

# Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Eritrositlerde Toplam ve İndirgenmiş Glutasyon Miktarının Tayini

[Quantitation of Total And Reduced Glutathione In Erythrocytes By High Performance Liquid Chromatography]

<sup>1,3</sup>Zahide Çavdar,

<sup>1,3</sup>Mehtap Yüksel Eğrilmez,

<sup>1</sup>Memduh Bülbül,

<sup>1,2,3</sup>Gül Güner,

<sup>2</sup>Semra Koçtürk

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), 35340, İnciraltı, İzmir

<sup>2</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

<sup>3</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 35340, İnciraltı, İzmir

## Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Araş. Gör. Zahide Çavdar, MSc

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)

35340, Balçova-İzmir.

Tel: 0 232 412 46 76

Fax: 0 232 277 6584

Cep Tel: 0 505 399 4626

e-mail: zahide.cavdar@deu.edu.tr

## ÖZET

Glutasyon; memeli hücrelerinde milimolar düzeyinde bulunan, başlıca protein olmayan bir tiyol bileşimidir. Bir tripeptid olan glutasyon, temel biyolojik indirgeme reaktifi olarak görev alır. Bu tripeptidin önemli görevleri; hücre içi redoks dengesi sağlamak ve hücreleri reaktif oksijen türevlerinden korumaktır. Ayrıca DNA sentezi ve amino asitlerin taşınması gibi fizyolojik süreçlerde de görev almaktadır. Bu çalışma, eritrosit toplam (indirgenmiş+oksidlenmiş glutasyon) ve indirgenmiş glutasyonun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile analizi için en uygun koşulların saptanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda glutasyonun ideal elüsyonu için en uygun asetonitril+asetat tampon karışımının oranı ve akış hızı, sistemin ve yöntemin performansını belirleyen teorik tabaka sayısı, kapasite faktörü, pik asimetrisi ve ayırıcılık değerleri göz önünde bulundurularak saptanmıştır. Bunun yanında gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları ile yöntem performansı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile glutasyon ölçüm yönteminin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu yöntemin hızlı, tekrarlanabilir ve yüksek duyarlılıkta olması nedeni ile biyolojik örneklerdeki glutasyon analizinde güvenilirlikle kullanılabileceği öngörülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Glutasyon, Eritrosit, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

## ABSTRACT

Glutathione is the main non-protein thiol compound present in mammalian cells in millimolar level. Glutathione which is a tripeptide functions as a principle reducing agent in biological systems. The most important function of this tripeptide is to maintain intracellular redox status and to protect cells from reactive oxygen species. It is also involved in physiological processes such as synthesis of DNA and transport of amino acids. This study was carried out to optimize the most suitable conditions for quantitation of total and reduced glutathione in erythrocytes by High Performance Liquid Chromatography. In our study, the most suitable composition of acetonitrile+acetate buffer and the flow rate for the ideal elution of glutathione were determined by evaluating the number of theoretical plate, capacity factor, peak asymmetry and resolution values, indicating the system and method performance. In addition, intra and inter assay reproducibility and recovery studies were done. The results obtained from this study provided an improved method for glutathione determination by High Performance Liquid Chromatography. Since this method is faster than the most commonly used methods and it also permits better reproducibility and high sensitivity, thus it is suggested that this method can be used confidently to determine the amount of glutathione in biologic samples.

**Key Words:** Glutathione, Erythrocyte, High Performance Liquid Chromatography

## GİRİŞ

Glutasyon (GSH); glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan ve hücresele antioksidan savunmada görev alan başlıca tiyol bileşimidir. Hücrelerde toplam GSH serbest veya proteine bağlı biçimde bulunabilir. Serbest GSH'ın büyük bir kısmı indirgenmiş haldedir ve oksidatif stres ile oksitlenmiş biçimine (GSSG) dönüşür. Yeni bir antioksidan savunma için glutasyon redüktaz enzimi aracılığı ile yeniden indirgenmesi gerekir (1). Glutasyonun redoks düzeyi, indirgenmiş ve oksitlenmiş düzeylerinin oranına (GSH/GSSG) bağlıdır. Bazal düzeyde GSH/GSSG oranı 100'ün üzerindedir, ancak birçok oksidatif stres modelinde bu oran 1–10 arasında değişim göstermektedir (2). Bu tripeptidin önemli görevleri, hücreleri reaktif oksijen türevlerinden korumak ve hücre içi redoks dengesini sağlamaktır. Ayrıca hücre membranlarının stabilizasyonu, DNA, protein sentezi, amino asitlerin taşınması ve ksenobiyotiklerin uzaklaştırılması gibi fizyolojik süreçlerde de görev almaktadır (3-5).

Biyolojik sıvılarda GSH analizi için tanımlanmış birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler enzimatik, flurometrik ve kolorimetrik olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır (6,7,8). Kolay uygulanmalarına karşın, bu yöntemlerin duyarlılık ve tekrarlanabilirlikleri düşüktür. Bu nedenle son yıllarda GSH analizi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniği, basit ve hızlı olmasının yanı sıra; kesinlik, tekrarlanabilirlik ve femtomol düzeyinde yüksek duyarlılığı nedeniyle diğer yöntemlere tercih edilmektedir (1).

HPLC temelli yöntemlerin birçoğu; glutasyonun, 5,5'-ditiyobis- (2-nitrobenzoic) asit (DNTB, Ellman's reaktifi) (9) veya 2,4 dinitrofluorobenzen (10) ile türevlendirilerek elde edilen UV-absorbansının, UV-dedektör ile değerlendirilmesine dayanmaktadır. UV-dedektörlerin yanısıra floresans dedektörler yardımıyla da glutasyonun tiyol gruplarının; monobromobiman, (11) orto-fitaldehit (OPA) (12,13), 1-dimetilaminofitalen-5-sülfonilklorür (dansil klörür) (14,15), amonyum 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4 sulfonat (SBD-F) (16) gibi fluorojenik reaktiflerle türevlendirilmesinden sonra oluşan floresansın değerlendirilmesi de yaygın olarak kullanılmaktadır. OPA, glutasyonun hem sülfidril hem de primer amino grubu ile şiddetli floresans veren türevler oluşturduğu için tercih edilen bir türevlendirme maddesidir (12).

Bu çalışmanın amacı; Cereser ve arkadaşlarının (17) önerdiği paket eritrositte toplam (GSH+GSSG) ve indirgenmiş glutasyonun (GSH), OPA ile türevlendirilmesini temel alan HPLC yöntemi kullanılarak, araştırmacıların çalışmalarında açık olarak belirtilmemiş olan optimum hareketli faz oranı ve akış hızının saptanması ve yöntemin biyolojik materyaller için uygulanabilir hale gelmesini sağlamaktır. Bu amaçla belirlediğimiz optimum şartlarda sistem performansı ile ilgili parametreler (pik asimetrisi, kapasite faktörü, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık değerleri) belirlenerek yöntemin uygulanabilirlik, tekrarlanabilirlik, geriye kazanım, doğrusalılık gibi analitik yöntem validasyon parametreleri incelenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### *Kimyasal Maddeler ve Su*

Çalışmada kullanılan GSH, OPA, metafosforik asit (MPA), Tris (hidroksimetil) aminometan ( $C_4H_{11}NO_3$ ), hidroklorik asit (HCl), disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ), sodyum hidrojen fosfat ( $NaHPO_4$ ), sodyum tetraborat ( $NaB_4O_7$ ), sodyum hidroksit (NaOH), metanol ( $CH_3OH$ ), ditiyotireitol (DTT), sodyum asetat ( $CH_3COONa$ ) Sigma'dan; asetonitril ( $C_2H_3N$ ) ve asetik asit ( $CH_3COOH$ ) ise Fluka'dan sağlanmıştır. Tüm kimyasal maddeler HPLC çalışmalarına uygun saflık derecesindedir. Çözeltilerin ve hareketli fazın hazırlanmasında kullanılan saf su 18.2 Mohm HPLC kalitedir (USF Elga, Maxima). Hareketli faz, analize başlamadan önce 0.20 µm filtreden geçirilerek süzölmüş ve en fazla iki gün kullanılmıştır.

### *Standart Çözeltiler*

0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.500, 1.00, 2.00 mmol/L derişimlerinde GSH standart çözeltileri hazırlandı. Tüm standartlara, örneklere uygulanan işlemlerin aynısı uygulanarak standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kullanılan yöntemde, indirgenmiş GSH türevlendirme işleminden sonra doğrudan ölçülmektedir. Toplam glutasyon (GSH+GSSG) ölçümü türevlendirme basamağından önce GSSG'nin, DTT ile GSH'a indirgenmesi ile ölçülmektedir. GSSG değeri ise; total glutasyon değerinden önceden ölçölmüş olan GSH değerinin çıkarılması ile hesaplanmaktadır (17).

### *Türevlendirme Reaktifi*

Türevlendirme reaktifi olan OPA, 5 mg/mL derişiminde ve 0.1 M Sodyum tetraborat, pH 9.9 tamponu içinde hazırlandı.

### *Paket Eritrosit Örneğlerinin Hazırlanması*

Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındıktan sonra 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Eritrositler 3 kez serum fizyolojik ile yıkandı. Elde edilen paket eritrosit örneklerinden, GSH ve toplam glutasyon (GSH+GSSG) analizi için örnek hazırlık aşaması gerçekleştirildi.

GSH için paket eritrosit örnekleri 1:1,5 (h/h) oranında 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 tamponu ile seyreltildi. Bu karışım 1:8 (h/h) oranında taze hazırlanmış % 6'lık MPA ile deproteinize edilerek 9168 x g +4 °C'de 7 dakika santrifüj edildi. Supernatant 1:4 (h/h) oranında 50 mM sodyum fosfat, pH 7.0 tamponu ile nötralleştirildi ve nötr supernatant 1:1 (h/h) oranında OPA reaktifi ile karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra hacim 1:4 (h/h) oranında 50 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.0 ile seyreltildi ve analiz için 5 µl HPLC cihazına enjekte edildi.

Total glutasyon (GSH+GSSG) analizi için örnek hazırlık aşamasında öncelikle paket eritrositte bulunan oksitlenmiş glutasyonun indirgenmesi gerekmektedir.

Bu amaçla, örnekler 2:2:1 (h/h) oranında örnek–25 mM DTT–0.1M Tris Tampon pH 8.5 sırası ile karıştırılarak +4 °C’de, 30 dakika bekletildi. Diğer aşamalar, yukarıda belirtilen şekilde GSH örnek hazırlığı için gerçekleştirilenler ile aynı idi.

### ***Kromatografik Koşullar***

Analizler Shimadzu-VP serisi HPLC sistemi ile yapıldı. Sistem, pompa (LC-10ADVP), floresans dedektör (RF-10AXL), oto enjektör (SIL-10ADVP), kolon fırını (CTO-10ASVP) ve kontrol ünitesinden (SCL 10AVP) oluşmaktaydı. Çalışmada; 5 µm tanecik çapında, 25 cm/4.6 cm boyutlarında C18 kolonu (ACE/121–254) ve 50 mM asetonitril+50 mM asetat tampon (pH 6.2) karışımından oluşan hareketli faz kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon fırını sıcaklığı 30°C, floresans dedektör eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla, 340 nm ve 420 nm olarak ayarlandı.

## **BULGULAR**

### ***Hareketli Faz Bileşimi ve Akış Hızının Kromatografik Parametrelere Etkisinin İncelenmesi***

#### ***Uygun Hareketli Faz Bileşiminin Saptanması***

Glutatyonun ideal elüsyon/alıkonma zamanını belirlemek için en uygun asetonitril/asetat tampon karışımını saptamak amacıyla, asetonitril oranları % 10, % 20, % 30, % 40 ve % 50 arasında değişen beş farklı hareketli faz hazırlandı. GSH standartı (0.5 mM), OPA ile türevlendirildikten sonra 5'er µL'lik hacimlerle kolona enjek-

te edildi. Her enjeksiyon sonrası kolonun temizlenmesi ve dengelenmesi için hareketli faz akışına 15 dakika devam edildi. Glutatyon pikinin alıkonma zamanı, 1 mL/dakika akış hızında elde edilen kromatogramlarda, 3–5 dakika arasında belirlendi. Farklı hareketli faz bileşimlerinde elde edilen kromatografik parametre değerleri Tablo 1’de gösterilmektedir. Elde edilen kromatogram ve kromatografik parametre değerlerine göre en uygun hareketli faz bileşiminin % 30 asetonitril+% 70 asetat tampon karışımı olduğu saptandı.

### ***Uygun Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi***

Uygun asetonitril+asetat tampon oranı saptandıktan sonra en uygun hareketli faz akış hızını belirlemek için, hareketli faz akış hızı 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, ve 0.9 ml/dakika değerlerinde uygulandı. Elde edilen kromatogram ve kromatografik parametre değerlerine göre en uygun hareketli faz akış hızı 0.7 ml/dak. olarak saptandı (Şekil 1, Tablo 2). Paket eritrosit için optimum kromatografik koşullarda kayıt edilmiş kromatogram Şekil 2’de gösterilmektedir.

### ***Standart Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması***

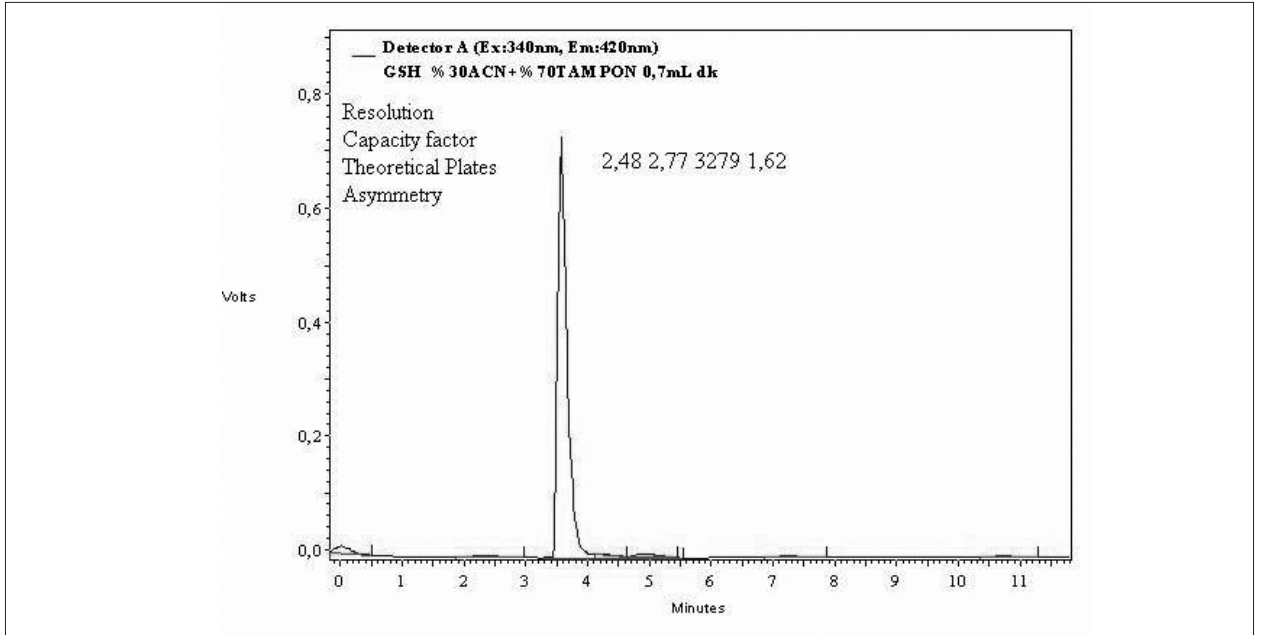
GSH standart kalibrasyon eğrisi, hazırlanan standartlar iki kez çalışılarak elde edildi. Standart kalibrasyon eğrisi için elde edilen korelasyon katsayısı (r) 0.996 olarak bulundu. Yapılan çalışmada 0.0156 mmol/L–2.00 mmol/L GSH derişimleri arasında yöntemin lineer olduğu görüldü. Standart kalibrasyon eğrisi ve kromatogram Şekil 3A ve 3B de gösterilmektedir.

**Tablo 1.** Sabit akış hızında (1 ml/dak) farklı hareketli faz bileşimleri ile elde edilen kromatografik parametre değerleri

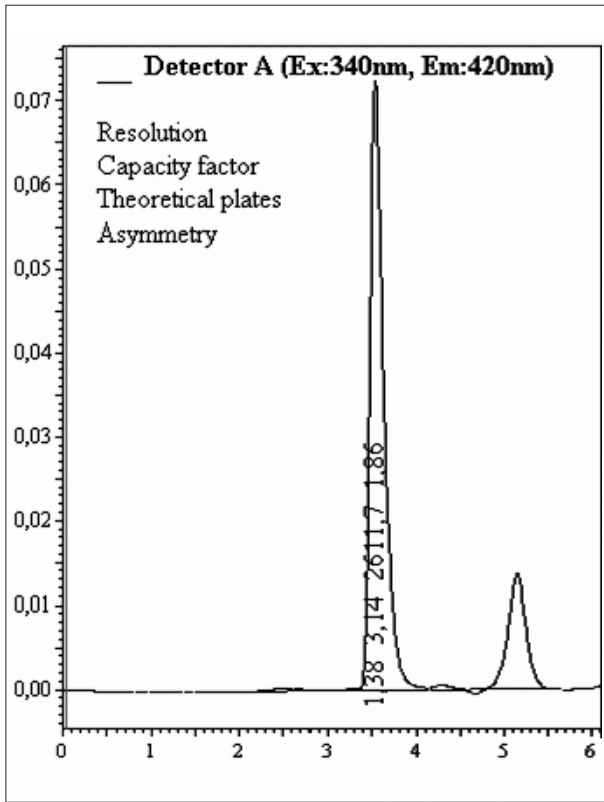
Hareketli Faz Bileşimi (%) Asetonitril+Sodyum Asetat	Ayırıcılık	Kapasite Faktörü	Teorik Tabaka Sayısı	Pik Asimetrisi
10+90	0.00	2.45	1968	0.00
20+80	0.68	2.51	3401	2.04
30+70	1.14	3.38	3063	1.64
40+60	0.80	3.36	3095	1.52
50+50	0.00	2.64	3097	1.84

**Tablo 2.** Sabit hareketli faz bileşiminde (% 30 asetonitril+% 70 sodyum asetat) farklı akış hızları ile elde edilen kromatografik parametre değerleri

Akış hızı (ml/dakika)	Ayırıcılık	Kapasite Faktörü	Teorik Tabaka Sayısı	Pik Asimetrisi
0.9	0.00	3.80	3356	2.15
0.8	0.00	3.81	3252	2.25
0.7	2.48	2.77	3279	1.62
0.6	0.00	2.41	2927	1.40
0.5	2.06	1.70	2410	1.80



Şekil 1. Sabit hareketli faz bileşiminde (% 30 asetonitril+ % 70 sodyum asetat) 0.7 ml/dakika akış hızı ile alınan kromatogram



Şekil 2. Paket eritrosit için optimum kromatografik koşullarda kayıt edilmiş kromatogram

### Tekrarlanabilirlik Çalışması

Belirlenen deney şartlarının rastgele hata oranını belirlemek amacıyla hazırlanmış olan paket eritrosit hazırlanmış (n = 10) gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Her gün taze hazırlanmış OPA reaktifi ile 1., 2., 3., 4. ve 5. günlerde indirgenmiş ve

total glutatyon analizleri yapıldı. Beş ardışık çalışma ile gerçekleştirilen gün-içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve bu sonuçları temel alarak günler-arası tekrarlanabilirlik sonuçları hesaplandı. Gün-içi % Bağlı Standart Sapma (BSS), GSSG için 11.78-18.34 arasında, GSH için 1.82-5.99 arasında bulundu. Günler-arası % BSS GSSG için 21.68, GSH için ise % 4.80 olarak elde edildi (Tablo 3).

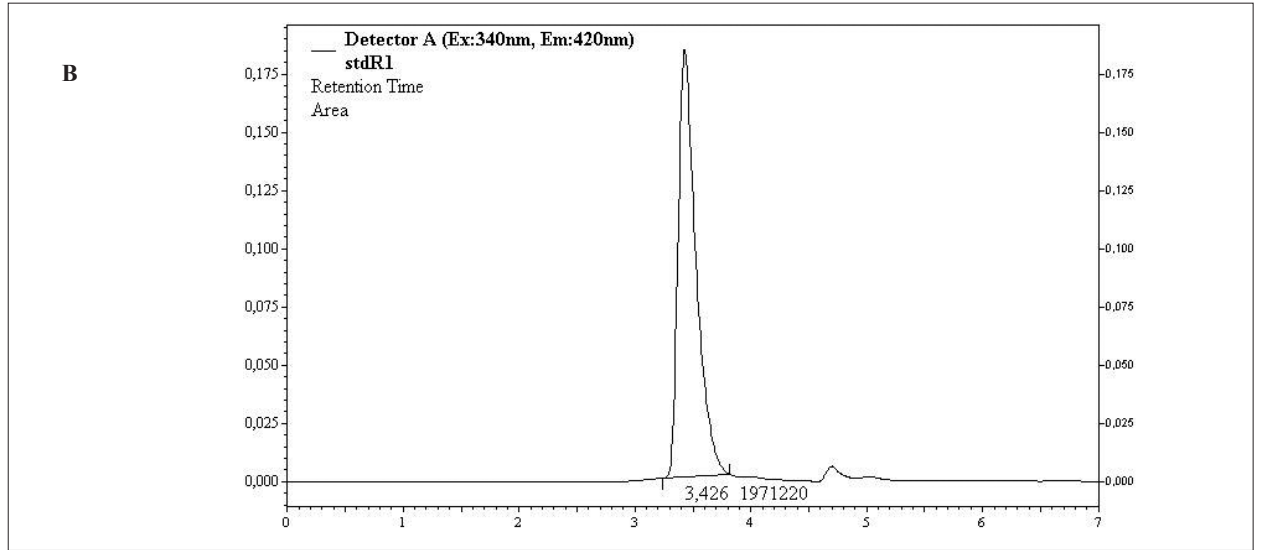
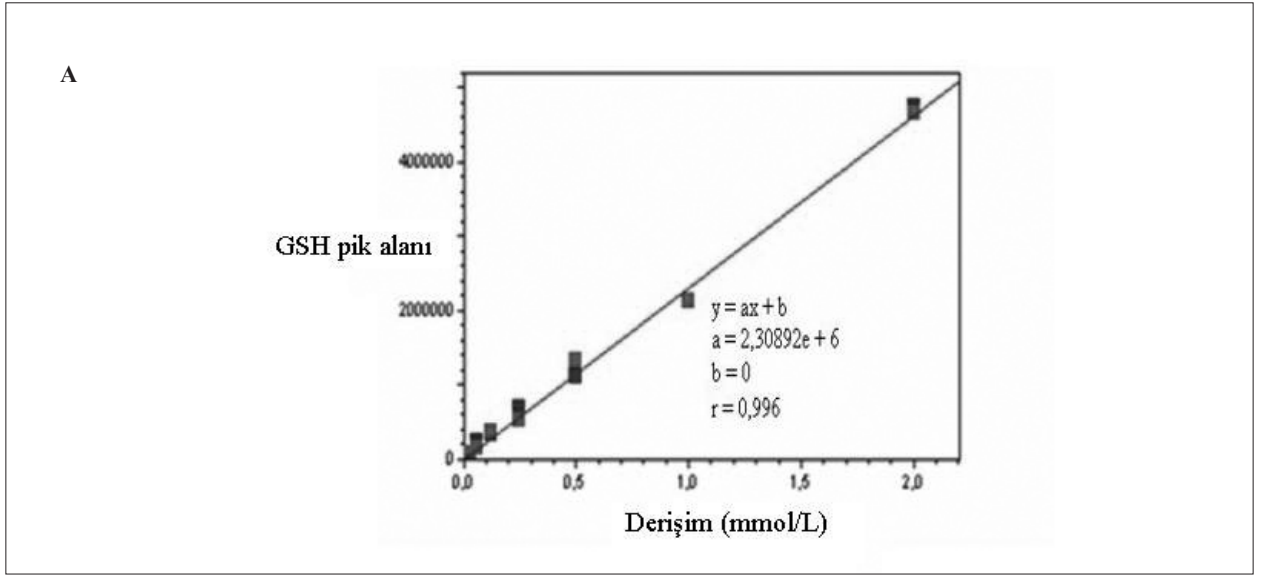
### Geri Kazanım Çalışması

Geri kazanım 4 farklı derişimde GSH'ın katılması ile ve her deneme için en az 3 tekrar ile gerçekleştirildi. Geri kazanım sonuçları en düşük ve en yüksek olmak üzere % 82.3 ile % 100.5 değerleri arasında bulundu. Bu değerler GSSG için % 79 ile % 100.6 arasında idi (Tablo 4).

### TARTIŞMA

Glutatyon, değişik biyolojik süreçlerde, özellikle de hücrelerin serbest radikallerden ve reaktif oksijen türlerinden korunmasında önemli rol oynamaktadır. Glutatyon, fizyolojik koşullarda indirgenmiş halde, daha az miktarda da oksitlenmiş halde bulunmaktadır (1). GSH ve GSSG düzeyleri, oksidatif strese neden olan patolojilerde değişmektedir. GSH/GSSG oranı hücrenin redoks durumu ile ilgili bilgi verir. Bu nedenle, glutatyon ölçüm yöntemi hem GSH hem de GSSG için uygulanabilir olmalı ve düşük derişimlerde bulunan GSSG'ye duyarlı olmalıdır.

Çalışmamızda, tiyol gruplarıyla reaksiyona girdikten sonra kolon öncesi türevlendirme basamağında OPA reaktifi ile floresans ışına özelliği gösteren ve yüksek seçiciliği olan yöntem temel alınmıştır (17). OPA türevlendirme reaktifi kullanılarak HPLC ile yapılan doku glutatyon ölçümü ile ilgili bulunan az sayıdaki kaynakta



Şekil 3. GSH standardı ile alınan kalibrasyon eğrisi (A) ve kromatogram (B)

Tablo 3. Paket eritrosit havuzu ile gerçekleştirilen gün-içi/günler-arası çalışma sonuçları

Gün-içi Tekrarlanabilirlik					
GSH (n=10)	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
Ort.	0.165	0.156	0.145	0.152	0.151
S.S	0.007	0.004	0.003	0.009	0.004
% BSS	4.13	2.57	1.82	5.99	2.73
GSSG (n=10)	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
Ort.	0.048	0.060	0.059	0.053	0.033
S.S	0.008	0.007	0.009	0.009	0.006
% BSS	17.76	11.78	15.17	17.15	18.34
Günler-arası Tekrarlanabilirlik					
	GSH (n=5 gün)		GSSG (n=5 gün)		
Ort.	0.154		0.050		
S.S	0.007		0.011		
% BSS	4.80		21.68		

**Tablo 4.** Paket eritrosit havuzu ile gerçekleştirilen geri kazanım çalışması sonuçları

Eklenen GSH ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	100	200	1000	2000
Saptanan GSH ( $\mu\text{mol/L}$ )	150	254	331	949	1916
Geri kazanım (%)		% 100.5	% 93	% 82.3	% 88
Eklenen GSSG ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	100	200	1000	2000
Saptanan GSSG ( $\mu\text{mol/L}$ )	150	267	369	918	1861
Geri kazanım (%)		% 91.8	% 100.6	% 79	% 88

isokratik koşulun uygun olduğu belirtilmektedir (12,17). Eritrositlerle yapılan bu çalışmada da GSH ve GSSG ölçümünde isokratik koşulda sonuç alınmıştır.

Cereser ve arkadaşları (17) tarafından eritrositlerde yapılan çalışmada da OPA kullanılarak HPLC ile glutatyon analizi gerçekleştirilmiştir. Temel almış olduğumuz bu çalışmada; türevlendirme basamakları, kolon özellikleri, fluoresans dedektörün dalga boyları, fırın sıcaklığı ve hareketli faz içeriği belirtilmiş olmasına karşın biyolojik örneklerin HPLC ile analizinde büyük önem taşıyan hareketli faz bileşimi, akış hızı ve sistemin kromatografik performansını gösteren pik asimetrisi, kapasite faktörü, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık değerleri belirtilmemiştir. Çalışmamız paket eritrosit örneklerinde güvenilir GSH/GSSG analizi için önemli olan performans parametrelerinin, kendi laboratuvar koşullarımızda belirlenmesi ve literatüre açıklık getirmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda başlıca amacımız, farklı akış hızlarında ve hareketli faz bileşimlerinde denemeler yaparak en iyi ayırıcılığı veren uygun akış hızını ve hareketli faz bileşimini bulmaktır. Denemeler sonucunda elde edilen ayırıcılık değerlerinin ( $R = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ ) formülüne göre değerlendirilmesinde  $R \geq 1$  kriter olarak alındı.  $R \geq 1$  olması bileşenlerin tamamen ayrıldığına,  $R < 1$  olması ise bileşenlerin birbirine çakıştığını ifade etmektedir (18). Kromatografik ayırımın gücünü yansıtan diğer parametreler kapasite faktörü ve teorik tabaka sayısıdır. Kapasite faktörünün 2 den büyük olması ( $k' > 2$ ), teorik tabaka sayısının da 2000 den büyük olması ayırımın kabul edilebilir olduğunu ifade etmektedir (19). Bu kriterlere göre, sabit akış hızında (1 ml/dak), farklı hareketli faz bileşimleri ile elde edilen en iyi ayırıcılık değeri (1.14), ölü hacim alıkonma zamanı ( $t_0$ : 47 saniye) ve kapasite faktör değeri (3.38) % 30 asetonitril+% 70 sodyum asetat içeren hareketli faz bileşiminde elde edilmiştir. Yine bu deney koşullarında teorik tabaka sayısı 3063, pik asimetri değeri ise 1.64 olarak saptanmıştır. Sistemin performansını etkileyen faktörlerden biri olan optimum akış hızı seçiminde de en iyi ayırıcılık değerinin elde edildiği koşul kabul edilmiştir. Bu şartlarda

% 30 asetonitril+% 70 sodyum asetat hareketli faz bileşiminde; 0.7 ml/dakika akış hızının en yüksek ayırıcılık değerine (2.48) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sistemin performansını belirleyen faktörlerin değerleri laboratuvar şartlarımızda tanımlanmıştır.

Yöntemin seçicilik çalışmasını gerçekleştirmek için glutatyon içermeyen bir matris sağlanamadığı için standarttan elde edilen kromatogramların alıkonma zamanı ile paket eritrosit kromatogramlarının alıkonma zamanları arasında bir fark olup olmadığı değerlendirilmiştir. Her iki uygulamada elde edilen kromatogramların alıkonma zamanlarına bakılarak (3.425/3.417) yöntemin biyolojik matrisimiz için uygun olduğuna karar verilmiştir.

Temel almış olduğumuz yöntemde (17) geri kazanım deneyleri yapılmış olmasına karşın derişime bağlı olarak belirtilmemiştir. Bu çalışma ile HPLC ile glutatyon ölçümüne ait teknik sonuçlar elde edilerek yöntem geliştirilmiş, örnek hazırlığı ve HPLC sisteminin şartlarında açık olmayan noktalar irdelenerek laboratuvar koşullarımıza en uygun şartlar belirlenmiştir. Belirlenen şartların performansı; rastgele hata göstergesi olan tekrarlanabilirlik çalışmaları ve sistematik hata göstergesi olan geri kazanım çalışmaları yapılarak doğrulanmıştır. Ardışık 5 gün süre ile aynı örneğin GSH ( $n = 10$ ) ölçümü sonucunda elde edilen SS ve % BSS değerleri irdelendiğinde gün-içi tekrarlanabilirliğinin sırasıyla 0.003–0.009; 1.82–5.99 arasında olduğu saptanmıştır. Standart sapma değerlerinin binde bir ondalık düzeyinde, % BSS'nin ise % 6'nın altında değişim göstermesi yöntemin tekrarlanabilirliğinin olduğunu ifade etmektedir. Bunun yanı sıra GSH için günler-arası tekrarlanabilirlik çalışmalarının da aynı oranlarda bulunması, hazırlanan örneklerden bu yöntemle tekrarlanabilir sonuçlar alınabildiğini ifade etmektedir. Oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) tekrarlanabilirlik göstergeleri olan SS ve BSS değerleri gün-içi çalışmalarda sırasıyla 0.006–0.009; % 11.78–18.34 arasında bulunmuştur. GSSG'nin günler-arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise SS 0.011 iken % BSS 21.68 değerindedir. GSSG ölçümleri için bulunan deneyler arası değişimin GSH değerlerine göre yüksek olması,

örneklerimizdeki GSSG değerlerinin düşük olmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Yöntemin doğruluğunu ve derişime bağımlı oransal hata düzeyini irdelemek amacıyla 100–2000 µmol/L GSH veya GSSG standartlarının örneklere katılması ile yapılan geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde; GSH için geri kazanım yüzdesinin 82.3-100.5, GSSG için geri kazanımın % 79-100.6 aralığında değıştığı belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğunu diğer bir deyişle sistematik hatalarının bir bölümünü gösteren geri kazanım yüzdelерinin her iki parametre için de yaklaşık 80-100 aralığında olması, sistematik hatasının kabul edilebilir sınırlarda olduğunu ve yöntemin oldukça yüksek derişimlerde bile kabul edilebilir sınırlarda oransal hata düzeyine sahip olduğunu göstermektedir.

Biyolojik materyallerde GSH analizi için tanımlanmış birçok yöntem bulunmasına karşın düşük duyarlılık ve tekrarlanabilirlik göstermeleri nedeni ile GSH/GSSG'nin HPLC tekniğı ile analizi önem taşımaktadır. Sonuç olarak basit ve hızlı olmasının yanı sıra; kesinlik, tekrarlanabilirlik ve yüksek duyarlılığından dolayı tercih edilen HPLC tekniğı ile paket eritrositte GSH/GSSG analizi için gereken yöntem çalışmaları bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin araştırmalarda oldukça önemli bir parametre olan GSH ölçümlerinde güvenilir sonuçlar elde edilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

## Kaynaklar

- [1] Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333, 19-39.
- [2] Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB Jr, Thomas JA. (1994) S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*. 310, 273-281.
- [3] Yamamoto T, Ohkuwa T, Itoh H, Sato Y, Naoi M. (2003) Relation between voluntary physical activity and oxidant/antioxidant status in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 135, 163-168.
- [4] Laird WJ, Gledhill AJ, Lappin GJ. (2003) Metabolism of methyl-(E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl]oxy]phenyl]-3-methoxyacrylate (azoxystrobin) in rat. *Xenobiotica*, 33, 677-690.
- [5] Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Petralia S, Giampaoletti S, Milzani A, Rossi R. (2003) Protein glutathionylation in erythrocytes. *Clin Chem*. 49, 327-330.

- [6] Tietze F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 27 (3), 502-522.
- [7] Hissin PJ, Hilf R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74, 214-226.
- [8] Owens CW, Belcher RV. (1965) A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem J*. 94, 705-711.
- [9] Reeve J, Kuhlenkamp J. (1980) Estimation of glutathione in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography: separation from cysteine and gamma-glutamylcysteine. *J.Chromatography*, 194, 424-428.
- [10] Yoshida T. (1996) Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J.Chromatography B*, 678, 157-164.
- [11] Luo JL, Hammarqvist F, Cotgreave IA, Lind C, Anderson K, Wernerman J. (1995) Determination of intracellular glutathione in human skeletal muscle by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.B Biomed Appl*, 670 (1), 29-36.
- [12] Paroni R, De Vecchi E, Cighetti G, Arcelloni C, Fermo I, Grossi A, Bonini P. (1995) HPLC with o-phthalaldehyde pre-column derivatization to measure total, oxidized, and protein-bound glutathione in blood, plasma and tissue. *Clin Chem*. 41, 448-454.
- [13] Neuschwander Tetri BA, Roll FJ. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione orthophthalaldehyde adduct. (1989) *Anal Biochem*. 179 (2), 236-41.
- [14] Martin J, White I.A.N. (1991) Fluorimetric determination of oxidized and reduced glutathione in cells and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. *J.Chromatography*, 568, 219-225.
- [15] Jones DP, Carlson JL, Samiec PS, Sternberg P JR, Mody VC, Reed RL, Brown LA. (1998) Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin Chim Acta*, 275 (2), 175-184.
- [16] Oe T, Ohyagi T, Naganuma A. (1998) Determination of gamma-glutamylglutathione and other low-molecular-mass biological thiol compounds by isocratic high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J.Chromatography B*. 708, 285-289.
- [17] Cereser C, Guichard J, Draı J, Bannier E, Garcia I, Parvaz P, Revol A. (2001) Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B*. 752, 123-132.
- [18] Schmit JA, Lehrer R (1987). *CRC Handbook of HPLC for the separation of aminoacids, peptides and proteins*. 61-78 CRC Press, New York.
- [19] Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Validation of Chromatographic Methods Guide. pp.1-32, (<http://www.fda.gov>).