

BIOLOĢISKI AKTĪVU SAVIENOJUMU NOTEIKŠANA AUGU EĻĻĀS AR VIEDTĀLRUNĪ IEGŪTU ATTĒLU ANALĪZI

DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN VEGETABLE OILS BY SMARTPHONE IMAGE ANALYSIS

Sanita Vucāne, Ingmārs Cinkmanis, Mārtiņš Šabovics

Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte

sanitavucane@inbox.lv

Abstract. Vegetable oils contain biologically active compounds that can be detected using a smartphone as an alternative to classical optical analytical methods. One of such vegetable oils of biologically active compounds are antioxidants, which inhibit the oxidation of fats, prolonging the shelf life and preserving the original properties of the sensors. Antioxidants react with radicals in vegetable oils to form new, more stable radicals that have oxidation reactions that are slowed down. To determine the antiradical activity of vegetable oils, a method based on 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazil, or DPPH reagent, is proposed. Huawei P30 lite smartphone was used for image analysis. The free radical scavenging activity was detected by using Android application "ColorPicker" with the image matching algorithm for RGB model. Chromatography vials, PS cuvettes (PSK) and UV / Vis spectrophotometer was used for data comparison. Eleven vegetable oils: sea buckthorn, sunflower, rice, macadamia nut, hemp, corn, grape, linseed, rapeseed, olive and milk thistle oils were selected for the analysis. The aim of the study is to determine whether it is possible to determine antiradical activity using glass chromatography vials compared to polystyrene cells with a smartphone image analysis. Based on the smartphone-based image analysis, the results showed that RG color values can be determined in RSA vegetable oils by chromatography vials with the same accuracy as PSK.

Key words: radical scavenging activity, DPPH, digital image analysis, vegetable oils, Android, Huawei.

Ievads

Lai konstatētu bioloģiski aktīvu savienojumu izmaiņas, ikdienā tiek lietotas klasiskās noteikšanas metodes, kuras ir vidēja vai liela izmēra un apgrūtina to pārvietošanu (mobilitāti) lauku apstākļos. Kā viens no risinājumiem ir meklēt alternatīvas, kuras būtu analogas klasiskām optiskām metodēm, lētākas, vieglāk kopjamas un pārvietojamas, piemēram, viedtālrunis. Tāpat kā spektrometrijā, viedtālruna augstas izšķirtspējas kameras un operētājsistēmas "Android" programmu algoritms var absorbēt krāsu saskaņā ar Bugēra-Lamberta-Bēra likumu (Anderson u.c., 2014). Cilvēka acs redzamās gaismas viļņa garumus var redzēt kā atšķirīgu krāsu. Tikai trīs krāsas – sarkanā (R), zaļā (G) un zilā (B) – ir primārās, kas nepieciešamas baltās krāsas veidošanā. Šādu triju krāsu izteikšana digitālā attēlu analīzē sauc par RGB krāsu modeli. Šis modelis raksturo redzamās gaismas intensitāti pikseļos, kas var svārstīties robežās no 0 līdz 255 (Rhyne, 2016). Viedtālrunis tiek plaši izmantots dažādās ķīmiskajās analīzēs (Coskun et al., 2012; Zhu et al., 2011; Masawat et al., 2015), testa strēmeliņos (Yetisena et al., 2014), dermatoloģijā (Kroemer et al., 2011; Jamalipour, Hossain, 2019) un citās nozarēs. Viedtālruna lietošana bioloģisko savienojumu noteikšanā paplašina ne tikai augu eļļu izstrādāto metožu iekārtu daudzveidību, bet to var arī izmantot dažādu citu pārtikas produktu zemākai izmaksu vielu detektēšanai, piemēram, augļu, ogu un dārzeņu bojāšanās pakāpes noteikšanai, testa strēmeliņu izveidei u. tml. Liels ieguldījums var būt arī farmācijas rūpniecībai, izstrādājot dažādas noteikšanas metodes, kas tiešā veidā var būt saistītas ar cilvēka veselību, piemēram, ādas vēža diagnosticēšanu vai citu ādas slimību noteikšanu. Augu eļļas satur bioloģiski aktīvus savienojumus, kuru noteikšanai var izmantot viedtālruni kā alternatīvu klasiskām, optiskām, analītiskām ķīmijas iekārtām. Vieni no šādiem bioloģiski aktīviem savienojumiem augu eļļās ir antioksidanti, kas kavē tauku oksidēšanos, pagarina uzglabāšanas laiku un saglabā tās sākotnējās sensorās īpašības. Antioksidanti, reaģējot ar radikāļiem, kas atrodas augu eļļās, veido jaunus, stabilākus radikāļus, kā rezultātā oksidēšanās reakcijas tiek palēninātas (Brand-Williams et al., 1995; St. Angelo, 1996). Lai konstatētu augu eļļu antiradikālo aktivitāti, par pamatu lieto metodi, kur aktīvais reaģents ir 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils jeb DPPH reaģents (Ahmed, Khan, Saeed, 2015). Pētījuma mērķis ir noskaidrot, vai ir iespējams noteikt antiradikālo aktivitāti, izmantojot stikla hromatogrāfijas pudeles, tās salīdzinot ar polistirola kivetēm kā klasiskajā spektrofotometrijā.

Materiāli un metodes

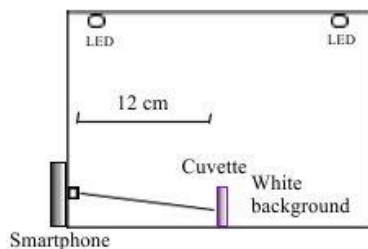
Pētījumi tika veikti Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Ķīmijas katedrā.

Paraugi: Analīzei tika izvēlētas vienpadsmit nerafinētas augu – smiltsērķšķu (*Hippophae rhamnoides*), saulespuķu (*Helianthus annuus*), rīsu (*Oryza sativa*), makadamijas riekstu (*Macadamia integrifolia*), kaņepju (*Cannabis sativa*), kukurūzas (*Zea mays*), linsēklu (*Oleum Lini*), rapšu (*Brassica napus*), olīvu (*Olea europaea*) un mārdaža (*Silybum marianum*) – eļļas oriģinālajā komerciālajā iepakojumā.

Analīzes aprīkojums: attēlu iegūšanai tika izmantots viedtālrunis "Huawei P30 Lite" ("Huawei Technologies Co.", Ltd., Ķīna), kas ražots 2019. gada 25. aprīlī, operētājsistēma "EMUI 10" ("Android 10"), 48 megapikseļu trīskāršā kamera ar attēlu iegūšanas sistēmu un analīzi, kas aprakstīta saskaņā ar S. Vucānes un kolēģu publikāciju (2020).

Antiradikālās aktivitātes noteikšana, izmantojot 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilu (DPPH): DPPH antiradikālā aktivitāte augu eļļās tika noteikta saskaņā ar D. Ahmed, M. M. Khan un R. Saeed (2015) metodi, ar nelielām izmaiņām. DPPH reaģents (Aldrich, Vācija) ar koncentrāciju 0.02 g L^{-1} 96% etanolā tika iegūts analīzes dienā, ievietots 4°C temperatūrā ledusskapī līdz turpmākai lietošanai.

Antiradikālās aktivitātes noteikšana augu eļļās: 0.1 mL augu eļļas sajauc ar 3 mL DPPH reaģenta 15 mL $120 \times 17 \text{ mm}$ koniskā PP mēģenē (Sarstedt AG & Co. KG, Vācija) un maisīja 30 sek. ar IKA Vortex 3 (KA®-Werke GmbH & Co. KG, Vācija) ar 7. ātrumu. Pēc 30 minūšu inkubācijas tumšā vietā istabas temperatūrā ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), mēģenes centrifugēja (Pro-Research, Centurion Scientific Ltd., Lielbritānija) ar 3000 apgriezieniem minūtē 5 minūtes, un krāsainu šķīdumu pārnesa uz PS 2.5 mL vienreizlietojamām kivetēm (BrandTech Scientific, Inc., ASV), kuru izmērs bija $12.5 \times 12.5 \times 45.0 \text{ mm}$. Parauga absorbcija pret kontroli (96% etanola) tika mērīta pie 517 nm, izmantojot UV/VIS spektrofotometru "Agilent Cary 60" (Agilent Technologies, Inc., ASV). Augu eļļas paraugu attēlu iegūšanai ar DPPH reaģentu un kontroles (96% etanola) šķīdumu PS kivetēs un stikla hromatogrāfijas pudelēs tika izmantota viedtālrunī iebūvēta oriģinālā kamera un programmatūra "Color Picker", kas iegūst datus, izmantojot RGB (R – sarkans, G – zaļš, B – zils) krāsu modeli (skat. 1. att.).



1. att. Eksperimentālā mini fotostudija digitālo bilžu iegūšanai ar viedtālruni.

Fig. 1. Experimental Mini-Photo Studio for digital photo acquisition with a smartphone.

Aprēķināšanas metode:

- 1) Izmantojot viedtālrunī esošo programmu "Color Picker", tika iegūta vidējā RG (sarkans, zaļš) krāsu vērtība saskaņā ar E. Jansona un J. Meijas (2002) vienādojumu, kas modificēts, piemērojot to RG krāsu modelim (1. vienādojums).

$$RG_{avg} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n R_i}{n} + \frac{\sum_{i=1}^n G_i}{n}}{2}, \quad (1)$$

sarkans – zaļš (RG_{avg}).

- 2) RG_{avg} vidējā krāsu vērtība tika pārvērsta absorbcijā pēc Bugēra-Lamberta-Bēra likuma saskaņā ar 2. un 3. vienādojumu (Firdaus et al., 2014).

$$Abs_{DPPH} = -\log\left(\frac{I_{DPPH}}{I_0}\right), \quad (2)$$

kur:

I_{DPPH} – RG_{avg} vidējā krāsu vērtība DPPH reaģentam pēc 30 min.

I_0 – RG_{avg} vidējā krāsu vērtība kontroles šķīdumam (96% etanols).

$$Abs_{DPPH} = -\log\left(\frac{I_{oil}}{I_0}\right), \quad (3)$$

kur:

I_{oil} – RG_{avg} augu eļļu vidējā krāsu vērtība ar DPPH pēc 30 min.

I_0 – RG_{avg} kontroles (96% etanola) vidējā krāsu vērtība.

3) Antiradikālā aktivitāte (ARA) tika aprēķināta saskaņā ar 4. vienādojumu pēc D. Ahmed, M. M. Khan un R. Saeed (2015) metodes, piemērojot to viedtālruņa attēlu analīzei.

$$ARA = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{oil}}{Abs_{DPPH}} * 100\right) = (\%), \quad (4)$$

kur:

Abs_{DPPH} – RG_{avg} DPPH absorbcija pēc 30 min.

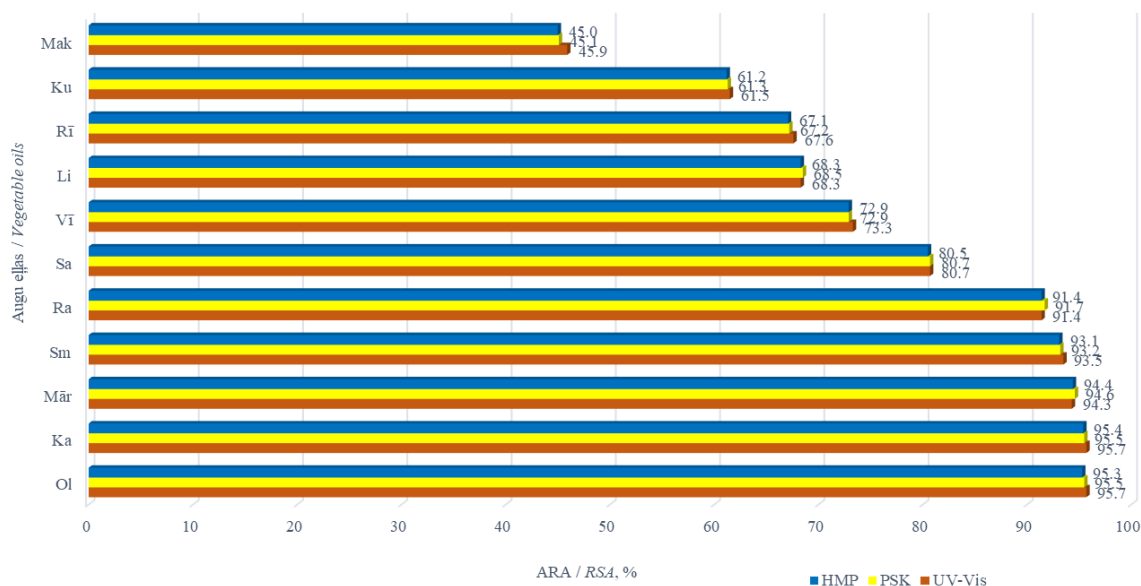
Abs_{oil} – RG_{avg} DPPH + augu eļļas pēc 30 min.

Datu apstrāde / statistiskā analīze: pētījuma dati tika analizēti ar statistikas un matemātikas metodēm (vidējā, standartnovirze). Datu analīzei tika izmantota "Microsoft Excel" programmatūras 2016. gada versija. Paraugi tika analizēti piecos atkārtojumos.

Rezultāti un diskusijas

Viedtālruņa attēla sensori uztver RGB jeb R – sarkanās, G – zaļās un B – zilās krāsas modeļu sistēmu (Kong et al., 2019). Dabā baltā krāsa sastāv no visām trim pamatkrāsām, tādēļ analīžu veikšanai un DPPH šķīduma un kontroles mēģinājumam tika izmantots baltās krāsas fons. Katra RGB modeļu sistēmas krāsa (sarkana, zaļa, zila) tiek izteikta pikseļos, kas svārstās robežās no 0 līdz 255, līdz ar to baltās krāsas pikseļu diapazonam ir jāsakrīt ar pamatkrāsām jeb 255 pikseļiem. Teorētiski, ja tiek izmantots baltās krāsas fons, visu trīs pamatkrāsu pikseļu rādītājam jābūt 255, tomēr pētījumā tika konstatēts, ka kontroles jeb 96% etanola šķīduma RGB uzrādīja 180 pikseļus. Šāds pikseļu diapazons samazinājums var būt skaidrojams ar izmantoto etanola koncentrāciju, gaismu un viedtālruņa attēla kameras parametriem. Viedtālruņa bilžu iegūšanai fotostudijā PULUZ tiek izmantotas LED diodes ar krāsas temperatūru 3200 K, kas ir tumšāka par pilnīgas baltās krāsas izgaismošanu, kas atbilst 8000 Kelvinu (Held, 2016).

Antiradikālās aktivitātes noteikšanai ar 2,2-defenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) reaģentu augu eļļās tika izmantotas tikai sarkanās un zaļās krāsas spektrs jeb RG modelis, kas iepriekšējā pētījumā uzrādīja vislabākos rezultātus (Vucane et al., 2020).



Ol – Olīvu/Olive, Ka – Kaņepju/Hemp, Mār – Mārdadžu /Milk thistle, Sm – Smiltsērķšķu /Sea buckthorn, Ra – Rapšu/Rapeseed, Sa – Saulespuķu/Sunflower, Vī – Vīnogu/Grape, Li – Linskēklu/Linseed, Rī – Rīsu/Rice, Ku – Kukurūzas/Corn, Mak – Makadamijas riekstu /Macadamia nut.

2. att. HMP, PSK, UV/Vis antiradikālās aktivitātes salīdzināšana, izmantojot viedtālrunī iegūto attēla analīzi, lietojot RG moduli.

Fig. 2. Comparison of free radical scavenging activity (%RSA) by HMP, PSK, UV/Vis and Smartphone-based image analysis with RG module.

Lai salīdzinātu stikla hromatogrāfijas pudeles (HMP) ar polistirola kivešu (PSK) ietekmi uz rezultātu datiem, kā kontrole tika izmantota UV/Vis spektroskopija. Pētījuma rezultāti apliecināja (skat. 2. att.), ka ARA RG moduļa, un aprēķinātā t vērtība viedtālrunī balstītai attēlu analīzei bija zemāka par kritisko t vērtību ($0.47, p > 0.05$), tāpēc netika novērota statistiska atšķirība 95% ticamības līmenī starp antiradikālo aktivitāti, izmantojot analīzei HMP, PSK un UV/Vis spektroskopiju. Visaugstākā antiradikālā aktivitāte augu eļļās tika noteikta, izmantojot UV/Vis spektroskopiju, HMP un PSK olīvu $95.7 \pm 0.1\%$ – $95.3 \pm 0.7\%$, kaņepju $95.7 \pm 0.1\%$ – $95.4 \pm 0.7\%$, mārdadža $94.3 \pm 0.1\%$ – $94.6 \pm 0.6\%$, smiltsērķšķu $93.5 \pm 0.1\%$ – $93.1 \pm 0.7\%$ un rapšu sēklu $91.4 \pm 0.1\%$ – $91.7 \pm 0.7\%$ eļļā, bet zemākā aktivitāte tika konstatēta makadamijas riekstu $45.9 \pm 0.1\%$ – $45.0 \pm 0.6\%$, kukurūzas $61.5 \pm 0.1\%$ – $61.2 \pm 0.6\%$ un rīsu $67.6 \pm 0.1\%$ – $67.1 \pm 0.6\%$ eļļā. Attēlu veidošanas metodes precizitāte tika vērtēta pēc relatīvās standartnovirzes (% RSD). Analīzei izmantojot UV/Vis spektroskopiju, RSD vērtība bija mazāka un uzrādīja labāku jutību – 0.1%. Izmantojot ar viedtālruni iegūtu attēlu analīzi, tika konstatēts, ka RSD bija augstāka, salīdzinot ar UV/Vis spektroskopiju un atradās robežās no 0.6 līdz 0.7% gan ar HMP, gan ar PSK. Diemžēl literatūrā trūkst zinātnisku pētījumu par antiradikālās aktivitātes noteikšanu ar PSK un HMP, izmantojot viedtālrunī balstītu attēlu analīzi.

Secinājumi

Pētījumā tika iegūta jauna metodika antiradikālās aktivitātes noteikšanai, aizstājot klasiskajā spektroskopijā izmantotās PSK ar HMP. Pamatojoties uz viedtālrunī balstītu attēlu analīzi, iegūtie rezultāti apliecināja, ka, izmantojot RG krāsu vērtības, augu eļļās iespējams noteikt ARA ar tādu pašu precizitāti kā PSK. Lai gan UV/Vis spektroskopijai raksturīga labāka jutība, tomēr rezultāti apliecināja, ka ARA noteikšanai var izmantot attēlu analīzi, lietojot viedtālruni. Viedtālrunī balstīta attēlu iegūšana ir vienkārša, viegli transportējama un par salīdzinoši zemākām izmaksām, tāpēc ir jāizstrādā jaunas noteikšanas metodes dažādām ķīmiskām analīzēm, pamatojoties uz viedtālruni digitālo attēlu analīzi.

Pateicība

Zinātniskais darbs tiek īstenots LLU programmas "Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU" zinātniskā projekta Nr. 3.2.-10/126, Z46 ietvaros.

Izmantotā literatūra

1. Ahmed D., Khan M. M., Saeed R. (2015). Comparative Analysis of Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant and Antibacterial Potential of Methanolic, Hexanic and Aqueous Extracts from *Adiantum caudatum* Leaves. *Antioxidants* 2015, 4, p. 394–409.
2. Anderson R. J., Bendell D. J., Groundwater P. W. (2004). *Organic Spectroscopic Analysis*. Royal Society of Chemistry; 1 edition, 8. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 182 p.
3. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. – *Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie*, Vol. 28, No.1, p. 25–30.
4. Coskun A., Wong J., Khodadadi D., Nagi R., Tey A., Ozcan A. (2012). A personalized foodallergen testing platform on a cellphone, *Lab Chip* 13, 636–640.
5. Firdaus M. L., Alwi W., Trinoveldi F., Rahayu I., Rahmidar L., Warsito K. (2014). Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry. *Procedia Environmental Sciences*, 20, p. 298–304.
6. Held G. (2016). *Introduction to Light Emitting Diode Technology and Applications*. CRC Press, p. 49.
7. Jamalipour A., Hossain M. A. (2019). *Smartphone Instrumentations for Public Health Safety*. Springer Nature Switzerland, 98.
8. Janson E., Meija J. (2002). *Kļūdas kvantitatīvajās noteikšanās* (Errors of quantitative determinations). Rīga: Rasa ABC.
9. Kong T., You J. B., Zhang B., Nguyen B., Tarlan F., Jarvi K., Sinton D. (2019). Accessory-free quantitative smartphone imaging of colorimetric paper-based assays. *Lab on a Chip*. 19(11), p. 1991–1999.
10. Kroemer S., Fruhauf J., Campbell T. M., Massone C., Schwantzer G., Soyer H.P. (2011). Mobile teledermatology for skin tumour screening: diagnostic accuracy of clinical and dermoscopic image tele-evaluation using cellular phones, *British Journal of Dermatology* 164. 973–979.
11. Masawat P., Harfield A., Namwong A. (2015). An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. *Food Chemistry* 184 (2015), p. 23–29.
12. Rhyne T. M. (2016). *Applying Color Theory to Digital Media and Visualization*. Boca Raton: CRC Press, 206 p.
13. St. Angelo A. J. (1996). *Lipid oxidation in foods*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, p. 175–224.
14. Vucane S., Sabovics M., Leitans L., Cinkmanis I. (2020). Smartphone-based colorimetric determination of DPPH free radical scavenging activity in vegetable oils. *In: Research for Rural Development 2020: annual 26th International scientific conference proceedings*, Jelgava, Latvia, 13–15 May, 2020 / Latvia University of Life Sciences and Technologies. Jelgava, 2020. Vol.35, p. 106–111.
15. Yetisena A. K., Martinez-Hurtadoa J. L., Garcia-Melendrezb A., da Cruz Vasconcellosa F., Lowea C. R. (2014). A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests. *Sensors and Actuators B* 196, p.156–160.
16. Zhu H., Mavandadi S., Coskun A. F., Yaglidere O., Ozcan A. (2011). Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone. *Analytical Chemistry* 83, p. 6641–6647.