



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДВНЗ «Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника»

Факультет природничих наук
Кафедра хімії

ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПЛУК В РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ МЕТОДОМ ФОЛІНА-ЧЕКАЛЬТЕУ

ІНСТРУКЦІЯ ДО ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

із дисципліни «Аналітична хімія харчових продуктів»

ІВАНО-ФРАНКІВСЬК
2020

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Тема: визначення поліфенольних сполук в рослинній сировині методом Фоліна-Чекальтеу.

Мета: навчитися визначати вміст поліфенолів у різних видах рослинної сировини, будувати калібрувальну криву, обробляти отримані результати аналізу.

Обладнання та реактиви: розчин галової кислоти 1 мг/см³, реактив Фоліна-Чекальтеу – 10 %-й, Na₂CO₃ - 7,5 %-й; спектрофотометр ULAB-102 UV, кювети з товщиною поглинаючого шару 5,0 мм, електронні ваги, мірні колби на 25 см³, мірні колби на 100 см³, піпетки об'ємом на 1,0; 2,0; 5,0 та 10,0 см³.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Фенольні сполуки - один з найбільш поширених і численних класів біологічно активних речовин, що містять ароматичні кільця з вільною або зв'язаною гідроксильною групою. Вони наявні в різноманітних фруктах, овочах, горіхах, насінні, квітках, корі, напоях і навіть деяких вироблених харчових продуктах, як складових використовуваних природних інгредієнтів. Як відомо, вони виявляють антиканцерогенні, антитромботичні, протизапальні, імуномодулюючі, антимікробні, судинорозширювальні та знеболюючі ефекти. Інтерес до досліджень поліфенолів з різних природних джерел зростає з кожним роком, оскільки поліфеноли можуть використовуватися як антиоксиданти в харчовій промисловості, і вони приносять користь здоров'ю людини різними способами. Сприятливий вплив поліфенолів на здоров'я людини може бути зумовлений їхніми властивостями, що знижують вміст вільних радикалів, блокуючи згубну дію цих молекул на клітини організму.

Аналіз кількісної оцінки фенолів заснований на методі Фоліна-Чекальтеу. Метод покладається на перенесення електронів у лужному середовищі з фенольних сполук з утворенням інтенсивно забарвленої сполуки синього кольору, максимальне поглинання якого залежить від концентрації фенольних сполук. Відновлений реагент Фоліна-Чекальтеу можна виявити за допомогою спектрофотометра в діапазоні від 650 до 750 нм. Температура реакції, яка може

бути використана для скорочення часу, необхідного для досягнення максимального світлопоглинання ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Як правило, галова кислота використовується в якості стандартної сполуки, а результати виражається, як еквівалентна кількість *галової кислоти* (мкг/мл).

ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Завдання: приготувати 50 мл реактиву Фоліна-Чекальтеу водний розчин (10 %). За допомогою піпетки вносять 5 см³ реактиву Фоліна-Чекальтеу в мірну колбу місткістю 50 см³, доливають до мітки водою і перемішують. Розчин можна використовувати протягом одного дня.

2. Завдання: приготувати 200 мл 7,5 %-вий розчин Na₂CO₃. 15 г натрій карбонату (Na₂CO₃) поміщають в мірну колбу місткістю 200 см³. Доливають приблизно до половини колби водою, перемішують до повного розчинення карбонату натрію, охолоджують розчин до кімнатної температури, додають воду до мітки і перемішують.

3. Завдання: приготувати стандартний розчин галової кислоти 1 мг/см³. Наважку масою $0,110 \pm 0,001$ г моногідрату галової кислоти ($M = 188,14$ г/моль) поміщають в мірну колбу місткістю 100 см³, розчиняють у воді, доводять до мітки і перемішують.

4. Завдання: приготувати робочий розчин галової кислоти 0,2 мг/см³. Розбавляють стандартний розчин галової кислоти за пропорцією 1:5.

5. Побудова калібрувальної кривої

Для побудови якогось у мірні колби на 25 см³ вносять 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 та 5,0 см³ робочого розчину (0,2 мг Галової к-ти/см³), до кожної проби додають 2 см³ реактиву Фоліна-Чекальтеу і через кілька хвилин 10 см³ 7,5%-ного розчину Na₂CO₃ і доводять об'єм водою до мітки. В одержаних розчинах концентрація галової к-ти у перерахунку на досліджувану пробу дорівнює 0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 та 40,0 мкг Галової к-ти/см³.

Оптичну густину приготованих розчинів вимірюють через 40 хвилин на спектрофотометрі, використовуючи світлофільтр із довжиною хвилі ($\lambda = 746$ нм) у кюветах із товщиною поглинаючого світлошару 5 мм. У якості розчину порівняння використовують: 2 см³ реактиву Фоліна-Чекальтеу і через кілька

хвилин 10 см³ 7,5%-ного розчину Na₂CO₃ і доводять об'єм водою до мітки колби 25 см³. За отриманими даними, будують калібрувальний графік (Рис. 1.б) – залежність оптичної густини від початкової концентрації розчину порівняння (с₀, мкг галової к-ти/см³).

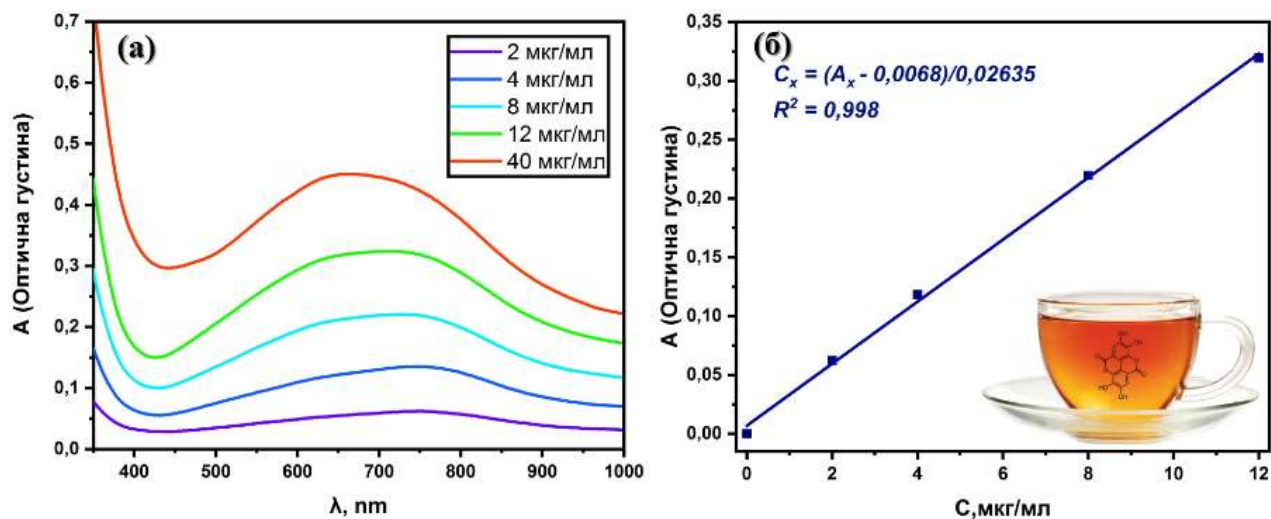


Рис. 1. а) залежність оптичної густини еталонних розчинів від довжини хвилі випромінювання; б) калібрувальний графік для визначення концентрації поліфенолів (мкг/л).

Із результатів даних калібрувальної кривої виведено рівняння, яке описує залежність концентрації галової к-ти від оптичної густини розчину [мкг/мл]:

$$C_x = \frac{A_x - 0,0068}{0,02635}, \quad (1)$$

6. Підготовка проби для аналізу

Наважку (0,500 ± 0,001) г підготовленої проби чаю поміщають в склянку місткістю 100 см³, додають 25 см³ дистильованої води (температура 60 °С). Перемішують до повного проходження екстракції проби і охолоджують до кімнатної температури. За допомогою піпетки поміщають 1,0 см³ екстракту розчинного чаю в мірну колбу місткістю 100 см³. Доводять дистильованою водою до мітки і ретельно перемішують.

7. Методика визначення

У мірну колбу на 25 см³ відбирають аліквоту з проби (розчини в діапазоні концентрацій 0,0 - 12,0 мкг галової к-ти/мл), додають 2 см³ реактиву Фоліна-Чекальтеу і через кілька хвилин 10 см³ 7,5%-ного розчину Na₂CO₃ і доводять об'єм водою до мітки колби 25 см³.

Оптичну густину приготованих розчинів вимірюють через 40 хвилин на спектрофотометрі, використовуючи світлофільтр із довжиною хвилі ($\lambda = 746$ нм) у кюветах із товщиною поглинаючого світлошару 5,0 мм. У якості розчину порівняння використовують: 2 см³ реактиву Фоліна-Чекальтеу і через кілька хвилин 10 см³ 7,5%-ного розчину Na₂CO₃ і доводять об'єм водою до мітки колби 25 см³. За даними оптичної густини розчину розраховують концентрацію вмісту поліфенолів, враховуючи розведення ($K_p = V_k / V_a$):

$$C'_x = \frac{A_x - 0,0068}{0,02635} \cdot K_p \quad (2)$$

8. Обробка результатів аналізу

Концентрацію поліфенолів визначають за наступною формулою:

$$C_{\text{polyphenols}} = (C'_x * V_{\text{ext}} * K_p) / (m_{\text{sample}} * 1000) - [\text{мг/г}], \quad (3)$$

де C'_x - концентрація поліфенолів визначена за формулою 2, (мкг/мл); V_{ext} – об'єм екстракту, (мл); K_p – коефіцієнт розведення (1:100); m_{sample} – маса наважки зразка (г); 1000 – коефіцієнт перерахунку з мкг у мг.