

MC-Transaction on Biotechnology, 2012, Vol. 4, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

鹼催化對 Folin-Ciocalteu 試劑檢測總多酚含量的影響

陳良宇、鄭建璋、王志玄、林志璋、張云力、李瑞玲、游欣、梁致遠*

銘傳大學健康科技學院生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

Folin-Ciocalteu 比色法是最普遍應用於檢測抗氧化總多酚含量的方法，定量上常以沒食子酸當量作為總多酚相對含量的表示。本研究討論 Folin-Ciocalteu 比色法中碳酸鈉添加對檢測總多酚的影響。結果表明，沒食子酸在鹼性環境下具有化學的不穩定性，當 20%碳酸鈉添加的步驟在 Folin-Ciocalteu 試劑之前，沒食子酸因鹼而形成不可逆的化合物，直接影響到 Folin-Ciocalteu 試劑的還原反應效率，進而對總多酚定量檢測造成顯著的干擾。

關鍵字：總多酚、沒食子酸、碳酸鈉

通訊作者：梁致遠[liang121@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2012-1-1 修正：2012-1-7 接受：2012-1-14

前 言

多酚類化合物是植物二次代謝產物，為天然植物中萃取的多羥基酚類衍生物，近年廣受歡迎。

Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚，是以 Folin 及 Denis 的方法^[1]改進，Folin-Ciocalteu 試劑中的鎢鉬酸可以將總多酚化合物定量，自身被還原(Mo^{6+} 變為 Mo^{5+})，生成藍色化合物，顏色的深淺與總多酚含量呈正相關。Folin-Ciocalteu 試劑與酚類化合物在酸性穩定，必須在鹼性條件下反應方可顯色，比色體系中碳酸鈉是顯色的重要因子^[2]。Folin-Ciocalteu 試劑偵測總多酚，具有檢測方便、操作簡單、再現性好等優點，累積了大量的數據，成為研究總多酚抗氧化的慣用的方法^[3]。

Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚含量，常以沒食子酸(gallic acid)作為標準品，進而比對，沒食子酸在苯環接有三個酚羥基團 (phenolic OH groups)及一個羧基

(carboxyl group)。

Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚，添加 Folin-Ciocalteu 試劑及鹼(碳酸鈉)使得反應順利進行。文獻上使用 Folin-Ciocalteu 方法測定總多酚的含量，加入 Folin-Ciocalteu 試劑及鹼的順序，卻有幾種不同的方式進行：(1) Folin-Ciocalteu 試劑與鹼一起添加並反應^[4-9] (2)先加 Folin-Ciocalteu 試劑混合 1 分鐘^[10-12]或 5 分鐘^[12, 13]後，再加鹼反應 (3)先加鹼^[14]或加鹼後 2 分鐘^[15-19]或 5 分鐘^[20]後，再加 Folin-Ciocalteu 試劑反應。文獻所使用的藥品，加入順序不同，造成實驗者無法依循，而 Folin-Ciocalteu 比色法的加入藥品的順序，是否會造成實驗結果的差異？文獻上從未討論。Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚，已是常用的分析方法，而總多酚常用於抗氧化分析的解釋，方法的正確與否，將嚴重影響抗氧化的數據解釋。

本研究目的在討論 (1)鹼的加入對沒食子酸的影響 (2) Folin-Ciocalteu 試劑與鹼的順序對總多酚的檢測影響。以沒食子酸的模式，探討 Folin-Ciocalteu 比色法中鹼的添加順序對總多酚偵測的影響，並訂定出正確的方法。

材料與方法

材料

- (1) 藥品：Folin-Ciocalteu 試劑、沒食子酸 (gallic acid)與碳酸鈉均為 Sigma 公司產品。
- (2) 儀器：分光光度計(PerkinElmer Lambda35 UV/Vis spectrometer)。

實驗方法

- (1) 鹼對沒食子酸吸收光譜的影響
取 0.25 mL 的 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 沒食子酸，0.5 mL 的 20%、2%、0.2%、0.02%、0.002%及 0.0002%的碳酸鈉，加 4.25 mL 的蒸餾水，在常溫下反應 25 分鐘後，以分光光度計於 200-800 nm 偵測吸光度。沒食子酸終濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (2) 添加 Folin-Ciocalten 試劑與碳酸鈉的順序對沒食子酸量測的影響
以修改 Folin-Ciocalteu 方法^[21]測試方法，取 0.25 mL 的沒食子酸及同體積的 Folin-Ciocalten 試劑、0.5 mL 20%碳酸鈉及 4 mL 的蒸餾水，沒食子酸的最終濃度為 0、20、60 及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在常溫下反應 25 分鐘後，以分光光度計於 730 nm 偵測吸光度。

Folin-Ciocalten 試劑與碳酸鈉的添加方式如下：

- 以沒食子酸先加碳酸鈉後再添加 Folin-Ciocalten 試劑。
- 以沒食子酸先加 Folin-Ciocalten 試劑後，混合 5 分鐘，再添加碳酸鈉。

結果與討論

驗對沒食子酸吸收光譜的影響

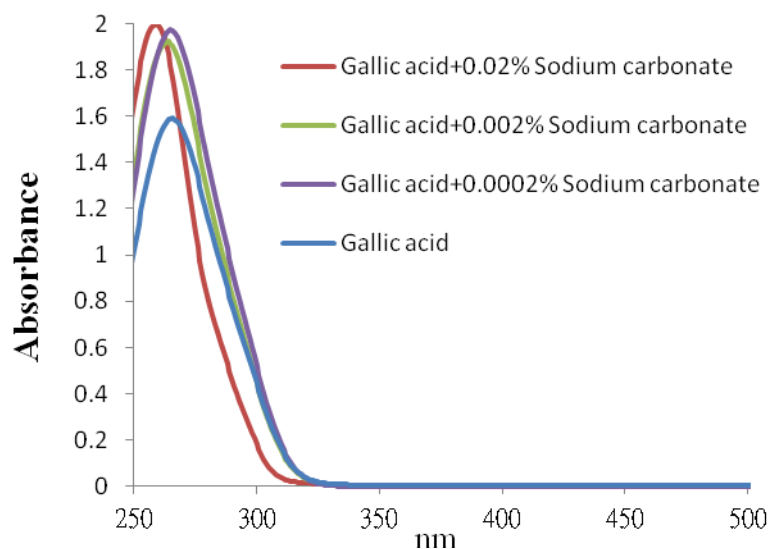
Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚含量，常以沒食子酸(gallic acid)作為比對的標準品。以沒食子酸作為標準，在未加碳酸鈉的情況下，其 pH 值為酸性，溶液是透明澄清，在添加碳酸鈉的過程，隨著碳酸鈉的濃度增加，pH 增加。添加 0.02%、0.002%及 0.0002%碳酸鈉處理，溶液的顏色是透明澄清，但添加 0.2%、2%及 20%碳酸鈉的處理，溶液是呈現綠色。以添加 0.2% 碳酸鈉的處理，在反應完成後，再以鹽酸調整 pH 至 2.34，溶液的顏色轉為粉紅色。

表一、沒食子酸添加碳酸鈉後各處理的 pH 值及顏色的變化。

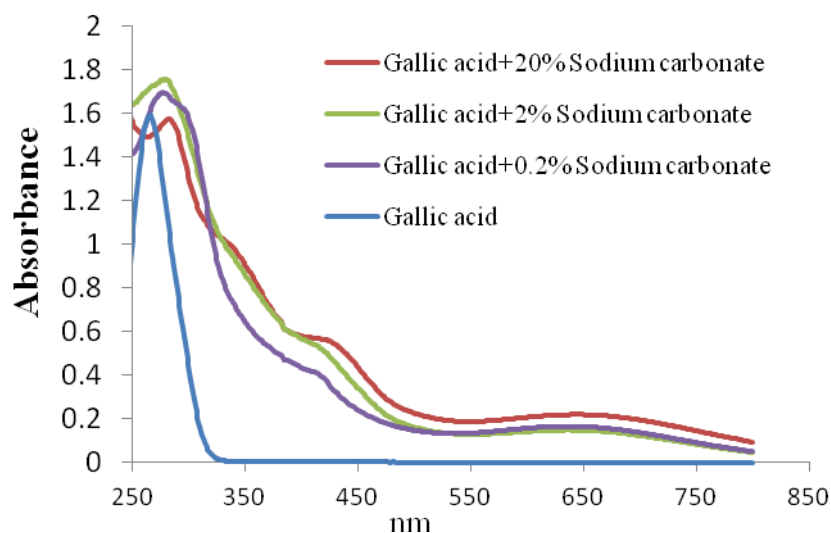
Gallic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Na ₂ CO ₃ (%)	-	0.0002	0.002	0.02	0.2	2	20	0.2	-
HCl	-	-	-	-	-	-	-	+	+
pH	3.27	3.44	4.58	6.75	9.70	10.7	11.1	2.34	1.98
Color	transparent	transparent	transparent	transparent	green	green	green	pink	transparen

沒食子酸及其添加 0.02%、0.002%與 0.0002%碳酸鈉處理後的吸收光譜如圖一，沒食子酸與添加低濃度的碳酸鈉處理，其吸收光譜相似，在 260 nm 處都有極強的吸收峰。

圖二是沒食子酸添加 0.2%、2%與 20%碳酸鈉處理後的吸收光譜，與圖一不同，在 260 nm 的吸收峰明顯偏移及改變。添加 0.2%以上的碳酸鈉，其 pH 值大幅增加，溶液為綠色。

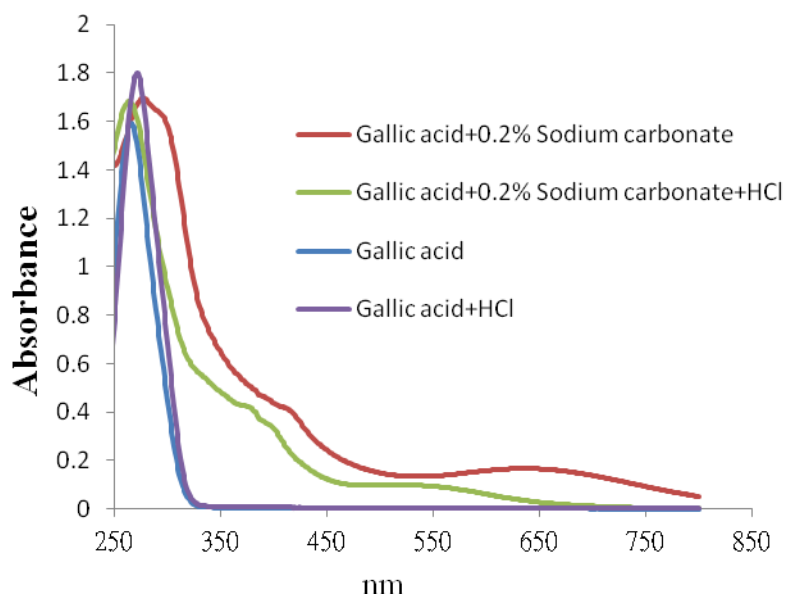


圖一、沒食子酸與添加 0.02%、0.002% 及 0.0002% 碳酸鈉各處理的吸收光譜。



圖二、沒食子酸與添加 20%、2% 及 0.2% 碳酸鈉各處理的吸收光譜。

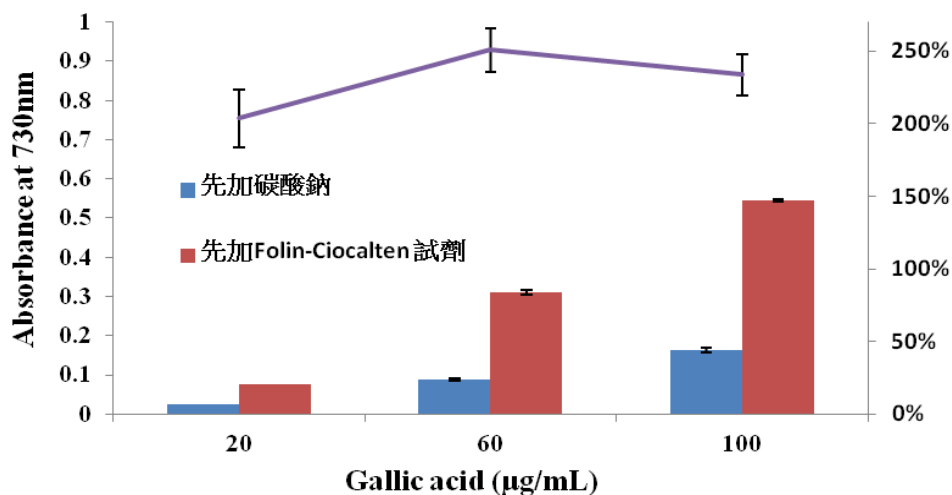
將沒食子酸及其添加 0.2% 碳酸鈉呈綠色反應溶液，再以鹽酸調整 pH 至 2 左右，其吸收光譜如圖三。沒食子酸水溶液在降低 pH 後，其吸收光譜不變，表示在酸性下沒食子酸穩定。但沒食子酸經 0.2% 碳酸鈉處理後，以鹽酸調整其 pH 至 2.3 時，其吸收光譜和未經鹼處理的樣本光譜明顯的不同。添加 0.2% 碳酸鈉處理後的沒食子酸水溶液，pH 超過 9，雖再以鹽酸調整 pH 至酸性，但溶液仍呈粉紅色，表示沒食子酸在強鹼反應後，雖以鹽酸調整回酸性，但溶液中已非全然都是沒食子酸。推論沒食子酸受強鹼的影響，可能產生新的化合物。



圖三、沒食子酸與添加 0.2%碳酸鈉處理，以鹽酸降低 pH 至 2 的吸收光譜。

添加試劑的順序對沒食子酸量測的影響

圖四探討添加 Folin-Ciocalteu 試劑與碳酸鈉的順序對總多酚量測的影響，檢測總多酚定量常以沒食子酸作標準，以作為總多酚含量的相對當量表示。以沒食子酸先添加 Folin-Ciocalteu 試劑後，混合 5 分鐘，再添加碳酸鈉處理的量測值，在 730 nm 下的吸光值都比較高。以沒食子酸先添加碳酸鈉後再加 Folin-Ciocalteu 試劑的處理，其量測值都偏低。圖四是兩種處理在各種沒食子酸的濃度時的吸光值及其吸光值增加的倍率的比較。先加 Folin-Ciocalteu 試劑的處理，在各種沒食子酸濃度下的吸光值反應，較先加碳酸鈉處理者其吸光值均增加 200%以上，表示 Folin-Ciocalteu 試劑與碳酸鈉的添加順序明顯影響總多酚定量的敏感度。



圖四、Folin-Ciocalteu 試劑與碳酸鈉的添加順序對沒食子酸量測的影響。

討 論

酸、鹼對沒食子酸的穩定性影響

沒食子酸水溶液為透明的酸性溶液，當沒食子酸溶液的 pH 降至近 2 時，及添加 0.02%碳酸鈉處理後，溶液亦澄清透明，此二處理的吸收光譜圖相似。如圖一所示，沒食子酸在酸性環境下，沒食子酸的化學性質是很穩定的。

添加 0.2% 以上的碳酸鈉處理，使溶液偏向鹼性，此時溶液呈現綠色，吸收光譜圖改變如圖二所示。吳等人^[22] 研究指出，當 pH 值為 7-10 時，沒食子酸在三小時已降解完全，說明沒食子酸在鹼性與中性條件下並不穩定。Friedman 及 Jürgens^[23] 研究植物的酚類化合物，如咖啡酸 (caffeic acid)、兒茶素((-)-catechin)、表兒茶素((-)-epigallocatechin)、阿魏酸(ferulic acid)、蘆丁(rutin)、綠原酸及沒食子酸等，探討 pH 對其穩定性的影響，其結果指出表明咖啡酸、綠原酸及沒食子酸等多酚物質在高 pH，鹼性環境下不穩定，其光譜的轉變是不可逆。

經沒食子酸加 0.2%碳酸鈉的鹼處理後，再以鹽酸調整其 pH 為 2.3 時，比較其吸收光譜與未調整 pH 值的沒食子酸溶液，由圖三可知有明顯的不同，此時溶液呈粉紅色，表示沒食子酸在強鹼下產生新的化合物，雖然降低 pH 值，也無法完全變回沒食子酸，是一不可逆的反應。

沒食子酸在苯環接有三個酚羥基團 (phenolic OH groups)，並沒有碳-碳共軛雙鍵，Friedman 及 Jürgens^[23] 認為酚羥基團可能是咖啡酸、綠原酸及沒食子酸在高 pH 下不穩定，光譜變化的主要關鍵。我們推測沒食子酸在強鹼環境下，可能經由酚羥基團或羧酸間的酯化縮合，造成沒食子酸的聚合反應，形成新的化合物，而這個過程是不可逆，也造成沒食子酸在鹼性環境下不穩定的現象。

鹼的順序對 Folin-Ciocalteu 方法測量沒食子酸的影響

酚類化合物與 Folin-Ciocalteu 試劑僅能在鹼性下反應。酚解離出一個質子(proton)生成酚陰離子，酚陰離子及 Folin-Ciocalteu 試劑間，經電子移轉，可還原 Folin-Ciocalteu 試劑，反應形成藍色的化合物^[3]。

先加 20%碳酸鈉於沒食子酸溶液後再和 Folin-Ciocalteu 試劑反應，沒食子酸的三個酚羥基團，在強鹼條件，可能經由分子間酚羥與羧酸基團的再聚合，產生不可逆的化合物。因此，再和 Folin-Ciocalteu 試劑反應時，能夠解離成酚陰離子減少，

產生還原反應的機會也相對減少；同時，反應形成藍色的化合物減少。以沒食子酸先加 Folin-Ciocalteu 試劑混合作用 5 分鐘後再加碳酸鈉的反應處理，分子間聚合的情況相對較少，電子移轉及還原反應的機會相對較高，反應藍色的化合物也較多。

以 Folin-Ciocalteu 試劑量測總多酚，是研究總多酚抗氧化的慣用的方法^[3]。Taga 等人^[19]以咖啡酸作為檢量的標準品，以先添加 20%碳酸鈉兩分鐘後再加 Folin-Ciocalteu 試劑作為檢測總多酚的方法。咖啡酸、綠原酸及沒食子酸等多酚物質在高 pH，鹼性環境下不穩定^[23]，因此，以咖啡酸先添加碳酸鈉是否會影響 Folin-Ciocalteu 方法中咖啡酸的定量效能，能須再進一步探討。但是，以沒食子酸作為標準品時^[15-18,20]，沒食子酸遇鹼不穩定，先添加碳酸鈉再加 Folin-Ciocalteu 試劑的處理，在本研究中造成沒食子酸繼續反應，形成新的化合物，影響電子轉移及 Folin-Ciocalteu 試劑還原反應，嚴重影響以沒食子酸做為定量基準之 Folin-Ciocalteu 方法的測量效能，相同的，總多酚的定量檢測也受影響。

參考文獻

- [1] Folin O, Denis W: A colormetric method for the determination of phenols (and phenol derivates) in urine, J Bio Chem 1915, X X II, No 2.
- [2] 張清安、范學輝、張志琪、馬學燕、陳瑜、王軍：沙苑子提取物中多酚含量的測定。食品科學 2010，31：178-181。
- [3] Huang D, Ou B, Prior R: The chemistry behind antioxidant capacity assays, J. Agric Food Chem 2005, 53: 1841-1856.
- [4] Alonso Borbalán ÁM, Zorro L, Guillén DA, Barroso CG: Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography–mass spectrometry and its relationship to antioxidant power, J Chromatogr A 2003, 1012: 31–38.
- [5] Maksimović Z, Dorđe M, Kovačević: Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts, Bioresour Technol 2005, 96: 873–877.
- [6] Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Núñez MJ: Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*), Food Chem 2004, 85: 267–273.

- [7] Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurade E, Shiwakuk K, Yamane Y: Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay, *J Agric Food Chem* 2004, 52: 2391–2396.
- [8] Lee MH, Jiang CB, Juan SH, Lin RD, Hou WC: Antioxidant and heme oxygenase-1 (HO-1)-induced effects of selected Taiwanese plants, *Fitoterapia* 2006, 77: 109–115.
- [9] Sachan NK, Arif M, Zaman K, Kumar Y: Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant potential of the stem bark of *spondias mangifera* willd, *Arch Biol Sci Belgrade* 2011, 63: 413-419.
- [10] Ao C, Li A, Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S: Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract, *Food Control* 2008, 19: 940-948.
- [11] Du G, Li M, Ma F, Liang D: Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits, *Food Chem* 2009, 113: 557-562.
- [12] Dorman HJD, Hiltunen R: Antioxidant and pro-oxidant in vitro evaluation of water-soluble food-related botanical extracts, *Food Chem* 2011, 129: 1612–1618.
- [13] Číž M, Čížová H, Denev P, Kratchanova M, Slavov A, Lojek A: Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables, *Food Control* 2010, 21: 518–523.
- [14] Faller ALK, Fialho E: The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking, *Food Research International* 2009, 42: 210–215.
- [15] Cock IE, Kukkonen L: An examination of the medicinal potential of *Scaevola spinescens*: toxicity, antibacterial, and antiviral activities, *Pharmacognosy Res* 2011, 3: 85–94.
- [16] Chen HY, Yen GC: Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves, *Food Chem* 2007, 101: 686-694.

- [17] Chen HY, Lin YH, Hsieh CL: Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs, *Food Chem* 2007, 104: 1418–1424.
- [18] Hussein AMS, Shedeed NA, Abdel-Kalek HH, Shams El-Dinb MHA: Antioxidative, antibacterial and antifungal activities of tea infusions from berry leaves, carob and doum, *Pol J Food Nutr Sci* 2011, 61: 201-209.
- [19] Taga M S, Miller EE, Pratt DE: Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants, *J Am Oil Chem Soc* 1984, 61: 928–931.
- [20] Wang BS, Chang LW, Wu HC, Huang SL, Chu HL, Huang MH: Antioxidant and antityrosinase activity of aqueous extracts of green asparagus, *Food Chem* 2011, 127: 141-146.
- [21] Gahler S, Otto K, Bohm V : Alterations of Vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products, *J Agric Food Chem* 2003, 51:7962-7698.
- [22] 吳雪釵、于波濤、侯艾林、胡婷婷、陸國慶：沒食子酸穩定性研究，*西南國防醫藥* 2006，16: 484-485。
- [23] Friedman M, Jürgens HS: Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J Agric Food Chem* 2000: 48: 2101-2110.

Effects of base-catalysis on determination of total polyphenols with Folin-Ciocalteu reagent

Liang-Yu Chen, Chien-Wei Cheng, Jr-Shiuan Wang, Chin-Chang Lin, Yun-Li Chang, Jui-Ling Li, Shin You , Ji-Yuan Liang*

Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, (Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

Gallic acid is often used as the quantitative standards in Folin-Ciocalteu colorimetric method for determination of total polyphenols. The evaluation of total polyphenol content is equivalent to the relative content of gallic acid. The effects of sodium carbonate on total polyphenol analysis with Folin-Ciocalteu reagent were studied. The results showed that gallic acid is unstable in alkaline solution. When 20% sodium carbonate was added before the addition of Folin-Ciocalteu reagent in the assay, an irreversible compound had been produced. With the alteration of reaction conditions, the electric transferring capacity of Folin-Ciocalteu reagent was decreased during its reduction. Therefore, the quantitative analyses of total polyphenols and calibration of using gallic acid as standards were also shown to be affected significantly.

Keyword: polyphenol, gallic acid, sodium carbonate

Corresponding author: Ji-Yuan Liang [liang121@mail.mcu.edu.tw]

Received 1 January 2012/Revised 7 January 2012/Accepted 14 January 2012

MC-Transaction on Biotechnology, 2012, Vol. 4, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.