

Analiza środowiskowa, żywności i leków

Oznaczanie związków polifenolowych w próbkach pochodzenia roślinnego i ich rola w procesie syntezy nanostruktur metalicznych

Wiadomości wstępne

Związki polifenolowe są wtórnymi metabolitami roślinnymi zawierającymi w swojej strukturze minimum jeden pierścień aromatyczny, do którego przyłączone są co najmniej dwie grupy hydroksylowe [1]. Wspomniana struktura szkieletu węglowego umożliwia podział związków polifenolowych na następujące klasy [2, 3]:

- stilbeny,
- lignany,
- flawonoidy (izoflawony, flawony, antocyjany, katechiny, flawonony, flawanole),
- chalkony,
- pochodne kwasu benzoowego,
- pochodne kwasu cynamonowego.

Związki polifenolowe są zawarte w materiale roślinnym, a ich stężenie zależy od [2]:

- gatunku rośliny,
- strefy klimatycznej w której dany gatunek rośliny wzrasta i dojrzewa,
- rodzaju gleby, z której roślina pobiera składniki mineralne.

Zgodnie z danymi przedstawionymi w Tabeli 1, wysoka zawartość związków polifenolowych w materiale roślinnym może umożliwić ich zastosowanie w procesie syntezy nanostruktur metalicznych [2, 4].

Nanocząstki metaliczne są to struktury, w których co najmniej jeden z wymiarów nie przekracza 100 nm. Ze względu na wysoki stosunek powierzchni do objętości cząstki, który jest tym większy im mniejsze są te struktury, w tego rodzaju nanomateriałach mogą pojawiać się lub intensyfikować nowe właściwości, nie występującego dla materiałów o rozmiarach makroskopowych [5]. Ze względu na doskonałe właściwości antybakteryjne w przemyśle włókienniczym i kosmetycznym są powszechnie stosowane nanocząstki srebra (AgNPs) [6].

Istnieje wiele sposobów syntezy nanostruktur metalicznych, wśród których możemy wyróżnić metody biologiczne, metody chemiczne, a także nowoczesne metody wykorzystujące zimną plazmę atmosferyczną [4, 6, 7].

W biologicznej metodzie syntezy AgNPs jony Ag(I) są redukowane do metalicznego Ag o rozmiarze nanometrycznym za pomocą substancji o charakterze redukującym (m.in. związków polifenolowych), zawartych w materiale roślinnym [6]. Związki polifenolowe pełnią w procesie syntezy AgNPs również funkcję stabilizatorów, przeciwdziałając agregacji i sedimentacji syntetyzowanych nanostruktur Ag [4, 7].

Istnieje wiele technik umożliwiających określenie właściwości optycznych i granulometrycznych AgNPs. Pierwszym potwierdzeniem syntezy AgNPs jest wizualna zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej po dodaniu substancji o właściwościach redukujących na żółtą, charakterystyczną dla zawiesin AgNPs [4]. **Właściwości optyczne** AgNPs są wyznaczane na podstawie położenia maksimum absorpcji pasma zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (LSPR) występującego w widmie absorpcyjnym UV/Vis i charakterystycznego dla nanostruktur Ag w zakresie 420

- 440 nm [6]. Z kolei **określenie morfologii** (rozmiar, kształt) AgNPs jest możliwe dzięki zastosowaniu techniki skaningowej lub/i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (SEM lub/i TEM), zależnej od rozmiaru wytworzonych AgNPs.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości związków polifenolowych w wodnych roztworach ekstraktów roślinnych oraz w mieszaninie reakcyjnej zawierającej zsyntetyzowane z zastosowaniem przygotowanych wodnych roztworach ekstraktów roślinnych AgNPs.

Tabela 1. Zawartość związków polifenolowych w wybranych owocach, warzywach oraz sokach owocowych [2].

Związki polifenolowe	Materiał roślinny	Zawartość związków polifenolowych w mg/kg świeżego materiału roślinnego lub w mg/dm ³ soku
antocyjany	borówki	250-5000
	jagoda	1000-4000
	czarna porzeczka	1300-4000
	czerwony grejpfrut	300-7500
	rabarbar	2000
	truskawka	150-750
flawonony	śliwka	20-250
	sok pomarańczowy	215-685
	sok cytrynowy	50-300
flawony	pietruszka	240-1850
flawanole	jarmuż	300-600
	por	30-225
	brokuły	40-100
	jabłko	20-40
pochodne kwasu cynamonowego	kiwi	600-1000
	bakłażan	600-660
pochodne kwasu benzoowego	jabłko	50-600
	jagoda	80-270
	maliny	60-100

Zasada oznaczania związków polifenolowych metodą spektroskopową z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu*'a

Jedną z metod umożliwiających oznaczenie całkowitej zawartości związków polifenolowych w analizowanym materiale roślinnym jest metoda spektroskopowa z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu*'a. Metoda ta jest związana ze zdolnością związków polifenolowych do reakcji z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu*'a, w wyniku której w środowisku zasadowym tworzy się związek kompleksowy.

Sprzęt i odczynniki (dla grupy 4-osobowej)

- waga analityczna
- spektrofotometr absorpcyjny UV/Vis
- łaźnia wodna

- 2 zlewki o objętości 250 cm³
- 3 zlewki o objętości 150 cm³
- 3 zlewki o objętości 25 cm³
- 7 kolb miarowych o objętości 25,00 cm³
- 7 kolb miarowych o objętości 10,00 cm³
- lejek szklany z sączkiem z bibuły filtracyjnej (miękki)
- 2 pipety wielomiarowe o objętości 100 do 1000 µL oraz 500 do 5000 uL
- pipety jednomiarowe o objętości 1,00; 5, 00; 10,00 oraz 20,00 cm³
- 100,00 cm³ roztworu podstawowego AgNO₃ o stężeniu 1000 mg/dm³ jonów Ag(I)
- 100,00 cm³ odczynnika *Folina-Ciocalteu'a*
- 200,00 cm³ roztworu węgla sodu o stężeniu 7,5%
- 100,00 cm³ roztworu wodno-etanolowego kwasu galusowego o stężeniu 600 mg/dm³ w 10 cm³ etanolu
- tryskawka
- bagietki
- miękkie sączki
- lód
- pojemnik na lód
- moździerz, pistel

Wykonanie oznaczenia

a) Przygotowanie wodnych roztworów ekstraktów roślinnych

Otrzymany wysuszony materiał roślinny rozdrobnić w moździerzu za pomocą pistla. Następnie, na wadze analitycznej odważyć około 4 g (z dokładnością do 0,0001 g) rozdrobnionego materiału roślinnego i przesypać do zlewki o objętości 250 cm³. Za pomocą pipety miarowej odmierzyć do zlewki zawierającej naważkę wysuszonego materiału roślinnego 100,00 cm³ wody destylowanej (4*25,00 cm³). Zlewkę ustawić na płytce metalowej nad powierzchnią palnika i doprowadzić do zagotowania, po czym utrzymywać w stanie lekkiego wrzenia przez 15 min. Po tym czasie zlewkę odstawić do ostygnięcia. Kolejną zawartość zlewki należy przesączyć przez lejek z miękkim sączkiem, tak aby oddzielić materiał roślinny od uzyskanego wodnego roztworu ekstraktu roślinnego. Przesącz zebrać do zlewki o pojemności 250 cm³. Otrzymany wodny roztwór ekstraktu roślinnego należy rozcieńczyć, tak aby uzyskać po 50 cm³ wodnego roztworu ekstraktu roślinnego o stężeniach: 0,50%; 1,0% oraz 2,0%.

b) Synteza nanostruktur Ag z zastosowaniem wodnych roztworów ekstraktów roślinnych

W celu syntezy AgNPs do 3 zlewek o objętości 25 cm³ należy kolejno pobrać po 10,00 cm³ odpowiedniego wodnego roztworu ekstraktu roślinnego (0,50%; 1,0% lub 2,0%), o temperaturze pokojowej (15-25°C). Następnie, dodać taką objętość roztworu podstawowego AgNO₃, w którym c jonów Ag(I) wynosi 1000 mg/dm³, tak aby stężenie jonów Ag(I) w końcowej objętości wynosiło 200 mg/dm³.

c) Wykonanie krzywej wzorcowej dla roztworu wzorca – kwasu galusowego

Do kolb miarowych o objętości 25,00 cm³ odmierzyć odpowiednią ilość roztworu podstawowego kwasu galusowego w etanolu o stężeniu 600 mg/dm³, tak aby jego stężenie końcowe wynosiło odpowiednio 0,0; 30,0; 60,0; 80 oraz 100,0 mg/dm³. Dopełnić wodą destylowaną do kreski/ Następnie przygotować próbki do pomiaru, poprzez pobranie po 0,500 cm³ odpowiedniego roztworu wzorcowego, dodanie 2,5 cm³ 10-krotnie rozcieńzonego odczynnika *Follina-Ciocalteu* i 2,0 cm³ 7,5% roztworu węgla sodu. Wymieszać. Ponadto należy również przygotować tzw. ślepą próbę - roztwór niezawierający kwasu galusowego. Przygotowane roztwory ogrzewać przez 15 min w łaźni wodnej o temperaturze 50°C, a następnie ochładzać je w łaźni lodowej przez 5 min. Następnie, maksymalnie po upływie 8 minut od zakończenia ochładzania, zmierzyć absorbancję analizowanych mieszanin reakcyjnych przy długości fali 765 nm. *Wykreślić krzywą wzorcową.*

d) Oznaczenie całkowitej zawartości związków polifenolowych w surowych wodnych roztworach ekstraktów roślinnych oraz w mieszaninach reakcyjnych zawierających AgNPs metodą spektroskopową

Aby oznaczyć całkowitą zawartość związków polifenolowych w analizowanych wodnych roztworach ekstraktów roślinnych, do plastikowego pojemnika należy odmierzyć odmierzyć 0,50 cm³ analizowanego wodnego roztworu ekstraktu roślinnego, 2,50 cm³ 10-krotnie rozcieńzonego roztworu odczynnika *Folina-Ciocalteu'a* oraz 2,00 cm³ roztworu Na₂CO₃ o stężeniu 7,5% (3 próbki tj. dla: 0,5;1,0; 2,0% wodnego roztworu ekstraktu roślinnego). W celu określenia ilości związków polifenolowych biorących udział w procesie redukcji jonów Ag(I) do AgNPs, należy do plastikowego pojemnika odmierzyć 0,50 cm³ analizowanego wodnego roztworu ekstraktu roślinnego zawierającego Ag(I) w stężeniu 200 mg/dm³, po czym dodać 2,50 cm³ 10-krotnie rozcieńzonego roztworu odczynnika *Folina-Ciocalteu'a* oraz 2,00 cm³ roztworu Na₂CO₃ o stężeniu 7,5% (3 próbki tj. dla: 0,5;1,0; 2,0% wodnego roztworu ekstraktu roślinnego wraz z 200 mg/dm³ jonów Ag(I)). Przygotowane próbki należy ogrzewać przez 15 min w łaźni wodnej o temperaturze 40°C, a następnie ochładzać je w łaźni lodowej przez 5 min. Następnie, maksymalnie po upływie 8 minut od zakończenia ochładzania, zmierzyć absorbancję analizowanych mieszanin reakcyjnych przy długości fali 765 nm. Jako odnośnik stosować roztwór ślepej próby.

Na podstawie wykreślonej krzywej wzorcowej określić całkowitą zawartość związków polifenolowych zarówno w surowych wodnych roztworach ekstraktów roślinnych, jak również w mieszaninach reakcyjnych zawierających zsyntetyzowane AgNPs. Wyniki podać w mg/g próbki w przeliczeniu na kwas galusowy.

Sprawozdanie:

- data, tytuł oraz cel wykonywanego ćwiczenia
- wprowadzenie teoretyczne
- krótki opis wykonywanego oznaczenia
- wyniki całkowitej zawartości związków polifenolowych zarówno w surowych wodnych roztworach ekstraktów roślinnych, jak również w mieszaninach reakcyjnych

zawierających zsyntetyzowane AgNPs. Wyniki podać w mg/g próbki w przeliczeniu na kwas galusowy.

- porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi

- wnioski

Literatura:

[1] M. Mężyńska, M. Brzóska. Związki polifenolowe w leczeniu i profilaktyce wybranych chorób cywilizacyjnych - dowody z badań epidemiologicznych. *Polski Przegląd Nauk o Zdrowiu* **2016**, 3, 269-276.

[2] H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle. *Food Chemistry* **1999**, doi: 10.1007/978-3-540-69934-7.

[3] E. Gheribi. Związki polifenolowe w owocach i warzywach. *Medycyna Rodzinna* **2011**, 14, 111-115.

[4] A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, G diCenzo, I. Sergiel, T. Kozlecki, P. Pohl. Preparation and characterization of gold nanoparticles prepared with aqueous extracts of *Lamiaceae* plants and the effect of follow up treatment with atmospheric pressure glow microdischarge. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, doi: 10.1016/j.arabjc.2016.04.004.

[5] A. Dzimitrowicz, P. Jamróz, P. Nowak. Synteza nanocząstek złota za pomocą mikroplazmy pod ciśnieniem atmosferycznym. *Inżynieria materiałowa* **2015**, 1, 9-14.

[6] I. Maliszewska, Z. Sadowski, A. Skłodowska, A. Leśkiewicz-Laudy. Wykorzystanie metod biotechnologicznych do otrzymywania nanocząstek metali. *Polimery* **2011**, 56, 140-145.

[7] A. Dzimitrowicz, S. Berent, A. Motyka, P. Jamroz, K. Kurcbach, W. Sledz, P. Pohl. Comparison of the characteristics of gold nanoparticles synthesized using aqueous plant extracts and natural plant essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, doi: 10.1016/j.arabjc.2016.09.007.