

## Ćwiczenie 5

### Antyoksydanty w diecie człowieka.

### Badanie zawartości polifenoli i właściwości antyoksydacyjnych win czerwonych i białych

#### Cel ćwiczenia:

Zapoznanie się z różnymi metodami oznaczania zdolności antyoksydacyjnej. Badanie zdolności antyoksydacyjnej, zawartości polifenoli win czerwonych i białych.

#### Wymagane wiadomości:

Przeciwutleniacze niskocząsteczkowe. Antyoksydanty roślinne – polifenole, flawonoidy (antocyjanidyny, flawonole, flawanole), fenole nie będące flawonoidami (kwasy hydroksybenzoesowe, hydroksycynamonowe, stilbeny). Pojęcie zdolności antyoksydacyjnej. Metody badania zdolności antyoksydacyjnej i zawartości fenoli.

#### 1. Oznaczenie zawartości polifenoli w winach czerwonych i białych

##### Zasada:

Do oznaczania całkowitego stężenia polifenoli używa się metody z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu. Metoda ta oparta jest na barwnej reakcji między polifenolami a odczynnikiem Folina-Ciocalteu, stąd ich zawartość można oznaczyć spektrofotometrycznie. W środowisku zasadowym związki fenolowe znajdują się w postaci anionu fenolowego, który redukuje odczynnik Folina-Ciocalteu tworząc niebieski barwnik.

##### Sprzęt, materiały i odczynniki:

Czytnik mikroplótek  
Przezroczyste płytki 96-dołkowe  
Probówki typu eppendorf  
Badane próbki win czerwonych i białych  
Odczynnik Folina-Ciocalteu rozcieńczony 10 razy  
Roztwór  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o stężeniu  $100 \text{ mg ml}^{-1}$

##### Wykonanie:

- 1) Próbki win białych rozcieńczyć dziesięciokrotnie wodą, czerwonych dwudziestokrotnie
- 2) Do płytki wielodołkowej odpipetować po:
  - 100  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$
  - 50  $\mu\text{l}$  badanej próbki
  - 100  $\mu\text{l}$  wody
  - 50  $\mu\text{l}$  odczynnika Folina-Ciocalteu

Dla każdej badanej próbki wykonać 3 powtórzenia techniczne. Przygotować próbę zerową (blank, próba odczynnikowa) – zamiast badanej próbki dodać 50  $\mu\text{l}$  wody

- 3) Zawartość płytki wymieszać i inkubować przez 15 min w temperaturze pokojowej
- 4) Zmierzyć absorbancję przy długości 750 nm
- 5) Od średnich wartości absorbancji prób badanych odjąć wartość absorbancji próby zerowej i obliczyć jakie jest stężenie polifenoli w badanych próbach korzystając z wcześniej przygotowanej krzywej wzorcowej z kwasem galusowym użytym jako standard (zakres stężeń 0,1 – 1 mmol dm<sup>-3</sup>). Uwzględnić rozcieńczenie wyjściowe badanych prób.

## 2. Oznaczenie zdolności do zmiatania wolnych rodników przez wina czerwone i białe

### Zasada:

DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) jest wolnym rodnikiem o stosunkowo dużej trwałości. Roztwór DPPH ma barwę purpurową, w czasie reakcji redukcji barwa ta stopniowo zmienia się na żółtą. Zmianę tę można monitorować spektrofotometrycznie. Stopień zmiany barwy roztworu DPPH po dodaniu do niego roztworu zawierającego antyoksydanty jest miarą ich zdolności do zmiatania wolnych rodników.

### Sprzęt, materiały i odczynniki:

Czytnik mikropłytek  
Przezroczyste płytki 96-dołkowe  
Probówki typu eppendorf  
Badane próbki win czerwonych i białych  
Roztwór DPPH o stężeniu 0,4 mM w etanolu

### Wykonanie:

- 1) Próbki win rozcieńczyć dwudziestokrotnie wodą
- 2) Do płytki wielodołkowej rozpipetować po 250 µl roztworu DPPH
- 3) Dodać po 50 µl badanych próbek (każdą badaną próbkę wykonać w 3 powtórzeniach technicznych) oraz wykonać próbę kontrolną (również w 3 powtórzeniach technicznych) – zamiast badanej próbki dodać 50 µl wody
- 4) Płytkę inkubować przez 30 min w temperaturze 30°C w ciemności
- 5) Zmierzyć absorbancję przy długości fali 516 nm
- 6) Obliczyć stopień zmiatania rodnika DPPH przez poszczególne próbki  
$$\% \text{ zmiatania DPPH} = (\text{Abs}_{\text{próby kontrolnej}} - \text{Abs}_{\text{próby badanej}}) / \text{Abs}_{\text{próby kontrolnej}} \times 100$$

## 3. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej win czerwonych i białych metodą redukcji jonów żelaza (III)

### Zasada:

Antyoksydanty na ogół są związkami redukującymi, stąd metody oznaczania ich zawartości w jakimś materiale często opierają się na pomiarze redukcji jakiegoś indykatora przez antyoksydanty. Antyoksydanty mogą redukować jony Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup>, które tworzą barwny kompleks z 2,4,6-tripirydylo-S-triazyną (TPTZ). Przyrost absorbancji tego kompleksu przy 593 nm jest miarą

zawartości antyoksydantów w badanej próbce. Całkowitą Zdolność Antyoksydacyjną (CZA) oznaczoną tą metodą wyrażamy w jednostkach stężenia jednoelektronowych równoważników Troloksu.

Sprzęt, materiały i odczynniki:

Spektrofotometr

Probówki typu eppendorf

Kuwety spektrofotometryczne

Badane próbki win czerwonych i białych

0,3 mol dm<sup>-3</sup> bufor octanowy pH 3,6

10 mmol dm<sup>-3</sup> roztwór 2,4,6-tripirydylo-5-triazyny (TPTZ) w 40 mmol dm<sup>-3</sup> HCl

20 mmol dm<sup>-3</sup> roztwór FeCl<sub>3</sub> (przygotowany tuż przed oznaczeniem)

Wykonanie:

- 1) Próbki win białych rozcieńczyć dziesięciokrotnie wodą, czerwonych pięćdziesięciokrotnie;
- 2) Przygotować roztwór roboczy do oznaczenia CZA: zmieszać bufor octanowy, TPTZ i FeCl<sub>3</sub> w proporcjach 10 : 1 : 1
- 3) Do probówek typu eppendorf odpipetować po 1160 µl roztworu roboczego, do jednej dodać 40 µl wody (próba odnośnikowa), do pozostałych po 40 µl badanych próbek, dokładnie wymieszać
- 4) Po 20 min zmierzyć absorbancję badanych próbek przy 593 nm względem próby odnośnikowej, odczytując jednocześnie na podstawie wcześniej przygotowanej krzywej wzorcowej, jakiemu stężeniu Troloksu odpowiada zmierzona absorbancja
- 5) Obliczyć Całkowitą Zdolność Antyoksydacyjną badanych próbek w jednostkach stężenia jednoelektronowych równoważników Troloksu:  
$$CZA = 2 \cdot \text{stężenie odczytane z krzywej wzorcowej} \cdot \text{rozcieńczenie próbki w kuwecie} \cdot \text{rozcieńczenie wyjściowe} [\mu\text{mol dm}^{-3} \text{ jednoelektronowych równoważników Troloksu}].$$

#### 4. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej win czerwonych i białych metodą redukcji kationorodnika ABTS<sup>•+</sup>

Zasada:

Antyoksydanty na ogół są związkami redukującymi, stąd metody oznaczania ich zawartości w jakimś materiale często opierają się na pomiarze redukcji jakiegoś indykatora przez antyoksydanty. Takim indykatorem może być roztwór kationorodnika ABTS<sup>•+</sup>, który jest związkiem barwnym. Antyoksydanty redukują ABTS<sup>•+</sup> (forma utleniona) do bezbarwnego ABTS (forma zredukowana). Spadek absorbancji jest miarą zawartości antyoksydantów w badanym materiale. Całkowitą Zdolność Antyoksydacyjną (CZA) wyrażamy w jednostkach stężenia jednoelektronowych równoważników Troloksu.

Sprzęt, materiały i odczynniki:

Spektrofotometr

Kuwety spektrofotometryczne

Probówki typu eppendorf

Badane próbki win czerwonych i białych

50 mmol dm<sup>-3</sup> bufor fosforanowy pH 7,4

Wyjściowy roztwór ABTS<sup>•+</sup> (W 7 ml buforu fosforanowego rozpuszczamy 19,5 mg ABTS a następnie 3,3 mg nadsiarczanu potasu. Pozostawiamy w ciemności w temperaturze pokojowej na 12 - 16 godzin. przechowujemy w stanie zamrożonym (-20°C)

Wykonanie:

- 1) Próbki win białych rozcieńczyć dziesięciokrotnie wodą, czerwonych pięćdziesięciokrotnie
- 2) Przygotować roztwór roboczy ABTS<sup>•+</sup>: rozcieńczyć wyjściowy roztwór ABTS buforem fosforanowym o pH 7,4, tak aby jego absorbancja przy długości fali 414 nm wynosiła ok. 1; w czasie pomiarów przechowywać w ciemności
- 3) Odmierzyć do kuwety 2 ml roztworu roboczego, zmierzyć absorbancję przy 414 nm
- 4) Dodać 50 µl badanej próbki, szybko wymieszać i dokładnie po 1 min odczytać absorbancję ponownie
- 5) Odjąć tę wartość absorbancji od zmierzonej przed dodaniem badanej próbki ( $\Delta A_{\text{próby}}$ )
- 6) Identyczne oznaczenie wykonać używając 50 µl wody zamiast badanej próby, obliczyć  $\Delta A_{\text{blank}}$ , odjąć tę wartość od  $\Delta A_{\text{próby}}$
- 7) Na podstawie wcześniej przygotowanej krzywej wzorcowej dla Troloksu (w zakresie stężeń 2 – 25 µmol dm<sup>-3</sup>) obliczyć jakiemu stężeniu Troloksu odpowiada zmierzony spadek absorbancji ( $\Delta A_{\text{próby}} - \Delta A_{\text{blank}}$ )
- 8) Wykonać analogiczne oznaczenie dla wszystkich badanych prób
- 9) Obliczyć Całkowitą Zdolność Antyoksydacyjną (CZA) badanych próbek w jednostkach stężenia jednoelektronowych równoważników Troloksu:  
CZA = 2 · stężenie odczytane z krzywej wzorcowej · rozcieńczenie próbki w kuwecie · rozcieńczenie wyjściowe [µmol dm<sup>-3</sup> jednoelektronowych równoważników Troloksu]

---

Zestawić wyniki z wszystkich doświadczeń, porównać wyniki uzyskane dla win czerwonych i białych, znaleźć potencjalne korelacje pomiędzy zawartością polifenoli i zdolnością antyoksydacyjną, porównać reaktywność w różnych metodach.

---