

# Razvoj metode za kvalitativno određivanje glutaciona pomoću HPLC-DAD sistema

---

Capurso, Orsat

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:926098>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**RAZVOJ METODE ZA KVALITATIVNO ODREĐIVANJE  
GLUTATIONA POMOĆU HPLC-DAD SISTEMA**

**Završni rad**

**ORSAT CAPURSO**

**Matični broj:416**

**Split, rujan 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**RAZVOJ METODE ZA KVALITATIVNO ODREĐIVANJE  
GLUTATIONA POMOĆU HPLC-DAD SISTEMA**

**Završni rad**

**ORSAT CAPURSO**

**Matični broj:416**

**Split, rujan 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**FORMING A METHOD FOR QUALITATIVE DETERMINATION OF  
GLUTATHIONE USING HPLC-DAD SYSTEM**

**Bachelor thesis**

**ORSAT CAPURSO**

**Parent number:416**

**Split, September 2022**

## Temeljna dokumentacijska kartica

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-Tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Tema rada:** Je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Prof. dr. sc. Mila Radan  
**Pomoć pri izradi:** Doc. prof. dr. sc. Franko Burčul

### RAZVOJ METODE ZA KVALITATIVNO ODREĐIVANJE GLUTATIONA POMOĆU HPLC-DAD SISTEMA

Orsat Capurso, 416

#### Sažetak:

Glutation (GSH) je intracelularni antioksidans. Tripeptid je glutamata, cisteina i glicina. Poznat je pod kemijskim nazivom kao  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicin. (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-[(karboksimetil) karbamoil]-2-sulfaniletil] karbamoil] butanoična kiselina. Glutation ima razne fiziološke funkcije među kojima je najistaknutija njegova antioksidacijska uloga šticeanja stanica od slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta, zbog čega je prisutan u skoro svim stanicama. Ovaj rad opisuje razvoj metode za kvantitativno određivanje glutaciona pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s nizom dioda kao detektorom.

**Ključne riječi:** glutacion, intracelularan, antioksidans, visokodjelotvorna tekućinska kromatografija

#### Rad sadrži:

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

- |                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| 1. doc. dr. sc. Maša Buljac          | predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić | član          |
| 3. prof. dr. sc. Mila Radan          | član - mentor |

#### Datum obrane:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### BACHELOR THESIS

**University of split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Undergraduate study of Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25.

**Mentor:** Mila Radan, Ph.D., full professor

**Technical assistance:** Franko Burčul, Ph.D., full professor

### DEVELOPMENT OF A METHOD FOR QUALITATIVE DETERMINATION OF GLUTATHIONE USING HPLC-DAD

Orsat Capurso, 416

#### **Abstract:**

Glutathione(GSH) is a intracellular thiole, tripeptide of glutamate, cisteine, and gycine. Chemically known as (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-[(carboxymethyl) carbamoyl]-2-sulfanylethyl] carbamoyl] butanoic acid. Glutathione has diverse physiological functions, the most prominent one being his antioxidant role in protection against reactive oxygen species, because of which he is present within almost every cell. This paper describes the development of a method for quantitative determination of glutathione via high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector.

**Key words:** glutathione, intracellular, antioxidant, high performance liquid chromatography,

#### **Thesis contains:**

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

- |                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. Doc. dr. sc. Maša Buljac          | Chair person    |
| 2. Doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić | member          |
| 3. Prof. dr. sc. Mila Radan          | member - mentor |

#### **Defence date:**





*Ovaj rad izrađen je u Zavodu za Biokemiju, Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Mile Radan u razdoblju od svibnja do rujna 2022. godine*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr. sc. Mili Radan, i doc. dr. sc. Franku Burčulu na velikoj pomoći i savjetima tokom izrade rada. Hvala mojim prijateljima bez kojih ne znam gdje bi bio, i obitelji na neiscrpoj podršci i strpljivosti koju su iskazali tokom mojih godina studiranja*

## **Zadatak završnog rada**

- Razvoj analitičke metode za kvalitativno određivanje glutaciona korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnutom s detektorom s nizom dioda

## SAŽETAK

Glutation (GSH) je intracelularni antioksidans. Tripeptid je glutamata, cisteina i glicina. Poznat pod kemijskim nazivom kao  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicin. Naziv po IUPAC-u: (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-[(karboksimetil) karbamoil]-2-sulfaniletil] karbamoil] butanoična kiselina. Glutation ima razne fiziološke funkcije među kojima je najistaknutija njegova antioksidacijska uloga zaštite stanice od slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta, zbog čega je prisutan u skoro svim stanicama. Ovaj rad opisuje razvoj metode za kvalitativno određivanje glutaciona pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s detektorom s nizom dioda.

## **SUMMARY**

Glutathione(GSH) is a intracellular antioxidant, tripeptide of glutamate, cysteine, and glycine, chemically known as  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine. Its IUPAC name: (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-[(carboxymethyl) carbamoyl]-2-sulfanylethyl] carbamoyl] butanoic acid. Glutathione has diverse physiological functions, the most prominent one being its antioxidant role in protecting the cell against free radicals and reactive oxygen species, hence is present within almost every cell. This paper describes the development of a method for qualitative determination of glutathione via high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector.

## SADRŽAJ

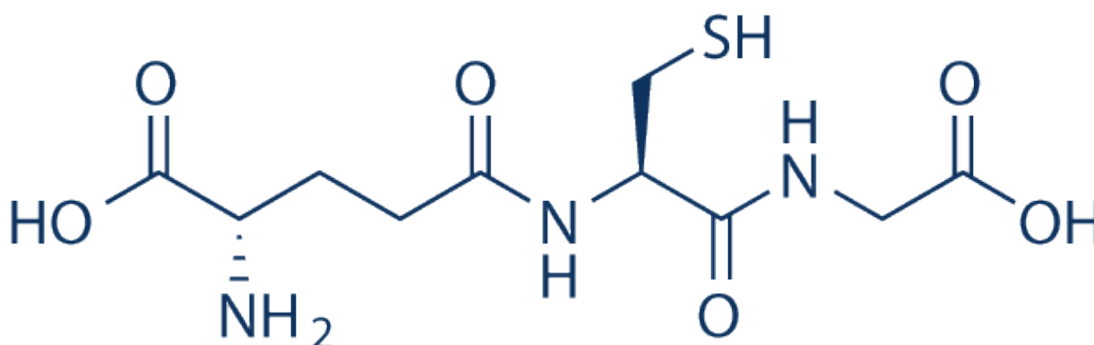
<b>UVOD</b> .....	1
<b>Glutation</b> .....	1
<b>Sinteza</b> .....	2
<b>Poremećaji</b> .....	6
<b>Kromatografija</b> .....	7
<b>Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC)</b> .....	8
<b>Kromatografski parametri</b> .....	10
<b>Materijali i metode</b> .....	13
<b>Popis korištenih kemikalija</b> .....	13
<b>Popis korištene opreme</b> .....	13
<b>Priprema standarda</b> .....	13
<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	14
<b>Detektor</b> .....	14
<b>Kolona za odjeljivanje</b> .....	15
<b>Parametri HPLC metode</b> .....	15
<b>Rasprava</b> .....	17
<b>Zaključak</b> .....	18
<b>Literatura</b> .....	19



## UVOD

### Glutation

Glutation(GSH) je unutarstanični tiol, tripeptid glutamata, cisteina i glicina, poznat pod imenom (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicin). Molekulska formula spoja je  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ , a molarna masa mu je  $307,32 \text{ g mol}^{-1}$ . Naziv mu po IUPAC nomenklaturi glasi {(2S)-2-amino-5-[(2R)-1-(karboksimetilamino)-1-okso-3-sulfanilpropan-2-il]amino}-5-oksopentanoična kiselina. Pri standardnim uvjetima je u krutom stanju, a temperatura tališta mu iznosi  $195^\circ\text{C}$ .<sup>1</sup>



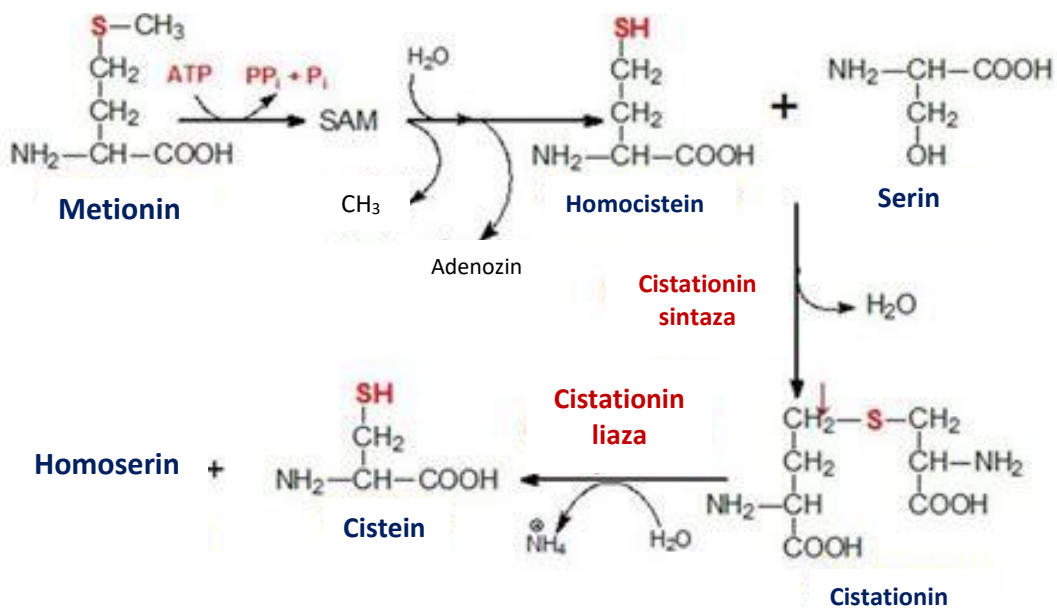
**Slika 1.<sup>2</sup>** Glutation

Prisutan je u svim tkivima gdje štiti stanicu od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta. Konjugira se sa ksenobioticima i endobioticima u detoksifikacijskim reakcijama, što pridodaje njegovoj važnosti kao detoksifikacijskog sredstva.<sup>3</sup>



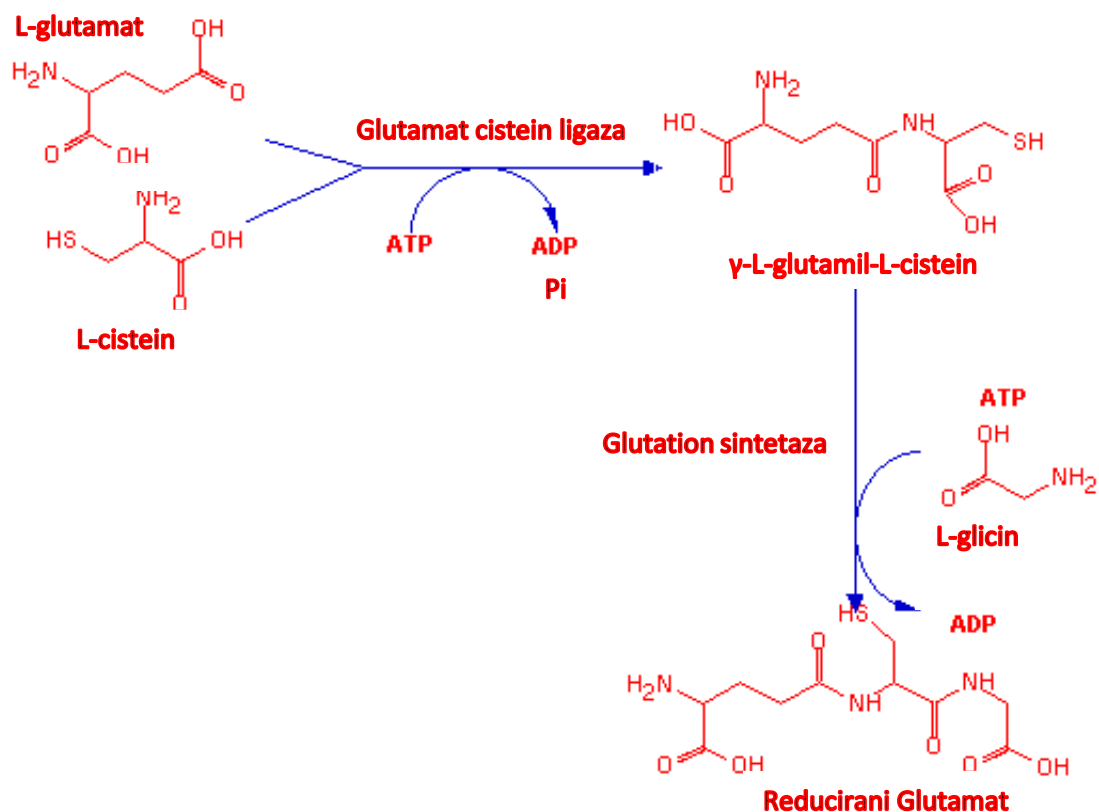
## Sinteza

Za sintezu glutationa potrebne su dovoljne količine glutamata, cisteina i glicina koje unosimo prehranom. Cistein se može sintetizirati iz metionina, druge aminokiseline koja također sadrži sumporov atom, i serina, koji izlazi iz reakcijskog slijeda kao homoserin (serin sa dodatnom metilenskom skupinom).<sup>4</sup>



Slika 2.<sup>5</sup> Sinteza cisteina iz metionina

Sinteza glutationa odvija se u citosolu stanica. Prvo se L-glutamat kondenzira s L-cisteinom u  $\gamma$ -L-glutamil-L-cistein. Reakciju katalizira glutamat cistein ligaza uz prisutstvo ATP-a. Zatim se glutation sintetazom fosforilira  $\gamma$ -glutamilcistein dajući enzimski vezani  $\gamma$ -glutamilcisteinilfosfat, koji se nakon supstituiranja fosfatne skupine s glicinom odvaja s enzima kao glutation. Mehanizmom povratne sprege spriječena je prekomjerna proizvodnja glutationa.<sup>4</sup>

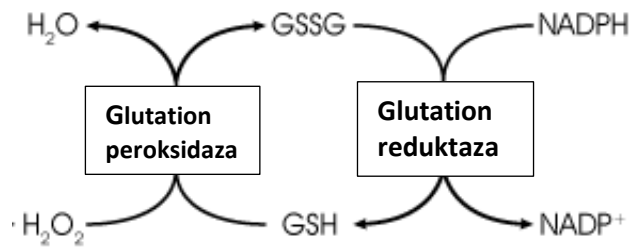


Slika 3.<sup>6</sup> Sinteza GSH

Glutation može postojati u dva oblika, reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Sadrži sulfhidrilnu skupinu koja dolazi od aminokiseline cisteina, čiji atom sumpora je nuklofilan i napadat će konjugirane elektrofilne akceptore. Unutar stanice će reducirati proteinske disulfidne veze do cisteina, reducirati reaktivne kisikove vrste i slobodne radikale, pri čemu prelazi u svoj oksidirani oblik glutation disulfida (GSSG). U većoj mjeri se nalazi u reduciranoj formi pogodnoj za gašenje oksidacijskih požara, jer ga iz oksidiranog u reducirani oblik prevodi glutation reduktaza, koja je eksprimiranija za vrijeme oksidacijskog stresa.<sup>4</sup>

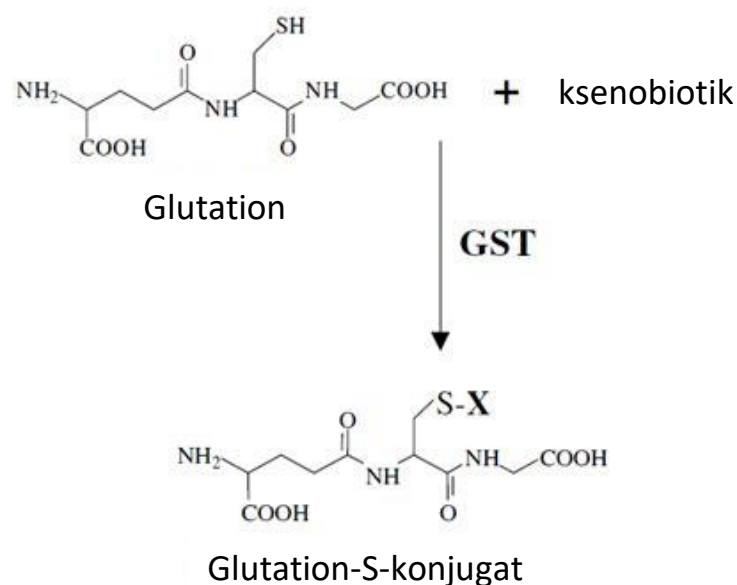
Glutation reduktaza je flavoproteinski enzim kojemu NADPH služi kao izvor elektrona, kojim je opskrbljen pentoza fosfatnim putem.<sup>7</sup> Glutation peroksidaza katalizira reakciju oksidacije glutationa. Na slici 4. supstrat glutation peroksidaze je uz GSH vodikov peroksid, no mogu biti i organski peroksidi pošto je glutation peroksidaza općenit naziv za enzimsku obitelj s peroksidaznom aktivnošću.<sup>8</sup> Enzimu je potreban selenij da bi bio funkcionalan, zbog čega moramo unositi u organizam hranu bogatu selenijem.<sup>9</sup> Izvori su

biljnog i životinjskog podrijetla, a to su tuna, svinjetina, piletina, banane, mango, papaja, gambori, gljive i ostalo.<sup>10</sup> Omjer količina GSH naspram GSSG unutar stanice često se koristi kao mjera stanične toksičnosti. U većini stanica odnos je veći od 500.<sup>4</sup>



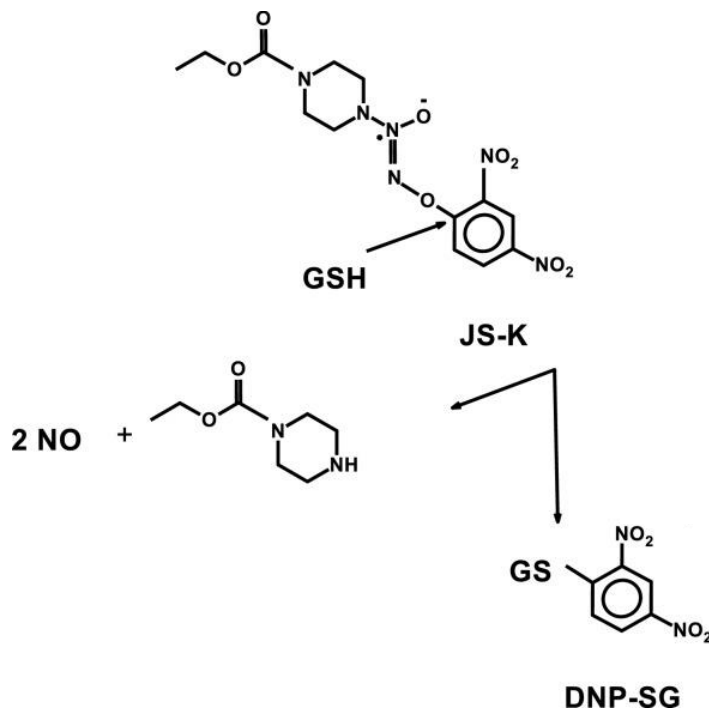
**Slika 4.** GSH-GSSG

Osim što gasi oksidacijske požare u stanici, glutation se može konjugirati s toksinima, čineći ih polarnijima. Na taj način sudjeluje u njihovom uklanjanju iz organizma. Glutation S-transferaze (GST) su enzimi koji kataliziraju reakcije konjugacije glutationa s elektrofilnim ksenobioticima i endobioticima s ciljem da ih prevedu u oblik topiviji u vodi. Pi, mi i alfa GST su izoenzimi, klase glutation transferaza koji se dodatno ekspimiraju kod razvoja tumora i bolesti.<sup>4</sup> Neki supstrati izravno stupaju u reakciju dok je neke potrebno prethodno transformirati u elektrofilne metabolite. Shematski prikaz konjugacije glutationa je prikazan na slici 5 .



**Slika 5.**<sup>11</sup> Shema konjugacije glutationa sa ksenobioticima

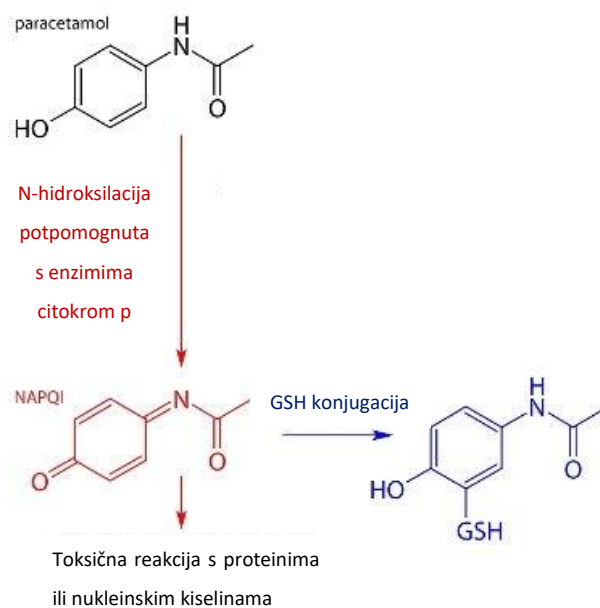
Najviše GST-a ima u citosolu hepatocita, gdje se i odvijaju biotransformacije ksenobiotika. U ostalim tkivima su prisutni u manjim količinama. Konjugacijom GSH sa potencijalno toksičnim ksenobioticima izbjegava se njihovo vezanje na proteine, DNA ili RNA što bi uzrokovalo znatna oštećenja stanice.<sup>4</sup> Pi klasa GST-a su prekomjerno eksprimirani kod određenih stanica raka, sugerirajući da ti tumori mogu biti ciljani sa predlijekovima koji se aktiviraju s eksprimiranim enzimom. To znači da bi Glutation S-transferaza pi mogla imati primjenu u antitumorskoj terapiji<sup>12</sup>. Slika 6. prikazuje konjugaciju glutationa sa JS-K(O<sup>2</sup>-(2,4-dinitrofenil)-1-[(4-etoksikarbonil)piperazin-1-il]diazon-1-on-1,2-diolat) koji se koristi kao kemoterapeutik. Navedeni spoj donor je dušikovog(II)oksida, koji služi kao medijator raznih bioloških procesa. Neuroprijenosnik je za kojeg istraživanja pokazuju da može promovirati ili suzbiti razvoj tumora.<sup>13</sup>



**Slika 6.**<sup>14</sup> Prikaz nukleofilnog napada glutationa na JS-K, oslobađajući NO

Visoka citosolna koncentracija GSH u specifičnim tkivima omogućava im da služe kao biomarkeri za lokalizaciju i praćenje razvoja ozljeda karakterističnih stanica. Tako je za hepatocite sa visokom koncentracijom  $\alpha$ GST i serumskim  $\alpha$ GST otkriveno da su indikatori ozljede jetre kod transplantacije.<sup>15</sup>

Glutacion igra ulogu u eliminaciji štetnih metaboličkih nusproizvoda kada se uzimaju analgetici i antipiretici kao što je paracetamol. Paracetamol je spoj koji u velikim dozama može uzrokovati oštećenje jetre i bubrega. N-hidroksilacija paracetamola enzimima citokroma P450 rezultira proizvodnjom N-acetil-p-benzokinona. Spoj se veže na proteine u organima, rezultirajući promjenom njihove funkcije. Redukcijom N-acetil-p-benzokinona s oksidiranim glutationom vraća se u paracetamol. Konjugacija glutaciona može vratiti aromatičnost reaktivnom metabolitu, tj. dodatkom glutaciona na dvostruku vezu. Krajnji rezultat ove kemijske reakcije je merkapturna kiselina, koja se eliminira iz tijela urinom. U slučaju trovanja paracetamolom količine glutaciona u stanici su snižene.<sup>16</sup>



**Slika 6.**<sup>17</sup> Uloga glutaciona u metabolizmu paracetamola

### Poremećaji

Prema istraživanjima, poremećaji u metabolizmu glutaciona (GSH) povezani su s nizom bolesti, uključujući očne bolesti, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, cističnu fibrozu, astmu, kroničnu opstruktivnu plućnu bolest i neurodegenerativne poremećaje poput

Alzheimerove i Parkinsonove bolesti . Pacijenti s HIV-om s niskim razinama glutaciona imaju povećan rizik od bolesti povezanih s disfunkcijom imunološkog sustava.<sup>18</sup>

## **Kromatografija**

Kromatografija je analitička tehnika odvajanja tvari na temelju njihove različite raspodjele između pokretne ili mobilne i nepokretne ili stacionarne faze.

Kromatografske tehnike možemo odijeliti na temelju više parametara, a postoje 3 podjele. Podjela s obzirom na agregatno stanje pokretne faze:

- ❖ **Plinska kromatografija** – pokretna faza je inertni plin npr. Ar, He, N<sub>2</sub>, a nepokretna faza je nehlapljiva tekućina nanescna s unutarnje strane kolone ili adsorbirana na kruti nosač koji je nanescen s unutarnje strane kolone
- ❖ **Tekućinska kromatografija** – pokretna faza je tekućina male viskoznosti, a nepokretna faza je u obliku finih čestica određenih dimenzija i kemijskih svojstava koje ispunjavaju kolonu
- ❖ **Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima** – pokretna faza je gusti plin (npr. CO<sub>2</sub>) pri uvjetima iznad svoje kritične temperature i tlaka

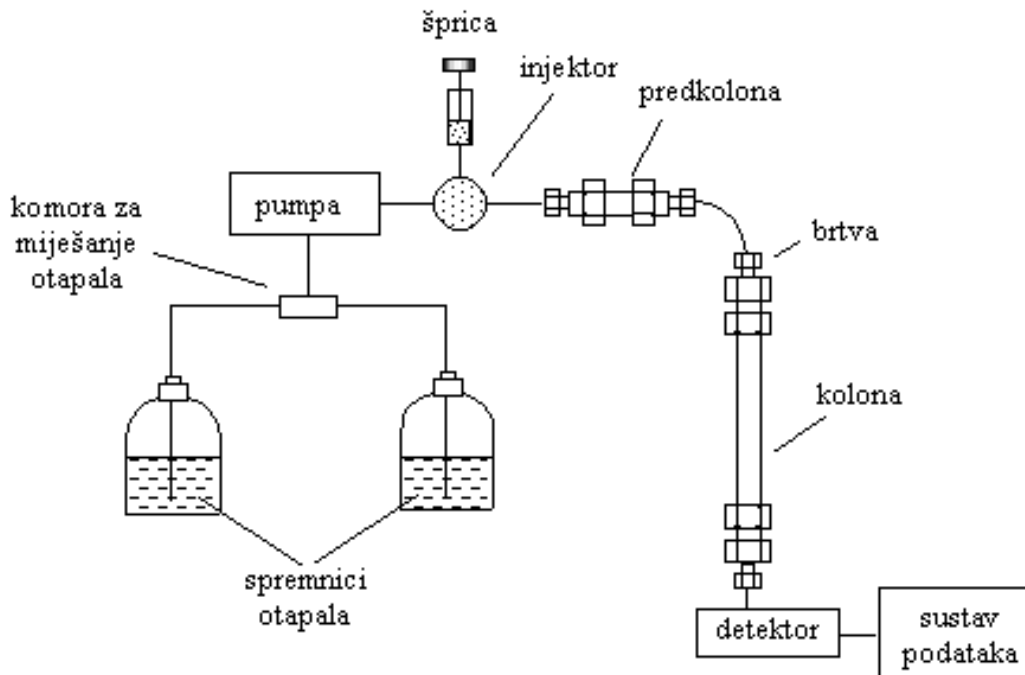
Podjela s obzirom na način ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze:

- ❖ **Kolonska kromatografija** – nepokretna faza nalazi se u koloni tj. uskoj cijevi kroz koju prolazi pokretna faza uz pomoć gravitacije ili tlaka
- ❖ **Plošna kromatografija** – nepokretna faza je kromatografski papir, a pokretna faza je tekuća. Dije se na papirnu plošnu i tankoslojnu kromatografiju

Podjela s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze:

- ❖ **Razdjelna kromatografija** – Pokretna faza može biti plin ili tekućina. Nepokretna faza je tekućina adsorbirana na čvrsti inertni nosač, uspostavlja se ravnoteža između dva fluida
- ❖ **Adsorpcijska kromatografija** – nepokretna faza je u čvrstom stanju, pokretna faza je plin ili tekućina. Ravnoteža se uspostavlja između fluida i površine nepokretne faze
- ❖ **Afinitetna kromatografija** – slična adsorpcijskoj, na krutoj nepokretnoj fazi nalaze se različite funkcijske skupine s definiranim prostornim rasporedom
- ❖ **Kromatografija isključenjem** – nepokretna faza je molekularno sito, materijal s porama definiranih dimenzija, a pokretna plin ili tekućina. Odjeljivanje je temeljeno na razlici molekularnih masa i volumenu
- ❖ **Kromatografija ionskom izmjenom** – nepokretna faza je najčešće ionska smola, a pokretna je tekućina. Odjeljivanje je temeljeno reakcijama ionske izmjene

### Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC)

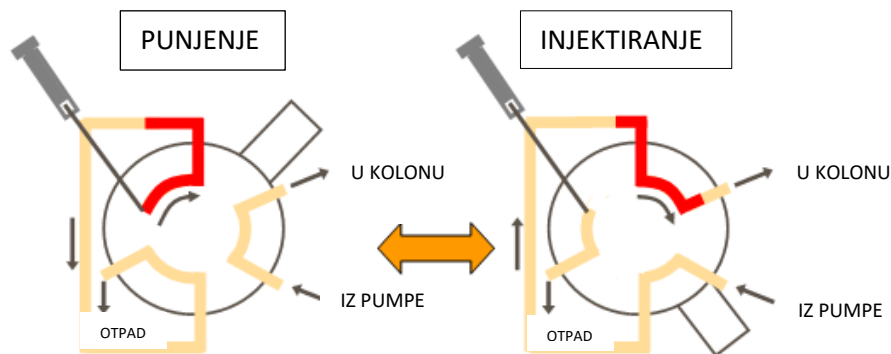


Slika 7.<sup>19</sup> Shema HPLC uređaja

Obzirom na prijašnje podjele kromatografije HPLC bi spadao pod tekućinsku, kolonsku i razdjelnu kromatografiju. Osnovni dijelovi uređaja su prikazani na slici 7, a to su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor uzorka, kolona za odjeljivanje i

detektor. Otapala moraju biti visoke čistoće, oslobođene čestica i plinova. Prilikom mijenjanja otapala provodi se otklanjanje plinova i suspendiranih čestica pod vakuumom. Pumpe služe za potiskivanje smjese otapala za mobilnu fazu pod visokim tlakom (max15Mpa) i određenim protokom kroz stupac do kolone(0,1-1mL/min).<sup>19</sup>

Šprica unosi uzorak u sustav za injektiranje(petlju), koji je pod tlakom. Preko njega se unosi uzorak u tok pokretne faze do kolone tako da prebacivanjem ventila struja otopine pokupi uzorak. Prije kolone bi bilo poželjno postaviti predkolonu, čija bi uloga bila da produlji vijek trajanja kolone.



**Slika 8.**<sup>20</sup> Petlja

Kolona i čestice kojima je punjena su strogo definiranih dimenzija, pomoću kojih se može procijeniti djelotvornost odvajanja u koloni. Čestice su najčešće od silikagela koji je presvučen sa tekućom nepokretnom fazom. Zbog finoće raspodjele čestica u koloni ima mnogo mjesta za međudjelovanje spojeva. Iz tog razloga protok otopine mora biti dovoljno visok kako bi otopina prošla kroz kolonu a ne ju začepila. Komponente uzorka se odjeljuju temeljem različitog afiniteta prema nepokretnoj fazi i dolaze u različitim vremenima do detektora, nakon kojega odlaze do spremnika za otpad.

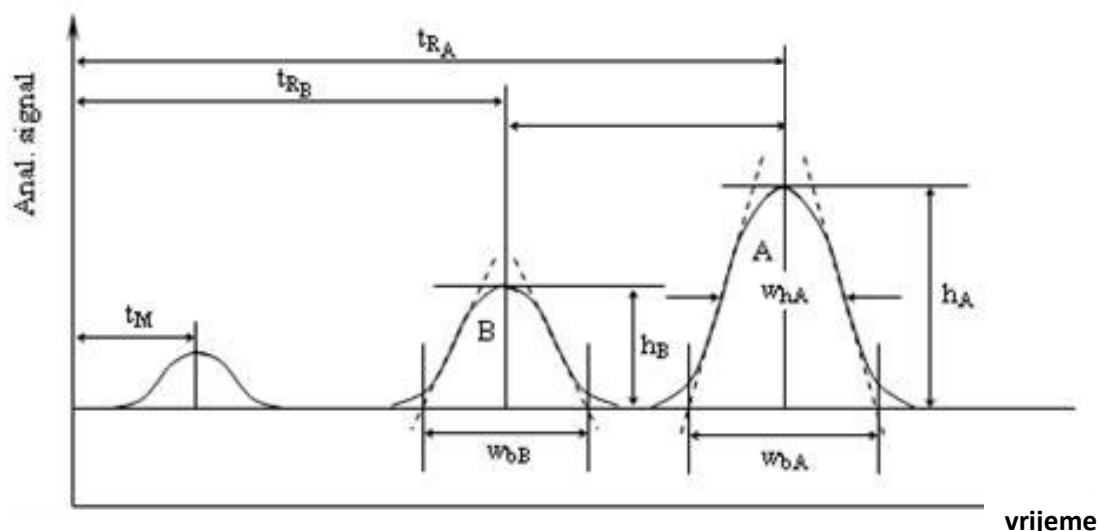
Detektor ima ulogu detekcije komponenti nakon što izađu iz stupca. Detektor može pratiti značajke mobilne faze pa neizravno dokazati prisustvo analita promjenom mjerenih veličina(indeks loma svjetlosti, električna vodljivost), ili može direktno pratiti značajke analita(apsorpcija u vidljivom i ultraljubičastom području zračenja, fluorescencija, struja na elektrokemijskom članku).<sup>21</sup>



## Kromatografski parametri

Temperatura, pH, tlak i volumen mobilne faze su parametri koji se optimiziraju tokom razvoja metode.

Kromatogram je grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka, ispis je bilo koje funkcije koncentracije analita u ovisnosti o vremenu i volumenu elucije. Kromatogram je koristan za kvantitativnu i kvalitativnu analizu.



**Slika 9.** Shematski prikaz kromatograma uzorka sa dvije komponente  $t_m$  predstavlja nezadržano vrijeme,  $t_r$  ukupno vrijeme zadržavanja,  $h$  je visina kromatografske krivulje,  $w$  je širina kromatografske krivulje u osnovici

Položaj kromatografske krivulje koju nazivamo pik (od engl. *peak*) koristi se za identifikaciju tvari (sadrži kvalitativnu informaciju), a površina ispod pika je proporcionalna koncentraciji komponente u uzorku (kvalitativna informacija).

Najvažniji kromatografski parametar je vrijeme zadržavanja.

Nezadržano vrijeme,  $t_m$  (engl *void time*) je vrijeme potrebno komponenti mobilne faze koja se ne zadržava na koloni za odjeljivanje da prođe kroz kolonu.

Ukupno vrijeme zadržavanja,  $t_r$  (engl *retention time*) je karakteristično za svaku komponentu, a predstavlja vrijeme od injektiranja uzorka u kolonu do maksimalnog odziva komponente.

Prilagođeno vrijeme zadržavanja ,  $t_r'$  (engl *adjusted retention time*) predstavlja vrijeme koje je komponenta provela vezana za nepokretnu fazu, a računa se oduzimanjem nezadržanog vremena od ukupnog vremena zadržavanja.

$$t_r' = t_r - t_m$$

$h$  je visina kromatografske krivulje, a  $w$  širina kromatografske krivulje u osnovici. Njihovom integracijom dobije se površina ispod pika i samim time koncentracija komponente.

Faktor zadržavanja je parametar kojim se opisuje brzina gibanja analita u koloni. govori nam koliko je puta zadržana komponenta bila dulje u koloni od nezadržane komponente mobilne faze, a predstavlja afinitet zadržane komponente za vezivanje za nepokretnu fazu. Što je veći, komponenta se dulje eluira iz kolone.

$$k' = \frac{t_r}{t_m}$$

Faktor odjeljivanja predstavlja omjer faktora zadržavanja dviju komponentata u uzorku. Komponente se mogu međusobno razdvojiti ako imaju različite faktore zadržavanja. Ako je faktor odjeljivanja veći od 1 onda možemo reći da su odvojene, zato komponenta sa većim faktorom zadržavanja mora biti u brojniku.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'}$$

Uspostavljanje ravnoteže između nepokretne i pokretne faze izražava se pomoću teorijskih tavana. Teorijski tavana su virtualni pojam koji predstavljaju broj mogućih odjeljivanja u koloni. Što je više tavana to su niži, a pikovi će biti i uži. Pomoću njih se opisuje djelotvornost kolone za odjeljivanje. Broj teorijskih tavana na istoj koloni ne mora biti isti za različite analite.

$$N = \frac{L}{H}, \text{ ili } N = 16 \times \left( \frac{t_r}{w} \right)^2$$

$N$  je teorijski broj tavana,  $L$  duljina kolone, a  $H$  visina teorijskih tavana

Razlučivanje je stupanj odjeljivanja dva susjedna pika kromatograma. Što je razlučivanje veće to je odjeljivanje dvaju komponenti uspješnije. Definirano je kao omjer razlika zadržavanja komponenti i prosječne širine pika na baznoj liniji.

$$R_s = \frac{2(\text{tr}2 - \text{tr}1)}{w1 + w2}$$

## **Materijali i metode**

Metoda je razvijena po uzoru na istraživački članak „A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Glutathione in PC-12 Cells” od Raju N. Appala, Sridevi Chigurupati, Raju V. V. S. S. Appala, Kesavanarayanan Krishnan Selvarajan, i Jahidul Islam Mohammad.

### **Popis korištenih kemikalija**

- Reducirani L-glutathion (Sigma-Aldrich, SAD)
- Ellmanov reagens, DTNB ili 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina (Aldrich, SAD)
- Acetonitril ili metilcijanid HPLC razreda
- Fosforna kiselina 20mmol pK<sub>a</sub> =2,5
- Ultra čista voda HPLC razreda
- Metanol HPLC razreda

### **Popis korištene opreme**

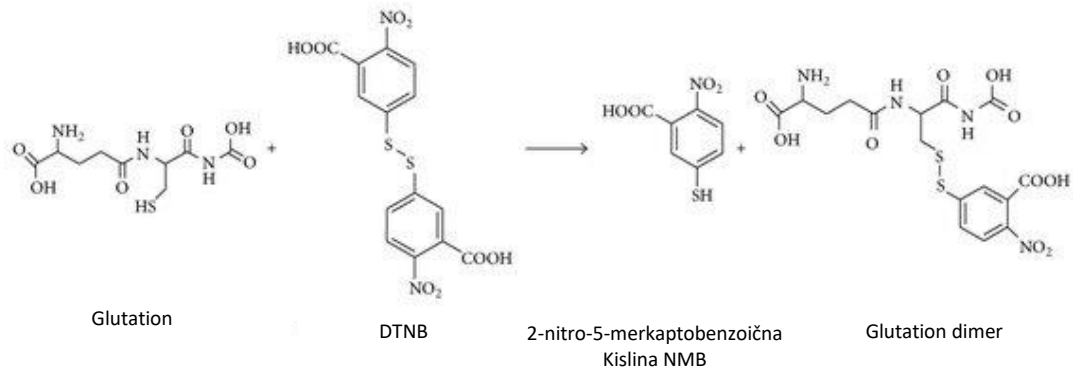
- Analitička vaga
- Mehaničke pipete
- HPLC-DAD uređaj – Ultimate 3000 (Thermo Scientific, SAD)
- Ultrazvučna kupelj

### **Priprema standarda**

GSH koncentracije 2 mM pripremljen je vaganjem 61,5 mg GSH. Prenesen je u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je nadopunjena do oznake sa ultra čistom vodom. Zatim je razrijeđen do koncentracije 0,1 mM premještanjem alikvota od 0,5mL prvotne otopine u epruvetu, u koju je dodano još 9,5 mL ultra čiste vode.

0,5mM DTNB pripremljen je vaganjem 19,8mg DTNB-a koji je otopljen u 100 ml metanola.

Reducirani glutation je deriviran sa DTNB-om, koji je reagens za dokazivanje tiolnih skupina. Reakcijom je glutationu na sulfhidrilnu skupinu dodan kromofor koji apsorbira pri 280 nm.



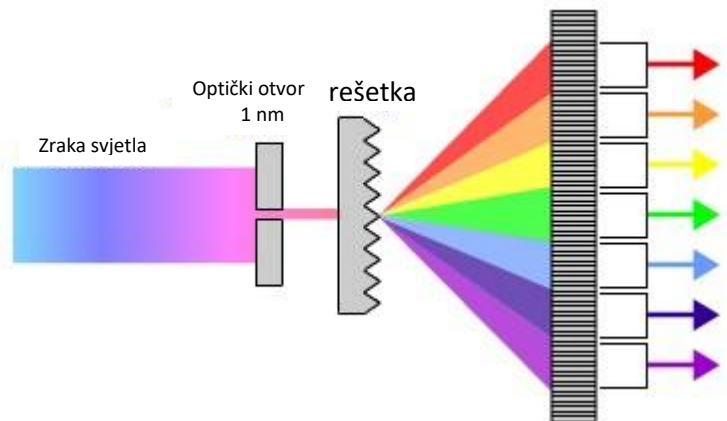
**Slika 10.** Reakcija GSH sa DTNB

0.5mL otopine GSH pomiješali smo sa 0.5mL otopine Ellmanovog reagensa u plastičnoj epruvetici od 2mL i stavili ju na ultrazvučnu kupelj da se grije 30 min na 60°C kako bi dopustili reakciji da se odvije.

## REZULTATI I RASPRAVA

### Detektor

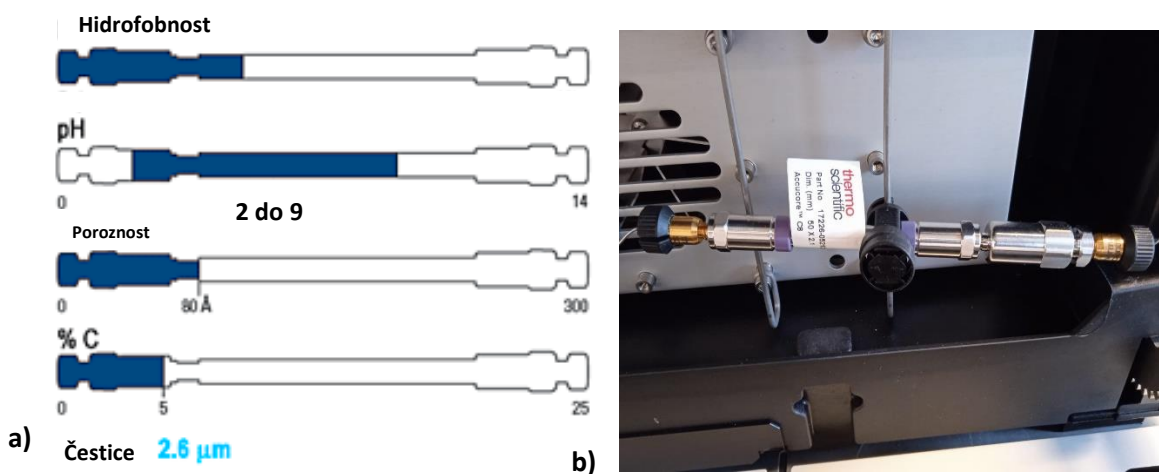
Maksimalni odziv dimera je pri valnoj duljini od 320 nm, ali smo radi uklanjanja interferencija i boljeg odnosa signala i šuma odabrali mjeriti na valnoj duljini od 280 nm, iako je pomoću detektora s nizom dioda moguće i nakon završenog mjerenja dobiti podatke o apsorpciji na bilo kojoj valnoj duljini koju diode mogu detektirati.



Slika 11. Detektor s nizom dioda

### Kolona za odjeljivanje

Oksidirani dimerni oblik glutaciona je nepolarniji od reduciranog koji je dosta polarniji. Kolona za odjeljivanje koju smo koristili tokom mjerenja je Accucore C8, (Thermo Fischer, SAD), koja se preporučuje za odjeljivanje analita koji su umjereno hidrofobni. Promjer joj je 2,1 mm, a duljina 50mm. Čestice kojima je punjena su promjera 2,6 $\mu$ m.



Slike 12. Accucore C8 kolona – a)shema svojstava b) postavljena na HPLC

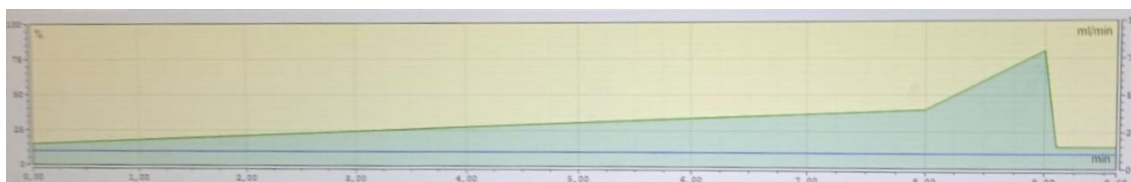
### Parametri HPLC metode

Volumen injektiranja bio je 50  $\mu$ L.

Protok i gradijent mobilne faze prikazani su u tablici 1. Eluens A je fosfatni pufer, a eluens B acetonitril. Protok smo održavali konstantnim od 1mL/min jer bi mijenjanjem protoka došlo i do promjene tlaka u koloni, zbog čega može doći do oštećenja kolone.

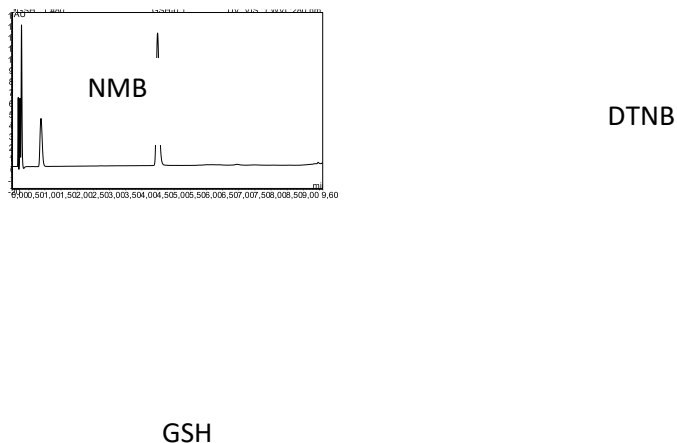
Tablica 1. Protok i gradijent mobilne faze

Vrijeme – min	Protok - mL/min	% eluens A	% eluens B
0.0	1	85	15
8.0	1	60	40
9.0	1	20	80
9.1	1	85	15
9.6	1	85	15



**Slika 13.** Prikaz gradijenta s korisničkog sučelja. Zelena boja predstavlja udio acetonitrila tokom mjerenja, a žuta fosfatni pufer. Plava linija označava protok koji je održavan konstantnim tokom cijelog mjerenja (1 mL/min)

Budući da je korištena kolona napravljena za rad pri pH 2, a fosfatnom puferu je  $pK_a$  2.5, radi zaštite kolone od prekomjernog protoniranja silikata i taloženja soli na njemu (iako se kolona uvijek ispiri pogodnim otapalima pri kraju analize) nije povećan gradijent fosfatnog pufera do 100 %. U slučaju da je povećan, i postepeno smanjen, moguće je da bi NMB bio eluiran nakon nekog vremena a ne na početku mjerenja skupa sa otapalom, zbog čega je otežano njegovo prepoznavanje, ali NMB nam nije od interesa u ovom radu.



Slika 14. Kromatogram pri 280 nm označen sa spojevima

Eclipse-a, a kolona rada je od Thermofischera, obje firme su iz SAD-a, i korišteni detektor u članku nije DAD, nego UV-VIS.

## Rasprava

Cilj završnog rada bio je razviti metodu za kvalitativno određivanje glutationa uz pomoć visokodjelotvorne tekućinske kromatografije s DAD detektorom. Glutation je preveden u oblik pogodan za odjeljivanje sa c8 kolonom i spektrometrijsku detekciju tako da je deriviran sa Ellmanovim reagensom. Kod odabira mobilne faze tražio se optimalan omjer otapala koji bi omogućio precizno i brzo odvajanje. Otapalo A je 20 mmol fosforna kiselina, a otapalo B acetonitril. Korištene su u gradijentnom načinu rada s početnim omjerom 85/15. Ta kombinacija pokazala se kao najbolja dajući zadovoljavajuće razdvajanje komponenti smjese. Pokretna faza je korištena u obliku gradijenta koji se povećavao do 80% acetonitrila. (Slika 13.)

Metoda analize trajala je sat vremena. Ova jednostavna metoda može poslužiti kao standardna smjernica za određivanje GSH u biološkim uzorcima.



## **Zaključak**

Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija spregnuta s detektorom s nizom dioda prikladna je za kvalitativno određivanje glutaciona. Ovaj rad može poslužiti kao temelj za izradu metode za kvalitativno određivanje glutaciona.

## Literatura

1. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886> (05.09.2022.)  
(04.09.2022.)
2. <https://file.selleckchem.com/downloads/struct/glutathione-chemical-structure-s4606.gif> (04.09.2022.)
3. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279700002143?via%3Dihub> (05.09.2022.)
4. Glutathione, Alton Meister and Mary E. Anderson
5. [https://www.researchgate.net/profile/Sundus\\_Hantoosh/publication/333680881/figure/download/fig23/AS:768500100501504@1560236110204/Synthesis-of-cysteine-from-methionine-and-serine-wwwgooglecom.jpg](https://www.researchgate.net/profile/Sundus_Hantoosh/publication/333680881/figure/download/fig23/AS:768500100501504@1560236110204/Synthesis-of-cysteine-from-methionine-and-serine-wwwgooglecom.jpg) (05.09.2022.)
6. [https://1.bp.blogspot.com/-4XNKXLTWdyU/UqGXfsU-2QI/AAAAAAAAAIY/7AwS\\_1H4-Fw/s1600/glutathione\\_synthesis.png](https://1.bp.blogspot.com/-4XNKXLTWdyU/UqGXfsU-2QI/AAAAAAAAAIY/7AwS_1H4-Fw/s1600/glutathione_synthesis.png) (05.09.2022.)
7. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
8. [https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione\\_peroxidase](https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_peroxidase)(05.09.2022.)
9. <https://www.youtube.com/watch?v=Zevn3E4zJcY> (04.09.2022.)
10. <https://www.healthline.com/health/selenium-foods> (05.09.2022.)
11. <https://external-content.duckduckgo.com/iu/?u=https%3A%2F%2Ftse2.mm.bing.net%2Fth%3Fid%3DOIP.GCQhgbdxybV7oWJkMGgK-gHaFY%26pid%3DApi&f=1> (05.09.2022.)
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8531399/> (05.09.2022.)
13. <https://www.nature.com/articles/7290133> (05.09.2022.)
14. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8531399/bin/41598\\_2021\\_327\\_Fig1\\_HTML.jpg](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8531399/bin/41598_2021_327_Fig1_HTML.jpg) (05.09.2022.)
15. Hughes VF, Trull AK, Gimson A, Friend PJ, Jamieson N, Duncan A, Wight DG, Prevost AT, Alexander GJ (November 1997). "Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum alpha-glutathione S-transferase concentration monitoring after liver transplantation".
16. Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada, 2013.

17. <https://image.slidesharecdn.com/acetaminophenpresentation-13289084682023-phpapp01-120210151957-phpapp01/95/acetaminophen-apap-toxicity-clinical-cases-diagnosis-pathology-treatments-and-patient-education-12-728.jpg?cb=1328887732> (08.09.2022.)
18. Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW i sur. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. Proc the Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1997 Mar 4; 94(5): 1967–1972 [pristupljeno: 07.09.2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20026/>
19. [https://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](https://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (05.09.2022.)
20. <https://doi.org/10.1155/2016/6897890> (05.09.2022.)