

Protokol pro fotometrické stanovení antioxidační aktivity v biologickém vzorku

AN ASSAY FOR SPECTROMETRIC DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF A BIOLOGICAL EXTRACT

Jiří Sochor, Petr Salaš, Josef Zehnálek, Boris Krška, Vojtěch Adam, Ladislav Havel, René Kizek
Mendelova univerzita v Brně

Volné radikály jsou zcela přirozeně tvořeny ve velkém počtu biologických i chemických systémech. Jsou to atomy nebo molekuly schopné samostatné existence, mající ve svém elektronovém obalu jeden, vzácně i více, volných elektronů. Reaktivními formami volných radikálů může být atakována většina biomolekul (nejzávažnější jsou reakce s biologickými membránami a nukleovými kyselinami). Radikály mohou být příčinou patologických stavů, nebo se naopak tvoří jako důsledek různých patologických stavů a způsobují sekundární poškození v živých organismech. Proti toxickému působení volných radikálů a reaktivních metabolitů má organismus vybudovány obranné mechanismy, kterými eliminuje tvorbu radikálů, nebo snižuje jejich negativní účinky. Cílem práce bylo optimalizovat a přesně popsat pět fotometrických metod sloužících ke stanovení antioxidační aktivity biologického vzorku.

Experimentální část

Použit byl automatický spektrofotometr BS-200 (Mindray, China), který se skládá z kyvetového prostoru (temperovaný na 37 ± 1 °C), reagenčního prostoru s karuselem pro reagenty a přípravu vzorků (temperovaný na 4 ± 1 °C) a optického detektoru. Přenos vzorků a reagentů zabezpečuje robotické rameno s dávkovací jehlou (chyba dávkování do 5 % objemu). Obsah kyvet je promíchán automatickým míchadlem ihned po přidání činidla nebo vzorku.

Výsledky a diskuze

V oblasti chemických analýz a biologického hodnocení antioxidačních charakteristik byly v posledních letech vypracovány četné metody umožňující stanovení antioxidační aktivity. Jsou principiálně odlišné a postupně se vyvíjí jejich modifikace. Jejich základním smyslem je charakterizovat antioxidační aktivitu v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí, avšak většina z nich není optimalizována pro automatizovanou analýzu. Naším cílem bylo navrhnout a optimalizovat fotometrické testy na automatickém analyzátoru BS-200.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH[•] testu

Postup měření: Metodu stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH[•] testu je možné použít pouze u vzorků s nízkými hodnotami antioxidační aktivity vyjádřenými následující koncentrací Troloxu 0,01–0,15 mmol.l⁻¹. Ve vyšších koncentracích (nad 0,2 mmol.l⁻¹ Troloxu) jsou hodnoty absorbance záporné, což značí, že antioxidy v měřeném vzorku dokázaly zhasit či vyčtyat všechny volné radikály. Chceme-li touto metodou stanovit vyšší antioxidační aktivitu, musíme je příslušné vzorky naředit

do požadovaného rozmezí. Získaná kalibrační křivka pro tuto metodu byla určena jako $y = 465,46x + 15,461$ při spolehlivosti $R^2 = 0,997$ a relativní směrodatné odchylce stanovení 3,4 %.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody TEAC

Postup měření: Limit pro měření metodou TEAC byl do koncentrace 0,4 mmol.l⁻¹ standardu Troloxu. Ve vyšších koncentracích dosahovaly absorbance záporných hodnot. Pro analýzu vzorků s antioxidační aktivitou vyšší než ekvivalent 0,4 mmol.l⁻¹ Troloxu je nutné jejich naředit. Byla sestrojena kalibrační křivka $y = 230,21x + 5,9326$ při spolehlivosti $R^2 = 0,999$ a relativní směrodatné odchylce stanovení 2,9 %.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

Postup měření: Pro metodu FRAP byly sestrojeny kalibrační křivky dvě. U velmi nízkých hodnot (0,01–0,15 mmol.l⁻¹ standardu Troloxu) hodnoty nebyly lineární a přepočtení bylo v tomto případě logaritmické $y = 0,07 \ln(x) + 0,4638$, $R = 0,994$. Hodnoty v rozmezí 0,15–1 mmol.l⁻¹ Troloxu linearity dosahovaly. Kalibrační křivka pro tyto hodnoty je $y = 0,8286x + 0,2101$, při spolehlivosti $R^2 = 0,999$ a relativní směrodatné odchylce stanovení 3,1 %.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DMPD

Postup měření: Se vzrůstající antioxidační kapacitou vyjádřenou stoupající koncentrací Troloxu, byl pozorován pokles absorbance. Hodnoty vyšší než 0,7 mmol.l⁻¹ ekvivalentu standardu Troloxu nebylo možno detekovat z důvodu nelinearity pozorované odpovědi. Byla získána kalibrační křivka: $y = -0,0839x + 0,2579$ při spolehlivosti $R^2 = 0,997$ a relativní směrodatné odchylce stanovení 3,9 %.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody Free Radicals Kit

Postup měření: Pro metodu Free Radicals Kit byla doporučena kalibrace na Fe²⁺ mmol.l⁻¹. Získaná kalibrační křivka měla následující parametry: $y = 0,035x + 0,2667$ a koeficient regrese $R^2 = 0,996$. Naši snahou však bylo srovnání metod z hlediska stejného standardu. Proto byl použit také přepočtení na Trolox jako u ostatních metod. Při měření Troloxu měly hodnoty se zvyšující se koncentrací klesající průběh získaných hodnot. Metodu lze použít pro analýzu v oblasti 0,25–0,9 mmol.l⁻¹ Troloxu. Kalibrační křivka pro Trolox byla $y = -0,0075x + 0,3002$ při spolehlivosti $R^2 = 0,992$ a relativní směrodatné odchylce stanovení 2,8 %.

Poděkování: Práci podpořil grant IGA ZF MENDELU 9/2010/591, 2B08020 NPV II, QJ91A032 a REMEDTECH GA ČR 522/07/0692.

Sochor J., Salaš P., Zehnálek J., Krška B., Adam V., Havel L., Kizek R.: An assay for spectrometric determination of antioxidant activity of a biological extract

Antioxidant activity is defined as the ability of a compound or a mixture of compounds inhibit oxidative degradation of various substances (e.g., preventing lipid peroxidation). Methods used for determination of antioxidant activity bases on the direct reaction of compound of interest with radicals (scavenging or complexing) or on the reaction with transition metals. The aim of this study was to optimize, automate and accurately describe the protocols of five photometric methods: the DPPH, TEAC, FRAP, DMPD and Free

Radicals Kit, used to determine the antioxidant activity of a biological sample. Methods were standardized using the substance Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Advantages, disadvantages and limitations of each method were discussed.

Key words: antioxidant activity, spectrometry, Trolox.

Kontaktní adresa – Contact address:

Ing. Jiří Sochor, Mendelova univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail:sochor.jirik@seznam.cz