ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΒΙΟΠΟΛΙΣ, ΜΕΖΟΥΡΛΟ
41500 ΛΑΡΙΣΑ

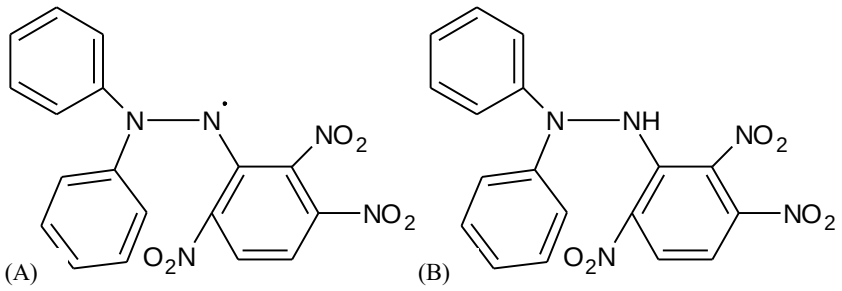
ΤΗΛ. (2410) 565271
ΦΑΞ. (2410) 565290
Email: dkouret@uth.gr

UNIVERSITY OF THESSALY
BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY DEPT
VIOPOLIS, MEZOYRLO
LARISSA, 41500-GREECE
TEL. 2410-565271
FAX. 2410-565290
Email: dkouret@uth.gr
Demetrios Kouretas
Professor

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΗΛΟΞΥΔΟΥ ΚΑΙ ΜΗΛΟΞΥΔΟΥ ΜΕ ΚΟΥΡΚΟΥΜΑ.

1.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Η μέθοδος, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Σχήμα 1). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Σχήμα 1), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση.



Σχήμα 1 (Α) Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•).

(Β) Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Για το διάλυμα DPPH (stock: 2mM), ενδεικτικά προστίθενται σε 25,4ml μεθανόλης, 20mg DPPH. Το αντιδραστήριο ετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος, και αφού διαλυθεί το DPPH, με ανάδευση μπορεί να διατηρηθεί στους +4°C, απουσία φωτός μέχρι και 3 ημέρες, ειδικά σε περίπτωση επανάληψης της μέτρησης.

Αρχικά, σε eppendorfs του 1 mL, προστίθενται 900μL μεθανόλης, 50μL του εξεταζόμενου εκχυλίσματος και 50μL DPPH, τελευταίο σε σειρά λόγω της φωτοευαισθησίας που παρουσιάζει, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της ρίζας να είναι 100μM. Δείγμα μόνο με μεθανόλη (1000μl) παρασκευάζεται με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου (blank), ενώ θετικοί μάρτυρες (control) παρασκευάζονται με προσθήκη μεθανόλης (950μL) και DPPH (50μL). Το εκχύλισμα (50μL) εξετάζεται επίσης και ως προς την ικανότητα να απορροφά από μόνο του, μόνο με την προσθήκη (950μL) μεθανόλης. Μετά από καλή ανάδευση με vortex, τα δείγματα επωάζονται στο σκοτάδι για 20 λεπτά και ακολουθεί φασματοφωτομέτρησή τους στα 517nm, με γυάλινη κυψελίδα, για πιο ακριβή αποτελέσματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, αξίζει να σημειωθεί πως εξετάστηκε δείγμα χυμού μηλόξυδου και μηλόξυδου με κουρκουμά, σε διαφορετικές αραιώσεις από το αρχικό δείγμα.

Η % αναστολή σχηματισμού, δηλαδή η εξουδετέρωση, της ρίζας DPPH, υπολογίζεται από τον τύπο:

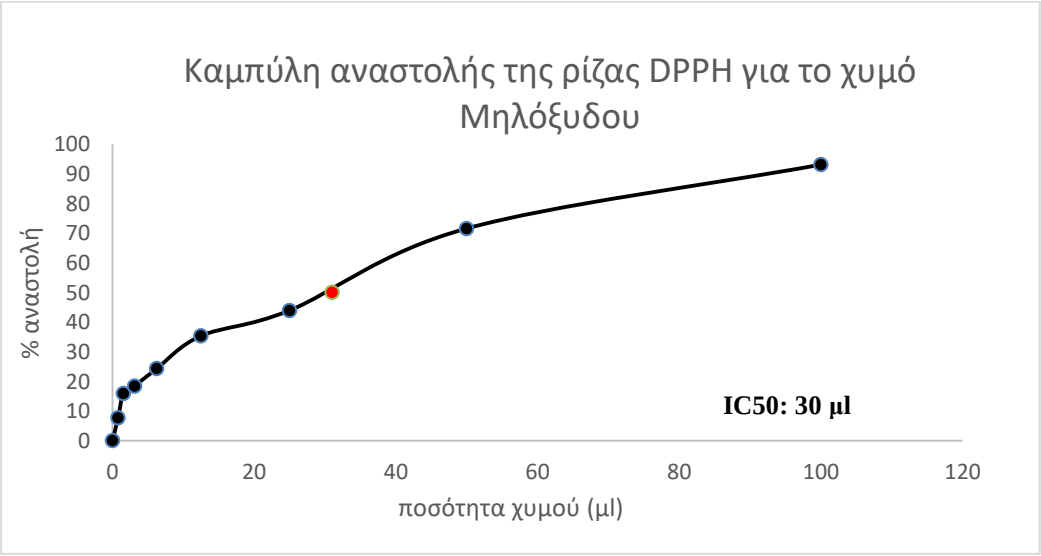
$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_\delta) / A_o \times 100, \text{ όπου}$$

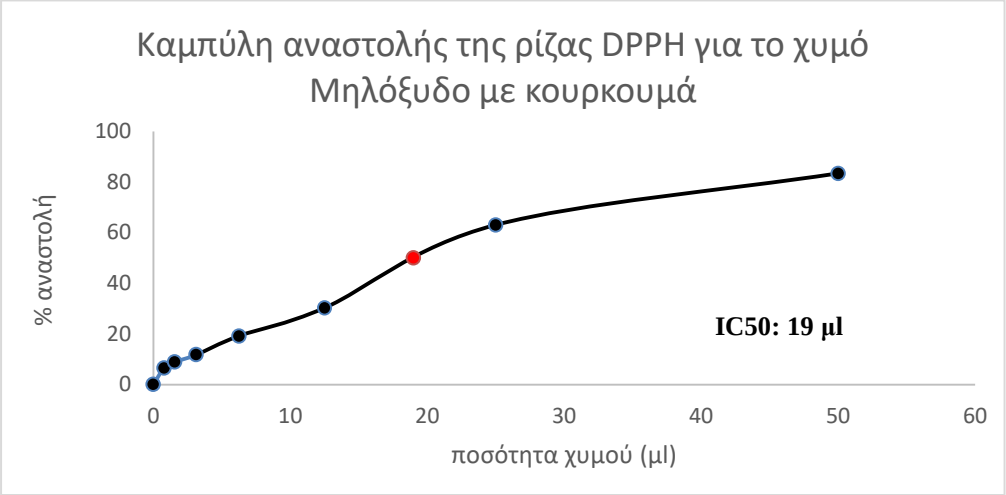
A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_δ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

Η καμπύλη % Αναστολή- Ποσότητα χυμού μηλόξυδου και μυλόξυδου με κουρκουμά (σε μl), όπως φαίνεται παρακάτω κατασκευάζεται σε υπολογιστικό φύλλο excel, με στόχο τον υπολογισμό της αντίστοιχης εξίσωσης από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης (οι τιμές που είναι στο μη γραμμικό τμήμα πρέπει να αφαιρεθούν).

Από την καμπύλη υπολογίζεται για το δείγμα απευθείας και η τιμή της ημιμέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωση (IC_{50}), δηλαδή η συγκέντρωση του δείγματος χυμού μυλόξυδου και μηλόξυδου με κουρκουμα που απαιτείται για αναστολή κατά 50% της ρίζας DPPH in vitro. Αυτή η τιμή, χρησιμοποιείται ως ένα μέτρο της δραστικότητας και αποτελεσματικότητας μιας ουσίας ή ενός εκχυλίσματος στην αναστολή συγκεκριμένης, βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας και είναι συγκρίσιμη με τιμές IC_{50} άλλων ουσιών ή εκχυλισμάτων.





Η αντιοξειδωτική δράση και των δύο δειγμάτων κρίνεται εξαιρετική.