

Optimiziranje spektrofotometrijske metode za određivanje malondialdehida u urinu

Nežić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:420552>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marko Nežić

**Optimiziranje spektrofotometrijske metode za
određivanje malondialdehida u urinu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Suzane Inić.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Suzani Inić i izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na strpljenju, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada, te najviše na prijateljskom odnosu i pruženoj motivaciji tijekom studiranja.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na pruženoj pomoći i korištenju sredstava i potrebne opreme Zavoda.

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za opću i anorgansku kemiju na korištenju prostora laboratorija i spektrofleurimetra.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima te posebno mojoj Tei na potpori, pomoći i razumijevanju.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

2-TBA - 2-tiobarbituratna kiselina

HNE - 4-hidroksinon-2-enal

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (od eng. *High-performance liquid chromatography*)

ICH - od eng. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

LoD - granica dokazivanja (od eng. *Limit of Detection*)

LoQ - granica određivanja (od eng. *Limit of Quantitation*)

M - $\mu\text{mol/L}$

MDA - malondialdehid

o- H_3PO_4 - ortofosforna kiselina

R^2 - koeficijent korelacije

ROS - reaktivne kisikove vrste (od eng. *Reactive Oxygen Species*)

RSD - relativna standardna devijacija

SD - standardna devijacija

UV - ultraljubičasto (od eng. *UltraViolet*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Fluorescencija.....	2
1.1.1. Mehanizam fluorescencije.....	2
1.1.2. Fluorescencija i struktura molekule.....	4
1.1.3. Fluorescencijska spektrofotometrija.....	5
1.1.4. Spektrofluorimetar.....	6
1.2. Validacija analitičke metode	8
1.2.1. Specifičnost/selektivnost	8
1.2.2. Linearnost i radno područje.....	8
1.2.3. Preciznost	9
1.2.4. Točnost	9
1.3. Malondialdehid - MDA	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Kemikalije	16
3.2. Aparatura	16
3.2.1. Spektrofluorimetar.....	16
3.3. Uzorci	17
3.4. Metode.....	17
3.4.1. Određivanje koncentracije MDA	17
3.4.2. Priprema otopina	18
3.4.3. Postupak mjerenja	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. Ispitivanje interferencija prilikom određivanja MDA u urinu.....	24
4.2. Validacija spektrofluorimetrijske metode određivanja MDA u urinu:.....	25
4.2.1. Linearnost metode sa standardima pripremljenim u vodi.....	25
4.2.2. Validacija metode sa standardima MDA pripremljenima u urinu.....	27
4.3. Primjena metode na uzorke urina	29
4.3.1. Određivanje koncentracije MDA metodom standardne adicije.....	30
4.3.2. Usporedba rezultata	31
5. ZAKLJUČAK.....	33
6. LITERATURA	35
7. SAŽETAK / SUMMARY	38
8. PRILOZI.....	43
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	48

1.UVOD

1.1. Fluorescencija

Fluorescencija je proces fotoluminescencije u kojem su atomi ili molekule pobuđeni elektromagnetskim zračenjem te nakon toga relaksacijom prelaze u osnovno stanje oslobađajući pri tome višak energije u obliku svjetla. Ovo svojstvo pokazuju samo određene molekule koje imaju sposobnost fluorescencije (Skoog i sur., 2014).

Fluorescencija je uzorkovana apsorpcijom energije i re-emisijom određenog dijela te energije u obliku fotona. Emitirana svjetlost je skoro uvijek veće valne duljine (λ) od valne duljine apsorbirane svjetlosti, a ta pojava je poznata kao Stokesov zakon. U fluorescenciji apsorpcija i emisija se dešavaju u vrlo kratkom vremenskom intervalu reda veličine 10^{-12} do 10^{-9} sekundi. Ukoliko emisija zračenja traje dulje od 10^{-8} sekundi onda govorimo o pojavi nazvanoj fosforescencija koja može trajati stotinku sekunde, ali može trajati i danima. Fluorescencija i fosforescencija pripadaju fotoluminescenciji koja opisuje pojavu emisije energije u obliku svjetlosnog vala nakon apsorpcije energije određene valne duljine. Fluorescencija je vrsta fotoluminescencije koja se prepoznaje po karakterističnom kratkom vremenu u kojem molekule prelaze iz pobuđenog stanja u osnovno stanje i vrlo često se koristi u analitičkoj kemiji (Jeffery i sur., 1989).

Prilikom vraćanja iz pobuđenog stanja u osnovno stanje nije nužno kod svih molekula da se energija promijeni u elektromagnetski val svjetlosti već neke molekule posjeduju takvu strukturu koja omogućava “trošenje” energije u obliku vibracije. Kako bi molekula mogla pokazati fluorescenciju ona mora imati takvu strukturu koja omogućava apsorpciju fotona ili UV zračenja. Molekula koja apsorbira zračenje ne mora i pokazivati fluorescenciju što se utvrđuje kvantnim prinosom, jedinicom koja daje kvantitativni uvid u intenzitet fluorescencije određene molekule. Kvantni prinos ϕ_f je omjer emitiranog i apsorbiranog svjetla:

$$\phi_f = \frac{N(\text{emitiranog zračenja})}{N(\text{apsorbiranog zračenja})} = \frac{\text{količina emitiranog zračenja}}{\text{količina apsorbiranog zračenja}}$$

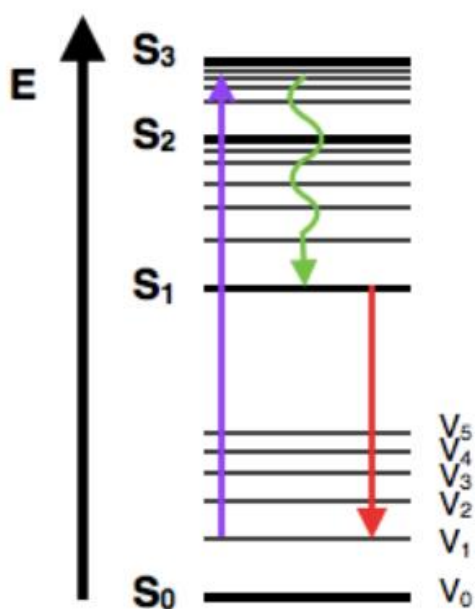
1.1.1. Mehanizam fluorescencije

Apsorpcijom kvanta UV-svjetlosti molekula ili ion prelazi iz osnovnog singletnog stanja u pobuđeno singletno stanje gdje ostaje 10^{-8} s pri čemu dio primljene energije potroši na

translaciju i rotaciju. Zbog pobuđenih elektrona u molekuli emitirano svjetlo ima veću λ a manju energiju od upadnog svjetla što predstavlja Stokesovo pravilo (G. G. Stokes). Proces nezračeće (vibracijske) relaksacije traje 10^{-10} s, a zračenje se emitira nakon 10^{-8} - 10^{-6} s. Fluorescencija nastupa kada se molekula koja je pobuđena do više titrajne razine singletnog pobuđenog stanja vraća izravno preko najniže titrajne razine na bilo koju titrajnu razinu osnovnog singletnog stanja i pri tome višak energije emitira u obliku svjetla fluorescencije ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fl}$) (Luterotti, 2014).

Procesi koji se događaju između apsorpcije i emisije svjetla su obično ilustrirani pomoću Jablonskijevih dijagrama. Jablonskijevi dijagrami su često početna točka u objašnjavanju apsorpcije i emisije zračenja te postoje u različitim oblicima kako bi prikazali različite molekulske procese koji se mogu događati u pobuđenom stanju.

Općeniti Jablonskijev dijagram prikazan je na slici 1. Singletno osnovno stanje, te ostala elektronska pobuđena stanja prikazani su oznakama S_0 , S_1 , S_2 itd. U svakom od ovih nivoa elektronske energije molekule mogu postojati u različitim nivoima vibracijske energije označenima brojevima V_0 , V_1 , V_2 Prijelazi između stanja prikazani su okomitim crtama.



Slika 1. Prikaz Jablonskijevog dijagrama

Fluorescencija je u Jablonskijevom dijagramu prikazana kao okomit pravac koji ide iz pobuđenog stanja S_1 u osnovno stanje S_0 . Fluorescencija je spor proces (u odnosu na druge energetske prijelaze) koji traje oko nanosekunde, stoga za taj prijelaz elektroni ne troše energiju. To se ne odnosi na elektronska pobuđena stanja viših energetske razina, već samo na prvi elektronski prijelaz. Iako je prijelaz spor, on predstavlja dopušteni prijelaz te elektron ostaje u stanju istog multipliciteta. Fluorescencija je skoro uvijek zapažena između prvog elektronskog pobuđenog stanja i osnovnog stanja jer za više energije veća je vjerojatnost da će se energija trošiti preko unutarnjeg prijenosa ili preko vibracijske relaksacije (Lakowicz, 1999).

Energija emitiranog fotona je skoro uvijek manja od energije apsorbiranog fotona (zračenja). Ova se razlika energije objašnjava gubitkom energije unutarnjom konverzijom i vibracijskom relaksacijom gdje se energija prenosi dalje od elektrona (Jaffe i Miller, 1966). U slučaju kad molekula već posjeduje veću energiju nego što odgovara osnovnom singletnom stanju S_0 , tada je energija emitiranog fotona veća od energije apsorbiranog fotona. Ta se pojava javlja kod plinova pod niskim tlakom (Luterotti, 2014).

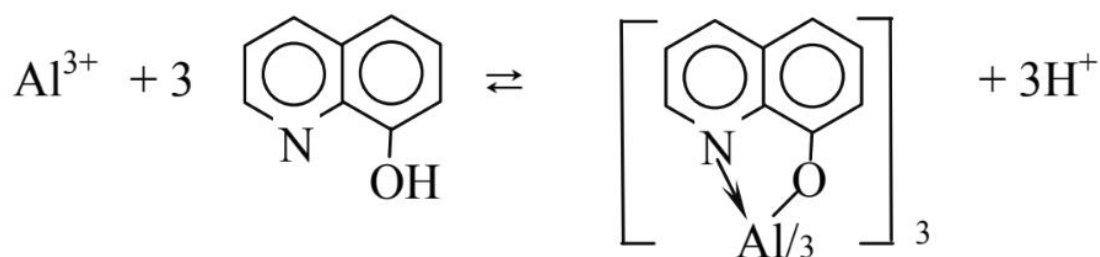
1.1.2. Fluorescencija i struktura molekule

Spojevi koji sadrže aromatsku jezgru u svojoj strukturi pokazuju najintenzivniju emisiju fluorescencije, a to svojstvo pokazuju i spojevi alifatske građe, alicikličke građe te konjugati s dvostrukim vezama. Mnogi nesupstituirani aromatski ugljikovodici fluoresciraju u otopini pri čemu se kvantni prinos povećava s povećanjem broja atoma u prstenu i sa stupnjem kondenzacije.

Jednostavni heterociklički spojevi kao što su piridin, furan, tiofen i pirol ne pokazuju fluorescenciju, ali ukoliko su uklopljeni unutar veće strukture onda dolazi do fluorescencije. Supstitucije na aromatskom prstenu uzrokuju pomak valne duljine maksimuma apsorpcije i odgovarajuće promjene u ekscitacijskoj vrpci (Skoog i sur., 2014).

Molekule koje posjeduju krutu strukturu često pokazuju svojstvo fluorescencije. Kruta struktura smanjuje mogućnost neradijacijske relaksacije što omogućava pojavu fluorescencije. Utjecaj krute strukture na pojavu fluorescencije često se koristi u analitičkoj kemiji pri reakcijama kompleksacije. Primjerice molekula 8-hidroksikinolina pokazuje fluorescenciju

slabijeg intenziteta nego kad je u kompleksu s ionom aluminija (Al^{3+}) (slika 2.) (Lakowicz, 1999).



Slika 2. Reakcija kompleksacije Al^{3+} s 8-hidroksikinolinom pri čemu nastaje kompleks koji intenzivnije fluorescira (preuzeto iz Luterotti, 2016)

Povećanjem temperature smanjuje se kvantni prinos fluorescencije jer se statistički povećava broj sudara s okolnim molekulama i povećava vibracijska relaksacija. Smanjenje kvantnog prinosa uzrokuje i smanjena viskoznost otapala koja djeluje na isti način (Skoog i sur., 2014). Također kao važan čimbenik koji utječe na intenzitet fluorescencije je i koncentracija otopine analita jer emitirano zračenje može biti ponovno apsorbirano drugim nepobuđenim molekulama u otopini visoke koncentracije (Nigović i sur., 2007).

1.1.3. Fluorescencijska spektrofotometrija

Fluorescencijska spektrofotometrija temelji se na molekulskoj emisijskoj spektroskopiji i molekulskom pobuđivanju UV/vidljivim zrakama. Nakon apsorpcije zračenja molekule emitiraju apsorbirano zračenje na većim valnim duljinama, a intenzitet fluorescencije je proporcionalan snazi pobudnog zračenja koje se apsorbira. Energija emitiranog zračenja je niža od apsorbirane energije te je u spektru vidljiva kao pomak od 50-150 nm u usporedbi s valnom duljinom zračenja koje uzrokuje pobuđivanje, a ta pojava naziva se Stokesov pomak (Nigović i sur., 2007).

$$F = k \log\left(\frac{P_0}{P}\right)$$

P_0 - snaga upadnog snopa

P - snaga snopa nakon prolaza kroz otopinu

k - konstanta ovisna o djelotvornosti fluorescencije sustava

Molekule koje se promatraju fluorimetrijski moraju imati više kromofora i moraju biti krute strukture kako bi se izbjegao gubitak energije vibracijom. Posebnost spektrofluorimetrije je ta da je selektivna za određivanje fluorescirajućih spojeva u prisutnosti velikog broja spojeva koji ne pokazuju fluorescenciju. Osim kvalitativne analize fluorimetrija se koristi i za određivanje koncentracije analita jer je intenzitet emitirane svjetlosti linearno proporcionalan koncentraciji pa se izmjereni intenzitet fluorescencije ispitivane tvari usporedi s intenzitetom poredbene tvari.

$$C_x = \frac{F_x \times C_s}{F_p}$$

C_x - koncentracija ispitivane tvari

C_s - koncentracija poredbene otopine

F_x - fluorescencija ispitivane otopine

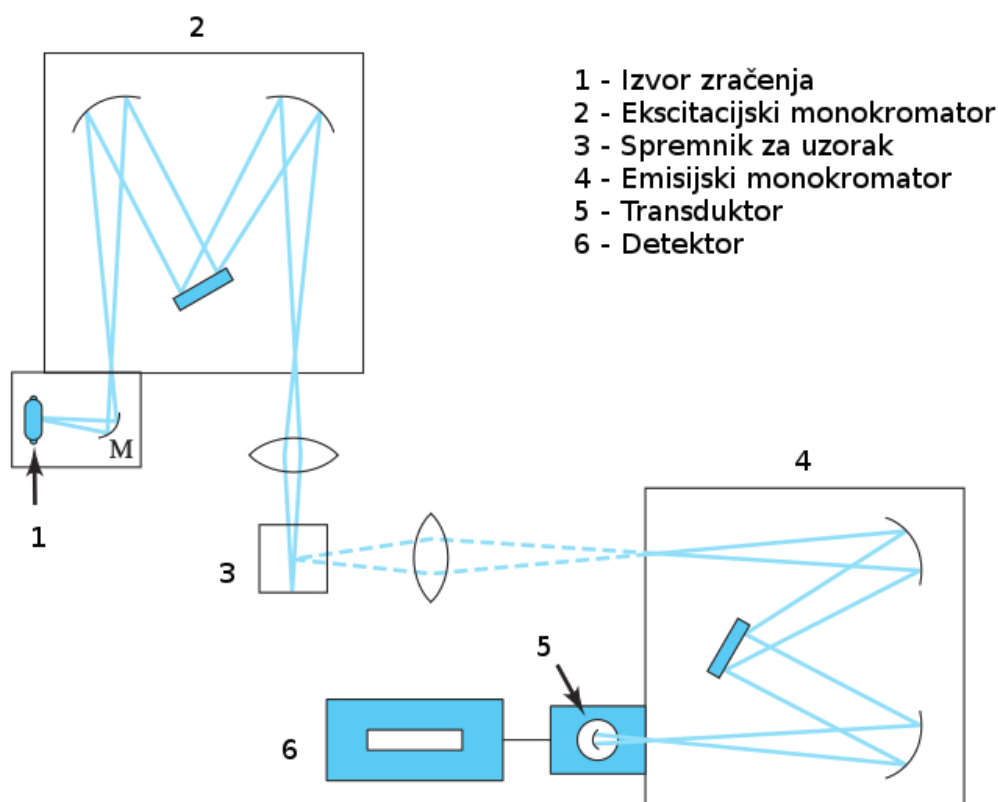
F_p - fluorescencija poredbene otopine

U kvantitativnoj analizi izradi se kalibracijski pravac pomoću poredbenih otopina poznatih koncentracija te se koncentracija analita odredi interpolacijom (Nigović i sur., 2007).

1.1.4. Spektrofluorimetar

Uređaji za mjerenje fluorescencije poznati su kao fluorimetri i spektrofluorimetri. Razlika između njih je u selektorima valne duljine, ako su oba selektora filteri radi se o fluorimetru, dok su kod spektrofluorimetra oba selektora monokromatori. Također postoje hibridi koji koriste ekscitacijski filter i emisijski monokromator. (Skoog i sur., 2014)

Grada spektrofluorimetra i put zraka svjetlosti prikazan je na slici 3. Ulazni snop zračenja određene valne duljine prolazi kroz uzorak te se emitirano zračenje detektira pomoću fotomultiplikatorske tube.



Slika 3. Dijelovi spektrofleurimetra (preuzeto iz Skoog i sur., 2014)

Izvor elektromagnetskog zračenja u spektrofleurimetru mogu biti ksenonova, živina, volfram-halogeni, deuterijska lampa ili laser. Pošto je intenzitet fluorescencije proporcionalan intenzitetu ulaznog zračenja, izvor zračenja mora biti vrlo stabilan kako bi uvijek imali konstantno zračenje (Jeffery i sur., 1989). Izvor proizvodi konstantno zračenje svjetlosti različitih valnih duljina pa je potreban monokromator kako bi se svjetlost razlučila na pojedine valne duljine. Ovakav postupak je sličan mjerenju UV-Vis spektrofotometrijom, ali je razlika u tome što se kod spektrofleurimetra emitirano zračenje detektira pri kutu od 90° od kuta ulaza ekscitacijskog zračenja. Osim toga kod spektrofleurimetra postoji drugi monokromator koji služi za odjeljivanje samo određene emitirane valne duljine, čime se sprječava detekcija ekscitacijskog snopa zračenja. Zbog kuta mjerenja od 90° kivete koje se koriste u spektrofleurimetriji i fluorimetriji imaju sve četiri plohe glatke pa se razlikuju od onih korištenih u UV-Vis spektrofotometriji koje imaju dvije glatke plohe (smjer ulaza i izlaza svjetlosti). Kivete koje se koriste kod mjerenja u UV području izrađene su samo od kvarca pošto staklene i plastične mogu apsorbirati dio ultraljubičastog zračenja (Sheehan, 2009).

1.2. Validacija analitičke metode

Cilj validacije analitičke metode je dokazati da je dana metoda prikladna za određenu primjenu i jamči da će se pod propisanim uvjetima korištenja analitičkog postupka dobiti valjani rezultat. Međunarodno vijeće za harmonizaciju (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*; ICH) je objavilo dokument procedure pod naslovom „*Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2*“ koji propisuje parametre koji se određuju u postupku validacije novih metoda ili pri promjeni bilo kojeg dijela analitičke metode koja je već bila validirana. Karakteristike metode koje se ispituju su: točnost, preciznost, specifičnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje. Izdržljivost metode nije u službenom zapisu dokumenta, ali morala bi se svakako uzeti u obzir kod razvoja analitičke metode. Koji će se parametri validacije ispitati ovisi o svrsi analitičke metode koja se koristi. Kod identifikacijskih metoda se često ispituje samo specifičnost, dok kod metoda za određivanje sadržaja se ispituju točnost, preciznost, specifičnost, linearnost i radno područje te granica dokazivanja (LoD) i granica određivanja (LoQ) (Nigović i sur., 2007).

1.2.1. Specifičnost/selektivnost

Selektivnost metode predstavlja mjeru sposobnosti metode da točno odredi analit u uzorku u kojem su prisutne druge tvari. Specifičnost metode je mjera sposobnosti metode koja opisuje nedvojbeno razlikovanje jednog analita od ostalih komponenata uzorka.

1.2.2. Linearnost i radno područje

Radno područje ili doseg metode predstavlja interval unutar kojeg analitička metoda ima prihvatljive parametre točnosti, linearnosti i preciznosti.

Linearnost predstavlja interval unutar kojeg su koncentracija analita i izmjereni signal u proporcionalnom odnosu. Za ispitivanje linearnosti napravi se najmanje pet razrjeđenja standardne otopine poznate koncentracije u radnom području i to s tri do šest određivanja na svakoj koncentracijskoj razini. Takvim mjerenjem dobiva se regresijski pravac kojeg opisuju koeficijent korelacije $R^2 > 0,999$, odsječak na y-osi te koeficijent smjera pravca. U nekim

slučajevima, da bi se dobila linearnost između signala i koncentracije analita, dobivene vrijednosti treba podvrgnuti matematičkoj transformaciji prije dobivanja regresijskog pravca (www.ich.com).

1.2.3. Preciznost

Preciznost predstavlja sukladnost između više ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim uvjetima. Preciznost se iskazuje preko ponovljivosti, srednje preciznosti i obnovljivosti. Ponovljivost pokazuje podudaranje između rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka pri istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu, a srednja preciznost pokazuje odstupanje između rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka, ali pod različitim uvjetima (različiti analitičar i instrument) kroz duži vremenski period. Obnovljivost predstavlja podudaranje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom, ali u različitim laboratorijima (Nigović i sur., 2007).

Preciznost se određuje ispitivanjem najmanje devet uzoraka koji pokrivaju radno područje i to sa najmanje tri određivanja za tri koncentracije unutar radnog područja. Izražava se kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija ili kao interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 [\%]$$

SD - standardna devijacija

$\bar{x}$ - srednja vrijednost dobivenih rezultata

1.2.4. Točnost

Točnost daje uvid jesu li vrijednosti rezultata dobivenih mjerenjem novom metodom u skladu s referentnim vrijednostima. Točnost se može odrediti tek nakon što su utvrđene preciznost, linearnost i specifičnost.

Za određivanje točnosti treba napraviti barem devet mjerenja uzorka i to najmanje tri mjerenja za tri koncentracije unutar radnog područja metode.

Točnost se izražava kao postotak prinosa (engl. recovery) analitičke metode koji predstavlja omjer srednje vrijednosti i prihvaćenih stvarnih referentih vrijednosti u istom intervalu (Watson, 1999).

$$R = \frac{X}{\bar{x}} \times 100 [\%]$$

X - srednja vrijednost dobivenih rezultata

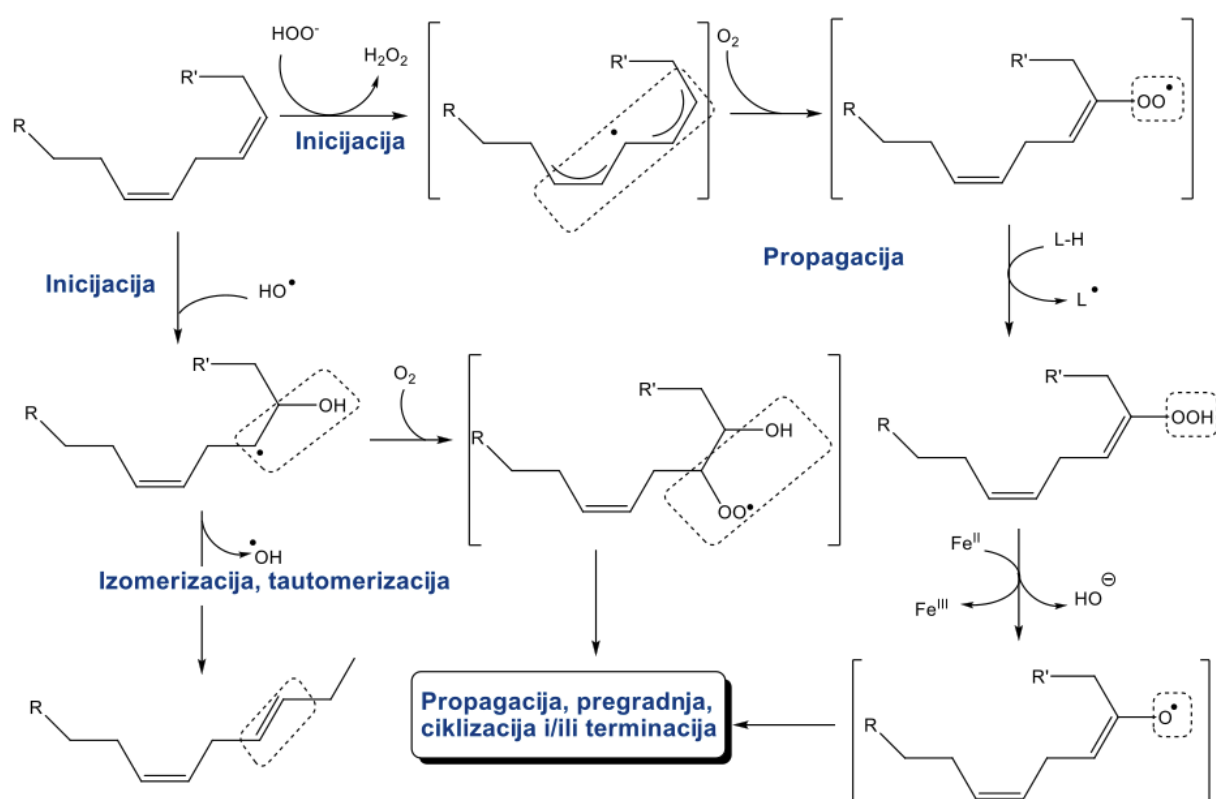
$\bar{x}$ - stvarna vrijednost analita u uzorku

1.3. Malondialdehid - MDA

Veliki dio energije u stanici dolazi iz mitohondrijske oksidativne fosforilacije kojom se stvara ATP i gdje se kisik reducira do vode. U tom procesu mogu nastati kao nusprodukti reaktivne kisikove vrste (kisikov i hidroksilni slobodni radikal te vodikov peroksid). Oksidativni stres je posljedica prekomjernog stvaranja tih nusprodukata i predstavlja stanje u kojem stvaranje reaktivnih slobodnih radikala nadvlada citoprotektivne mehanizme antioksidacijskih sustava (Rang i sur., 2005). Studije pokazuju kako je oksidacijski stres povezan s nastankom kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, karcinoma i drugih bolesti. Stanice konstantnim metabolizmom proizvode slobodne radikale koji mogu oštetiti molekule DNA, citosolne molekule i staničnu membranu koja se u velikoj mjeri sastoji od lipida (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

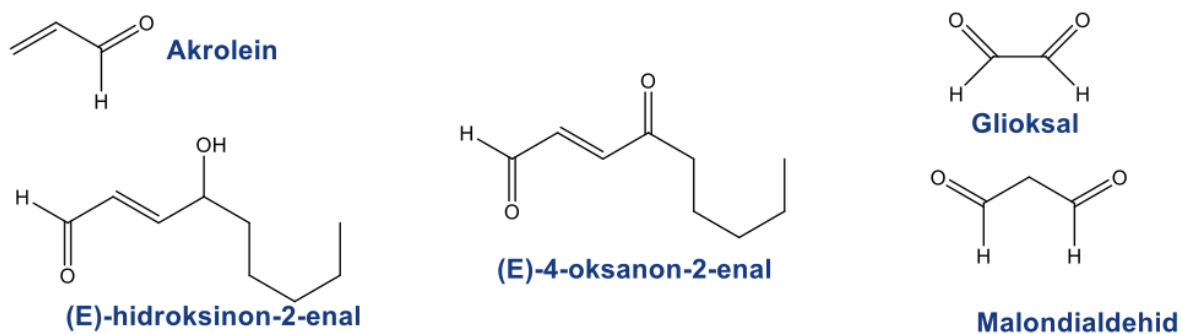
Lipidna peroksidacija je proces u kojem slobodni radikali oštećuju višestruko nezasićene masne kiseline. Tim procesom mogu nastati lipidni peroksidiradikali (ROO*) koji dalje uzrokuju nastanak lipidnih hidroksiperoksida (ROOH) koji onda potiču stvaranje novih peroksi radikala. To je takozvana lančana reakcija. S obzirom da su višestruko nezasićene masne kiseline glavna komponenta staničnih membrana, takva lančana reakcija može u konačnici dovesti do promjene u membranskoj propusnosti. Pored toga novonastali lipidni peroksidi mogu reagirati i s makromolekulama prisutnim u citosolu te takvo stanje može dovesti do stanične smrti (Rang i sur., 2005). Zbog toga je praćenje razine lipidne peroksidacije vrlo važno. Malondialdehid (MDA) je stabilni produkt lipidne peroksidacije pa se koristi za određivanje razine lipidne peroksidacije u biološkim uzorcima.

Reakcija peroksidacije lipida uključuje tri stupnja: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Za početak reakcije, odnosno inicijaciju glavnu ulogu imaju ROS i to $\text{HOO}^\bullet$ i $\text{HO}^\bullet$. $\text{HOO}^\bullet$ reagira s nezasićenim masnim kiselinama tako da oduzme vodik iz $-\text{CH}_2-$ skupine u α -položaju do $\text{C}=\text{C}$ veze pri čemu nastaje vodikov peroksid i C-radikal koji reagira s molekulskim kisikom i daje peroksilni radikal ($\text{ROO}^\bullet$) koji dalje širi reakciju oduzimanjem vodika iz drugih kiselina. Reakcija se dovršava pregradnjom, ciklizacijom ili stvaranjem stabilnih produkata s dodatnom $\text{C}=\text{C}$ vezom (slika 4.) (Jadrijević-Mladar Takač, 2016).



Slika 4. Reakcija peroksidacije lipida (preuzeto iz Jadrijević-Mladar Takač, predavanja, Metabolizam i toksičnosti, 2016)

Kao markeri lipidne peroksidacije uzimaju se produkti koji su relativno stabilni kao što su MDA, konjugirani dieni, 4-hidroksinon-2-enal (HNE) i izoprostani (slika 5.).



Slika 5. Stabilni produkti lipidne peroksidacije (preuzeto iz Jadrijević-Mladar Takač, predavanja, Metabolizam i toksičnosti, 2016)

2.OBRAZLOŽENJE TEME

Oksidacijski stres, odnosno povećana razina slobodnih radikala u organizmu povezuje se s brojnim patološkim stanjima. Istraživanja pokazuju da su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, razne kardiovaskularne komplikacije i brojna druga stanja povezana s oksidacijskim stresom. Stoga ne čudi interes znanstvenika za razvoj metoda kojima bi se mogao pratiti oksidacijski stres u organizmu. Pri tome najveći problem predstavljaju upravo slobodni radikali koji su nestabilni te ih je vrlo teško izmjeriti u biološkim uzorcima poput krvi, plazme ili urina.

Lipidna peroksidacija je proces oksidacijskog oštećenja lipida pri čemu nastaju brojni produkti. Jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije koji je ujedno i stabilan je MDA te se u studijama dovodi u izravnu vezu s već spomenutim bolestima kao i razvojem karcinoma (Seljeskog i sur., 2006). Upravo stoga što je stabilan MDA se koristi u istraživanjima kao pokazatelj oksidacijskog stresa.

Cilj ovog rada bio je optimizirati spektrofluorimetrijsku metodu za određivanje koncentracije MDA u humanom urinu. U prvom koraku, ispitan je utjecaj interferencija, odnosno utjecaj spojeva prisutnih u humanom urinu kao i reaktanata na izmjerenu koncentraciju MDA. Pomoću standarda MDA validirana je spektrofluorimetrijska metoda za određivanje koncentracije MDA. Kao bi se provjerila primjenjivost optimizirane metode, u sakupljenim uzorcima humanog urina odredila se koncentracija MDA. Dobiveni rezultati izmjerene koncentracije MDA u humanom urinu uspoređeni su s rezultatima dobivenim u drugim studijama kako bi se donijeli zaključci o primjenjivosti razvijene metode.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

Za određivanje koncentracije MDA u urinu korištene su sljedeće kemikalije:

- 1,1,3,3 tetraetoksipropan kao standard MDA, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- 2-tiobarbituratna kiselina, 2-TBA, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- Kreatinin, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, SAD
- orto-fosforna kiselina, o-H₃PO₄, min 85 %, PO Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Urea, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće, osim kreatinina koji je bio za istraživanje i razvoj.

3.2. Aparatura

Korištena aparatura uključivala je:

- Analitičku vagu (Acculab sartorius group, Bradford, SAD)
- Grijač G-Term 035 (Fratelli Galli, Milano, Italija)
- Grijač/mješalicu WiseStir MSH-20D (Wisd Laboratory Instruments, Dublin, Irska)
- Spektrofluorimetar OLIS RSM 1000F (Olis Inc., Bogart, Georgia, USA) sa softwareom OLIS Globalworks software

3.2.1. Spektrofluorimetar

U ovom radu korišten je spektrofluorimetar OLIS RSM 1000 koji koristi ksenonovu lampu od 150W i sustav ekscitacijskog i emisijskog monokromatora s fotomultiplikatorskom tubom kao detektorom (olisweb.com). Spektrofluorimetar je prikazan na slici 6.



Slika 6. Spektrofluorimetar OLIS RSM 1000 (preuzeto s <http://olisweb.com>)

3.3. Uzorci

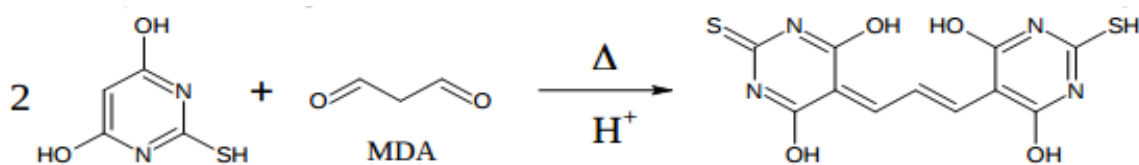
Za određivanje koncentracije MDA prikupljeni su uzorci humanog urina ($n = 7$) zdravih dobrovoljaca.

Uzorci su držani u staklenim epruvetama s čepom i skladišteni na -20°C . Neposredno prije postupka mjerenja uzorci su držani na sobnoj temperaturi, centrifugirani, a za mjerenje je uzet supernatant.

3.4. Metode

3.4.1. Određivanje koncentracije MDA

Test se temelji na reakciji MDA i kromogenog reagensa 2-TBA koji reagiraju u omjeru 1:2 preko Knoevenagelove kondenzacije prilikom čega nastaje kromogena skupina. Reakcija se odvija pri kiselim uvjetima $\text{pH}=1-2$ i povišene temperature. Tom reakcijom nastaje produkt MDA-TBA₂ koji boji otopinu crveno i mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini ekscitacije 515 nm i emisije na 553 nm (slika 7.). (Agarwal i Chase, 2002).



Slika 7. Reakcija između 2-TBA i MDA pri kiselim uvjetima (preuzeto iz Oxford Biomedical Research, FR35)

Del Rio i sur. (2005) u svom radu navode kako velika količina MDA ostane vezana za makromolekule matriksa ukoliko se ne izvrši hidroliza pa se tako dobije lažno negativni rezultat. Kako bi se to izbjeglo u ovom radu korištena je 1% otopina H_3PO_4 koja molekule MDA hidrolitički uklanja s makromolekula s ciljem dobivanja što točnijeg rezultata.

3.4.2 Priprema otopina

1% otopina o- H_3PO_4

Otopina je pripremljena alikvotiranjem 5,9 mL 85% o- H_3PO_4 te nadopunjavanjem do oznake u odmjerne tikvici od 500,00 mL s destiliranom vodom.

0,6% otopina 2-TBA

Otopina je pripremljena vaganjem 0,6 g 2-TBA i otapanjem uz blago zagrijavanje u destiliranoj vodi te je nakon hlađenja pri sobnoj temperaturi tikvica nadopunjena do oznake od 100,00 mL destiliranom vodom.

100 mmol/L otopina kreatinina

Otopina je pripremljena vaganjem 113,00 mg kreatinina te otapanjem u destiliranoj vodi u odmjerne tikvici do volumena 10,00 mL. Ta otopina je korištena za ispitivanje mogućih interferencija s TBA prilikom određivanja MDA.

5 mmol/L otopina uree

Otopina je pripremljena otapanjem 30,00 mg uree u 100,00 mL destilirane vode uz blago miješanje i zagrijavanje. Ta otopina je korištena za ispitivanje mogućih interferencija s TBA prilikom određivanja MDA.

Standardna otopina MDA

Kao standard MDA korišten je 1,1,3,3-tetraetoksipropan koji neenzimskom hidrolizom prelazi u MDA. Iz matične otopine MDA koncentracije 6,07 mol/L alikvotirano je 25 μL te razrijeđeno do 50,00 mL s destiliranom vodom. Takva se otopina (koncentracija 3,035 mmol/L) dalje razrjeđuje 150 puta do postizanja koncentracije od 20,23 $\mu\text{mol/L}$. Takva otopina standarda korištena je za daljnju izradu ostalih radnih standardnih otopina od 0,5; 1,01; 2,02; 4,04; 6,07;

8,09 i 10,11 $\mu\text{mol/L}$ koje su korištene za validaciju metode u vodi. Priprema standardnih otopina prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije i priprema standardnih otopina MDA u vodi

Volumen tikvice [mL]	Volumen standarda 20,23 μM [mL]	Koncentracija novog radnog standarda [$\mu\text{mol/L}$]
10,00	0,25	0,50
10,00	0,50	1,01
10,00	1,00	2,02
10,00	2,00	4,04
10,00	3,00	6,07
10,00	4,00	8,09
10,00	5,00	10,11

Za validaciju metode u uzorku urina uzeta je već pripremljena standardna otopina koncentracije 3,035 mmol/L u volumenu od 2,50 mL i razrijeđena je 10 puta. Takva nova otopina standarda koncentracije 303,5 $\mu\text{mol/L}$ korištena je za izradu drugih radnih standardnih otopina za validaciju, postupak je prikazan u tablici 2.

S obzirom da nema uzorka urina bez već prisutnog MDA za izradu otopine “nulte” koncentracije korištena je otopina priređena dodavanjem 0,2 mL destilirane vode u 2,8 mL urina.

Tablica 2. Koncentracije i priprema standardnih otopina MDA u urinu

Volumen tikvice za pripravu	Uzeti volumen standarda 303,5 $\mu\text{mol/L}$	Dobivena koncentracija novog standarda I u vodi	Uzeti volumen novog standarda I	Volumen urina	Koncentracija standarda u urinu
[mL]	[mL]	[$\mu\text{mol/L}$]	[mL]	[mL]	[$\mu\text{mol/L}$]
50,00	1,00	7,50	0,20	2,80	0,50
50,00	2,00	15,20	0,20	2,80	1,01
50,00	5,00	30,40	0,20	2,80	2,02
50,00	7,50	45,40	0,20	2,80	3,03
50,00	10,00	60,70	0,20	2,80	4,04
50,00	15,00	91,00	0,20	2,80	6,07

3.4.3 Postupak mjerenja

Uzorci urina su centrifugirani 5 minuta na 3500 okretaja u minuti, nakon čega je uzet bistri supernatant (400 μL) te prebačen u Eppendorf epruvetu od 1,5 mL. U uzorak se potom dodaje 750 μL 1% o- H_3PO_4 i 250 μL otopine 0,6% TBA te se epruveta zatvori i promućka. Tako priređena reakcijska smjesa se prenese u grijaći blok i zagrijava se 30 minuta na 90°C. Nakon toga se epruvete stavljaju na led 5 minuta kako bi se smjesa ohladila.

Uzorci su izmjereni spektrofotometrijski s postavljenom ekscitacijom na 515 nm i detekcijom emisije na 553 nm te je koncentracija MDA određena pomoću jednadžbe regresijskog pravca dobivenog sa standardnim otopinama poznatih koncentracija. Tako dobivena koncentracija MDA je izražena u jedinici $\mu\text{mol/L}$.

Uz svaku seriju uzoraka korištena je i slijepa proba. Uzorak slijepe probe umjesto uzorka urina sadrži 400 μL destilirane vode te je daljnji postupak isti.

Kod metode standardne adicije, dodatkom poznate koncentracije MDA u uzorak korištene su koncentracije od 3,03 i 6,07 $\mu\text{mol/L}$ te je koncentracija MDA određena pomoću parametara regresijskog pravca (nagib i odsječak na y osi).

Uzorci su mjereni na sobnoj temperaturi u kvarcnoj kiveri na spektrofotometru OLIS RSM 1000F sa softverom OLIS Globalworks software. Jedinice intenziteta fluorescencije (engl. fluorescence units, [f.u.]) iskazane su kao omjer signala dobivenog od uzorka i signala referentnog fotomultiplikatora. Svaki prikazani spektar predstavlja prosjek od 10 000 brzih snimanja fluorescencije u 10 sekundi.

4.REZULTATI I RASPRAVA

MDA je stabilni produkt lipidne peroksidacije te se koristi za praćenje kako razine lipidne peroksidacije tako i oksidacijskog stresa. Iz izmjerene koncentracije MDA u biološkim uzorcima mogu se donijeti zaključci o samom oksidacijskom stresu organizma. Koncentracija MDA u urinu i/ili krvi ukazuje na razinu oksidacijskog stresa u cijelome organizmu, dok koncentracija MDA u stanici ukazuje na razinu MDA u toj stanici odnosno organu (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Za određivanje koncentracije MDA razvijene su brojne metode. Najčešće se koristi takozvani tiobarbiturati test, u kojem MDA reagira s dvije molekule 2-TBA pri čemu nastaje kromogeni MDA-TBA₂ produkt, a razina izmjerenog MDA-TBA₂ odgovara koncentraciji MDA. Produkt MDA-TBA₂ može se odrediti pomoću UV-Vis, ali i fluorimetrijski.

Kako bi se odredila koncentracija kromogenog produkta MDA-TBA₂ koriste se razne tehnike, a svaka od njih ima svojih prednosti i nedostataka. Prednost određivanja koncentracije MDA-TBA₂ UV-Vis spektroskopijom je ta što je metoda brza i laka, no kao nedostaci se navode razne interferencije (manjak specifičnosti) kao i veliki volumen uzorka te početna supstancija 2-TBA koju je teško pribaviti. Kromatografske metode, točnije tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC od engl. *High performance liquid chromatography*) smatra se najboljim odabirom za određivanje koncentracije MDA-TBA₂ produkta u biološkim uzorcima. Na koloni dolazi do razdvajanja komponenti iz uzorka što povećava selektivnost u odnosu na UV-Vis spektrofotometriju jer dolazi do odvajanja interferencija od analita u uzorku (Agarwal i Chase, 2002). Dodatna prednost je u manjem volumenu biološkog uzorka koji je potreban. Nedostaci su dugotrajnost metode (potrebno je određeno vrijeme za razdvajanje uzorka na koloni) kao i troškovi (za otapala, za mobilnu fazu te kromatografsku kolonu). Fluorescencija je specifično svojstvo neke molekule te se ono može koristiti u njezinom određivanju što povećava osjetljivost metode (Luterotti, 2016). S obzirom da produkt reakcije MDA-TBA₂ fluorescira, u ovome istraživanju optimizirana je spektrofluorimetrijska metoda određivanja MDA.

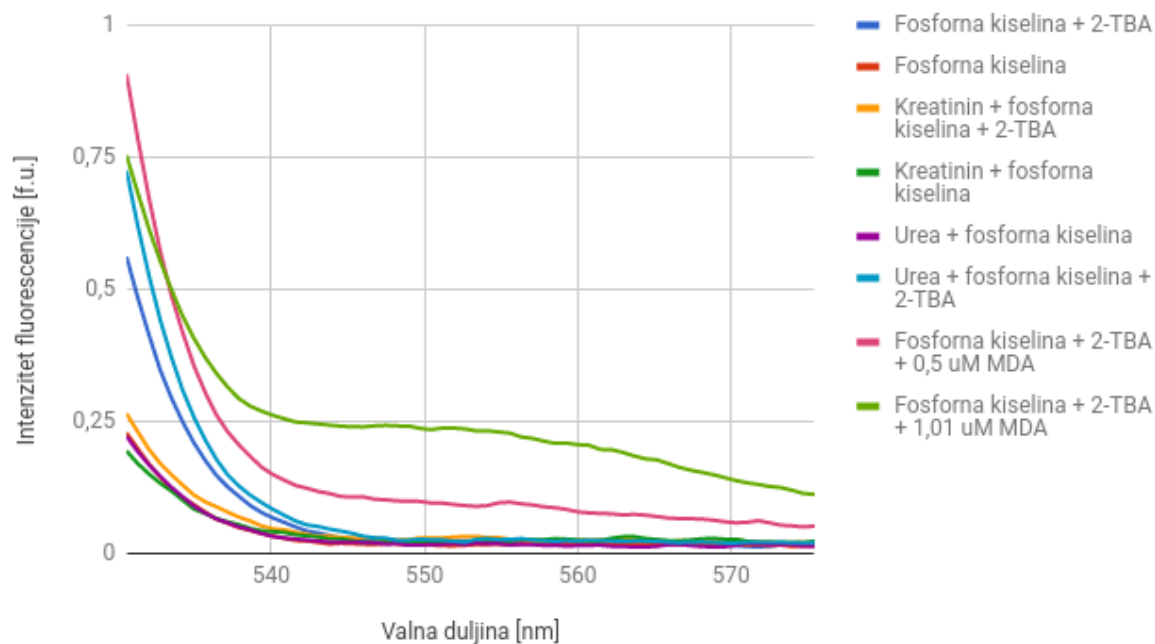
4.1. Ispitivanje interferencija prilikom određivanja MDA u urinu

Uzorak humanog urina sadrži brojne spojeve koji bi mogli interferirati s reakcijom MDA-TBA₂. U literaturi se navode kreatinin i urea koji se i inače nalaze u humanom urinu, a koji interferiraju, odnosno reagiraju s TBA te tako reakciju MDA-TBA čine nespecifičnom. Korchazhkina i suradnici u radu iz 2003. navode kako su veće vrijednosti MDA bile izmjerene u odsustvu uree iz uzorka. Iako su oni koristili drugu metodu kompleksacije, u ovom radu je odlučeno uzeti u obzir mogući utjecaj interferencija i ispitati ih. Stoga je prije samog mjerenja uzorka ispitano postojanje eventualnih interakcija između reaktanata potrebnih za stvaranje adukta MDA-TBA₂ i kreatinina i uree koji se inače nalaze u uzorku humanog urina. Kod ispitivanja interferencija važno je bilo praćenje fluorescencije na valnoj duljini od 553 nm. Kao slijepa proba korištena je destilirana voda.

Prvo je izmjeren spektar za 1% otopinu o-H₃PO₄ (prilog 1.), nakon toga izmjeren je spektar za 1% otopinu o-H₃PO₄ i 0,6% otopinu 2-TBA (prilog 2.) Potom su izmjereni spektri za 100 mmol/L otopinu kreatinina i 1% otopinu o-H₃PO₄, (prilog 3.) te za 5 mmol/L otopinu uree i 1% otopinu o-H₃PO₄ (prilog 4.) Također izmjereni su spektri smjese 5 mmol/L otopine uree, 1% otopine o-H₃PO₄ i 0,6% otopine 2-TBA (prilog 5.) te smjese 100 mmol/L otopine kreatinina, 1% otopine o-H₃PO₄ i 0,6% otopine 2-TBA (prilog 6.).

Skup svih spektara prikazan je na slici 8. te su dodana još 2 uzorka koji sadrže poznatu koncentraciju MDA, odnosno korištene su otopine od 0,50 μmol/L MDA i 1,01 μmol/L MDA. Pri valnoj duljini od 553 nm intenzitet fluorescencije svih reaktanata, kreatinina, uree i njihovih kombinacija je zanemariv u odnosu na intenzitet uzorka koji sadrži MDA u koncentraciji od 0,5 μmol/L te se iz dobivenih rezultata može zaključiti da kreatinin i urea te reaktanti reakcije ne pokazuju interferencijski signal prilikom spektrofluorimetrijskog određivanja MDA pri 553 nm.

.

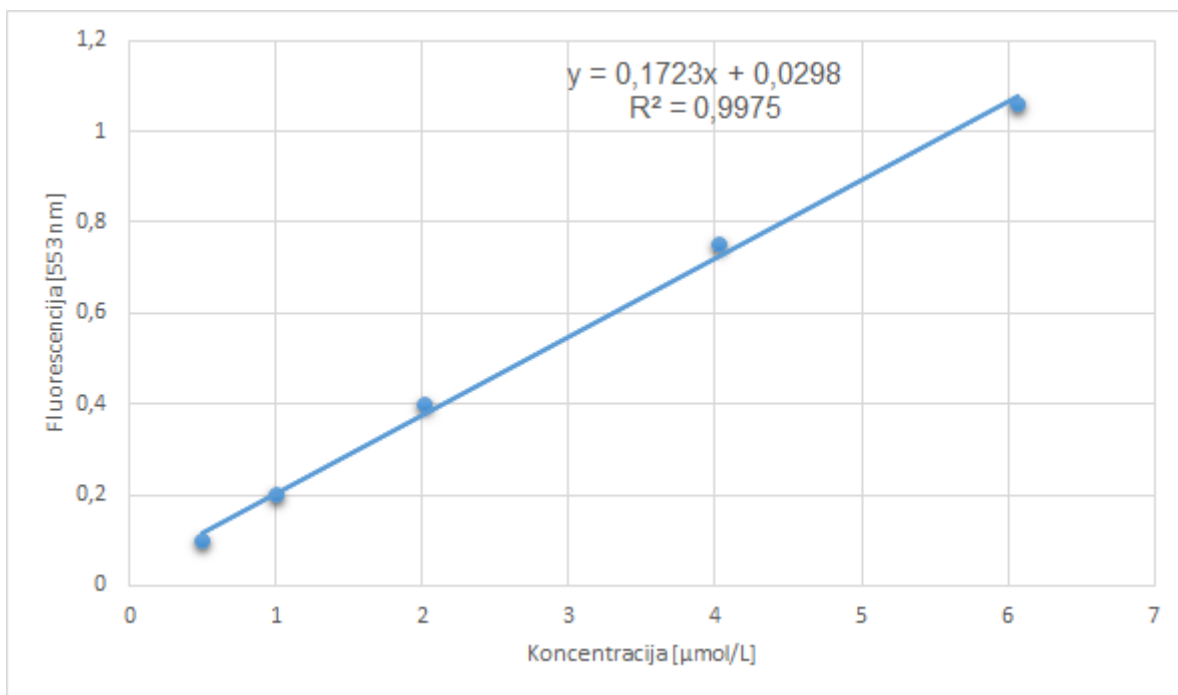


Slika 8. Fluorescencijski spektri pojedinih reaktanata, uree i kreatinina prilikom ispitivanja interferencija pri spektrofotometrijskom određivanju MDA

4.2. Validacija spektrofotometrijske metode određivanja MDA u urinu

4.2.1. Linearnost metode sa standardima pripremljenim u vodi

Pripremljeni standardi u vodi priređeni su u rasponu u kojem se očekuju vrijednosti MDA u urinu, odnosno bili su u rasponu od 0,5 $\mu\text{mol/L}$ do 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Za određivanje linearnosti napravljeno je tri mjerenja za svaku koncentraciju. Od dobivenih rezultata mjerenja izrađen je regresijski pravac jednadžbe $y=0,1723 x + 0,0298$ s koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9975$ što ukazuje na linearnost dobivenog pravca (slika 9.).



Slika 9. Regresijski pravac dobiven sa standardima pripremljenim u vodi primjenom spektrofotometrijske metode.

U daljnju svrhu validacije određena je ponovljivost u seriji za koncentracije 0,5; 2,02 i 6,07 μmol/L. Za ispitivanje ponovljivosti u seriji napravljeno je pet mjerenja za svaku od tri spomenute koncentracije te je ponovljivost izražena kao omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti fluorescencije za svaku odgovarajuću koncentraciju. Dobivene vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD) prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Ponovljivost u seriji sa standardima pripremljenim u vodi primjenom spektrofotometrijske metode

Koncentracija standarda [μmol/L]	Relativna standardna devijacija (RSD) [%]
0,5	3,76
2,02	3,02
6,07	2,25

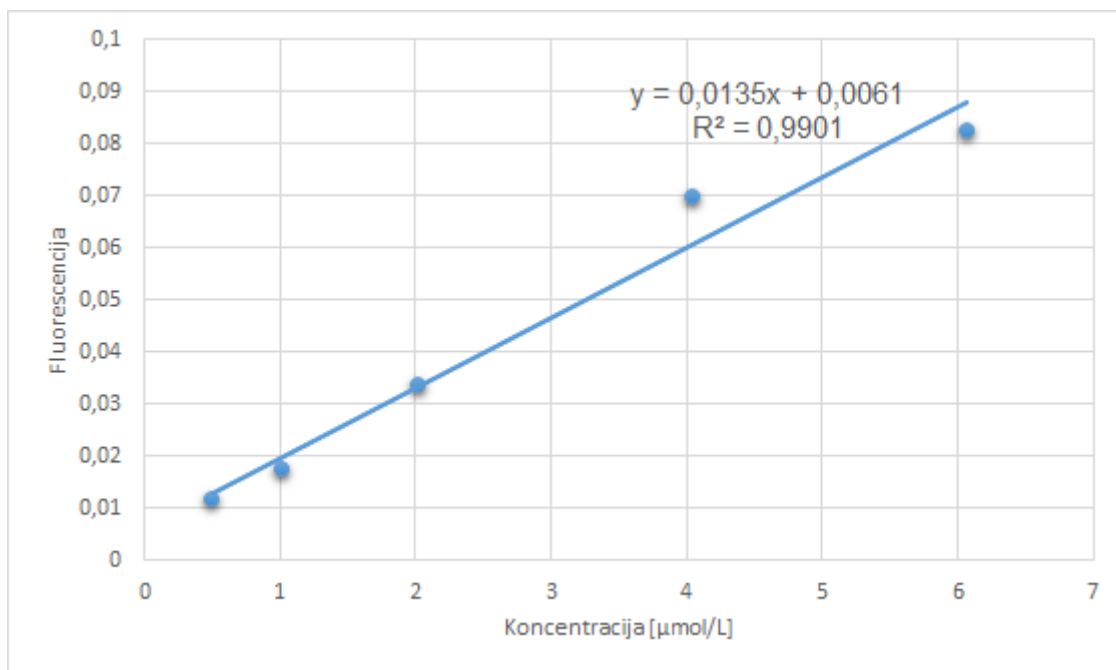
Ispitana je i ponovljivost iz dana u dan (srednja preciznost) za koncentraciju 6,07 μmol/L. Napravljena su tri određivanja za tu koncentraciju tijekom pet dana te je dobivena

prosječna vrijednost RSD od 4,27%. Vrijednosti ponovljivosti u seriji i vrijednosti ponovljivosti iz dana u dan bile su manje od 10% što po standardima *ICH* ukazuje da je metoda precizna za određivanje koncentracije MDA.

Određena je granica dokazivanja (LoD) i granica određivanja (LoQ). LoD predstavlja najnižu koncentraciju MDA koja može biti detektirana u uzorku i određena je nakon pet mjerenja standarda MDA koncentracije 0,5 µmol/L. Dobivena je vrijednost od 0,078 µmol/L. LoQ predstavlja najnižu koncentraciju MDA koja može biti određena u uzorku. Dobivena vrijednost LoQ iznosi 0,237 µmol/L.

4.2.2. Validacija metode sa standardima MDA pripremljenima u urinu

Pripremljeni standardi u urinu priređeni su u rasponu od 0,5 µmol/L do 6,07 µmol/L. Standardne otopine priređene su standardnom adicijom, odnosno dodavanjem pripremljenih vodenih standarda MDA u urin. Ovakav postupak bio je nužan jer nema uzorka urina u kojem nema već prisutnog MDA. Za postupak validacije korišten je samo jedan uzorak urina. Za ispitivanje linearnosti provedena su tri mjerenja za svaku koncentraciju, kao i za uzorak urina u kojem nije dodan MDA, tzv urin “nula” koji na grafu predstavlja odsječak na y osi i prikazuje prisutnu koncentraciju MDA u uzorku urina. Od dobivenih rezultata mjerenja izrađen je regresijski pravac jednadžbe $y = 0,0135 x + 0,0061$ s koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9901$ što ukazuje na linearnost dobivenog pravca (slika 10.).



Slika 10. Regresijski pravac dobiven sa standardima pripremljenim u urinu korištenjem spektrofotometrijske metode

Određena je ponovljivost u seriji za koncentracije 0,5; 2,02 i 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Za ispitivanje ponovljivosti u seriji napravljeno je pet mjerenja za svaku pojedinu koncentraciju, te je ponovljivost izražena kao omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti fluorescencije za svaku odgovarajuću koncentraciju. Dobivene vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD) prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Ponovljivost u seriji sa standardima pripremljenim u urinu korištenjem spektrofotometrijske metode

Koncentracija standarda [$\mu\text{mol/L}$]	Relativna standardna devijacija (RSD) [%]
0,5	2,02
2,02	5,18
6,07	6,16

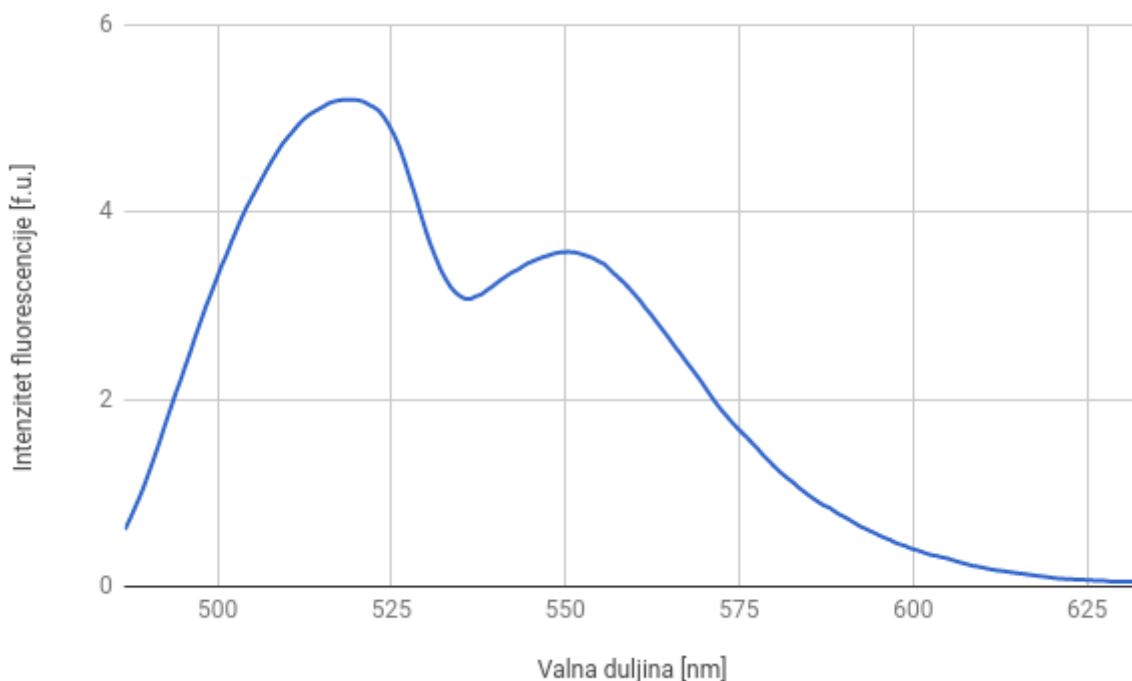
Određena je i ponovljivost iz dana u dan za koncentraciju 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Napravljena su tri određivanja za tu koncentraciju tijekom pet dana te je dobivena prosječna vrijednost RSD

od 5,14%. Vrijednosti ponovljivosti u seriji i vrijednosti ponovljivosti iz dana u dan bile su manje od 10% što po standardima *ICH* ukazuje da je metoda precizna za određivanje koncentracije MDA u uzorku urina.

Određena je granica dokazivanja (LoD) i granica određivanja (LoQ). LoD predstavlja najnižu koncentraciju MDA koja može biti detektirana u uzorku i utvrđena je nakon pet mjerenja standarda MDA koncentracije 0,5 $\mu\text{mol/L}$. Dobivena je vrijednost od 0,246 $\mu\text{mol/L}$. LoQ predstavlja najnižu koncentraciju MDA koja može biti određena u uzorku vode. Dobivena vrijednost LoQ iznosi 0,746 $\mu\text{mol/L}$.

4.3. Primjena metode na uzorke urina

U sedam uzoraka urina prikupljenih od zdravih dobrovoljaca određena je koncentracija MDA spektrofotometrijskom metodom iz ovog rada. Ekscitacija fluorimetra je namještena na 515 nm, dok je praćenje emisije bilo na 553 nm. Cijeli spektar jednog uzorka prikazan je na slici 11. gdje su jasno vidljivi prijelazi pri valnim duljinama od 515 nm i 553 nm.



Slika 11. Fluorescencijski spektar uzorka humanog urina koji sadrži MDA

Mjerenje svakog uzorka je napravljeno u triplicatu i uzete su srednje vrijednosti za daljnji račun. Koncentracija je dobivena na temelju parametara regresijskog pravca sa standardima MDA u urinu. Rezultati fluorescencije i pripadajuće koncentracije prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Intenziteti fluorescencije i odgovarajuće koncentracije MDA u uzorcima humanog urina dobivenih spektrofлуorimetrijskom metodom

Uzorak [n]	Fluorescencija [f.u.]	Koncentracija [μmol/L]
1	0,027189	1,562
2	0,021164	1,116
3	0,024701	1,378
4	0,019278	0,976
5	0,021226	1,120
6	0,020500	1,066
7	0,042306	2,680

U ovim uzorcima koncentracija MDA bila je u rasponu od 0,97 do 2,68 μmol/L, odnosno $1,41 \pm 0,59$ μmol/L.

4.3.1. Određivanje koncentracije MDA metodom standardne adicije

Metoda standardne adicije predstavlja rješenje kod mogućih interferencija matriksa. U metodi standardne adicije dodaje se poznata koncentracija standarda u uzorak analita. Metoda standardne adicije zahtijeva linearan odgovor na dodatak poznate koncentracije standarda. Ta linearnost u ovom radu je dokazana preko parametara regresijskog pravca sa standardima u urinu. Prvi se uzorak mjeri bez dodatka standarda, dok se ostali uzorci mjere uz dodatak poznate koncentracije standarda čime se dobiva regresijski pravac (Skoog i sur., 2014).

Kako bi sa sigurnošću utvrdili da interferencije iz uzorka ne uzrokuju lažno povećanu koncentraciju MDA provedena je analiza istih 7 uzoraka metodom standardne adicije. Svaki je uzorak napravljen tako da je dodana poznata koncentracija MDA. U ovom istraživanju korištene su koncentracije standarda MDA od 3,03 $\mu\text{mol/L}$ i 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Svi uzorci su izmjereni u triplicatu, a koncentracija uzorka dobivena je interpolacijom dobivenih točaka, odnosno korištenjem odsjeka na y osi i nagiba pravca za račun koncentracije prema izrazu b/a gdje je “ b ” odsječak na y-osi, a “ a ” nagib regresijskog pravca. Tablica 6. prikazuje srednje vrijednosti koncentracije za svaki uzorak.

Tablica 6. Koncentracije MDA u uzorcima ljudskog urina izmjerenih metodom standardne adicije

Uzorak [n]	Koncentracija [$\mu\text{mol/L}$]
1	0,851
2	0,776
3	1,097
4	1,235
5	1,084
6	0,871
7	1,135

U ovim uzorcima koncentracija MDA bila je u rasponu od 0,85 do 1,23 $\mu\text{mol/L}$, odnosno $1,01 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$.

4.3.2. Usporedba rezultata

Metodom standardne adicije vrijednosti MDA bile su $1,01 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$, dok bez standardne adicije koristeći se regresijskim pravcem vrijednosti su bile $1,41 \pm 0,59 \mu\text{mol/L}$. Takvu razliku

u vrijednosti možemo pripisati prisutnim tvarima u matriksu. Pokazano je kako urea i kreatinin ne daju interferenciju pri 553 nm pa se može zaključiti kako postoje druge molekule koje mogu uzorkovati smetnje. Korištenje metode standardne adicije predstavlja način za dobivanje točnijih rezultata bez potrebe za ispitivanjem daljnjih interferencija te jedini nedostatak predstavljaju vrijeme i veća količina reagenasa potrebnih za analizu većeg broja uzoraka.

U studiji Lee i Kang iz 2008. uzet je urin od 44 kineska dobrovoljaca u razdoblju od tri tjedna i mjereno MDA već razvijenom TBA metodom te je za mjerenje korišten HPLC sa fluorimetrijskim detektorom. Dobivene vrijednosti za koncentraciju urinarnog MDA bile su $1,52 \pm 0,2$; $1,38 \pm 0,19$ te $1,98 \pm 1,20$ $\mu\text{mol/L}$. U epidemiološkoj studiji iz 2014. godine koju su proveli Kil i suradnici korišten je HPLC sa fluorimetrom kao detektorom te je na uzorku od $N=500$ dobivena vrijednost urinarnog MDA od $2,15 \pm 1,60$ $\mu\text{mol/L}$. Te su vrijednosti dobivene s postavljenom valnom duljinom ekscitacije na 515 nm te 553 nm za praćenje emisije. Studija koju su proveli Drury i suradnici iz 1997. godine napravljena je s TBA metodom te je za mjerenje korišten HPLC sa UV-Vis detektorom. U toj studiji je na uzorku od 50 novorođenčadi dobiven interval urinarnog MDA od 0,5 do 2,5 $\mu\text{mol/L}$.

Vrijednosti urinarnog MDA dobivenog u ovom radu primjenom standardne adicije i bez nje slažu se s vrijednostima gore spomenutih studija. Stoga se može zaključiti da je optimizirana spektrofluorimetrijska metoda primjenjiva za mjerenje MDA u humanom urinu. Ipak adicija poznate koncentracije standarda MDA u uzorak urina predstavlja metodu s kojom se dobivaju točniji rezultati i smanjuje utjecaj matriksa.

5.ZAKLJUČAK

Ispitivanjem interferencija reagensa TBA testa te kreatinina i uree pri valnoj duljini od 553 nm pokazano je da ne dolazi do lažnih pozitivnih rezultata.

Slaganje rezultata ove studije sa vrijednostima drugih studija koje su koristile HPLC kao metodu odjeljivanja prije detekcije fluorimetrom pokazuje kako je ova metoda precizna i pouzdana te se može koristiti za određivanje MDA u urinu kao biljega oksidativnog stresa organizma.

Spektrofluorimetrijska metoda je brža u usporedbi s HPLC-FL, HPLC-UV/Vis metodama te je posebno pogodna za veliki broj uzoraka jer za razliku od HPLC-a, skeniranja spektrofluorimetrom traju 10 s. Ova metoda je i jeftinija od HPLC metoda jer ne zahtijeva korištenje organskih otapala.

Primjenom metode standardne adicije dodatkom MDA poznate koncentracije u mjereni uzorak urina dulje je vrijeme mjerenja po uzorku, ali se time eliminira utjecaj matriksa na samo mjerenje te je koncentracija MDA dobivena tim putem bolji pokazatelj stanja samog MDA u urinu.

Slaganje rezultata ove studije s vrijednostima drugih studija koje su koristile HPLC kao metodu odjeljivanja prije detekcije fluorimetrom pokazuje kako je metoda određivanja MDA u urinu pomoću 2-TBA te standardnom adijcijom standarda MDA poznate koncentracije u uzorak precizna i pouzdana te se može koristiti za određivanje MDA u urinu kao biljega oksidativnog stresa organizma.

6.LITERATURA

Agarwal R, Chase SD. Malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr. B*, 2002, 775, 121-126.

Čvorišćec D, Čepelak I. Slobodni radikali U:Štrausova Medicinska Biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 638-648.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *NMCD*, 2005, 15, 316-328.

Drury J, Nycyk JA, Cooke RWI. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin. Chim. Acta*, 1997, 263, 177-185

The European agency for the evaluation of medical products. ICH Topic Q2B Note for guidance on validation of analytical procedures: Methodology. GPMP/ICH/ 281/95, 1996.

Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients, 2000, <http://www.ich.org>, pristupljeno 14.11.2017.

Jaffe HH, Miller AL. The fates of electronic excitation energy. *J. Chem. Educ.*, 1966, 43 (9), 469

Jadrijević-Mladar Takač M, Metabolizam i toksičnost [predavanje], Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmaceutsku kemiju, Zagreb, 2016

Jeffery GH, Bassett J, Mendham J, Denney RC. Vogel's - Textbook of quantitative chemical analysis 5th edition. Essex; Longman Scientific & Technical, 1989

Kil HN, Eom SY, Park JD, Kawamoto T, Kim YD, Kim H. A Rapid Method for Estimating the Levels of Urinary Thiobarbituric Acid Reactive Substances for Environmental Epidemiologic Survey. *Toxicol Res*, 2014, 8, 7-11.

Korchazhkina O, Exley C, Spencer SA. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Chromatog. B*, 2003, 23, 353-362.

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York; Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

Lee KH, Kang D. Stability and Intra-Individual Variation of Urinary Malondialdehyde and 2-Naphtol. *J Prev Med Public Health*, 2008, 41, 195-199.

Luterotti S. Uvod u Kemijsku Analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 105;118.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković J, Praktikum iz analitike lijekova II.dio, Validacija analitičkog postupka. Zagreb, 2007, str. 67

Olis Inc, <http://olisweb.com>, pristupljeno 17.11.2017

Oxford Biomedical Research. TBARS Cuvette Assay Kit. Broj dokumenta: FR35.111206

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 493; 726

Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. A novel HPLC, Method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem*, 2006, 39, 947-954.

Sheehan D. Physical Biochemistry: Principles and Applications. 2. izdanje. Irska, WileyBlackwell, 2009, str. 64-75.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Stanley RC. Fundamentals of analytical chemistry 9th edition. Belmont; Brooks/Cole, 2014, str. 802-814

Watson D. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str 4-11

7.SAŽETAK / SUMMARY

SAŽETAK

Optimiziranje spektrofлуорimetrijske metode za određivanje malondialdehida u urinu

Marko Nežić

Spektrofлуорimetrija predstavlja jednu od osjetljivijih metoda s obzirom na mogućnost detekcije željenog spoja u smjesi bez prethodnog odjeljivanja. Malondialdehid (MDA) je stabilan produkt lipidne peroksidacije te je uzet za mjerenje razine oksidacijskog stresa u uzorcima humanog urina.

Metoda korištena u ovom radu za određivanje koncentracije MDA u urinu temelji se na reakciji MDA s dvije molekule 2-tiobarbituratne kiseline (2-TBA) pri visokoj temperaturi od 90°C i kiselim uvjetima koji su postignuti korištenjem 1% otopine o-H₃PO₄. Prije mjerenja ispitane su interferencije korištenjem kreatinina, uree, 2-TBA i o-H₃PO₄. Ispitivanja su napravljena na spektrofлуорimetru OLIS RSM 1000F s ekscitacijom na $\lambda=515$ nm i detekcijom emisije na $\lambda=553$ nm. Ispitivanja interferencija nisu pokazala značajan signal ispitanih supstancija pri $\lambda=553$ nm. Za validaciju metode korišteni su standardi otopine MDA dobiveni razrjeđivanjem matične komercijalne otopine 1,1,3,3-tetraetoksipropana te su izrađeni standardi u rasponu od 0,5 do 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Validacijom u vodi dobiven je regresijski pravac $y=0,1723x+0,0298$ s $R^2=0,9975$. Ponovljivost u seriji za koncentraciju standarda 2,02 $\mu\text{mol/L}$ iznosila je 3,02%, dok je ponovljivost iz dana u dan bila 4,27%. Granica detekcije bila je na 0,078 $\mu\text{mol/L}$, a granica određivanja na 0,237 $\mu\text{mol/L}$. Kod validacije u urinu dobiven je regresijski pravac $y=0,135x+0,0061$ s $R^2=0,9901$. Ponovljivost u seriji za koncentraciju standarda 2,02 $\mu\text{mol/L}$ iznosila je 5,18%, dok je ponovljivost iz dana u dan bila 5,14%. Granica detekcije bila je na 0,248 $\mu\text{mol/L}$, a granica određivanja na 0,746 $\mu\text{mol/L}$.

Mjerenjem koncentracije MDA u urinu sedmorice zdravih dobrovoljaca i izračunom koncentracije pomoću kalibracijske krivulje dobivene su vrijednosti koncentracije MDA $1,41\pm0,59$ $\mu\text{mol/L}$. Kako bi se poništio utjecaj matriksa isti su uzorci izmjereni metodom standardne adicije poznate koncentracije MDA te su dobivene vrijednosti $1,01\pm0,17$ $\mu\text{mol/L}$. Dobivene vrijednosti validacije i rezultata mjerenja uzoraka upućuju na to kako su obje metode

pouzdana za mjerenje koncentracije MDA u urinu, ali metoda standardom adicijom daje točnije vrijednosti.

Ključne riječi: Spektrofluorimetrija, lipidna peroksidacija, malondialdehid, standardna adicija, validacija, optimiziranje

SUMMARY

Development of the spectrofluorimetric method for determination of malondialdehyde in urine

Marko Nežić

Spectrofluorometry is one of the more sensitive methods with the ability to detect the desired compound in a mixture without prior separation. Malondialdehyde (MDA) is a stable product of lipid peroxidation and is used to measure oxidative stress levels in human urine samples.

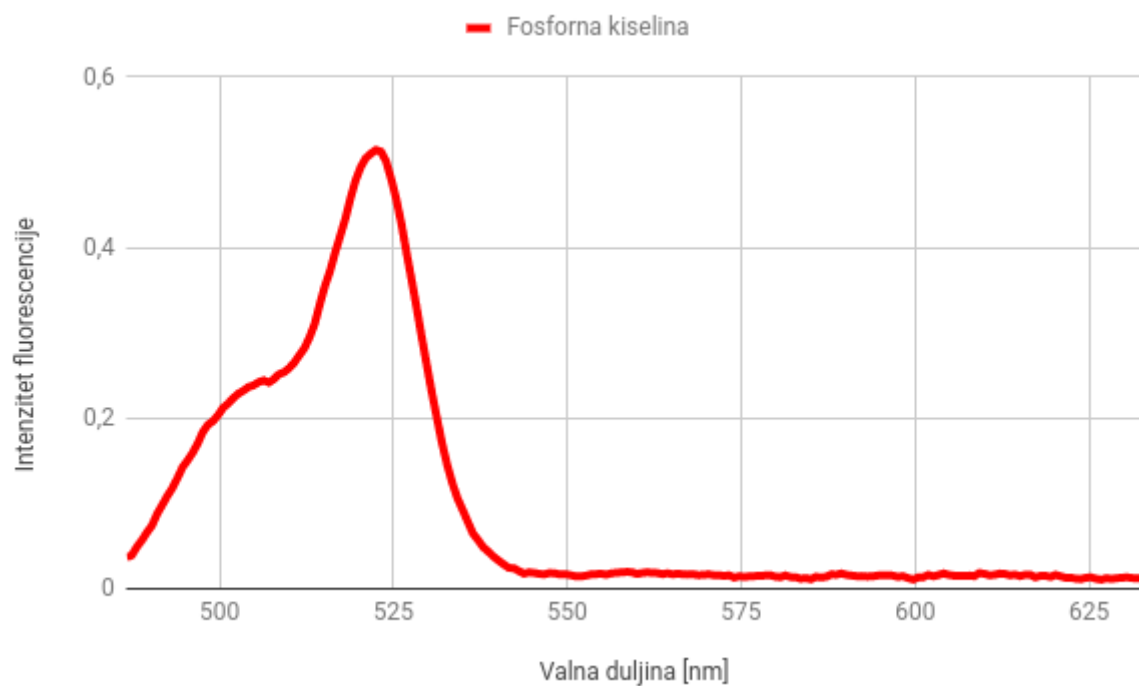
The method used in this work to determine the MDA concentration in urine is based on the MDA reaction with two 2-thiobarbituric acid (2-TBA) molecules at high temperature of 90°C and acid conditions achieved using a 1% o-H₃PO₄ solution. Before measurement, interferences were investigated using creatinine, urea, 2-TBA and o-H₃PO₄. Tests were made on the spectrofluorimeter OLIS RSM 1000F with excitation at $\lambda = 515$ nm and detection of emission at $\lambda = 553$ nm. Interference tests did not demonstrate a significant signal of the tested substances at $\lambda = 553$ nm. Standard validation of the MDA solution obtained by diluting the commercial solution of 1,1,3,3-tetraethoxypropane was used to validate the method and to make standards ranging from 0,5 to 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Validation in water gives the regression line $y = 0.1723x + 0.0298$ with $R^2 = 0.9975$. Repeatability for the 2,02 $\mu\text{mol/L}$ standard concentration range was 3,02%, and day-to-day repeatability was 4,27%. The detection limit was 0,078 $\mu\text{mol/L}$ and the limit of quantitation was at 0,237 $\mu\text{mol/L}$. After the validation in the urine a regression line was obtained $y = 0.135x + 0.0061$ with $R^2 = 0.9901$. Repeatability for the 2,02 $\mu\text{mol/L}$ standard concentration range was 5,18%, while the day-to-day repeatability was 5,14%. The detection limit was 0,248 $\mu\text{mol/L}$ and the limit of quantitation was at 0,746 $\mu\text{mol/L}$.

Measuring the MDA concentration in the urine of seven healthy volunteers and calculating the concentration by means of the calibration curve, were obtained MDA concentrations of $1,41 \pm 0,59$ $\mu\text{mol/L}$. In order to overcome the impact of the matrix, the same samples were measured by the standard addition method adding a known concentration of MDA and the obtained values were $1,01 \pm 0,17$ $\mu\text{mol/L}$. The obtained values from validation and the measurement results of the samples indicate that both methods are reliable for

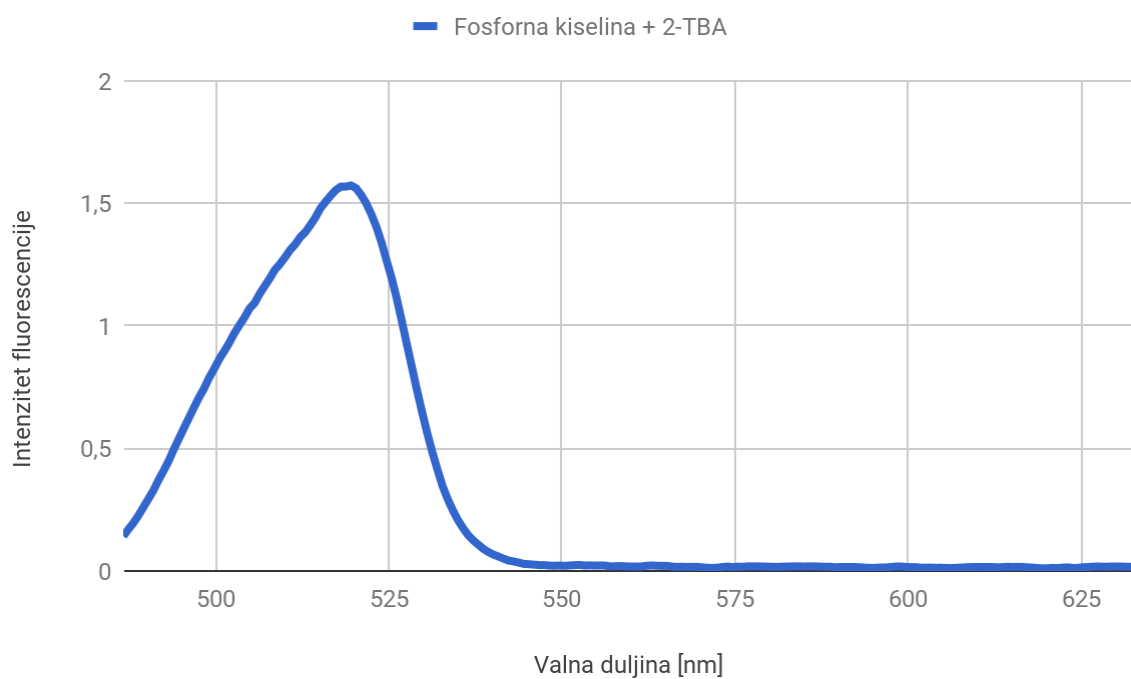
measuring MDA concentration in urine, but the standard addition method gives more accurate values.

Keywords: Spectrofluorimetry, lipid peroxidation, malondialdehyde, standard addition, validation,

8.PRILOZI



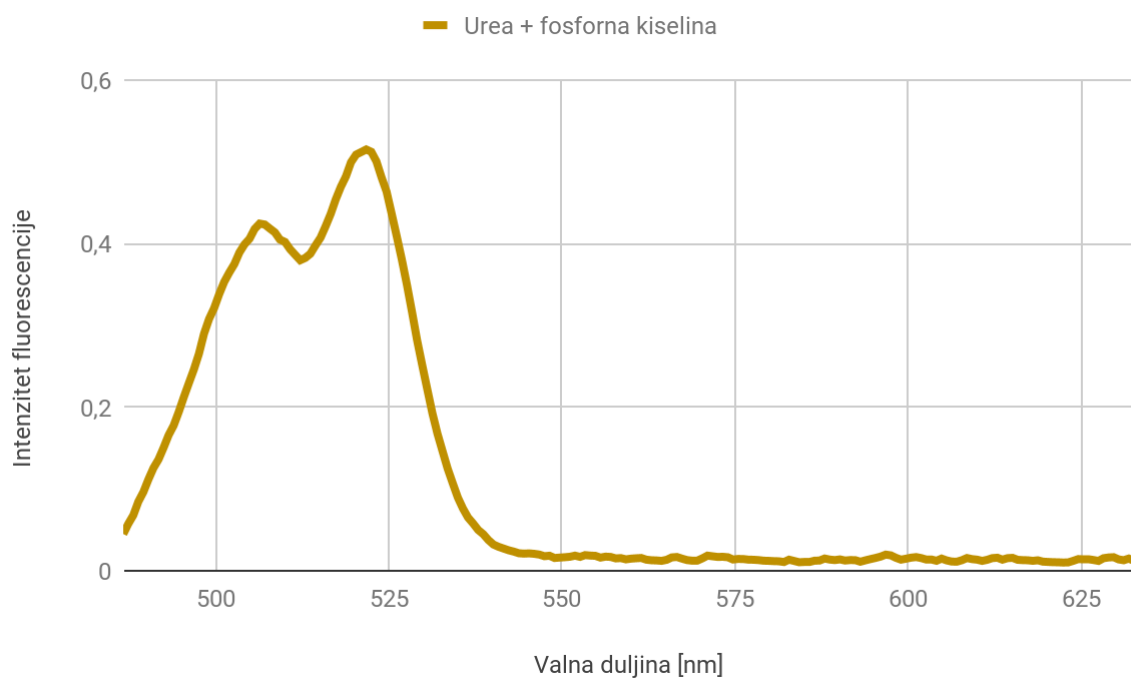
Prilog 1 - Fluorescencijski spektar 1% $\text{o-H}_3\text{PO}_4$



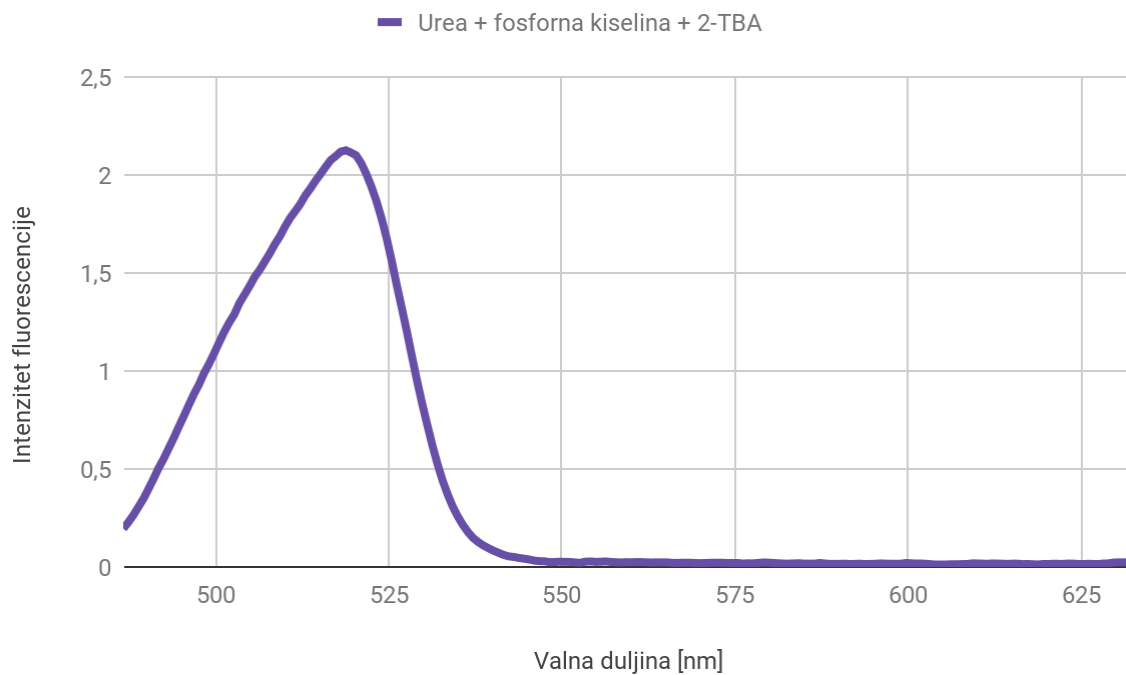
Prilog 2 - Fluorescencijski spektar 1% $\text{o-H}_3\text{PO}_4$ i 0,6% otopine 2-TBA



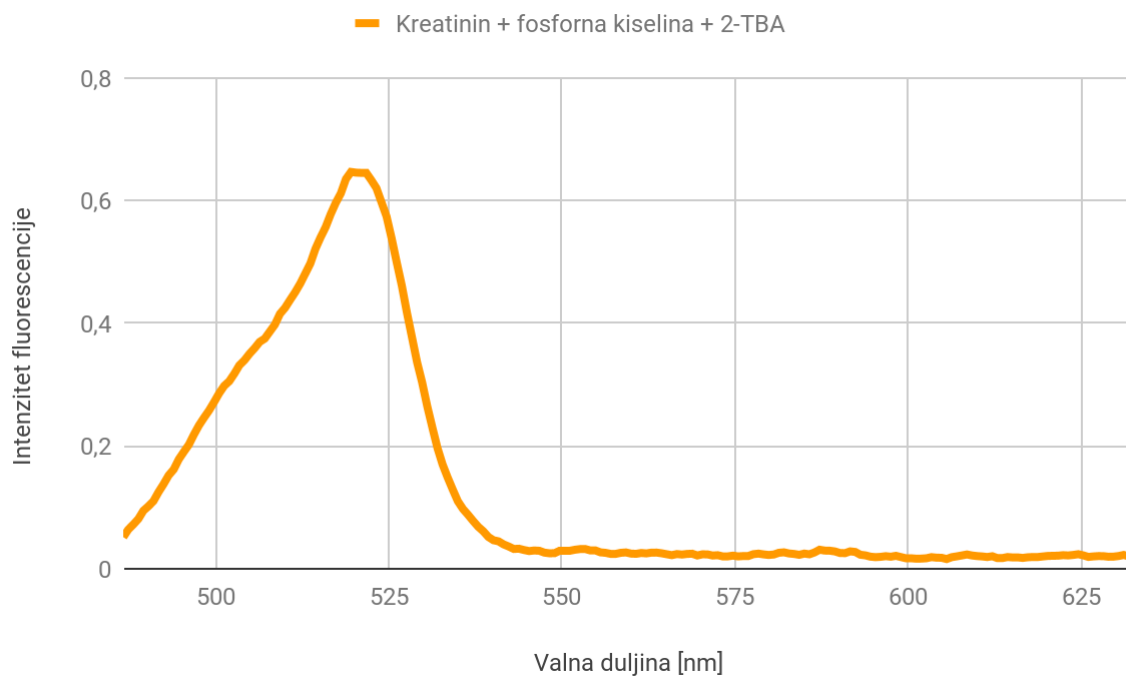
Prilog 3 - Fluorescencijski spektar 1% α -H₃PO₄ i 100 mmol/L otopine kreatinina



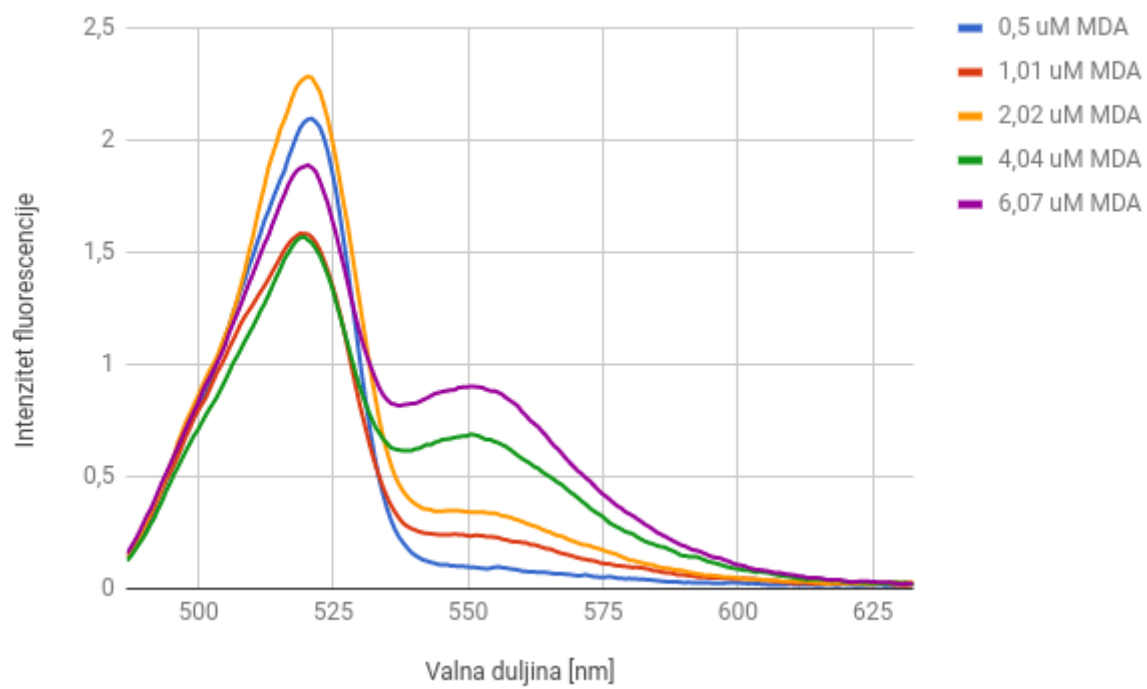
Prilog 4 - Fluorescencijski spektar 1% α -H₃PO₄ i 5 mmol/L otopine uree



Prilog 5 - Fluorescencijski spektar 1% α -H₃PO₄, 5 mmol/L otopine uree i 0,6% otopine 2-TBA



Prilog 6 – Fluorescencijski spektar 1% α -H₃PO₄, 100 mmol/L otopine kreatinina i 0,6% otopine 2-TBA



Prilog 7 – Fluorescencijski spektri standarda MDA u rasponu od 0.5 do 6.07 µmol/L

9.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Optimiziranje spektrofotometrijske metode za određivanje malondialdehida u urinu

Marko Nežić

SAŽETAK

Spektrofotometrija predstavlja jednu od osjetljivijih metoda s obzirom na mogućnost detekcije željenog spoja u smjesi bez prethodnog odjeljivanja. Malondialdehid (MDA) je stabilan produkt lipidne peroksidacije te je uzet za mjerenje razine oksidacijskog stresa u uzorcima humanog urina.

Metoda korištena u ovom radu za određivanje koncentracije MDA u urinu temelji se na reakciji MDA s dvije molekule 2-tiobarbituratne kiseline (2-TBA) pri visokoj temperaturi od 90°C i kiselim uvjetima koji su postignuti korištenjem 1% otopine o-H₃PO₄. Prije mjerenja ispitane su interferencije korištenjem kreatinina, uree, 2-TBA i o-H₃PO₄. Ispitivanja su napravljena na spektrofotometru OLIS RSM 1000F s ekscitacijom na $\lambda=515$ nm i detekcijom emisije na $\lambda=553$ nm. Ispitivanja interferencija nisu pokazala značajan signal ispitanih supstancija pri $\lambda=553$ nm. Za validaciju metode korišteni su standardi otopine MDA dobiveni razrjeđivanjem matične komercijalne otopine 1,1,3,3-tetraetoksipropana te su izrađeni standardi u rasponu od 0,5 do 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Validacijom u vodi dobiven je regresijski pravac $y=0,1723x+0,0298$ s $R^2=0,9975$. Ponovljivost u seriji za koncentraciju standarda 2,02 $\mu\text{mol/L}$ iznosila je 3,02%, dok je ponovljivost iz dana u dan bila 4,27%. Granica detekcije bila je na 0,078 $\mu\text{mol/L}$, a granica određivanja na 0,237 $\mu\text{mol/L}$. Kod validacije u urinu dobiven je regresijski pravac $y=0,135x+0,0061$ s $R^2=0,9901$. Ponovljivost u seriji za koncentraciju standarda 2,02 $\mu\text{mol/L}$ iznosila je 5,18%, dok je ponovljivost iz dana u dan bila 5,14%. Granica detekcije bila je na 0,248 $\mu\text{mol/L}$, a granica određivanja na 0,746 $\mu\text{mol/L}$.

Mjerenjem koncentracije MDA u urinu sedmorice zdravih dobrovoljaca i izračunom koncentracije pomoću kalibracijske krivulje dobivene su vrijednosti koncentracije MDA $1,41\pm0,59$ $\mu\text{mol/L}$. Kako bi se poništio utjecaj matriksa isti su uzorci izmjereni metodom standardne adicije poznate koncentracije MDA te su dobivene vrijednosti $1,01\pm0,17$ $\mu\text{mol/L}$. Dobivene vrijednosti validacije i rezultata mjerenja uzoraka upućuju na to kako su obje metode pouzdane za mjerenje koncentracije MDA u urinu, ali metoda standardom adicijom daje točnije vrijednosti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 18 grafičkih prikaza, 7 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Spktrofotometrija, lipidna peroksidacija, malondialdehid, standardna adicija, validacija

Mentor: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *izvanredni profesor, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Mirela Matić, *docent, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: veljača 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Analytical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development of the spectrofluorimetric method for determination of malondialdehyde in urine

Marko Nežić

SUMMARY

Spectrofluorometry is one of the more sensitive methods with the ability to detect the desired compound in a mixture without prior separation. Malondialdehyde (MDA) is a stable product of lipid peroxidation and is used to measure oxidative stress levels in human urine samples. The method used in this work to determine the MDA concentration in urine is based on the MDA reaction with two 2-thiobarbituric acid (2-TBA) molecules at high temperature of 90°C and acid conditions achieved using a 1% o-H₃PO₄ solution. Before measurement, interferences were investigated using creatinine, urea, 2-TBA and o-H₃PO₄. Tests were made on the spectrofluorimeter OLIS RSM 1000F with excitation at $\lambda = 515$ nm and detection of emission at $\lambda = 553$ nm. Interference tests did not demonstrate a significant signal of the tested substances at $\lambda = 553$ nm. Standard validation of the MDA solution obtained by diluting the commercial solution of 1,1,3,3-tetraethoxypropane was used to validate the method and to make standards ranging from 0,5 to 6,07 $\mu\text{mol/L}$. Validation in water gives the regression line $y = 0.1723x + 0.0298$ with $R^2 = 0.9975$. Repeatability for the 2,02 $\mu\text{mol/L}$ standard concentration range was 3,02%, and day-to-day repeatability was 4,27%. The detection limit was 0,078 $\mu\text{mol/L}$ and the limit of quantitation was at 0,237 $\mu\text{mol/L}$. After the validation in the urine a regression line was obtained $y = 0.135x + 0.0061$ with $R^2 = 0.9901$. Repeatability for the 2,02 $\mu\text{mol/L}$ standard concentration range was 5,18%, while the day-to-day repeatability was 5,14%. The detection limit was 0,248 $\mu\text{mol/L}$ and the limit of quantitation was at 0,746 $\mu\text{mol/L}$. Measuring the MDA concentration in the urine of seven healthy volunteers and calculating the concentration by means of the calibration curve, were obtained MDA concentrations of $1,41 \pm 0,59 \mu\text{mol/L}$. In order to overcome the impact of the matrix, the same samples were measured by the standard addition method adding a known concentration of MDA and the obtained values were $1,01 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$. The obtained values from validation and the measurement results of the samples indicate that both methods are reliable for measuring MDA concentration in urine, but the standard addition method gives more accurate values.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 18 figures, 7 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Spectrofluorimetry, lipid peroxidation, malondialdehyde, standard addition, validation

Mentor: **Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted February 2018.