

Folin-Ciocalteu 法测定大熊猫主食竹中多酚含量

赵 莘,段丽娟,高 健,郑丽丽,李俊清*

(北京林业大学 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室,北京 100083)

摘 要:为建立 Folin-Ciocalteu 法测定大熊猫主食竹缺苞箭竹(*Fargesia denudata*)总酚酸含量的方法。以没食子酸为对照品,研究了 Folin-Ciocalteu 法测定缺苞箭竹中酚酸类物质含量的适宜条件。结果表明,适宜的比色条件为 Folin-Ciocalteu 试剂与 10% Na_2CO_3 体积比为 1:6, Folin-Ciocalteu 试剂 3 mL,显色温度 25℃,反应时间 2 h,检测波长 780 nm。浓度为 20~100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时与其吸光值呈良好的线性关系,测定方法的平均回收率为 99.4%。可见该法有较好的准确度和重现性。

关键词:缺苞箭竹;Folin-Ciocalteu 法;总酚

中图分类号:S795.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2014)06-0212-05

Determination of the Contents of Polyphenols in *Fargesia denudata*, the Main Food of Giant Panda by Folin-Ciocalteu Colorimetric Method

ZHAO Shen, DUAN Li-juan, Gao Jian, ZHENG Li-li, LI Jun-qing*

(The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Aims: to establish a quantitative method of measuring total phenols in *Fargesia denudata*, the main food of giant panda. Methods: with gallic acid as reference substance to study the suitable conditions of the measurement by Folin-Ciocalteu method. Results: the optimum conditions for determining total polyphenols were as follows: the volume ratio of Folin-Ciocalteu reagent to 10% Na_2CO_3 : 1:6, 3 mL of Folin-Ciocalteu reagent incubated at 25℃ for 2 h, followed by detection at 780 nm. Good linear relationship was found in the concentration of 20—100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the average recovery was 99.4%.

Key words: *Fargesia denudata*; Folin-Ciocalteu; polyphenol

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国特有的珍稀濒危动物,也是世界野生动物保护的旗舰种。大熊猫原为食肉动物,但经过对环境的长期适应和协同进化,逐渐转化为以竹类为主食的觅食对策^[1],这一特殊食性在肉食动物中是绝无仅有的,一直以来受到世界各国专家学者的广泛关注^[2-4]。

植物多酚在植物体生长和生态系统中的重要意义已经得到生态学领域研究人员的充分重视,植物多酚由于其在植物界分布的广泛性、生理功能的多样性以及来源的丰富性等特点,已经成为天然产物和有机化学研究的热点^[5],有关植物多酚与草食动

物之间关系的研究大量兴起^[6-7]。近年来,生态学家把目光更多地投向了植物多酚在植物养分循环中的作用,而植物多酚作为一种生态防御物质,在抵御植物体内和体外不利环境条件所起的重要作用也得到了充分的重视^[8]。大熊猫采食幼嫩竹子(竹笋,1年生竹)的数量大于多年生竹子的数量^[9-10],究其原因,除众所周知的多年生竹子在纤维素含量大于幼嫩的竹子外^[11],可能多年生竹子在口感,风味上也与幼嫩的竹子有较大的差别。对于动物而言,多酚类会使食物产生不良的味觉(如涩味),从而影响其摄食量^[12]。E. Haslam^[13]认为,多酚与口腔中唾

收稿日期:2014-02-25 修回日期:2014-03-19

基金项目:林业公益性行业科研专项(201404422)。

作者简介:赵莘,女,博士,研究方向:生物多样性保护。E-mail:zhaoshen1993@163.com

* 通信作者:李俊清,男,教授,研究方向:恢复生态学。E-mail:Ljq@bjfu.edu.cn

液蛋白的结合导致了食物中涩味的产生。动物取食多酚含量较高的食物时,口腔上皮细胞受到刺激而产生收缩、折皱等一系列复杂的感觉,降低了食物的适口性,能够抑制动物的食物摄入量,具有拒食效果。多年生竹子与幼嫩竹子的纤维素^[14]、生长节律^[15]、生物量^[16-17]、叶面积指数等生理生化特征^[18-19]已有研究。由于植物体内多酚含量和种类变化多,容易受到植物周围环境因素的影响,一旦选择了不适宜的多酚定性定量分析方法,就会导致试验结果偏差较大,得出生态和生理意义的错误结论。因此,如何科学地确定植物中多酚的含量就成为研究人员首要解决的问题^[20]。本研究以占岷山山系大熊猫主食竹资源 1/4 的大熊猫主食竹—缺苞箭竹为研究对象^[21-22],对缺苞箭竹总酚酸的含量测定方法进行了详细的研究,以建立 Folin-Ciocalteu 法测定大熊猫主食竹总酚酸含量的方法,为评价大熊猫栖息地、培育、保护大熊猫偏爱喜食的竹子都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

四川王朗国家级自然保护区(103°55′—104°10′E、32°49′—33°02′N)位于四川省西北部的平武县,面积 32 297 hm²,建于 1965 年是我国最早建立的以保护大熊猫等珍稀动物为主的自然保护区之一,该区域地处全球生物多样性核心地区之一的喜马拉雅—横断山区,保持了完整的自然生态系统。王朗自然保护区平均海拔 3 000 m,相对高差 2 700 m,气候上具有季风气候与高原气候间过渡的性质,属于丹巴松潘半湿润气候区。王朗地区降水丰富,为四川降水较多的地区,年降水量 1 088 mm,降水日数 195 d,降水日数频率 53%左右。降水量在年内分配很不均匀,差异很大,多集中于夏秋季,占全年降水量的 80%左右。王朗地区地表层年平均土壤温度 6.5℃,平均最高温度 23.2℃,平均最低温度—1.5℃^[21]。

1.2 材料

缺苞箭竹(*Fargesia denudata*)竹叶于 2013 年 5 月采自四川王朗国家级自然保护区。分光光度计 U-3900(日本日立公司),水浴锅,粉碎机,离心机。没食子酸对照品(天津市光复精细化工研究所),福林酚试剂(国药集团化学试剂有限公司)

1.3 试验方法

1.3.1 样品溶液的制备 将竹叶于粉碎机中粉碎,筛分后称取 60~80 目粗粉 1 g,放入圆底烧瓶中,

按照料液比 1:20 分别加入 70%乙醇溶液 20 mL,70℃冷凝回流 2 h,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,双层滤纸抽滤,移至 25 mL 容量瓶中,用去离子水定容至刻度。

1.3.2 Folin-Ciocalteu 比色条件

1.3.2.1 测定波长 取稀释 5 倍后的缺苞箭竹样品溶液和 100 μg·mL⁻¹没食子酸溶液各 1 mL,分别加入 Folin-Ciocalteu 试剂及适量 10%Na₂CO₃ 溶液,并用二次蒸馏水定容至 25 mL,静置,反应一段时间后,用分光光度计在 410~900 nm 波长范围内扫描,确定最大检测波长。用 1 cm 比色皿测定吸光值,随行空白。

1.3.2.2 比色体系中各试剂的用量 Folin-Ciocalteu 试剂与 10% Na₂CO₃ 比例:取 1 mL 缺苞箭竹样品溶液,加入 1 mL Folin-Ciocalteu 试剂,5 min 后加入不同体积 10% Na₂CO₃ 溶液,经显色反应后加水定容至 25 mL,放置反应一段时间后,于分光光度计上测定吸光值。

Folin-Ciocalteu 试剂用量:取 1 mL 缺苞箭竹样品溶液,加入 0.5~3.0 mL Folin-Ciocalteu 试剂,5 min 后加入 6 倍于 Folin-Ciocalteu 试剂体积的 10% Na₂CO₃ 溶液,经显色反应后加水定容至 25 mL,放置反应一段时间后,测定吸光值。

1.3.2.3 显色温度 取 1 mL 缺苞箭竹样品溶液,加入 3 mL Folin-Ciocalteu 试剂,5 min 后加入 18 mL 10% Na₂CO₃ 溶液,用蒸馏水定容至 25 mL,在 10℃~45℃之间不同的温度下显色,测定吸光值。

1.3.2.4 显色时间 按 1.2.2.3 项中的方法准备试样,于 25℃条件下反应,隔时隔 30 min 测定吸光值,以确定比色体系显色完全所需要的时间。

1.3.3 标准曲线的绘制 准确吸取 0.2、0.4、0.6、0.8 mL 与 1 mL 没食子酸标准溶液,分别定容于 25 mL 量瓶内,配成不同浓度的标准溶液,然后从各溶液中吸取 1 mL,按 1.3.1 项中的方法准备试样,在 25℃水浴中振荡反应 2 h,随行空白,在 780 nm 处测定吸光值,以吸光值为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.4 Folin-Ciocalteu 比色方法评价

1.3.4.1 稳定性试验 取 1 mL 缺苞箭竹样品溶液,按 2.2.3 项中的方法准备试样,于 25℃条件下反应 2 h 后,隔时隔测定其吸光值,以评价该分析方法的稳定性。

1.3.4.2 重复性试验 取竹样品液 5 份,按上述处理及检测方法,分别测定其总酚酸含量,并计算结果的相对标准偏差,以评价该方法的重现性。

1.3.4.3 精密度试验 采用 Folin-Ciocalteu 比色法对缺苞箭竹样品同一样品重复测定 6 次,并计算结果的相对标准偏差,以评价该方法的精密度。

1.3.4.4 加样回收试验 在缺苞箭竹样品液中加入不同量的没食子酸标准溶液,分别测定其总酚酸含量,并计算其回收率,以评价该分析方法的准确性和可靠。

2 结果与分析

2.1 吸收波长的选择

利用 Folin-Ciocalteu 法时应根据原料及所选用的对照品来选择最佳吸收波长没食子酸溶液和缺苞箭竹样品溶液与 Folin-Ciocalteu 试剂反应显色后分别在 410~900 nm 范围内扫描,分别在 779.5 与 780 nm 有明显的吸收峰,且波形相似,而空白溶液则无吸收峰,表明方法可行,所以选择没食子酸为标准品,选择 780 nm 为检测波长。

2.2 Folin-Ciocalteu 试剂与 10% Na₂CO₃ 用量的确定

Na₂CO₃ 是反应体系中显色的介质,控制着反应体系的酸碱环境,不同的 Na₂CO₃ 加入量会有不同的颜色效,由表 1 可知,当 Na₂CO₃ 的加入量>6 mL 时,显色完全且趋于稳定。可确定 Folin-Ciocalteu 试剂与 10% Na₂CO₃ 的体积比为 1:6。从图 1 可知,当 Folin-Ciocalteu 试剂的加入量趋于 3 mL 时,体系的显色反应较充分且趋于稳定,所以可确定 Folin-Ciocalteu 试剂的加入量为 3 mL。

表 1 Folin-Ciocalteu 试剂与 10% Na₂CO₃ 的比例

Table 1 Proportion of 10% Na₂CO₃ and Folin-Ciocalteu reagent

10% Na ₂ CO ₃ 加入量/mL	吸光值	溶液颜色	pH 值范围
0.25	0.090	黄色	2~3
0.50	0.120	黄色	3~4
1.0	0.149	浅绿色	7~8
2.0	0.194	蓝绿色	8
3.0	0.231	浅蓝色	8
4.0	0.280	蓝色	9~10
5.0	0.317	蓝色	9~10
6.0	0.335	蓝色	9~10
7.0	0.337	蓝色	9~10
8.0	0.336	蓝色	10

2.3 反应温度和时间对显色稳定性的影响

反应温度在 25℃~30℃之间时,显色反应较为完全,吸光度出现最大值(图 2)。所以适宜的显色反应温度为 25℃。酚酸与显色剂的充分反应需要一定的时间。2 h 后显色反应较为完全且趋于稳定(图 3),所以 2 h 为适宜的显色反应时间。

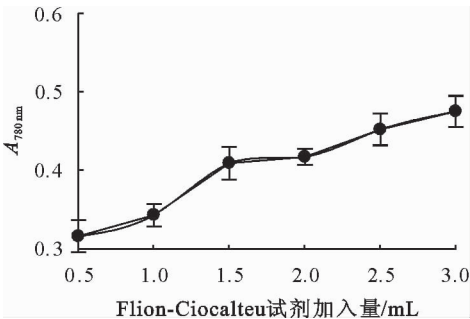


图 1 Folin-Ciocalteu 试剂加入量对显色稳定性的影响
Fig. 1 Effect of the amount of Folin-Ciocalteu reagent added on the absorbance of the reaction product at 780 nm

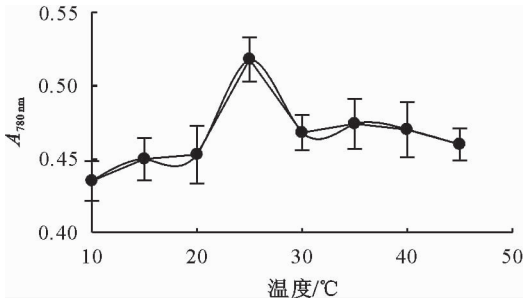


图 2 反应温度对显色稳定性的影响
Fig. 2 Effect of the reaction temperature on the absorbance of the reaction product at 780 nm

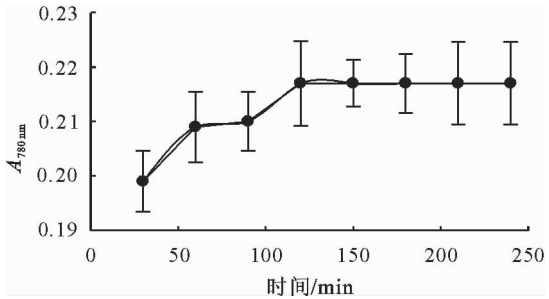


图 3 反应时间对显色稳定性的影响
Fig. 3 Effect of the reaction time on the absorbance of the reaction product at 780 nm

2.4 标准曲线的绘制

根据 1.3.3 项的方法绘制标准曲线,回归方程看,相关系数为 0.999 4,没食子酸浓度在 20~100 μg·mL⁻¹ 范围内与其吸光值呈良好的线性关系(图 4),确定该方程可用于缺苞箭竹酚酸的定量检测。

2.5 稳定性试验

按照 1.3.4.1 项的方法,对缺苞箭竹样品提取液的显色反应进行稳定性试验,放置 2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5 h 和 6 h 后测定吸光值分别为 0.312、0.312、0.313、0.312、0.312、0.312、0.313、0.312 与 0.312,相对标注偏差(RSD)为 0.14%,表明该方法在显色反应完全后 2~6 h 内吸光值仍比较稳定。

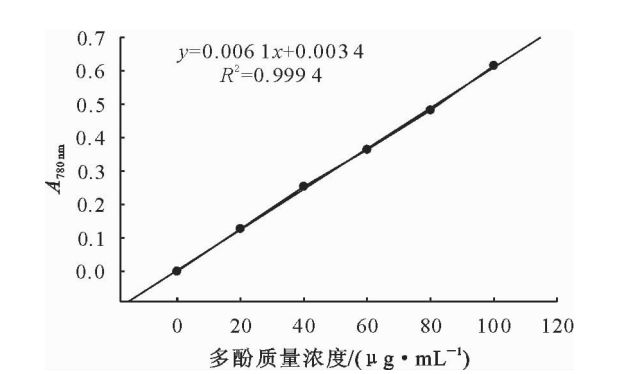


图 4 没食子酸测定标准曲线

Fig. 4 Standard curve of gallic acid

2.6 重复性试验

按照 1.3.4.2 项的方法,对缺苞箭竹提取液的显色反应进行重现性试验,5 份样品所测得的总酚质量分别为 2.057、2.080、2.067、2.092、2.053 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,相对标准偏差(RSD)为 0.78%,表明该方法重现性较好。

2.7 精密度试验

按照 1.3.4.3 项的方法,对同一样品测定 6 次,吸光值分别为 0.377、0.377、0.377、0.377、0.377、0.377,样品的总酚质量分别为 2.664、2.664、2.664、2.664、2.664、2.664 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,说明该方法具有很高的精密度,能够达到样品分析要求。

2.8 加样回收率试验

按照 1.3.4.4 项的方法进行加标回收试验,由表 2 可知,5 次加标回收试验的最低回收率为 98.0%,最高回收率为 102.6%,平均回收率为 99.4%,其 RSD 为 1.52%。表明该方法准确可靠,可用于缺苞箭竹总酚含量的检测。

表 2 加标回收率试验结果

本底量 / μg	加标量 / μg	总检出量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
2.41	1	3.40	99.0	99.4	
2.29	1	3.27	98.0		
2.37	1	3.36	99.0		1.52
2.04	1	3.03	99.0		
1.84	1	2.86	102.0		

3 结论与讨论

酚酸类化合物分子上有极易氧化的羟基,Folin-Ciocalteu 试剂中的钨钼酸可以将其定量氧化,自身被还原,在碱性条件下生成蓝色化合物。颜色的深浅与酚酸含量呈正相关,在一定条件下遵从 Lambert-Beer 定律,可测定缺苞箭竹中酚酸总量^[23-24]。不同的酚类物质与 Folin-Ciocalteu 试剂显色后最大吸收波长略有差异^[25]。因此,利用 Fo-

lin-Ciocalteu 法时应根据原料及所选用的对照品来选择最佳吸收波长没食子酸溶液和缺苞箭竹样品溶液与 Folin-Ciocalteu 试剂反应显色后分别在 410~900 nm 范围内扫描,分别在 779.5 nm 与 780 nm 有明显的吸收峰,且波形相似,而空白溶液则无吸收峰,表明方法可行,所以选择没食子酸为标准品,选择 780 nm 为检测波长。

结果 3.4.4 本文采用 Folin-Ciocalteu 法对缺苞箭竹中的总酚酸含量进行测定。结果表明,适宜的 Folin-Ciocalteu 试剂与 10% Na_2CO_3 的体积比为 1:6,Folin-Ciocalteu 试剂 3 mL,显色温度 25℃,反应时间 2 h,检测波长 780 nm。此总酚酸含量的检测方法具有操作过程简单便捷、灵敏度高、稳定性好、精密度高、准确可靠等优点,对大熊猫主食竹缺苞箭竹品质的评价有着重要作用。

参考文献:

[1] ZHANG Z J, WEI F W, LI M, *et al.* Microhabitat separation during winter among sympatric giant pandas, red pandas, and tufted deer: the effects of diet, body size, and energy metabolism[J]. Canadian Journal of Zoology, 2004, 82(9):1451-1457.

[2] 胡锦涛.大熊猫的食性研究[J].西华师范大学学报:自然科学版,1981(3):17-22.

HU J C. The giant panda diet research[J]. Journal of China West Normal University: Natural Sciences, 1981(3):17-22. (in Chinese)

[3] CAMPBELL J J, QIN Z S. Interaction of giant pandas, bamboos, people[J]. Journal of the American Bamboo Society, 1984,4(1/2):1-35.

[4] SCHALLER G B, TENG Q T, JOHNSON K G, *et al.* Feeding ecology of giant panda and asiatic black bear in the Tangjiahe reserve, China. in: Gittleman. Carnivore Behavior, Ecology and Evolution[C]. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1987.

[5] 石碧,狄莹.植物多酚[M].北京:科学出版社,2000:19-20.

[6] PAIGE K N. Overcompensation in response to mammalian herbivory: from mutualistic to antagonistic interactions[J]. Ecology,1992, 73(6): 2076-2085.

[7] STRAUSS SY, SIEMENS D H, DECHER M B, *et al.* Ecological costs of plant resistance to herbivores in the currency of pollination[J]. Evolution, 1999, 53: 1105-1113.

[8] 程春龙,李俊清.植物多酚的定量分析方法和生态作用研究进展[J].应用生态学报,2006,17(12):2475-2460.

CHENG C L, LI J Q. Research advances in ecological significance and quantification of plant poly phenols[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 200617(12):2475-2460. (in Chinese)

[9] 赵晓红,刘广平,马泽芳.竹子中单宁含量的测定及其对大熊猫采食量的影响[J].东北林业大学学报,2001,29(2):67-71.

ZHAO X H, LIU G P, MA Z F. Determination of the tannin

in bamboo and its effect on the panda[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2001,29(2):67-71. (in Chinese)

[10] 何东阳.大熊猫取食竹选择、消化率及营养和能量对策的研究[D]. 北京:北京林业大学,2010.

[11] 唐平,周昂,李操,等. 冶勒自然保护区大熊猫摄食行为及营养初探[J]. 四川师范学院学报:自然科学版,1997,18(1):1-4. TANG P, ZHOU A, LI C, *et al.* An investigation of the foraging behaviour and nutritious condition of the giant panda in Yele Natural Reserve[J]. Journal of Sichuan Teachers College: Natural Sciences, 1997,18(1):1-4. (in Chinese)

[12] VAN HOVEN L. Tannins and digestibility in Greater Kudu [J]. Canadian Journal of Plant Science,1984,64:177-198.

[13] HASLAM E, LILLEY T H. Natural astringency in food-stuffs-a molecular interpretation[J]. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1988, 27(1): 1-40.

[14] 王爱民 邹兴淮 魏广强. 大熊猫常食竹类的“双效”作用及保护对策[J], 林业科学, 2006,42(5):94-97. WANG A M, ZOU X H, WEI G Q. The dual effect of the giant panda edible bamboo and prevetion counter measures [J]. Scientia Silvae Sinicae,2006,42(5):94-97. (in Chinese)

[15] 杨道贵,宿以明,向永国,等. 王朗引种区大熊猫主食竹生长发育规律的研究[J]. 竹子研究汇刊 1992,11(4):26-36. YANG D G, SU Y M, XIANG Y G, *et al.* Wanglang national giant panda staple food bamboo introduction research on the laws of the growth and development[J]. Journal of Bamboo Research,1992,11(4):26-36. (in Chinese)

[16] 牟克华, 史立新. 大熊猫主食竹—冷箭竹生物学特性的研究[J]. 竹子研究汇刊,1991,10(4): 24-32. MO K H, SHI L X. The giant panda staple food bamboo-cold arrow bamboos biological characteristics research [J]. Journal of Bamboo Research, 1991,10(4): 24-32. (in Chinese)

[17] 周世强,黄金燕,王鹏彦,等. 大熊猫野化培训圈主食竹种生长发育特性及生物量结构调查[J]. 竹子研究汇刊,2004,23(2):15-20 ZHOU S Q, HUANG J Y, WANG P Y, *et al.* A study on the feature of bamboo growth and biomass structurein giant panda's field training area[J]. Journal of Bamboo Research, 2004,23(2): 15-20. (in Chinese)

[18] 罗定泽,赵佐成,王季勋. 四川王朗自然保护区大熊猫主食竹—缺苞箭竹(*Fargesia denudat*)不同发育时期酯酶和 α -淀粉酶同工酶的研究[J]. 武汉植物学研究,1989,7(3):263-267. LUO D Z, ZHAO Z C, WANG J X. Sichuan Wanglang Nature Reserve for giant pandas staple food bamboo- lack of *Fargesia denudate* in different development period of esterase and α -amylase isozyme research[J]. Journal of Wuhan Botanical Research,1989,7(3):263-267. (in Chinese)

[19] 周材权,胡锦涛,任丽平. 马边大风顶自然保护区大熊猫二主食竹微量元素的研究[J]. 四川师范学院学报:自然科学版, 1997,18(1): 5-9. ZHOU C Q, HU J C, REN L P. Study of the trace elements in two species of bamboos,the main components of the diet of the gaint panda in Mabiandafengding Natural Reserve[J]. Journal of Sichuan Teachers College: Natural Science, 1997, 18(1): 5-9. (in Chinese)

[20] 闵红,范智超,张志琪,七叶鬼灯檠中多酚类化合物提取工艺研究与含量测定[J]. 西北林学院学报,2007,22(3):138-140. MIN H, FAN Z C, ZHANG Z Q, Extractionand determination of total polyphenol from the root of *Rodgersia aesculiifolia* [J], Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(3):138-140. (in Chinese)

[21] 解蕊,亚高山不同针叶林冠下大熊猫主食竹的克隆生长[D]. 北京:北京林业大学,2009.

[22] 贾昊,武吉华. 四川王郎自然保护区大熊猫主食竹天然更新[J]. 北京师范大学学报:自然科学版,1991,27(2):250-256 JIA J, WU J H. Sichuan Wanglang Nature Reserves pandas staple food bamboo natural regeneration [J]. Journal of Beijing Normal University: Natural Sciences, 1991, 27(2): 250-256. (in Chinese)

[23] TSIMIDOU M, PAPADOPOULOS G, BOSKOU D. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil Part I[J]. Food Chemistry, 1992,45:141-144.

[24] 吴萼,徐宁,温美娟. 磷钼酸—磷钨酸盐比色法测定土壤中总酚酸含量[J]. 环境化学,2000,19(1):67-72. WU E, XU N, WEN M J. The measurement of total phenolic acids in soil by phosphomolybdic-phosphotungstic acid phenol reagent colorimetry[J]. Environmental Chemistry, 2000, 19(1): 67-72. (in Chinese)

[25] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. American Journal of Enology and Viticulture,1965,16: 144-158.