

ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT ANTIOXIDANTS IN SERUM SAMPLES

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ HLADINY NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH ANTIOXIDANTŮ V SÉRU

Kračmarová A.¹, Sochor J.^{2,3}, Adam V.^{2,3}, Kizek R.^{2,3}, Pohanka M.^{1,2}

¹Centre of Advanced Studies and Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic

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

³Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: kracmarova@pmfhk.cz; miroslav.pohanka@gmail.com

ABSTRACT

The objective of the experiment was to establish and optimize an electrochemical method of low molecular weight antioxidants` assay using square wave voltammetry performed on screen printed sensors with carbon working electrodes. The potential range of square wave voltammetry was 0 - 1.1 V. The optimal values for the assay, potential step 5 mV, amplitude 5 mV, frequency 1 Hz and volume of sample 20 μ l, were found. The linearity and sensitivity of the method were verified by standard antioxidants - ascorbic acid, trolox, N-acetylcysteine and melatonin. The suitability for low molecular weight antioxidants` assay in human serum samples was confirmed by standard ferric reducing antioxidant power test (FRAP). Limits of detection were 0.3 mmol/l for ascorbic acid, 0.04 mmol/l for melatonin, 0.03 mmol/l for trolox, and 0.07 mmol/l for N-acetylcysteine. There was apparent a strong correlation between square wave voltammetry and the FRAP value as the correlation coefficient was 0.9778.

Key words: electrochemistry; antioxidant; screen printed sensor; ascorbic acid.

Acknowledgments: SV/201203

ÚVOD

Cílem práce bylo zavést a optimalizovat jednoduchou metodu stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v séru pomocí elektrochemické metody – tzv. SW voltametrie (z angl. square-wave). Tato metoda byla později použita pro stanovení hladiny nízkomolekulárních antioxidantů ve vzorcích séra ve studii zabývající se mimo jiné hodnocením oxidační rovnováhy onkologických pacientů.

Nízkomolekulární antioxidanty jsou sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které mají schopnost snadno se oxidovat. Přirozeně se vyskytují v organizmech, kde je jejich úkolem vycíhat a následně zneškodňovat vznikající volné radikály. Spolu s některými enzymy, jako je glutathionreduktasa nebo superoxid dismutasa tak tvoří antioxidační systém organismu. Mezi nejvýznamnější nízkomolekulární antioxidanty patří např. tokoferol, retinol, kyselina askorbová, glutathion, cystein, kyselina močová (Finaud *et al.* 2006; Kohen *et al.* 2004; Szarka *et al.* 2012).

Změna koncentrace nízkomolekulárních antioxidantů svědčí o aktivaci antioxidační obrany organismu. Je-li organismus vystaven oxidačnímu stresu, antioxidační systém se aktivuje a hladina nízkomolekulárních antioxidantů se zvýší. Pokud míra oxidačního stresu vyčerpá kapacitu antioxidačního systému, dojde naopak ke snížení hladiny antioxidantů. V takovém případě je oxidační homeostáza v organismu narušená a může dojít k oxidativnímu poškození citlivých tkání (Vovk *et al.* 2005). Stanovení celkové hladiny nízkomolekulárních antioxidantů nám tudíž může poskytnout cenné informace o stavu oxidační rovnováhy organismu a kapacitě antioxidačního systému v situacích, kdy se předpokládá, že došlo k oxidačnímu stresu (Pohanka *et al.* 2010). Mezi takové situace patří např. expozice některým lékům či otravným látkám nebo některá onemocnění (např. kardiovaskulární, neurodegenerativní, nádorová onemocnění) (Tsakanova *et al.* 2011; Vostálová *et al.* 2012).

Elektrochemické techniky stanovení antioxidační aktivity tvoří atraktivní alternativu k zavedeným spektrofotometrickým metodám (Sochor *et al.* 2010, 2011). SW voltametrie je jedna z nejcitlivějších elektrochemických analytických technik používaných pro přímé stanovení řady redoxně aktivních látek (Dogan-Topal *et al.* 2010; Masarik *et al.* 2011). Byla použita např. pro stanovení kyseliny askorbové (Kumar, Vicente-Beckett 2012), současné stanovení kyseliny askorbové, dopaminu a kyseliny močové v moči (Tian *et al.* 2012), současné stanovení kyseliny listové a *N*-acetylcysteinu (Salmanipour *et al.* 2012), při vývoji biosenzoru pro stanovení měďnatých iontů (Lin *et al.* 2012), senzoru pro stanovení pentachlorofenolu ve vodě (Remes *et al.* 2012), pro stanovení dopaminu v lidském séru (Rattanarat *et al.* 2012), při stanovení antioxidačního potenciálu různých druhů ovoce (Komorsky-Lovrić, Novak 2011), nebo pro určení antioxidační síly biomasy tvořené mikroskopickými řasami (Goiris *et al.* 2012). SW voltametrie sleduje, podobně jako jiné voltametrické techniky, závislost procházejícího proudu na vkládaném proměnlivém potenciálu. Oxidace stanovovaných látek se na křivce, jež tuto závislost vyjadřuje, projeví vznikem tzv. anodické vlny. Specifický potenciál, při němž anodická vlna vzniká, poskytuje kvalitativní informaci, plocha anodické vlny informuje o kvantitě analytu. Mezi hlavní výhody

měření pomocí SW voltametrie na sítotiskových senzorech patří rychlé a jednoduché provedení, které nevyžaduje předchozí úpravu biologického vzorku a rovněž nízká spotřeba vzorku. Na druhou stranu je metoda zatížená nižší reprodukovatelností a obtížnější interpretací výsledků.

MATERIÁL A METODIKA

Práce byla provedena na elektrochemickém analyzátoru PalmSens (Elmstat, Houston, Nizozemsko) se softwarem PSLite (PalmSens) a sítotiskových senzorech s uhlíkovou pracovní a pomocnou elektrodou a stříbrnou srovnávací elektrodou nanesených na keramické platformě (Metrohm, Herisau, Švýcarsko).

Na vodorovně upevněný senzor bylo pipetováno 20 μl (resp. 30 μl a 40 μl) vzorku tak, aby se všechny elektrody spojily. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů 0 - 1,1 V. Potenciálový skok byl postupně nastavován na 1, 3, 5, 10 mV, amplituda na 5, 10, 20, 30, 50, 100 mV a frekvence na 1, 2 a 4 Hz. Po změření standardů bylo vybráno nastavení analyzátoru s nejlepší odezvou. Toto nastavení bylo po té použito pro analýzu vzorků séra, které byly nanášeny přímo na senzor bez předchozí úpravy.

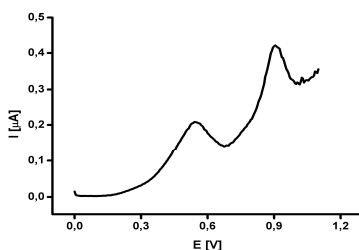
Kalibrační křivky (závislost plochy anodické vlny na koncentraci standardu) byly získány změřením roztoků zvolených standardních antioxidantů kyseliny askorbové (Penta, Praha), (S)-trolox metyletheru, melatoninu a *N*-acetyl-L-cysteinu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Standardní roztoky v rozsahu koncentrací od 0,010 do 10 mmol/l byly připraveny rozpuštěním kyseliny askorbové a *N*-acetyl-L-cysteinu v 0,1 mol/l fosfátovém pufru v koncentracích 0,010 – 10,00 mmol/l. (S)-trolox metylether a melatonin byly nejprve rozpuštěny v 1 ml etanolu (96% w/w) a následně naředěny 0,1 mol/l fosfátovým pufrům v rozmezí koncentrací 0,01 – 10,00 mmol/l. Získané kalibrační křivky byly vytvořeny a zpracovány pomocí lineární regrese za použití statistického softwaru Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Z kalibrační křivky byl metodou podle Hubauxe a Vose určen limit detekce pro jednotlivé antioxidanty (Hubaux, Vos 1970; O'Neill *et al.* 2002).

Zda je metoda vhodná pro stanovení antioxidantů ve vzorcích séra, bylo ověřeno porovnáním se standardní spektrofotometrickou metodou FRAP (z angl. ferric reducing antioxidant power) založenou na schopnosti antioxidantů redukovat železité ionty na železnaté. Stanovení FRAP bylo provedeno postupem zavedeným na našem pracovišti, který byl již dříve publikován (Benzie, Strain 1996; Pohanka *et al.* 2010). Tytéž vzorky vzniklé přidávkem 5 μl standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 0,10 - 0,50 - 1,0 - 5,0 a 10 mmol/l do 50 μl séra byly analyzovány pomocí SW voltametrie i FRAP. Ve statistickém softwaru byl vytvořen graf vyjadřující závislost příslušných ploch anodických vln na absorbancích naměřených metodou FRAP a vypočítán korelační koeficient *r*.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro měření na senzoru s uhlíkovou pracovní elektrodou bylo zvoleno nastavení analyzátoru s potenciálovým skokem a amplitudou 5 mV při frekvenci 1 Hz. Nebylo zaznamenáno ovlivnění stanovení objemem naneseného vzorku, na senzor bylo tedy z důvodu úspory séra nanášeno 20 μl . Jak je patrné na obrázku číslo 1, který představuje příklad voltamogramu lidského séra, nízkomolekulární antioxidanty vyskytující se v séru a plazmě se projevují vznikem dvou anodických vln při dvou různých specifických potenciálech, což odpovídá dříve publikovaným pozorováním (Komorsky-Lovrić, Novak 2011; Pohanka *et al.* 2010).

Obr. 1 Voltamogram získaný měřením vzorku lidského séra



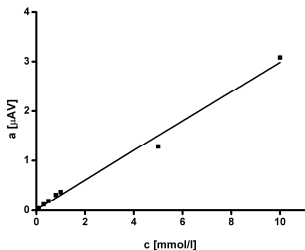
V tabulce číslo 1 se nachází korelační koeficienty r kalibračních křivek a vypočítané limity detekce pro jednotlivé použité standardní antioxidanty. Kalibrační křivka pro kyselinu askorbovou, melatonin a trolox byla lineární v rozsahu koncentrací od 0,010 mmol/l do 10 mmol/l s korelačním koeficientem přesahujícím 0,9861 (melatonin). Kalibrační závislost pro *N*-acetylcystein se podařilo změřit pouze v koncentracích od 0,010 mmol/l do 1,0 mmol/l, protože při vyšších koncentracích docházelo k přílišné polarizaci elektrody. Závislost byla rovněž lineární s korelačním koeficientem 0,9954. Hladiny nízkomolekulárních antioxidantů naměřené v lidském séru tento koncentrační rozsah nepřesahovaly. Limity detekce standardních antioxidantů se pohybovaly v rozmezí 0,03 mmol/l (trolox) - 0,3 mmol/l (kyselina askorbová).

Tab. 1 Korelační koeficienty (r) kalibračních křivek a limity detekce (LOD) pro jednotlivé standardní látky

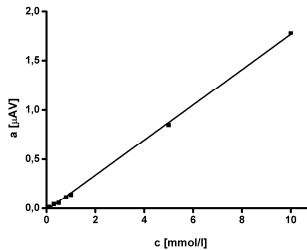
Standardní antioxidant	r	LOD [mmol/l]
Kyselina askorbová	0,9995	0,3
Trolox	0,9861	0,03
Melatonin	0,9953	0,04
<i>N</i> -acetylcystein	0,9954	0,07

Obr. 2 Kalibrační křivky pro vybrané antioxidanty, a = plocha anodické vlny, c = koncentrace standardu

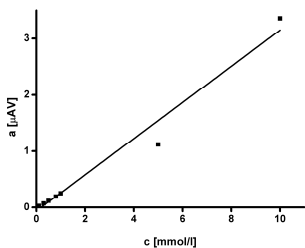
Trolox



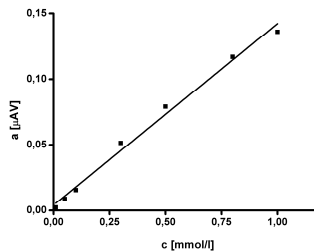
Kyselina askorbová



Melatonin

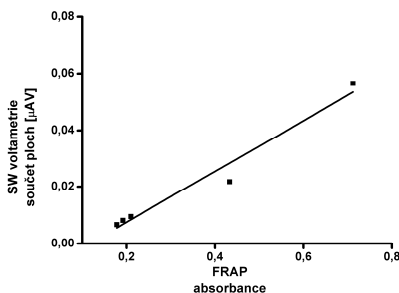


N-acetylcystein



Použitá voltametrická metoda dobře korelovala (korelační koeficient $r=0,9778$) se standardní metodou FRAP, jak je vyjádřeno na obrázku 3. Rovněž jiné práce zabývající se stanovením nízkomolekulárních antioxidantů pomocí SW voltametrie uvádějí dobrou korelaci mezi těmito metodami (Goiris *et al.* 2012).

Obr. 3 Korelace SW voltametrie a metody FRAP – na ose x absorbance naměřená metodou FRAP, na ose y součet ploch anodických vln získaných SW voltametrií



ZÁVĚR

Byla zavedena a optimalizována elektrochemická technika stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v lidském séru s použitím SW voltametrie na síťotiskových senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou. Pomocí několika zástupců nízkomolekulárních antioxidantů, které se obvykle vyskytují v organismu (kyselina askorbová, *N*-acetylcystein, melatonin) nebo jejich ekvivalentů (trolox), byla ověřena citlivost metody a její lineární odpověď v dostatečném koncentračním rozsahu. Zda je metoda vhodná pro stanovení antioxidantů v séru, bylo ověřeno pomocí standardní metody FRAP, s níž byla prokázána dobrá korelace. Popsaná metoda představuje alternativu dříve optimalizovaným postupům založeným na spektrofotometrii.

LITERATURA

- Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239: 70–76.
- Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B. (2010): The analytical applications of square wave voltammetry on pharmaceutical analysis. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, 3: 56-73.
- Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006): Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports medicine (Auckland, N. Z.)*, 36(4): 327-358.
- Goiris K., De Vreese P., De Cooman L., Muylaert K. (2012): Rapid screening and guided extraction of antioxidants from microalgae using voltammetric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, Jul 17. [Epub ahead of print].
- Hubaux A., Vos G. (1970): Decision and detection limits for linear calibration curves. *Analytical Chemistry*, 42: 849-855.

Kohen R., Oron M., Zekowicz A., Kanevsky E., Farfour S., Wormser U. (2004): Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers: an age dependent phenomenon in the rat. *Experimental Gerontology*, 39: 67–72.

Komorsky-Lovrić Š., Novak I. (2011): Abrasive stripping square-wave voltammetry of blackberry, raspberry, strawberry, pomegranate, and sweet and blue potatoes. *Journal of food science*, 76(6): doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02256.x. [Epub ahead of print].

Kumar S., Vicente-Beckett V. (2012): Glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes for the determination of ascorbic acid by square-wave voltammetry. *Beilstein journal of nanotechnology*, 3: 388–396.

Lin M., Hu X., Ma Z., Chen L. (2012): Functionalized polypyrrole nanotube arrays as electrochemical biosensor for the determination of copper ions. *Analytica Chimica Acta*, 746: 63–69.

Masarik M., Gumulec J., Sztalmachova M., Hlavna M., Babula P., Krizkova S., Ryvolova M., Jurajda M., Sochor J., Adam V., Kizek R. (2011): Isolation of metallothionein from cells derived from aggressive form of high-grade prostate carcinoma using paramagnetic antibody-modified microbeads off-line coupled with electrochemical and electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 32 (24): 3576-3588.

O'Neill D. T., Rochette E. A., Ramsey P. J. (2002): Method detection limit determination and application of a convenient headspace analysis method for methyl tert-butyl ether in water. *Analytical chemistry*, 74(22): 5907-5911.

Pohanka M., Band'ouchová H., Vlčková K., Žďárová Karasová J., Kuča K., Damková V., Pecková L., Vitula F., Pikula J. (2010): Square wave voltammetry on screen printed electrodes: comparison to ferric reducing antioxidant power in plasma from model laboratory animal (Grey Partridge) and comparison to standard antioxidants. *Journal of applied biomedicine*, 9: 103–109.

Rattanarat P., Dungchai W., Siangproh W., Chailapakul O., Henry C. S. (2012): Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. *Analytica Chimica Acta* 744: 1– 7.

Remes A., Pop A., Manea F., Baciú A., Picken S. J., Schoonman J. (2012): Electrochemical determination of pentachlorophenol in water on a multi-wall carbon nanotubes-epoxy composite electrode. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(6): 7033-7046.

Salmanipour A., Taher M. A., Beitollahi H., Hosseinzadeh R. (2012): New voltammetric strategy for simultaneous determination of N-acetylcysteine and folic acid using a carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102: 385– 390.

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: 8618-8640.

Sochor J., Skutkova H., Babula P., Zitka O., Cernei N., Rop O., Krska B., Adam V., Provaznik I., Kizek R. (2011): Mathematical evaluation of the amino acid and polyphenol content and antioxidant activities of fruits from different apricot cultivars. *Molecules*, 16: 7428-7457.

Szarka A., Tomasskovic B., Bánhegyi G. (2012): The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *International journal of molecular sciences*, 13(4): 4458-4483.

Tian X., Cheng C., Yuan H., Du J., Xiao D., Xie S., Choi M. M. F. (2012): Simultaneous determination of l-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles- β -cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry. *Talanta*, 93: 79– 85.

Tsakanova G. V., Ayvazyan V. A., Boyajyan A. S., Arakelova E. A., Grigoryan G. S., Guevorkyan A. A., Mamikonyan A. A. (2011): A comparative study of antioxidant system and intensity of lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke aggravated and not aggravated by type 2 diabetes mellitus. *Bulletine of experimental biology and medicine*, 151(5): 564-566.

Vostálová J., Galandáková A., Strebl P., Zdražil J. (2012): Oxidative stress in patients on regular hemodialysis and peritoneal dialysis. *Vnitřní lékařství*, 58(6): 466-472.

Vovk T., Bogataj M., Roškar R., Kmetec V., Mrhar A. (2005): Determination of main low molecular weight antioxidants in urinary bladder wall using HPLC with electrochemical detector. *International Journal of Pharmaceutics*, 291: 161–169.