长;②福林酚试剂与碱液 Na_2CO_3 含量及比例各不相同,有 1:1、1:2、1:3 及 1:5 等;③ Na_2CO_3 溶液浓度差别很大,有 5% (w/v)、7.5%、10%、15%、20%、饱和浓度等;④显色时间分布在 30~120 min 等;⑤显色温度 20~60 ℃ 不等。因此很有必要对影响福林酚显色的因素进行系统考察,以确定最优检测条件。目前对火棘中多酚化合物的定量测定方法尚未见报道。为了更好地开发利用火棘植物中的功效成分,本文通过响应面优化建立了福林酚比色法检测火棘总酚含量的定量方法,此方法也可推广应用用于其它植物总酚的含量测定。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

Lambda 25 型紫外-可见光分光光度计(美国 PE 公司),CR 22G 高速冷冻离心机(日本 HATACHI 公司),Molelement1018a 型摩尔超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司),万分之一电子天平(德国赛多丽斯公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特实验设备有限公司);HSJ 系列恒温水浴搅拌器(金坛市科析仪器有限公司);STARTER 2100 实验室 pH 计(奥豪斯仪器有限公司);STARTER 2100 实验室 pH 计(奥豪斯仪器有限公司)。

没食子酸标准品(中国药品生物制品检定所,批号:110831-201403),福林酚试剂(sigma 公司),碳酸钠、乙醇等均为国产分析纯。

火棘果,2014 年 11 月中旬采自湖北恩施来凤地区,经华中科技大学植物学博士杨悦鉴定为全缘火棘 *Pyracantha atalantoides* 的果实。

1.2 实验方法

1.2.1 火棘多酚提取物的制备

取干燥、粉碎过 20 目筛的火棘果粉末 20 g,加体积分数 45% 乙醇 200 mL 于 92 ℃ 冷凝回流提取 2 h,减压抽滤,滤液定容于 200 mL,浓度以火棘干物质质量计为 100 g/L,离心,收集上清液 0~4 ℃ 冷藏备用。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平及编码值

Table 1 Levels and factors of response surface tests

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	+1
X_1 碳酸钠浓度 Na_2CO_3 concentrations (g/L)	50	125	200
X_2 水浴时间 Incubation time (min)	20	45	70
X_3 水浴温度 Incubation temperature (℃)	20	30	40

1.2.7 方法学验证

经过响应面优化得到火棘多酚含量检测的最优条件后,我们确定了没食子酸的标准曲线及火棘多酚的工作曲线,并进行重复性、重现性、稳定性、回收率等方法学验证实验。

2 结果与讨论

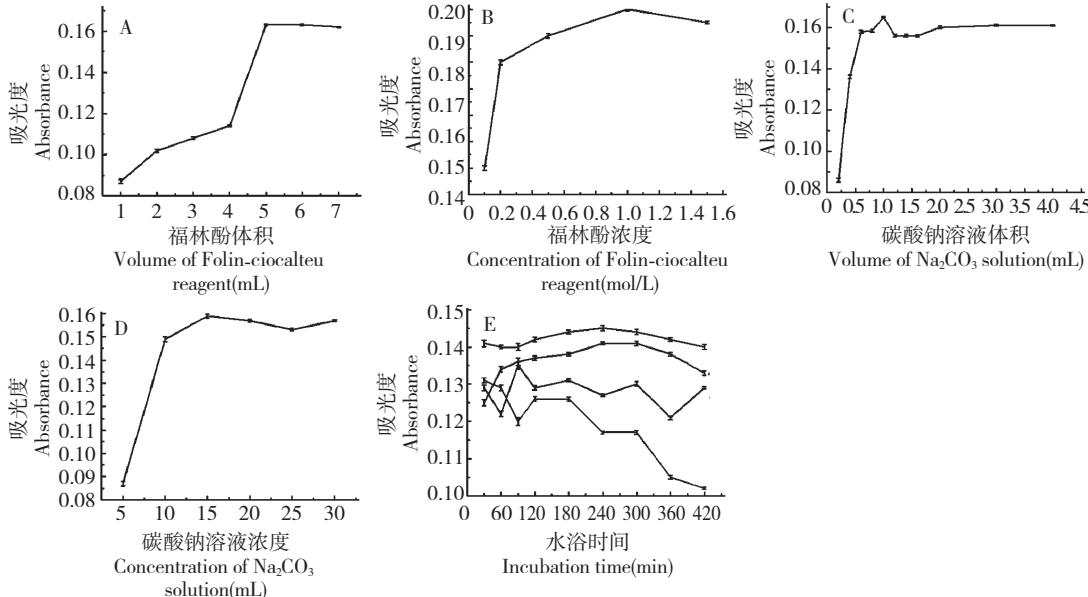


图 1 福林酚试剂的用量(A)及浓度(B)、Na₂CO₃ 溶液的用量(C)及浓度(D)、水浴时间及温度(E)对火棘总酚含量测定的影响

Fig. 1 Effects of amount (A) and concentration (B) of Folin-Ciocalteu reagent, amount (C) and concentration (D) of Na₂CO₃, Incubation time and temperature (E) on total polyphenols of *P. fortuneana*

由图 1(A)可知,随着福林酚用量的增加,吸光度逐渐增加,至福林酚体积 5 mL 时达到最大,此后趋于平缓,因此,福林酚添加量选为 5 mL。由图 1(B)可知,福林酚浓度增加时,吸光度逐渐升高,当浓度超过 0.2 mol/L 时增幅趋缓,故选择福林酚浓度为 0.2 mol/L 继续研究。由图 1(C)及图 1(D)可知,随着 Na₂CO₃ 溶液体积及浓度的增加,吸光度先快速增加后趋于平缓,添加量为 1.0 mL,浓度为 150 g/L 时达到最大,因此 Na₂CO₃ 溶液添加量选为 1.0 mL,浓度为 150 g/L。由图 1(E)可知,随着水浴温度的增加,吸光度先增后减,25 ℃时,达到最大值,当温度继续增加时,体系稳定性下降;随着水浴时间的延长,吸光度增幅缓慢,选水浴时间 30 ~ 60 min 较为合适。

2.3 影响火棘多酚含量测定的单因素考察

参照 1.2.5 设计,结果见图 2(A~E)。

2.1 最大吸收波长的确定

参照 1.2.3 设计,结果表明火棘多酚提取液及没食子酸标准品溶液均在 765 nm 处达到最大吸收,故可选 765 nm 作为最大检测波长。

2.2 反应体系的确定

参照 1.2.4 设计,结果分别见图 1(A~E)。

参照 2.2 的分析,结合图 2(A~C)可知,在用于火棘多酚检测时,福林酚浓度可调整至 0.4 mol/L,Na₂CO₃ 溶液浓度可选择 200 g/L,水浴温度选择 25 ℃,水浴时间 60 min 较为合适。由图 2(D)可知,溶液体系的 pH 对总酚含量的测定有一定影响,当 pH < 3 时,无显著影响,3 < pH < 5 时,随 pH 增加,吸光度增加,5 < pH < 7 时,随 pH 增加,吸光度减小。考虑到火棘酚类溶液呈酸性,在酸性条件下贮藏稳定,因此只考察酸性条件对检测的影响。工业化生产时,多酚的提取免不了使用乙醇为溶剂,由图 2(E)可知,待检体系中乙醇的含量对多酚检测有一定影响,随着乙醇浓度的增加,吸光度先增后减,乙醇浓度为 40 % 时达到极值,进一步增大乙醇浓度超过 80 % 时,待检溶液出现浑浊,分析认为是提取液中少量多糖醇沉析出或 Na₂CO₃ 难溶入乙醇而析出。

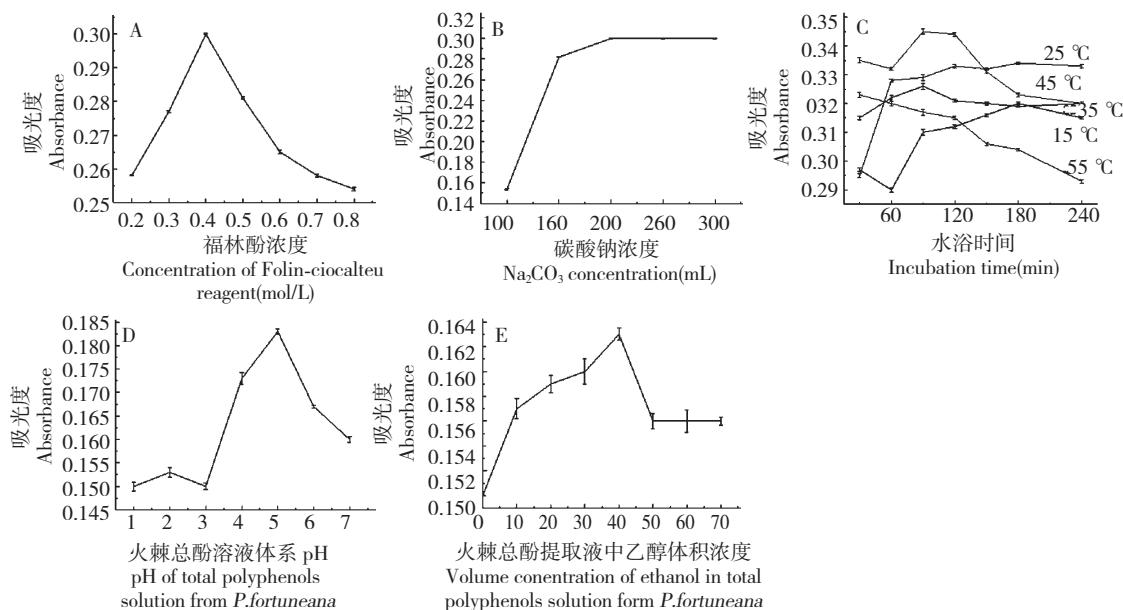


图 2 福林酚试剂的浓度(A)、Na₂CO₃ 溶液的浓度(B)、水浴时间及温度(C)、火棘总酚溶液体系 pH 值(D)及火棘总酚提取液中乙醇体积浓度(E)对火棘总酚含量测定的影响.

Fig. 2 Effects of concentration of Folin-Ciocalteu reagent (A), concentration of Na₂CO₃ (B), incubation time and temperature (C), pH of total polyphenols solution from *P. fortuneanna* (D) and ethanol concentration of extraction solution from *P. fortuneana* (E) on total polyphenols of *P. fortuneana*

2.4 响应面优化实验

按照 1.2.6 设计,具体结果参见表 2。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and the results

实验序号 No.	水平 Factors			吸收度 Absorbance
	X ₁ 碳酸钠浓度 Na ₂ CO ₃ concentrations	X ₂ 水浴时间 Incubation time	X ₃ 水浴温度 Incubation temperature	
1	-1	-1	0	0.12
2	1	-1	0	0.321
3	-1	1	0	0.148
4	1	1	0	0.308
5	-1	0	-1	0.122
6	1	0	-1	0.31
7	-1	0	1	0.154
8	1	0	1	0.304
9	0	-1	-1	0.254
10	0	1	-1	0.277
11	0	-1	1	0.301
12	0	1	1	0.305
13	0	0	0	0.302
14	0	0	0	0.293
15	0	0	0	0.304
16	0	0	0	0.308
17	0	0	0	0.302

利用 Design-Expert 8.0.6 软件,对表 2 结果进行统计分析,得到三元二次回归方程式: $Y = 0.30 + 0.087 X_1 + 5.25 \times 10^{-3} X_2 + 0.013 X_3 - 0.01 X_1 X_2 - 9.5 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 4.75 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 0.07 X_1^2 - 7.9 \times 10^{-5} X_2^2 -$

$9.65 \times 10^{-3} X_3^2$ 利用 Design-Expert 8.0.6 软件,进一步对实验结果进行统计分析,结果见表 3。

表 3 方差分析表

Table 3 ANOVA of regression analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean squares	F 值 F values	P 值 P values
模型 model	0.085	9	9.473×10^{-3}	131.30	< 0.0001 **
X_1	0.061	1	0.061	846.50	< 0.0001 **
X_2	2.205×10^{-4}	1	2.205×10^{-4}	3.06	0.1239
X_3	1.275×10^{-3}	1	1.275×10^{-3}	17.67	0.0040 **
$X_1 X_2$	4.202×10^{-4}	1	4.202×10^{-4}	5.82	0.0465 *
$X_1 X_3$	3.610×10^{-4}	1	3.610×10^{-4}	5.00	0.0604
$X_2 X_3$	9.025×10^{-5}	1	9.025×10^{-5}	1.25	0.3003
X_1^2	0.020	1	0.020	283.10	< 0.0001 **
X_2^2	2.628×10^{-4}	1	2.628×10^{-4}	3.64	0.0980
X_3^2	3.921×10^{-4}	1	3.921×10^{-4}	5.43	0.0525
残差 Residual	5.051×10^{-4}	7	7.215×10^{-5}		
失拟项 Lack of Fit	3.843×10^{-4}	3	1.281×10^{-4}	4.24	0.0983
纯误差 Pure Error	1.208×10^{-4}	4	3.020×10^{-5}		
总离差 Cor Total	0.086	16			
$R^2 = 0.9941$	$R_{Adj}^2 = 0.9865$		$R_{pred}^2 = 0.9261$	$CV = 3.26\%$	精密度 = 31.256

注: * $0.01 < P < 0.05$; ** $P < 0.001$ 。

由表 3 可知, X_1 、 X_3 、 X_1^2 项对响应值影响极显著 ($P < 0.01$), $X_1 X_2$ 项影响显著 ($0.01 < P < 0.05$)。判定系数 $R^2 = 0.9941$ 说明模型显著, 相关性非常好, 实验因素对响应值有较大影响。校正判定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9865$, 表明 98.65% 的实验数据的变异性可以用此回归模型解释。变异系数 $CV = 3.26\%$, 说明实验的可信度及精确度较好。精确度 > 4 视为合理, 本实验精密度 = 31.256, 表明符合要求。模型 F 值为 131.30, 表明该模型达到极显著水平 ($P < 0.01$)。此外, 失拟项 F 值为 4.24 ($P = 0.0985 > 0.05$), 说明失拟值和纯误差没有显著性关系, 回归模型在被研究的整个回归区域不失拟, 该模型能用于指导实验。

进一步对模型进行两因素效应分析, 结果见图 3。

由图 3(A) 可知, Na_2CO_3 浓度与水浴时间交互作用显著, 吸光度随 Na_2CO_3 浓度的增加呈现先快增后减缓的趋势, 在 Na_2CO_3 浓度为 145 g/L 左右时达到极值, Na_2CO_3 浓度对吸光度影响显著。图 3(B) 表明水浴时间与水浴温度交互作用不显著, 相

对而言, 水浴温度对吸光度的影响更显著一些。图 3(C) 表明, 吸光度随 Na_2CO_3 浓度的增加呈现先快增后减缓的趋势, 在 Na_2CO_3 浓度为 160 g/L 左右时达到极值, 相对而言, Na_2CO_3 浓度对吸光度影响更显著。

通过软件 (Design Expert 8.0.6) 分析得到火棘多酚检测的最适条件为 Na_2CO_3 浓度 171 g/L、水浴时间 40.43 min, 水浴温度 33.97 °C, 在此条件下吸光度的预测值为 0.3306。为了验证该响应面结果的可行性, 对所得最佳条件进行了优化和验证实验。在 Na_2CO_3 浓度 170 g/L、水浴时间 40 min, 水浴温度 34 °C 条件下进行 5 次实验, 所得吸光度分别为 0.3253、0.3263、0.3243、0.3260、0.334, 平均值为 0.3277, 相对标准偏差为 0.495%, 说明该条件下实验结果稳定, 与预测值的相对误差为 1.51%, 说明该响应面结果可靠。

2.5 测定方法评价

2.5.1 标准曲线关系考察

配制不同浓度 (10、15、20、25、30、35 μg/mL) 的

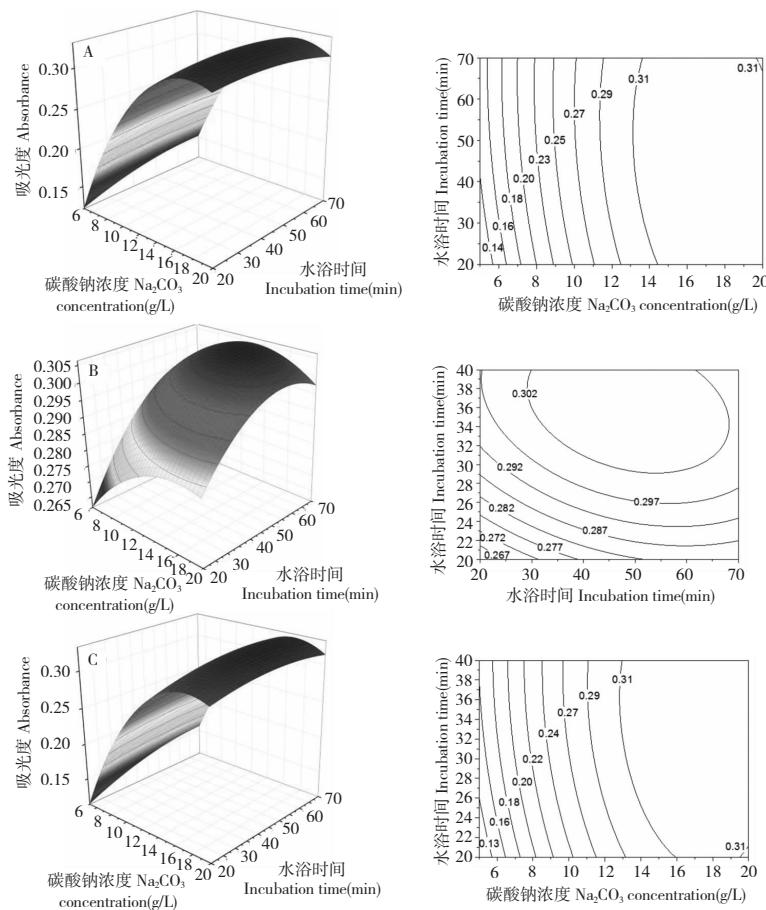


图 3 火棘多酚含量测定响应面及等高线图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots for the determination of polyphenols content from *P. fortuneana*

注:A:碳酸钠浓度与水浴时间;B:水浴时间与水浴温度;C:碳酸钠浓度与水浴温度

Note: A: Concentration of Na_2CO_3 and incubation time; B: Incubation time and temperature; C: Concentration of Na_2CO_3 and incubation temperature

没食子酸溶液及火棘总酚提取液(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 g/L),按以上试验得出的最适条件显色后,在765 nm波长\测吸光度,分别以没食子酸及火棘总酚提取液浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标进行线性回归,分别得到线性回归方程为: $Y = 0.00111 + 0.01682X(R^2 = 0.9983)$, $Y = 0.04482 + 0.32057xX(R^2 = 0.9965)$ 。结果表明没食子酸及火棘总酚提取液浓

度分别在10~35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及0.4~1.4 g/L与吸光度线性关系良好。其中y为吸光度,x为浓度。

2.5.2 重复性考察

按已确定的最适条件,取火棘总酚浓度为0.4、1.4 g/L样品2份,由同一分析人员在765 nm波长处平行测定5次吸光度,记录数据,求相对标准偏差RSD(%),结果见表4。

表4 重复性实验

Table 4 Repeatability tests of the determination results

火棘总酚浓度 Concentration of total polyphenols from <i>P. fortuneana</i> (g/L)	吸光度 Absorbance A ₁	吸光度 Absorbance A ₂	吸光度 Absorbance A ₃	吸光度 Absorbance A ₄	吸光度 Absorbance A ₅	平均值 Average value A	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD (%)
0.4	0.177	0.175	0.173	0.176	0.174	0.175	0.00158	0.90%
1.4	0.502	0.501	0.506	0.500	0.501	0.502	0.00235	0.47%

表 5 重现性实验

Table 5 Reproducibility tests of the determination results

火棘总酚浓度 Concentration of total polyphenols from <i>P. fortuneana</i> (g/L)	吸光度 Absorbance A ₁	吸光度 Absorbance A ₂	吸光度 Absorbance A ₃	吸光度 Absorbance A ₄	吸光度 Absorbance A ₅	平均值 Average value Ā	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD (%)
0.4	0.173	0.170	0.175	0.176	0.174	0.1736	0.00230	1.33%
1.4	0.500	0.498	0.504	0.501	0.503	0.5012	0.00239	0.48%

由表 4 可知,该方法测定 2 份样品的标准偏差分别为 0.00158 和 0.00235, 相对标准偏差为 0.90% 和 0.47%, 呈现出良好的重复性。

2.5.3 重现性考察

按已确定的最适条件,取火棘总酚浓度为 0.4、1.4 g/L 样品 2 份,由不同实验室,不同分析人员在 765 nm 波长处平行测定 5 次吸光度,记录数据,求相对标准偏差 RSD(%),结果见表 5。

由表 5 可知,该方法测定 2 份样品的标准偏差分别为 0.00230 和 0.00239, 相对标准偏差为 1.33% 和 0.48%, 呈现出良好的重现性。

2.5.4 稳定性考察

按已确定的最适条件,取火棘总酚浓度为 0.4、1.4 g/L 样品 2 份,每隔 10 min 在 765 nm 波长处测定吸光度,连续测定 6 次。记录数据,求相对标准偏差 RSD(%),结果见表 6。

表 6 稳定性实验

Table 6 Stability tests of the determination results

火棘总 酚浓度 Concentration of total polyphenols from <i>P. fortuneana</i> (g/L)	吸光度 Absorbance A ₁	吸光度 Absorbance A ₂	吸光度 Absorbance A ₃	吸光度 Absorbance A ₄	吸光度 Absorbance A ₅	吸光度 Absorbance A ₆	平均值 Average value Ā	标准偏差 SD	相对标准偏差 RSD (%)
0.4	0.177	0.178	0.180	0.180	0.181	0.181	0.1788	0.0016	0.92%
1.4	0.502	0.502	0.504	0.505	0.506	0.506	0.5033	0.0018	0.36%

由表 6 可知,该方法测定 2 份样品的标准偏差分别为 0.0016 和 0.0018, 相对标准偏差为 0.92% 和 0.36%, 表明样品在 1 h 内检测稳定。

2.5.5 加标回收率测定

取 5 份浓度为 0.4 mg/mL 火棘总酚提取液 1.0

mL, 分别加入没食子酸 0.2 mg, 按以上实验确定的最适条件, 测定 5 份样品的吸光度并计算混合后的总酚含量。计算回收率及相对标准偏差, 结果见表 7。

表 7 没食子酸加样回收率实验 (n=5)

Table 7 Recovery tests of gallic acid (n=5)

火棘总酚吸光度 Absorbance	总酚原有量 Original amount (mg)	没食子酸加入量 Added amount (mg)	总酚测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average value (%)	相对标准偏差 RSD (%)
		0.2	0.5988	99.8%		
		0.2	0.5998	99.97%		
0.177	0.4	0.2	0.6007	100.12%	99.95%	0.12%
		0.2	0.5995	99.92%		
		0.2	0.5996	99.93		

由表 7 可知,该方法的相对标准偏差仅为 0.12%,具有较高的回收率 99.95%。

3 结论

通过响应面优化建立了福林酚比色法检测火棘总酚含量的定量方法。结果表明,火棘总酚的最适检测条件为:1 mL 适宜浓度的火棘总酚提取物,加入 0.4 mol/L 福林酚试剂 5 mL, 涡旋混匀后, 加入 170 g/L Na₂CO₃ 溶液 1 mL, 混匀后于 34 ℃水浴反应 40 min, 冰水中快速冷却, 室温条件下于 765 nm 波长测吸光度。该方法具有极好的重复性及重现性, 1 h 内检测稳定性高, 回收率高达 99.95%, 测定时虽然待测液体系 pH 及乙醇浓度对吸光度有一定影响, 但因为待检样品液检测时都被预先稀释了很多倍或通过待检体系得以稀释, 因此可忽略待测液体系 pH 及乙醇浓度的影响。该方法可推广应用到其它植物总酚含量的检测。

参考文献

- Li SJ (李三杰). *Pyracantha fortuneana* resources chemistry and its antioxidant effect. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学), MSc. 2011.
- Cheng C (程超), Li W (李伟), Mo KJ (莫开菊), et al. Different firethorn polyphenols of free radical scavenging effect *in vitro*. *Chin Brew* (中国酿造), 2008, 10;39-42.
- Li W (李伟), Zhang YT (张应团). Firethorn polyphenols *in vitro* antioxidant effect. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2008, 9;121-123.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2;270-278.
- Xiang L, Sun K, Lu J, et al. Anti-aging effects of phloridzin, an apple polyphenol, on yeast via the SOD and Sir2 genes. *Biosci Biotech Biochem*, 2011, 75;854-858.
- Wang XJ (王修杰), Yuan SL (袁淑兰), Wei YQ (魏于全). Plant polyphenols cancer anticancer. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17;508-517.
- Grubešić RJ, Vuković J, Kremer D, et al. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: prevalidation and application on *Plantago* L. species. *J Pharm Biomed*, 2005, 39;837-842.
- Cozzolino D, Kwiatkowski MJ, Parker M, et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Anal Chim Acta*, 2004, 513;73-80.
- Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, et al. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A*, 2004, 1046;89-100.
- Wang MY (王明月), Luo JH (罗金辉), Li JG (李建国). HPLC method for determination of polyphenols in penang. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23;101-104.
- Zhao Y (赵艳), Bai YY (白玉艳), Wang BJ (王白娟). Meng library of yunnan large leaf puer tea polyphenol content analysis. *South China J Agric Sci* (南方农业学报), 2013, 44;131-134.
- Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzy Mol*, 1999, 299;152-178.
- Wang DB (汪殿蓓). Composite enzymatic extraction of okra tender fruit polyphenol process optimization. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26;909-914.
- Lei CG (雷昌贵), Chen JP (陈锦屏), Lu DX (卢大新), et al. The determination method of polyphenol compounds in food and its research progress. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2007, 33;100-104.
- Cheng YF (程雅芳), Yang Y (杨洋), Wen FX (温富雄), et al. The response surface analysis, the optimization of enzyme extracted sweet tea polyphenols process. *Food Sci* (食品科学), 2012, 33;10-15.
- He ZY (何志勇), Xia WS (夏文水). Folin Ciocalteu-colorimetric method was developed for the determination of olive polyphenol in the research. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2006, 26;15-18.
- Li SF (李淑芳), Fan ZY (范志远), Yang JH (杨建华), et al. Folin Ciocalteu-colorimetric determination of walnut kernel polyphenols content. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 2013, 26;1670-1673.
- Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J*, 2009, 91;107-110.
- Han J (韩菊), Wei FX (魏福祥). Folin Ciocalteu-colorimetric method for determination of polyphenols in apple residue. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31;179-182.