

Celina Pieszko, Agata Zaremba

ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W EKSTRAKTACH Z PRÓBEK MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Katedra Chemii Analitycznej Politechniki Śląskiej w Gliwicach
Kierownik prof. dr hab. *I. Staneczko-Baranowska*

Celem pracy było porównanie całkowitej zawartości związków fenolowych w różnych próbkach materiału roślinnego, który może być wykorzystany do produkcji kosmetyków: owoce – truskawka, warzywa – czarna rzepa, materiał roślinny – pokrzywa, mięta, liście orzecha włoskiego, liście brzozy zwyczajnej. Badania obejmowały dobór rozpuszczalnika do ekstrakcji oraz oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli metodami spektrofotometrycznymi: Folin-Ciocalteu oraz z zastosowaniem 1,10-fenantroliny i błękitu pruskiego.

Hasła kluczowe: polifenole, spektrofotometria, ekstrakty roślinne.

Key words: polyphenols, spectrophotometry, plant extracts.

Związki fenolowe występują powszechnie w roślinach, co powoduje ich obecność w żywności, lekach i kosmetykach. Określenie zawartości tych związków w żywności, kosmetykach, roślinach kosmetycznych czy lekach budzi duże zainteresowanie, co można tłumaczyć faktem, iż związki te wykazują działanie przeciwtleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz konserwujące. Zioła od tysiącleci były wykorzystywane jako główny surowiec do produkcji kosmetyków (1). Zainteresowanie ekstraktami roślinnymi w ostatnich latach zaczęło wzrastać. Jest to spowodowane faktem, że niejednokrotnie syntetyczne substancje podrażniają skórę, wywołują alergie oraz w wyniku wchłonięcia się w skórę mogą przyczyniać się do powstawania różnych schorzeń. W kosmetyce używa się zarówno ekstrakty z całej rośliny, jak i jej określonego składnika chemicznego (2). Całe rośliny były używane w kosmetyce od tysiącleci. Natomiast pojedyncze składniki są wykorzystywane od momentu, w którym ich pozyskiwanie z roślin stało się łatwiejsze (1). W literaturze znaleźć można wiele doniesień dotyczących oznaczania całkowitej zawartości związków fenolowych w różnego rodzaju próbkach. Najszerzej opisana i jednocześnie stosowana jest metoda *Folin-Ciocalteu*. Metoda ta wykorzystywana jest do oznaczania całkowitej zawartości polifenoli w roślinach, owocach, ziołach czy kosmetykach (3–6). Brak jest natomiast w piśmiennictwie doniesień na temat oznaczania związków fenolowych w ziołach czy warzywach za pomocą błękitu pruskiego i 1,10-fenantroliny, czy też odnalezienie publikacji, w których te trzy metody byłyby ze sobą porównane. W niniejszej pracy podjęto próbę sprawdzenia czy wszystkie trzy metody mogą zostać z powodzeniem zastosowane do oznaczenia polifenoli w ekstraktach z owoców, warzyw oraz ziół czy liści drzew. W przygotowaniu próbek materiału roślinnego do analizy dominuje ekstrakcja ciecz-ciecz, która może

być też wspomagana ultradźwiękami. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji związków fenolowych z próbek roślinnych są woda, aceton, metanol i etanol (3, 5, 7, 8). Aceton stosowano w przypadku ziela majeranku, szałwi, metanol był stosowany przy ekstrakcji liści buka i ziela dziurawca oraz mniszka lekarskiego, a etanol w ekstrakcji związków fenolowych z rokitnika i topoli czarnej. Wśród wielu długotrwałych sposobów przygotowania próbek materiału roślinnego do analizy znalazły się również takie, które wymagają tylko zalania analizowanej rośliny wrzącą wodą – kora wierzby, lawenda, kwiat bzu (5) oraz takie, gdzie z próbki wyciska się sok, sączy przez bibułę filtracyjną i poddaje się analizie – imbir, niektóre owoce i warzywa (9, 10).

Celem pracy było porównanie całkowitej zawartości związków fenolowych w ekstraktach z różnych próbek materiału roślinnego, który może być wykorzystany do produkcji kosmetyków. Badania obejmowały również dobór metody ekstrakcji oraz oznaczenia za pomocą metoda: *Folin-Ciocalteu*, błękitu pruskiego oraz z zastosowaniem 1,10-fenantroliny i ich wpływ na ostateczny wynik całkowitej zawartości.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 6 próbek roślinnych (mięta, pokrzywa, liście brzozy, liście orzecha włoskiego, truskawka i czarna rzepa), których ekstrakty są stosowane w kosmetykach. Przy wyborze próbek do badań sugerowano się ich dostępnością oraz starano się wybrać taki materiał, którego ekstrakty bogate są w związki fenolowe.

Przygotowanie próbek do analizy

Odważono ok. 2 g ($\pm 0,0001$ g) materiału roślinnego zalano 95 cm³ wody (ekstrakcja 1) lub 95 cm³ metanolu (ekstrakcja 2) i utrzymywano w temp. 70°C przez 30 min. Następnie ekstrakty przeniesiono do kolb miarowych poj. 100 cm³ i uzupełniono do kreski odpowiednim rozpuszczalnikiem (woda bądź metanol).

Metody analizy

Metodą spektrofotometrii UV–VIS oznaczono całkowitą zawartość polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy (krzywa wzorcowa) w wyżej wymienionym materiale roślinnym. Krzywa wzorcowa opierała się na trzykrotnym powtórzeniu każdego punktu stężenia. Z otrzymanych wyników wykreślono krzywą $y = ax + b$, dla której wyliczono parametry oraz granicę oznaczalności (LOD) i wykrywalności (LOQ) (tab. I).

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \frac{S_b}{a} \quad \text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOQ}$$

Wykonano statystyczną ocenę wyników, która obejmowała obliczenie odchylenia standardowego, współczynnika zmienności oraz przedziału ufności ($p = 0,95$) dla trzykrotnych powtórzeń pomiaru z trzykrotnych odważek próbki materiału.

Tabela 1. Parametry krzywej wzorcowej w przeliczeniu na kwas galusowy

Table 1. Parameters of the calibration plot in terms of gallic acid

Krzywa	a	b	R ²	S _a	S _b	S _{xy}	LOD (μg/cm ³)	LOQ (μg/cm ³)
(1)	0,118	0,095	0,999	0,001	0,006	0,007	0,168	0,503
(2)	0,118	0,053	0,997	0,003	0,015	0,031	0,420	1,260
(3)	0,152	0,011	0,998	0,003	0,011	0,015	0,241	0,724

(1) – metoda F-C, (2) – metoda błękitu, (3) – metoda 1,1-fenantroliny

Metody oznaczenia

Metoda *Folin-Ciocalteu* jest metodą służącą do oznaczania całkowitej zawartości polifenoli. Związki fenolowe obecne w próbce ulegają utlenieniu natomiast sole kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego, które są składnikami odczynnika Folina ulegają redukcji w środowisku zasadowym – powstający produkt reakcji ma barwę niebieską. Metoda ta wykorzystuje zdolność polifenoli do barwnej reakcji z odczynnikiem Folina, a absorbancja mierzona przy długości fali $\lambda = 756$ nm jest proporcjonalna do całkowitej zawartości związków fenolowych w badanej próbce (11).

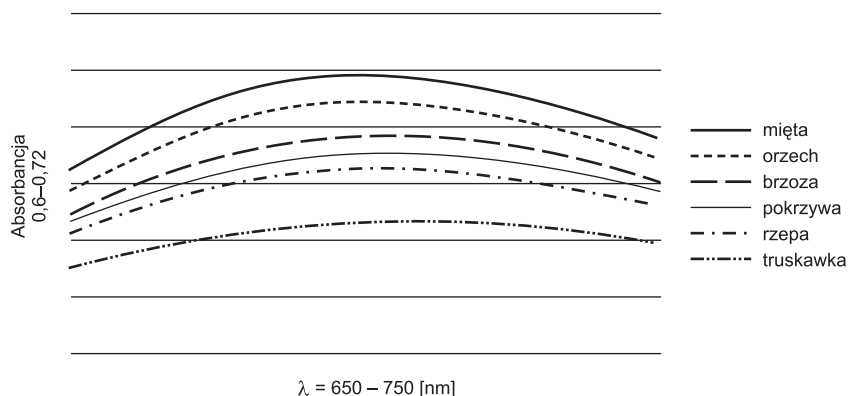
Kolejną metodą spektrofotometryczną, która umożliwia oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli, jest metoda wykorzystująca zdolność związków fenolowych do redukcji żelaza(III). Powstałe żelazo(II) reaguje z jonami Fe³⁺ wprowadzonymi w postaci roztworu FeCl₃ w wyniku czego tworzy się niebieski kompleks, który stanowi podstawę oznaczenia (12). W metodzie błękitu pruskiego pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali $\lambda = 700$ nm.

Trzecią metodą spektrofotometryczną, która pozwala na oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli jest metoda z zastosowaniem 1,10-fenantroliny. Wykorzystuje ona podobnie jak metoda błękitu pruskiego zdolność polifenoli do redukcji żelaza(III). Powstałe w reakcji żelazo(II) reaguje z 1,10 fenantroliną w wyniku czego uzyskuje się czerwony kompleks, który stanowi podstawę oznaczenia przy długości fali $\lambda = 510$ nm (13).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

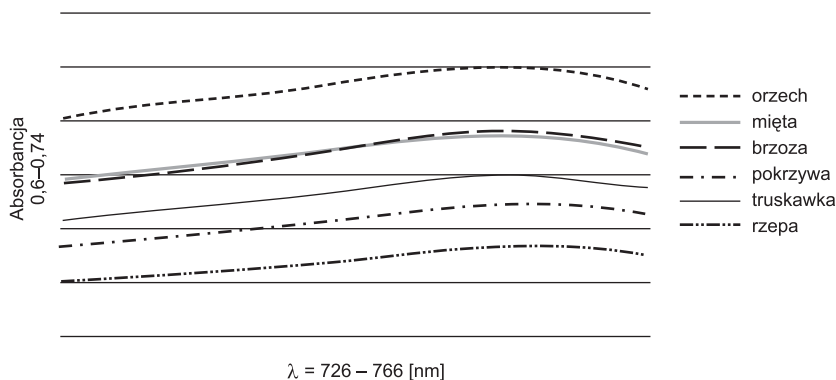
W pracy oznaczono całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach z próbek: liście orzecha włoskiego, liście brzozy, pokrzywy, mięty, truskawki, czarnej rzepy, jak również porównanie uzyskanych wyników w zależności od zastosowanej metody spektrofotometrycznej. Zgodnie z danymi literaturowymi wydzielenie polifenoli z próbek odbywa się w procesie ekstrakcji. Spotyka się ekstrakcje przeprowadzane za pomocą wrzącej wody lub wrzącego metanolu, dlatego w pracy zbadano również czy na ostateczny wynik ma wpływ dobór metody ekstrakcji. Na ryc. 1 i 2 przedstawiono przykładowe widma absorpcyjne barwnych związków uzyskanych w reakcjach polifenoli z roztworami K₃Fe(CN)₆ i FeCl₃ (krzywa 2), a także z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu* (krzywa 1). Najmniejszą całkowitą zawartość polifeno-

li, bez względu na zastosowaną metodę spektrofotometryczną oraz rozpuszczalnik do ekstrakcji, otrzymano w próbkach pochodzących z korzenia czarnej rzepy. Wyniki zawartości polifenoli uzyskane dla naparów wodnych i metanolowych różnią się od siebie, jednak różnice te można uznać za mieszczące się w granicach błędu metody.



Ryc. 1. Widmo absorpcyjne barwnego związku powstającego w reakcji polifenoli z $K_3Fe(CN)_6$ i $FeCl_3$ w próbkach roślinnych – napary wodne.

Fig. 1. Absorption spectrum of the color product of the reaction between polyphenols and $K_3[Fe(CN)_6]$ and $FeCl_3$ in vegetation samples – aqueous infusion.



Ryc. 2. Widmo absorpcyjne barwnego związku powstającego w reakcji polifenoli z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu* w próbkach roślinnych – napary metanolowe.

Fig. 2. Absorption spectrum of the colored product of the reaction between polyphenols and *Folin-Ciocalteu* reagent in plant samples – methanolic infusion.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy uzyskaną zawartością polifenoli w próbkach, a rodzajem rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji. Dlatego zgodnie z zasadami zielonej chemii analitycznej lepiej jest stosować do ekstrakcji gorącą wodę skoro przynosi porównywalne efekty z ekstrakcją metanolową, a jest tańsza i nie toksyczna.

na. Porównując wyniki uzyskane za pomocą trzech metod możliwe jest stwierdzenie, że najwyższą całkowitą zawartość polifenoli uzyskano stosując metodę błękitu pruskiego w obu rodzajach ekstraktach (tab. II).

Tab e l a II. Zawartość polifenoli z uwzględnieniem rodzaju ekstrakcji i metody analizy

Tab l e II. Content of polyphenols vs. on type of extraction and method of analysis

Próbka	Całkowita zawartość polifenoli (mg/g)					
	Napary wodne			Napary metanolowe		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
Orzech	33,82 ± 0,03	28,90 ± 0,04	28,76 ± 0,07	37,21 ± 0,04	36,75 ± 0,10	30,02 ± 0,02
Mięta	29,85 ± 0,07	29,89 ± 0,04	27,08 ± 0,02	27,41 ± 0,03	35,28 ± 0,08	28,04 ± 0,09
Brzoza	24,96 ± 0,07	28,35 ± 0,01	25,09 ± 0,07	31,72 ± 0,03	31,45 ± 0,08	28,64 ± 0,03
Truskawka	20,26 ± 0,07	24,74 ± 0,03	21,71 ± 0,20	20,87 ± 0,13	24,28 ± 0,04	22,35 ± 0,10
Pokrzywa	17,88 ± 0,14	19,50 ± 0,01	18,10 ± 0,03	15,98 ± 0,10	21,05 ± 0,04	19,07 ± 0,09
Rzepa	15,26 ± 0,14	16,21 ± 0,02	15,54 ± 0,03	14,72 ± 0,06	16,67 ± 0,11	16,58 ± 0,10

(1) – metoda F-C, (2) – metoda błękitu, (3) – metoda 1,1-fenantroliny

Wyjątek stanowią próbki liści orzecha włoskiego, dla których metoda Folin-Ciocalteu daje wyższe wyniki.

Parametrem, który pozwolił na właściwe porównanie zastosowanych metod spektrofotometrycznych ze sobą jest molowy współczynnik absorpcji ϵ , który wynosił dla:

- metody *Folin-Ciocalteu* – $2,33 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$;
- metody błękitu pruskiego – $2,26 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$;
- metody wykorzystującej 1,10-fenantrolinę – $2,58 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$.

Metodę, uważa się za dostatecznie czułą, jeśli molowy współczynnik absorpcji jest większy niż $1 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$. Jak widać wszystkie trzy metody są metodami czułymi i nadającymi się do analizy polifenoli. Najwyższy molowy współczynnik adsorpcji uzyskano dla metody wykorzystującej 1,10-fenantrolinę i to właśnie tę metodę uznać można za najczulszą. Wszystkie uzyskane wyniki są porównywalne, skąd można wnioskować, że każda z tych metod może zostać zastosowana do oznaczania polifenoli w owocach, warzywach, ziołach oraz liściach z drzew takich, jak orzech i brzoza.

C. Pieszko, A. Zaremba

CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANT EXTRACTS

Summary

The aim of the research was the comparison of the total amount of phenolic compounds in different plant matrices: fruit – strawberries, vegetables – black turnip as well as nettle, mint, walnut and birch tree leaves. The extraction technique was optimized. Moreover, the influence of the conditions for spectrophotometric determination by the following methods: *Folin-Ciocalteu*, Prussian blue and 1,10-phenantroline was investigated. The lowest concentration of polyphenols, regardless of the spectrophotometric method

and solvent used for the extraction, was obtained in the black turnip samples. No correlation between the determined content of polyphenols in plant samples and the type of applied solvent was observed. Molar absorptivity in all spectrophotometric methods was above $1 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$, what indicates, that the each of the proposed method may be applied for the determination of phenolic compounds in plant tissue extracts. All obtained results are comparable, therefore all of the proposed procedures may be applied for determination of polyphenols in fruit, vegetables as well as walnut and birch tree leaves.

PIŚMIENNICTWO

1. Marzec A.: Chemia kosmetyków, surowce, półprodukty, preparatyka wyrobów. TNOiK DOM ORGANIZATORA, Toruń, 2009. – 2. Marzec A.: Chemia nowoczesnych kosmetyków, substancje aktywne w preparatach i zabiegach kosmetycznych. TNOiK DOM ORGANIZATORA, Toruń, 2010. – 3. Stanciu G, Chirila E., Dobrinas S., Negreanu-Pirjol T.: Studies Regarding the Determination of Antioxidant Properties of New Plant Extracts for Cosmetic Purposes. REV. CHIM. 2010; 61(1): 41-44. – 4. Mariko N., Hassimoto A., Genovese M.I., Lajolo F.M.: Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables and Commercial Frozen Fruit Pulps. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 2928-2935. – 5. Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M.: Screening of 70 medical plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry. 2006; 94: 550-557. – 6. Wojdyło A., Oszmiański J., Czerny R.: Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 2007; 105: 940-949. – 7. Grzegorzczak I., Matkowski A., Wysokińska H.: Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. Food Chemistry. 2007; 104: 536-541. – 8. Sroka Z., Żukowski P., Cisowski W.: Badanie aktywności przeciwutleniającej wyciągów uzyskanych z liści buka (*Fagi folium*) i z ziela dziurawca (*Hyperici herba*). Adv. Clin. Exp. Med. 2003; 12(3): 273-280. – 9. Maizura M., Aminah A., Wan Aida W.M.: Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. International Food Research Journal. 2011; 18: 529-534. – 10. Lin J.Y., Tang Ch.Y.: Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry. 2007; 101: 140-147.
11. Waterhouse A.L.: Determination of Total Phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. 2002; 11.1-11.1.8. – 12. Graham H.D.: Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. J. Agric. Food Chem. 1992; 40: 801-805. – 13. Hemingway R.W., Laks P.E.: Plant Polyphenols-Synthesis, Properties, Significance. Basic Life Sciences. 1991; 59: 263-265.

Adres: 44-100 Gliwice, ul. Ks. M. Strzody 7