



**Chemia żywności**  
**Katedra Analizy Środowiska**

# **Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych**

## **Ćwiczenie nr 11**

### **Oznaczanie związków polifenolowych w wybranych produktach zielonych**

**Chemia żywności**

Gdańsk, 2016

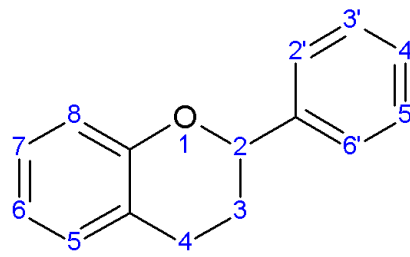
## 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

### 1.1. Związki fenolowe i ich właściwości przeciwutleniające

Liczne produkty spożywcze pochodzenia roślinnego zawierają w swoim składzie znaczne ilości związków fenolowych, które są uważane za cenne składniki żywności ze względu na swoje działanie przeciwutleniające (antyoksydacyjne). Naturalne antyoksydanty polifenolowe to związki o różnej strukturze i właściwościach. Produkowane są przez niektóre rośliny w warunkach normalnego wzrostu, ale także w odpowiedzi na stres, uszkodzenie, infekcję grzybową lub promieniowanie ultrafioletowe(UV). Polifenole są związkami organicznymi powszechnie występującymi w postaci glikozydów rozpuszczalnych w wodzie, dzięki temu zapobieganie autooksydacji może zachodzić w środowisku wodnym, jakim są naturalne układy biologiczne (np. błona komórkowa). Polifenole to duża grupa związków o bardzo zróżnicowanej budowie i właściwościach trudna do jednoznacznego podziału. Do roślinnych związków fenolowych należą: **flawonoidy, taniny, kwasy fenolowe, stilbenoidy, lignany, ligniny** i inne. Występują powszechnie w roślinach, zwłaszcza w liściach, tkankach kwiatowych i zdrewniałych częściach, jak łodygi i kora, w mniejszym stężeniu w owocach, nasionach i innych. Dwie najpowszechniejsze grupy związków polifenolowych to flawonoidy oraz kwasy fenolowe.

Flawonoidy są największą i najlepiej dotąd poznaną grupą związków fenolowych, występujących powszechnie w świecie roślin (dziennie spożycie flawonoidów pochodzących z warzyw i owoców wynosi średnio 1-2 g). Występują we wszystkich nadziemnych częściach roślin, głównie w kwiatach, owocach i liściach (wyjątek stanowi cebula, która w częściach podziemnych zawiera bardzo duże ilości kwercetyny). Podstawowy szkielet budowy flawonoidów wywodzi się ze struktury 2-fenylochromanu (flawanu). Jest to cząsteczka zbudowana z dwóch pierścieni aromatycznych (A i B) połączonych heterocyklicznym pierścieniem (C) zawierającym atom tlenu. Na **Rysunku 1** przedstawiono budowę szkieletu węglowego flawonoidów. Znanych jest kilka tysięcy różnych flawonoidów. Taką ilość i różnorodność związków powoduje obecność grup hydroksylowych, metoksyłowych czy reszt cukrowych. Flawonoidy są substancjami stałymi, najczęściej żółtymi, niebieskimi, czerwonymi i fioletowymi (głównie antocyjanidyny). Nadają również smak roślinom i produktom, w których występują, np. narynginina nadaje smak goryczy grejpfrutom, kapsaicyna - ostrość chili. Rozpuszczają się dobrze w wodzie i alkoholu etylowym, większość też w octanie etylu. Aglikony nie rozpuszczają się w wodzie.

## 11. Oznaczenie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych



flawan

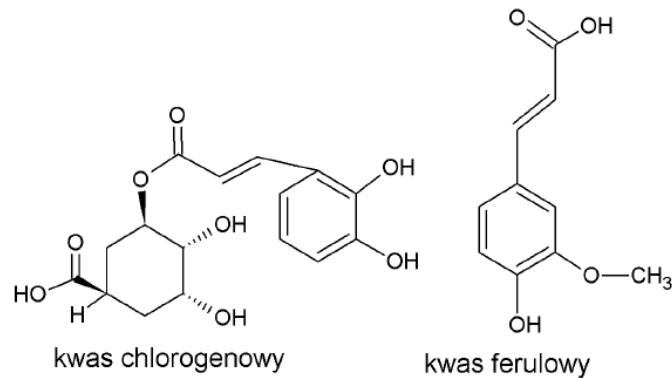
**Rysunek 1.** Budowa szkieletu węglowego flawonoidów (flawanu).

Kwasy fenolowe to, po flawonoidach, druga główna grupa polifenoli spożywanych przez człowieka wraz z pokarmem. Stosunek ilościowy spożywanych flawonoidów i kwasów fenolowych wynika z ich rozpowszechnienia w żywności pochodzenia roślinnego i wynosi około 2:1. Kwasy fenolowe są metabolitami wtórnymi roślin i pełnią funkcje ochronne przed działaniem owadów oraz mikroorganizmów, przed utlenianiem lipidów zawartych w owocach czy nasionach. Roślina w fazie wzrostu i dojrzewania nasion i owoców wymaga większej ochrony, stąd zawartość kwasów fenolowych w młodych roślinach jest większa i zmniejsza się w dojrzałych. Ma to wpływ na właściwości smakowe produktów roślinnych, przykładem może być zanikanie cierpkiego smaku owoców w miarę dojrzewania.

Kwasy fenolowe, szczególnie pochodne kwasu cynamonowego, pełnią funkcję konstytucjonalne (usztywniają ściany komórkowe), wchodząc w skład białek i polisacharydów - np. hemiceluloz czy polisacharydów ściany komórkowej. Hamują wiele szlaków metabolicznych (kwas ferulowy aktywuje oksydazę hormonu wzrostu - auksyny IAA) i odgrywają ważną rolę w dojrzewaniu roślin, np. w kształtowaniu spoczynku u ziarniaków oraz w ochronie przed patogenami i szkodnikami. Kwasy fenolowe to związki zawierające co najmniej jedną grupę hydroksylową i karboksylową (przykładowe struktury na **Rysunku 2**). Dzielą się na:

- hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego (związki typu C<sub>6</sub>C), np. kwas salicylowy (*o*-hydroksybenzoowy), galusowy i wanilinowy (kwas 3-metoksy,4-hydroksybenzoowy)
- kwasy fenylooctowe (związki typu C<sub>6</sub>C<sub>2</sub>),
- pochodne kwasu cynamonowego (związki typu C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>), np. kwas *p*-kumarowy, kawowy, ferulowy i synapinowy.

## 11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych



**Rysunek 2.** Struktury wybranych kwasów fenolowych.

### **1.2. Występowanie związków fenolowych w żywności**

**Flawonoidy** występują w znacznej ilości w częściach zielonych roślin oraz ich kwiatach, np. w koszyczku rumianku, liściach brzozy, kwiatach czarnego bzu, ziele skrzypu, dziurawca i fiołka trójbarwnego, kwiatostanach głogu, lipy i innych. Badania wskazują, że niektóre flawonoidy są znacznie skuteczniejsze jako ekstrakty flawonoidowe z roślin niż jako pojedyncze substancje. Na przyswajalność flawonoidów mają też wpływ inne składniki pożywienia. Flawonoidy spożywane z pokarmem ulegają resorpcji i przemianom metabolicznym z udziałem flory bakteryjnej jelit. Przede wszystkim ulegają deglikolizacji nawet przed wchłonięciem. Metabolizm polega na przyłączeniu do grup hydroksylowych reszt siarczanowych lub kwasu glukuronowego. Zniesienie lub zachowanie aktywności biologicznej metabolitów zależy od sposobu podstawienia tych grup.

Inne grupy związków polifenolowych spotykane są w bardzo różnych produktach pochodzenia roślinnego. **Flawony** występują w częściach naziemnych roślin, głównie w liściach i skórkach owoców. Główne źródła flawonów to pietruszka i seler oraz zielona herbata, cytrusy, winogrona, jabłka, pomidory i czerwona papryka. Źródła **flawonoli** to brokuły, endywia, sałata, cebula, pomidory, jabłka, grejpfruty, jagody i herbata. Bogatym źródłem **izoflawonów** jest soja (do kilkaset mg na 100g), produkty sojowe i warzywa strączkowe. **Flawanony** to flawonoidy występujące głównie w cytrusach. Kwasy fenolowe wykrywane są w bardzo licznych produktach. Przykłady zawartości kwasów fenolowych w żywności pochodzenia roślinnego zamieszczono w **Tabeli 1**.

## 11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych

Tabela 1. Zawartość kwasów fenolowych w wybranych produktach pochodzenia roślinnego.

<i>Produkt spożywczy</i>	<i>Zawartość kwasów fenolowych</i>	
	Kwas	Zawartość w mg/kg (w cieczach mg/dm <sup>3</sup> )
Jabłko	chlorogenowy	200
Sok jabłkowy	chlorogenowy	180
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	100
Czereśnia	chlorogenowy	400
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	180
Śliwka	chlorogenowy	500
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	25
Brzoskwinia	chlorogenowy	250
Czarna porzeczka	chlorogenowy	50
	<i>p</i> -kumarowy	40
	ferulowy	15
Czarna jagoda	chlorogenowy	2 000
	<i>p</i> -kumarowy	10
	ferulowy	10
Ziemniaki surowe	chlorogenowy	1 400
gotowane	chlorogenowy	300
Marchew surowa	chlorogenowy	80
gotowana	chlorogenowy	45
Szpinak	<i>p</i> -kumarowy	350
	ferulowy	110
Pomidory	synapinowy	130
	<i>p</i> -kumarowy	30
	ferulowy	700
Kabaczek	kawowy	80
	<i>p</i> -kumarowy	200
	ferulowy	220
Mąka pszenna	synapinowy	25
	ferulowy	150
	kawowy	30
	<i>p</i> -kumarowy	10
Otręby pszenne	<i>p</i> -kumarowy	50
	ferulowy	700
Płatki owsiane	ferulowy	145
	kawowy	17
	<i>p</i> -kumarowy	50
Ziarno kawowe surowe	chlorogenowy	60 000
	dikawoiloilochinowy	10 000
	feruloilochinowy	8 000
Napar kawowy	chlorogenowy	500
	kawowy	250
	ferulowy	50

## 11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych

---

Jednym ze źródeł kwasów fenolowych są ziarniaki zbóż. Dla przykładu, w ziarnie jęczmienia jest ok. 0,5 g/kg kwasu ferulowego, ok. 100 mg/kg kwasu wanilinowego, ok. 30 mg/kg kwasu p-kumarowego i ok. 20 mg/kg kwasu kawowego. Różnice w zawartości kwasów fenolowych w ziarnie spowodowane są czynnikami genetycznymi (gatunek, odmiana) i środowiskowymi (rodzaj uprawy, rok, zbioru, lokalizacja uprawy). Większość z nich znajduje się w wewnętrznej warstwie ziarna. Podczas produkcji mąki, kasz i innych przetworów zewnętrzna warstwa ziarna jest usuwana, co zuboża produkt końcowy w cenne składniki antyoksydacyjne. Poza tym, podczas przetwarzania surowców roślinnych może dochodzić do zmniejszenia zawartości kwasów fenolowych, zmiany ich aktywności biologicznej i biodostępności.

W **winogronach** występują trzy grupy flawonoidów (czerwone antocyjaniny, flawonole, flawan-3-ole), oligomeryczne proantocyjanidyny i polimeryczne skondensowane taniny, kwasy fenolowe (galusowy, hydroksycynamonowy, hydroksybenzoesowy) i stilbenoidy. W **owocach borówki, czarnej jagody, czarnej porzeczki** i innych ciemnych owocach, jak **wiśnie, truskawki, bez czarny** znajdują się głównie antocyjany, poza tym stilbenoidy i inne polifenole. Barwa antocyjanidyn zależy od pH i obecności metali, z którymi tworzą barwne kompleksy. Najbardziej rozpowszechnione to pelargonidyna (czerwona), cyjanidyna (niebieska) i delfinidyna. Barwniki antocyjaninowe wykorzystuje się do barwienia żywności, np. ekstrakt ze skórki ciemnych winogron czy ekstrakt z czarnej porzeczki.

Podobnie jak ciemne owoce, **ciemne warzywa**, takie jak czerwona kapusta, czerwona cebula, czarna fasola, bakłażan są również dobrym źródłem antocyjanów, stilbenoidów i innych związków fenolowych. Związki fenolowe we wszystkich warzywach występują w naziemnych częściach roślin, jedynym wyjątkiem jest cebula, która w części podziemnej zawiera duże ilości polifenoli, głównie kwercetyny.

**Świeże liście herbaty** zawierają nawet do 25-35 % związków fenolowych w przeliczeniu na suchą masę. Są to głównie flawanole (80%), proantocyjanidyny, kwasy fenolowe, flawonole i flawony. Podczas fermentacji flawanole są utleniane enzymatycznie tworząc związki odpowiedzialne za kolor i smak czarnej herbaty. Zielona herbata zawiera 17,5 % związków polifenolowych natomiast czarna – 14,4 %. Głównymi składnikami frakcji polifenolowej w herbacie zielonej są katechiny. Także inne gatunki roślin zawierają znaczne ilości związków fenolowych. Stąd, produkty zielone są często cennymi i bogatymi źródłami tych substancji, wykazując także istotne działanie antyoksydacyjne.

## 11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych

### **1.3. Oznaczanie sumy związków fenolowych**

Istnieją liczne metody analizy ilościowej związków polifenolowych, z których większość polega na ich ekstrakcji z badanego materiału, oczyszczaniu uzyskanych ekstraktów, a następnie analizie przy użyciu zaawansowanych technik chromatograficznych (chromatografia gazowa oraz cieczowa) i spektroskopowych. Spośród metod prostszych, najbardziej rozpowszechnione jest spektrofotometryczne oznaczanie sumy związków fenolowych po reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a (F-C).

#### **1.3.1. Zastosowanie odczynnika Folina-Ciocalteu'a (F-C)**

Podstawą oznaczania jest odwracalna reakcja redukcji przez fenole w środowisku alkalicznym molibdenu (VI) do molibdenu (V) zawartego w odczynniku F-C. W wyniku reakcji powstaje niebieski związek, który wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 745 - 750 nm. Intensywność absorpcji przy tej długości fali jest proporcjonalna do stężenia fenoli. Odczynnik F-C przygotowuje się z mieszaniny wolframianu sodu ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ), molibdenianu sodu ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), siarczanu litu ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ), wody bromowej i stężonych kwasów solnego i fosforowego. Struktura powstającego związku nie jest znana. Mechanizm reakcji polega na przenoszeniu elektronu. Do reakcji potrzebne jest alkaliczne środowisko (pH ok. 10), w którym powstaje anion fenolanowy redukujący molibden. Niebieski barwnik powstaje w reakcji odczynnika F-C z fenolami niezależnie od ich struktury.

Interferencje w metodzie F-C mogą powodować różne, niefenolowe związki, jak cukry redukujące, aromatyczne aminy, ditlenek siarki, kwas askorbinowy, sorbowy, Fe(II) i inne. Dla uzyskania wiarygodności wyników pomiarów należy zachować następujące warunki, które są krytyczne w tej metodzie:

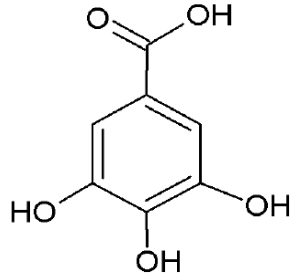
1. Należy zachować odpowiedni, stały stosunek ilościowy zasady do odczynnika F - C.
2. Zoptymalizować czas i temperaturę reakcji dla uzyskania właściwej barwy i trwałości produktu.
3. Mierzyć absorbancję przy długości fali 765 nm.
4. Używać kwasu galusowego jako substancji wzorcowej (**Rysunek 3**).

Dla uzyskania środowiska alkalicznego stosuje się nasycony roztwór bezwodnego węgla sodu. Próbkę o odpowiednim rozcieńczeniu miesza się z odczynnikiem F - C i dodaje się nasyconego

## 11. Oznaczenie związków fenolowych w wybranych produktach ziołowych

---

roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Zalecana proporcja objętości nasyconego roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  do odczynnika F-C wynosi 3:1.



kwasy galusowy

**Rysunek 3.** Struktura kwasu galusowego.

## 2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest określenie zawartości związków polifenolowych przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a (F-C) w naparach z powszechnie stosowanych produktów ziołowych.

### 2.2. Wykonanie ćwiczenia

#### *Analizowane produkty spożywcze*

- produkty ziołowe (susze liście mięty pieprzowej *Mentha × piperita* L. oraz aronii czarnej *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott)

#### *Odczynniki chemiczne*

- woda destylowana
- metanol
- nasycony wodny roztwór węglanu sodu
- kwas galusowy
- odczynnik Folina-Ciocalteu'a (F-C)

#### *Szklano laboratoryjne, sprzęt i akcesoria*



## 11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych

---

- moździerz porcelanowy – 2 szt.
- kolba miarowa 10 ml z korkiem – 6 szt.
- butelka zakręcana 4 ml – 8 szt.
- zlewka 250 ml – 2 szt.
- kolba stożkowa 250 ml – 2 szt.
- kolba stożkowa 100 ml – 2 szt.
- lejek – 2 szt.
- sączki
- szkiełko zegarkowe – 2 szt.
- łopatka metalowa – 1 szt.
- marker
- pipeta z tłoczkiem 1 ml – 1 szt.
- pipeta z tłoczkiem 2 ml – 1 szt.
- pipeta automatyczna 0,1 ml (1 szt.) + końcówki jednorazowe
- łyżka metalowa mała – 1 szt.
- bagietka szklana – 2 szt.

### **SPOSÓB WYKONANIA**

#### ***Przygotowanie naparów z materiału roślinnego***

Do szklanych zlewek o pojemności 250 ml przenieść po 0,5 g odważonego suszu roślinnego. Zalać każdą z naważek dokładnie 100 ml **wrzącej wody destylowanej**. Zlewki przykryć szkiełkami zegarkowymi i odczekać 10 minut, mieszając w tym czasie napary 2-3 razy za pomocą bagietek szklanych. Następnie napary zdekantować lub przesączyć (w zależności od przejrzystości naparu oraz obecności cząstek stałych) do kolb stożkowych o pojemności 250 ml.

**UWAGA** – potrzebne jest zaledwie kilka ml naparu.

## **11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych**

---

### ***Przygotowanie krzywej wzorcowej dla kwasu galusowego***

W kolbie miarowej (10 ml) umieścić naważkę 50 mg kwasu galusowego i rozpuścić go w metanolu (**roztwór podstawowy o stężeniu 5 mg/ml**). Następnie, w kolejnych kolbach miarowych przygotować roztwory kwasu galusowego o stężeniach: 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml. W tym celu, pobrać odpowiednią objętość roztworu podstawowego, rozcieńczyć wodą destylowaną, wymieszać i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.

### ***Pomiar zawartości związków fenolowych w ekstraktach oraz roztworach kwasu galusowego***

Za pomocą pipety automatycznej pobrać do osobnych butelek zakręczanych o pojemności 4 ml po 100  $\mu$ l badanych naparów oraz poszczególnych roztworów kwasu galusowego (poza roztworem podstawowym). Przygotować także osobną butelkę na ślepą próbę, do której dodać 100  $\mu$ l metanolu. Do każdego z naczyń dodać kolejno: po 1,5 ml wody destylowanej i (za pomocą pipety automatycznej) po 100  $\mu$ l odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Próbkę wstrząsnąć i odstawić na 3 minuty. Po tym czasie, dodać do każdej po 0,3 ml nasyconego roztworu węgla sodu. Butelki wstawić do bloczka grzejnego (40°C) i pozostawić na 30 minut. Następnie, zmierzyć absorbancję dla każdej z prób przy długości fali  $\lambda = 765$  nm, rozpoczynając od ślepej próby zgodnie ze wskazówkami prowadzącego.

## **3. OPRACOWANIE WYNIKÓW**

Sprawozdanie powinno zawierać opis części eksperymentalnej, uzyskane wyniki i ich krótką dyskusję. W szczególności, należy w nim umieścić:

- a) wykreśloną krzywą wzorcową dla kwasu galusowego, gdzie  $A=f(\text{stężenie kwasu galusowego [mg/ml]})$ ; proszę podać równanie krzywej oraz określić jej liniowość za pomocą współczynnika korelacji,
- b) obliczone – na podstawie równania krzywej kalibracyjnej – zawartości związków fenolowych, wyrażone jako ekwiwalent kwasu galusowego na ml roztworu,
- c) znając wyjściową objętość naparów oraz masę odważonego materiału roślinnego, określić zawartość związków fenolowych w suszu roślinnym (w mg/kg suchej masy).

## 11. Oznaczanie związków fenolowych w wybranych produktach zielonych

---

### LITERATURA

1. *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne.* W. Grajek (red.), WNT, Warszawa, 2007.
2. *Chemia żywności. Składniki żywności, tom 1.* Red. Z. E. Sikorski, WNT, Warszawa, 2007.
3. Stankovic, M.S., Niciforovic, N., Mihailovic, V., Topuzovic, M., Solijic, S. (2012). Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **81**(2), 117-122.