

ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Fenoli su sekundarni biljni metaboliti koje u obilju pronalazimo u biljnim plodovima, sjemenkama, listovima (Crozier i sur., 2006). Sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Na temelju osnovnog kostura (broj C-atoma) kategorizirani su u nekoliko skupina: C₆ – jednostavni fenoli i benzokinoni (npr. katehol i hidrokinon), C₆-C₁ – fenolne kiseline (npr. galna i salicilna kiselina), C₆-C₂ – acetofenoni i feniloctena kiselina, C₆-C₃ – hidroksicimetne kiseline (derivati cimetine kiseline), fenilpropani, kumarini, izokumarini, kromoni (npr. kavina i ferulinska kiselina, umbeliferon), C₆-C₄ – naftokinoni (npr. juglon), C₆-C₁-C₆ – ksantoni, C₆-C₂-C₆ – stilbeni, antrakinoni (npr. resveratrol), C₆-C₃-C₆ – kalkoni, flavonoidi, izoflavonoidi, neoflavonoidi (npr. kvercetin, cijanidin, genistein), (C₆-C₃)₂ – lignani i neolignani, (C₆-C₃-C₆)₂ – biflavonoidi, (C₆-C₃)_n – lignini, (C₆)_n – kateholski melanini, (C₆-C₃-C₆)_n – kondenzirani tanini (Harborne, 1980).

Sadržaj ukupnih fenola u vodenim i etanolnim ekstraktima određuje se spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Zhishen i sur., 1999). Ova kolorometrijska metoda temelji se na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u plavo obojene volfram- i molibden-oksidi (Ough i Amerine, 1998). Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima određuje se očitavanjem baždarnе krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline.

REAGENSI:

- 1) etanol (96 % v/v)
- 2) Folin-Ciocalteu reagens
- 3) 1,88 M Na₂CO₃ (1.88M; 2g bezvodnog Na₂CO₃ otopiti u malo dH₂O i nadopuniti do 10 ml)
- 4) galna kiselina

APARATURA I PRIBOR:

- 1) odmjerne tikvice ili menzura volumena (10-100 mL)
- 2) pipete, volumena (0-10 mL)
- 3) mikropipeta, volumena (0-100 µL)
- 4) Eppendorf plastične epruvete i kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) spektrofotometar, vrtložna miješalica, inkubator ili vodena kupelj

NAČIN IZVOĐENJA

Odpipetirajte u prethodno označene Eppendorf plastične epruvete od 2 mL 1580 µL dH₂O, 20 µL etanolnog ili vodenog biljnog ekstrakta ili pojedine koncentracije GA (za referentno mjerenje na spektrofotometru koristiti 20 µL destilirane vode ili etanola).

Zatim u svaku epruvetu dodati 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa.

Dobivenu smjesu u zatvorenoj Eppendorf epruveti promiješajte na vrtložnoj miješalici. Nakon miješanja dodajte po 300 µL 1,88 M otopine Na₂CO₃ te smjesu otopina još jednom promiješane i inkubirajte 30 minuta na 45 °C. Nakon inkubacije na spektrofotometru očitajte apsorbanciju na spomenutoj valnoj duljini od 765 nm.

Sadržaj ukupnih fenola u pojedinim uzorcima određuje se očitavanjem baždarnе krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline poznatih koncentracija (0,1 - 1 mg mL⁻¹) te se izražava u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg GAE/g sm).

Postupak za izradu baždarne krivulje

Priprema matične otopine konačne koncentracije 2 mg/mL: 50 mg galne kiseline otopiti u dH₂O/EtOH i nadopuniti do 25 ml.

Priprema niza razrjeđenja u Eppendorf plastičnim epruvetama u konačnom volumenu V=0,5 mL tj. 500 μL (V₂):

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

| Koncentracija (mg/mL) | V galne kiseline (μL matične otopine) | V dH₂O/EtOH (μL) |
|----------------------------------|--|--|
| 0,1 | 25 | 475 |
| 0,3 | 75 | 425 |
| 0,5 | 125 | 375/ |
| 0,7 | 175 | 325 |
| 1 | 250 | 250 |

Postupak za izradu baždarnog pravca u Excel-u

Označite koncentracije galne kiseline (c; mg/ml) u koloni A te apsorbancije galne kiseline (Aps) u koloni B -> Insert Scatter (x,y) -> Add Trendline -> Format Trendline

Format Trendline

Trendline Options

- Exponential
- Linear
- Logarithmic
- Polynomial Order
- Power
- Moving Average Period

Trendline Name

Automatic Linear (S)

Custom

Forecast

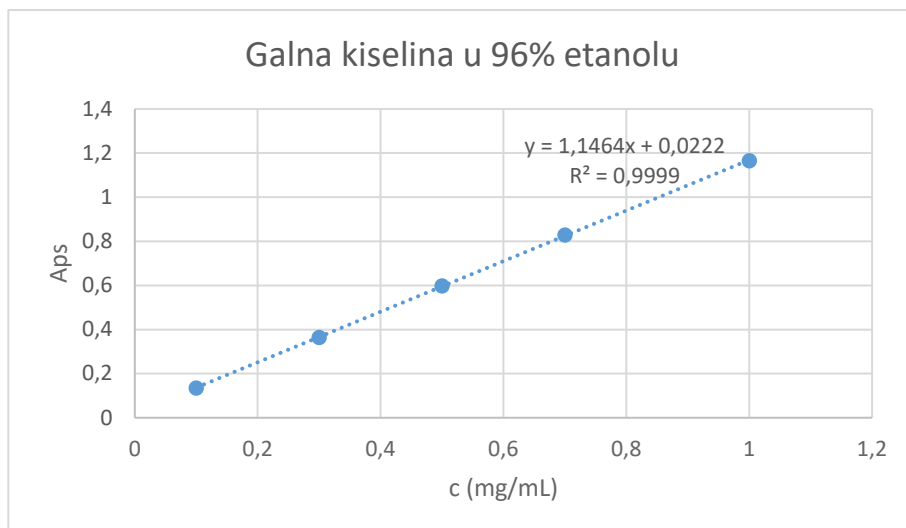
Forward 0,0

Backward 0,0

Set Intercept 0,

Display Equation on chart

Display R-squared value on chart



y os (apsorbancije galne kiseline) i x os (koncentracije galne kiseline u mg/mL)

a = ekstinkcijski koeficijent

b = odsječak na osi y

R^2 = ukazuje na točnost izrade

Račun za sadržaj ukupnih fenola

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$[\text{fenoli}] = \frac{A}{\varepsilon \times l} \quad [\text{mg/mL}]$$

$$\text{fenoli/g} = \frac{[\text{fenoli}]}{m \text{ (g)}} \quad [\text{mg/g}]$$

A = apsorbancija pri 765 nm

ε = ekstinkcijski koeficijent

l = dužina optičkog puta = 1 cm

Literatura:

1. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews 56: 317-333.
2. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (2006) Plant secondary metabolites-occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
3. Harborne JB (1980) Plant phenolics. U: Bell EA, Charlwood BV (ur.) Encyclopedia of plant physiology, volume 8, Secondary plant products. New York, Springer-Verlag, 329-395.
4. Ough CS, Amerine MA (1988) Phenolic compounds. U: Ough CS, Amerine MA (ur.) Methods for analysis of musts and wines. New York, John Wiley & Sons, Inc., 203-221.
5. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555-559.