

固相萃取-福林酚比色法测定食用油中 油溶性茶多酚

秦爱霞, 纪姝晶, 高哲, 赫贝贝, 康小虎, 贾亚楠, 陈灿, 崔同*
(河北农业大学食品科技学院, 保定 071000)

摘要: **目的** 建立一种简单、准确的油溶性茶多酚测定的新方法。**方法** 采用硅胶固相萃取对油脂中的油溶性茶多酚富集, 酸性甲醇回收, 通过皂化, 将浓缩后的油溶性茶多酚转化成水溶性茶多酚, 采用福林酚比色法测定其含量。**结果** 该方法的线性方程为 $Y=0.0007X-0.0381$, $R^2=0.9566$, 回收率为 82.7%和 84.8%, 相对标准偏差为 5%左右, 能够满足常规分析。**结论** 本方法操作简单, 不需要复杂分析仪器, 分析结果较可靠, 可以用于食用油中油溶性茶多酚的含量测定。

关键词: 固相萃取; 福林酚比色法; 茶多酚; 油溶性茶多酚

Determination of oil-soluble tea polyphenols in oil by solid phase extraction and Folin-Ciocalteu colorimetry

QIN Ai-Xia, JI Shu-Jing, GAO Zhe, HE Bei-Bei, KANG Xiao-Hu, JIA Ya-Nan, CHEN Can, CUI Tong*

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simple and accurate method for determination of oil-soluble tea polyphenols. **Methods** The oil-soluble tea polyphenols in oil were extracted by solid phase extraction column, and then eluted by acid methanol. The oil-soluble tea polyphenols were transformed into water-soluble tea polyphenols by saponification, and then determined by Folin-Ciocalteu colorimetry. **Results** The linear equation of this method was $Y=0.0007X-0.0381$, $R^2=0.9566$. The recoveries were 82.7%~84.8% and the relative standard deviations (RSDs) were about 5%, which can satisfied the routine analysis. **Conclusion** This method is simple, and need no complex analysis instrument. The analysis results are reliable and it can be used for the determination of oil-soluble tea polyphenols in edible oil.

KEY WORDS: solid phase extraction; Folin-Ciocalteu colorimetry; polyphenols; oil-soluble tea polyphenols

1 引言

为防止油脂, 尤其是含有丰富的多不饱和脂肪酸的食用植物油的氧化酸败, 通常会使用少量(0.2 mg/g)的抗氧化剂, 如丁基羟基茴香醚(butyl hydroxy

anisid, 简称 BHA)、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, 简称 BHT)、叔丁基对苯二酚(tertiary butylhydroquinone, 简称 TBHQ), 但考虑到这些合成抗氧化剂可能会有潜在的毒性和致癌性, 一些国家已相继对它们的使用作了限制^[1-3]。

*通讯作者: 崔同, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为功能食品化学和食品营养。E-mail: cuitong98@aliyun.com

*Corresponding author: CUI Tong, Professor, Doctoral Tutor, College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, No.2596, Le Kai Street, Baoding 071000, China. E-mail: cuitong98@aliyun.com

茶多酚又称茶单宁,是茶叶中的主要生理活性物质^[4-6],具有优异的抗氧化、清除自由基以及其他广泛的药理作用^[7-11],已作为一种优异的天然抗氧化剂,列入《中华人民共和国食品添加剂使用卫生标准》名录中(GB2760-2011),并在食品工业中得到广泛应用^[12]。其改性产品油溶性茶多酚是一种效果优于TBHQ的新型商用油脂抗氧化剂^[6],然而其定量分析方法却未见任何报道。其技术难点主要有两方面,首先由于它在油脂中的添加水平很低,通常不超过0.2 mg/g,受灵敏度的限制,用于茶多酚定量的一些分光光度法^[13-15]并不理想;其次油溶性茶多酚是一种组成十分复杂的多酚混合物,对这种具有“类”特征的混合物,高效液相色谱法^[16-19]等分离分析手段也不合适。加之油脂样品中含有大量的甘油三酯等干扰成分,必须进行适当的样品前处理。本研究在参考以往茶多酚分析方法^[20]包括GB/T 8313-2008方法的基础上,采用硅胶固相萃取对样品中的油溶性茶多酚进行富集浓缩,再进行净化、皂化,最后用灵敏度较高的福林酚比色法测定油溶性茶多酚的含量。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

未添加任何抗氧化剂的食用油样品由山东鲁花集团有限公司提供;一种人工合成的油溶性茶多酚工业品(山东鲁花集团有限公司提供)用作标准对照品;Silica 硅胶固相萃取柱(1 g/6 mL),购自月旭材料科技有限公司;福林酚试剂(分析纯),购自阿拉丁试剂公司;水为重蒸水,其余试剂为分析纯。

2.2 仪器设备

SP-756P 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);固相萃取装置(美瑞泰克科技有限公司);101-0AB 型电热鼓风干燥箱(天津泰斯特有限公司);TB-215D 分析天平(十万分之一)(德国赛多利斯公司);RE-5210、RE-52CS 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 硅胶柱的预处理

准确移取 15 mL 甲醇(含 0.2% 甲酸)清洗硅胶固相萃取小柱。待甲醇全部流出后,将小柱置于电热鼓风干燥箱内于 100 °C 干燥 30 min 后,再在 105 °C 干燥 210 min 以活化硅胶固相萃取小柱,备用。

2.3.2 固相萃取

准确称取油脂样品 5.0 g,溶于 5.0 mL 石油醚中,混匀后上硅胶固相萃取小柱,控制流速每 2~3 s 一滴。待样品滴完后,加入 6 mL 的石油醚洗脱柱中的残余油脂,然后加入 15 mL 酸性甲醇(含 0.2% 甲酸)淋洗柱上的油溶性茶多酚,并用蒸馏烧瓶回收淋洗液。

2.3.3 皂化

将淋洗液减压蒸干,用 10.0 mL 乙醚回溶并转移至 60 mL 的分液漏斗中,加入 5.0 mL 2% 氢氧化钾水溶液进行皂化,20 min 后取下层溶液,立即用盐酸中和至溶液 pH 6~7。然后再用 0.5% 的氢氧化钾溶液对醚层萃取 2 次,每次 5.0 mL,20 min,收取下层溶液,调节 pH 至 6~7 后合并,转移至 25 mL 容量瓶中加水定容。

2.3.4 标准曲线的绘制

用石油醚将油溶性茶多酚标准品溶解,配制成浓度为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mg/mL 的标准工作液,上样于硅胶固相萃取小柱,用石油醚洗柱后再用酸性甲醇(含 0.2% 甲酸)洗脱,收集洗脱液,经氢氧化钾皂化备用。准确吸取 2.0 mL 皂化萃取液于比色管中,加入 5.0 mL 10% 的福林酚溶液,摇匀,于 3~8 min 之内加入 10% 的碳酸钠溶液 3.0 mL,显色 1 h(显色后若出现白色浑浊可离心除去沉淀),用分光光度计在 765 nm 下测定吸光度,以油溶性茶多酚的浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.3.5 茶多酚的测定

准确移取 2.0 mL 食用油样品的皂化萃取液于比色管中,加入福林酚溶液、碳酸钠溶液显色,并用分光光度计测定吸光度(方法同 2.3.4)。然后取未加抗氧化剂的同种食用油进行空白测定,再把扣除之后的吸光度的值代入标准曲线计算样品食用油中油溶性茶多酚的含量。

3 结果与讨论

3.1 石油醚洗脱体积对油脂洗脱率的影响

准确称取食用油样品 5.0 g,按照 2.3.2 节所述方法进行硅胶柱固相萃取,收集上样流出液。然后依次加入石油醚洗脱油脂,且每 3 mL(1 倍柱体积,1 BV)接收 1 管,并与上样流出液一样,分别挥干石油醚称重。以石油醚用量为横坐标,油脂洗脱率为纵坐标,绘制洗脱曲线。结果见图 1。

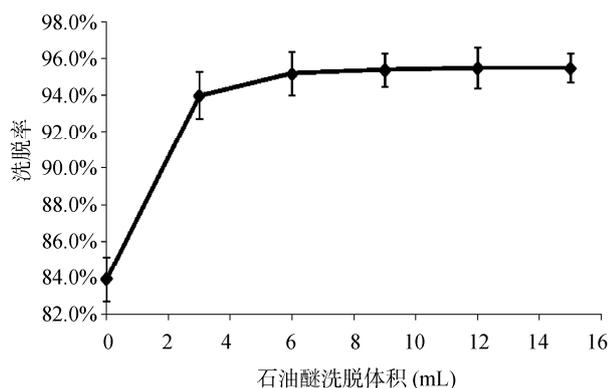


图 1 石油醚洗脱体积对硅胶柱上油脂洗脱效果的影响 ($n=3$)

Fig. 1 The effect of petroleum ether elution volume on eluting of lipa ($n=3$)

从图 1 可以看出, 上样过程中从硅胶柱自流出油脂达 84%, 在石油醚洗脱初期, 随着石油醚洗脱体积的增加油脂的洗脱率快速上升, 当洗脱体积达到 6 mL 时洗脱率达到 95.2%, 再继续增加洗脱体积洗脱率的变化不大, 所以本实验确定石油醚洗脱体积为 6 mL。

3.2 石油醚洗脱体积对油溶性茶多酚损失率的影响

虽然石油醚属于极性很弱的溶剂, 但它在洗脱油脂的同时仍会带走少量的油溶性茶多酚, 从而造成一定的损失。按 2.3.2 所述方法上样 10.0 mL 浓度为 0.1 mg/mL 的油溶性茶多酚标准品石油醚溶液, 然后用石油醚洗脱, 收集洗脱液, 每 1 倍柱体积(1 BV, 3 mL)接收 1 管, 采用 UV 分光光度法在 280 nm 下测定每管洗脱液的吸光度, 再与上样的油溶性茶多酚标准溶液比较, 计算出每管溶液中回收的油溶性茶多酚的含量, 从而得出不同洗脱体积时硅胶柱中油溶性茶多酚的洗脱损失率, 结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出, 随石油醚洗脱体积增加, 油溶性茶多酚的损失率会逐渐升高, 当洗脱体积为 6 mL 时, 油溶性茶多酚的损失率为 7%。

3.3 洗脱溶剂的选择

准确称取油脂样品 3 份, 分别按 2.3.2 所述方法上硅胶固相萃取小柱, 并以石油醚洗脱油脂, 然后分别以含 0.2% 甲酸的乙酸乙酯、丙酮、甲醇为洗脱剂进行洗脱, 每 1 BV 收集 1 管洗脱液, 并于 280 nm 下测定每管吸光度, 计算不同洗脱剂在不同体积下对

茶多酚的洗脱率。以洗脱剂的体积为横坐标, 茶多酚的洗脱率为纵坐标绘制流出曲线, 结果如图 3。

从图 3 可以看出, 甲醇对茶多酚的洗脱回收率明显高于其他两种溶剂, 因此, 选用甲醇作为洗脱剂回收茶多酚。

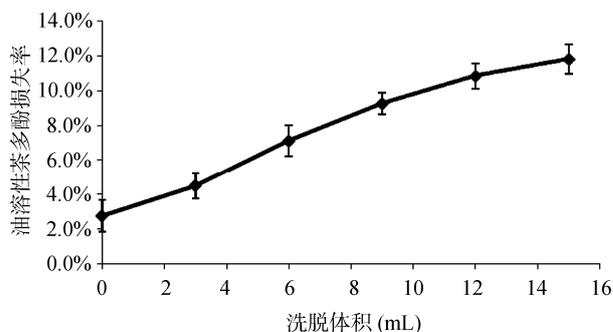


图 2 石油醚洗脱对油溶性茶多酚损失的影响 ($n=3$)

Fig. 2 The effect of petroleum ether elution volume on the loss of oil-soluble tea polyphenols ($n=3$)

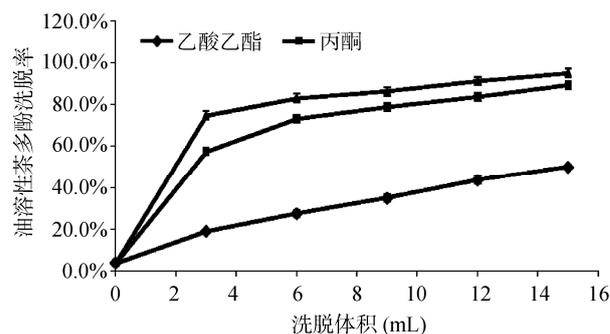


图 3 不同洗脱剂对茶多酚的洗脱效果的影响 ($n=3$)

Fig. 3 The effect of different elution agents on tea polyphenol ($n=3$)

3.4 酸性甲醇对回收油溶性茶多酚效果的影响

以 10.0 mL 的 0.1 mg/mL 油溶性茶多酚石油醚溶液上样硅胶固相萃取小柱, 再以 6 mL 石油醚洗脱, 然后再用含 0.2% 甲酸的酸性甲醇进行洗脱, 每 1 BV 洗脱液接收 1 管, 除去甲醇后用石油醚定容至 5 mL, 于 280 nm 下测定吸光度计算回收率, 绘制曲线结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出, 随酸性甲醇洗脱体积的增加, 油溶性茶多酚的回收率逐渐升高, 当达到 15 mL (5 BV) 时回收率已达到 97.4%, 因此本实验采用 15 mL 的酸性甲醇洗脱。

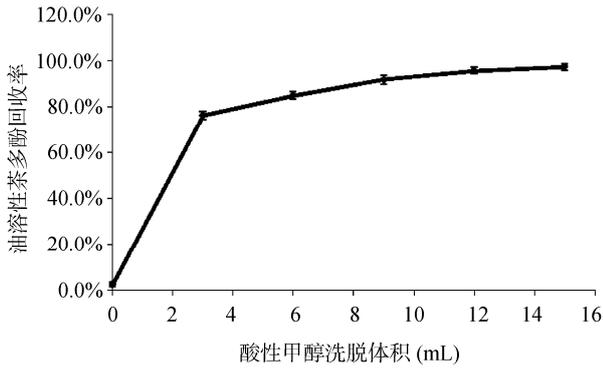


图4 酸性甲醇用量对油溶性茶多酚回收效果的影响($n=3$)

Fig. 4 The effect of acidic methanol on the recovery of oil-soluble tea polyphenols ($n=3$)

3.5 皂化时间的选择

准确称取食用油样品 5.0 g 三份, 按 2.3 所述方法, 依次进行硅胶柱固相萃取, 石油醚淋洗除油, 酸性甲醇回收, 皂化。其皂化反应时间分别设为 20、40、60 min, 最后福林酚法显色测定。结果如图 5 所示。

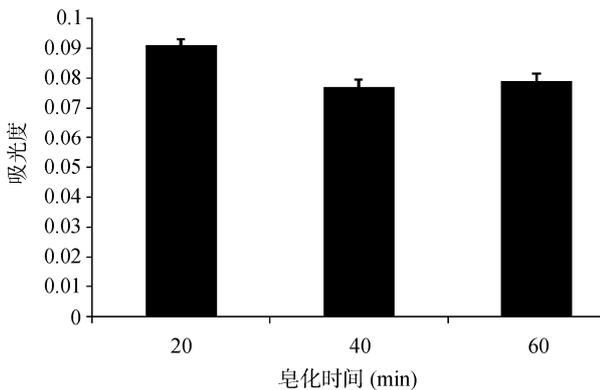


图5 皂化时间对测量结果的影响($n=3$)

Fig. 5 Effects of saponification time on the result of the measurement ($n=3$)

从图 5 可以看出皂化 20 min 已经基本完全, 继续延长时间会使结果略有降低, 故采用 20 min。

3.6 空白油样中杂质成分对测定的影响

在食用植物油中通常都含有一些非甘油三酯类的油溶性杂质, 其中一些成分同样会被硅胶柱吸附、再被酸性甲醇洗脱、再经皂化、最后参与福林酚试剂的显色反应。因此为了扣除这些成分对分析结果的干扰, 就需要做油样的空白实验。以没有添加油溶性茶多酚的空白油为样品, 按照 2.3 所述方法进行操作,

对不同体积酸性甲醇洗脱液进行后续的皂化、显色和分光光度测定, 结果如图 6。

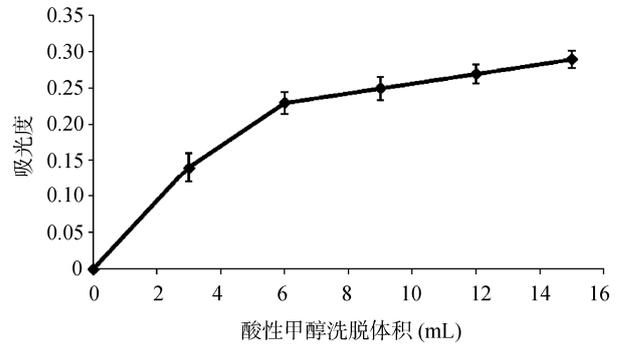


图6 空白油中杂质成分对显色的影响($n=3$)

Fig. 6 The effect of the polarity in the blank oil on color effects ($n=3$)

从图 6 中可以看出, 随着酸性甲醇的洗脱体积增大, 被回收的极性杂质成分越多, 产生的吸光度越大, 当酸性甲醇用量为 15 mL 时, 杂质成分显色后的吸光度为 0.293, 其将作为本底进行扣除。

3.7 标准曲线的绘制

将配制好的标准工作液, 按照 2.3.5 方法进行测定, 以油溶性茶多酚的浓度为横坐标(X), 吸光度为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数, 结果如下:

$$\text{标准回归方程: } Y=0.0007X-0.0381 \quad (R^2=0.9566)$$

3.8 重现性和回收率实验

将油溶性茶多酚标准品加入空白样品油中, 浓度分别为 0.1 mg/mL 和 0.2 mg/mL, 按照实验方法测定三次, 考察方法的重现性(RSD)和加标回收率, 结果如表 1 所示。

表 1 方法重现性与回收率
Table 1 reproducibility and recovery

序号	样品质量浓度(mg/mL)	RSD%	回收率
1	0.1	5.10	82.7%
2	0.2	5.12	84.8%

4 小结

油溶性茶多酚是一种以茶多酚为原料经脂肪酸改性的新型高效油脂抗氧化剂, 由于它并非一种组

成和结构明确的单一化学成分,加之它在食用植物油中的添加量很低,通常在0.2 mg/mL以下,所以它的定量分析始终是个难题。本实验采用硅胶固相萃取,石油醚淋洗去除油脂,酸性甲醇洗脱回收,再经皂化,最后用福林酚试剂显色分析,从而开发了一种油脂中油溶性茶多酚的定量分析方法。这种新方法操作简单,不需要复杂的仪器设备,灵敏度和准确度能够满足一般样品的监测分析,可以做食用油中油溶性茶多酚总含量分析的常规检测方法,并为将来国标分析方法的建立提供有益的参考。

参考文献

- [1] Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, *et al.* Carcinogenicity of BHA in F344 Rats[J]. *Natl Cancer Inst*, 1983, 70: 343–352.
- [2] Williams GM, McQueen CA, Tong C. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene I. Genetic and cellular effects[J]. *Food Chem Toxicol*, 1990, 28 (12): 793–798.
- [3] 陈志华. 茶多酚是食品行业很有前途的天然抗氧化剂[J]. *食品科学*, 2001, 22(11): 95–97.
Chen ZH. Tea polyphenols is a very promising natural antioxidants in food industry[J]. *Food Sci*, 2001, 22(11): 94–97
- [4] 于春霞, 王宇, 王爱青. 茶多酚的应用研究进展[J]. *辽宁化工*, 2012, 41(8): 809–812.
Yu CX, Wang Y, Wang AQ. Research progress in application of tea polyphenol[J]. *Liaoning Chem Ind*, 2012, 41(8): 809–812.
- [5] 付勇, 李万林, 张哲, 等. 茶多酚提取方法的研究进展[J]. *饮料工业*, 2013, 16(5): 15–17.
Fu Y, Li WL, Zhang Z, *et al.* Progress in research on methods of extracting tea polyphenols[J]. *Beverage ind*, 2013, 16(5): 15–17.
- [6] 应乐, 蒋晓翠, 姚波, 等. 脂溶性茶多酚抗氧化性能的研究及应用[J]. *中国食品添加剂*, 2012, (S1): 110–117.
Ying L, Jiang XC, Yao B, *et al.* Research and application of antioxidant properties of Lipid-soluble tea polyphenols[J]. *China Food Addit*, 2012, (S1): 110–117.
- [7] 孙海岚, 杨剑. 茶多酚的抗炎研究进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(35): 3766–3768.
Sun HL, Yang J. Anti-inflammatory research progress of tea polyphenols [J]. *Chongqing Med*, 2012, 41(35): 3766–3768.
- [8] 王婧. 茶多酚抗肺癌效应及抗肺癌血管生成相关信号通路研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
Wang J. Research on effects of tea polyphenols against lung cancer and lung cancer angiogenesis related signal pathways [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2013.
- [9] An BJ, Kwak JH, Son JH, *et al.* Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols[J]. *Food Chem*, 2004, 88(4): 549–555.
- [10] Namal Senanayake SPJ. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications—A review[J]. *J Functional Foods*, 2013, 5(4): 1529–1541.
- [11] Gramza A, Korczak J. Tea constituents (*Camelliasinensis*) as antioxidants in lipid systems[J]. *Trends in Food Sci Technol*, 2005 (16): 351–359.
- [12] 王佩华, 赵大伟. 茶多酚在食品工业中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(33): 19075–19076, 19089.
Wang PH, Zhao DW. Application of tea polyphenols in the food industry[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(33): 19075–19076, 19089.
- [13] 王丽丽, 陈剪, 宋振硕, 等. 茶叶中茶多酚检测方法研究进展[J]. *茶叶科学技术*, 2013(4): 6–12.
Wang LL, Chen J, Song ZS, *et al.* Advance in Study on Test Method of Tea Polyphenols in Tea [J]. *Tea Sci Technol*, 2013(4): 6–12.
- [14] 张淑芳. 一种测定茶叶中茶多酚的光谱新方法[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(7): 1630–1631.
Zhang SF. Determination of Polyphenols in Tea by a new method spectrophotometry[J]. *Spectrosc Spectr Anal*, 2008, 28(7): 1630–1631.
- [15] 陈孝权, 肖海军. 分光光度法测定茶叶中茶多酚含量的不确定度评估[J]. *化学通报*, 2013, 76(10): 945–950.
Chen XQ, Xiao HJ. Evaluation of uncertainty for determination of tea polyphenols by spectrophotometry[J]. *Chem Bull*, 2013, 76(10): 945–950.
- [16] 唐根源, 吴红京, 吴棱, 等. 等度反相高效液相色谱法测定茶多酚中的儿茶素和咖啡因[J]. *色谱*, 2001, 19(3): 233–235.
Tang GY, Wu HJ, Wu L, *et al.* Separation of catechins and caffeine in tea polyphenol by isocratic elution high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2001, 19(3): 233–236.
- [17] 张继, 王惠明, 马君义, 等. 高效液相色谱法测定绿茶中茶多酚及咖啡因[J]. *理化检验: 化学分册*, 2012, 48(3): 312–314.
Zhang J, Wang HM, Ma JY, *et al.* HPLC determination of tea polyphenols and caffeine in green tea[J]. *Chem Anal*, 2012, 48(3): 312–314.
- [18] 戴军, 王洪新, 陈尚卫, 等. 茶叶及茶多酚中儿茶素的高效液相色谱分析方法研究[J]. *色谱*, 2001, 19(5): 398–402.
Dai J, Wang HX, Chen SW, *et al.* Study on the analytical methods of catechins in tea and green tea polyphenol samples by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*,

2001, 19(5): 339-402.

- [19] 侯冬岩, 回瑞华, 李铁纯, 等. 高效液相色谱法对绿茶中茶多酚含量的测定[J]. 食品科学, 2011, (24): 305-307.

Hou DY, Gao F, Li TC, *et al.* HPLC determination of polyphenols in green tea[J]. Food Sci, 2011 (24): 305-307.

- [20] 党法斌, 高峰, 郭磊, 等. 茶多酚含量测定方法研究综述[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 410-412, 417.

Dang FB, Gao F, Guo L, *et al.* Research status of determination method of tea polyphenol content [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(5): 410-412.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



秦爱霞, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学与营养。

E-mail: qinax206429@126.com



崔同, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为功能食品化学和食品营养。

E-mail: cuitong98@aliyun.com

“转基因食品安全”专题征稿

在过去的 30 年里, 科学家已经成功培育出多种转基因动植物。近年来, 转基因食品的研发迅猛发展, 产品品种及产量也成倍增长, 有关转基因食品的问题日渐凸显, 其致敏性、安全性、抗药性等问题引起了科学家和公众的广泛关注。我国于 2001 年颁布《农业转基因生物安全管理条例》, 对转基因食品进行科学监管, 之后又发布了一系列管理办法。

鉴于此, 本刊特别策划了“转基因食品安全”专题, 由上海交通大学张大兵教授担任专题主编, 张大兵教授现为上海交大学生命科学技术学院副院长, 国家杰出青年基金获得者、教育部长江学者奖励计划特聘教授, 担任国家农业转基因生物安全委员会委员, 长期从事转基因生物分子特征等方面研究, 发表 SCI 论文近百篇, 获授权专利 14 项; 制定国家 ISO 技术标准 4 项, 制定国家标准 20 余项。本专题主要围绕转基因食品成分检测、监测与溯源、安全性分析评价, 转基因食品管理法律法规、监管现状及问题等或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2014 年下半年出版。

本刊编辑部特请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2014 年 6 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部