

## Ćwiczenie

### Pomiar zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH

**Cel ćwiczenia:** Zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych metodą DPPH, poznanie skuteczności antyoksydacyjnej wybranych związków.

**1. Materiał badawczy:** herbata zielona, herbata czarna, herbata czerwona, bratek, mięta, liść brzozy, ziele skrzypu, kwiatu bzu czarnego, kwiatostan głogu, kawa mielona, kawa rozpuszczalna, kwas askorbinowy

**2. Odczynniki:**

- metanol
- DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl),

**3. Sprzęt:**

- spektrometr Jasco UV-VIS\_NIR V670,
- waga techniczna WPT 2, RADWAG,
- waga analityczna AS 220/C/2, RADWAG,
- drobny sprzęt laboratoryjny (zlewki, kolba miarowa, pipety, lejki, szalki Petriego, cylinder miarowy).

**4. Wykonanie oznaczenia**

W celu sporządzenia roztworu rodnika DPPH odważyć na wadze analitycznej 9,8 mg DPPH i rozpuścić w 50 cm<sup>3</sup> metanolu. Roztwór mieszać na mieszadle magnetycznym przez 1h, aż do całkowitego rozpuszczenia barwnika. Następnie roztwór przenieść do butelki z ciemnego szkła i przechowywać w ciemności.

**Uwaga:** Do dalszych pomiarów należy przygotować rozcieńczenie roztworu DPPH. W tym celu: przenieść ilościowo 25 ml wyjściowego roztworu DPPH do kolby miarowej na 100 ml, dopełnić kolbę do kreski metanolem. Wymieszać aż kolor roztworu będzie jednolity. Przebrać roztwór do butelki z ciemnego szkła. Absorbancja tak przygotowanego roztworu przy długości fali 515 nm powinna wynosić 0,9.

### Przygotowanie roztworów i naparów antyoksydantów

- ✓ Przygotować 1% napary: 1 g badanego oksydantu zalać 100 ml wody o temperaturze 90 °C. Po upływie odpowiednio 1, 5, 15 minut napar przesączyć i ochłodzić do temperatury pokojowej. Ekstrakty rozcieńczyć wodą w stosunku 1:1.
- ✓ 1 mM wodny roztwór kwasu askorbinowego ( $M = 176,12 \text{ g/mol}$ )

### Ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej

Do kuwety dodać  $2 \text{ cm}^3$  świeżo przygotowanego roztworu rodnika DPPH oraz  $200 \mu\text{l}$  badanego roztworu. Po 5 minutach zmierzyć absorbancję próby badanej względem próby ślepej ( $2 \text{ cm}^3$  metanolu i  $200 \mu\text{l}$  wody) przy długości fali 515 nm. Jako próbę kontrolną należy przygotować  $2 \text{ cm}^3$  roztworu rodnika DPPH i  $200 \mu\text{l}$  wody. Dla każdego roztworu badanego wykonać 3-krotny pomiar absorbancji.

Dla próbek kwercetyny i kwasu kawowego ślepą próbą jest sam metanol, a próbą kontrolną  $2 \text{ cm}^3$  roztworu rodnika DPPH i  $200 \mu\text{l}$  metanolu.

### Obliczenia

Zdolność badanego antyoksydantu obliczyć ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = [(A_0 - A) / A_0] \cdot 100$$

$A_0$  – absorbancja rodnika DPPH

$A$  – średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant

Na podstawie uzyskanych wyników sporządzić tabelkę, podając w kolumnach średnią wartość absorbancji i % inhibicji dla badanych roztworów oraz wyciągnąć wnioski odnośnie ich zdolności antyoksydacyjnej.