



Πάτρα 15 Μαΐου 2018

### **Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης του προϊόντος ANTI SPOT (in vitro)**

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στα πειράματα μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης της κρέμας στηρίχτηκε στη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Brand-Williams<sup>(1)</sup> σε συνδυασμό με την αντίστοιχη του Kim<sup>(2)</sup> και χρησιμοποιεί τη ρίζα 1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH).

Μια ποσότητα κρέμας (0.310g) διαλύθηκε σε 80% μεθανόλη (διάλυμα A: 2ml). Ακολούθησε η παρασκευή διαλύματος 1mM DPPH σε 80%(v/v) μεθανόλη και ανάδευση για 40 min (Διάλυμα B). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης του και αραίωση του διαλύματος B με 80%(v/v) μεθανόλη μέχρι η απορρόφηση στο UV-Vis να δίνει τιμές μικρότερες του 1 (Διάλυμα Γ: συγκέντρωση DPPH  $0.087 \times 10^{-2}$  mM). Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν πέντε δείγματα που περιείχαν 5μl του διαλύματος A και 2,95mL διαλύματος DPPH σε τελικό όγκο 3mL. Ακολούθησε η επώαση τους για 40 min σε σκοτεινό θάλαμο.

Μετά την επώαση, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517nm.

- ♦ Sample: 2,995 μL διαλύματος Γ (DPPH) και 5 μL διαλύματος A (κρέμα). Το προκύπτον μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση (100 rpm, 30 min) σε σκοτεινό θάλαμο. Η διαδικασία πραγματοποιείται τρεις φορές (δείγματα 1, 2 και 3). Περιεχόμενες ποσότητες: 102.5 μg DPPH και 775 μg κρέμας (συγκέντρωση: 258.33 μg/mL).
- ♦ Blank: 2,995 μL διαλύματος μεθανόλης 80% v/v και 5 μL από το διάλυμα A (κρέμα). Περιεχόμενη ποσότητα: 775 μg κρέμας.
- ♦ Control: 2,995 μL διαλύματος Γ (DPPH) και 5 μL διαλύματος μεθανόλης 50% v/v. Περιεχόμενη ποσότητα: 102.5 μg DPPH.

Το ποσοστό αναστολής της ρίζας (scavenging activity percentage) I% υπολογίζεται

από τον τύπο: 
$$I\% = 100 - \frac{[Abs (sample) - Abs (blank)] * 100}{Abs (control)}$$

### Αποτελέσματα

Το ποσοστό παρεμπόδισης των ελεύθερων ριζών (I%) από την κρέμα που δοκιμάστηκε.

Πίνακας 1: Υπολογισμός ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH από το δείγμα		
Δείγμα	Απορρόφηση (517nm)	I%
Blank	0.022	-
Control	0.929	-
Sample 1	0.472	51.56
Sample 2	0.419	57.27
Sample 3	0.440	55.01
Mean		<b>54.61</b>
SD		<b>2.88</b>

*Παρασκευή καμπύλης βαθμονόμησης ασκορβικού οξέος:*

### Πειραματική διαδικασία:

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί έκφραση του αποτελέσματος μέσω σύγκρισης πρότυπης ουσίας, σχεδιάστηκε και παρασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης με ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C). Παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης τα οποία αντέδρασαν με το DPPH ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω.

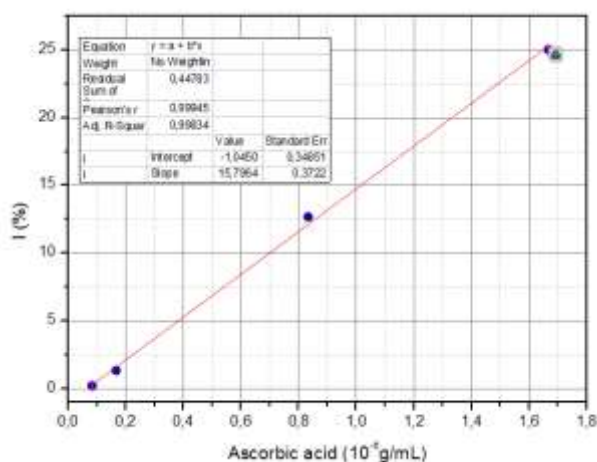
### Διαλύματα:

- Διάλυμα 1: Σε vial αναμειγνύουμε 0.001 g ασκορβικού οξέος σε 1 ml διαλύματος μεθανόλης 80% v/v με τελική συγκέντρωση 5.7 mM.
- Διάλυμα 2: Αναμείχθηκαν 0.25ml του διαλύματος 1 με 0,25ml διαλύματος μεθανόλης 80% v/v με τελική συγκέντρωση 2.85 mM. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιέχεται στο διάλυμα είναι 251 μg.
- Διάλυμα 3: 0.1 ml του διαλύματος 2 αναμείχθηκαν με 0.4 ml διαλύματος μεθανόλης 80% v/v με τελική συγκέντρωση 0.57 mM. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιέχεται στο διάλυμα είναι 50.2 μg.
- Διάλυμα 4: Έγινε ανάμειξη 0.25 ml του διαλύματος 3 με 0.25 ml του διαλύματος μεθανόλης 80% v/v και το διάλυμα που προέκυψε είχε συγκέντρωση 0.285 mM. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιείχε το διάλυμα ήταν 25.1 μg.

### Δείγματα που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis:

- ♦ Control: 2.995  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\Gamma$  (DPPH) και 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος μεθανόλης 50% v/v.
- ♦ Sample 1: 2.995  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\Gamma$  (DPPH) και 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος 1. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιείχε το διάλυμα ήταν 5  $\mu\text{g}$ .
- ♦ Sample 2: 2.995  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\Gamma$  (DPPH) και 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος 2. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιείχε το διάλυμα ήταν 2.5  $\mu\text{g}$ .
- ♦ Sample 3: 2.995  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\Gamma$  (DPPH) και 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος 3. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιείχε το διάλυμα ήταν 0.5  $\mu\text{g}$ .
- ♦ Sample 4: 2.995  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\Gamma$  (DPPH) και 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος 4. Η ποσότητα του ασκορβικού που περιείχε το διάλυμα ήταν 0.25  $\mu\text{g}$ .

Όνομα δείγματος	Απορρόφηση (Abs) στα 517 nm	I%
Blank	0.000	
Control	0.899	
Sample 1	0.674	25.03
Sample 2	0.785	12.68
Sample 3	0.887	1.33
Sample 4	0.897	0.22



Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weightin		
Residual Sum of Squares	0.44783		
Pearson's r	0.99945		
Adj. R-Square	0.99834		
		Value	Standard Err
I	Intercept	-1,0450	0,34851
I	Slope	15,7964	0,3722

**Διάγραμμα 1:** Καμπύλη βαθμονόμησης με ασκορβικό οξύ. Στον άξονα y παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH που παρουσιάζει η αντίστοιχη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (άξονας x).

Από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει η εξίσωση:

$$y = -1.04505 + 15.796x \quad (2),$$

Με βάση την εξίσωση 2 υπολογίζεται η συγκέντρωση ασκορβικού που αντιστοιχεί στη μέση αναστολή ( $I\%=54.61$ ) που προκάλεσε το προς εξέταση δείγμα.

$$x = 3.52 \mu\text{g/mL}$$

### Σύνοψη αποτελεσμάτων:

Πίνακας 3: Αποτελέσματα αναστολής της ρίζας DPPH που προκάλεσε το η δοκιμαζόμενη συγκέντρωση δείγματος και η αντίστοιχη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος		
Όνομα δείγματος	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/mL}$ )	I (%)
Sample (κρέμα)	258.33	54.61
Ασκορβικό οξύ (πρότυπο)	3.52	54.61

### Συμπεράσματα:

Το προϊόν ANTI SPOT προκάλεσε την αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH. Ως πρότυπη ένωση αναφοράς με επιβεβαιωμένη αντιοξειδωτική δράση χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ.

Το δείγμα της κρέμας που αξιολογήθηκε είχε συγκέντρωση 258.33 $\mu\text{g/ml}$ . Εάν ληφθεί υπόψη ότι ο αντιοξειδωτικός παράγοντας στο προϊόν (εκχύλισμα) απαντάται σε περιεκτικότητα 1.0% η συγκέντρωσή του στο δείγμα υπολογίζεται ότι είναι 2.58 $\mu\text{g/ml}$ .

Τα ποσοτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι απαιτείται η δράση διαλύματος κρέμας συγκέντρωσης 258.33 $\mu\text{g/ml}$  (συγκέντρωση αντιοξειδωτικού στο δείγμα: 2.58 $\mu\text{g/ml}$ ) ισοδυναμεί με αυτή διαλύματος ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 3.52 $\mu\text{g/ml}$ .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το προϊόν ANTI SPOT έχει πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση.

### Βιβλιογραφία

1. Brand-Williams, W, Cuvelier, M E, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity (1995) *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **28**, 25-30
2. Kim D-O, Lee, KW, Lee HJ, Lee CY: Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3713–3717