

## Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

### Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) (Vermeris & Nicholson, 2006; Singleton & Rossi, 1965). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ( $P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$ ,  $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$ ). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $Na_2CO_3$ , αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

### Διαλύματα

- Για την πειραματική διαδικασία χρειάζεται η παρασκευή διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $Na_2CO_3$ ) 25% w/v. Για 10 ml (σε  $H_2O$ ) ζυγίζουμε 2.5 g. Για να διαλυθεί απαιτείται θέρμανση (σκεπάζουμε το ποτήρι ζέσεως με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος).
- Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι φωτοευαίσθητο

Σε tube των 2ml προστίθενται τα παρακάτω:

|                        | Blank | Cn   | Negative Control<br>Cn |
|------------------------|-------|------|------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b>  | 1020  | 1000 | 1100                   |
| <b>Folin-Ciocalteu</b> | 100   | 100  | -                      |
| <b>Δείγμα</b>          | -     | 20   | -                      |

| Επώαση 3min σε θερμοκρασία δωματίου |     |     |     |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> | 280 | 280 | 280 |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>               | 600 | 600 | 600 |

Πίνακας 1: Σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων

Το μίγμα ανακινείται και επωάζεται για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα **765 nm** σε φασματοφωτόμετρο ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάζεται εις τριπλούν. Εξετάζουμε ακόμη και την οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

### Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. **Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης.** Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάζεται με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 και 1500 µg/mL γαλλικού οξέος. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/g εκχυλίσματος.