

# 果蔬中总多酚和维生素C测定方法优化的研究

马丽<sup>1\*</sup>, 白淑荣<sup>2</sup>, 韩占友<sup>1</sup>, 王佳<sup>1</sup>, 王蕾<sup>1</sup>

(1. 呼伦贝尔市食品药品检验所, 呼伦贝尔 021000; 2. 呼伦贝尔市人民医院, 呼伦贝尔 021000)

**摘要:** **目的** 建立一种简单、准确地测定果蔬中总多酚和维生素C含量的方法。**方法** 采用 Oasis HLB 固相萃取柱富集待测物质, 用纯水洗脱回收水溶性干扰物质, 用甲醇洗脱回收多酚类物质, 加热水洗脱液除去其中的维生素C, 优化福林酚比色法, 测定总多酚和维生素C的含量。**结果** 该方法的线性方程为  $Y=0.0118X+0.0045$ ,  $R^2=0.9989$ , 确定福林酚比色法的条件为: 在 760 nm 处测定, 福林酚试剂: 水(1:1), 7.5%的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 温度为 20~30 °C, 静置 60 min。通过采用福林酚比色法分别测定原料提取液(RE)和水洗脱液(WE)中还原性物质的含量, 取其差值作为样品总多酚含量。同时, 测定加热处理水洗脱液(HWE)中还原性物质的含量, 取其差值作为样品维生素C的含量。**结论** 此方法简便实用、条件易满足, 分析结果可靠, 可应用于果蔬总多酚和维生素C含量的测定。

**关键词:** 福林酚比色法; 总多酚; 维生素C; 固相萃取

## Study on optimized determination of total polyphenols and vitamin C

MA Li<sup>1\*</sup>, BAI Shu-Rong<sup>2</sup>, HAN Zhan-You<sup>1</sup>, WANG Jia<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>

(1. Food and Drug Control Institution of Hulun Buir, Hulun Buir 021000, China;  
2. Hulun Buir Peoples Hospital, Hulun Buir 021000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a simple and accurate method for determination of total polyphenols and vitamin C in fruits and vegetables. **Methods** Substances were extracted by solid-phase extraction column, and the water soluble interference reducing-substances were eluted by water, the polyphenols were eluted by methanol, Then the vitamin C were subtracted from water extract by the method of heating. The total polyphenols and vitamin C were determinate by correcting Folin-Ciocalteu assay. **Results** The linear equation of this method was  $Y=0.0118X+0.0045$ ,  $R^2=0.9989$ . The condition of the Folin-Ciocalteu colorimetry was confirmed, the maximum absorption wavelength is 760 nm, Folin-Ciocalteu reagent concentration is 50%, 7.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution, 20~30 °C, and stewing 60 min. The content of reducing substances of raw extract and water extract were determined by Folin-Ciocalteu colorimetry, the total polyphenols content were assayed by subtracting the interfering reducing of water extract (WE) substances from the Folin-Ciocalteu response of raw extract (RE). While the content of vitamin C was assayed by subtracting the Folin-Ciocalteu response of heating water extraction from that of water extract (WE). **Conclusion** This method is simple and practical, the experiment condition is satisfied easily, the analysis results are reliable and that can be applied in the determination of total polyphenols and vitamin C.

**KEY WORDS:** folin-ciocalteu colorimetry; total polyphenols; vitamin C; solid-phase extraction

\*通讯作者: 马丽, 质量检验工程师, 硕士, 主要研究方向为食品检验。E-mail: mali0927@126.com

\*Corresponding author: MA Li, Engineer, Master, Food and Drug Control Institution of Hulun Buir, Hulun Buir 021000, China. E-mail: mali0927@126.com

## 1 引言

近年来,多酚类物质包括黄酮、单宁等受到越来越多的关注,尤其是在营养学、流行病学、食品加工等领域。这主要是由于其优越的生物特性,抗氧化作用以及在各类氧化应激慢性疾病中发挥的作用<sup>[1,2]</sup>。多酚是人们日常饮食中摄入的含量最丰富的抗氧化物质,平均每日摄入量可以达到1 g,分别是维生素C、维生素E和胡萝卜素的10倍、100倍、500倍<sup>[3]</sup>。常食用的谷类、水果、蔬菜等含有丰富的多酚类物质,在预防各类疾病方面起了积极地作用<sup>[4]</sup>。研究发现,富含多酚的水果和蔬菜可以预防中风和癌症,其中大豆黄酮和茶多酚在预防乳腺癌方面作用明显<sup>[5-8]</sup>。

在过去的几年中,果蔬食品被研究证实含有某种多酚和维生素<sup>[9]</sup>等抗氧化物质,为评价多酚的抗氧化物质和人体健康的关系积累了大量可靠的数据,然而如何简便有效的评估日常摄入多酚总量仍然比较困难。目前测定多酚的方法主要有两大类:一是比色法,多酚类物质经化学反应生成有颜色的化合物,根据浓度与吸光度的相关性确定其含量,如福林酚试剂比色法<sup>[10-13]</sup>。此方法适用于总多酚含量的测定,优点在于可以测定具有还原性的多酚类物质的总含量,方法简单,实验条件易满足,但是果蔬类产品含有丰富的维生素C、还原性糖等物质,会干扰测定结果。二是利用高效液相色谱法<sup>[14-15]</sup>,适用于测定结构已知的多酚物质,需要已商业化的标准品,优点是测定结果准确,缺点是多酚类物质结构多样,大部分结构尚不明确,因此HPLC法测定总多酚含量难以实现。利用HPLC法测定维生素C含量,定量限低,数据精准,但是耗费较大;比色法简便,适用于大批量实验,但准确度不及HPLC法。

本文的研究意义,首先优化了福林酚比色法的条件;其次利用固相萃取技术<sup>[16]</sup>富集待测物质,回收溶于水的还原性物质,如维生素C和还原性糖,测定其含量,将其从直接测定样品总多酚含量中扣除,测得更为准确的总多酚含量。同时,可以利用维生素C热不稳定的特性,将水洗脱液加热处理,测定其加热前后吸光度值的变化,即可确定样品中维生素C的含量,简单易操作,耗费少,尤其适用于大批量实验。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

水果购于当地大型超市,4℃贮存;福林酚试剂购于Sigma公司;溶剂均为高级纯;标准品来自中国食品药品检定研究院;固相萃取柱SPE(Oasis HLB, Waters); Milli-Q超纯水

### 2.2 仪器设备

UV-2450型紫外分光光度计(日本岛津株式会社);固相萃取装置(美瑞泰科科技有限公司);BT125D分析天平(0.01 mg, Sartorius, 德国);XS365M分析天平(0.001 g, Precisa, 瑞士);均质仪(IKA, 德国);旋转蒸发仪(IKA, 德国);减压抽滤装置;超声仪;水浴锅;LC-20A高效液相色谱仪-二极管阵列检测器(日本岛津株式会社)

### 2.3 试验方法

#### 2.3.1 原料提取物的制备(RE)

取样品(苹果、橘子、番茄)10 g,搅碎,加入50 mL丙酮:水(7:3)均质,超声提取30 min。抽滤,滤液旋转蒸发除去有机溶剂。用超纯水定容至50 mL。

#### 2.3.2 固相萃取分离多酚和水溶性成分

吸取2 mL RE,过HLB萃取柱,用水洗涤(2×2 mL),收集洗涤液(WE)待测定,再用甲醇洗脱(2×2 mL),收集洗脱液待测定。

#### 2.3.3 加热去除水溶性成分中的维生素(HWE)

将洗涤液(WE)85℃加热2 h,得到加热去除维生素C的洗涤液(HWE)。

#### 2.3.4 福林酚比色法条件的优化

配制不同浓度的福林酚试剂和碳酸钠溶液,取原料提取液2 mL,加入1 mL一定比例纯水稀释的福林酚试剂,然后加入2.5 mL一定浓度的碳酸钠溶液,定容至10 mL,在不同反应温度,测定不同反应时间在最大吸收波长处的吸光度值。利用SPSS17.0软件英文版,通过单因素实验确定FC试剂、碳酸钠试剂、反应时间各因素对实验影响的显著性。

#### 2.3.5 标准曲线的绘制

##### 2.3.5.1 没食子酸在760 nm处测定吸光度值。

配制浓度为1.0 mg/mL的储备液,稀释制备浓度为10、20、30、40、50、60 μg/mL的一系列工作液,绘制标准曲线。

##### 2.3.5.2 抗坏血酸在760 nm处测定吸光度值。

配制浓度为1.0 mg/mL的储备液,稀释制备浓度

为 10、20、30、40、50、60  $\mu\text{g/mL}$  的一系列工作液, 绘制标准曲线。

### 2.3.6 各多酚固相萃取回收率测定

#### 2.3.6.1 固相萃取

分别将没食子酸、咖啡酸、绿原酸、儿茶素、柚皮苷、柚皮素、根皮素、根皮苷、槲皮素、槲皮苷、芸香苷、木犀草素、木犀草素 7-葡萄糖苷、花青素、花青苷配成溶液, 取 1 mL 分别过 SPE 柱子, 将水洗涤液(WE)和醇洗脱液分别收集测定。

#### 2.3.6.2 高效液相法测定各多酚含量

检测器: LC-20A DAD; 色谱柱: Diamonsil  $C_{18}$ ,  $250 \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ ; 流速 1.0 mL/min;

流动相: A:0.5%甲酸, B:乙腈; 梯度洗脱: 0 ~ 10 min A:B 90%:10%, 10 ~ 35 min A:B 50%:50%, 35 ~ 50 min, B 100%。

#### 2.3.7 样品中总多酚和维生素含量

$$\text{计算公式: } M = \frac{C}{1000} \times \frac{m}{V_2} \times \frac{V_1}{V_3} \times 100$$

$M$  --100 g 样品中多酚或维生素 C 的含量 (mg/100 g);  $C$  --还原性物质的含量( $\mu\text{g/mL}$ );

$m$  --样品的质量(g);  $V_1$  --原料提取液定容体积 (mL);  $V_2$  --原料提取液体积(mL);

$V_3$  --吸光度测定定容体积(mL);

总多酚含量: 以没食子酸计(mg/100 g), 将水洗涤液(WE)中测得的还原性物质从原料提取液(RE)中扣除所得。

维生素含量: 分别以没食子酸和抗坏血酸计 (mg/100 g)将加热的水洗涤液(HWE)中测得的还原性物质从水洗涤液(WE)中扣除所得。

## 3 结果与分析

### 3.1 福林酚比色法条件优化

采用福林酚试剂法测定总多酚, 其原理是在碱溶液中, 分类化合物可以将钨钼酸还原  $W^{6+}$  为  $W^{5+}$  生成蓝色化合物, 与多酚的含量成正相关, 在 760 nm 波长下测定。

如表 1~4 所示, 福林试剂的比例对实验的影响是显著的( $P < 0.05$ ), 反应物颜色的变化程度和福林酚试剂的含量呈正相关, 因此选择福林酚试剂: 水(1:1)条件进行试验, 组内差异不明显, 表明该条件下实验数据误差小。  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液的浓度对实验的影响并不显著, 因此选择浓度为 7.5%的低浓度溶液最为合理。实验温度对反应影响同样不显著, 因此选择在稳定的室温下 20-30  $^\circ\text{C}$  进行实验。显色反应 60 min 时达到稳定, 放置 90 min 和 120 min 后测定值无显著变化, 因此选择静置 60 min, 再测定吸光度值。

表 1 福林酚试剂浓度对试验结果的影响( $n=3$ )

Table 1 Effects of folin-cioculteu reagent concentration on the result of the measurement ( $n=3$ )

FC:水	N	均值	标准偏差	95%置信区间		F 值	Sig.	
				下限	上限			
1:1	3	.611	.002	.604	.617	组间	1009	0.0
1:2	3	.582	.003	.574	.589			
1:3	3	.506	.004	.494	.517			
1:4	3	.483	.004	.471	.494			
1:5	3	.451	.003	.443	.459			
总和	15	.526	.062	.492	.561	组内		

表 2  $\text{NaCO}_3$  浓度因素对试验结果的影响( $n=3$ )

Table 2 Effects of  $\text{NaCO}_3$  concentration on the result of the measurement ( $n=3$ )

碳酸钠%	N	均值	标准偏差	95%置信区间		F 值	Sig.	
				下限	上限			
5.0	3	.435	.003	.428	.442	组间	2.3	0.2
7.5	3	.435	.005	.422	.447			
10.0	3	.439	.005	.426	.451			
15.0	3	.443	.004	.433	.453			
总和	12	.438	.005	.434	.441			

表 3 温度因素对试验结果的影响( $n=3$ )  
Table 3 Effects of treatment temperature on the result of the measurement ( $n=3$ )

反应温度	N	均值	标准偏差	95%置信区间		F 值	Sig.	
				下限	上限			
20	3	.585	.004	.575	.595	组间	0.8	0.5
30	3	.587	.003	.579	.595			
50	3	.585	.003	.578	.592			
70	3	.588	.002	.584	.592	组内		
总和	12	.586	.003	.584	.588	总和		

表 4 反应时间因素对试验结果的影响( $n=3$ )  
Table 4 Effects of response time on the result of the measurement ( $n=3$ )

反应时间	N	均值	标准偏差	95%置信区间		F 值	Sig.	
				下限	上限			
15	3	.529	.006	.514	.544	组间	137	0.0
30	3	.588	.005	.575	.600			
60	3	.597	.003	.590	.604	组内		
90	3	.596	.004	.587	.605			
120	3	.596	.003	.588	.604			
总和	15	.581	.027	.566	.596	总和		

### 3.2 标准曲线测定

FC 比色法在 760 nm 处测定的没食子酸和抗坏血酸的标准曲线分别为  $Y=0.0118X+0.0045$ ,  $R^2=0.9989$ ,  $Y=0.0095X+0.0047$ ,  $R^2=0.9992$ , 每个水平重复三次实验, 以平均值表示。在 10~60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内线性正相关, 同样浓度的抗坏血酸约是没食子酸吸光度值的 80%。

### 3.3 多酚回收率测定

经 Oasis HLB 柱萃取, HPLC 法确定各甲醇洗脱液中多酚物质的含量, 实验证实各类多酚回收率差异较大, 这可能是由于多酚类物质结构差异大, 柱子对其吸附能力以及醇溶液对其洗脱能力不同所致。如表 5 所示, 柚皮素和柚皮苷洗脱效果达到 99%, 儿茶酸和儿茶酸聚合物的回收率较差, 分别有 23%、35% 的物质未被洗脱下来, 仍保留在萃取柱上。具有糖苷结构的黄酮类物质, 如根皮素、槲皮素、花青素经甲醇洗脱, 回收率在 70%~90% 之间。

### 3.4 总多酚含量测定

待测定样品溶液, 经 Oasis HLB 萃取柱处理, 用

2×2 mL 纯化水洗脱, 得到 WE, 利用福林酚比色法分别测定 RE 和 WE 中的还原性物质含量, 取其差值作为样品中总多酚的含量。同时利用 HPLC 法测定 WE, 证明其中并不含有没食子酸、儿茶酸等多酚物质。

### 3.5 维生素 C 含量测定

在 85 °C 条件下加热 2 h 就可以完全破坏维生素 C, 因此利用福林酚比色法分别测定 HWE 和 WE 中还原物质的含量, 取二者差值作为维生素 C 的含量。

### 3.6 FC 比色法在测定果蔬中总多酚和维生素 C 含量方面的应用

改进总多酚的测定方法在评价果蔬中多酚含量和价值方面有较为重要的意义。实际上, 由表 6 和图 1 计算可得, 苹果浆和苹果汁中干扰性物质约占全部参与福林酚反应物质的 32.1%~48.6%, 橘子汁和番茄汁的干扰物质比例更大, 达到 77.3% 和 72.6%。证实了的确存在大量的还原性物质干扰福林酚法反应测定总多酚含量, 其中维生素 C 发挥了很大的作用。橘子汁和苹果浆的维生素 C 含量丰富, 以没食子酸计约占总干扰物质的 32% 和 43%, 番茄汁中维生素 C 含量仅占总干扰物质的 10%。

表5 不同多酚固相萃取的回收率%,以没食子酸计( $\mu\text{g}$ ,  $n=3$ )

Table 5 The recovery percents of different polyphenols by solid-phase extraction%, express in Gallic acid( $\mu\text{g}$ ,  $n=3$ )

多酚种类	含量	萃取前	萃取后	回收率
没食子酸	480	0.571	0.520	91
咖啡酸	350	0.418	0.392	94
绿原酸	459	0.546	0.470	86
儿茶酸	340	0.406	0.312	77
聚合物	183	0.220	0.143	65
柚皮素	390	0.465	0.460	99
柚皮苷	390	0.465	0.456	98
根皮素	486	0.578	0.410	71
槲皮素	462	0.550	0.484	88
槲皮苷	258	0.309	0.247	80
芸香苷	430	0.512	0.450	88
花青素	148	0.179	0.127	71

表6 不同果蔬中总多酚和维生素的含量( $\text{mg}/100\text{g}$ ,  $n=3$ )

Table 6 Content of total polyphenols and vitamin C in different fruits and vegetables( $\text{mg}/100\text{g}$ ,  $n=3$ )

果蔬种类	总多酚 <sup>a</sup>	维生素 C <sup>a</sup>	维生素 C <sup>b</sup>
苹果浆	95.2	19.3	23.6
苹果汁	56.2	10.4	12.6
橘子汁	18.7	20.7	25.1
番茄汁	15.9	4.1	5.0

注: a 以没食子酸计的测定值, b 以抗坏血酸计的测定值( $n=3$ )

PS: a expression in Gallic acid; b expression in ascorbic acid ( $n=3$ )

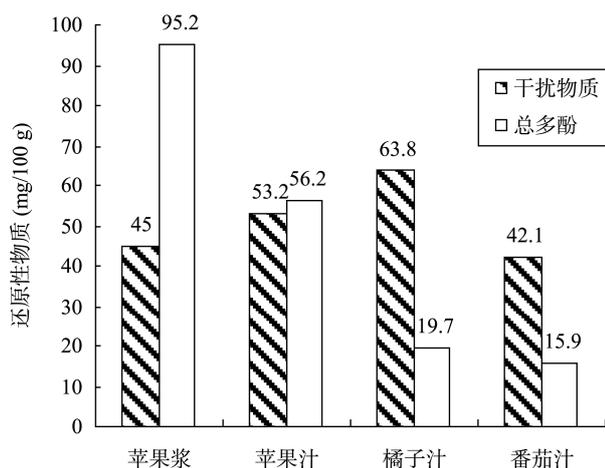


图1 果蔬中总多酚和干扰性物质比较(没食子酸计,  $\text{mg}/100\text{g}$ ,  $n=3$ )

Fig. 1 Comparison of total polyphenols and interference substances in different fruits and vegetables (express in Gallic acid,  $\text{mg}/100\text{g}$ ,  $n=3$ )

## 4 讨论

果蔬中除多酚类物质还含有大量的维生素 C 和一些还原性糖及氨基酸, 这些物质尤其是具有强还原性的维生素 C 对用福林酚比色法直接测定总多酚含量有很大影响, 因此测定总多酚含量必须去除这些干扰性物质。有相关研究报告利用固相萃取法, 富集净化分离多酚类物质测定其含量, 以避免其他干扰性物质对实验结果的影响。

本文研究得到没食子酸、儿茶酸等已知结构的多酚类物质经固相萃取洗脱收集后, 回收率差异大, 这可能是由于各多酚之间结构差异大, 固相萃取柱对其吸附能力不同, 洗脱液对其洗脱能力不同造成的影响。因此, 仅通过测定甲醇洗脱液的吸光度值确定样品的总多酚含量并不合理, 尤其是富含单宁类物质的果蔬产品。本文通过福林酚比色法测定经过固相萃取得到的纯水洗脱液中还原性干扰物质的总含量, 其中包括水溶性的维生素 C 和一些还原性糖等, 进而间接确定待测样品中总多酚含量。并且通过加热纯水洗脱液, 破坏热不稳定的维生素 C 比较加热前后的测定值, 可以得到维生素 C 的含量。本方法测定总多酚含量, 样品处理简单, 仅需具备固相萃取装置, 另外可以同时测定维生素 C 的含量, 耗材少, 经济可行, 尤其是在大规模应用中, 如流行病学、工业、食品化合物等研究领域有着更为重要的意义。

本方法中样品经固相萃取柱富集后, 纯水洗脱液中尚不能完全确定是否含有其他未被确定结构的多酚类物质, 如含有可能导致测定结果偏小。另外, 虽已证实加热处理可以使维生素 C 完全被破坏, 但不能肯定是否有其他热不稳定性的还原物质存在, 可导致维生素 C 含量偏大, 这些问题仍有待研究。

## 参考文献

- [1] Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables [J]. Food Chem, 2011, (126): 1821-1835.
- [2] Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols [J]. J Nutr, 2000, 130 (8S Suppl): 2073S-85S.
- [3] Beecher GR. Overview of dietary flavonoids nomenclature, occurrences and intake [J]. J Nutr, 2003, 133(10): 3248S-3254S.
- [4] Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review [J]. J Am Diet Assoc, 1996, (96): 1027-1039.
- [5] Jansen MC, Mc Kenna D, Bueno DM, et al. Quantity and variety

- of fruit and vegetable consumption and cancer risk [J]. *Nutr Cancer*, 2004, (48): 142–148.
- [6] Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, (71): 1705S–1709S.
- [7] Senanayake SPJN. Green tea extract: chemistry, antioxidant properties and food applications a review [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(4): 1529–1541.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 吕群金, 衣杰荣, 丁勇. Folin Ciocalteu 比色法测定杨桃的多酚含量[J]. *湖南农业科学*, 2009, (7): 99–101.
- Lv QJ, Yi JR, Ding Y. Determination of polyphenol in carambola by folin ciocalteu colorimetry [J]. *Hunan Agric Sci*, 2009, (7): 99–101.
- [11] Stephane G, Pierre B, Pascaline A, *et al.* Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, (53): 1370–1373.
- [12] 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 spectrophotometers [J]. *Spectrosc Spectr Anal*, 2008, 28(7): 1630–1631.
- [13] 秦爱霞, 纪姝晶, 高哲, 等. 固相萃取-福林酚比色法测定食用油中油溶性茶多酚 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 4(5): 1185–1190.
- Qin AX, Ji SJ, Gao Z, *et al.* Determination of oil-soluble tea polyphenols in oil by solid phase extraction and Folin-Ciocalteu colorimetry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 4(5): 1185–1190.
- [14] Maria NI, Victoria FS, Costas GB, *et al.* Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, (134): 1624–1632.
- [15] 翁鸿珍, 岳泰新, 成宇峰. 固相萃取-高效液相色谱法测定葡萄酒多酚物质[J]. *中国酿造*, 2009, (3)204: 164–166.
- Weng HZ, Yue TX, Cheng YF. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of polyphenols in wine [J]. *China Brewing*, 2009, 204(3): 164–166.
- [16] David WJ, Mercurio MD, Markus JH, *et al.* Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid-phase extraction [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, (56): 2571–2580.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



马 丽, 质量检验工程师, 硕士, 主要研究方向为食品检验。  
E-mail: mali0927@126.com