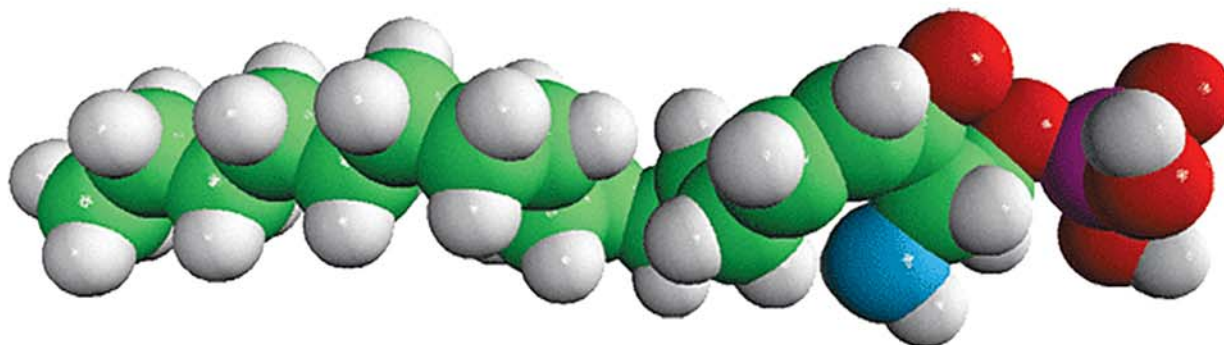
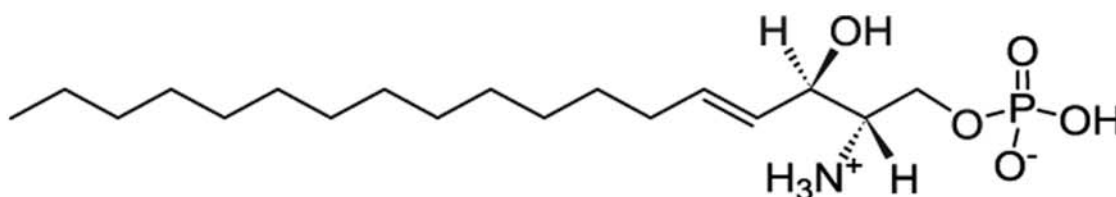


Sphingosine-1-phosphate HPLC bepaling met FMOC-Cl derivatisering

Sphingosine-1-phosphate HPLC assay with FMOC-Cl derivatisation



Academisch Medisch Centrum Universiteit van Amsterdam
afdeling Farmacologie en Farmacotherapie

Hogeschool Utrecht
Institute for Life Sciences & Chemistry
deeltijd Chemistry

Mina Mirzaian
studentennummer 1216760

afstudeerbegeleider AMC:
drs. Jan Butter

afstudeerbegeleider school:
Els Willems

Juni 2007



Sphingosine-1-phosphate HPLC bepaling met FMOC-Cl derivatisering

Sphingosine-1-phosphate HPLC assay with FMOC-Cl derivatisation

Academisch Medisch Centrum Universiteit van Amsterdam
afdeling Farmacologie en Farmacotherapie

Hogeschool Utrecht
Institute for Life Sciences & Chemistry
deeltijd Chemistry

Mina Mirzaian
studentennummer 1216760

afstudeerbegeleider AMC:
drs. Jan Butter

afstudeerbegeleider school:
Els Willems

Juni 2007



Voorwoord

Dit verslag is het resultaat van mijn afstudeeropdracht welke is uitgevoerd bij de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie van het Academisch Medisch Centrum Amsterdam.

Hierbij wil ik mijn begeleider drs. Jan Butter bedanken voor de begeleiding tijdens dit project.

Verder wil ik prof.dr. Martin Michel bedanken voor de gelegenheid die hij mij heeft geboden om op zijn afdeling te kunnen afstuderen.

Tenslotte gaat mijn dank uit naar Els Willems, mijn afstudeerbegeleider van de Hogeschool Utrecht.

Samenvatting

Sphingolipiden zijn polaire lipiden die gevonden worden in celmembranen en zijn de laatste decennia belangrijk geworden vanwege de mogelijke ziekte voorspellende waarde. Deze grote klasse van lipiden is onderverdeeld in drie subklassen: ceramiden, sphingomyelinen en glycosphingolipiden. De basismolecuul is 18-koolstof amino alcohol sphingosine. Sphingosine heeft twee functionele groepen (amino en hydroxyl) die chemisch gemodificeerd kunnen worden om verschillende sphingolipiden te maken. De meest bestudeerde sphingolipiden zijn sphingosine-1-phosphate en ceramide.

Cruciaal is het evenwicht tussen de sphingolipiden ceramide en sphingosine-1-phosphate, omdat deze twee verbindingen op verschillende vlakken een tegengestelde werking hebben. Ceramide is bijvoorbeeld in de meeste celtypen een apoptose-inducer die aanzet tot celdood, terwijl sphingosine-1-phosphate juist mitogeen werkt en de celdeling bevordert.

De afdeling Farmacologie en Farmacotherapie van het Academisch Medisch Centrum Universiteit van Amsterdam doet hoofdzakelijk onderzoek op het gebied van de cardiovasculaire en urogenitale farmacologie. Eén cardiovasculaire researchlijn betreft onderzoek naar de rol van sphingolipiden en sphingolipid-receptoren. Een assay voor sphingosine-1-phosphate als biomarker in lichaamsvloeistoffen is reeds ontwikkeld. Er bestaat behoefte aan snelle, gevoelige en selectieve methoden om sphingolipiden, specifiek sphingosine-1-phosphate, te bepalen in onder andere cellen.

Het uitgevoerde onderzoek heeft als uitgangspunt een combinatie van de bestaande methode van de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie (Butter, Koopmans en Michel, 2005) en de methode zoals beschreven door Andréani en Gräler (2006). Deze combinatie wordt als volgt omschreven: een sphingosine-1-phosphate assay high-performance liquid chromatography bepaling ontwikkelen met 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatisering gebruikmakend van een high-performance liquid chromatography isocratisch systeem zonder kolom verwarming; als eluens het organische deel acetonitril in plaats van methanol; solid phase extractie in plaats van vloeistof/vloeistof extractie; binnen een acceptabele analysetijd.

Gebruikmakend van de eluens 70% acetonitril in dikaliumwaterstoffosfaat 15 mM pH 9,3 geeft een retentietijd van 16,1 minuten voor D-erythro C₁₇ sphingosine-1-phosphate (deze wordt gebruikt als interne standaard), 23,3 minuten voor sphingosine-1-phosphate en 32,2 minuten voor sphinganine-1-phosphate. De recovery van sphingosine-1-phosphate met solid phase extractie is 63% ten opzichte van indampen met stikstof.

Omdat 9-fluorenylmethyl chloroformate een hoog front geeft wordt asparaginezuur als stopreagens gebruikt om deze met de overmaat van 9-fluorenylmethyl chloroformate te laten reageren. De standaard calibratielijn van 0 - 1 - 2 - 3 - 4 µg/ml van sphingosine-1-phosphate geeft een regressie coëfficiënt van $R = 0,997142$ en $R^2 = 0,994292$. Deze calibratielijn is na 24 uur bij kamertemperatuur

te hebben laten staan nogmaals gemeten. De standaard calibratielijns geeft een regressie coëfficiënt van $R = 0,99789$ en $R^2 = 0,995785$. De 9-fluorenylmethyl chloroformate derivaten zijn stabiel.

Er is gekeken naar de effecten van tijd, temperatuur, pH en verschillende buffers op de labeling.

Naarmate de tijd van de labeling van 9-fluorenylmethyl chloroformate toeneemt, neemt ook de respons (piekoppervlakte) toe. Als gevolg hiervan neemt de gevoeligheid toe. De standaard calibratielijns van 0 - 1 - 2 - 3 - 4 $\mu\text{g/ml}$ van sphingosine-1-phosphate geeft de volgende resultaten: $R = 0,995714$ en $R^2 = 0,991446$ na 3 minuten; $R = 0,999127$ en $R^2 = 0,998255$ na 5 minuten; $R = 0,999945$ en $R^2 = 0,99989$ na 10 minuten. De labelingstijd van 10 minuten geeft een betere lineariteit. Er is een vergelijking gemaakt van de labeling bij kamertemperatuur en bij een waterbad van 40°C . Wanneer de labelingsstap in het waterbad van 40°C plaatsvindt, vervolgens asparaginezuur wordt toegevoegd en deze direct wordt gemeten, daalt het front binnen 5 minuten.

Omdat dikaliumwaterstoffosfaat bij pH 9,3 weinig bufferingscapaciteit heeft wordt naar verschillende pH-waarden en verschillende buffers gekeken. De uitkomst hiervan is dat dikaliumwaterstoffosfaat pH 9,3 uiteindelijk toch het beste resultaat geeft.

Er wordt een standaard calibratie gemaakt in 100 μl foetal calf serum. De standaard calibratielijns van 0 - 1 - 2 - 3 - 4 $\mu\text{g/ml}$ van sphingosine-1-phosphate geeft de volgende resultaten: $R = 0,999253$ en $R^2 = 0,998506$. Met deze methode ligt de detecteerbaarheid bij circa 0,1 $\mu\text{g/ml}$ en de ijklijn loopt lineair vanaf 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Summary

Sphingolipids are polar lipids found in membranes of cells and are the last decades become important because of the possible disease predictive value. This major class of lipids is represented by three subclasses: ceramides, sphingomyelins and glycosphingolipids. Here the foundation molecule is the 18-carbon amino alcohol sphingosine. Sphingosine has two functional groups (amino and hydroxyl) that can be chemically modified to make a variety of sphingolipids. The most studied sphingolipids are sphingosine-1-phosphate and ceramide.

Crucial is the balance between the sphingolipids ceramide and sphingosine-1-phosphate, because these two have an opposite effect on different levels. Ceramide is for example in most cell types an apoptosis-inducer which stimulate cell death, while sphingosine-1-phosphate triggers mitogen which encourages cell division.

The department Pharmacology and Pharmacotherapy of Academic Medical Center of the University of Amsterdam does mainly research on the area of cardiovascular and urogenital pharmacology. One of the cardiovascular research line is regarding to research of the role of sphingolipids and sphingolipids receptors. An assay for sphingosine-1-phosphate as biomarker in body fluid is already developed. There is a need for quick, sensitive and selective methods to determine sphingolipids, specifically sphingosine-1-phosphate, in among others cells.

The performed research has as starting point a combination of the already existing method of the department Pharmacology and Pharmacotherapy (Butter, Koopmans and Michel, 2005) and the method described by Andréani and Gräler (2006). This combination is described as followed: a sphingosine-1-phosphate assay high-performance liquid chromatography assay developing with 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatisation using a high-performance liquid chromatography isocratic system without column heating; as mobile phase the organic part acetonitril in stead of methanol; solid phase extraction in stead of liquid/liquid extraction; within an acceptable analyse time.

Using the mobile phase 70% acetonitril in dipotassium hydrogen phosphate 15 mM pH 9.3 gives the retention time of 16.1 minutes for D-erythro C₁₇ sphingosine-1-phosphate (using as internal standard), 23.3 minutes for sphingosine-1-phosphate and 32.2 minutes for sphinganine-1-phosphate. The recovery of sphingosine-1-phosphate with solid phase extraction is 63% comparing to evaporation with nitrogen.

Because 9-fluorenylmethyl chloroformate gives a high background signal asparagine acid is used as stop reagent to react with an excess of 9-fluorenylmethyl chloroformate. The standard calibration curve of 0 - 1 - 2 - 3 - 4 µg/ml of sphingosine-1-phosphate results in regression coefficients of $R = 0.997142$ and $R^2 = 0.994292$. This calibration curve is measured after 24 hours left at room temperature. The standard calibration curve results in regression coefficients of $R = 0.99789$ and $R^2 = 0.995785$. The 9-fluorenylmethyl chloroformate derivates are stable.

The effects of time, temperature, pH and different buffers on labeling have been observed.

As time of labeling of 9-fluorenylmethyl chloroformate increases, the response (peak area) increases also. As a result of this sensitivity increases. The standard calibration curve of 0 - 1 - 2 - 3 - 4 µg/ml of sphingosine-1-phosphate results in: $R = 0.995714$ and $R^2 = 0.991446$ after 3 minutes; $R = 0.999127$ and $R^2 = 0.998255$ after 5 minutes; $R = 0.999945$ and $R^2 = 0.99989$ after 10 minutes. The labeling time of 10 minutes gives a better linearity.

A comparing is made between labeling at room temperature and at a 40°C in water-bath. When the labeling step took place in a 40°C water-bath, after which asparagine acid is added and been measured directly, the background signal decreases within 5 minutes.

Because dipotassium hydrogen phosphate at pH 9.3 has low buffering capacity the effects of different pH values and different buffers have been observed. The result of this is that dipotassium hydrogen phosphate pH 9.3 nevertheless gives the best result.

A standard calibration curve has been made in 100 µl foetal calf serum. The standard calibration curve of 0 - 1 - 2 - 3 - 4 µg/ml of sphingosine-1-phosphate results in: $R = 0.999253$ and $R^2 = 0.998506$. With this method the lowest concentration that can be detected is around 0.1 µg/ml. The linearity of the standard calibration curve starts at 0,5 µg/ml.

Lijst van gebruikte afkortingen

AcN	acetonitril
AMC	Academisch Medisch Centrum
Asp	asparaginezuur
C ₁₇ -1P	D-erythro C ₁₇ sphingosine-1-phosphate
FCS	foetal calf serum
FMOC-Cl	9-fluorenylmethyl chloroformate
HPLC	high-performance liquid chromatography
o-fosforzuur	ortho-fosforzuur
OPA	orthophthalaldehyde
Sa1P	sphinganine-1-phosphate
SPE	solid phase extractie
S1P	sphingosine-1-phosphate

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Samenvatting	2
Summary	4
Lijst van gebruikte afkortingen	6
Inhoudsopgave	7
1. Inleiding	9
1.1 Sphingolipiden	9
1.2 Probleemstelling	10
1.3 Vraagstelling	10
1.4 Doelstelling	10
1.5 Voornaamste resultaten literatuuronderzoek	10
1.6 Opbouw verslag	11
2. Theorie	12
2.1 Bepaling sphingosinen met behulp van HPLC methode	12
2.2 Korte omschrijving van de Butter, Koopmans en Michel methode	13
2.3 Korte omschrijving van de Andréani en Gräler methode	13
2.4 Onderzoek	13
3. Werkwijze	14
3.1 Materialen	14
3.2 Standaarden en reagentia	14
3.3 Extractie	15
3.4 Derivatisering van sphingolipiden met FMOC-Cl	15
3.5 Instrumenten	15
3.6 Methode van Andréani et al. (2006)	16
3.6.1 Materialen en methoden	16
3.6.2 Derivatisering van sphingolipiden met FMOC-Cl	16
3.6.3 HPLC analyses van FMOC-Cl gelabelde sphingolipiden	16
4. Resultaat	17
4.1 Startfase	17
4.2 Optimalisatiefase	20

5.	Discussie en conclusie	27
6.	Literatuurlijst	29
	Bijlage 1. Effect van tijd op labeling	30
	Bijlage 2. Effect van temperatuur op labeling	31
	Bijlage 3. Vergelijking standaard 1 µg met verschillende buffers met pH 9,3	32
	Bijlage 4. Calibratielijns S1P in 100 µl FCS	33
	Bijlage 5. Chromatogram S1P en C ₁₇ -1P (interne standaard) in FCS	34
	Bijlage 6. Calibratielijns detecteerbaarheid	35

1. Inleiding

De AMC-afdeling Farmacologie en Farmacotherapie doet hoofdzakelijk onderzoek op het gebied van de cardiovasculaire en urogenitale farmacologie. Eén cardiovasculaire onderzoekslijn binnen de afdeling is onderzoek naar bloeddrukverlagende geneesmiddelen voor patiënten met hart- en vaatziekten. Een tweede cardiovasculaire researchlijn betreft onderzoek naar de rol van sphingolipiden en sphingolipid-receptoren. De interesse gaat hierbij vooral uit naar de communicatie via deze receptoren in vasculaire gladde spiercellen.

De werking van gladde spiercellen in ons cardiovasculair systeem berust onder meer op een goede huishouding van sphingolipiden, vetachtige verbindingen in het celmembraan van de spiercellen. Onder invloed van specifieke enzymen kunnen de verschillende sphingolipiden via reversibele reacties in elkaar worden omgezet:

Cruciaal hierbij is het evenwicht tussen de sphingolipiden ceramide en sphingosine-1-phosphate (S1P), omdat deze twee verbindingen op verschillende vlakken een tegengestelde werking hebben. Ceramide is bijvoorbeeld in de meeste celtypen een apoptose-inducer die aanzet tot celdood, terwijl S1P juist mitogeen werkt en de celdeling bevordert. Zowel ceramide als S1P zijn 'vasoactive' stoffen die de concentratie van spiercellen beïnvloeden, maar ze hebben in verschillende vaatbedden een tegengestelde werking. Vanwege dit functionele antagonisme en vanwege het feit dat een cel de ceramide- en S1P-niveaus zelf kan regelen wordt gesproken van de 'ceramide-S1P rheostaat' (Michel, 2005).

1.1 Sphingolipiden

Sphingolipiden zijn polaire lipiden die gevonden worden in celmembranen. Deze grote klasse van lipiden is onderverdeeld in drie subklassen: ceramiden, sphingomyelinen en glycosphingolipiden. De basismolecuul is 18-koolstof amino alcohol sphingosine. Sphingosine heeft twee functionele groepen (amino en hydroxyl) die chemisch gemodificeerd kunnen worden om verschillende sphingolipiden te maken (Boyer, 2006).

De naam sphingolipide is bedacht door de Duitse chirurg en chemicus Johann L. W. Thudichum in 1884. Hij isoleerde de nog onbekende stof uit hersenweefsel en analyseerde deze. Maar in plaats van dat de resultaten van de analyses het hem duidelijk maakte om wat voor soort stof het ging, leverden de resultaten alleen maar meer raadsels op. Daarom gaf hij de stof de naam sphingosine om het te vernoemen naar de Sphinx, een gedaante uit de Griekse mythologie, die raadsels voorlegde aan Oedipus (Waarts, 2004).

Sphingolipiden zijn de laatste decennia belangrijk geworden, vooral vanwege twee sleutel ontdekkingen welke de onderzoekswereld wakker schudde. Ten eerste zijn sphingolipiden nu bekend om hun werking van zowel eerste als tweede messengers in hun diversiteit van signalering pathways. Ten tweede hebben ze vitale rollen in membraan microdomeinen, de zogenaamde 'lipid raft'.

Sphingosine en S1P, ceramiden en ceramiden-1-phosphate horen bij sphingolipiden. Recente studies hebben deze sphingolipiden geplaatst in het centrum van een aantal belangrijke biologische processen, in het bijzonder in signaal transductie pathways.

Vele ziekteprocessen zoals diabetes, hartziekten, auto-immuniteit en kanker ontstaan door defecten in signaal transductie pathways, het grote belang benadrukkend van signaal transductie voor de biologie als voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.

1.2 *Probleemstelling*

De rol van sphingolipiden en de mogelijke ziekte voorspellende waarde heeft er voor gezorgd dat dit een aandachtsgebied is binnen de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie van het AMC. Een assay voor S1P als biomarker in lichaamsvloeistoffen is reeds ontwikkeld.

Er bestaat behoefte aan snelle, gevoelige en selectieve methoden om sphingolipiden, specifiek S1P, te bepalen in onder andere cellen.

1.3 *Vraagstelling*

Is het mogelijk een S1P assay HPLC bepaling te ontwikkelen met 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) derivatisering; gebruikmakend van een HPLC isocratisch systeem zonder kolom verwarming; als eluens het organische deel acetonitril in plaats van methanol; solid phase extractie (SPE) in plaats van vloeistof/vloeistof extractie; binnen een acceptabele analysetijd?

1.4 *Doelstelling*

Een methode ontwikkelen die zo goed mogelijk voldoet aan de in de vraagstelling genoemde eisen met betrekking tot de genoemde S1P assay HPLC bepaling met FMOC-Cl labeling.

1.5 *Voornaamste resultaten literatuuronderzoek*

De bovenstaande doelstelling vraagt allereerst om een overzicht van de actuele ontwikkelingen op dit gebied. Er is daarom gezocht naar de meest recente publicaties. Uiteindelijk resulteerde dit in het artikel van Andréani en Gräler (2006). Dit artikel is als basis gebruikt voor het uitvoeren van het onderzoek, in combinatie met de bestaande methode welke door de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie is ontwikkeld (Butter, Koopmans en Michel, 2005).

Tevens is uit de verschillende artikelen gebleken dat fluorescentie labeling met FMOC-Cl een hoge selectiviteit geeft en de gevoeligheid voor de detectie van sphingolipiden verhoogt. In tegenstelling tot

orthophthalaldehyde (OPA), welke alleen fluoresceert na derivatisering met een primaire amine, is FMOC-Cl als zodanig fluorescerend. FMOC-Cl derivaten lijken erg stabiel te zijn.

Uit alle gevonden publicaties blijkt dat alle S1P bepalingen met FMOC-Cl derivatisering uitgevoerd zijn met gebruik van een HPLC gradiënt systeem.

1.6 *Opbouw verslag*

In dit verslag wordt de ontwikkeling methode van een S1P assay HPLC bepaling met FMOC-Cl labeling beschreven, evenals enige theorie en de bestaande methoden die van belang zijn. Er is een werkwijze beschreven die gebaseerd is op de laatst uitgevoerde experimenten. In de verwerking van de meetresultaten zijn steeds de overwegingen en redenen van de gezette stappen meegenomen. Het verslag wordt afgesloten met een discussie en conclusie.

2. Theorie

2.1 Bepaling sphingosinen met behulp van HPLC methode

Voor de bepaling van sphingosinen met behulp van HPLC methode wordt gebruik gemaakt van fluorescentie labelingstechniek. De meest gebruikte labelingsreagens is OPA. Sphingosinen worden gedetermineerd als derivaten van OPA (figuur 2.1).

De techniek is gebaseerd op het gebruik van een pre-kolom om een hoge fluorescentie detectie te verkrijgen.

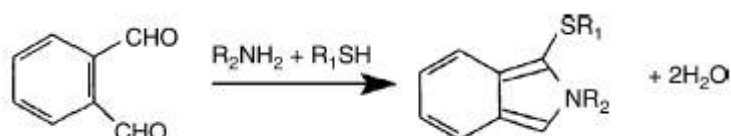


fig. 2.1 Reactie schema voor derivatisering van primaire amine met OPA reagens. R_2NH_2 : vette amine, R_1SH : mercaptoethanol.

Nadeel van deze methode is dat OPA derivaten instabiel zijn.

Het laatste jaar is er een andere HPLC methode benadering beschreven (Andréani en Gräler, 2006). Deze methode is gebaseerd op een fluorescentie labeling met FMOC-Cl in plaats van OPA (figuur 2.2). Er wordt beweerd dat deze methode een verhoogde sensitiviteit en een verlaagde detectielimiet van sphingosinen geeft.

In tegenstelling tot OPA, welke alleen fluoresceert na derivatisering met een primaire amine, is FMOC-Cl als zodanig fluorescerend. FMOC-Cl derivaten lijken erg stabiel te zijn.

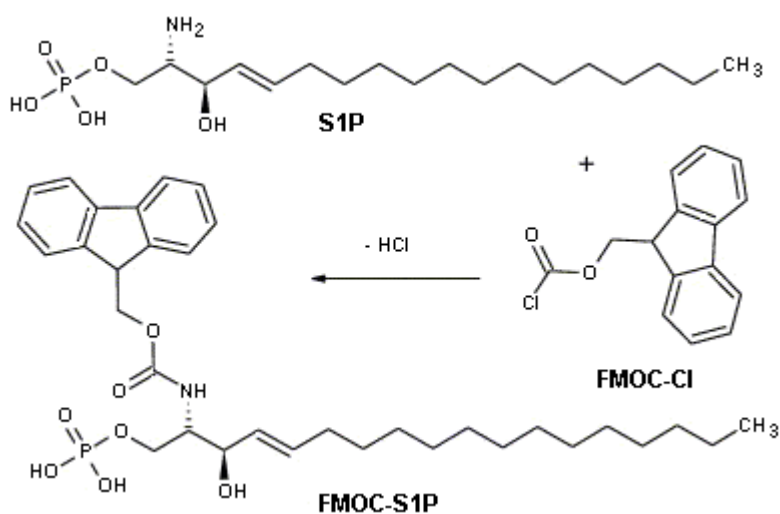


fig. 2.2 Reactie schema voor derivatisering van S1P met FMOC-Cl.

De afdeling Farmacologie en Farmacotherapie maakt gebruik van een gevalideerde methode met OPA derivatisering (Butter et al., 2005). Vanwege het bovengenoemde nadeel van OPA derivatisering

en de geclaimde voordelen van FMOC-Cl labelingsmethode, recent beschreven door Andréani en Gräler (2006), geeft dit de afdeling genoeg reden om deze bepalingmethode te onderzoeken.

2.2 Korte omschrijving van de Butter, Koopmans en Michel methode

Butter et al. (2005) beschrijven de ontwikkeling en validatie van de analytische methodologie voor de bepaling van S1P in plasma. Er wordt gebruik gemaakt van SPE gevolgd door een geautomatiseerde reversed-phase gradiënt HPLC kolomstelselsysteem met een pre-kolom derivatisatie met OPA en fluorescentie detectie, deze is gemeten bij emissie golflengte van 455 nm en excitatie golflengte van 340 nm. De limiet van kwantificatie is bepaald op 100 ng/ml exogene S1P met een relatieve standaard deviatie voor precisie en nauwkeurigheid < 15%.

De eluens A is 50% AcN in 7 mM kaliumfosfaat pH 6,0 en 100% AcN voor eluens B.

De runtijd is 20 minuten en de retentietijd van S1P is 7,2 minuten.

2.3 Korte omschrijving van de Andréani en Gräler methode

Andréani et al. (2006) hebben gebruik gemaakt van vloeistof/vloeistof extractie methode (organische laag is chloroform). FMOC-Cl is gebruikt voor derivatisering, de detectietechniek is fluorescentie en er is gemeten bij emissie golflengte van 316 nm en excitatie golflengte van 263 nm. De detectiegrens is 20 fmol.

Er is gebruik gemaakt van een HPLC gradiënt systeem (eluens: 82-95% methanol, 5-0% van 70 mM K_2HPO_4 en 13-5% water), waarbij de totale runtijd 68 minuten is en de retentietijd van S1P 30 minuten.

2.4 Onderzoek

Het uit te voeren onderzoek heeft als uitgangspunt een combinatie van de bestaande methode van de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie en de methode zoals beschreven door Andréani et al. (2006).

Deze combinatie wordt als volgt omschreven: een S1P assay HPLC bepaling ontwikkelen met FMOC-Cl derivatisering gebruikmakend van een HPLC isocratisch systeem zonder kolom verwarming; als eluens het organische deel acetonitril in plaats van methanol; SPE in plaats van vloeistof/vloeistof extractie; binnen een acceptabele analysetijd.

3. Werkwijze

3.1 Materialen

D-erythro sphingosine-1-phosphate (S1P), D-erythro C₁₇ sphingosine-1-phosphate (C₁₇-1P) en D-erythro sphinganine-1-phosphate (Sa1P), alle drie met een zuiverheid > 99%, van Avanti (Alabaster, AL, VS).

9-Fluorenylmethyl Chloroformate (Fmoc-Cl), zuiverheid van > 99%, van Fulka (St. Gallen, Zwitserland).

Foetal Calf Serum (FCS), van Gibco (Breda, Nederland).

1,4-Dioxaan anhydrous, zuiverheid > 99%, van Alderich (Zwijndrecht, Nederland).

Methanol en acetonitril (supra gradiënt), van Biosolve (Valkenswaard, Nederland).

Dikaliumwaterstoffsfaat (K₂HPO₄), zuiverheid > 99%, van Merck-VWR (Amsterdam, Nederland).

L-Asparaginezuur-Na, zuiverheid > 98%, van Sigma (Nederland).

Ammonia 25%, van Merck-VWR (Amsterdam, Nederland).

Chloroform, van Merck-VWR (Amsterdam, Nederland).

Natriumbicarbonaat, zuiverheid > 99%, van Merck-VWR (Amsterdam, Nederland).

Boorzuur, zuiverheid > 99%, van Merck-VWR (Amsterdam, Nederland).

Solid phase extraction kolommen (Oasis HLB), van Waters (Etten-Leur, Nederland).

Ultra zuiver water bereid door Mili-Q distillatie eenheid, van Millipore (Etten-Leur, Nederland).

3.2 Standaarden en reagentia

Standaarden van 200 µg/ml S1P en 200 µg/ml C₁₇-1P zijn bereid door 1 mg in 5 ml chloroform/methanol/ammoniumformaat 5 mM (10:10:1) op te lossen.

De stockstandaard is 4 µg/ml 60% methanol in water.

Standaard Sa1P is gemaakt door 27,4 µg/ml op te lossen in 90% methanol, hieruit is een stockstandaard gemaakt van 4 µg/ml 60% methanol in water.

De calibratielijn voor S1P is gemaakt door vanuit de stockstandaard 4 µg/ml een standaard reeks te maken van 0 - 0,5 - 1 - 2 - 3 en 4 µg/ml 60% methanol in water. Van elk van deze standaardoplossing is 100 µl in 100 µl FCS gepipetteerd, vervolgens 50 µl van stockstandaardoplossing C₁₇-1P (4 µg/ml) toegevoegd als interne standaard.

De concentraties van de standaard reeks is als volgt: 0 - 0,5 - 1 - 2 - 3 en 4 µg/ml FCS.

K₂HPO₄ molmassa 174,18 g/mol. Concentratie van stockoplossing = 140 mM, 24,39 g/l opgelost in water.

Fmoc-Cl molmassa 258,7 g/mol, 3,6 mg/ml (= 13,9 mM).

18 mg Fmoc-Cl opgelost in 5 ml dioxaan.

Asparaginezuur (Asp) met natriumzout molmassa 155,1 g/mol, 27 mg in 3 ml water = 9 mg/ml (= 58,3 mM Asp).

3.3 *Extractie*

SPE kolomen worden geconditioneerd met 2 keer 1 ml methanol 100%, vervolgens 2 keer 1 ml 25% methanol in 0,1% o-fosforzuur.

De extractie van de standaardoplossing is als volgt (er dient ook een blanco te worden bereid):

- pipeteer 100 µl FCS in een epje;
- pipeteer van elke standaardoplossing 100 µl;
- pipeteer 50 µl van stockstandaardoplossing C₋₁₇1P (interne standaard) met een concentratie van 4 µg/ml;
- pipeteer 900 µl van de oplossing 25% methanol in 0,1% o-fosforzuur;
- doe de dop van het epje goed dicht;
- vortex de oplossing gedurende 20 seconden;
- zet het epje gedurende 15 minuten op de rolbank;
- breng deze oplossing in een vooraf geconditioneerde SPE kolom;
- laat de oplossing langzaam door de kolom lopen;
- spoel de kolom met 1 ml 25% methanol in 0,1% o-fosforzuur oplossing;
- laat de kolom drogen met vacuüm gedurende 10 min;
- zet de kolom in een reageerbuis en pipeteer in de kolom 800 µl dioxaan 90%;
- centrifugeer deze met gradiënt centrifuge van 0 tot 600 rpm in 10 minuten;
- haal de kolom uit de buis, de standaarden zijn klaar voor derivatisering.

3.4 *Derivatisering van sphingolipiden met FMOC-Cl*

- pipeteer in geëluëerde standaarden 400 µl K₂HPO₄ 140 mM in de eluaat en vortex gedurende 20 seconden;
- voeg 400 µl FMOC-Cl reagens toe, meng de oplossing door vortexen;
- zet de buis in een waterbad van 40°C;
- stop de reactie na 10 minuten met 200 µl Asp oplossing;
- haal de reageerbuis uit het waterbad en vortex dit gedurende 20 seconden;
- laat de oplossing afkoelen.

Voor de analyse wordt 1 ml van bovengenoemde oplossing in de sample vial gepipetteerd. Het injectie volume is 20 µl.

3.5 *Instrumenten*

HPLC opstelling:

- detector, Separations Fluorescentie Detector met een excitatie golflengte van 263 nm en emissie golflengte van 316 nm, Jasco (Japan);

- pomp, SP Thermo Separation Products Spectra Series P100 (isocratisch), degasser Separations GT-103 (VS);
- auto sampler, Spark Holland Triathlon (Emmen, Nederland);
- kolom compartiment, Spark Holland Mistral (Emmen, Nederland);
- scheidingskolom Bridge™ C-18 3.5 µm S/N 2.1 x 150 mm kolom part.nr. 186 00 3023, Waters (Etten-Leur, Nederland);
- eluens 70% AcN in K₂HPO₄ 15 mM pH 9,3, flow 0,34 ml/min;
- pre-kolom, Hysphere Resin GP (10 µm, 10 mm x 2 mm, Spark Holland, Emmen, Nederland);
- Chromeleon Chromatography Information Management System, Dionex (Amsterdam, Nederland).

3.6 *Methode van Andréani et al. (2006)*

3.6.1 *Materialen en methoden*

Standaardoplossingen van 1, 3, 10 en 30 µM sphingolipiden werden verder opgelost in methanol. Tien microliter van elke standaardoplossing werd gebruikt om 10, 30, 100 en 300 pmol standaarden/monsters voor te bereiden. Eén zestigste van elk monster werd geanalyseerd.

3.6.2 *Derivatisering van sphingolipiden met FMOC-Cl*

FMOC-Cl (18 mg) opgelost in 5 ml dioxaan. Vacuüm gedroogde monsters werden opgelost in 200 µl dioxaan met achtereenvolgens toevoeging van 200 µl van 70 mM K₂HPO₄ in water en 200 µl FMOC-Cl reagens.

3.6.3 *HPLC analyses van FMOC-Cl gelabelde sphingolipiden*

HPLC gradiënt methode: De eluens was 82-95% methanol, 5-0% van 70 mM K₂HPO₄ en 13-5% water. De runtijd is 68 minuten, flow 1,3 ml/min. Tien microliter monster werd geïnjecteerd volgens de Cut-injection methode. Scheiding van sphingolipiden met reserved-phase chromatografie werd uitgevoerd met een 250 x 4,6 mm Kromasil 100-5 C18 scheidingskolom en een 17 x 4 mm Kromasil 100-5 C18 pre-kolom. Kolom werd verwarmd tot 35°C, detectie werd uitgevoerd met fluorescentie detector bij 263 nm excitatie en 316 nm emissie golflengte.

4. Resultaat

4.1 Startfase

Als start werd gebruik gemaakt van de eluens welke door de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie wordt gebruikt voor eigen bepaling. Een kolomschakelsysteem met een pre-kolom werd gebruikt om de monsters te concentreren (volgens Butter et al., 2005).

tabel 4.1 Start experiment

Eluens	50% AcN in fosfaatbuffer 80 mM pH 7
Eluens pre-kolom	35% AcN in fosfaatbuffer 80 mM (gemaakt met o-fosforzuur 85%) pH 3
Buffer	Na ₂ HPO ₄ 70 mM pH 9,3 (in plaats van K ₂ HPO ₄ pH 9,3)
Flow	0,3 ml/min.
Volume injectie	100 µl
Runtijd	60 minuten
Blanco	15 µl 60% methanol ingedampt met N ₂
St. 1 S1P	vanuit de standaard 500 ng/ml 15 µl (= 7,5 ng) ingedampt met N ₂
St. 2 S1P	vanuit de standaard 1000 ng/ml 15 µl (= 15 ng) ingedampt met N ₂
St. opgelost in achtereenvolgens	- 200 µl dioxaan gevortex (gedurende 20 sec.) - 200 µl buffer gevortex (gedurende 20 sec.) - 200 µl FMOC-Cl (13,9 mM) gevortex (gedurende 20 sec.)

Resultaat: Chromatogrammen hadden een hoge fluorescentie (hoog achtergrondsignaal) gedurende 60 minuten. Gestopt met de run, vervolgens werd een aantal keren eluens geïnjecteerd waardoor het signaal langzaam verminderde.

Bovengenoemde testen werden herhaald met een runtijd van 99 minuten, het probleem bleef bestaan.

Het hoge achtergrondsignaal werd veroorzaakt door FMOC-Cl. Volgens de literatuur geeft FMOC-Cl een hoog achtergrondsignaal gedurende 25 minuten (Andréani et al., 2006).

Testen werden herhaald volgens tabel 4.1, maar met aangepaste buffer: K₂HPO₄ 70 mM pH 9,3.

Voor het drogen van de standaarden werd een rotatieverdamer gebruikt.

Resultaat: geen verandering.

Omdat bovenstaande geen resultaat opleverde werd zoveel mogelijk geprobeerd het gradiënt schema van Andréani et al. (2006) te volgen. Volgens deze publicatie is de retentietijd van S1P circa 35 minuten. Dit komt overeen met 91% methanol, 4,5% K₂HPO₄ 70 mM en 4,5% water.

tabel 4.2 Aanpassingen experiment

Eluens	90% methanol in K_2HPO_4 35 mM pH 9,3
Eluens pre-kolom	35% AcN in fosfaatbuffer 80 mM (gemaakt met o-fosforzuur 85%) pH 3
Buffer	K_2HPO_4 70 mM pH 9,3
Flow	0,23 ml/min.
Volume injectie	100 μ l
Runtijd	99 minuten
Blanco	15 μ l 60% methanol ingedampt met N_2
St. 1 S1P	vanuit de standaard 500 ng/ml 15 μ l (= 7,5 ng) ingedampt met N_2
St. 2 S1P	vanuit de standaard 1000 ng/ml 15 μ l (= 15 ng) ingedampt met N_2
St. 3 S1P	vanuit de standaard 500 ng/ml 250 μ l (= 125 ng) ingedampt met N_2
St. 4 S1P	vanuit de standaard 1000 ng/ml 250 μ l (= 250 ng) ingedampt met N_2
St. opgelost in achtereenvolgens	- 200 μ l dioxaan gevortex (gedurende 20 sec.) - 200 μ l buffer gevortex (gedurende 20 sec.) - 200 μ l FMOC-Cl (13,9 mM) gevortex (gedurende 20 sec.)

Resultaat: Na 10 minuten geen hoog achtergrondsignaal meer. Geen verschil tussen blanco en standaard.

Overwegingen: Om uit te sluiten dat de piek van S1P niet in het achtergrondsignaal zat werd gekozen om de eluens aan te passen vanaf gradiënttijd nul volgens de publicatie van Andréani et al. (2006).

Eluens: 82% methanol in K_2HPO_4 35 mM pH 9,3.

Er werd gedacht dat S1P waarschijnlijk niet vanuit de pre-kolom elueerde. Daarom werd een nieuw eluens voor de pre-kolom gemaakt: 35% AcN in K_2HPO_4 35 mM pH 9,3.

Dit leverde ook geen gewenst resultaat op. Zelfs niet met standaard S1P 100 μ l en 200 μ l vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml.

Er diende rekening gehouden te worden met overmaat FMOC-Cl reagens, die een reactie geeft met onder andere methanol en ook water, met FMOC-OH als product. Dit wordt in de literatuur als een storende factor beschreven (Shangguan et al., 2001).

Omdat de pomp hoge druk gaf (350 Bar), dit als gevolg van neerslagvorming in de pre-kolom, werd deze verwijderd.

Er werd gedacht dat de piek van S1P waarschijnlijk veel later elueerde dan 99 minuten, daarom werd een recorder ingeschakeld.

tabel 4.3 Aanpassingen experiment naar aanleiding van resultaten en overwegingen

Eluens	82% methanol in K_2HPO_4 35 mM pH 9,3
Buffer	K_2HPO_4 70 mM pH 9,3
Flow	0,23 ml/min.
Volume injectie	20 μ l
Runtijd	99 minuten + extra looptijd recorder
Blanco	1 ml 60% methanol ingedampt met N_2

St. 1 S1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 4 ml (= 16 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. opgelost in achtereenvolgens	- 600 µl dioxaan gevortex (gedurende 20 sec.) - 600 µl buffer gevortex (gedurende 20 sec.) - 600 µl Fmoc-Cl (13,9 mM) gevortex (gedurende 20 sec.)

Resultaat: Standaard 16 µg liet een grote en brede piek bij 132 minuten zien. Blanco had geen piek bij dezelfde retentietijd. Runtijd: 8,8 uur om te bevestigen dat deze piek de S1P piek was.

Overweging: Nu S1P was gedetecteerd werd gekeken naar de retentietijd van C₁₇-1P, met de bedoeling deze als interne standaard te gebruiken.

Sa1P is volgens de literatuur de laatst eluerende piek en daarom werd deze ook meegenomen.

tabel 4.4 Aanpassingen experiment naar aanleiding van resultaten en overwegingen

Eluens	82% methanol in K ₂ HPO ₄ 35 mM pH 9,3
Buffer	K ₂ HPO ₄ 70 mM pH 9,3
Flow	0,23 ml/min.
Volume injectie	20 µl
Runtijd	99 minuten + extra looptijd recorder
Blanco	1 ml 60% methanol ingedampt met N ₂
St. 1 S1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 100 µl (= 0,4 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. 2 S1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 200 µl (= 0,8 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. 1 C ₁₇ -1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 100 µl (= 0,4 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. 2 C ₁₇ -1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 200 µl (= 0,8 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. 1 Sa1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 100 µl (= 0,4 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. 2 Sa1P	vanuit de stockstandaard 4 µg/ml 200 µl (= 0,8 µg) ingedampt met rotatieverdamer
St. opgelost in achtereenvolgens	- 600 µl dioxaan gevortex (gedurende 20 sec.) - 600 µl buffer gevortex (gedurende 20 sec.) - 600 µl Fmoc-Cl (13,9 mM) gevortex (gedurende 20 sec.)

tabel 4.5 Resultaat experiment tabel 4.4

	Retentietijd in minuten	Piekhoogte in mm
Blanco	-	-
St. 1 S1P	132	30
St. 2 S1P	132	56
St. 1 C ₁₇ -1P	102	60
St. 2 C ₁₇ -1P	102	150
St. 1 Sa1P	192	30
St. 2 Sa1P	192	77

Overweging: Het experiment uit tabel 4.4 en de resultaten uit tabel 4.5 gaven lange retentietijden. Om dit korter te maken was een aanpassing aan de mobiele fase noodzakelijk. Er werd een nieuwe eluens gemaakt met een hoog percentage AcN. Er werd gekeken naar de oplosbaarheidscurve van

AcN met K_2HPO_4 . Uitkomst hiervan was dat er bij het maximale percentage van 70% AcN met buffer K_2HPO_4 15 mM geen neerslag ontstond.

tabel 4.6 Aanpassingen experiment naar aanleiding van resultaten en overwegingen

Eluens	70% AcN in K_2HPO_4 15 mM pH 9,3
Buffer	K_2HPO_4 70 mM pH 9,3
Flow	0,34 ml/min.
Volume injectie	20 μ l
Runtijd	99 minuten + extra looptijd recorder
Blanco	1 ml 60% methanol ingedampt met N_2
St. 1 S1P	vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml 100 μ l (= 0,4 μ g) ingedampt met N_2
St. 2 S1P	vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml 200 μ l (= 0,8 μ g) ingedampt met N_2
St. 1 C_{17} -1P	vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml 100 μ l (= 0,4 μ g) ingedampt met N_2
St. 2 C_{17} -1P	vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml 200 μ l (= 0,8 μ g) ingedampt met N_2
St. 1 Sa1P	vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml 100 μ l (= 0,4 μ g) ingedampt met N_2
St. 2 Sa1P	vanuit de stockstandaard 4 μ g/ml 200 μ l (= 0,8 μ g) ingedampt met N_2
St. opgelost in achtereenvolgens	- 200 μ l dioxaan gevortex (gedurende 20 sec.) - 200 μ l buffer gevortex (gedurende 20 sec.) - 200 μ l FMOC-Cl (13,9 mM) gevortex (gedurende 20 sec.)

tabel 4.7 Resultaat experiment tabel 4.6

	Retentietijd in minuten	Piekopp.
Blanco	-	-
St. 1 S1P	23,23	203,4672
St. 2 S1P	23,43	369,3648
St. 1 C_{17} -1P	16,09	294,3182
St. 2 C_{17} -1P	16,16	652,996
St. 1 Sa1P	32,12	118,6659
St. 2 Sa1P	32,33	237,3115
Opmerking: de kleine verschuivingen van de retentietijden komen waarschijnlijk door dat K_2HPO_4 15 mM pH 9,3 minder bufferingscapaciteit heeft, of door temperatuurschommelingen tussen dag en nacht.		

4.2 Optimalisatiefase

Nadat er een acceptabele analysetijd was bereikt werd er voor optimalisatie van de bepaling gekeken naar de volgende factoren: recovery van SPE ten opzichte van indampen met N_2 ; gebruikmaking van Asp als stopreagens; effect van tijd; effect van temperatuur; effect van pH en type buffers.

Om de recovery van SPE ten opzichte van indampen met N_2 te berekenen werden de ingedampte standaarden met N_2 opgelost in 200 μ l dioxaan, vervolgens 200 μ l K_2HPO_4 70 mM pH 9,3 en 200 μ l FMOC-Cl (13,9 mM) toegevoegd.

De standaarden van SPE werden geëlueerd met 400 μ l dioxaan 90% en vervolgens werden 200 μ l K_2HPO_4 70 mM pH 9,3 en 200 μ l FMOC-Cl (13,9 mM) toegevoegd.

Standaarden van SPE werden 1,3 keer meer verdund dan de standaarden van N₂. Deze factor is meegenomen bij de berekening van de recovery.

Tabel 4.8 Resultaten van SPE vergeleken met resultaten van indampen met N₂

St. µg/ml	SPE piekopp.		N ₂ piekopp.		Recovery in %	
	S1P	C ₁₇ -1P	S1P	C ₁₇ -1P	S1P	C ₁₇ -1P
0	0	0	0	0	-	-
2	39,4091	67,2302	84,8413	223,4257	62	40
3	64,9508	91,9231	136,169	360,9073	64	34
4	83,8421	122,7836	178,4495	480,8964	63	34

Overwegingen: Er werd geprobeerd om C₁₇-1P als interne standaard te gebruiken. Er werd 50 µl uit C₁₇-1P stockstandaard 4 µg/ml in elke standaardoplossing voor de ijklijn toegevoegd.

Indien de standaardoplossingen direct na de bereiding geïnjecteerd werden, gaf het een hoger front dan wanneer deze een tijd hadden gestaan. Dit werd veroorzaakt door een overmaat FMOC-Cl. Om dit probleem op te lossen werd gedacht aan een soort stopreagens die met een overmaat FMOC-Cl zou reageren. Voor stopreagens werd gebruik gemaakt van Asp. Asp is één van de twintig natuurlijk voorkomende aminozuren die de bouwstenen zijn van eiwitten.

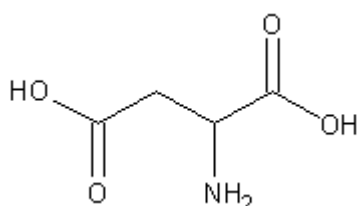


fig. 4.1 Asparaginezuur

Het schema was als volgt: standaarden werden geëluëerd met 800 µl dioxaan 90% en vervolgens werden 200 µl K₂HPO₄ 140 mM pH 9,3, 400 µl FMOC-Cl (13,9 mM) en 200 µl Asp (58,3 mM) toegevoegd.

Tabel 4.9 Standaard calibratie met interne standaard waarbij gebruik werd gemaakt van SPE

St. µg/ml	S1P piekopp.	C ₁₇ -1P piekopp.	Piekratio
0	0	0	0
1	30,612	59,8011	0,511897
2	76,9839	63,2411	1,217308
3	111,5286	64,3618	1,732838
4	142,0874	65,1978	2,179328
R = 0,997142; R ² = 0,994292; richting = 0,5579598; snijpunt = 0,012355.			
Retentietijd S1P = 23,4 minuten; retentietijd C ₁₇ -1P = 16,1 minuten.			

Tabel 4.10 Zelfde standaard als tabel 4.9 na 24 uur

St. µg/ml	S1P piekopp.	C ₁₇ -1P piekopp.	Piekratio
0	0	0	0
1	28,32	56,1873	0,504028
2	73,7639	62,503	1,180166
3	107,6021	63,9278	1,683182
4	139,3398	64,9933	2,14391
R = 0,99789; R ² = 0,995785; richting = 0,5466974; snijpunt = 0,008863.			
Retentietijd S1P = 23,5 minuten; retentietijd C ₁₇ -1P = 16,2 minuten.			

Resultaat: Gebruikmakend van C₁₇-1P als interne standaard gaf een goede respons en de ijklijn liep lineair. Deze calibratielijn werd na 24 uur bij kamertemperatuur te hebben laten staan nogmaals gemeten. Er was weinig verschil tussen de gemeten resultaten. De FMOC-Cl derivaten waren stabiel.

Tabel 4.11 Effect van tijd op labeling

St. µg/ml	S1P piekopp.			C ₁₇ -1P piekopp.			Piekratio		
	3 min.	5 min.	10 min.	3 min.	5 min.	10 min.	3 min.	5 min.	10 min.
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13,022	15,2515	53,4268	18,5514	22,5701	89,4447	0,701942	0,675739	0,597317
2	24,4467	37,2438	95,9332	20,1612	26,7738	78,8186	1,212562	1,391054	1,217139
3	36,9552	56,8546	149,5458	17,2104	28,4386	82,3692	2,14726	1,999205	1,815555
4	46,2774	97,3719	203,953	17,6072	37,7203	85,0946	2,628323	2,581419	2,39678
3 minuten: R = 0,995714; R ² = 0,991446; richting = 0,6701963; snijpunt = -0,00238.									
5 minuten: R = 0,999127; R ² = 0,998255; richting = 0,6486304; snijpunt = 0,032223.									
10 minuten: R = 0,999945; R ² = 0,99989; richting = 0,6011797; snijpunt = 0,002999.									

Voor calibratie zie bijlage 1, figuur a.

Resultaat: Naarmate de tijd van de labeling van FMOC-Cl toenam, nam ook de respons (piekoppervlakte) toe. Daarmee nam de gevoeligheid toe. Daarom gaf de labelingstijd van 10 minuten een betere lineariteit.

Overweging: Om de stabiliteit van de standaardoplossingen na de toevoeging van Asp te controleren werd dezelfde oplossing nog een keer na 24 uur geïnjecteerd (zie tabel 4.12).

Tabel 4.12 Effect van tijd op labeling na 24 uur

St. µg/ml	S1P piekopp.			C ₁₇ -1P piekopp.			Piekratio		
	3 min.	5 min.	10 min.	3 min.	5 min.	10 min.	3 min.	5 min.	10 min.
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13,7644	13,6901	44,8513	17,2555	22,8069	89,3016	0,797682	0,600261	0,502245
2	25,627	38,3754	92,9419	17,97	28,7959	78,0222	1,426099	1,332669	1,191224

3	35,2367	49,3301	148,5745	18,4643	25,2459	82,4915	1,908369	1,953985	1,801089
4	46,4288	96,4481	207,4994	16,4248	37,8572	84,2525	2,82675	2,547682	2,462828
3 minuten: $R = 0,995467$; $R^2 = 0,990955$; richting = 0,6764187; snijpunt = 0,038943.									
5 minuten: $R = 0,999378$; $R^2 = 0,998756$; richting = 0,6449087; snijpunt = -0,0029.									
10 minuten: $R = 0,998946$; $R^2 = 0,997893$; richting = 0,6224499; snijpunt = -0,05342.									

Voor calibratie bij tabel 4.12 bij een labelingsijd van 10 minuten, zie bijlage 1, figuur b.

Resultaat: De FMOC-Cl derivaten bleven stabiel.

Tabel 4.13 Effect van temperatuur op labeling (labelingsijd van 10 minuten)

St. µg/ml	S1P piekopp.		C ₁₇ -1P piekopp.		Piekratio	
	kamertemp.	waterbad van 40°C	kamertemp.	waterbad van 40°C	kamertemp.	waterbad van 40°C
0	0	0	0	0	0	0
1	9,3942	14,5634	17,4008	22,0724	0,539872	0,659801
2	15,8715	31,7671	12,829	21,7596	1,237158	1,459912
3	47,5543	47,3916	23,9559	23,8731	1,98508	1,985146
4	69,7694	67,8813	23,9051	23,5907	2,918599	2,87746
kamertemp.: $R = 0,99522$; $R^2 = 0,990463$; richting = 0,7282403; snijpunt = -0,12034.						
waterbad van 40°C: $R = 0,997645$; $R^2 = 0,9953$; richting = 0,7080265; snijpunt = -0,01959.						

Voor chromatogram bij tabel 4.13 zie bijlage 2.

Resultaat: De piekoppervlakten waren groter bij een temperatuur van 40°C, dat gold zowel voor S1P als C₁₇-1P. Hierdoor was er weinig verschil tussen de ratio's van de pieken bij deze temperatuur en bij die van kamertemperatuur. De temperatuur had een positief effect op het dalen van het front. Het front daalde binnen 5 minuten.

Zonder gebruikmaking van Asp en een temperatuur van 40°C gaf de injectie direct na de labeling een hoog front van 17 minuten als resultaat. Deze nam af tot 5 minuten naarmate de standaarden voor langere tijd stonden (circa 2 uur).

De labelingsstap in het waterbad van 40°C zonder gebruikmaking van Asp gaf hetzelfde resultaat. Indien alleen gekozen werd voor toevoeging van Asp bij kamertemperatuur diende de standaard 40 minuten te staan om een afnemend front na 5 minuten te krijgen.

Wanneer de labelingsstap in het waterbad van 40°C plaatsvond, vervolgens Asp als stopreagens werd toegevoegd en deze direct gemeten werd, daalde het front binnen 5 minuten. Deze combinatie gaf het beste resultaat.

Tabel 4.14 Invloed van pH en labelingstijd (standaard van 0,4 µg)

	S1P piekopp.		C ₁₇ -1P piekopp.	
	na 10 min.	na 60 min.	na 10 min.	na 60 min.
K ₂ HPO ₄ 140 mM pH 7,4	78,4371	201,1623	74,8179	210,5336
K ₂ HPO ₄ 140 mM pH 9,3	180,9872	303,1024	156,4071	271,7443
Boraat 500 mM pH 10,4	11,3184	8,1889	-	-

Tabel 4.15 Recovery van tabel 4.14 berekend ten opzichte van K₂HPO₄ 140 mM pH 9,3

	S1P recovery in %		C ₁₇ -1P recovery in %	
	K ₂ HPO ₄ 140 mM pH 7,4	Boraat 500 mM pH 10,4	K ₂ HPO ₄ 140 mM pH 7,4	Boraat 500 mM pH 10,4
na 10 min.	43	6	48	-
na 60 min.	66	3	78	-

Tabel 4.16 Invloed van verschillende buffers met dezelfde pH waarde (labelingstijd van 10 minuten)

	S1P piekopp.		C ₁₇ -1P piekopp.	
	0,1 µg	0,4 µg	0,1 µg	0,4 µg
Boraat 70 mM pH 9,3	0	0	0	0
K ₂ HPO ₄ 140 mM pH 9,3	10,2972	43,4972	39,5088	40,0549

Tabel 4.17 Invloed van verschillende buffers met dezelfde pH waarde (labelingstijd van 10 minuten) met een 10x hogere hoeveelheid dan tabel 4.15

	S1P piekopp.		C ₁₇ -1P piekopp.	
	1 µg	4 µg	1 µg	4 µg
Boraat 70 mM pH 9,3	5,4528	37,3789	23,2511	64,9482
K ₂ HPO ₄ 140 mM pH 9,3	154,1165	711,8584*	345,4384	714,0954*
Bicarbonaat 25 mM pH 9,3	39,4964	173,286	93,4775	367,5371
* Signalen zijn zo hoog dat er een piekplateau ontstaat.				
De recovery werd berekend ten opzichte van K ₂ HPO ₄ 140 mM van een standaard 1 µg.				

Voor chromatogram van 1 µg, zie bijlage 3.

Tabel 4.18 Recovery van tabel 4.17 berekend ten opzichte van K₂HPO₄ 140 mM

	S1P recovery in %		C ₁₇ -1P recovery in %	
	Boraat 70 mM pH 9,3	Bicarbonaat 25 mM pH 9,3	Boraat 70 mM pH 9,3	Bicarbonaat 25 mM pH 9,3
1 µg	4	26	7	25

Resultaat: K₂HPO₄ 140 mM pH 9,3 gaf de hoogste respons.

Er werd een standaard calibratie gemaakt in 100 µl FCS. Het schema was als volgt: standaarden werden geëluëerd met 800 µl dioxaan 90%, vervolgens respectievelijk 200 µl K₂HPO₄ 140 mM pH 9,3, 400 µl FMOC-Cl (13,9 mM) en 200 µl Asp (58,3 mM) toegevoegd. De labelingstijd was 10 minuten (zie tabel 4.19).

Tabel 4.19 Standaard calibratie in 100 µl FCS

St. µg/ml	S1P piekopp.	C ₁₇ -1P piekopp.	Piekratio
0	0	0	0
1	18,7771	39,5084	0,47527
2	35,0026	32,2373	1,08578
3	53,5057	31,9907	1,672539
4	76,6684	35,0245	2,188993
R = 0,999253; R ² = 0,998506; richting = 0,5575257; snijpunt = -0,03054.			

Voor standaard calibratie zie bijlage 4, figuur a. Voor chromatogram zie bijlage 5.

Resultaat: De blanco FCS gaf geen storende piek bij de te bepalen componenten. De ijklijn liep lineair.

Overweging: Om de gevoeligheid van het apparaat en de detectiegrens van dit systeem te bepalen werden lagere concentraties van de standaarden gemaakt.

Het schema was als volgt: standaarden werden geëluëerd met 800 µl dioxaan 90%, vervolgens respectievelijk 400 µl K₂HPO₄ 140 mM pH 9,3, 400 µl FMOC-Cl (13,9 mM) en 200 µl Asp (58,3 mM) toegevoegd. De labelingstijd was 10 minuten (zie tabel 4.20).

Tabel 4.20 Standaard calibratie in 100 µl FCS met lagere concentraties

St. µg/ml	S1P piekopp.	C ₁₇ -1P piekopp.	Piekratio
0	0	0	0
0,25	7,3446	87,5126	0,083926
0,5	12,55	113,2037	0,110862
1	24,5876	88,3767	0,278214
2	56,0893	113,4422	0,494431
3	70,967	95,1785	0,74562
4	66,176	69,1002	0,957682
R = 0,998862; R ² = 0,997725; richting = 0,2397633; snijpunt = 0,013326.			

Resultaat: De ijklijn was wel oplopend, maar niet lineair. De piek van het laagste punt van de ijklijn (0,25 µg/ml) was niet scherp, waardoor de ijklijn niet lineair liep (zie bijlage 4, figuur b). Met het weglaten van 0,25 µg/ml is de ijklijn wel lineair.

Overweging: Om de gevoeligheid van het apparaat en de detectiegrens te verhogen werd geprobeerd om de standaarden in minder volume te verdunnen. Het schema was als volgt: standaarden werden geëluëerd met 800 µl dioxaan 90%, vervolgens respectievelijk 200 µl K₂HPO₄ 280 mM pH 9,3, 200 µl FMOC-Cl (27,8 mM) en 100 µl Asp (116,6 mM) toegevoegd. De labelingstijd werd verhoogd van 10 minuten naar 20 minuten (zie tabel 4.21).

Tabel 4.21 Standaard calibratie in 100 µl FCS met lagere concentraties en een labelingstijd van 20 minuten

St. µg/ml	S1P piekopp.	C ₁₇ -1P piekopp.	Piekratio
0	0	0	0

0,2	21,8755	314,8685	0,069475
0,5	40,3123	300,4419	0,134177
1	86,3253	311,0741	0,277507
2	199,2162	318,5355	0,625413
3	311,3617	348,5129	0,893401
4	417,6381	356,586	1,171213
R = 0,999216; R^2 = 0,99843; richting = 0,2963377; snijpunt = 0,000184.			

Resultaat: De ijklijn was wel oplopend, maar niet lineair. De lijn liep krom (zie bijlage 4, figuur c). Er was weinig verschil tussen de resultaten van tabel 4.20 en tabel 4.21 wat betreft lineariteit. Het laagste punt van de ijklijn gaf nog steeds hetzelfde probleem. Echter elk punt van deze calibratie werd afzonderlijk als onbekende (x) berekend volgens de lineaire regressie methode. Het resultaat was betrouwbaar (zie tabel 4.22). Deze had eventueel polynoom berekend kunnen worden, de bedoeling was echter om een lineaire calibratielijn te verkrijgen.

Tabel 4.22 Betrouwbaarheid calibratielijn

nominale x-waarde in µg/ml	0	0,2	0,5	1	2	3	4
berekende x-waarde in µg/ml	0	0,23382	0,45216	0,93583	2,10985	3,01418	3,95167

Opmerking: Het verhogen van de concentraties van de buffer K_2HPO_4 280 mM pH 9,3, Fmoc-Cl en Asp gaf een hoge druk van de pomp als resultaat (290 Bar). Na controle van de geïnjecteerde monsters was er neerslag te zien, dit kwam waarschijnlijk doordat deze buffer na een tijdje neersloeg.

Overweging: Omdat de verhoogde concentratie van de buffer neerslag vormde werd de vorige samenstelling gebruikt. Het schema was als volgt: standaarden werden geëluëerd met 800 µl dioxaan 90%, vervolgens respectievelijk 200 µl K_2HPO_4 140 mM pH 9,3, 200 µl Fmoc-Cl (13,9 mM) en 100 µl Asp (58,3 mM) toegevoegd.

Tabel 4.23 Detecteerbaarheid

St. µg/ml	S1P piekopp.	C ₁₇ -1P piekopp.	Piekratio
0	0	0	0
0,1	7,7532	199,1605	0,038929
0,2	11,6298	199,1254	0,058404
0,5	30,0328	193,2969	0,155371
1	61,5432	233,8107	0,263218
2	111,7236	209,3453	0,533681
3	195,6511	255,8975	0,764568
4	245,0553	222,5739	1,101006
R = 0,998679; R^2 = 0,997359; richting = 0,26629; snijpunt = 0,004906.			

Voor standaard calibratie zie bijlage 6.

Resultaat: De laagste standaard met de concentratie van 0,1 µg/ml was wel detecteerbaar.

5. Discussie en conclusie

Er is als eerste geprobeerd om met bestaande eluens van de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie te experimenteren. Deze geeft een zodanig hoog front dat de analyse is gestopt. Vervolgens is geprobeerd om de gradiënt elutie van het gepubliceerde artikel van Andréani en Gräler (2006) na te doen. Deze geeft als resultaat dat S1P een retentietijd van 132 minuten heeft, C₁₇-1P, die als interne standaard gebruikt zal worden, van 102 minuten en sphinganine, die volgens alle literatuur de laatst eluerende sphingolipide is, binnen 192 minuten.

Na aanpassing van het eluens met 70% AcN in K₂HPO₄ 15 mM pH 9,3 geeft S1P een retentietijd van 23,3 minuten, C₁₇-1P van 16,1 minuten en sphinganine binnen 32,1 minuten.

Het vervangen van methanol door AcN heeft een zeer positief effect op de retentietijd. De retentietijd neemt met de factor 6 af in vergelijking met de eluens van Andréani et al. (2006).

Een extra factor die een bijdrage levert aan de afname van de retentietijd is het feit dat deze eluens tevens de druk van de pomp verlaagt, zodat de flow met de factor 1,5 kan worden verhoogd, waardoor de te bepalen componenten sneller uit de kolom komen.

Er is een vergelijking gemaakt tussen de resultaten van standaarden die ingedampt zijn met N₂ en die geëluëerd zijn met SPE. De recovery van S1P van SPE is 63% ten opzichte van S1P van N₂. De recovery van C₁₇-1P van SPE is 36% ten opzichte van C₁₇-1P van N₂.

Uit de vergelijkingen van de chromatogrammen blijkt dat SPE een rustigere baselijn geeft en scherpere pieken heeft dan die van N₂. De lage recovery van C₁₇-1P is geen probleem, omdat deze als interne standaard wordt gebruikt. De recovery van S1P van 63% heeft een nadelig effect op de detectiegrens.

Als de gederivatiseerde standaarden direct gemeten worden geven deze een hoog front tot ongeveer 17 minuten. Deze neemt af tot 5 minuten naarmate de standaarden voor langere tijd staan (circa 2 uur).

Om dit probleem op te lossen wordt Asp als stopreagens gebruikt. Als resultaat hiervan reduceert de tijd die een standaard moet blijven staan tot 40 minuten. Om dit nog te verbeteren wordt naar het effect van temperatuur gekeken. De derivatiseringsstap gebeurt in een waterbad van 40°C. Deze geeft als resultaat een hogere respons en de standaarden hoeven niet meer te blijven staan. Ze hebben een laag front direct na de injectie.

Het toevoegen van Asp heeft een positief effect op de verlaging van het front. Dit in combinatie met de temperatuur geeft het gewenste resultaat.

Er is ook gekeken naar het effect van tijd op de labeling. Het effect wordt getest bij 3, 5 en 10 minuten. Hoe langer FMOC-Cl de tijd krijgt, des te hoger de respons. Een hoge labelingstijd heeft een positief effect op de gevoeligheid van de bepaling. Nadeel hiervan is dat door de verdamping van de organische fase er neerslag kan ontstaan, waardoor het slechts mogelijk is de labelingstijd binnen een bepaalde marge te verhogen.

Er is een standaard calibratie gemaakt en geanalyseerd. Vervolgens is deze, na 24 uur bij kamertemperatuur te hebben laten staan, nogmaals gemeten. Er is weinig verschil tussen de gemeten resultaten. De FMOC-Cl derivaten zijn stabiel, dit in tegenstelling tot OPA derivaten.

Omdat K_2HPO_4 bij pH 9,3 weinig bufferingscapaciteit heeft worden experimenten gedaan om de invloed van verschillende buffers en verschillende pH waarden te bekijken.

De uitkomst van deze experimenten is dat K_2HPO_4 pH 9,3 uiteindelijk toch het beste resultaat geeft.

De standaarden worden in FCS gemaakt. Er is geen storende piek op de plek van S1P en $C_{17-1}P$. De standaard calibratielijne van 0 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 $\mu g/ml$ loopt lineair. De ijklijn van 0 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 $\mu g/ml$ is oplopend, maar niet lineair. Dit geeft aan dat de detecteerbaarheid bij circa 0,1 $\mu g/ml$ ligt.

Als oplossing hiervoor wordt geprobeerd om het eindvolume te verkleinen, namelijk met het verhogen van de concentraties van de buffer, FMOC-Cl en Asp. Dit geeft neerslag als resultaat.

Uitgaande van de vraagstelling en doelstelling betekent dit dat met een HPLC isocratisch systeem zonder kolom verwarming, gebruikmakend van acetonitril als organische deel van het eluens en door middel van SPE in plaats van vloeistof/vloeistof extractie, een acceptabele analysetijd is bereikt.

Nadeel is dat de bepaling een lagere gevoeligheid heeft dan de bestaande methode van de afdeling Farmacologie en Farmacotherapie. Dit was echter al te verwachten gezien de faciliteiten waarmee de experimenten zijn uitgevoerd.

Gezien het feit dat spingholipiden een ingewikkelde materie is om te onderzoeken, de beperkte tijd van de stage en de minder geschikte faciliteiten is het niet gelukt om een bepalingmethode te ontwikkelen voor de bepaling van de monsters. Er is echter een goede basis gelegd voor verder onderzoek. Het is zinvol een methode te ontwikkelen met FMOC-Cl derivatisering omdat de derivaten vrij stabiel zijn.

Suggesties om de gevoeligheid te verhogen, gebruikmakend van dezelfde faciliteiten als de uitgevoerde experimenten, zijn:

- gebruikmaken van een prekolom om de monsters te preconcentreren;
- monsters indampen in plaats van SPE (hogere recovery);
- verder onderzoek doen naar de mogelijkheid om de eindvolumes van de te bepalen monsters te verlagen (dit kan ook gedeeltelijk bereikt worden door de monsters in te dampen in plaats van SPE);
- in plaats van dioxaan als eluatiestof gebruikmaken van andere organische middelen, waardoor het mengen van deze middelen met hogere concentraties van FMOC-Cl en K_2HPO_4 (met als gevolg lagere volumes) geen neerslag oplevert;
- voor snellere voorbereiding kan worden geprobeerd om het derivatiseringsproces online uit te voeren.

Literatuurlijst

Paul Andréani and Markus H. Gräler. Comparative quantification of sphingolipids and analogs in biological samples by high-performance liquid chromatography after chloroform extraction, *Analytical Biochemistry* 358 (2006) 239-246.

Rodney Boyer (2006). Concepts in Biochemistry (third edition). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.

Jan J. Butter, Richard P. Koopmans and Martin C. Michel. A rapid and validated HPLC method to quantify sphingosine 1-phosphate in human plasma using solid-phase extraction followed by derivatization with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 824 (2005) 65-70.

Dr. R. van der Laan (2004). Exact communiceren, Richtlijnen voor de communicatie over natuurwetenschappelijk onderzoek. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten.

Martin Michel. Farmacologie in AMC maakt mooie doorstart. *Conceptuur* 42 (2005), 9-10.

Dihua Shangguan, Yingxin Zhao, Huiwan Han, Rui Zhao and Guoquan Liu. Derivatization and Fluorescence Detection of Amino Acids and Peptides with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate on the Surface of a Solid Adsorbent, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 2054-2057.

Varian HPLC Reference Guide HPLC columns.

Barry-Lee Waarts (2004). Cell Entry Mechanisms of Alphaviruses, *Receptor Interaction and Membrane Fusion in a Liposomal Model System*. Rijksuniversiteit Groningen, Groningen.

www.chromatographyonline.com, benaderd op 18 februari 2007.

Bijlage 1 Effect van tijd op labeling

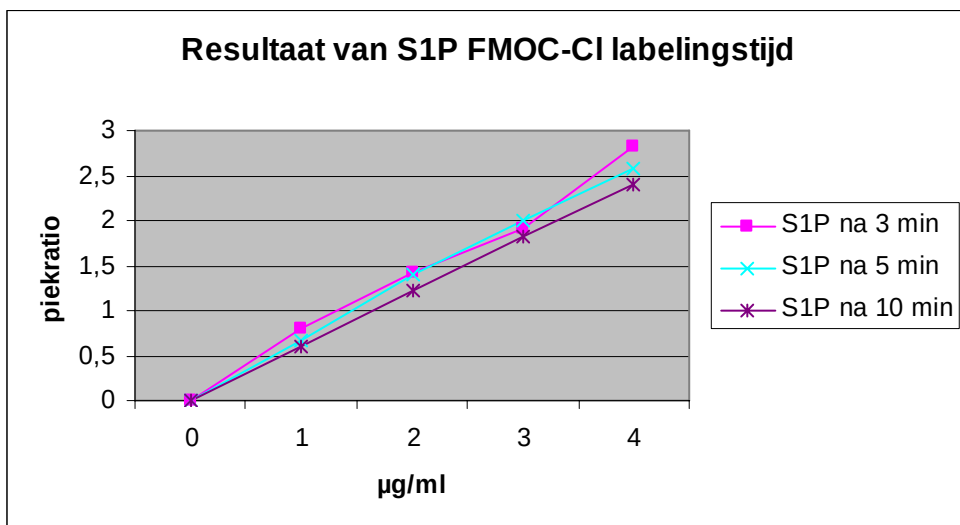


fig. a Resultaat van S1P FMOCCl met verschillende labelingstijd

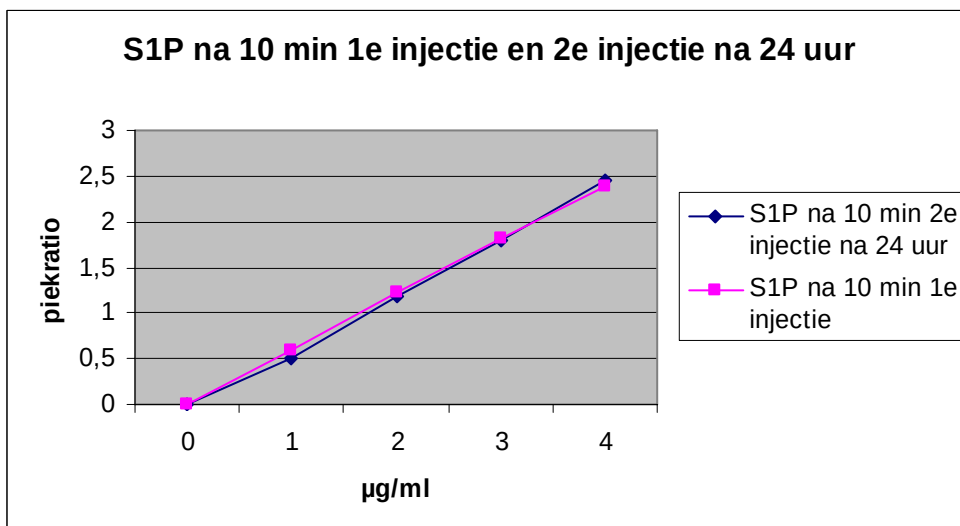
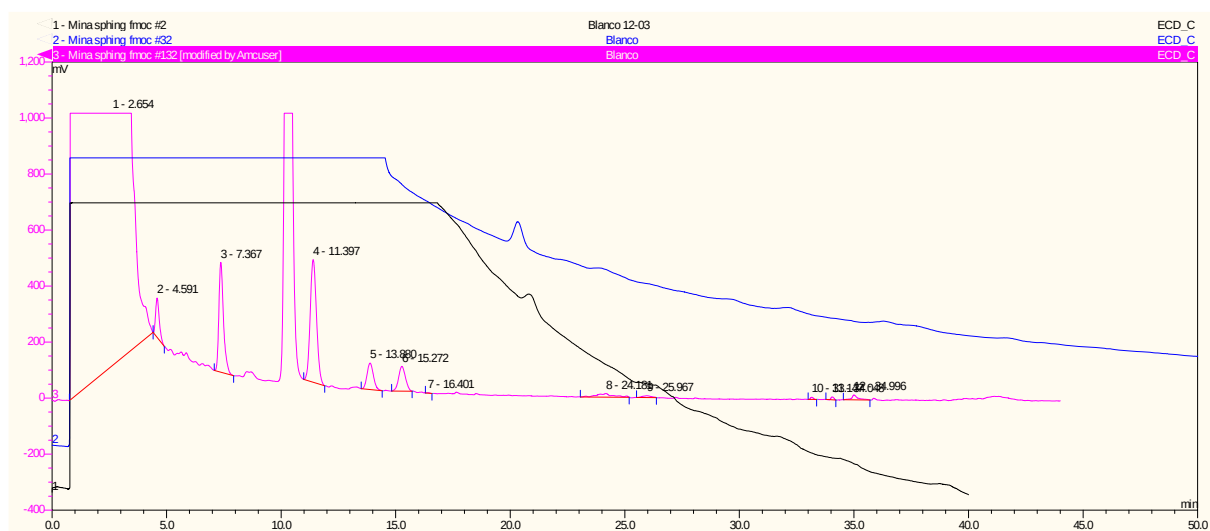


fig. b S1P na labelingstijd van 10 minuten 1^e injectie en 2^e injectie na 24 uur

Bijlage 2 Effect van temperatuur op labeling



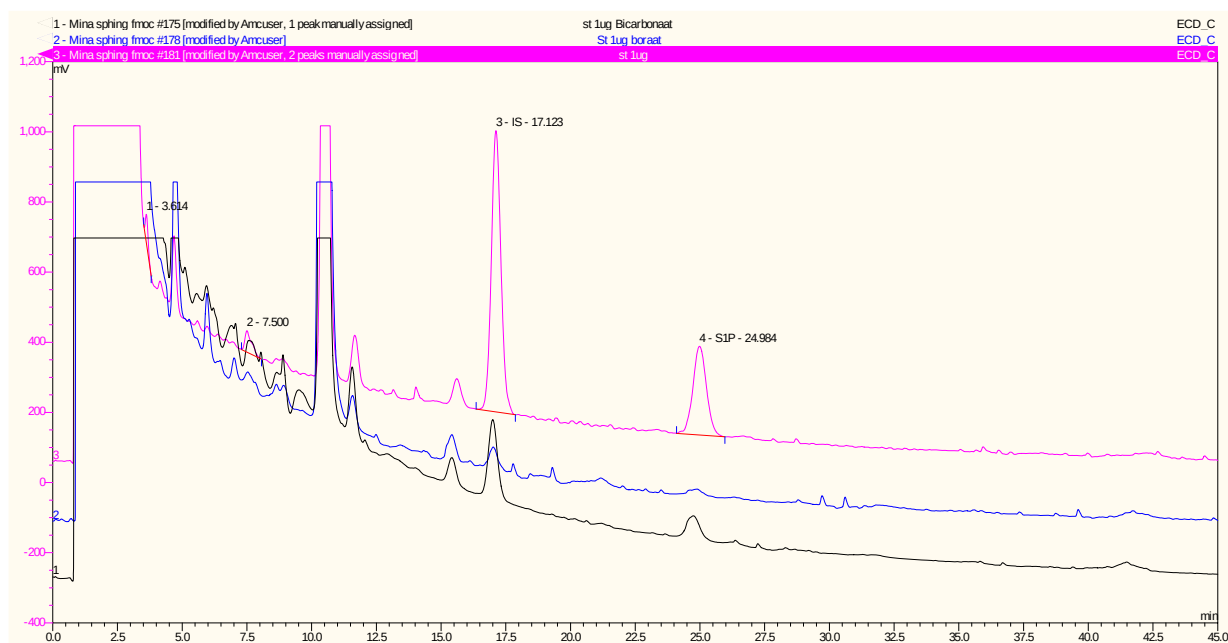
Legenda:

roze: FMOC-Cl met Asp bij 40°C

blauw: FMOC-Cl met Asp

zwart: FMOC-Cl zonder Asp

Bijlage 3 Vergelijking standaard 1 µg met verschillende buffers met pH 9,3



Legenda:

roze: K₂HPO₄ 140 mM pH 9,3
 blauw: Boraat 70 mM pH 9,3
 zwart: Bicarbonaat 25 mM pH 9,3

Bijlage 4 Calibratielijn S1P in 100 µl FCS

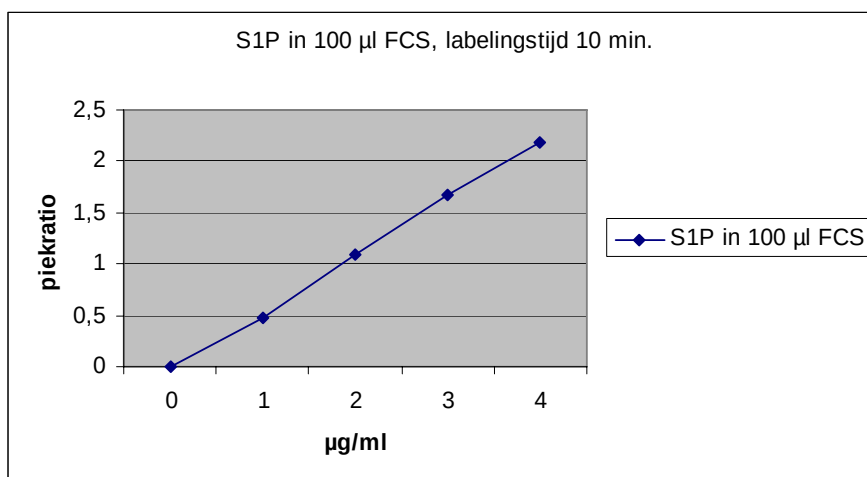


fig. a Standaard calibratie S1P in 100 µl FCS

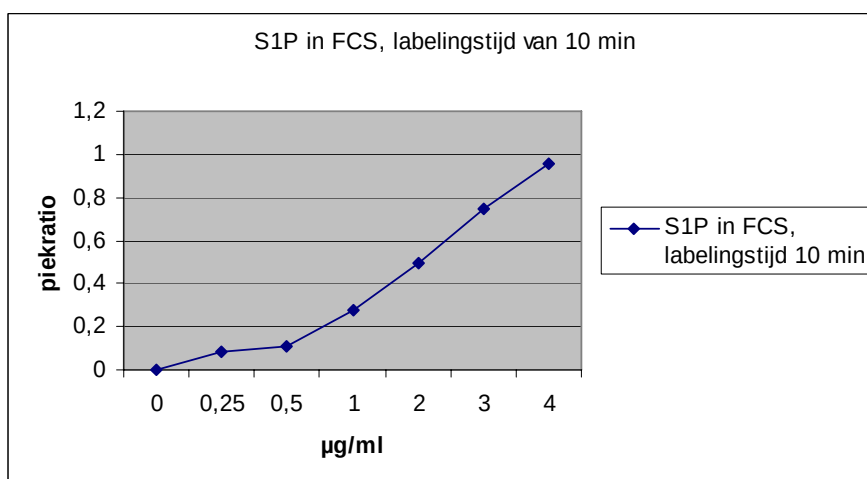


fig. b Standaard calibratie S1P in 100 µl FCS met lagere concentraties

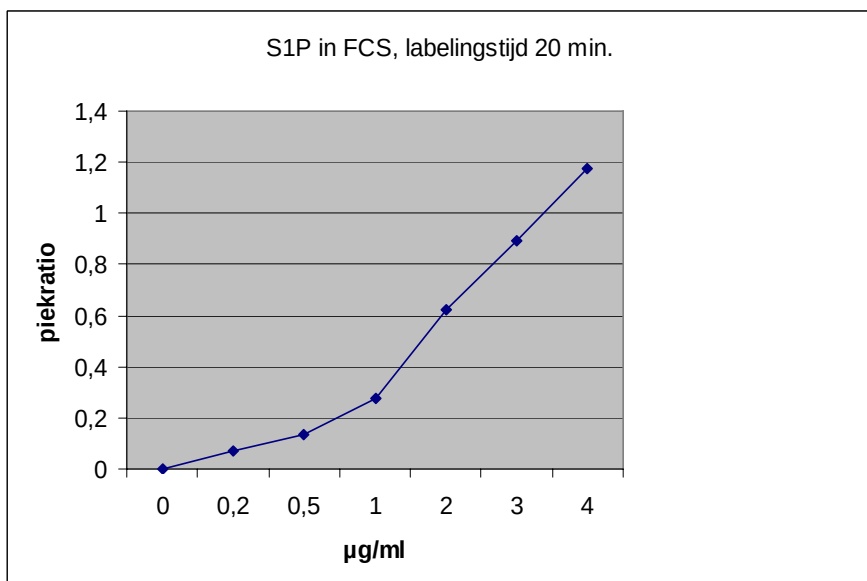
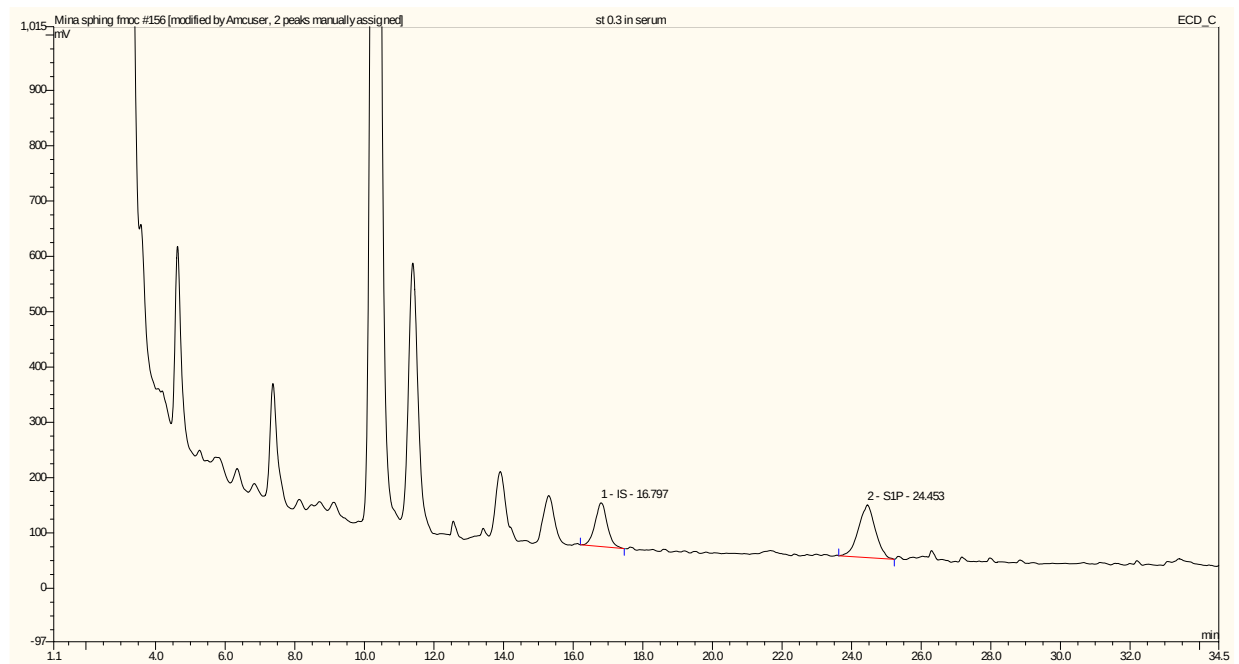


fig. c Standaard calibratie S1P in 100 µl FCS met lagere concentraties en een labelingstijd van 20 minuten en buffer 200 µl K_2HPO_4 280 mM, 200 µl FMOC-Cl (27,8 mM) en 100 µl Asp (116,6 mM)

Bijlage 5 Chromatogram S1P en C₁₇-1P (interne standaard) in FCS



Bijlage 6 Calibratielijn detecteerbaarheid

