

# Stanovení celkové antioxidační aktivity v biologickém materiálu pomocí FIA-ECD metody



HORNA A.<sup>1,2</sup>, VOŘÍŠEK V.<sup>2,3</sup>, KABRHELOVÁ J.<sup>2</sup>, PLÍŠKOVÁ M.<sup>2</sup>, PRŮŠOVÁ K.<sup>2</sup>



<sup>1</sup>Institut Nutrce a Diagnostiky s.r.o., Sakařova 1400, 530 03 Pardubice

<sup>2</sup>RADANAL s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice

<sup>3</sup>Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

## Úvod

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá využití elektrochemie pro studium bioaktivních látek. Byla vyvinuta metoda průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ECD) pro hodnocení celkové antioxidační aktivity nápojů, potravních doplňků a extraktů z ovoce, listí a bylin. Tato metoda je založená na měření náboje v uC a poskytuje objektivní srovnání schopností antioxidačních látek předávat náboj nezávisle na matici. Byla použita pro hodnocení celkové antioxidační aktivity lidské moče. Metoda poskytuje velmi zajímavé srovnání.

## FIA-ECD

### Přístrojové vybavení pro FIA-ECD:

Model 582 Solvent Delivery Module + Model 542 HPLC Autosampler + elektrochemický detektor Coularray Detector ESA, Model 5600A (ESA Inc, USA)

### FIA-ECD podmínky:

Mobilní fáze: 90 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05M + 10% ACN (pH 4,8)

Průtok: 1 ml/min

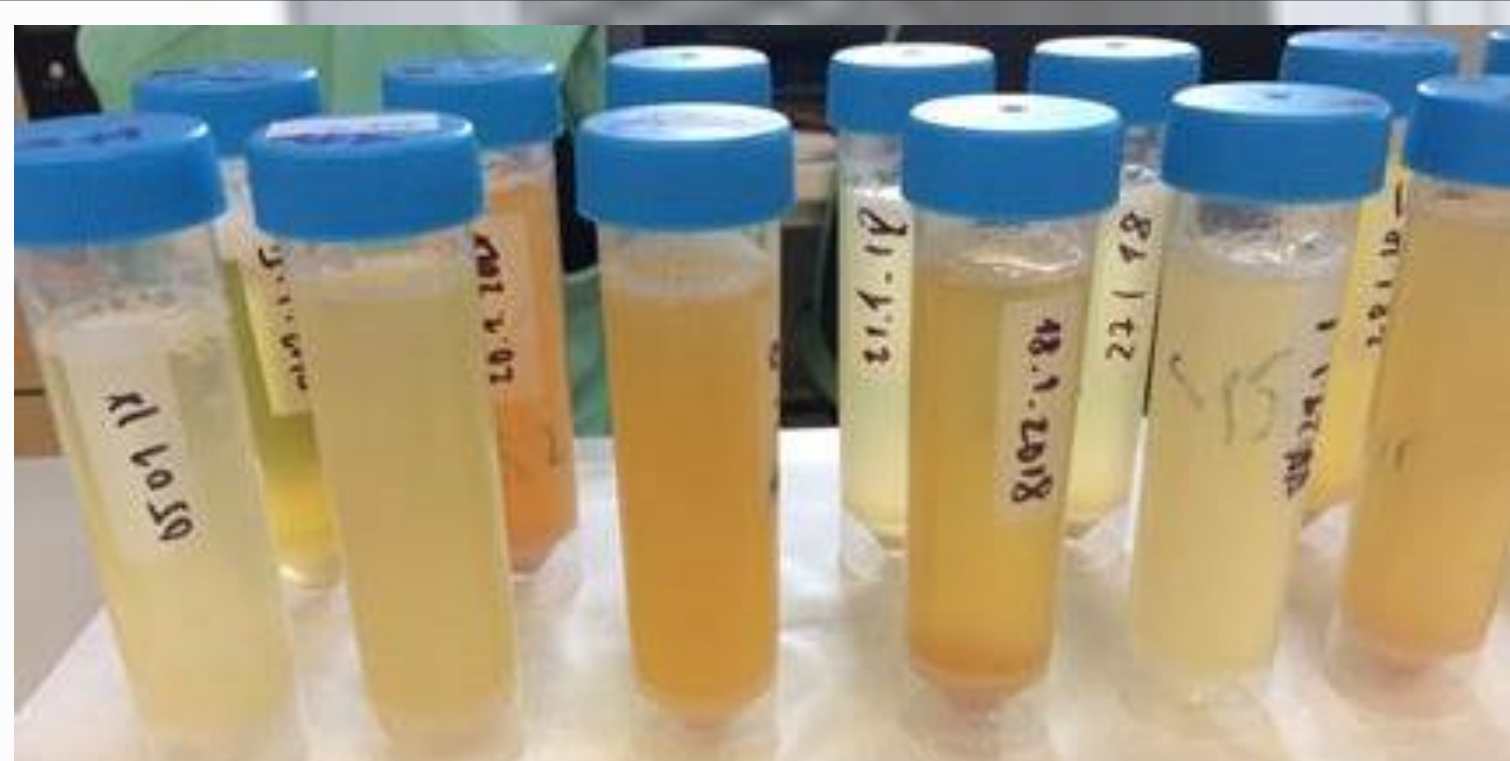
Isokratický proces

Nástřik: 10  $\mu\text{l}$

Potenciály: 200, 400, 600 a 800 mV

Čas analýzy: 1,1 min

Vzorek zředěný mobilní fází 1:3 (plná moč:mobilní fáze)



Obrázek 1: Vzorky moči analyzované FIA-ECD.

## HPLC-MS/MS

### Přístrojové vybavení pro HPLC-MS/MS:

UltiMate 3000 Binary RSLC + TSQ Quantum Access Max s ionizací elektrosprejem H-ESI (Thermo Fisher Scientific, USA)

### HPLC podmínky:

**Kolona:** Kinetex F5 100 Å 1,7  $\mu\text{m}$  50 x 2,1 mm (Phenomenex), s univerzální předkolumnou Zorbax Eclipse XDB- C18, 4,6 x 5 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  (Agilent)

**Mobilní fáze A:** 0,1 obj. % kyseliny mravenčí ve vodě

**Mobilní fáze B:** 0,1 obj. % kyseliny mravenčí v methanolu

### MS Parametry:

Ionizační mód: ESI+

Scenovací mód: SRM

Čas skenovacího cyklu: 0,5 s

Tlak kolizního plynu: 1,5 mTorr

Teplota kapiláry: 325 °C

Teplota odpařovací jednotky: 300 °C

Tlak sušícího plynu: 45 arb units

Tlak čistícího plynu: 2 arb units

Hodnota sprejovacího napětí: 3300 V

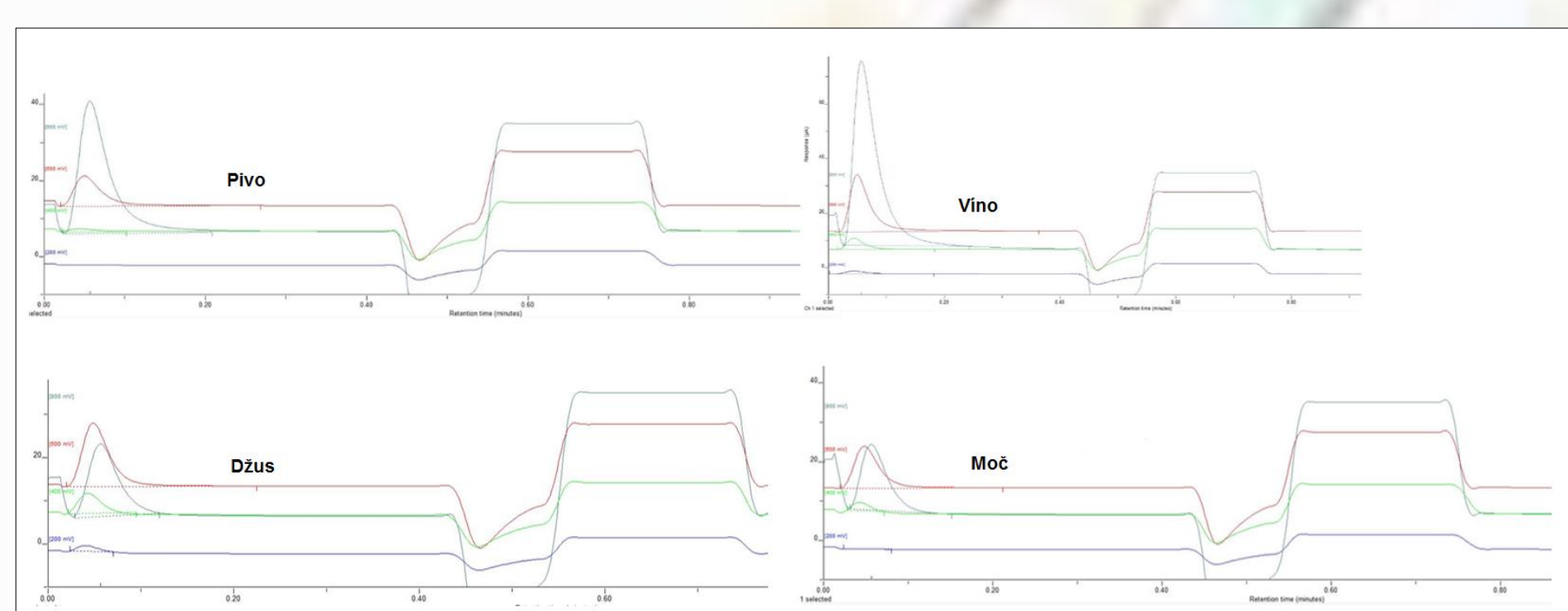
## Výsledky

Pomocí vyvinuté FIA-ECD metody byla zjištěna celková antioxidační aktivita ve vzorcích sbírané moči šedesátiletého dobrovolníka v období prosinec 2017 až listopad 2018 (celkem 281 vzorků). Ve vzorcích byly pomocí HPLC-MS/MS kvantifikovány markery oxidačního poškození DNA (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin) a RNA (8-hydroxyguanosin). V rámci studie byla posuzována souvislost mezi hladinami markerů poškození nukleových kyselin v moči a hladinami antioxidační aktivity lidské moče.

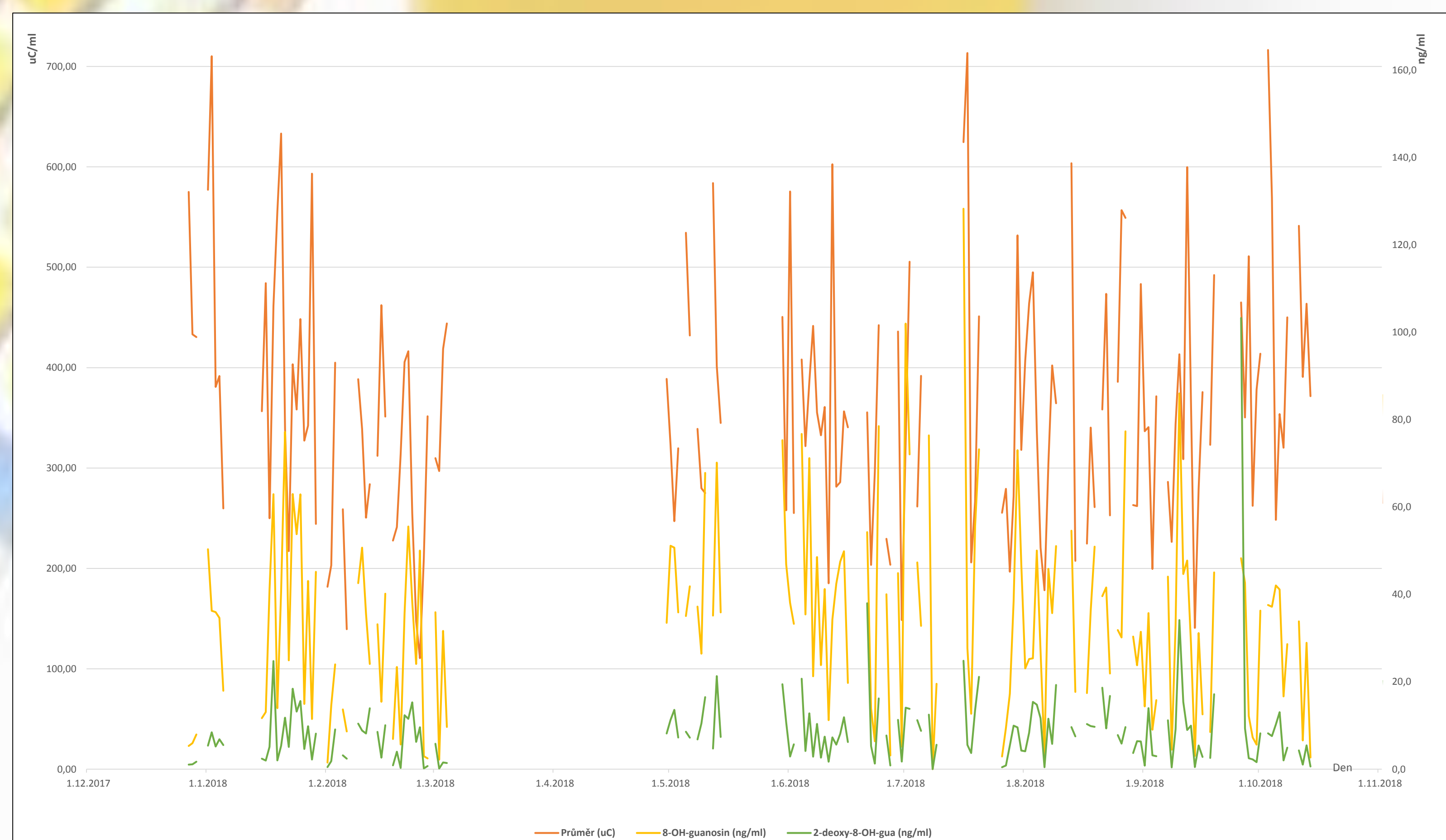
Průměrná hodnota antioxidační aktivity vzorků moči (FIA-ECD) byla nalezena  $360 \pm 128$   $\mu\text{C}/\text{ml}$  a pohybovala se od 88  $\mu\text{C}/\text{ml}$  do 872  $\mu\text{C}/\text{ml}$ . Koncentrační hladiny biomarkerů sledovaných metodou HPLC-MS/MS se pohybovaly v rozmezí hodnot 1,5-163 ng/ml (8-hydroxyguanosin) a 0,1-103 ng/ml (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin). Průběh nalezených koncentračních hladin analytů nekoreloval s antioxidační aktivitou moče. Bylo zjištěno, že z hlediska antioxidační aktivity může být lidská moč hodnotnější než kvalitní červené víno.



Obrázek 2: Přístrojové vybavení pro FIA-ECD: pumpy, autosampler, CoulArray detektor a analyzátor



Obrázek 3: Stanovení celkové antioxidační aktivity ve vybraných vzorcích pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí.



Obrázek 4: Grafické srovnání výsledků měření celkové antioxidační aktivity plné moče metodou FIA-ECD a měření koncentrace dvou biomarkerů metodou UPLC-MS/MS