

杨春妹, 李志明, 范先婷, 等. 福林酚比色法测定海藻多酚的反应条件优化[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 238-245.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.027

福林酚比色法测定海藻多酚的反应条件优化

杨春妹, 李志明, 范先婷, 沈 宏

(华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为明确福林酚比色法测定海藻多酚含量的反应条件, 本研究采用单因素试验和正交试验相结合的方法, 优化了福林酚用量、碳酸钠用量、反应时间、反应温度等福林酚法测海藻多酚含量的检测条件; 并进一步分析了外源物质(有机物质、无机离子)对测定结果的影响。结果表明, 应用福林酚比色法测定海藻多酚的最佳反应条件为: 12% 福林酚 5 ml、3% 碳酸钠 4 ml、反应温度 37 ℃、反应时间 30 min、最佳吸收波长 730 nm; 该方法的加标回收率为 96.70%~103.67%, 相对标准差 2.68%。优化的福林酚法测得 7 种藻类的多酚含量为 120.0~273.0 mg/L, 其测定结果与国家标准茶多酚检测法的检测结果一致。外源添加 1% 或 5% 的 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cl^- 、 I^- 、蛋白质、可溶性淀粉测定结果增加 2.31%~149.79%; 添加 5% 的 Zn^{2+} 、 CO_3^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 测定结果显著降低, 而山梨酸钾、葡萄糖、D-山梨醇对福林酚比色法检测海藻多酚含量无明显影响。本研究建立的海藻多酚检测法的稳定性、重现性以及加标回收率的相对标准差均低于 3%, 符合检测要求。

关键词: 海藻多酚; 福林酚比色法; 海藻; 有机物质; 无机离子

中图分类号: TS201.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)01-0238-08

Study on determination conditions of seaweed polyphenols by Folin-Ciocalteu colorimetry

YANG Chun-mei, LI Zhi-ming, FAN Xian-ting, SHEN Hong

(College of Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to clarify the reaction conditions for the determination of seaweed polyphenol content by Folin-Ciocalteu colorimetric method, single factor test and orthogonal test were used to optimize the amount and concentration of Folin phenol, the amount and concentration of sodium carbonate, the reaction time and the reaction temperature. The effects of exogenous substances (organic substances and inorganic ions) on the determination results were further analyzed. The results showed that the optimum conditions for the determination of seaweed polyphenols by Folin-Ciocalteu colorimetric method were 12% Folin phenol 5 ml, 3% sodium carbonate 4 ml, reaction temperature 37 ℃, reaction time 30 min and the best absorption wavelength 730 nm. The recovery of this method was 96.70%~103.67%, and the relative standard deviation was 2.68%. The polyphenol content of seven kinds of algae measured by the optimized Folin-Ciocalteu colorimetric method was

120.0~273.0 mg/L, which was consistent with the results of national standard tea polyphenol detection method. Exogenous addition of 1% or 5% Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cl^- , I^- , protein, soluble starch would increase the determination results by 2.31%~149.79%. The addition of 5% Zn^{2+} , CO_3^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} significantly reduced the determination results, while glycine, potassium sorbate, glu-

收稿日期: 2022-05-27

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2021A15150121-13); 国家重点研发计划项目(2016YFD0200405-5)

作者简介: 杨春妹(1997-), 女, 云南大理人, 硕士研究生, 主要从事海藻提取物相关方向的研究。(E-mail) 2057707404@qq.com

通讯作者: 沈 宏, (E-mail) hshen@scau.edu.cn

cose and *D*-sorbitol had no significant effect on the determination of algae polyphenol content by Folin-Ciocalteu colorimetric method. The relative standard deviations of stability, reproducibility and the recovery of seaweed polyphenols detection method established in this study were all lower than 3%, which met the detection requirements.

Key words: seaweed polyphenols; Folin-Ciocalteu colorimetry; algae; organic matter; inorganic ions

海藻是重要的生物资源,其自身细胞为了适应低温、高盐、寡照等恶劣的海洋环境,产生次级代谢产物来保护自身细胞免受氧化应激的损伤^[1]。次级代谢产物主要包括海藻酸、海藻多酚、甘露醇、甜菜碱等^[2-3],其中海藻多酚是以间苯三酚为基本结构单位,通过不同连接方式而构成的一类酚羟基化合物^[4],已被证实具有较强的抗氧化、抗菌、抗癌等生物活性,广泛应用于食品、化妆品、农业等领域^[5]。

海藻多酚的种类多样,易氧化,且结构不稳定,因此在尽可能保持海藻多酚原有结构的基础上采用适宜的检测方法才能准确测定海藻多酚含量。目前关于化合物多酚含量的检测方法有光谱法、色谱法、质谱法 3 种^[6]。色谱法和质谱法灵敏性高,检测时间短,但操作复杂且设备昂贵。光谱法中的福林酚比色法是在碱性环境下,酚类化合物将钨钼酸还原,生成蓝色的化合物。其具有操作简单、检测快速、准确性高等特点而被广泛应用^[7-8]。但由于多酚类物质的来源、化学结构和含量不同^[9],文献所报道的福林酚比色法检测条件(福林酚和碳酸钠浓度和用量等)都不尽相同。张洋婷等用福林酚 1.0 ml,10%碳酸钠 8 ml 测定酸浆宿萼总多酚的含量^[10];吴晓青等用福林酚 3.0 ml,10%碳酸钠 4.0 ml 测定檀香橄榄总多酚的含量^[11];高志远等用 15%福林酚 1 ml,5%碳酸钠 0.8 ml 测定甘薯块根多酚的含量^[12];茶多酚测定的国家标准 GB/T 8313—2018 中用的是 10%福林酚 5.0 ml,7.5%碳酸钠 4.0 ml^[13]。而不同的试剂用量又影响到检测结果,因此一些学者还采用单因素试验法开展了福林酚比色法的优化条件研究^[10,12]。但目前采用福林酚法检测海藻多酚的报道还比较少见。此外,海藻中富含 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 等无机离子及蛋白质、淀粉等有机物,这些物质对海藻多酚含量的检测是否存在影响还鲜有报道。

针对上述问题,本研究首先采用单因素和正交试验优化了福林酚法检测海藻多酚的反应条件,然后对此方法的稳定性和可靠性进行评价,并用优化的福林酚法和国家标准茶多酚检测法测定了不同藻

类中多酚的含量,最后分析了外源物质对海藻多酚含量测定的影响,以期海藻多酚的测定及应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

海藻液及 7 种藻类[羊栖菜(*Hizikia fusiforme*)、海带(*Laminaria japonica*)、马尾藻(*Sargassum fusiforme*)、泡叶藻(*Ascophyllum nodosum*)、面条藻(*Durvillaea antarctica*)、N 藻(*Lessonia nigrescens*)、F 藻(*Lessonia flavicans*)]购于广州申晶雅农业科技有限公司。

1.2 仪器和设备

恒温水浴锅(HWS-5A),上海百典仪器设备有限公司制造;离心机(H1850R),湘仪离心机仪器有限公司制造;754 型紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平仪器有限公司制造;恒温摇床(BSD-YX 3200),上海博迅实业公司制造。

1.3 最佳吸收波长的选择

参考茶多酚检测的反应条件,分别吸取 1.0 ml 样液(海藻液)和标液(0.1 mg/mL 没食子酸)于试管,在每个试管中分别加入 10%(体积分数)福林酚 5.0 ml,摇匀。反应 5 min 后,加质量浓度 7.5%碳酸钠溶液 4.0 ml,摇匀,室温下暗反应 45 min 后,在 500~800 nm 波长以 1 nm 为步长测定吸光值,选择最佳吸收波长。

1.4 福林酚比色法检测海藻多酚含量的条件优化

以上述反应条件为基础,依次改变福林酚用量(2.0 ml、3.0 ml、4.0 ml、5.0 ml、6.0 ml、7.0 ml、8.0 ml)、福林酚体积分数(2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%)、碳酸钠用量(1.0 ml、2.0 ml、3.0 ml、4.0 ml、5 ml、6.0 ml、7.0 ml)、碳酸钠质量浓度(1%、3%、5%、7%、9%、11%、13%)、反应温度(32 ℃、37 ℃、42 ℃、47 ℃、52 ℃、57 ℃、62 ℃)、暗反应时间(10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min) 6 个因素中的一个,开展海藻多酚检测条件的单因素优化试验。

根据单因素试验结果,选取对海藻多酚含量检测敏感因素各自最好的 3 个水平进行正交试验,每个处理重复 3 次。进而明确海藻多酚含量检测的最优条件。

1.5 检测方法的评价

标准曲线绘制:以没食子酸为标准品,配制质量浓度为 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L 的没食子酸工作液,用优化的福林酚法测定其吸光值。以吸光值为 Y 轴,没食子酸浓度为 x 轴,绘制标准曲线。

重复性评价:用优化的福林酚法测定 5 份海藻液的吸光值。计算相对标准偏差,评价该方法的重复性。

稳定性评价:海藻液在最佳条件下反应 30 min 后,在 5 h 内每隔 1 h 测定一次吸光值,计算其相对标准偏差,分析该方法在一定时间内的稳定性。

加标回收率试验:分别取 0.5 ml 质量浓度为 10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L 的标液于试管中,且每个试管加 0.5 ml 已知多酚含量的样液,用优化的福林酚法测其吸光值,评价方法的准确性。加标回收率的计算按下式进行:

加标回收率 = (加标后测定的含量 - 样品含量) / 加标量 \times 100%。

1.6 优化的福林酚法和国家标准茶多酚检测法测定不同藻类中多酚含量

海藻经清洗、烘干、粉碎后,过 0.15 mm 筛备用。分别称取 3.00 g 样品,加水至 100 ml,调节体系 pH 为 8.5,加 1.5 ml 纯海藻酸裂解酶^[14],在 180 r/min、40 °C 条件下降解 18 h。降解结束后,离心,收集上清液,分别用优化的福林酚法和国家标准茶多酚检测法测定多酚的含量。

1.7 有机物质或无机离子对福林酚法测海藻多酚的影响

每个试管依次添加质量浓度 1% 或 5% 阳离子 (Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+})、阴离子 (F^- 、 Cl^- 、 I^- 、 CO_3^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-})、有机物质 (甘氨酸、山梨酸钾、蛋白质、可溶性淀粉、葡萄糖、 D -山梨醇) 的样液 1 ml,用优化的福林酚法测其吸光值。以不添加其他成分的样液为对照,每个处理重复三次。

1.8 数据处理及统计分析

采用 Excel 2016 进行数据分析,用 SPSS statistic 25 的 Duncan's 新复极差法进行处理间差异的显

著性分析,用 Origin 2017 作图。

2 结果与分析

2.1 最佳吸收波长的确定

研究结果表明福林酚与多酚的反应物在 680~780 nm 处有较大吸收^[10]。将样液 (海藻液)、标液 (没食子酸) 与福林酚反应后,于 500~800 nm 波长扫描,其光谱吸收曲线如图 1。从图 1 可知样液、标液的吸光值均随波长的增加而先增后减,在 730 nm 处达最大值,故选 730 nm 为福林酚法测定海藻多酚的最佳吸收波长。

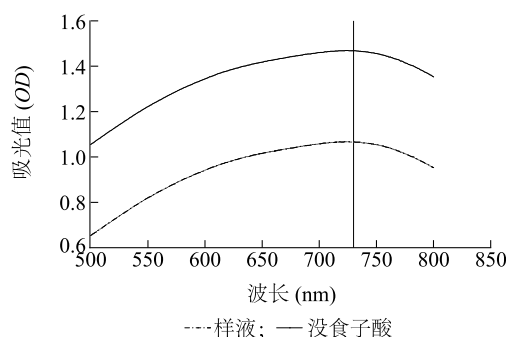


图 1 样液和标液的光谱吸收曲线

Fig.1 Spectral absorption curves of sample solution and standard solution

2.2 福林酚法测海藻多酚的反应条件优化

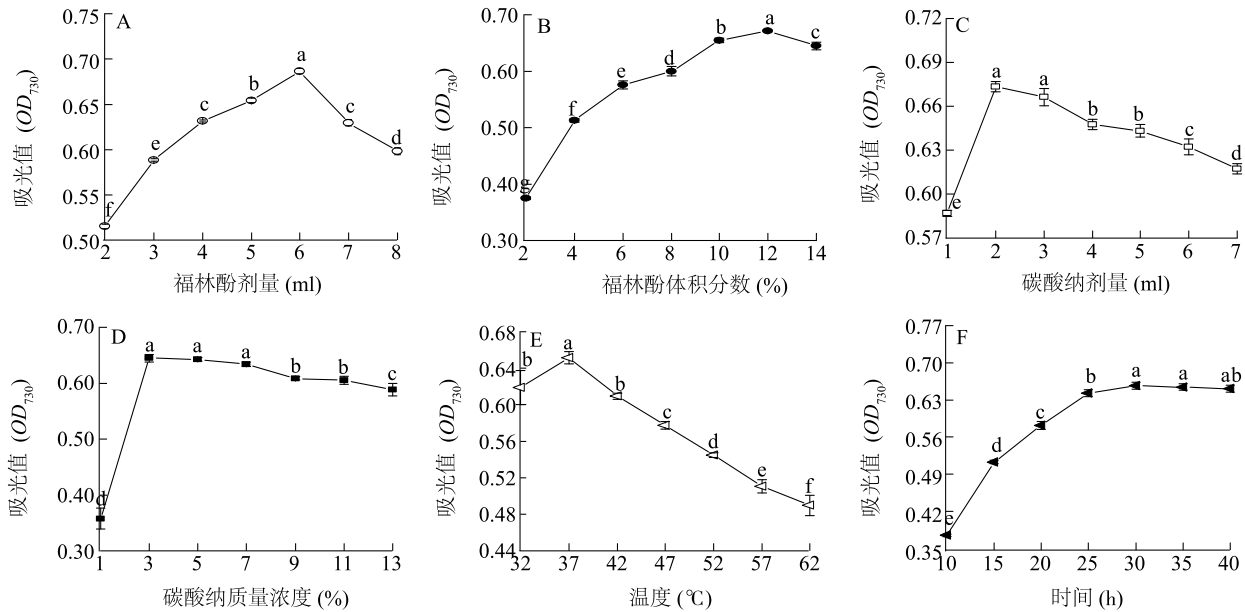
福林酚剂量和体积分数对福林酚法测定海藻多酚的影响如图 2A、图 2B 所示。随着福林酚用量或体积分数的不断增加,吸光值呈现先增后减的趋势,福林酚试剂用量在 6 ml 时吸光值达最大,显色效果最好 (图 2A);当福林酚试剂的体积分数为 12% 时吸光值最大,其吸光值比体积分数为 2% 时增加 79.18% (图 2B)。

碳酸钠溶液是显色介质,其用量或质量浓度较低时,显色液呈草绿色,显色效果差,导致测定结果偏低^[15]。碳酸钠剂量和质量浓度对福林酚法测海藻多酚的影响如图 2C、图 2D 所示。吸光值随碳酸钠剂量和质量浓度的增加也呈现先增加后减少的特征。碳酸钠剂量为 2 ml 时,吸光值最大。当碳酸钠用量大于 3 ml 时,吸光值反而因碱性过强而下降 (图 2C);当碳酸钠质量浓度小于 3% 或大于 7% 时,吸光值均较低。当碳酸钠质量浓度为 3% 时,吸光值最大,其值比 1% 增加了 80.24% (图 2D)。

温度对福林酚法测定海藻多酚的影响如图 2E 所示。随反应温度的升高,730 nm 吸光值亦表现出先增加后减少的趋势。当反应温度 37 ℃ 时,吸光值最高;62 ℃ 的反应温度下,海藻液吸光值仅为 0.489 7,相比于 37 ℃ 时减少了 24. 82%。

福林酚试剂与多酚类物质的显色需要一定的时

间,反应时间对显色效果的影响如图 2F 所示。当反应时间介于 10~30 min 时,吸光值随时间的延长而增加;反应时间 30 min 时的海藻液吸光值比 10 min 时增加了 75. 36%。而当反应时间进一步增加时,海藻液吸光值无显著变化。这说明,只要反应时间达 30 min 后,反应时间对吸光值将无显著影响。



图中不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 不同反应条件下海藻液吸光值的变化

Fig.2 Changes of optical density at 730 nm under different reaction conditions by Folin-Ciocalteu colorimetric method

上述单因素试验结果表明福林酚用量与体积分数、碳酸钠用量与质量浓度以及反应温度对海藻液 730 nm 吸光值有较大影响,而反应时间大于 30 min 后,对吸光值影响不大。进一步根据上述

试验结果,选取各单素最优的 3 个水平(表 1)进行正交试验,以确定最优的福林酚法测定海藻多酚的反应条件。

表 1 福林酚测定条件的正交试验因素与水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels of determination conditions of Folin-Ciocalteu colorimetric method

水平	福林酚剂量 (ml)	碳酸钠剂量 (ml)	福林酚体积分数 (%)	碳酸钠质量浓度 (%)	温度 (°C)
1	5	2	10	3	32
2	6	3	12	5	37
3	7	4	14	7	42

进一步利用上述 5 因素 3 水平进行 $L_{18}(3^5)$ 正交试验,结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出福林酚剂量和体积分数、碳酸钠剂量和质量浓度、反应温度对吸光值有较大的影响,优化的测试条件为 12% 福林酚 5 ml, 3% 碳酸钠 4 ml, 温度 37 ℃。从表 3 中可以看

出,不同水平下,福林酚剂量、碳酸钠剂量、福林酚体积分、碳酸钠质量浓度、反应温度的吸光值极差分别为 0.051、0.112、0.086、0.012、0.111。因此,影响吸光值的 5 个因素的顺序大小依次为:碳酸钠剂量>温度>福林酚体积分数>福林酚剂量>碳酸钠质量浓度。

表 2 福林酚法测海藻多酚含量的正交试验 $L_{18}(3^5)$ 结果

Table 2 Orthogonal test $L_{18}(3^5)$ results for the determination of seaweed polyphenol content with Folin-Ciocalteu colorimetric method

试验号	福林酚剂量 (ml)	碳酸钠剂量 (ml)	福林酚体积分数 (%)	碳酸钠质量浓度 (%)	温度 (℃)	吸光值
1	5	2	10	3	32	0.745
2	5	3	12	5	37	0.773
3	5	4	14	7	42	0.733
4	6	2	10	5	37	0.782
5	6	3	12	7	42	0.583
6	6	4	14	3	32	0.708
7	7	2	12	7	32	0.626
8	7	3	14	3	37	0.753
9	7	4	10	5	42	0.661
10	5	2	14	5	42	0.473
11	5	3	10	7	32	0.737
12	5	4	12	3	37	0.799
13	6	2	12	3	42	0.403
14	6	3	14	5	32	0.733
15	6	4	10	7	37	0.742
16	7	2	14	7	37	0.675
17	7	3	10	3	42	0.761
18	7	4	12	5	32	0.726

表 3 正交试验各因素不同水平下的海藻液平均吸光值

Table 3 Average optical density at 730 nm of seaweed liquid under different levels of factors in orthogonal test

水平	吸光度均值				
	福林酚剂量	碳酸钠剂量	福林酚体积分数	碳酸钠质量浓度	温度
1	0.710	0.617	0.738	0.695	0.713
2	0.659	0.723	0.652	0.691	0.754
3	0.700	0.729	0.679	0.683	0.602

2.3 检测方法评价

2.3.1 标准曲线绘制 按优化的福林酚法测定质量浓度分别为 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L 标准溶液(没食子酸)的吸光值,结果表明在 0~50 mg/L,标准溶液吸光值和质量浓度呈良好的线性关系,其线性回归方程为 $Y=0.0065x-0.0005(R^2=0.9999)$ 。其中 Y 为吸光值, x 为标准溶液质量浓度(mg/L)。

2.3.2 重复性评价 按优化的福林酚法测定 5 份海藻液的吸光值,其结果如表 4 所示。5 份样液的均值为 0.771,相对标准差 0.84%,表明优化的福林

酚法重复性良好。

表 4 重复性试验结果

Table 4 Results of sepeatability test

样品号	1	2	3	4	5	均值
吸光值	0.773	0.778	0.765	0.763	0.775	0.771

2.3.3 稳定性评价 海藻液在最佳条件下反应 30 min 后,5 h 内每隔 1 h 测定一次吸光值,结果如表 5 所示。其体系反应 30 min 后在放置的 5 h 内吸光值较稳定,相对标准差为 0.61%,表明优化的福林酚法稳定性良好。

表 5 稳定性试验结果

Table 5 Results of stability test

时间 (h)	0	1	2	3	4	5	均值
吸光值	0.751	0.761	0.773	0.779	0.775	0.771	0.772

2.3.4 加标回收率 向已知多酚含量的海藻液中分别加入不同质量的没食子酸,对加标后样品的总酚含量进行测定,结果如表 6 所示。其平均回收率为 100.28%,相对标准差 2.68%,说明优化的福林酚法测定海藻多酚含量较为准确。

2.4 优化法和国家标准茶多酚检测法测定不同藻类中多酚的含量

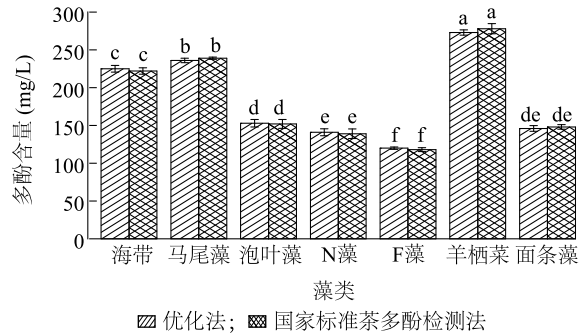
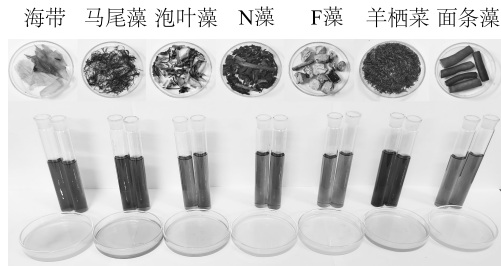
海藻生长环境条件差异大,且种类、发育阶段、采收季节等都会影响海藻多酚的种类和含量。采用优化法和国家标准茶多酚检测法测定 7 种海藻中多酚的含量,测定结果如图 3 所示。优化的福林酚法测得 7 种海藻的多酚含量为 120.0~273.0 mg/L,且不同藻类的多酚含量从高到低依次为:羊栖菜>马尾藻>海

带>泡叶藻>面条藻>N 藻>F 藻,其结果与国家标准茶多酚检测法相一致。值得一提的是,羊栖菜中海藻多酚的含量显著高于其他藻类,而海带、马尾藻中的多酚含量也较高,均在 225.0 mg/L 以上。

表 6 加标回收率试验结果

Table 6 Test results of standard addition and recovery

样品含量 (μg)	标准品添加量 (μg)	总量 (μg)	回收率 (%)
92.50	5	97.52	100.40±0.66
92.50	10	102.17	96.70±0.73
92.50	15	108.05	103.67±0.54
92.50	20	112.26	98.80±0.65
92.50	25	117.96	101.84±0.39



右图中不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 不同藻类中海藻多酚的含量

Fig.3 Seaweed polyphenol contents in different algae

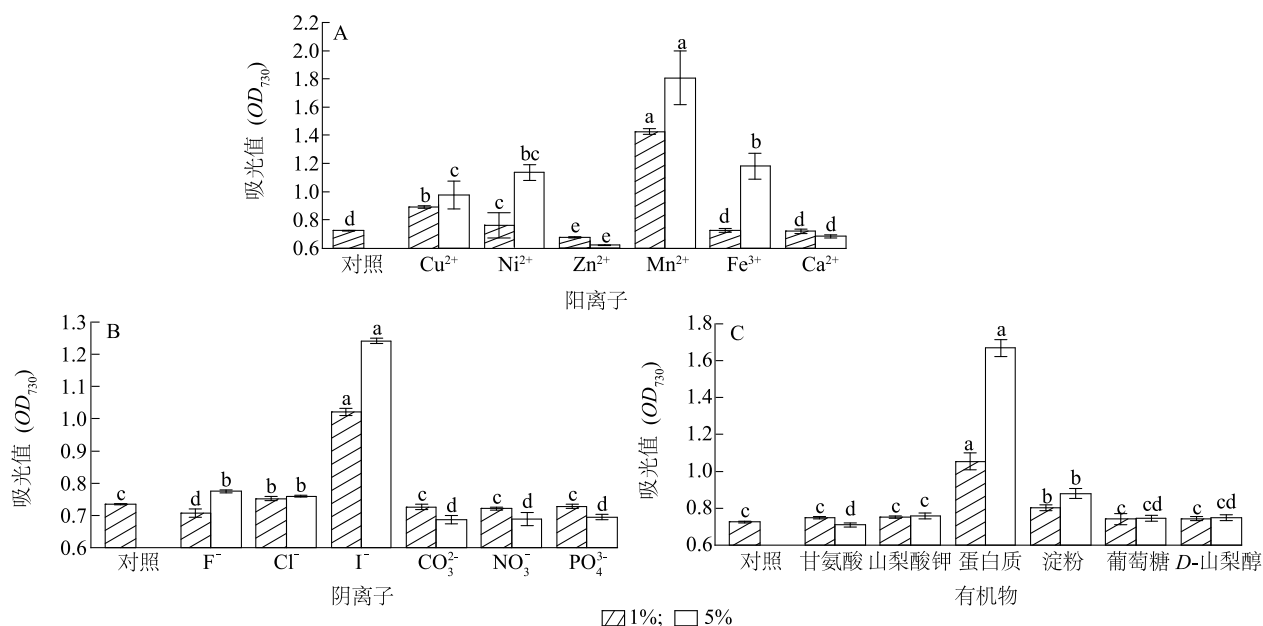
2.5 外源物质对福林酚法测定海藻多酚的影响

不同质量浓度阳离子对海藻多酚检测结果的影响如图 4A 所示。海藻样品中添加 1% 或 5% 的 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 以及 5% 的 Fe^{3+} 均使吸光值显著偏高,其中样品中添加 1% 和 5% 的 Mn^{2+} 时,吸光值比对照分别增加了 97.23% 和 149.79%;而添加 1% 或 5% 的 Zn^{2+} 时,吸光值显著低于对照。样品中添加 1% 或 5% Ca^{2+} 以及 1% Fe^{3+} 对海藻多酚的检测结果无明显影响。

不同质量浓度阴离子对海藻多酚的检测结果的影响如图 4B 所示。 Cl^- 、 I^- 对福林酚法测定多酚影响较大,含 Cl^- 或 I^- 时,吸光值分别比对照增加了

2.31%~3.97%、39.05%~69.77%。与对照相比,样品中添加 5% 的 CO_3^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 使吸光值显著低于对照,而 1% 的 CO_3^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 对测定结果无明显影响。此外,与对照相比,1% F^- 使测定值偏低 ($P < 0.05$),而 5% F^- 使测定值偏高 ($P < 0.05$)。

不同质量浓度有机物对海藻多酚检测结果的影响如图 4C 所示。样品中添加不同质量浓度的蛋白质或可溶性淀粉时,其吸光值分别比对照增加了 45.04%~127.07%、10.61%~19.73%,并且浓度越高,对其影响越大。而样品中添加 1% 或 5% 的山梨酸钾、葡萄糖、D-山梨醇时,其吸光值与对照均无显著差异。



图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 有机物质或无机离子对福林酚法测定海藻多酚含量的影响

Fig.4 Effects of organic substances or inorganic ions on the determination of seaweed polyphenols by Folin-Ciocalteu colorimetry

3 讨论

3.1 反应条件对福林酚法测定海藻多酚的影响

在测定多酚的众多方法中,福林酚法操作简单,重现性好,是目前多酚含量测定的常用方法。其原理是在碱性溶液中,酚类化合物将钨钼酸还原(W^{6+} 变为 W^{5+}),生成蓝色的化合物,颜色的深浅与多酚含量成正比^[16]。本研究得到的优化福林酚法和国家标准茶多酚检测法在测定海藻多酚含量虽然结果基本一致,但两者在碳酸钠的使用质量浓度上有较大差异。前者用的是 3.0% 碳酸钠 4.0 ml,后者是 7.5% 碳酸钠 4.0 ml,这说明在福林酚法测定多酚含量的体系中,碳酸钠质量浓度并不是最重要的影响因素,其主要作用是提供一个碱性环境,只有当碳酸钠质量浓度超过一定值时,其稀释了体系中蓝色络合物,使吸光值降低^[17]。

福林酚与多酚类物质的反应需一定时间,升温可加速反应,促进有色物质生成,缩短反应时间^[18],但温度过高会破坏多酚类物质本身的结构,且影响有色物质的生成^[19]。张娅等^[20]在测定葡萄酒中多酚含量以及詹莉莉等^[21]在测定露兜簕果实中多酚含量时均发现,当反应温度高于 40 °C 时,吸光值骤降,本试验结果亦印证了这一观点。这说明高温可

能导致多酚类物质降解或反应体系生成的蓝色物质在高温下稳定性变差。

3.2 有机物质或无机离子对福林酚法测定海藻多酚的影响

多酚类化合物具有多个酚基团,分子结构独特,其结构中的酚羟基有很好的螯合性能,能与金属离子发生螯合反应,且螯合产物有明显的色泽变化,进而对多酚含量测定产生干扰^[22]。本试验结果也证实了这点,即样品中添加了 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子时,其吸光值与对照差异显著。

福林酚试剂中的磷钼酸-磷钨酸盐易被蛋白质中的酪氨酸、色氨酸等残基还原,产生蓝色混合物,因此被测样品中如果含有蛋白质,福林酚法测定的多酚含量会有一定偏差^[23]。本研究结果同样表明海藻样品中含蛋白质后,其吸光值偏高。此外,赵晓娟等^[24]研究结果表明山梨酸钾会明显干扰苹果醋中多酚含量的测定,而本研究海藻液中含山梨酸钾时测定的吸光值与对照无明显差异。这可能是不同物质中多酚的种类及含量不同造成的。有关可溶性淀粉或阴离子干扰福林酚法测定海藻液中多酚含量的原因还有待进一步研究。

4 结论

福林酚法测定海藻多酚的最佳反应条件为

12%福林酚 5 ml、3%碳酸钠 4 ml、温度 37℃、反应时间 30 min、吸收波长 730 nm。该条件下测得的结果准确性高,重复性好,与国家标准茶多酚测定法中的反应条件 10.0%福林酚 5 ml、7.5%碳酸钠 4 ml、室温反应 60 min、波长 765 nm 有一定差异,但两者均可高效测定不同藻类中的多酚含量,且测定结果无显著差异。海藻样品中含蛋白质、淀粉等有机物质以及 1%或 5% Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cl^- 、 I^- 等无机离子时,均导致吸光值增加;含 1%或 5% Zn^{2+} 以及 5% CO_3^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 时,吸光值显著降低;山梨酸钾、葡萄糖、D-山梨醇则对测定结果无明显影响。

参考文献:

- [1] 耿银银,尹媛红,沈 宏. 海藻功能物质的提取工艺、理化性质以及在农业领域中的应用[J]. 生态学杂志, 2017, 36(10): 2951-2960.
- [2] BARBOSA M, LOPES G, ANDRADE P B, et al. Bioprospecting of brown seaweeds for biotechnological applications; Phlorotannin actions in inflammation and allergy network[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 86:153-171.
- [3] KHAJOU EI R A, KERAMAT J, HAMDAMI N, et al. Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed *Nizimuddinina zanardini* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118:1073-1081.
- [4] 袁圣亮,段智红,吕应年,等. 海藻多酚类化合物及其抗氧化活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5):274-281.
- [5] MASISI K, BETA T, MOHAMMED M H. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies [J]. Food Chemistry, 2016, 196: 90-97.
- [6] 马 雪,赵 丹,张 瑞,等. 多酚类化合物检测分析方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11):4575-4582.
- [7] 周晓晴,胡立文,罗 琦,等. 茶叶籽油中茶多酚和儿茶素的测定[J]. 食品工业科技,2019(14):291-295.
- [8] 林 倩,吴 昊,刘芊辰,等. 响应面法优化福林酚法测定冬枣中总酚含量[J]. 食品工业, 2020, 41(4):86-90.
- [9] PARYS S, ROSENBAUM A, KEHRAUS S, et al. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(12):1865-1870.
- [10] 张洋婷,郗艳丽,葛红娟,等. 福林酚比色法测定酸浆宿萼中总多酚含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23):138-141.
- [11] 吴晓青,孙燕丽,钟碧萍. 福林酚法测定檀香橄榄中总多酚含量的研究[J]. 福建中医药, 2021, 52(6):22-24.
- [12] 高志远,胡亚亚,韩美坤,等. 甘薯块根多酚高效测定技术优化与应用[J]. 中国粮油学报, 2021(11):49-56.
- [13] 国家市场监督管理总局,中国国家标准化管理委员会. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313-2018[S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- [14] YANG J, CUI D D, CHEN D W, et al. Purification and characterization of a novel endolytic alginate lyase from *Microbulbifer* sp. SH-1 and its agricultural application [J]. Marine Drugs,2020,18(4):184-195.
- [15] 李颖畅,吕艳芳,励建荣. Folin-Ciocalteu 法测定不同品种蓝莓叶中多酚含量[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1):273-278.
- [16] ROVER M R, BROWN R C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2013, 104:366-371.
- [17] 谭晓舒,吴建文,梨贵卿,等. 火麻仁油总酚含量福林酚测定法的优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2):166-173.
- [18] 汪佳丹,徐 婷,韩 伟. 金针菇中总多酚含量测定方法的优选[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2017, 39(2):113-120.
- [19] 吴 澎,贾朝爽,李向阳,等. 响应面分析优化福林酚法测定櫻桃酒中总酚的含量[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20):200-206,211.
- [20] 张 娅,石方剑,杨有仙. 福林酚比色法测定葡萄酒中总多酚含量的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(10):163-166.
- [21] 詹莉莉,章程辉,常 刚,等. 福林酚比色法测定露兜蓟果实中的总多酚[J]. 广东农业科学, 2013, 40(4):77-80.
- [22] LOZZI I, PUCCI A, PANTANI O L, et al. Interferences of suspended clay fraction in protein quantitation by several determination methods[J]. Analytical Biochemistry, 2008, 376(1):108-114.
- [23] 贺建华,鹿 麟,邵纯君,等. 福林酚法与考马斯亮蓝法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质含量的比较[J]. 中国药师, 2017, 20(10):1861-1863.
- [24] 赵晓娟,李敏仪,黄桂颖,等. Folin-Ciocalteu 法测定苹果醋饮料的总多酚含量[J]. 食品科学, 2013, 34(8):31-35.

(责任编辑:石春林)