

Professional Paper

DOI: 10.2478/10004-1254-59-2008-1868

ODREĐIVANJE POLIFENOLA U NAMIRNICAMA METODOM UBRIZGAVANJA U PROTOK

Suzana BEREND¹ i Zorana GRABARIĆ²

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada¹, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu², Zagreb, Hrvatska*

Primljeno u veljači 2008.
Prihvaćeno u lipnju 2008.

U ovom radu predložena je modificirana automatizirana metoda ubrizgavanja u protok za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u namirnicama bazirana na Folin-Ciocalteuovoj reakciji u 0,5 mol L⁻¹ NaOH. Metoda omogućuje automatiziranu analizu različitih uzoraka brzinom protoka 55 uzoraka na sat uz upotrebu galne kiseline kao standarda. Primjenom predložene metode na konkretne uzorke (bijelo i crno vino, zeleni, indijski čaj od lipe, metvice i kamilice i bistri voćni sokovi od crnog ribiza i višnje), određen je njihov "indeks ukupnih polifenola" s većom repetibilnošću za razliku od ranije objavljenih metoda, manje ovisno o razrjeđenju uzorka. U odnosu na "batch" metodu, ova je metoda visoko tolerantna prema najčešćim interferentima (SO₂, reducirajući šećeri i askorbinska kiselina). Rezultati dobiveni predloženom metodom pokazali su relativno slaganje s onima dobivenim referentnom Folin-Ciocalteuovom metodom.

KLJUČNE RIJEČI: *Folin-Ciocalteuova reakcija, indeks ukupnih polifenola, interferenti*

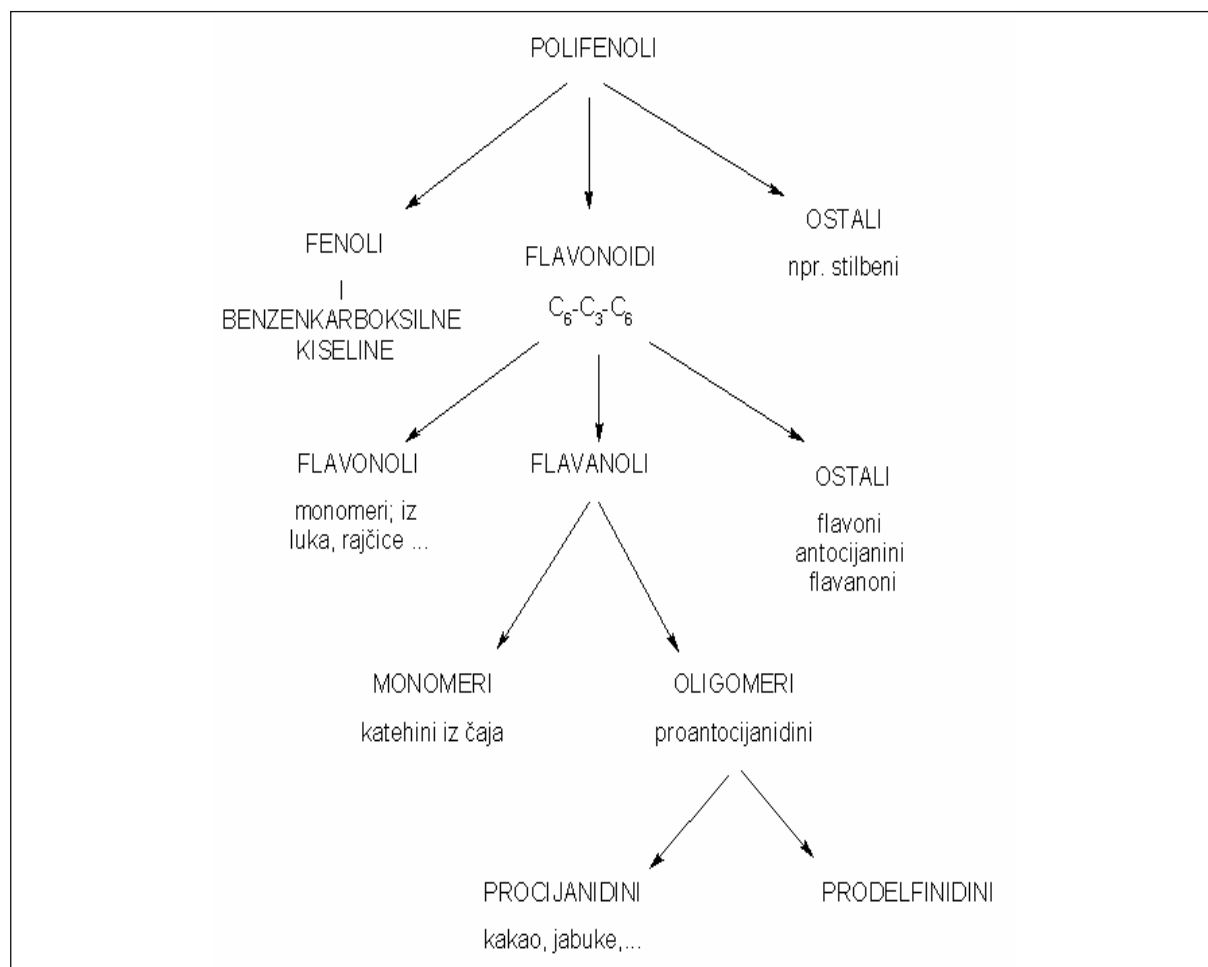
Fenolni spojevi u prirodi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključuju spojeve različite kemijske strukture od jednostavnih hidroksicimetnih kiselina, antocijanina (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina. Na slici 1 prikazana je osnovna podjela polifenola (1). Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (2). Polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, oštini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (3). Literaturni podaci upućuju na to da važnu ulogu u prevenciji humanih bolesti, uz vitamine i minerale, imaju i polifenolni antioksidansi iz voća i

povrća (4-7). Dokazana su protuupalna, protualergijska i protukancerogena djelovanja nekih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadržavaju, kao npr. crno vino i zeleni čaj (6, 8). Spojevi iz skupine flavonoida pokazali su se kao najjači antioksidansi. Do sada je otkriveno da barem osamnaest flavonoida ima veću antioksidativnu učinkovitost od vitamina C i E (7). Antioksidativna aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres odnosno indukciji "antioksidativnih" enzima (1). Ujedno polifenoli imaju sposobnost keliranja metala (9) te vezanja ugljikohidrata i proteina s pomoću hidroksilnih skupina (1).

Određivanje koncentracije ukupnih polifenola česta je analitička metoda koja se svakodnevno provodi kako u prehrambenoj industriji tako i u agrokulturi (10). Naime, podaci o ukupnim polifenolima imaju važnu teorijsku primjenu pri analizi antioksidativnog kapaciteta namirnice jer je upravo mjerenje "ukupnih

polifenola” prvi pristup u određivanju indeksa ukupnih antioksidansa. Kako namirnice sadržavaju različite fenolne komponente, mjere se kolektivno kao tzv. “indeks ukupnih polifenola”. Rezultat je prosjek različitih analitičkih odgovora fenolnih komponenti u uzorku. Dosad su za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u upotrebi najčešće bile spektrofotometrijske metode. Najjednostavnija primjenjiva metoda je direktno mjerenje apsorbancije uzorka na 280 nm, no na taj način dobije se samo aproksimacija budući da spektri pojedinih analita mogu jako varirati (11, 12). Najpouzdanijom se pokazala Folin-Ciocalteuova (FC) metoda. Reakcijom polifenola i FC reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) u blago alkalnim uvjetima dolazi do stvaranja relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa koji potom možemo spektrofotometrijski odrediti pri 750 nm (13). Iako su spektrofotometrijske metode jednostavne i praktične, nedostaci poput sporosti u uspostavljanju ravnoteže i mogućnosti

interferencije nekih uobičajenih tvari iz uzoraka dovele su do razvoja originalnih “batch” metoda za uporabu u sistemima kontinuiranog protoka, poput analize ubrizgavanja u protok (engl. Flow-Injection Analysis; FIA). Prvi rad predložen u literaturi adaptacija je Jerumanisove metode, koja uključuje reakciju s amonijevim željezovim(III) citratom u alkalnome mediju pri čemu nastaje obojeni željezov(II) polifenolni kompleks (14). Budući da taj postupak uvelike ovisi o eksperimentalnim uvjetima, usporedba protočnih i “batch” pokusa rezultirala je s oko 37 % pogreške (14). Stoga je pogodna osnova za mjerenje postala FC metoda, standardna metoda za određivanje ukupnih polifenola, koja je prisutna u zakonskoj regulativi vezanoj za metode analize vina diljem svijeta (15). Kako bi se unaprijedile metode koje se temelje na Folin-Ciocalteuovoj reakciji, ispitana je primjena metoda automatiziranog određivanja koncentracije ukupnih polifenola.



Slika 1 Osnovna podjela polifenola (1)

MATERIJAL I METODE

Mjerni uređaji

Pri spektrofotometrijskim mjerenjima korišten je spektrofotometar Analytik Jena model Specord 200.

Sistem za analizu ubrizgavanjem u protok konstruiran je u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a osnovni dijelovi su mu: trokanalna peristaltička crpka, Valco Cheminert injekcijski ventil sa šest otvora montiran na Valco Model E60 aktuator, petlja za miješanje ($\Phi=40$ mm) unutarnjeg promjera 0,8 mm, teflonske cijevi te spektrofotometar s jednom zrakom i protočnom ćelijom (duljina optičkog puta 0,8 mm) kao detektor (slika 2 a, b, c).

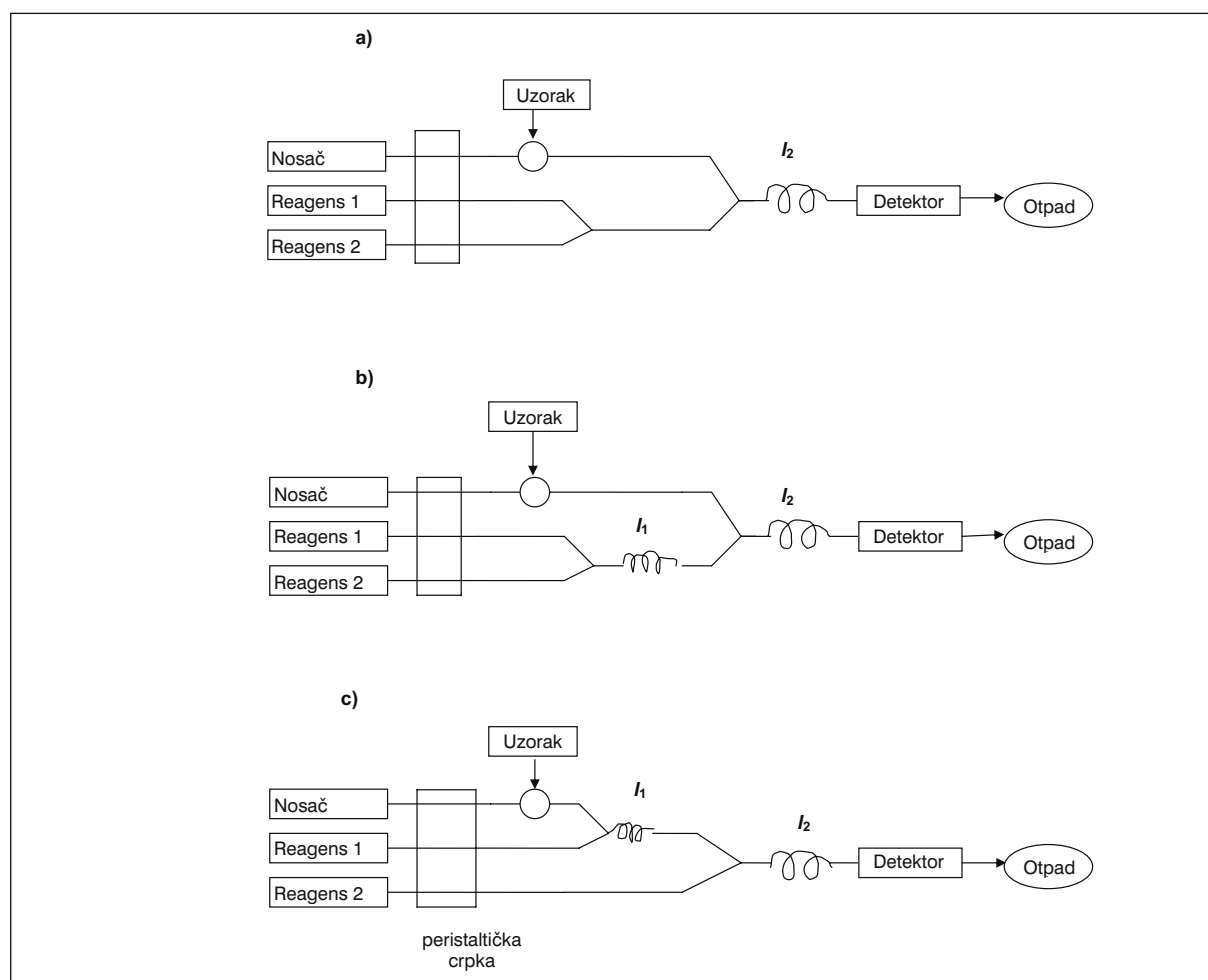
Svi uređaji bili su povezani s PC računalima u svrhu praćenja mjerenja, pohrane te obrade mjernih podataka. Prilikom obrade podataka korišteni su programski paketi WinASPECT, OriginPro 7.0 i Microsoft Excell 2000 iz Microsoft Office 2000.

Kemikalije i otopine

Sve kemikalije bile su p.a. čistoće. Voda je bila deionizirana na Millipore Milli Q aparatu.

Otopine standarda galne kiseline pripremljene su dnevno odgovarajućim razrjeđivanjem izvorne otopine masene koncentracije 1 g L^{-1} u deioniziranoj vodi, a za potrebe mjerenja metodom ubrizgavanja u protok te za ispitivanje utjecaja interferenata korištene su i izvorne otopine galne kiseline masene koncentracije 5 g L^{-1} i 10 g L^{-1} .

Otopina FC reagensa razrijeđena je u omjeru 1:5 deioniziranom vodom.



Slika 2 Dijagrami protoka: a) petlja l_2 - miješanje cjelokupne reakcijske smjese; b) petlja l_1 - miješanje otopina reagensa 1 i 2; c) petlja l_1 - miješanje nosača i injektiranog uzorka s reagensom 1. Nosač = deionizirana voda, reagens 1 = Folin-Ciocalteau reagens (1:10), reagens 2 = NaOH ($c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ i $1,0 \text{ mol L}^{-1}$), uzorak = galna kiselina ($\gamma = 20 \text{ mg L}^{-1}$, 200 mg L^{-1} i 1000 mg L^{-1}), injektirani volumen = $20 \mu\text{L}$, protok $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ i $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $l_1 = 65 \text{ cm}$, $l_2 = 1 \text{ m}$

Pripravljena je otopina Na_2CO_3 masene koncentracije 200 g L^{-1} u deioniziranoj vodi te otopina NaOH koncentracije 1 mol L^{-1} u deioniziranoj vodi, koja je za potrebe mjerenja metodom ubrizgavanja u protok razrijeđena u odgovarajućim omjerima deioniziranom vodom.

Otopine askorbinske kiseline i Na_2SO_3 pripravljene su u masenim koncentracijama 100 mg L^{-1} i 400 mg L^{-1} u deioniziranoj vodi, dok su odvagane mase (0,207 g i 0,500 g) glukoze dodane direktno u 10 mL uzorka.

Uzorci

Crno vino *Cabernet Sauvignon* (Povardarie a.d. Negotino, Makedonija, 2000.) razrijeđeno je četiri puta deioniziranom vodom, dok su bijela vina *Chardonnay* (Erdutski vinogradi d.o.o., Hrvatska, 2001.) i *Graševina* (Vinarija Daruvar d.o.o., Hrvatska, 2001.) korištena nerazrijeđena.

Otopine čajeva pripravljane su iz filtarskih vrećica u 100 mL deionizirane vode zagrijane do temperature vrenja. Otopina zelenog čaja razrijeđena je četiri puta, indijskog dva puta, dok su otopine čajeva od metvice, lipe i kamilice korištene nerazrijeđene.

Sokovi od crnog ribiza i višnje razrijeđeni su dva i pol, odnosno dva puta deioniziranom vodom.

Metode rada

Referentna Folin-Ciocalteuova (FC) metoda

Mjerenja su provedena spektrofotometrijski prema postupku za određivanje koncentracije ukupnih polifenola autora Slinkard i Singleton (16) uz redukciju volumena. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline mg L^{-1} .

Metoda ubrizgavanja u protok (FIA)

Aparatura sa slike 2c upotrijebljena je za protok deionizirane vode (nosač), reagensa 1 (1:5 FC reagens) i reagensa 2 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH) uz brzinu od $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Duljina l_1 bila je 65 cm, a l_2 1 m. Nakon što je sistem uravnotežen pri $\lambda = 750 \text{ nm}$ izmjerene su apsorbancije i izrađen je baždarni dijagram za galnu kiselinu kao standard (20 mg L^{-1} do 1500 mg L^{-1}) uz injicirani volumen od $20 \mu\text{L}$. Potom su na isti način analizirani uzorci odgovarajućih razrjeđenja. Izmjereno je 50 do 60 uzoraka na sat.

REZULTATI I RASPRAVA

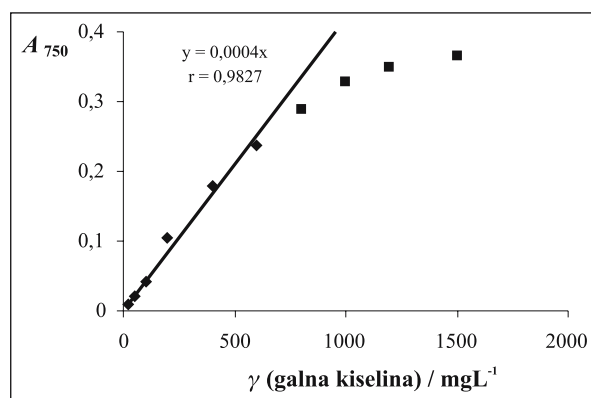
U ovom radu ispitana je preciznost, osjetljivost na neke interferente i primjenjivost razrađene

automatizirane metode za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u namirnicama rabeći Folin-Ciocalteuov reagens. S ciljem da se predloženom analitičkom metodom omogući određivanje ukupnih polifenola u široku rasponu koncentracija kako bi bila primjenjiva za velik broj različitih uzoraka, ispitane su određene varijable u svrhu postizanja optimalnih uvjeta.

Optimiranje kemijskih varijabli izvedeno je tako da je prvo ispitan utjecaj razrjeđenja FC reagensa prema postupku za referentnu FC metodu. Nakon što je utvrđeno da razrjeđenje FC reagensa nema značajnog utjecaja na tijek reakcije i spektrofotometrijsko praćenje procesa, radi ekonomičnosti korišten je FC reagens razrijeđen u omjeru 1:5 za mjerenja i referentnom i predloženom metodom. Prema literaturnim podacima s obzirom na kinetiku nastajanja FC kompleksa, apsorbancija se mjeri 30 odnosno 60 min nakon dodatka reagensa (10, 13, 16), što mora biti vremenski točno koordinirano te je to problem standardne FC metode jer je takvo određivanje relativno. Nadalje, da bi se izbjeglo formiranje mjehurića u reakcijskoj petlji kao posljedica otpuštanja CO_2 u reakciji neutralizacije kiselog medija otopine FC reagensa s Na_2CO_3 , za analize ubrizgavanja u protok korištena je otopina NaOH (13). Kako nije poznato koji su polifenoli sadržani u uzorcima, iskazujemo ih kao ekvivalente standardnih polifenola, najčešće galne kiseline.

Na analitički signal utječu i instrumentalne varijable, poput unutarnjeg promjera i duljine reakcijske petlje, duljine petlje za miješanje, injiciranog volumena te protoka. Testirana su tri načina miješanja uzorka (galna kiselina), reagensa 1 (FC reagens) i reagensa 2 (NaOH) (slika 2), a odabran je onaj kojim su dobiveni oštri pikovi te ravna osnovna linija. Naime, primjenom načina miješanja sa slike 2a bez obzira radilo se o $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ili $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ otopini NaOH , protoku $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ ili $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ nije bilo moguće postići odgovarajuću repetibilnost, a dobivena je izrazito neravna osnovna linija. Razliku između 2a i 2b čini samo petlja l_1 , koja omogućuje bolje miješanje otopina FC reagensa i NaOH , a to nema bitnog utjecaja na mjerenja jer se u oba slučaja nosač u koji je injiciran uzorak miješa sa smjesom FC reagensa i NaOH . Način miješanja prikazan na slici 2c slijedi referentnu FC metodu. Dakle, u prvom koraku u petlji l_1 dolazi do miješanja nosača (deionizirana voda) i injiciranog uzorka s FC reagensom (reagens 1), a potom se u petlji l_2 ta smjesa miješa s otopinom NaOH (reagens 2). Značajan učinak na taj korak imala je duljina petlje. Prema ispitanim uvjetima odabrani su

radni uvjeti: razrjeđenje Folin-Ciocalteuova reagensa 1:5, $c(\text{NaOH})=0,5 \text{ mol L}^{-1}$, injicirani volumen $20 \mu\text{L}$ i protok $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Radi provjere odabranih uvjeta provedena su mjerenja predloženom metodom s deset različitih koncentracija galne kiseline (20 mg L^{-1} do 1500 mg L^{-1}) kako bi se dobio baždarni dijagram (slika 3). Iz baždarnog dijagrama vidljivo je da područje linearnosti obuhvaća raspon koncentracija od 20 mg L^{-1} do 600 mg L^{-1} .

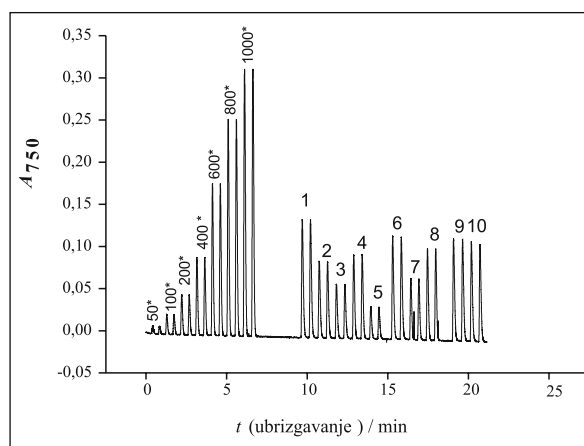


Slika 3 Baždarni dijagram za određivanje galne kiseline metodom ubrizgavanja u protok

Smetnje koje mogu uzrokovati neki spojevi uobičajeni u vinima, ali i drugim namirnicama, tijekom određivanja sadržaja ukupnih polifenola ispitane su određivanjem razlika očitanih vrijednosti apsorbancija za standardne otopine galne kiseline s interferirajućom komponentom ili bez nje. Ispitan je utjecaj triju interferirajućih spojeva u skladu s literaturom (10, 13) tako da su smjese bile analizirane referentnom

i predloženom metodom. Utjecaj SO_2 istražen je dodatkom natrijeva hidrogensulfita otopini galne kiseline ($\gamma=200 \text{ mg L}^{-1}$). Dobiveni rezultati prikazani na tablici 1 pokazuju da je za razliku od FC metode FIA tolerantnija na prisutnost SO_2 , što može biti pripisano činjenici da je predložena metoda ubrizgavanja u protok u osnovi vremenski fiksirana kinetička metoda, dok je referentna metoda ravnotežna (mjerenja se provode 60 minuta nakon početka reakcije). Reducirajući šećeri i askorbinska kiselina također manje utječu na FIA metodu što se može interpretirati na isti način kao i za utjecaj SO_2 .

Nakon što su određeni optimalni uvjeti za mjerenja u protoku, izmjereni su ukupni polifenoli u uzorcima



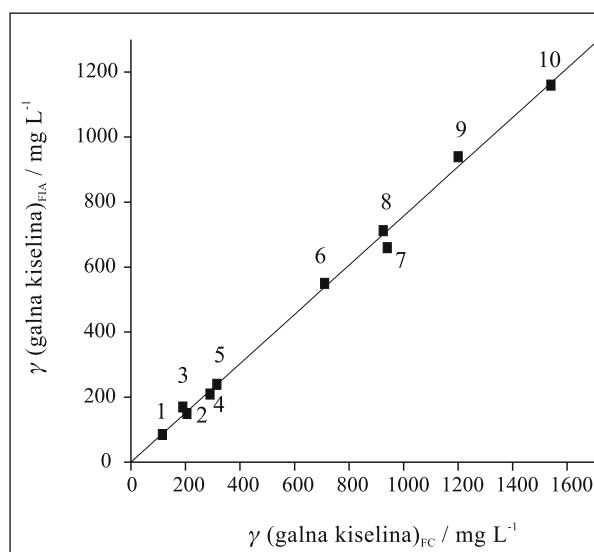
Slika 4 Rezultati mjerenja metodom FIA standardnih otopina galne kiseline [$\gamma = (50-1000) \text{ mg L}^{-1}$] te ukupnih polifenola u uzorcima: 1. zelenog čaja; 2. čaja od mente; 3. indijskog čaja; 4. čaja od lipe; 5. čaja od kamilice; 6. crnog vina Cabernet Sauvignon; 7. bijelog vina Graševina; 8. bijelog vina Chardonnay; 9. soka od crnog ribizla; 10. soka od višnje. Svaki standard i uzorak injektirani su po dva puta.

*Masene koncentracije standarda izražene u mg L^{-1}

Tablica 1 Usporedba rezultata određivanja galne kiseline u smjesi s interferirajućim spojevima referentnom metodom FC i razrađenom metodom FIA. γ (galna kiselina)_{dodano} = 200 mg L^{-1}

Interferent	$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	FC		FIA	
		γ (galna kiselina) _{nađeno} / mg L^{-1}	RSD / %	γ (galna kiselina) _{nađeno} / mg L^{-1}	RSD / %
Askorbinska kiselina	100	$300 \pm 2,64$	0,88	$255 \pm 5,29$	2,07
	400	$550 \pm 6,00$	1,09	$415 \pm 4,00$	0,96
SO_2	100	$280 \pm 4,58$	1,64	$245 \pm 3,61$	1,47
	400	$375 \pm 2,52$	0,67	$250 \pm 2,00$	0,80
Glukoza	2000	$220 \pm 4,00$	1,82	$190 \pm 2,65$	1,39
	5000	$240 \pm 3,61$	1,50	$230 \pm 2,00$	0,87

(slika 4). Prije injiciranja pripremljena su odgovarajuća razrjeđenja uzoraka. Ukupni fenoli u uzorcima određeni su FC i FIA metodom u ekvivalentima galne kiseline. Obje metode koriste spektrofotometrijski detektor i FC reagens. Korelacija dviju metoda (slika 5) pokazuje dobru linearnost, iako su rezultati određeni metodom FC sustavno viši od rezultata određenih metodom FIA. To je u skladu s činjenicom da polifenoli, kao nedefinirana smjesa različitih analita, s FC reagensom stvaraju kompleksan spoj koji ima svoju kinetiku. Najviši rezultat dobio bi se mjerenjem apsorbancije nakon više od dva sata, kada se postiže ravnotežno stanje, što nije prikladno za praktičnu upotrebu. Prema tome, FC metoda, kod koje se spektrofotometrijski signal mjeri nakon jednog sata, mora dati više rezultate od FIA metode koja je brža, što je vidljivo iz tablice 1 i slike 5. Prednost FIA metode je u automatizaciji i brzini mjerenja, što je važno kod velikog broja analiza. Dobra korelacija samo pokazuje da se s obje metode dobiju linearno proporcionalni rezultati s ukupnom koncentracijom polifenola.



Slika 5 Usporedba mjerenja ukupnih polifenola metodom FC i metodom FIA u uzorcima: 1. čaja od kamilice; 2. čaja od lipe; 3. bijelog vina Graševina; 4. čaja od mente; 5. bijelog vina Chardonnay; 6. soka od višnje; 7. indijskog čaja; 8. soka od crnog ribizla; 9. zelenog čaja; 10. crnog vina Cabernet Sauvignon. Dobiivena korelacija je pravac $y = 0,755x + 1,930$ s pripadajućim $r = 0,9988$

ZAKLJUČAK

Rabeći optimizirani dijagram protoka i najbolje prilagođene vrijednosti kemijskih varijabli uključenih u određivanje ukupnih polifenola, razrađena je metoda ubrizgavanja u protok, koja se pokazala pouzdanijom

od dosad opisanih metoda. Metoda ubrizgavanja u protok omogućuje realnija mjerenja polifenolnih spojeva za razliku od često korištene metode direktnog mjerenja apsorbancije uzorka pri 280 nm i mnogo je brža od navedenih dviju referentnih metoda kod kojih je potrebno više od 30 min za analizu jednog uzorka. Analitičke karakteristike metode (preciznost uvjetovana tolerancijom uobičajenih interferencija, repetibilnost, raspon primjene) te brzina, jednostavnost i ekonomičnost omogućuju primjenu predložene metode ubrizgavanja u protok za svakodnevna rutinska određivanja ukupnog sadržaja polifenola.

Zahvala

Zahvaljujemo svim djelatnicima Laboratorija za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu PBF-a, a posebice D. Ivekoviću na korisnim raspravama i sugestijama tijekom izrade ovog rada.

LITERATURA

1. Escarpa A, Gonzalez MC. An overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Crit Rev Anal Chem* 2001;31:57-139.
2. Blasco AJ, Rogerio MC, González MC, Escarpa A. "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Anal Chim Acta* 2005;539:237-44.
3. Naczek M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004;1054:95-111.
4. Seeram NP, Lee R, Scheuller HS, Heber D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem* 2006;97:1-11.
5. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572-84.
6. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem* 2003;82:409-16.
7. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997;2:152-9.
8. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:89-143.
9. López-Cueto G, Ostra M, Ubide C, Zuriarrain J. Fenton's reagent for kinetic determinations. *Anal Chim Acta* 2004;515:109-16.

10. López Moreno C, Cañada Rudner P, Cano García JM, Cano Pavón JM. Development of a sequential injection analysis device for the determination of total polyphenol index in wine. *Microchim Acta* 2004;148:93-8.
11. Costin JW, Barnett NW, Lewis SW, McGillivray DJ. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta* 2003;499:47-56.
12. Mataix E, Luque de Castro MD. Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I280) and density in wines by flow injection. *Analyst* 2001;126:251-5.
13. Celeste M, Cerda V, Cladera A, Estela JM, Tomas C. Enhanced automatic flow-injection determination of the total polyphenol index of wines using Folin-Ciocalteu reagents. *Anal Chim Acta* 1992;269:21-8.
14. Goreti M, Sales F, Schoonen JW. Determination of polyphenols in wines by reaction with 4-aminoantipyrine and photometric flow-injection analysis. *Anal Bioanal Chem* 2002;372:822-8.
15. Office International de la Vigne et du Vin (OIV). *Recueil des Méthodes International d'Analyse des Vins et des Mouts*. Paris: OIV; 1990.
16. Slinkard K, Singleton KVL. Total Phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic* 1977;28:49-55.

Summary

DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN FOOD WITH THE FLOW-INJECTION METHOD

This paper describes an optimised flow-injection method for the determination of total polyphenol in food based on the Folin-Ciocalteu reaction in 0.5 mol L⁻¹ NaOH. The method allows different types of samples to be analysed automatically at a rate of 55 samples per hour by using gallic acid as standard. By applying the proposed method to real samples (white and red wines, green, Indian, lime-tree, mentha and chamomile teas, and blackberry and cherry juices), their total polyphenol indices were determined with a higher reproducibility than obtained by earlier methods, whatever the dilution used. This method is highly tolerant towards the most common interferences (SO₂, reducing sugars, and ascorbic acid) associated with the batch method. The results obtained by the proposed method relatively agree with those obtained using the referent Folin-Ciocalteu method.

KEY WORDS: *Folin-Ciocalteu reaction, total polyphenol index, interferences*

CORRESPONDING AUTHOR:

Suzana Berend
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, HR-10001 Zagreb
E-mail: suzana@imi.hr