

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高職組 化工、衛工及環工科

第一名

091102

從『C』到『酚』

—Folin-Ciocalteu 試劑改良研究

學校名稱：國立東勢高級工業職業學校

作者： 職二 劉惟竣 職二 詹承穎 職二 潘振盛	指導老師： 江柎鈞 陳慎平
---	-----------------------------

關鍵詞：Folin-Ciocalteu 試劑、總酚含量、沒食子酸

得獎感言

經過這次全國賽之後，讓我們對科學展覽會的了解，更上了一層，每位選手和每件參賽作品都非常的出色，還有化學闖關競賽，每個關卡都設計的很周詳，也很具有挑戰性，雖然大家在場上是競爭對手，但是大家互相學習，充實自己對化學的了解，是一件很棒的事。

進行科學研究，讓我們了解到許多事，原來科學家們在發明東西或改良東西時，都花上了很長的時間，挫折也會很多，也不知會不會成功，但他們都很努力想去完成，團隊合作也是非常重要的，在一起做實驗時，互相討論，觀察數據，才有成果，科學研究是一項很艱辛的任務，一定要有努力，才会有好成果，我們相信未來，我們會朝著新的方向，繼續努力。

鼓勵其他的選手能加油，雖然科學研究很艱辛，但是在跟大家進行研究時，不管是對你還是其他人，都能讓自己更上一層樓，也能了解到科學研究的精神，能讓你在未來的人生道路上，用認真的態度去學習。

做了快接近1年半的實驗，從基礎開始練習，到熟練，才開始實驗，一步一步來，做了大量數據，決定下一步該怎麼做，到成功改良試劑，開發出試紙，非常的辛苦，常常做到晚上，但我們都是為了拿下勝利，沒有付出就不會有好成果，常常遇到挫折，都是老師鼓勵我們，讓我們努力做下去，老師也很辛苦，陪著我們做實驗，和我們進行討論，看著我們拿下冠軍，能跟大家進行科學實驗真的很棒。



這張相片是我們比賽完拍的，作為留念。

摘要

本研究主要以『總磷之比色定量—維生素 C 法』的反應試劑，來改良 Folin-Ciocalteu 試劑。以鉬酸鈉配製成磷鉬酸酚混合呈色劑取 5mL，10% Na_2CO_3 溶液 4mL 與沒食子酸在室溫下反應 10 min，測其在波長 320 nm 及 700 nm 吸光值，320 nm 沒食子酸水溶液標準檢量線在 0.06 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.3025x + 0.0061$ ， $R^2=0.9994$ ，檢量線確認回收率為 100.28%， $\text{RSD}=2.34\%(n=3)$ ；工作波長 700 nm，沒食子酸標準檢量線在 0.1 ~ 16 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.0446x - 0.0021$ ， $R^2=0.9997$ ，檢量線確認回收率為 99.91%， $\text{RSD}=3.04\%(n=3)$ 。以此方法進行精油及飲料的總酚含量測定，添加標準品回收率均可在 90~110%間，表示此方法可適用精油及飲料試樣分析測定。本研究的磷鉬酸酚呈色劑配製相當簡單快速且價格便宜，非常適合學生於課堂學習總酚含量測定。並以此開發出多酚快速檢測試紙，配合標準比色卡可快速測得水溶液試樣中的總多酚含量。

壹、研究動機

在學校實驗課看到同學在做精油的總酚含量測定實驗時，看到他們在離心管中添加反應試劑後進行定量分析，隨口問了他們，怎不要用量瓶定容操作呢？「這 Folin-Ciocalteu 試劑不便宜耶」引起我們對 Folin-Ciocalteu 試劑的好奇，從相關的研究得知，常以 Folin-Ciocalteu 試劑來檢測總多酚含量。Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚含量^[4]時，利用 Folin-Ciocalteu 試劑中的磷鉬酸與總多酚化合物反應，磷鉬酸被還原，生成藍色化合物，藍色的深淺與總多酚含量呈正相關。



在日常生活中，「多酚」時常在廣告上看到這一名詞，它是廣泛存在天然食品中的一種天然抗氧化劑，也和維持健康代謝有關聯，因此，多酚類物質含量的多寡總是被渲染。然而，Folin-Ciocalteu 試劑的價格並不便宜，如要自行製備 Folin-Ciocalteu 試劑其方法繁瑣耗時^[4]，因此，本研究想尋找可替代 Folin-Ciocalteu 試劑的方法，以讓此生活化的分析檢測能在高中職階段課程實施。

在高二的分析化學^[2,3]中學習到以酸性的鉬酸鉍可定性檢測正磷酸根的存在，由實驗得知鉬酸鉍與正磷酸根反應後生成黃色的磷鉬酸鉍沉澱，由實驗觀察我們也發現黃色沉澱越多表示磷酸根含量越高。並在「總磷之比色定量」分析實驗中^[1]，學習到以鉬酸鉍及酒石酸銻鉀與正磷酸鹽作用，再經維生素 C 還原為藍色複合物鉬藍^[7]，其顏色的深淺與正磷酸鹽含量成正相關。由「Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚含量」與「總磷之比色定量」中，我們發現有以下共通點：

1. 都是六價鉬(Mo^{6+})被還原
2. 都有還原劑(抗氧化劑)
3. 都有正磷酸根

從上述三點共通點，本研究從鉬酸鹽、磷酸鹽及沒食子酸(還原劑)三方面進行研究改良 Folin-Ciocalteu 試劑。

貳、研究目的

一、混合呈色試劑之研究

- (一) 改變鉬酸鹽的作用量，並找出合適的作用濃度範圍
- (二) 改變氫氧化鈉的作用量，並找出合適的作用濃度範圍
- (三) 改變正磷酸鹽的作用量，並找出合適的作用濃度範圍
- (四) 改變酸的作用濃度，並找出合適的作用濃度範圍

二、呈色反應的研究

- (一) 探討碳酸鈉的濃度對呈色的影響
- (二) 探討混合呈色試劑、碳酸鈉及沒食子酸的添加順序
- (三) 探討呈色反應對時間的穩定性
- (四) 沒食子酸的線性範圍

三、混合呈色試劑的適用性研究

- (一) 應用於精油總酚含量檢測
- (二) 與市售 Folin-Ciocalteu 試劑比較

四、自製多酚快速檢測試紙

- (一) 多酚試紙檢測極限及沒食子酸標準比色卡製作
- (二) 市售飲料多酚含量的檢測
- (三) 探討多酚檢測試紙的保存穩定性

參、研究器材

器 材			藥 品			
分光光度槽	濾紙	秤量瓶	沒食子酸	果糖	蔗糖	酒石酸銻鉀
電磁加熱攪拌器	量筒	精密電子天平	硫酸	碳酸鈉	咖啡因	酒石酸鉀
量瓶 (50mL、25mL)	取液器	真空濃縮器	醋酸	鉬酸鉍	硫酸銅	草酸鈉
紫外線可見光譜儀 (Spectrophotometer HALO RB-10)			磷酸	鉬酸鈉	碳酸氫鈉	檸檬酸鈉
			鹽酸	磷酸氫二鈉	氫氧化鈉	EDTA-2Na

肆、研究過程與方法

一、標準檢量線之製作

- (一) 混合呈色試劑：依序加入 40mg/mL 鉬酸鉍(或 50mg/mL 鉬酸鈉)溶液 20mL，並加入 2mg/mL 磷酸氫二鈉溶液 20mL，混合均勻之後，再加入 2.5M 之硫酸溶液 10mL。
- (二) 取 5mL 混合呈色劑於 50 毫升量瓶中，分別加入 0~10 不同體積 50ppm 沒食子酸標準溶液，混勻靜置 10 分鐘後，加入 2mL 20%碳酸鈉溶液，分別於 10、20 及 30 分鐘時以分光光度計測定各呈色液於 700 與 320nm 波長之吸光度，以沒食子酸濃度與吸光度計算求得標準檢量線。

二、混合呈色試劑之研究

- (一) 改變鉬酸鹽的作用量，並找出合適的作用濃度範圍
 1. 分別秤取 0~3 克鉬酸鉍(鉬酸鈉)，同檢量線實驗步驟配置混合呈色試劑。
 2. 取 5 mL 沒食子酸標準溶液於 50mL 量瓶中，加入適量的試劑水。
 3. 取 5mL 混合呈色試劑加入各 50mL 量瓶中混合，靜置 10 分鐘後，再加入 2mL 的 20%碳酸鈉溶液，定量至刻度，混合均勻後，靜置 10、20、30 分鐘。
 4. 以分光光度計測定 700nm 與 320nm 波長之吸光度。
 5. 代入沒食子酸標準檢量線，求得標準品回收率。
- (二) 改變氫氧化鈉的作用量，並找出合適的作用濃度範圍
 1. 分別取 0~20 mL 3M NaOH 溶液，同檢量線實驗步驟配置混合呈色試劑。
 2. 同(一)2~5 步驟。
- (三) 改變正磷酸鹽的作用量，並找出合適的作用濃度範圍
 1. 秤 1g 的磷酸氫二鈉，溶於去離子水 250mL。
 2. 分別取 0~20 mL 磷酸氫二鈉溶液，同檢量線實驗步驟配置混合呈色試劑。
 3. 同(一)2~5 步驟。
- (四) 改變酸的作用濃度，並找出合適的作用濃度範圍
 1. 分別取 0~5 mL 5M H₂SO₄ 溶液，同檢量線實驗步驟配置混合呈色試劑。
 2. 同(一)2~5 步驟。

三、呈色反應的研究

- (一) 探討碳酸鈉的濃度對呈色的影響
 1. 配製 10%碳酸鈉溶液。
 2. 同檢量線實驗步驟配置混合呈色試劑。
 3. 取 5 mL 沒食子酸標準溶液於 50mL 量瓶中，加入適量的試劑水。
 4. 取 5mL 混合呈色試劑加入各 50mL 量瓶中混合，靜置 10 分鐘後，再加入 2~10mL 10% Na₂CO₃ 溶液，定量至刻度，混合均勻後，靜置 10、20、30 分鐘。
 5. 以分光光度計測定 700nm 與 320nm 波長之吸光度。
 6. 代入沒食子酸標準檢量線，求得標準品回收率。
- (二) 探討混合呈色試劑、碳酸鈉及沒食子酸的添加順序

1. 如檢量線實驗步驟之溶液配製。
 2. 將 5mL 呈色劑、5mL 沒食子酸標準溶液及 4 mL 10% Na_2CO_3 溶液以不同順序依序添加，定量至刻度，混合均勻後，靜置 10、20、30 分鐘。
 3. 以分光光度計測定 700nm 與 320nm 波長之吸光度。
 4. 代入沒食子酸標準檢量線，求得標準品回收率。
- (三) 探討呈色反應對時間的穩定性
- 以 5mL 沒食子酸標準溶液同檢量線實驗操作，分別於靜置後 10、20、30、40、50、60、90 及 120 分鐘後，以分光光度計測定 700nm 與 320nm 波長之吸光度，並代入沒食子酸標準檢量線，求得標準品回收率。
- (四) 沒食子酸的線性範圍
- 以前述研究目的所得各添加成分最適合的作用濃度配製溶液及取用量，依檢量線實驗對不同作用濃度範圍沒食子酸標準液進行操作，靜置 10 分鐘後以分光光度計測定 700nm 與 320nm 波長之吸光度，以沒食子酸作用濃度對吸光度，以最小平方迴歸求得標準檢量線。

四、混合呈色試劑的適用性研究

(一) 應用於精油總酚含量檢測

1. 精秤 0.04g 精油，以乙醇溶解並定量至 50mL，此為精油試樣溶液。
2. 分取 2mL 精油試樣溶液於三個 50mL 量瓶中，加入 5mL 磷鉬酸混合呈色劑(依研究目的二所得配置)靜置 10 分鐘。
3. 加入 4mL 10% Na_2CO_3 溶液，加水定量至刻度，靜置 10 分鐘後，以分光光度計測定 700nm 與 320nm 波長之吸光度，代入沒食子酸標準檢量線求得相當沒食子酸量。
4. 精秤 0.05g 沒食子酸溶於乙醇溶液定量至 50mL 作為沒食子酸儲備液。取 2.5mL 沒食子酸儲備液，以乙醇稀釋至 50mL 作為沒食子酸標準溶液。
5. 分取 2mL 精油試樣溶液於三個 50mL 量瓶中，分別加入 2mL 沒食子酸標準溶液，再加入 5mL 磷鉬酸混合呈色劑(依研究目的二所得配置)靜置 10 分鐘。
6. 加入 4mL 10% Na_2CO_3 溶液，加水定量至刻度，靜置 10 分鐘後，以分光光度計測定各呈色液於 700 與 320nm 波長之吸光度，代入沒食子酸標準檢量線求得相當沒食子酸量。
7. 扣除精油試樣，計算添加標準品回收率。

(二) 與市售 Folin-Ciocalteu 試劑比較

以市售 2NFolin-Ciocalteu 試劑，每次取量 2.5 mL 及 5mL 20% Na_2CO_3 重複精油總酚含量檢測步驟。

五、自製多酚快速檢測試紙

(一) 多酚試紙檢測極限及沒食子酸標準比色卡製作

1. 將濾紙裁剪成適當大小，浸泡在磷鉬酸酚試劑 24 小時。取出以熱風吹乾。
2. 分別以 0~1000 ppm 沒食子酸標準溶液滴一滴於試紙上，1 分鐘後再滴一滴 3.5% 碳酸鈉溶液。

(二) 市售飲料多酚含量的檢測

1. 以自製試紙檢測：

將製作好的試紙滴一滴飲料，1 分鐘後再滴一滴 3.5%碳酸鈉溶液。

2. 以光度法檢測：

將市售飲料取 2mL 稀釋至 50mL 做為飲料試樣溶液。以 2 mL 飲料試樣溶液，依精油總酚含量檢測步驟進行飲料中總酚含量檢測。

(三) 探討多酚檢測試紙的保存穩定性

1. 將製作好的試紙依光線隔絕及空氣隔絕進行測試，記錄至測試試紙些微變色時間。

2. 以添加化學試劑製作好的試紙依光線隔絕及空氣隔絕進行測試，記錄至測試試紙些微變色時間。

伍、研究結果與討論

在進行沒食子酸標準檢量線實驗時，本研究是以抗壞血酸法檢測水中總磷的比色定量為基礎，利用鉬酸銨、硫酸及磷酸氫二鈉配製成的混合呈色試劑，但所得結果不如預期，量瓶中溶液顏色偏綠色而非藍色，因此嘗試以氫氧化鈉將鉬酸銨溶液酸鹼值調整至 pH=9 後再加熱沸騰 10 分鐘後冷卻再進行相同操作，呈色為藍色，且吸光度與沒食子酸濃度也有線性關係。因此，我們認為溶液中的 NH_4^+ 會干擾混合呈色試劑與還原劑的呈色反應。

全光譜圖

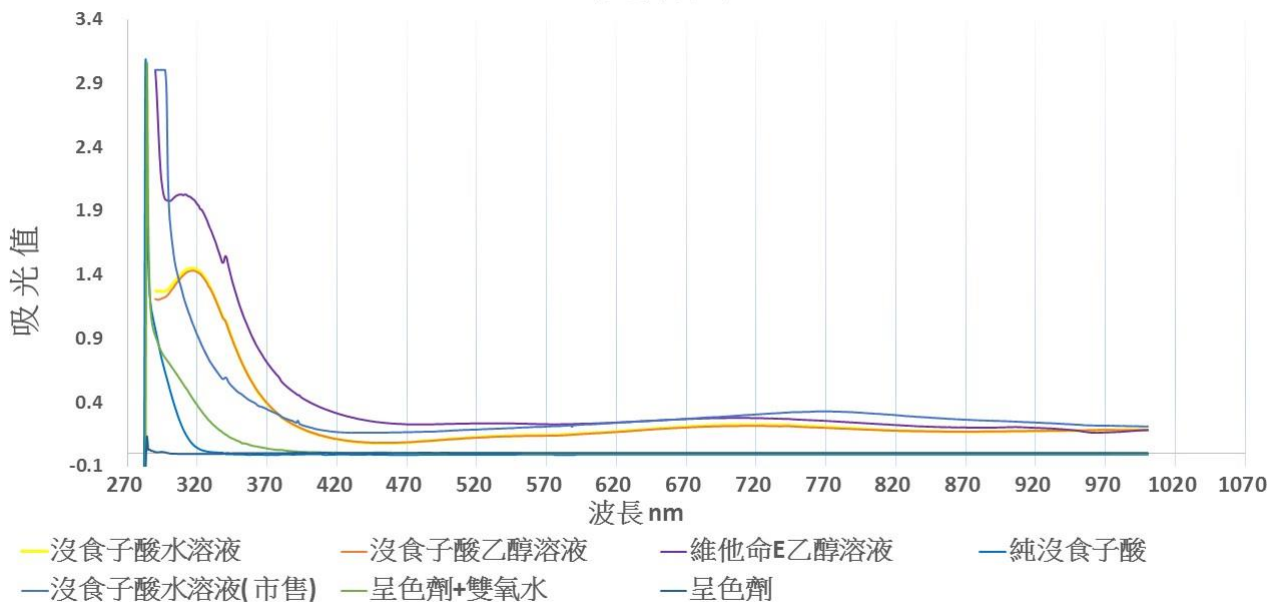


圖1 純沒食子酸溶液及標準品呈色反應後溶液全光譜圖

在製備檢量線前，針對實驗反應所得藍色溶液進行全光譜掃描發現在波長 280 nm 有極強吸收，如圖 1 所示，當我們要選擇工作波長 320 nm 與 700 nm 時，因此同時進行沒食子酸與維他命 E 乙醇溶液反應後的全光譜，發現維他命 E 與呈色劑反應後在 320 nm 也有很強的吸收，所以，我們認定在波長 320 nm 的吸收，是還原劑與磷鉬酸試劑反應後所產生的吸收，最後，我們選擇 320 nm 與 700 nm 作為本研究的工作波長。

本研究決定工作波長為 320nm 及 700nm，但 320nm 工作波長從無人利用在總酚含

量測定，然而從全光譜顯示在波長 320nm 的吸收強度極佳，為了更加確認在波長 320nm 的吸光值完全為測試物質與呈色劑反應後所產生的，進行下表確認實驗，相同作用濃度的沒食子酸與維他命 E，在未加入呈色劑時(實驗編號 4 及 5)，吸光值只為有呈色劑的 6%，而其他添加試劑在波長 320nm 的吸光值影響小於 2%，從圖 1 呈色劑加雙氧水後再加碳酸鈉溶液所得的光譜和只用呈色劑加碳酸鈉反應的光譜比較，我們認為是磷鉬酸酚被雙氧水還原後的紫外光區吸收，這和磷鉬酸酚試劑與沒食子酸和維他命 E 反應所得的光譜在此紫外光區相似，因此更加確定波長 320nm 的吸收是呈色劑與沒食子酸(或維他命 E)加入碳酸鈉後經反應後生成物在紫外光區的吸收。而從圖 1 全光譜，使用市售福林試劑與本研究自製的磷鉬酸酚試劑所得的吸收光譜有很明顯的不同，我們認為是市售福林試劑中的磷鎢酸與沒食子酸所產生的鎢藍複合物。

實驗編號	呈色劑	沒食子酸 (25ppm)	維他命E (99.84ppm)	10%碳酸鈉	吸光值
1	5mL	5mL (乙醇溶液)	-	2mL	1.084
2	5mL	-	5mL	2mL	1.012
3	5mL	-	-	2mL	0.014
4	-	5mL	-	2mL	0.066
5	-	-	5mL	2mL	0.074
6	-	5mL (水溶液)	-	-	-0.008
7	-	5mL (乙醇溶液)	-	-	0.000
8	-	-	5mL	-	0.006

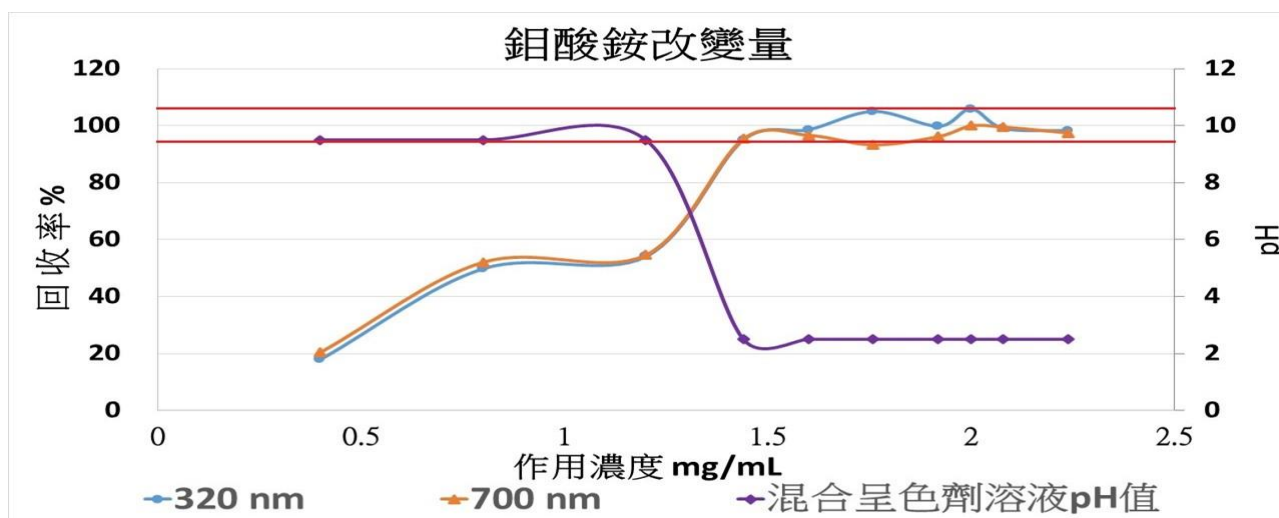
註：“-”表示未添加。

一、混合呈色劑之研究

為了確認本研究所要使用的試劑成分的適合作用濃度範圍，以所製得檢量線為基礎，每次改變一個試劑成分濃度為變因，以等量的標準溶液添加，進行回收率測試，當回收率在 95~105%之間則為較佳的使用範圍。

(一) 改變鉬酸鹽的作用量，並找出合適的作用濃度範圍

1. 使用鉬酸鉍



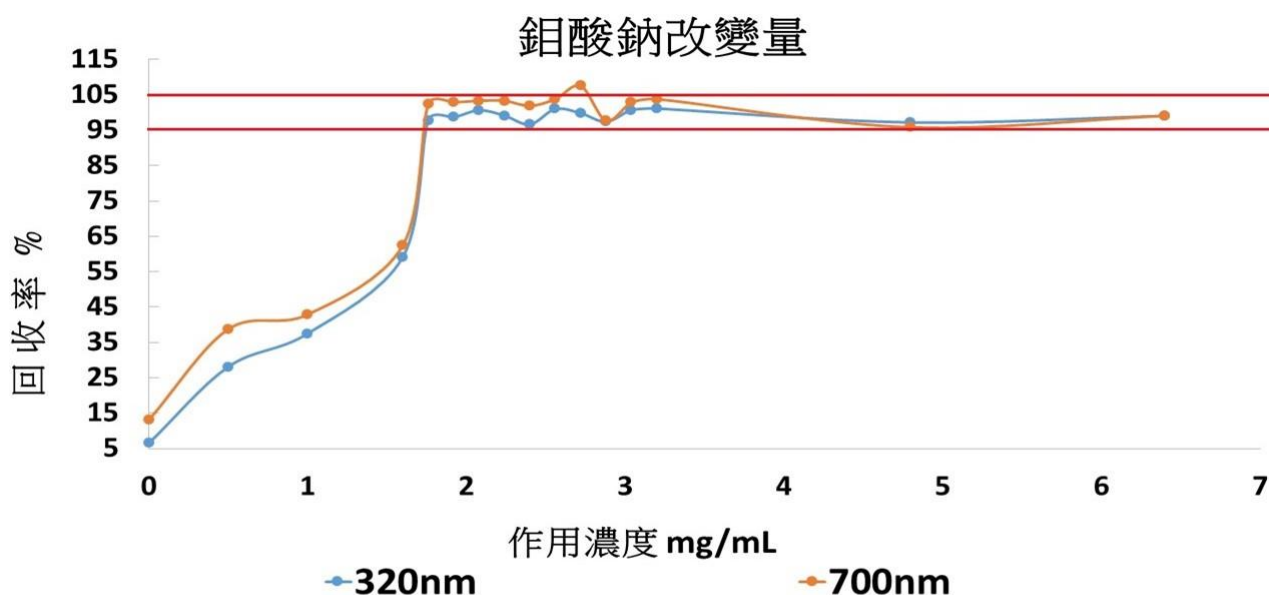
註：以檢量線 320nm : $y=0.3084x-0.0133$ ($R^2=0.9975$)，700nm : $y=0.0479x-0.0085$ ($R^2=0.9980$) 計算得回收率。

圖2鉬酸鉍系統：改變鉬酸鉍添加量對沒食子酸回收率的影響

當鉬酸銨的反應作用濃度低於 1.44 mg/mL 時，回收率很明顯的偏低，我們認為有兩點原因，第一，鉬酸銨的量不足與全部的沒食子酸作用完；第二，由圖 2 可看出鉬酸銨作用濃度低於 1.44 mg/mL 時，呈色劑溶液的 pH>2.5，而使得當沒食子酸與呈色劑混合時溶液的酸度不夠而反應不完全，當加入碳酸鈉後讓沒食子酸呈現鹼性極不穩定^[6]的狀態而無法和呈色劑完全反應造成回收率偏低。

當鉬酸銨作用濃度大於 1.44 mg/mL 時，沒食子酸標準液的回收率可落在 95~105%之間，但當鉬酸銨作用濃度為 2.08 mg/mL 時，也就是取 2.6 克鉬酸銨來配置混合呈色試劑溶液，10 分鐘呈色劑即開始沉澱析出，2.8 克鉬酸銨 5 分鐘開始有析出，3.0 克鉬酸銨使用量則不及 1 分鐘立即析出，當鉬酸銨與添加氫氧化鈉質量比值大於 2.8 時，配製的混合呈色劑即會沉澱析出。因此，由圖 2 我們認為鉬酸銨適合的作用濃度為 1.44~2.24 mg/mL，換算實驗配製添加量為 1.8~2.8 g。

2. 使用鉬酸鈉



註：以檢量線320nm： $y=0.1442x-0.0141$ ($R^2=0.9994$)，700nm： $y=0.0213x+0.0015$ ($R^2=0.9994$)計算得回收率。

圖3鉬酸鈉系統：改變鉬酸鈉添加量對沒食子酸回收率的影響

圖 3 為將鉬酸銨改為鉬酸鈉時，當鉬酸鈉作用濃度為 1.76~6.40 mg/mL 時，沒食子酸標準品回收率實驗皆在 95~105%之間，換算實驗所添加的鉬酸鈉量為 2.2~8.0 g。

圖 4 為不同鉬酸鹽條件配製的呈色試劑溶液，當鉬酸銨不添加氫氧化鈉時，加入正磷酸鹽與硫酸後立即產生黃色鉬黃沉澱，而在鉬酸銨溶液中加入適量的氫氧化鈉煮沸後所配製的呈色試劑不會產生沉澱，由鉬酸鈉所配製的呈色劑也不發生沉澱。



鉬酸銨不加氫氧化鈉之混合溶液



鉬酸銨加氫氧化鈉之混合溶液

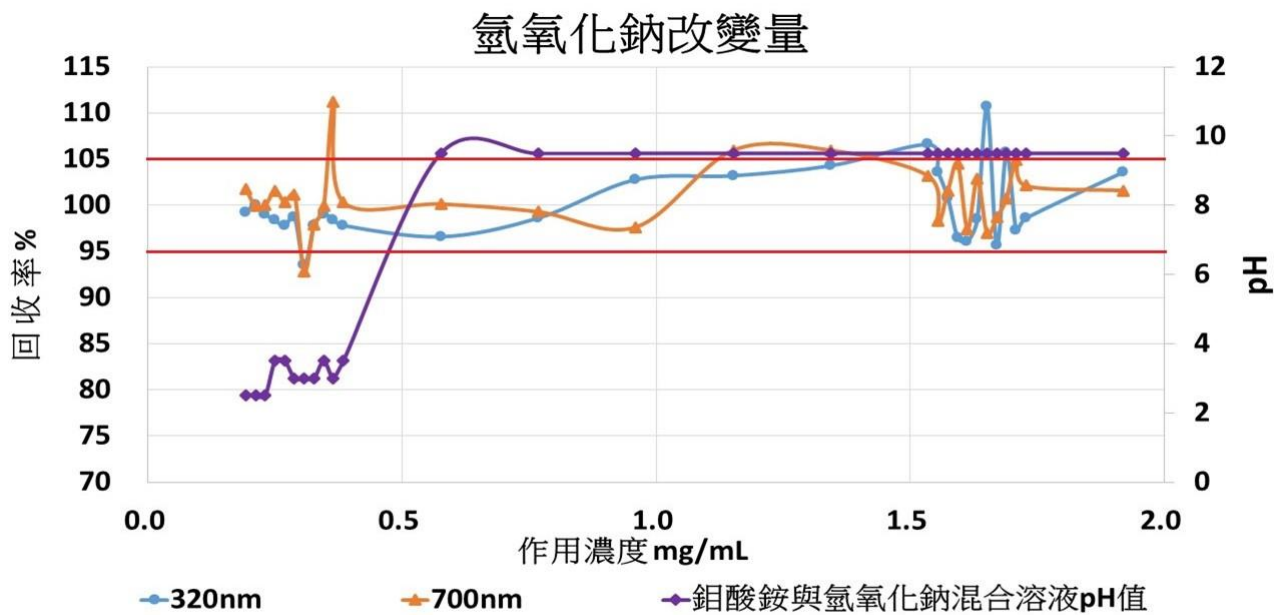


鉬酸鈉之混合溶液

圖4 不同鉬酸鹽條件配製的呈色試劑溶液

(二) 改變氫氧化鈉的作用量，並找出合適的作用濃度範圍

1. 使用鉬酸銨



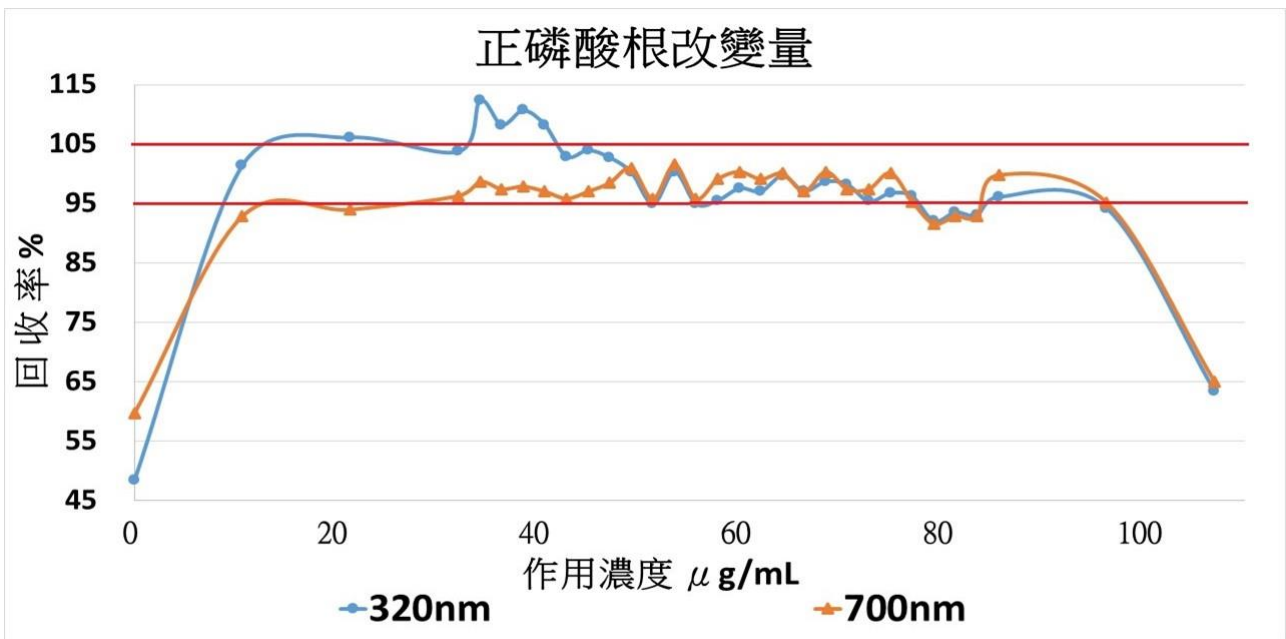
註：以檢量線320nm： $y=0.3084x-0.0133(R^2=0.9975)$ ，700nm： $y=0.0479x-0.0085(R^2=0.9980)$ 計算得回收率。

圖5 鉬酸銨系統：改變氫氧化鈉添加量對沒食子酸回收率的影響

圖 5 為鉬酸銨與氫氧化鈉不同添加量混合溶液 pH 值。由圖得知，當氫氧化鈉作用濃度偏低時，回收率測試實驗的不穩定性相對的較高，當氫氧化鈉作用濃度大於 0.38 mg/mL 時，實驗的穩定性漸佳。以氫氧化鈉作用濃度為 0.38~1.15 mg/mL 為適合作用範圍，相當實驗取用 3M NaOH 體積為 4.0~12.0 mL。

(三) 改變正磷酸鹽的作用量，並找出合適的作用濃度範圍

1. 對鉬酸銨

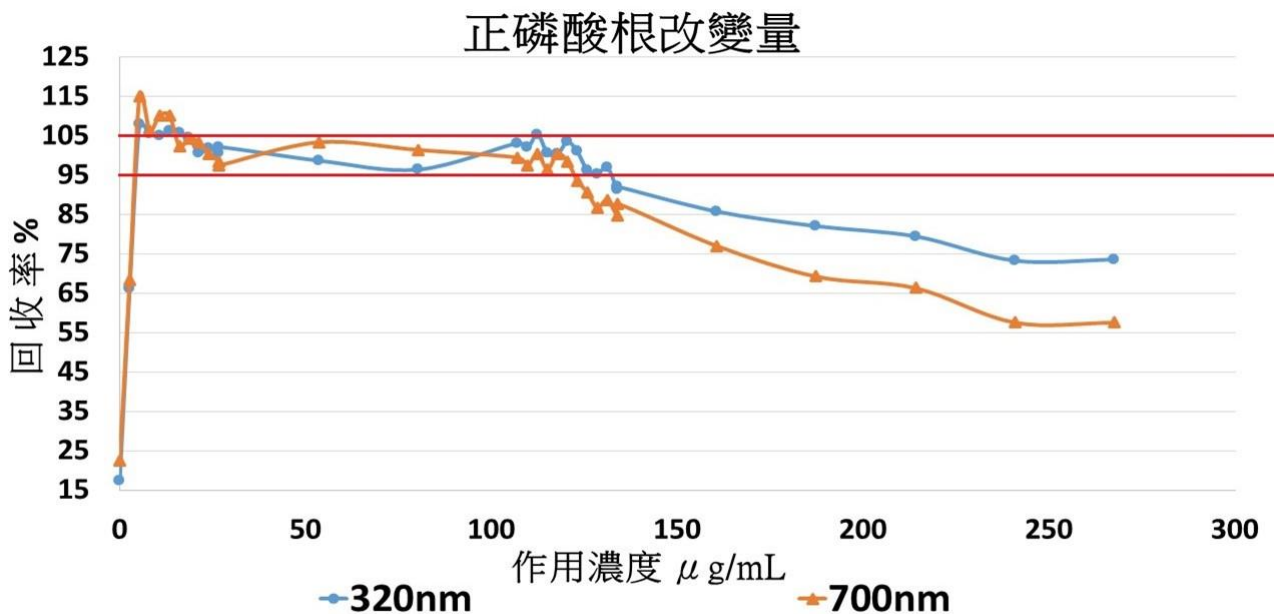


註：以檢量線320nm： $y=0.3084x-0.0133(R^2=0.9975)$ ，700nm： $y=0.0479x-0.0085(R^2=0.9980)$ 計算得回收率。

圖6 鉬酸鉍系統：改變正磷酸根添加量對沒食子酸回收率的影響

當以不同量的磷酸氫二鈉進行配製磷鉬酸混合呈色劑溶液時，磷酸氫二鈉添加量少，混合溶液為很淡的黃色溶液，如圖 6 正磷酸根作用濃度低於 $10 \mu\text{g/mL}$ 時，沒食子酸標準品回收率很明顯的偏低，高於 $10 \mu\text{g/mL}$ 時回收率落在 95~105%之間波動，直到正磷酸根作用濃度大於 $96 \mu\text{g/mL}$ 時回收率急劇的下降，因此，正磷酸根作用濃度的適合範圍 $42.8\sim77.1 \mu\text{g/mL}$ ，相當於實驗時添加 4mg/mL 磷酸氫二鈉溶液 $4.0\sim7.2$ 毫升。

2. 對鉬酸鈉



註：以檢量線320nm： $y=0.2781x-0.0265(R^2=0.9986)$ ，700nm： $y=0.0410x-0.0010(R^2=0.9999)$ 計算得回收率。

圖7 鉬酸鈉系統：改變正磷酸根添加量對沒食子酸回收率的影響

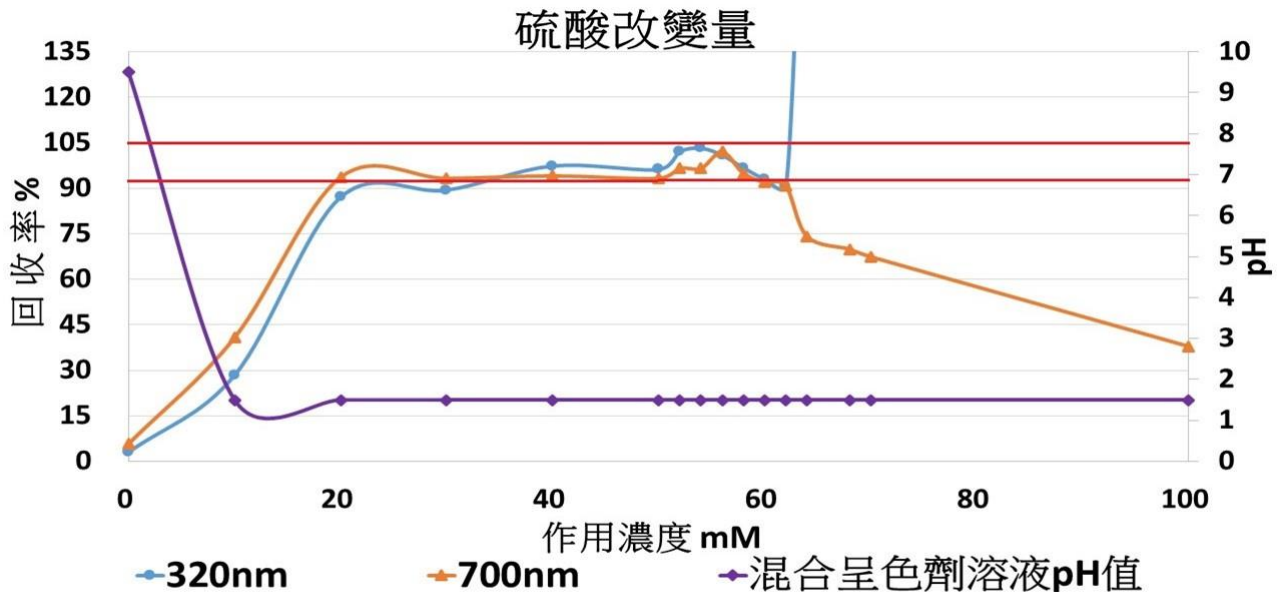
相同的，在鉬酸鈉體系中，正磷酸根的作用濃度低於 $5.4 \mu\text{g/mL}$ 高於 $133.8 \mu\text{g/mL}$ 時回收率偏低。如圖 7 結果所示，在鉬酸鈉系統中，正磷酸根適合的作用濃度為 $18.7\sim120.4 \mu\text{g/mL}$ ，相當於實驗時添加 4mg/mL 磷酸氫二鈉溶

液 1.4~9.0 毫升。

從圖 6 及圖 7 比較，兩種鉬酸鹽系統對於正磷酸根的適合作用濃度有所差異，鉬酸鈉系統明顯的比鉬酸鹽系統的適合作用範圍還要寬，然而如將兩種鉬酸鹽全轉換成 MoO_3 時，鉬酸鉍的作用濃度比鉬酸鈉還高 10%，也就是說，在這個實驗中，每一個試劑成分的作用量都有其適合的範圍，過高或過低都會造成準確度的差異，這也就是本研究的最主要的目的，找出每一個作用試劑的適合作用濃度範圍。

(四) 改變酸的作用濃度，並找出合適的作用濃度範圍

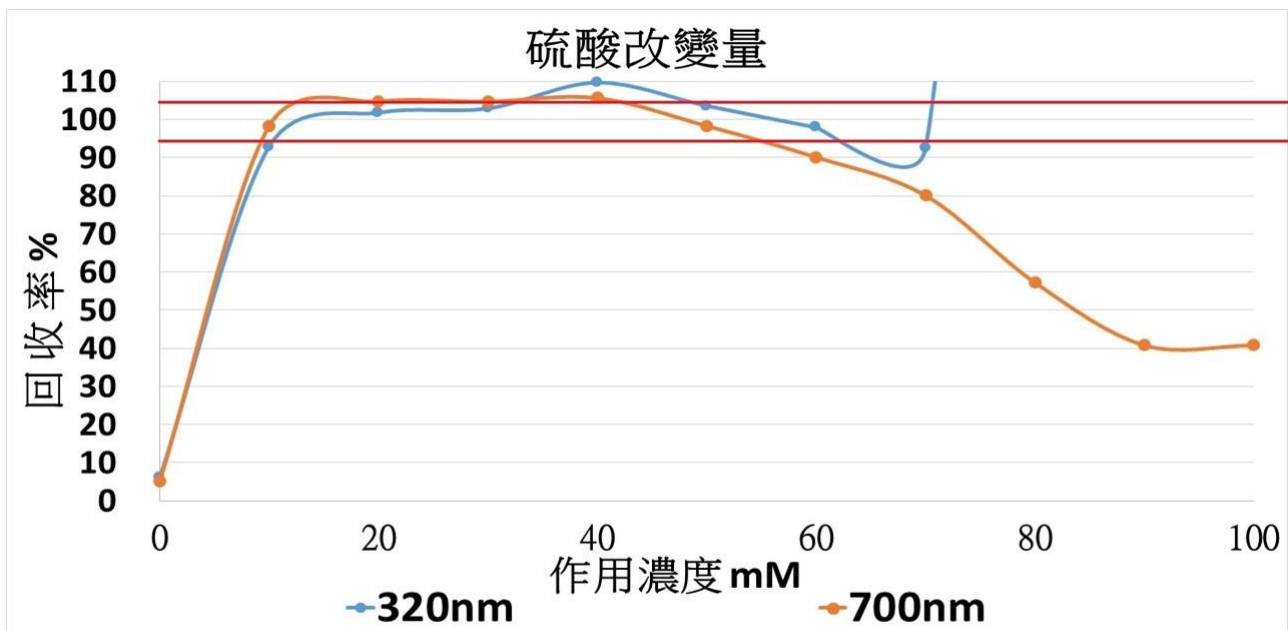
1. 對鉬酸鉍



註：以檢量線 $320\text{nm} : y=0.3084x-0.0133(R^2=0.9975)$ ， $700\text{nm} : y=0.0479x-0.0085(R^2=0.9980)$ 計算得回收率。

圖8 鉬酸鉍系統：改變硫酸的添加量對沒食子酸回收率的影響

2. 對鉬酸鈉



註：以檢量線 $320\text{nm} : y=0.2885x-0.0141(R^2=0.9994)$ ， $700\text{nm} : y=0.0438x-0.0007(R^2=0.9999)$ 計算得回收率。

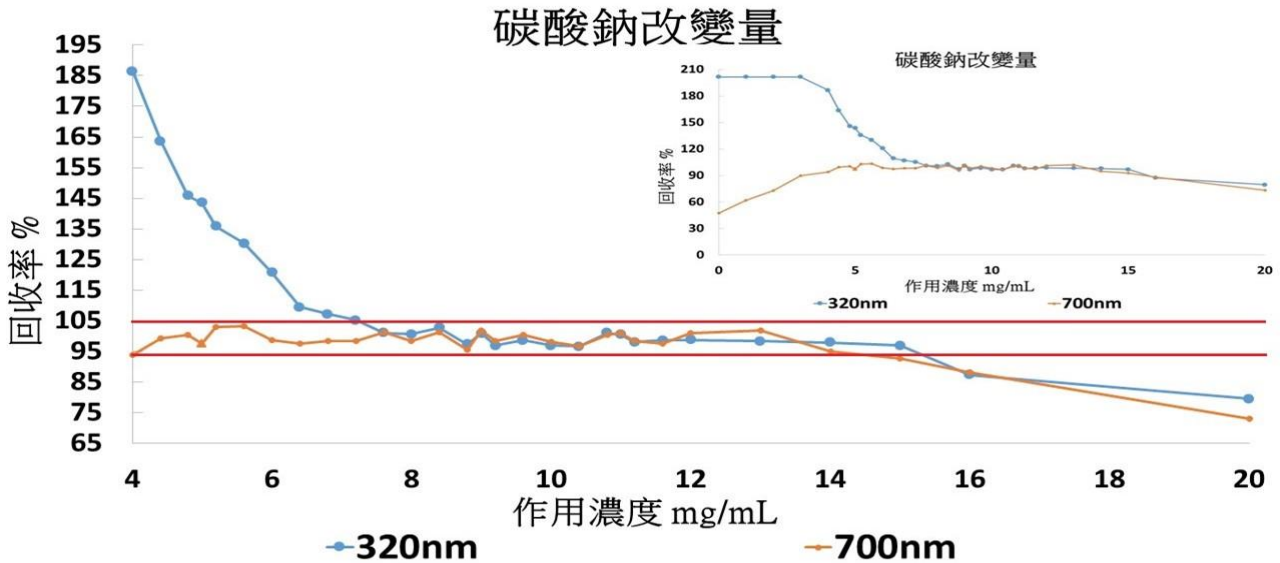
圖9 鉬酸鈉系統：改變硫酸添加量對沒食子酸回收率的影響

從圖 8 及圖 9 結果中，鉬酸鉍系統因有使用氫氧化鈉鹼化而使得對硫酸的最低需求作用濃度明顯的比鉬酸鈉系統還高，分為鉬酸鉍>20mM、鉬酸鈉>10mM，但當硫酸作用濃度高於 60mM 時，兩系統的回收率實驗急劇的變差，代表著本反應對酸非常的敏感，過高或過低都會影響反應，進而影響到實驗的準確性。

二、呈色反應的研究

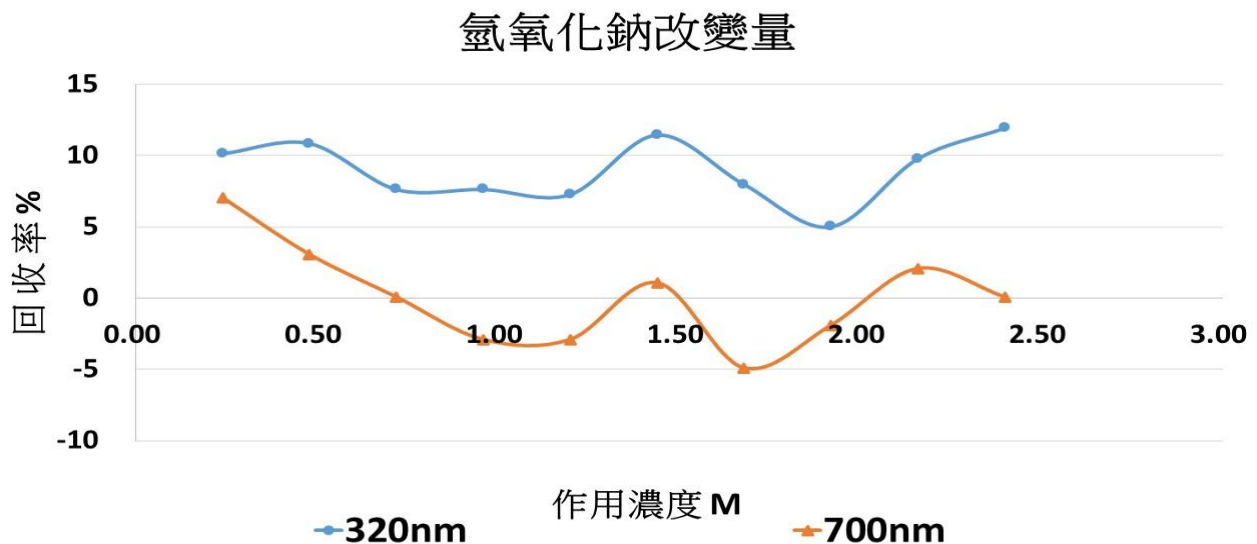
(一) 探討碳酸鈉的濃度對呈色的影響

1. 使用鉬酸鉍



註：以檢量線320nm： $y=0.1491x+0.0125(R^2=0.9993)$ ，700nm： $y=0.0211x-0.0028(R^2=0.9994)$ 計算得回收率。

圖10 鉬酸鉍系統：改變碳酸鈉添加量對沒食子酸回收率的影響

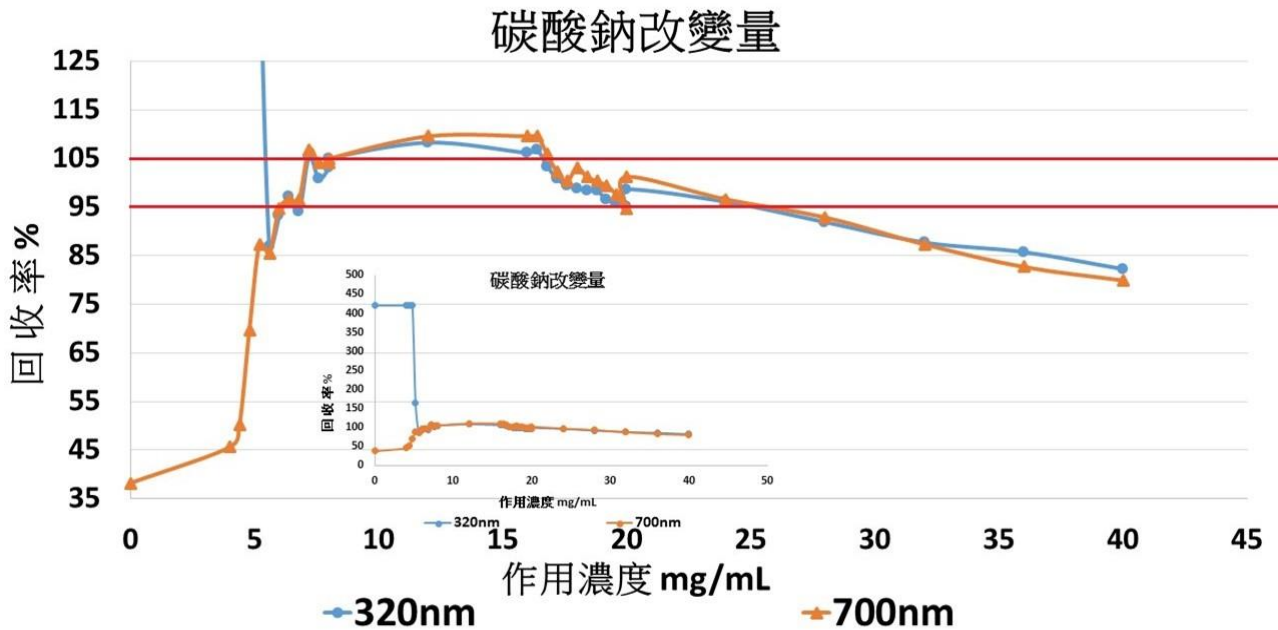


註：以檢量線320nm： $y=0.3084x-0.0133(R^2=0.9975)$ ，700nm： $y=0.0479x-0.0085(R^2=0.9980)$ 計算得回收率。

圖11 鉬酸鉍系統：改變氫氧化鈉添加量對沒食子酸回收率的影響

在鉬酸鉍系統中分別使用碳酸鈉及氫氧化鈉作為添加鹼，發現使用氫氧化鈉時因鹼性太強而產生其它化合物而無法和呈色試劑進行反應產生藍色的化合物。

2. 使用鉬酸鈉



註：以檢量線320nm： $y=0.2860x-0.0138(R^2=0.9996)$ ，700nm： $y=0.0431x-0.0030(R^2=0.9991)$ 計算得回收率。

圖12 鉬酸鈉系統：改變碳酸鈉添加量對沒食子酸回收率的影響

在兩個系統中，碳酸鈉適合的作用濃度範圍，分為鉬酸鉍為 7.2~12.0 mg/mL；鉬酸鈉為 6.4~24.0 mg/mL。相當於實驗時添加 10%碳酸鈉溶液體積分為 3.6~6.0mL、3.2~12.0mL。從圖 10 及圖 12 可看出，當碳酸鈉作用濃度太低時，呈色體系中的藍色化合物明顯的偏低(700 nm)，代表著碳酸鈉在這呈色體系中是生成藍色化合物的重要因素。

在圖 10 及 12 中，當添加碳酸鈉量偏低時，波長 320nm 的吸收非常大，使得回收率異常的高，這和圖 8 及圖 9 中，當硫酸的作用濃度高於 60mM 時，波長 320nm 的回收率也急劇升高，代表著此反應系統在工作波長 320nm 對酸的敏感度很高，為什麼在酸性偏高的情況下，在波長 320nm 的吸光值會增大的如此之多，我們認為有可能在強酸下，沒食子酸先進行了其他反應，而反應後的化合物在波長 320nm 的莫耳吸收常數非常的大，但卻也能和呈色劑進行反應，在波長 700nm 仍有吸光值，只是反應性變差，求得的回收率偏低。

表1 兩種鉬酸鹽系統各成分適合作用濃度範圍

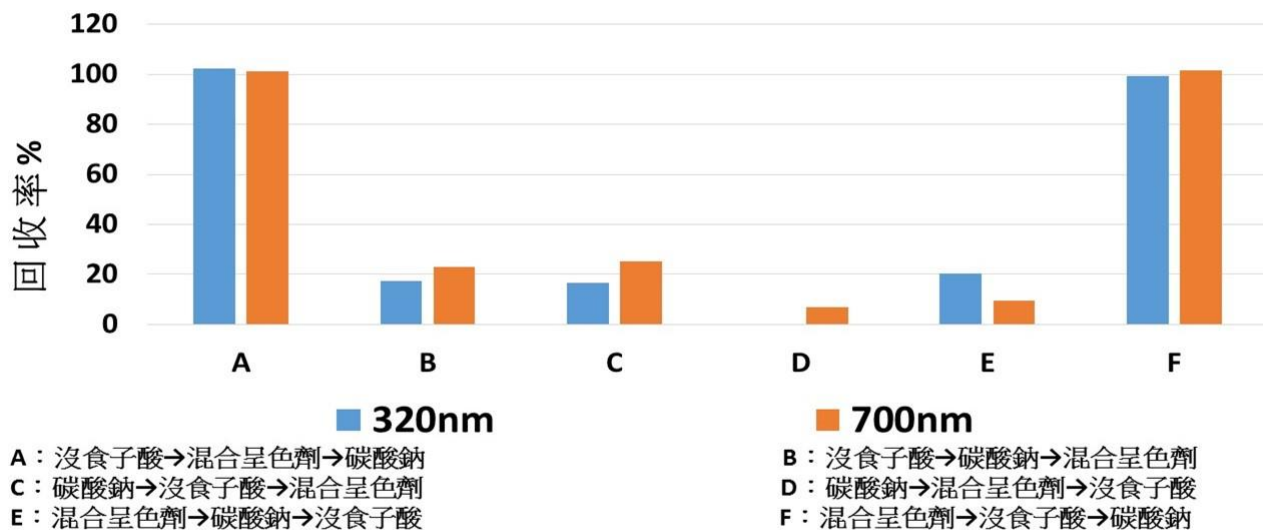
鉬酸鉍系統	鉬酸鉍作用濃度 (mg/mL)	氫氧化鈉作用濃度 (mg/mL)	硫酸作用濃度(mM)	正磷酸根作用濃度 (μ g/mL)	碳酸鈉作用濃度 (mg/mL)
鉬酸鉍	1.44~2.24	1.6	1.6	1.6	1.6
氫氧化鈉	0.768	0.38~1.15	0.768	0.768	0.768
硫酸	50	50	40~58	50	50
正磷酸根	53.5	53.5	53.5	42.8~77.1	53.5
碳酸鈉	8	8	8	8	7.2~12.0

鉬酸鈉系統	鉬酸鉍作用濃度(mg/mL)	硫酸作用濃度(mM)	正磷酸根作用濃度 (μ g/mL)	碳酸鈉作用濃度(mg/mL)
鉬酸鈉	1.76~6.40	2.0	2.0	2.0
硫酸	50	10~30	50	50
正磷酸根	53.5	53.5	18.7~120.4	53.5
碳酸鈉	8	8	8	6.4~24.0

由表 1 中，我們以各成分作用濃度為鉬酸鹽 2 mg/mL、氫氧化鈉 0.768 mg/mL(鉬酸鉍系統)、硫酸 50 mM(鉬酸鈉為 20mM)、正磷酸根 53.5 μ g/mL(鉬酸鈉為 69.55 μ g/mL)及碳酸鈉 8 mg/mL 為後續實驗時，各成分的作用濃度。配製混合呈色劑各成分溶液配製方法如下：

- (1)鉬酸鉍溶液：秤取 5g 鉬酸鉍加水 80mL 後加入 8mL 6M NaOH_(aq)加熱煮沸 10 分鐘，冷卻後加水至 100mL。
 - (2)鉬酸鈉溶液：秤取 5g 鉬酸鈉加水至 100mL 溶解。
 - (3)正磷酸根溶液：秤取 1g 磷酸氫二鈉加水至 500mL 溶解。
 - (4)鉬酸鉍系統混合呈色劑：依序取鉬酸鉍溶液 20mL、正磷酸根溶液 20mL 及 10mL 2.5M H₂SO_{4(aq)}混合均勻。反應取量 5mL。
 - (5)鉬酸鈉系統混合呈色劑：依序取鉬酸鈉溶液 20mL、正磷酸根溶液 26mL 及 4mL 2.5M H₂SO_{4(aq)}混合均勻。反應取量 5mL。
 - (6)10% Na₂CO_{3(aq)}取量 4mL。
- (二) 探討混合呈色試劑、碳酸鈉及沒食子酸的添加順序

改變添加順序



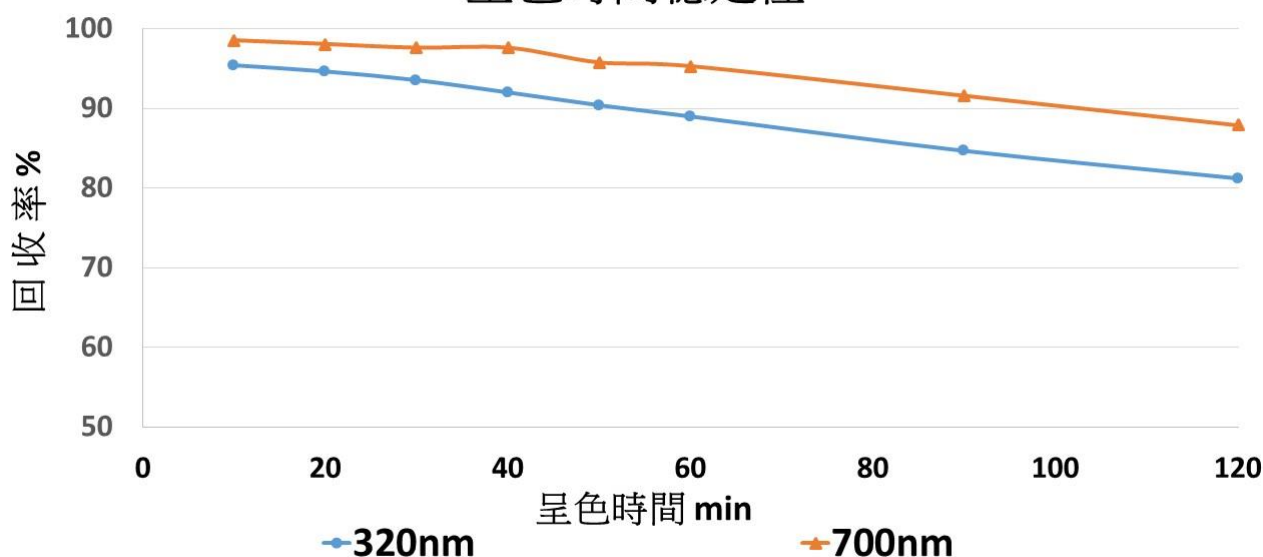
註：以檢量線320nm： $y=0.1491x+0.0125(R^2=0.9993)$ ，700nm： $y=0.0211x-0.0028(R^2=0.9994)$ 計算得回收率。

圖13 呈色劑、沒食子酸及碳酸鈉添加順序對沒食子酸回收率的影響

由圖 13 可看出，呈色劑、沒食子酸及碳酸鈉的添加順序，必須讓呈色劑與沒食子酸先行混合後才能再加入碳酸鈉；當碳酸鈉先與沒食子酸混合時，已先讓沒食子酸呈現鹼性狀態，就算再加入酸性的呈色劑，也無法讓沒食子酸回復到最原先狀態^[6]；當呈色劑先與碳酸鈉混合時，酸性呈色劑先與鹼性碳酸鈉作用而使得沒食子酸加入時碳酸鈉量不足，造成無法全部反應呈色。因此，本研究後續則以下列順序添加：沒食子酸→呈色劑→碳酸鈉。

(三) 探討呈色反應對時間的穩定性

呈色時間穩定性



註：以檢量線320nm： $y=0.1491x+0.0125(R^2=0.9993)$ ，700nm： $y=0.0211x-0.0028(R^2=0.9994)$ 計算得回收率。

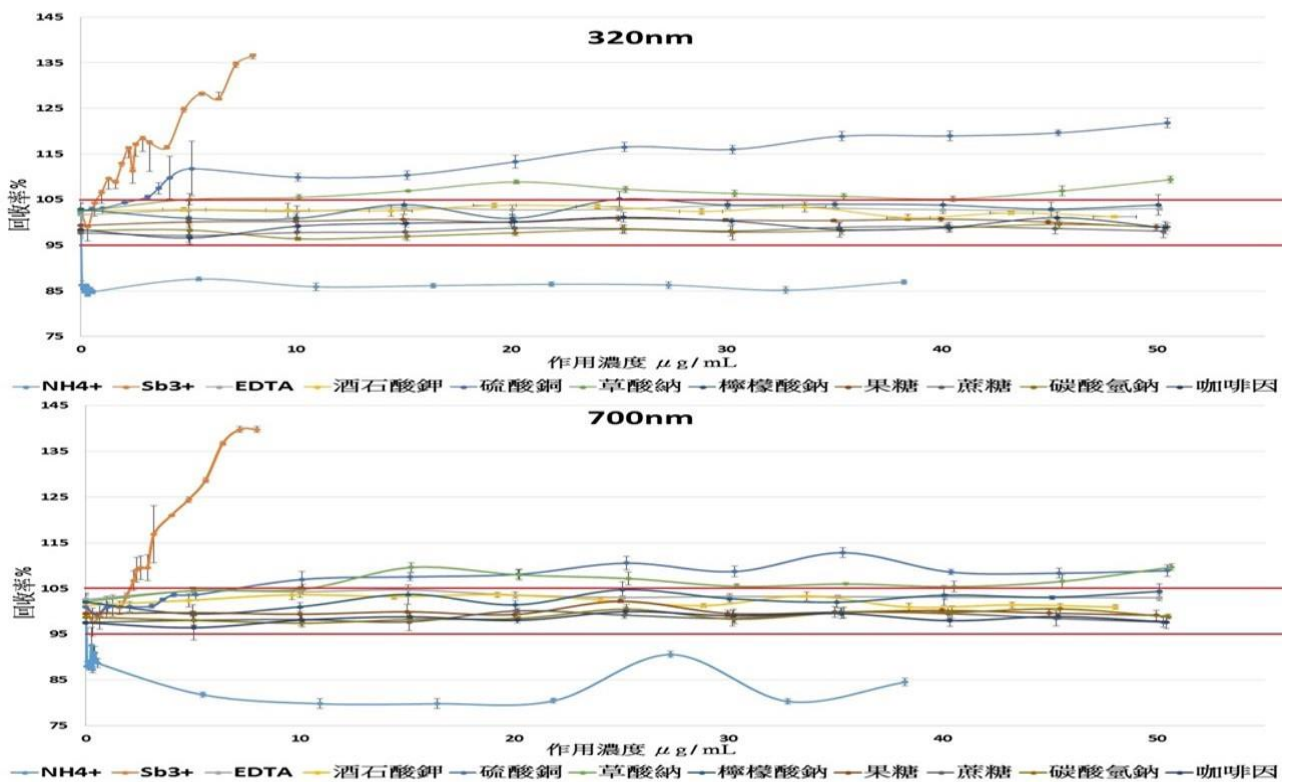
圖14 利用沒食子酸標準溶液添加回收率測定呈色時間穩定性

如圖 14，在以定量沒食子酸標準溶液進行實驗時發現兩個工作波長對時間的穩定性明顯的不同，在 320nm 工作波長，靜置 30 分鐘時標準液的回收率開始低於 95%，但 700nm 的工作波長在靜置 60 分鐘時還高於 95%。因此，本研究最

適合的偵測吸光值時間為所有試劑完全混合後靜置 10~20 分鐘，後續實驗則以靜置 10 分鐘為工作時間。

在『總磷之比色定量—維生素 C 法』的反應試劑中的酒石酸銻鉀具有加速反應及穩定呈色的功用，為了讓兩個工作波長的穩定性一致，嘗試以酒石酸銻鉀等試劑進行實驗，結果如圖所示，發現當作用溶液中 $[\text{NH}_4^+] > 0.2\text{ppm}$ 、 $[\text{Sb}^{3+}] > 2\text{ppm}$ 、 $[\text{Cu}^{2+}] > 2\text{ppm}$ 及 $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] > 3\text{ppm}$ 均會對沒食子酸的回收率影響，其中銻根離子的存在和本實驗初以鉬酸銻進行混合呈色劑配製時如添加氫氧化鈉量不足或加熱煮沸時間不足時，均會造成配製試劑沉澱或極不穩定而影響呈色，證實在製作檢量線時我們認為溶液中的 NH_4^+ 會干擾混合呈色試劑與還原劑的呈色反應。

除了上述四種添加試劑對呈色現象造成影響外，其餘添加試劑在作用濃度小於 50ppm 對呈色反應的干擾不具影響，但對呈色的穩定性卻無幫助。



註：以檢量線 $320\text{nm} : y=0.3025x+0.0061(R^2=0.9994)$ ， $700\text{nm} : y=0.0446x-0.0021(R^2=0.9997)$ 計算得回收率。

圖15 各種不同試劑的作用濃度對沒食子酸回收率的影響

(四) 沒食子酸的線性範圍

一、沒食子酸水溶液

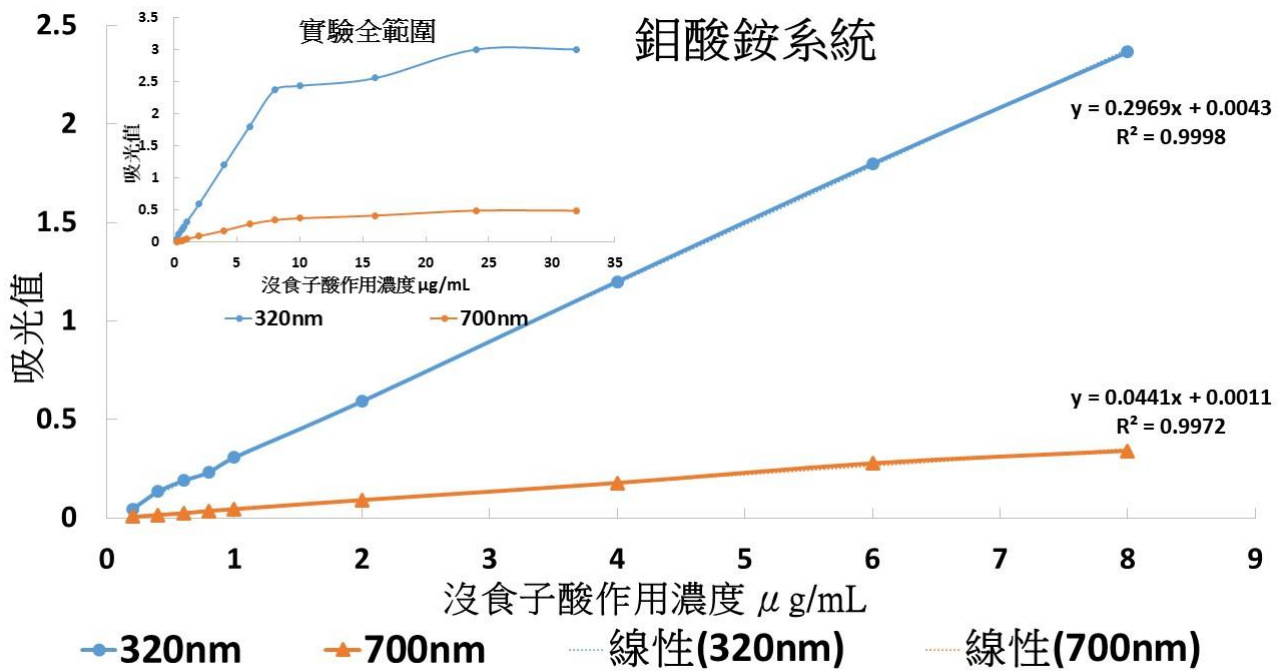


圖16 鉬酸銨水溶液系統：沒食子酸線性範圍

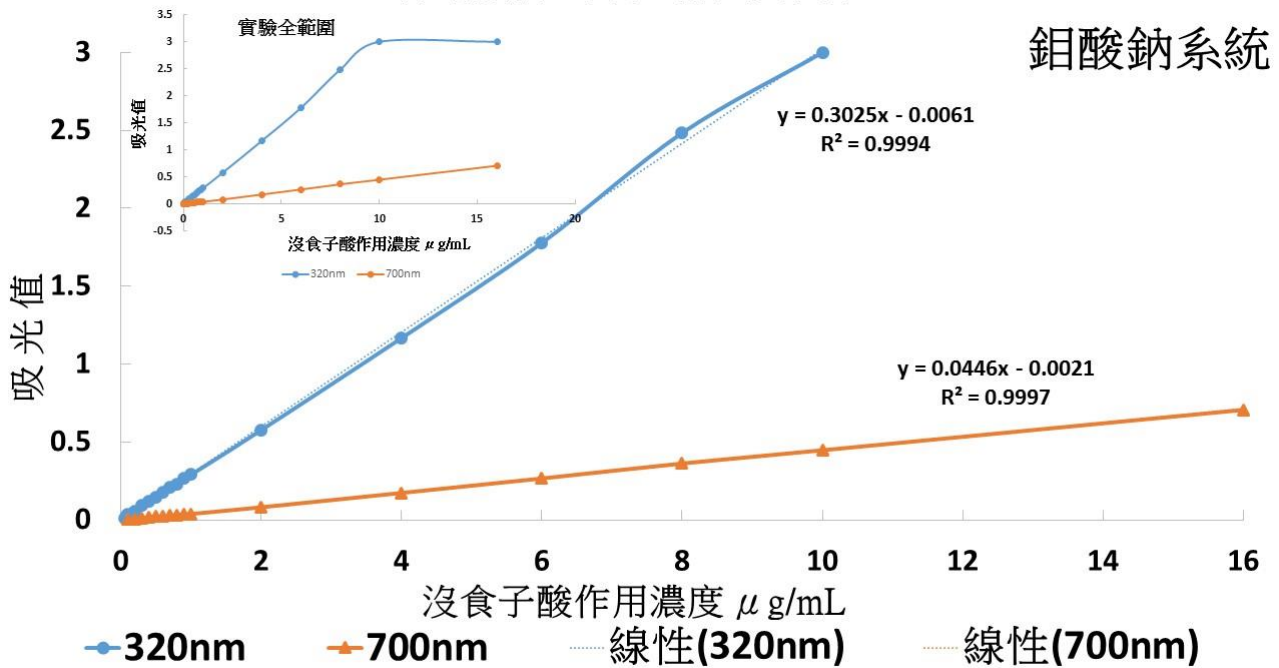


圖17 鉬酸鈉水溶液系統：沒食子酸線性範圍

表2 沒食子酸線性範圍實驗各成分作用濃度

	鉬酸銨(鈉)	氫氧化鈉	硫酸	正磷酸根	碳酸鈉
鉬酸銨系統	2 mg/mL	0.768 mg/mL	50 mM	53.5 $\mu\text{g/mL}$	8 mg/mL
鉬酸鈉系統	2 mg/mL	-	20 mM	69.55 $\mu\text{g/mL}$	8 mg/mL

以表 2 各成分作用濃度進行沒食子酸工作濃度線性範圍測試實驗，結果如

圖 16 及圖 17。在鉬酸鉍系統中，工作波長 320 nm 及 700 nm，沒食子酸標準檢量線在 0.2 ~ 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 範圍 $y = 0.2969x + 0.0043$ ， $R^2=0.9998(320\text{ nm})$ ，檢量線確認回收率為 102.68%， $RSD=0.54\%(n=3)$ ； $y = 0.0441x + 0.0011$ ， $R^2=0.9972(700\text{ nm})$ ，檢量線確認回收率為 102.67%， $RSD=1.49\%(n=3)$ 。

在鉬酸鈉系統中，工作波長 320 nm，沒食子酸標準檢量線在 0.06 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.3025x + 0.0061$ ， $R^2=0.9994$ ，檢量線確認回收率為 100.28%， $RSD=2.34\%(n=3)$ ；工作波長 700 nm，沒食子酸標準檢量線在 0.1 ~ 16 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.0446x - 0.0021$ ， $R^2=0.9997$ ，檢量線確認回收率為 99.91%， $RSD=3.04\%(n=3)$ 。

二、沒食子酸乙醇溶液

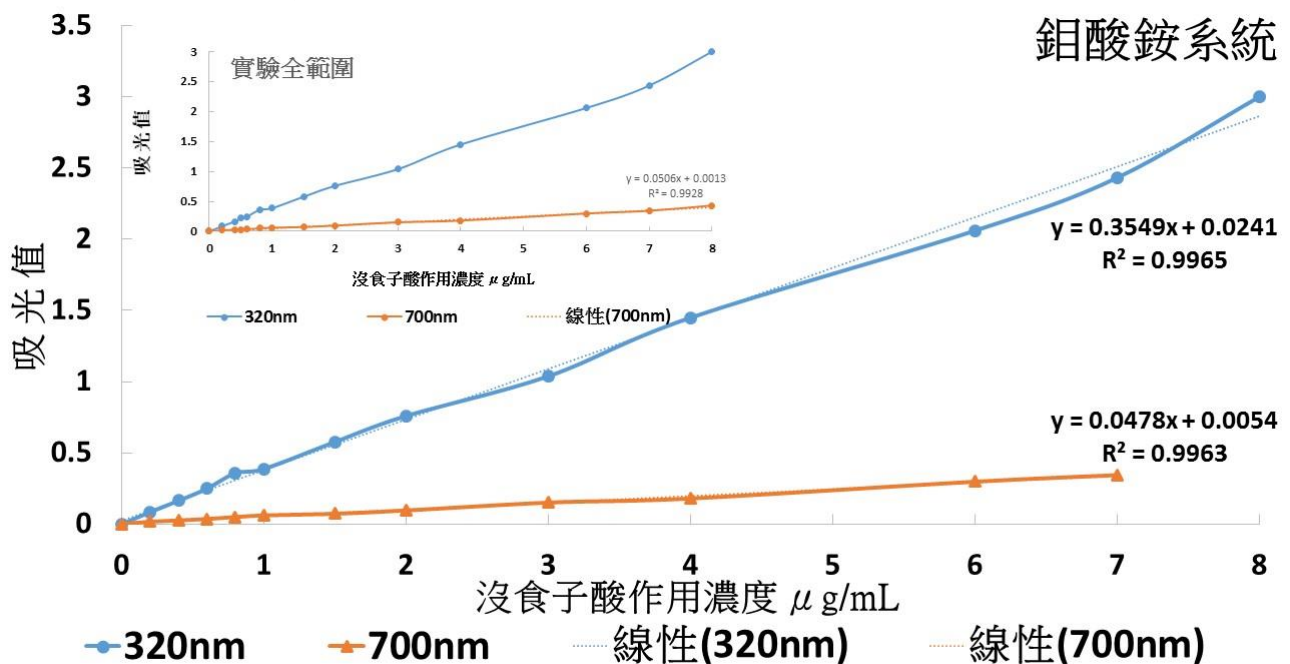


圖18 鉬酸鉍乙醇溶液系統：沒食子酸線性範圍

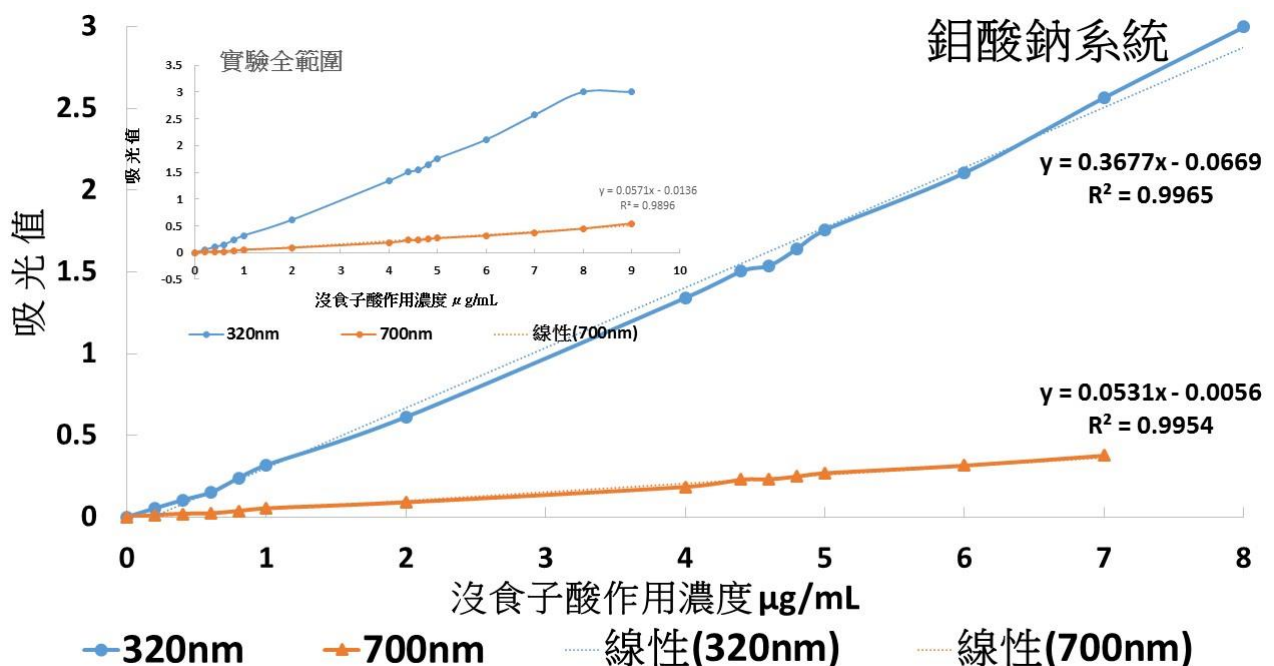


圖19 鉬酸鈉乙醇溶液系統：沒食子酸線性範圍

由於進行精油總酚含量測試會以乙醇做為溶解的溶劑，因此以乙醇為溶劑來溶解標準品沒食子酸進行本研究開發磷鉬酸呈色劑線性範圍測試。在鉬酸鉍系統中，工作波長 320 nm 沒食子酸標準檢量線在 0 ~ 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.3549x + 0.0241$ ， $R^2=0.9965$ ，檢量線確認回收率為 101.55%， $RSD=0.87\%(n=3)$ ；工作波長 700 nm 沒食子酸標準檢量線在 0 ~ 7.0 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.0478x + 0.0054$ ， $R^2=0.9963$ ，檢量線確認回收率為 101.20%， $RSD=0.78\%(n=3)$ 。

在鉬酸鈉系統中，工作波長 320 nm 沒食子酸標準檢量線在 0~ 9.0 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.3677x - 0.0669$ ， $R^2=0.9965$ ，檢量線確認回收率為 101.24%， $RSD=0.21\%(n=3)$ ；工作波長 700 nm 沒食子酸標準檢量線在 0 ~ 7.0 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內 $y = 0.0531x - 0.0056$ ， $R^2=0.9954$ ，檢量線確認回收率為 102.75%， $RSD=1.03\%(n=3)$ 。

在兩種鉬酸鹽呈色劑的沒食子酸線性範圍中，以鉬酸鈉系統的混合呈色劑在沒食子酸的水溶液偵測極限最廣，此系統適合分析茶飲中的多酚含量。

三、混合呈色試劑的適用性研究

(一) 應用於精油總酚含量檢測

表3-1 以自製磷鉬酸呈色劑測定精油總酚含量

精油名稱	作用濃度 $\mu\text{g/mL}$	工作波 長nm	相當沒食子酸濃度 $\mu\text{g/mL}$	總酚含量 mg G.A. / g (mL)	添加標準品回收率 %
德克斯特 薰衣草精油	45.12	320	0.41±0.03	9.17±0.64	97.22±2.78
		700	0.39±0.02	8.64±0.36	103.03±9.09
檸檬桉精油	40.64	320	0.18±0.01	4.51±0.23	97.22±0.25
		700	0.08±0.02	1.89±0.46	104.04±1.01
香茅精油	43.76	320	0.65±0.03	14.93±0.78	91.67±2.78
		700	0.35±0.08	8.07±1.81	99.75±11.36
柳丁皮精油	42.40	320	1.00±0.03	23.51±0.73	91.67±0.26
		700	0.95±0.04	22.48±0.91	94.95±0.51
迷迭香精油	46.72	320	0.32±0.03	6.92±0.73	100.51±1.52
		700	0.13±0.01	2.78±0.43	94.95±1.01
茶樹精油	43.76	320	0.42±0.02	8.76±0.94	99.50±1.02
		700	0.38±0.04	8.40±0.57	100.76±0.25
沒食子酸乙醇溶液標準檢量線		320	$y=0.3677x - 0.0669$ $R^2=0.9965$		
		700	$y=0.0531x - 0.0056$ $R^2=0.9954$		

註：本實驗精油樣品為同學自製精油所提供。

註：平均值±S.D.(n=3)。

表3-2 以自製磷鉬酸酚呈色劑測定精油總酚含量

	作用濃度	工作波長 nm	相當沒食子酸濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	總酚含量 $\text{mg G.A.}/\text{g (mL)}$	添加標準品回收率 %
香澤蘭精油	17.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$	320	1.37±0.04	79.28±2.50	98.77±0.61
		700	1.30±0.05	75.23±2.63	102.81±1.58
小花蔓澤蘭 精油	15.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$	320	1.63±0	104.17±0.30	100.71±0.61
		700	1.55±0.01	98.85±0.90	96.51±2.99
香澤蘭 乙醇萃取液	0.40 $\mu\text{L}/\text{mL}$	320	2.21±0.01	5.53±0.03	105.72±2.10
		700	1.94±0.02	4.84±0.06	102.81±3.56
小花蔓澤蘭 乙醇萃取液	0.40 $\mu\text{L}/\text{mL}$	320	3.82±0	9.54±0.01	94.89±0.99
		700	3.33±0	8.33±0	97.16±1.83
香澤蘭露水	25.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$	320	0.89±0.01	35.60±0.33	97.92±1.00
		700	0.88±0.02	35.07±0.82	98.65±0.19
小花蔓澤蘭 露水	25.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$	320	0.51±0	20.27±0.19	98.65±0.48
		700	0.53±0.01	21.33±0.38	101.33±2.84
沒食子酸乙醇溶液標準檢量線		320	$y=0.3677x - 0.0669 \quad R^2=0.9965$		
		700	$y=0.0531x - 0.0056 \quad R^2=0.9954$		
沒食子酸水溶液標準檢量線		320	$y=0.3025x - 0.0061 \quad R^2=0.9994$		
		700	$y=0.0446x - 0.0021 \quad R^2=0.9997$		

註：本實驗精油樣品為同學自製精油所提供。

註：平均值±S.D.(n=3)。

表 3 為以同學蒸餾所得的八種天然精油、兩種水蒸氣蒸餾所得露水及兩種乙醇浸泡萃取液，利用本研究開發所得的磷鉬酸酚呈色劑進行測定總酚含量結果，除了檸檬桉、香茅及迷迭香精油在 320nm 工作波長測得的總酚含量明顯的較 700nm 工作波長的高，其餘幾種測得在兩個工作波長的總酚含量差異並不大，對於這三種精油總酚含量在兩個工作波長的差異如此大的原因，我們認為可能應該是三種精油中含有的還原性成分化合物，再加入磷鉬酸酚試劑後而增強了 320nm 工作波長所測得的吸收值，使得測得的總酚含量偏高很多。

由表 3 添加標準品回收率實驗均能落在 90~110%，這表示本分析方法適合用來作為測定精油之總酚含量。

(二) 與市售 Folin-Ciocalteu 試劑比較

表4 比較市售與自製磷鉬酸呈色劑測定小花蔓澤蘭與香澤蘭個是提取物的總酚含量

檢 測 方 法	市售Folin-Ciocalteu試劑 ^註	自行改良Folin-Ciocalteu試劑
檢 量 線	$y=0.1089x + 0.0014(700\text{nm})$, $R^2=0.9975$	乙醇： $y=0.0531x - 0.0056(700\text{nm})$, $R^2=0.9954$ 水： $y=0.0446x - 0.0021(700\text{nm})$, $R^2=0.9997$
香澤蘭精油	65.97 mg G.A./g (RSD=7.48%)	75.23 mg G.A./g (RSD=3.50%)
小花蔓澤蘭精油	81.21mg G.A./g (RSD=2.43%)	98.85 mg G.A./g (RSD=0.91%)
香澤蘭乙醇萃取液	7.21 mg G.A./mL (RSD=0.16%)	4.84 mg G.A./mL (RSD=1.29%)
小花蔓澤蘭乙醇萃取液	21.17mg G.A./mL (RSD=0.56%)	8.33 mg G.A./mL (RSD=0%)
香澤蘭露水	49.07 $\mu\text{g G.A.}/\text{g}$ (RSD=1.02%)	35.07 $\mu\text{g G.A.}/\text{g}$ (RSD=2.34%)
小花蔓澤蘭露水	38.00 $\mu\text{g G.A.}/\text{g}$ (RSD=3.75%)	21.33 $\mu\text{g G.A.}/\text{g}$ (RSD=1.77%)

註：以市售2N福林試劑取量2.5mL

註：RSD(n=3)



圖20 自製磷鉬酸酚試劑與市售福林試劑與精油乙醇溶液反應呈色比較

從表 4 市售與自製磷鉬酸呈色劑測定精油總酚含量，兩種呈色劑以相同的定容容器進行總酚含量測定，並在相同工作波長 700nm 下測定的結果，市售的福林試劑再進行精油總酚含量測定時，反應後溶液明顯呈混濁，如圖 20 所示，必須經靜置或離心才能測吸光值，但兩呈色劑所得結果差異不大。

本研究改良的 Folin-Ciocalteu 試劑與市售 Folin-Ciocalteu 試劑之差異：

1. 可於每次實驗前可快速配製，不必擔心購賣試劑保存的問題。
2. 配置本研究 1N 呈色劑 500 mL 成本約為 50 元，但市售 2N 福林試劑 250mL 價格約為 1800 元。
3. 呈色快速(靜置 10 分鐘，且不需離心)，適合學生進行總酚含量測定課程教學。
4. 產生的廢液較常見總酚含量測定方法還多(改良：50mL；市售：8mL)。

四、自製多酚快速檢測試紙

(一) 多酚試紙檢測極限及沒食子酸標準比色卡製作

沒食子酸 濃度(ppm)	0	25	50	100	200	300	400	500	1000
多 酚 檢 測 試 紙 比 色 卡	White	Light blue	Light blue	Light blue	Light blue	Light blue	Light blue	Light blue	Dark blue

圖21快速檢測試紙沒食子酸標準比色卡

濃度ppm	5	10	15	20	25	30
呈色結果						

圖22快速檢測試紙最低偵測下限

利用自製磷鉬酸酚試劑製成的多酚快速檢測試紙，在經實驗後，當滴一滴測試溶液後，如同光度分析法般，需再滴加碳酸鈉溶液才能快速顯色，製作標準比色卡時，同以光度法 10%碳酸鈉滴加，發現在高濃度沒食子酸顯色沒有差異，因此，改變碳酸鈉濃度實驗，最後以 3.5%碳酸鈉呈色快速且能有明顯色差，結果如圖所示。並以 5~30ppm 沒食子酸標準溶液進行試紙的偵測下限，結果如圖 22 所示，雖然 20ppm 已有些微的變色，但不是很明顯，因此在製作標準比色卡仍以 25ppm 為可測出多酚的下限。在製作試紙過程發現做好的試紙很容易由黃色變為黃綠色最後變為藍色如圖 23 所示，因此，有必要探討試紙的保存穩定性。



圖23 自製多酚試紙與空氣及光線接觸的變色現象

(二) 市售飲料多酚含量的檢測

表5 以自製多酚檢測試紙進行市售飲料中多酚含量的檢測

試樣	市售杯裝紅茶	市售杯裝綠茶	麥X紅茶	麥X綠茶	XX果柳橙汁	每XX柳橙汁	XX無糖綠茶	XX冷泡茶包
多酚檢測試紙呈色結果								
相當沒食子酸濃度(ppm)	461.7±1.2	928.3±6.6	251.7±9.7	604.2±15.4	264.2±5.1	405.0±5.4	785.8±5.1	766.7±5.1
與檢測試紙濃度比對	500ppm -1000ppm	500ppm -1000ppm	200ppm -300ppm	500ppm- 1000ppm	300ppm -400ppm	300ppm -400ppm	500ppm -1000ppm	500ppm -1000ppm

表6以自製磷鉬酸酚試劑利用光度法進行市售飲料中總酚含量測定

飲料名稱	作用濃度 μL / mL	工作波長 nm	相當沒食子酸濃度 μg / mL	總酚含量 ppm G.A.	添加標準品回收率 %
麥X綠茶	1.60	320	2.37±0.01	593.33±3.12	98.88±0.49
		700	2.42±0.06	604.17±15.46	102.18±0.86
麥X紅茶	1.60	320	0.99±0.00	248.33±1.18	99.73±0.61
		700	1.01±0.04	251.67±9.65	97.90±1.20
XX無糖綠茶	1.60	320	3.14±0.02	785.83±5.14	98.39±1.71
		700	3.14±0.04	785.83±9.20	96.92±1.71
XX冷泡茶	1.60	320	3.07±0.02	766.67±5.14	96.07±0.86
		700	3.05±0.03	762.50±7.07	95.58±1.34
市售杯裝紅茶	1.60	320	1.85±0.00	461.67±1.18	96.32±0.86
		700	1.65±0.01	411.67±2.36	103.27±2.20
市售杯裝綠茶	1.60	320	3.71±0.03	928.33±6.56	99.86±3.18
		700	3.46±0.04	864.17±9.20	102.30±2.60
XX果柳橙汁	1.60	320	0.95±0.01	237.50±2.04	98.88±0.49
		700	1.06±0.02	264.17±5.14	99.49±2.81
每XX柳橙汁	1.60	320	1.62±0.02	405.00±5.40	96.56±1.83
		700	1.47±0.05	368.33±12.30	104.50±1.96
沒食子酸水溶液標準檢量線		320nm : $y=0.3025x - 0.0061$ $R^2=0.9994$; 700nm : $y=0.0446x - 0.0021$ $R^2=0.9997$			

註：平均值±S.D.(n=3)。

在利用自製多酚快速檢測試紙進行市售飲料的總多酚含量測定，經與標準比色卡比對，所得結果在與光度法進行比較，兩種測定方法所得市售茶飲料中的總多酚含量差異並不大，代表著我們以自行配製的磷鉬酸酚泡製所得的多酚快速檢測試紙具有其實際的應用性。

(三) 探討試紙的保存穩定性

表7 以自製磷鉬酸酚試劑與市售福林試劑製作多酚檢測試紙的穩定性

	自製磷鉬酸酚試劑	市售1N福林試劑	市售2N福林試劑
暴露空氣未避光	45分	70分	50分
暴露空氣避光	4天	5天	3天
隔離空氣未避光	50分	70分	60分
隔離空氣避光	6天	5天	3天

本實驗進行利用自製磷鉬酸酚呈色劑與市售 2N 福林試劑製作多酚快速檢測試紙，利用吸塵器與塑膠袋封口機與空氣隔離，所得結果如表所示，三種試紙暴露在空氣及光線下約 40~70 分鐘均些微變為黃綠色，隔離空氣但未避光約 60 分鐘變色，但如將試紙避光則在 3~6 天後試紙才會稍變為黃綠色，結果顯示，避免光線的照射可以有效增加試紙的保存時間。

表8以添加化學試劑製作好的試紙依光線隔絕及空氣隔絕進行測試

	浸泡1% 澱粉液 呈色劑	浸泡2% 澱粉液 呈色劑	浸泡 2.5%澱 粉液呈 色劑	浸泡 0.6%植 物膠呈 色劑	浸泡 0.8%植 物膠呈 色劑	試紙塗 抹1%澱 粉	試紙塗 抹2%澱 粉	試紙塗 抹2.5% 澱粉	試紙塗 抹2%植 物膠	浸泡2% 醋酸呈 色劑
暴露空氣 未避光	95分	130分	170分	75分	80分	130分	190分	230分	130分	80分
暴露空氣 避光	2天	2天	4天	2天	2天	3天	3天	3天	3天	4天
隔離空氣 未避光	95分	130分	170分	75分	80分	130分	190分	230分	130分	80分
隔離空氣 避光	2天	2天	4天	2天	2天	3天	3天	3天	3天	4天

在前項實驗隔絕空氣及光線可以有效增長試紙的保存時間，本實驗以浸泡或塗抹的方式嘗試是否可增長試紙的保存時間，在未避光的實驗試紙的保存時間較前項實驗增加至 80~230 分鐘才會稍微變色，但避光的實驗並沒有明顯的改變，因此，在使用輔助試劑延長試紙的保存時間仍有待進一步的研究。

陸、結論

一、本研究改良的磷鉬酸酚呈色劑，最適合的作用濃度如下表：

	鉬酸鉍(鈉)	氫氧化鈉	硫酸	正磷酸根	碳酸鈉
鉬酸鉍系統	2 mg/mL	0.768 mg/mL	50 mM	53.5 µg/mL	8 mg/mL
鉬酸鈉系統	2 mg/mL	-	20 mM	69.55µg/mL	8 mg/mL

經改良的磷鉬酸酚試劑，可以不必如傳統的磷鉬酸酚試劑自行配製時的耗時，如以鉬酸鈉配製時更可於實驗前配製，相當的方便快捷。

- 二、進行總酚含量測試時，鹼的作用強度對呈色影響非常大，且反應的添加順序相當重要，磷鉬酸酚混合呈色劑、試樣溶液及碳酸鈉水溶液三者的添加順序可以是(1)混合呈色劑→試樣溶液→碳酸鈉，或(2)試樣溶液→混合呈色劑→碳酸鈉。
- 三、本研究改良的實驗方法，最佳測定反應溶液吸光值的時間為室溫靜置 10~20 分鐘，比一般測試總酚含量的方法在室溫下均要靜置 0.5~1.5 小時^[4]來的佳。
- 四、以自製磷鉬酸酚進行總酚含量檢測時，當作用溶液中 $[\text{NH}_4^+] > 0.2\text{ppm}$ 、 $[\text{Sb}^{3+}] > 2\text{ppm}$ 、 $[\text{Cu}^{2+}] > 2\text{ppm}$ 及 $[\text{C}_2\text{O}_4^{2-}] > 3\text{ppm}$ 均會對反應的呈色造成干擾。
- 五、本研究針對 320nm 及 700nm 兩個工作波長進行不同鉬酸鹽配製的混合呈色劑與沒食子酸標準水溶液與乙醇溶液最佳線性範圍如下表：

呈色劑	沒食子酸標準溶液	工作波長	線性範圍 (µg/mL)	標準檢量線 y 為吸光值； x 為作用濃度	R^2	檢量線確認回收率(%)	RSD(%)
鉬酸鉍系統	水溶液	320 nm	0.2 ~ 8.0	$y = 0.2969x + 0.0043$	0.9998	102.68	0.54
		700 nm	0.2 ~ 8.0	$y = 0.0441x + 0.0011$	0.9972	102.67	1.49
	乙醇溶液	320 nm	0 ~ 8.0	$y = 0.3549x + 0.0241$	0.9965	101.55	0.87
		700 nm	0 ~ 7.0	$y = 0.0478x + 0.0054$	0.9963	101.20	0.78
鉬酸鈉系統	水溶液	320 nm	0.06 ~ 10.0	$y = 0.3025x + 0.0061$	0.9994	100.28	2.34
		700 nm	0.1 ~ 16.0	$y = 0.0446x - 0.0021$	0.9997	99.91	3.04
	乙醇溶液	320 nm	0 ~ 9.0	$y = 0.3677x - 0.0669$	0.9965	101.24	0.21
		700 nm	0 ~ 7.0	$y = 0.0531x + 0.0056$	0.9954	102.75	1.03

其中以鉬酸鈉水溶液配製的混合呈色劑對沒食子酸的偵測極限最廣，再加以呈色劑配製的便利性，我們認為以鉬酸鈉系統最好。

- 六、本研究方法進行精油及飲料的總酚含量測定時，添加標準品回收率均能落在 90~110% 間，代表本方法適合精油及飲料試樣的總酚含量測定。
- 七、本研究自製的磷鉬酸酚試劑比市售福林試劑價格便宜且方便配製、反應快速，且與檢測試樣反應後並不會產生沉澱。

八、以自製磷鉬酸酚做成的試紙進行多酚含量快速檢測，當檢測試樣多酚含量高於 25ppm 時即可檢測出，並以標準比色卡進行比對，可快速測得水溶性試樣中的總酚含量。

九、以自製磷鉬酸酚呈色劑做成試紙，進行飲料中多酚物質含量測定，並與分光光度法進行比對，兩者所得結果差異不大，表示本研究開發的試紙具有檢測定量飲料中的多酚含量。

柒、參考資料

1. 化學技能檢定編輯工作室(2012)。乙級化學學術科快攻寶典。新北市:台科大圖書股份有限公司。
2. 江孟玲、蔡永昌(2011)。分析化學 I。新北市:台科大圖書股份有限公司。
3. 江孟玲、蔡永昌(2012)。分析化學 II。新北市:台科大圖書股份有限公司。
4. 周媛、喻玲玲(2009)。苧麻葉中總多酚的含量測定。取自 <http://wenku.baidu.com/view/d62a3711cc7931b765ce1556.html>
5. 徐佳、辛立方、張瑞廷、王華斌、傅力(2012)。改良的 Folin Ciocalteu 比色法測定核桃外果皮中總多酚含量。食品工業科技，6，26~29。
6. 陳良宇、鄭建璋、王志玄、林志璋、張云力、李瑞玲、游欣、梁致遠(2012)。鹼催化對 Folin-Ciocalteu 試劑檢測總多酚含量的影響。取自:<http://www1.mcu.edu.tw/Apps/SB/data/1712/mc-bio/foLin%20reagent.pdf>
7. 陳宥成、莫皓宇、吳季珊(2011)。磷鉬藍法的探討比較。取自: <http://www.shs.edu.tw/works/essay/2011/11/2011111419203416.pdf>

【評語】 091102

1. 開發以磷鉬酸酚成分為主之酚類快速檢測試紙，應用於精油與飲料中酚類含量之分析，並與傳統商業化之試紙比較，研究設計與分析項目完整，具科學性與創新性。
2. 建議在實驗過程中，考量數據量化呈現與精準度之控制，將可提高研究結果之品質及未來改善實驗條件之參考依據。