

Folin - Ciocalteu 比色法测定头花蓼多酚含量

江楠¹, 李潇彬², 顾曼琦², 廖莉玲^{2*}

(1. 贵州轻工职业技术学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州师范大学化学与材料科学学院, 贵州贵阳 550001)

摘要 [目的]建立头花蓼中多酚含量的比色测定方法。[方法]以没食子酸为对照品,对测定头花蓼中多酚含量的比色条件(包括检测波长、 Na_2CO_3 用量、Folin - Ciocalteu 试剂用量、反应温度及时间对吸光值的影响)进行了研究。[结果]当 FC 试剂用量为 2.5 mL, 12% Na_2CO_3 用量为 7 mL 时,在 35 °C 下反应 40 min 为最佳反应条件;多酚的含量与 760 nm 处吸光度呈良好的线性关系;测定方法的平均回收率为 98.66%, RSD 为 0.380%。[结论]该方法不仅操作简单,而且稳定性、重现性、精密度好,能够用于头花蓼提取液多酚含量的测定。

关键词 头花蓼;多酚;Folin - Ciocalteu 比色法;检测条件

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)23-0114-02

Determination of Polyphenols in *Polygonum capitatum* by Folin-Ciocalteu Colorimetry

JIANG Nan¹, LI Xiao-bin², GU Man-qi², LIAO Li-ling^{2*} (1. Guizhou Institute of Light Industry, Guiyang, Guizhou 550025; 2. School of Chemistry and Material Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a colorimetric method for the determination of polyphenols in *Polygonum capitatum*. [Method] To gallic acid as a reference substance, the colorimetric conditions (the effects of detection wavelength, Na_2CO_3 dosage, Folin-Ciocalteu reagent dosage, reaction temperature and time on the absorbance value) were studied. [Result] When Folin-Ciocalteu reagent was 2.5 mL and 12% sodium carbonate solution was 7 mL, reaction 40 min at 35 °C, there was a good linearity between the absorbance and gallic acid concentration in 760 nm, the average recovery was 98.66% and RSD was 0.380%. [Conclusion] This method is simple, accurate, repeatable and stable. It can be used for the determination of polyphenol content in *Polygonum capitatum*.

Key words *Polygonum capitatum*; Polyphenol; Folin-Ciocalteu colorimetry; Detecting condition

头花蓼 (*Polygonum capitatum*) 为蓼科 (Polygonaceae) 蓼属 (*Polygonum* L.) 多年生植物, 又名小红要、小红藤等, 主要分布在贵州、云南等地, 现广泛用于治疗泌尿系统疾病^[1]。目前从头花蓼中分离和鉴定的主要化合物为黄酮类、酚酸类、有机酸、醇、酯、醛类等^[2-3]。方炜等^[4]用高速逆流色谱法同时分离制备得到头花蓼中没食子酸和原儿茶酸; 刘跃等^[5]建立了头花蓼药材中没食子酸、原儿茶酸、陆地棉苷、槲皮苷、儿茶素、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷及槲皮素的 UPLC - MRM - MS 检测方法; 李占彬等^[6]利用 HPLC - MS/MS 同时测定头花蓼中 6 种酚酸类有效成分。这些检测方法虽然结果精确, 但所需要的仪器价格高昂, 操作也复杂。Folin - Ciocalteu 比色法由于操作简单、成本低, 已广泛用于测定植物中多酚的含量^[7-10]。笔者探讨了 Folin - Ciocalteu 比色法测定头花蓼总多酚的条件。

1 材料与与方法

1.1 仪器 101 - 1A 型电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司), A200S 型电子天平 (Made in Germany), 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), KDM 型控温电热套 (山东鄞城华鲁电热仪器有限公司), UV2300 分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司), FZ102 型微型植物粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司)^[7]。

1.2 试材 头花蓼 (施秉三元威门公司), 没食子酸标准品 (贵州迪大生物科技有限公司), Folin - Ciocalteu (分析纯)。

基金项目 贵州省科技厅 2014 年度贵州省科技厅与贵州师范大学联合基金项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7064 号)。

作者简介 江楠 (1962—), 女, 贵州遵义人, 副教授, 从事食品化学、药物化学方向研究。* 通讯作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事天然产物研究。

收稿日期 2017 - 05 - 31

1.3 方法

1.3.1 对照品溶液的制备。精密称取没食子酸 0.025 0 g, 精确配制成 0.025 0 mg/L 的没食子酸标准溶液。

1.3.2 头花蓼样液制备。在 70 °C 下将 2.0 g 头花蓼粉末用 100 mL 水回流提取 2 次, 每次 1 h。将提取液稀释于 500 mL 即得到待测试样。

1.3.3 Folin - Ciocalteu 法检测条件。

1.3.3.1 比色波长的测定。分别移取 2.0 mL 标准液和样品液, 加入 2.0 mL FC 试剂及 6.0 mL 12% 的 Na_2CO_3 后稀释至 25 mL, 30 °C 显色 1 h 后, 在 400 ~ 900 nm 波长范围内扫描, 确定最佳检测波长。

1.3.3.2 FC 试剂用量的研究。取 1 mL 样品液, 6 mL 12% Na_2CO_3 溶液, 然后分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 的 FC 试剂, 均定容到 25 mL 棕色容量瓶中, 30 °C 下显色 1 h 后以试剂空白作参比, 在 760 nm 下测定吸光度。

1.3.3.3 Na_2CO_3 用量的研究。取 1 mL 样品液、2.5 mL FC 试剂, 12% Na_2CO_3 溶液的用量分别为 3、4、5、6、7、8 mL, 均定容到 25 mL 棕色容量瓶中, 30 °C 下显色 1 h 后以试剂空白作参比, 在 760 nm 下测定吸光度。

1.3.3.4 显色时间和温度的确定。取 1 mL 样品液、2.5 mL FC 试剂、7 mL Na_2CO_3 溶液, 均定容至 25 mL 棕色容量瓶中。分别在 20、25、30、35、40 °C 下显色 10、20、30、40、50、60 min 后以试剂空白作参比, 在 760 nm 下测定吸光度。

1.3.4 方法评价

1.3.4.1 标准曲线的建立。分别取没食子酸标准品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 用最适宜的条件显色后测吸光度。以没食子酸浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.4.2 稳定性试验。分别测定头花蓼样液显色反应完全 (40 min) 后 0、20、40、60、80、100 min 的吸光度,该比色法的稳定性根据吸光度的变化来评价。

1.3.4.3 精密度试验。精密量取头花蓼样液,按照标准曲线的测定方法测定吸光度,重复测定 5 次,以吸光度分析结果的相对标准偏差 (RSD) 评价该仪器精密度。

1.3.4.4 重现性试验。同一批头花蓼样品取 5 份提取液,按照标准曲线方法进行检测,以吸光度分析结果的 RSD 评价该比色法重现性。

1.3.4.5 加标回收试验。分别测定提取液中加入不同量的没食子酸后的多酚含量,并计算其回收率和 RSD,以此评价该比色方法的准确度和可靠性。

2 结果与分析

2.1 比色条件的测定

2.1.1 最佳吸收波长。从图 1 可以看出,样品液和标准液在 760 nm 处有最大吸光度,因此确定最佳吸收波长为 760 nm。

2.1.2 最佳 FC 试剂用量。当 FC 试剂用量为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 时,吸光度分别为 0.346、0.384、0.401、0.429、0.461、0.460。由此可见,FC 试剂用量在 0.5~2.0 mL 随着用量的增加吸光度也在增加,在 2.5 mL 时达到最大值,之后吸光度开始稳定,因此选择 2.5 mL 为最佳用量。

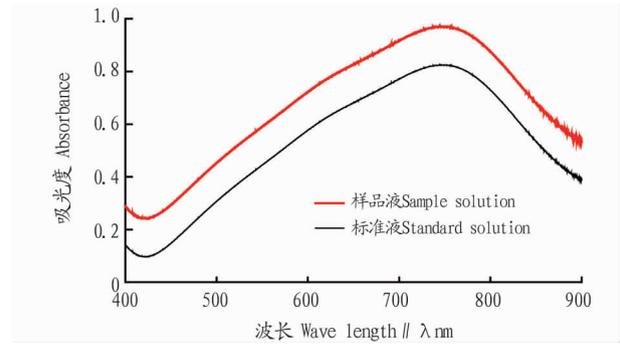


图 1 标准和样品溶液的光谱吸收曲线

Fig. 1 The spectral absorption curve of standard and sample solution

2.1.3 最佳 Na_2CO_3 用量。当 Na_2CO_3 用量为 3、4、5、6、7、8 mL 时,吸光度分别为 0.414、0.434、0.457、0.461、0.464、0.464。由此可见,从 7 mL 开始吸光度随着 Na_2CO_3 用量的增加而稳定开始趋于平缓,因此选择 7 mL 为最佳用量。

2.1.4 最佳显色温度和时间。从表 1 可以看出,温度较低时,显色反应缓慢且吸光度较小;当温度升高时,显色反应加快且吸光度增大;但温度升至 40 °C 吸光度反而降低,表明显色温度不能太高。因此选择最佳反应温度和时间分别为 35 °C、40 min。

表 1 不同温度和反应时间的吸光度

Table 1 Absorbance of the different temperature and reaction time

温度 Temperature // °C	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
20	0.350	0.360	0.371	0.386	0.420	0.426
25	0.365	0.379	0.395	0.420	0.435	0.444
30	0.409	0.419	0.426	0.435	0.447	0.464
35	0.428	0.456	0.459	0.464	0.464	0.463
40	0.459	0.453	0.451	0.446	0.441	0.420

2.2 比色方法评价

2.2.1 标准曲线。以没食子酸溶液浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程 $y = 0.1313x + 0.0053$ ($R^2 = 0.9993$),线性关系良好,该方程可用于头花蓼多酚的定量测定。

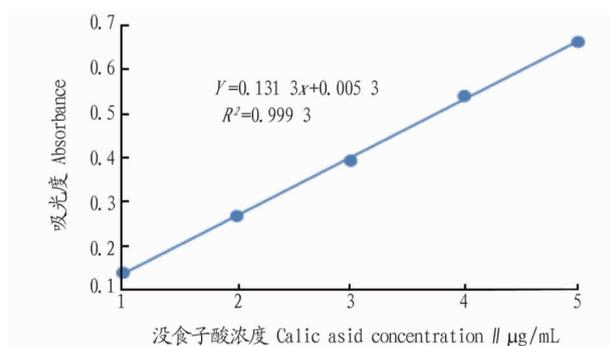


图 2 头花蓼多酚测定的标准曲线

Fig. 2 Standard curve for the determination of polyphenols in *Polygonum capitatum*

2.2.2 稳定性试验。在完全反应后 0、20、40、60、80、100 min 时的吸光度分别为 0.466、0.465、0.466、0.464、0.463、0.463, RSD 为 0.297%。由此可见,溶液在 100 min 内稳定性良好。

2.2.3 精密度试验。溶液重复测定 5 次的吸光度分别为 0.464、0.464、0.465、0.464、0.463, RSD 为 0.152%。表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验。同一批头花蓼分别提取 5 次。5 份溶液的吸光度分别为 0.466、0.466、0.464、0.464、0.465, RSD 为 0.215%。表明该方法重复性良好。

2.2.5 加标回收试验。由表 2 可知,4 次加标回收率在 98.33%~98.98%,平均回收率为 98.66%,RSD 为 0.380%。表明该研究所建立的 Folin - Ciocalteu 检测法准确可靠,完全可用于头花蓼多酚含量的测定。

表 2 加标回收率试验结果

Table 2 Results of recovery rate experiment

加标量 Adding standard matter amount // µg/L	总酚含量 Polyphenol content µg/L	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
25	113.96	98.98	98.66	0.380
25	113.96	98.98		
50	137.79	98.33		
50	137.79	98.33		

为 4 726.30 亿元/a, 占森林生态总价值的 52.21%, 说明森林涵养水源功能显著, 能在防洪排涝中起到重要作用; 其次为固碳释氧, 产生价值 2 896.32 亿元/a, 占总价值的 32.00%; 最后, 固土保肥、净化大气、积累营养物质、游憩功能所产生的价值分别占总价值的 7.92%、5.29%、2.01% 和 0.57%。

表 2 湖南省森林生态系统各项服务价值及总价值量

Province	Value classification	Annual flow value
功能分类 Function classification	价值类别 Value classification	年流量价值 Annual flow value
涵养水源 Water conservation	调节水量价值	3 551.60
	净化水质价值	1 174.70
固土保肥 Soil conservation	固土价值	188.61
	保肥价值	528.33
固碳释氧 Carbon fixation and oxygen released	固碳价值	1 104.97
	释氧价值	1 791.35
积累营养物质 Nutrient accumulation	积累营养物质价值	182.01
净化大气 Atmosphere environmental purification	吸收有害气体价值	1.34
	滞尘价值	477.82
森林游憩 Forest recreation	游憩价值	51.62
合计 Total		9 052.35

(上接第 115 页)

3 结论

(1) 该研究采用 Folin - Ciocalteu 比色法测头花蓼多酚含量, 确定最佳的显色条件为: 2.5 mL Folin - Ciocalteu 试剂、7 mL 12% Na₂CO₃、显色温度 35 °C、显色时间 40 min、测定波长 760 nm。标准曲线的线性回归方程为 $y = 0.131 3x + 0.005 3$ ($R^2 = 0.999 3$)。

(2) 该方法的稳定性试验、精密度试验、重现性试验、回收率试验的 RSD 分别 0.297%、0.152%、0.215%、0.380%, 表明该研究建立起的 Folin - Ciocalteu 法测定头花蓼多酚含量可信、可靠。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 147.

3 结论

根据湖南省森林生态系统服务价值的综合评价结果, 可以得出以下结论: 从评估结果上看, 湖南省森林生态系统服务功能价值构成中, 涵养水源和固碳释氧 2 项服务功能价值占总价值的 84.21%, 在湖南省森林生态服务中发挥着重要作用。从评价结果与全省同期 GDP 的比较来看, 2015 年湖南省森林生态系统服务价值占全省国内生产总值的 31.32%; 单位有林地面积的服务价值为 8.21 万元/hm²。根据 2016 年湖南省统计年鉴可知, 2015 年湖南省林业生产总值为 3 173 766 万元。从森林生态系统服务功能的评估结果来看, 湖南省森林生态系统的生态价值是林业生产总值的 28.52 倍。由此可知, 森林生态系统的价值不仅体现在林木的培育和种植、竹木采运和提供林产品等直接经济价值上, 更重要的是与直接经济价值相比, 它为区域经济与社会发展所提供的潜在生态价值, 森林所产生的生态价值更大。

参考文献

- [1] 段晓峰, 许学工. 区域森林生态系统服务功能评价: 以山东省为例[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2006, 42(6): 751 - 756.
- [2] 邓湘雯. 不同年龄阶段会同杉木林水文学过程定位研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2007.
- [3] 康文星, 田大伦. 湖南省森林公益效能的经济评价 II 森林的固土保肥、改良土壤和净化大气效益[J]. 中南林学院学报, 2001, 21(4): 1 - 4.
- [4] 康文星, 田大伦. 湖南省森林公益效能的经济评价 I 森林的木材生产效益与水源涵养效益[J]. 中南林学院学报, 2001, 21(3): 13 - 17.
- [5] 李晓曼, 康文星. 广州市城市森林生态系统碳汇功能研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(1): 8 - 13.
- [6] 《中国生物多样性国情研究报告》编写组. 中国生物多样性国情研究报告[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998.

- [2] 谢宇, 张丽丽, 徐亮, 等. HPLC 特征图谱对 GAP 基地产头花蓼药材品质控制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(8): 70 - 72.
- [3] 王洪平, 曹芳, 杨秀伟. 头花蓼地上部分的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(1): 24 - 30.
- [4] 方炜, 万金志, 张丽艳. 高速逆流色谱法同时分离制备头花蓼中没食子酸和原儿茶酸[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 299 - 303.
- [5] 刘跃, 胡杰, 谢玉敏, 等. UPLC - MRM - MS 法测定头花蓼药材中 7 个指标成分[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 73 - 76, 88.
- [6] 李占彬, 杨鸿波, 谭红, 等. 贵州特色中药头花蓼中六种酚酸类有效成分的 HPLC - MS/MS 同时测定[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 850 - 852.
- [7] 崔紫姣, 张彩云, 刘彬彬, 等. Folin - Ciocalteu 比色法测定甜茶总多酚含量[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(3): 158 - 160.
- [8] 刘丽香, TANGUY LAURA, 梁兴飞, 等. Folin - Ciocalteu 比色法测定苦丁茶中多酚含量[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 101 - 106.
- [9] 牛广财, 闫公昕, 朱丹, 等. Folin - Ciocalteu 比色法测定沙棘酒中总多酚含量的工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 80 - 83, 142.
- [10] 杨磊, 隋小宇, 祖元刚, 等. Folin - Ciocalteu 法测定迷迭香中总酚酸含量[J]. 中成药, 2009, 31(2): 272 - 275.