

Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej naparów metodą ABTS

Wolne rodniki są wysoce reaktywnymi i niebezpiecznymi cząstkami, którym ostatnio przypisuje się kluczową rolę w patogenezie tzw. chorób cywilizacyjnych. Ich wszechobecność powoduje, że żyjemy w chronicznym stresie oksydacyjnym, który jest przyczyną przeciążenia i nieskuteczności naturalnych systemów obronnych organizmów. Wtórne metabolity roślinne obecne w diecie i ekstraktach z roślin leczniczych często wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Istnieje szereg metod pomiaru tej aktywności. Najbardziej rozpowszechnione jest stosowanie tzw. metod *in vitro* (np. DPPH, ABTS, F-C, DMPD).

Celami ćwiczenia jest oznaczenie aktywności przeciwutleniającej naparów kawy lub herbaty

1. Odczynniki, sprzęt i aparatura

- ❖ zlewki o pojemności 250 ml,
- ❖ spektrofotometr,
- ❖ kuweta kwarcowa,
- ❖ waga,
- ❖ pipety,
- ❖ kolbki miarowe
- ❖ ABTS [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]
- ❖ Trolox (masa cząsteczkowa 250,29 g/mol)
- ❖ $K_2S_2O_8$
- ❖ herbata, kawa

2. Przygotowanie roztworów

Roztwór ABTS: 7 mmol/L ABTS (360,2 mg/100 mL) i 2.45 mmol/l $K_2S_2O_8$ (66,22 mg/100 mL) przygotować 24 h przed użyciem

3. Wykonanie oznaczenia:

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotować roztwór wyjściowy Troloxu o stężeniu 16 mg/5 ml w metanolu. Następnie poprzez kolejne rozcieńczenia roztworu wyjściowego sporządzić roztwory o stężeniach: 0; 0,01; 0,04; 0,08; 0,12; 0,016 i 0,2 $\mu\text{mol}/10\text{ ml}$. Do kolbki odmierzyć odpowiednią ilość wzorca, a następnie dodać 300 μl roztworu ABTS i uzupełnić kolbkę do kreski wodą. Zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali 725 nm po 6 minutach od momentu przygotowania próbek. Następnie sporządzić krzywą wzorcową.

Przygotowanie badanej próbki herbaty (kawy)

Na wadze analitycznej odważyć do zlewki ok. **0.2 g herbaty (kawy)**, zalać 100 ml gorącej wody destylowanej, przykryć szkiełkiem zegarkowym i pozostawić do zaparzenia na 20 min. Napary herbaty (kawy) przesączyć przez sączek bibułowy. Pobrać **200 µl** przesącza i przenieść do kolbki na 10 ml, dodać 300 µl ABTS i uzupełnić kolbkę do kreski wodą. Po 6 minutach zmierzyć absorbancję przygotowanych ekstraktów przy długości fali 725 nm.

4. Obliczenie zdolności antyoksydacyjnej

- a) Zdolność antyoksydacyjną [%] obliczyć ze wzoru:

$$\text{ABTS aktywność (\%)} = ((A_c - A_s)/A_c) \times 100\%$$

were: A_c – absorbancja ślepej próbki

A_s – absorbancja próbki

- b) Aktywność przeciwutleniającą wyrazić w mg Troloxu / 100 g próby, wobec krzywej wzorcowej