

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u uzorcima algi

Žanko, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:598369>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH
FENOLA U UZORCIMA ALGI

ZAVRŠNI RAD

TEA ŽANKO

MATIČNI BROJ: 1350

Split, listopad 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U
UZORCIMA ALGI

ZAVRŠNI RAD

TEA ŽANKO

MATIČNI BROJ: 1350

Split, listopad 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
CHEMICAL ENGINEERING

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TOTAL PHENOLICS IN
SEAWEEDS

BACHELOR THESIS

TEA ŽANKO

Parent number: 1350

Split, October 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Prediplomski studij Kemijско inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Kemija hrane

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U UZORCIMA ALGI

Tea Žanko, 1350

Sažetak:

Alge su važan izvor različitih bioaktivnih spojeva, stoga su od iznimne važnosti otkrića i razvoj novih analitičkih metoda i tehnika za proučavanje njihovih metabolita. Osobitu pozornost znanstvenika privukli su fenoli smeđih algi koji su karakteristični samo za te organizme, a nazivaju se florotanini. Cilj ovog završnog rada je bio postaviti metodu određivanja ukupnih fenola na dva uređaja; klasičnom UV-VIS spektrofotometru i mikrotitarskom čitaču ploča. Kod postavljanja metode korištene su dvije otopine standarda, galna kiselina i floriglucinol. Galna kiselina je općenito najkorišteniji standard za izradu baždarnih pravaca i izražavanje rezultata određivanja fenola u različitim uzorcima (biljke, plodovi, sokovi, prerađevine, itd.), dok je floriglucinol osnovna građevna jedinica florotanina. Obzirom da se rezultati određivanja sadržaja fenola u algama u znanstvenim studijama izražavaju preko oba spoja, postavljanje metode određivanja ukupnih fenola korištenjem oba standarda može olakšati njihovu međusobnu usporedbu.

Ključne riječi: ukupni fenoli, mikrotitarski čitač ploča, spektrofotometar, galna kiselina, floriglucinol

Rad sadrži: 23 stranice, 15 slika, 4 tablice, 18 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza- predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek- član
3. Prof. dr. sc. Ladislav Vrsalović- član

Datum obrane: 30.10.2020

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjenu Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28.

Mentor: Assist. Prof Ivana Generalić Mekinić, Ph. D.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TOTAL PHENOLICS IN SEAWEEDS

Tea Žanko, 1350

Abstract:

Seaweeds are an important source of various bioactive compounds, so discovery and development of new analytical methods and techniques for the study of their metabolites are extremely important. Special attention has been drawn to the brown algae phenolics, which are unique to these organisms and are called phlorotanins. The aim of this bachelor thesis was to set up a method for the determination of total phenolics using two devices; classic UV-VIS spectrophotometer and microtiter plate reader. Two standard solutions, gallic acid and phloroglucinol, were used in setting up the method. Gallic acid is generally the most widely used standard for creation of calibration curves and determination of phenols in various samples (plants, fruits, juices, processed products, etc.), while phloroglucinol is the basic building unit of phlorotanins. Since in the scientific literature the phenolic content of seaweed samples is expressed using both standards, setting up a method for determining total phenols using both standards can provide easier comparison of the results.

Keywords: total phenols, microtiter plate reader, spectrophotometer, gallic acid, phloroglucinol

Thesis contains: 23 pages, 15 figures, 4 tables, 18 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assist. Prof. Danijela Skroza – Ph. D. - chairperson
2. Assist. Prof. Mario Nikola Mužek- Ph. D. - member
3. Full Prof. Ladislav Vrsalović – Ph. D. - member

Defence date: 30.10.2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,
Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić
Mekinić u razdoblju od siječnja do listopada 2020.godine.*

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na ukazanom povjerenju, strpljenju u radu sa mnom, pomoći te vodstvu pri izradi ovoga rada.

Također, jedno veliko hvala mojim roditeljima i obitelji, kao i prijateljima na nesebičnoj podršci tijekom školovanja.

ZADATAK

Zadatak ovog završnog rada je bio postaviti metodu određivanja ukupnih fenola u uzorcima algi na dva uređaja; klasičnom UV-VIS spektrofotometru i mikrotitarskom čitaču ploča, korištenjem dvaju standarda.

SAŽETAK

Alge su važan izvor različitih bioaktivnih spojeva, stoga su od iznimne važnosti otkrića i razvoj novih analitičkih metoda i tehnika za proučavanje njihovih metabolita. Osobitu pozornost znanstvenika privukli su fenoli smeđih algi koji su karakteristični samo za te organizme, a nazivaju se florotanini. Cilj ovog završnog rada je bio postaviti metodu određivanja ukupnih fenola na dva uređaja; klasičnom UV-VIS spektrofotometru i mikrotitarskom čitaču ploča. Kod postavljanja metode korištene su dvije otopine standarda, galna kiselina i floroglucinol. Galna kiselina je općenito najkorišteniji standard za izradu baždarnih pravaca i izražavanje rezultata određivanja fenola u različitim uzorcima (biljke, plodovi, sokovi, preradevine, itd.), dok je floroglucinol osnovna građevna jedinica florotanina. Obzirom da se rezultati određivanja sadržaja fenola u algama u znanstvenim studijama izražavaju preko oba spoja, postavljanje metode određivanja ukupnih fenola korištenjem oba standarda može olakšati njihovu međusobnu usporedbu.

Ključne riječi: ukupni fenoli, mikrotitarski čitač ploča, spektrofotometar, galna kiselina, floroglucinol

SUMMARY

Seaweeds are an important source of various bioactive compounds, so discovery and development of new analytical methods and techniques for the study of their metabolites are extremely important. Special attention has been drawn to the brown algae phenolics, which are unique to these organisms and are called phlorotanins. The aim of this bachelor thesis was to set up a method for the determination of total phenolics using two devices; classic UV-VIS spectrophotometer and microtiter plate reader. Two standard solutions, gallic acid and phloroglucinol, were used in setting up the method. Gallic acid is generally the most widely used standard for creation of calibration curves and determination of phenols in various samples (plants, fruits, juices, processed products, etc.), while phloroglucinol is the basic building unit of phlorotanins. Since in the scientific literature the phenolic content of seaweed samples is expressed using both standards, setting up a method for determining total phenols using both standards can provide easier comparison of the results.

Keywords: total phenols, microtiter plate reader, spectrophotometer, gallic acid, phloroglucinol

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Spektrofotometrija	2
1.1.1. UV-VIS spektrofotometrija.....	2
1.1.2. Spektrofotometar.....	3
1.1.3. Beerov zakon.....	4
1.2. Fenolni spojevi	8
1.2.1. Klasifikacija fenolnih spojeva.....	9
1.2.2. Fenolni spojevi u algama.....	11
1.2.3. Određivanje ukupnih fenola.....	12
2. EKSPERIMENTALNI DIO	13
2.1. Metoda određivanje ukupnih fenola.....	13
3. REZULTATI I RASPRAVA	15
4. ZAKLJUČAK	21
5. LITERATURA	22

UVOD

U posljednjem desetljeću morski ekosustav privukao je pozornost istraživača diljem svijeta, osobito organizmi koji posjeduju ili proizvode spojeve visoke biološke aktivnosti. Posebno zanimljivima se smatraju alge, heterogena skupina fotosintetskih organizama često izložena nepovoljnim uvjetima okoliša koji na njih ne ostavljaju posljedice, što implicira na njihovu sposobnost stvaranja ili posjedovanje različitih zaštitnih metabolita. Od osobitog značaja među fitokemikalijama u algama se smatraju fenolni spojevi, jedna od najvećih i najrasprostranjenijih grupa sekundarnih metabolita, koji su važni zbog velike farmakološke aktivnosti i niza blagotvornih učinaka od kojih je najpoznatije njihovo antioksidacijsko djelovanje.

Zbog složenosti i raznolikosti fenola te razlika u njihovoj reaktivnosti prema reagensima koji se koriste za njihovo određivanje, vrlo je teško pronaći odgovarajući standard za njihovu kvantifikaciju. Za to se najčešće koriste galna kiselina (engl. *Galic acid equivalents*, GAE), floroglucinol (engl. *PhloroGlucinol Equivalents*, PGE), pirokatehol (engl. *PhloroCatechol Equivalents*, PCE) i katehin (engl. *Catechin Equivalents*, CE).

U ovom radu za određivanje fenola je korištena Folin Ciocalteu metoda na koju su testirana upravo dva najkorištenija standarda; galna kiselina i floroglucinol, dok su za postavljanje metode korištena i dva različita uređaja: klasični UV-VIS spektrofotometar i mikrotitarski čitač ploča.

1. OPĆI DIO

1.1. SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrija je instrumentalna metoda koja služi za proučavanje atomske i molekulske strukture spojeva. Temelji se na interakciji uzorka s elektromagnetskim zračenjem, pri čemu ispitivani uzorak apsorbira ili emitira točno određenu količinu zračenja koja se potom mjeri i interpretira. Apsorpcijska spektroskopija temelji se na ultraljubičastom (UV) i vidljivom zračenju (VIS) te predstavlja najpopularniju tehniku u kvantitativnoj kemijskoj analizi zbog svoje točnosti, selektivnosti, jednostavnosti, široke primjenjivosti, velike osjetljivosti i brzine izvođenja. (1,2)

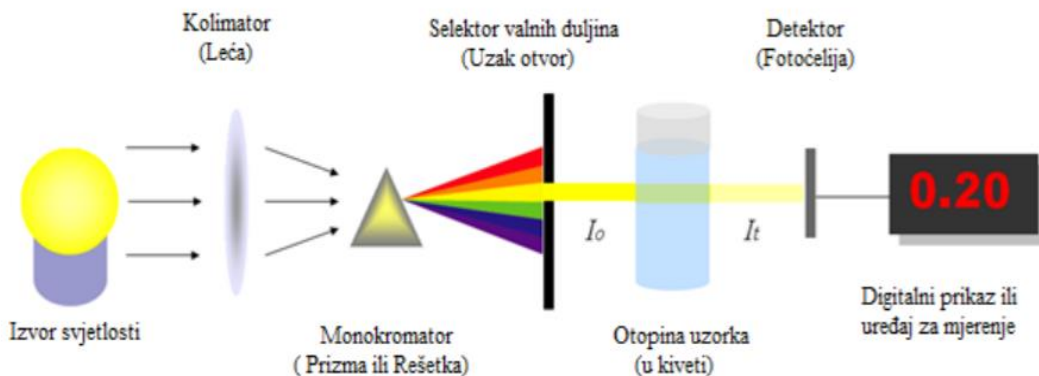
1.1.1. UV-VIS spektrofotometrija

UV-VIS spektrofotometrija je tehnika kojom se određuje koncentracija uzorka mjereći intenzitet zračenja kojeg je ispitivani uzorak apsorbirao. U osnovi, tu se radi o energijama koje uzrokuju određeni elektronski prijelaz s obzirom na vrste veza u molekulama uzorka. Navedene energije zapravo predstavljaju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje koje uzrokuje prijelaz elektrona popunjene orbitale manje energije u nepopunjenu orbitalu više energije. (3)

Spektralni raspon za UV-VIS područje je približno 190–900 nm (4), a korist UV-VIS spektroskopije za kvantitativna mjerenja proizlazi iz linearnog odnosa između apsorbancije i koncentracije apsorbirajuće tvari. (2) Obzirom da brojni organski i anorganski spojevi apsorbiraju UV-VIS zračenje, upravo se oni korištenjem UV-VIS spektroskopije mogu na jednostavan način kvantitativno i odrediti. (5)

1.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je instrument koji mjeri apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Princip određivanja se temelji na tome da zraka svjetlosti prolazi kroz otopinu uzorka te se jedan dio zrake apsorbira od strane uzorka (molekula), dok se drugi dio zrake propušta. Spektrofotometar mjeri propušteno tj. neapsorbirano zračenje, odnosno točnije, uspoređuje intenzitet ulaznog svjetla i svjetla koje je prošlo kroz uzorak. (3) Obzirom na postojanje linearnog odnosa između apsorbancije i koncentracije apsorbirajuće tvari, spektrofotometrom se može odrediti i koncentracija poznate kemijske tvari mjerenjem intenziteta detektirane svjetlosti.



Slika 1. Shematski prikaz osnovne strukture spektrofotometra (3)

Glavni dijelovi spektrofotometra su (6):

a) Izvor svjetlosti

Žarulja koja daje svjetlost bijele boje podjednagog intenziteta za cjelokupno područje valnih duljina. Kao izvor UV-VIS zračenja najčešće se koriste deuterijeva i halogena žarulja.

b) Monokromator (dispersion element)

Za razdvajanje svjetlosti prema valnim duljinama koristi se prizma ili optička rešetka.

c) Spremnik za uzorke

Tekući uzorci stavljaju se u kivete koje su obično debljine od jednog centimetra. Kao referentni uzorak se uglavnom koristi čisto otapalo (obično voda). Kivete koje se koriste za referentni uzorak moraju odgovarati materijalom i dimenzijama kivetama u kojima se nalaze ispitivani uzorci.

Razlikuju se jednosnopni i dvosnopni spektrofotometri. Oni jednosnopni prvo mjere intenzitet zračenja kroz referentni uzorak, a nakon toga intenzitet zračenja propuštenog kroz uzorak koji se određuje, dok se kod dvosnopnog spektrofotometra zrake monokromatskog zračenja razdvajaju u dva snopa od kojih jedan prolazi kroz referentni uzorak, a drugi kroz uzorak koji se određuje.

d) Detektor zračenja i pretvornik

Ovaj dio spektrofotometra sastoji se od fotoćelije koja predstavlja senzor. Fotoćelija, proporcionalno intenzitetu zračenja, daje električni signal koji se potom preračunava u apsorbanciju.

e) Procesor signala i uređaj za njegovo očitavanje

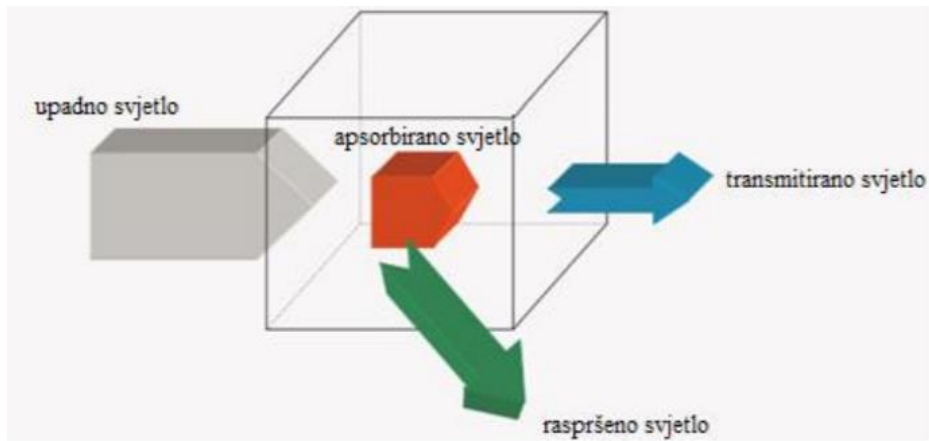
Naprava koja pojačava električni signal iz detektora predstavlja sami procesor signala, dok monitor računala predstavlja uređaj za njegovo očitavanje.

1.1.3. Beerov zakon

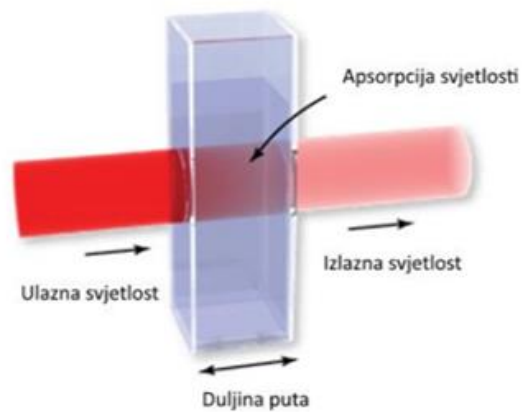
Snop svjetlosti usmjeren kroz uzorak, može biti transmitiran, apsorbiran ili raspršen. Apsorbirano svjetlo je energija svjetla apsorbirana u volumenu uzorka, transmitirano svjetlo ima isti smjer prolaza kroz uzorak kao i upadni snop svjetla, dok raspršeno svjetlo prolazi u drugom smjeru s obzirom na ulazno svjetlo. (3)

Kod UV-VIS spektroskopije mjerenja se izvode pomoću transmitancije T koja predstavlja mjeru količine neapsorbiranog zračenja. To je zapravo omjer intenziteta propuštenog zračenja kroz uzorak (I) i intenziteta ulaznog zračenja (I_0) iz čega proizlazi jednačica:

$$T = I / I_0$$



Slika 2. Shematski prikaz apsorpcije, transmisije i raspršenja svjetla (3)



Slika 3. Smanjenje intenziteta ulaznog zračenja prolazom kroz uzorak kao rezultat apsorpcije elektromagnetskog zračenja (3)

Transmitancija ovisi eksponencijalno o koncentraciji pa kako bi se funkcija koncentracije prikazala linearno koristi se apsorpcija (A). (6)

Apsorbancija predstavlja mjeru količine apsorbiranog zračenja i obrnuto je proporcionalna transmitanciji tj. raste kako se povećava prigušenje zrake.

Definira se jednadžbom:

$$A = \log (1/T) = \log (I_0/I) = \varepsilon \times b \times c$$

gdje je:

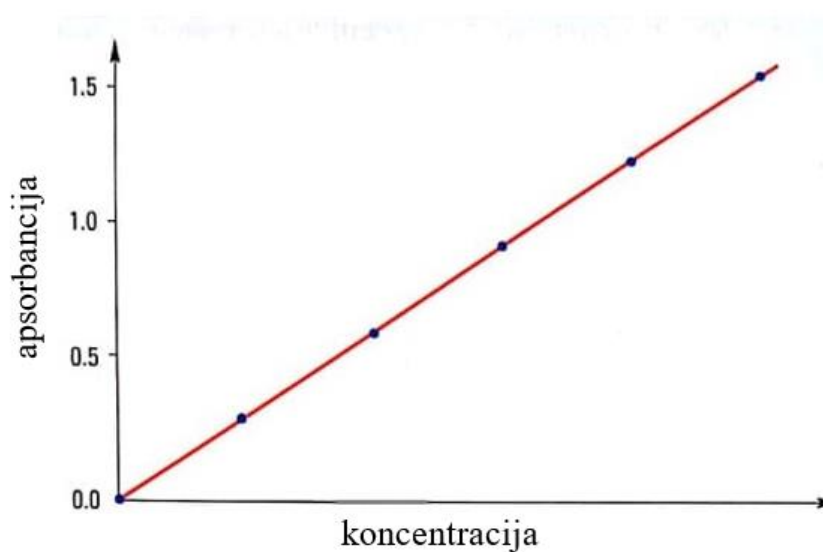
ε - molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$),

b - duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm),

c - koncentracija otopljene tvari u otopini.

Ovaj izraz je poznat kao **Lambert-Beerov**, ili kraće samo **Beerov zakon**.

Apsorpcijski ili ekstinkcijski koeficijent (ε) je karakteristika neke tvari pod točno određenim uvjetima kao što su valna duljina, otapalo i temperatura, a ovisi i o karakteristikama korištenog uređaja. U kvantitativnoj analizi se upravo zato ne koristi ovaj parametar, već se koriste baždarni (kalibracijski) pravci izrađeni testiranjem otopina standarda poznatih koncentracija. (7)



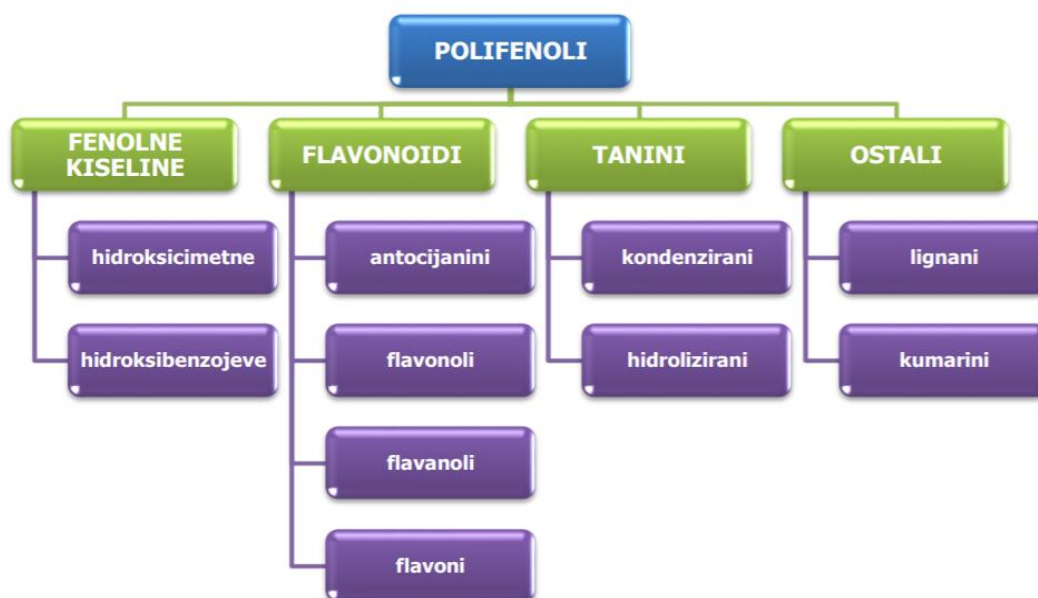
Slika 4. Beerov zakon (ovisnost apsorbanije o koncentraciji) (7)

Lambert-Beerov zakon, odnosno zakon apsorpcije kvantitativno pokazuje ovisnost apsorpcije o koncentraciji. Prilikom prolaza zračenja kroz medij u kojem se ispitivani analit nalazi, smanjuje se intenzitet elektromagnetskog zračenja zbog prijelaza analita u pobuđeno stanje.

Mjerenja apsorpcije uglavnom se izvode na valnoj duljini koja odgovara nekom apsorpcijskom maksimumu, jer je promjena apsorpcije po jedinici koncentracije u toj točki najveća. Apsorpcijska krivulja je relativno ravna u maksimumu, što omogućuje dobru linearnost i manju mogućnost pogreške ako se ne postigne točna valna duljina na instrumentu. Apsorpcijski spektri u UV-VIS području koriste se i za određivanje prisutnosti pojedinih skupina u spoju, u nekim slučajevima može se ustanoviti identitet spoja kao cjeline. (5)

1.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su jedna od najznačajnijih i najbrojnijih te široko rasprostranjenih skupina sekundarnih biljnih metabolita uključenih u mnoge metaboličke procese. (8,9) Strukturno, fenole čini aromatski prsten koji na sebi sadrži jednu ili više hidroksilnih (-OH) skupina. Ukupno je do danas pronađeno i istraženo preko 8000 različitih fenolnih spojeva koji se dijele na jednostavne spojeve (fenolne kiseline, flavonoidi) i visokopolimerizirane spojeve (lignini, tanini). U prirodi ih se rijetko pronalazi slobodne te se najčešće javljaju kao konjugati s mono- i polisaharidima, povezani s jednom ili više fenolnih skupina, a pojavljuju se i kao esteri i metilni esteri. (8)



Slika 5. Osnovna podjela polifenola (2)

U biljkama gdje ih se primarno može naći djeluju antimikrobno i štite od UV zračenja, daju boju cvjetovima te na taj način pridonose oprašivanju dok fenoli lišća pospješuju fiziološko preživljavanje biljaka štiteći je od gljivičnih infekcija i zračenja. Uključeni su i u disanje, proces fotosinteze, spolno određivanje i prijenos energije. Osim toga fenoli utječu na boju, okus i miris hrane te joj daju stabilnost, dok konzumacija hrane koja obiluje ovim spojevima pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje i štiti organizam od brojnih oboljenja. (9)

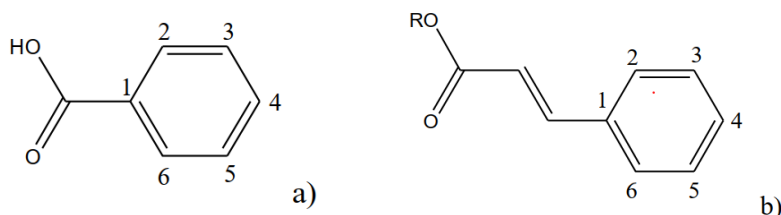
Fenolnim spojevima prepisuju se mnoga pozitivna djelovanja na organizam od kojih je najznačajnije antioksidacijsko, antialergijsko, antibakterijsko, antikancerogeno, antimutageno, antiviralno i protuupalno djelovanje. (10)

1.2.1. Klasifikacija fenolnih spojeva

Heterogena skupina fenolnih spojeva dijeli se na složene spojeve (polifenole) koji imaju dvije i više povezanih fenolnih podjedinica te jednostavne spojeve (monofenole) koji sadrže samo jednu fenolnu jezgru.

1. Fenolne kiseline

Dijele se u dvije skupine: derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline (slika 6).

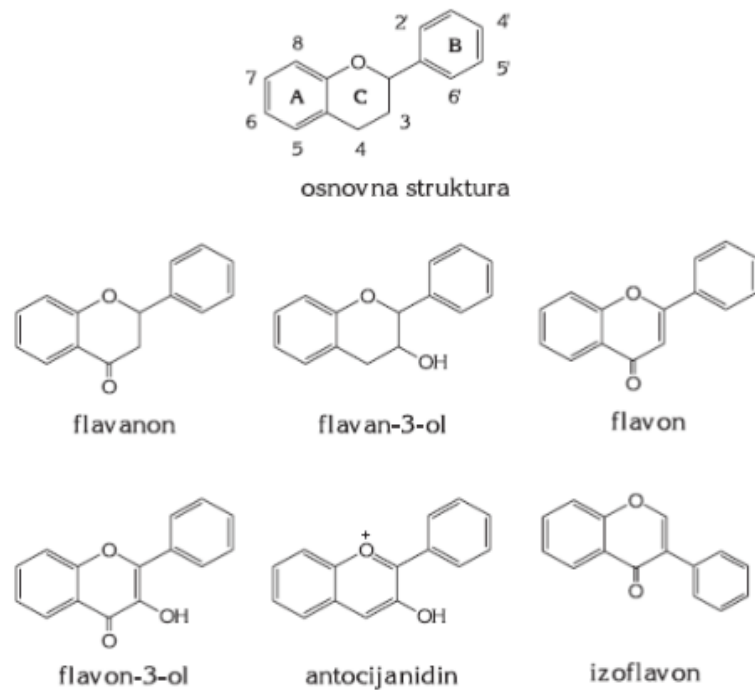


Slika 6. Osnovna struktura: a) derivat hidroksibenzojeve kiseline b) derivat hidroksicimetne kiseline (11)

2. Flavonoidi

Flavonoidi su grupa polifenolnih spojeva, rasprostranjeni u cijelom biljnom svijetu. Koncentrirane ih se može naći u kori drveća i voća, listu, cvijetu, sjemenkama, orašastim plodovima, čaju te vinu (11). Do danas identificirano je preko 6400 flavonoida.

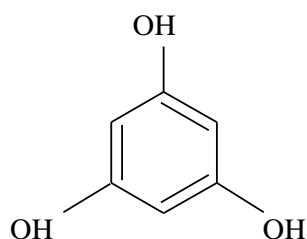
Najraširenija skupina flavonoida je ona čija se osnovna struktura sastoji od C15 (C6-C3-C6) flavonskog kostura, odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (slika 7). (12)



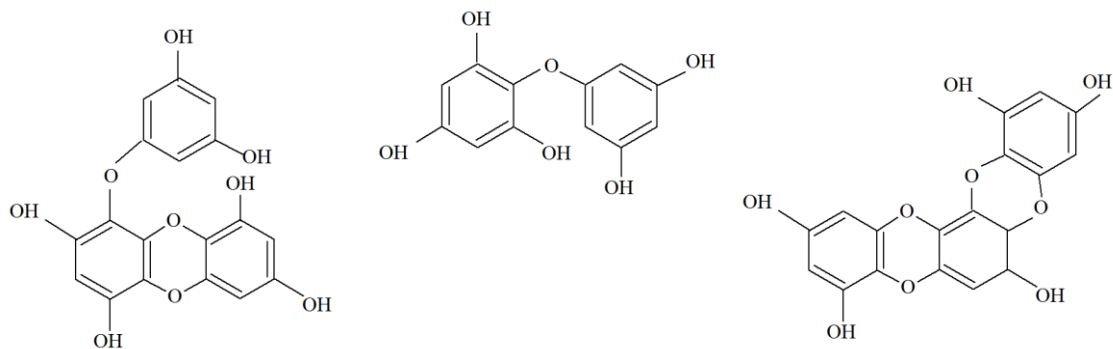
Slika 7. Prikaz osnovne strukture flavonoida i podskupina (12)

1.2.2. Fenolni spojevi u algama

Polifenoli u algama čine važnu i raznovrsnu skupinu sekundarnih metabolita. Najviše su zastupljene fenolne kiseline kao najjednostavniji fenoli, zatim flavonoidi te izrazito kompleksni spojevi naziva florotanini. Florotanini su podskupina tanina dobivena polimerizacijom floroglucinolnih jedinica (1,3,5-trihidroksibenzena). Njihov sadržaj u različitim vrstama algi može varirati od 1 do 14%, a najveća koncentracija ovih spojeva je pronađena u smeđim algama. Florotanini u algama mogu biti topljivi (slobodni u citoplazmi ili pojedinim staničnim organelama) ili mogu biti u vezanom obliku za stanične stijenke što je karakteristična forma za većinu tanina. Florotanini su heterogena i visokomolekulska skupina spojeva od iznimne važnosti za alge u svakom stupnju njihova razvoja, a također su im dokazane važne biološke aktivnosti kao što su antioksidacijska, antialergijska, protuupalna, antibiotska i antidijabetička aktivnost. Obzirom na prirodu i oblik veza između floroglucinolnih jedinica koje čine florotanine te broj i raspored hidroksilnih skupina u molekulama, florotanini se dijele u četiri osnovne podskupine; floretole i fuhalole, fukole, fukofloretole i ekole. (13,14)



Slika 8. Prikaz osnovne strukture floroglucinola (14)



Slika 9. Strukture nekih florotanina pronađenih u algama (14)

1.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Folin-Ciocalteu (FC) metoda je najpoznatija i najkorištenija kolorimetrijska metoda za određivanje ukupnih fenola. Razvili su je Folin i Ciocalteu (1927.), a temelji se na reakcijama oksidacije i redukcije tj. na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu dolazi do promjene boje iz žute u tamnoplavu. (15,16)

Reagens se pripravlja kuhanjem tijekom 10 h smjese natrijevog volframata ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g), natrij molibdata ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g), koncentrirane klorovodične kiseline (100 mL), 85% fosforne kiseline (50 mL) i vode (700 mL). Nakon ključanja smjese se doda litijev sulfat ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 150 g) kako bi se dobila intenzivno žuto obojena otopina FC reagensa. (17)

Kontaminacija reducensa dovodi do zelene boje, a dodavanje oksidansa poput broma može ponovno vratiti željenu žutu boju.

FC reagens oksidira fenolne spojeve u alkalnom mediju, nakon čega se isti reduciraju u okside. (18) Reakcija se odvija putem mehanizma prijenosa elektrona, a plavo obojeni spojevi nastali reakcijom fenolata i FC reagensa neovisni su o strukturi fenolnih spojeva, dakle isključuju mogućnost koordinacije kompleksa nastalih između metalnog središta i fenolnih spojeva.

Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski određivanjem apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm te je proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. (16) Kao standard najčešće se koristi galna kiselina i rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu ili litri uzorka.

Najveća prednost FC metode je njena jednostavnost, preciznost, ponovljivost i ekonomičnost, dok je njen najveći nedostatak nespecifičnost reagensa i moguće smetnje drugih prisutnih redukcijskih spojeva. Problem u analizi pomoću FC reagensa je taj da znanstvenici za istraživanje rezultata koriste različite spojeve kao standarde, dodatno komplicirajući usporedbe rezultata različitih studija. (14)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Metoda određivanje ukupnih fenola

Uredaji:

- Analitička vaga Mettler P1210 (Mettler-Toledo International Inc., Columbus, SAD)
- Spektrofotometar Specord 200 plus, (AnalytikJena, Jena, Njemačka)
- Čitač mikrotitarskih ploča Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SAD)

Standardi:

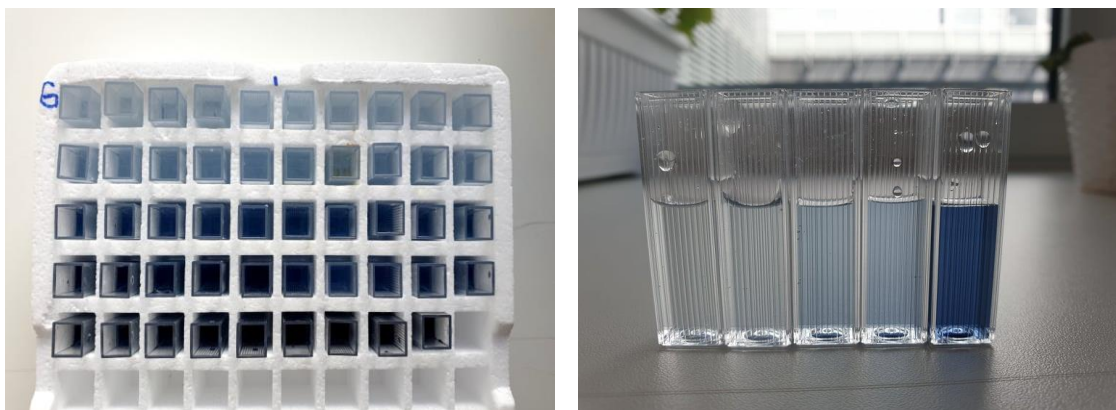
- Galna kiselina (50-1000 mg L⁻¹)
- Floroglucinol (50-1000 mg L⁻¹)

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens
- Otopina natrijeva karbonata, w (Na₂CO₃) = 20%

Postupak određivanja na spektrofotometru:

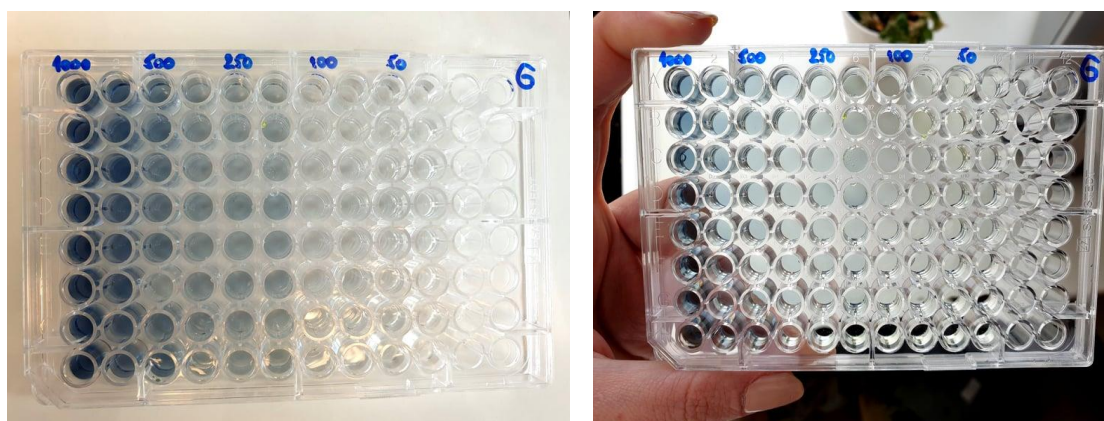
U kivetu se otpipetira 25 µL uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 125 µL Folin-Ciocalteu reagensa te se smjesi nakon 5 minuta doda 375 µL otopine natrijevog karbonata. Otopina se ostavi stajati 2 h u mraku nakon čega joj se očita apsorbancija. Rezultati sadržaja ukupnih fenola u uzorcima se izračunaju preko jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta standardnog spoja po 1 L ekstrakta (mg L⁻¹).



Slika 10. Pripravljene uzorke otopina standarda za izradu baždarnih pravaca kod određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom na spektrofotometru

Postupak za određivanja na mikrotitarskom čitaču ploča

Otpipetira se na pločicu 2,5 μL uzorka, 200 μL destilirane vode i 12,5 μL Folin-Ciocalteu reagensa te se smjesi nakon 5 minuta doda 37,5 μL otopine natrijevog karbonata. Otopine se ostave stajati 2 h u mraku nakon čega im se očita apsorbancija. Rezultati sadržaja ukupnih fenola u uzorcima se izračunaju preko jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta standardnog spoja po 1 L ekstrakta (mg L^{-1}).



Slike 11. Pripravljene uzorke otopina standarda za izradu baždarnih pravaca kod određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom na čitaču mikrotitarskih ploča

3. REZULTATI I RASPRAVA

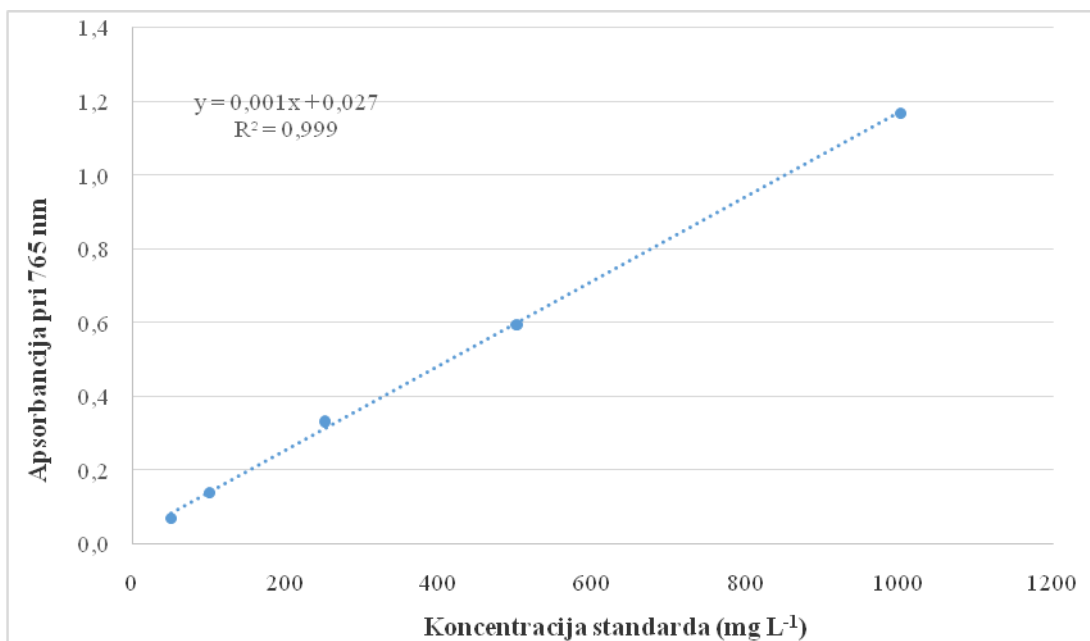
Zadatak ovog rada bio je postaviti metodu određivanja ukupnih fenola na UV-VIS spektrofotometru i mikrotitarskom čitaču ploča te su u tu svrhu korištena dva standarda koja se uobičajeno koriste za izražavanje rezultata sadržaja ukupnih fenola u uzorcima algi, a to su galna kiselina i floriglucinol.

Za testiranje pripravljene su otopine oba standarda, i galne kiseline i floriglucinola, u rasponu koncentracija od 50 do 1000 mg L⁻¹. Pripravljeno je 5 otopina standarda (koncentracija 50, 100, 250, 500 i 1000 mg L⁻¹) kako bi konstruirani baždarni pravci prolazili kroz 5 točaka (tablice 1-4). Nadalje, u svrhu kvantifikacije fenolnih spojeva preko baždarnih pravaca izvedene su jednadžbe istih.

Rezultati određivanja ukupnih fenola i konstruiranja baždarnih pravaca na klasičnom UV-VIS spektrofotometru za otopine galne kiseline prikazani su u tablicama 1 i 2 te na slikama 12 i 13, dok su rezultati određivanja na mikrotitarskom čitaču ploča prikazani su u tablicama 3 i 4 te na slikama 14 i 15.

Tablica 1. Odnos koncentracije galne kiseline i apsorbancije dobiven mjerenjem na UV-VIS spektrofotometru

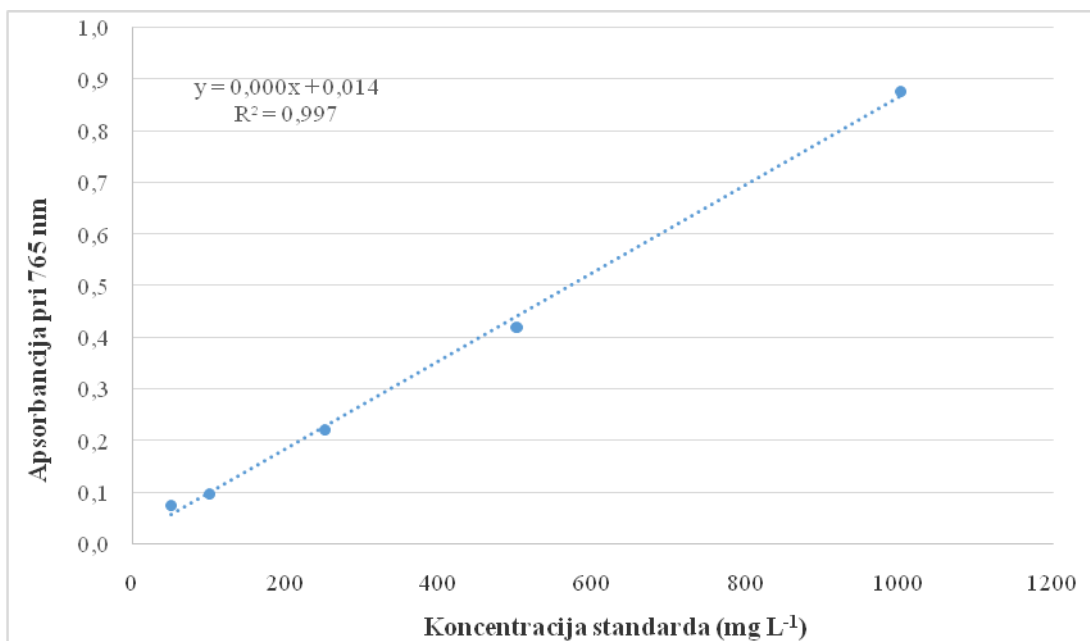
Koncentracija galne kiseline (mg L ⁻¹)	Apsorbancija (765 nm)
50	0,0716 ± 0,0024
100	0,1395 ± 0,0026
250	0,3333 ± 0,0062
500	0,5962 ± 0,0085
1000	1,1687 ± 0,0589



Slika 12. Baždarni pravac dobiven testiranjem otopina galne kiseline korištenjem UV-VIS spektrofotometra

Tablica 2. Odnos koncentracije floroglucinola i apsorbancije dobiven mjerenjem na UV-VIS spektrofotometru

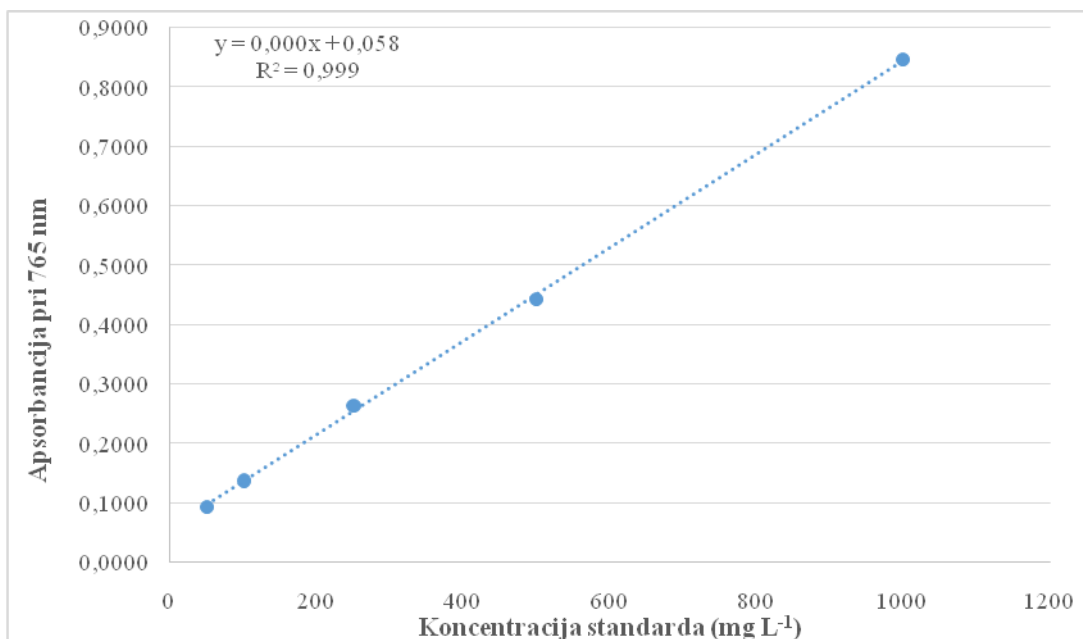
Koncentracija floroglucinola (mg L ⁻¹)	Apsorbancija (765 nm)
50	0,0747 ± 0,0057
100	0,0970 ± 0,0038
250	0,2201 ± 0,0057
500	0,4193 ± 0,0082
1000	0,8768 ± 0,0200



Slika 13. Baždarni pravac dobiven testiranjem otopina floroglucinola korištenjem UV-VIS spektrofotometra

Tablica 3. Odnos koncentracije galne kiseline i apsorbancije dobiven mjerenjem na mikrotitarskom čitaču ploča

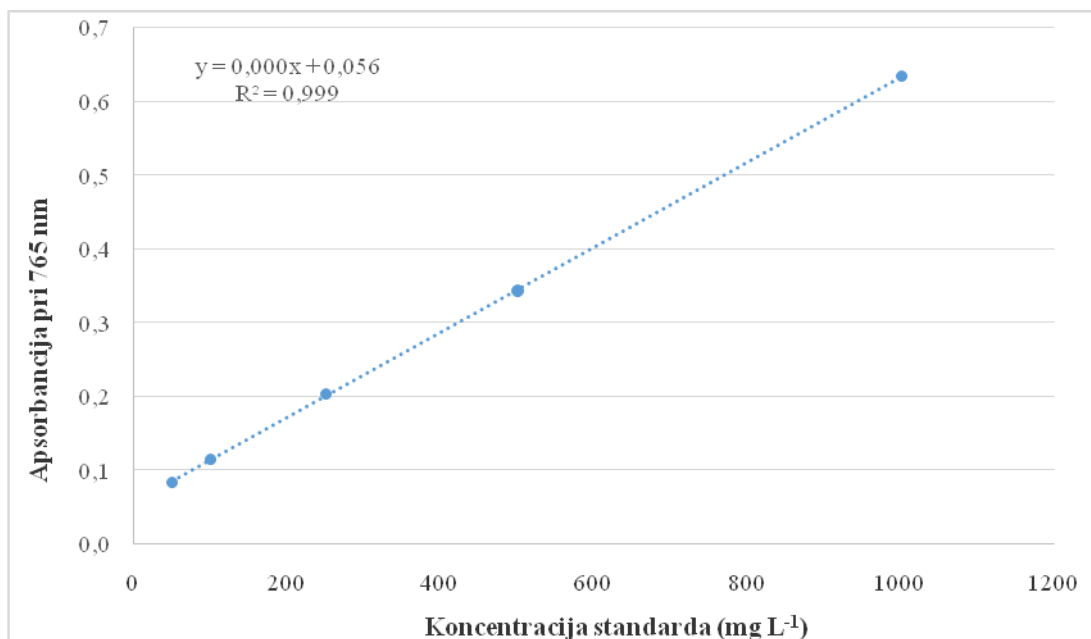
Konzentracija galne kiseline (mg L ⁻¹)	Apsorbancija (765 nm)
50	0,0937 ± 0,0012
100	0,1377 ± 0,0017
250	0,2639 ± 0,0091
500	0,4430 ± 0,0367
1000	0,8458 ± 0,0181



Slika 14. Baždarni pravac dobiven testiranjem otopina galne kiseline korištenjem mikrotitarskog čitača ploča

Tablica 4. Odnos koncentracije floroglucinola i apsorbancije dobiven mjerenjem na mikrotitarskom čitaču ploča

Konzentracija floroglucinola (mg L ⁻¹)	Apsorbancija (765 nm)
50	0,0834 ± 0,0070
100	0,1144 ± 0,0230
250	0,2035 ± 0,0048
500	0,3429 ± 0,0075
1000	0,6336 ± 0,0297



Slika 15. Baždarni pravac dobiven testiranjem floroglucinola korištenjem mikrotitarskog čitača ploča

Kao što je vidljivo sa slika koje prikazuju mjerenja na UV-VIS spektrofotometru jednadžbe baždarnih pravaca su sljedeće:

Galna kiselina	$y = 0,0011x + 0,027$	$R^2 = 0,9993;$
Floroglucinol	$y = 0,0009x + 0,014$	$R^2 = 0,9979$

dok su iste na mikrotitarskom čitaču ploča:

Galna kiselina	$y = 0,0008x + 0,0582$	$R^2 = 0,9995;$
Floroglucinol	$y = 0,0006x + 0,0563$	$R^2 = 0,9999$

U oba slučaja je vidljivo da pravci dobiveni za galnu kiselinu imaju znatno veće nagibe od onih dobivenih za floroglucinol, iz čega proizlazi da su rezultati izraženi preko galne kiseline brojčano niže vrijednosti nego li su vrijednosti rezultata izraženih preko floroglucinola kao standarda.

Na primjer:

U slučaju da je očitana apsorbancija uzorka na UV-VIS spektrofotometru 0,5 prema jednadžbi baždarnog pravca u uzorku bi bilo 552 mg fenola izraženih preko galne kiseline u ekvivalentima galne kiseline po 1 L ekstrakta (mg GAE L^{-1}), dok bi rezultat izražen u ekvivalentima floroglucinola po 1 L ekstrakta (mg PG L^{-1}) bio 739 mg PG L^{-1} . Ukoliko bi isto očitavanje bilo na mikrotitarskom čitaču ploča sadržaj fenola bi bio 430 mg GAE L^{-1} , odnosno 540 mg PG L^{-1} .

4. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je opisanom Folin-Ciocalteu metodom moguće provesti određivanje fenolnih spojeva korištenjem klasičnog UV-VIS spektrofotometra kao i korištenjem mikrotitarskog čitača ploča. Ipak, rezultati prikazani u ovom radu omogućuju izražavanje rezultata sadržaja ukupnih fenola u uzorcima preko obaju standarda, i galne kiseline i floroglucinola, što omogućuje bolju usporedbu rezultata s onima objavljenim u drugim znanstvenim studijama.

5. LITERATURA

1. Onofrejšová L, Vašičková J, Klejdus B, Stratil P, Mišurcová L, Kráčmar S, Kopecky J, Vacek J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;51(2):464-70.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.027>
2. Buratović A. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2017.
3. Bajt P. Lambert-Beerov zakon [Završni rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju; 2018.
4. Tissue BM. Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. Characterization of Materials. 2002;(2):1-13.
<https://doi.org/10.1002/0471266965.com059>
5. Krnaš M. Spektrofotometrijska studija sustava škrob-trijodid [Završni rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju; 2012.
6. Šeba T. Određivanje koncentracije obojanih otopina pomoću pametnog telefona [Završni rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju; 2015.
7. Owen T. Fundamentals of UV-visible spectroscopy: a primer. Hewlett-Packard: Agilent Technologies; 1996.
8. Jolić N. Antioksidacijska aktivnost fenola: Interakcija derivate hidroksibenzojeve kiseline [Završni rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017.
9. Kajić D. Utjecaj biološke obrade kukuruzne silaže pomodu *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva [Završni rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju; 2015.
10. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Berghe DV. Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 1998;61(1):71-6.
<https://doi.org/10.1021/np970237h>.

11. Sandhar HK., Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 2011;1(1):25-41.
12. Lovrić S. Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci [Završni rad]. Osijek: Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet; 2014.
13. Matanić J. Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira* primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2018.
14. Generalić Mekinić I, Skroza D, Šimat V, Hamed I, Čagalj M, Popović Perković Z. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules* 2019;9(6):244.
<https://doi.org/doi:10.3390/biom9060244>
15. Dabić D. Predikcija fizikalno-kemijskih parametara vodenih ekstrakata samoniklog bilja primjenom blisko infracrvene spektroskopije u kombinaciji s kemometrijskim metodama. [Magistarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2019.
16. Mihajlovski M. Primjena mikrovalne ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz smeđe alge *Dictyota Dichotoma* Var. *Intricate* [Magistarski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.
17. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005;53(6):1841-56.
<https://doi.org/10.1021/jf030723c>
18. Cvetković AM. Modeliranje i optimiranje fizikalno-kemijskih karakteristika i UV spektara vodenih ekstrakata lavande i melise [Magistarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2017.