

A plazma összantioxidáns kapacitásának meghatározására szolgáló fotometriás reagenskészlet. (DPPH módszer)

A szervezetben reaktív oxigén intermedierek keletkezése természetes folyamat. Ezen ún. szabad gyökök romboló hatását a szervezet antioxidáns mechanizmusokkal egy bizonyos mértékig ki tudja védeni, azonban, ha az egyensúly a szabadgyökök irányába tolódik el, oxidatív stressz lép fel. A szabad gyököknek jelentős szerepe van az öregedésben, az atherosclerosisban, gyulladásokban, carcinogenesisben, májbetegségekben.

A meghatározás elve

A DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) egy stabil szabad gyök, aminek oldata abszorbanciaváltozáson megy át antioxidáns tulajdonságú vegyület hatására. A semlegesítődés két módon történik, proton vagy elektron átadással. A reakciót spektrofotométerrel 510-550 (540) nm között lehet nyomonkövetni. Az abszorbanciacsökkenés arányos a minta antioxidáns tulajdonságával.

A referencia-értéktartomány

Normál tartomány: >0,5 mmol/l TEAC

(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Minden laboratóriumnak ajánlott a saját normálérték-tartományát meghatározni.

Reagens

1. Reagens (R1): DPPH liofilizátum

2. Reagens (R2): DMSO (oldószer R1-hez)

3. Reagens (R3): puffer a R1+R2 hígításához.

Tris HCl

detergens

4. Reagens (R4): Standard. Lásd a mellékelt standard használati utasítását.

Biztonsági információk:

Reagens 1:

Veszély. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil tartalmaz. Allergiás bőrreakciót válthat ki. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por belélegzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Légzési problémák esetén: forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

Reagens 3:

Figyelem. 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol hidrokloridot tartalmaz. Súlyos szemirritációt okoz. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

Minta

Szérum, plazma, eritrocita, szöveti szuszpenzió, bor, sör, gyümölcslevek, stb. Vizeletmintánál, bormintánál, gyümölcsmintánál az ajánlott hígítási arány 1:5

Reagens stabilitása

Fénytől védve és 2-8 °C-on tárolva, felbontás nélkül a címkén jelzett ideig.

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE

A módszer kétreagens.

Az első reagens (ER): R3 puffer, felhasználásra kész.

A második reagens (MR): Oldjon fel egy ampulla R1-et pontosan 1 ml R2 oldószerben. Várja meg, amíg az oldódás teljes lesz. Ez néhány percet vehet igénybe. Ha kész, pipettázzon pontosan 5 ml R3 puffert az R1+R2 oldathoz.

Stabilitás

Első reagens (ER): 2-8°C-on tárolva: 4 hét

Második reagens (MR): fénytől védve és 2-8°C-on tárolva: 9 nap

A mérési eljárás

Hullámhossz: 540 (510-550) nm

Hőmérséklet: 37°C

Fényút: 1 cm

Mérési mód: végpontos (csökkenő)

Leolvasás: minta vakkal szemben

Bemérés

	minta	standard
ER	1 ml	1 ml
minta	40 µl	
standard		40 µl

Keverje össze és inkubálja 1 percig és olvassa le az abszorbanciát (A1).

MR	250 µl	250 µl

Keverjük össze és 5 perc inkubáció után olvassuk le az abszorbanciaértéket mintavakkal szemben (A2). $\Delta A = A2 - A1$

Kalibráció: (DPPH módszer, 37 °C-on)

S1: Desztillált víz

S2: A készletben található standard

Ajánlott új kalibrációt végezni:

- új gyártási számú készlet felbontásakor,
- ahogy ezt a laboratórium minőségügyi rendszere előírja.

Az eredmény kiszámítása

$$\frac{\Delta A_{Minta}}{\Delta A_{Kalibrátor}} \times C_{Kalibrátor} = C_{Minta}$$

A=abszorbancia

C=koncentráció

A REAGENS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐI

A méréseket Cobas Mira Plus automatán végeztük (37°C)

Linearitási tartomány

A módszer 4,1 mmol/l koncentrációig lineáris.

Érzékenység

Minden laboratórium számára ajánlott meghatározni saját érzékenységi határt, mivel ezt az alkalmazott spektrofotométer érzékenysége is befolyásolja. A becslést legkisebb kimutatható koncentráció 0,07 mmol/l.

Precizitás

Reprodukálhatóság			
	Átlag konc. (mmol/l)	SD	CV %
1. minta	0,47	0,04	7,78
2. minta	2,40	0,26	10,72

Ismételhetőség

	Átlag konc. (mmol/l)	SD	CV %
1. minta	0,21	0,017	8,25
2. minta	1,79	0,063	3,54

Korreláció

Reagensünket összehasonlítottuk a Randox TAS kijével.

A korrelációs regresszió adatai a következők:

korrelációs együttható: $r = 0,9309$

lineáris regresszió: $y \text{ (mmol/l)} = 1,0115x - 0,4632$

(x= más gyártó reagensé, y= saját reagens).

Szelektivitás










Hemoglobinnal 2,5 g/l-ig nem befolyásolja a mérést. Glükóz, bilirubin, lipid, nem befolyásolja a mérést.

Megjegyzés

Ne használja a reagenst a csomagolása címkéjén feltüntetett lejárati dátum eltelté után. A készítményeket, tesztadatokat és reagenset csak az itt leírt teszthez szabad felhasználni. Ha az R2 komponens 19°C alatt tárolja, az oldat megfagyhat, de ez semmilyen hatással sincs a reagens minőségére. Fagyás esetén hagyja szobahőn vagy termosztátban felolvadásig.

Használata *in vitro* diagnosztikai célra és kutatásra egyaránt alkalmas.

A címkéken a következő szimbólumok lehetnek

	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz		Gyártási szám
	Gyártó		Kódszám
	CE-jelölés		Tárolási irány
	Tárolási hőmérséklet		Biológiai veszély
	Lejárati idő (év/hónap)		

Irodalom:

Blois, M., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200.

Verzió: 86-DL-2015-10

Felülvizsgálat dátuma: 2016-03

Cat.: 48661, 218663
 Size: 4x30 ml (4x1 ml + 1x4 ml + 1x120 ml + 1x2 ml)

Reagent kit to determine the plasma or serum total antioxidant capacity (DPPH method)

The formation of reactive oxygen intermediers in the human body is a natural progress. The damaging effect of the free radicals can be avoid in the human body by the antioxidant mechanisms to some extent however if the balance is shifted into a greater number of free radicals oxidative stress may occur. Free radicals have significant role in ageing, inflammations, carcinogenesis and liver diseases. The determination of total antioxidant capacity is suitable for screening tests because the total antioxidant capacity of the plasma can decrease in case of lack of vitamins, inflammations, tumors and damage of immuno-processes and also for monitoring the efficiency of treatments.

Principle

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) is a stable free radical. The absorbance of DPPH solution decreases in the presence of antioxidant molecules. There are two ways for neutralize this radical, proton or electron transfer. The reaction can be measured with spectrophotometer at 540 nm. The change in the absorbance is proportional with the antioxidant capacity of the sample.

Reference values

Serum: >0,5 mmol/l TEAC

(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

It is recommended that each laboratory should assign its own normal range.

Reagents

1. Reagent (R1): DPPH freeze dried

2. Reagent (R2): DMSO (solvent for R1)

3. Reagent (R3): buffer for R1+R2 dilution

Tris HCl

detergent

4. Reagent (R4): Standard. See the insert of the standard.

Safety instructions:

Reagent 1:

Danger. Contains 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. May cause an allergic skin reaction.

May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. Avoid breathing dust. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER/doctor.

Reagent 3:

Warning. Contains 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride. Causes serious eye irritation. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.

Remove contact lenses if present and easy to do – continue rinsing.

Sample

Serum, plasma, erythrocyte, tissue suspension, wine, beer, fruits, etc.

For urine, wine and fruit sample the recommended dilution ratio is 1:5.

Stability

Avoid from light! Without opening and store at 2-8 °C until the expire date.

PROCEDURE

The method is two-reagent.

First reagent (FR): R3 buffer, ready to use.

Second reagent (SR): Add exactly 1 ml of R2 solvent to one vial R1. Wait until it dissolve (couple of minutes). When ready, add exactly 5 mls of R3 buffer to this R1+R2 solution.

Stability

First reagent (FR): at 2-8°C

Second reagent (SR): avoid from light at 2-8°C

9 days

4 weeks

Assay conditions

Wavelength: 540 (510-550) nm

Temperature: 37°C

Cuvette: 1 cm light path

Method: Endpoint (decreasing)

Reading: against sample blank

Procedure

	sample	standard
FR	1 ml	1 ml
sample	40 µl	
standard		40 µl

Mix and after 1 min incubation read the absorbance (A1).

SR	250 µl	250 µl
----	--------	--------

Mix and after 5 mins incubation read the absorbance against sample blank (A2). $\Delta A = A2 - A1$

Calibration: (DPPH method, at 37 °C)

S1: Distilled water

S2: TAOC standard

Two-point calibration is recommended

- after reagent lot change,

- as required following quality control procedures.

Calculation

$$\frac{\Delta A_{Sample}}{\Delta A_{Calibrator}} \times C_{Calibrator} = C_{Sample}$$

A=absorbance

C=concentration

PERFORMANCE DATA

The following data were obtained using Cobas Mira Plus analyzer

Linearity

The test is linear up to 4,1 mmol/l.

Sensitivity

It is recommended that each laboratory establishes its own range of sensitivity as this is limited by the sensitivity of the spectrophotometer used.

The estimated lowest detectable concentration is 0,07 mmol/l.

Precision

Reproducibility			
	average conc. (mmol/l)	SD	CV %
1. sample	0,47	0,04	7,78
2. sample	2,40	0,26	10,72

Repeatability			
	average conc. (mmol/l)	SD	CV %
1. sample	0,21	0,017	8,25
2. sample	1,79	0,063	3,54

Correlation

Comperative studies were done with Randox TAS kit.

The results are detailed below:

Correlation coefficient: $r=0,9309$

Linear regression: $y=1,0115x-0,4632$

(x=other commercial reagent, y=own reagent)

Specificity

Hemoglobin up to 2,5 g/l, glucose, bilirubin, lipid, don't interfere with the test.










Note

Do not use reagents after the expiry date stated on each reagent container label. Do not use products, test solution and reagents described above for any purpose other than described herein.

The R2 component can be freezeed under 19°C, however it does not affect the reagent quality. In this case leave this reagent at room temperature until it melts.

For in vitro and research purposes.

The following symbols can be used on the labels

	In vitro diagnostic device		Batch code
	Manufacturer		Catalogue number
	CE-marking		This way up
	Temperature limitations		Biological risk
	Use by (year/month)		

References:

Blois, M., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200.

Version: 86-DL-2015-10

Date of revision: 2016-03