

POLITECHNIKA RZESZOWSKA
im. Ignacego Łukasiewicza
WYDZIAŁ CHEMICZNY
**Zakład Chemii Nieorganicznej
i Analitycznej**

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

Opracowanie:
mgr inż. Joanna Piech
dr Elżbieta Woźnicka

WYKAZ SKRÓTÓW

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

ABTS - [2,2'-azobis(3- etylobenzotiazolino-6-sulfonian)].

BHA – butylowanyhydroksyanizol.

BHT - butylowany hydroksytoluen.

EDTA - sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego.

F-C - odczynnik Folina-Ciocaltea.

DMPD - dichlorowodorekdimetylo-p-fenylendiaminy.

FRAP - (ferricionreducingantioxidantparameter), zdolność redukowania jonów żelaza.

HA T - mechanizm przeniesienia jonów wodoru.

ORAC - (oxygenradicalabsorbancecapacity), zdolność przeniesienia rodników tlenowych.

CBA - (crocinbleachingassay), odbarwienie krocyny.

TOSC - (totaloxidant scavenging capacity), całkowita zdolność wychwytywania rodników tlenowych

1. Rola przeciwutleniaczy w organizmach żywych

Szczególne znaczenie w utrzymaniu prawidłowej równowagi potencjału utleniająco-redukującego w organizmie człowieka ma żywność. Wśród czynnych substancji zawartych w pożywieniu ważną funkcję pełni grupa związków określonych mianem przeciwutleniaczy. Związki te nie są syntezowane przez organizm człowieka, więc, zapewnianie prawidłowej ich ilości w całodziennej racji pokarmowej jest uważane za jeden z podstawowych warunków prawidłowego żywienia i utrzymania dobrego zdrowia [1].

1.1. Przeciwutleniacze roślinne i ich podział

Głównym źródłem przeciwutleniaczy są produkty i surowce pochodzenia roślinnego. Związki te ze względu na różnorodność ich występowania, różnice w budowie czy mechanizmie działania podzielono na wiele sposobów. Wśród związków natywnie występujących w żywności i charakteryzujących się aktywnością antyoksydacyjną należy wymienić następujące klasy związków :

- karotenoidy (likopen, luteina) występujące w szpinaku, pomarańczach, brokułach, pomidorach itd.;
- bioflawonoidy (flawony, flawonole, moryna, flawanony, izoflawony) występują w herbacie, czerwone wino, warzywa, owoce, fasola, brokuły, jabłka itd.;
- fitosterole (sitosterol) występują w olejach roślinnych: słonecznikowy, rzepakowy;
- taniny (katechiny) obecne w herbacie zielonej, czerwonym winie, winogronach,
- chlorofile (chlorofil A, chlorofiliny), których bogatym źródłem są zielone części roślin;
- terpeny (olejki eteryczne) obecne w pomarańczach (limonen), cytrynach (limonen, cytral);
- związki allilowe (siarczek diallilu) występuje w warzywach cebulowych;
- pochodne indolowe (alkaloidy indolowe), których źródłem są brukselka, kalafior, kapusta, brokuł [1];

1.1.1. Przeciwutleniacze w produktach żywnościowych i ich charakterystyka

Przeciwutleniacze zarówno naturalne jak i syntetyczne są powszechnie stosowane jako substancje dodatkowe w przetwórstwie żywności w celu zapobiegania psuciu się produktów lub przedłużania ich okresu trwałości. Dodatek składników o wysokiej zawartości naturalnych antyutleniaczy może wpływać zarówno na poprawę jakości, jak też wartości odżywczej produktów. Z drugiej strony, przeciwutleniacze, podobnie jak inne składniki produktów żywnościowych, przestają być zdrowe, jeśli są spożywane w nadmiarze, szczególnie przeciwutleniacze syntetyczne należy stosować w ściśle określonych ilościach [2].

Przykładowe naturalne i syntetyczne przeciwutleniacze w produktach żywnościowych,

Rys.1.

Kwas askorbinowy - inaczej witamina C, organiczny związek chemiczny, pochodna glukozy. Dobrze rozpuszcza się w wodzie, roztwór ma odczyn kwaśny. Bierze udział w przemianie tyrozyny, niedobór prowadzi do szkorbutu (samoistne krwawienie, uszkodzenia naczyń krwionośnych).

Kwas cytrynowy - uważany za bezpieczny związek jednak może powodować uszkodzenie oczu w przypadku bezpośredniego kontaktu. Jest także regulatorem kwasowości.

Kwas winowy - występuje w owocach, głównie winogronach. Stosowany do żywności jako regulator kwasowości. Wykorzystuje się go również do produkcji serów topionych.

Kwas adypinowy - wykorzystuje się go do produkcji nylonu, środków owadobójczych, klejów, zmiękczaczy oraz dodaje się go do proszku do pieczenia, nadzieni i polew w wyrobach ciastkarskich i piekarskich, reguluje on kwaśność oraz nadaje specyficzny zapach. Jego codzienne spożycie nie powinno przekroczyć 5 miligramów na kilogram ciała. Występuje w burakach oraz w soku trzciny cukrowej.

Kwas bursztynowy - występuje w bursztynie, grzybach, porostach. Używany jest do stonowania lakierów i barwników. Dobrze rozpuszcza się w gorącej wodzie, trudno rozpuszczalny w zimnej.

Kwas nikotynowy - witamina PP. Uczestniczy w produkcji czerwonych krwinek, hamuje toksyczne działanie związków chemicznych i leków, reguluje poziom

cholesterolu we krwi, rozszerza naczynia krwionośne, oddziałuje korzystnie na system nerwowy.

Tokoferol - inaczej witamina E, rozpuszczalny w tłuszczach, główny przeciwutleniacz występujący w komórkach. Bierze udział w dostarczaniu składników odżywczych do komórki. Chroni czerwone krwinki przed zbyt szybkim rozpadem oraz wzmacnia ściany naczyń krwionośnych.

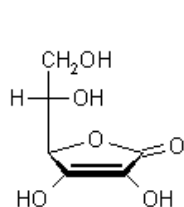
Lecytyna - niezbędna w funkcjonowaniu układu nerwowego zwierząt. W organizmie człowieka występuje głównie w błonie komórkowej. Ważny element składowy mózgu i tkanki nerwowej, bierze udział w gospodarce hormonalnej.

Galusan - silny przeciwutleniacz, występuje w dużej ilości w zielonej herbacie.

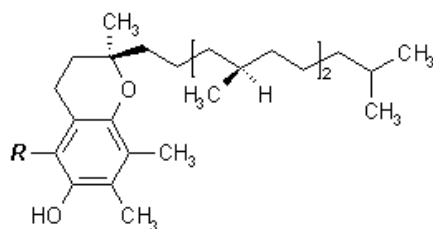
BHA - (butylowanyhydroksyanizol), przeciwutleniacz w tłuszczach i produktach tłuszczowych, stosowany by zapobiec jęczeniu. Może powodować reakcje pseudoalergiczne. BHA w połączeniu z dużymi ilościami witaminy C wytwarza wolne rodniki, które mogą uszkodzić składniki komórek, w tym DNA. Z tego powodu władze UE postanowiły w przyszłości ograniczyć stosowanie BHA.

BHT - (butylowany hydroksytoluen), antyoksydant zapobiegający psuciu się wielu artykułów spożywczych. BHT stosuje się zarówno do konserwowania produktów spożywczych, w tym olejów, jak również gumy i tworzyw sztucznych.

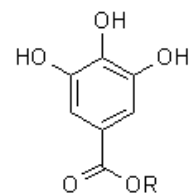
Sól EDTA - ważnym zastosowaniem EDTA jest maskowanie jonów metali, takich jak bizmut, chrom(III), cynk, cyrkon, glin, kadm, kobalt, wanad i żelazo(III), które jest możliwe na skutek tworzenia kompleksów chelatowych z jonami metali. Własności chelatujące EDTA są na tyle silne, że tworzy ona kompleksy nawet z berylowcami [3].



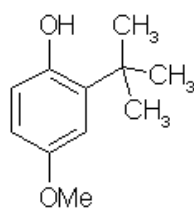
kwask askorbinowy (E300)



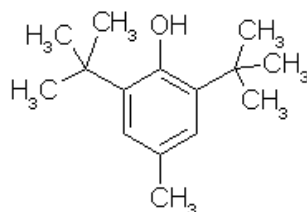
α tokoferol; R = CH₃ (E307)
γ tokoferol; R = H (E308)



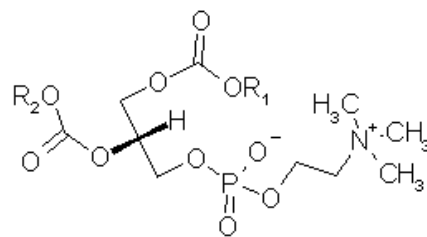
galusany (E310-312)



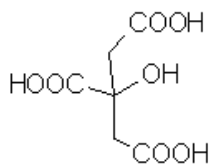
BHA (E320)



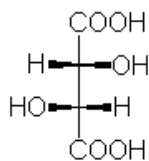
BHT (E321)



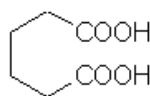
lecytyna (E322)



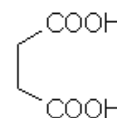
kwask cytrynowy (E330)



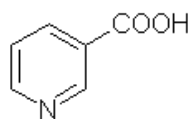
kwask winowy (E334)



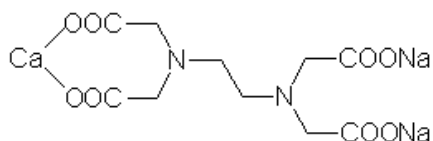
kwask adypinowy (E355)



kwask bursztynowy (E363)



kwask nikotynowy (E375)



sól EDTA (E385)

Rys. 1. Przykładowe naturalne i syntetyczne przeciwutleniacze w produktach żywnościowych [3]

1.2. Metody badań skuteczności antyoksydantów

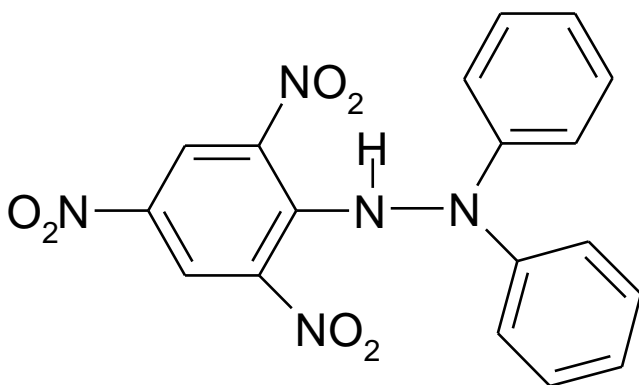
Przeciwutleniacze charakteryzuje zdolność do dezaktywacji rodników, zgodnie z dwoma podstawowymi mechanizmami reakcji: (1) mechanizm przeniesienia atomu wodoru, tzw. HAT oraz (2) mechanizm przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET. Oba te mechanizmy mogą występować równolegle, natomiast mechanizm dominujący w syntezie jest zależny od: rozpuszczalności, współczynnika podziału, właściwości przeciwutleniacza oraz układu stosowanych rozpuszczalników.

Metody oznaczenia zdolności przeciwutleniających można podzielić na addycyjne oraz postaddycyjne, uwzględniając zastosowany system pomiarowy.

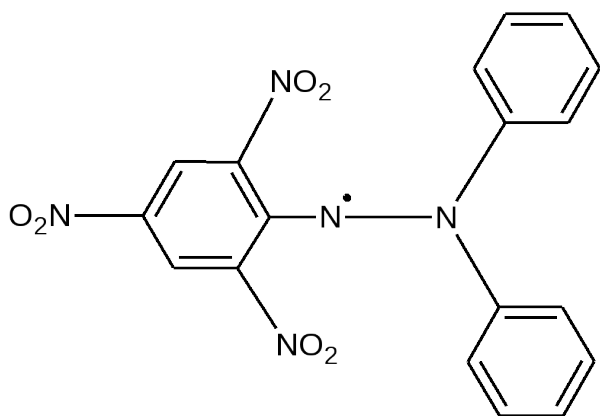
W metodach addycyjnych aktywność jest oznaczana jako opóźnienie procesu rozpoczęcia działania dodanego oksydanta na antyoksydant wskaźnikowy, w wyniku łatwiejszego, a zatem wcześniejszego utleniania w tym procesie antyoksydantów z badanej próbki. W metodach postaddycyjnych aktywność jest oznaczona poprzez pomiar zmiany stężenia testowego reagenta lub produktu (np. $\text{ABTS}^{+\cdot}$, DPPH^{\cdot} , Cu^{+2} , Fe^{+2}) w wyniku bezpośredniej reakcji chemicznej lub rodnikowej odczynnika i antyoksydantów obecnych w próbce [1].

1.2.1. Metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH

Związek 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), (rys.3) jest jednym z kilku stabilnych i komercyjnie dostępnych rodników azotowych. Roztwory tego związku mają barwę purpurową z maksimum absorbancji przy długości fali 515nm. W czasie reakcji redukcji barwa roztworu zanika; postęp można monitorować spektrofotometrycznie [1].



Rys.3. Forma zredukowana 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) [4]



Rys.4. Forma rodnikowa 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH)

Ograniczeniem tej metody jest fakt, że DPPH rozpuszcza się jedynie w rozpuszczalnikach organicznych i nie pozwala na oznaczenie antyoksydantów hydrofilowych. Zaletą tej metody jest jej szybkość i dokładność, a otrzymane wyniki są odtwarzalne i porównywalne z wartościami uzyskanymi podczas innych badań opartych na zdolności zmiatania wolnych rodników [5].

1.2.2. Metoda z zastosowaniem odczynnika ABTS

Inną metodą, która również jest często wykorzystywana do badań jest test, w którym wolnym rodnikiem jest [2,2-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]. Zastosowanie odczynnika ABTS umożliwia pomiar całkowitej aktywności antyoksydacyjnej próbek, w tym płynów ustrojowych i próbek żywności. Rodniki ABTS tworzą się podczas reakcji chemicznej. Utlenianie ABTS następuje natychmiast, jednak maksymalną wartość absorbancji i pełną stabilność rodnik uzyskuje po upływie 6 godzin. Rodniki generowane podczas reakcji mają barwę niebieskozieloną.

Stosunkowo prosty sposób wykonania oznaczeń w metodzie ABTS sprawia, że jest to analiza rutynowo używana do oznaczenia zdolności antyoksydacyjnych próbek przeciwutleniaczy zarówno hydrofobowych jak i hydrofilowych. Dodatkowymi zaletami są duża szybkość reakcji karborodnika ABTS z przeciwutleniaczami oraz rozpuszczalność ABTS zarówno w wodnych, jak i organicznych rozpuszczalnikach [6].

1.2.3. Metoda z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocaltea

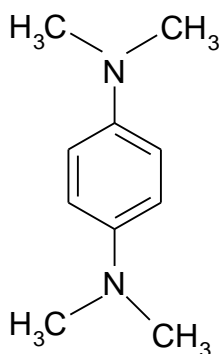
Do oznaczeń potencjału przeciwutleniającego używa się również metody z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (F-C). Metoda ta służy do analizy całkowitej zawartości fenoli. Oparta jest na barwnej reakcji między polifenolami a odczynnikiem [7]. Jej zaletą jest duża prostota i użyteczność do standaryzacji materiałów biologicznych, wadą zaś mała specyficzność.

Odczynnik F-C jest przygotowywany przez zmieszanie wolframianu sodu (Na_2WO_4), molibdenianu sodu (Na_2MoO_4), siarczanu litu (Li_2SO_4), wody bromowej oraz stężonych kwasów

solnego i fosforowego. Nie określono dokładnej struktury związku powstającego w czasie przygotowania tego odczynnika. Przymuszcza się, że jest to heteropolifosfowolframian molibdenu. Daje on, w wyniku odwracalnej reakcji jedno- lub dwuelektronowej redukcji, niebiesko zabarwiony związek $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. Molibden Mo(VI) przyjmuje elektron i redukowany jest do Mo(V) . Związki fenolowe reagują z odczynnikiem F-C jedynie w środowisku alkalicznym (pH 10). Tylko w tych warunkach powstaje anion fenolowy, który redukuje odczynnik F-C. Mechanizm reakcji opiera się na przenoszeniu elektronu, a tworzenie niebieskiego barwnika w reakcji związków fenolowych z odczynnikiem F-C jest niezależne od struktury fenoli [6]. Powyższa metoda znajduje zastosowanie w analizie ekstraktów roślinnych, żywności, a także leków, których elementami są grupy fenolowe, jak np. salbutamol i morfina [8].

1.2.4. Metoda z użyciem odczynnika DMPD

Metoda z zastosowaniem odczynnika dichlorowodorekdimetylo-p-fenylendiaminy (DMPD) jest również zaliczana do metod opartych na pomiarze stopnia odbarwienia roztworu odczynnika. Źródłem rodników w tym teście jest DMPD.



Rys.4. dichlorowodorekdimetylo-p-fenylendiaminy (DMPD) [6]

W środowisku kwasowym i w obecności utleniaczy DMPD tworzy stabilny, barwny kationorodnik.

1.2.5. Metoda oznaczenia zdolności redukcji jonów żelaza – FRAP

Metoda FRAP używana jest do oznaczania zdolności przeciwutleniającej komórek i tkanek. Służy także do pomiaru stresu oksydacyjnego i jego skutków w organizmie. Dostarcza informacji na temat oporu stawianego uszkodzeniom spowodowanym przez utleniacze. Stosowano ją przede wszystkim do oznaczenia siły redukcyjnej płynów ustrojowych

Metoda FRAP pozwala na bezpośrednie określenie redukujących zdolności czystego związku, mieszaniny substancji, czy też próbki materiału biologicznego. Zasada działania tej metody opiera się na pomiarze redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-S-tiazyny) pod wpływem działania antyoksydantu. Następuje zmiana zabarwienia substratu. Z bezbarwnego odczynnika powstaje intensywnie niebieski produkt.

Metoda ta jest tania, reagenty łatwo przygotować, a otrzymane wyniki są wysoce powtarzalne. Dodatkową zaletą jest szybki przebieg analizy [6].

Wariantem metody FRAP jest metoda oznaczania zdolności redukcji miedzi(II) (CRA). Różnica polega na tym, że zamiast żelaza redukowane są jony miedzi. Pod wpływem działania przeciwutleniaczy obecnych w próbce kompleks Cu(II) jest redukowany do barwnego kompleksu miedzi Cu(I). W metodzie tej wykorzystuje się pomiar wartości absorpcji tego barwnego produktu. Istnieją dwie opcje tej metody. Pierwsza z nich wykorzystuje związek o nazwie batokuproina (2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolina), który tworzy pomarańczowy kompleks z miedzią Cu(I), będący chromoforem. W drugiej opcji stosuje się pokrewny żółty kompleks z Cu(I) [1].

1.2.6. Metody wykorzystujące mechanizm reakcji przeniesienia atomu wodoru-HAT

Metody korzystające z mechanizmu reakcji przeniesienia atomu wodoru – HAT poleca się do pomiaru dezaktywacji wolnych rodników, zachodzącej w wyniku oddania atomu wodoru przez antyoksydant. Przeciwutleniacz obecny w analizowanej próbce i modelów przeciwutleniacz o znanym stężeniu, zwany „sondą molekularną” konkurują ze sobą o możliwość reakcji z rodnikiem nadtlenkowym.

Do analiz opierających się na mechanizmie HAT zaliczamy metodę oznaczenia zdolności absorpcji rodników tlenowych(ang. *oxygenradicalabsorbancecapacity* ORAC). Test ten opiera się na pomiarze spadku fluorescencji tzw. sondy molekularnej spowodowanym uszkodzeniem chemicznym wywołanym działaniem wolnych rodników. Metoda ta jest bardziej czuła niż metoda FRAP [10]. Sonda molekularna w wyniku reakcji z termicznie generowanymi rodnikami nadtlenkowymi ulega przekształceniu w produkt pozbawiony właściwości fluorescencyjnych [11].

Kolejnym testem jest oznaczanie całkowitej zdolności wychwytywania wolnych rodników. Analizuje się tu spadek fluorescencji białka R- fikoerytryny, który spowodowany jest przez rodniki nadtlenkowe produkowane na drodze termicznego rozkładu związku azowego AAPH.

Przy określaniu aktywności antyoksydantów znajduje także zastosowanie metoda oznaczania zdolności inhibicji utleniania lipidów. Test ten opiera się na oszacowaniu możliwości

inhibicji produktów peroksydacji modelowych lipidów frakcji LDL-cholesterolu lub kwasu linolowego przez przeciwutleniacze zawarte w próbce [1,6].

1.2.7. Metoda odbarwienia krocyny - CBA

Krocyna jest pochodną karotenoidową naturalnie występującą w krokusach, ulegającą odbarwieniu wyłącznie wskutek utleniania rodnikowego. Tę właściwość wykorzystuje się w metodzie CBA. Pierwszym etapem jest przygotowanie buforu fosforowego zawierającego krocynę i odpowiednią ilość analizowanej próbki przeciwutleniaczy. W celu zapoczątkowania reakcji rodnikowej dodaje się związek azowy 2,2'-azobis (2-amidinopropan) di chlorowodoru [12].

Metoda ta służy do pomiaru aktywności przeciwutleniaczy hydrofilowych jest jedną z najczęściej stosowanych do ilościowej analizy ekstraktów z owoców i warzyw, także pojedynczych związków oraz płynów ustrojowych [13]. Wymienia się ją jako odpowiednią do analizy próbek złożonych, zawierających wiele składników, szybko oraz wolno działających antyoksydantów.

1.3. Inne metody

1.3.1. Metoda oznaczenia całkowitej zdolności wychwytywania rodników tlenowych - TOSC

Istnieją także badania, które nie opierają się ani na mechanizmie SET, ani na mechanizmie HAT. Zaliczamy do nich między innymi metodę oznaczenia całkowitej zdolności wychwytywania rodników tlenowych (TOSC). Zaletą tej metody jest możliwość badania czystego roztworu antyoksydantu, jak również złożonych próbek biologicznych. Stosowana bywa do oznaczania antyoksydantów rozpuszczalnych w wodzie oraz tych rozpuszczalnych w lipidach. Pozwala oznaczyć zdolność badanego roztworu do inhibicji trzech silnych utleniaczy: rodników hydroksylowych, rodników nadtlenowych i nadtlenoazotynowych [14]. Wolne rodniki reagują z dowolnym kwasem alfa-keto-gamma-metiolobutanowym (KMBA) i utleniają go do etylenu. Właściwości antyoksydacyjne próbki są tym większe, im większa jest zdolność obecnych w niej przeciwutleniaczy do inhibicji reakcji tworzenia się etylenu. Analiza przeprowadzona jest dla badanej próbki, także dla próbki kontrolnej nie zawierającej przeciwutleniaczy [15].

1.3.2. Metoda chemiluminestencyjna (CL)

Warto wspomnieć także o tzw. metodzie chemiluminacyjnej (CL). W wyniku reakcji rodników tlenowych z odpowiednim znacznikiem powstają wzbudzone formy emitujące chemiluminestencję. Przeciwutleniacze zawarte w próbce mające zdolność reagowania z rodnikami

hamują emisję promieniowania. Utleniaczami są rodniki nadtlenkowe powstające z nadtlenku wodoru pod wpływem peroksydazy chrzanowej lub heminy jako katalizatorów. Znacznik, którym jest najczęściej luminol, reaguje z utleniaczami i zmienia ich słabą emisję na emisję intensywną, długotrwałą i stabilną.

Aktywność antyoksydacyjna próbki jest wyznaczona poprzez porównanie kinetyki reakcji próby kontrolnej (bez substancji tłumiących chemiluminestencję) z analizą zawierającą antyoksydanty [1]. Do zalet metody chemiluminestencyjnej należy bardzo niski próg wykrywalności antyoksydantów, szeroki zakres liniowości i szybkość, która jest większa niż przy standardowych metodach. Stosuje się ją często do określania zawartości reaktywnych form tlenu w różnych systemach biologicznych, także jako metodę pośrednią analizy właściwości antyoksydacyjnych [16].

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, kwas kawowy, kwercetyna

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 cm³ 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 ($M = 176,12 \text{ g/mol}$)
- ✓ 1 mM metanolowe roztwory kwasu kawowego ($M = 180,16 \text{ g/mol}$) i kwercetyny ($M = 338,27 \text{ g/mol}$)

Ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej

Do kuwety dodać 2 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 cm^3 metanolu i $200 \mu\text{l}$ wody) przy długości fali 515 nm . Jako próbę kontrolną należy przygotować 2 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 cm^3 roztworu rodnika DPPH i $200 \mu\text{l}$ metanolu.

Obliczenia

Zdolność badanego antyoksydantu obliczyć ze wzoru:

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

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.

LITERATURA

- [1] Grajka W., *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*, Wydawnictwo Naukowo- Techniczne, Warszawa 2005; 50-80, 120-150, 532-560.
- [2] Le Cren F., *Przeciwutleniacze. Rewolucja w medycynie XXI wieku*, Wydawnictwo Klub dla Ciebie 2006
- [3] Niki E., *Antioxidant activity: Are we measuring it correctly?* Nutrition 2002; 524-525.
- [4] Zych I. i Kopiłko A., *Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH*, Katedra Biochemii i Chemii Środowiskowej, Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie 2010; 51-54.
- [5] Sanchez-Moreno C., *Method used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems*, Food Sci Technol 2000; 419-421.
- [6] Cybul M., Nowak R., *Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych*, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej Akademia Medyczna, Lublin 2008; 68- 76.
- [7] Zhang Q., Zhang J., Silva A., Dennis DA., Barrow CJ., *A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol concent in seaweeds*. J. Appl Physiol 2006; 445-450.
- [8] Fernández- Pachón MS. Villaño D., Garcia-Parrilla MC., *Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition*, Anal Chim Acta 2004; 113-118.
- [9] Bartosz G., *Druga twarz tlen. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003; 54-98.
- [10] Price JA., Sanny ChG., Sevlín D., *Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of "total" antioxidant activity of drugs and natural products*, J Pharmacol Toxicol Methods 2006; 56-61.
- [11] Huang D., Ou B., Prior R., *The chemistry behind antioxidant capacity assays*, J Agric Food Chem 2005; 1841-1856.
- [12] Ordoudi SA., Tsimidou MZ., *Crocin bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds*, J Agric Food Chem 2006; 47-56.

- [13] Ninfali P., Bacchiocca M., Biagotti E., Servili M., Montedoro G., *Validation of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) parameter as a new index of quality and stability of virgin olive oil*, J Am Chem Soc 2002; 977-82.
- [14] Lee HS., *HPLC analysis of phenolic compounds*. W: LM. Nollet (red.) *Food analysis by HPLC*. New York 2000.
- [15] Lichtenthaler R., Marx F., Kind OM, *Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay*, Eur Food Res Technol 2003; 166-173.
- [16] Atanassova D., Kefalas P., Psillakis E., *Measuring the antioxidant activity of olive oil mill Wastewater using chemiluminescence*, Analyst 2002; 145-171.