

## ASSAY OF NATURAL ANTIOXIDANTS POTENCY USING PIPETING ROBOT AND SPEKTROFOTOMETRY

### STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ AUTOMATICKÉHO ROBOTA A SPEKTROFOTOMETRU

Dobeš J.<sup>1</sup>, Sochor J.<sup>1</sup>, Ruttkay-Nedecký B.<sup>1</sup>, Adam V.<sup>1</sup>, Kizek R.<sup>1,2</sup>, Klejdus B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: sochor.jirik@seznam.cz

#### ABSTRACT

This work deals with the comparing antioxidant activity standards gallic acid, ferulic acid, quercitrin and rutin with oxidative status model cell lines. The assay was carried out by methods DPPH', ABTS', DMPD', FRAP' and free radicals. Antioxidant activity was determined individual standards in relation to time, concentration and temperature, compared the characteristics of each set of radicals and their antioxidant capacity. We decided to introduce fully automated assay of antioxidants using not only automated sample measurement but also processing of samples and application of reagents. Automated pipetting system epMotion 5075 and the automated spectrophotometer BS 400 were chosen for the assay purposes. All of the tested methods were found suitable for implementation in the automated assay. Owing to the capacity of the method, approximately 240 samples per hour (one sample per 15 seconds) can be assayed using the automated protocol.

**Key words:** antioxidant activity, antioxidant, oxidative stress, automatization

**Acknowledgments:** This work was supported by project „Postdoc CZ.1.07/2.3.00/30.0017“ and SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

## ÚVOD

Udržování vnitřních podmínek v organismu je prvořadým úkolem biochemických procesů. Fyziologickou funkcí antioxidantů je rovnováha mezi výrobou reaktivního kyslíku a dusíku. Když jsou antioxidanty v nedostatku, dochází k oxidačnímu stresu. Mnohé patologické procesy jsou důsledkem produkce reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů, např. Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, nebo se účastní patologických procesů, kde má oxidační stres klíčovou úlohu. Podávání antioxidantů je považováno za způsob jak zabránit patologickým důsledkům oxidačního stresu. Zejména rostlinné extrakty jsou vhodné a snadno dostupné produkty pro prevenci patologických jevů (Bouayed, a kol., 2011, Esmaili a Sonboli, 2010, Kaviarasan, a kol., 2007, Kuo, a kol., 2009, Re, a kol., 1999, Reckziegel, a kol., 2011, Uysal, a kol., 1989). Výzkum antioxidační aktivity není stále standardizovaný a výsledky tak mohou být ovlivněny v důsledku metodické chyby nebo i lidským faktorem (Mariod, a kol., 2010, Müller, a kol., 2011, Parejo, a kol., 2000, Stiborová, a kol., 2011). Implementace standardních protokolů s automatizovaným postupem stanovení je vhodná nejen pro zjednodušení a úsporu nákladů, ale je rovněž nezbytná pro snížení testu nejistoty. Tento experiment je zaměřen na plně automatizovaný postup, vhodný pro rychlé a spolehlivé stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v biologických vzorcích. Využívá plně automatizované manipulace se vzorky a činidly za účelem získání výsledků s eliminací lidských chyb a s úsporou nákladů.

## MATERIÁL A METODIKA

### Chemikálie

Deionizovaná voda, rutin, kvercetin, kyselina ferulová a gallová, 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxid (DMSO), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS), peroxidisíran draselný, 2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ), kyselina chlorovodíková, hexahydrát chloridu železitého, trihydrát octanu sodného, N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen (DMPD), kyselina octová. Chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Reakční pufr, koncentrát, chlorofylin a jeho katalyzátor byly zakoupeny od SEDIUM R & D (Česká republika).

### Standardy

Byly použity standardy rutinu, kvercetin, kyseliny ferulové a gallové v koncentracích 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 a 1000 mg/ml. Standardní kalibrační roztoky byly vytvořeny automatizovaným ředěním roztoků 1000, 100 a 10 mg/ml pomocí deionizované vody.

### Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Principem DPPH testu je schopnost stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH• vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukcí antioxidantem (AH) nebo radikálem (R•) roztok odbarví dle následující reakce:  $\text{DPPH}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH H} + \text{A}\cdot$ ,  $\text{DPPH}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{DPPH-R}$ .

Do plastových kyvet bylo pipetováno 150  $\mu\text{l}$  reagentie R1 (0,095 mM 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl-DPPH•), následně bylo přidáno 15  $\mu\text{l}$  měřeného vzorku. DPPH• test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH• vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Absorbance byla měřena 12 minut při  $\lambda = 505 \text{ nm}$ .

### Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

ABTS metoda je jedním z nejvíce používaných testů na stanovení koncentrace volných radikálů. Princip stanovení je založen na neutralizaci radikalkationtu vzniklého jedno elektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS• (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS• – e- ABTS•+. Tato reakce je monitorována spektrofotometricky, měří se změna absorbance.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 150  $\mu\text{l}$  reagentie R1 (7 mM ABTS• (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina a 4,95 mM peroxodisíran draselný), následně bylo přidáno 3  $\mu\text{l}$  vzorku. Absorbance byla měřena při  $\lambda = 660 \text{ nm}$  po dobu 12 minut.

### Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na redukcí železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým ( $\text{FeCl}_3$ ), které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukcí tvoří modře zbarvený železnatý komplex. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3.6) a nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly.

Příprava reagentie: 1. 10 mM roztok TPTZ, doplnit po rysku 40 mM kyselinou chlorovodíkovou (HCl); 2. roztok 20 mM  $\text{FeCl}_3$ ; 3. acetátový pufr 20 mM, pH 3,6; tyto tři roztoky se smíchají v poměru TPTZ:  $\text{FeCl}_3$ : acetátový pufr – 1:1:10. Reagentie je použitelná týden při uskladnění v temném prostředí a teplotě 4 °C. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150  $\mu\text{l}$  reagentie a následně bylo přidáno 3  $\mu\text{l}$  vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při  $\lambda = 605 \text{ nm}$ .

### Stanovení antioxidační aktivity metodou DMPD

Sloučenina DMPD (N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen) je působením železité soli v roztoku převedena na relativně stabilní a barevnou radikálovou formu DMPD•+. Sloučeniny s antioxidační aktivitou jsou schopny DMPD•+ radikály zhaset a tím dochází k odbarvení roztoku a poklesu absorbance.

Do plastových kyvet bylo pipetováno 160  $\mu$ l reagenie R1 (200 mM N, N-dimethyl-p-fenyldiamin-DMPD, 0,05 M FeCl<sub>3</sub>, 0,1 M acetátový pufr pH 5,25), následně bylo přidáno 4  $\mu$ l měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při  $\lambda = 505$  nm.

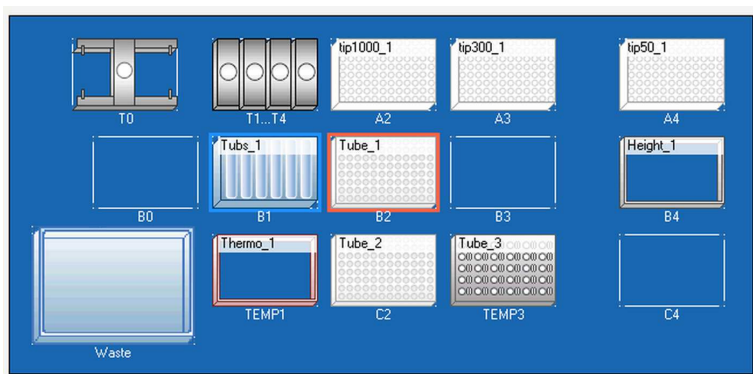
### Stanovení antioxidační aktivity metodou Free radicals

U této metody je využíváno schopnosti chlorofylinu (sodno-mědnatá sůl chlorofylu) přijímat a odevzdávat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. Tento děj je podmíněn alkalickým prostředím a přidávkem katalyzátoru. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150  $\mu$ l reagenie R1 (0,1 M HCl, extrakt chlorofylinu, reakční pufr, katalyzátor) a následně bylo přidáno 6  $\mu$ l vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při  $\lambda = 450$  nm

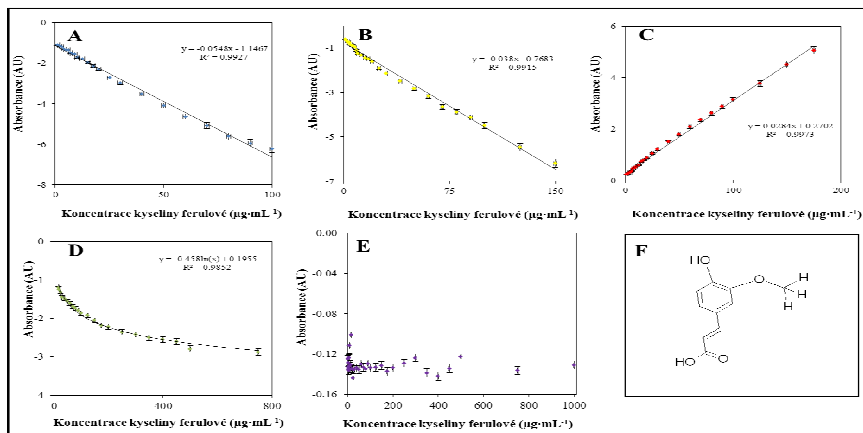
## VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro testovací účely bylo použito pět metod popsanych v experimentální části. Byl vybrán rutin, kvercetin, kyselina ferulová a gallová pro automatizované stanovení antioxidační aktivity. Nejprve byla testována kyselina ferulová (obr. 2). Závislost absorbance na koncentraci kyseliny ferulové byla měřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR (obr. 2 A, B, C, D a E). Kyselina ferulová je znázorněna na obr. 2 F. Stejně výsledky byly získány pro kvercetin (obr. 3), rutin (obr. 4) a kyselinu gallovou (obr. 5). Kalibrační křivky jednotlivých metod jsou uvedeny na obr. 2 až 5. Byly nalezeny koeficienty stanovení v rozmezí 0,9927 až 0,9992 pro metodu DPPH, 0,9915 až 0,9982 pro metodu ABTS, 0,9973 až 0,9996 pro metodu FRAP, 0,9852 až 0,9982 pro metodu DMPD a 0,9991 až 0,9996 pro metodu FR.

Obr.1: Automatický pipetovací stroj epMotion 5075. Pohled z přední části.

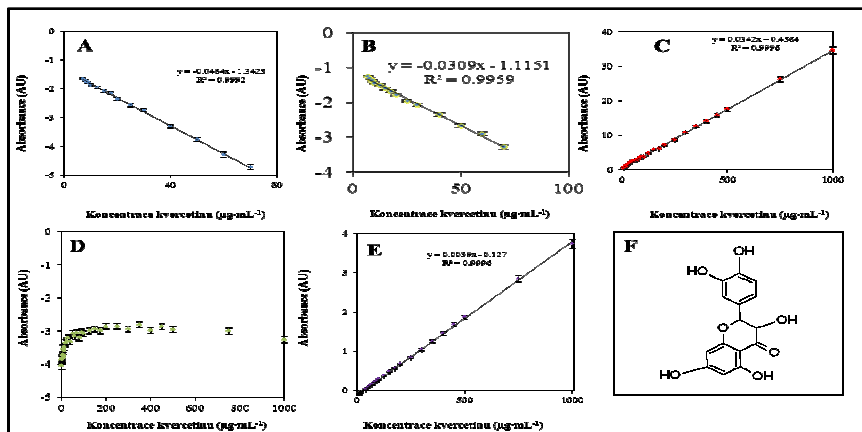


Obr. 2: Stanovení obsahu kyseliny ferulové pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B) FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura kyseliny ferulové (F).



Závislost absorbance na koncentraci kyseliny ferulové byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9927 pro metodu DPPH, 0,9915 pro metodu ABTS, 0,9973 pro metodu FRAP, 0,9852 pro metodu DMPD. Metodou FR se kyselinu ferulovou změřit nepodařilo. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FRAP.

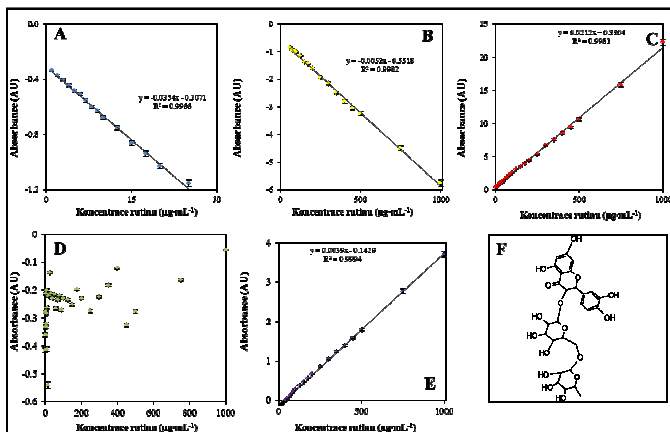
Obr. 3: Stanovení kvercetinů pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B), FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura kvercetinů (F).



Závislost absorbance na koncentraci kvercetinů byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9992 pro metodu DPPH, 0,9959 pro metodu

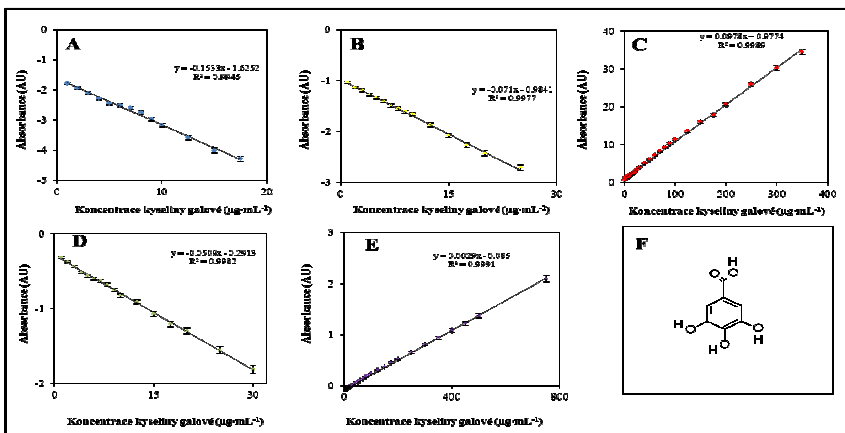
ABTS, 0,9996 pro metodu FRAP, 0,9852 pro metodu DMPD a pro metodu FR 0,9991. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FRAP.

Obr. 4: Obsah rutinu pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B), FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura rutinu (F).



Závislost absorbance na koncentraci rutinu byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9966 pro metodu DPPH, 0,9982 pro metodu ABTS, 0,9983 pro metodu FRAP a pro metodu FR 0,9994. Metodou DMPD se měření nepodařilo. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FR.

Obr. 5: Stanovení kyseliny gallové pomocí DPPH testu (A), ABTS testu (B), FRAP metody (C), DMPD metody (D), FR metody (E). Poslední část obrázku je struktura kyseliny gallové (F).



Závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové byla změřena pomocí metod DPPH, ABTS, FRAP, DMPD a FR. Byly nalezeny koeficienty stanovení 0,9945 pro metodu DPPH, 0,9970 pro metodu ABTS, 0,9989 pro metodu FRAP a pro metodu FR 0,9852. Metodou DMPD se měření nepodařilo. Nejlepší závislost byla získána pomocí metody FRAP.

Automatizace a robotizace preanalytické fáze přináší pro laboratoř řadu výhod. Dochází ke snížení počtu chyb, zkrácení časové odezvy, zvýšení produktivity práce a s tím spojené finanční úspore a omezení styku personálu s biologickým materiálem (Sochor, a kol., 2010). Technický rozvoj způsobuje tendenci nárůstu počtu analýz a zrychlení analytického procesu. Díky automatizaci se snižuje riziko záměny vzorků, celý proces je mnohem rychlejší, je snížena spotřeba reagensů, personální úspora (Pohanka, a kol., 2012, Sochor, a kol., 2010).

## ZÁVĚR

Byly vyvinuty automatizovaná metody pro rychlé a spolehlivé stanovení antioxidantů. Tyto metody byly shledány jako vhodné pro stanovení oxidační aktivity v biologických vzorcích. Jako nejvhodnější pro automatizované stanovení se jevila metoda FRAP. Největší lineární rozsah měla metoda FRAP a FR, a to až 1 g/l. Lineární rozsah metody DPPH byl 100 mg/ml pro kyselinu ferulovou a 20 mg/ml pro kyselinu gallovou. U stanovení rutinu metodou DMPD a stanovení kyseliny ferulové metodou FR nebylo stanovení přesné z důvodu jejich nízké afinity k radikálům DMPD a FR.

## LITERATURA

- Bouayed J., Hoffmann L., Bohn T. (2011): Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1): 14-21.
- Esmaili M. A., Sonboli A. (2010): Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3): 846-853.
- Kaviarasan S., Naik G. H., Gangabhairathi R., Anuradha C. V., Priyadarsini K. I. (2007): In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103(1): 31-37.
- Kuo W.-W., Huang C.-Y., Chung J.-G., Yang S.-F., Tsai K.-L., Chiu T.-H., Lee S.-D., Ou H.-C. (2009): Crude extracts of *Solanum lyratum* protect endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action. *Journal of Vascular Surgery*, 50(4): 849-860.
- Mariod A. A., Ibrahim R. M., Ismail M., Ismail N. (2010): Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*, 118(1): 120-127.

Müller L., Fröhlich K., Böhm V. (2011): Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1): 139-148.

Parejo I., Codina C., Petrakis C., Kefalas P. (2000): Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(3): 507-512.

Pohanka M., Sochor J., Ruttkay-Nedecky B., Cernei N., Adam V., Hubalek J., Stiborova M., Eckschlager T., Kizek R. (2012): Automated assay of the potency of natural antioxidants using pipetting robot and spectrophotometry. *Journal of Applied Biomedicine*, 10(3): 155-167.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.

Reckziegel P., Bouffleur N., Barcelos R. C. S., Benvegnú D. M., Pase C. S., Muller L. G., Teixeira A. M., Zanella R., Prado A. C. P., Fett R., Block J. M., Burger M. E. (2011): Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6): 1770-1778.

Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Adam V., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., Kizek R. (2010): Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*, 15(12): 8618-8640.

Sochor J., Salas P., Zehnalek J., Krska B., Adam V., Havel L., Kizek R. (2010): An assay for spectrometric determination of antioxidant activity of a biological extract. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 126(11): 416-417.

Stiborová M., Rupertová M., Frei E. (2011): Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(1): 175-185.

Uysal M., Kutalp G., Özdemirler G., Aykaç G. (1989): Ethanol-induced changes in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain. *Drug and Alcohol Dependence*, 23(3): 227-230.