

ROZVOJ *IN-VITRO* METOD STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY VYBRANÝCH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH ANTIOXIDANTŮ A ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ

Ferretti Ursula¹

¹*Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, Slezská Ostrava, 710 00, +420 605 001 561, ursula.ferretti@gmail.com*

Abstrakt

Expozice abiotickým faktorům prostředí může způsobovat v rostlinách nadměrnou produkci aktivních forem kyslíku a dusíku (AFK/D). Rostliny se proti AFK/D brání antioxidačními ochrannými systémy. Pokud tyto selžou, dochází ke vzniku oxidativního stresu. Tato práce se zabývá *in-vitro* stanovením antioxidační aktivity (AOA), redukční síly a stanovení celkového množství polyfenolů v extraktech pořízených z primárních listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus). Ječmen byl vypěstován při nízké (LI – 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a vysoké (HI – 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ozáření a zároveň vystaven zvýšené dávce UV-B záření (0,5 W.m^{-2}). Byly zavedeny a zkalibrovány metody fluorimetrického a spektro-fotometrického stanovení antioxidační aktivity, redukční síly a stanovení celkového množství polyfenolů (metoda ORAC, ABTS, DPPH, FRAP a TPC). Zaznamenali jsme vyšší AOA, redukční sílu a vyšší množství polyfenolů v extraktech pořízených z rostlin, vypěstovaných při vysoké ozáření a také u rostlin vystavených zvýšené dávce UV-B záření.

Klíčová slova: ABTS; DPPH; FRAP; ORAC; TPC

Úvod

Hlavními původci stresu u rostlin jsou faktory prostředí, které často způsobují narušení normálních životních funkcí rostlin a mohou zapříčinit i jejich smrt. [1] Jedním z těchto faktorů je např. vysoká ozáření (HI), která může zapříčinit nadměrnou produkci oxidantů, tzv. aktivních forem kyslíku a dusíku (AFK/D). AFK/D jsou i za normálních podmínek v rostlinách vytvářeny neustále. Mohou mít významný vliv při destrukčních procesech, ale jsou také podstatnou součástí signálních drah rostlinného organismu. [1]

Aby rostlina mohla udržet hladinu AFK/D v normě, využívá enzymatických či nízkomolekulárních antioxidačních ochranných systémů. Pokud se poruší rovnováha mezi množstvím AFK/D a účinností antioxidačních systémů, dojde ke vzniku oxidativního stresu. Tento vede k poškození buněčných struktur a může vést i k jejich nevratnému poškození. [1]

Cílem této práce byl rozvoj *in-vitro* metod pro stanovení AOA (ABTS, DPPH a ORAC), redukční síly (FRAP) a stanovení celkového množství polyfenolů (TPC). Tento experiment by měl zodpovědět zda je antioxidační aktivita, redukční síla a množství polyfenolů v extraktech získaných z rostlin vystavených stresovým podmínkám vyšší oproti kontrolním rostlinám. [1, 2, 3]

Materiál a metody

Rostliny ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus) byly pěstovány 8 dní za kontrolovaných podmínek (16 h světlo/8 h tma; teplota 20 °C a relativní vlhkost vzduchu přibližně 65%) v růstových komorách Fitotron (HGC 1014, Weiss Gallenkamp, Německo) a BioLine (HB 1014, Vötsch, Německo). LI rostliny byly v průběhu růstu vystaveny ozáření 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ FAR, zatímco HI rostliny byly vystaveny ozáření 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ FAR. Část LI i HI rostlin byla zároveň vystavena zvýšené dávce UV-B záření (0,5 W.m^{-2}). Osmý den

byly rostliny odebrány z růstových komor a ze středních segmentů listů bylo naváženo 6 vzorků po 100 mg. Z těchto vzorků byly postupně připravovány extrakty ve vybraném rozpouštědle tj. voda, 40% a 100% metanol. Do třecí misky byl nastříhán vzorek ječmene, k němu byla přidána špetka mořského písku a malé množství rozpouštědla. Lístky byly následně tloučkem rovnoměrně třeňy, dokud nebyl získán tekutý extrakt. Tento byl pak přelit do centrifugační zkumavky – třecí miska i s tloučkem byla pomocí pipety promyta použitým rozpouštědlem. Zkumavka se vzorkem byla ultrasonifikována po dobu 5 minut a následně byla provedena 3 minutová centrifugace při 6000 otáčkách/min. Vzniklý supernatant byl opatrně přelit do odměrné zkumavky a doplněn na objem 3 ml použitým rozpouštědlem (voda, 40% a 100% metanol). Z koncentrovaného extraktu byl odebrán 1 ml do další odměrné zkumavky a tento byl doplněn na objem 4 ml opět použitým rozpouštědlem (voda, 40% a 100% metanol).

Všechna spektrofotometrická měření – metody ABTS, DPPH, FRAP a TPC byla provedena na UV-VIS spektrofotometru Specord 250 (Analytik Jena, Německo). Na spektrofluorimetru LS – 50B (Perkin – Elmer, Anglie) byly měřeny vzorky metodou ORAC.

Metoda ABTS - Metoda stanovení antioxidační kapacity pomocí ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonát), patří ke zřáhsecím metodám. ABTS je oxidací peroxidisíranem draselným ($K_2S_2O_8$) přeměněn na svou modrozelenou kation radikálovou formu $ABTS^{+}$. V přítomnosti antioxidantů redukujících $ABTS^{+}$ dochází ke zpětné reakci modrozeleného $ABTS^{+}$ na jeho neradikálovou bezbarvou formu – ABTS. Množství $ABTS^{+}$ určujeme na základě změny absorbance při 734 nm v 60-té minutě, kdy dochází k částečnému ustálení reakce. [1]

Metoda DPPH - Princip reakce je obdobný jako u metody ABTS. Základem metody stanovení antioxidační kapacity pomocí stabilního radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH[•]) je jeho reakce s antioxidanty, doprovázená barevnou změnou. DPPH[•] vykazuje absorpční maximum ve viditelné oblasti při vlnové délce 515 nm. Při reakci s antioxidanty lze sledovat odbarvení fialového roztoku DPPH[•] na světle žlutý produkt. Měření provádíme v 60-té minutě při ustálení reakce. [1]

Metoda FRAP - Na rozdíl od předcházejících metod FRAP test nepracuje s volnými radikály, ale je založen na principu redukce železitých iontů na železnaté, tudíž na principu redoxní reakce. Užívá se zde železitého komplexu TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazin), který v roztoku s bezbarvým hexokyanatem draselným ($K_3[Fe(CN)_6]$) vytváří modře zbarvenou směs železitých komplexů. Po reakci s antioxidantem lze nárůst vzniklého produktu (železnatanu) změřit při vlnové délce 593 nm. Měření bylo provedeno již v 10-té minutě, později dochází k tvorbě krystalků v měřícím médiu, které s rostoucím časem zvyšují chybu při stanovení AOA. [1]

Změnu absorbance pro metody ABTS, DPPH a FRAP vypočítáváme $\Delta A = (A_{vz} - A_{bl}) / A_{bl}$, kde A_{vz} je absorbance vzorku a A_{bl} je absorbance blanku.

Metoda ORAC - Principem této metody je sledování úbytku signálu fluorescenční sondy (fluoresceinu), jež je zřáhena působením radikálů, generovaných za pomoci azo-iniciátoru (AAPH). V přítomnosti antioxidantů dochází ke zřáhšení fluorescence sondy – dochází tedy ke kompetici antioxidantů s molekulami fluorescenční sondy o molekuly AFK/D. K vyhodnocení výsledků se využívá AUC (Area Under Curve/Plocha pod křivkou), $AUC = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 \dots f_n/f_0)$, kde f_0 je počáteční hodnota fluorescence a f_n je fluorescence v čase n . Z hodnot AUC byly vypočítány $\Delta AUC = AUC_{vz} - AUC_{bl}$, kde AUC_{vz} je plocha pod křivkou daného vzorku a AUC_{bl} je plocha pod křivkou blanku. [1, 2]

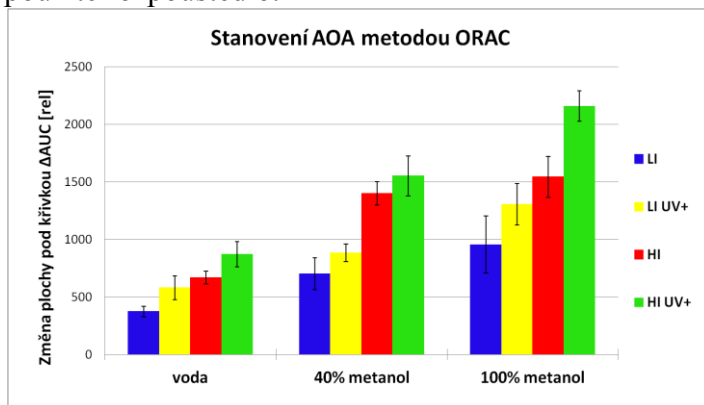
K porovnání použitých metodik bylo použito standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman 2-dikarboxylové kyseliny), derivát vitamínu E.

Metoda TPC - Podstatou metodiky stanovení celkového množství polyfenolů ve vzorku je oxidace fenolických látek v alkalickém prostředí. Během reakce probíhá barevná změna vzorku,

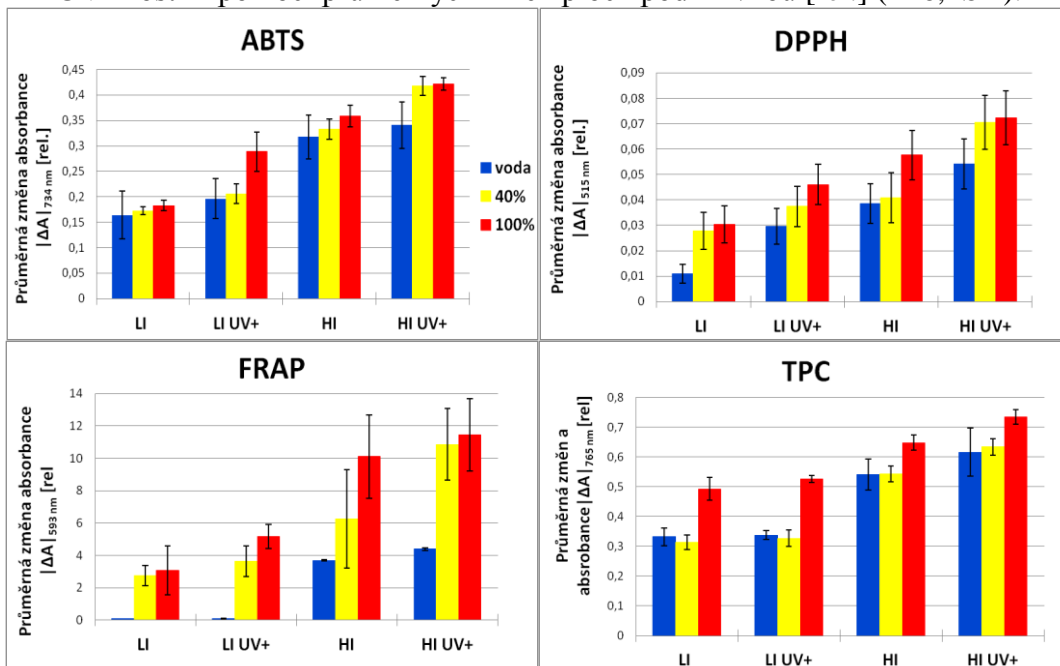
kdy ze světla žlutého roztoku vznikne tmavě modrý. Intenzita reakce fenolových sloučenin s činidlem byla změřena po 25-ti minutové inkubaci při vlnové délce 765 nm. Změnu absorbance spočítáme $\Delta A = (A_{vz} - A_{bl})$, kde A_{vz} je absorbance vzorku a A_{bl} je absorbance blanku. [3]

Výsledky a diskuse

Byly stanoveny a srovnány antioxidační účinky extraktů listů ječmene jarního, pěstovaného při nízké a vysoké ozáření a vystaveného vlivu UV-B záření (LI, LI UV+, HI a HI UV+). Na Obr.1. je patrná vyšší relativní změna plochy pod křivkou (ΔAUC) u rostlin pěstovaných při vysoké ozáření pod vlivem UV-B a extrahovaných ve 100% methanolu. Vyšší ΔAUC je dáno tím, že HI UV+ rostliny obsahují větší množství antioxidačních látek než LI rostliny, jelikož vlivem vysoké ozáření dochází ke vzniku většího množství radikálů a rostlina se vyšší produkcí antioxidantů brání poškození. Jak můžeme vidět tak antioxidační aktivitu (Obr. 1 i 2) velmi ovlivňuje také použité rozpouštědlo.



Obrázek 1. Závislost změny plochy pod křivkou ΔAUC [rel.] na typu použitého rozpouštědla (voda, 40% a 100% metanol). Srovnání ΔAUC extraktů připravených z LI, LI UV+, HI a HI UV+ rostlin pomocí průměrných změn ploch pod křivkou [rel.] ($n=6, \pm SD$).



Obrázek 2. Srovnání antioxidační aktivity na základě závislosti průměrné změny absorbance $|\Delta A|$ LI, LI-UV, HI a HI-UV ($n=6, \pm SD$) rostlin extrahovaných ve vodě, 40% a 100% metanolu

A) po 60-ti minutách vzájemné reakce vzorku s měřicím roztokem ABTS při 734 nm [rel.]. B) po 60-ti minutách vzájemné reakce vzorku s měřicím roztokem DPPH při 515 nm [rel.]. C) po 10-ti minutách vzájemné reakce vzorku s měřicím činidlem FRAP při 593 nm [rel.]. D) po 25-ti minutách inkubace vzorku s činidlem Folin-Ciocalteu při 765 nm [rel.].

Z výsledků na Obr. 2A, 2B, 2C a 2D je patrná vyšší antioxidační aktivita (ABTS a DPPH), redukční síla (FRAP) a celkové množství polyfenolů (TPC) u rostlin vystavených zvýšené dávce UV-B záření oproti kontrolním rostlinám. Rozdíly mezi samotnými rozpouštědly mohou být způsobeny vyšší účinností méně polárních činidel extrahovat fotosynteticky aktivní pigmenty (karotenoidy) a vybrané fenolické látky (Obr. 1, Obr. 2 A, B, C, D) .

Závěr

Byly zavedeny, optimalizovány a zkalibrovány metody ke stanovení AOA, redukční síly a celkového množství polyfenolů (ABTS, DPPH, ORAC, FRAP a TPC). Kalibrace byly provedeny pomocí standardu Trolox u metod ABTS, DPPH, FRAP a ORAC a pomocí standardu kyseliny gallové u TPC. Byl navržen ekofyziologický experiment zaměřený na stanovení AOA extraktů listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare*, L. cv. Bonus) pod vlivem nízké (LI) a vysoké (HI) ozáření a vystavené vlivu UV-B záření. Z výsledků byla patrná vyšší AOA pro rostliny pěstované při vysoké ozáření a pod vlivem UV-B záření, než u rostlin pěstovaných na nízkou ozáření. Byl pozorován nárůst antioxidační aktivity, redukční síly a celkového množství polyfenolů vzorků s klesající polaritou rozpouštědel použitých k extrakci.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ostravskou univerzitou v Ostravě (SGS21/PřF/2014). Děkuji za drahocenné rady Mgr. Jakubu Nezvalovi. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Běle Piskořové a Mgr. Michalu Štrochovi, Ph.D. za pomoc při práci s růstovými komorami.

Literatura

- [1] FERRETTI, Ursula. *Stanovení antioxidační aktivity rostlinných extraktů in-vitro*. Ostrava, 2012. Bakalářská práce. Ostravská Univerzita v Ostravě.
- [2] NAGUIB, Y. M.A. *A Fluorometric Method for Measurement of Oxygen Radical-Scavenging Activity of Water-Soluble Antioxidants*. Analytical Biochemistry, 2000, roč. 284, č. 1, s. 93-98.
- [3] ALEKSENKO, S. S. *Antioxidant activity and phenolic compounds of buckwheat and barley by the data of spectrophotometry and HPLC*. Journal of Analytical Chemistry, 2013, roč. 68, č. 5, s. 458-465.

Abstract

The exposition of plants to abiotic stress factors often leads to the excessive production of reactive oxygen and nitrogen species (RONS). Plants reduce (or prevent) damage caused by RONS using the complex of antioxidant protective system. If this system is failing, the oxidative/nitrosative stress takes place. This work deals with fluorimetric determination, comparison of the antioxidant activity (AOA) and determination of total polyphenolic compounds of leaf extracts from barley (*Hordeum vulgare*, L. cv. Bonus), grown at low (LI - 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) and high (HI - 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) irradiation. Methods for the determination of the relative AOA, reduction power and total polyphenolic compounds of plants *in-vitro*, such as ABTS, DPPH, ORAC, FRAP and TPC, have been established and calibrated. We observed higher AOA, reducing power and amount of total polyphenolics in extracts taken from plants cultivated in HI compared to LI conditions. Moreover the UV-B radiation induced a slight increase in the AOA and the reducing power.