

**ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z PODSTAW BIOCHEMII DLA  
KOSMETOLOGÓW  
DLA STUDENTÓW II ROKU KOSMETOLOGII**

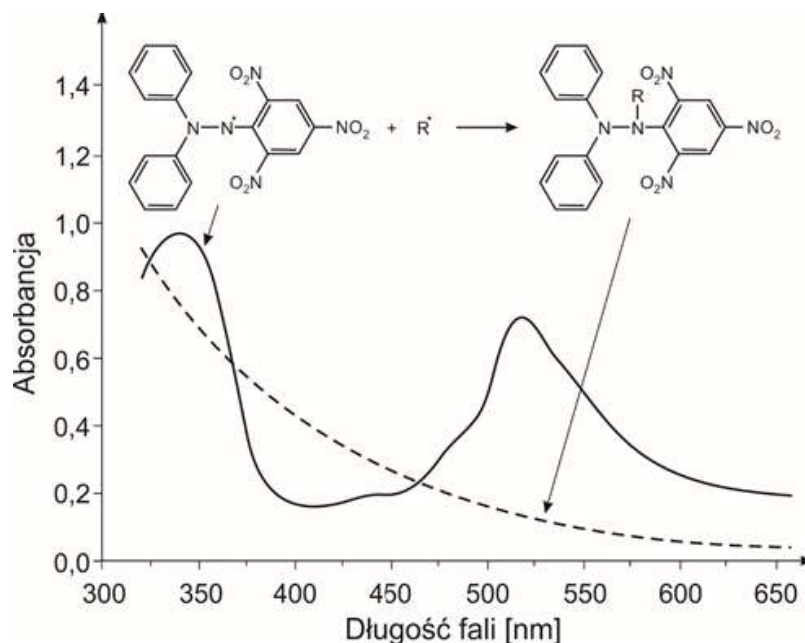
**Ćwiczenie 3. BADANIE WPŁYWU RODZAJU I STĘŻENIA SKŁADNIKÓW  
ANTYOKSYDACYJNYCH ORAZ WARUNKÓW REAKCJI NA  
ZDOLNOŚĆ INAKTYWACJI REAKTYWNYCH FORM TLENU.**

**Zagadnienia do przygotowania:**

1. Definicja reaktywnych form tlenu i ich przykłady.
2. Powstawanie reaktywnych form tlenu w organizmie człowieka.
3. Mechanizmy obrony przez reaktywnymi formami tlenu.
4. Zasada oznaczania zdolności antyoksydacyjnej substancji przy użyciu DPPH.

-----

Aktywność antyoksydacyjną oznaczono posługując się zmodyfikowaną metodą Branda-Wiliamsa i wsp. przy użyciu syntetycznego stabilnego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyd). Przygotowano 0,5 mM alkoholowy roztwór DPPH (19,71 mg DPPH rozpuszczono w 100 g etanolu 96%). Otrzymany roztwór przechowywano w temperaturze 2-8°C chroniąc od światła.



DPPH wykazuje silną zdolność absorpcji światła o długości 519 nm a jego roztwór ma intensywnie fioletowe zabarwienie. Po reakcji ze związkiem o właściwościach antyoksydacyjnych powstaje bezbarwny lub blado żółty roztwór, co powoduje spadek wartości absorpcji przy  $\lambda=519$  nm. Właściwość ta pozwala na bezpośrednie śledzenie przebiegu reakcji i ilościowe oznaczenie liczby cząsteczek rodnika DPPH pozostałych w roztworze przez pomiar zmian wartości absorpcji przy  $\lambda = 519$  nm.

## 1. Badanie zdolności antyoksydacyjnej roztworów kwasu askorbinowego

Przygotować 4 probówki i oznaczyć je 1, 2 3 i 4. Wyjściowy roztwór kwasu askorbinowego o stężeniu 1 mmola/dm<sup>3</sup> należy kolejno dwukrotnie rozcieńczyć wodą destylowaną zgodnie z instrukcją z Tabeli 1 uzyskując roztwory o stężeniu 0,5 mmola/dm<sup>3</sup>, 0,25 mmola/dm<sup>3</sup> i 0,125 mmola/dm<sup>3</sup>.

Tabela 1. Przygotowane rozcieńczenia kwasu askorbinowego

Nr probówki	Stężenie końcowe witaminy C	Objętość wody	Objętość roztworu witaminy C o stężeniu c = 1 mmola/dm <sup>3</sup>
1	1 mmola/dm <sup>3</sup>	0	0,8 ml
2	0,5 mmola/dm <sup>3</sup>	0,4 ml	0,4 ml
3	0,25 mmola/dm <sup>3</sup>	0,6 ml	0,2 ml
4	0,125 mmola/dm <sup>3</sup>	0,7 ml	0,1 ml

Przygotować dwa statywy z 5 probówkami w każdym statywie. Oznaczyć je jako A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> i A<sub>4</sub> w pierwszym statywie i B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> i B<sub>4</sub> w drugim statywie. Do każdej z probówek A<sub>0</sub>-A<sub>4</sub> i B<sub>0</sub>-B<sub>4</sub> odpipetować 1,5 ml 0,5 mM roztworu DPPH a następnie dodać 20 µl roztworu witaminy C lub etanolu 96% o danym stężeniu zgodnie z Tabelami 2 i 3.

Tabela 2. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych do badania aktywności antyoksydacyjnej rozcieńczeń witaminy C w temperaturze pokojowej

Nr probówki	Objętość roztworu DPPH	Objętość roztworu witaminy C o danym stężeniu
A <sub>0</sub>	1,5 ml	20 µl etanolu 96%
A <sub>1</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 1
A <sub>2</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 2
A <sub>3</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 3
A <sub>4</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 4

Tabela 3. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych do badania aktywności antyoksydacyjnej rozcieńczeń witaminy C w temperaturze 2-8 °C

Nr probówki	Objętość roztworu DPPH	Objętość roztworu witaminy C o danym stężeniu
B <sub>0</sub>	1,5 ml	20 µl etanolu 96%
B <sub>1</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 1
B <sub>2</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 2
B <sub>3</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 3
B <sub>4</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z probówki nr 4

Statyw z probówkami A<sub>0</sub>-A<sub>4</sub> ochronić przed światłem i inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Statyw z probówkami B<sub>0</sub>-B<sub>4</sub> ochronić przed światłem i inkubować w temperaturze 2-8°C w lodówce przez 30 minut. Po zakończeniu inkubacji zmierzyć wartość absorpcji dla każdej z próbek A<sub>0</sub>-A<sub>4</sub> i B<sub>0</sub>-B<sub>4</sub> przy długości fali  $\lambda = 519$  nm wobec 96% etanolu jako próby odnośnikowej.

Zdolność antyoksydacyjną danego rozcieńczenia witaminy C obliczyć ze wzoru :

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

gdzie

$A_0$  – wartość absorpcji roztworu rodnika DPPH ( $A_0$  lub  $B_0$ ) przy  $\lambda = 519 \text{ nm}$

$A_i$  – wartość absorpcji danego stężenia roztworu witaminy C  $\lambda = 519 \text{ nm}$  ( $A_1, A_2, A_3$  i  $A_4$  lub  $B_1, B_2, B_3$  i  $B_4$ )

## 2. Badanie zdolności antyoksydacyjnej roztworów kwasu galusowego

Przygotować 4 probówki i oznaczyć je A, B C i D. Wyjściowy roztwór kwasu galusowego o stężeniu  $1 \text{ mmola/dm}^3$  należy kolejno dwukrotnie rozcieńczyć wodą destylowaną zgodnie z instrukcją z Tabeli 4 uzyskując roztwory o stężeniu  $0,5 \text{ mmola/dm}^3$ ,  $0,25 \text{ mmola/dm}^3$  i  $0,125 \text{ mmola/dm}^3$ .

Tabela 4. Przygotowane rozcieńczeń kwasu galusowego

Nr probówki	Końcowe stężenie kwasu galusowego	Objętość wody	Objętość r-ru kwasu galusowego o $c = 1 \text{ mmola/dm}^3$
1	$1 \text{ mmola/dm}^3$	0 ml	0,8 ml
2	$0,5 \text{ mmola/dm}^3$	0,4 ml	0,4 ml
3	$0,25 \text{ mmola/dm}^3$	0,6 ml	0,2 ml
4	$0,125 \text{ mmola/dm}^3$	0,7 ml	0,1 ml

Przygotować dwa statywy z 5 probówkami w każdym statywie. Oznaczyć je jako  $C_0, C_1, C_2, C_3$  i  $C_4$  w pierwszym statywie i  $D_0, D_1, D_2, D_3$  i  $D_4$  w drugim statywie. Do każdej z probówek  $C_0$ - $C_4$  i  $D_0$ - $D_4$  odpipetować 1,5 ml  $0,5 \text{ mM}$  roztworu DPPH a następnie dodać 20  $\mu\text{l}$  roztworu witaminy C lub etanolu 96% o danym stężeniu zgodnie z Tabelami 5 i 6.

Tabela 5. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych do badania aktywności antyoksydacyjnej rozcieńczeń kwasu galusowego w temperaturze pokojowej

Nr probówki	Objętość roztworu DPPH	Objętość roztworu kwasu galusowego o danym stężeniu
$C_0$	1,5 ml	20 $\mu\text{l}$ etanolu 96%
$C_1$	1,5 ml	20 $\mu\text{l}$ roztworu z probówki nr 1
$C_2$	1,5 ml	20 $\mu\text{l}$ roztworu z probówki nr 2
$C_3$	1,5 ml	20 $\mu\text{l}$ roztworu z probówki nr 3
$C_4$	1,5 ml	20 $\mu\text{l}$ roztworu z probówki nr 4

Tabela 6. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych do badania aktywności antyoksydacyjnej rozcieńczeń kwasu galusowego w temperaturze 2-8 °C

Nr próbówki	Objętość roztworu DPPH	Objętość roztworu kwasu galusowego o danym stężeniu
D <sub>0</sub>	1,5 ml	20 µl etanolu 96%
D <sub>1</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z próbówki nr 1
D <sub>2</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z próbówki nr 2
D <sub>3</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z próbówki nr 3
D <sub>4</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu z próbówki nr 4

Statyw z próbkami C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> ochronić przed światłem i inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Statyw z próbkami D<sub>0</sub>-D<sub>4</sub> ochronić przed światłem i inkubować w temperaturze 2-8°C w lodówce przez 30 minut. Po zakończeniu inkubacji zmierzyć wartość absorpcji dla każdej z próbek C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> i D<sub>0</sub>-D<sub>4</sub> przy długości fali  $\lambda = 519$  nm wobec 96% etanolu jako próby odnośnikowej (próbówka C<sub>0</sub> i D<sub>0</sub>).

Zdolność antyoksydacyjną danego rozcieńczenia kwasu galusowego obliczyć ze wzoru:

$$\% \text{inhibicji} = 100\% \cdot (C_0 - C_i) / C_0$$

gdzie

C<sub>0</sub> – wartość absorpcji roztworu rodnika DPPH przy  $\lambda = 519$  nm (C<sub>0</sub> lub D<sub>0</sub>)

C<sub>i</sub> – wartość absorpcji danego stężenia roztworu kwasu galusowego przy  $\lambda = 519$  nm (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> lub D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> i D<sub>4</sub>)

### 3. Porównanie zdolności antyoksydacyjnej różnych antyutleniaczy

Przygotować statyw z 10 próbkami i oznaczyć je jako K<sub>0</sub>, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, K<sub>5</sub>, K<sub>6</sub>, K<sub>7</sub>, K<sub>8</sub> i K<sub>9</sub>. Do każdej z próbek K<sub>0</sub>-K<sub>9</sub> odpipetować 1,5 ml 0,5 mM roztworu DPPH a następnie dodać 20 µl 1mM roztworu badanych antyoksydantów: witaminy C, kwasu galusowego, glutationu zredukowanego, cysteiny, rozcieńczeń kawy mielonej i rozpuszczalnej, zielonej herbaty, czarnej herbaty i czerwonego wina zgodnie z Tabelą 7.

Tabela 7. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych do badania aktywności antyoksydacyjnej wybranych substancji

Nr próbówki	Objętość roztworu DPPH	Objętość roztworu badanego antyoksydanta
K <sub>0</sub>	1,5 ml	20 µl etanolu 96%
K <sub>1</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu 1 mM witaminy C
K <sub>2</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu 1 mM kwasu galusowego
K <sub>3</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu 1mM glutationu zredukowanego
K <sub>4</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu 1 mM cysteiny
K <sub>5</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu rozcieńczenia kawy mielonej
K <sub>6</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu rozcieńczenia kawy rozpuszczalnej
K <sub>7</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu zielonej herbaty
K <sub>8</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu czarnej herbaty
K <sub>9</sub>	1,5 ml	20 µl roztworu czerwonego wina

Statyw z próbkami K<sub>0</sub>-K<sub>9</sub> ochronić przed światłem i inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po zakończeniu inkubacji zmierzyć wartość absorpcji dla każdej z próbek K<sub>0</sub>-K<sub>9</sub> przy długości fali  $\lambda = 519 \text{ nm}$  wobec 96% etanolu jako próby odnośnikowej.

Zdolność antyoksydacyjną danego rozcieńczenia kwasu galusowego obliczyć ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100\% \cdot (K_0 - K_i) / K_0$$

gdzie

K<sub>0</sub> – wartość absorpcji roztworu rodnika DPPH

K<sub>i</sub> – wartość absorpcji roztworu danego antyoksydanta (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, K<sub>5</sub>, K<sub>6</sub>, K<sub>7</sub>, K<sub>8</sub> i K<sub>9</sub>)

### Opracowanie wyników

Na podstawie uzyskanych wyników wykreślić na papierze milimetrowym zależności:

- Zdolności antyoksydacyjnej witaminy C od jej stężenia dla dwóch badanych wartości temperatur.
- Zdolności antyoksydacyjnej kwasu galusowego od jego stężenia dla dwóch badanych wartości temperatur.

Jaki jest wpływ temperatury i stężenia na zdolności antyoksydacyjne badanych związków?

Porównać zdolność antyoksydacyjną roztworów K<sub>1</sub>- K<sub>9</sub> i wyciągnąć wnioski.