

## ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH ANTIOXIDANTŮ V SÉRU

ALŽBĚTA KRAČMAROVÁ<sup>a</sup> a MIROSLAV  
POHANKA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany  
v Brně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, <sup>b</sup> Vysoká  
škola Karla Engliše, Mezírka 1, 602 00 Brno  
miroslav.pohanka@gmail.com*

Došlo 18.7.12, přepracováno 6.3.13, přijato 9.5.13.

Klíčová slova: elektrochemie, antioxidant, krevní plasma,  
sítotiskový senzor, kyselina askorbová

### Úvod

Antioxidační systém organismu se skládá ze dvou částí. Jednu ze složek tvoří nízkomolekulární antioxidanty, což jsou sloučeniny, které snadno podléhají oxidaci a mohou tudíž bránit jiné molekuly před oxidací volnými radikály. Druhou jeho složkou je enzymatický aparát, který se podílí na reaktivaci nízkomolekulárních antioxidantů, případně metabolické degradaci reaktivních forem kyslíku (enzymy superoxidodismutasa, katalasa, glutathionreduktasa). Mezi biologicky více zastoupené nízkomolekulární antioxidanty patří tokoferol, retinol, kyselina askorbová, glutathion, cystein, kyselina močová. Pokud hladina reaktivních forem kyslíku (dusíku) přesáhne kapacitu nízkomolekulárních antioxidantů, jež jsou schopné tyto reaktivní molekuly zneškodnit, dochází k oxidačnímu poškození tkání. Zvýšená koncentrace nízkomolekulárních antioxidantů se považuje za známku toho, že byl organismus vystaven vyššímu oxidačnímu stresu a tento stres byl schopen potlačit. Vzhledem k rozmanitosti nízkomolekulárních antioxidantů a jejich zastoupení v různém poměru bývá zvykem stanovovat v biologickém materiálu spíše jejich celkovou antioxidační kapacitu než koncentraci jednotlivých nízkomolekulárních antioxidantů<sup>1–4</sup>.

Existuje několik metod stanovení nízkomolekulárních antioxidantů. Poměrně oblíbená je metoda měření schopnosti absorbovat kyslíkové radikály (ORAC, z angl. oxygen radical absorbance capacity), založená na schopnosti antioxidantů ve vzorku zabránit oxidační reakci v přítomnosti volných radikálů<sup>5</sup>. Asi nejběžnější fotometrické stanovení nízkomolekulárních antioxidantů spočívá v měření tzv. síly redukující železité ionty (FRAP, z angl. ferric reducing antioxidant power nebo také ferric reducing ability of plasma), založené na redukci železitých iontů na železnaté s následující fotometrickou detekcí<sup>6</sup>. Jednotlivé nízkomolekulární antioxidanty lze stanovovat např. metodou HPLC s elektrochemickou detekcí<sup>4,7</sup>.

Vzhledem k redoxním vlastnostem nízkomolekulárních antioxidantů se přímo nabízí jejich elektrochemické stanovení. Dříve byly pro analytické účely zavedeny různé polarografické metody, v současnosti jsou pak zaváděny protokoly založené na cyklické voltametrii<sup>7,8</sup>, případně SW voltametrii (z angl. square wave voltammetry)<sup>3,9</sup>. SW voltametrie je jedna z nejcitlivějších elektrochemických technik používaných k přímému stanovení koncentrace řady sloučenin<sup>10,11</sup>. SW voltametrie byla použita např. pro stanovení vitaminů B6 a B12 ve farmaceutických přípravcích<sup>12</sup>, nikelnatých a hlinitých iontů ve tkáních<sup>13</sup>, antioxidační kapacity některých druhů ovoce<sup>14</sup>, pro současné stanovení L-askorbové kyseliny, dopaminu a kyseliny močové v moči pomocí modifikovaných uhlíkových elektrod<sup>15</sup> nebo pro hodnocení kvality jedlých rostlinných olejů<sup>16</sup>. S využitím SW voltametrie se rovněž často počítá při konstrukci biosenzorů<sup>17,18</sup>.

Oxidace stanovovaných látek se při použití SW voltametrie projeví vznikem anodického píku na křivce vyjadřující závislost procházejícího proudu na vloženém potenciálu. Kvantita stanovovaných látek odpovídá ploše píku, kvalitativní informaci získáme ze specifického potenciálu, při němž se pík objevuje.

Cílem práce bylo optimalizovat a ověřit protokol pro stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v séru pomocí SW voltametrie s použitím komerčně dostupných sítotiskových senzorů s uhlíkovou pracovní elektrodou, zavést vhodné standardní látky a srovnat voltametrickou metodu se standardním protokolem metody FRAP. Na našem pracovišti byla již SW voltametrie provedena na sítotiskových senzorech úspěšně použita pro stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v plazmě pokusných zvířat, jednalo se ovšem o senzory s pracovní elektrodou na bázi platiny<sup>3,9</sup>. Úkolem tohoto experimentu bylo optimalizovat metodu s použitím senzorů s pracovní elektrodou na bázi uhlíku. Rovněž bylo třeba ověřit stanovení pro použití v lidském séru, což vyžadovala další chystaná experimentální práce na pracovišti.

Askorbová kyselina je zástupce typických antioxidantů, které můžeme v organismu očekávat. V séru zdravých postarších dobrovolníků byla naměřena hladina  $47,60 \pm 0,60 \mu\text{g ml}^{-1}$  askorbové kyseliny<sup>19</sup>, což odpovídá koncentraci přibližně  $0,27 \text{ mmol l}^{-1}$ . Martinello a da Silva naměřili v séru zdravých dobrovolníků ve věku nad 18 let průměrně  $0,046 \text{ mmol l}^{-1}$  askorbové kyseliny. Po 4 hodinách od p. o. podání 250 mg vitamínu C tato koncentrace stoupla na  $0,126 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>20</sup>). V českých podmínkách stanovil Škrh a spol. koncentraci askorbové kyseliny v séru zdravých kontrol na  $0,075 \pm 0,014 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $0,072 \pm 0,017 \text{ mmol l}^{-1}$ , zatímco v séru osob trpících diabetem typu II to bylo  $0,056 \pm 0,014 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $0,071 \pm 0,019 \text{ mmol l}^{-1}$  a v séru pacientů s diabetem typu I  $0,073 \pm 0,014 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $0,075 \pm 0,015 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>21</sup>). Trolox je syntetický derivát tokoferolu. Vyznačuje se při zachování obdobných antioxidačních vlastností lepší rozpustností než tokoferol. Jedná se o velmi často používaný standardní antioxidant. V lidském séru se přirozeně vyskytuje  $\alpha$ -tokoferol. U zdravých dospělých jedinců byla naměřena

hladina  $\alpha$ -tokoferolu  $7,90 \pm 1,50 \text{ mg l}^{-1}$ , což odpovídá přibližně  $0,02 \text{ mmol l}^{-1}$ , a u pacientů trpících hypercholesterolemíí  $11,12 \pm 3,00 \text{ mg l}^{-1}$ , tedy přibližně  $0,03 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>22</sup>).

Melatonin je látka s výrazným antioxidačním účinkem, v séru se však nachází jen ve velmi nízkých koncentracích, v řádech desítek až stovek  $\text{pmol ml}^{-1}$ . Sérová hladina melatoninu je u lidí vyšší v noci než ve dne<sup>23,24</sup>. *N*-Acetylcystein byl rovněž vybrán jako látka s výraznými antioxidačními vlastnostmi<sup>25</sup>. Výskyt samotného *N*-acetylcysteinu v lidském séru v detegovatelné koncentraci nelze předpokládat, v experimentu zastupuje antioxidanty s volnými thiolovými skupinami jako je redukovaný glutathion nebo cystein. Standardní látky byly vybrány jako modelové antioxidanty, jež se mohou podílet na antioxidačních vlastnostech séra, k jejichž charakterizaci má popisovaná metoda sloužit. Není její ambicí stanovit přesnou koncentraci těchto analytů.

## Experimentální část

### Přístroje a zařízení

Pro voltametrické stanovení byl použit elektrochemický analyzátor PalmSens (EmStat, Houten, Nizozemsko). Práce byla provedena na sítotiskových senzorech s kompozitní uhlíkovou pracovní elektrodou, vyrobených firmou Metrohm (typ 6.1208.110, Herisau, Švýcarsko). Pracovní kompozitní uhlíková elektroda měla průměr 4 mm, pomocná elektroda byla rovněž z uhlíku a srovnávací elektroda byla typu Ag/AgCl. Elektrody byly nanесeny na keramické platformě. Křivky závislosti procházejícího proudu na potenciálu byly získány pomocí PSLite softwaru (PalmSens). Kalibrační křivky byly zpracovány za použití statistického softwaru Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

### Chemikálie a jejich příprava

Jako standardy pro nízkomolekulární antioxidanty byly použity askorbová kyselina (p. a., Penta, Praha), (S)-trolox methylether, melatonin a *N*-acetyl-L-cystein (vše p. a., Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Standardní roztoky byly připraveny rozpuštěním askorbové kyseliny a *N*-acetyl-L-cysteinu v  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátovém pufru (pH 7,4) v koncentracích  $0,01$ – $10,00 \text{ mmol l}^{-1}$ .  $26,4 \text{ mg}$  (S)-trolox metyletheru a  $23,8 \text{ mg}$  melatoninu bylo nejprve rozpuštěno v  $1 \text{ ml}$  ethanolu (96% w/w) a následně naředěno  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátovým pufrem v rozmezí koncentrací  $0,01$ – $10,00 \text{ mmol l}^{-1}$ .

$10 \text{ mmol l}^{-1}$  roztok 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazinu – (TPTZ; p. a., Sigma-Aldrich) rozpuštěného ve  $40 \text{ mmol l}^{-1}$  kyselině chlorovodíkové (p. a., Penta, Praha),  $20 \text{ mmol l}^{-1}$  roztok chloridu železitého (p. a., Penta, Praha) v deionizované vodě a  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  acetátový pufr (pH 3,6) byly připraveny pro stanovení FRAP.

### Vzorky

Metoda byla optimalizována pro použití v lidském séru. Sérum bylo připraveno z čerstvé srážlivé krve, která byla ponechána 30 min při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , a koagulum bylo odděleno po centrifugaci 10 min při  $1000\times g$ . Vzorky séra byly analyzovány přímo, bez jakékoliv další úpravy.

Vzorky pro srovnání voltametrické metody a FRAP vznikly přidáním  $5 \mu\text{l}$  standardního roztoku askorbové kyseliny o koncentraci  $0,10$ ;  $0,50$ ;  $1,0$ ;  $5,0$  a  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  do  $50 \mu\text{l}$  séra.

### Pracovní postupy

#### Optimalizace voltametrické metody

Senzor byl upevněn vodorovně, aby z něj vzorek nestékal a pipetou bylo nanесeno  $20 \mu\text{l}$  (resp.  $30 \mu\text{l}$  a  $40 \mu\text{l}$ ) vzorku tak, aby byly překryty všechny tři elektrody. Měření bylo prováděno v rozsahu potenciálu od  $0 \text{ V}$  do  $1,1 \text{ V}$ . Další parametry metody (potenciálový krok, amplituda, frekvence) byly postupně nastavovány  $1$ ,  $2$  a  $4 \text{ Hz}$  (frekvence),  $5$ ,  $10$ ,  $20$ ,  $30$ ,  $50$ ,  $100 \text{ mV}$  (amplituda) a  $1$ ,  $3$ ,  $5$ ,  $10 \text{ mV}$  (potenciálový krok). Po změření standardů bylo vybráno nastavení analyzátoru s nejlepší odezvou. Toto nastavení bylo poté použito pro analýzu reálných biologických vzorků. Nejlepších výsledků bylo dosaženo, když byl každý senzor použit pouze pro jedno měření, při opakovaném použití zejména pro analýzu séra se elektrody pravděpodobně pasivovaly přítomnými proteiny.

#### Kalibrační křivky a limit detekce

Kalibrační křivky (závislost plochy anodické vlny na koncentraci standardu) byly získány změřením standardních roztoků v rozsahu koncentrací od  $0,010$  do  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  a zpracovány pomocí lineární regrese.

Limit detekce byl stanoven graficky metodou podle Hubauxe a Vose<sup>26</sup> za využití kalibrační křivky a grafického znázornění konfidenčního intervalu 95 %. Tato metoda je vhodná pro zjištění limitu detekce stanovení, u kterých kvantifikace vychází z hodnoty plochy pod píkem.

#### FRAP

Krátce před měřením byl připraven reakční roztok, který vznikl smísením  $2,5 \text{ ml}$  roztoku TPTZ,  $2,5 \text{ ml}$  roztoku chloridu železitého a  $25,0 \text{ ml}$   $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  octanového pufru pH 3,6. Roztok byl následně 10 min zahříván na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Do  $200 \mu\text{l}$  reakčního roztoku bylo přidáno  $30 \mu\text{l}$  vzorku nebo  $30 \mu\text{l}$  fyziologického roztoku (blank). Po přidání  $770 \mu\text{l}$  deionizované vody se vzniklá směs inkubovala 10 min při laboratorní teplotě a dalších 10 min byla centrifugována při  $10\,000\times g$ . Supernatant byl přenesen do kyvety o tloušťce  $1 \text{ cm}$  a proti blanku byla změřena absorbance při  $593 \text{ nm}$ .

#### Korelace voltametrické metody a FRAP

Tytéž vzorky s přidavkem standardních roztoků byly analyzovány SW voltametrií a metodou FRAP. Ve statistickém softwaru byl vytvořen graf vyjadřující závislost

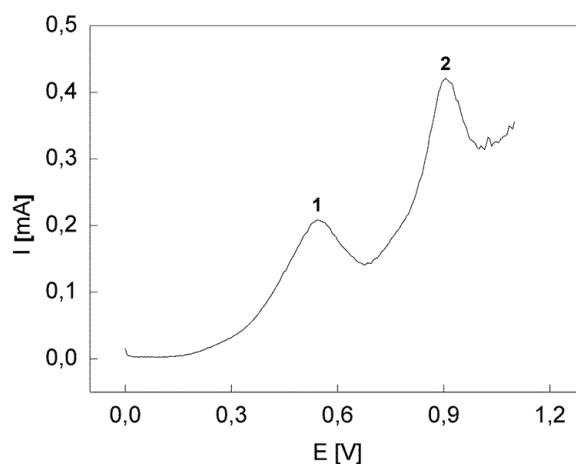
příslušných ploch anodických píků na naměřených absorbancích a vypočítán korelační koeficient  $r$ .

## Výsledky a diskuse

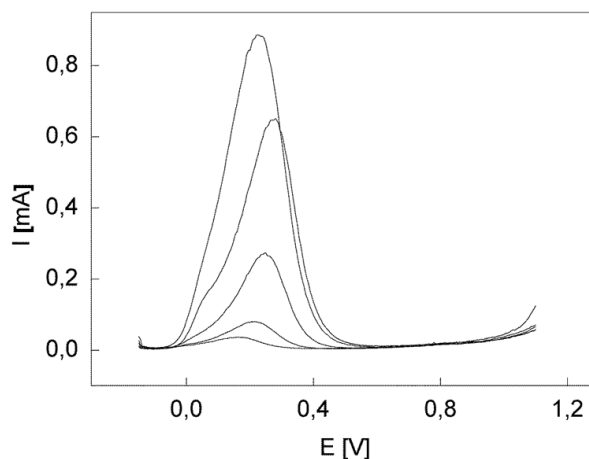
### Optimalizace voltametrické metody

Pro měření na senzoru s uhlíkovou pracovní elektrodou bylo zvoleno nastavení analyzátoru s potenciálovým skokem a amplitudou 5 mV při frekvenci 1 Hz a výsledné rychlosti polarizace 5 mV s<sup>-1</sup>. Při frekvencích 2 a 4 Hz byl anodický pík při stejné koncentraci antioxidantů menší. Vzhledem k tomu nebyla frekvence dále zvyšována, ačkoliv by přístroj dovozoval pracovat při frekvenci do 100 Hz. S těmito parametry trvala analýza jednoho vzorku do čtyř minut. Objem naneseného vzorku neměl na naměřené hodnoty žádný vliv, z důvodů šetření biologickým materiálem bylo rozhodnuto, že bude na senzory nanášeno 20  $\mu$ l vzorku.

Na obr. 1 je příklad typického voltamogramu získaného analýzou reálného séra, kde se vyskytuje řada různých nízkomolekulárních antioxidantů, které můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, jaké vložené napětí potřebují pro svou maximální oxidaci. Jejich přítomnost se při SW voltametii projevuje vznikem 2 píků při dvou specifických potenciálech<sup>3</sup>. Jak vyplývá z voltamogramů získaných měřeními standardních látek (obr. 2–5) a z tab. I, mezi látky, jež se oxidují při vloženém potenciálu nižším než 0,6 V, patří askorbová kyselina, *N*-acetylcystein a melatonin. Oxidaci melatoninu vzniká ovšem ještě jeden pík, jež se objevuje při potenciálu vyšším než 0,6 V. Do skupiny antioxidantů, jejichž oxidace se projeví při potenciálu vyšším než 0,6 V, patří také trolox. Tato pozorování odpovídají dříve publikovaným údajům<sup>3</sup>. Standardy rozpuštěné ve fosfátovém pufru se oxidují při nižších potenciálech než v prostředí reálného lidského séra. To vysvětluje, proč jsou na voltamogramu lidského séra na obr. 1 znázorněny píky při vyšších potenciálech, než odpovídá potenciálovým intervalům z měření standardních roztoků. Na obr. 6 vidíme voltamogramy získané po přidavku různých koncentrací askorbové kyseliny do lidského séra. Neobjevuje se zde nový pík při potenciálu  $0,237 \pm 0,060$  V, ale dochází k nárůstu píku, který vzniká při potenciálu  $0,583 \pm 0,027$  V, což ukazuje, že tento pík odpovídá jak oxidaci askorbové kyseliny, tak i dalších antioxidantů náležících



Obr. 1. Voltamogram vzorku lidského séra. Pík č. 1 ( $E < 0,6$  V) odpovídá oxidaci askorbové kyseliny, *N*-acetylcysteinu a melatoninu, pík č. 2 ( $E > 0,6$  V) odpovídá oxidaci melatoninu či troloxu

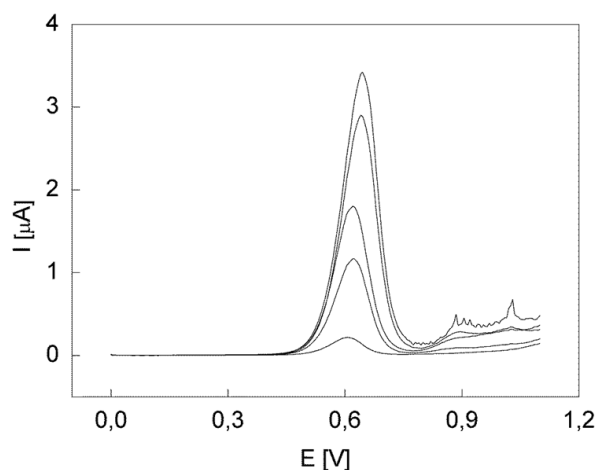


Obr. 2. Voltamogram standardních roztoků askorbové kyseliny v koncentracích 0,05 mmol l<sup>-1</sup>, 0,10 mmol l<sup>-1</sup>, 0,30 mmol l<sup>-1</sup>, 0,80 mmol l<sup>-1</sup> a 1,0 mmol l<sup>-1</sup>

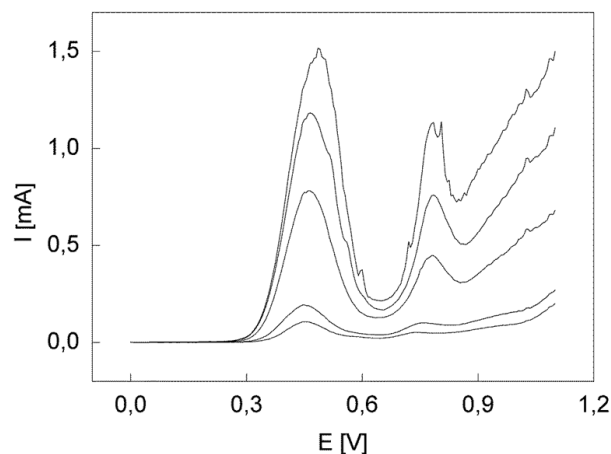
### Tabulka I

Potenciál ( $E$  [V]) píků, limit detekce (LOD [mmol l<sup>-1</sup>]) a korelační koeficient ( $R$ ) kalibračních křivek pro jednotlivé standardní látky

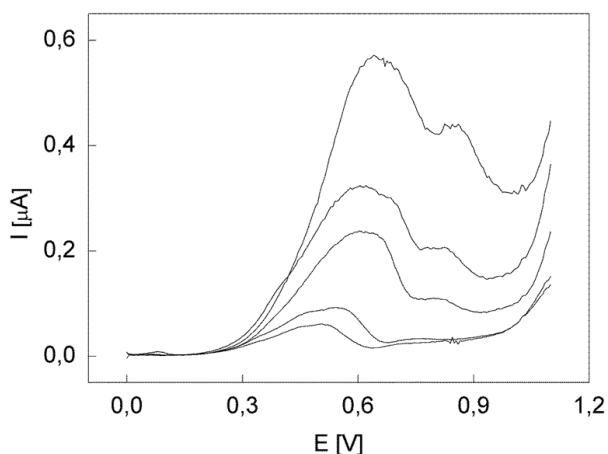
Látka	$E$ [V]	LOD [mmol l <sup>-1</sup> ]	$R$
Askorbová kyselina	$0,237 \pm 0,060$	0,09	0,9995
Trolox	$0,618 \pm 0,007$	0,03	0,9953
<i>N</i> -Acetylcystein	$0,549 \pm 0,110$	0,07	0,9954
Melatonin	$0,451 \pm 0,022$ $0,765 \pm 0,019$	0,04	0,9861



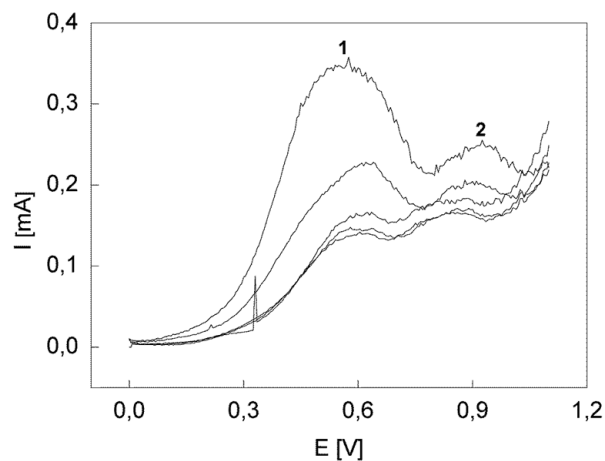
Obr. 3. Voltamogram standardních roztoků troloxu v koncentracích  $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,30 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,50 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,80 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$



Obr. 5. Voltamogram standardních roztoků melatoninu v koncentracích  $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,10 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,50 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,80 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$



Obr. 4. Voltamogram standardních roztoků *N*-acetylcysteinu v koncentracích  $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,10 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,30 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,50 \text{ mmol l}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$



Obr. 6. Voltamogramy lidského séra s přidávkou standardu. Do  $50 \mu\text{l}$  séra přidáno  $5 \mu\text{l}$  roztoku askorbové kyseliny o koncentracích  $0 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ mmol l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ . Pík č. 1 s přidávkou askorbové kyseliny narůstá, plocha píku č. 2 odpovídající oxidaci antioxidantů při potenciálu  $E > 0,6 \text{ V}$  přítomných v séru se nemění

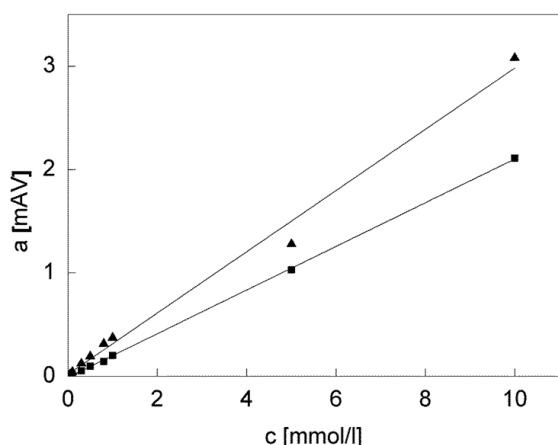
do první skupiny (oxidují se při potenciálu nižším než  $0,6 \text{ V}$ ).

#### Kalibrační křivky

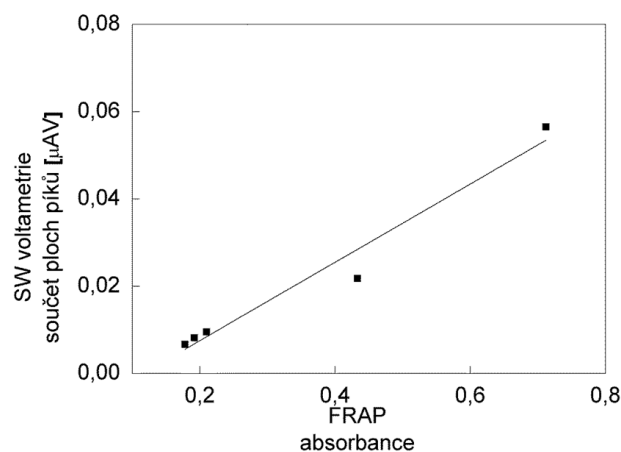
V tab. I jsou zaznamenány limity detekce, korelační koeficienty kalibračních křivek a potenciály, při nichž docházelo k oxidaci standardů. Kalibrační křivky získané z měření standardních roztoků askorbové kyseliny, melatoninu a troloxu byly lineární v celém koncentračním rozsahu ( $0,010$ – $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) s korelačními koeficienty  $0,9995$ ,

resp.  $0,9861$  a  $0,9953$ . Kvůli značnému nárůstu procházejícího proudu, k němuž docházelo při měření koncentrovanějších roztoků, se kalibrační křivku pro standard *N*-acetylcystein podařilo změřit pouze v rozsahu koncentrací  $0,010$ – $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ . Korelační koeficient pro *N*-acetylcystein byl  $0,9954$ . Voltamogramy získané měřením standardních roztoků jsou znázorněny na obr. 2–5. Obr. 7 ukazuje kalibrační křivky získané pro askorbovou kyselinu a trolox.

Limit detekce pro askorbovou kyselinu byl  $0,09 \text{ mmol l}^{-1}$ , pro melatonin na  $0,04 \text{ mmol l}^{-1}$ , pro trolox  $0,03$



Obr. 7. Kalibrační křivky pro trolox (▲) a kyselinu askorbovou (■);  $a$  [mAV] = plocha anodického píku,  $c$  [mmol l<sup>-1</sup>] = koncentrace standardu



Obr. 8. Korelace SW voltametrie a metody FRAP; na ose x absorbance naměřená metodou FRAP, na ose y součet ploch anodických vln získaných SW voltametrií;  $r=0,9778$

mmol l<sup>-1</sup> a pro *N*-acetylcystein 0,07 mmol l<sup>-1</sup>. Limit detekce pro askorbovou kyselinu, se v porovnání s pracemi citovanými v úvodu, v nichž byla stanovována koncentrace samotné askorbové kyseliny v séru, nejeví jako dostačující. Protože se však v případě této metody nejedná o stanovení samotné kyseliny askorbové, ale společné stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v séru, není pravděpodobné, že by jejich hladina tohoto limitu nedosáhla. Dostatečná citlivost metody se potvrdila při měření reálných vzorků lidského séra<sup>27</sup>.

#### Korelace voltametrické metody a FRAP

Výsledky stanovení vzorků séra s přidávkem kyseliny askorbové SW voltametrií korelovaly s výsledky stanovení metodou FRAP s  $r = 0,9778$ . Korelace je znázorněna na obr. 8.

#### Závěr

SW voltametrie na sítotiskových senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou je vhodná metoda pro stanovení nízkomolekulárních antioxidantů v séru. Metoda byla optimalizována, úspěšně ověřena na standardních látkách, které se vyskytují v organismu, jako jsou askorbová kyselina a melatonin, i na látkách, jež jsou látkám vyskytujícím se v organismu příbuzné, např. trolox (ve vodě rozpustný ekvivalent vitamínu E). Rovněž byly stanoveny limity detekce pro jednotlivé standardy. Byla prokázána dobrá korelace s jinou běžně užívanou metodou stanovení nízkomolekulárních antioxidantů (FRAP).

#### LITERATURA

1. Finaud J., Lac G., Filaire E.: *Sports Med.* 36, 327 (2006).
2. Podda M., Grundmann-Kollmann M.: *Clin. Exp. Dermatol.* 26, 578 (2001).
3. Pohanka M., Bandouchová H., Vlčková K., Žďárová Karasová J., Kuča K., Damková V., Pecková L., Vitula F., Píkula J.: *J. Appl. Biomed.* 9, 103 (2011).
4. Vovk T., Bogataj M., Roškar R., Kmetec V., Mrhar A.: *Int. J. Pharm.* 291, 161 (2005).
5. Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G.: *Free Radical Biol. Med.* 14, 303 (1993).
6. Benzie I. F. F., Strain J. J.: *Anal. Biochem.* 239, 70 (1996).
7. Kohen R., Oron M., Zekowicz A., Kanevsky E., Faraoui S., Wormser U.: *Exp. Gerontol.* 39, 67 (2004).
8. Kohen R., Gati I.: *Toxicology* 148, 149 (2000).
9. Pohanka M., Bandouchová H., Sobotka J., Sedláčková J., Soukupová I., Píkula J.: *Sensors (Basel)* 9, 9094 (2009).
10. Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B.: *TOCBMJ* 3, 56 (2010).
11. Ramaley L., Krause M. S.: *Anal. Chem.* 41, 1362 (1969).
12. Hernández S. R., Ribero G. G., Goicoechea H. C.: *Talanta* 61, 743 (2003).
13. Paulino A. T., Vargas A. M. M., Santos L. B., Nozaki J., Muniz E. C., Tambourgi E. B.: *Anal. Sci.* 24, 1443 (2008).
14. Komorsky-Lovrić Š., Novak I.: *J. Food Sci.* 76, C916 (2011).
15. Tian X., Cheng Ch., Yuan H., Du J., Xiao D., Xie S., Choi M. M. F.: *Talanta* 93, 79 (2012).
16. Gambarra-Neto F. F., Marino G., Araújo M. C. U., Galvão R. K. H., Pontes M. J. C., de Medeiros E. P.,

- Lima R. S.: *Talanta* 77, 1660 (2009).
17. Liu X., Duckworth P. A., Danny Wong D. K. Y.: *Biosens. Bioelectron.* 25, 1467 (2010).
  18. Zhang S., Wright G., Yang Y.: *Biosens. Bioelectron.* 15, 273 (2000).
  19. Fernández-Calle P., Jiménez-Jiménez F. J., Molina J. A., Cabrera-Valdivia F., Vázquez A., Urra D. G., Bermejo F., Matallana M. C., Codoceo R.: *J. Neurol. Sci.* 118, 25 (1993).
  20. Martinello F., da Silva E. L.: *Clin. Biochem.* 39, 396 (2006).
  21. Škrha J., Prázný M., Hilgertová J., Weiserová H.: *Clin. Chim. Acta.* 329, 103 (2003).
  22. Cham B. E., Smith J. L., Colquhoun D. M.: *Clin. Chim. Acta.* 287, 45 (1999).
  23. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., Garcia-Gonzalez M. J., Reiter R. J.: *Thromb. Res.* 120, 361 (2007).
  24. Tomimatsu Shimauti E. L., Silva D. G. H., de Almeida E. A., Zamaro P. J. A., Belini E. Jr., Bonini-Domingos C. R.: *Blood Cells, Mol., Dis.* 45, 297 (2010).
  25. Sener G., Tosun O., Sehirli A. O., Kacmaz A., Arbak S., Ersoy Y., Ayanoglu-Dülger G.: *Life Sci.* 72, 2707 (2003).
  26. Hubaux A., Vos G.: *Anal. Chem.* 42, 849 (1970).
  27. Pohanka M., Hynek D., Kracmarova A., Kruseova J., Ruttikay-Nedecky B., Sochor J., Adam V., Hubalek J., Masarik M., Eckschlager T., Kizek R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 11978 (2012).

**A. Kračmarová<sup>a</sup> and M. Pohanka<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> *Centre of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové,* <sup>b</sup> *Karel English College in Brno*): **Electrochemical Determination of Low-Molecular-Weight Antioxidants in Blood Serum**

The aim of the study was to establish and optimize an electrochemical method for the assay of low-molecular-weight antioxidants (LMWA). We used square-wave voltammetry (at 0–1.1 V) on screen-printed sensors with C working electrodes. Optimum parameters were: potential step and amplitude 5 mV and frequency 1 Hz. Ascorbic acid, trolox, *N*-acetylcysteine and melatonin were used as standard antioxidants to test the linearity and sensitivity of the method. Limits of detection were 0.09 mmol l<sup>-1</sup> for ascorbic acid, 0.04 mmol l<sup>-1</sup> for melatonin, 0.03 mmol l<sup>-1</sup> for trolox, and 0.07 mmol l<sup>-1</sup> for *N*-acetylcysteine. 20 μl samples were used. The suitability of the method for the assay was confirmed by the standard ferric reducing ability of plasma test. Both methods correlated well (correlation coefficient 0.9778).