

农产品贮藏加工

植物多酚常见的定性定量分析方法

高浩祥^a, 梁恒宇^a, 曾维才^{a,b}, 石碧^c

(四川大学 a.食品工程系 b.食品科学与技术四川省高校重点实验室
c.皮革化学与工程教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: **目的** 对植物多酚常见的定性定量分析方法进行综述, 为其在食品包装和贮藏领域的资源化利用提供方法和实验支撑。**方法** 从实验原理、实际操作、适用范围和优缺点等方面对纸色谱法、薄层色谱法、显色法等常见的定性分析方法, 以及高锰酸钾滴定法、酒石酸亚铁法、普鲁士蓝法、福林酚法、香草醛-盐酸法、正丁醇-盐酸法、近红外光谱法和原子吸收光谱法等常用的定量分析方法进行介绍和对比分析, 对定量分析方法和测定标准品的选择进行进一步的介绍。**结果** 植物多酚常见的定性定量分析方法的原理和繁简程度各不相同, 测试结果有较大差异, 各有优缺点; 在测定中, 通常采取几种不同的分析方法对同一样品中的植物多酚含量进行定量测定, 从而对样品中所含的不同结构和种类植物多酚的含量得到一个综合的表征与认识; 在定量分析中, 通常采用与样品中多酚类物质属于同一类的酚类化合物纯物质作为标准品进行测定。**结论** 研究者需要根据各自的研究目的和样品的特点, 选择几种合适的方法构建一套合理的分析方案对植物多酚进行定性定量分析, 从而全面地反映样品中植物多酚的类型和含量。

关键词: 植物多酚; 定性分析; 定量分析

中图分类号: TS206.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2021)07-0001-11

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2021.07.001

Common Methods of Qualitative and Quantitative Analysis for Plant Polyphenols

GAO Hao-xiang^a, LIANG Heng-yu^a, ZENG Wei-cai^{a,b}, SHI Bi^c

(a.Department of Food Engineering b.The Key Laboratory of Food Science and Technology of Sichuan Province of Education c.The Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

ABSTRACT: In present study, the common qualitative and quantitative methods for plant polyphenols were reviewed, which could provide technology and experimental supports for its resource utilization in food packaging and storage. Based on the principle, procedure, application, advantages and disadvantages, the paper chromatography, thin layer chromatography, chromogenic method and other qualitative methods were reviewed. Meanwhile, the choice about the quantitative methods and standard compounds in determination were also introduced. The principle and complexity for all the qualitative and quantitative methods were different, and their testing results were also different, which both possessed advantages and disadvantages. Commonly, several methods should be used in quantitative determination for the same sample, so as to obtain the detailed information of plant polyphenols. In addition, some pure phenolic compounds as the plant polyphenols in sample were usually used as the standard. Therefore, researchers should design the analytical

收稿日期: 2020-09-19

基金项目: 国家自然科学基金(31801548); 四川省科技计划(2021YFH0072); 国家重点研发计划(2019YFE0103800)

作者简介: 高浩祥(1996—), 男, 四川大学在读博士生, 主要研究方向为食品科学。

通信作者: 曾维才(1986—), 男, 博士, 四川大学副教授, 主要研究方向为食品化学。

schemes by using several methods, which can reflect the type and content of plant polyphenols.

KEY WORDS: plant polyphenols; qualitative analysis; quantitative analysis

植物多酚是一类存在于植物体内具有多个酚羟基结构的化合物,是植物的次生代谢产物,广泛分布于植物的叶、皮、根和果实中^[1-2]。植物多酚的化学结构以苯酚为基本骨架,以苯环的多羟基取代为特征,通常分为水解类多酚(又称聚没食子酸酯类多酚)、缩合类多酚(又称聚黄烷醇类多酚)和复杂类多酚(同时含有水解类和缩合类组分)。水解类多酚是多个没食子酸或与没食子酸有生源关系的酚羧酸与多元醇通过分子内酯键连接形成的酯类化合物,具有C6-C1的结构特征;缩合类多酚是多个黄烷醇单体以C-C键连接形成的聚合物,具有C6-C3-C6的结构特征^[3-4]。

植物多酚因其特殊的化学结构,呈现出多种生物活性,被广泛用于食品的包装、贮藏和保鲜领域。植物多酚可作为抗氧化和抗菌成分,通过喷洒、涂抹或直接添加等方式用于食品的贮藏和保鲜^[5-6],同时植物多酚也常被用于活性成分添加到成膜基质中,形成具有缓释作用的包装膜用于食品的贮藏和保鲜^[7-8]。此外,植物多酚还能被用于食品包装材料和保鲜膜的品质改良剂,在赋予包装材料更好性能的同时,还能显著提升包装材料的功能性^[9-10]。植物多酚在食品包装、贮藏和保鲜中的资源化利用已成为相关领域的研究热点,在对植物多酚的开发和利用中,定性定量分析是进一步对植物多酚相关特性进行研究的基础,更是对其进行后续加工与应用的关键。文中在参考和整理大量有关植物多酚定性定量分析文献的基础上,对常见方法的原理、操作、优缺点和适用范围进行介绍,以期对植物多酚在食品包装、贮藏、保鲜及其他相关领域的加工利用提供有益的帮助和参考。

1 植物多酚的定性分析

在植物多酚的研究和应用领域,对植物多酚的定性分析是很重要也是最常遇到的问题。不同种类的植物多酚具有不同的结构特征,其研究方法和应用领域有明显的区别。例如,葡萄酒中多酚的种类对其特殊风味的形成有不同的影响;植物性食品中不同的多酚使其具有不同的营养作用或抗营养作用。可见,对植物多酚的种类进行分析不仅有利于进一步认识其结构和作用,也对植物多酚的资源化开发利用具有重要的指导意义^[11-12]。如何快速、简便、准确地进行植物多酚的定性分析一直是相关领域科技工作者十分关注的问题。

“定性分析”运用分析和综合的方法对待测目标进行“质”方面的考察,通过去粗取精、去伪存真、由

此及彼、由表及里,对物质的化学组成(或成分)和种类进行鉴定,从而达到认识物质的本质,揭示其内在规律的目的^[13]。目前,已有纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法、质谱法和核磁共振法等多种分析方法应用于植物多酚的定性分析。由于植物多酚种类繁多,组分复杂,且往往还可能含有部分杂质,几乎没有一种分析方法可以适用于所有体系植物多酚的定性分析,因此需要根据实际情况综合选择测定方法和实验条件^[14-15]。文中从“快速、简便、准确”的角度出发,主要对植物多酚定性分析中最为常用的纸色谱法、薄层色谱法和显色法进行介绍。

1.1 纸色谱法

纸色谱法创立于20世纪40年代中期,可用于多种物质的定性分析,具有简单、高效、低成本等特点,是一种分析化学领域有效的分离和鉴定技术,在植物多酚的定性分析中占有重要的地位^[16-17]。

纸色谱法一般使用滤纸作为载体,以滤纸纤维周围的水为固定相,采用不同组成和配比的有机溶剂为流动相,利用植物多酚中不同组分在不同溶剂中分配系数的差异对植物多酚进行分离和鉴定,是一种典型的分配色谱^[16,18-19],其分离和定性分析的原理见图1。

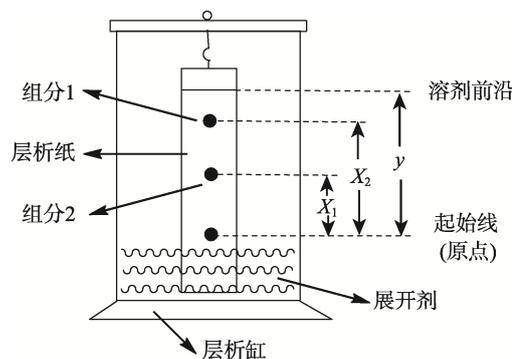


图1 纸色谱法定性分析原理

Fig.1 Qualitative analysis principle of paper chromatography

纸色谱法中(见图1),不同组分的移动情况通常以比移值(R_f)表示, R_f 的计算公式为: $R_f=x/y$,式中 x 为原点至斑点中心的距离, y 为原点至溶剂前沿的距离。 R_f 值与物质本身的性质及其在两相间的分配系数有关,当两相确定时,物质的 R_f 值通常是固定的。可根据物质在不同溶剂中的 R_f 值和颜色,对物质进行定性分析^[16]。需要注意的是,当2种组分在纸色谱中的比移值之差(ΔR_f)大于0.02时,2种组分可被有效分离,小于0.02则不能被有效分离。

纸色谱法对植物多酚进行定性分析的一般操作步骤：层析纸的准备→样品的点样→溶剂展开→显色剂显色→定位→分析与鉴定。在测定过程中，常用的层析纸有新华牌色谱用滤纸以及 Whatman 1 号和 3 号滤纸，常用定容毛细管或微量注射器进行样品的点样，样点的直径通常保持在 3~5 mm。纸色谱法中常用于植物多酚定性分析的展开剂包括 BAW 溶剂 ($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{醋酸}}:V_{\text{水}}=4:1:5$)、BHW 溶剂 ($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{浓盐酸}}:V_{\text{水}}=6:1:5$)、Forestal 溶剂 ($V_{\text{浓盐酸}}:V_{\text{醋酸}}:V_{\text{水}}=3:30:10$)、甲酸溶剂 ($V_{\text{甲酸}}:V_{\text{浓盐酸}}:V_{\text{水}}=5:2:3$)、体积分数为 1% 的盐酸溶剂、体积分数为 6% 的乙酸溶剂等。常用的显色途径有物理显色和化学显色。物理显色利用紫外光和荧光照射，使不同组分在层析纸上显出不同颜色的荧光斑点，进而获得其 R_f 值和颜色，根据参考文献对植物多酚进行定性分析。化学显色利用碘蒸汽处理层析纸或将各式各样的显色试剂均匀喷洒在层析纸上，使层析纸上不同组分的植物多酚显色，进而对其进行定性分析，常用的显色试剂有硫酸溶液 ($V_{\text{硫酸}}:V_{\text{水}}=1:1$ 或 $V_{\text{硫酸}}:V_{\text{乙醇}}=1:1$)、50 mg/L 碘的氯仿溶液和 5 mg/L 中性高锰酸钾溶液^[20-23]。

在实际应用中，纸色谱法常用于原花色素和与其有生源关系的植物多酚的定性分析，还能初步分析不同空间构型和分子量分布的植物多酚^[16,20]。同时，通过与紫外-可见分光光谱等技术的耦合联用，纸色谱法在植物多酚定性分析方面的应用范围得到了较大的提升。纸色谱法在植物多酚的定性分析中具有操作简单、样品需求小、快速和敏捷等特点，特别适用于对植物多酚样品的初步、快速定性分析。该方法也存在分离和鉴定效果不明显，准确度低，易受杂质干扰，无法回收样品等缺点^[24-25]。

1.2 薄层色谱法

薄层色谱法于 20 世纪 50 年代后期开始在植物多酚的分离和鉴定中得到推广和应用，该方法是在纸色谱法的基础上优化和发展而来，其原理和操作与纸色谱法基本一致。由于薄层色谱法比纸色谱法更高效、灵敏和耐腐蚀，因此得到了迅速的发展。薄层色谱法是在玻璃板或塑料板等支撑物上均匀涂布一层固定相，以不同组成和配比的有机溶剂为流动相对样品进行层析，利用样品中不同组分在固定相和流动相中的吸附和解吸能力的差异对物质进行分离和鉴定。薄层色谱法的实验装置、操作步骤和分析鉴定方法与纸色谱法基本相同，均通过化学或物理方法获得不同组分在薄层板上所形成的斑点的颜色和位置，进而计算其 R_f 值，通过与标准物质或对照数据库中 R_f 值相比较，对不同组分进行定性分析，该方法是植物多酚定性分析中一种重要的方法^[26-27]。

薄层色谱法对植物多酚进行定性分析的一般操

作步骤：薄层板的制备→样品的点样→溶剂展开→显色剂显色→定位→分析与鉴定。常用于制备薄层板的固定相物质有硅胶、氧化铝、纤维素、聚酰胺、硅藻土等。薄层色谱法中常用于植物多酚定性分析的展开剂有 BAW 溶剂 ($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{醋酸}}:V_{\text{水}}=4:1:5$)、AHW 溶剂 ($V_{\text{乙酸}}:V_{\text{浓盐酸}}:V_{\text{水}}=15:3:82$) 和体积分数为 1% 的盐酸溶液。此外，按照 $V_{\text{浓盐酸}}:V_{\text{甲酸}}:V_{\text{水}}=24.9:23.7:51.4$ 组成的展开溶剂适合于绝大多数不同结构类型的植物多酚的薄层层析。同时，通过调整各溶剂在流动相中的比例，可有效地改善不同组分的层析效果，有助于植物多酚的定性分析^[28-29]。在薄层色谱法中用于植物多酚定性分析的显色试剂和方法与纸色谱法中使用的完全相同，在此不再赘述。

需要特别指出的是，在通过薄层色谱法对植物多酚进行定性分析时，展开剂中不同流动相的选择和组成对薄层层析的效果有显著的影响。展开剂中溶剂的选择常遵循 2 个原则：溶剂对被分离组分有一定的溶解度；溶剂对被分离组分具有适当的亲和力。一般情况下，对极性较大的目标物使用极性较大的溶剂，极性较小的目标物则使用极性较小的溶剂，溶剂的极性要比被分离组分的极性略小。通常情况下，溶剂的极性可用介电常数来衡量，极性随介电常数的增大而增大。在使用薄层色谱法对植物多酚进行定性分析时，需要根据样品中待测组极性的大致情况选择展开剂中溶剂的种类和组成^[30-32]。薄层色谱中常用溶剂的介电常数见表 1。

表 1 薄层色谱中常用溶剂的介电常数 (15~20 °C)
Tab.1 Dielectric constants of solvents in thin layer chromatography (15~20 °C)

溶剂	介电常数	溶剂	介电常数
水	81	乙酸乙酯	6.5
甲醇	35	甲苯	5.8
乙醇	26	氯仿	5.2
丙酮	24	乙醚	4.4
正丁醇	19	二硫化碳	2.6
异戊醇	16	苯	2.3
吡啶	12	四氯化碳	2.2
氯苯	11	己烷	1.9
乙酸	9.7	石油醚	1.8

薄层色谱法具有操作方便、设备简单、显色容易等特点。同时，其展开速度快，时间短，既适用于微量植物多酚样品的定性分析，又能用于较大数量植物多酚组分纯品的分离和纯化制备。此外，与纸色谱法相比，薄层色谱法还可以使用浓硫酸、浓盐酸之类的腐蚀性显色剂。由于在分析过程中会使用大量的有机溶剂，因此，薄层色谱法易受蛋白质、多糖等

生物大分子杂质的影响，存在重现性和分辨率不足的问题。

1.3 显色法

显色法是植物多酚研究中常用的一种有效定性分析方法，该方法在分析过程中利用显色试剂与植物多酚反应，进而使反应体系呈现颜色，通过产物展现出的不同颜色对植物多酚进行定性分析。

用于植物多酚定性分析的显色反应较多，较常用的是植物多酚与三价铁盐间的显色反应(原理示意图2)。实验中，常用的显色试剂是三氯化铁-铁氰化钾混合液，实验前先将2种试剂各自配成0.01 g/L的水溶液，测定时各自分别加入3~5滴至待测样品中，根据样品呈现的不同颜色对样品中的植物多酚进行定性分析。该反应的原理是植物多酚与反应试剂中的三价铁盐发生络合反应，使反应体系特征性地呈现蓝黑色或深绿色。其中，蓝黑色是三价铁与植物多酚分子中的邻苯三酚结构作用所致，主要指示待测物质中含有水解类多酚；深绿色则是三价铁与植物多酚分子

中的邻苯二酚结构作用所致，主要指示待测物质中含有缩合类多酚^[1,3]。

该方法是植物多酚的定性分析中一种重要的测定方法，适合于植物提取物等水溶液中多酚类物质的定性分析，具有灵敏度高、速度快、操作简便等优点。由于显色法是基于植物多酚与铁离子之间的反应，故该方法仅适用于测定水溶液或极性较大的甲醇和乙醇等溶液中是否含植物多酚及其种类，不适用于分析极性较小的有机溶液体系。同时，若反应溶液中含有对铁离子影响较大的杂质，则可能导致不显色或显色不明显，影响测定结果的准确性^[14]。

除上述的植物多酚与三价铁盐间的显色反应，表2中所有显色反应均可用于溶液中植物多酚的定性分析。如缩合类多酚与浓硫酸呈红色，水解类多酚则呈黄色或褐色；有间苯三酚A环的缩合类多酚遇香草醛-盐酸溶液呈红色，遇茴香醛-硫酸溶液显橙色^[1,14]。在实际实验过程中，可以根据植物多酚的性质和具体条件选择一种或多种方法使用。

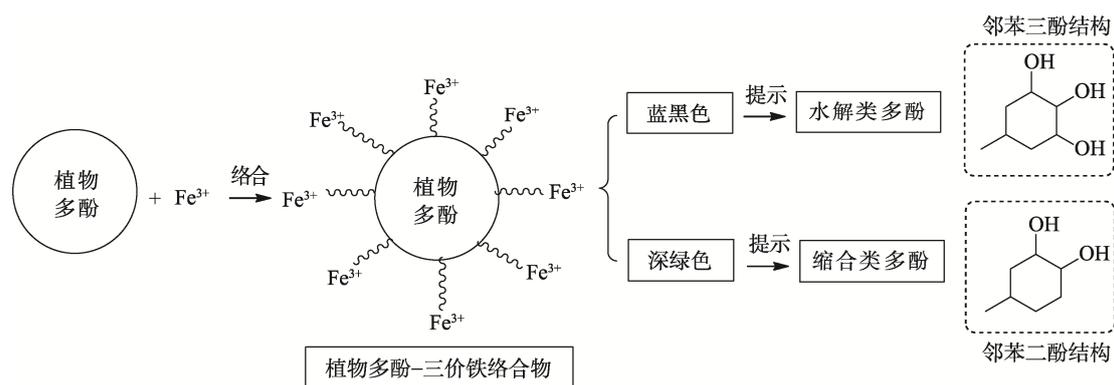


图2 植物多酚与三价铁盐显色反应原理

Fig.2 Principle of color reaction between plant polyphenols and ferric salts

表2 植物多酚的特征性显色反应
Tab.2 Characteristic color reaction of plant polyphenols

试剂	结构特征或化学本质	反应颜色和现象
香草醛-盐酸	间苯三酚型A环	红色
茴香醛-硫酸	间苯三酚型A环	橙色
三氯化铁	间苯二酚	绿色
	邻苯二酚	绿色
三氯化铁-铁氰化钾	邻苯三酚	蓝色
	邻位酚羟基	蓝色
亚硝酸钠-醋酸	六羟基联苯二酸酯	红色
碘酸钾	没食子酸酯	红色→褐色
重氮化对氨基苯磺酸	缩合类多酚	红色
	缩合类多酚	红色
浓硫酸	水解类多酚	黄色
溴水	缩合类多酚	橙红色

此外，显色法也可以与薄层色谱法联合使用，对植物多酚进行快速、简单的初步鉴定。不同种类的植物多酚具有不同的化学结构特征，使其与显色试剂反应后呈现不同的颜色，根据产物的颜色可对植物多酚进行初步的定性分析。可先将植物多酚进行薄层层析，再在层析板上分别喷洒三氯化铁和茴香醛-硫酸等显色试剂，根据不同组分所留斑点的颜色初步判断各组分的类型^[1]，见图 3。

2 植物多酚的定量分析

在食品、医药、化工、生物等领域，植物多酚的含量常常对产品的质量、化工过程的优化、生化反应的调节等方面产生显著的影响，因此，快速、准确地测定样品中植物多酚的含量是相关领域科研工作者非常关注的问题，其既有助于剖析科学现象和阐述深层次科学原理，也能在产品质量控制和监督、工业生产调节和优化等方面起到有益的参考作用^[33]。

“定量分析”是指在定性分析的基础上对待测目标进行“量”方面的考察，通过恰当的方法和技术，对其组成中某类物质或某个组分的含量进行确定，从而掌握物质的组成和变化规律^[13]。与糖类、酯类、蛋白质等相比，植物多酚在组成和结构上是一类非常复杂的化合物，不同组分官能团的种类、数目和位置各不相同，分子量也大不相同，这些变化因素使得难以简单地用一种方法对不同样品中的植物多酚含量进行定量分析，必须根据实际情况选择不同的测定方法和测定条件，以满足不同情况下不同样品中植物多酚的定量分析^[34]。从“快速、简便”的角度出发，文中对植物多酚定量分析中较为典型的方法进行介绍，并对相关酚类标准品在分析方法中的选择进行探讨。

2.1 高锰酸钾滴定法

高锰酸钾滴定法是一种对植物多酚进行定量分析的传统方法，在植物多酚的定量分析中具有一定的代表性。高锰酸钾滴定法的测定原理是利用植物多酚结构中酚羟基的还原性，以靛红为指示剂，采用强氧化性的高锰酸钾试剂对样品溶液进行滴定，根据两者之间氧化还原反应的定量关系，通过高锰酸钾的消耗量计算样品中植物多酚的含量，该法的滴定终点是反应溶液的颜色由蓝色转变为亮黄色^[35]。

该方法中，高锰酸钾标准滴定液的常用浓度为 0.02 mol/L，且需要通过 0.063 g/L 的草酸溶液进行校正后才能使用，靛红指示剂的质量浓度为 0.01 g/L，通过绘制多酚标准品的浓度与高锰酸钾标准滴定液消耗量之间的标准曲线，获得以标准品为当量计算的样品中植物多酚的含量。实验测定中，取 200 mL 蒸馏水滴加 5 mL 的 0.01 g/L 的靛红指示剂，再加入 5 mL 的样品溶液，混匀后置于白瓷皿。使用标定后的高锰酸钾标准滴定液对样品进行滴定，滴定速度维持在 1 滴/s 且滴定过程始终保持样品 80~100 r/min 的搅拌速度。接近滴定终点时放慢滴定速度，直至反应溶液的颜色由蓝色转变为亮黄色，停止滴定，根据高锰酸钾的消耗量计算样品中以标准品当量计算的植物多酚含量。同时，使用溶解样品的溶剂做空白实验^[14, 35]。

高锰酸钾滴定法在植物多酚的定量分析中具有较长的使用历史，是一种在实践中应用较为广泛的分析方法，该方法具有快速、简单、易于操作的优点，对于缩合类多酚是一种经典的定量分析方法。由于样品中含有的抗坏血酸等还原性杂质对该方法有较大的影响，会使测定结果偏高，故其不适用于还原性杂质含量较高的样品^[35]。同时，该方法也存在滴定终点不易掌握、人为操作误差较大、实验试剂需经常标定等缺点。

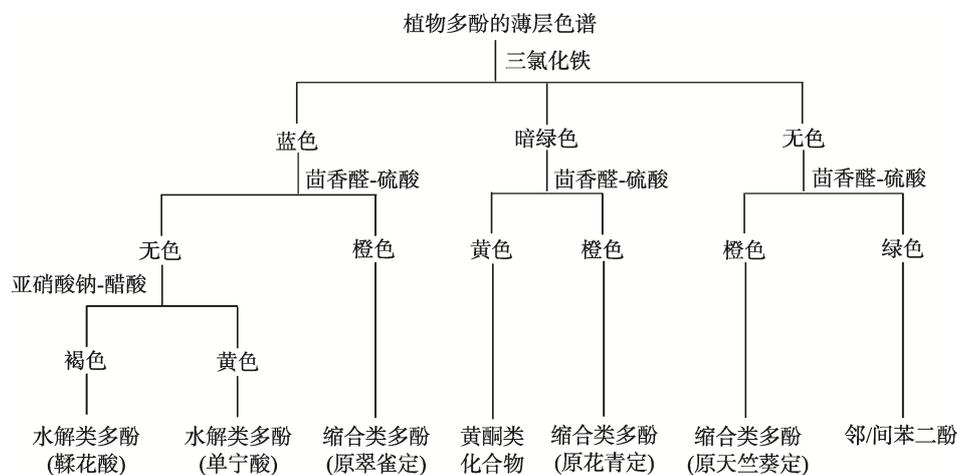


图 3 显色法与薄层色谱法联合使用对植物多酚的定性分析

Fig.3 Qualitative analysis of plant polyphenols by combination of chromogenic method and thin layer chromatography

2.2 酒石酸亚铁比色法

酒石酸亚铁比色法是在植物多酚定量分析中应用较为广泛的一种快速分析方法。酒石酸亚铁比色法的测定原理是利用植物多酚结构中二羟基酚或三羟基酚在磷酸缓冲液(pH值为7.5)中与酒石酸亚铁结合,形成在波长540 nm处有特征吸收的蓝紫色化合物,通过测定反应溶液的吸光度进而获得样品中植物多酚的含量^[36]。

实验测定中,常采用1.0 mL样品溶液与5.0 mL酒石酸亚铁溶液(1.0 g硫酸亚铁和5.0 g酒石酸钾钠混合后加蒸馏水溶解,定容到1 L)和4.0 mL蒸馏水混合,再用pH值为7.5的磷酸缓冲液定容至25 mL,于波长540 nm处测定反应溶液的吸光度。通过绘制多酚标准品的浓度与反应混合溶液吸光度之间的标准曲线,获得以标准品当量计算的样品中植物多酚的含量^[37]。

该方法可检测到样品中20~30 mg/L级别的微量植物多酚含量,具有灵敏、快速、简便、重现性好等优点,适用于大多数类型的植物多酚含量的测定,但也存在测定结果普遍偏高的缺点。此外,该方法对酚类标准品的要求较高,需要采用与待测样品中植物多酚结构非常相近的酚类化合物作为标准品绘制标准曲线^[38]。

2.3 普鲁士蓝比色法

普鲁士蓝比色法是一种测定微量或极微量植物多酚含量的方法,该方法的测定原理是利用植物多酚在酸性介质中能将三价铁离子还原成二价亚铁离子,二价亚铁离子进一步与铁氰化钾生成在波长700 nm处有特征吸收的深蓝色配位化合物(普鲁士蓝),通过测定反应溶液的吸光度进而获得样品中植物多酚的含量^[14]。

实验测定中,1.0 mL样品溶液(最佳测试浓度应低于20 μg/mL)与1.0 mL三氯化铁溶液(0.1 mol/L)和1.0 mL铁氰化钾溶液(0.008 mol/L)混合,使用盐酸溶液(0.1 mol/L)将混合液定容至25 mL,室温条件下避光反应60 min,于波长700 nm处测定反应溶液的吸光度。通过绘制多酚标准品的浓度与反应混合溶液吸光度之间的标准曲线,获得以标准品当量计算的样品中植物多酚的含量^[39]。

该测定方法操作简便,精密度和准确度高,重现性好,适用于绝大多数样品中植物多酚的定量分析。由于样品中具有还原性的抗坏血酸、氨基酸等物质,对测定结果有干扰,同时,反应生成的普鲁士蓝在室温下的溶解度较小,且一般只能稳定存在30 min左右,故该方法需要在反应后30 min内完成测定,从而有效控制和减小实验的误差^[40]。

2.4 福林酚比色法

福林酚比色法是目前用于植物多酚含量测定的最为广泛和典型的方法,也是多个行业和地方标准中测定植物多酚含量的推荐方法。该方法的测定原理是利用植物多酚结构中羟基易于氧化的性质,使其在碱性条件下与福林酚试剂发生氧化反应,生成在波长765 nm处有特征吸收的蓝紫色化合物,通过测定反应溶液的吸光度进而获得样品中的植物多酚含量^[41]。

实验测定中,吸取0.1 mL样品溶液与2.0 mL碳酸钠溶液(20 mg/mL)混合,在25 °C下孵育2 min后,加入0.9 mL福林酚试剂(0.1 mol/L,现配现用),混匀,在25 °C下反应30 min,于波长765 nm处测定反应溶液的吸光度。通过绘制多酚标准品的浓度与反应混合溶液吸光度之间的标准曲线,获得以标准品当量计算的样品中植物多酚的含量^[42]。

福林酚比色法是茶叶等食品中植物多酚含量测定的国家标准(GB/T 8313—2018)和国际标准(ISO 14502—1/2: 2005)中规定和推荐的方法,具有选择性好、简单易操作、测定结果准确可靠等优点。同时,该方法对不同类型的酚类化合物没有特异性,适用于绝大多数的植物多酚。该方法在反应中可能会出现浑浊或沉淀,且样品中含有酚羟基这类官能团的简单酚、氨基酸、蛋白质和抗坏血酸等杂质,对测定结果有较大的干扰^[43—44]。

2.5 香草醛-盐酸比色法

香草醛-盐酸比色法是一种常用于缩合类植物多酚含量测定的典型方法,该方法的测定原理是利用间苯三酚、间苯二酚型黄烷醇和聚合原花色苷结构中A环较高的化学反应活性,使其在酸催化条件下与香草醛发生缩合反应,生成在波长500 nm处有特征吸收的正碳离子,通过该正碳离子吸光度的强弱测定样品中植物多酚的含量^[1,3]。

实验测定中,0.5 mL样品溶液与3.0 mL香草醛-甲醇溶液(体积分数为4%,甲醇作为溶剂配制)和1.5 mL浓盐酸混合,在30 °C下反应20 min,于波长500 nm处测定反应溶液的吸光度。通过绘制多酚标准品的浓度与反应混合溶液吸光度之间的标准曲线,获得以标准品当量计算的样品中植物多酚的含量^[1,38]。

香草醛-盐酸比色法的反应体系稳定,结果重现性好,测定误差范围小,具有快速、准确、操作简单等优点,适用于黄烷-3-醇单体、低聚原花色苷等缩合类植物多酚含量的测定。该方法无法有效区分原花色苷的单体和聚合体,同时,样品中存在的叶绿素、抗坏血酸等物质,对测定结果有较大的干扰^[38,45]。

2.6 正丁醇-盐酸比色法

正丁醇-盐酸比色法也是一种常用于缩合类植物多酚含量测定的方法,该方法的测定原理是利用缩合

类植物多酚中的原花色色素类化合物可在热酸作用下催化生成在波长 546 nm 处有特征吸收的红色产物，通过测定反应溶液的吸光度进而获取样品中缩合类植物多酚的含量^[1, 36]。

实验测定中，将 1.0 mL 样品溶液（甲醇配制）与 0.2 mL 硫酸铁铵溶液（体积分数为 2%，2 mol/L 盐酸配制）和 6.0 mL 正丁醇-盐酸溶液（ $V_{\text{正丁醇}} : V_{\text{浓盐酸}} = 95 : 5$ ）混合，在 95 °C 水浴中冷凝回流反应 40 min，迅速冷却至室温，于波长 546 nm 处测定反应溶液的吸光度值。通过绘制多酚标准品的浓度与反应混合溶液吸光度之间的标准曲线，获得以标准品当量计算的样品中植物多酚的含量^[36, 39]。

正丁醇-盐酸比色法的反应体系稳定，测试结果的重现性较好，适用于缩合类植物多酚的定量测定。相较于前述几种比色法，该方法的实验操作和程序较为复杂，同时，该方法对样品中植物多酚化学结构的依赖性较大，选择性较高，与儿茶素、没食子儿茶素等缩合类植物多酚单体不发生反应，故其在实际应用中测定结果一般偏低^[46]。

2.7 近红外光谱分析法

近红外光谱分析法是近年来在植物多酚定量分析中发展较快的一种新型定量分析技术。该方法的测定原理是利用植物多酚结构中含活泼氢的基团（—OH，—COOH）在波长 780~2526 nm 的电磁波区域跃迁时产生的光谱变化，结合计算机分析和化学计量学方法测定样品中植物多酚的含量^[47]。

实验测定中，常用于测试的样品溶液浓度为 1~2 mg/mL，光谱扫描范围为 4000~10 000 cm^{-1} ，液体样品池为 2 mm 光程的石英比色皿，扫描次数为 32~64，分辨率为 8 cm^{-1} ，测试时环境温度为 25 °C，相对湿度为 40%，采用空气为参比进行样品溶液透射光谱的扫描和采集。通过绘制多酚标准品的浓度与透射光谱吸光度之间的标准曲线，获得以标准品当量计算的样品中植物多酚的含量^[48]。

近红外光谱分析法无需向样品中额外添加其他化学试剂和药品，也无需进行复杂的样品前处理及反应，可将获得的样品溶解后直接测定。同传统的方法相比，其具有快速、无损、原位和无污染等诸多显著的特点，适用于经过分离和纯化，且具有一定纯度的植物多酚含量的测定。该方法在实验测定前需对最佳定量分析模型和相关参数进行优化和校正，同时，样品中存在的抗坏血酸、柠檬酸等含有活泼氢的物质，对测定结果有较大的干扰^[47, 49]。

2.8 原子吸收光谱分析法

原子吸收光谱分析法是一种间接测定植物多酚含量的方法。该方法的测定原理是利用 Pb^{2+} 等金属盐与植物多酚反应生成难溶性的金属离子-多酚络合物，分离后用原子吸收光谱法测定溶液中过量的 Pb^{2+}

离子，或将沉淀溶解后测定其中的 Pb^{2+} 离子的含量，由此间接测定样品中植物多酚的含量^[50]。

实验测定中，取 1.0 mL 样品溶液与 2.0 mL 碱性乙酸铅溶液（1 mg/mL）混合，并用蒸馏水定容至 10.0 mL，混合液在沸水浴中孵育 20 min，迅速冷却至室温后，在 3000 r/min 下离心 10 min，取 2.0 mL 上清液置于比色管，并用蒸馏水定容至 10.0 mL，以蒸馏水为空白对照组，测定其在原子吸收光谱仪中的吸光度。通过绘制 Pb^{2+} 离子的浓度与透射光谱吸光度之间的标准曲线，获得上清液中 Pb^{2+} 离子的含量，从而计算出沉淀中与植物多酚按照 1 : 1 结合的 Pb^{2+} 离子的量，进而间接计算出样品中植物多酚的含量^[51]。

原子吸收光谱分析法具有灵敏度高、简单、快速的优点，适用于样品中微量植物多酚的定量分析。该方法步骤较多，操作烦琐，结果通过间接计算得到，误差较大。同时，样品中存在能与 Pb^{2+} 等金属离子发生沉淀反应的物质，对测定结果有较大的干扰。

除上述提及的方法外，近年来，随着分析化学理论和技术的发展，高效液相色谱法、气相色谱法、质谱法和核磁共振法等色谱和光谱分析法在植物多酚的定量分析中也得到了发展和应用^[14, 38]。这些方法的实施需要较贵重的分析仪器，样品前处理也较复杂。同时，鉴于目前已有大量文献综述对这些分析方法在测定多酚类化合物的应用方面进行了报告，故文中不再对其在植物多酚的定性定量分析中的应用进行介绍。

3 定量分析方法的选择

从上述关于植物多酚定量分析方法的介绍中可以看出，虽然能用于植物多酚定量分析的测定方法多种多样，但没有一种方法可适用于所有种类植物多酚的定量分析（见表 3）。在实际研究中，需要根据研究的目的和待测样品的特点，选择一种或几种合适的方法进行定量分析，并尽量避免样品中杂质对分析结果准确性的干扰。

在对植物多酚的定量分析方法进行选择时，可根据以下的多个影响因素进行综合考虑^[52]：测定目标（植物多酚的总含量或特定组分的含量）、样品中植物多酚的类型（水解类、缩合类、复杂类）、样品中植物多酚含量的大致范围（大量或微量）、样品中杂质的含量（大量或微量）、样品中杂质对测定结果的影响（偏大或偏小）、待测样品的数量（批量或少量）、测定结果的要求（相对含量或绝对含量）、测定精度的要求（准确度和灵敏度）、测定条件的限制（具备的试剂和仪器）。

采用不同方法对同一样品的植物多酚含量进行测定时，其测定结果通常会出现较大的差异。分别采用普鲁士蓝比色法和福林酚比色法对 10 种茶叶和葡

表3 植物多酚定量分析方法的比较
Tab.3 Comparison of quantitative analysis methods of plant polyphenols

定性方法	主要原理	仪器	主要试剂	适用范围	优势	局限性
高锰酸钾滴定法	利用植物多酚与高锰酸钾之间氧化还原反应的定量关系	滴定管	高锰酸钾、草酸、靛红指示剂、酚类标准品	缩合类多酚	快速、简单、易于操作	还原性杂质有影响, 误差大, 试剂需经常标定
酒石酸亚铁比色法	植物多酚与酒石酸亚铁结合, 形成蓝紫色化合物	紫外-可见分光光度计	酒石酸亚铁、磷酸缓冲液、酚类标准品	大多数类型的植物多酚	灵敏、快速、简便、重现性好	结果普遍偏高, 对酚类标准品的要求较高
普鲁士蓝比色法	植物多酚将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 进而与铁氰化钾生成普鲁士蓝	紫外-可见分光光度计	三氯化铁、铁氰化钾、盐酸、酚类标准品	大多数类型的植物多酚	精密度及准确度高, 重现性好	还原性杂质有影响, 普鲁士蓝在室温下的溶解度较小
福林酚比色法	植物多酚与福林酚试剂发生氧化反应, 形成蓝紫色化合物	紫外-可见分光光度计	碳酸钠、福林酚试剂、酚类标准品	大多数的植物多酚	选择性好、简单、准确	含有酚羟基杂质有干扰, 反应可能有沉淀
香草醛-盐酸比色法	植物多酚与香草醛发生缩合反应, 形成正碳离子	紫外-可见分光光度计	香草醛、甲醇、浓盐酸、酚类标准品	缩合类植物多酚	快速、准确、操作简单	还原性杂质有影响, 无法区分单体和聚合体
正丁醇-盐酸比色法	植物多酚在热酸作用下催化生成红色产物	紫外-可见分光光度计	硫酸铁铵、甲醇、正丁醇、盐酸、酚类标准品	缩合类植物多酚	反应体系稳定, 重现性好	程序复杂, 选择性较高, 结果一般偏低
近红外光谱分析法	植物多酚的含活泼氢跃迁时产生光谱变化	近红外光谱仪	酚类标准品	大多数经分离和纯化后的植物多酚	快速、无损、原位、无污染	含活泼氢杂质有干扰, 需对模型参数进行优化
原子吸收光谱分析法	利用原子吸收光谱测定金属离子, 间接测定植物多酚	原子吸收光谱仪	金属离子溶液	大多数的植物多酚	灵敏度高、简单、快速	操作烦琐, 误差大, 干扰杂质多

萄汁中植物多酚含量进行测定, 测定结果见表 4^[53]。从结果中可以看到, 2 种方法在测定不同样品中植物多酚的含量时都具有良好的稳定性和准确性, 由于两者的测定原理不同, 因此所得测定结果具有一定的差距。

在实际测定中, 通常采取几种不同的分析方法对同一样品中的植物多酚含量进行定量分析, 从而对样品中所含的不同结构和种类的植物多酚的含量得到一个综合的表征和认识。

4 标准品的选择

在上述有关植物多酚定量分析方法的介绍中可知, 多数分析方法需要使用化学结构和纯度已知的酚类化合物作为标准品绘制标准曲线或对仪器和方法进行校正的依据。可见, 标准品的选择对测定结果的准确性具有较大影响。需要科学地选择测试所用的标准品, 否则, 即使之后的分析环节非常准确, 其测定结果也毫无价值, 还可能得出错误的结论。

一般情况下, 实验研究中所用的酚类标准品应与待测样品中的植物多酚在性质上基本一致, 在结构上相近。同时, 酚类标准品本身的化学结构和纯度应已

知, 且适合于样品测定的实验体系。在植物多酚的定量分析中, 通常采用属于同一类的植物多酚纯物质作为标准品进行测定。例如, 测定水解类植物多酚含量时, 常采用没食子酸作为标准品; 测定缩合类植物多酚含量时, 则采用儿茶素为标准品。需要特别指出, 不管使用何种植物多酚纯物质作为标准品, 都无法完全准确地反映样品中植物多酚的真实含量。只有使用从样品中分离纯化得到的植物多酚纯品为标准品进行分析时, 才能得出更为真实的测定结果^[54-55]。在大量实验的基础上, 植物多酚定量分析的不同方法中建议使用的酚类标准品见表 5。

此外, 在同一分析方法中, 若 2 种以上的酚类化合物都可用作标准品时, 则最好对其进行比较, 通过灵敏度和测定范围分析, 选择出更适用于该分析方法的标准品。在定量分析植物多酚的生物活性时, 还需要进一步考虑酚类标准品的化学结构对所测试活性的影响^[42,52]。例如, 单宁酸对反刍类动物体内的氮素代谢无显著影响, 而其它水解类植物多酚则可能较大幅度地降低其对氮素的生物代谢和利用。若此时采用单宁酸做阳性对照标准品, 不仅无法真实反映实验结果, 还会得出错误的结论。

表 4 不同方法对茶叶和葡萄汁中植物多酚含量测定结果的比较
Tab.4 Comparison of determination results of plant polyphenols in tea and grape juice by different methods mg/L

样品	编号	PB 法	PC 法
茶叶	1	1654±84.71	1449±85.65
	2	1679±28.99	1663±94.57
	3	1650±91.84	1610±99.72
	4	1775±9.40	1711±12.76
	5	1731±32.87	1819±39.45
	6	1113±27.64	1431±45.40
	7	1824±53.84	1404±170.69
	8	1673±31.10	1251±52.14
	9	1865±30.39	1717±212.38
	10	1315±52.84	1213±22.91
葡萄汁	1	645±24.35	709±35.56
	2	1347±138.30	2166±100.29
	3	1626±62.54	3394±212.65
	4	983±42.31	1410±151.00
	5	1782±65.13	3377±266.26
	6	1623±44.15	3385±141.93
	7	1133±51.70	1727±71.74
	8	1765±70.22	3579±19.68
	9	1509±19.31	2952±240.71
	10	1422±31.34	1856±71.74

注: PB 为普鲁士蓝比色法; PC 为福林酚比色法

表 5 植物多酚不同定量分析方法中建议使用的酚类标准品

Tab.5 Recommended phenolic standards for different quantitative determination methods of plant polyphenols

定量测定方法	酚类标准品	测定目标
福林酚比色法	没食子酸	植物多酚总含量
普鲁士蓝比色法	没食子酸	植物多酚总含量
酒石酸亚铁比色法	没食子酸	水解类植物多酚含量
香草醛-盐酸比色法	儿茶素	缩合类植物多酚含量
正丁醇-盐酸比色法	原花青素	缩合类植物多酚含量

5 结语

目前, 植物多酚以其来源的广泛性、含量的丰富性、性质的多样性以及利用的绿色环保性等特点, 被

形象地称为“植物化学界有待开发的金矿”, 已成为国内外天然产物领域的研究热点, 在食品、生物、包装材料等领域展现出良好的应用价值和广阔的发展前景。目前, 世界各国关于植物多酚的研究热点主要集中在植物多酚的抗氧化活性、植物多酚的体内代谢机理、植物多酚的生物利用度及其抗癌作用机制研究等 3 个主要方向。今后一段时间内, 相关的研究工作将重视准确测定植物多酚在体内的各种生物活性, 深入揭示植物多酚中的活性成分对机体代谢的调控机制和构效关系, 进一步优化提高植物多酚生物利用度的方法, 并加强植物多酚的临床实验研究, 充分挖掘和开发植物多酚的应用价值。

植物多酚定性定量分析的基本要求是全面准确地反应植物多酚的类型和含量, 既要测定其在样品中的含量, 又要考虑各类植物多酚的结构特点。通过综合分析和考虑, 用于植物多酚定性定量分析的理想方法应该具有如下特点: 原理清楚且具有良好的准确度和精密度; 操作简单易行; 适用于绝大多数类型的植物多酚。在长期的科学实践中, 不同领域的科研工作者基于各自的学科背景和特点, 建立了许多有关植物多酚的定性定量分析方法, 这些方法的测定原理和繁简程度各不相同, 测试结果也有较大差异, 各有优缺点。在对植物多酚的研究中, 研究者需要根据各自的研究目的和样品的特点, 选择几种合适的方法构建一套合理的分析方案对植物多酚进行定性定量分析, 从而全面地反映样品中植物多酚的类型和含量。

随着分析化学及相关学科理论的发展, 免疫印迹、纳米荧光、分子探针和化学芯片等新技术开始逐渐被应用到植物多酚的定性定量分析中。由于实验成本和条件的限制, 该类新技术还未能普遍推广和广泛应用, 因此, 基于目前经典的测定方法, 开发更准确、简单、易行、经济的植物多酚定性定量分析方法是相关科技工作者未来的研究方向。

参考文献:

- [1] 石碧, 曾维才, 狄莹. 植物单宁化学及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2020: 1—3.
SHI Bi, ZENG Wei-cai, DI Ying. Plant Tannin Chemistry and Its Application[M]. Beijing: Science Press, 2020: 1—3.
- [2] CROZIER A, JAGANATH I B, CLIFFORD M N. Dietary Phenolics: Chemistry, Bioavailability and Effects on Health[J]. Natural Products Reports, 2009, 26: 1001—1043.
- [3] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 3—6.
SUN Da-wang. Plant Tannin Chemistry[M]. Beijing: China Forestry Press, 1992: 3—6.
- [4] CROZIER A, CLIFFORD M N, ASHIHARA H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and

- Role in the Human Diet[M]. New York: Wiley-Blackwell, 2006: 179—185.
- [5] CHAIJAN S, PANPIPAT W, PANYA A, et al. Preservation of Chilled Asian Sea Bass (*Lates Calcarifer*) Steak by Whey Protein Isolate Coating Containing Polyphenol Extract from Ginger, Lemongrass, or Green Tea[J]. Food Control, 2020, 118: 107400.
- [6] FARIAS T R B, RODRIGUES S, FERNANDES F A N. Effect of Dielectric Barrier Discharge Plasma Excitation Frequency on the Enzymatic Activity, Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Apple Cubes and Apple Juice[J]. Food Research International, 2020, 136: 109617.
- [7] GAO Hao-xiang, HE Zheng, SUN Qun, et al. A Functional Polysaccharide Film Forming by Pectin, Chitosan, and Tea Polyphenols[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 215: 1—7.
- [8] SAHRAEE S, MILANI J M, REGENSTEIN J M, et al. Protection of Foods Against Oxidative Deterioration Using Edible Films and Coatings: A Review[J]. Food Bioscience, 2019, 32: 100451.
- [9] ZHANG Xin, LIU Jing, YONG Hui-min, et al. Development of Antioxidant and Antimicrobial Packaging Films Based on Chitosan and Mangosteen (*Garcinia Mangostana* L) Rind Powder[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 1129—1139.
- [10] YUAN Biao, CAO Yu-xuan, TANG Qi, et al. Enhanced Performance and Functionality of Active Edible Films by Incorporating Tea Polyphenols into Thin Calcium Alginate Hydrogels[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105197.
- [11] MOTTA S, GUAITA M, CASSINO C, et al. Relationship Between Polyphenolic Content, Antioxidant Properties and Oxygen Consumption Rate of Different Tannins in A Model Wine Solution[J]. Food Chemistry, 2020, 313: 126045.
- [12] GARRIDO J, BORGES F. Wine and Grape Polyphenols-A Chemical Perspective[J]. Food Research International, 2013, 54: 1844—1858.
- [13] ALISTAIR B. Analytical Chemistry (1st ed)[M]. London: Auris Reference Ltd, 2012, 113—124.
- [14] KHODDAMI A, WILKES M A, ROBERTS T H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds[J]. Molecules, 2013, 18: 2328—2375.
- [15] KALININ A M, ANTONOVA N P, BOKOVIKOVA T N, et al. Differential Approach to Analysis of Tannin-Containing Herbal Raw Materials and Medicines[J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2018, 51: 1082—1084.
- [16] CLEGG D L. Paper Chromatography[J]. Analytical Chemistry, 1950, 22: 48—59.
- [17] HUANG Yun-qing, YOU Jing-qing, ZHANG Jun-sheng, et al. Coupling Frontal Elution Paper Chromatography with Desorption Corona Beam Ionization Mass Spectrometry for Rapid Analysis of Chlorphenamine in Herbal Medicines and Dietary Supplements[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 121: 7371—7376.
- [18] SREENIVASAN K. Determination of Polymer Molecular Weights by Paper Chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1985, 325: 363—365.
- [19] MEER W A, WESTBY R S, SIRGO W. Identification and Evaluation of Botanical Extracts by Paper Chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1962, 51: 756—759.
- [20] TOENNIES G, KOLB J J. Techniques and Reagents for Paper Chromatography[J]. Analytical Chemistry, 1951, 23: 823—826.
- [21] ROBERTS E A H, WOOD D J. Separation of Tea Polyphenols on Paper Chromatograms[J]. Biochemical Journal, 1953, 53: 332—336.
- [22] NAMBIAR V S, DANIEL M, GUIN P. Characterization of Polyphenols from Coriander Leaves (*Coriandrum Sativum*), Red Amaranthus (*A Paniculatus*) and Green Amaranthus (*A Frumetaceus*) Using Paper Chromatography and Their Health Implications[J]. Journal of Herbal Medicine and Toxicology, 2010, 4: 173—177.
- [23] TOIT M H D, EGGEN P O, KVITTINGEN L, et al. Normal and Reverse-Phase Paper Chromatography of Leaf Extracts of Dandelions[J]. Journal of Chemical Education, 2012, 89: 1295—1296.
- [24] THOMPSON R S, JACQUES D, HASLAM E, et al. Plant Proanthocyanidins. Part I: The Isolation, Structure, and Distribution in Nature of Plant Procyanidins[J]. Journal of the American Chemical Society, 1972, 1: 1387—1399.
- [25] GALLOWAY K R, BRETZ S L, NOVAK M. Paper Chromatography and UV-Vis Spectroscopy to Characterize Anthocyanins and Investigate Antioxidant Properties in The Organic Teaching Laboratory[J]. Journal of Chemical Education, 2015, 92: 183—188.
- [26] POOLE C F. Thin-Layer Chromatography: Challenges and Opportunities[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1000: 963—984.
- [27] MARSTON A. Thin-Layer Chromatography With Biological Detection in Phytochemistry[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218: 2676—2683.
- [28] TUZIMSKI T. Application of Different Modes of Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry for The Separation and Detection of Large and Small Biomolecules[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218: 8799—8812.
- [29] CIESLA L, WAKSMUNDZKA-HAJNOS M. Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography in The Analysis of Secondary Plant Metabolites[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 1035—1052.
- [30] POOLE C F, DIAS N C. Practitioner's Guide to Method Development in Thin-Layer Chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 892: 123—142.
- [31] SHERMA J. Thin-Layer Chromatography in Food and

- Agricultural Analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 880: 129—147.
- [32] CIURA K, DZIOMBA S, NOWAKOWSKA J, et al. Thin Layer Chromatography in Drug Discovery Process[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1520: 9—22.
- [33] KHAN M K, HUMA Z E, DANGLES O. A Comprehensive Review on Flavanones, The Major Citrus Polyphenols[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, 33: 85—104.
- [34] GLEICHENHAGEN M, SCHIEBER A. Current Challenges in Polyphenol Analytical Chemistry[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2016, 7: 43—49.
- [35] SCHOFIELD P, MBUGUA D M, PELL A N. Analysis of Condensed Tannins: A Review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2001, 91: 21—40.
- [36] ARAPITSAS P. Hydrolyzable Tannin Analysis in Food[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135: 1708—1717.
- [37] HRNCIRIK K, FRITSCH S. Comparability and Reliability of Different Techniques for The Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, 106: 540—549.
- [38] NACZK M, SAHIDI F. Review: Extraction and Analysis of Phenolics in Food[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054: 95—111.
- [39] MUELLER-HARVEY I. Analysis of Hydrolysable Tannins[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2001, 91: 3—20.
- [40] GRAHAM H D. Stabilization of The Prussian Blue Color in The Determination of Polyphenols[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40: 801—805.
- [41] CHEN Liang-yu, CHENG Chen-wei, LIANG Ji-yuan. Effect of Esterification Condensation on The Folin-Ciocalteu Method for The Quantitative Measurement of Total Phenols[J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 5—10.
- [42] GAO Mai-rui, XU Qian-da, HE Qiang, et al. A Theoretical and Experimental Study: The Influence of Different Standards on the Determination of Total Phenol Content in the Folin-Ciocalteu Assay[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2019, 13: 1349—1356.
- [43] SANCHEZRANGEL J C, BENAVIDES J, HEREDIA J B, et al. The Folin-Ciocalteu Assay Revisited: Improvement of Its Specificity for Total Phenolic Content Determination[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5: 5990—5999.
- [44] ANDRESSA B, GISELY C L, JOAO C P M. Application and Analysis of the Folin-Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense L*[J]. *Molecules*, 2013, 18: 6825—6856.
- [45] ABEYNAYAKE S W, PANTER S, MOURADOV A, et al. A High-Resolution Method for the Localization of Proanthocyanidins in Plant Tissues[J]. *Plant Methods*, 2011, 7: 1—6.
- [46] PORTER L J, HRSTICH L N, CHAN B G. The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin[J]. *Phytochemistry*, 1986, 25: 223—230.
- [47] POREP J U, KAMMERER D R, CARLE R. On-Line Application of Near Infrared (NIR) Spectroscopy in Food Production[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2015, 46: 211—230.
- [48] NOGALES-BUENO J, BACA-BOCANEGRA B, RODRIGUEZ-PULIDO F J, et al. Use of Near Infrared Hyperspectral Tools for the Screening of Extractable Polyphenols in Red Grape Skins[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 559—564.
- [49] HUANG Hai-bo, YU Hai-yan, XU Hui-rong, et al. Near Infrared Spectroscopy for On/In-Line Monitoring of Quality in Foods and Beverages: A Review[J]. *Journal of Food Engineering*, 2008, 87: 303—313.
- [50] CROZIER A. Methods in Polyphenol Analysis[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 1172—1173.
- [51] MUCCHINO C, MUSCI M. Extraction of Al, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn-Polyphenol Complexes from Black Tea Infusions by Amberlite Resins[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94: 2234—2238.
- [52] ESCRIBANO-BAILON T, DAY A, PASCUAL-TERESA S D, et al. Methods in Polyphenol Analysis[M]. London: Royal Society of Chemistry, 2003: 109—137.
- [53] MARGRAF T, KARNOPP A R, ROSSO N D, et al. Comparison Between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate the Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80: 2397—2403.
- [54] ROBBINS R J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 2866—2887.
- [55] KONG J M, CHIA L S, GOH N K, et al. Analysis and Biological Activities of Anthocyanins[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 923—933.
- [56] TOMAS-BARBERAN F A, ANDRES-LACUEVA C. Polyphenols and Health: Current State and Progress[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 8773—8775.
- [57] DOMINGUEZ-RODRIGUEZ G, MARINA M L, PLAZA M. Strategies for the Extraction and Analysis of Non-Extractable Polyphenols from Plants[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1514: 1—15.
- [58] ANDERSON H E, SANTOS I C, HILDENBRAND Z L, et al. A Review of the Analytical Methods Used for Beer Ingredient and Finished Product Analysis and Quality Control[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1085: 1—20.