

MĚŘENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY (TAC)

Úloha č.1: Vytvoření kalibračních křivek pro standardy metod TEAC a FRAP

A) Vytvořte kalibrační křivku pro metodu TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) - již zpracováno v lab.

- 1) Do malých očíslovaných zkumavek připravte ředěním kalibrační roztoky syntetického vitamínu E – troloxu ze zásobního roztoku o koncentraci $c_{\text{TROLOX}} = 2 \text{ mmol/l}$. Vypočítejte výslednou koncentraci kalibračních roztoků.
- 2) Do paralelních zkumavek napipetujte po 2 ml činidla ABTS. Z připravených kalibračních roztoků odeberte 50 μl a přidejte je do zkumavek s činidlem. Přesně po 10 minutách změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 734 nm.

č. zkumavky	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zás. roztok TROLOX (μl)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
destilovaná voda (μl)	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
c_{TROLOX} (mmol/l)		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
A^{734}											

3) Vytvořte kalibrační graf $A^{734} = f(c_{\text{TROLOX}})$ => osa y ... A^{734} , osa x ... c_{TROLOX} .

B) Vytvořte kalibrační křivku pro metodu FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

- 1) Do malých očíslovaných zkumavek připravte ředěním kalibrační roztoky síranu železnatého ze zásobního roztoku o koncentraci $c_{\text{FeSO}_4} = 1 \text{ mmol/l}$. Vypočítejte výslednou koncentraci kalibračních roztoků.
- 2) Do paralelních zkumavek napipetujte 2 ml činidla FRAP. Z připravených kalibračních roztoků odeberte 50 μl a přidejte je do zkumavek s činidlem v intervalu 30 sekund tak, že přesně po 10 minutách změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 593 nm. (Při přidání 50 μl ze zkumavky 0 spustíte stopky, které necháte běžet, po 30 sekundách přidáváte 50 μl z kalibračního roztoku 1 do paralelní zkumavky 1, atd. Přesně po 10 minutách provedete nulování na slepý vzorek, po dalších 30 sekundách [tedy po 10 minutách a 30 sekundách od prvního přidání ze zkumavky 0] provedete první měření absorbance vzorku 1, atd.).

č. zkumavky	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zás. roztok FeSO_4 (μl)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
destilovaná voda (μl)	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
c_{FeSO_4} (mmol/l)											
A^{593}											

3) Vytvořte kalibrační graf $A^{593} = f(c_{\text{FeSO}_4})$ → osa y ... A^{593} , osa x ... c_{FeSO_4} .

Úloha č.2: Měření celkové antioxidační kapacity vzorků séra

A) Do očíslovaných zkumavek napipetujte po 2 ml činidla ABTS. Ze vzorků séra přidejte do příslušných zkumavek po 50 μ l podle tabulky. Přesně po 10 minutách změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 734 nm. Z kalibrační křivky pro TEAC odečtěte hodnoty koncentrace troloxu.

č. zkumavky	0	1	2
činidlo ABTS (μl)	2000	2000	2000
vzorek séra (μl)	-	50 S1	50 S2
dest. voda (μl)	50	-	-
A⁷³⁴			
c_{TROLOX} (mmol/l)			

B) Do očíslovaných zkumavek napipetujte po 2 ml činidla FRAP. Ze vzorků séra přidejte do zkumavek po 50 μ l. Přesně po 10 minutách změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 593 nm. Z kalibrační křivky pro FRAP odečtěte hodnoty koncentrace FeSO₄.

č. zkumavky	0	1	2
činidlo FRAP (μl)	2000	2000	2000
vzorek séra (μl)	-	50 S1	50 S2
dest. voda (μl)	50	-	-
A⁵⁹³			
c_{FeSO4} (mmol/l)			

Úloha č.3: Měření celkové antioxidační kapacity (TAC) po přidání antioxidačního suplementu

A) Změřte TAC po přidání vitamínu C

- 1) Do malých očíslovaných zkumavek připravte ředěním zásobního roztoku vitamínu C ($c_{vit.c} = 1 \text{ mmol/l}$) vzorky vitamínu C o různé koncentraci.

č. zkumavky	0	1	2	3	4	5
zás. roztok vit. C (μl)	0	100	200	300	400	500
dest. voda (μl)	1000	900	800	700	600	500
$c_{vitamin\ C}$ (mmol/l)						

- 2) Do nových zkumavek napipetujte po 2 ml činidla ABTS. Z připravených vzorků různých koncentrací vitamínu C odeberte 50 μl a přidejte je podle schématu v následující tabulce s intervalem 30 sekund do zkumavek s činidlem. Přesně po 10 minutách od přidání změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 734 nm. Z kalibrační křivky pro TEAC odečtěte hodnoty koncentrace troloxu.

č. zkumavky	0	1	2	3	4	5
činidlo ABTS (μl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
vzorek vit. C (μl)	50	50	50	50	50	50
A^{734}						
c_{TROLOX} (mmol/l)						

- 3) Do nových zkumavek napipetujte po 2 ml činidla FRAP. Z připravených vzorků různých koncentrací vitamínu C odeberte 50 μl a přidejte je podle schématu v následující tabulce s intervalem 30 sekund do zkumavek s činidlem. Přesně po 10 minutách od přidání změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 593 nm. Z kalibrační křivky pro FRAP odečtěte hodnoty koncentrace FeSO_4 .

č. zkumavky	0	1	2	3	4	5
činidlo FRAP (μl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
vzorek vit. C (μl)	50	50	50	50	50	50
A^{593}						
c_{FeSO4} (mmol/l)						

B) Změřte TAC dvou antioxidačních preparátů

- 1) Následující postup provádějte paralelně pro 2 různé tablety. Ve třecí misce rozetřete tabletu antioxidačního preparátu. Prášek přesypte do malé kádinky a rozpusťte v 5 ml destilované vody. Pro odstranění pevných částí přefiltrujte vzniklou suspenzi přes filtrační papír v nálevce do čisté zkumavky. Z takto vzniklého vzorku přepipetujte po jednom ml do kádinky a zřeďte 100 ml destilované vody. Takto zředěné roztoky antioxidačního preparátu budou sloužit jako vzorek T₁ a vzorek T₂.
- 2) Do očíslovaných zkumavek napipetujte po 2 ml činidla ABTS. Z připravených vzorků T₁ a T₂ odeberte podle schématu v tabulce po 50 μl a přidejte je do zkumavek s činidlem. Přesně po 10 minutách změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 734 nm. Z kalibrační křivky pro TEAC odečtěte hodnoty koncentrace troloxu.

č. zkumavky	0	1	2
činidlo ABTS (μl)	2000	2000	2000
vzorek T1 (μl)	-	50	-
vzorek T2 (μl)	-	-	50
destilovaná voda (μl)	50	-	-
A⁷³⁴			
C_{TROLOX} (mmol/l)			

- 3) Do očíslovaných zkumavek napipetujte po 2 ml činidla FRAP. Z připravených vzorků T₁ a T₂ odeberte podle schématu v tabulce po 50 μl a přidejte je do zkumavek s činidlem. Přesně po 10 minutách změřte absorbanci proti slepému vzorku (zkumavka č. 0) při 593 nm. Z kalibrační křivky pro FRAP odečtěte hodnoty koncentrace FeSO₄.

č. zkumavky	0	1	2
činidlo FRAP (μl)	2000	2000	2000
vzorek T1 (μl)	-	50	-
vzorek T2 (μl)	-	-	50
destilovaná voda (μl)	50	-	-
A⁵⁹³			
C_{FeSO4} (mmol/l)			

Úloha č.4: Měření celkové antioxidační kapacity slin

- 1) Vyšetření se provádí nejdříve 30 minut po jídle. Vyšetřovaná osoba si vloží do úst sací váleček. Mírným žvýkáním nebo převalováním v ústech po dobu 1 minuty dojde k nasátí slin do válečku. Vatový váleček se pak vloží zpět do příslušné centrifugační zkumavky Salivette, která se uzavře víčkem. K získání vzorku slin se provede odstředění po dobu 2 minut při rychlosti 2.500 ot./min.
- 2) Připravte do stojanu zkumavky podle schématu v následující tabulce (počet zkumavek na každou metodu stejný jako počet studentů v laboratorní skupině + 1 pro slepý vzorek). Do první přidejte 50 μ l destilované vody (bude sloužit jako slepý vzorek metody ABTS) a stiskněte stopky. Pak po 30 sekundách přidávejte do každé další zkumavky 50 μ l vzorku slin (mezi různými vzorky slin vyměňujte špičku). Stejným způsobem pak postupujte i u druhé metody.

	Stud.1	Stud.2	Stud.3	Stud.4	Stud.1	Stud.2	Stud.3	Stud.4		
č. zkumavky	0A	1A	2A	3A	4A	0F	1F	2F	3F	4F
činidlo ABTS (μl)	2000	2000	2000	2000	2000	-	-	-	-	-
činidlo FRAP (μl)	-	-	-	-	-	2000	2000	2000	2000	2000
vzorek slin (μl)	-	50	50	50	50	-	50	50	50	50
dest. voda (μl)	50	-	-	-	-	50	-	-	-	-
A⁷³⁴										
C_{TROLOX} (mmol/l)										
A⁵⁹³										
C_{FeSO4} (mmol/l)										

- 3) Přesně po 10 minutách změřte absorbanci roztoků s přidanými slinami proti slepému vzorku (zkumavka č. 0A) při 734 nm pro metodu TEAC a proti slepému vzorku (zkumavka č. 0F) při 593 nm pro metodu FRAP.
- 4) Z kalibrační křivky pro TEAC odečtěte hodnoty koncentrace troloxu a z kalibrační křivky pro FRAP odečtěte hodnoty koncentrace FeSO₄. Srovnejte získané hodnoty s fyziologickým rozmezím (sliny TAC = 0,3 - 1,0 mmol/l troloxu).
- 5) Vytvořte graf korelace mezi hodnotami TEAC (mmol/l troloxu) a hodnotami FRAP (mmol/l FeSO₄) jako TEAC = fce(FRAP) pro změřené hodnoty vzorků slin všech studentů v laboratoři. Uveďte parametrické vyjádření korelační přímky ($y = k \cdot x + q$) a korelační koeficient.

Příprava činidel a zásobních roztoků

Příprava činidla ABTS:

- Navážit 0,192g ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)], rozpustit a doplnit na 100 ml destilovanou vodou.
- Navážit 1,622g $K_2S_2O_8$ [peroxodisíran draselný], rozpustit a doplnit na 100 ml destilovanou vodou.
Roztoky **a** a **b** uchovávat v lednici jako zásobní roztoky.
Před praktikem:
- Smíchat **a** + **b** v poměru 800 μ l **a** + 400 μ l **b** a nechat za občasného promíchání reagovat 5 minut při laboratorní teplotě.
- Vzniklý tmavě-modrý roztok se doplní 50 ml čerstvého acetátového pufru (pH = 4,3).

Příprava činidla FRAP:

- Navážit 0,310 g TPTZ [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine], rozpustit a doplnit na 100 ml 40 mmol/l HCl.
- Navážit 0,540g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ [hexahydrát chloridu železitého], rozpustit a doplnit na 100 ml destilovanou vodou.
Roztoky **a** a **b** uchovávat v lednici jako zásobní roztoky.
- Připravit acetátový pufr o pH = 3,6.
- Smíchat roztoky **a** + **b** + **c** v poměru 1:1:10.

Příprava zásobního roztoku $FeSO_4$ (c = 1 mmol/l):

- Navážit 0,278g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ [heptahydrát síranu železnatého], rozpustit a doplnit na 1 litr destilovanou vodou.

Příprava zásobního roztoku vitamínu C (c = 1 mmol/l):

- Navážit 0,176g vitamínu C [kyselina L-askorbová], rozpustit a doplnit na 1 litr destilovanou vodou.

Příprava acetátového pufru (pH = 4,3):

- Na 1 litr pufru smíchat 600 ml 0,1M kyseliny octové a 400 ml 0,1M octanu sodného.

Příprava acetátového pufru (pH = 3,5):

- Na 1 litr pufru smíchat 800 ml 0,1M kyseliny octové a 200 ml 0,1M octanu sodného.

Příprava zásobního roztoku TROLOX (c = 2 mmol/l):

- Navážit 0,501g TROLOXu [6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid], rozpustit a doplnit na 1 litr destilovanou vodou.