

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMON KOLAR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJA PLAZEMSKIH
KONCENTRACIJ OKSIDIRANE IN REDUCIRANE OBLIKE
GLUTATIONA S POMOČJO FLUORESCENČNIH LIGANDOV**

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR
DETERMINATING REDUCED AND OXIDIZED GLUTATHIONE
LEVELS IN PLASMA WITH THE AID OF FLUORIMETRIC
PROBES**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom asist. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.. Spektroskopske in kromatografske meritve sem izvajal v laboratorijih Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Zahvaljujem se mentorju za pomoč pri načrtovanju in izvajanju praktičnega dela ter za izkazano zaupanje pri samostojnem delu z aparaturo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom asist. dr. Tomaža Vovka, mag. farm..

Vsebina

1. POVZETEK	1
3. SEZNAM OKRAJŠAV	3
4. UVOD.....	4
4.1. <i>Glutation</i>	<i>4</i>
4.2. <i>Osnove fluorescense</i>	<i>11</i>
4.3. <i>Delovanje fluorescenčnega detektorja.....</i>	<i>13</i>
5. NAMEN DELA	15
6. MATERIALI.....	16
6.1. <i>Biološki material.....</i>	<i>16</i>
6.2. <i>Standardi.....</i>	<i>16</i>
6.3. <i>Reagenti in topila.....</i>	<i>16</i>
6.4. <i>Naprave in pribor</i>	<i>17</i>
7. METODE.....	18
7.1. <i>Kromatografske metode</i>	<i>18</i>
7.2. <i>Priprava bioloških vzorcev</i>	<i>18</i>
7.3. <i>Osnovna metoda določanja GSH.....</i>	<i>19</i>
7.4. <i>Osnovna metoda določanja GSSG.....</i>	<i>19</i>
7.5. <i>Optimizacija kromatografskih pogojev.....</i>	<i>19</i>
7.6. <i>Optimizacija detekcije.....</i>	<i>20</i>
7.7. <i>Optimizacija metode določanja GSH.....</i>	<i>21</i>
7.8. <i>Optimizacija metode določanja GSSG.....</i>	<i>22</i>
7.9. <i>Validacija.....</i>	<i>23</i>
8. REZULTATI.....	28
8.1. <i>Optimizacija detekcije.....</i>	<i>28</i>
8.2. <i>Optimizacija kromatografskih pogojev.....</i>	<i>32</i>
8.3. <i>Optimizacija metode določanja GSH.....</i>	<i>33</i>
8.4. <i>Metoda določanja GSSG.....</i>	<i>37</i>
8.5. <i>Validacija.....</i>	<i>42</i>
9. RAZPRAVA	53
9.1. <i>Izbor metode.....</i>	<i>53</i>
9.2. <i>Optimizacija detekcije.....</i>	<i>53</i>
9.3. <i>Optimizacije kromatografskih pogojev</i>	<i>54</i>
9.4. <i>Optimizacija metode določanja GSH.....</i>	<i>55</i>
9.5. <i>Optimizacija metode določanja GSSG.....</i>	<i>55</i>
9.6. <i>Validacija.....</i>	<i>57</i>
10. SKLEPI.....	58
11. LITERATURA	59

1. Povzetek

Glutation je glavni tiolni antioksidant, ki sodeluje pri celični obrambi. Njegova koncentracija v krvi je klinični kazalnik oksidativnega stresa organizma in je spremenjena pri nekaterih patoloških procesih. Detekcija je možna neposredno z elektrokemijskimi metodami ali tandem masno spektrometrijo, z uvedbo derivatizacije pa lahko uporabimo cenovno učinkovitejše metode. V okviru diplomske naloge smo razvili metodi za določevanje reducirane (GSH) in oksidirane (GSSG) oblike glutaciona v plazmi z uporabo HPLC separacijske tehnike in fluorescenčne detekcije.

Izhodni vzorec za določanje GSH je predstavljala kri z dodanim antikoagulantom. Po centrifugiranju smo plazmi z dodatkom metafosforjeve kisline oborili proteine in jih odstranili s ponovnim centrifugiranjem. Supernatant smo razredčili z derivatizacijskim pufrom s pH 9 ter dodali fluorescenčni ligand orto-ftaldialdehid, ki reagira s sulfhidrilno in amino skupino glutaciona do tricikličnega produkta s fluorescenčnimi lastnostmi.

Postopek priprave vzorcev za določanje GSSG je zelo podoben. Razlikuje se v uporabi derivatizacijskega pufru s pH 13 namesto 9, predhodni odstranitvi GSH z dodatkom *N*-etilmaleinimida ter dodatkom borove kisline v končni stopnji z namenom znižanja pH. Občutljivosti metod smo izboljšali z optimizacijo sestave derivatizacijskega pufru, koncentracije reagentov ter kromatografskih in detekcijskih pogojev. Zaradi motečega vpliva oksidacije GSH metode določanja GSSG nismo uspeli izpopolniti. Kljub številnim poskusom optimizacije na ravni odvzema vzorca in postopka alkilacije GSH nam ni uspelo oksidacije dovolj upočasniti.

Obe metodi smo razvili na koloni Luna C18, termostahirani na 40° C. Mobilna faza je bila sestavljena iz 15% metanola in 85% 25 mmol/l fosfatnega pufru pH 6. Elucija je potekala izokratsko s pretokom 0,7 ml/min. Volumen injiciranja je znašal 50 µl za GSH in 100 µl za GSSG. Detekcijo smo izvajali pri valovnih dolžinah ekscitacije 420 nm in emisije 340 nm. Območje linearnosti je bilo od 0,2 – 20 µmol/l za GSH in 0,1 – 2 µmol/l za GSSG. Meji kvantifikacije sta znašali 0,19 µmol/l za GSH in 0,036 µmol/l za GSSG. Točnost je bila v območju od 86,1 do 111,7% za GSH in od 86,4 do 113,6% za GSSG. Najboljša oz. najslabša ponovljivost je bila 0,67 oz. 5,1% za GSH in 1,16 oz. 4,53% za GSSG. V postopku validacije smo dokazali, da ustrezno optimizirana metoda omogoča zanesljivo določevanje GSH v humani plazmi.

2. Abstract

Glutathione stands out as an essential antioxidant involved in cellular defense. Its level is indicative in oxidative stress and may change in the presence of a pathological process. Tandem mass spectrometry and electrochemical methods allow direct measurements of glutathione levels. With the addition of a derivatisation procedure more common and cost-effective instrumentation may be used. An HPLC method for determination of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in human plasma with fluorescent detection has been developed and evaluated.

For GSH determination samples of peripheral venous blood with EDTA as anticoagulant were obtained from healthy blood donors. Plasma was separated from red blood cells by means of centrifugation. Cold metaphosphoric acid was added to plasma. After incubation and centrifugation supernatants were diluted with a derivatisation buffer pH 9. To this mixture orthophthalaldehyde was added to react with amine and thiol group of GSH to form a fluorescent tricyclic product. The procedure for GSSG determination is very similar to the one for GSH determination with following differences. To eliminate GSH N-Ethylmaleimide is used, the derivatization buffer pH 9 is changed with buffer pH 13, and the resulted pH is lowered before analysis with the addition of boric acid.

Method sensitivity was improved with derivatization buffer, reagents concentration, chromatographic and detection optimization. Interference caused by GSH oxidation prevented accurate measurement of GSSG levels. Numerous attempts were made to inhibit the oxidation including optimization of sample obtainment and the alkylation process. Though improvements were made, the oxidation process was not adequately halted.

Both methods were developed using a Luna C18 column heated to 40 °C. Mobile phase consisted of 15% MeOH in 25 mmol/l phosphate buffer pH 6 with a flow rate of 0.7 ml/min. Injection volume was 50 µl for GSH and 100 µl for GSSG assay. Detection was carried out with excitation and emission wavelengths set at 340 nm and 420 nm, respectively. Linear range was 0.2 µmol/l – 20 µmol/l for GSH and 0.1 µmol/l – 2 µmol/l for GSSG measurement. Limits of quantization were 0.19 µmol/l for GSH and 0,036µmol/l for GSSG. Accuracy varied from 86.1% to 111.7% for GSH and 86.4 to 113.6% for GSSG. Precision ranged from 0.67 to 5.1% for GSH and from 1.16 to 4.53% for GSSG. The optimized method of GSH determination in human plasma was successfully validated.

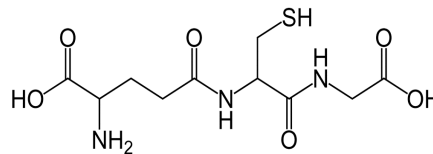
3. Seznam okrajšav

GSH	Glutation, reducirana oblika
GSSG	Glutation, oksidirana oblika
OPA	Ortoftaldialdehid
MPA	Metafosforjeva kislina
NEM	<i>N</i> -etilmaleinimid
UV	Ultravijolična svetloba
SD	Standardna deviacija
CV	Koeficient variance
QC	Kontrolni standard
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
H	Višina kromatografskega vrha
S	Površina pod kromatografskim vrhom
r	Pearsonov koeficient
R ²	Determinacijski koeficient
LU	Luminescenčna enota

4. Uvod

4.1. Glutation

Glutation (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicin) je glavni tiolni antioksidant, ki sodeluje pri celični obrambi. Po zgradbi je tripeptid, sestavljen iz cisteina, glutaminske kisline in glicina. Molekula nastaja in je prisotna v praktično vseh tkivih in organih, največ v jetrih (1).



Slika 1: Strukturna formula GSH

Glutation ima dve strukturalni značilnosti, ki pomembno vplivata na biološko aktivnost: sulfhidrilno skupino, ki deluje kot nukleofil in γ -glutamilni most. Ti omogočata, da je udeležen v številnih biokemijskih procesih. Transhidrogeniranje omogoča regeneracijo sulfhidrilne skupine številnih encimov in proteinov, npr. koencima A. Glutation povečuje redukativno kapaciteto celice, ki je nujna pri številnih bioloških reakcijah, npr. sintezi deoksiribonukleotidov z ribonukleinsko reduktazo ali redukciji dehidroaskorbata do askorbata. Udeležen je tudi pri detoksifikaciji vodikovega peroksida, drugih peroksidov in radikalov (2).

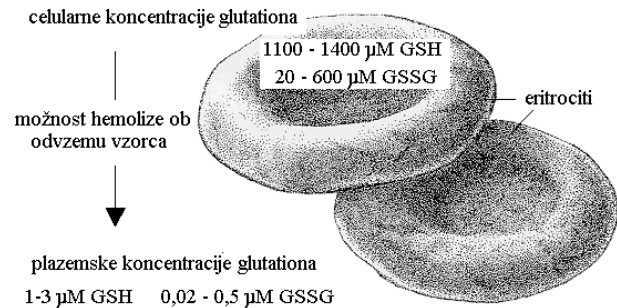
Konjugacija z glutationom je pomembna reakcija pri izločanju ksenobiotikov, ki omogoča, da se vodotopen produkt izloča z urinom. Sinteza glutationa poteka v kaskadi encimskih reakcij, imenovanih γ -glutamilni cikel.

4.1.1. Biokemija glutaciona

Večina glutaciona se nahaja intracelularno, v milimolarnih koncentracijah (0,5-10 mmol/l), medtem ko se plazemske koncentracije gibljejo v mikromolarnem območju. Omenjena kombinacija pogojuje previdnost pri odvzemu krvi, ker bi hemoliza lažno povišala plazemsko koncentracijo glutaciona (Slika 2).

V celicah je lahko prisoten v prosti obliki ali vezan na proteine. V prosti obliki je večina glutaciona reduciranega, ki potem ob oksidativnem stresu prehaja v oksidirano obliko (1). Regeneracijo slednje omogoča encim glutation reduktaza in s tem zmanjšuje izgube pri oksidacijah. Reduktivna zmogljivost celice ali tkiva oz. tako imenovani redoks

status je odvisen od razmerja reducirane in oksidirane oblike glutationa (GSH/GSSG) in predstavlja pomembno determinanto pri vzdrževanju homeostaze celic. Ob normalnih pogojih sta koncentraciji obeh oblik v celici v milimolarnem območju med 1 in 10 mM, prevladuje GSH. Ko so



Slika 2: Običajne celične in plazemske koncentracije

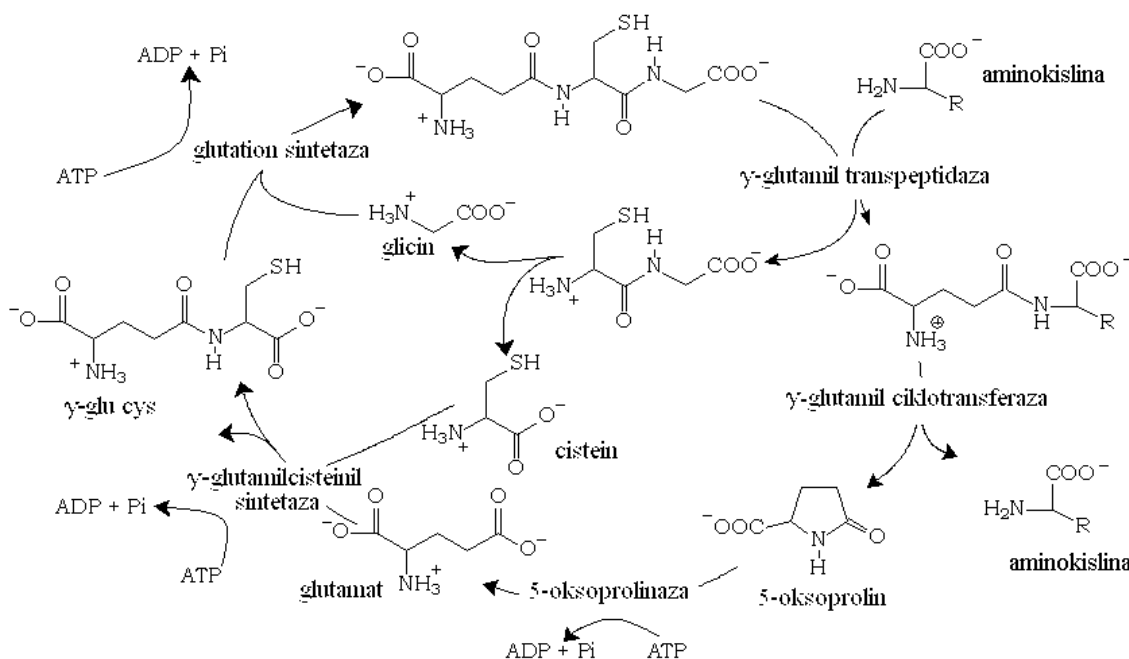
celice relativno oksidativno neobremenjene lahko to razmerje presega vrednost 100, medtem ko ob različnih oksidativnih obremenitvah ta vrednost pade na 1 do 10 (1). Številne študije zadnjih nekaj let nakazujejo na verjetnost, da so glutationilirani proteini udeleženi pri nekaterih patofizioloških procesih (1). V skupini S-glutationiliranih proteinov se najpogosteje omenja glutationiliran hemoglobin kot klinični kazalnik oksidativnega stresa v človeški krvi. Hudo pomanjkanje GSH v krvi lahko povzroči hemolizo. Odstranjevanje iz plazme poteka v ledvicah, ki uporabljajo tako glutation proizveden v samih ledvičnih celicah, kakor tudi tistega, ki se nahaja v plazmi (4).

V prisotnosti inhibitorja transpeptidaze se koncentracija glutationa v plazmi zviša. Večino k plazemski količini prispevajo jetra, ki manjše količine transportirajo v žolč. Po drugi strani, v primeru aplikacije inhibitorja sinteze, kot je npr. butionin sulfoksimin, se koncentracija v tkivih in posledično tudi plazemska koncentracija znižata. Hiter padec tkivnih koncentracij je posledica nespremenjenega delovanja transportnega sistema, ki črpa glutation iz teh tkiv, medtem ko je produkcija zavrtja z inhibitorjem. Razvoj selektivnih inhibitorjev sinteze glutationa je omogočil usmerjanje njegovega metabolizma (5).

Na splošno povišanje koncentracije glutationa v celici zmanjšuje stranske učinke, povezane z jemanjem nekaterih protitumornih učinkovin in ojača odpornost na oksidativni stres in škodljivo sevanje. Po drugi strani terapija, ki celično koncentracijo znižuje, povečuje občutljivost na nekatera zdravila, sevanje in škodljive učinke kisika. Takšni učinki so zaželeni pri terapiji tumorjev, ki so pridobili rezistenco na sevanje ali protitumorne učinkovine. Raziskave kažejo, da nekateri tumorji dosegajo rezistenco s povišanjem koncentracije glutationa (6). Terapija z butionin sulfoksiminom lahko to sposobnost oslabi in omogoča, da je terapija zaradi znižane rezistence učinkovita. Omenjeni primeri nakazujejo na pomembnost spreminjanja tkivnih koncentracij glutationa in doseganja selektivnega varovalnega ali uničevalnega učinka določenih celic (2).

4.1.2. Biogena sinteza glutationa (γ -glutamilni cikel)

Sinteza glutationa poteka kot kaskada šestih encimsko kataliziranih stopenj (Slika 3), skupno imenovanih γ -glutamilni cikel. Glavna udeležena encima sta γ -glutamilcistein sintetaza (GCS) in glutation sintaza (GS). Encim GCS je heterodimer, sestavljen iz težke podenote (GCS_h), pomembne za katalitično delovanje in lahke podenote (GCS_l) z regulatorno funkcijo. Slednja poteka po principu negativne povratne zanke, kjer naraščajoča koncentracija produkta (glutaciona) zavira aktivnost γ -glutamilcistein sintetaze. Obe podenoti sta povezani preko reverzibilne disulfidne vezi. Nastanek ali prekinitev vezi vpliva na aktivnost encima in je odvisna od trenutne redukativne kapacitete v celici. (7).



Slika 3: Shema γ -glutamilnega ciklusa

Drugo stopnjo sinteze, adicijo glicina na γ -glutamilcistein dipeptid, katalizira glutation sintetaza, katere aktivnost ni odvisna od koncentracije produkta, temveč je količina definirana z ekspresijo gena tega encima v določenem tkivu. Višje koncentracije se nahajajo npr. v ledvicah. Selektivno inhibicijo glutation sintetaze povzroča butionin sulfoksimin, neselektivno pa metionin sulfoksimin (7).

Transport glutationa iz celice vrši γ -glutamil transpeptidaza, encim, ki je vezan na zunanji strani celičnih membran v določenih tkivih. Reakcija katalizirana z γ -glutamil transpeptidazo daje produkta γ -glutamil amino kislino in cisteinilglicin. Slednjega encim

dipeptidaza razcepi na glicin in cistein. γ -glutamil amino kisline so substrat za intracelularno lociran encim γ -glutamil ciklotransferazo, ki jih razcepi do ustreznih amino kislin in 5-oksiprolina. Iz slednjega v procesu deciklizacije nastaja glutamat. γ -glutamil transpeptidaza je locirana na epiteliju tistih tkiv, ki so udeležena pri transportu glutaciona: npr. nefroni, jejunum, pleksus in ciliarno telesce. Lokalizirana je na zunanji površini celične membrane, medtem ko se večina glutaciona nahaja intracelularno. Namen transporta iz celice je stabilna oskrba celične membrane in njene bližnje okolice s tioli (7).

4.1.3. Oblike glutaciona in njihov pomen pri določanju

Glutation v celicah nastopa v reducirani (GSH) in oksidirani (GSSG) prosti obliki ter frakciji, vezani na proteine. Prvi korak analize je obarjanje neželenih proteinov. V te namene se uporabljajo kisline, kot so trikloroacetna, perklorna, metafosforjeva ali sulfosalicilna kislina (4). Po obarjanju proteine odstranimo s centrifugiranjem, v prosti obliki ostane glutacion v supernatantu, frakcija, vezana na proteinih, se skupaj z njimi obori. Pri analitiki tiolov predstavlja resen problem oksidacija. Reduktivna funkcija glutaciona poteka tudi v samem vzorcu. Prisotnost atmosferskega kisika pospešuje oksidacijo do disulfida (GSSG) in predstavlja lažno znižanje razmerja GSH/GSSG. Za preprečevanje oksidacije je potrebna zaščita prostih $-SH$ skupin. V ta namen se uporabljajo različne spojine; *N*-etilmaleinimid (NEM), jodocetna kislina, 2-vinil piridin in druge (8). Mehanizem zaščite z uporabo NEM je alkiliranje $-SH$ skupine, ki v tem primeru poteka z adicijo sulfhidrilne skupine GSH na alifatsko dvojno vez imida maleinske kisline. Alkilacijo izvedemo po centrifugiranju pri relativno nizkem pH. Reaktivnost alkilanta pri teh pogojih je manjša kot v nevtralnih in šibko bazičnih pogojih, kar je možno preiti z daljšim časom inkubacije (9).

Večjo težavo predstavlja frakcija glutaciona, vezanega na proteine. Za določevanje te frakcije se iz vzorca odvzame peleta proteinov pred postopkom obarjanja. Peleto se ponovno raztopi z natrijevim hidroksidom, nakar se pripravljene raztopine izmeri koncentracija. Uporaba protokolov proteomike, kot sta 2D NaSDS-PAGE in MALDI-TOF analiza, omogoča identifikacijo proteinov, ki so vezani z glutacionom in se pojavljajo ob patofizioloških stanjih. Slabost omenjenih metod je, da sta kvalitativni ali semi-kvantitativni (3, 4).

4.1.4. Metodologija analize

Redukcija

Določanje koncentracije tako v plazmi ali krvi zahteva redukcijo disulfidne vezi med glutationom in drugimi tioli ali proteini. Izbira reducenta je odvisna od separacijskega postopka in načina detekcije. Reducenti s sulfhidrilno skupino, kot so ditioeritrol, ditiotreitrol ali merkaptoetanol, reducirajo vezan glutation v prosto obliko. Slabost reducentov je interakcija z drugimi reagenti. Zaradi strukturne podobnosti in proste –SH skupine tvorijo adukte in omenjene reagente porablajo. Hidridi, kot sta natrijev in kalijev borhidrid sta dokaj primerna, vendar manj specifična reducenta (1). Za potek reakcije so potrebne visoke koncentracije teh reducentov (1,4 mol/l) pri sobni temperaturi. Ob segrevanju je možna uporaba nižjih koncentracij. Izhajanje plinov in penjenje raztopine lahko predstavlja praktične probleme. Med močnejše reducente spadajo trialkilfosfini. Pri uporabi teh je pomembno odmerjanje. Količina dodanega reducenta ne sme bistveno presežati oksidativne kapacitete disulfidov. Prednost trialkil fosfinov je, da ne reagirajo s tiol specifičnimi reagenti, ki jih uporabljamo pri derivatizaciji. Primer takih reducentov sta tributilfosfin (TBP) in tris-(2-karboksietil)-fosfin (TCEP). Slabost prvega je nizka topnost v vodi, neželjena reakcija s fluorogenim reagentom in iritantni učinek (povzroča srbenje) ob potencialnem stiku s kožo osebja, ki pripravlja vzorce. Oksidacijo tiolov močno pospešuje prisotnost nekaterih kovinskih ionov, predvsem bakrovih in železovih, ki delujejo kot katalizatorji. Z dodatkom EDTA ali 1,10 fenantrolina prisotne kovinske ione keliramo in zmanjšamo neželjene katalitične učinke (1).

Derivatizacija

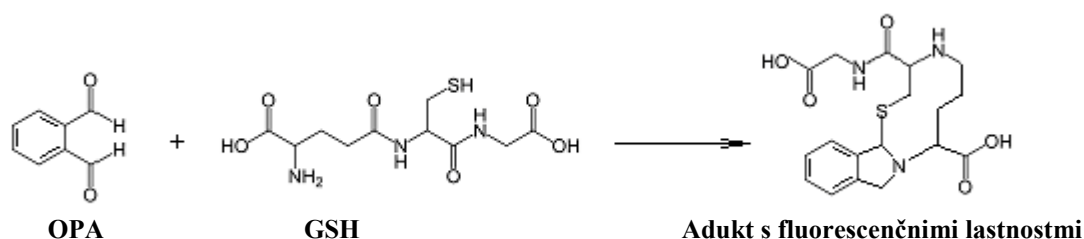
Detekcija nederivatiziranega glutationa je možna le z elektrokemičnimi metodami ali tandem masno spektroskopijo. Ker kot molekula nima posebne strukturne značilnosti, ki bi omogočala selektivno detekcijo, je pri vseh, razen pri prej omenjenih metodah potrebna derivatizacija. Možni mesti za derivatizacijo sta primarna aminska (-NH₂) in sulfhidrilna (-SH) skupina. Ker se slednja v bioloških sistemih redkeje pojavlja, je primernejša za derivatizacijo z namenom selektivne detekcije. V zadnjih letih so se uveljavile metode, ki

temeljijo na predkolonski derivatizaciji s kolorimetričnimi reagenti, kot sta Ellmanov ali Sangerjev reagent (1).

Popularne so postale tudi metode, ki temeljijo na derivatizaciji s fluorogenimi reagenti, predvsem zaradi večje občutljivosti takega načina detekcije. Reagente lahko smatramo za uporabne le, če tvorijo adukte z glutationom z jakostjo fluorescence, ki omogoča določevanje koncentracij v celici detektorja v pikomolarnem območju ali še nižje. Zahteve za idealni reagent bi bile, da sam kot reagent ne flouescira, niti ne vsebuje flouescirajočih nečistot in da z reaktantom hitro in selektivno tvori produkt, katerega flouescenca omogoča zanesljive meritve. Noben trenutno razpoložljivi reagent ne zadosti vsem omenjenim zahtevam, so se pa nekateri reagenti, npr. bimani in halogensulfonilbenzofurani, izkazali za uporabne (1, 8).

Bimani hitro zreagirajo s tioli pri pH 8 in sobni temperaturi. Produkt reakcije je tioeter z visoko jakostjo fluorescence. Slabost teh reagentov je, da že sami skupaj z njihovimi produkti spontane hidrolize dajejo fluorescenčni signal, kar na kromatogramu opazimo kot pojav večih vrhov, ki k sreči ne sovpadajo ali motijo signala glutationa. Za določanje tiolov se uporabljajo tudi halogensulfonilbenzofurani. Tipični predstavnik je amino-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol-4-sulfonat (SBD-F). Reaktivnost SBD-F je nizka in derivatizacija zahteva ostre pogoje (pH 9,5, 60 °C vsaj eno uro), kar potencira problem reoksidacije glutationa. Kljub nizki reaktivnosti nezreagiran reagent in produkti njegove hidrolize ne predstavljajo problema pri določanju, saj nimajo fluorescenčnih lastnosti. HPLC kromatogram, pridobljen s SBD-F, je tako čistejši in ne vsebuje nedefiniranih signalov (1, 8).

Mogoče najzanimivejši reagent za derivatizacijo je orto-ftalaldehid (OPA). Reakcija derivatizacije poteka na dveh funkcionalnih skupinah glutationa, tako na sulfhidrilni skupini kot amino skupini (Slika 4), kar povišuje selektivnost. Hkrati reakcija poteka pri milih pogojih in povzroča manj problemov s stranskimi produkti in nehoteno reoksidacijo



Slika 4: Reakcijska shema derivatizacije GSH z OPA

glutaciona. Nastali stabilni biciklični produkt z visoko jakostjo fluorescence omogoča meritve nizkih koncentracij glutaciona ali drugih tiolov in amino kislin (1).

4.1.5. Pomembnejše metode določanja glutaciona

Pri analitiki glutaciona so uporabne številne metode: spektrofotometrične, flourometrične, metode na osnovi bioluminescence, kapilarna elektroforeza, HPLC v kombinaciji z drugimi metodami, masna spektrometrija in jedrska magnetna resonanca.

V okviru te diplomske naloge si bomo podrobneje ogledali določevanje z uporabo HPLC kot separacijske tehnike in detekcije s flourometrijo. Slednja kombinacija se je izkazala za cenovno učinkovito metodo določanja, zaradi česar je uporaba te metode v primerjavi z drugimi dokaj velika (1, 3, 10, 12). V sklopu teh metod obstaja več reagentov za derivatizacijo. Osredotočili se bomo na orto-ftalaldehid (OPA), zaradi preprostejšega in predvidljivejšega rokovanja.

OPA je primeren je za določanje plazemskih in celokupnih krvnih koncentracij, z njim pa lahko določamo še frakcijo, vezano na proteine. Uporablja se kot reagent za predkolonsko derivatizacijo. Prednost predkolonskih metod je v manj zahtevnem analitskem priboru. Za določanje zadostuje običajen HPLC kromatograf, na katerega je zaporedno vezan fluorescencečni detektor, medtem ko za postkolonsko kromatografijo potrebujemo reagenčno zanko, vezano za kolono, v kateri poteka reakcija derivatizacije, preden lahko produkt potuje naprej do detektorja. Slabost predkolonskih metod je v dejstvu, da ne kromatografiramo analitov samih temveč njihove derivate. Razlike v afiniteti do stacionarne in mobilne faze nederivatiziranih in derivatiziranih analitov so lahko občutne. Hkrati se spopadamo s stranskimi produkti derivatizacije kot reakcije z omejeno učinkovitostjo.

Metoda po Paroni-ju omogoča določanje krvne in celokupne plazemske koncentracije. Prvi korak je redukcija vzorca z ditiotreitolum in obarjanje proteinov s perklorno kislino. Za določanje različnih oksidiranih oblik je nujna selektivna blokada sulfhidrilnih skupin glutaciona z *N*-etilmaleimidom (NEM). Za derivatizacijo se uporablja OPA kot reagent. Nastale adukte glutaciona ločujemo z reverzno-fazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (1).

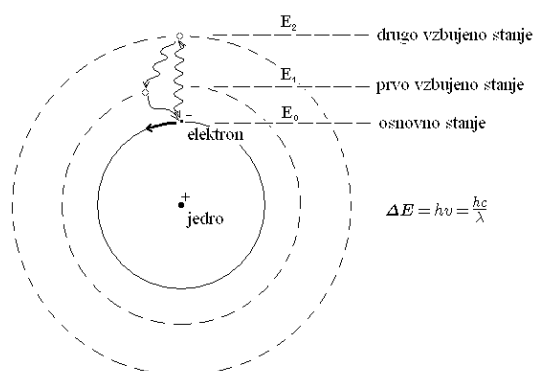
Za določanje obeh oblik se uporablja metoda po Cereser-ju. Gre za modificirano metodo, ki še vedno temelji na OPA kot reagentu za derivatizacijo. Razlika je v uporabi

metafosforne kisline (MPA) za deprotonizacijo aduktov glutationa. Te ločujemo z gradientno elucijo na reverzno-fazni kromatografski koloni. Rezultati te meritve omogočajo določanje koncentracije celokupne in koncentracije reducirane oblike glutationa, ki sta potrebni za izračun njunega razmerja. Omenjena vrednost je indikator biološkega stanja celic in tkiv. Natančnost te metode je možno izboljšati z dodatkom etilnega estra glutationa kot internega standarda, ki pa ne ustreza zahtevi, da se eluira pred analitom, temveč preide kolono šele po desetih minutah in nam tako nezaželeno podaljša in podraži analizo (1).

4.2. Osnove fluorescense

4.2.1. Bohr-ov model atoma

Elektroni se gibljejo po točno določenih stacionarnih energijskih lupinah, ki se s časom ne spreminjajo. Pri kroženju je njihova energija konstantna in ne sevajo elektromagnetnih valov. Atom seva elektromagnetno energijo le, če elektron preskoči s krožnice z višjo na krožnico z nižjo energijo (Slika 5). Razlika energij obeh tirov ΔE je energija fotona:



Slika 5: Bohrov model atoma

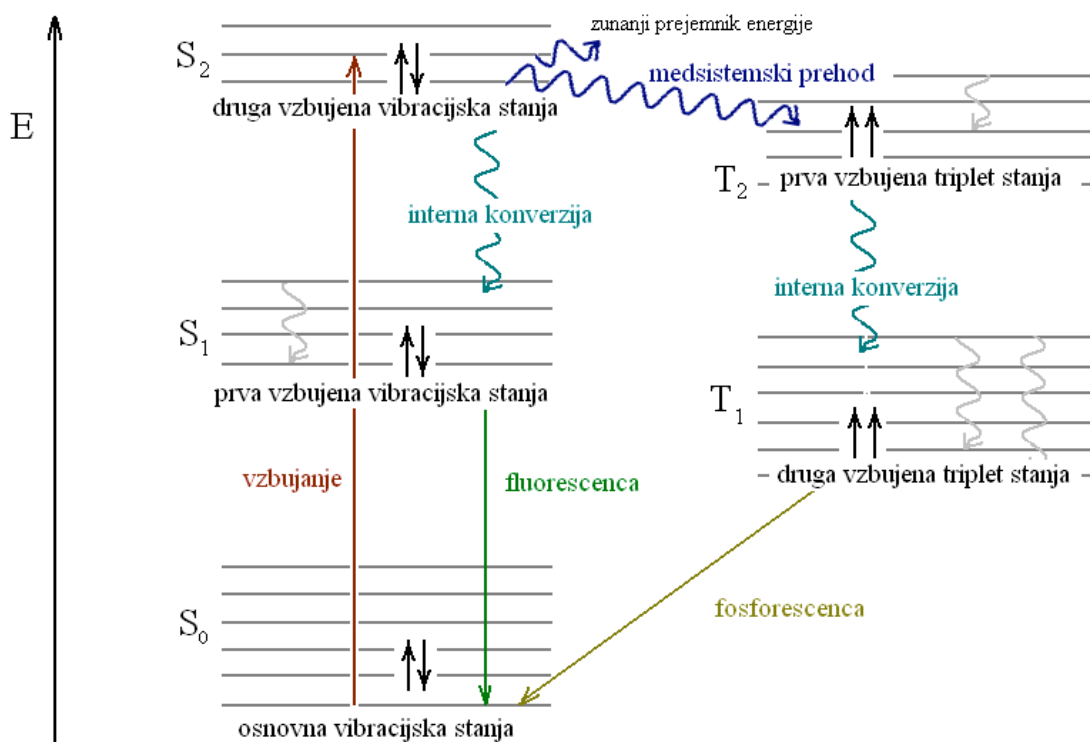
$$\Delta E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

ν je frekvenca elektromagnetnega valovanja, h je Planckova konstanta ($6,63 \times 10^{-34}$ J s) in c je svetlobna hitrost (3×10^8 m/s).

4.2.2. Luminescenca

Luminescenca je fizikalni pojav emisije svetlobe ob vračanju molekul snovi iz vzbujenega v osnovno energetska stanje. Vzbujanje je možno doseči z absorpcijo različnih vrst energij, najpogosteje z elektromagnetnim valovanjem oz. svetlobo, kar imenujemo fotoluminescenca in kot širši pojem zajema fluorescenco in fosforescenco. Če energija za vzbujanje nastane kot produkt kemijske reakcije, govorimo o kemiluminescenci.

Načeloma lahko fluorescira vsaka snov, pogoj je nekaj ostro definiranih in razmaknjenih energetskih stanj oz. odsotnost zveznega emisijskega spektra. Fluorescenco najlažje obrazložimo s prikazom energetskih sprememb v diagramu Jablonskega (Slika 6).



Slika 6: Pojav fluorescence prikazan na diagramu Jablonskega.

Imenovan po poljskem fiziku Aleksandru Jabłońskemu, diagram prikazuje energetska stanja elektronov v molekuli in prehode med njimi. Ta stanja so nanizana vertikalno po naraščajoči energiji elektronov in horizontalno po spinski konfiguraciji. Sevalni prehodi se označujejo z ravno puščico, nesevalni pa z valovito. Vibracijska stanja so označena s črtami, pri čemer je črta osnovnega vibracijskega stanja prikazana debelejša od višjih stanj. Medtem ko sevalni prehodi zajemajo absorpcijo ali emisijo fotonov, obstajajo pri nesevalnih prehodih različni mehanizmi prenosa energije. Ta se lahko izgublja iz molekule

s trki ali dipol-dipol interakcijami s sosednjimi molekulami (dušilci), ki običajno pripadajo topilu, zraku ali trdnemu nosilcu. Drug možen način - notranja konverzija - je prenos znotraj molekule, kjer preko sklapljanja kot prejemniki delujejo elektroni sosednjih orbital v nižjih vzbujenih stanjih. Tretji način, t.i. medsystemski prehod je sprememba spinske konfiguracije ob trku s sosednjimi molekulami. Nastalo vzbujeno triplet stanje je občutno stabilnejše, hkrati energijsko nižje in emisija je upočasnjena. Ta je možna šele po obratu v izhodiščno spinsko stanje, ki nastopi po ponovnem trku z drugo sosednjo molekulo. Zaradi deficita energije vrnitev v prejšnje stanje ni možno, temveč elektron prehaja v nižje vzbujeno ali celo osnovno stanje. Pri vračanju iz nižjih vzbujenih stanj v osnovno se preostala energija izseva v obliki fotona z valovno dolžino, daljšo od ekscitacijske. Molekule, pri katerih se znaten delež energije prenaša na slednji način, sevajo z nižjo intenziteto, vendar dlje časa po prenehanju vzbujanja. Pojav imenujemo fosforescenca, ki lahko traja več ur, medtem ko fluorescenca kot pojav izzveni po nekaj milisekundah. Ostro mejo med obema pojavoma je težko določiti po kriteriju trajanja emisije. Bolj uporabna značilnost za razlikovanje je čas nastanka emisije po začetku vzbujanja. Molekule, ki fluorescirajo, začnejo sevati svetlobo praktično takoj ($10^{-9} - 10^{-5}$ s), medtem ko pri fosforescenci zamik med ekscitacijo in emisijo znaša več kot milisekundo.

4.3. Delovanje fluorescenčnega detektorja (11)

Detektor je sestavljen iz številnih komponent, ki so shematsko prikazane na Sliki 7. Kot izvor svetlobe se uporablja ksenonska žarnica oz. bliskavica. Ta ne sveti s stalno jakostjo, kot je običajno za druge detektorje, npr. UV, temveč utripa z visoko frekvenco (296 Hz oz. 74 Hz v varčnem načinu). Posamezen blisk zajema zvezni spekter svetlobe od 200 do 900 nm. To svetlobo lažje fokusira in usmeri skozi optično režo z namenom, da se žarek zoži. Pri fluorescentnem detektorju sta potrebna dva monokromatorja, prvi za ustvarjanje monokromatske ekscitacijske svetlobe, drugi za ustvarjanje emisijske svetlobe. V ta namen se uporabljajo optična sita. Gre za tolerančno izdelana optična stekla, ki so na površini ranjena. Na vsakem milimetru se nahaja 1200 zarez, na površini katerih prihaja do sipanja svetlobe. Sito kot celota tako odbija kot razpršuje svetlobo. Interferenca obeh daje ojačitve prvega reda v obliki monokromatske svetlobe. Valovna dolžina le-te je odvisna od odbojnega kota. Ekscitacijsko sito je načrtovano tako, da optimalno deluje v UV območju, emisijsko pa v območju vidne svetlobe, kjer pričakujemo izsevane fotone z nižjo energijo.

Takoj za sitom je locirana reža, ki omogoča prehod le monokromatski svetlobi z ustreznim odbojnim kotom.

Ko svetloba zapusti drugo režo, vpada kot monokromatska na pretočno celico. Podobno kot celica UV spektrofotometrov je ta izdelana iz kvarčnega stekla z namenom, da ne absorbira svetlobe valovnih dolžin, potrebnih za meritve. Za razliko od UV ima fluorescenčna pretočna celica manjši volumen in bistveno tanjše stene, ker imamo opravka s svetlobo nižje jakosti, kar še posebej velja za emisijsko svetlobo. Rezultat je manjša odpornost celice na povratni tlak tekočine (prenese le 20 barov), ki bi sicer lahko nastal ob morebitni zamašitvi izhodne kapilare, in je tudi razlog, zakaj je fluorescenčni detektor običajno vezan kot zadnji modul sistema.

Fluorescenca kot pojav dejansko poteka v celici. Molekule vzorca absorbirajo fotone vpadne svetlobe, energija se porablja za prehod elektronov v vzbujeno stanje. Pri vračanju v osnovno stanje elektroni izsevajo fotone v naključne smeri kot sevalno telo. Za meritve se zbira emitirana svetloba, ki je pravokotna na ekscitacijsko. Na ta način ekscitacijska svetloba najmanj moti meritve emisijske svetlobe in je eden glavnih dejavnikov občutljivosti fluorescenčnega detektorja. Zaradi nizkega izkoristka fluorescence in zbiranja iz le določene smeri imamo sedaj opravka s svetlobo nizke jakosti. Zbiralna leča jo usmerja skozi naslednjo optično režo naprej na emisijsko optično sito. Podobno kot pri ekscitacijskemu situ lega le tega omogoča pot skozi zadnjo režo le svetlobi izbrane valovne dolžine.

Kot detektor v pravem pomenu besede služi fotopomnoževalka. Naprava zajema fotokatodo, serijo dinod in anodo kot terminalni detektor, omenjene plošče so pod napetostjo. Signal v tej fazi je prešibek za kvantitativno analizo, pred detekcijo je potrebna ojačitev. Vpadni fotoni preko foto efekta izbijajo elektrone na fotokatodi, ki potujejo do anode preko posrednih odbojev na seriji dinod. Odvisno od pritisnjene napetosti pri tem izbijajo nove elektrone iz dinod in posledično pomnožujejo signal. Končno število prispelih elektronov na anodi v časovni enoti definira anodni tok. To količino merimo.

Spektrofotometri potrebujejo načeloma referenčne meritve, da izničijo napake zaradi nihanja jakosti izvora svetlobe. Referenčna dioda meri količino ekscitacijske svetlobe, ki preleti celico, kar se upošteva pri izračunu signala emisije.

5. Namen dela

Določanje plazemskih koncentracij GSH in GSSG je zanesljiv način ovrednotenja kratkoročnih obremenitev z oksidacijami. Oksidativen stres je del patoloških procesov številnih obolenj. Plazemske koncentracije glutationa ni možno določevati z uporabo UV detektorjev, hkrati spojina kot taka nima fluorescenčnih lastnosti. Z uvedbo derivatizacijskega postopka lahko produkt zaznamo s fluorescenčnim detektorjem, katerega prednost je predvsem v zmožnosti določanja nizkih koncentracij analitov. Objavljene metode večinoma opisujejo določanje v polni krvi, medtem ko so pri metodah določanja plazemskih koncentracij velikokrat opisane kot netočne ali premalo občutljive.

Namen diplomske naloge je razvoj metod za določevanje koncentracij GSH in GSSG v humani plazmi, ki omogočajo spremljanje oksidativnega stresa bolnikov s shizofrenijo. Osnovo nam bo predstavljala v literaturi objavljena metoda, ki temelji na derivatizaciji glutationa s fluorescenčnim ligandom OPA ter določanje nastalega produkta s pomočjo HPLC (1).

Prvi del razvoja metode določanja glutationa bo predstavljala pridobitev temeljnih znanj o fluorescenci in fluorescenčnem detektorju ter izraba in uporaba obeh z namenom doseganja čim boljše občutljivosti detektorja.

V drugem delu bomo optimizirali metodo določanja GSH. Osredotočili se bomo predvsem na izboljšanje izkoristka postopka derivatizacije ter izbor kromatografskih pogojev.

V tretjem delu bomo poskusili optimizirati metodo določanja GSSG, za katero je potrebna še višja občutljivost. Ker temelji določanje GSH in GSSG na detekciji iste spojine, bomo preverili selektivnost metode pri določanju GSSG.

Zadnji del diplomske naloge bo predstavljalo vrednotenje analiznih metod oz. validacija. Določili bomo linearnost, območje linearosti, točnost, ponovljivost metod ter meje detekcije in kvantifikacije. Na osnovi validacije bomo zaključili, ali je metoda primerna za rutinsko uporabo na realnih plazemskih vzorcih.

6. Materiali

6.1. Biološki material

Uporabljali smo humano plazmo (antikoagulant EDTA), pridobljeno na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana. Plazmo smo odmrznili, razdelili v 2 ml alikvotne in hranili do uporabe pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kot vir plazme za izvajanje poskusov optimizacije analitske metode smo razen omenjene plazme uporabljali še plazmo, pridobljeno od prostovoljcev. Prva serija je bila odvzeta z antikoagulantom EDTA, druga s heparinom, tretja in četrta pa sta razen omenjenih antikoagulantov vsebovala še NEM, kot alkilant GSH.

6.2. Standardi

GSH γ -L-Glutamil-L-cisteinil-glicin, $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, $M=307.32\text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

GSSG (γ -Glu-Cys-Gly)-(γ -Glu-Cys-Gly) [disulfidni most: 2_a-2_b], $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$, $M=612.63\text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

6.3. Reagenti in topila

OPA Benzen-1,2-dikarboksaldehid, $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$, $M=134.13\text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija)

NEM *N*-Etilmaleimid, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$, $M=125.13\text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija)

EDTA Etilendiamintetraocetna kislina, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, $M=292.24\text{ g/mol}$ (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, Združene države Amerike)

Metanol CH_3OH $M_r=32,04\text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija)

Acetonitril $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ $M_r=41,05\text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija)

Borna kislina H_3BO_3 $M_r=61,83\text{ g/mol}$ (Merck, Darmstad, Nemčija)

Puferske raztopine pH=3, pH=4, pH=5, pH=6, pH=7, pH=8, pH=9, pH=11, pH=13 (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)

Glicin $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ $M=75,1\text{ g/mol}$ (Boehringer Ingelheim, Nemčija)

6.4. Naprave in pribor

HLADILNIK (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

ZAMRZOVALNIK –20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

ZAMRZOVALNIK –70 °C MDF-U50V (Sanyo electric biomedical, Moriguchi, Japonska)

TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

TEHTNICA H 54 AR (Mettler, Greifensee, Švica)

PH METER MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)

ELEKTROMAGNETNO MEŠALO HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska)

MEŠALNIK VIBROMIX 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

ULTRAZVOČNA KADIČKA SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)

POLAVTOMATSKE PIPETE 2-20 µl, 20-200 µl in 200-1000 µl (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

PLASTIČNE EPRUVETE 1,5 ml (High tech lab, Varšava, Poljska)

PLASTIČNE EPRUVETE Light protection 1,5 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

CELULOZNO ACETATNI FILTER 0,45 µm (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija)

HPLC KOLONE :

- Spherisorb ODS2 (C18) 150 x 4,6mm 5µm (Waters, Milford, Maine, Združene države Amerike)
- Zorbax C18 150 x 4,6 mm 5 µm (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Luna C18 100A (2) 150 x 4,6 mm 3 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

HPLC PREDKOLONA Gemini C18 3 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

STEKLENI INVENTAR: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viala, inserti za viala

OSTALI INVENTAR: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje, Parafilm® M

HPLC SISTEM Agilent technologies 1100 series z UV detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)

FLUORESCENČNI DETEKTOR MODUL (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)

7. Metode

7.1. Kromatografske metode

7.1.1. Priprava mobilne faze

Mobilno fazo smo dnevno pripravljali svežo, ločeno organsko in vodno komponento. Vodna komponenta je 25 mM fosfatni pufer s pH 6,0. Zatehtamo 1,701 g KH_2PO_4 , prenesemo v 500 ml bučko ter dopolnimo z bidestilirano vodo do oznake. Raztopino prenesemo v čašo in z dodajanjem 1M NaOH umerimo pH na 6,0. Nato filtriramo preko 0,45 μm celulozno acetatnega filtra in razplinjamo 5 min v ultrazvočni kadički. Organska komponenta je sveže razplinjen metanol HPLC kakovosti.

7.1.2. Hranjenje stacionarne faze

Po končanem delu smo kolono spirali 30 min s 15% MeOH / H_2O pri pretoku 0,6 ml/min, da smo odstranili večino fosfatnega pufera in nato še 45 min s 65% MeOH/ H_2O . Na daljše obdobje smo kolono shranjevali v 65% acetonitrilu in 35% H_2O , kot priporoča proizvajalec (9).

7.2. Priprava bioloških vzorcev

Izhodni vzorec predstavlja kri z dodanim antikoagulantom. Plazmo od ostalih komponent krvi ločimo s centrifugiranjem (1.700g, 15min, 8°C). Alikvotu 200 μl plazme dodamo 400 μl ohlajene 10% raztopine metafosforne kisline (MPA). Slednjo pripravimo z raztapljanjem 1g MPA v 10ml bidestilirane vode. Obarjanje plazemskih proteinov poteče po 10 min inkubaciji zmesi pri 4°C. Nato s centrifugiranjem (22.000g, 15min, 4°C) te proteine odstranimo. Alikvot supernatanta (100 μl za določanje GSH in 300 μl za določanje GSSG) prenesemo v 1,5ml epice in shranimo pri -80°C. Pripravljene biološke vzorce odmrzujemo tik pred uporabo.

7.3. Osnovna metoda določanja GSH

K 50 µl odmrznjenega biološkega vzorca dodamo 1 ml 0,1% EDTA v 0.1M NaH₂PO₄ s pH 8,0. Omenjeno raztopino pripravimo z raztapljanjem 50 mg EDTA in 690 mg NaH₂PO₄·H₂O v 50 ml bidestilirane vode in z dodatkom ustrezne količine 1M NaOH umerimo na pH 8,0. 20 µl alikvot odpipetiramo v pred svetlobo zaščiteni epico in dodamo 300 µl 0,1% EDTA v 0.1M NaH₂PO₄ pH 8,0 in 20 µl 0,1% OPA v metanolu. Raztopino OPA pripravimo z raztapljanjem 5 mg OPA v 5 ml metanola HPLC kakovosti (čistosti več kot 99%). Pripravljeno reakcijsko mešanico v zaprtih epicah inkubiramo 15 min pri 25 °C. Po končani inkubaciji reakcijsko mešanico filtriramo z 0,2 µm filtrom. Derivatizirane vzorce hranimo pri 4 °C pred injiciranjem na HPLC (1).

7.4. Osnovna metoda določanja GSSG

200 µl odmrznjenega biološkega vzorca odpipetiramo v epico, zaščiteni pred svetlobo in dodamo 200 µl 40 mM NEM, ki smo ga pripravili z raztapljanjem 50 mg NEM v 10 ml bidestilirane vode. Raztapljanje pospešimo s 5 min sonifikacijo v ultrazvočni kadički. Zmes inkubiramo 25 min pri 25 °C in ob koncu nevtraliziramo z dodatkom 750 µl 0,1M NaOH. Slednjo raztopino smo pripravili z redčenjem 1 mL 1M standardizirane raztopine NaOH na 10 mL z bidestilirano vodo. Po končani inkubaciji in nevtralizaciji 20 µl alikvot odpipetiramo v novo, pred svetlobo zaščiteni epico in dodamo 300 µl 0.1M NaOH in 20 µl 0,1% OPA v metanolu. Pripravljeno mešanico v zaprtih epicah inkubiramo 15 min pri 25 °C. Po končani inkubaciji reakcijsko mešanico filtriramo preko 0,2 µm filtra. Derivatizirane vzorce hranimo pri 4 °C pred injiciranjem na HPLC (1).

7.5. Optimizacija kromatografskih pogojev

7.5.1. Izbor stacionarne faze

Za separacijo produktov plazme in GSH z OPA se uporablja reverznofazna kromatografija z uporabo kolon C18. Na voljo smo imeli več rabljenih kolon, med katerimi smo izbrali tri najobetavnejše: Agilent Zorbax C18 150 x 4,6 mm 5 µm, Phenomenex Luna C18 (2) 100A

150 x 4,6 mm 3 μm in Waters Spherisorb ODS2 150 x 4,6 mm 5 μm . Kot vzorec smo uporabili 2 $\mu\text{mol/l}$ vodne raztopine GSH in z uporabo vsake od kolon posneli kromatogram.

7.5.2. Izbor mobilne faze

Najpogosteje uporabljena mobilna faza, kot je navedeno v izhodiščnem in sorodnih člankih, je sestavljena iz 15% metanola in 85% 25 mmol/l fosfatnega pufru pH 6,0 (1, 2, 3). Pri vodni komponenti mobilne faze smo preskusili premik pH za eno enoto v obe smeri. Delež metanola smo spreminjali od 12 – 18%. Posneli smo kromatogram 2 $\mu\text{mol/l}$ vodne raztopine GSH ob uporabi različnih mobilnih faz.

7.5.3. Preverjanje možnosti koelucije

Možnost koelucije se preverja s posnetkom kromatograma slepega vzorca. Uporabili smo humano plazmo, ki smo ji GSH predhodno inaktivirali. To smo dosegli z dodatkom 200 μl 1 mmol/l NEM k 100 μl alikvotu plazme. Postopek derivatizacije smo nadaljevali po osnovni metodi določanja GSH ter posneli kromatogram.

7.6. Optimizacija detekcije

7.6.1. Ekscitacijska in emisijska valovna dolžina

Prvi korak je predstavljalo snemanje valovnega spektra adukta GSH z OPA. Snemanje smo izvedli na HPLC sistemu z ustavitvijo črpalk ob ravno pravšnjem trenutku, ko se je eluiran produkt nahajal v pretočni celici. Posneli smo ekscitacijsko krivuljo v intervalu od 300 do 380 nm in emisijsko od 355 do 460 nm. Nato smo izbrali potencialno obetavne kombinacije valovnih dolžin, ki so bile v razponu od 315 do 355 nm za ekscitacijsko in 410 do 455 nm za emisijsko. Za vsako kombinacijo smo posneli kromatogram pripravljenega vodnega vzorca GSH koncentracije 10 μM . Odčitali smo jakost odziva in ocenili šum z opazovanjem nihanja bazne linije 90 s pred elucijo analita.

Poskusili smo še meritev z ugasnjenim UV detektorjem, ki je vezan pred fluorescenčnim detektorjem in rezultate primerjali z izhodiščno metodo.

7.6.2. Ojačitev fotopomnoževalke

Preskusili smo možnost nastavitve PMT-GAIN vrednosti med 10 in 18. Podobno kot pri optimizaciji valovnih dolžin smo izmerili odziv vodnega vzorca GSH koncentracije 10 μM pri različnih faktorjih ojačitve in ga primerjali z ocenjenim šumom 90 s pred njegovo elucijo.

7.6.3. Odzivni čas

Preskusili smo tri nastavitve odzivnega časa: 0,05, 0,25 in 1,0 s. Posneli smo kromatograme vodnega vzorca GSH koncentracije 10 μM z uporabo omenjenih nastavitvev.

7.7. Optimizacija metode določanja GSH

7.7.1. EDTA

Za ugotavljanje potrebne količine EDTA smo pripravili derivatizacijske pufre z vsebnostmi EDTA od 0 do 1,6% in jih uporabili za derivatizacijo plazemskega vzorca.

7.7.2. OPA

Za preverjanje poteka derivatizacije smo plazemski vzorec razdelili in derivatizacijo izvedli z naraščajočimi časi inkubacije od 5 do 70 min.

Za določanje potrebne količine OPA smo plazemski vzorec pripravili z uporabo derivatizacijskih mešanic, ki so v 5ml vsebovale od 0,2 do 625 mg OPA. Slepri vzorec je predstavljal voda.

7.7.3. Derivatizacijski pufer

Preskusili smo učinkovitost pufrov od pH 8 do pH 13 na vzorcu 2 $\mu\text{mol/l}$ vodne raztopine GSH. Pufre smo pripravili iz 0.1 mol/l borove kisline z naalkaljenjem do željenega pH. Izjemoma pufer s pH 13 ni bil boratni, teveč smo uporabili 0,1mol/l NaOH.

7.7.4. Volumni reagentov in faktorji redčitev

Prva sprememba je v stopnji redčenja supernatanta plazme z derivatizacijskim pufrom: vzeli smo 50 μl supernatanta in ga razredčili s 500 μl derivatizacijskega pufra (predhodno 1000 μl) (1). V naslednji stopnji smo odpipetirali 100 μl alikvot (predhodno 20 μl) (1) ter mu dodali 500 μl derivatizacijskega pufra (prej 300 μl) in 100 μl 0,1% OPA v MeOH (prej 20 μl).

7.7.5. Volumen injiciranja

Injicirali smo volumne od 5 do 100 μl in opazovali linearnost odziva ter potencialne spremembe retencijskega časa in simetrije dobljenih signalov. Kot vzorec smo uporabili vodno raztopino GSH koncentracije 2 $\mu\text{mol/l}$. Slep vzorec je predstavljala voda.

7.8. Optimizacija metode določanja GSSG

Optimizacijo vseh parametrov določanja GSSG razen odvzema krvi in preverjanja stopnje oksidacije smo izvedli na vodnih vzorcih vzorcih 2 $\mu\text{mol/l}$ GSH in 0,2 $\mu\text{mol/l}$ GSSG ter slepem vzorcu, katerega je predstavljala voda.

7.8.1. Koncentracija NEM

Koncentracijo NEM smo spreminjali v intervalu od 2,5 do 160 mmol/l .

7.8.2. Temperatura inkubacije

Inkubacijo smo izvedli pri treh različnih temperaturah: 25, 40 in 65 $^{\circ}\text{C}$.

7.8.3. Čas inkubacije

Čas inkubacije smo spreminjali od 25 do 300 min.

7.8.4. Vpliv topila

Posneli smo kromatograme vzorcev, kjer je alkiliranje GSH z NEM potekalo v topilih različne polarnosti. Uporabili smo vodo, 50% metanol v vodi in acetonitril.

7.8.5. pH inkubacije

Pripravili smo tri različne postopke, pri katerih smo s pomočjo pufrov pH zmesi v koraku inkubacije z NEM naravnali na željene vrednosti. Izbrali smo pH 3, 7,4 in 11.

7.8.6. Odvzem krvi

Alikvotu krvi smo takoj dodali raztopino NEM v izotoničnem fosfatnem pufru. Postopek derivatizacije smo nadaljevali enkrat z in drugič brez nadaljnega alkiliranja z NEM. Poleg uporabe obeh antikoagulantov in izvedbe alkilacije v krvi ali plazmi smo preskusili še možne kombinacije omenjenih sprememb.

7.8.7. Preverjanje stopnje oksidacije

V kolikšni meri smo uspeli zmanjšati vpliv oksidacije GSH smo preverili z analizo plazemskih vzorcev, pripravljenih iz krvnih vzorcev, katerim smo takoj po odvzemu dodali znano količino GSH (2 $\mu\text{mol/l}$). Postopek derivatizacije smo izvedli z uporabo optimiziranih parametrov metode določanja GSSG.

7.9. Validacija

7.9.1. Priprava GSH standardov za validacijo

Pripravili smo devet standardov različnih koncentracij. Vzorce smo pripravili z zaporednimi redčitvami osnovne raztopine koncentracije 2 mmol/l GSH. Slednjo smo pripravili z raztapljanjem 6,15 mg GSH v 10 ml 1 mmol/l HCl. Iz osnovne raztopine smo s tremi zaporednimi redčitvami 1:10 pripravili nove raztopine s koncentracijami 200 $\mu\text{mol/l}$,

20 $\mu\text{mol/l}$ in 2 $\mu\text{mol/l}$. S pipetiranjem ustreznih alikvotov slednjih dveh raztopin in 1mmol/l HCl smo pripravili standardne vzorce (Tabela I).

Tabela I: Odpipetirani volumni za pripravo GSH validacijskih standardov

koncentracija pripravljene standarda [$\mu\text{mol/l}$]	koncentracija vmesne raztopine GSH za pripravo [$\mu\text{mol/l}$]	aliquot raztopine [μl]	volumen 1mmol/l HCl za dopolnitev [μl]
0,2	2	20	180
0,4	2	40	160
0,6	2	60	140
1	2	100	100
2	2	200	0
3	20	30	170
5	20	50	150
10	20	100	100
20	20	200	0

7.9.2. Priprava GSSG standardov

Na podoben način smo pripravili GSSG standarde. 6,12 mg GSSG smo raztopili v 5 ml bučki z 1 mmol HCl in dopolnili do oznake. To osnovno raztopino smo štirikrat zaporedoma razredčili v razmerju 1:10. Iz zadnjih dveh vmesnih raztopin (2 $\mu\text{mol/l}$ in 0,2 $\mu\text{mol/l}$) smo s pipetiranjem ustreznih volumnov pripravili GSSG standarde (Tabela II).

Tabela II: Priprava GSSG validacijskih standardov

koncentracija pripravljene standarda GSSG [$\mu\text{mol/l}$]	koncentracija vmesne raztopine GSSG za pripravo [$\mu\text{mol/l}$]	aliquot raztopine [μl]	volumen 1 mmol/l HCl za dopolnitev [μl]
0,02	0,2	20	180
0,04	0,2	40	160
0,06	0,2	60	140
0,1	0,2	100	100
0,2	0,2	200	0
0,3	2	30	170
0,5	2	50	150
1	2	100	100
2	2	200	0

7.9.3. Priprava kontrolnih vzorcev

Za določanje parametrov validacije smo uporabili deset standardov, pripravljenih na enak način, kot je opisano pri pripravi standardov za validacijo. Razen teh vzorcev smo za določevanje točnosti potrebovali še kontrolne vzorce (QC). To so vzorci, ki vsebujejo znano količino analita in pokrivajo vsa velikostna območja (nižje, srednje in višje) umeritvene krivulje. Njihove koncentracije so izbrane tako, da ne sovpadajo s standardi oz. točkami, iz katerih izhaja umeritvena krivulja. Kontrolne vzorce tako za GSH kot za GSSG smo pripravili na podoben način kot standarde (Tabeli III, IV)).

Tabela III: Priprava GSH kontrolnih vzorcev

koncentracija pripravljene GSH QC [$\mu\text{mol/l}$]	koncentracija vmesne raztopine GSH za pripravo [$\mu\text{mol/l}$]	aliquot raztopine [μl]	volumen 1 mmol/l HCl za dopolnitev [μl]
0,5	2	50	150
2,5	20	25	175
12,5	20	125	75

Tabela IV: Priprava GSSG kontrolnih vzorcev

koncentracija pripravljenega GSSG QC [$\mu\text{mol/l}$]	koncentracija vmesne raztopine GSSG za pripravo [$\mu\text{mol/l}$]	aliquot raztopine [μl]	volumen 1 mmol/l HCl za dopolnitev [μl]
0,5	2	50	150
1,75	2	175	25
12,5	20	125	75

7.9.4. Ponovljivost

Ponovljivost je sposobnost metode, da daje vedno enake rezultate. Ovrednotimo jo s standardno deviacijo (SD) in koeficientom variacije (CV). Kriterij za ponovljivost posamezne točke je, da njene meritve ne izkazujejo koeficienta variacije, večjega od 15% oz. 20%, če se točka nahaja v bližini meje kvantifikacije (13).

7.9.5. Linearnost in območje linearnosti

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala zagotavlja odzive instrumenta, ki so premosorazmerni s koncentracijo analizirane substance v vzorcu. Linearnost preverimo s statistično obdelavo analize standardov. Z dobljenimi rezultati določimo regresijsko premico z metodo najmanjše vsote kvadratov odstopanj. Premica ima enačbo $y = k \cdot x + n$, pri čemer je y jakost odziva, za kar smo izbrali površino kromatografskih vrhov, x koncentracija analita, n pa odsek na ordinati in k naklon premice. Korelacijo med koncentracijo in odzivom podajamo s Pearsonovim koeficientom (r) oz. determinacijskim koeficientom (R^2). Za ugotavljanje linearnosti ICH smernice (13) priporočajo vsaj 5 koncentracij standardov in slep vzorec.

Območje linearnosti analizne metode je pogojeno s stopnjo korelacije umeritvene premice, katero opisuje Pearsonov koeficient korelacije (R) oz. njegova kvadratna vrednost (R^2). Pogoj linearnosti je izpolnjen, če je R^2 na danem intervalu večji od 0,998 (13).

7.9.6. Točnost

Točnost je sposobnost metode, da določi pravo vrednost, oz. da izmerjena vrednost signifikantno ne odstopa od dejanske. Točnost ugotavljamo s preverjanjem odzivov standardov oz. vzorcev znanih koncentracij. Iz odzivov s pomočjo enačbe umeritvene krivulje izračunamo določeno koncentracijo in jo primerjamo z dejansko. Izračunana vrednost ne sme odstopati od dejanske za več kot 15%. Za točke blizu meje kvantifikacije je dovoljeno rahlo večje odstopanje - 20% (13).

7.9.7. Meja detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ)

Meja detekcije je najnižja koncentracija analita, ki daje signal, katerega še lahko razločimo od šuma, medtem ko je meja kvantifikacije najnižja koncentracija analita, ki jo lahko kvantitativno določimo. Vrednosti smo izračunali po enačbah, navedenih v ICH smernicah (13):

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \frac{\text{SE}}{\text{B}} \quad \text{LOQ} = 10 \cdot \frac{\text{SE}}{\text{B}} ;$$

pri čemer SE predstavlja standardno deviacijo odsekov na ordinati in B povprečno vrednost naklonov umeritvenih premic.

8. Rezultati

8.1. Optimizacija detekcije

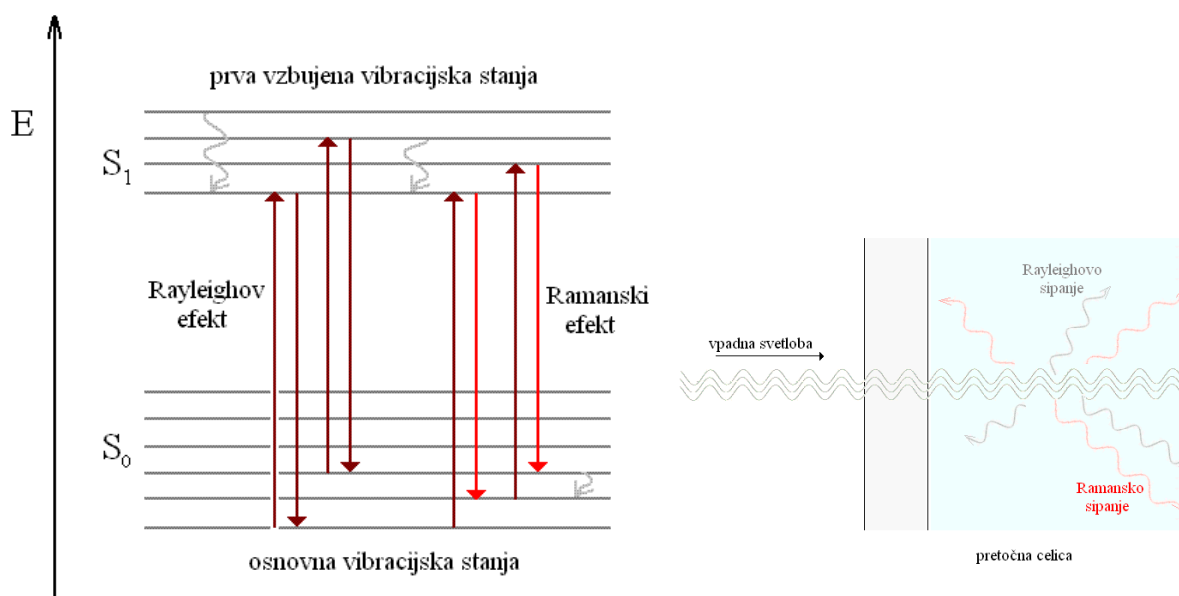
8.1.1. Ekscitacijska in emisijska valovna dolžina

Pravilen izbor valovnih dolžin je ključen za doseganje potrebne občutljivosti spektroskopskih metod. Fluorescenčni detektor ima možnost nastavitve valovne dolžine ekscitacijske in emisijske svetlobe. Načeloma so manj primerne tiste kombinacije, pri katerih je razlika med obema majhna zaradi interferenčnih motenj in relativno majhnih energij vmesnih prehodov elektronskih stanj, ki redkeje potekajo. Pri začetnih poskusih smo za ekscitacijsko valovno dolžino izbrali 350 nm in emisijsko 420 nm. Kombinacija je pogosto omenjena v člankih o metodah, pri katerih se kot derivatizacijski reagent uporablja OPA (1, 3, 10, 12).

Prvi korak pri optimizaciji je predstavljalo snemanje valovnega spektra adukta GSH z OPA. Kljub večjemu izboru instrumentov, ki so tega postopka zmožni, smo se odločili meritve opraviti na samem HPLC sistemu, čeprav je to zahtevalo dolgotrajnejši postopek. Razlog za omenjeno odločitev je bila neskladnost podatkov, pridobljenih z drugimi aparaturami. Pri slednjih ni bilo možno izvesti separacije vseh produktov derivatizacije, temveč smo izmerili spekter zmesi reakcijskih produktov.

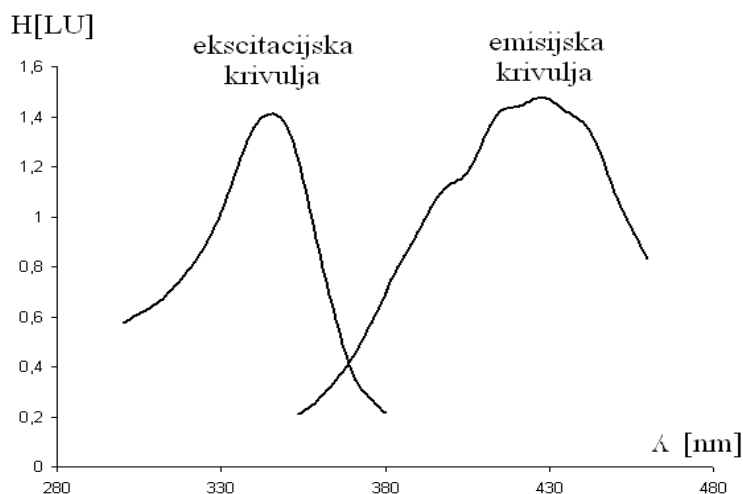
Snemanje s kiveto se je izkazalo za manj ugodno, smo pa z njeno pomočjo odkrili zaskrbljujočo značilnost derivatiziranega GSH. Z vzbujanjem vzorca nismo dosegli le fluorescence molekul, temveč tudi njihov postopni razpad. Da bi preverili, ali fotokemični razpad vpliva na točnost meritev, smo isti vzorec posneli s ksenonsko žarnico, nastavljeno na varčni način, pri katerem obratuje žarnica z nižjo močjo. Poskusili smo še meritev z ugasnjenim UV detektorjem, ki je vezan pred fluorescenčnim detektorjem in rezultate primerjali z izhodiščno metodo. Izkazalo se je, da vzorci sevanju niso izpostavljeni dovolj časa, da bi fotokemični razpad povzročil merljivo napako.

Snemanje spektra je odkrilo, da se maksimum fluorescence nahaja zelo blizu linije Rayleighovega sipanja prvega reda. Kot referenco smo posneli še spekter ozadja in ugotovili, da maksimum absorpcije derivatiziranega GSH (ekscitacija 350 nm, emisija 420 nm) delno sovpada s signali Ramanskega sipanja.



Slika 7: Prikaz Rayleighovega in Ramanskega efekta v Jablonskem diagramu (levo) in shematska slika omenjenih vrst sipanj v pretočni celici fluorescenčnega detektorja (desno)

Omenjeno sipanje je posledica Ramanovega efekta, ki nastopi zaradi razpršitve vpadne svetlobe, ki zadeva molekule vzorca (Slika 7). Večina sipane svetlobe ima enako valovno dolžino kakor vpadna svetloba. Določen delež je zaradi vmesnih prehodov med posameznimi vibracijskimi stanji izsevan z nižjo energijo in ima daljšo valovno dolžino. V spektru ima Ramanska svetloba obliko podolgovate lise, ki je vzporedna liniji Rayleighovega sipanja prvega reda. Predvidevali smo, da bo občutljivost moč izboljšati z oddaljevanjem valovnih dolžin vstran od Ramanske črte.



Slika 8: Ekscitacijska in emisijska krivulja adukta GSH-OPA

Na sliki 8 sta prikazani ekscitacijski in emisijski krivulji, dobljeni s snemanjem spektra fluorescence. V tabeli V so prikazani rezultati preskušanja različnih kombinacij ekscitacijskih in emisijskih valovnih dolžin.

Tabela V : Vpliv ekscitacijske in emisijske valovne dolžine na razmerje med signalom in šumom

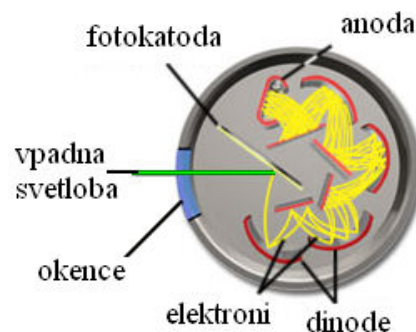
ekscitacijska valovna dolžina [nm]	emisijska valovna dolžina [nm]	višina odziva vodnega vzorca 2 $\mu\text{mol/l}$ GSH [LU]	ocenjena višina šuma [LU]	razmerje višin signal / šum
315	415	0,9	0,050	18
315	435	2,0	0,050	40
325	420	4,9	0,215	23
325	425	2,1	0,055	38
325	445	1,5	0,040	38
330	410	3,3	0,065	51
330	415	3,5	0,060	58
330	420	3,7	0,065	57
335	410	3,8	0,065	60
335	415	4,1	0,065	63
335	420	4,5	0,070	64
335	435	1,0	0,050	20
340	410	4,2	0,130	32
340	415	4,6	0,080	58
340	420	4,8	0,070	69
345	425	1,5	0,055	27
345	445	0,7	0,050	14
350	420	5,0	0,215	23
355	415	4,5	0,070	64
355	435	0,8	0,060	13

Večje razmerje med signalom in šumom omogoči nižji meji detekcije in kvantifikacije. Kot najugodnejša se je izkazala kombinacija z ekscitacijsko valovno dolžino 340 nm in

emisijsko valovno dolžino 420nm. Te nastavitve smo uporabljali pri vseh nadaljnjih poskusih.

8.1.2. Ojačitev fotopomnoževalke

Kot terminalni detektor fluorescence služi fotopomnoževalka. Ta optično-električna naprava s fotoefektom pretvarja svetlobni signal v električnega, ga preko serije dinod pomnoži in na anodi izmeri. Razlog za nastavljaljivost fotopomnoževalke je možnost zasičenja pri visokih odzivih in pomanjkanje občutljivosti pri nizkih. Detektor je opremljen s fotopomnoževalko tipa "side-on" (Slika 9), katere prednost je v hitrejšem odzivnem času zaradi krajše poti elektronov (11). Z večanjem dinodne napetosti se verjetnosti izboja dodatnih elektronov in z njimi povezan signal povečuje. Detektor ima možnost nastavitve PMT-GAIN vrednosti med 0 in 18. Vrednosti simbolizirajo število podvojitev jakosti signala (11). V tabeli II so prikazani rezultati optimizacije ojačitve fotopomnoževalke.



Slika 9: Shematski prikaz fotopomnoževalke tipa side-on

Tabela VI : Razmerje signal/šum na vzorcu 10 mmol vodne raztopine GSH v odvisnosti od faktorja ojačitve fotopomnoževalke

faktor ojačitve (gain)	višina odziva analita [LU]	višina ocenjenega šuma [LU]	razmerje signal/šum
10	0,07	0,007	10
11	0,14	0,008	18
12	0,30	0,009	33
13	0,61	0,012	51
14	1,20	0,023	52
15	2,50	0,050	50
16	5,00	0,100	50
17	10,0	0,200	50
18	20,1	0,405	50

Signal je naraščal z drugo potenco faktorja ojačitve. Šum je sprva naraščal počasneje, pri višjih vrednostih pa praktično sorazmerno s signalom. V skladu s pričakovanji je višanje faktorja ojačitve do neke mere izboljšalo detekcijo. Kot optimalno nastavitvev smo izbrali faktor ojačitve 14, pri kateri popolnoma izkoristimo potencial detektorja.

8.2. Optimizacija kromatografskih pogojev

8.2.1. Izbor stacionarne faze

Z uporabo Phenomenex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 3 μ m smo dosegli zadovoljivo ločljivost, ostali koloni, ki uporabljata večje delce stacionarne faze, pa sta se izkazali kot bistveno slabši.

8.2.2. Izbor mobilne faze

Rezultati uporabe različnih mobilnih faz in njihov vpliv na površino odziva in retencijski čas so prikazani v Tabeli VII.

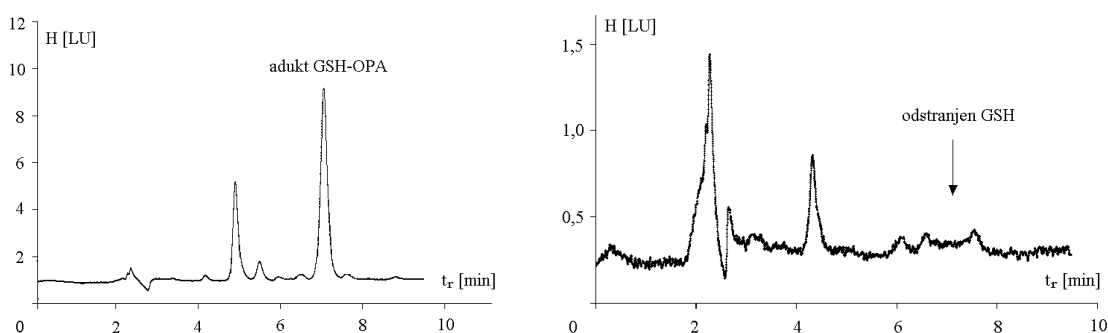
Tabela VII : Vpliv sestave mobilne faze na odziv in retencijski čas derivata GSH

delež metanola [%]	pH mobilne faze	površina odziva	retencijski čas [min]
15	6	28,4	6,72
15	7	26,9	6,85
15	8	26,1	6,91
12	6	28,5	7,51
18	6	27,6	5,98

Preskušene kombinacije sestave mobilnih faz niso izkazale signifikantnih prednosti. Čas analize ob uporabi višjih deležev metanola se je skrajšal, vendar je delovni tlak občutno narasel. Odločili smo se za uporabo preverjene sestave mobilne faze, kot je omenjeno v izhodiščnem in sorodnih člankih (1, 3, 12).

8.2.3. Preverjanje možnosti koelucije

Derivatizirani plazemski vzorci vsebujejo več fluorescentnih produktov. Obstaja možnost, da se eden ali več teh produktov eluira ob enakem retencijskem času kot analit. Možnost koelucije se normalno preveri s posnetkom kromatograma slepega vzorca. V našem primeru nastane problem priprave slepega vzorca, ki bi po definiciji moral vsebovati vse komponente plazme razen glutationa, ki pa je kot biološka spojina v plazmi vedno prisotna. Kot slepi vzorec bi lahko uporabili umetno plazmo, ki ga ne vsebuje, a hkrati mogoče ne vsebuje tudi motečih substanc. Odločili smo se za uporabo humane plazme, ki smo ji GSH predhodno inaktivirali. Kromatogram vzorca s predhodno odstranjenim GSH je prikazan na sliki 10 (desno) zraven kromatograma plazemskega vzorca (levo).



Slika 10: Kromatogram derivatiziranega plazemskega vzorca (levo) ter vzorca s predhodno odstranjenim GSH (desno), ki dokazuje, da na mestu elucije GSH-OPA ni motečih signalov.

Kromatogram pripravljenega slepega vzorca je dokazal, da na mestu elucije analita ni signalov motečih spojin, vsaj ne nesulfidnih.

8.3. Optimizacija metode določanja GSH

8.3.1. EDTA

Koncentracije oksidantov v plazmi so v primerjavi z GSH sorazmeroma velike. Biološka funkcija glutationa kot reducenta pogojuje težnjo po oksidaciji. Najpomembnejša dejavnika oksidacije sta povišana temperatura in prisotnost katalizatorjev, npr. kovinskih ionov. Dodatek EDTA (etilendiamintetraocetne kisline) kot kompleksanta kovinskih ionov

k derivatizacijskemu pufu oksidacijo upočasuje. Rezultati optimizacije količine EDTA so podani v Tabeli VIII.

Tabela VIII : Vpliv EDTA v derivatizacijskem pufu na površino odziva plazemskega vzorca

delež dodane EDTA k derivatizacijskemu pufu [%]	površina odziva plazemskega vzorca
0	72,9
0,025	73,8
0,1	81,8
0,4	80,6
1,6	81,9

Dodatek kompleksanta je izboljšal odziv, vendar nastopi zasičenje že pri dodatku 0,1% EDTA, še višje količine pa ne prinašajo prednosti. Kot optimalno količino smo izbrali dodatek 0,1% EDTA, kot je navedeno v izhodiščnem članku (1).

8.3.2. OPA

V tabeli IX so prikazani odzivi vodnega vzorca GSH, pripravljenega po postopkih z uporabo različnih časov derivatizacije.

Tabela IX: Odvisnost površine signala vodnega vzorca GSH od časa derivatizacije

čas derivatizacije	površina signala vodnega vzorca 2 $\mu\text{mol/l}$ GSH
brez	31,5
5 min	41,6
10 min	43,5
20 min	43,6
30 min	43,2
50 min	43,4
70 min	43,6

Kot je bilo pričakovano, se je čas inkubacije desetih minut, kot je navedeno v izhodiščnem članku, izkazal kot najprimernejši. Podaljšanje časa inkubacije ni pripomoglo k ojačitvi signala. Reakcija je izredno hitra, kar obrazloži težave s kontaminacijo, pri čemer preostali

OPA v končnem vzorcu derivatizira zaostale nečistote v avtomatskem vzorčevalniku HPLC sistema, ki povzročijo moteče signale.

Glutation določamo v humani plazmi, ki razen analita vsebuje veliko raznovrstnih spojin. Mnoge od teh, še posebej proteini s primarnimi amino ali sulfidnimi funkcionalnimi skupinami OPA porabljajo. Logični ukrep je zvišanje količine dodanega OPA, v celo tisočkratnih prebitkih glede na količino analita. Žal prihaja pri pretiranem povišanju do problemov zaradi kontaminacije HPLC sistema. Zaostanki krvnih vzorcev, adherirani na funkcionalnih delih injektorja že v izredno nizkih količinah dajejo moteče signale. Reaktivnost OPA neželjene signale, povezane s kontaminacijo še poslabša. Rezultati optimizacije količine potrebnega derivatizacijskega reagenta so prikazani v tabeli X.

Tabela X: Površina prispevka adukta GSH-OPA k signalu v odvisnosti od količine OPA pri derivatizaciji

količina dodane OPA k 5ml derivatizacijske raztopine [mg]	površina odziva plazemskega vzorca	površina slepega vzorca	razlika površin plazemskega in slepega vzorca
0,2	4,3	1,1	3,2
1	17,3	1,6	15,7
5	43,8	3,5	40,3
25	44,6	4,5	40,1
125	46,5	6,1	40,3
625	50,5	9,3	41,2

Meritve so pokazale, da je za derivatizacijo plazme najprimernejša raztopina s koncentracijo OPA 1 mg/ml. Ta količina zadostuje za popolno derivatizacijo analita, hkrati pa ne prispeva k pretiranemu odzivu zaradi nečistot.

8.3.3. Derivatizacijski pufer

V alkalnem mediju je kvantitativni izkoristek derivatizacije največji, v nevtralnem nižji, v kislem pa reakcija praktično ne poteka. Dvig derivatizacijskega pH je enostaven način izboljšanja odziva in posledično občutljivosti, vendar moramo upoštevati omejitve HPLC sistema. Določene komponente sistema so lahko izpostavljene medijem s pH vrednostjo do

10. Sama kolona je stabilna do pH 9,5. Hkrati pri zelo visokih pH ob prisotnosti reducentov poteka redukcija GSSG, kar bi privedlo do lažno znižanih rezultatov meritev njegove koncentracije. GSSG je stabilen do pH 12. Rezultati optimizacije pH derivatizacijskega pufru so prikazani v tabeli XI.

Tabela XI: Razmerje med odzivom polnega in slepega vzorca v odvisnosti od pH derivatizacije

pH derivatizacijskega pufru	površina odziva slepega vzorca	površina odziva 2 $\mu\text{mol/l}$ raztopine GSH v vodi	površina odziva 20 $\mu\text{mol/l}$ raztopine GSH v vodi	razmerje med odzivom 2 $\mu\text{mol/l}$ vzorca in slepim vzorcem
8	0,99	1,83	20,1	0,84
9	2,23	5,96	43,6	1,67
10	2,95	7,22	52,6	1,45
11	3,77	8,09	57,8	1,15
12	4,16	9,09	60,2	1,19
13	5,75	12,09	67,8	1,10

Kot je bilo pričakovano, je jakost signala naraščala z višanjem pH derivatizacijskega pufru. Žal so vzorci, pripravljene z višjim pH, izkazovali visoko reaktivnost, kar je vodilo do večjih količin produktov z nečistotami, prisotnih na HPLC sistemu. Odločili smo se za derivatizacijski pufer pH 9. Glede na izhodiščni članek, kjer je bil uporabljan 0,1 mol/l fosfatni pufer s pH 8, to ni velika sprememba, vendar signifikantno izboljša občutljivost.

8.3.4. Volumen injiciranja

Rezultati uporabe različnih volumnov injiciranja so prikazani v tabeli XII.

Tabela XII: Površina signala, faktor simetrije in retencijski čas adukta GSH-OPA v odvisnosti od volumna injiciranja

volumen injiciranja [μl]	površina signala vodnega vzorca 0,1 $\mu\text{mol/l}$ GSH	faktor simetrije	retencijski čas [min]
5	0,50	1,065	6,74
15	0,97	1,038	6,74
25	1,15	1,064	6,74
50	1,60	0,984	6,74
75	2,08	1,310	6,72
100	2,60	1,252	6,71

Večanje volumna injiciranja je predvidljivo povišalo jakost odziva, odvisnost med obema količinama je pričakovano linearna. Večji volumni niso povzročili niti spremembe oblike signala niti retencijskega časa. Za optimalen volumen smo izbrali 50 μl , ker je pri tem volumnu občutljivost metode zadostna. Nadaljnje višanje ni potrebno in bi skrajšalo življensko dobo predkolone. Za omenjen volumen smo se odločili tudi zaradi praktičnih razlogov. Končne vzorce smo shranjevali v vialah s 150 μl inserti.

8.4. Metoda določanja GSSG

8.4.1. Preprečevanje motečega vpliva GSH pri meritvi oksidirane oblike

Metoda določanja GSSG se je izkazala kot neselektivna. Pri snemanju vzorcev, ki so vsebovali tako GSSG kot GSH, je prisotnost GSH povzročala znaten dvig jakosti signala GSSG. Prispevek GSH je sicer relativno majhen, vendar njegov količinski prebitek glede na GSSG povzroča signifikantno motnjo.

8.4.2. Koncentracija NEM

Najenostavnejši poizkus optimizacije reakcije GSH z NEM je dvig njegove koncentracije. Reagent je sicer v prebitku, vendar je nestabilen; kot imid je podvržen hidrolizi. V primeru, da je razpad NEM vzrok neselektivnosti, bo povečanje njegove količine to kompenziralo. Rezultati optimizacije NEM so prikazani v tabeli XIII.

Tabela XIII: Prispevki GSH in GSSG k površini signala ob uporabi različnih količin NEM pri alkilaciji

koncentracija NEM [mmol/l]	površina signala slepega vzorca	površina signala GSH koncentracije 2 μ mol/l	površina signala GSSG koncentracije 0,2 μ mol/l
2,5	5,90	13,71	25,58
10	6,34	13,56	25,51
40	6,23	15,11	25,00
160	6,11	18,78	24,42

V nasprotju s pričakovanji je povišanje količine NEM selektivnost še poslabšalo. Reagenta je očitno dovolj, v večjih količinah povzroča celo stranske reakcije. Količine NEM zato nismo povečali.

8.4.3. Temperatura inkubacije

Rezultati uporabe višjih temperatur inkubacije z namenom zmanjšanja motečega vpliva GSH pri meritvi GSSG so prikazani v tabeli XIV.

Tabela XIV: Površine signalov slepega vzorca, GSH in GSSG pri uporabi višjih temperatur inkubacije

temperatura inkubacije [°C]	površina signala slepega vzorca	površina signala GSH koncentracije 2 μ mol/l	površina signala GSSG koncentracije 0,2 μ mol/l
25	5,73	13,02	25,16
40	5,51	16,82	24,77
65	5,81	10,43	17,81

Zvišanje temperature na 40° C je moteč vpliv GSH oblike le poslabšalo. Najverjetnejši vzrok zato je pospešena oksidacija GSH. Kot vemo, sta temperatura in prisotnost kovinskih

ionov glavna dejavnika oksidacij. Še višja temperatura (65°) ni uporabna, ker povzroča razpad analitov.

8.4.4. Čas inkubacije

V tabeli XV so prikazani rezultati poskusa podaljšanja časa alkilacije z NEM.

Tabela XV: Površine signalov slepega vzorca, GSH in GSSG pri podaljšanih časih alkilacije

čas alkilacije [min]	površina signala slepega vzorca	površina signala GSH koncentracije 2 $\mu\text{mol/l}$	površina signala GSSG koncentracije 0,2 $\mu\text{mol/l}$
25	6,91	14,09	26,48
50	7,21	14,33	26,73
75	7,23	13,81	26,45
300	7,02	13,72	26,40

Podaljšanje časa inkubacije ni bistveno izboljšalo selektivnosti. Očitno neželjene reakcije potečejo v prvih minutah inkubacije z NEM ali že pred samo inkubacijo.

8.4.5. Vpliv topila

Hidroliza imidnega obroča ni edina reakcija razpada NEM. Dvojna vez na maleinskem delu je podvržena redukciji (14). Bolj kot inaktivacija reagenta je zaskrbljujoča oksidoredukcijska narava reakcije. Ker se NEM reducira, deluje kot oksidant in če kot reducent porablja GSH, lahko s tem obrazložimo zvišane izmerjene koncentracije GSSG. Ker obe reakciji, alkilacija in oksidacija GSH pod vplivom NEM potekata istočasno, je njuna fizična ločitev nemogoča. Zato smo poskusili spremeniti pogoje inkubacije, da bi privilegirali potek alkilacije ali upočasnili oksidacijo GSH. Rezultati uporabe različno polarnih topil na površino motečega prispevka signala GSH ob meritvi GSSG so prikazani v tabeli XVI.

Tabela XVI: Površine signalov slepega vzorca, GSH in GSSG, ob uporabi različnih topil raztopine z NEM

sestava topila inkubacijske mešanice	površina signala slepega vzorca	površina signala GSH koncentracije 2 $\mu\text{mol/l}$	površina signala GSSG koncentracije 0,2 $\mu\text{mol/l}$
100% H ₂ O	8,28	13,64	27,87
50% metanol, 50% H ₂ O	7,94	13,37	27,65
100% acetonitril	8,14	11,76	28,13

S spreminjanjem topila nismo dosegli izboljšanja selektivnosti.

8.4.6. pH inkubacije

Reakcija poteka v širokem pH območju, vendar le v nevtralnem in bazičnem z zadovoljivo hitrostjo (13, 14). Močno bazični pogoji bistveno pospešijo reakcijo NEM z OPA, vendar tudi povzročajo razpad NEM. Izbor optimalnega pH je tako kompromis med hidrolitično stabilnostjo (15) in reaktivnostjo z GSH (14). Pripravili smo tri različne postopke, pri katerih smo s pomočjo pufrov pH zmesi v koraku inkubacije z NEM naravnali na željene vrednosti. Izbrali smo pH 3, kolikor je pH pripravljenih vodnih vzorcev zaradi dodatka 1mM HCl, nato 7,4, kolikor je pH plazemskih vzorcev zaradi pufrske kapacitete krvi, in pH 11, ki je najvišja vrednost pH, preden začne potekati redukcija oksidirane oblike. Rezultati meritev so podani v Tabeli XVII.

Tabela XVII: Preverjanje uspešnosti alkilacije pri različnih pH

pH inkubacije z NEM	površina signala slepega vzorca	površina signala GSH koncentracije 2 $\mu\text{mol/l}$	površina signala GSSG koncentracije 0,2 $\mu\text{mol/l}$
3	7,58	15,11	27,32
7,4	7,34	13,91	26,17
11	7,56	20,65	23,84

Sprememba pH inkubacije z NEM ni bistveno izboljšala selektivnosti. To je potrdilo naše sume, da je pri meritvi oksidirane oblike vzrok motečega vpliva GSH njegova oksidacija,

ki poteče, še preden vzorec inkubiramo z NEM. Je pa poskus nakazal možnost izvedbe alkilacije v krvi (pH 7,4), kar je bil naslednji korak optimizacije.

8.4.7. Odvzem krvi

Rezultati poskusov, s katerimi bi ugotovili, v kateri stopnji derivatizacije potekajo neželjene reakcije so prikazani v tabeli XVIII. Spremljali smo površino odziva GSSG na plazemskem vzorcu, ki je bil pripravljen z uporabo kombinacij različnih antikoagulantov in mest izvajanja alkilacije.

Tabela XVIII: Vpliv antikoagulanta, uporabljenega za pripravo plazme in mesta dodajanja NEM na odziv plazme

antikoagulant	alkilacija z NEM	površina odziva GSSG
EDTA	v plazmi	69,7
EDTA	v krvi	44,99
EDTA	v krvi in plazmi	45,04
heparin	v plazmi	63,89
heparin	v krvi	40,97
heparin	v krvi in plazmi	39,32

Oba antikoagulanta sta se izkazala kot uporabna. Pri tem poskusu je heparin na videz rahlo učinkovitejši, vendar smo po večjih odvzemih ugotovili, da sta antikoagulanta ekvivalentna in se manjše razlike le redko pojavljajo. Ugotovili smo, da je alkilacija GSH uspešnejša, če jo izvedemo v krvi oz. čimprej in tako oksidacijo časovno onemogočimo. Ker smo poskus izvajali na humani plazmi z neznano koncentracijo GSSG, je uspešnost alkilacije težko oceniti. Zato smo pripravili nov poskus, pri čemer smo odvzeti krvi najprej dodali sveže pripravljeno raztopino GSH znane koncentracije v PBS, rahlo premešali in nato dodali raztopino NEM v PBS. V primeru da je alkilacija v krvi uspešna, dodatek GSH h krvi ne bi smel zvišati signala meritev GSSG.

8.4.8. Preverjanje stopnje oksidacije

V tabeli XIX je prikazano v kolikšni meri smo uspeli zmanjšati vpliv oksidacije GSH z uporabo optimizirane metode določanja GSSG.

Tabela XIX: Rezultati uspešnosti preprečevanja oksidacije GSH posodobljene metode določanja GSSG

dodana koncentracija GSH h krvi [$\mu\text{mol/l}$]	mesto poteka alkilacije z NEM	površina odziva GSSG
0	v plazmi	60,24
2	v plazmi	80,36
0	v krvi	59,77
2	v krvi	66,28

Poskus kaže izboljšanje selektivnosti pri izvajanju alkilacije v krvi, vendar še vedno ne dosegamo popolne reakcije. Optimizirali smo številne parametre, da bi odstranili moteč vpliv GSH pri meritvi GSSG. Kljub vsem naporom nismo dosegli uporabnosti metode določanja GSSG v plazmi. Metoda deluje le, ko analiziramo vodne vzorce, ki vsebujejo le oksidirano obliko. To nam omogoči, da posnamemo umeritveno krivuljo z uporabo pripravljenih vodnih vzorcev in izvedemo validacijo za vodne vzorce. S tem lahko dokažemo, da je s tekočinsko kromatografijo in fluorescenčno detekcijo možno analizirati nizke koncentracije GSSG, kakršne bi se nahajale v plazmi.

8.5. Validacija

Rezultati dnevne in meddnevne validacije metod določanja GSH v plazmi in določanja GSSG v vodi so navedeni v tabelah od XX do XXIII.

Tabela XX: Odzivi serij dnevne validacije metode določanja GSH v plazmi

c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	površina odziva GSH		
	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0	5,93	5,82	6,01
0,2	8,73	8,39	8,63
0,4	10,91	11,45	10,34

0,6	12,61	13,32	12,65
1	17,46	17,95	16,88
2	29,26	29,56	28,67
3	42	43,8	44,66
5	64,35	66,64	66,23
10	125,61	127,93	126,8
20	232,85	244,25	240,64
c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	jutranji odzivi	dopoldanski odzivi	popoldanski odzivi
0,5	12,62	12,51	11,79
2,5	35,52	36,9	34,87
12,5	158,1	157,5	151,4

Tabela XXI: Odzivi serij meddnevne validacije metode določanja GSH v plazmi

	površina odziva GSH		
c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	serija 1. dne	serija 2. dne	serija 3. dne
0	6,52	6,08	6,01
0,2	8,73	8,63	8,63
0,4	11,24	10,83	10,34
0,6	13,58	13,31	12,65
1	18,34	17,58	16,88
2	31,75	30,25	28,67
3	45,06	42,99	44,66
5	68,8	66,38	66,23
10	135,27	130,65	126,8
20	252,51	243,35	240,64
c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	1.dan	2.dan	3.dan
0,5	12,13	11,26	11,79
2,5	33,95	36,04	34,87
12,5	152,59	158,79	151,39

Tabela XXII: Odzivi serij dnevne validacije metode določanja GSSG v vodi

	površina odziva GSH		
c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0	7,49	7,37	8,26
0,02	10,2	9,25	9,95
0,04	11,13	11,9	11,33
0,06	13,22	13,52	12,82
0,1	15,15	15,45	15,45
0,2	25	25,58	25,21
0,3	30,19	31,94	32,46
0,5	43	46,25	46,59
1	75,22	77,8	77,93
2	143,04	147,26	149,15
c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	jutranji odzivi	dopoldanski odzivi	popoldanski odzivi
0,05	11,83	12,61	12,42
0,175	22,08	21,17	22,49
2,5	89,88	93,7	92,41

Tabela XXIII: Odzivi serij meddnevne validacije metode določanja GSSG v vodi

c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	serija 1. dne	serija 2. dne	serija 3. dne
0	6,67	7,99	8,26
0,02	9,71	10,43	9,95
0,04	11,99	12,05	11,33
0,06	13,17	13,14	12,82
0,1	15,04	16,34	15,45
0,2	23,56	24,42	25,21
0,3	30,29	30,35	32,46
0,5	42,64	43,96	46,59
1	73,99	75,11	77,93
2	140,66	143,17	149,15

c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	1.dan	2.dan	3.dan
0,05	11,83	12,14	12,42
0,175	22,08	21,53	22,49
2,5	89,88	88,59	92,41

Enačbi umerivenih premic metode določanja GSH:

- Dnevna serija : $y = 12,1 \text{ l/umol} \cdot x + 5,9$; $R^2 = 0,9993$
- Meddnevna serija: $y = 12,3 \text{ l/umol} \cdot x + 6,0$; $R^2 = 0,9995$

Enačbi umerivenih premic metode določanja GSSG:

- Dnevna serija : $y = 75,3 \text{ l/umol} \cdot x + 8,6$; $R^2 = 0,9958$
- Meddnevna serija: $y = 73,1 \text{ l/umol} \cdot x + 8,5$; $R^2 = 0,9961$

8.5.1. Ponovljivost metod

Rezultati vrednotenja ponovljivosti metod določanja GSH in GSSG so podani v tabelah XXIV in XXV.

Tabela XXIV: Ponovljivost metode določanja GSH v plazmi

c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	dnevna serija		meddnevna serija	
	povprečje \pm SD	CV [%]	povprečje \pm SD	CV [%]
0	5,92 \pm 0,10	1,61	6,20 \pm 0,28	4,46
0,2	8,58 \pm 0,17	2,04	8,66 \pm 0,05	0,67
0,4	10,90 \pm 0,55	5,09	10,80 \pm 0,45	4,17
0,6	12,86 \pm 0,40	3,10	13,18 \pm 0,48	3,63
1	17,43 \pm 0,53	3,07	17,60 \pm 0,73	4,15
2	29,2 \pm 0,45	1,55	30,2 \pm 1,5	5,10
3	43,5 \pm 1,4	3,12	44,2 \pm 1,1	2,48
5	65,7 \pm 1,2	1,86	67,1 \pm 1,4	2,15
10	127,3 \pm 1,2	0,92	130,9 \pm 4,2	3,24
20	239 \pm 6	2,44	246 \pm 6	2,53

c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	povrečje \pm SD	CV [%]	povrečje \pm SD	CV [%]
0,5	12,3 \pm 0,5	3,66	11,72 \pm 0,44	3,74
2,5	35,8 \pm 1,0	2,90	35,0 \pm 1,1	3,00
12,5	155,7 \pm 3,7	2,38	154,3 \pm 4,0	2,57

Tabela XXV: Ponovljivost metode določanja GSSG v vodi

c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	dnevna serija		meddnevna serija	
	povrečje \pm SD	CV [%]	povrečje \pm SD	CV [%]
0	7,70 \pm 0,48	6,27	7,64 \pm 0,85	11,14
0,02	9,80 \pm 0,49	5,02	10,03 \pm 0,37	3,66
0,04	11,45 \pm 0,40	3,49	11,79 \pm 0,40	3,39
0,06	13,19 \pm 0,35	2,66	13,04 \pm 0,19	1,49
0,1	15,35 \pm 0,17	1,13	15,61 \pm 0,66	4,26
0,2	25,3 \pm 0,3	1,16	24,4 \pm 0,8	3,38
0,3	31,5 \pm 1,2	3,77	31,0 \pm 1,2	3,98
0,5	45,3 \pm 2,0	4,38	44,4 \pm 2,0	4,53
1	77,0 \pm 1,5	1,99	75,7 \pm 2,0	2,68
2	146,5 \pm 3,1	2,14	144,3 \pm 4,4	3,02
c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	Povrečje \pm SD	CV [%]	Povrečje \pm SD	CV [%]
0,05	12,29 \pm 0,41	3,31	12,13 \pm 0,30	2,43
0,175	21,9 \pm 0,7	3,08	22,0 \pm 0,5	2,19
1,25	92,0 \pm 1,9	2,11	90,3 \pm 1,9	2,15

8.5.2. Linearnost

Rezultati vrednotenja linearnosti metod določanja GSH in GSSG so podani v tabelah XXVI in XXVII.

Tabela XXVI: Parametri linearnosti metode določanja GSH v plazmi

dnevna serija	naklon (k) [l/ μ mol]	odsek (n)	R ²
jutranja	11,7	6,02	0,9996
dopoldanska	12,2	6,01	0,9991
popoldanska	12,1	5,71	0,9992
dnevno povprečje	12,0 \pm 0,26	5,91 \pm 0,18	
meddnevna serija	naklon (k) [l/ μ mol]	odsek (n)	R ²
1. dan	12,6	6,27	0,9995
2. dan	12,1	6,02	0,9997
3. dan	12,1	5,71	0,9992
meddnevno povprečje	12,3 \pm 0,28	6,00 \pm 0,28	

Tabela XXVII: Parametri linearnosti metode določanja GSSG v vodi

dnevna serija	naklon (k) [l/ μ mol]	odsek (n)	R ²
jutranja	70,7	8,64	0,9925
dopoldanska	77,5	8,33	0,9952
popoldanska	77,9	8,37	0,9975
dnevno povprečje	75,4 \pm 4,0	8,45 \pm 0,18	
meddnevna serija	naklon (k) [l/ μ mol]	odsek (n)	R ²
1. dan	70,4	8,4	0,9935
2. dan	71,0	9,00	0,9972
3. dan	77,9	8,37	0,9975
meddnevno povprečje	73,1 \pm 4,2	8,59 \pm 0,36	

8.5.3. Točnost

Rezultati vrednotenja dnevne in meddnevne točnosti obeh metod so podani v tabelah od XXVIII do XXXI.

Tabela XXVIII: Dnevna točnost metode določanja GSH v plazmi

c _{St} [μmol/l]	točnost [%]		
	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0	-	-	-
0,2	112,0	98,0	107,9
0,4	100,7	111,7	89,0
0,6	90,3	100,0	90,9
1	94,0	98,0	89,2
2	95,3	96,6	92,9
3	98,4	103,3	105,6
5	95,7	99,4	98,8
10	98,0	99,9	99,0
20	92,3	97,6	96,2
c _{QC} [μmol/l]	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0,5	108,6	106,8	95,0
2,5	96,8	101,3	94,7
12,5	99,7	99,4	95,3

Tabela XXIX: Meddnevna točnost metode določanja GSH v plazmi

c _{St} [μmol/l]	točnost [%]		
	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0	-	-	-
0,2	112,6	108,6	108,6
0,4	107,2	98,9	89,0
0,6	103,1	99,5	90,5
1	100,5	94,3	88,6
2	104,6	98,5	92,1
3	105,7	100,1	104,6

5	101,9	98,0	97,8
10	104,9	101,1	98,0
20	100,0	96,2	95,2
c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0,5	100,2	86,1	94,7
2,5	90,8	97,6	93,8
12,5	95,1	99,2	94,4

Vse meritve dajejo rezultate, ki od dejanske vrednosti odstopajo za manj kot 15%. Metoda določanja koncentracije GSH v plazmi ustreza validacijskim kriterijem točnosti.

Tabela XXX: Dnevna točnost metode določanja GSSG v vodi; vrednosti, ki ne ustrezajo validacijskim kriterijem so označene s krepko pisavo

c_{St} [$\mu\text{mol/l}$]	točnost [%]		
	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0	-	-	-
0,02	116,1	53,1	99,5
0,04	88,9	114,4	95,5
0,06	105,5	112,1	96,6
0,1	88,9	92,9	92,9
0,2	109,8	113,6	111,2
0,3	96,1	103,9	106,2
0,5	91,7	100,3	101,2
1	88,6	92,0	92,2
2	89,3	92,1	93,3
c_{QC} [$\mu\text{mol/l}$]	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0,05	89,7	110,4	105,3
0,175	103,3	96,4	106,4
1,25	86,4	90,5	89,1

Tabela XXXI: Meddnevna točnost metode določanja GSSGv vodi; vrednosti, ki ne ustrezajo validacijskim kriterijem, so označene s krepko pisavo

c _{St} [μmol/l]	točnost [%]		
	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0	-	-	-
0,02	76,3	125,5	92,7
0,04	116,1	118,2	93,5
0,06	104,3	103,6	96,3
0,1	88,2	106,0	93,8
0,2	102,4	108,2	113,6
0,3	98,9	99,2	108,8
0,5	93,1	96,8	104,0
1	89,5	91,0	94,9
2	90,3	92,1	96,1
c _{QC} [μmol/l]	jutranja serija	dopoldanska serija	popoldanska serija
0,05	88,5	97,0	104,7
0,175	105,4	101,1	108,6
1,25	89,0	87,5	91,7

Nekatere točke v nižjem koncentracijskem območju izkazujejo preveliko odstopanje od realnih vrednosti. Večje napake so se pojavile pri določevanju meddnevne točnosti, vendar je pojav najverjetneje naključen in izhaja iz pomanjkanja odziva. Tudi čistost sistema ob izvajanju validacije ni bila idealna, odzivi slepih vzorcev so v primerjavi s prispevki vzorcev nižjih koncentracij relativno veliki. Prav v tem območju lahko deviacija prispevka slepega vzorca povzroči izredno velike odklone, kot je to razvidno pri meritvi koncentracije 0,02 μmol/l GSSG. Pred začetkom izvedbe validacije nismo z gotovostjo vedeli, kako nizke koncentracije bomo lahko še določali. Točke nizkih koncentracij so izbrane namensko z majhnim razmakom, da omogočajo čim natančnejšo določitev meje kvantifikacije. Koncentracija 0,02 μmol/l se je izkazala kot nedoločljiva in smo jo zato izključili iz postopka validacije. Točnost smo tako uspeli validirati na območju od 0,04 μmol/l do 2 μmol/l GSSG. Nekatere točke pri koncentraciji 0,04 μmol/l sicer presegajo mejo odstopanja 15%, vendar je za njih kot novo določeno mejo kvantifikacije dovoljeno 20% odstopanje, čemur pa ustrezajo. Točnost kontrolnih vzorcev je ustrezna.

8.5.4. Območje linearnosti

Metoda določanja koncentracije GSH je linearna na celotnem koncentracijskem intervalu, koeficienti korelacije so ustrezni (tabela XXVI).

Žal se je metoda določanja GSSG izkazala kot nelinearna, še posebej v območju nižjih koncentracij. Vzrok za to sta prej omenjeno pomanjkanje odziva in relativno visoki signali slepih vzorcev. S pomikanjem proti višjim koncentracijam se koeficient korelacije izboljšuje in pri mejni koncentracij 0.1 $\mu\text{mol/l}$ preseže zahtevano vrednost 0,998. Analizna metoda določanja koncentracije GSSG je linearna na območju od 0,1 $\mu\text{mol/l}$ do 2 $\mu\text{mol/l}$.

8.5.5. Meja detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ)

$$\text{LOD}_{\text{GSH}} = 3,3 \cdot \frac{\text{SE}_{\text{GSH}}}{\text{B}_{\text{GSH}}} = 3,3 \cdot \frac{\text{SE}_{\text{GSH}}}{\frac{k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6}{6}};$$

SE_{GSH} predstavlja standardno deviacijo odseka na ordinati serij GSH. S k_1 do k_3 so označeni nakloni umeritvenih premic znotrajdnevne in s k_4 do k_6 meddnevne serije vzorcev GSH.

$$\text{LOD}_{\text{GSH}} = 6 \cdot 3,3 \cdot \frac{\text{SE}_{\text{GSH}}}{k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6}$$

$$\text{LOD}_{\text{GSH}} = 19,8 \cdot \frac{0,23}{(11,7 + 12,2 + 12,1 + 12,6 + 12,1 + 12,1)/\mu\text{mol}}$$

$$\text{LOD}_{\text{GSH}} = 0,063 \mu\text{mol/l}$$

Na enak način določimo mejo detekcije za metodo določanja koncentracije GSSG:

$$\text{LOD}_{\text{GSSG}} = 3,3 \cdot \frac{\text{SE}_{\text{GSSG}}}{\text{B}_{\text{GSSG}}} = 3,3 \cdot \frac{\text{SE}_{\text{GSSG}}}{\frac{k_7 + k_8 + k_9 + k_{10} + k_{11} + k_{12}}{6}};$$

SE_{GSSG} predstavlja standardno napako odseka na ordinati serije GSSG. S k_7 do k_9 in k_{10} do k_{12} smo podobno kot prej označili naklone umeritvenih premic znotrajdnevne in meddnevne serije vzorcev GSSG.

$$LOD_{GSSG} = 6 \cdot 3,3 \cdot \frac{SE_{GSSG}}{k_7 + k_8 + k_9 + k_{10} + k_{11} + k_{12}}$$

$$LOD_{GSSG} = 19,8 \cdot \frac{0,27}{(70,7 + 77,5 + 77,9 + 70,4 + 71,0 + 77,9) \mu\text{mol}}$$

$$LOD_{GSSG} = 0,012 \mu\text{mol/l}$$

Iz dobljenih mej detekcije smo izračunali ustrezni meji kvantifikacije (13):

$$LOQ_{GSH} = \frac{10}{3,3} \quad LOD_{GSH} = \frac{10}{3,3} \cdot 0,0625 \mu\text{mol/l}$$

$$LOQ_{GSH} = 0,19 \mu\text{mol/l}$$

$$LOQ_{GSSG} = \frac{10}{3,3} \quad LOD_{GSSG} = \frac{10}{3,3} \cdot 0,0120 \mu\text{mol/l}$$

$$LOQ_{GSSG} = 0,036 \mu\text{mol/l}$$

9. Razprava

Razvoj metode je potekal postopoma in sistematično. Pri večini korakov optimizacije so dobljeni rezultati in ugotovitve pogojevali pristop k sledečemu problemu.

9.1. Izbor metode

Kot izhodišče naloge smo izbrali članek, ki opisuje določanje GSSG in GSH z uporabo HPLC separacijske tehnike in fluorescenčne detekcije v bioloških vzorcih. Uporaba fluorescenčnega liganda OPA je pogosto navedena v sorodnih člankih. Reagent naj bi bil stabilen, reagiral naj bi z visokim izkoristkom in omogočal meritve nizkih koncentracij glutationa. Postopek določanja GSSG je v primerjavi s sorodnimi članki enostavnejši, predvsem zaradi odsotnosti uporabe reducentov.

9.2. Optimizacija detekcije

Začetne poskuse smo izvedli z uporabo parametrov, ki so navedeni v izhodiščnem članku. Rezultati meritev so pokazali znatno pomanjkanje občutljivosti. Razmerje med signalom in šumom je nakazovalo mejo detekcije v območju 40 $\mu\text{mol/l}$ GSH, kar je za faktor 100 prenizka občutljivost. Z namenom izboljšanja odziva smo začeli pri optimizaciji fluorescenčnega detektorja. Tabela XXXII prikazuje parametre, ki smo jih poskusili optimizirati, izhodiščno in optimizirano vrednost ter približen delež izboljšanja občutljivosti.

Tabela XXXII: Pregled optimiziranih parametrov fluorescenčne detekcije

parameter detekcije	izhodiščna vrednost	optimizirana vrednost	ocenjen delež porasta občutljivosti
ekscitacijska valovna dolžina [nm]	350	340	220 %
emisijska valovna dolžina [nm]	420	420	
faktor ojačitve fotopomnoževalke	10	14	520%
odzivni čas [s]	0,1	0,25	/
frekvenca utripanja svetilke [Hz]	296	296	/
stanje UV detektorja	vklopljen	vklopljen	/

9.3. Optimizacije kromatografskih pogojev

Že začetni kromatografski pogoji so omogočali dobro separacijo analita od ostalih vrhov. Kljub temu smo preiskusili tri stacionarne in mobilne faze (Tabela XXXIII). Ker ni nobena od ostalih izbranih stacionarnih faz pripomogla k izboljšanju separacije, smo za nadaljno delo izbrali začetne kromatografske pogoje.

Tabela XXXIII: Pregled kromatografskih parametrov

kromatografski parameter	izhodišče	optimizirana vrednost	ocenjen delež porasta občutljivost
stacionarna faza	Luna C18 150mm x 4,6 mm 3 μ m	Luna C18 150mm x 4,6 mm 3 μ m	/
sestava mobilne faze	15% MeOH / 25mM fosfatni pufer pH 6	15% MeOH / 25mM fosfatni pufer pH 6	/
pH mobilne faze	6,0	6,0	/

9.4. Optimizacija metode določanja GSH

Kljub signifikantnemu izboljšanju detekcije še vedno nismo dosegali željene občutljivosti. Nadaljevali smo z optimizacijo koncentracije OPA, pH derivatizacijskega pufra in časa inkubacije z namenom izboljšanja izkoristka derivatizacije (Tabela XXXIV). Z dodatkom večjih količin kompleksatorja kovinskih ionov EDTA smo preverili vpliv oksidacije GSH na njegovo določanje. Zadnji ukrep je bilo zmanjšanje faktorjev redčenja alikvotov s pufri v posameznih fazah derivatizacije.

Tabela XXXIV: Pregled optimiziranih parametrov derivatizacije GSH

derivatizacijski parameter	izhodiščna vrednost	optimizirana vrednost	ocenjen delež porasta občutljivost [%]
količina EDTA dodana k derivatizacijskem pufri [%]	0,1	0,1	/
čas inkubacije [min]	10	10	/
količina OPA v derivatizacijski raztopini [mg/5ml]	5	5	/
pH derivatizacijskega pufra	8,0 (fosfatni pufer)	9,0 (boratni pufer)	200
faktor redčenja z derivatizacijskim pufrom po centrifugiranju	1 : 21	1 : 11	190
faktor redčenja alikvota v derivatizacijski zmesi	1 : 17	1 : 7	240

Z optimizacijo vseh parametrov detekcije in derivatizacije smo izboljšali občutljivost za približno 104-krat.

9.5. Optimizacija metode določanja GSSG

Pri obeh metodah, tako pri določanju GSH kot GSSG na detektorju, zaznavamo enako spojino. Večina parametrov, optimiziranih za metodo določanja GSH, je tako prenosljiva in smo z njihovo uporabo predvideno dosegli željeno občutljivost. Pri tej metodi smo se osredotočili na odpravljanje napak, ki jih povzroča oksidacija GSH v biološkem vzorcu.

Oksidacija lažno zviša izmerjeno količino GSSG. V tabeli XXXV so prikazani parametri, ki smo jih poskusili optimizirati, izhodiščno in optimizirano vrednost ter približen delež upada oksidacije.

Tabela XXXV: Pregled optimiziranih parametrov specifičnih za metodo določanja GSSG

parameter metode določanja GSSG	izhodiščna vrednost	optimizirana vrednost	ocenjen deleža upada oksidacije GSH [%]
koncentracija NEM [mmol/l]	10	10	/
čas alkilacije [min]	25	75	2,0
T alkilacije [°C]	25	25	/
pH alkilacije	3,0	7,4	8,0
Sestava topila raztopine z NEM	H ₂ O	100% acetonitril /	8,5

Ker z optimizacijo alkilacije nismo dosegli želenih rezultatov, smo domnevali, da moteče oksidacije potečejo, še preden uspemo iz krvi pripraviti plazemski vzorec. Osredotočili smo se na optimizacijo odvzema krvi ter alkilacijo GSH namesto v plazmi poskusili izvesti že v krvi (Tabela XXXVI).

Tabela XXXVI: Pregled optimiziranih parametrov odvzema krvi

Parameter priprave vzorca	Izhodišče	Optimiziran izbor	ocenjen deleža upada oksidacije GSH [%]
Antikoagulant	EDTA	EDTA	/
Mesto izvedbe alkilacije	plazma	Kri	44

Obseg oksidacije GSH smo uspeli zmanjšati iz 3,1% na 1,4%, vendar ne do take mere, ki bi omogočila analitično uporabnost.

9.6. Validacija

Validacijo metode določanja GSH v plazmi smo uspešno izvedli. Metoda je ustrezala kriterijem znotrajdnevne in meddnevne ponovljivosti in točnosti. Linearnost je bila potrjena po celotnem koncentracijskem območju od 0,2 $\mu\text{mol/l}$ – 20 $\mu\text{mol/l}$ GSH. Meja detekcije je znašala 0,063 $\mu\text{mol/l}$ in meja kvantifikacije 0,19 $\mu\text{mol/l}$ GSH.

Metode določanja GSSG v plazmi nismo uspeli izpopolniti. Zaradi prispevka oksidacije GSH h količini GSSG, že prisotni v plazmi, je metoda netočna. Kljub temu smo poskusili dokazati, da je s HPLC separacijsko tehniko in fluorescenčno detekcijo možno določati nizke koncentracije GSSG. Validacijo smo izvedli na vodnih vzorcih, ki so vsebovali le GSSG. Metoda je ustrezala kriterijem točnosti in ponovljivosti od druge najnižje koncentracije (0,04 $\mu\text{mol/l}$) naprej. Tudi območje linearnosti ni obsegalo vseh koncentracij, metoda je linearna od 0.1 $\mu\text{mol/l}$ do 2 $\mu\text{mol/l}$ GSSG.

9.7. Uporaba optimiziranih metod določanja GSH in GSSG v praksi

V plazmi zdravega prostovoljca smo z optimiziranimi metodama določili vsebnost GSH 1,31 $\mu\text{mol/l}$ in GSSG 0,43 $\mu\text{mol/l}$. Določena koncentracija GSH sovпада s koncentracijskim območjem normalnih vrednosti GSH zdravih ljudi ($1.82 \pm 0.55 \mu\text{mol/l}$) kot jo navaja avtor članka, katerega metodo smo izbrali kot izhodišče (1). Koncentracija GSSG, ki smo jo določili v plazmi prostovoljca, pa je pričakovano višja od koncentracijskega območja normalnih vrednosti GSSG zdravih ljudi ($0.154 \pm 0.044 \mu\text{mol/l}$), po podatkih, podanih v izhodiščnem članku (1).

10. Sklepi

Razvili smo metodo HPLC za določevanje plazemskih koncentracij GSH z derivatizacijo s fluorescenčnim ligandom OPA.

HPLC metodo smo razvili na koloni Luna 2 μm C18 100A 150 x 4,6 mm 3 μm termostatirano na 40 °C s predkolono Luna C18. Mobilna faza je bila sestavljena iz 15% MeOH in 85% 25 mmol/l fosfatnega puфра pH 6,0. Pretok mobilne faze je znašal 0,7 ml/min, elucija je potekala izokratsko. Volumen injiciranja je znašal 50 μl . Posamezna analiza je trajala 10 min.

Detekcija analita je potekala na fluorescenčnem detektorju pri ekscitacijski valovni dolžini 340 nm in emisijski valovni dolžini 420 nm. Frekvenca utripanja svetilke je bila nastavljena na 296 Hz, faktor ojačitve fotopomnoževalke na 14 in odzivni čas pretvorbenega filtra signala na 0,25 s.

Metodo določanja GSH v humani plazmi smo validirali znotraj dneva in med dnevi. Območje linearnosti za GSH je obsegalo od 0,2 $\mu\text{mol/l}$ do 20 $\mu\text{mol/l}$. Najmanjša oz. največja točnost sta bili 86,1% oz. 111,7%, najboljša oz. najslabša ponovljivost je znašala 0,67% oz. 5,1%. Izračunani limiti detekcije in kvantifikacije sta znašali 0,063 $\mu\text{mol/l}$ in 0,19 $\mu\text{mol/l}$. Metoda je po smernicah ICH ustrezna in primerna za rutinsko uporabo.

Validacija metode določanja GSSG v humani plazmi ni bila uspešna. Območje linearnosti za GSSG je obsegalo od 0,1 $\mu\text{mol/l}$ do 2 $\mu\text{mol/l}$. Najmanjša oz. največja točnost sta bili 86,4% oz. 113,6%, najslabša oz. najboljša ponovljivost je znašala 1,16% oz. 4,53%. Izračunana limita detekcije in kvantifikacije sta znašali 0,012 $\mu\text{mol/l}$ in 0,036 $\mu\text{mol/l}$. Metoda po smernicah ICH ni ustrezna za rutinsko uporabo, predvsem zaradi problemov, povezanih z oksidacijo GSH.

11. Literatura

- 1) Giustarini D, Dalee-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free radical biology & medicine* 2003; 35: 1365–1372
- 2) Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemont F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta* 2003; 333: 19–39
- 3) Kand'ár R, Žáková P, Lotková H, Kučera O, Červinková Z. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; 43: 1382–1387
- 4) Jones DP, Carlson JL, Samiec PS, Sternberg P Jr., Mody VC Jr., Reed RL, Brown LS. Glutathione measurement in human plasma, evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clinica chimica acta* 1998; 275: 175–184
- 5) Rossi R, Dalle-Donne I, Milzani A, Giustarini D. Oxidized forms of glutathione in peripheral blood as biomarkers of oxidative stress. *Clinical chemistry* 2006; 52: 1406–1414
- 6) Giustarini D, Dalee-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. Interference of plasmatic reduced glutathione and hemolysis on glutathione disulfide levels in human blood. *Free radical research* 2004; 38: 1101–1106
- 7) Vina JR, Palacin M, Puertes IR, Hernandez R, Vina J. Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *AJP - Endocrinology and Metabolism* 1989; 257: 916-922

- 8) Liang S, Wang H, Zhang Z, Zhang H. Determination of thiol by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection with 5-methyl-(2-(m-iodoacetylaminophenyl)benzoxazole). *Anal bioanal chem* 2005; 381: 1095–1100
- 9) HPLC column protection guide version 0908, Phenomenex inc. 2008
- 10) Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry* 1976; 74: 214-226
- 11) Agilent 1100 series fluorescent detector reference manual. Agilent technologies 1998.
- 12) Senft AP, Dalton TP, Shertzer HG. Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe *o*-phthalaldehyde. *Analytical biochemistry* 2000; 280: 80–86
- 13) Guidance for industry Q2B validation of analytical procedures: Methodology (ICH) <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf> (dostop 22.08.2009)
- 14) Gregory JD. The Stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups. *J Am Chem Soc* 1955; 77: 3922-3923
- 15) Frese R, Gröschel-Stewart U. On the Stability of N-Ethylmaleimide Alkylated Sulfhydrylgroups. *Birkhäuser Basel* 1972; 28: 1420-682