

TRABAJO FIN DE GRADO

Determinación colorimétrica de hipoxantina mediante métodos enzimáticos y/o generación de nanomateriales.

Colorimetric determination of hypoxanthine by enzymatic methods and/or generation of nanomaterials.

Autor:

Juan Albareda Torrijo

Directora:

Isabel Sanz Vicente

Este trabajo es parte del proyecto de I+D+i PID2022-139235OB-I00 financiado por MICIN/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER “Una manera de hacer Europa”, y las ayudas del Gobierno de Aragón a los grupos de investigación E-25_23R.

Resumen

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método analítico enzimático colorimétrico que permita la determinación de hipoxantina de forma cuantitativa.

Este método está basado en una reacción enzimática que oxida la hipoxantina a ácido úrico produciendo peróxido de hidrógeno en el proceso, el cual se acopla a una reacción indicadora que consiste en la reacción de los peróxidos con un colorante de tal forma que se pueda seguir la reacción mediante espectroscopía de absorción molecular.

En primer lugar, se hace un estudio de la reacción indicadora para decidir que colorante será utilizado. Despues se optimizarán los parámetros de la reacción general que son el colorante (TMB o AR) y su concentración, la enzima HRP, la enzima XO y la disolución amortiguadora con su concentración y pH.

Con los resultados obtenidos se realizará la calibración de hipoxantina mediante absorción y fluorescencia sobre una disolución amortiguadora de TRIS 0,1 M a pH 8, con 0,24 U/mL de HRP, 0,2 U/mL de XO y $3 \cdot 10^{-5}$ M de AR. En ambos casos se obtiene una recta de calibrado de las que se obtienen los parámetros analíticos. Mediante absorción se obtiene 70567,11 L/mol de sensibilidad, $2,47 \cdot 10^{-8}$ M de límite de detección, $8,22 \cdot 10^{-8}$ M límite de cuantificación y un rango lineal de $8,22 \cdot 10^{-8}$ M a $1,00 \cdot 10^{-5}$ M. Por fluorescencia se obtiene $6,35 \cdot 10^7$ L/mol de sensibilidad, $5,34 \cdot 10^{-8}$ M de límite de detección, $1,78 \cdot 10^{-7}$ M límite de cuantificación y un rango lineal de $1,78 \cdot 10^{-7}$ M a $1,50 \cdot 10^{-6}$ M.

A partir de las diferencias en las cinéticas entre xantina e hipoxantina se aborda la determinación de mezclas de ambas permitiendo la determinación de xantina en presencia de hipoxantina.

Abstract

The aim of this study is to develop an enzymatic colorimetric analytical method that allows the quantitative determination of hypoxanthine.

This method is based on an enzymatic reaction that oxidizes hypoxanthine to uric acid, producing hydrogen peroxide in the process, which is coupled with an indicator reaction where the peroxides react with a dye. This allows the reaction to be monitored via molecular absorption spectroscopy.

First, a study of the indicator reaction is conducted to decide which dye will be used. Then, the parameters of the overall reaction will be optimized, including the dye (TMB or AR) and its concentration, the enzyme HRP, the enzyme XO, and the buffer solution along with its concentration and pH.

With the results obtained, hypoxanthine calibration will be performed using absorption and fluorescence in a 0,1 M TRIS buffer solution at pH 8, with 0,24 U/mL of HRP, 0,2 U/mL of XO, and $3 \cdot 10^{-5}$ M of AR. In both cases, a calibration curve will be obtained from which analytical parameters are obtained. Through absorption, a sensitivity of $70567,11$ L/mol, a detection limit of $2,47 \cdot 10^{-8}$ M, a quantification limit of $8,22 \cdot 10^{-8}$ M, and a linear range from $8,22 \cdot 10^{-8}$ M to $1,00 \cdot 10^{-5}$ M are obtained. Through fluorescence, a sensitivity of $6,35 \cdot 10^7$ L/mol, a detection limit of $5,34 \cdot 10^{-8}$ M, a quantification limit of $1,78 \cdot 10^{-7}$ M, and a linear range from $1,78 \cdot 10^{-7}$ M to $1,50 \cdot 10^{-6}$ M are obtained.

Based on the differences in the kinetics between xanthine and hypoxanthine, the determination of mixtures of both will be addressed, allowing for the determination of xanthine in the presence of hypoxanthine.

Abreviaturas

ATP – Adenosín trifosfato

ADP – Adenosín difosfato

AMP – Adenosín monofosfato

IMP – Inosina monofosfato

Ino – Inosina

HX – Hipoxantina

X – Xantina

AU – Ácido úrico

XO – Xantina oxidasa

HRP – Peroxidasa

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

AR – AmplexRed

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano $8(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$

Fosfatos – Hidrogenofosfato de sodio (Na_2HPO_4)

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Hipoxantina	1
1.2	Métodos de determinación	2
2.	Objetivos y planteamiento	3
3.	Parte experimental.....	4
3.1	Instrumentos y materiales	4
3.1.1	Instrumentos	4
3.1.2	Materiales y aparatos	4
3.2	Reactivos y disoluciones	4
3.3	Procedimiento experimental	5
3.3.1	Medidas de absorbancia en espectrofotómetro	5
3.3.2	Medidas de absorbancia en fluorímetro	5
3.3.3	Medidas de fluorescencia en fluorímetro	6
3.3.4	Medidas de fluorescencia quenching en PTI	6
4.	Resultados	7
4.1	Estudios previos	7
4.2	Elección del colorante.....	9
4.3	Optimización (Parámetros ópticos).....	11
4.4	Optimización (Parámetros reacción).....	12
4.4.1	Optimización de la XO.....	12
4.4.2	Optimización del pH	13
4.4.3	Optimización del AR	14
4.4.4	Optimización del HRP	14
4.5	Calibración hipoxantina. Características analíticas.	15
4.5.1	Mediante fluorescencia.....	15
4.5.2	Mediante absorción.....	15
4.6	Determinación de Xantina e Hipoxantina en mezclas	16
4.6.1	Condiciones	16
4.6.2	Determinación de xantina	19
4.6.3	Determinación de hipoxantina	20
5.	Conclusiones.....	22
6.	Bibliografía.....	23

1. Introducción

1.1 Hipoxantina

Una de las biomoléculas más estudiadas en los últimos tiempos es el ATP (adenosín trifosfato, figura 1.1) debido a su importancia como fuente energética en todos los seres vivos.

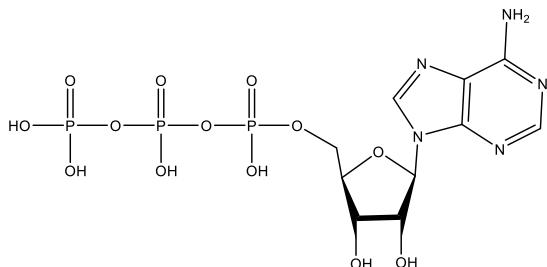


Figura 1.1 ATP

Este nucleótido está compuesto por una base nitrogenada llamada adenina, un azúcar tipo pentosa llamado ribosa y tres grupos fosfato que son los causantes de la función energética del ATP. Es por eso por lo que los organismos presentan una elevada concentración de esta molécula mientras se encuentran en un estado óptimo. Sin embargo, cuando el organismo muere se deja de producir este nucleótido y comienzan una serie de reacciones en cascada^{1,2} que acaban degradando el ATP a ácido úrico (Figura 1.2).

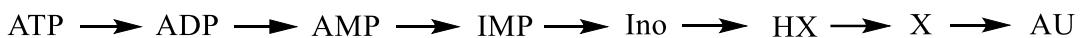


Figura 1.2. Ruta de degradación de ATP

Uno de los indicadores de frescura en los alimentos se basa en esta misma degradación ya que cuanto más ATP haya en el alimento más fresco será. Durante el proceso de degradación disminuyen las concentraciones de productos intermedios como la inosina monofosfato (IMP) o la inosina (Ino) y se acumulan las de los productos finales, hipoxantina (HX) o xantina (X) que, al igual que ocurre con las aminas biogénas, se identifican con una pérdida de calidad alimentaria³. Por este motivo es por el que se han propuesto diferentes parámetros para establecer la frescura de los alimentos basados en esta ruta metabólica, entre ellos la concentración de HX⁴ cuya estructura se observa en la figura 1.3.

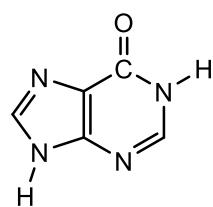


Figura 1.3 Hipoxantina

Además de ser importante su determinación como índice de frescura en alimentos también lo es porque se ha descubierto que es un importante biomarcador de diferentes enfermedades como la hipoxia^{5,6}, el Alzheimer⁷, la esclerosis múltiple⁸ o el cáncer colorrectal⁹.

Por otro lado, ya que la HX y X son indicadores de metabolismo de ATP, pueden ser utilizados como marcadores de rendimiento durante el entrenamiento físico y es importante su cuantificación después del ejercicio para controlar la recuperación de los atletas después de entrenamientos de alta intensidad¹⁰.

1.2 Métodos de determinación

Debido a la importancia de conocer la concentración de hipoxantina (y de xantina) existen muchos métodos que se pueden encontrar en la bibliografía. Los más utilizados usan técnicas de separación que incluyen electroforesis capilar¹¹, cromatografía de gases¹² o cromatografía líquida de alta precisión^{13,14}.

Aunque estos métodos son útiles para separar los compuestos en mezclas complejas, requieren de mucha instrumentación y tiempo de preparación.

Una alternativa son los métodos ópticos enzimáticos como el que hace uso del sensor colorimétrico CUPRAC. Este método se usa como indicador de la frescura de peces y consiste en la interacción del sensor CUPRAC con los productos de la reacción enzimática de la hipoxantina generando un quelato cromóforo que absorbe a 450 nm¹⁵. El sensor responde a los productos de la reacción enzimática, tanto a H₂O₂ como a ácido úrico.

El método usado en este trabajo se basa en la reacción enzimática de hipoxantina con xantina oxidasa (Figura 1.4) produciendo peróxidos (H₂O₂) como subproducto.

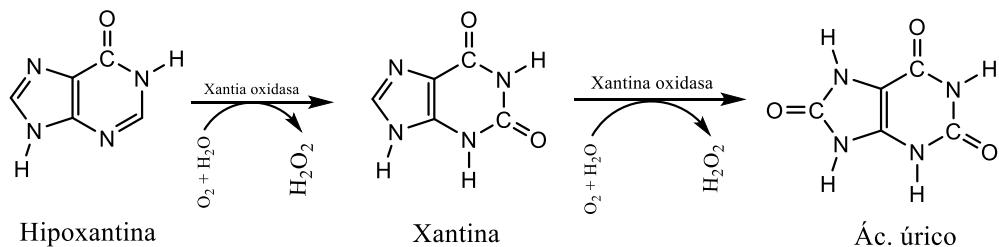


Figura 1.4. Reacción enzimática de hipoxantina con xantina oxidasa

Los peróxidos producidos reaccionan con peroxidasa oxidándola y reaccionando a su vez con un colorante incoloro que al oxidarse se vuelve coloreado.

La reacción se puede seguir midiendo las propiedades ópticas del colorante. Observando las diferencias en los perfiles cinéticos de la reacción de la xantina oxidasa con xantina y con hipoxantina podría llevarse a cabo una determinación diferenciada de ambos compuestos.

2. Objetivos y planteamiento

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un método enzimático para determinar hipoxantina. Este método se basa en la secuencia de reacciones mostrada en la figura 2.1:

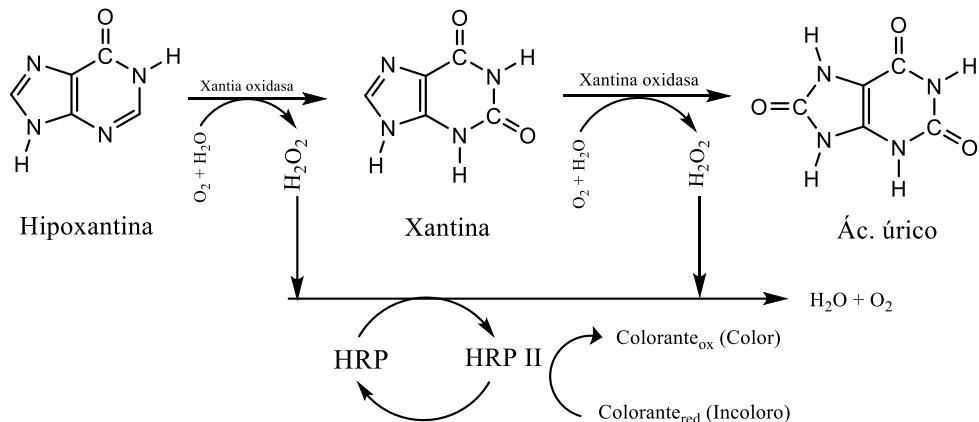


Figura 2.1 Esquema de planteamiento de la reacción

En la primera secuencia de reacciones la hipoxantina reacciona con una enzima llamada xantina oxidasa (XO) dando como productos una molécula de peróxido de hidrógeno y otra de xantina. La xantina reacciona a su vez con XO para acabar dando otra molécula de H₂O₂ y ácido úrico.

En la segunda secuencia de reacciones el H₂O₂ liberado al medio se hace reaccionar con la enzima peroxidasa (HRP) dejando a esta enzima en un estado oxidado HRP II y al H₂O₂ reducido de nuevo a agua y oxígeno, los reactivos originales. El HRP II oxidado reacciona ahora con un colorante añadido al medio que pasa de su forma reducida incolora a su forma oxidada coloreada.

La señal analítica será la variación de absorbancia o fluorescencia, dependiendo de las propiedades ópticas del colorante, que será proporcional a la concentración del analito.

Los objetivos más concretos de este trabajo son:

1. Aprender a trabajar con técnicas de absorción y fluorescencia molecular.
2. Estudiar y optimizar los parámetros de la reacción de hipoxantina con xantina oxidasa y peroxidasa en presencia de un colorante.
3. Establecer las características analíticas del método.
4. Estudiar las posibilidades de determinación simultánea de xantina e hipoxantina.
5. Extraer la información analítica de los datos obtenidos en el laboratorio, realizando los tratamientos estadísticos necesarios de los mismos, así como la correcta exposición de los resultados.

3. Parte experimental

3.1 Instrumentos y materiales

3.1.1 Instrumentos

- Espectrofotómetro PerkinElmer LAMBDA 465 UV/Vis de red de diodos. Rango de medida de 190 a 1100 nm. Lámpara doble de tungsteno y deuterio. Rango de temperatura de 15 a 35°C.
- Espectrofluorímetro Cary Eclipse Agilent Technologies. Rango de emisión de 200 a 900 nm y de excitación de 200 a 900 nm. Lámpara de xenón de 8 W. Posiciones de rendija ajustables. Soporte para cubetas y placas de pocillos.
- Luminómetro PTI (Photon Technology International) Time Master (model TM-2/2003-PTI). Presenta una lámpara de xenón de 70 W con un detector fotomultiplicador.
- Balanza analítica AND modelo GR-202-EC de precisión ±0,01mg.
- pH-metro CRISON, Basic 20.

3.1.2 Materiales y aparatos

- Micropipetas Eppendorf de volúmenes 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur y tubos Falcon™.
- Cubetas de PMMA de 4 mL y 1,5 mL y 1 cm de paso óptico.
- Cubetas de vidrio de 4 mL y 1 cm de paso óptico
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Placas de pocillos Nunc™.
- Baño ultrasonidos P selecta, Precisterm.

3.2 Reactivos y disoluciones

- Disolución amortiguadora fosfatos $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (131679.1211) de concentración 0,1 M y pH 6 a 8; se prepara disolviendo aproximadamente 0,7 g de Na_2HPO_4 ($M_m=141,96$ g/mol) en 50 mL de agua mili-Q, ajustando el pH con una disolución de HCl 2 M.
- Disolución amortiguadora TRIS $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}^+/(CH_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ (28812.232) de concentración 0,1 M y pH 8; se prepara disolviendo aproximadamente 0,6 g de $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ ($M_m=121,14$ g/mol) en 50 mL de agua mili-Q, ajustando el pH con una disolución de HCl 2 M.
- Peroxidasa (HRP) (P8125-25KU), 89,63 U/mg; se prepara una disolución 12 U/mL disolviendo 1 mg en 1 mL de agua mili-Q y diluyendo 134 µL en 866 µL de agua mili-Q.
- 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (862336-1G), 240,35 g/mol; se prepara una disolución de $5 \cdot 10^{-4}$ M disolviendo 6 mg en 500 µL de DMSO y haciendo una dilución 1/100.
- Ampliflu Red (AR) (90101-5MG), 257,24 g/mol; se prepara una disolución de $1 \cdot 10^{-3}$ M disolviendo 5 mg en 20 mL de DMSO obteniendo 100 viales de 200 µL.

- Xantina oxidasa (X2252-25UN), 25 U/mg; se prepara una disolución 7 U/mL disolviendo 1 mg en 25 mL de tampon fosfatos 0,1 M a pH 7 obteniendo 10 viales de 100 µL y 25 U/mL y diluyendo 28 µL en 72 µL de agua mili-Q.
- Peróxido de hidrógeno (216763-500ML), 9,8 M; se prepara una disolución 0,098 M disolviendo 20 µL en 1980 µL de agua mili-Q.
- Xantina (X4002-5G), 152,11 g/mol; se prepara una disolución de concentración 0,04 M disolviendo 6,5 mg en 425 µL de agua mili-Q y 525 µL de NaOH 0,1 M con posterior baño de ultrasonidos para completa disolución.
- Hipoxantina (H9636-5G), 136,1 g/mol; se prepara una disolución de concentración 0,04 M disolviendo 6 mg en 425 µL de agua mili-Q y 525 µL de NaOH 0,1 M con posterior baño de ultrasonidos para completa disolución.

3.3 Procedimiento experimental

3.3.1 Medidas de absorbancia en espectrofotómetro

Las medidas de absorbancia se llevan a cabo en cubetas de PMMA de bajo volumen (1,5 mL). Primero se añade 626 µL de disolución amortiguadora seguido de 14 µL HRP 12 U/mL, 20 µL de XO 7 u/mL y 20 µL de AR $1 \cdot 10^{-3}$ M. Se mezcla bien y se comienza a medir tomando esta señal como línea base. Tras la estabilización de la señal (unos 60 s) se añaden 20 µL de analito, ya sea hipoxantina o xantina, hasta un volumen máximo de 700 µL y se obtiene la variación de la señal.

En el caso de las cubetas de PMMA de 4 mL se añade primero 1872 µL de tampon seguido de 40 µL de HRP 12 U/mL, 8 µL de XO 25 U/mL y 40 µL de AR $1 \cdot 10^{-3}$ M. Tras la estabilización de la señal se añaden 40 µL de HX/X hasta los 2000 µL.

Para la medida únicamente de los peróxidos es igual que en los casos anteriores, pero sin añadir los 20 µL de XO que se sustituyen por 20 µL más de tampon.

Las medidas se toman mediante un barrido espectral de 190 nm a 1100 nm tomando medidas cada 3, 5 o 10 segundos, dependiendo de la medida. Una vez obtenido el espectro se toman las señales a 650 nm en el caso del TMB y a 573 nm en el caso del AR. Para el apartado 4.7 las muestras fueron tomadas cada 3 segundos.

3.3.2 Medidas de absorbancia en fluorímetro

Para las lecturas en el fluorímetro en placas de pocillos se añaden primero 150 µL de tampon, 20 µL de HRP 1,2 U/mL y 10 µL de TMB 0,01 M. Posteriormente se añaden 20 µL de peróxidos hasta los 200 µL totales y se deja reaccionar unos segundos, entonces se lleva a cabo la medida. Se toma como referencia agua mili-Q y como blanco la disolución previa a añadir el analito. Se utilizan tantos pocillos como puntos de la recta se requieran más los dos de referencia y blanco, de forma que se miden todos los puntos de forma simultánea.

Se utiliza la opción de fluorescencia sincrónica en la que se hace un barrido de excitación y emisión haciendo que el desplazamiento en la longitud de onda sea cero. Se excita y se emite en un rango de 400 a 800 nm de forma simultánea obteniendo datos de intensidad a las diferentes longitudes de onda. La excitación y emisión se realiza por la cara superior de la placa.

3.3.3 Medidas de fluorescencia en fluorímetro

Las medidas de fluorescencia se hacen igual que las de absorbancia en el espectrofotómetro. Primero se añaden los reactivos y se coloca la cubeta en el soporte del instrumento midiendo la excitación a 575 nm y la emisión a 610 nm. El tamaño de rendijas de excitación y emisión se fijó en 2,5 y 5 nm respectivamente para no saturar la señal. Tras la estabilización de la señal se añade el analito.

3.3.4 Medidas de fluorescencia quenching en PTI

Para las medidas en el luminómetro PTI del quenching de fluorescencia se usan cubetas de PMMA de 4 mL en las que se añaden 1955 μ L de disolución amortiguadora de fosfatos 0,1 M a pH 6 y 8, 16 μ L de XO 25 U/mL y 9 μ L de una sal de rutenio $1 \cdot 10^{-3}$ M. Para completar los 2000 μ L de la cubeta se termina añadiendo 20 μ L de X o HX tras la estabilización de la señal. Se usaron como longitud de onda de emisión 610 nm y de excitación 460 nm.

4. Resultados

4.1 Estudios previos

Se comienza estudiando la segunda secuencia de reacciones que corresponde a la parte indicadora del método ya que es la que va a marcar la sensibilidad. Se empezó usando como colorante 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) ya que había sido utilizado con anterioridad en el grupo de investigación. Este colorante es incoloro en su estado reducido y azul en su estado oxidado. En la figura 4.1 a. se puede ver que presenta un máximo de absorción a 650 nm. Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1 se midió la variación de absorbancia a 650 nm obteniendo las señales de la figura 4.1 b.

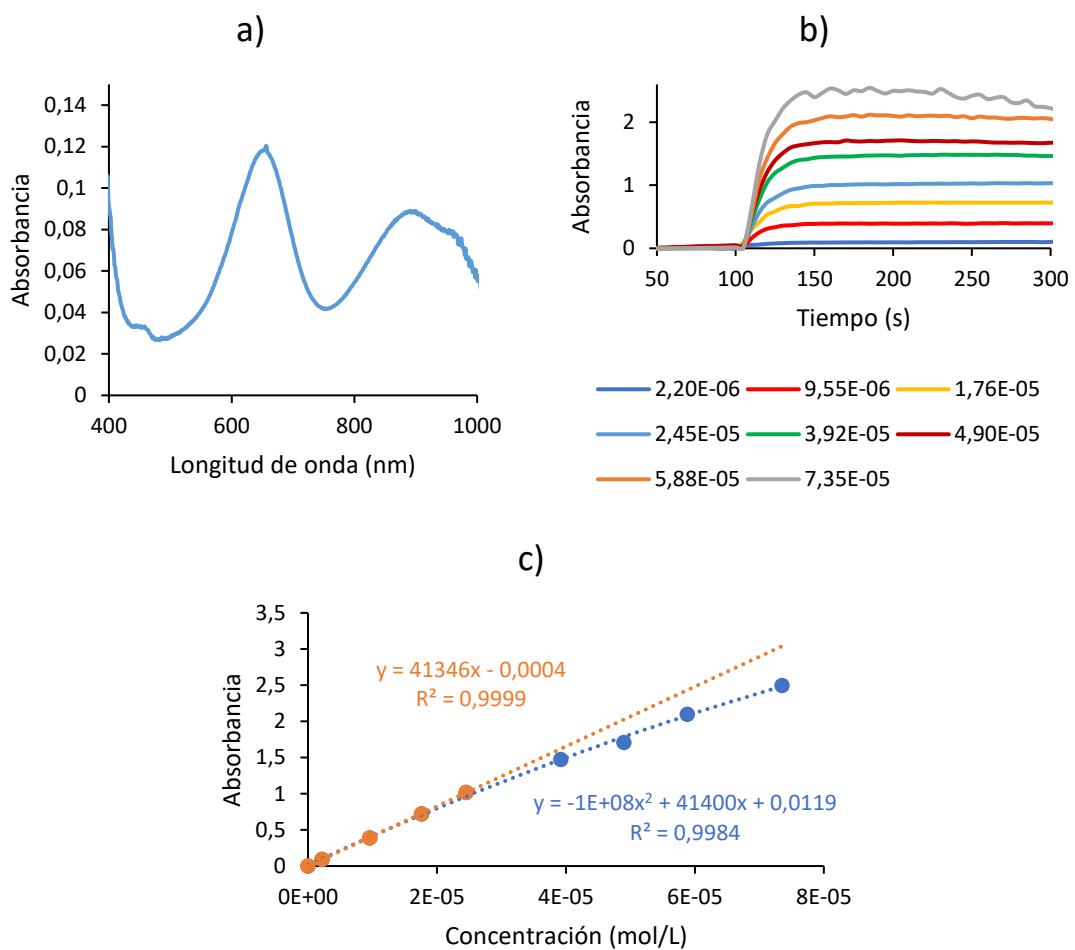


Figura 4.1. Calibración de peróxidos con TMB. Condiciones en cubeta: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,12 u/mL. TMB $5,0 \cdot 10^{-4}$ M. a) Espectro de absorción del TMB con $2,2 \cdot 10^{-6}$ M de peróxidos. b) Señales de absorción a 650 nm. c) Calibración de H_2O_2 .

La figura 4.1 c. muestra la gráfica de calibración obtenida, obteniendo una respuesta lineal hasta $2,45 \cdot 10^{-5}$ M.

El grupo de investigación tiene un fluorímetro equipado con lector de placas por lo que, con el fin de reducir el gasto de reactivos, se estudió la posibilidad de realizar medidas de absorbancia con el fluorímetro usando las placas de pocillos de 200 microlitros (procedimiento 3.3.2). Allí se obtienen medidas de intensidad de luz en un rango de longitudes de onda, por lo que, para

transformar las señales en medidas de absorción es necesario usar la ley de Lambert-Beer, que es la ley que define la absorción como el logaritmo decimal del cociente de intensidades, una de la muestra (I) y otra de la referencia (I_0) (1), por lo que se debe medir también la intensidad de una muestra de referencia, tratándose en este caso de agua mili-Q.

$$Abs = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1)$$

Siguiendo la ecuación 1 se toman parejas de datos de intensidades a la misma longitud de onda, una la muestra y otra la referencia, se toma su cociente y se realiza el logaritmo decimal, obteniéndose un dato de absorbancia a dicha longitud de onda. Repitiendo el proceso para cada concentración de analito se consigue transformar el espectro de intensidades (Figura 4.2 a) en los espectros de absorbancias (Figura 4.2 b).

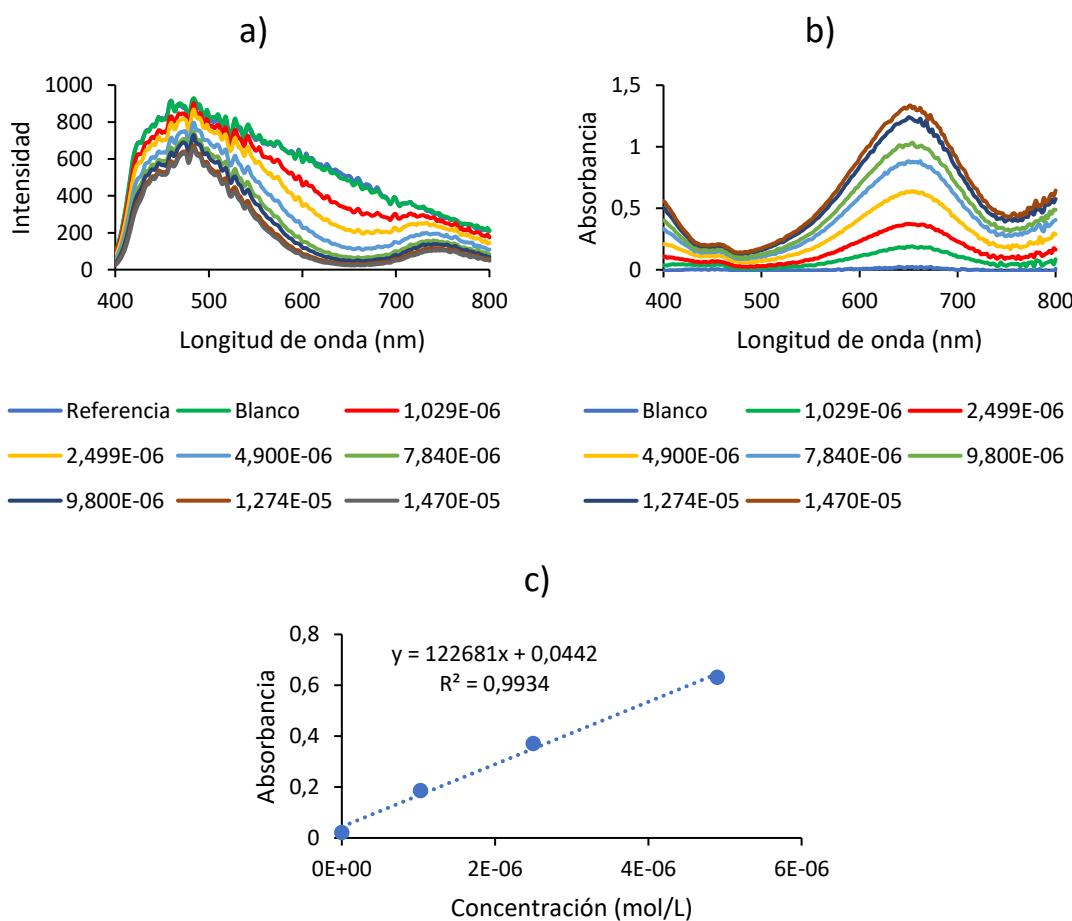


Figura 4.2 Espectros de peróxidos con TMB en pocillos. Condiciones en pocillos: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,12 u/mL. TMB $5,0 \cdot 10^{-4}$ M. a) Espectro intensidades. b) Espectro absorción. c) Recta calibrado.

Como se puede observar, una vez tratados los datos, el espectro de absorbancia del TMB oxidado se corresponde con lo obtenido en el espectrofotómetro, lo que pone de manifiesto que se puede usar esta metodología para medir la cantidad de luz absorbida por el analito.

Sin embargo, el rango lineal es más pequeño por lo que se decidió seguir usando el espectrofotómetro de red de diodos, pero con cubetas de bajo volumen, de 700 microlitros.

Una vez estudiada la reacción indicadora el siguiente paso fue estudiar cómo se comporta con el conjunto de la reacción. La enzima no se había probado en el grupo de investigación por lo que primero se buscaron unas condiciones en que se observara señal. (Figura 4.3). La señal sube hasta alcanzar un máximo y luego desciende, lo que indica que algún reactivo o producto de la reacción reduce el TMB oxidado. Con el fin de evitarlo, se hicieron pruebas aumentando la concentración de TMB, pero no se obtuvo señal. El TMB está disuelto en DMSO por lo que al aumentar la concentración se está aumentando la cantidad de DMSO que afecta a la actividad enzimática.

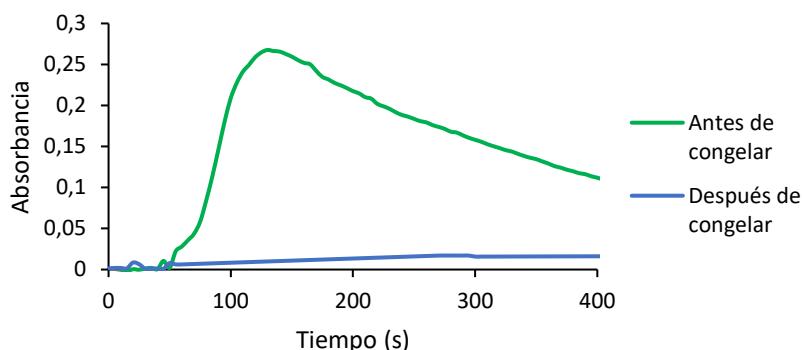


Figura 4.3 Primera señal de HX. Condiciones en cubeta pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,12 u/mL. TMB $5 \cdot 10^{-4}$ M. XO 0,25 u/mL. HX $1,8 \cdot 10^{-4}$ M.

Con el fin de aumentar la concentración de TMB, pero sin aumentar la de DMSO se preparó una disolución inicial lo más concentrada posible. Sin embargo, al repetir las pruebas en las mismas condiciones, pero días distintos, se observó una disminución considerable de la actividad de la enzima XO, que impedía obtener una señal analítica observable. La única diferencia con las medidas anteriores es que la enzima fue congelada para favorecer su conservación, lo que acabó dando el resultado contrario. Por lo tanto, se llega la conclusión de que la xantina oxidasa no debe congelarse y a partir de ahora se conservará en el frigorífico.

4.2 Elección del colorante

Una vez recibida la nueva enzima se estudió cómo influía la concentración de xantina oxidasa en su reacción con xantina obteniendo los resultados de la Figura 4.4.

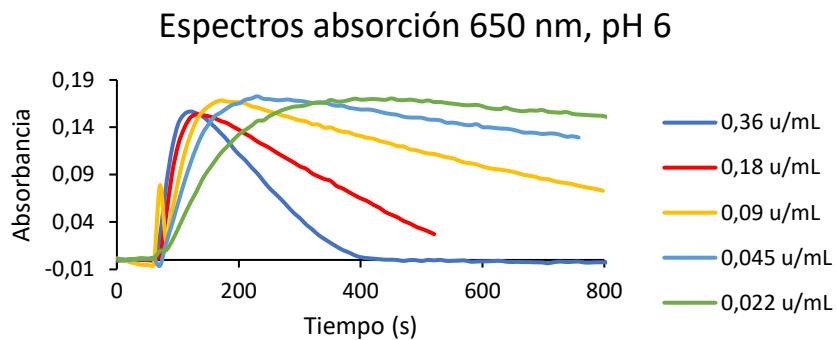


Figura 4.4 Señales de absorción a 650 nm de Xantina. Condiciones: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,12 u/mL. TMB $5,0 \cdot 10^{-4}$ M. X $1,12 \cdot 10^{-3}$ M.

Se puede ver que la enzima funciona con su actividad normal, es decir, que la cinética es mayor conforme se va aumentando la concentración de XO, pero también se ve que la señal del TMB decrece con el tiempo una vez alcanzado el máximo. A más enzima más rápido decrece la señal por lo que se puede asumir que la inestabilidad del TMB está relacionada con la cantidad de xantina oxidasa que hay en el medio. Esto se debe a que el TMB reducido incoloro reacciona con la peroxidasa oxidada pasando a tener TMB oxidado de color azul haciendo que aumente la señal. A continuación, el TMB es reducido de nuevo debido a la presencia de algunas proteínas que forman la xantina oxidasa, perdiendo su color azul y por tanto disminuyendo la señal.

Todos estos resultados sirven para ver que, en estas condiciones, la señal del TMB oxidado no es estable, por lo que no sirve este colorante para lo que se busca en este trabajo, aunque no es descartable su uso para otros objetivos que no precisen de una señal estable. El trabajo continúa usando a partir de ahora otro colorante llamado AmplexRed que ya había sido estudiado en el grupo de investigación, y se sabía que el producto oxidado coloreado era más estable que el del TMB. Este colorante pasa de incoloro a rosa absorbiendo a 573 nm y además presenta fluorescencia.

Para comprobarlo se realizó una prueba con distintas concentraciones de xantina observando los resultados de la figura 4.5.

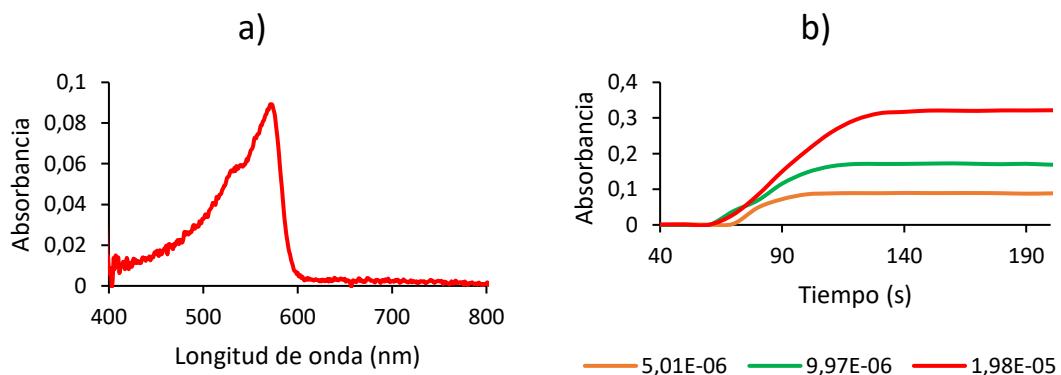


Figura 4.5 a) Espectro de absorción de AR b) Señales de absorción a 573 nm de X. Condiciones en cubeta: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,2 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M.

Los resultados recogidos en la Figura 4.5 demuestran la estabilidad del AmplexRed con el tiempo, por lo que en adelante se trabajará únicamente con este colorante y se trabajará indistintamente tanto con medidas de absorción como de fluorescencia.

4.3 Optimización (Parámetros ópticos)

Todos los parámetros de la reacción serán optimizados en el fluorímetro mediante fluorescencia y siguiendo el protocolo descrito en 3.3.3.

Lo primero es realizar un espectro de emisión y excitación para encontrar los máximos de fluorescencia mostrado en la Figura 4.6.

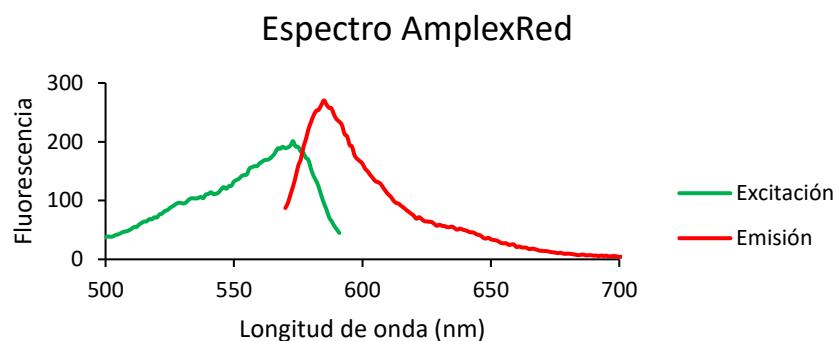


Figura 4.6 Espectro de fluorescencia del AmplexRed

El espectro de emisión está realizado excitando a 560 nm para evitar que el pico de la dispersión de Rayleigh se solape con el pico máximo de emisión y así poder ver con más exactitud a que longitud de onda se encuentra. También, para evitar que sature la señal se ha reducido el tamaño de rendija de excitación a 2,5 nm. De esta forma se ve que el máximo de emisión del AmplexRed es 585 nm.

El espectro de excitación se ha realizado con el monocromador de emisión en 585 nm y tiene un tamaño de rendija de excitación de 2,5 nm. Aquí se ve que el máximo de excitación es 573 nm.

Como longitudes de onda de medida se eligió 575 y 610 nm. de excitación y emisión respectivamente para evitar el filtro interno. El tamaño de rendija de emisión se deja en 5 nm y el de excitación en 2,5 nm.

Otra cosa a tener en cuenta es que las cubetas de bajo volumen no tienen las cuatro caras iguales. Como en fluorescencia se excita y se emite a 90°, entran en juego dos caras diferentes y por lo tanto hay dos posiciones a la hora de colocarlas en el soporte (Figura 4.7):

- a. la luz incide sobre la cara de la cubeta plana, que hemos llamado cara α ,
- b. la luz incide sobre la cara cuya zona inferior está más hundida, que hemos llamado cara β .

Se estudió si la orientación de la cubeta influía en las medidas obtenidas.



Figura 4.7 Cubeta de bajo volumen

Para ello se realizó una calibración con H_2O_2 en presencia de HRP y AmplexRed midiendo la fluorescencia obtenida con la cubeta en las dos orientaciones. Los resultados se muestran en la figura 4.8. Se observa que la orientación influye en la sensibilidad y que es mayor si la cubeta se coloca con la cara α orientada hacia la luz de excitación.

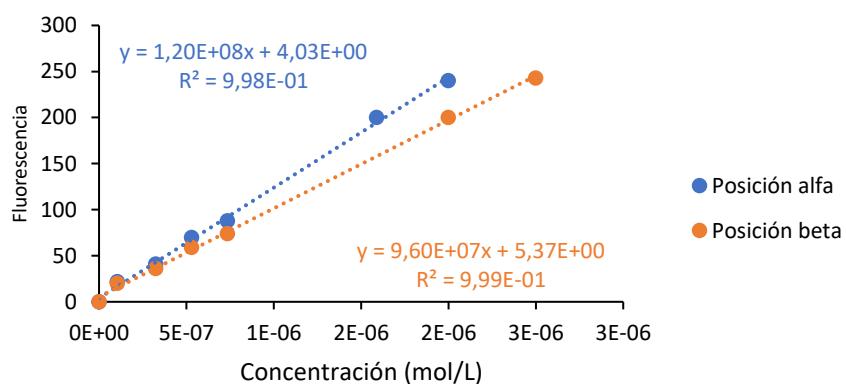


Figura 4.8 Calibración de peróxidos en fluorescencia con distinta posición de cubeta.

Condiciones en cubeta: pH 8 TRIS 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M.

4.4 Optimización (Parámetros reacción)

A continuación, se estudió como afectan los reactivos que entran en juego en la reacción: la enzima XO, la enzima peroxidasa HRP, el colorante AmplexRed, y el pH de la disolución. La optimización se ha llevado a cabo en el fluorímetro (siguiendo el protocolo descrito en 3.3.3) en cubetas de bajo volumen de 700 μL con las longitudes de onda de emisión y excitación mencionadas anteriormente (585 nm y 560 nm respectivamente) y el tamaño de rendija de excitación de 2,5 nm.

Las señales se obtienen añadiendo hipoxantina $1,0 \cdot 10^{-6}$ M a la mezcla de reactivos de la cubeta.

4.4.1 Optimización de la XO

Se empezó por la xantina oxidasa. Se probaron concentraciones de 0,1; 0,2; 0,4 y 0,6 u/mL de enzima en cubeta obteniendo los resultados siguientes (Figura 4.9).

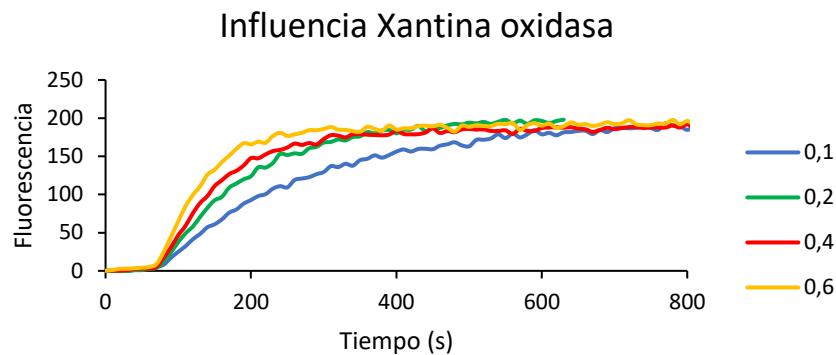


Figura 4.9 Señales Xantina oxidasa. Condiciones en cubeta: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,12 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M. HX $1,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Se puede ver que, como era de esperar, las cinéticas aumentan al tener mayor concentración de enzima llegando todas a la misma señal máxima. La cantidad de enzima afecta a la velocidad de la reacción por lo que a mayor cantidad de XO mayor velocidad. Sin embargo, este reactivo es caro por lo que queremos reducir su cantidad lo necesario para gastar lo menos posible. Quitando la más baja, el resto tienen cinéticas parecidas por lo que no compensa el gasto de reactivo. Es por eso por lo que se ha escogido 0,2 u/mL como concentración óptima de la enzima xantina oxidasa.

4.4.2 Optimización del pH

El pH de la disolución amortiguadora afecta tanto a la reacción enzimática de la xantina oxidasa como de la peroxidasa, por lo que su influencia se estudió en el conjunto de la reacción. Se usaron varios pHs en tampon de fosfatos y en tampon de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) todos a 0,1 M de concentración (Figura 4.10).

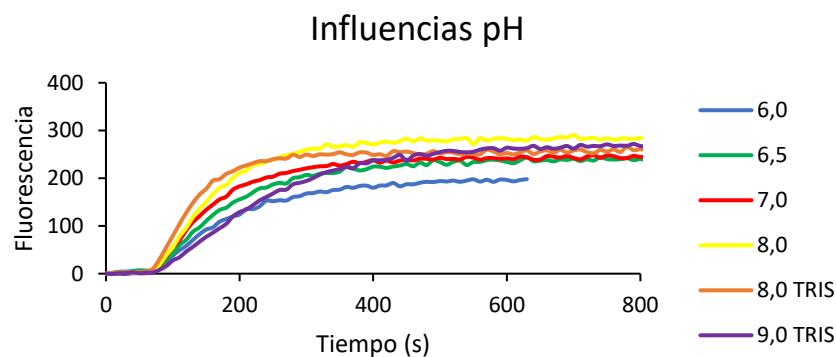


Figura 4.10 Señales pHs. Condiciones en cubeta: HRP 0,12 u/mL. XO 0,2 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M. HX $1,0 \cdot 10^{-6}$ M.

El pH del medio afecta a la efectividad de las enzimas por lo que modifica las cinéticas de la reacción. Se sabe que el pH óptimo del HRP es 6, pero en la gráfica se puede ver que a ese pH la reacción es la más lenta. Las reacciones más rápidas se dan a pH 8, por lo que se deduce que ese es el pH óptimo de la XO. Se podrían usar indistintamente la disolución de fosfatos o TRIS ya que difieren poco en la cinética. En este trabajo se optó por usar la disolución amortiguadora de TRIS a pH 8.

4.4.3 Optimización del AR

El tercer reactivo por optimizar es el colorante AmplexRed. El problema del AmplexRed es que se encuentra disuelto en DMSO en viales de $1,0 \cdot 10^{-3}$ M por lo que para aumentar la concentración de colorante en el medio hay que añadir más DMSO lo que puede afectar a la señal. Se han probado las siguientes concentraciones: $8,0 \cdot 10^{-6}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$, $3,0 \cdot 10^{-5}$ y $5,0 \cdot 10^{-5}$ M (Figura 4.11).

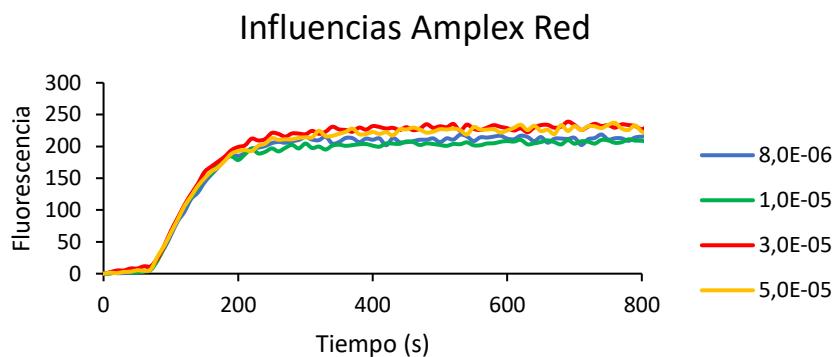


Figura 4.11 Señales de AmplexRed. Condiciones en cubeta: pH 8 TRIS 0,1 M. 0,12 u/mL. XO 0,2 u/mL. HX $1,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Se puede apreciar un ligero aumento de la señal conforme aumenta la concentración lo que aumenta la sensibilidad, sin embargo, al estar en exceso de colorante no hay grandes cambios en la señal. Finalmente se eligió con $3,0 \cdot 10^{-5}$ M de AmplexRed como concentración óptima.

4.4.4 Optimización del HRP

Por último, quedo por optimizar la enzima peroxidasa, HRP. Esta enzima es la que controla la velocidad de la segunda reacción, la que reduce los peróxidos y oxida el colorante. Se probaron las siguientes concentraciones: 0,06; 0,12; 0,24; 0,5 y 1,0 u/mL (Figura 4.12).

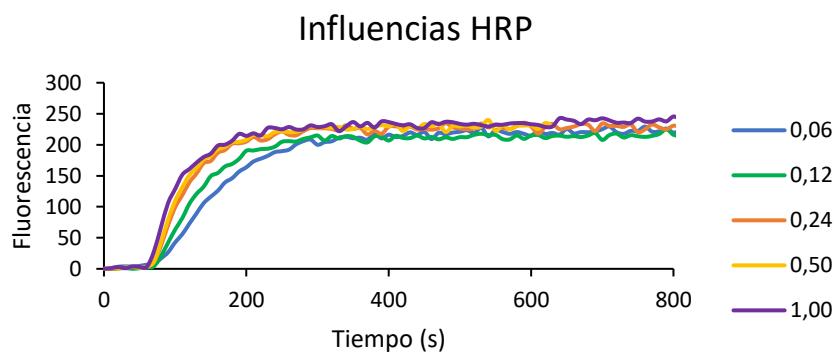


Figura 4.12 Señales de HRP. Condiciones en cubeta: pH 8 TRIS 0,1 M. XO 0,2 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M. HX $1,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Ocurre lo mismo que en el caso anterior, a más enzima más velocidad. Se ve que las tres más altas tienen cinéticas prácticamente iguales por lo que de las tres elegimos la de menor concentración, 0,24 u/mL de HRP.

Con esto ya están optimizados los cuatro reactivos que entran en juego en la reacción a estudiar.

4.5 Calibración hipoxantina. Características analíticas.

Una vez optimizados todos los parámetros, tanto reactivos como ópticos, se realizó la calibración de la hipoxantina en sus condiciones óptimas tanto por fluorescencia como por absorción molecular.

4.5.1 Mediante fluorescencia.

La primera recta de calibrado es en el fluorímetro (Figura 4.13). El rango de concentraciones de la hipoxantina va desde $3,0 \cdot 10^{-7}$ M hasta $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

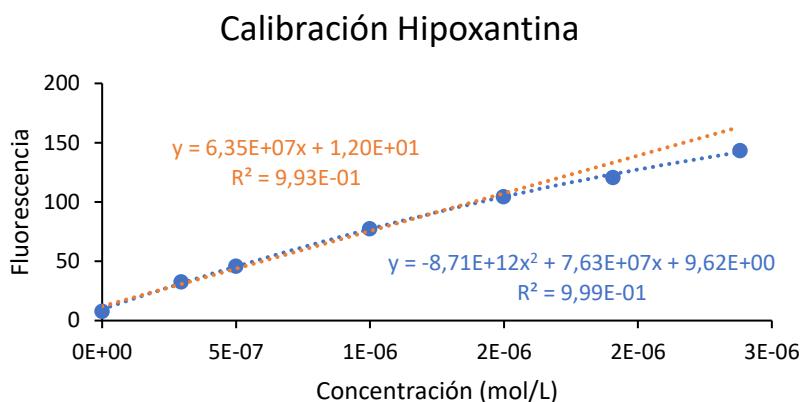


Figura 4.13 Calibración de HX por fluorescencia. Condiciones en cubeta: pH 8 TRIS 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,2 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M. Condiciones ópticas: $\lambda_{ex} = 575$ nm, $\lambda_{em} = 610$ nm, tamaño de rendija de excitación 2,5 nm y de emisión 5 nm.

Los resultados se ajustan a una ecuación de segundo grado si bien los primeros puntos se ajustan a una recta. Las características analíticas fueron tomadas para ambos casos y se recogen en la tabla 4.1.

Calibración	Sensibilidad (L/mol)	Límite detección (M)	Límite cuantificación (M)	Rango (M)
Lineal	$6,35 \cdot 10^7$	$5,34 \cdot 10^{-8}$	$1,78 \cdot 10^{-7}$	$1,78 \cdot 10^{-7} - 1,50 \cdot 10^{-6}$
2º grado	$7,63 \cdot 10^7$	$3,98 \cdot 10^{-7}$	$1,48 \cdot 10^{-7}$	$1,48 \cdot 10^{-7} - 2,38 \cdot 10^{-6}$

Tabla 4.1 Características analíticas de la calibración de HX por fluorescencia

Para ver su reproducibilidad se realizaron 5 réplicas en estas condiciones obteniendo una desviación estándar relativa (DER) del 1,99%.

4.5.2 Mediante absorción.

La segunda calibración se realizó por absorción. En este equipo las condiciones de cubeta son las mismas y se midió al máximo de absorbancia, a 573 nm. El rango de concentraciones de hipoxantina probado es de $1 \cdot 10^{-6}$ M a $1 \cdot 10^{-5}$ M obteniéndose la siguiente recta (Figura 4.14).

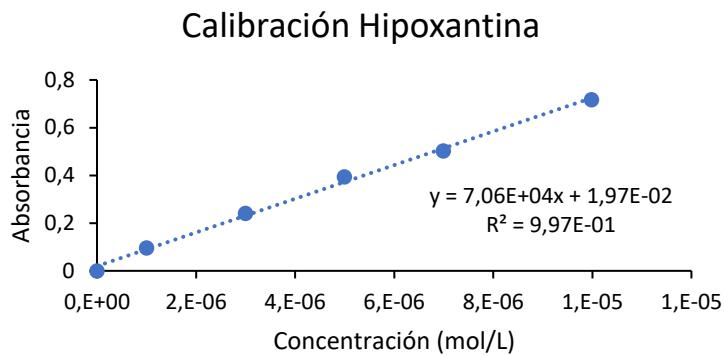


Figura 4.14 Calibración de HX por absorción. Condiciones en cubeta: pH 8 TRIS 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,2 u/mL. AR 3,0·10⁻⁵ M. Longitud de onda 573 nm.

En este caso hay un mejor ajuste lineal. La sensibilidad del método es 70567,11 L/mol, el límite de detección es $2,47 \cdot 10^{-8}$ M, el límite de cuantificación es $8,22 \cdot 10^{-8}$ M y el rango lineal es de $8,22 \cdot 10^{-8}$ M a $1,00 \cdot 10^{-5}$ M.

4.6 Determinación de Xantina e Hipoxantina en mezclas

4.6.1 Condiciones

El segundo objetivo principal del trabajo es diferenciar las señales de hipoxantina y xantina en mezclas de dichos compuestos. Para ello, lo primero que se hace es una calibración de xantina en las condiciones óptimas de la hipoxantina para comparar sus sensibilidades.

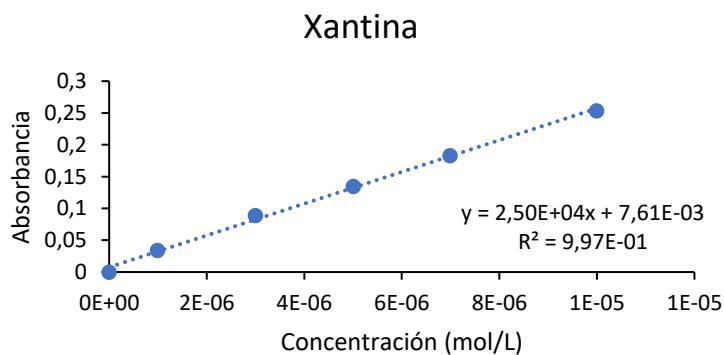


Figura 4.15 Calibración por absorción de X. Condiciones en cubeta: pH 8 TRIS 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,2 u/mL. AR 3,0·10⁻⁵ M.

Como se puede ver en la figura 4.15, la xantina tiene una sensibilidad unas tres veces menor que la hipoxantina. Teóricamente debería ser la mitad ya que la xantina produce la mitad de los peróxidos que la hipoxantina. Para comprobar la actividad de la enzima xantina oxidasa con xantina e hipoxantina se llevó a cabo la reacción, pero midiéndola por otro método en el que solo estuviera implicada la enzima xantina oxidasa.

Este método consiste en medir el consumo de oxígeno de la reacción mediante quenching fluorescente: la reacción consume oxígeno para producir los peróxidos, al disminuir la cantidad de oxígeno en el medio, el fluoróforo añadido al medio aumenta su señal.

La prueba se realizó en un instrumento llamado PTI en cubetas de 2000 microlitros usando rutenio como fluoróforo. Las pruebas se hicieron a pH 8 y como analito se usó xantina e hipoxantina.

La longitud de onda de emisión es 610 nm y la de excitación es 460 nm (Figura 4.16).

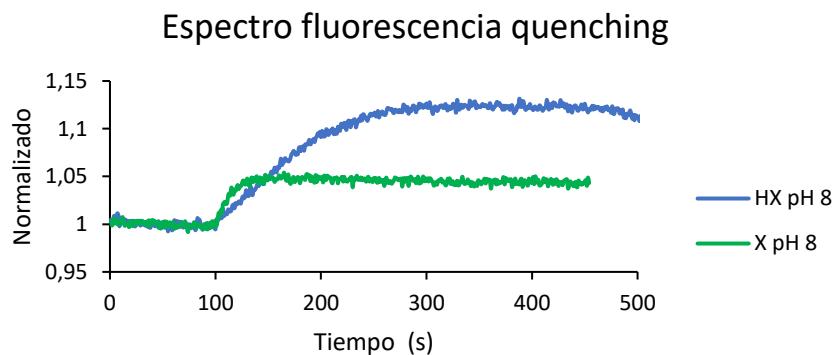


Figura 4.16 Espectro de fluorescencia quenching. Condiciones: pH 8 fosfatos 0,1 M. XO 0,2 u/mL. Sal de Rutenio $5,0 \cdot 10^{-6}$ M. X $5,0 \cdot 10^{-5}$ M. HX $5,0 \cdot 10^{-5}$ M.

Se puede ver que a medida que ocurre la reacción, la fluorescencia del fluoróforo aumenta debido al consumo de oxígeno. El registro ha sido normalizado para poder comparar los distintos resultados. Aquí se comprueba que en efecto la hipoxantina consume más oxígeno que la xantina, pero más del doble. Se observa también una diferencia en sus cinéticas.

La xantina, al tener una reacción menos, en principio es más rápida que la hipoxantina. Para poder diferenciar ambas señales se disminuyó la concentración de XO a la mitad y se estudiaron diferentes pHs de la disolución amortiguadora con el objetivo de disminuir la cinética de la HX sin afectar demasiado a la de la X. Se probaron pHs 6, 7 y 8 de fosfatos. A medida que disminuye el pH de la disolución también lo hace la actividad de la XO, como se explica en el apartado 5.2.1, lo cual afecta fundamentalmente a la cinética de la hipoxantina (Figura 4.17). A pH 6 se observan las mayores diferencias (b).

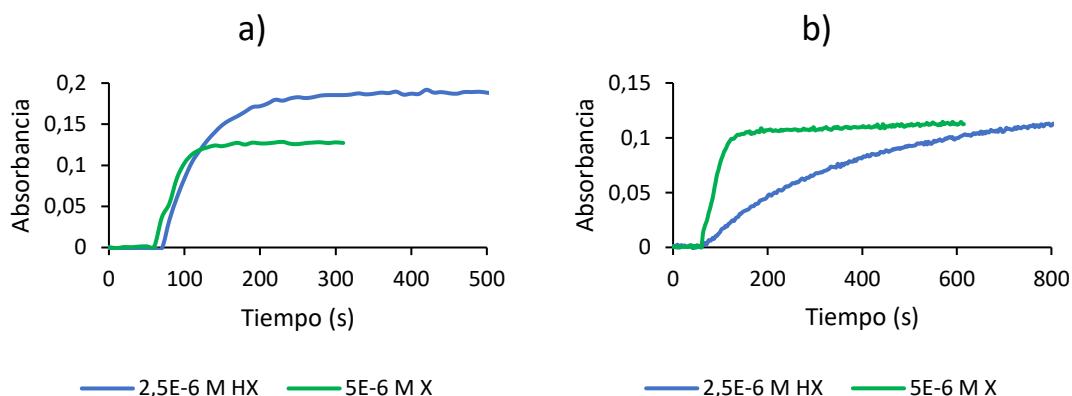


Figura 4.17 Señales HX y X a distinto pH. Condiciones en cubeta: HRP 0,24 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M. a) pH 8 fosfatos 0,1 M. XO 0,2 u/mL. b) pH 6 fosfatos 0,1 M. XO 0,1 u/mL.

Aunque por separado se ha logrado diferenciar las señales, el objetivo es diferenciarlas en mezclas de los dos compuestos. Para ello se estudian disoluciones que contienen distintas concentraciones de HX y X (Tabla 4.2) y las señales obtenidas se comparan con las que darían por separado.

	Hipoxantina	Xantina
Mezcla 1	$2,5 \cdot 10^{-6}$ M	$5,0 \cdot 10^{-6}$ M
Mezcla 2	$5,0 \cdot 10^{-6}$ M	$5,0 \cdot 10^{-6}$ M
Mezcla 3	$2,5 \cdot 10^{-6}$ M	$1,0 \cdot 10^{-6}$ M

Tabla 4.2 Composición de las mezclas

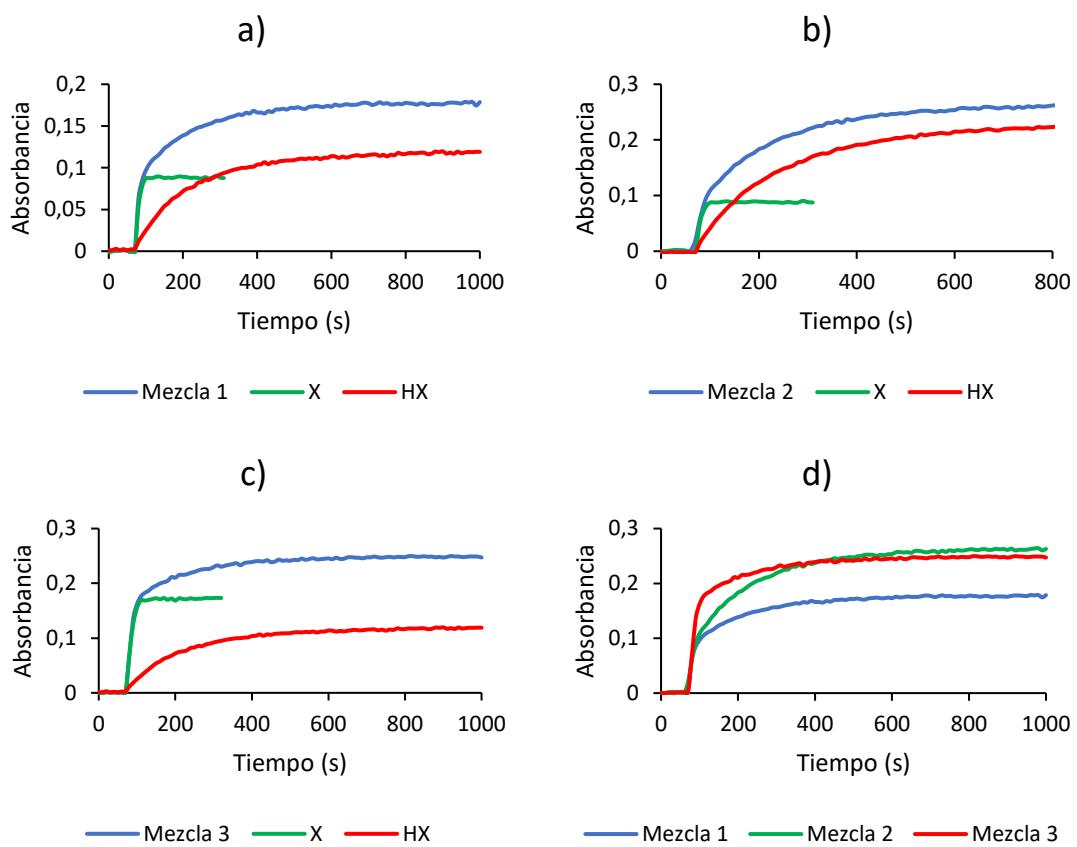


Figura 4.18 Comparación señales HX, X y mezclas. Condiciones: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,2 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M. a) Mezcla 1. b) Mezcla 2. c) Mezcla 3. d) Comparación tres mezclas.

En la figura 4.18 (a, b, c) se representa cada mezcla junto con las señales de las disoluciones de xantina e hipoxantina individuales; se puede ver para las tres mezclas que la pendiente inicial corresponde a la pendiente inicial de la xantina, mientras que la curva del resto de la señal es similar a la de la hipoxantina. En la gráfica d se representan las 3 mezclas juntas. Se puede observar que en las mezclas 1 y 2, que tienen la misma cantidad de xantina, la pendiente inicial es la misma; la parte curva de la señal cambia ya que la concentración de hipoxantina es

diferente. Las mezclas 1 y 3 tienen la misma cantidad de hipoxantina y como se observa la parte correspondiente a su señal es paralela.

Esto hace pensar que se puede determinar la cantidad de xantina que hay en una mezcla a partir de la pendiente inicial de la señal.

Por otro lado, una vez conocida la concentración de xantina, si se resta su absorbancia de la absorbancia de la mezcla se obtendría la absorbancia de la hipoxantina y a partir de ella se podría conocer su concentración. Para ello la absorbancia de la mezcla debería ser la suma de las absorbancias de las señales individuales.

4.6.2 Determinación de xantina

Se planteó por tanto la determinación de xantina en presencia de hipoxantina.

Para ello se realiza una calibración de xantina. Midiendo las pendientes iniciales se hace una recta de calibrado pendiente/concentración (Recta A. Figura 4.19) poniendo de manifiesto que las pendientes dependen de la concentración de xantina. Con la variación de absorbancia máxima se hace la recta B.

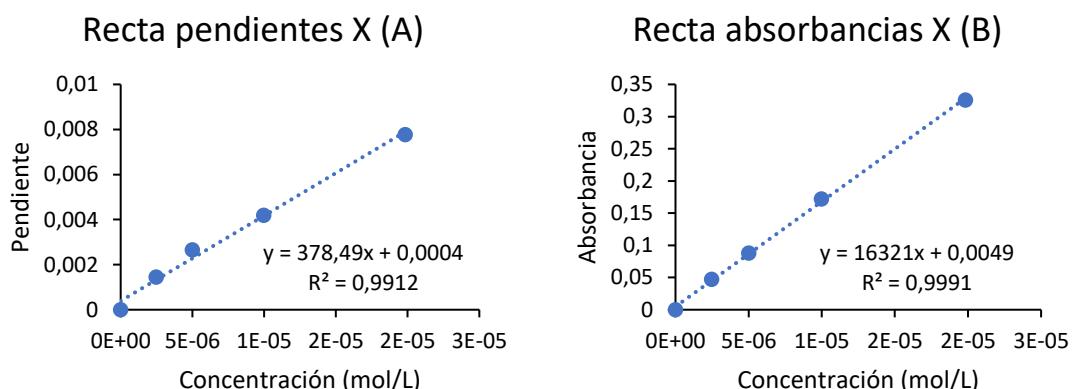


Figura 4.19 Calibraciones para la determinación de X. *Condiciones en cubeta: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,1 u/mL. AR 3,0·10⁻⁵ M.*

Se mide la variación de absorbancia de las mezclas de X + HX; la pendiente inicial obtenida se interpola en la recta A obteniendo la concentración de X. Los resultados se muestran a continuación, en la tabla 4.3.

	Var Señal	Var t (s)	Pendiente	[X] (M)	[X] real (M)	% Error X
Mezcla 1	0,0952	40	0,0024	5,23·10 ⁻⁶	5,00·10 ⁻⁶	4%
Mezcla 2	0,1076	40	0,0026	5,81·10 ⁻⁶	5,00·10 ⁻⁶	16%
Mezcla 3	0,1604	40	0,0040	9,53·10 ⁻⁶	1,00·10 ⁻⁶	-4%

Tabla 4.3. Resultados obtenidos de xantina.

Los resultados para las mezclas 1 y 3 son muy satisfactorios al obtener errores por debajo del 5%, mientras que la mezcla 2 tiene un error del 16%. Esto puede deberse a la mayor presencia de hipoxantina en la mezcla que podría afectar a la pendiente.

4.6.3 Determinación de hipoxantina

En cuanto a la hipoxantina, en la tabla 4.4 se comparan las absorbancias de las mezclas con la suma de las absorbancias de las señales individuales.

	Suma absorbancias	Absorbancias mezcla	
Mezcla 1	0,208	0,176	85%
Mezcla 2	0,316	0,261	83%
Mezcla 3	0,291	0,248	85%

Tabla 4.4 Comparación de las señales en mezclas

Como se observa, la absorbancia de las mezclas es del orden del 85% de la suma de absorbancias en todos los casos.

La reacción de la xantina es más rápida que la de hipoxantina, por lo que se estudió si los productos de su reacción afectaban a la señal de la hipoxantina. Para ello se realizó la reacción con xantina y cuando estaba estable la señal se añadió hipoxantina (Figura 4.20).

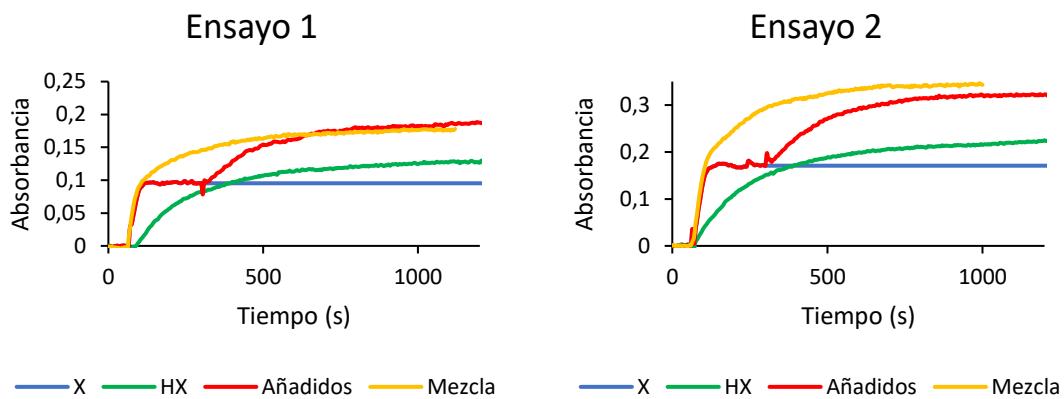


Figura 4.20 Comparación de señales de X, HX mezclas y añadidos. Condiciones en cubeta: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,1 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M.

Los resultados se muestran en la tabla 4.5. En ella se muestra también la señal de la misma concentración de hipoxantina que hay en la adición.

	Absorbancia X	Absorbancia HX	Absorbancia añadidos	Absorbancia X+HX	
Ensayo 1	0,096	0,127	0,189	0,223	85%
Ensayo 2	0,171	0,214	0,321	0,385	83%

Tabla 4.5 Resultados y comparación de las señales

Se observa que el hecho de que la xantina haya reaccionado afecta a la señal de la mezcla porque su señal es alrededor del 85% de lo que debería.

Como trabajo a futuro habría que seguir haciendo estudios para intentar solucionar este problema. Por el momento para determinar la hipoxantina se hará una estimación teniendo en cuenta que la señal medida para las mezclas es un 85% de la que se debería haber obtenido.

A esta señal obtenida se le resta la señal de X obteniendo la señal de HX. La señal de X se ha obtenido interpolando la concentración obtenida en la tabla 4.2 en la recta de calibración de la figura 4.19 b. La señal de HX se interpola ahora en la calibración de la figura 4.21 obteniendo así la concentración de HX en la mezcla. Los resultados se muestran en la tabla 4.6.

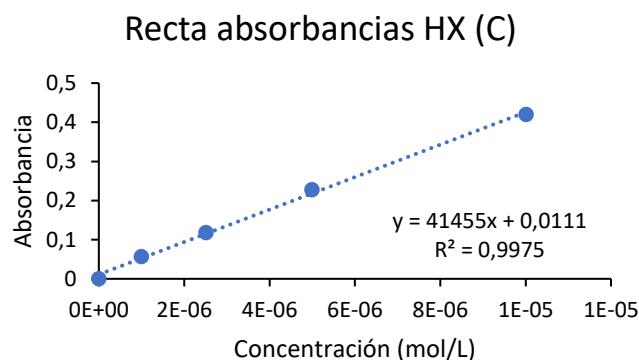


Figura 4.21 Calibración de HX. Condiciones en cubeta: pH 6 fosfatos 0,1 M. HRP 0,24 u/mL. XO 0,1 u/mL. AR $3,0 \cdot 10^{-5}$ M.

	Señal mezcla	Señal teórica	Señal X	Señal HX	[HX] (M)	[HX] real (M)	% Error HX
Mezcla 1	0,176	0,2082	0,0903	0,1179	$2,58 \cdot 10^{-6}$	$2,50 \cdot 10^{-6}$	3%
Mezcla 2	0,261	0,3082	0,1036	0,2046	$4,67 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	-6%
Mezcla 3	0,248	0,2924	0,1605	0,1319	$2,91 \cdot 10^{-6}$	$2,50 \cdot 10^{-6}$	16%

Tabla 4.6 Resultados para la determinación de HX

Los resultados son satisfactorios al obtenerse errores por debajo del 6% en dos de las tres mezclas.

5. Conclusiones

Las conclusiones a las que se ha llegado se enumeran a continuación:

- 1) Es posible la determinación tanto por fluorescencia como por absorción molecular de hipoxantina por reacción con xantina oxidasa, peroxidasa y amplex red siendo las condiciones óptimas: disolución amortiguadora de TRIS 0,1 M a pH 8, xantina oxidasa 0,2 U/mL, peroxidasa 0,24 U/mL y Amplex Red $3,0 \cdot 10^{-5}$ M.
- 2) El método tiene un límite de detección más bajo por fluorescencia que por absorción molecular si bien su rango lineal es más corto.
- 3) La cinética de la reacción de la xantina es diferente de la de la hipoxantina, lo que ha permitido determinar xantina de forma cuantitativa en presencia de hipoxantina mediante las pendientes iniciales.
- 4) En mezclas de ambos analitos, la xantina afecta a la señal de la hipoxantina haciendo que la absorbancia de la mezcla sea alrededor del 85% de la que debería.
- 5) La enzima xantina oxidasa no se debe conservar congelada porque pierde actividad.

6. Bibliografía

- (1) Yu, D., Wu, L., Regenstein, J. M., Jiang, Q., Yang, F., Xu, Y., & Xia, W. Recent advances in quality retention of non-frozen fish and fishery products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2019**, 60 (10), 1747–1759; DOI: 10.1080/10408398.2019.1596067.
- (2) Hong, H., Regenstein, J. M., & Luo, Y. The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2017**, 57 (9), 1787–1798; DOI: 10.1080/10408398.2014.1001489.
- (3) Aleida S. Hernández-Cázares, María-Concepción Aristoy, Fidel Toldrá. Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness. *Food Chemistry*, **2010**, 123 (3), 949-954; DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.066.
- (4) Gui, M.; Binzhao; Song, J.; Zhang, Z.; Hui, P.; Li, P. Biogenic amines formation, nucleotide degradation and TVB-N accumulation of vacuum-packed minced sturgeon (*Acipenser schrenckii*) stored at 4 °C and their relation to microbiological attributes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2013**, 94 (10), 2057-2063; DOI: 10.1002/jsfa.6524.
- (5) Saugstad, O. D. Hypoxanthine as a measurement of hypoxia. *Pediatric Research*, **1975**, 9 (4), 158-161; DOI: 10.1203/00006450-197504000-00002.
- (6) Nagao, H., Nishizawa, H., Tanaka, Y., Fukata, T., Mizushima, T., Furuno, M., ... & Shimomura, I. Hypoxanthine secretion from human adipose tissue and its increase in hypoxia. *Obesity*, **2018**, 26 (7), 1168-1178; DOI: 10.1002/oby.22202.
- (7) Chouraki, V., Preis, S. R., Yang, Q., Beiser, A., Li, S., Larson, M. G., ... & Seshadri, S. Association of amine biomarkers with incident dementia and Alzheimer's disease in the Framingham Study. *Alzheimer's & Dementia*, **2017**, 13 (12), 1327-1336; DOI: 10.1016/j.jalz.2017.04.009.
- (8) Lazzarino, G., Amorini, A. M., Petzold, A., Gasperini, C., Ruggieri, S., Quartuccio, M. E., ... & Tavazzi, B. Serum compounds of energy metabolism impairment are related to disability, disease course and neuroimaging in multiple sclerosis. *Molecular neurobiology*, **2017**, 54, 7520-7533; DOI: 10.1007/s12035-016-0257-9.
- (9) Long, Y., Sanchez-Espíridion, B., Lin, M., White, L., Mishra, L., Raju, G. S., ... & Wu, X. Global and targeted serum metabolic profiling of colorectal cancer progression. *Cancer*, **2017**, 123 (20), 4066-4074; DOI: 10.1002/cncr.30829.
- (10) Włodarczyk, Michał¹; Kusy, Krzysztof¹; Słomińska, Ewa²; Krasiński, Zbigniew³; Zieliński, Jacek¹. Changes in Blood Concentration of Adenosine Triphosphate Metabolism Biomarkers During Incremental Exercise in Highly Trained Athletes of Different Sport Specializations. *Journal of Strength and Conditioning Research*, **2019**, 33 (5), 1192-1200; DOI: 10.1519/JSC.00000000000003133.
- (11) Gang Chen, Qingcui Chu, Luyan Zhang, Jiannong Ye, Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 457 (2), 225-233; DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00027-2.
- (12) Bao-Shyung Hwang, Jih-Terng Wang, Youk-Meng Choong, A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products, *Food Chemistry*, **2003**, 82 (2), 329-334; DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00005-0.
- (13) Muñoz JI, Costas E, Rodríguez-Calvo MS, Suárez-Peñaanda JM, López-Rivadulla M, Concheiro L. A high-performance liquid chromatography method for hypoxanthine

- determination in vitreous humour: application to estimation of postmortem interval. *Human & Experimental Toxicology*. 2006, 25 (5), 279-281; DOI: 10.1191/0960327106ht615oa.
- (14) Ruediger Kock, Bert Delvoux, H Greiling. A High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Hypoxanthine, Xanthine, Uric Acid and Allantoin in Serum. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 1993, 31 (5), 303-310; DOI: 10.1515/cclm.1993.31.5.303.
- (15) Aslı Neslihan Avan, Özge Karakaş, Sema Demirci-Çekiç, Reşat Apak. Enzymatic determination of hypoxanthine in fish samples as a freshness indicator using the CUPRAC colorimetric sensor. *Enzyme and Microbial Technology*. 2023, 162, 110-137; DOI: 10.1016/j.enzmictec.2022.110137.