

Folin-Ciocalteu 比色法测定铜藻中褐藻多酚含量的研究

段海霞, 林云霞, 张金荣*, 严小军, 骆其君

宁波大学海洋学院 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 宁波 315211

摘要:以没食子酸为标准品,使用福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂,通过紫外-可见分光光度法,对铜藻中褐藻多酚的含量进行了测定。结果表明,测定波长为 760 nm,显色试剂 Folin-Ciocalteu 的用量为 1.25 mL,0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液用量为 4.0 mL,定容至 10 mL,显色温度为 30 °C,反应时间为 60 min,多酚含量在 15 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系,回归方程为 $Y = 0.0138X + 0.0267$, $R^2 = 0.9993$ 。本测定方法的平均回收率为 96.18%,相对标准偏差(RSD)为 2.44%。该方法的稳定性、重现性、精密度以及加标回收率的相对标准偏差均符合要求,可用于铜藻中褐藻多酚含量的测定。按照本方法测定铜藻中褐藻多酚的平均含量为 17.36 mg/g (RSD = 1.25%)。

关键词:铜藻;褐藻多酚;福林酚

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.08.011

Determination of Phlorotannins in *Sargassum horneri* Using Folin-Ciocalteu Colorimetric Method

DUAN Hai-xia, LIN Yun-xia, ZHANG Jin-rong*, YAN Xiao-jun, LUO Qi-jun

Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: With gallic acid as the standard, the content of phlorotannins in *Sargassum horneri* was determined by UV-visible spectrophotometric method using Folinphenol (Folin-Ciocalteu). The detection wavelength was set at 760 nm. The color reaction was carried out with 1.25 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 4.0 mL of 0.1 g/mL aqueous Na_2CO_3 solution in darkness at 30 °C for 60 min. The linear range of the established standard curve was 15-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the regression equation was $Y = 0.0138X + 0.0267$, $R^2 = 0.9993$. The average recovery rate of the added sample was 96.18%, with relative standard deviation (RSD) of 2.44%. The RSDs of stability, reproducibility, precision and recovery rate of the developed method were all satisfactory. Thus, this method can be applied to determine phlorotannins of *S. horneri*. The average content of phlorotannins in *S. horneri* was 17.36 mg/g (RSD = 1.25%).

Key words: *Sargassum horneri*; phlorotannins; Folin-Ciocalteu reagent

铜藻(*Sargassum horneri*),又名丁香屋,隶属圆子纲(Cyclospreae)、墨角藻目(Fucales)、马尾藻科(Sargassaceae)、马尾藻属(*Sargassum*),为北太平洋西部特有的暖温带性海藻。铜藻在我国沿海分布广泛,是暖温带海域营造海洋牧场,进行生物修复海洋生态的首选品种^[1]。铜藻作为海藻工业的优质原料,已广泛用于食品、饲料工业,具有较高的商业价值^[2,3]。近年来,随着我国海藻资源开发利用研究的快速发展,铜藻因富含多糖、褐藻多酚、岩藻黄素

等多种生物活性物质而引起了人们的广泛关注,但对其中褐藻多酚的研究不多^[4]。褐藻多酚(phlorotannins)是海洋褐藻中重要的次级代谢产物,化学结构上是一类以间苯三酚为基础骨架的独特的多酚类化合物,其聚合度可以几个至几百个,并具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗心血管疾病、抗糖尿病综合症、保肝等多种生物活性^[5-7]。严小军等以 Folin-Denis 法测定了中国常见海藻的褐藻多酚含量,并研究了褐藻多酚含量随海藻生长及季节的变化规律^[8]。

目前,植物多酚含量测定的最常见方法——Folin-Ciocalteu 比色法^[9-11]。鉴于褐藻多酚的化学结构类型为多酚类化合物,故本研究选择 Folin-Ciocalteu 比色法进行铜藻中褐藻多酚的含量测定。以没

收稿日期:2015-04-14 接受日期:2015-06-12

基金项目:浙江省海洋生物技术产业创新团队(20121009-2);宁波市海洋藻类资源高效开发利用创新团队(2011B81007);国家自然科学基金(41406163)

* 通讯作者 Tel:86-574-8760-0458;E-mail:zhangjinrong@nbu.edu.cn

食子酸为标准品,分别考察检测波长、显色温度、显色时间、Folin-Ciocalteu 试剂和碱液用量等测定条件对 Folin-Ciocalteu 比色法的影响,确定 Folin-Ciocalteu 比色法测定铜藻中褐藻多酚含量的最优条件,为铜藻中褐藻多酚提取工艺的研究提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

新鲜铜藻于 2013 年 5 月采自浙江温州南麂岛,样品由宁波大学骆其君教授鉴定,编号为 NJD20130501,保存于宁波大学海洋学院。

1.2 仪器

752N 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);SB4200D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);BSA124S-CW 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);超纯水仪(Pall 公司);RXZ-380B 型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂);移液器(德国 Eppendorf 公司);1 cm 石英比色皿(上海尤尼柯仪器有限公司)。

1.3 试剂

Folin-Ciocalteu 试剂(Sigma 公司,批号 BCBL4436V);没食子酸标准品(Sigma 公司,批号 AGM01-HOSS);其余试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 没食子酸标准溶液的配制

精密称取没食子酸对照品 0.100 g,用重蒸馏水完全溶解并定容至 100 mL,配成质量浓度 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没食子酸储备溶液(现配)。

2.2 没食子酸工作液的配制

用移液管分别移取 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL 的没食子酸标准储备液于 100 mL 容量瓶中,分别加水定容至刻度,摇匀,配置质量浓度分别为 15、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的没食子酸工作液,待用。

2.3 供试品溶液的制备

称取新鲜铜藻 1.000 g 于锥形瓶中,加入 50 mL 60% (V/V) 乙醇溶液,40 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min,过滤至 50 mL 容量瓶,加 60% 乙醇定容至 50 mL,待用。

2.4 Folin-Ciocalteu 法测定褐藻多酚的比色条件优化

2.4.1 检测波长的选取

精密量取没食子酸工作液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、供试品溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,分别加水稀释,加 1.25 mL Folin-Ciocalteu 试剂,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min,以试剂空白为对照,在 400~800 nm 范围内扫描确定最大吸收波长。

2.4.2 显色温度的考察

精密量取没食子酸工作液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1.0 mL,加水稀释,加入 Folin-Ciocalteu 试剂 1.25 mL,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,分别于 15、20、25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光反应 60 min,以试剂空白为对照,在 760 nm 处测定溶液吸光值,以考察反应温度对显色效果的影响。

2.4.3 显色时间的影响

取没食子酸工作液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1.0 mL,加水稀释,加入 Folin-Ciocalteu 试剂 1.25 mL,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 分别避光反应 30、60、90、120、150、180 min,以试剂空白为对照,在 760 nm 处测定溶液吸光度,以确定显色完全的最佳时间。

2.4.4 Folin-Ciocalteu 试剂的加入量

取没食子酸工作液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1.0 mL,加水稀释,分别加入 0.75、1.0、1.25、1.5、1.75 mL Folin-Ciocalteu 试剂,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min,以试剂空白为对照,在 760 nm 处测定溶液吸光度,以考察 Folin-Ciocalteu 试剂用量对显色效果的影响。

2.4.5 Na_2CO_3 溶液用量的确定

取没食子酸工作液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1.0 mL,加水稀释,加 Folin-Ciocalteu 试剂 1.25 mL,混匀,3 min,分别加入 3.2、4.0、4.8、5.6、6.4 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min,以试剂空白为对照,在 760 nm 处测定溶液吸光度,考察 Na_2CO_3 溶液用量对吸光度的影响。

2.5 标准曲线的绘制

精密量取不同浓度的没食子酸工作液各 1.0 mL 于 10 mL 的容量瓶中,加水稀释,分别加入 1.25 mL Folin-Ciocalteu 试剂,混匀,3 min 后加入 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液 4.0 mL,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min,以试剂空白为对照,在 760

nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,没食子酸溶液质量浓度为横坐标绘制标准曲线,褐藻多酚含量以没食子酸标准品计。

2.6 Folin-Ciocalteu 法测定铜藻中褐藻多酚的方法学评价

2.6.1 稳定性实验

精密量取同一铜藻供试品溶液按 2.4 的测定条件,分别在样品液与显色剂反应完全(60 min)后的 0、30、60、90、120 min 测定吸光度,以评价该方法在一段时间内的稳定性。

2.6.2 重现性实验

分别取同一铜藻样品 5 份,依 2.3 的方法制备供试品溶液,分别测定其多酚含量,计算结果的相对标准偏差(RSD),以评价该方法的重现性。

2.6.3 精密度实验

采用优化的 Folin-Ciocalteu 比色法对同一铜藻供试液测定 5 次,并计算结果的相对标准偏差(RSD),以评价方法的精密度。

2.6.4 加标回收实验

精密量取已知含量的铜藻供试品溶液 0.5 mL,6 份,分别加入 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没食子酸工作液 0.14、0.14、0.17、0.17、0.20、0.20 mL,加水稀释,混匀,加入 Folin-Ciocalteu 试剂 1.25 mL,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^\circ\text{C}$ 避光反应 60 min,分别测定混合样品中褐藻多酚含量,并计算其回收率和相对标准偏差,以评价该分析方法的准确性和可靠性。

2.7 含量测定

精确量取 2.3 中的铜藻供试液 1.0 mL,5 份,加水稀释,混匀,加入 Folin-Ciocalteu 试剂 1.25 mL,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 $^\circ\text{C}$ 避光反应 60 min。反应完全后,利用紫外-可见分光光度计,于 760 nm 下测定体系吸光值,根据没食子酸标准品所得标准曲线,计算铜藻供试液中褐藻多酚的含量,公式如下:

$$\text{褐藻多酚含量}(\text{mg}/\text{g}) = C \times V/m$$

式中,C:铜藻供试液中多酚浓度(mg/mL);V:铜藻供试液总体积(mL);m:铜藻质量(g)。

3 结果与分析

3.1 检测波长的确定

多酚类物质与 Folin-Ciocalteu 试剂反应显色是基于 Folin-Ciocalteu 试剂中的钨钼酸能将多酚化合

物定量氧化,自身被还原,生成蓝色物质,在 680 ~ 780 nm 有较大吸收,测定显色反应后溶液的紫外-可见吸收光谱,选择最大吸收波长作为比色法的测定波长。图 1 为没食子酸工作液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和供试品溶液分别与 Folin-Ciocalteu 试剂显色后的全波长扫描图,由图 1 可知,两者均在 760 nm 处有最大吸收,故选择 760 nm 为检测波长。

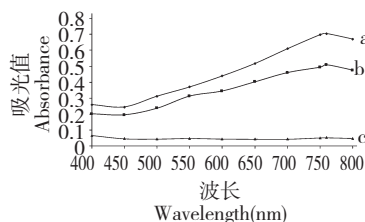


图 1 没食子酸(a)、供试品(b)和试剂空白(c)分别与 Folin-Ciocalteu 试剂显色后的全波长扫描

Fig. 1 Scanning spectra of gallic acid (a), testing solutions (b) and sample blank (c) reacted with Folin-Ciocalteu reagent

3.2 显色温度和时间的确定

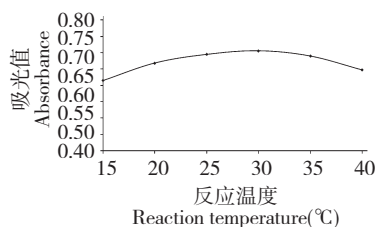


图 2 吸光度随反应温度的变化

Fig. 2 The absorbance at different reaction temperatures

酚类化合物与 Folin-Ciocalteu 试剂反应需要一定显色温度和时间才能显色完全。由图 2 可知,没食子酸标准溶液在不同温度条件下显色,显色温度对比色效果影响较大,反应温度过低、过高均不利于多酚显色。当温度低于 30 $^\circ\text{C}$ 时,吸光度较小。30 $^\circ\text{C}$ 显色,反应 60 min 时,吸光度达到最大,吸光值为 0.705。35 ~ 40 $^\circ\text{C}$,显色 60 min 时,吸光度逐渐减

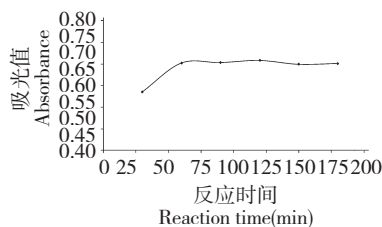


图 3 吸光度随反应时间的变化

Fig. 3 The absorbance at different reaction times

小。说明温度高能加快显色进程,但是温度过高,反应体系的稳定性较差。综合考虑显色的完全程度和反应体系的稳定性,确定显色温度为 30 ℃。

没食子酸标准溶液在不同温度条件下显色,达到最大吸光度的时间有差异。由图 3 可知,没食子酸标准溶液与 Folin-Ciocalteu 试剂在 30 ℃ 条件下,避光反应,显色时间 60 min 内,随着时间的延长,吸光度增大。当显色 60 min 时体系吸光度达到最大。显色 60 min 后,体系吸光度变化很小,表明显色反应基本完全,显色体系稳定性很好。因此,确定 Folin-Ciocalteu 比色法的反应时间为 60 min。

综上所述,确定 Folin-Ciocalteu 比色法测定褐藻多酚含量的显色温度为 30 ℃,显色时间为 60 min。

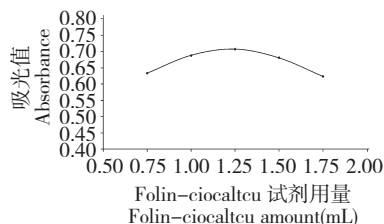


图 4 吸光度随 Folin-Ciocalteu 试剂用量的变化

Fig. 4 The absorbance at different addition amounts of Folin-Ciocalteu reagent

3.3 Folin-Ciocalteu 显色剂和 Na_2CO_3 加入量的确定

Folin-Ciocalteu 显色剂的用量对显色效果具有较大影响,由图 4 可知,Folin-Ciocalteu 试剂用量在 0.75 ~ 1.75 mL 内,随着显色剂用量的增加,测得的吸光度增加;当 Folin-Ciocalteu 试剂加入量为 1.25 mL,吸光度达到最大,吸光值为 0.707。当显色剂用量超过 1.25 mL 后,吸光度略有下降。因此,确定 Folin-Ciocalteu 试剂的加入量为 1.25 mL。

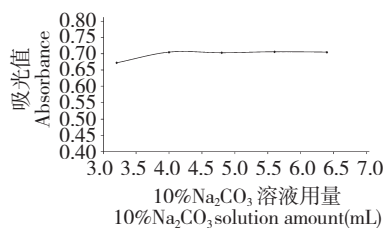


图 5 吸光度随 10% Na_2CO_3 溶液加入量的变化

Fig. 5 The absorbance at different addition amount of 10% Na_2CO_3 solution

酚类化合物与 Folin-Ciocalteu 试剂反应必须在碱性条件才可以显色,反应体系中 Na_2CO_3 溶液是

显色的支持介质。由图 5 可知:随着 Na_2CO_3 用量的增加,体系吸光度逐渐升高,当 Na_2CO_3 用量为 4.0 mL 时,吸光度达到最大。但进一步增加 Na_2CO_3 溶液吸光度变化幅度不大,因此确定 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液的加入量为 4.0 mL。

3.4 标准曲线的绘制

精密量取不同浓度的没食子酸工作液各 1.0 mL,按照 2.4 确定的最优比色条件绘制标准曲线,得线性回归方程为 $Y = 0.0138X + 0.0267$,相关系数 $R^2 = 0.9993$ 。表明没食子酸质量浓度在 15 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,与其吸光值呈良好的线性关系,符合朗伯-比尔定律,可用于铜藻中褐藻多酚的含量测定。

3.5 Folin-Ciocalteu 法测定褐藻中褐藻多酚的方法学评价

稳定性实验:对 Folin-Ciocalteu 比色法测定的铜藻中的褐藻多酚进行稳定性实验,反应完全后在 30 ℃ 下避光放置 0、30、60、90、120 min 后测定吸光值,其吸光值分别为 0.508、0.501、0.499、0.512、0.499,结果表明随着时间的延长,吸光度值略有下降,但幅度不大,相对标准偏差 (RSD) 为 1.169%,表明 120 min 内溶液稳定性良好。

精密度实验:对 Folin-Ciocalteu 比色法测定的铜藻中的褐藻多酚进行精密度实验,同一样液测定 5 次,吸光值分别为 0.487、0.491、0.510、0.497、0.497,其相对标准偏差 (RSD) 为 1.754%,表明该方法具有较高的精密度,能够满足样液分析的要求。

重现性实验:对 Folin-Ciocalteu 比色法测定的铜藻中的褐藻多酚进行重现性实验,取同一批铜藻样品 5 份,各 1.0 g,精密称定,按 2.3 的方法,分别测定吸光度,吸光值分别为 0.488、0.492、0.498、0.499、0.502,其相对标准偏差 (RSD) 1.145%,表明该方法具有良好的重现性。

加标回收率试验:按照 2.6 的方法进行加标回收试验,由表 1 可以看出采用 Folin-Ciocalteu 比色法测定铜藻中褐藻多酚的加标试验中,回收率最高的为 99.36%,最低为 92.50%,平均回收率 96.18%,其 RSD 为 2.44%。结果表明,该方法具有较高的准确性和可靠性,可以用于铜藻中褐藻多酚含量的测定。

3.6 铜藻中褐藻多酚的含量

按照 2.7 中的方法测定铜藻中褐藻多酚的含量分别为 17.44、17.58、17.08、17.18、17.51 mg/g,其

表1 加标回收率试验结果

Table 1 Results of recovery experiment

编号 No.	已知含量 Original (μg)	加入量 Added (μg)	测量值 Detected (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
1	174.13	140	306.74	94.72		
2	174.86	140	313.96	99.36		
3	171.23	170	328.48	92.50	96.18	2.44
4	171.96	170	335.72	96.33		
5	170.51	200	364.71	97.10		
6	169.09	200	364.71	97.09		

平均含量为 17.36 mg/g (RSD = 1.25%)。

4 结果与讨论

综上所述,考虑影响多酚含量测定的主要因素:检测波长、显色温度、显色时间、Folin-Ciocalteu 试剂和碱液用量,确定 Folin-Ciocalteu 比色法测定铜藻中褐藻多酚含量的测定条件为:精密量取铜藻供品溶液 1.0 mL,加水稀释,加 1.25 mL Folin-Ciocalteu 试剂,混匀,3 min 后加入 4.0 mL 0.1 g/mL Na_2CO_3 溶液,加水定容至 10 mL,混匀,30 °C 避光反应 60 min,以试剂空白为对照,在 760 nm 波长处测定吸光度。方法学实验证明该方法具有操作简单、精密度高、稳定性好、准确可靠等优点,可用于铜藻中褐藻多酚含量的测定。

参考文献

- Sun JZ(孙建璋), Zhuang DG(庄定根), Chen WD(陈万东). Studies on sexual reproduction and seedling production of the brown alga *Sargassum horneri*. *South China Fish Sci* (南方水产), 2008, 4(2): 6-14.
- Sun JZ(孙建璋), Zhuang DG(庄定根), et al. Study on *Sargassum heneri* (Tarn) Ag around Nanji Islands. *Mod Fish Inf* (现代渔业信息), 2009, 24(5): 19-21.
- Gu LX(顾丽霞), Liu LJ(刘丽佳), He ST(何淑婷), et al. Study on water extraction technology and antioxidative activity of polysaccharides from *Sargassum heneri*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2014, 42: 10139-10141.
- Yuan QX(袁清香), Fu L(付玲). Study on the chemical constituents of brown alga *Sargassu horneri*. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2006, 33(5): 42-43.
- Wei YX(魏玉西), Guo DS(郭道森), Niu XZ(牛锡珍), et al. Researching progresses in brown algal poly phenolics. *Mar Sci* (海洋科学), 2002, 26(10): 18-19.
- Qin XL(秦绪龙), Wan SB(万升标), Jiang T(江涛), et al. Research progresses in Eckols of phlorotannins. *Trans Oceanol Limnol* (海洋湖沼通报), 2007, Suppl 1: 176-181.
- Zhang LB(张丽斌), Xiong HJ(熊何健), Wu JN(吴靖娜), et al. Study on biological activity and extract technology of phlorotannins. *J Fujian Fish* (福建水产), 2013, 12: 480-484.
- Yan XJ(严小军), Zhou TC(周天成), et al. Quantitative determination of phlorotannins from some Chinese common brown sea weeds. *Mar Sci* (海洋科学), 1996, 5: 39-42.
- Liu ZJ(刘子衿), Li Q(李倩), Zhang F(张枫). Spectrophotometric determination of the total phenolic content in *Prunella vulgaris* L. by Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 212-216.
- Li YC(李颖畅), Lv YF(吕艳芳), Li JR(励建荣). Determination of polyphenol content in different varieties blueberry leaves by Folin-Ciocalteu colorimetry. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2014, 14: 273-278.
- Zhang J(张军), Li JX(李江遐), Lu CZ(陆翠珍), et al. Determination of the total content of polyphenols in the leaf of mulberry by Folin-ciocalteu colorimetry. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), 2012, 21: 131-134.