

Folin-Denis 分光光度法测定五倍子中单宁酸的含量

耿娜娜¹, 李学英^{1*}, 顾丁¹, 刘林²

(1. 遵义医学院细胞生物学与遗传学教研室, 贵州遵义 563099; 2. 遵义林源医药化工有限责任公司, 贵州遵义 563099)

摘要 [目的]探索 Folin-Denis 可见分光光度法精确快速测定五倍子中单宁酸含量的可行性。[方法]用水温浸提法消化五倍子后,其提取液中的单宁酸与 Folin-Denis 试剂反应形成稳定的蓝色配合物,通过测定该反应体系的吸光度来确定单宁酸的含量,同时验证最佳的检测条件。[结果]单宁酸浓度在 0.002 ~ 0.010 mg/ml 范围内,吸光度和单宁酸浓度具有良好的线性关系,符合回归方程 $A = 44.31c + 0.008$, $R^2 = 0.999 0$,加标回收率为 97.8% ~ 101.8%,相对标准偏差(RSD) < 0.5%,单宁酸平均含量为 82.0%。[结论]利用 Folin-Denis 分光光度法测定五倍子中单宁酸的含量,操作简便、快速、精密度高、重现性好、加标回收率较高。

关键词 Folin-Denis 试剂;分光光度法;五倍子;单宁酸;测定

中图分类号 TQ 947 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2013)29 - 11848 - 03

Determination of Tannic Acid Content in Gallnut by Folin-Denis Spectrophotometry

GENG Na-na et al (Department of Cell Biology and Genetics, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099)

Abstract [Objective] To explore the feasibility of using Folin-Denis visible spectrophotometry to detect accurately and quickly the content of tannic acid in gallnut. [Method] Gallnut was digested with water extraction method, then tannic acid in the extract and Folin-Denis can react to form a stable blue complex. According to measuring the absorbance of the color reaction system, the content of tannic acid was determined. At the same time, the best testing conditions were proved. [Result] There was a linear relationship between absorbance and concentration of tannic acid, when the concentration of tannic acid was in the range of 0.002 - 0.010 mg/ml. The regression equation was $A = 44.31c + 0.008$, $R^2 = 0.999 0$, and that the recovery rate was ranged from 97.8% to 101.8%, with an RSD (relative standard deviation) less than 0.5%, and that the average content of tannic acid was 82.0%. [Conclusion] Folin-Denis spectrophotometer could be a rapid method to detect the content of gallnut tannic acid with its simplicity, convenience, high precision, reproducibility, and high recovery.

Key words Folin-Denis reagent; Spectrophotometry; Gallnut; Tannic acid; Determination

五倍子(Chinese Gallnut),是瘿绵蚜科一些蚜虫寄生在漆树科盐肤木属植物上形成的一种虫瘿,其有效成分主要是单宁酸^[1]。单宁酸是一类多元酚类化合物,可广泛应用于鞣革、染料、医药、化工等方面^[2],它具有抑菌、抗突变、抗氧化等功效。近年来的研究发现,单宁酸还具有抗艾滋病病毒(HIV)和抗肿瘤作用^[3]。单宁酸含量测定的方法有很多,如皮粉法、香草醛法、KMnO₄法、高效液相色谱法(HPLC)。皮粉法^[4]精确度较高,但缺点是样品耗用多,测定周期长,且不易区别五倍子单宁和其他单宁,并且皮粉试剂的供应和质量都较难保证。香草醛法^[5]测定五倍子单宁酸显色很弱,灵敏度低。KMnO₄法^[6]中的 KMnO₄会氧化样品中的有机物质,导致结果偏高。HPLC法^[6]测定结果较为精确,但至今没有完善的国家标准,且需要纯度很高的标准物质,分析成本昂贵。分光光度法灵敏度较高、选择性好、耗时短、效率高。笔者采用 Folin-Denis 可见分光光度法测定五倍子中单宁酸的含量,并进一步探索最佳的检测条件,为快速准确地分析五倍子单宁酸提供依据。

1 材料与方

1.1 材料 供试样品:五倍子由贵州省遵义市林源医药化工有限责任公司提供,去杂粉碎后过 60 目筛,置于 60 °C 电

热恒温干燥箱中烘干,低温密闭保存备用。主要试剂:钨酸钠(Na₂WO₄ · 2H₂O)、磷钼酸(24MoO₃ · P₂O₅ · XH₂O)、磷酸(H₃PO₄ ≥ 85%)和无水碳酸钠(Na₂CO₃)均为分析纯,单宁酸标准品(C₇₆H₅₂O₄₆),含量 ≥ 95%,美国 Sigma 公司。主要仪器:754 紫外-可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;鼓风电热恒温干燥箱,浙江省嘉兴县新腾电热仪器厂;电热恒温水箱,天津市泰斯特仪器有限公司;电子天平(精度 1/10 000),北京赛多利斯仪器系统有限公司;超低温保存箱,青岛海尔特种电器有限公司;真空冷冻干燥机,美国 Labconco 公司。

1.2 方法

1.2.1 Folin-Denis 显色剂的制备。称取 50.0 g 钨酸钠、10.0 g 磷钼酸,加水溶解,移入 500 ml 回流瓶,再加入 25 ml H₃PO₄ 溶液,混匀,接冷凝管,沸水浴回流 2 h 后,静置冷却至室温,定容至 500 ml 容量瓶,置于棕色瓶中保存备用。

1.2.2 饱和 Na₂CO₃ 溶液的制备。称取 37.5 g 无水碳酸钠溶于 250 ml 温水中,冷却稀释至 500 ml,过滤备用。

1.2.3 单宁酸标准溶液的制备。准确称取单宁酸标准品 0.15 g 放入 50 ml 容量瓶中,加适量蒸馏水溶解,定容,摇匀,再稀释 10 倍,制成 0.3 mg/ml 的单宁酸标准溶液,用时现配。

1.2.4 待测样品液的制备。准确称取五倍子原料 4.001 g (精确至 0.001 g),置于 250 ml 三角锥形瓶中,加入适量蒸馏水,于 60 °C 电热恒温水箱中连续浸提 3 次,每次 2 h,残渣用蒸馏水不断重复浸提。将滤液和洗涤液合并后,用中速定量滤纸过滤,得提取液约 150 ml。

将上述提取液置于超低温保存箱过夜后,于真空冷冻干燥机干燥,得冻干粉末约 2.562 g。准确称取 0.2 g 溶于水

基金项目 贵州省教育厅特色药用资源研发创新团队项目([2013] 15)。

作者简介 耿娜娜(1989 -),女,安徽凤阳人,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail:23077252@qq.com。* 通讯作者,教授,从事生物学与药用资源研发利用。

收稿日期 2013-08-19

中,定容至 500 ml 容量瓶,得待测样品液。

1.2.5 Folin-Denis 显色反应。分别准确吸取一定量单宁酸标准液和待测样品液,置于盛有 20 ml 蒸馏水的 50 ml 容量瓶中,摇匀;加入 2.0 ml Folin-Denis 试剂,摇匀;静置 6 min 后,再加入 5.0 ml Na_2CO_3 溶液,用蒸馏水定容,摇匀。静置避光显色 80 min 后,以试剂空白(即 0.0 ml 单宁酸标准液)为参比,用 1 cm 比色皿在选定波长处测定其吸光值。

1.2.6 最佳测定条件的选择。

1.2.6.1 检测波长。吸取标准液和待测样品液各 1.0 ml,按试验方法显色后,在波长 400~880 nm 区间扫描(以 10 nm 为间隔),测定各波长处吸光值,绘制吸光度—波长曲线。

1.2.6.2 显色时间。吸取标准液和待测样品液各 1.0 ml,分别加入 2.0 ml Folin-Denis 试剂,静置 6 min 后再加入 5.0 ml Na_2CO_3 溶液,定容,显色 20、40、60、80、100、120、140 min 后分别测定各吸光值,绘制吸光度—显色时间曲线。

1.2.6.3 Na_2CO_3 溶液用量。吸取标准液和待测样品液各 1.0 ml,分别加入到 7 只 50 ml 容量瓶中,再分别加入 2.0 ml Folin-Denis 试剂,静置 6 min 后分别加入 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 ml Na_2CO_3 溶液,定容,显色后测定各吸光值,绘制吸光度— Na_2CO_3 用量曲线。

1.2.6.4 Folin-Denis 试剂用量。吸取标准液和待测样品液各 1.0 ml,分别加入到 6 只 50 ml 容量瓶中,再分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml Folin-Denis 试剂,静置 6 min 后分别加入 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 ml Na_2CO_3 溶液,定容,显色后测定各吸光值,绘制吸光度—Folin-Denis 试剂用量曲线。

1.3 单宁酸标准曲线的绘制 将标准液稀释 3 倍后,得 0.1 mg/ml 标准液的稀释液。分别准确吸取该稀释液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,按最佳试验条件显色后测定各吸光值。以单宁酸质量浓度 c (mg/ml) 为横坐标,吸光度值 A 为纵坐标绘制标准曲线。

1.4 样品中单宁酸含量的测定 吸取 1.0 ml 待测样品液,按最佳试验条件显色后测定各吸光值(重复测定 5 次),由标准曲线得出待测样品液中的单宁酸浓度,再按以下公式计算出提取液中单宁酸的总含量。

$$X = \frac{c \times V \times D}{m} \times 100\%$$

式中, X 为提取液中单宁酸的含量(%); c 为样品液中单宁酸的浓度(mg/ml); V 为样品液的定容体积(ml); D 为样品液的稀释倍数; m 为样品质量(mg)。

1.5 精密度的试验 准确吸取 1.0 ml 单宁酸标准液,按最佳试验条件显色,于波长 760 nm 处测定吸光值(重复测定 5 次),计算吸光值的 RSD 。

1.6 重现性试验 准确吸取待测样品液 1.0 ml,做 5 份平行样品液,按最佳试验条件分别显色,于波长 760 nm 处测定各吸光度值,并计算吸光值的 RSD 。

1.7 加标回收率试验 准确吸取待测样品液 0.5 ml 5 份,分别加入到 5 只 50 ml 容量瓶中,再依次加入 0.1、0.3、0.5、

0.7、0.9 ml 单宁酸标准液,分别显色测吸光值,并按公式:加标回收率 = [(测得的单宁酸含量 - 样品中单宁酸含量)/加入单宁酸标准品的含量] × 100% 计算加标回收率。

再准确吸取待测样品液 1.0 ml 5 份,分别加入到 5 只 50 ml 容量瓶中,再依次加入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 单宁酸标准液,分别显色测吸光值,并计算加标回收率。

2 结果与分析

2.1 最佳测定条件分析 由图 1 可见,单宁酸标准液和待测样品液显色后的吸收光谱趋势接近,且均在波长 $\lambda = 760$ nm 处有最大吸收峰。因此该试验选择 760 nm 为检测波长。

由图 2 可知,显色时间在 70~120 min 范围内,吸光强度趋于稳定,吸光值变化小于 1%。该试验显色时间选用 80 min。

由图 3 可见,吸光值随着 Na_2CO_3 用量的增加而增加,当 Na_2CO_3 用量达到 5.0 ml 时,吸光值达到最大,显色反应最完全;而当用量超过 5.0 ml 时,吸光值反而降低。因此,该试验选用 5.0 ml Na_2CO_3 溶液。

由图 4 可见,Folin-Denis 试剂用量在 2.0~3.0 ml 范围内时,反应体系较为稳定,其颜色较为清亮,对吸光值影响较小;当其用量超过 3.0 ml 时,反应体系中开始有白色沉淀物产生,且随着 Folin-Denis 试剂用量的增加,沉淀物越来越多,吸光值不稳定。因此,该试验选用 2.0 ml Folin-Denis 试剂。

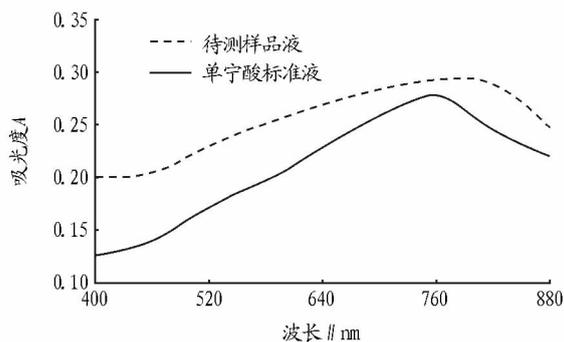


图 1 标准液和样品液不同波长处显色后的吸收曲线

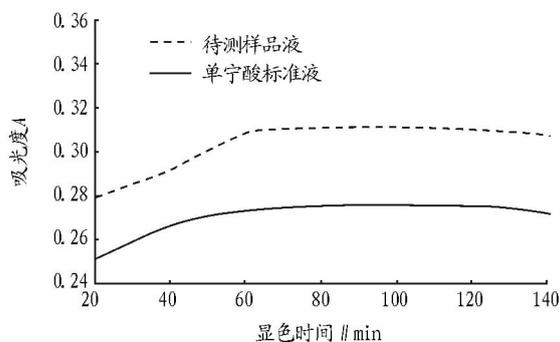


图 2 标准液和样品液显色不同时间后的吸收曲线

2.2 标准曲线和回归方程 由图 5 可见,标准曲线的回归方程为 $A = 44.31c + 0.008$, $R^2 = 0.9990$,线性范围为 0.002~0.010 mg/ml。

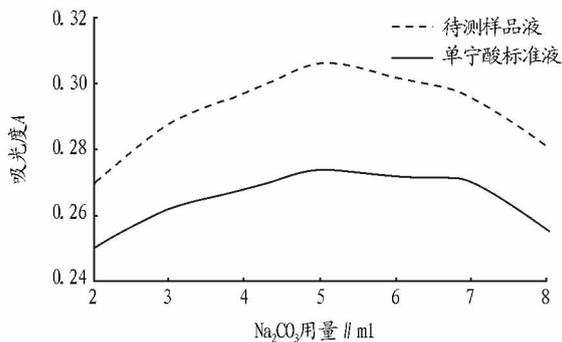


图3 标准液和样品液不同 Na_2CO_3 用量显色后的吸收曲线

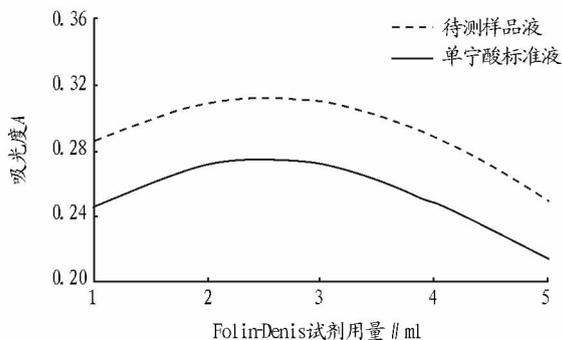


图4 标准液和样品液不同用量 Folin-Denis 试剂显色后的吸收曲线

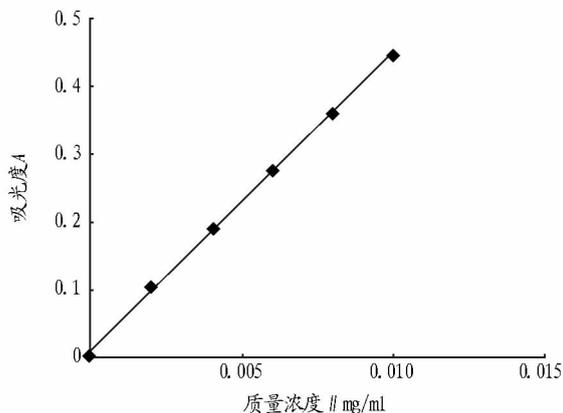


图5 单宁酸标准曲线

2.3 样品中单宁酸含量 试验得出,5次测定的吸光值分别为0.298、0.299、0.299、0.301、0.300,计算得样品中单宁酸的平均含量为52.9%,且5次测定结果的RSD为0.38%。

2.4 精密度试验 精密度试验的RSD为0.48%,表明此方法的精密度较高。

2.5 重现性试验 重现性试验的RSD为0.26%,表明此方法的重现性很好。

2.6 加标回收率 由表1可见,加标回收率在97.8%~101.8%,平均加标回收率为100.2%。

表1 加标回收率试验的结果

样品编号	加标量/mg	样品量/mg	吸光值	测得量/mg	加标回收率/%
1	0.03	0.164 35	0.180	0.194 09	99.1
2	0.09	0.164 35	0.233	0.253 89	99.5
3	0.15	0.164 35	0.289	0.317 08	101.8
4	0.21	0.164 35	0.342	0.376 89	101.2
5	0.27	0.164 35	0.392	0.433 31	99.6
6	0.03	0.328 37	0.325	0.357 71	97.8
7	0.06	0.328 37	0.353	0.389 30	101.6
8	0.09	0.328 37	0.378	0.417 51	99.0
9	0.12	0.328 37	0.407	0.450 24	101.6
10	0.15	0.328 37	0.433	0.479 58	100.8

3 结论

通过对最佳试验条件的验证,得到 Folin-Denis 分光光度法测定五倍子中单宁酸含量的最佳试验条件为:检测波长 760 nm,显色时间 80 min, Na_2CO_3 用量 5.0 ml,Folin-Denis 试剂用量 2.0 ml,适用于 50 ml 反应体系。

顾人侠等研究了酒石酸钾钠-硫酸亚铁可见分光光度法测定五倍子单宁酸的含量为 86.5%,精密度试验的 RSD 在 0.5%~0.9%,与《中国药典》的皮粉法测定的五倍子单宁酸含量 81.5% 比较,偏差较大^[7]。因为该法易受环境和测定条件(温度、时间等)影响,条件不易控制,容易产生误差,分析仪器的准确度和稳定性偏低,因此测定结果的精密度不高,且测定比较繁琐。笔者所用 Folin-Denis 分光光度法受环境(如温度)影响较小,分析仪器较前大为先进,测得五倍子单宁酸的含量为 82.0%,与皮粉法结果基本一致;该方法的平均加标回收率为 100.2%,RSD<0.5%,与顾人侠等

采用的分光光度法比较,该方法的精确度也较高;皮粉法测定五倍子单宁酸的时间为 7~8 h,该方法的测定时间约为 4 h,比皮粉法更为省时。

综上所述,利用 Folin-Denis 分光光度法测定五倍子中单宁酸的含量操作简便、快速、精密度高、重现性好、加标回收率高、分析成本低,适合于五倍子单宁酸的准确快速检测。

参考文献

- 乔彩云,李建科.五倍子及五倍子单宁的研究进展[J].食品工业科技,2011(7):458-462.
- 孙衍华,杨景芝,付蕾,等.溴氧化法测定五倍子中单宁的研究[J].分析实验室,2004,23(8):34-36.
- 刘慧文.分光光度法快速测定核桃仁中总单宁含量[J].研究报告,2010(6):35-36.
- 王全杰,任方萍,高龙.植物单宁的含量测定方法[J].西部皮革,2010,32(23):26-31.
- 杨景芝,孙衍华,王日为,等.碘氧化法测定中药五倍子中的单宁[J].应用化学,2005,22(2):227-229.

$$f = \mu N$$

式中: L —成型模具长度;

D —成型模具直径;

$f(l)$ —摩擦力密度;

μ —物料与成型模具间的摩擦系数。

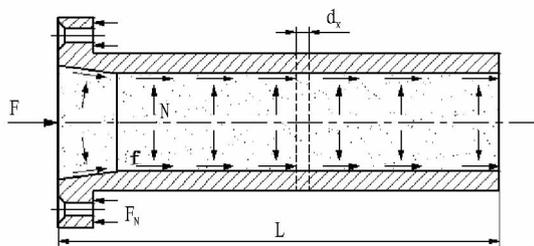


图 6 成型模具受力情况

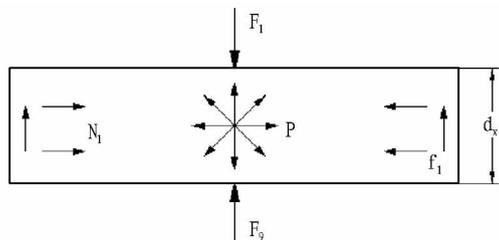


图 7 简化的受力模型

物料在成型的过程中,由于在成型模具中产生高压、高温的环境,使得物料中的木质素完全软化,当挤压力不在增加时,物料发生了塑化。塑化后的物料流动很充分,因此可以把长度为 d_x 成型模具看作是一个压力容器,对成型模具的受力进行简化,如图 7 所示。

根据图 6 的受力模型可得:

$$P = F_1 / S = \frac{4F_1}{\pi D^2}$$

$$N = P \pi D dx = \pi D \frac{4F_1}{\pi D^2} dx = \frac{4F_1 dx}{D}$$

由上述两式和图 7 可得:

$$F_1 = \int_0^L f(l) ds + F_2 = \pi D N \mu dx + \int_0^L f(l) dl$$

根据图 6 所示,由于沿轴的方向上压力 N 是变化的,因此摩擦力 f 也是变化的。设成型模具的环向应力为 σ_θ ,轴向应力为 σ_x , t 为假设等压容器的壁厚,如图 8~9 所示。由于容器壁很薄,因此可以假设环向应力 σ_θ 和轴向应力 σ_x 沿成型模具壁的厚度方向上均匀分布。根据力学平衡条件有:

$$\sigma_x (\pi D t) - P \frac{\pi D^2}{4} = 0$$

$$\sigma_\theta (1 \times 2t) - P (1 \times D) = 0$$

解得:

$$\sigma_x = PD/4t; \sigma_\theta = PD/2t$$

根据广义胡克定律,环向应变 ε_θ 与环向应力 σ_θ 、轴向应力 σ_x 二者有关,即有关系式:

$$\varepsilon_\theta = \frac{\sigma_\theta}{E} - \mu \frac{\sigma_x}{E}$$

带入到公式解得:

$$P = \frac{2Et\varepsilon_\theta}{D(1-0.5\mu)}$$

式中: P —成型模具内部各点压强;

E —成型模具的弹性模量;

μ —成型模具的泊松比。

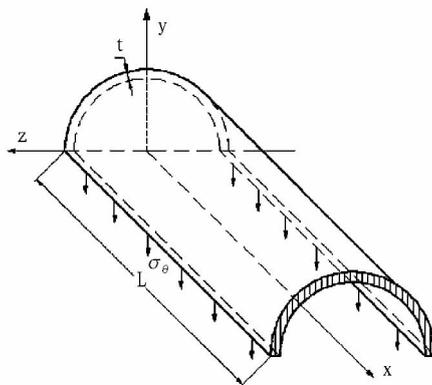


图 8 成型模具环向应变力分析

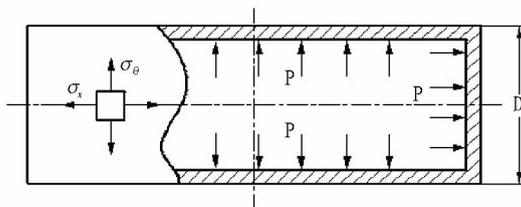


图 9 成型模具截面受力分析

通过上述的力学计算分析可知:要想得到成型模具内部任何一点的压强 P ,只要确定成型模具内部该点的环向应变 ε_θ 即可,进而可以计算出该处的摩擦力和压力。

3 结论

该文对环模成型机的成型模具进行了全新的结构改进设计,采用镶嵌型的成型模具,可以有效地减少模具的磨损,延长模具的循环使用寿命,方便更换维修,降低了生产成本。同时,对成型模具在工作过程中进行了力学分析,为以后的进一步研究提供了理论依据。

参考文献

[1] 王字满. 生物质成型模具检测技术及模具优化设计[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2012.
 [2] 阳向军. 卧式环模制粒机环模失效原因浅析[J]. 饲料工业,2003(9):9-10.
 [3] 吴劲锋. 制粒环模磨损失效机理研究及优化设计[D]. 兰州:兰州理工大学,2008.
 [7] 顾人侠,谢常实,徐崇福,等. 分光光度法测定倍子单宁酸的研究[J]. 林产化学与工业,1985(4):12-23.

(上接第 11850 页)

[6] 吕翔,杨子祥,李杨,等. 五倍子单宁含量测定方法的比较研究[J]. 西南农业学报,2012,25(3):1080-1084.