



Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 1

Ekstrakcja i oznaczanie zawartości
związków fenolowych z produktów
roślinnych

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2011

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodami:

- izolacji związków wrażliwych na działanie temperatury, tlenu i promieniowania UV, jakimi są polifenole;
- oznaczania całkowitej zawartości związków fenolowych w surowcach i produktach roślinnych metodami spektroskopowymi.

Wykonanie ćwiczenia polega na ekstrakcji rozpuszczalnikowej (wspomaganej ultradźwiękami) związków fenolowych z następujących surowców roślinnych:

- świeża czerwona kapusta,
- świeża czerwona cebula,
- zielona (lub czarna) herbata.

W otrzymanych ekstraktach należy oznaczyć sumaryczną zawartość związków fenolowych metodą spektroskopową z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a (F-C). Wynik oznaczeń ilościowych należy przedstawić w przeliczeniu na zawartość kwasu galusowego na masę surowca (mg/g). W tym celu należy przeprowadzić reakcję kwasu galusowego (roztwory kalibracyjne o różnych stężeniach) z odczynnikiem F-C i wykonać krzywą kalibracyjną. Krzywą kalibracyjną dla kwasu galusowego oraz pomiary absorbancji próbek studenci wykonują wspólnie. Każdy student wykonuje ekstrakcję jednego surowca.

1. Surowce roślinne zawierające związki fenolowe

1.1. Ziarniaki zbóż i ich przetwory

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.

1.2. Owoce jagodowe

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. Stilbenoidów w winorośli jest mniej niż innych związków fenolowych jak np. flawonoidów. Stilbenoidy wykryto zarówno w

jadalnych jak i niejadalnych częściach roślin. W dużych ilościach, głównie w postaci glukozydu, występują w skórce owoców, w mniejszych w nasionach i łodydze. W świeżej roślinie występuje tylko forma trans.

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. Antocyjany występują w postaci O-glikozydów z wiązaniem w pozycji C-3. Na część cukrową składają się przede wszystkim cząsteczki glukozy, rzadziej ramnozy. Aglikon nazywany jest antocyjanidyną. 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 (E 163(i)), ekstrakt z czarnej porzeczki (E 163(iii)).

1.3. Warzywa

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.

1.4. Herbata

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.

2. Wykonanie ćwiczenia

2.1. Ekstrakcja

W czasie ekstrakcji i innych etapów izolacji polifenoli należy chronić próbkę przed działaniem światła i tlenu. Naczynia należy osłaniać folią aluminiową, jeśli to możliwe, czynności wykonywać bez dostępu światła. Ekstrakcję i hydrolizę wykonywać w atmosferze gazu obojętnego, np. azotu. Przechowywać ekstrakty w ciemności, najlepiej w temperaturze -20°C.

Ekstrakcja czerwonej kapusty i czerwonej cebuli

Okolo 100 mg rozdrobnionej (posiekanej lub rozniecionej) czerwonej cebuli (kapusty) odważyć z dokładnością do 0,5 mg w naczynku zakręcanym, dodać 1 ml roztworu 1% kwasu octowego w metanolu, usunąć powietrze z naczynka azotem i zamknąć. Zawinąć naczynko folią aluminiową i

wstawić do łaźni lodowo-wodnej. Całość umieścić w łaźni ultradźwiękowej i ekstrahować przez 3 min. Po 3 min sprawdzić, czy w łaźni znajduje się lód, jeśli brak, uzupełnić i ekstrahować następne 3 min. Próbkę z ekstraktem pozostawić do dekantacji w ciemności. Ekstrakty z badanych surowców po zdekantowaniu nadają się do oznaczania fenoli.

Ekstrakcja zielonej (czarnej) herbaty

W celu sporządzenia naparu próbkę herbaty należy zalać odpowiednią ilością wody o temperaturze 70°C (100°C) i pozostawić pod przykryciem bez mieszania (proporcja 50 ml wody na 0,5 g herbaty). Po 10 min parzenia należy zdekantować napar i pozostawić do schłodzenia do temperatury pokojowej. Po wykonaniu wstępnych oznaczeń ewentualnie odpowiednio rozcieńczyć roztwór do oznaczenia fenoli metodą F-C.

2.2. Oznaczanie całkowitej zawartości fenoli metodą Folina-Ciocalteu'a (F-C)

Należy tak zaplanować pracę w laboratorium, aby w miarę możliwości, jednocześnie przeprowadzić reakcję z odczynnikiem F-C dla roztworów wzorca kwasu galusowego oraz dla badanych ekstraktów a następnie serię pomiarów spektrofotometrycznych UV-Vis.

2.2.1. Wykonanie krzywej kalibracyjnej dla roztworu wzorca - kwasu galusowego

a) Przygotować roztwory kwasu galusowego o następujących stężeniach:

0 mg/ml 0,1 mg/ml 0,2 mg/ml 0,3 mg/ml 0,4 mg/ml 0,5 mg/ml

W tym celu do kolby miarowej (o poj. 5 ml) pobrać odpowiednią objętość **roztworu wzorcowego kwasu galusowego** o stężeniu $c = 5 \text{ mg/ml}$ a następnie uzupełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać.

b) Do kolb miarowych (o poj. 10 ml) pobrać po 0,1 ml z każdego roztworu kalibracyjnego, 6 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a, dobrze wymieszać i pozostawić dokładnie na 3 minuty (minimum 0,5 min do maksymalnie 8,0 min). Następnie dodać po 1,5 mL nasyconego roztworu węgla sodu, uzupełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać. Wstawić do termostatu ustawionego na 40°C na 30 min (do uzyskania trwałego, charakterystycznego, niebieskiego koloru). Zmierzyć absorbancję przy 765 i 735 nm wobec ślepej próby (0 mg/ml roztworu kwasu galusowego).

Wykreślić krzywą kalibracyjną $A = f(\text{stężenie kwasu galusowego [mg/ml]})$

2.2.2. Pomiar absorbancji badanych ekstraktów

Do kolb miarowych (o poj. 10 ml) pobrać po 0,1 ml z roztworu każdego badanego ekstraktu, 6 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a, dobrze wymieszać i pozostawić na 3 minuty (minimum 0,5 min do maksymalnie 8,0 min). Następnie dodać po 1,5 mL nasyconego roztworu węgla sodu, uzupełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać. Wstawić do termostatu ustawionego na 40°C na 30 min (do uzyskania trwałego, charakterystycznego, niebieskiego koloru). Zmierzyć absorbancję przy 765 i 735 nm.

Odczytać z krzywej kalibracyjnej stężenie kwasu galusowego odpowiadające absorbancji badanej próbki i obliczyć całkowitą zawartość polifenoli w mg/g próbki w przeliczeniu na kwas galusowy.

3. Sprawozdanie

Sprawozdanie z wykonanego ćwiczenia powinno obejmować:

- 0,5 stronicowy wstęp teoretyczny obejmujący zagadnienia wyszczególnione w wymaganiach,
- schemat wykonania ćwiczenia,
- uzyskane wyniki,
- porównanie oznaczonych ilości polifenoli w badanych surowcach z danymi opublikowanymi, np. w internecie, i dyskusję na temat możliwości przeciwutleniających badanych próbek.

4. Zakres materiału do zapoznania się przed wykonaniem ćwiczenia

1. Przyczyny stresu oksydacyjnego w komórce i zapobieganie autooksydacji.
2. Naturalne przeciwutleniacze w produktach i surowcach roślinnych.
3. Metody izolacji polifenoli z surowców roślinnych (Metody ekstrakcyjne)
4. Spektroskopowe metody oznaczania związków fenolowych (Spektrofotometria UV/Vis).
5. Oznaczanie ilościowe metodą krzywej kalibracyjnej (Metody analizy ilościowej).

Odczynniki

1. Nasycony roztwór węglańcu sodu Na_2CO_3 przygotowany w następujący sposób: 50 g Na_2CO_3 rozpuścić w 200 ml wody i podgrzać do wrzenia. Po wystudzeniu dodać kilka kryształków węglańcu sodu i po 24 godz. przesączyć do kolby miarowej i uzupełnić wodą do 250 ml.
2. Odczynnik Folina-Ciocalteu'a (*przechowywać w lodówce w ciemnym naczyniu*).
3. Roztwór wzorcowy kwasu galusowego $c = 5 \text{ mg/ml}$ przygotowany poprzez rozpuszczenie 25 mg kwasu galusowego w kolbie miarowej ($V = 5 \text{ mL}$) w 0,5 ml etanolu i uzupełnienie wodą destylowaną do kreski.
4. Roztwór 1% kwasu octowego w metanolu ($V = 100 \text{ mL}$)
5. Woda destylowana.

Szkló i sprzęt laboratoryjny

Ekstrakcja

2 naczynka zakręcane o pojemności 4 ml, moździerz porcelanowy, łopata dentystyczna, pipeta miarowa 1 ml, folia aluminiowa, 4 zlewki ($V = 100 \text{ ml}$), pokrywka pasująca do zlewki, termostat.

Oznaczanie fenoli

6 kolbek miarowych o pojemności 5 ml, 9 kolbek miarowych o pojemności 10 ml, pipety miarowe o pojemności: 1 ml (3 szt.), 2 ml, 5 ml, 10 ml, pipeta automatyczna eppendorf ($100 \mu\text{l} = 0,1 \text{ mL}$) wraz z pasującymi końcówkami.