

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEA PEČOVNIK

RAZVOJ METODE NA OSNOVI TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE
LOČLJIVOSTI ZA VREDNOTENJE AMINOKISLIN IN NEKATERIH PEPTIDOV, KI SO
DOVZETNI ZA OKSIDACIJO

DEVELOPMENT OF METHOD BASED ON HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY FOR EVALUATION OF CERTAIN AMINO ACIDS AND
PEPTIDES, WHICH ARE SUSCEPTIBLE TO OXIDIZE

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za vse nasvete in strokovno pomoč. Zahvala gre tudi družini, ki mi je omogočila študij in mi je tekom študija vedno stala ob strani. Hvala tudi vsem prijateljem za nepozabna študijska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Tea Pečovnik

Predsednik komisije:

izr. prof. dr. Janez Ilaš

Član komisije:

izr. prof. dr. Rok Dreu

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 AMINOKISLINE IN PEPTIDI	1
1.2 AMINOKISLINE V TERAPEVTSKE NAMENE	2
1.3 ANALIZA AMINOKISLIN	3
1.3.1 Smernice Evropske farmakopeje	4
1.3.2 Določevanje aminokislin z reakcijo derivatizacije po metodi HPLC	5
1.3.3 Tekočinska kromatografija	6
1.4 STABILNOST	9
1.4.1 Fizikalna in kemijska nestabilnost proteinov	10
1.4.2 Oksidativna nestabilnost aminokislin	11
1.4.3 Vrste stabilnostnih testov	12
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Reagenti in kemikalije	16
3.1.2 Referenčne spojine	16
3.1.3 Aparature	17
3.2 METODE	18
3.2.1 Razvoj in optimizacija metode	18
3.2.2 Končni kromatografski pogoji.....	21
3.2.3 Priprava vzorcev in raztopin za razvoj in optimizacijo metode	21

3.2.4	Validacija analizne metode.....	23
3.2.5	Stresna študija.....	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	29
4.1	RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA METODE.....	29
4.1.1	Izbira osnovnih kromatografskih pogojev.....	30
4.1.2	Dodatne spremembe kromatografskih pogojev.....	35
4.1.3	Izbira gradienta.....	36
4.2	VALIDACIJA METODE.....	39
4.2.1	Selektivnost.....	39
4.2.2	Linearnost.....	40
4.2.3	Ponovljivost in točnost.....	42
4.2.4	Meja zaznave in meja določitve.....	44
4.2.5	Stabilnost vzorcev.....	45
4.2.6	Rezultati validacije metode.....	45
4.3	REZULTATI STRESNE ŠTUDIJE.....	47
5	SKLEP.....	51
6	LITERATURA.....	52
	PRILOGE.....	55

POVZETEK

Namen magistrske naloge je bil razviti in optimizirati metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti za vrednotenje aminokislin, dipeptidov in tripeptida, ki so občutljivi na oksidacijo, ter potrditi njeno primernost za predvideno uporabo. V praksi se uporablja veliko metod za vrednotenje aminokislin, vendar večina metod temelji na derivatizaciji vzorca. Naš cilj je bil razviti neposredno analizno metodo, brez predhodne kemijske pretvorbe vzorca.

V razvoj metode smo vključili naslednje analite: cistein (Cys), histidin (His), tirozin (Tyr), metionin (Met), triptofan (Trp), *N*-acetil cistein (*N*-acetil Cys), alanin-histidin (Ala-His), glicin-metionin (Gly-Met), alanin-tirozin (Ala-Tyr), levcin-tirozin (Leu-Tyr) in glutation (GSH). Najprej smo izbrali osnovne kromatografske pogoje, s katerimi smo zadržali polarne analite na koloni. Zaradi nestabilnosti Cys smo v analizo vključili tudi njegov oksidacijski produkt cistin, ki je prav tako zelo polaren. Z ustrezno izbiro mobilne faze A (25 mM fosfatni puffer, pH 8,3) in stacionarne (Luna, 250 × 4,6 mm, 5 μm) faze smo dosegli uspešno selektivnost med analiti. Z izbiro ustreznega gradientnega programa z mobilno fazo B (acetonitril) smo skrajšali čas analize na 24 min. HPLC-analizno metodo smo validirali v skladu z Q2(R1) ICH smernico. Potrdili smo selektivnost metode, linearnost ($R^2 > 0,999$), ponovljivost (RSD < 5%), točnost (95%-105%), mejo zaznave in mejo določitve (od 10^{-3} do 10^{-1} mg/mL) in stabilnost (za Cys do 12h, za ostale analite vsaj 28h).

Uporabnost validirane HPLC-metode smo preverili s stresno študijo, ki smo jo izvajali v vodnem mediju pri temperaturah 25 °C in 40 °C ter medijih 0,1 M HCl; 0,1 M NaOH; 0,3 % H₂O₂ pri temperaturi 25 °C in izpostavljenosti UV svetlobi v vodnem mediju. Ob časovnih točkah 0, 4, 8, 16, 20 in 36 h smo z metodo HPLC vrednotili upad koncentracije posameznih analitov. Pri stresni študiji smo pri vseh pogojih analizirali vsak posamezen analit, zmes vseh analitov, zmes analitov, ki vsebujejo žveplo, in zmes analitov, ki vsebujejo aromatski obroč. S stresno študijo smo prišli do ugotovitev, da so na izvedene stresne pogoje najbolj občutljive aminokisliline z vsebujočo tiolno skupino, medtem ko so manj občutljive aminokisliline z aromatskim obročem. S stresnimi študijami smo prišli do sklepa, da so aminokisliline vezane v dipeptide bolj stabilne kot posamezne aminokisliline. Prav tako smo potrdili, da so aminokisliline v zmesih z ostalimi aminokislilinami bolj stabilne kot posamezno.

Ključne besede: aminokisliline, peptidi, razvoj metode HPLC, HPLC določanje aminokislin brez derivatizacije, stresna študija

ABSTRACT

The purpose of the master's thesis was to develop and optimize a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the evaluation of amino acids, dipeptides and a tripeptide susceptible to oxidation and to confirm its suitability for the intended use. In practice, many methods for the evaluation of amino acids are used, but most of the methods are based on the sample derivatization. Our goal was to develop a direct analytical method without any additional sample preparation.

The following analytes were included in the development of the HPLC-method: cystine, cysteine, glutathione, histidine, methionine, N-acetyl cysteine, tyrosine, tryptophan, alanine-tyrosine, leucine-tyrosine, glycine-methionine. Firstly, the basic chromatographic conditions were chosen to retain the polar analyte on the column. Due to unstable nature of cysteine, we also included its oxidation product cystine, which is also very polar. With the appropriate selection of mobile (25 mM phosphate buffer, adjusted to pH 8.3) and stationary (Luna, 250 × 4.6 mm, 5 μm) phase, we successfully achieved selectivity between the eleven analytes. By selecting the appropriate gradient program, we shortened the analysis time to 24 min. The HPLC-analytical method was validated in accordance with the Q2 (R1) ICH guidelines. We confirmed the selectivity of the method, the linearity ($R^2 > 0.999$), the repeatability (RSD < 5%), the accuracy (95% - 105%), the limits of detection and quantification (from 10^{-3} to 10^{-1} mg / mL) and stability (for cysteine until 12h, for other analytes at least 28h).

Stress study was carried out in aqueous medium at various temperatures (25 °C, 40 °C) and various media (0.1M HCl, 0.1M NaOH, 0.3% H₂O₂) at a temperature of 25 °C. At the sampling time points 0, 4, 8, 16, 20 and 36h, the decrease in the concentration of individual analytes was evaluated by the HPLC-method. In stress study, under each condition, each individual analyte, mixture of all analytes, a mixture of analytes containing the sulfur group and a mixture of analytes containing the aromatic ring were analyzed. We came to the conclusion that the most sensitive amino acids are containing a thiol group, while less sensitive are amino acids with an aromatic ring. We also found out that amino acids bound to dipeptides are more stable than individual amino acids. In addition, we confirmed that amino acids in mixtures with other amino acids are more stable than individual ones.

Key words: amino acids, peptides, development of HPLC methods, HPLC determination of amino acids without derivatization, stress study

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN: acetonitril

AQC: 6-aminokinolil-*N*-hidroksi sukcinimidil karbamat

DABS-Cl: (dimetilamino)azobenzen sulfonil klorid

Fmoc: 9-flourenilmetil kloroformiat

GC: plinska kromatografija

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ICH: Mednarodna konferenca o harmonizaciji

LOD: meja zaznave

LOQ: meja določitve

OPA: orto-ftalaldehid

OR: osnovna raztopina za umeritveno premico

PITC: 4-dimetilaminoazobenzen-4-sulfonil klorid, fenilizotiocianat

R²: determinacijski koeficient

RF-HPLC: reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

RSD: relativni standardni odklon

RV: relativna vlažnost

R_t: retencijski čas

SD: standardni odklon

stab: stabilnost

TFA: trifluoroocetna kislina

UV-VIS: ultravijolično in vidno območje

WHO: Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

1.1 AMINOKISLINE IN PEPTIDI

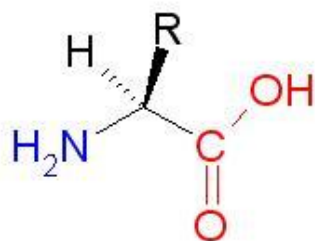
V naravi je bilo odkritih več kot 700 aminokislin, večina od njih je alfa-aminokislin. Njihov obstoj zagotavljajo bakterije, glive in alge, v katerih se aminokislina nahajajo v prosti obliki ali vezane v večjih molekulah. Dvajset aminokislin, ki se nahajajo v živih celicah, sodi v posebno kategorijo, so namreč nujno potrebne kot gradniki peptidov in proteinov. Aminokislina imajo pomembno vlogo v živih organizmih in izkazuje različne lastnosti: so osnovni gradniki beljakovin; uporabljajo se kot prekursorji mnogih biološko aktivnih molekul, kot so živčni prenašalci; služijo kot vir energije; nekatere delujejo kot regulatorji genske ekspresije in celične signalizacije, kar vpliva na več fizioloških procesov, ki so povezani z rastjo, vzdrževanjem, razmnoževanjem in imunostjo (1, 2).

Aminokislina so skupina organskih molekul, ki so sestavljene iz amino skupine ($-NH_2$), karboksilne skupine ($-COOH$) in stranske verige ($-R$ skupina). Vsaka molekula alfa-aminokislina vsebuje centralni ogljik, na katerega sta pritrjeni amino in karboksilna skupina, ter stransko verigo (slika 1) (3). Karboksilna skupina ima nizek pKa (okrog 2) in je zato pri fiziološkem pH 7 deprotonirana in negativno nabita skupina. Amino skupina ima visok pKa (9–10) in je pri fiziološkem pH protonirana in pozitivno nabita skupina. Stranska veriga se pri vsaki aminokislini razlikuje in določa edinstvenost 20 standardnih aminokislin v človeških proteinih, ki so predstavljene v preglednici I (2).

Preglednica I: 20 standardnih aminokislin, ki tvorijo genetski kod človeka(2).

Aminokislina	Okrajšava	
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Aspargin	Asn	N
Asparginska kislina	Asp	D
Cistein	Cys	C
Glutaminska kislina	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
Izolevcin	Ile	I

Aminokislina	Okrajšava	
Levcin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V



Slika 1: Aminokislina so skupina organskih molekul, ki so sestavljene iz centralnega ogljika, amino skupine, karboksilne skupine in stranske verige.

Aminokislina so sestavljene iz ogljika, vodika, kisika in dušika, pri aminokislinah z žveplovim atomom pa kisik v stranski verigi nadomesti žveplo. Žveplo in kisik sodita v šesto skupino periodnega sistema. Ena izmed njunih pomembnih razlik je manjša elektronegativnost žvepla. Pri Met pomeni zamenjava kisika z žveplom manj hidrofobno aminokislino. Cys zlahka tvori disulfidne vezi in se enostavno disociira v tiolni anion, na drugi strani pa Ser, ki se od Cys razlikuje samo v nadomestitvi žvepla s kisikom, ne tvori zlahka dioksida. To razliko pojasni dejstvo, da so tioli močnejše kisline kot alkoholi (4, 5).

1.2 AMINOKISLINE V TERAPEVTSKE NAMENE

Aminokislina so velika skupina organskih spojin in predstavljajo končni produkt hidrolize proteinov. Aminokislina so sestavni del proteinov v človeškem telesu. Deset aminokislin je esencialnih in so nujno potrebne za človeško telo: Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp in Val (6).

Arg in His se sintetizirata v telesu, vendar je Arg kljub temu potreben v prehrani mladih ljudi, ki so v obdobju rasti. Prav tako je potreben vnos His s hrano pri otrocih, starejših ljudeh in ljudeh z degenerativnimi obolenji (7). Z ustrezno aminokislinsko terapijo se lahko izboljša stanje različnih bolezni: depresijo, nespečnost, okužbe s herpesom, težave s telesno maso, epilepsijo in še druge. Z uporabo aminokislin v terapiji se izboljšajo nekatere fiziološke funkcije, kot so razstrupljanje težkih kovin, odstranjevanje radikalov in izboljšana mentalna funkcija preko stimulacije živčnih prenašalcev. Pri bolezenskih stanjih, ki so posledica napak presnove aminokislin, ima pomembno vlogo tudi povezava aminokislin z beljakovinami (6).

Najpomembnejše aminokisliline z aromatskim obročem so Phe, Tyr in Trp. Te spojine so izredno pomembne za normalno delovanje možganov, v patofiziologiji različnih bolezenskih stanj in odzivih možganov na različna bolezenska stanja. Kot ostale aminokisliline, prisotne v hrani, tudi aromatske aminokisliline krožijo po krvi in preidejo v možgane, kjer se vključijo v peptide ali proteine (8).

Phe je esencialna aminokislina, ki služi kot prekursor v biosintezi ostalih aminokislin, vključno s Tyr. Ima veliko vlogo pri sintezi pomembnejših živčnih prenašalcev: levodope, dopamina, adrenalina, noradrenalina, tiroksina in melanina. Terapevtsko je Phe poznan po antidepresivnem delovanju in analgetičnih učinkih (9).

Tyr je neesencialna aminokislina s polarno stransko skupino in v telesu sodeluje pri procesih signalizacije. V možganskih celicah je prekursor živčnih prenašalcev: dopamina, noradrenalina in adrenalina. Ti živčni prenašalci so pomemben del simpatičnega živčnega sistema, njihova koncentracija v telesu in možganih pa je odvisna od koncentracije Tyr (10).

Trp deluje kot antidepresiv in narkotik. Fiziološki učinek Trp povzročita njegova metabolita, živčna prenašalca serotonin in epifizni hormon melatonin (11). Trp je esencialna aminokislina in prekursor vitamina niacina, zato se uporablja tudi kot dodatek v prehrani (9). Pomanjkanje Trp v telesu vodi do bolezni pelagre, zato je aminokislina triptofan pomembna pri uravnoteženi prehrani (11).

1.3 ANALIZA AMINOKISLIN

Razvoj analiznih metod je bistvenega pomena za ugotavljanje aminokislin v bioloških vzorcih, saj pomagajo izvajalcu ugotoviti potrebe pacienta. Področje tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) se vse bolj razvija in omogoča izvajanje testov, ki ovrednotijo nivo aminokislin v proteinskih vzorcih. Aminokisliline imajo pomembno vlogo pri strukturi in funkciji telesa, pri homeostazi ter pri obvladovanju bolezenskega stanja. Zdrav organizem mora imeti na voljo pravilno razmerje aminokislin. Če je razmerje specifičnih aminokislin neustrezno, je moten proces sinteze proteinov. S primerno HPLC analizo metodo lahko kvantitativno ocenimo posameznikov aminokislinski profil. Ti profili omogočajo predvidevanje zdravstvenih težav, ki jih lahko s takojšnjim ukrepanjem preprečimo. Spremljanje aminokislin, ki vsebujejo žveplo, je pomembno v prehranskih in biokemijskih raziskavah, pri farmakodinamskih študijah ali pri diagnostiki nekaterih

bolezni (12). Zaradi teh razlogov obstaja vse večji interes za izboljšanje kromatografskih metod za določevanje aminokislin z žveplom in glutationa (GSH) v bioloških vzorcih ter za določevanje aminokislinskih profilov v hrani (13).

Aminokislinska analiza se uporablja na več področjih:

- pri kvantifikaciji in identifikaciji peptidov oziroma proteinov;
- v medicini: za določevanje nivoja aminokislin v fizioloških tekočinah in tkivih;
- v farmacevtski industriji: za analizo farmacevtskih izdelkov;
- v biotehnologiji: za spremljanje biosinteze peptidov;
- v živilski industriji: za analizo prehranskih proizvodov (12).

1.3.1 Smernice Evropske farmakopeje

Pred analizo aminokislinske sestave je potrebno proteine hidrolizirati na posamezne aminokisliline. Najpogostejša metoda je kislinska hidroliza proteina. Kislinska hidroliza lahko prispeva k različni variaciji analize, zaradi popolnega ali delnega razpada več aminokislin: Trp popolnoma razpade; Ser in Thr delno razpadeta; Met je lahko podvržen oksidaciji; Cys pa se pretvori v cistin (14). Evropska farmakopeja predpisuje enajst metod, ki omogočajo aminokislinsko analizo proteinov in so predstavljene v preglednici II.

Preglednica II: Enajst metod, ki omogočajo aminokislinsko analizo proteinov, predpisanih s strani Evropske Farmakopeje (14).

Metoda 1	Kislinska hidroliza z uporabo klorovodikove kisline, ki vsebuje fenol; je najpogostejši postopek za proteinsko/peptidno hidrolizo
Metoda 2	Oksidacija Trp s hidrolizo ob uporabi merkaptotansulfonske kisline
Metoda 3	Oksidacija Trp z uporabo tioglikolne kisline
Metoda 4	Oksidacija cistina in Cys z ogljikovo kislino
Metoda 5	Oksidacija cistina in Cys v tekoči fazi z natrijevim azidom
Metoda 6	Oksidacija cistina in Cys z dimetilsulfoksidom
Metoda 7	Redukcijo cistina in Cys izvedemo z reakcijo piridil metiliranja s parno fazo
Metoda 8	Redukcijo cistina in Cys izvedemo z reakcijo piridil metiliranja s tekočo fazo
Metoda 9	Redukcijo cistina in Cys izvedemo z reakcijo karboksil metiliranja s tekočo fazo
Metoda 10	Cistin in Cys reagirata z ditioglikolno kislino ali ditiopropionsko kislino
Metoda 11	Asn in Gln se z hidrolizo pretvorita v Asp in Glu

Obstaja velika izbira aminokislinskih analiz, ki pa se uporabijo glede na njihovo občutljivost pri določanju vsebnosti. Pri približno polovici aminokislinskih analiz se uporablja ionsko-izmenjevalna kromatografija s po-kolonsko derivatizacijo. Po-kolonska derivatizacija se uporablja na vzorcih, ki vsebujejo majhne količine pufrskih komponent. Ostale aminokislinske tehnike običajno temeljijo na pred-kolonski derivatizaciji prostih aminokislin in reverzno fazni HPLC (RF-HPLC) (14).

Za kvantitativno aminokislinsko analizo se lahko uporabijo naslednje metode:

- po-kolonska derivatizacija z ninhidrinom;
- po-kolonska derivatizacija z oftaldefidom (OPA);
- pred-kolonska derivatizacija z fenilizotiocianatom (PITC);
- pred-kolonska derivatizacija z 6-aminokinolil-*N*-hidroksi sukcinimidil karbamatom;
- pred-kolonska derivatizacija z OPA;
- pred-kolonska derivatizacija z (dimetilamino)azobenzensulfonil kloridom (DABS-Cl);
- pred-kolonska derivatizacija z 9-flourenilmetil kloroformiatom (FMOC-Cl);
- pred-kolonska derivatizacija z 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazolom (NBD-F) (14).

1.3.2 Določevanje aminokislin z reakcijo derivatizacije in HPLC

Reakcija derivatizacije je najpogosteje uporabljena tehnika v analizi aminokislin (13). Z reakcijo derivatizacije se izboljša občutljivost spojine na detektor oziroma se zmanjša polarost ter tako podaljša retencijski čas (R_t) (15). Aminokislina se derivatizirajo bodisi pred bodisi po ločitvi na koloni (16). Derivatizacija pred kolono se izvede preden se aminokislina injicirajo, nato se na koloni reakcijski produkti ločijo in detektirajo. Pri metodi derivatizacije po koloni se aminokislina ločijo na koloni, nato poteče derivatizacija in na detektorju se spojine detektirajo (17). Lastnosti reakcije derivatizacije so predstavljene v preglednici III.

Derivatizacijski reagent se ovrednoti glede na naslednje vidike: sposoben mora biti reagirati s primarno in sekundarno amino skupino, reakcija mora biti kvantitativna in ponovljiva, posamezna aminokislina mora tvoriti en derivat, pogoji reakcije morajo biti

blagi in preprosti, derivatizacijski produkti morajo biti stabilni (15). Najpogostejši derivatizacijski reagenti so: ninhidrin, orto-ftaldehid, 9-flourenilmetil kloroformiat, 4-dimetilaminoazobenzen-4-sulfonil klorid, fenilizotiocianat, 6-aminokinilil-N-hidroksi sukcinimidil karbamat (AQC) (17).

Preglednica III: Prednosti in slabosti derivatizacije pred in po koloni (18).

	Prednosti	Slabosti
Derivatizacija pred kolono	<ul style="list-style-type: none"> - porabi se manj reagenta; - poenostavlja konfiguracijo instrumentov; - omogoča povečanje občutljivosti; - široka razpoložljivost reagentov (omogoča izbiro reagenta, ki najbolje ustreza tipu detektorja); - omogoča uporabo RF-HPLC 	<ul style="list-style-type: none"> - na učinkovitost reakcije vpliva matrika vzorca; - reakcijski produkti so pogosto nestabilni in lahko vplivajo na rezultate kvantifikacije
Derivatizacija po koloni	<ul style="list-style-type: none"> - reakcije lahko avtomatiziramo; - sposobnost kvantifikacije in obnovljivost; - ker so komponente vzorca ločene na koloni pred reakcijo, matrika vzorca ne vpliva na reakcijo z derivatizirajočim reagentom 	<ul style="list-style-type: none"> - ni primerno za visoko občutljivo analizo; - relativno visoka poraba reagenta; - uporablja se lahko omejena vrsta reagentov za derivatizacijo; - ne moremo uporabiti RF-HPLC

1.3.3 Tekočinska kromatografija

Razvoj moderne tekočinske kromatografije sega v leto 1903, ko je ruski botanik Mihail Cvet uporabil steklene kolone, napolnjene s trdimi delci, za ločevanje barvil ekstrahiranih iz rastlin (19, 20). V vertikalno postavljene kolone, v katere je najprej dodal ekstrahirana barvila, je kontinuirano dodajal topilo. Barvila so se različno adsorbirala na trdne delce in na koloni so se pojavili barvni obroči. Posamezni barvni obroč je predstavljal drugo barvilo iz rastline. Zaradi omenjenega poskusa je nastal izraz *chromatography* (*chroma* = barvilo, *graphy* = pisati, i. e. pisanje v barvah) (19, 21).

Cvet je adsorpcijski proces v koloni razložil tako, da imajo molekule različno afiniteto (interakcije) z adsorpcijsko površino. Analiti s šibkimi interakcijami se na koloni zadržijo krajši čas in obratno (22). V moderni tekočinski kromatografiji še vedno drži njegova trditev, da je ločevanje analitov odvisno od različne afinitete analitov do stacionarne faze. Tekočinska kromatografija je način, s katerim dosežemo ločbo zmesi različnih komponent, tako da se porazdelijo med dve fazi, stacionarno in mobilno. Stacionarna faza je lahko porazdeljena na ravnem nosilcu (planarna kromatografija) ali v koloni (kolonska kromatografija), mobilna faza pa je primeren tekoč medij. Ločitvene tehnike se delijo na porazdelitveno, normalno in reverzno fazno, ionsko-izmenjevalno, gelsko in adsorpcijsko (20).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

V farmacevtski industriji je na razpolago veliko metod za analiziranje farmacevtskih spojin, ena izmed najpomembnejših je metoda HPLC. HPLC se v farmacevtski industriji uporablja za določevanje čistote novih učinkovin, spremljanje sprememb v sinteznih procesih, medprocesnem testiranju razvoja novih učinkovin, razvoju farmacevtskega izdelka in predvsem kontroli kakovosti končnega izdelka (23). Cilj HPLC analize je ločiti analite od ostalih komponent v vzorcu in jih ustrezno kvantificirati.

Da lahko to dosežemo, morajo biti izpolnjeni določeni pogoji:

1. Vzorec mora biti topen.

S HPLC metodo lahko analiziramo samo raztopine. Največ težav pri določanju vsebnosti povzročajo slabo topne zdravilne učinkovine in formulacije s kontroliranim sproščanjem učinkovine.

2. Analiti se morajo zadržati na koloni in se diferencialno premikati znotraj kolone. Analiti morajo za ločitev komponent interagirati s stacionarno fazo.

3. Mobilna faza kontrolira ločbo analitov.

Medtem ko stacionarna faza zagotavlja zadrževanje na koloni in vpliva na mehanizem ločbe, mobilna faza kontrolira celotno ločitev. Razvoj metode se posveča predvsem izboru mobilne faze, ki na primerni stacionarni fazi zagotavlja ustrezno ločitev kromatografskih vrhov.

4. Raztopina vzorca je pripravljena v ustreznem topilu.

Če lastnosti analita dopuščajo, je zaželeno, da je vzorec raztopljen v mobilni fazi ali topilu, ki je šibkejši kot mobilna faza. Pri uporabi močnejših topil se velikokrat

pojavijo težave, kot sta cepljenje in nesimetričnost kromatografskih vrhov. V primeru, da se močnemu toplu ne moremo izogniti, je priporočljiv manjši volumen injiciranja (5–10 μL) (21, 24).

HPLC instrument

HPLC instrument je sestavljen iz spodaj opisanih delov:

- Vsebnik za mobilno fazo

HPLC sistem mora imeti vedno dovolj mobilne faze za stalen potek analize (21). Mobilna faza mora biti, preden doseže kolono, filtrirana in razplinjena. Razplinjenje mobilne faze je potrebno predvsem zaradi raztopljenih plinov, kot sta kisik in dušik, ki pridejo v detektorsko celico in povzročijo neenakomerno bazno linijo in popačene odzive topila (19).

- Črpalka

Črpalka zagotavlja konstanten pretok mobilne faze skozi sistem. Moderne črpalke so sposobne kontrolirati mešanje različnih mobilnih faz iz različnih zbiralnikov (21). Črpalke so lahko binarne, terciarne in kvarterne (19).

- Injektor

Injektor injicira mešanico analitov v mobilno fazo, preden ta vstopi v kolono. Večina modernih injektorjev je avtomatskih vzorčevalnikov, kar omogoča programirano injiciranje različnih volumnov vzorca iz vial (21).

- Kolona

Kolona je najpomembnejši del HPLC sistema, na njej namreč poteka ločitev analitov. Obstaja veliko različnih vrst kolon. Najpomembnejše karakteristike kolone so: tip (monolitna, porozna, neporozna), geometrija (površina, volumen por, premer por, velikost in oblika delcev), površinska kemija (tip vezanih ligandov) in tip osnovnega materiala kolone (silicij, polimeri) (21). Standardni premeri kolon so 1–5 mm, dolžina 3–30 cm in velikost delcev 1–10 μm (19).

- Detektor

Vloga detektorjev je zaznava analitov, ki se ločujejo na kromatografski koloni. Najbolj pogost detektor v farmacevtski industriji je ultravijolični detektor (UV-VIS detektor), ki

omogoča zaznavo analitov pri izbrani valovni dolžini oziroma večjem razponu valovnih dolžin (21).

- Program za pridobivanje podatkov in nadzorni sistem

Računalniški sistem kontrolira parametre HPLC sistema (mešanje mobilnih faz, temperaturo, sekvenco injiciranja) in omogoča zbiranje in obdelavo podatkov, pridobljenih iz detektorja (21, 25). Rezultat pridobljenih podatkov je kromatogram, ki predstavlja kromatografski odziv analita (y-os) v odvisnosti od časa (x-os) (20).

1.4 STABILNOST

Stabilnost je pomemben parameter vseh farmacevtskih izdelkov, zato so stabilnostni testi kritična komponenta tekom razvoja zdravila. Namen testiranja stabilnosti je pridobiti informacije o tem, kako se kakovost zdravilne učinkovine oziroma zdravila s časom spreminja pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov. S stabilnostnimi testi določimo rok uporabnosti zdravila in priporočene pogoje shranjevanja. Nestabilnost lahko vodi do kemijske razgradnje in zmanjšanja učinkovitosti zdravila ali pa se tvori nova kemijska spojina, ki ima lahko potencialne toksične neželene učinke. S stabilnostnimi testi dobimo informacije o spremembi kakovosti produkta skozi čas in pod vplivom različnih dejavnikov, kot so temperatura, vlažnost in svetloba (26).

Sprememba kakovosti izdelka se lahko odraža kot:

- sprememba vsebnosti učinkovine, kar lahko povzroči spremembo učinkovitosti zdravila. Vsebnost učinkovine je eden izmed osnovnih parametrov pri spremljanju stabilnosti farmacevtskega produkta;
- nastanek nečistot in razpadnih produktov, ki lahko zmanjšajo varnost končnega izdelka;
- sprememba biofarmacevtskih parametrov in s tem sprememba učinkovitosti zdravila;
- sprememba v fizikalnih, kemijskih, bioloških in mikrobioloških lastnostih (26).

Za določitev kakovosti zdravilne učinkovine ali zdravila je treba s pomočjo analitskih postopkov postaviti specifikacije zdravilne učinkovine ali zdravila, ki vključujejo fizikalne, kemijske, biološke in mikrobiološke lastnosti (27).

Stabilnost učinkovin ima pomemben vpliv na številnih področjih:

- razvoj analizne metode;
- razvoj formulacije in izbor ovojnine;
- izbira ustreznih pogojev shranjevanja in določitev roka uporabnosti;
- toksikološke lastnosti;
- izbor soli in polimorfne oblike;
- proizvodnih parametrov;
- študij absorpcije, porazdelitve, metabolizma in izločanja (ADME);
- vpliv na okolje (28).

1.4.1 Fizikalna in kemijska nestabilnost proteinov

Fizikalne spremembe so posledica sprememb v fizikalnih stanjih, namreč metastabilne oblike imajo težnjo po pretvorbi v termodinamično najugodnejšo obliko. Izguba konformacije pri proteinih poruši ravnotežne vezi v molekuli, kar povzroči zmanjšanje ali celo izgubo biološke aktivnosti (denaturacija). Sprememba konformacije proteina se lahko pojavijo kot posledica sprememb v strukturi ali zaradi izpostavitve zunanjim stresnim dejavnikom, kot so sprememba temperature, sprememba pH, dodatek organskega topila, mehanske sile in kovinski ioni. Te spremembe se na farmacevtskem produktu odražajo kot sprememba organoleptičnih lastnosti, vplivajo tudi na topnost, hitrost raztapljanja. Organoleptične spremembe so velikokrat posledica kemijskih sprememb. Fizikalno-kemijske spremembe so medsebojno odvisne (29, 30).

Kemijska nestabilnost zdravil je posledica spremembe zdravilne učinkovine s kemijsko reakcijo, ki se kaže kot izguba učinkovitosti zdravila. Razlogi, zakaj je treba poznati kemijsko nestabilnost učinkovin in pomožnih snovi, so naslednji: komponente zdravila se lahko pretvorijo v toksične produkte, zato je pomembno, da se zdravilna učinkovina kvantitativno ovrednoti in se identificira razpadne produkte. Nestabilnost lahko povzroči spremembo organoleptičnih lastnosti zdravila. Pri zdravilih za peroralno uporabo mora biti poleg formulacijske stabilnosti dokazana tudi stabilnost pri pH pogojih v gastrointestinalnem traktu (29). Pri proteinih pomeni kemijska nestabilnost spremembo primarne strukture proteina, tj. aminokislinskega zaporedja, zaradi tvorbe ali cepitve kovalentne vezi. Osnovne aminokisliline imajo različne molekulske strukture in so podvržene različnim kemijskim reakcijam, ki so predstavljene v preglednici IV.

Najpogostejše razgradne poti so: hidroliza, deamidacija, racemizacija, oksidacija, fotodegradacija in interakcije s pomožnimi snovmi in drugimi zdravilnimi učinkovinami (29, 30).

Preglednica IV: Aminokislina in njihove razgradne poti (29).

Aminokislina	Razgradna pot
Ala	Relativno stabilen
Arg	Relativno stabilen
Asn	Deamidacija, racemizacija, izomerizacija
Asp	Hidroliza, racemizacija, izomerizacija
Cys	Oksidacija, β -eliminacija, disulfidna izmenjava, racemizacija
Glu	Relativno stabilna
Gln	Deamidacija, racemizacija, izomerizacija
Gly	N-terminalna lokacija pospešuje tvorbo diketopiperazina
His	Oksidacija
Ile	Relativno stabilen
Leu	Relativno stabilen
Lys	Relativno stabilen
Met	Oksidacija
Phe	Relativno stabilen
Pro	N-terminalna lokacija pospešuje tvorbo diketopiperazina
Ser	β -eliminacija, racemizacija
Thr	β -eliminacija, racemizacija
Trp	Oksidacija
Tyr	Oksidacija
Val	Relativno stabilen

1.4.2 Oksidativna nestabilnost aminokislin

Oksidacija je ena izmed glavnih razgradnih poti učinkovin peptidnega in proteinskega izvora. Najbolj dovzetne osnovne aminokislina za oksidacijo so: Met in Cys (zaradi vsebujočega žvepla) ter His, Trp in Tyr (zaradi vsebujočega aromatskega obroča). Te aminokislina so nagnjene k oksidaciji zaradi stranske verige z veliko elektronsko gostoto (31). Najpogostejši produkti oksidacije petih osnovnih aminokislin oz. njihovih aminokislinskih ostankov v proteinih so predstavljeni v preglednici V.

Preglednica V: Produkti oksidacije aminokislin, ki so podvržene oksidaciji (32).

Aminokislina	Produkt oksidacije
Met	Met-sulfoksid
Cys	-S-S-disulfid, sulfenska/sulfinska/sulfonska kislina
His	2-oksohistidin, aspartat/asparagin
Trp	N-formilkinurenin, kinurenin
Tyr	di-tirozin, 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA)

Oksidacijo omenjenih aminokislin v proteinih lahko sprožijo različni dejavniki: prisotnost kisika, peroksidov, radikalov, kovinskih ionov ali svetlobe.

Oksidacije pogosto katalizirajo kovinski ioni, predvsem ioni prehodnih elementov. Prehodni elementi omogočajo odcep elektrona iz molekule in s tem nastanek radikala, ki mora biti relativno stabilen, da lahko potekajo reakcije oksidacije (29). Nastali radikali reagirajo s kisikom ali neposredno s stransko verigo določenega aminokislinskega ostanka (npr. s tiolno skupino Cys), da nastane radikal, ki kasneje vodi v različne produkte oksidacije (32). Nekateri izmed elementov (kalcij, cink, kobalt) pa lahko v ozkem koncentracijskem območju tudi stabilizirajo proteine (31).

Pri oksidacijah povzročenih s prisotnostjo kisika oz. oksidantov ima glavno vlogo prostorska porazdelitev aminokislinskih stranskih verig, ki so izpostavljene na površini ali skrite v notranjosti proteina. Aminokislinski ostanki na površini proteina so dovzetnejši za oksidacijo, saj lažje pridejo v stik z oksidantom (32).

Pogost vzrok nestabilnosti aminokislin je izpostavljenost svetlobi, kar lahko povzroči oksidacijo fotolabilnih aminokislin: Trp, Tyr, Phe in Cys. Razgradnja se začne z absorpcijo fotona, kar povzroči prehod elektrona v vzbujeno stanje in vodi v neposredno cepitev molekule ali v posredno oksidacijo preko kisika (31).

Oksidacija proteinov se lahko pojavi tudi spontano na zraku, takrat govorimo o avtooksidaciji. Vendar je ta reakcija zelo počasna in jo lahko pospeši le prisotnost katalizatorja (svetloba ali kovinski ioni) (32).

1.4.3 Vrste stabilnostnih testov

Na splošno je potrebno zdravilno učinkovino ali zdravilo oceniti pri pogojih shranjevanja, s katerimi testiramo termično stabilnost in občutljivost na vlago. Pogoji shranjevanja in dolžina izbranih študij stabilnosti morajo biti primerni za kritje skladiščenja, pošiljanja in uporabe zdravila (33).

FDA in ICH smernice navajajo zahtevo o podatkih stabilnostnih študij, da bi razumeli, kako se kakovost zdravilne učinkovine in zdravila spremeni s časom, pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov (33). Stabilnostne teste glede na ICH smernice razdelimo v naslednje kategorije: dolgoročno, pospešeno, vmesno pospešeno in stresno testiranje (34).

Študije dolgoročne stabilnosti so študije, pri katerih se farmacevtski izdelki shranjujejo na predpisanih pogojih, z namenom določitve in kasnejšega potrjevanja in podaljševanja roka uporabnosti zdravila. Pogoji predpisani za dolgoročne študije stabilnosti so 25°C/60% relativna vlažnost (RV) ali 30°C/65%RV (34).

Študije pospešene stabilnosti izvedemo pri ostrejših pogojih (40°C/70%RV) z namenom pospešitve fizikalno-kemijskih sprememb v farmacevtskem izdelku. Podatki iz pospešenega testiranja se lahko uporabijo za ovrednotenje učinka kratkotrajnih odstopanj pogojev shranjevanja, kot se lahko pojavijo npr. med prevozom zdravila. Rezultati dolgoročne in pospešene stabilnosti so del registracijske dokumentacije in jih uporabljamo za predvidevanje potencialnih sprememb farmacevtske oblike (34).

Študije vmesne pospešene stabilnosti so prav tako načrtovane z namenom pospešitve fizikalno-kemijskih sprememb, vendar za izdelke, ki imajo na pogojih pospešene stabilnosti neustrezno stabilnost. Predpisani pogoji za vmesne pospešene študije stabilnosti so 30°C/65%RV (34).

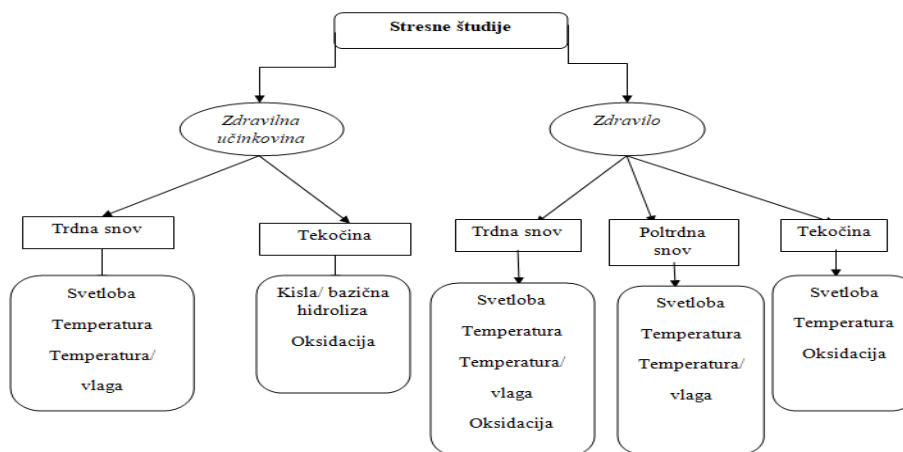
Študije stresne stabilnosti omogočajo dokazovanje kemijskih sprememb molekule, ki pomagajo pri razvoju formulacije in pakiranja. Smernica ICH navaja, da so stresni testi namenjeni prepoznavanju razpadnih produktov, ki dodatno pomagajo pri določanju stabilnosti molekule učinkovine in določanju razpadnih poti. ICH smernice za stresne teste so zelo splošne in ne predpisujejo podrobnosti o praktičnem pristopu stresnih testov (34). Farmacevtska industrija in raziskovalne organizacije so postavila svoje lastne pristope za izvedbo stresnih študij, ki pa so dokaj podobni. Priporočena testiranja za zdravilno učinkovino ali zdravilo v različnih fizikalnih stanjih so predstavljena na sliki 2. Minimalni dejavniki, ki jih je potrebno upoštevati pri stresnih študijah so kislinsko/bazična hidroliza, povišana temperatura, fotoliza in oksidacija (32).

Hidroliza je pogosta kemijska reakcija, ki poteka v širokem pH območju. Izbira tipa in koncentracije kisline ali baze je odvisna od stabilnosti zdravilne učinkovine. Najpogosteje uporabljeni kislini sta klorovodikova kislina in žveplova kislina v koncentracijskem območju 0,1-1 M. Najpogosteje uporabljeni bazi sta natrijev ali kalijev hidroksid v koncentracijskem območju 0,1-1 M (32).

Stresni pogoji priporočeni za termično razgradnjo farmacevtskega izdelka so predstavljeni v ICH smernici Q1A. Priporočena povišana temperatura je v območju 40-80°C (34).

V ICH smernici Q1B so napisani pogoji za fotostabilnostno testiranje. Trdni/tekoči vzorci naj bi bili izpostavljeni svetlobi najmanj $1,2 \times 10^6$ lx h in 200 W h/m^2 in največ 6×10^6 lx h. Uporabljena valovna dolžina je v območju 300-800 nm (35).

Najpogosteje uporabljeni oksidant je vodikov peroksid (H_2O_2), poleg tega se kot oksidacijska sredstva uporabljajo tudi kovinski ioni, radikalski iniciatorji in kisik. Priporočena koncentracija H_2O_2 je 0,1-3% (33, 36, 37).



Slika 2: Shema stresnih pogojev za zdravilno učinkovino in zdravilo v različnih fizikalnih stanjih (povzeto po (33)).

Namen stresnega testiranja (tudi za pripravo vzorcev za razvoj stabilnostno indikativne analize metode) (33):

- za določitev razpadnih poti zdravilnih učinkovin;
- za razlikovanje razpadnih produktov, ki so povezani z razpadom zdravilne učinkovine od tistih, ki so nastali zaradi pomožnih snovi v zdravilu;
- za ugotovitev strukture razpadnih produktov;
- za ugotavljanje intrinzične stabilnosti zdravilne učinkovine znotraj formulacije;
- za odkrivanje razpadnih mehanizmov kot so hidroliza, oksidacija, termoliza in fotoliza zdravilne učinkovine in zdravila;
- za vzpostavitev stabilnostno indikativne metode;
- za razumevanje kemijskih lastnosti molekul;
- za pripravo stabilne formulacije;
- za pridobitev profila nečistot, ki je potreben pri formalni študiji pri ICH pogojih;
- za reševanje problemov povezanih s stabilnostjo učinkovine/izdelka (33).

2 NAMEN DELA

V sklopu magistrske naloge bomo razvili in validirali metodo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti za vrednotenje aminokislin in nekaterih peptidov, ki so dovzetni za oksidacijo: Cys, His, GSH (glutation; tripeptid, ki vsebuje Cys), Ala-His, Met, *N*-acetil Cys, Tyr, Gly-Met, Ala-Tyr, Trp, Leu-Tyr. Uporabnost validirane metode bomo nato preverili s stresnimi študijami. Magistrska naloga bo potekala po spodaj naštetih korakih:

1. Razvili in optimizirali bomo neposredno metodo HPLC z UV-VIS detekcijo (brez derivatizacije) za vrednotenje oksidativnih aminokislin, dipeptidov in tripeptida.
2. V skladu z ICH-smernicami bomo ovrednotili HPLC-metodo z uporabo naslednjih parametrov: selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, meja zaznave in meja določitve ter stabilnost.
3. Za posamezne aminokisliline, dipeptide in tripeptid ter različne zmesi (zmes vseh analitov; zmes analitov, ki vsebujejo žveplo; zmes analitov, ki vsebujejo aromatski obroč) bomo izvedli stresne študije. Pogoji, katerim bodo raztopine izpostavljene, so:
 - temperatura: 25 in 40 °C;
 - mediji: 0,1 M HCl; 0,1 M NaOH; 0,3 % H₂O₂;
 - svetloba: dnevna UV-svetloba.

Raztopine bomo z validirano metodo HPLC analizirali ob časovnih točkah: 0, 4, 8, 16, 20, 36 h. S temi podatki bomo ugotovili stabilnost posameznih aminokislin pri različnih pogojih, primerjali stabilnost posameznih aminokislin z njihovimi dipeptidi/tripeptidom in določili občutljivost analitov na izpostavljene pogoje.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in kemikalije

- Acetonitril (ACN), C_2H_2N , $M = 41,05 \text{ g/mol}$, HPLC grade (J. T. Baker, USA)
- Citronska kislina, $C_6H_8O_7$, $M = 192,12 \text{ g/mol}$, (Merck, Nemčija)
- Fosforjeva (V) kislina, H_3PO_4 , $M = 98,00 \text{ g/mol}$, 85 %, (Merck, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , $M = 136,08 \text{ g/mol}$, $\geq 99,5 \%$ (Merck, Nemčija)
- MiliQ voda, Fakulteta za farmacijo
- 1 M natrijev hidroksid, pripravljen iz Titrisol[®] (Merck, Nemčija)
- 1 M klorovodikova kislina, pripravljena iz Titrisol[®] (Merck, Nemčija)
- Vodikov peroksid, H_2O_2 , $M = 34,01 \text{ g/mol}$, 30 % (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo
- Trifluoroocetna kislina (TFA), $C_2HF_3O_2$, $114,02 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.1.2 Referenčne spojine

- Cistein (Cys), $M = 121,16 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Cistin, $M = 240,30 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Glutation (GSH), $M = 307,32 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Histidin (His), $M = 155,15 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Metionin (Met), $M = 149,21 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- *N*-acetil cistein (*N*-acetil Cys), $M = 163,19 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tirozin (Tyr), $M = 181,19 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Triptofan (Trp), $M = 204,23 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Alanin-tirozin (Ala-Tyr), $M = 252,27 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Levcin-tirozin (Leu-Tyr), $M = 294,35 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Glicin-metionin (Gly-Met), $M = 206,26 \text{ g/mol}$, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.1.3 Aparature

- Analitska tehtnica Excellence Plus AG 245 (Mettler Toledo, Švica)
- Avtomatske pipete 20–200 μL , 100–1000 μL (Eppendorf, Nemčija)
- HPLC-sistem 1100 (Agilent Technologies, ZDA)
 - Kvarterna črpalka
 - Avtomatski vzorčevalnik
 - Termostat za kolono
 - UV-VIS detektor
 - ChemStation programska oprema
- Hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- Kolona Synergi Hydro, 250 x 4,6 mm, 4 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Luna NH₂, 150 x 4,6 mm, 3 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Jupiter PROTEO, 250 x 4,6 mm, 4 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Jupiter 300, C4, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Xterra RP8, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Waters, ZDA)
- Kolona HyperClone, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
- Kolona Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
- pH meter MP basic (Mettler Toledo, Švica)
- Sistem za pripravo MiliQ vode A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- Stekleni in ostali inventar (merilne bučke, čaše, vialo, mikrocentrifugirke, nastavki za pipete, spatule, tehtiči)
- Ultrazvočna kad Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija)
- Mešalo Rotamix SHP-10

3.2 METODE

3.2.1 Razvoj in optimizacija metode

Pri HPLC-analizi sta za učinkovito selektivnost analitov bistvenega pomena poznavanje vzorca ter ustrezna izbira stacionarne (kolone) in mobilne faze (kombinacija topil). Analizirali smo enajst analitov: Cys, His, GSH, Ala-His, Met, *N*-acetil Cys, Tyr, Gly-Met, Ala-Tyr, Trp, Leu-Tyr. Na začetku razvoja metode smo analizirali polarne analite, na podlagi katerih smo izbrali ustrezno kolono in 100 % vodni del mobilne faze. Zaradi prekrivanja kromatografskih vrhov Cys in njegovega derivata cistina smo s spreminjanjem temperature, pretoka in volumna injiciranja opazovali spremembe v njuni selektivnosti. V nadaljevanju smo z analiziranjem vseh enajstih analitov izbrali še ustrezen gradient, z dodatkom organskega dela mobilni fazi (acetonitril).

- **Izbira osnovnih kromatografskih pogojev**

V preglednici VI so navedene metode, ki smo jih preizkusili tekom razvoja in optimizacije metode. Uporabljeni parametri analize pri metodah 1–24 so bili: volumen injiciranja 20 μL , pretok mobilne faze 1 mL/min, temperatura kolone 25 °C in valovni dolžini 210 in 275 nm. Kot mobilno fazo smo uporabili 100 % vodni del mobilne faze.

Preglednica VI: Metode, ki smo jih uporabili pri razvoju in optimizaciji metode.

Metoda	Kolona	Vodni del mobilne faze
1	Synergi Hydro, 250 x 4,6 mm, 4 μm	0,05 % H_3PO_4
2	Synergi Hydro, 250 x 4,6 mm, 4 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 3,0
3	Synergi Hydro, 250 x 4,6 mm, 4 μm	0,1 % TFA
4	Synergi Hydro, 250 x 4,6 mm, 4 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 4,6
5	Synergi Hydro, 250 x 4,6 mm, 4 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 6,8
6	Jupiter PROTEO, 250 x 4,6 mm, 4 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 6,8
7	Jupiter PROTEO, 250 x 4,6 mm, 4 μm	0,05 % H_3PO_4
8	Jupiter 300, C4, 250 x 4,6 mm, 5 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 6,8
9	Xterra RP8, 250 x 4,6 mm, 5 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 8,0
10	HyperClone, 250 x 4,6 mm, 5 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 6,8
11	Luna NH_2 , 150 x 4,6 mm, 3 μm	0,05 % H_3PO_4
12	Luna NH_2 , 150 x 4,6 mm, 3 μm	25 mM KH_2PO_4 pH = 6,8

Metoda	Kolona	Vodni del mobilne faze
13	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	0,05 % H ₃ PO ₄
14	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 3,0
15	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	0,1 % TFA
16	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 4,6
17	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 6,8
18	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 8,0
19	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 6,8
20	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7,1
21	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7,4
22	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7,7
23	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 8,0
24a	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 8,3
24b	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm	12,5 mM KH ₂ PO ₄ pH = 8,3

- **Dodatne spremembe HPLC-parametrov**

Z dodatnimi spremembami HPLC-parametrov smo preverili, ali se izboljša selektivnost aminokislin. Z modifikacijo metode 19 smo analizirali aminokislino Cys in cistin. Spremembe kromatografskih parametrov so predstavljene v preglednici VII.

Preglednica VII: Dodatne spremembe HPLC-parametrov, s katerimi smo preverili selektivnost med Cys in njegovim oksidacijskim produktom cistinom na koloni Luna C8, 250 x 4,6 mm.

Metoda	Pretok (mL/min)	Volumen injiciranja (µL)	Temperatura kolone (°C)
19a	1	5	25
19b	0,8	5	25
19c	0,8	5	40

- **Izbira gradienta**

V preglednici VIII so zbrani različni gradientni programi, ki smo jih preizkusili tekom razvoja in optimizacije metode. Kot mobilno fazo B smo uporabili acetonitril. Za osnovo smo uporabili metodo 24a.

Preglednica VIII: Gradientni programi metode 24a, s katerimi smo optimizirali metodo za vse analite.

Gradientni program	Čas (min): % mobilne faze B
1	0–10,0 min: 0 %; 10,0–20,0 min: 30 %; 20,0–25,0 min: 30%; 25,0–25,1 min: 0 %; 25,1–28,0 min: 0 %
2	0–6,0 min: 0 %; 6,0–16,0 min: 30 %; 16,0–20,0: 30 %; 20,0–20,1 min: 0 %; 20,1–25,0 min: 0 %
3	0–7,0 min: 0 %; 7,0–17,0 min: 50 %; 17,0–17,1 min: 0 %; 17,1–20,0 min: 0 %
4	0–4,5 min: 0 %; 4,5–10,0 min: 20 %; 10,0–15,0 min: 50 %; 15,0–20,0 min: 50 %; 20,0–20,1 min: 0 %; 20,1–25 min: 0 %
5	0–4,5 min: 0 %; 4,5–7,5 min: 20 %; 7,5–17,0 min: 40 %; 17,0–17,1 min: 0 %; 17,1–22,0 min: 0 %
6	0–4,5 min: 0 %; 4,5–8,5 min: 40 %; 8,5–15,0 min: 40 %; 15,0–15,1 min: 0 %; 15,1–20: 0 %
7	0–4,0 min: 0 %; 4,0–7,0 min: 10 %; 7,0–13,0 min: 40 %; 13,0–18,0 min: 40 %; 18,0–18,1 min: 0 %; 18,1–22 min: 0 %
8	0–4,0 min: 0 %; 4,0–7,0 min: 10 %; 7,0–11,0 min: 10 %; 11,0–18,0 min: 50 %; 18,0–18,1 min: 0%; 18,1–22,0 min: 0 %
9	0–4,0 min: 0 %; 4,0–7,0 min: 5 %; 7,0–12,0 min: 10 %; 12,0–18,0 min: 50 %; 18,0–18,1 min: 0 %; 18,1–22,0 min: 0 %
10	0–4,0 min: 0 %; 4,0–7,0 min: 5 %; 7,0–10,0 min: 10 %; 10,0–18,0 min: 50 %; 18,0–18,1 min: 0 %; 18,1–22,0 min: 0 %
11	0–4,0 min: 0 %; 4,0–7,0 min: 10 %; 7,0–13,0 min: 50 %; 13,0–18,0 min: 50 %; 18,0–18,1 min: 0 %; 18,1–22min: 0 %
12	0–4,5 min: 0 %; 4,5–10,0 min: 10 %; 10,0–15,0 min: 50 %; 15,0–20,0 min: 50 %; 20,0–20,1 min: 0 %; 20,1–24 min: 0 %
13	0–7,0 min: 0 %; 7,0–17,0 min: 20 %; 17,0–20,0 min: 20 %; 20,0–20,1 min: 0 %; 20,1–24 min: 0 %

3.2.2 Končni kromatografski pogoji

Končni kromatografski pogoji metode HPLC za vrednotenje aminokislin, dipeptidov in GSH (metoda 24a in gradientni program 13):

- kolona: Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 μ m;
- gradientni program: 0–7 min: 0 %; 7–17 min: 20 %; 17–20 min: 20 %; 20,0–20,1 min: 0 %; 20,1–24 min: 0 %;
- pretok mobilne faze: 1 mL/min;
- temperatura kolone: 25 °C;
- valovni dolžini detekcije: 210 nm, 275 nm;
- volumen injiciranja: 20 μ L;
- čas analize: 24 min;
- temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25 °C.

3.2.3 Priprava vzorcev in raztopin za razvoj in optimizacijo metode

Priprava osnovnih raztopin aminokislin, dipeptidov in GSH

Cys, His, Met, *N*-acetil Cys, Tyr, Trp smo natehtali po 1 mg v 2 mL mikrocentrifugirko in raztopili v 1 mL prečiščene vode (1 mg/mL). GSH, Ala-His, Gly-Met, Ala-Tyr, Leu-Tyr smo natehtali po 1 mg v 5 mL bučko, raztopili v 2 mL prečiščene vode in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake (0,2 mg/mL).

Priprava raztopin vzorcev za injiciranje posameznega analita

Raztopine Cys, Met, *N*-acetil Cys, Tyr smo pripravili z 10-kratnim redčenjem osnovnih raztopin neposredno v mikrocentrifugirko (0,1 mg/mL). Raztopini GSH in Ala-His smo pripravili z 10-kratnim redčenjem osnovnih raztopin neposredno v mikrocentrifugirko (0,02 mg/mL). Raztopino His smo pripravili z 20-kratnim redčenjem osnovne raztopine His (0,05 mg/mL), raztopino Trp pa s 50-kratnim redčenjem osnovne raztopine Trp (0,02 mg/mL). Raztopine smo redčili s prečiščeno vodo.

Priprava raztopine zmesi aminokislin, dipeptidov in GSH

Raztopine zmesi aminokislin, dipeptidov in GSH smo pripravili tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 50 μ L osnovne raztopine His, 20 μ L osnovne raztopine Trp in po 100 μ L

vseh ostalih osnovnih spojin neposredno v mikrocentrifugirko. Nato smo zmesi dodali še 30 μL prečiščene vode do končnega volumna 1000 μL . Dobili smo naslednje končne koncentracije: Cys, Met, *N*-acetil Cys, Tyr (0,1 mg/mL); His (0,05 mg/mL); GSH, Ala-His, Gly-Met, Ala-Tyr, Trp in Leu-Tyr (0,02 mg/mL).

Priprava mobilne faze A (vodni del mobilne faze)

- Priprava 0,05 % H_3PO_4

0,05 % H_3PO_4 smo pripravili tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 0,588 mL 85 % H_3PO_4 v litrsko bučo in s prečiščeno vodo (MQ) vodo dopolnili do oznake.

- Priprava fosfatnega pufra

25 mM fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 3,4 g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v litrsko bučo in z MQ vodo dopolnili do oznake. Nato smo raztopino umerili na različne pH (3,0; 4,6; 6,8; 7,1; 7,4; 7,7; 8,0; 8,3) z 1 M NaOH ali 1 M HCl.

12,5 mM fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 1,7 g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v litrsko bučo in z MQ vodo dopolnili do oznake. Nato smo raztopino umerili na pH 8,3 z 1 M NaOH.

- Priprava 0,1 % trifluoroocetne kisline (TFA)

0,1 % TFA smo pripravili tako, da smo z avtomatsko pipeto odmerili 1,0 mL 100 % TFA v litrsko bučo in z MQ vodo dopolnili do oznake.

- Raztopina 0,1 % citronske kisline

Natehtali smo 50 mg citronske kisline in jo raztopili v 50 mL MQ vode.

3.2.4 Validacija analizne metode

- Priprava raztopin za vrednotenje linearnosti, ponovljivosti in točnosti

Natehtali smo po 3 mg Cys, His, Met, *N*-acetil Cys in Trp v 2 mL mikrocentrifugirko in vse skupaj raztopili v 1 mL 0,1% raztopine citronske kisline. Tako smo dobili osnovne raztopine aminokislin s koncentracijo 3 mg/mL. Nato smo natehtali po 2 mg GSH, Ala-His, Gly-Met, Ala-Tyr, Leu-Tyr v 2 mL mikrocentrifugirko in vse skupaj raztopili v 1 mL 0,1 % raztopine citronske kisline. Tako smo dobili osnovne raztopine dipeptidov in tripeptida s koncentracijo 2 mg/mL. Natehtali smo 1,5 mg Tyr in ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko, v katero smo dodali 250 μ L osnovne raztopine His, 100 μ L osnovne raztopine Trp ter po 500 μ L ostalih osnovnih raztopin. Nato smo z 0,1 % raztopino citronske kisline redčili nastalo raztopino do 5 mL. Raztopina je osnova za umeritveno premico (OR). Koncentracije analitov v OR so: Cys, Met, *N*-acetil Cys, Tyr 0,3 mg/mL, His 0,15 mg/mL, Trp 0,06 mg/mL, GSH, Ala-His, Gly-Met, Ala-Tyr, Leu-Tyr, 0,2 mg/mL.

Preglednica IX: Priprava kalibracijskih in kontrolnih raztopin.

Raztopina (%)	Volumen osnovne raztopine (100 %) (μ L)	Volumen 0,1 % raztopine citronske kisline (μ L)
100 (OR)	1000	0
80	800	200
60	600	400
50 (QC1)	500	500
40	400	600
30 (QC2)	300	700
20	200	800
10	100	900
5	50	950
2,5	250 (10%)	750
1	100 (10%)	900
0,5	50 (10%)	950
0	0	1000

Za izdelavo umeritvenih krivulj smo posneli kromatograme referenčnih spojin različnih koncentracij, ki so predstavljene v preglednici IX. Kalibracijske raztopine smo pripravili

tako, da smo izhajali iz OR, ki smo jo ustrezno redčili z 0,1 % raztopino citronske kisline. Za vrednotenje ponovljivosti in točnosti metode smo pripravili šest paralelk vzorcev 50 % OR (QC1). Za vrednotenje ponovljivosti in točnosti med dnevi smo pripravili po tri paralelke 30 % OR, v treh zaporednih dneh (QC2).

- Vrednotenje HPLC-metode

HPLC-analizno metodo smo validirali v skladu z Q2(R1) ICH smernico (27). Preverjali smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, mejo zaznave, mejo določanja in stabilnost.

- Selektivnost

Selektivnost analize metode smo preverili s primerjavo retencijskih časov enajstih analitov Cys, His, GSH, Ala-His, Met, *N*-acetil Cys, Tyr, Gly-Met, Ala-Tyr, Trp, Leu-Tyr in 0,1 % raztopino citronske kisline, ki smo jo uporabili za redčenje raztopin. Dodatno selektivnost smo preverili med Cys in njegovim derivatom cistinom. Selektivnost smo preverili tudi s topili, uporabljenimi pri stresnih študijah: 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH in 0,3 % H₂O₂. Tako smo ugotovili retencijske čase aminokislin in preverili kromatografske vrhove topil, ki bi lahko vplivali na vrednotenje analitov.

- Linearnost

Linearnost analize metode smo določili z injiciranjem enajstih raztopin v koncentracijskem območju 1,5-300 mg/L (Cys, Met, *N*-acetil Cys); 0,75-150 mg/mL (His); 0,3-60 mg/L (Trp); 1-200 mg/L (GSH, Ala-His, Leu-Tyr, Gly-Met, Ala-Tyr). Postopek smo ponovili v treh zaporednih dneh z uporabo sveže pripravljenih raztopin vzorcev (preglednica IX). Z metodo najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih premic in determinacijske koeficiente (R^2). Za mejo sprejemljivosti smo definirali $R^2 \geq 0,99$.

- Ponovljivost in točnost

Za vrednotenje ponovljivosti smo pripravili šest paralelk QC1 (preglednica IX). Ponovljivost injiciranja smo ovrednotili s šestkratnim injiciranjem vzorca QC1. Izračunali smo standardni odklon (SD) in relativni standardni odklon (RSD). Postavili smo naslednje merilo sprejemljivosti: $RSD \leq 5\%$. Med-dnevno ponovljivost smo vrednotili tako, da smo

postopek priprave QC2 ponovili še drugi in tretji dan ter primerjali ujemanje rezultatov med dnevi. Vsak dan smo pripravili tri paralelke in izračunali dnevno povprečje ter SD in RSD za tri dni. Postavili smo naslednje merilo sprejemljivosti: $RSD \leq 5 \%$.

Točnost analizne metode smo preverili na istih kontrolnih vzorcih, kot smo jih uporabili za ponovljivost (QC1). Na osnovi kromatografskih odzivov smo s pomočjo umeritvenih premic izračunali koncentracijo posameznega analita. Med-dnevno točnost smo vrednotili tako, da smo postopek priprave QC2 ponovili še drugi in tretji dan ter primerjali ujemanje rezultatov med dnevi. Kot rezultat točnosti smo podali odstopanje med izračunanimi in dejanskimi koncentracijami, izraženimi v odstotkih (*enačba 1*). Interval odstopanja za točnost analize smo definirali od 95 % do 105 %.

$$\% \text{ odstopanja} = \frac{c_i}{c} \times 100 \quad \text{Enačba 1}$$

c_i ...izračunana koncentracija analita v kontrolni raztopini QC

c ...dejanska vrednost analita v kontrolni raztopini QC

- Meja zaznave in meja določitve

Na osnovi umeritvenih premic treh zaporednih dni smo izračunali meje zaznave (LOD) in meje določitve (LOQ). Izračuna za LOD in LOQ sta predstavljena z *enačbama 2* in *3*.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad \text{Enačba 2}$$

$$LOQ = \frac{10 * \sigma}{S} \quad \text{Enačba 3}$$

σ ...standardni odklon povprečnih vrednosti odsekov na ordinati

S ...povprečna vrednost naklona umeritvene premice

- Stabilnost

Analizirali smo raztopino QC2. Stabilnost raztopine smo vrednotili v avtomatskem vzorčevalniku pri 25 °C. Raztopine smo analizirali ob času 0, po 12 in 28 urah. Rezultate smo izračunali kot razmerje kromatografskih odzivov po določenem času glede na odziv v času 0, izražene v odstotkih. Meja sprejemljivosti je bila: $100 \pm 5 \%$.

3.2.5 Stresna študija

Stresno študijo smo izvajali v skladu z Q1A ICH smernico (34). Za stresno študijo smo uporabili 25 % OR (preglednica IX). Analite smo analizirali v štirih različnih raztopinah: vsak analit posebej, zmes vseh enajstih analitov, zmes analitov, ki vsebujejo žveplo (Cys, GSH, *N*-acetil Cys, Met, Gly-Met), in zmes analitov, ki vsebujejo aromatski obroč (Tyr, Ala-Tyr, Trp, Leu-Tyr).

- Priprava vzorcev in raztopin za študijo stabilnosti
 - Priprava posameznih raztopin aminokislin, njihovih dipeptidov in glutationa za študijo stabilnosti

V preglednici X so predstavljene priprave osnovnih raztopin za analizo posameznih spojin.

Preglednica X: Priprava vzorcev za stresno študijo.

	Osnovna raztopina (natehta/redčenje z MQ)	Raztopina vzorca + medij	Koncentracija (mg/mL)
Cys	3 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,075
His	1,5 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,0375
GSH	2 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,05
Ala-His	2 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,05
Met	3 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,075
<i>N</i> -acetil Cys	3 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,075
Tyr	6 mg/20 mL	250 µL + 750 µL	0,075
Trp	3 mg/5 mL	25 µL + 975 µL	0,015
Leu-Tyr	2 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,05
Gly-Met	2 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,05
Ala-Tyr	2 mg/1 mL	25 µL + 975 µL	0,05

Medij = prečiščena voda; 0,1 M NaOH; 0,1 M HCl; 0,3 % H₂O₂

- Priprava vzorcev za analizo zmesi vseh 11 spojin (zmes 1)

Za zmes 1 smo uporabili osnovne raztopine iz preglednice X. V mikrocentrifugirko smo dodali 250 µL osnovne raztopine Tyr in po 25 µL vseh ostalih osnovnih spojin ter redčili z izbranim medijem do 1000 µL. Koncentracije končne raztopine posameznih spojin so enake kot v osnovni raztopini (preglednica X).

- Priprava vzorcev za analizo zmesi spojin, ki vsebujejo žveplo (zmes 2)

Za zmes 2 smo uporabili osnovne raztopine Cys, GSH, Met, *N*-acetil Cys in Gly-Met iz preglednice X. V mikrocentrifugirko smo dodali po 25 μ L posamezne spojine ter redčili z izbranim medijem do 1000 μ L. Koncentracije končne raztopine posameznih spojin so enake kot v osnovni raztopini (preglednica X).

- Priprava vzorcev za analizo zmesi spojin, ki vsebujejo aromatski obroč (zmes 3)

Za zmesi 3 smo uporabili osnovne raztopine Trp, Tyr, Ala-Tyr in Leu-Tyr iz preglednice X. V mikrocentrifugirko smo dodali 250 μ L osnovne raztopine Tyr in po 25 μ L vseh ostalih spojin ter redčili z izbranim medijem do 1000 μ L. Koncentracije končne raztopine posameznih spojin so enake kot v osnovni raztopini (preglednica X).

- Priprava medija

0,3 % H₂O₂

0,3 % H₂O₂ smo pripravili tako, da smo prenesli 1,0 mL 30 % H₂O₂ v 100-mL bučko in le-to do oznake dopolnili s prečiščeno vodo.

• Dejavniki stresne študije

Stabilnost spojin smo preverili v vodni raztopini pri različnih temperaturah (25 °C, 40 °C) in v različnih topilih (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, 0,3 % H₂O₂) (preglednica XI). Pri temperaturi 25 °C smo vrednotili tudi občutljivost analitov na svetlobo. Raztopine smo analizirali v naslednjih časovnih točkah: 0, 4, 8, 16, 20, 36 h.

Preglednica XI: Shema stresne študije

Pogoj	Temperatura	Medij	UV-svetloba
1	25	MQ	NE
2	40	MQ	NE
3	25	0,1 M HCl	NE
4	25	0,1 M NaOH	NE
5	25	0,3 % H ₂ O ₂	NE
6	25	MQ	DA

Temperatura

Raztopine, s katerimi smo preverili stabilnost pri temperaturah 25 °C in 40 °C, smo pripravili tako, kot je predstavljeno v preglednici X. Redčili smo jih s prečiščeno vodo. Raztopine smo shranjevali v avtomatskem vzorčevalniku, v katerem smo nastavili temperaturo, pri kateri smo ob določenih časovnih intervalih analizirali vzorce (25 ali 40 °C).

Medij

Raztopine, s katerimi smo preverili občutljivost na različne medije, smo pripravili, kot je predstavljeno v preglednici X. Osnovno raztopino smo pripravili s prečiščeno vodo, nato pa smo raztopino redčili z določenim medijem (0,1 M NaOH; 0,1 M HCl ali 0,3 % H₂O₂). Raztopine smo shranjevali v avtomatskem vzorčevalniku pri sobni temperaturi in jih analizirali ob določenih časovnih intervalih.

UV-svetloba

Raztopine, s katerimi smo preverili občutljivost na svetlobo, smo pripravili, kot je predstavljeno v preglednici X. Analizirali smo jih ob času 0 in jih nato za 20 h postavili na dnevno svetlobo pri sobni temperaturi. Po 20 h smo raztopine ponovno analizirali.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Glavna metoda za analizo aminokislin je tekočinska kromatografija z derivatizacijo analitov. Reakcije derivatizacije lahko potečejo pred kolono ali po njej. Derivatizacija aminokislin omogoča daljše zadrževanje analitov na koloni in hkrati tudi izboljšano detekcijo. Prednost razvoja naše HPLC-metode je kratka in enostavna analiza, brez predpriprave oziroma derivatizacije vzorcev. Razvili smo metodo za aminokislino, ki so občutljive na oksidacijo, vključili pa smo tudi nekatere njihove dipeptide ter tripeptid. Razvoj metode je bil zapleten predvsem zaradi različne narave enajstih analitov, ki so tako zelo hidrofilni (Cys, His) kot lipofilni (aromati, dipeptidi) in imajo različne fizikalno kemijske lastnosti. Razvili smo neposredno kromatografsko metodo, s katero smo spojine zadržali na koloni ter jih ustrezno ločili. Metodo smo ustrezno validirali po ICH-smernicah. Njeno uporabnost smo preverili s stresno študijo, kjer smo opazovali medsebojni vpliv analitov, vpliv strukture analita in občutljivost analitov na različne pogoje.

4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA METODE

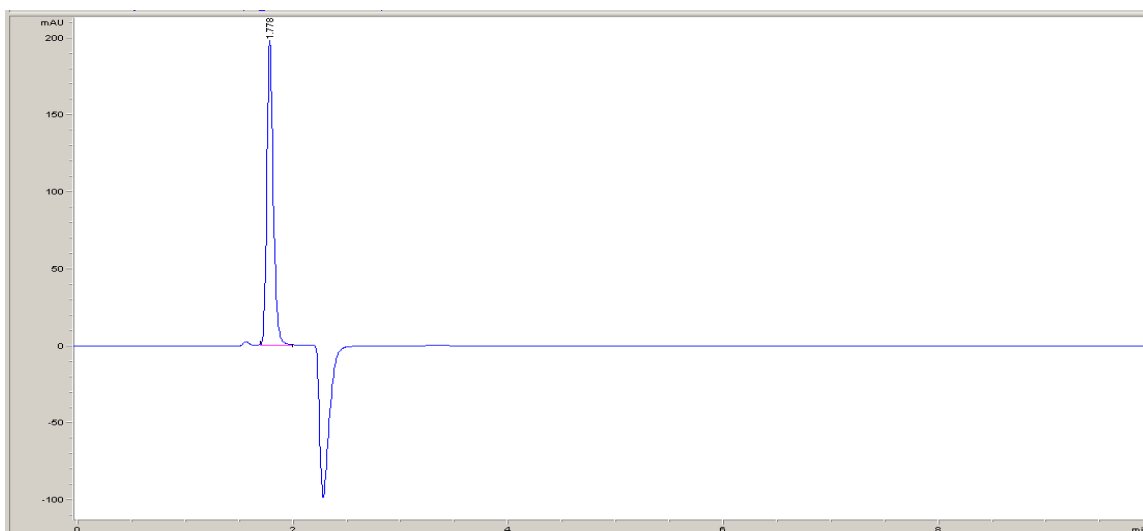
Cilj razvoja kromatografske metode je izbrati optimalno kromatografsko kolono in mobilno fazo ter določiti ostale kromatografske pogoje, s katerimi dosežemo ustrezno izpiranje analitov.

Glavni izziv je bil zadržati polarne analite na koloni, zato smo z metodami 1–24 (preglednica VI) analizirali samo polarne analite in spremljali njihove retencijske čase. Tekom razvoja smo preizkusili različne tipe reverzno faznih kolon, različne mobilne faze, pretoke in temperature kolon. Pri tem smo spremljali predvsem selektivnost analitov in retencijske čase ter opazovali, kakšni so njihovi kromatografski vrhovi (faktor simetrije, število teoretskih podov...). Ko smo uspeli zadržati polarne analite na koloni, smo v analizo dodali še dipeptide in tripeptid, prav tako smo analizirali tudi zmes aminokislin in njihovih dipeptidov ter GSH, saj smo želeli ugotoviti predvsem, ali smo dosegli ustrezno selektivnost med analiti.

4.1.1 Izbira osnovnih kromatografskih pogojev

Pri izbiri osnovnih kromatografskih pogojev smo spremljali selektivnost in simetrijo kromatografskih vrhov. Pri izbiranju ustrezne kolone in mobilne faze smo uporabili izokratsko analizo s 100 % vodno mobilno fazo. Zaradi velikega števila analitov smo uporabljali dolge kolone: 150 x 4,6 mm oziroma 250 x 4,6 mm. Tekom razvoja smo za izbiro ustrezne kolone in mobilne faze preverjali polarne analite: Cys, His, Met, *N*-acetil Cys, Tyr, Trp, nato smo za potrebe analize dodali še GSH in Ala-His.

Pri metodah 1–5 smo izbrali kolono Synergi Hydro; 250 x 4,6 mm; 4 µm, ki je primerna za mešanico polarnih in nepolarnih analitov v 100 % vodnih pogojih (38). Najprej smo kot mobilno fazo uporabili 0,05 % H₃PO₄ in 25 M KH₂PO₄ s pH 3,0. Pri teh pogojih smo opazili, da se aminokislina His ni zadržala na koloni (slika 3), prav tako se kromatografski vrh Cys ni ločil od topila. Nato smo za mobilno fazo uporabili 0,1% TFA, ki je »ion pairing« reagent in se veže na polarne analite ter jim podaljša zadrževalni čas na koloni. Pričakovano se je retencijski čas His podaljšal, vendar se ni dovolj zadržal, da bi se ločil od kromatografskega vrha topila. Pri metodah 4 in 5 smo povečali pH mobilne faze na 4,6 in 6,8. Pri tem smo opazili, da se je kromatografski vrh His pojavil za vrhom Cys, vendar se kromatografski vrh Cys ni ustrezno ločil od vrha topila.



Slika 3: Pri metodi 1 se aminokislina His ni zadržala na koloni.

Tekom analize smo opazili, da se Cys zelo hitro pretvarja in se kromatografski vrh njegovega oksidacijskega derivata cistina prekriva s Cys. Zaradi tega smo se odločili

stabilizirati Cys, in sicer tako, da smo kot topilo uporabili raztopino citronske kisline. Raztopina Cys v citrinski kislini je stabilna do 12h (preglednica XVII).

Poleg tega smo potem, ko smo že izbrali kolono in mobilno fazo, posebej analizirali standard cistina in ga poskusili s spreminjanjem kromatografskih pogojev ločiti od Cys.

Z metodami od 6 do 8 smo raztopine analizirali s kolonama Jupiter, ki sta optimalni za karakterizacijo proteinov in peptidov (38). S kolono Jupiter Proteo; 250 x 4,6 mm; 4 µm nismo zadržali analitov na koloni. S kolono Jupiter 300, C4; 250 x 4,6 mm; 5 µm in metodo 8 so se vsi analiti zadržali na koloni, vendar sta bila kromatografska vrhova Cys in His pri enakem retencijskem času 2,9 min.

Pri metodah 9 in 10 smo preizkusili koloni Xterra RP8 in HyperClone. Glede na prejšnje podatke, s katerimi smo ugotovili, da dosežemo boljšo selektivno analitov pri višjih pH mobilne faze, smo uporabnost kolon Xterra in HyperClone preizkusili samo pri višjih pH. Metodi 9 in 10 se nista izkazali za uporabni, saj nismo opazili izboljšanja selektivnosti.

V nadaljevanju smo preizkusili kolone Luna. Te kolone so stabilne v širokem spektru pH vrednosti mobilne faze, od 1,5 do 10, kar nam je dopuščalo večje spremembe pri izboru mobilne faze. Najprej smo pri metodah 11 in 12 uporabili kolono Luna NH₂. Ti dve metodi sta se izkazali za neustrezni, saj se polarni analiti niso zadržali na koloni.

Nato smo uporabili kolono Luna C18; 150 x 4,6 mm; 5 µm (metode 13–18). Z metodami 13 in 14 se kromatografski vrh Cys ni ustrezno ločil od vrha topila, kar smo predpisali prenizkemu pH mobilne faze. Pri metodi 15 smo kot mobilno fazo uporabili 0,1 % TFA. Pričakovano se je retencijski čas analitov podaljšal, vendar ni ločil kromatografskih vrhov Cys in His (preglednica XII) prav tako ni ločil kromatografskega vrha topila in Cys.

Preglednica XII: Primerjava retencijskih časov z metodama 14 in 15.

	His	Cys	Met	Tyr	N-acetil Cys	Trp
25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 3,0	1,5 min	1,7min	3,7 min	5,3 min	9,7 min	11,3 min
0,1 % TFA	2,3 min	2,2min	3,9 min	10 min	11,6 min	12,9 min

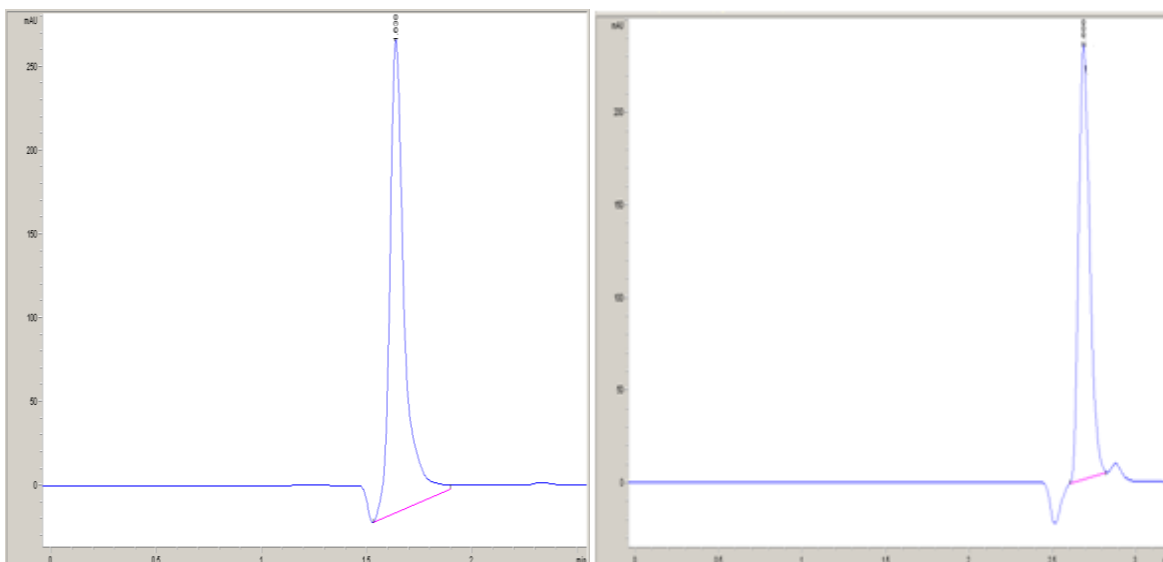
V nadaljevanju smo pri metodah 16–18 kot mobilno fazo uporabili fosfatni pufer, z višjim pH. Opazili smo, da se je kromatografski vrh His pri nižjih pH vrednostih izpiral pred

kromatografskim vrhom Cys (metoda 16). Pri pH vrednostih, večjih od 6,8 pa je bilo ravno obratno (preglednica XIII).

Z metodo 17 se kromatografska vrhova Cys in His nista ustrezno ločila, zato smo z metodo 18 pH mobilni fazi povišali na 8,0. Z metodo 18 sta se kromatografska vrhova Cys in His ustrezno ločila. Pri metodi 18 se je izboljšala tudi ločba med kromatografskim vrhom topila in Cys (slika 4).

Preglednica XIII: Vpliv pH na retencijski čas aminokislin His in Cys pri metodah 15, 16 in 17.

	R _t His (min)	R _t Cys (min)
25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 3,0	1,5	1,7
25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 4,6	1,5	1,7
25 mM KH ₂ PO ₄ pH = 6,8	1,9	1,7

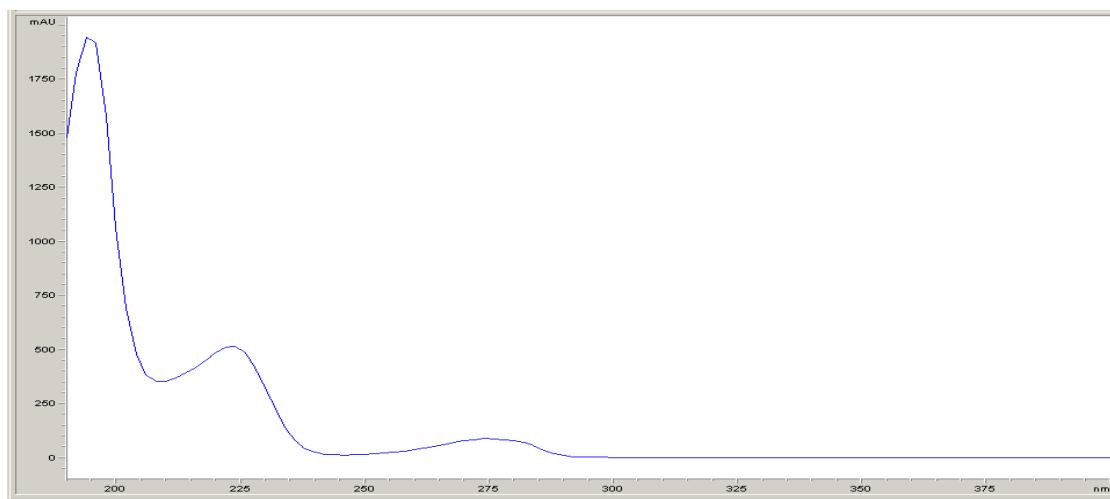


Slika 4: Levo: Kromatografski vrh Cys z metodo 17; Desno: Izboljšanje ločbe Cys od topila z metodo 18.

Metoda 18 se je izkazala za dobro osnovo, vendar smo selektivnost analitov in obliko kromatografskih vrhov preverili še s kolono Luna C8; 250 x 4,6 mm; 5 µm. Tekom razvoja smo opazili, da dosežemo z višjimi pH vrednostmi mobilne faze boljšo selektivnost, zato smo z metodami od 19 do 24 preizkusili mobilne faze v pH območju od 6,8 do 8,3. Pri pH 6,8 so bili, v primerjavi s kolono Luna C18; 150 x 4,6 mm; 5 µm, kromatografski vrhovi s kolono Luna C8; 250 x 4,6 mm; 5 µm izboljšani, zato smo se za nadaljnjo optimizacijo metode odločili za kolono Luna C8; 150 x 4,6; 5 µm.

Glede na predhodna opažanja, da je His občutljiv na pH, smo se na tem mestu odločili, da v analizo vključimo tudi dipeptid Ala-His ter preverimo, ali sta kromatografska vrhova His in Ala-His pri pH 6,8 ločena. Kromatografska vrhova His in Ala-His sta se pri pH vrednosti 6,8 prekrivala, zato smo pH mobilni fazi še povišali. Pri pH 7,1 ni bilo izboljšanja, pri pH 7,4 pa smo dosegli izboljšanje v ločbi, saj je bil vrh His pri 3,0 min, vrh Ala-His pa se je premaknil na 3,3 min. Bolj kot smo povečevali pH mobilni fazi, dalj časa se je Ala-His zadržal na koloni. Pri pH 8,0 je bil kromatografski vrh His pri retencijskem času 3,1 min, Ala-His pa 4,0 min. S povišanjem pH fosfatnemu puftru smo dosegli ustrezno ločbo kromatografskih vrhov med aminokislino His in dipeptidom Ala-His.

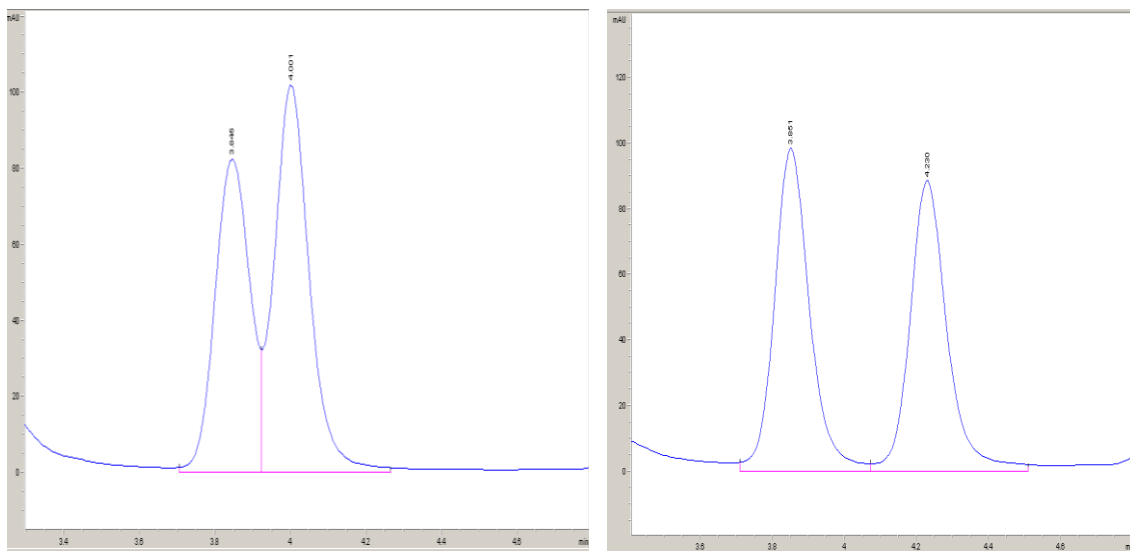
Kromatografska vrhova, ki nam jih z metodo 23 ni uspelo ločiti, sta bila Tyr in *N*-acetil Cys ($R_t = 6,7$ min). Spojini smo identificirali na podlagi spektra, ki smo ga posneli 190–400 nm. Glede na njune različne fizikalno kemijske lastnosti smo se odločili, da ju bomo ločili z izbiro gradienta. Poleg tega smo kromatograme spremljali tudi na valovni dolžini 275 nm, ker gre za valovno dolžino, pri kateri dodatno absorbirajo Tyr oziroma ostale aromatske skupine. V primeru, da nam ne bi uspelo ločiti kromatografskih odzivov *N*-acetil Cys in Tyr pri 210 nm, bi Tyr lahko kvantitativno določili tudi pri višji valovni dolžini (slika 5).



Slika 5: UV-spekter Tyr (za identifikacijo vrhov smo uporabili spekter od 190 do 400 nm).

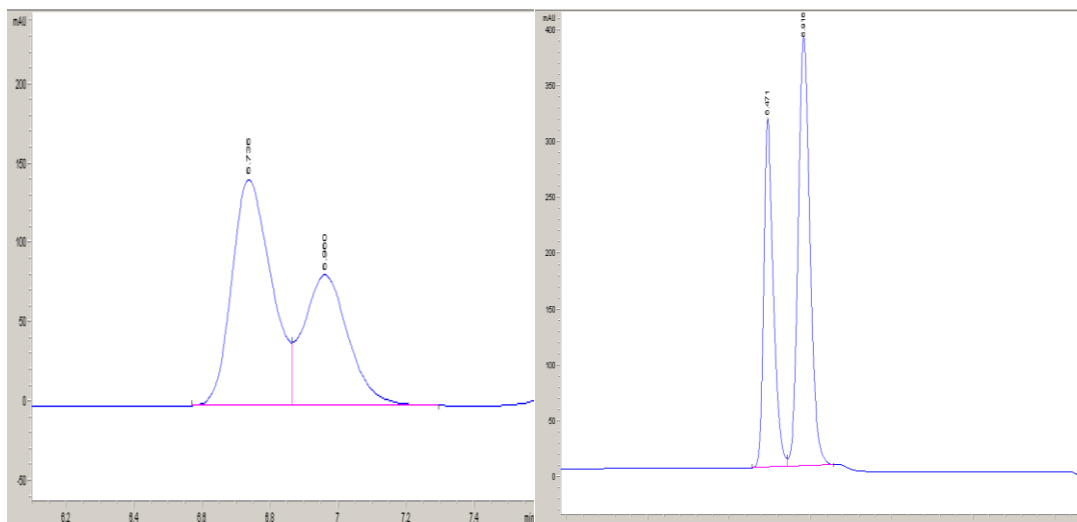
Z metodo 23 smo, z izjemo *N*-acetil Cys in Tyr, dosegli ustrezno selektivnost in obliko kromatografskih vrhov analiziranih analitov. Pri retencijskem času Ala-His ($R_t = 4,0$ min) smo glede na podatke iz literature pričakovali tudi odziv GSH (39), zato smo se odločili, da v analizo vključimo tripeptid GSH in preverimo njegov retencijski čas pri teh pogojih.

Kot je razvidno iz slike 6, se kromatografska vrhova z metodo 23 nista ustrezno ločila. Glede na prejšnje ugotovitve, da je Ala-His občutljiv na pH, smo se odločili, da pH mobilni fazi še povečamo ter tako podaljšamo retencijski čas Ala-His. pH mobilne faze smo zato povišali na 8,3. Pri teh pogojih sta se kromatografska vrhova Ala-His (4,2 min) in GSH (3,8 min) ustrezno ločila (slika 6 na desni strani).



Slika 6: Levo: Kromatografska vrhova GSH (Rt=3,8 min) in Ala-His (Rt=4,0 min) nista ločena (pri pH mobilne faze 8,0; metoda 23); Desno: Kromatografska vrhova GSH (Rt=3,8 min) in Ala-His (Rt=4,2 min) sta ločena (pri pH mobilne faze 8,3; metoda 24).

S povišanjem pH vrednosti mobilni fazi na 8,3 smo poleg spremembe retencijskih časov Ala-His in GSH opazili še eno spremembo. Pri metodi 23 smo namreč opazili, da se kromatografska vrhova Tyr in *N*-acetil Cys prekrivata. Pri povečevanju pH vrednosti na 8,3 smo opazili, da sta se kromatografska odziva *N*-acetil Cys in Tyr ločila, in sicer je bil retencijski čas *N*-acetil Cys pri 6,5 min, Tyr pa pri 7,0 min (slika 7).

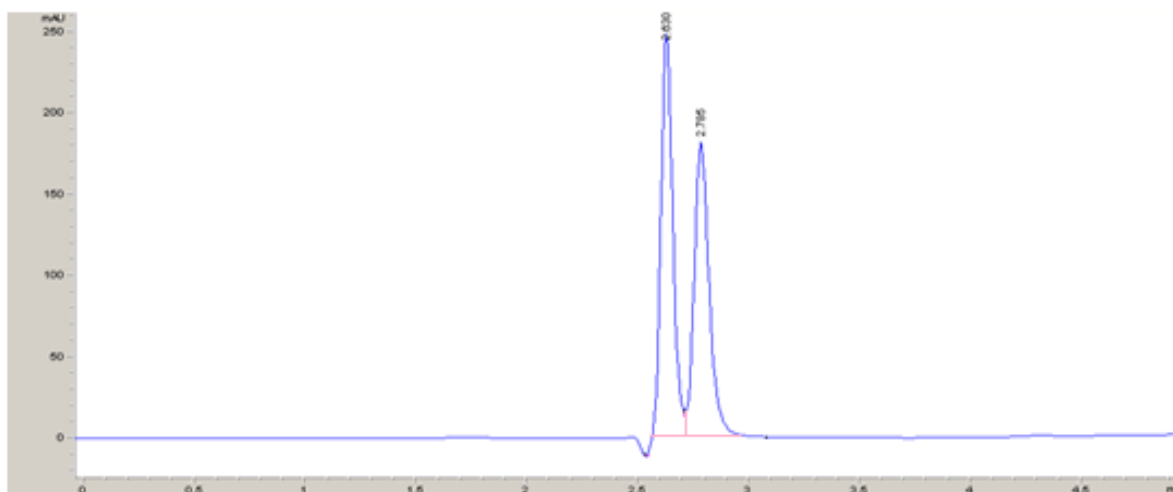


Slika 7: Levo: Kromatografska vrhova *N*-acetil Cys ($R_t=6,7$ min) in Tyr ($R_t=6,9$ min) nista ločena (pri pH mobilne faze 8,0; metoda 23); Desno: Kromatografska vrhova *N*- acetil Cys ($R_t=6,5$ min) in Tyr ($R_t=7,0$ min) sta se pri višjem pH ločila (pri pH mobilne faze 8,3; metoda 24).

Z metodo 24 smo dosegli selektivnost metode in ustrezno obliko kromatografskih vrhov, zato smo se za nadaljnji razvoj odločili za kolono Luna C8; 250 x 4,6 mm; 5 μ m in mobilno fazo 25 mM KH_2PO_4 .

4.1.2 Dodatne spremembe kromatografskih pogojev

Tekom razvoja smo opazili, da nestabiliziran Cys, raztopljen v vodi, razpada že tekom analize in se prekriva s kromatografskim odzivom svojega derivata cistina. Retencijski čas Cys in cistina je bil 2,6 min, zato smo se zaradi ustreznega vrednotenja Cys odločili, da ločimo tudi ti dve spojini. Z modifikacijo metode 19 smo poskusili ločiti spojini s spremembo pogojev: zmanjšali smo volumen injiciranja na 5 μ L, pretok smo zmanjšali na 0,8 mL/min, nato smo poskusili tudi s povišanjem temperature kolone na 40 $^{\circ}\text{C}$. Pri teh spremembah nismo opazili znatnega izboljšanja ločbe. Kljub temu, da te spremembe niso vplivale na selektivnost obeh aminokislin, smo ločitev izboljšali z metodo 24, pri kateri smo pH mobilne faze povečali na 8,3. Retencijski čas Cys je 2,8 min, cistina pa 2,6 min (slika 8).

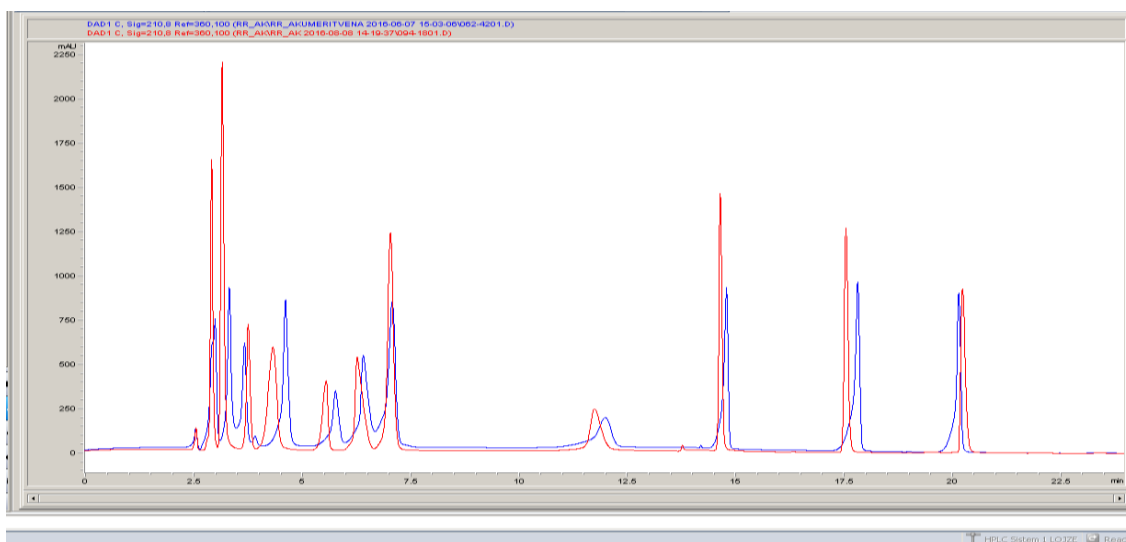


Slika 8: Cys in njegov disulfidni derivat cistin, ločena z metodo 24.

4.1.3 Izbira gradienta

Za hitrejšo analizo in ločitev analitov smo se odločili za gradientno analizo, z organskim modifikatorjem ACN. Pri izbiri gradienta smo v analizo vključili manj polarne analite: dipeptide in tripeptid. Analizirali smo tudi zmes vseh aminokislin, dipeptidov in tripeptida. Cilj gradientne analize je bil doseči čim krajši čas analize za vseh enajst analitov. Nekatere spojine se lahko močneje in dalj časa zadržujejo na koloni, vendar jih lahko z ustreznim gradientom hitreje speremo s kolone ter tako skrajšamo čas analize. Gradienti, ki smo jih uporabili, so predstavljeni v preglednici VIII.

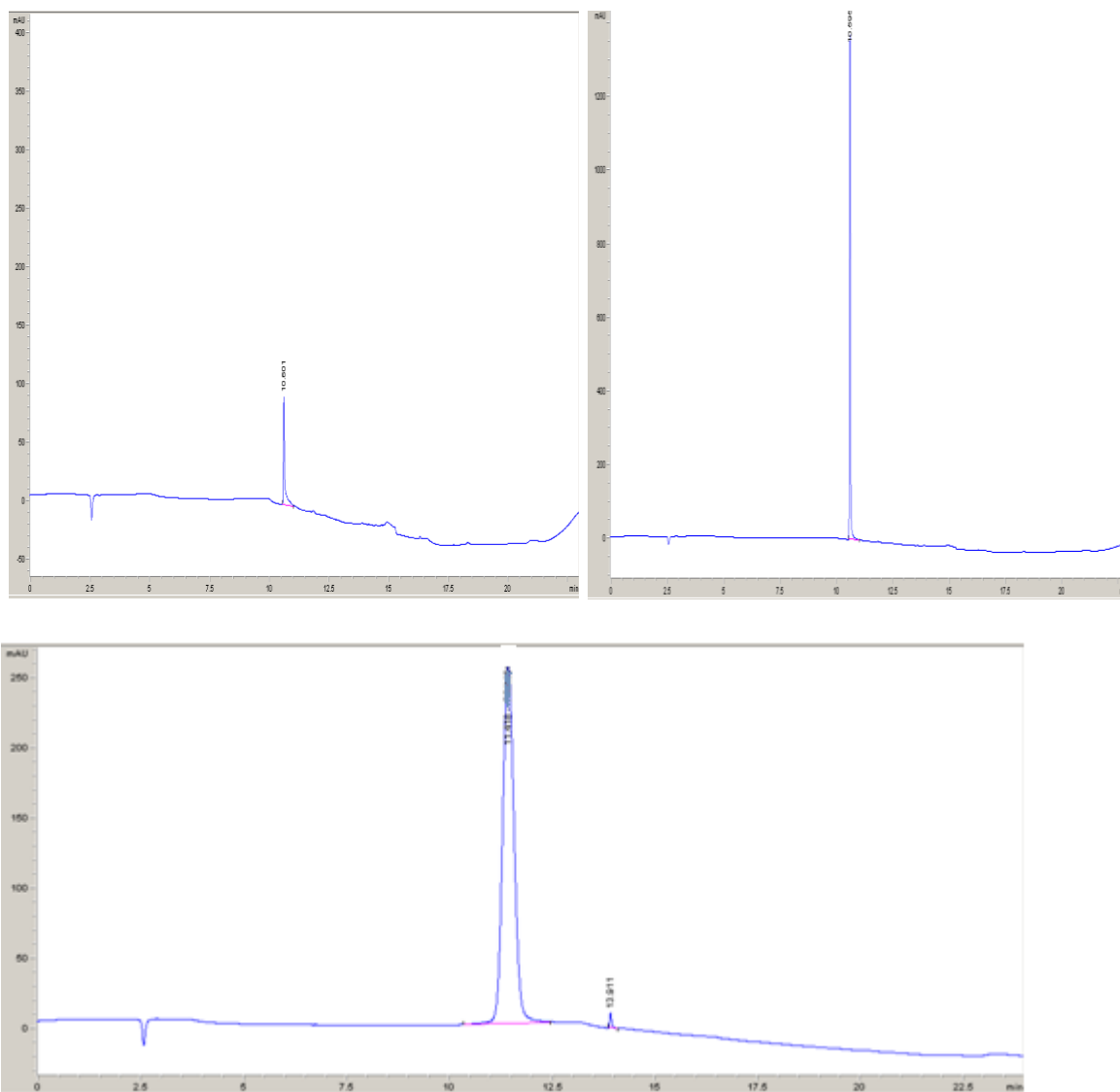
Glede na to, da smo uporabljali 25 mM fosfatni pufer, smo bili omejeni s količino ACN. Pri višjih koncentracijah fosfatnega pufera namreč ne smemo uporabiti več kot 50 % ACN, kajti fosfati se oborijo in lahko poškodujejo črpalko ali frito na koloni (40). Z namenom, da bi lahko uporabili večji delež ACN in tako dosegli še hitrejše izpiranje analitov, smo preizkusili 12,5 mM fosfatni pufer (metoda 24b). Kot je razvidno s slike 9, je simetrija kromatografskih vrhov v primerjavi s 25 mM pufrum slabša, zato smo se odločili, da ostanemo pri 25 mM pufru.



Slika 9: Primerjava kromatogramov zmesi vseh 11 analitov po metod 24a z 25 mM pufrom (rdeča) in 24b z 12,5 mM pufrom (modra).

Za začetni del kromatograma, kjer se na koloni zadržijo polarni analiti, smo ohranili izokratsko analizo. Gradient smo v analizo vključili po tem, ko so se polarni analiti že izprali s kolone. Najprej smo želeli ugotoviti, kakšna količina ACN je potrebna za čim krajšo in selektivno gradientno analizo. Najkrajši čas analize je pri gradientnem programu 6 (preglednica VIII), ki traja 20 minut, vendar metoda zaradi velikega števila analitov in kratke analize ni selektivna. Pri gradientni analizi smo opazili, da se pri gradientnih programih 7–10 kromatografski vrh gradienta topila in dipeptida Gly-Met prekrivata ($R_t=10,5$ min), zato smo poskušali z različnimi odstotki ACN spremeniti retencijski čas oziroma zmanjšati vrh gradienta topila. Izmed vseh gradientov sta bila najbolj ustrezna gradientna programa 12 in 13. Kromatografski vrh gradienta topila je bil pri višjih odstotkih ACN (40 % in več) večji kot pri nižjem odstotku (gradientni program 13).

Pri gradientnem programu 13 smo zmanjšali vrh gradienta topila in dosegli ustrezno ločitev topila od Gly-Met (slika 10).



Slika 10: Zgoraj levo: Kromatogram odziva gradienta (Rt=10,6 min) z gradientnim programom 10.

Zgoraj desno: Kromatogram Gly-Met (Rt=10,6 min) z gradientnim programom 10.

Spodaj: Kromatografski vrh Gly-Met (Rt=10,6 min), ločen od vrha gradienta (Rt=13,9 min) z gradientnim programom 13.

Z vsemi izbranimi parametri (kolona: Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 μ m; mobilna faza: pufer KH_2PO_4 pH = 8,3; gradientni program: delež ACN: 0–7 min: 0 %; 7–17 min: 20 %; 17–20 min: 20 %; 20,1–24 min: 0 %) smo dosegli selektivnost analitov, njihovi retencijski časi so prikazani v preglednici XIV, kromatogram pa na sliki 12.

Preglednica XIV: Retencijski časi analitov z metodo 24a.

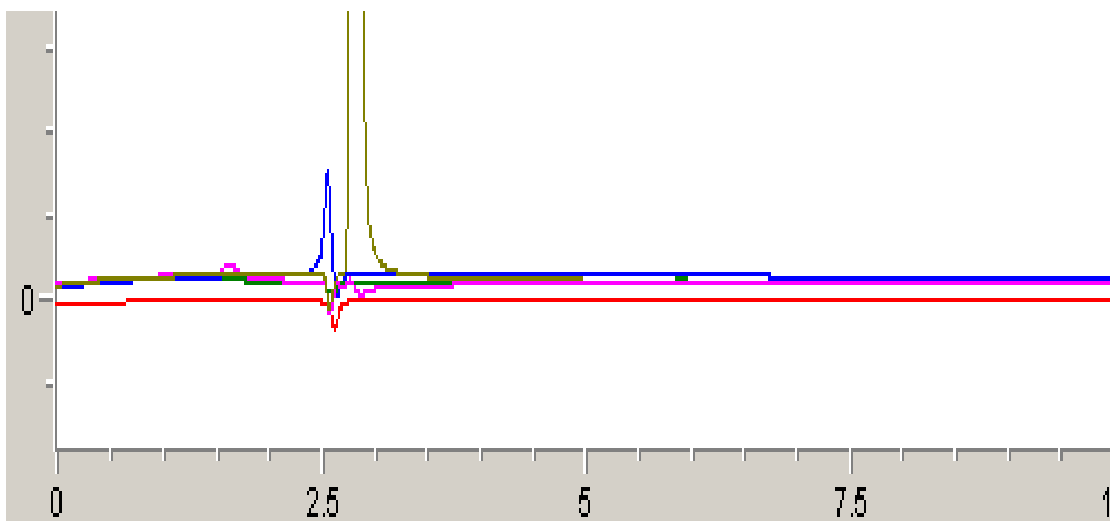
Analit	Rt (min)
Cys	2,8
His	3,2
GSH	3,7
Ala-His	4,4
Met	5,7
<i>N</i> -acetil Cys	6,6
Tyr	7,0
Gly-Met	11,7
Ala-Tyr	14,7
Trp	17,5
Leu-Tyr	20,3

4.2 VALIDACIJA METODE

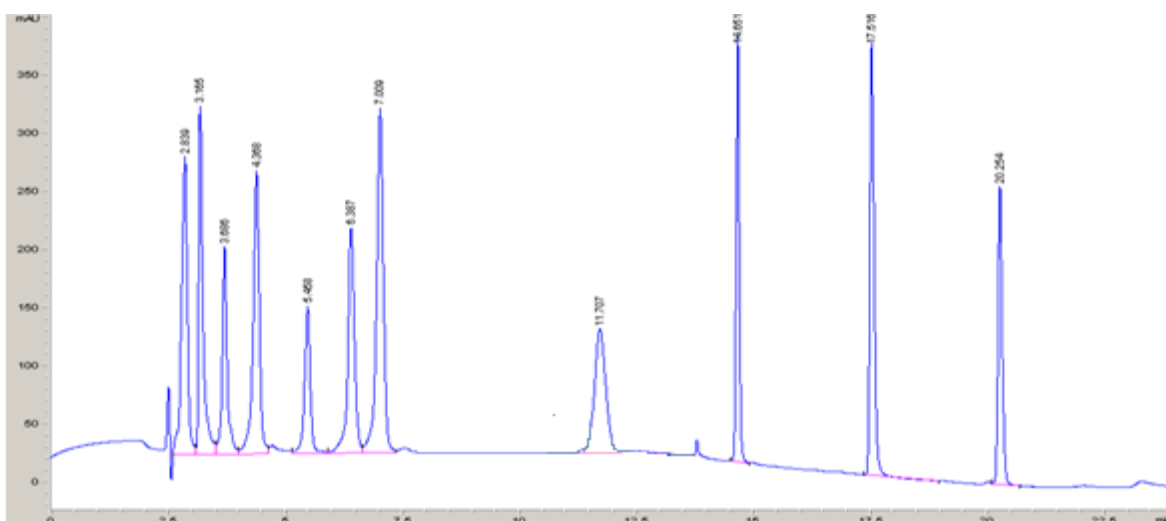
Validacijo metode smo izvedli v skladu s smernicami ICH, preverili smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, mejo zaznave in določitve ter stabilnost.

4.2.1 Selektivnost

Tekom razvoja in optimizacije metode smo uspešno ločili kromatografske vrhove analitov od vrha topila, prav tako smo med sabo ustrezno ločili kromatografske vrhove vseh enajstih analitov. S tem smo potrdili selektivnost metode, kar je razvidno s slike 12. Selektivnost smo potrdili tudi med Cys in njegovim oksidacijskim dimerom cistinom. Med študijo stabilnosti smo potrdili, da topila 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl in 0,3 % H₂O₂ ne izkazujejo kromatografskih vrhov na mestu posameznih analitov (slika 11). Izjema je le H₂O₂, ki ima kromatografski vrh na istem mestu kot Cys, zato selektivnosti ne moremo potrditi na primeru Cys in pri topilu 0,3 % H₂O₂.



Slika 11: Na kromatogramu so predstavljeni kromatografski vrhovi topil prečiščena voda (roza), raztopina 0,1 % citronske kisline (rdeča), 0,1 M NaOH (modra), 0,1 M HCl (zelena) in 0,3 % H₂O₂ (rumeno-zelena).



Slika 12: Kromatogram vseh analitov pri 100 % koncentraciji osnovne raztopine za umeritveno premico.

4.2.2 Linearnost

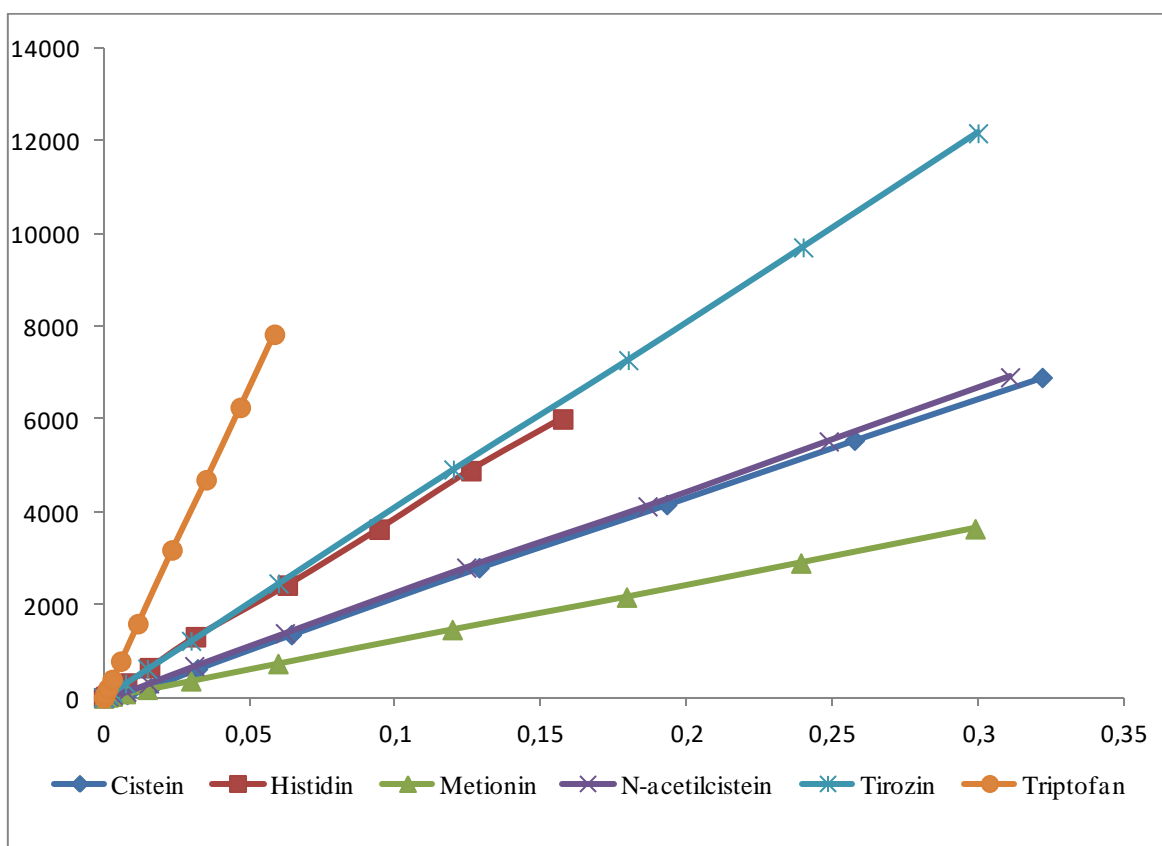
Linearnost metode smo preverili z injiciranjem kalibracijskih raztopin desetih različnih koncentracij (preglednica IX). Rezultati vrednotenja linearnosti analitov so numerično predstavljeni v preglednicah XV in XVI ter grafično na slikah 13 in 14.

Iz kromatografskih odzivov smo izračunali umeritvene premice in determinacijske koeficiente R^2 vseh enajstih analitov. Determinacijski koeficient je pri vseh analitih znašal

več kot 0,999. Z vrednostmi determinacijskega koeficienta smo potrdili, da je metoda linearna za vse analite v izbranem koncentracijskem območju.

Preglednica XV: Rezultati vrednotenja linearnosti aminokislin.

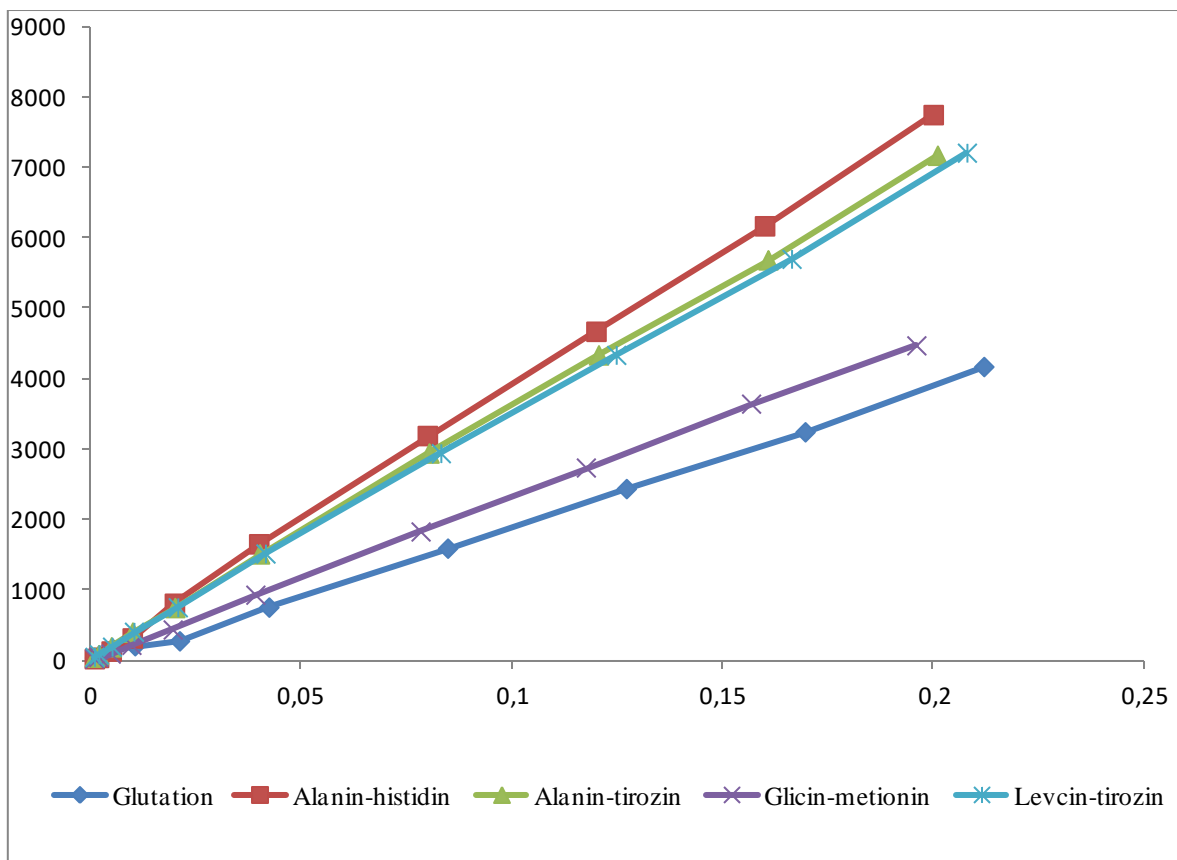
	Cys	His	Met	N-acetil Cys	Tyr	Trp
Naklon	21709,5	38290,5	12150,8	22271,2	40472,4	133518,0
Odsek na ordinati	-53,2	21,1	1,1	-14,5	11,7	9,9
R ²	0,9997	0,9997	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000



Slika 13: Grafična predstavitev rezultatov linearnosti aminokislin.

Preglednica XVI: Rezultati vrednotenja linearnosti dipeptidov in tripeptida.

	GSH	Ala-His	Gly-Met	Ala-Tyr	Leu-Tyr
Naklon	21165,9	38754,4	24130,2	33972,4	34883,8
Odsek na ordinati	17,0	-5,6	-7,2	0,9	5,8
R ²	0,9999	1,0000	1,0000	0,9999	1,000



Slika 14: Grafična predstavitev rezultatov linearnosti dipeptidov in tripeptida.

4.2.3 Ponovljivost in točnost

V preglednicah XVII in XVIII so predstavljeni rezultati za ponovljivost in točnost metode. Ponovljivost in točnost metode smo preverili s QC1 (preglednica IX). RSD kot merilo ponovljivosti šestih paralelek je bil največ 0,9 % za His, kar je znotraj postavljene meje 5 %. Ostali analiti imajo RSD med 0,2 % in 0,4 %. Največje odstopanje točnosti je prav tako pri aminokislini His, in sicer znaša 98,5 %, kar je ustrezno glede na postavljen kriterij 100 ±5 %.

Preglednica XVII: Rezultati ponovljivosti in točnosti metode za aminokisliline.

	Cys	His	Met	<i>N</i> -acetil Cys	Tyr	Trp
Izračunana koncentracija (mg/mL)	0,1610	0,0788	0,1495	0,1555	0,1500	0,0293
Dejanska koncentracija (mg/mL)	0,1632	0,0799	0,1497	0,1563	0,1507	0,0294
SD ₆ (mg/mL)	0,00041	0,0007	0,00025	0,00045	0,00058	0,00005
RSD ₆ (%)	0,3	0,9	0,2	0,3	0,4	0,2
Točnost (%)	98,7	98,5	99,9	99,5	99,5	99,7
Med-dnevna točnost (%)	100,3	99,2	101,0	104,0	98,3	98,9
Med-dnevna ponovljivost (%)	1,7	4,7	2,4	4,5	3,3	3,3
Ponovljivost injiciranja (%)	0,9	1,0	0,8	0,5	0,6	0,2
Stab. 12 h (%)	95,2	99,3	99,2	100,6	99,6	99,9
Stab. 28 h (%)	81,3	98,7	98,2	98,7	99,5	99,6

S petkratnim zaporednim injiciranjem istega vzorca QC2 (preglednica IX) smo določili tudi ponovljivost injiciranja. Največje odstopanje je pri aminokislini His in znaša 1,0 %, vendar znotraj postavljene meje 2,0 %.

Preglednica XVIII: Rezultati ponovljivosti in točnosti metode za dipeptide in tripeptid.

	GSH	Ala-His	Gly-Met	Ala-Tyr	Leu-Tyr
Izračunana koncentracija (mg/mL)	0,1045	0,1075	0,0975	0,1070	0,0980
Dejanska koncentracija (mg/mL)	0,1058	0,1073	0,0966	0,1070	0,0985
SD ₆ (mg/mL)	0,00023	0,00018	0,00038	0,00038	0,00041
RSD ₆ (%)	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4
Točnost (%)	98,8	100,2	101,0	100,0	99,5
Meddnevna točnost (%)	96,4	104,0	97,3	99,8	99,4
Meddnevna ponovljivost (%)	3,0	2,9	3,2	2,4	3,1
Ponovljivost injiciranja (%)	0,6	0,3	0,6	0,5	0,3
Stab. 12 h (%)	99,7	99,7	100,6	98,7	99,9
Stab. 28 h (%)	97,1	98,9	100,8	99,3	98,4

Med-dnevno ponovljivost in točnost smo določili s QC2 (preglednica IX). Merilo za med-dnevno ponovljivost je RSD povprečne vrednosti rezultatov treh dni. Najvišji RSD je pri aminokislinah His (4,7 %) in *N*-acetil Cys (4,5 %), vendar še vedno znotraj postavljene meje 5,0 %. Najboljšo med-dnevno ponovljivost izkazuje aminokislina Cys (1,4 %).

Med-dnevna točnost največ odstopa pri aminokislini *N*-acetil Cys in dipeptidu Ala-His, in sicer za 4 %, vendar so rezultati znotraj postavljene meje 100 % ±5 %.

4.2.4 Meja zaznave in meja določitve

Meja zaznave (LOD) in meja določitve (LOQ) sta izraza za najmanjšo koncentracijo, ki jo je mogoče zanesljivo določiti z analizo metodo. Meja zaznave je najnižja koncentracija analita, za katero lahko zanesljivo rečemo, da ni šum, medtem ko lahko analit na meji določitve tudi zanesljivo kvantificiramo.

Meje zaznave in meje določitve analiziranih spojin, določene s QC2 (preglednica IX), se nahajajo pri nizkih koncentracijah reda od 10⁻³ do 10⁻¹ mg/mL (preglednica XIX in XX).

Preglednica XIX: Preglednica rezultatov LOD in LOQ za aminokisljine.

	Cys	His	Met	N-acetil Cys	Tyr	Trp
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	4,1	4,2	1,4	1,2	1,0	0,3
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	12,5	13,0	4,3	3,4	3,2	1,2

Preglednica XX: Preglednica rezultatov LOD in LOQ za dipeptide in tripeptid.

	GSH	Ala-His	Gly-Met	Ala-Tyr	Leu-Tyr
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	3,2	1,8	1,6	0,6	0,1
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	9,9	5,6	4,9	1,8	0,5

4.2.5 Stabilnost vzorcev

Test stabilnosti kontrolnih raztopin smo izvedli pri QC1 (preglednica IX). Raztopine smo analizirali ob času 0 h, 12 h in 28 h ter preko zmanjšanja odzivov analitov vrednotili stabilnost. Rezultati stabilnosti pri 12 h in 28 h so razvidni v preglednicah XVII in XVIII. Ugotovili smo, da je bil upad koncentracije pri vseh analitih manjši kot 2 % po 28 h, razen pri Cys. Pričakovano je opazen večji upad koncentracije pri aminokisljini Cys, po 12 h je ostalo 95,2 %, po 28 h se je koncentracija Cys zmanjšala še za 13,9 %. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da so spojine, raztopljene v 0,1% citrinski kislini, stabilne najmanj 28 h, razen raztopine Cys, ki je stabilna do 12 h.

4.2.6 Rezultati validacije metode

Selektivnost

USTREZA, razen Cys v prisotnosti vodikovega peroksida

Linearnost

Meja sprejemljivosti: $R^2 \geq 0,999$

$R^2 = 0,9997 - 1,0000$ USTREZA

Ponovljivost

Meja sprejemljivosti: RSD ne sme biti večji od 5 %.

RSD = 0,2 % – 0,9 % < 5 % USTREZA

Ponovljivost injiciranja

Meja sprejemljivosti: RSD ne sme biti večji od 2 %.

RSD = 0,2 % – 1,0 % < 2 % USTREZA

Med-dnevna ponovljivost

Meja sprejemljivosti: RSD ne sme biti večji od 5 %.

RSD = 1,7 % – 4,7 % < 5 % USTREZA

Točnost

Meja sprejemljivosti: 95 % – 105 %

98,5 % – 101,0 % USTREZA

Med-dnevna točnost

Meja sprejemljivosti: 95 % – 105 %

96,4 % – 104,0 % USTREZA

Stabilnost

Meja sprejemljivosti: 95 % – 105 %

Cys do 12h; ostali analiti vsaj 28h

4.3 REZULTATI STRESNE ŠTUDIJE

Po ovrednotenju smo metodo aplicirali v stresni študiji, ki smo jo izvajali v skladu z ICH-smernicami (Q1A). Stresne teste smo izvajali pri dveh različnih temperaturah (25 in 40 °C) in v treh različnih medijih (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, 0,3 % H₂O₂). Raztopine smo analizirali v naslednjih časovnih točkah: 0, 4, 8, 16, 20, 36 h. Vrednotili smo posamezne analite in tri zmesi: zmes 1 (zmes vseh analitov: Cys, His, GSH, Ala-His, Met, *N*-acetil Cys, Tyr, Gly-Met, Trp, Leu-Tyr, Ala-Tyr), zmes 2 (zmes aminokislin z vsebujočim žveplom: Cys, GSH, Met, *N*-acetil Cys, Gly-Met) in zmes 3 (zmes aminokislin z vsebujočim aromatskim obročem: Tyr, Ala-Tyr, Trp, Leu-Tyr). Posamezne analite smo vrednotili zato, da smo ugotovili njihovo občutljivost na temperaturo, hidrolizo, oksidacijo in svetlobo. Zmesi pa smo analizirali z namenom, da ugotovimo medsebojni vpliv analitov, izpostavljenim različnim pogojem. Rezultati stresnih študij so predstavljeni v prilogi v preglednicah XXIV-XXXIV.

- Vpliv temperature

Analite smo izpostavili temperaturama 25 in 40°C, v vodnem mediju. Pri 25°C so nestabilnost izkazale aminokislina Cys, His in Cys. Prav tako je nestabilnost pri obeh temperaturah pokazal tripeptid GSH. Cys, GSH in *N*-acetil Cys so spojine, ki vsebujejo Cys, iz česar lahko sklepamo, da so aminokislina ki vsebujejo Cys relativno nestabilne. Povišanje temperature na 40°C še poveča nestabilnost spojin Cys, GSH in *N*-acetil Cys. Najbolj občutljiv na povišanje temperature je GSH, ki po 36 h popolnoma razpade. His pri obeh temperaturah izkazuje približno enako nestabilnost, tako da sprememba temperature ne vpliva na njegovo stabilnost. Rezultati za Cys, His, GSH in *N*-acetil-Cys pri različnih temperaturah so predstavljeni v preglednici XXI. Aminokislina Tyr in Trp sta pri temperaturah 25 in 40°C stabilni, kar je razvidno iz tabele XXII.

Preglednica XXI: Rezultati stresne študije Cys, His, GSH in *N*-acetil Cys pri temperaturah 25 in 40°C, v vodnem mediju. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t (h)	Cys		His		GSH		N-acetil Cys	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
4	94	45	100	95	97	76	92	91
36	51	35	90	93	85	0	68	0

Preglednica XXII: Rezultati stresne študije Tyr in Trp pri temperaturah 25°C in 40°C, v vodnem mediju. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t (h)	Tyr				Trp			
	25°C	40°C	0,1 M NaOH	0,1 M HCl	25°C	40°C	0,1 M NaOH	0,1 M HCl
4	100	100	100	100	100	100	100	100
36	100	100	99	100	100	100	98	100

- Vpliv pH

Analite smo izpostavili tako bazičnemu kot kislemu okolju. V bazičnem okolju smo ponovno opazili nestabilnost spojin Cys, GSH in N-acetil Cys. N-acetil Cys, po 36h popolnoma razpade. V bazičnem okolju je prav tako nestabilna aminokislina Met, saj že prej kot v 4h popolnoma izgine. Iz teh podatkov je razvidno, da so spojine, ki vsebujejo -SH skupino občutljive na bazičen pH, kar je razvidno iz preglednice XXIII. V bazičnem okolju so spojine bolj podvržene oksidaciji zato opazimo, da so spojine v bazičnem bolj nestabilne kot v vodnem okolju. Ravno obratno pa se spojine z vsebujočo -SH skupino obnašajo v kislem. GSH, N-acetil Cys in Met so v kislem stabilni. Cys pa je v kislem okolju bolj stabilen kot pri ostalih stresnih pogojih. Na splošno lahko rečemo, da so aminokislina, ki vsebujejo -SH skupino bolj stabilne v kislem kot v bazičnem okolju, kar je razvidno iz preglednice XXIII. Aromatski aminokislina Tyr in Trp sta stabilni tako v bazičnem kot kislem okolju, rezultati so predstavljeni v tabeli XXII.

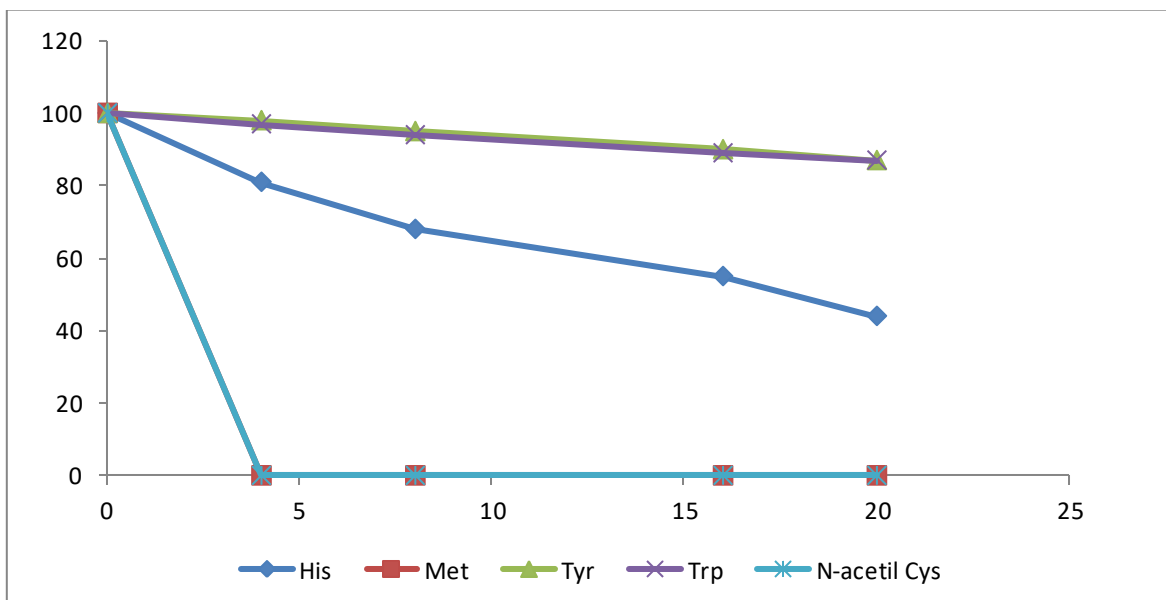
Preglednica XXIII: Rezultati stresne študije vpliva pH-ja na aminokislina. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t (h)	Cys		GSH		N-acetil Cys		Met	
	0,1 M NaOH	0,1 M HCl	0,1 M NaOH	0,1 M HCl	0,1 M NaOH	0,1 M HCl	0,1 M NaOH	0,1 M HCl
4	87	95	99	99	62	97	0	100
36	49	71	59	99	1	99	0	100

- Vpliv oksidacije

Aminokislina, ki smo jih analizirali so oksidacijsko nestabilne, tako da smo največjo nestabilnost pričakovali ravno pri pogojih 0,3% H₂O₂. Najbolj občutljivi sta na oksidacijo

aminokislini Met in N-acetil Cys, ki sta že ob prvem analiziranem času (po 4h) popolnoma razpadla. Prav tako je zelo občutljiv na oksidacijo tripeptid GSH, ki vsebuje Cys. Tudi pri oksidacijskih pogojih se kaže vzorec, da so spojine z –SH skupino najbolj nestabilne. Pri oksidaciji sta rahlo nestabilnost pokazali tudi aminokislini Tyr in Trp. Rezultati vpliva oksidacijskih pogojev na aminokislino so grafično prikazani na sliki 15.



Slika 15: Vpliv vodikovega peroksida (oksidacije) na stabilnost aminokislin.

- Vpliv UV

Rezultati stresne študije vpliva UV svetlobe na stabilnost aminokislin so enaki rezultatom pri temperaturi 25°C v vodnem mediju. Prav tako, kot pri temperaturi 25°C, so pri izpostavljeni UV svetlobi relativno nestabilne spojine Cys, GSH, His in N-acetil Cys. To so vse spojine, ki vsebujejo –SH skupino. Aromatski aminokislini Tyr in Trp sta tako kot pri temperaturi 25°C tudi na UV svetlobi stabilni.

- Vpliv strukture

Stresno študijo smo izvedli tudi na dipeptidih izbranih petih aminokislin in tripeptidu GSH. S tem smo želeli predvsem ugotoviti kako struktura vpliva na aminokislino pri različnih pogojih.

Opazili smo, da je dipeptid Ala-His približno enako stabilen kot aminokislina His. Razen v oksidativnem okolju, kjer je Ala-His občutno bolj stabilen kot His.

Primerjali smo tudi spojini Met in Gly-Met. Aminokislina Met je v bazičnem okolju popolnoma nestabilna, medtem ko je v obliki dipeptida stabilizirana. Met in Gly-Met sta občutljiva na oksidativno okolje, kjer sta nestabilna. Pri ostalih pogojih imata primerljivo stabilnost.

Aminokislino Tyr smo imeli v dveh dipeptidih Ala-Tyr in Leu-Tyr. Opazamo, da so spojine pri vseh pogojih, razen oksidativnem, stabilne. V oksidativnem okolju smo opazili, da je aminokislina Tyr nestabilna, medtem ko sta dipeptida stabilna.

Na splošno lahko povzamemo, da so aminokislina vezane v dipeptide stabilnejše kot pa posamezne aminokislina.

- **Vpliv zmesi**

Z namenom, da ugotovimo, kako analiti medsebojno vplivajo pri različnih pogojih, smo analizirali zmes vseh analitov. Ker je tiolna funkcionalna skupina bolj dovzetna za oksidacijo, smo posebej analizirali analite s tiolno skupino (Cys, GSH, Met, N-acetil Cys, Gly-Met). Prav tako smo posebej analizirali analite z aromatsko skupino (Tyr, Trp, Ala-Tyr, Leu-Tyr).

Pri aminokislini Cys smo opazili, da je pri 25°C bolj stabilna, če se nahaja v zmesi kot pa posamezno. Ravno obratno se obnaša pri povišani temperaturi, torej je bolj stabilna posamezno. Podobno se obnaša tudi N-acetil Cys, ki je v zmesih bolj stabilen kot sam. Cys in N-acetil Cys sta najbolj stabilna v zmesi 2.

Tripeptid GSH je pri temperaturah 25°C in 40°C najbolj stabilen v zmesi 2, v kateri so spojine z vsebujočo -SH skupino. V zmesi 1 je tripeptid GSH najmanj stabilen, kar je pričakovano glede na njegovo naravo, namreč stabilizira ostale spojine. Ker GSH v oksidativnem okolju deluje kot antioksidant je najbolj stabilen ko je sam (41).

Aminokislina Met je v zmesih 1 in 2 pri povišani temperaturi manj stabilna kot, če je sama. Njegov dipeptid Gly-Met je enako stabilen posamezno ali v zmesi.

Aromatska aminokislina Tyr je v zmesi 1 in 3, pri oksidativnih pogojih, bolj stabilna kot posamezno. Dipeptida, ki vsebujeta Tyr sta stabilna tako posamezno kot v zmesih. Podobna opažanja so tudi pri aromatski aminokislini Trp, ki je pri oksidativnih pogojih najbolj stabilen v zmesi 3.

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo razvili in optimizirali neposredno metodo HPLC za kvantitativno vrednotenje oksidativnih aminokislin, njihovih dipeptidov in tripeptid. Metoda omogoča vrednotenje vsebnosti aminokislin, dipeptidov in tripeptida v raztopini, brez predhodne priprave vzorcev. Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

- Z metodo smo zagotovili selektivnost med aminokislino Cys in njegovim derivatom cistinom.
- Za ustrezno kvantifikacijo je treba aminokislino Cys stabilizirati, zato smo raztopine pripravljali z raztopino citronske kisline.
- Metodo HPLC smo validirali v skladu s smernicami ICH in potrdili njeno selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, mejo zaznave in mejo določitve.
- Metoda omogoča vrednotenje analiziranih aminokislin, dipeptidov in tripeptida v 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl in 0,3 % H₂O₂. Izjema je aminokislina Cys, ki je v topilu 0,3 % H₂O₂ zaradi neustrezne selektivnosti, ne moremo kvantificirati.

Validirano metodo smo aplicirali na stresno študijo kjer smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Aminokislina z vsebujočo –SH skupino so bolj stabilne v kislem kot v bazičnem okolju.
- Aminokislina so bolj stabilne v dipeptidu kot posamezno.
- Aminokislina z vsebujočo –SH skupino so najbolj stabilne v zmesi, kjer se nahajajo skupaj.
- Na stresne pogoje so najmanj občutljive aminokislina z aromatsko skupino.
- Na oksidacijske pogoje so najbolj občutljive aminokislina z –SH skupino. Poleg teh sta na oksidacijo občutljiva tudi Tyr in Trp.

6 LITERATURA

- (1) G. C. Barrett in D. T. Elmore, *Amino Acids and Peptides*. Cambridge University Press, 1998.
- (2) A. Kessel, N. Ben-Tal, *Amino Acids: Chemistry, Biochemistry & Nutrition*. Taylor & Francis Group, 2010.
- (3) D. R. Ferrier, *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- (4) J. T. Brosnan in M. E. Brosnan, *The Sulfur-Containing Amino Acids*, *J. Nutr.* 2006, 6: 1636S-1640S,
- (5) R. Masella in G. Mazza, *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease.*, John Wiley & Sons, 2009.
- (6) L. Chaitow, *Amino Acids in Therapy: A Guide to the Therapeutic Application of Protein Constituents*. Inner Traditions / Bear & Co, 1985.
- (7) J. Bland, *Medical Applications of Clinical Nutrition*. Keats Pub., 1983.
- (8) R. J. Wurtman, *Aromatic Amino Acids in the Brain*, Mouton & Co, 1974
- (9) M. B. Stargrove, J. Treasure, in D. L. McKee, *Herb, Nutrient, and Drug Interactions: Clinical Implications and Therapeutic Strategies.*, Elsevier Health Sciences, 2008.
- (10) G. Lubec, G. A. Rosenthal, *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine*. Springer Science & Business Media, 2012.
- (11) W. Kochen in H. Steinhart, *L-tryptophan: Current Prospects in Medicine and Drug Safety*. Walter de Gruyter, 1994.
- (12) E. Bald in R. Glowacki, *2-chloro-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV-tagging reagent for liquid chromatography*, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2001, 24: 1323–1339.
- (13) M. C. Wąsowska J. Kowalczyk, K. M. Niedźwiedzka and I., *A highly efficient method for determination of some amino acids and glutathione by liquid chromatography*, *J. Anim. Feed Sci.* 2003, 12: 199–215.
- (14) *Evropska farmakopeja Ph.Eur.* 9.0, EDQM, 2016.
- (15) L. M. L. Nollet in F. Toldra, *Handbook of Dairy Foods Analysis*. CRC Press, 2009.
- (16) M. W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, 2006.
- (17) L. M. L. Nollet in F. Toldra, *Handbook of Muscle Foods Analysis*. CRC Press, 2008.
- (18) J. F. Lawrence in R. W. Frei, *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography.*, Elsevier, 2000.

- (19) M. F. Vitha, *Chromatography: Principles and Instrumentation*. John Wiley & Sons, 2016.
- (20) L. M. L. Nollet in F. Toldra, *Food Analysis by HPLC, Third Edition*. CRC Press, 2012.
- (21) Y. V. Kazakevich in R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, 2007.
- (22) M. S. Tswett, *Chromophilis in Animal and Plant World, Doctor of Science dissertation*,. Warsaw, 1910.
- (23) D. Corradini, E. E. (Katz), R. Eksteen, P. Schoenmakers, in N. Miller, *Handbook of HPLC*. CRC Press, 2011.
- (24) S. Ahuja in M. Dong, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier, 2005.
- (25) D. Parriott, *A Practical Guide to HPLC Detection*., Academic Press, 2012.
- (26) K. Huynh-Ba, *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*., Springer Science & Business Media, 2009.
- (27) International Conference on Harmonization Guidelines, *Validation of analytical procedures Q2(R1), Proceeding of the International Conference of Harmonization (ICH), Commission of the European Communities*. 2005
- (28) K. Huynh-Ba, *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices*. Springer Science & Business Media, 2008.
- (28) S. W. Baertschi, K. M. Alsante, in R. A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, Second Edition*., CRC Press, 2016.
- (29) Banker G.S., Rhodes C.T., *Modern Pharmaceuticals: Third Edition, revised and expanded*. New York: Marcel Dekker Inc., 1996.
- (30) S. Yoshioka in V. J. Stella, *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Springer Science & Business Media, 2007.
- (31) Ž. Temova, R. Roškar, *Stabilnost terapevtskih proteinov, Farm.Vest.*, 2018, 69: 236–243.
- (32) Waterman K.C., Adami R.C., Alsante K.M., Hong J., Landis M.S., Lombardo F., Roberts C.J., *Stabilization of Pharmaceuticals to oxidative Degradation*, Pharm. Dev. Technol., 2002, 7(1): 1–32.

- (33) Blessy M, Ruchi D P, Prajesh N P, Y K Agrawal, *Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs*, J. Pharm. Anal., 2014, 4(3): 159–165.
- (34) ICH, *Stability testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*, International Conference on Harmonization, ICPMA, 2003.
- (35) ICH, *Stability testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Product Q1B*, International Conference on Harmonization, ICPMA, 1996.
- (36) Iram F, Iram H, Iqbal A, Husain A, *Forced Degradation Studies*, J. Anal. Pharm. Res., 2016, 3(6).
- (37) Charde M S, Kumar J, Welankiwar A S, Chakole R D, *Development of forced degradation studies of drugs*, Int. J. Adv. Pharm., 2013, 2(3): 34–40.
- (38) „Kemomed predstavitev - Kemomed d.o.o.“ (Na spletu). Dostopno na: <http://kemomed.si/products/5-hplc-in-gc-potrosni-material/19-Phenomenex/33-HPLC+kolone> (dostopano april 2018)
- (39) R. Paroni, *HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total, oxidized, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue.*, Clin. Chem., 1995, 3: 448–454.
- (40) J. Ermer in J. H. M. Miller, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. John Wiley & Sons, 2006.
- (41) C. Kerksick in D. Willoughby, *The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress*, J. Int. Soc. Sports Nutr., 2005, 2: 38–44.

PRILOGE

Rezultati stresne študije aminokislin, dipeptidov in tripeptida so predstavljeni v preglednicah XXIV-XXXIV.

Preglednica XXIV: Rezultati stresne študije za aminokislino Cys. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2
4	94	98	97	45	93	96	87	87	90	95	75	89	94	98	97
8	85	95	96	43	61	88	72	72	82	83	67	89	/	/	/
16	71	94	96	39	43	82	59	38	63	74	64	88	/	/	/
20	59	92	95	39	28	54	53	29	52	76	65	89	59	92	95
36	51	76	86	35	13	25	49	42	46	71	77	81	/	/	/

Preglednica XXV: Rezultati stresne študije za aminokislino His. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C		T = 40 °C		0,1 M NaOH		0,1 M HCl		0,3 % H ₂ O ₂		UV svetloba	
	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1
4	100	98	95	100	99	98	98	104	81	94	100	98
8	99	92	94	104	101	95	97	98	68	94	/	/
16	99	87	95	105	101	92	98	101	55	95	/	/
20	96	87	93	105	98	90	98	98	44	95	96	87
36	90	81	93	80	101	91	98	100	/	/	/	/

Preglednica XXVI: Rezultati stresne študije za tripeptid GSH. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2
4	97	97	100	76	93	95	99	99	96	99	81	93	45	0	0	97	97	100
8	91	94	99	60	88	92	99	92	92	99	83	89	40	0	0	/	/	/
16	83	86	99	41	66	85	100	70	78	94	80	86	34	0	0	/	/	/
20	87	79	93	16	54	79	96	59	56	95	76	83	28	0	0	87	79	93
36	85	76	88	0	0	57	59	0	49	99	57	57	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXVXXIV: Rezultati stresne študije za dipeptid Ala-His. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C		T = 40 °C		0,1 M NaOH		0,1 M HCl		0,3 % H ₂ O ₂		UV svetloba	
	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1	Sam	Zmes 1
4	103	100	98	100	98	100	100	96	96	70	103	100
8	99	98	97	99	97	96	101	96	91	70	/	/
16	99	96	97	100	100	101	99	101	95	75	/	/
20	99	97	96	99	96	100	99	102	94	71	99	97
36	98	96	93	95	97	100	101	103	/	/	/	/

Preglednica XXVIII: Rezultati stresne študije za aminokislino Met. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2
4	100	98	100	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	100	98	100
8	100	98	99	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	/	/	/
16	100	98	99	102	98	99	0	0	0	100	99	100	0	0	0	/	/	/
20	100	99	99	101	95	97	0	0	0	101	99	100	0	0	0	100	99	99
36	100	97	99	100	86	92	0	0	0	99	99	100	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXIX: Rezultati stresne študije za aminokislino N-acetil-Cys. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2
4	92	99	99	91	98	98	62	91	92	97	99	100	0	0	0	92	99	99
8	90	97	98	77	93	95	37	79	85	96	99	100	0	0	0	/	/	/
16	86	96	97	47	81	88	6	50	68	96	98	99	0	0	0	/	/	/
20	89	99	100	32	73	85	2	47	53	96	97	98	0	0	0	89	99	100
36	68	90	94	0	10	62	1	50	49	99	97	98	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXX: Rezultati stresne študije za aminokislino Tyr. Stabilnost je izražena v % , glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba			
	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	99	98	101	100	100	100	100	100
8	99	100	99	100	101	100	99	100	100	100	98	99	95	101	99	/	/	/	
16	99	100	99	102	101	101	100	99	100	100	98	99	90	100	98	/	/	/	
20	100	99	98	101	101	101	100	98	100	100	98	99	87	100	97	100	99	98	
36	100	100	98	100	96	98	99	98	100	100	97	98	/	/	/	/	/	/	

Preglednica XXXI: Rezultati stresne študije za dipeptid Gly-Met. Stabilnost je izražena v % , glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2	Sam	Zmes 1	Zmes 2
4	100	98	98	99	100	101	99	95	100	100	93	101	0	0	0	100	98	98
8	98	98	99	95	99	101	98	97	101	99	92	98	0	0	0	/	/	/
16	97	97	98	99	99	99	95	100	101	99	94	99	0	0	0	/	/	/
20	98	97	99	99	99	95	96	100	102	99	94	98	0	0	0	98	97	99
36	96	96	96	97	99	95	100	100	98	98	93	98	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXXII: Rezultati stresne študije za dipeptid Ala-Tyr. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3
4	100	101	100	100	99	100	100	99	100	100	98	100	99	99	100	100	101	100
8	100	101	100	101	99	101	98	100	100	100	97	100	98	99	99	/	/	/
16	100	101	99	101	100	101	98	100	100	100	98	100	96	98	98	/	/	/
20	101	101	99	100	99	101	98	100	101	100	99	100	95	97	98	101	101	99
36	100	100	99	101	98	99	97	100	100	99	99	99	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXXIII: Tabela rezultatov stresnih študij za aminokislino Trp. Stabilnost je izražena v %, glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3
4	101	97	100	100	100	101	100	100	100	100	98	100	97	95	99	101	97	100
8	100	97	99	100	101	101	98	100	100	100	98	100	94	93	98	/	/	/
16	101	96	99	99	101	101	98	100	100	100	98	100	89	90	96	/	/	/
20	101	96	99	99	101	101	97	99	100	100	98	100	87	88	95	101	96	99
36	100	94	99	100	98	99	98	98	99	100	98	100	/	/	/	/	/	/

Preglednica XXXIV: Rezultati stresne študije za dipeptid Leu-Tyr. Stabilnost je izražena v % , glede na začetno koncentracijo.

t[h]	T = 25 °C			T = 40 °C			0,1 M NaOH			0,1 M HCl			0,3 % H ₂ O ₂			UV svetloba		
	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3	Sam	Zmes 1	Zmes 3
4	100	100	99	99	98	99	100	100	100	101	101	100	99	99	100	100	100	99
8	100	100	99	99	99	99	99	99	100	100	101	100	98	99	96	/	/	/
16	100	100	99	100	99	100	100	100	100	100	101	99	96	98	98	/	/	/
20	100	100	98	99	99	100	100	100	100	99	101	99	94	97	97	100	100	98
36	100	99	100	100	99	97	100	100	100	100	101	99	/	/	/	/	/	/

* Sam; analizirali smo vsak posamezen analit.

** Zmes 1; analizirali smo zmes v kateri so bili analiti Cys, His, Tyr, Met, Trp, *N*-acetil Cys, Ala-His, Gly-Met, Ala-Tyr, Leu-Tyr in GSH.

*** Zmes 2; analizirali smo zmes v kateri so bili analiti Cys, Met, *N*-acetil Cys, Gly-Met in GSH.

**** Zmes 3; analizirali smo zmes v kateri so bili analiti Tyr, Trp, Ala-Tyr in Leu-Tyr.