

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Infotehnoloogia teaduskond

Biomeditsiinitehnika ja meditsiinifüüsika

Mart Adler 153577YADM

**PENTOSIDIINI ANALÜÜSIMEETODI
JUURUTAMINE TTÜ
TERVISETEHNOLOOGIATE INSTITUUDI
KROMATOGRAAFIALABORIS**

Magistritöö

Juhendajad: Risto Tanner

Vanemteadur

Ivo Fridolin

Professor

Tallinn 2017

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Mart Adler

22.05.2017

Annotatsioon

Magistritöö eesmärgiks on juurutada dialüsaadi pentosidiini analüüsimetoodika TTÜ Tervisetehnoloogiate kromatograafialaboris. Uurimistöö probleemiks on pentosidiini heitdialüsaadi analüüsimetoodika puudumine. Kirjandusmaterjal kirjeldas plasma pentosidiini analüüsimeetodit. Pentosidiini fluorestsentsi hindamine dialüsaadist on oluline, et saada täiendavat infot dialüüsiprotsessi käigus eralduvatest lipofiilsetest fluorofooridest.

Kromatograafialabori standardmeetodiga heitdialüsaadi analüüsimisel ei olnud dialüsaadist võimalik eristada vaba pentosidiini teistest segavatest fluorofooridest. Kirjandusest leitud ioonpaari pöördfaas-kromatograafia meetod aga andis piisava fluorofooride eralduse, mis võimaldas määrata vaba pentosidiini kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt.

Töös annan ülevaate pöördfaas- ja ioon-paarmeetodist, mida omavahel ka võrdlen. Valminud tööd on võimalik edaspidi kasutada TTÜ Tervisetehnoloogiate instituudi kromatograafialaboris kui ioonpaarmeetodi analüüsimetoodika juhendit.

Lõputöö on kirjutatud eesti keeles ning sisaldab teksti 34 lehekülge, 7 peatükki, 19 joonist, 5 tabelit.

Abstract

Pentosidine Analysis Method Implementation in Chromatography Laboratory of TUT Department of Health Technologies

The purpose of this thesis was to implement dialysate pentosidine analysis method in chromatography laboratory of TUT department of Health Technologies. Problem of this thesis was the lack of dialysate pentosidine analysis methods. Literature on all found sources described plasma pentosidine analysis methods.

Evaluation of free pentosidine was done by two separate chromatography methods: reverse phase (TR1) and ion-pair method (TR2). For both methods online fluorescence detection wavelengths were set to Ex330/Em373 nm, that corresponds to pentosidine fluorescence wavelengths. Mass spectra analysis was performed on MicrOTOF-QII MS/MS type quadrupole/TOF type mass spectrometry. Protein bound pentosidine separation was performed with Strata-XL column and separated protein fraction was hydrolysed with a method found in the literature.

Free pentosidine identification was performed by comparison of dialysate and standard solution peak retention times. TR1 reverse phase method did not achieve enough pentosidine separation from other fluorophores. Peak was melted into other peaks and identification and quantification was problematic if not impossible. Mass spectra analysis could not have been performed, because of small quantity of free pentosidine in dialysate. TR2 ion-pair method provided good fluorophore separation, dialysate and standard solution chromatogram comparison showed matching peaks with the same retention time. Solid phase extraction control experiment showed that Strata-XL does not retain all peptides. Based on that, it is not known how much protein bound pentosidine the column retained and how much went through. This method requires additional experiments.

The thesis is in Estonian and contains 34 pages of text, 7 chapters, 19 figures, 5 tables.

Lühendite ja mõistete sõnastik

AcN	Atsetonitriil
AcOH	Äädikhape
AGE	Glükatsiooni lõpp-produktid
APCI	Atmosfäärirõhul keemiline ionisatsioon
ELISA	Immunoensüümmeetod
Em	Emissioon
ESI	Elektropihusti ionisatsioon
Ex	Ergastus
HD	Hemodialüüs
HFBA	Heptafluorovõihape
HPLC	Kõrgsurvevedelikkromatograafia
LC/MS	Vedelikkromatograafia massispektromeetria
m/z	Massi-laengu suhe
MeOH	Metanool
NH ₄ form	Ammooniumformiaat
ODS	Oktadetsüülsilikageel
ROS	Reaktiivsed hapnikuühendid
SPE	Tahke faasi ekstraktatsioon
TFA	Trifluoroädikhape
TOF	Lennuaja (massispektromeetria)
TR	Töörežiim
UV	Ultraviolet

Sisukord

1 Sissejuhatus	8
2 Glükatsiooni lõpp-produktide ülevaade.....	9
2.1 Maillardi reaktsioon.....	10
2.2 Pentosidiin	12
2.3 Pentosidiini analüüsivõimalused	13
3 Kõrgsurvedelikkromatograafia (HPLC)	14
3.1 HPLC tüübid.....	14
3.1.1 Normaalfaasi ja pöördfaasi HPLC.....	14
3.1.2 Suuruseksklusioon-HPLC	15
3.1.3 Ioonvahetus-HPLC	16
3.1.4 Ioonpaarkromatograafia	16
3.2 HPLC süsteemiosad.....	17
3.2.1 Eluent ja selle eeltötlus	17
3.2.2 Kõrgsurvepump	18
3.2.3 Proovidosaatore	19
3.2.4 Kolonn	20
3.2.5 Detektorid	20
3.2.6 Integraator ja arvuti	23
3.3 Kõrgsurvedelikkromatograafia massispektromeetria (LC/MS).....	23

3.3.1 LC/MS-liides ja ionisatsioonitüübid.....	24
3.3.2 Massianalüsaatorid	26
3.3.3 Detektor ja massispekter.....	27
4 Materjalid ja meetodid.....	28
4.1 HPLC ja MS uuring.....	29
4.2 Tahke faasi ekstraktsioon (SPE) ja hüdrolüüs.....	31
5 Tulemused ja arutelu	32
5.1 Töörežiim 1.....	32
5.2 Töörežiim 2.....	34
5.3 Tahke faasi ekstraktsioon	38
6 Järeldused	41
7 Kokkuvõte	42
Kasutatud kirjandus	43
Lisa 1 – Standardlahuse lahjenduste tabel.....	48
Lisa 2 – Kromatograafid.....	49
Lisa 3 – SPE kolonn	51
Lisa 4 – TR1 kalibratsioonikõvera mõõtetulemuste tabel.....	52
Lisa 5 – P1 dialüsaadi TR1 ja TR2 võrdlus.....	53
Lisa 6 – Dialüsaatide kromatograafilise eralduse võrdlused.....	54
Lisa 7 – Patsientide 10. ja 240. minuti dialüsaatide pentosidiini tulemuste tabel.....	56
Lisa 8 – TR2 kalibratsioonikõvera mõõtetulemuste tabel.....	57
Lisa 9 – Korratavuse algandmed	58

1 Sissejuhatus

Hemodialüüs (HD) on kallis ja mitmeid tunde kestev protsess, mille tõhusust saab jälgida ureemiliste toksiinide eritumise määramisega. Ureemilisi toksine määratakse vereseerumist enne ja pärast HD-d. See on aeganõudev protsess, kuna hõlmab vere võtmist, transporti laborisse ja analüüsi tegemist. See protsess on ka kulukas kemikaalide ja ühekordse plastiku kasutamise ning tööjõu tõttu.

HD reaalajaliseks jälgimiseks on olemas meetod, mille käigus kasutatakse HD-aparaadist väljuva dialüsaadi UV-sumbuvust (ingl *Ultraviolet*). Kuid see meetod ei ole täiuslik, kuna iseloomustab vaid osa reaalajas eralduvaid ureemilisi toksine, nagu vees suhteliselt hästi lahustuvad ja kergesti eralduvad ureemilised toksiinid. Teine osa – lipofiilsemad ained, mis on seondunud vere albumiini pinnaga – eralduvad aeglasemalt, nende seas on ka fluorestseeruvaid aineid, mille eraldamist patsiendi verest saab jälgida fluorestsentsi abil [1]. Üks oluline rühm fluorestseeruvaid aineid veres – *Advanced Glycation End-products* ehk AGE-d – on aga kovalentselt seotud valkudega ja need eralduvad dialüüsil ainult niivõrd, kui võrd dialüüsivedelik sisaldab väikseid dialüüsिमembraani läbivaid valke või valkude laguprodukte. Selle rühma ainete üheks tunnustatud markerühendiks on pentosidiin.

Magistritöö eesmärk on AGE-de rühma kuuluva pentosidiini analüüsimeetodi juurutamine TTÜ Tervisetehnoloogiate instituudi kromatograafialaboris. Vastavalt töö teemale on püstitatud järgnevad ülesanded:

- 1) hinnata laboris olemasoleva heitdialüsaadi analüüsimeetodi sobivust vaba pentosidiini määramiseks;
- 2) valida kirjandusest sobiv meetodika ja hinnata selle sobivust vaba pentosidiini määramiseks dialüsaadis;
- 3) eraldada dialüsaadist väikeste valkude ja peptiidide fraktsioon seotud pentosidiini analüüsiks hüdrolüsaadis.

2 Glükatsiooni lõpp-produktide ülevaade

AGE-d ehk glükatsiooni lõpp-produktid on heterogeenne aineühendite grupp, mis tekib mitte-ensümaatilisel valkude, lipiidide või aminohapete glükatsiooni tulemusel [2]. Glükatsioon on keerulist ja mitut järjestikust oksüdatiivset ja mitteoksüdatiivset molekulaarset ümberkorraldust sisaldav reaktsioonide ahel mitmete erinevate lõpp-produktidega [3]. Glükatsiooni tuleb eristada glükosülatsioonist, mis on ensümaatiline glükoosi liitmise reaktsioon teiste ainetega [4].

Glükeerumist kirjeldas esmaselt Louis-Camille Maillard 1912. aastal, selle seost toidu pruunistumisega küpsetamisel kirjeldas John E. Hodge 50 aastat hiljem [4]. Esimese glükeeritud valgu avastamisest saati on avastatud palju teisi AGE-sid [4]. AGE-sid ei saa kliinilises praktikas lihtsalt mõõta, sest neid on raske leida keerulisest bioloogilisest materjalist nagu veri, lisaks nõuab tähtsamate kudede ühendunud ühendite hindamine biopsiat, mis on invasiivne meetod [5]. Kuid mõnele AGE-le on iseloomulik autofluorestsentsi omadus, mis lihtsustab selle tuvastamist *in situ* või *in vivo* [4].

Üks suuremaid AGE-de tekkepõhjusi on diabeet [6]. Kõrgenenud glükoositase võib esile kutsuda glükatsiooni erinevates funktsionaalsetes ja struktuursetes valkudes nagu plasmavalk ja kollageen [6]. Hüperglükeemia soodustab AGE-de teket, kuid ei ole nende moodustumise põhjus [5]. AGE-de teke suureneb ka kõrgemas vanuses, oksüdatiivse stressi tagajärjel või seoses põletikuga ning need hakkavad kuhjuma nõrgenenud maksa- või neerufunktsiooniga organismis [2]. Eksogeensed faktorid nagu söömisharjumused ja suitsetamine mõjutavad AGE-de moodustumise kiirust [4].

AGE-de kuhjumist organismis on seostatud nii vähenenud neerufunktsiooni kui ka suurenenud organismisese AGE-de moodustumisega [2]. AGE-de kuhjumisel organismis mängib tähtsat rolli ka toitumine, olles üks AGE-de allikaid [2]. Toidust saadavad AGE-d tõstavad neerupuudulikkusega patsientidel seerumi AGE-taset [7]. Uribarri *et al.* uuring näitab ka, et toidust saadavat AGE-de hulka on võimalik vähendada ilma, et kompromiteeritaks vajalike toitainete kättesaadavust, kuna ei ole

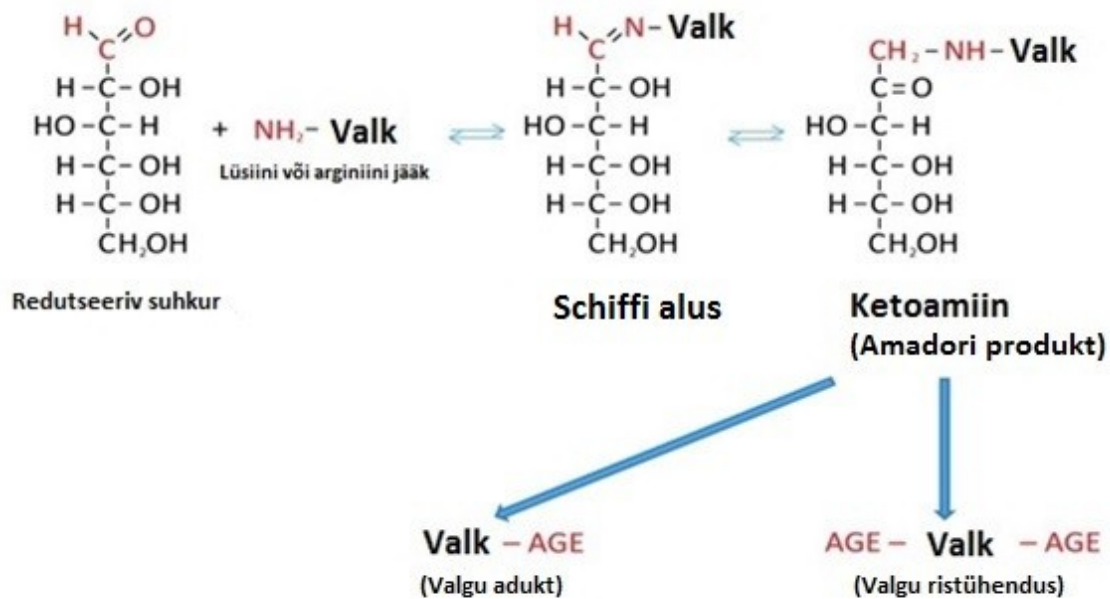
leitnud korrelatsiooni seerumi AGE-taseme ja valgu, rasva ega süsivesikute toidunormi vahel [7].

Olenemata oma suurest struktuursest heterogeensusest on kõik AGE-d seondunud kas valgu peptiidahela külge (adukt) või valgusiseste peptiidahelate vahele (ristühendus) [2]. Plasmavalkude nagu albumiini, fibrinogeeni ja globuliinide mitte-ensümaatiline muutus võib tekitada erinevaid kahjulikke efekte. Nende hulka kuuluvad ravimite seondumise muutus plasmas, trombotsüütide aktivatsioon, hapniku vabaradikaalide teke, häiritud fibrinolüüs ja immuunsüsteemi regulatsioon [6]. Valkude glükatsioon häirib nende normaalset funktsiooni: segades molekulaarset kohandamist, muutes ensümaatilist aktiivsust, vähendades nende tundlikkust lõhustumisele ja retseptorite äratundmisvõimet [6]. AGE kuhjumise määr ja sellest tulenev kahju on rohkem esindatud kudedes, millel on madalam uuenemiskiirus [8].

AGE organismivälise saamise ja organismisese tekke vastu on kroonilise neerupuudulikkuse korral mitmeid strateegiaid. Organismivälise AGE allika vähendamiseks aitab rohke AGE-de sisaldusega toidu vältimine ja kõrge suhkrusisaldusega toitude söömise vähendamine. AGE organismisese moodustumise vähendamiseks saab kasutada probiootikume või antioksidante (vitamiin E). Juba olemasolevate AGE-de ristühenduste lõhustamiseks saab kasutada ravimit *Alagebrium*. Kõige parem AGE kuhjumise vastane ravi kroonilise neerupuudulikkuse korral on siiski uue neeru siirdamine. [9]

2.1 Maillard'i reaktsioon

AGE-de teke on keeruline molekulaarne protsess, mis sisaldab endas lihtsaid ja keerukamaid mitmeastmelisi reaktsioone [4], mis toimuvad nädalate või kuude jooksul [10]. Maillard'i reaktsioon on mitte-ensümaatiline reaktsioon valguvaba aminorühma ja redutseeriva suhkru karbonüülrühma vahel (vaata Joonis 1) [6]. Reaktsioon võib aset leida nii kudedes kui ka hoiustatud glükoosilahustes, nagu näiteks lahustes, mida kasutatakse peritoneaaldialüüsi läbiviimiseks [5]. Maillard'i reaktsiooni algstaadiumis sõltub glükatsioon rohkem algainete kontsentratsioonist kui hilises faasis, mis tähendab, et diabeet soodustab reaktsiooni [10].



Joonis 1. Maillardi reaktsiooni skeem, kohandatud allika [4] põhjal.

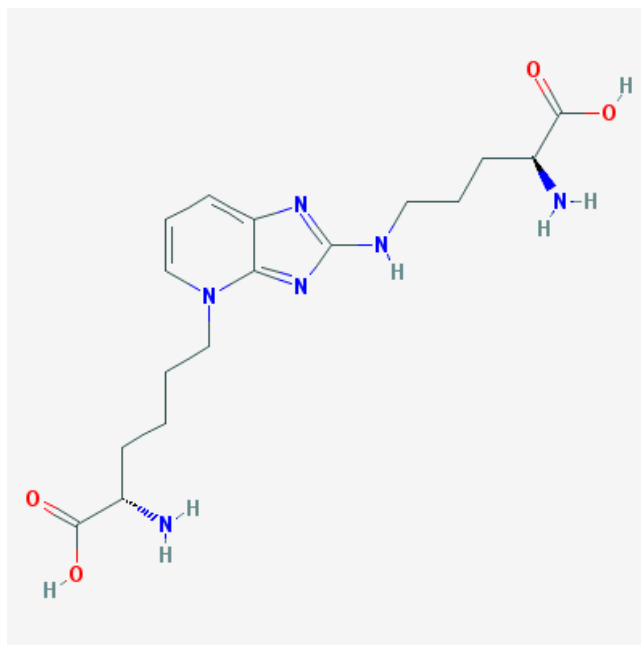
Maillardi reaktsiooni saab jaotada kolmeks alagrupiks: varajane, vahepealne ja hiline staadium [6]. Reaktsiooni kestus on igas staadiumis aeglane, mille tulemuseks on valgu struktuuri muutus ja põhjalikud muutused molekuli biokeemilistes omadustes [3]. Varajases staadiumis reageerib glükoos (või mõni teine redutseeriv suhkur nagu fruktoos, pentoos, galaktoos, mannoos või ksüloos) bioloogilise amiini vaba aminorühmaga ning moodustab ebastabiilse ühendi, mida nimetatakse Schiffi aluseks, mis omakorda läbib ümberkorraldusi ja moodustab stabiilsema Amadori' produkti [6]. Vahepeelses staadiumis laguneb Amadori produkt dehüdratatsiooni, oksüdatsiooni ja teiste keemiliste reaktsioonide mõjul mitmesugusteks reaktiivseteks dikarbonüülühenditeks nagu glüoksaal, metüülglüoksaal ja deoksüglükosoon [6]. Hilises glükatsioonistaadiumis tekivad dikarbonüülühenditest oksüdatsiooni, dehüdratatsiooni ja tsükliliste reaktsioonide kaudu pöördumatud ühendid, mida nimetatakse AGE-deks [6]. Hapnik, reaktiivsed hapnikuühendid (ROS – *reactive oxygen species*) ja redoksaktiivsed siirdemetallid kiirendavad AGE-de tekkimist [4] ning redutseerivad ühendid nagu askorbiinhape pärsivad seda [10].

AGE-d on kollakaspruunid, fluorestseeruvad ja lahustumatud aduktid, mis akumulerevad pikaealistes valkudes, häirides sellega nende füsioloogilisi funktsioone [6]. Ureemilistel patsientidel, kelle organismis kuhjub suures kontsentratsioonis AGE-sid, võivad need mõjutada lühema elueaga ühendeid nagu rasvühendid ja

nukleiinhapped [10]. Lisaks võivad AGE-d olla valkudevahelised ristlülid, tekitades proteinaasiresistentseid agregate [6].

2.2 Pentosidiin

Pentosidiini eraldasid ja iseloomustasid esmakordselt Sell ja Monnier 1989. aastal [4, 11]. See koosneb arginiin- ja lüsiinjääkidest, mis on ristseotud pentoosiga [4]. Pentosidiin on fluorestseeruv glükoksüdatsiooni (glükatsiooni reaktsioon oksüdatsiooni kaudu) produkt, mis moodustab valgu peptiidahelate vahelisi ristühendusi [4]. Pentosidiin on süsivesikute baasil glükeerunud ja oksüdeerunud AGE [12]. Pentosidiinil endal ei ole erilist bioloogilist aktiivsust, kuid ta korreleerub tugevalt karbonüülühendite tasemega, mis on AGE moodustumise eelained, mistõttu peetakse seda usaldusväärseks AGE markeriks [13]. Plasmavalguga seotud pentosidiin moodustab rohkem kui 95% kogu pentosidiinist, mis on peaaegu erandlikult seotud albumiiniga [12]. Pentosidiini vabavorm, mis on näidatud Joonis 2, moodustab 3–4% kogu pentosidiinist normaalse neerufunktsiooni korral [12], kuid hakkab kuhjuma langenud neerufunktsiooni korral [14]. Vaba pentosidiini molekulaarkaal on 378,2 g/mol ja ta on hüdroolüüsile resistentne [11].



Joonis 2. Pentosidiini keemiline struktuur. [13]

Sell ja Monnier tegid kindlaks, et pentosidiini UV-sumbuvasse piiki on 320 nm [11]. Neelduvus oleneb pH-tasemest, mis on maksimaalne pH 12 ja minimaalne pH 2 juures [11]. Pentosidiin on fluorestseeruv, olles kõige intensiivsem ergastuse (*Ex*) lainepikkusel 330 nm ja emissiooni (*Em*) lainepikkusel 373 nm [15]. Ka fluorestsentsi intensiivsus on pH-st sõltuv, olles maksimaalne pH 2 ja minimaalne pH 9 juures [11].

2.3 Pentosidiini analüüsivõimalused

Kirjanduse põhjal on plasma pentosidiini peamine analüüsitehnika kõrgsurvevedelik-kromatograafia [11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Pentosidiini eralduse saavutamiseks kasutatakse pöördfaas C18 kolonni [11, 12, 14, 15, 16, 17, 18]. See meetodika ulatub tagasi aastasse 1989, kui Sell ja Monnier kasutasid seda pentosidiini kindlakstegemiseks [11]. Pentosidiini analüüsiks kasutatakse ka HypercarbTM poorset grafiitsüsinikkolonni, mis seob polaarseid ühendeid [19, 20]. Antud meetodite eluentideks on vesi ja atsetonitriil, mille vahetuse muudetakse uuringu käigus lineaarse gradientmeetodiga [11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20], kuhu on lisatud ionpaarreagenti, milleks võib olla kas heptafluorovõihape (HFBA) [11, 12, 15, 16, 18] või trifluoroäädikhape (TFA) [15, 19, 20].

Immuokeemilise ELISA meetodi sobivust pentosidiini leidmiseks on TTÜ Tervisetehnoloogia instituudi kromatograafialaboris juba uurinud Mari-Liis Kasemets oma bakalaureusetöös „Pentosidiin-spetsiifilise antikehade testi sobivus pentosidiini analüüsiks neeruhaigete hemodialüsaadis“ aastal 2014 [21]. Kuigi plasma pentosidiini-spetsiifiline ELISA meetod annab võrreldavaid tulemusi HPLC-analüüsiga, eelistatakse viimast kogu pentosidiini (seotud ja vabavorm) mõõtmiseks, sest ELISA meetodi antikehad ei pruugi ulatuda valgusisese pentosidiinini [12]. Lisaks on ELISA meetodi korral vajalik hüdrolyüsimine ja valgu ensümaatilise lagundamine, mis võib antikeha seondumiskohta muuta [12].

Vastavalt TTÜ Tervisetehnoloogia instituudi kromatograafialabori analüütilistele võimalustele kasutati antud töös pentosidiini uurimiseks kõrgsurvevedelik-kromatograafiat koos fluorestsentsmonitori ja massispektromeetriga.

3 Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC)

Kromatograafia on ainesegude eristamise tehnika, mis lahutab ainesegu komponentide molekulaarse struktuuri ja molekulaarse koostise alusel. Kromatograafia hõlmab statsionaarset (kolonitüüpide) ja mobiilset faasi (eluent). Mobiilne faas voolab läbi statsionaarse faasi, kandes uuritavat ainesegu endaga kaasa. Proovi aineosad, millel on suurem vastastikmõju statsionaarse faasiga, liiguvad kolonnist läbi aeglasemalt kui väiksema vastastikmõjuga aineosad. See läbimiskiiruse erinevus põhjustab erinevate aineosakeste eraldumist üksteisest. Tavalise vedelikkromatograafia puhul liigub eluent gravitatsiooni mõjul läbi kolonni. Vedelikkromatograafia edasiarendus on HPLC, kus statsionaarse faasi eripinna suurendamiseks kasutatakse väga peeneteralist kolonitüüpide, mistõttu eluent enam niisama kolonni ei läbi ja on vajalik kõrgsurvepumba kasutus. [22]

3.1 HPLC tüübid

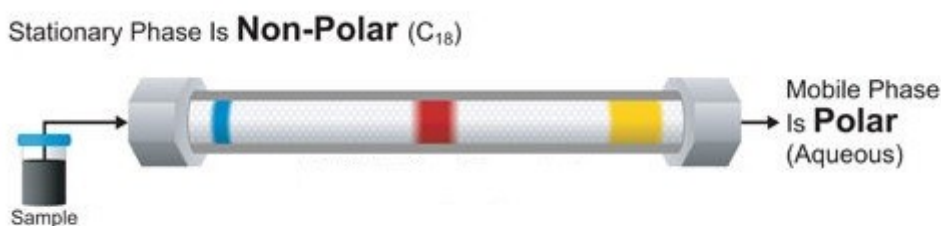
Peamiselt kasutatakse HPLC abil eralduse tekitamiseks kolme keemiliste ühendite omadust. Need on polaarsus, molekulaarne suurus ja elektriline laeng. Molekulide polaarsus ja mittepolaarsus on tingitud molekuli funktsionaalsest rühmast, mis omakorda tekib molekulide siseste aatomite kindlast järjestusest. Sarnase kromatograafilise polaarsusega molekulid tõmbuvad ja erineva polaarsusega molekulidel on kas väiksem vastastikmõju või tõukuvad üksteisest. Polaarsuse hindamiseks kasutatakse kahte HPLC-meetodit, milleks on normaalfaas- ja pöördfaaskromatograafia. [23]

3.1.1 Normaalfaasi ja pöördfaasi HPLC

Normaalfaasi HPLC-meetod eraldab uuritava proovi polaarsuse põhjal. Selleks kasutatakse polaarset statsionaarfaasi ja mittepolaarset mobiilset faasi. Tavaliselt kasutatakse statsionaarseks faasiks silikageeli ja mobiilseks faasiks heksaani, metüleenkloriidi, kloroformi, dietüületrit või nende segusid. Tänu sellele peetakse

polaarsed proovid kolonnitäite polaarsel pinnal kauem kinni kui vähem polaarsed aineosakesed. [22]

Pöördfaas-HPLC termin kirjeldab kromatograafia meetodit, mis on vastupidine normaalfaasi kromatograafiale [23]. Nimelt on pöördfaas-HPLC puhul statsionaarne faas mittepolaarne (hüdrofoobne), ning mobiilne faas on polaarne vedelik nagu vee ja metanooli segu või atsetonitriil [22]. Selle tööpõhimõtte seisneb hüdrofoobsetel vastastikmõjudel, ehk mida mittepolaarsem materjal on, seda kauem seda kolonnis kinni peetakse, nagu näidatud Joonis 3 [22].



Joonis 3. Näide proovi eraldumisest pöördfaaskolonnis. Polaarne kollane värv liigub läbi kolonni kiiremini kui mittepolaarne sinine värv. Statsionaarne faas on mittepolaarne (C18), mobiilne faas on polaarne. [23]

Eraldus oleneb mobiilses faasis lahustunud molekuli hüdrofoobsest seondumisest statsionaarse faasi pinnal oleva liikumatu ligandiga [24]. Proovi segu lastakse alguses läbi kolonni vett sisaldava puhvriga ja proov pestakse kolonnist välja mobiilsesse faasi lisatud orgaanilise lahustiga [24]. Elueerimist saab läbi viia isokraatses tingimuses, mis tähendab, et orgaanilise lahusti kontsentratsioon on uuringu jooksul konstantne [24]. Gradientväljapesu puhul tõuseb aja jooksul orgaanilise lahuse kontsentratsioon [24]. Tänu sellele elueeruvad proovi aineosad tõusva molekulaarse hüdrofoobsuse järjekorras [24]. Pöördfaaskromatograafia on tänapäeval laialdasemalt levinud kui normaalfaaskromatograafia, sest tal on parem korratavus ja laiem kasutusvaldkond [23]. Kõige populaarsem kolonn pöördfaaskromatograafia korral on silikageeli täidis, mille külge on ühendatud C18-ahel, mida nimetatakse ka ODS-kolonniks (ingl *Octadecyl-silica*) [23].

3.1.2 Suuruseksklusioon-HPLC

Suuruseksklusioon-HPLC kolonn on täidetud materjaliga, millel on kindel pooride läbimõõt ja aineosakesed eralduvad vastavalt oma molekulaarsele suurusele [22].

Statsionaarse faasi poorisuuruse jaotus valitakse vastavalt uuritava analüüdi molekuli suurusele, et see läbiks antud poore [23]. Suuremad molekulid läbivad kolonni kiiremalt, sest liiguvad poorsete graanulite vahelt läbi [22]. Väiksemad molekulid läbivad kolonni poore ja tulevad kolonnist hiljem välja [22]. Mobiilsel faasil on kaks ülesannet: lahustada uuritavat analüüti ja vältida polaarsusest või laengust tekkivaid vastastikmõjusid analüüdi ja statsionaarse faasi vahel [23].

3.1.3 Ioonvahetus-HPLC

Ioonvahetus-HPLC statsionaarne faas on proovi ionidega vastupidise laenguga [22]. Tüüpilised biomolekulide laetud rühmad on $-\text{NH}_3^+$, $=\text{NH}_2^+$, $\geq\text{NH}^+$, $-\text{COO}^-$, PO_4^- , SO_3^{2-} [25]. Erinevalt polaarsusest, ioonvahetus-HPLC korral vastandioonid tõmbuvad ja sama laenguga ionid tõukuvad [23]. Seda meetodit kasutatakse ainult iooniliste või ioniseeritavate proovide puhul [22]. Statsionaarfaasi pind on funktsioonilt happeline või aluseline, olenevalt uuritavast proovist [23]. Katioon-ioonvahetit kasutatakse positiivselt laetud aineosakeste tõmbamiseks ja hoidmiseks kolonni negatiivsel pinnal [23]. Vastupidiselt, anioon-ioonvaheti tõmbab ja hoiab negatiivselt laetud aineosakesi kolonni positiivsel pinnal [23]. Mida tugevam on proovi laeng, seda tugevamalt tõmbub ta statsionaarfaasi pinnale ja seda kauem läbib kolonni [22]. Mitteühendunud biomolekulid, nagu neutraalsed molekulid ja statsionaarse faasiga sama laenguga molekulid, tulevad koheselt kolonnist läbi ja nende eraldust ei teki [25]. Mobiilne faas on vedelik, mille puhul kasutatakse pH-d ja ioonset jõudu, et mõjutada proovi kolonni läbimisaega [22].

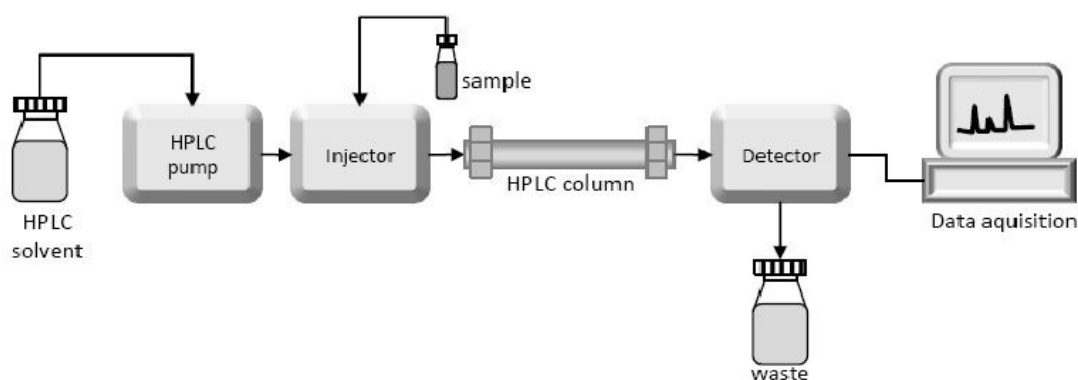
3.1.4 Ioonpaarkromatograafia

Ioonpaarkromatograafia on alternatiiv ioonvahetuskromatograafiale [26]. Ioonpaari reagent ehk vastandioon on vastandlaenguga uuritavale ainele ja seda lisatakse mobiilsesse faasi [27]. Ioonpaari moodustumisele on kaks teooriat [27]. Esimese teooria järgi vastandioon ja uuritav proov moodustavad ioonpaari. Tekkinud ioonpaar on pikk, mittepolaarne pseudomolekul, mille laeng on ühenduskohast neutraliseeritud [27]. Seejärel eraldub pseudomolekul statsionaarsel faasil nagu tal poleks laengut [27]. Teise ioonpaarteooria kohaselt ühendub vastandioon kõigepealt statsionaarse faasiga, olles ise vastastikmõjus uuritava analüüdiga [27]. Ioonpaarkromatograafia eelisteks on, et saab kasutada pöördfaaskromatograafia kolonni, tekitada eraldust happeliste, aluseliste ja

neutraalsete ainete segust ning mõjutada selektiivsust vastandiooni valikuga [26]. Kui ioonpaarreagente kasutatakse gradientmeetodil, siis peaks lisama neid kõikidesse eluentidesse sama palju, et vältida baasjoone triivi analüüsi ajal [27]. Ideaalis peaks ioonpaarreagent olema uuritava aine lainepikkustel optiliselt mitteaktiivne [27].

3.2 HPLC süsteemiosad

HPLC-masin koosneb pumbast, proovidosaatorist, kolonnist, detektorist, integraatorist või andmete töötlejast ja kuvamissüsteemist ning see süsteem on näidatud Joonis 4 [22]. Kogu süsteem on omavahel ühendatud kõrgsurvet kannatavate torude ja kinnitustega, mille kaudu juhitakse mobiilne faas, proov ja eraldatud ühendid edasi süsteemi osade vahel [28]. Kuna tulemust andev töö toimub kolonnis, nimetatakse seda süsteemi südameks [27].



Joonis 4. Kõrgsurvevedelikkromatograafia skeem koosneb: HPLC eluent, pump, proovidosator, kolonn, detektor ja andmete talletamise süsteem [22].

3.2.1 Eluent ja selle eeltöötlus

Eluendi nõu sisaldab mobiilset faasi ja see on reeglina klaasist [22]. Eluenti nimetatakse mobiilseks faasiks, sest ta liigub [28]. Mobiilsel faasil ei tohiks olla omadusi, mida kasutatakse detekteerimiseks [26]. Sellisel juhul võib esineda tahtmatuid baasjooneefekte ja lisapiike kromatogrammil [26]. Soovituslikud eluendid on märgistusega „HPLC grade“ või sarnase kvaliteediga [26]. Kui eluenti ei kasutata tema originaalpudelist, siis on vajalik selle filtreerimine 0,5 või 0,8 μm filtriga enne kasutust [26]. Alati on oht, et eluendis võib esineda tahkeid osakesi, mis võivad kahjustada pumpa, klappe või tekitada ummistust kapillaarides või kolonnis [26].

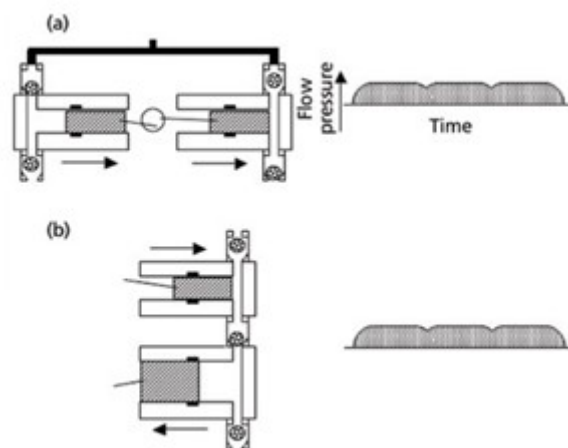
Eluentidest, mida kasutatakse HPLC jaoks, tuleks eemaldada gaas, eriti polaarsete eluentide korral, sest nendes lahustub hapnik hästi [26]. Ilma gaasi eemaldamiseta võivad ilmnedä järgmised probleemid: õhumullid detektoris, kus vastusurve on väiksem, suur baasjoone müra, väiksemad piigid ja lisapiigid kromatogrammil, kuna lahustunud hapnik neelab lühikese lainepikkusega UV-kiirgust ja vähendab fluorestsentsi [26]. Kõige tavalisem gaasieemaldi on tänapäeval vaakumkambriga ümbritsetud gaasi läbilaskev toru või membraan, mida mööda mobiilne faas liigub [29]. Kui kambris genereeritakse vaakum, siis lahustunud gaasid läbivad toru või membraani poore, kuid mobiilne faas, mis on vedelik, jääb torusse [29].

Kahe või enama eluendi korral on vajalik nende segunemine enne kolonni jõudmist. Selleks on kahte eri tüüpi miksereid – madalrõhu- ja kõrgrõhumikser. Madalrõhumikseri korral toimub segunemine enne pumpa, elektrooniliselt juhitava klapi abil, mis laseb eluenti süsteemi vastavalt nõudlusele. Kõrgrõhumikseri puhul toimub segunemine pärast pumpa ja iga eluendi jaoks on vajalik eraldi pump. [30]

3.2.2 Kõrgsurvepump

Pumba eesmärk on lükata eluenti läbi kolonni ja detektori [22]. Pump peab suutma saavutada ja hoida kindlat mobiilse faasi voolukiirust, mida tüüpiliselt mõõdetakse ühikuga ml/min [28]. Lisaks ei tohi voolukiirus oleneda kolonni vastusurvest [26]. Pumba töösurve oleneb kolonni diameetrist, statsionaarse faasi sorbendi tera suurusest, voolukiirusest ja mobiilse faasi koostisest (viskoossusest) [22]. Mobiilse faasi liikumine ei tohi olla pulsiline, eriti murdumisnäitaja-, juhtivus- ja elektrokeemilise detektori korral [26]. Pump peab tagama võimalikult ühtlase pulsatsioonita voolu [26].

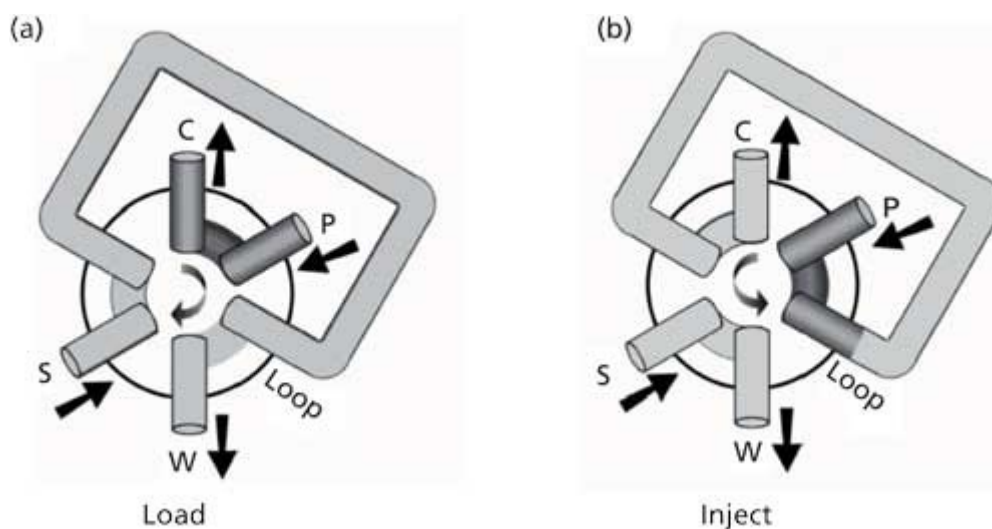
HPLC jaoks saab kasutada eri tüüpi pumпасid nagu pneumaatiline, membraankolb- ja pritsepump, kuid kõige efektiivsem ja vastupidavam on kolbpump. Ühe kolviga pump tekitab tugevat pulsatsiooni ja sellepärast kasutatakse enamasti kahe kolviga pumпасid, mis on kujutatud Joonis 5. Kaksikkolbpumba tööpõhimõte on, et kolvid liiguvad eri faasides: kui üks täitub, siis pumpab teine samal ajal eluenti. Sel viisil pumbatakse eluent ühte kanalisse ja minimeeritakse või elimineeritakse pulsatsioon. [30]



Joonis 5. Kahe kolviga pumbad: (a) kaksikkolbpump, mille vasak kolb on täitetsükli ja parem kolb on tööttsükli lõpus, (b) akumulaatorkolbpump, mille ülemine kolb on tööttsükli lõpus ja alumine on täitetsükli. Nooled näitavad kolvide liikumise suunda; voolurõhu graafik on paremal [30].

Proovidosaat

Proovidosaat võib olla manuaalne või automatiseeritud süstimisüsteem (*autosampler*) [22]. HPLC automaatsüstimissüsteem peab suutma hea korratavusega süstida suurt vedelikukoguse vahemikku kõrge surve all [22]. Lisaks ei tohi proovi süstimine süsteemi takistada mobiilse faasi pidevat voolamist [28]. Selleks kasutatakse kuue avaga kahepositsioonilist klappi, mis on kujutatud Joonis 6 [26].



Joonis 6. Kuue kanaliga proovisüstimisklapp: (a) laadimispositsioon, (b) süstimispositsioon. [31]

Proovi sisestamiseks kromatograafi täidetakse klapi aas kas täielikult või osaliselt. Aasa suurus dikteerib proovi maksimaalse süstimisemahu, sest kui süstida aasa ruumalast

suurem proovi hulk, läheb ülejääk otse jääkidesse. Sellepärast eelistatakse kasutada suuremat aasa ja osaliselt täidetud aasa meetodit. [31]

3.2.3 Kolonn

Kolonnid on tavaliselt tehtud poleeritud roostevabast terasest, need on 50–300 mm pikad ja nende sisediaameeter on 2–5 mm [22]. Kolonn on täidetud statsionaarse faasiga, mille osakese suurus on 3–10 μm [22]. Statsionaarne faas võib olla kas tahke, poorne või pindaktiivne materjal, mis on mikroosakeste kujul või tahkel alusel õhukese kihina [26]. Kolonni mõlemas otsas on roostevabast terasest kettakujuline filter, mida nimetatakse fritiks [27]. Sellel on kaks funktsiooni: esiteks väldib see süstitud proovi teatud suurusest alates osakeste sattumist kolonni, teiseks ei luba see statsionaarset faasi kolonnist välja uhtuda [27]. Täitematerjali nimetatakse statsionaarseks faasiks, sest seda hoiab kindlalt paigal kolonni ümbris [28]. Kolonni, millel on väiksem sisemine diameeter kui 2 mm, nimetatakse mikropoorkolonniks [22].

Süsteemi võib lisada ka lühikese kaitsekoloni, mis paigaldatakse proovidosaatori ja eralduskoloni vahele. Selle täitematerjaliks on sama statsionaarne faas mis eralduskolonnis või sellega keemiliselt sarnane. Sellega saab vältida proovi osade sattumist eralduskoloni, mis sealt läbi ei tule. Õigesti valitud ja paigaldatud kaitsekolonn ei mõjuta eraldusfaktorit ja selle regulaarne vahetamine aitab pikendada eralduskoloni eluiga. [26]

Temperatuuri mõju eri HPLC-meetodite korral on erinev, mõne meetodi korral suurendab see eraldusfaktorit, mõne korral vähendab [26]. Analüüsi ajal peaks mobiilse ja statsionaarse faasi temperatuuri hoidma stabiilsena, et ei tekiks ebakõlasid [22]. Tuleb arvestada ka sellega, et mobiilne faas soojeneb voolutakistuse tagajärjel, sellest tulenevalt peaks jahutama mobiilset faasi ja kolonni, kui mobiilne faas on madala keemistemperatuuriga [26].

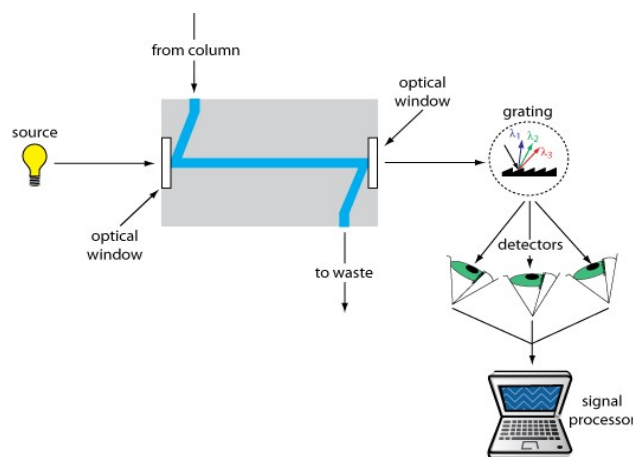
3.2.4 Detektorid

HPLC-detektor asub pärast kolonni ja detekteerib kolonnist tulevat eraldatud proovi [22]. Selleks jälgib ta mingil määral muutusi mobiilse faasi koostises ja muundab selle elektriliseks signaaliks ning edastab selle isekirjutajale või ekraanile, kus see on nähtav kui kõrvalekalle baasjoonest [26]. Detektorid võivad olla kas kontsentratsiooni- või

massitundlikud [26]. Seda on võimalik kindlaks teha, kui jätta HPLC-pump piigi maksimumi ajal seisma, siis säilitavad kontsentratsioonitundlikud detektorid oma taseme, kuid massitundlikud saavutavad taas oma baasjoone [26]. HPLC korral on kuus peamist detektoritüüpi: murdumisnäitaja-, ultraviolet-, fluorestsents-, elektrokeemiline, juhtivusdetektor ja massispektromeetria [27]. Massitundlikud on elektrokeemiline ja juhtivusdetektor [26] ning massispektromeetria [27]. Konsentratsioonitundlikud on UV-, fluorestsents- ja murdumisnäitajadetektor [26]. TTÜ Tervisetehnoloogiate instituudi laboris on kromatograafidel kasutuses UV-, fluorestsentsdetektor ja massispektromeeter.

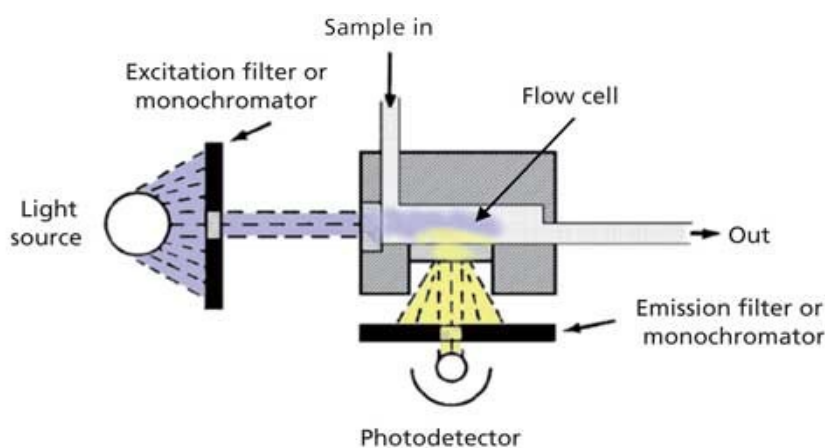
Massispektromeeter, mida ühendab HPLC-süsteemi külge aurustav liides, on HPLC-süsteemis kõige paindlikum ja kallim detektor [27]. Sellest saadava informatsiooni põhjal saab kindlalt ära identifitseerida eraldatud ained, kuid vajalik on ulatuslik andmete kogumine ja hindamine ning pädev operaator [27]. Massispektromeetrist on lähemalt juttu peatükis 3.3.

UV-detektor registreerib eluendi sumbuvalt [26]. Mobiilse faasi valikul peaks lähtuma selle optilistest omadustest, ehk ta ei tohi olla optiliselt aktiivne detektori lainepikkustel [26]. Tänapäeval kasutatakse muudetava lainepikkusega UV-detektoreid, mis võimaldavad katta lainepikkuse ulatuse 195–650 nm [27]. Selleks on kasutuses kaks lampi: deuteriumlamp (UV, kuni 340 nm) ja volfram-halogenlamp (nähtav valgus, 340–650 nm) [26]. Sellisel juhul on kindla lainepikkuse valimiseks paigutatud difraktsioonivõre enne detektorrakku, mis murrab talle langeva valguse eraldi lainepikkusteks, kuid see võimaldab jälgida vaid ühte lainepikkust antud ajahetkel [26]. Sellise detektori uuendus on diodrividetektor, kus difraktsioonivõre on asetatud pärast detektorrakku ja ühe fotodiodi asemel on neid pandud ritta palju, selle näide on Joonis 7 [27]. Mida suurem fotodiodide rida, seda üksteisele lähedasemaid lainepikkusi valida saab [27]. Selline lähenemine võimaldab samaaegselt jälgida mitut lainepikkust korraga [26].



Joonis 7. Diodrividetektori tööpõhimõte. [32]

Fluorestsentsdetektor on tundlikum ja spetsiifilisem kui UV-detektor [27]. Ained, mida fluorestsentsdetektori abil leitakse, peavad UV-kiirguse toimetel sumbuma ja lisaks veel fluorestseeruma [27]. Kui aineühendid vastavad nendele kriteeriumitele, siis on neid võimalik tuvastada 2–10 korda suurema tundlikkusega kui UV-detektoriga [27]. Selleks on vaja intensiivset lampi, et anda ergastav energia UV- ja nähtava valguse ulatuses [33]. Tüüpiliseks valikuks on ksenoonimpulsslamp, mis võimaldab lainepikkusi 200 nm kuni 700–900 nm ulatuses [33]. Vältimaks ergastusvalguse sattumist fotodiodi, seatakse see 90-kraadise nurga alla, sest fluorestsentsi emissioon kiirgab igas suunas [33]. Ergastus- ja emissiooni lainepikkuste valimiseks kasutatakse monokromaatorite paari, selleks on neil mõlemal sisseehitatud difraktsioonivõre, mis lahutab langeva valguse spektriiks ja valib uuritava ergastus- ja emissiooni lainepikkuse [33]. Fluorestsentsdetektori ehitus on esitatud Joonis 8.



Joonis 8. Fluorestsentsdetektori tööpõhimõte. [33]

3.2.5 Integraator ja arvuti

Detektorist tulevaid signaale salvestatakse elektrooniliste integraatorite abil, mis varieeruvad oma keerukuse ja kromatograafiliste andmete töötlemise, talletamise ja taastötlemise võimekuse poolest [22]. Kasutades analoog-digitaalkonverterit, muudab integraator pideva analoogpinge signaali diskreetideks ehk astmeliseks digitaalsignaali [27]. Integraator liidab piigialuse ala ja salvestab pindala, piigi kõrguse ja piigi maksimumi aja iga piigi korral [27]. Arvuti ülesandeks on piikide leidmine, integratsioon ja tuvastamine, mis tehakse samaaegselt kromatografeerimise käigus [27]. Arvutiga andmete töötlemine talletab rohkem informatsiooni ja vajab rohkem mälu, kuid võimaldab analüüsijärgset kuvamist ja kromatograafi andmete taastötlemist [27].

3.3 Kõrgsurvevedelikkromatograafia massispektromeetria (LC/MS)

Kromatograafia peamine puudus on ainesegu komponentidele üheselt mõistetava tuvastuse andmine, isegi kui need on üksteisest täielikult eraldunud. Tuvastus baseerub kolonnist väljumisaja võrdlusel referentsmaterjaliga, mille analüüs on läbi viidud identsetes tingimustes. Massispektromeetri korral on paljude aineühendite massi spektrid piisavalt spetsiifilised, et neid on võimalik tuvastada piisava usaldusega. Kuid kui uuritav aine on osa ainete segust, siis koosneb massispekter ainesegu kõikidest ioonidest, mis teeb tuvastamise oluliselt raskemaks kui mitte võimatuks. Sel juhul aitab kromatograaf viia ained massispektrometrisse ükshaaval. Ainete puhul, millel on sarnane või sama eraldusaeg, saab komponente eraldada masside erinevuse järgi. [34]

Massispektromeetria on analüütiline tehnika, mis annab uuritavate ainete kohta nii kvalitatiivset (struktuur), kui ka kvantitatiivset (molekulaarmass või kontsentratsioon) informatsiooni pärast nende ioonideks muutmist [35]. Uuritavad molekulid juhitakse esmalt massispektromeetri ionisatsiooniliidesesse, kus nad ioniseeritakse ja saavad kas positiivse või negatiivse laengu [35]. Ioon juhitakse seejärel läbi massianalüsaatori [35]. Seal lendab laetud ioon läbi magnet- või elektrivälja [35]. Selle toimel oniooni kõrvalekaldu mine oma trajektooriga mõjutatud pöördvõrdeliselt molekulaarmassist ja võrdeliselt laengust [27]. Tänu kõrvalekaldele satuvad ioonid detektori eri piirkondadesse vastavalt oma massi-laengu (m/z) suhtele [35]. Mida väiksem mass, seda

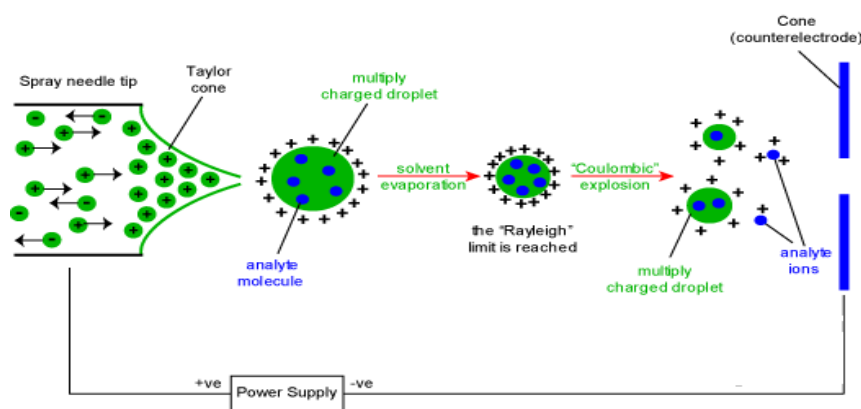
suurem kõrvalekalle antud laengu juures, mida suurem laeng, seda suurem kõrvalekalle antud massi juures [27]. Massispektromeetri analüsaator töötab kõrge vaakumi tingimustes (10^{-5} – 10^{-7} torr), et vältida kokkupõrkeid õhu molekulidega, mis võivad põhjustada ionide lagunemist või neutraliseerimist enne nende jõudmist detektorini [36].

3.3.1 LC/MS-liides ja ionisatsioonitüübid

HPLC-kolonnist tuleva eluendi rõhk ja kogus on massispektromeetri jaoks liiga suur ja see koormaks MS-detektori üle [36]. Sellepärast peab LC/MS-liides suutma eemaldada enamiku mobiilsest faasist ja selle lisandid ilma uuritava aine eemaldamiseta [36]. Selline peen tasakaal saavutatakse küttekehade, vähendatud rõhu ja inertse gaasi pihustamise kombinatsiooniga, et aurustada ja eemaldada ebavajalikud eluendiosad [36]. Mobiilse faasi voolukiiruse vähendamiseks paigutatakse enne liidest klapp, mis võimaldab soovitud hulga HPLC-st tuleva eluendi juhtimist massispektromeetrisse [36]. Teine peamine liidese funktsioon on uuritava aine ionisatsioon, kuna paljudel ainetel ei ole naturaalselt laengut [36]. Kõige populaarsemad LC/MS-liidesed on atmosfäärirõhul ionisatsiooniliidesed, milleks on elektropihustiionisatsioon (ESI) ja atmosfäärirõhul keemiline ionisatsioon (APCI) [27].

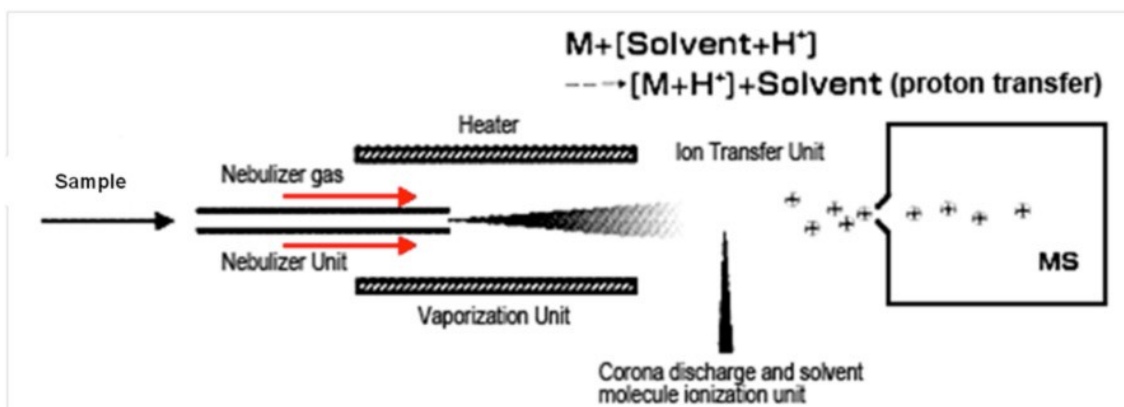
Elektropihustiionisatsiooni korral juhitakse kolonnist tulev eluent läbi metallist kapillaari, mis on kõrge pinge all (tavaliselt 3–4 kV) [34]. Kapillaar on tavaliselt risti või mingi nurga all massianalüsaatori avausega, et vähendada saastumise ohtu [37]. Kõrge pinge toimel pihustub vedelikujuga, mis koosneb kõrge laenguga piiskadest, tekitades udu [34]. Lisaks saab kasutada pihustavat gaasi (tavaliselt lämmastikku), see võimaldab kasutada suuremat eluendi voolukiirust [35]. Laenguga piisad, mis tekitatakse elektropihusti otsa lõpus, liigutatakse mööda rõhu- ja pingegradiendi massispektromeetri analüsaatorisse [35]. Kasutades kõrgendatud temperatuuri ja/või kuivatavat lämmastikugaasi juga need piisad aurustatakse [35]. Aurustumise käigus piiskade suurus väheneb, kuni laengute vahelised tõukejõud piiskade pinnal ületavad pindpinevuse kooshoidva jõu, mida nimetatakse Rayleigh limiidiks [34]. Siis toimub Coulombi plahvatus, mis tekitab hulga väiksemaid piiskasid, mille raadius on umbes 10% algse piisa raadiusest [34]. Aurustumise käigus annavad piisad oma laengu analüüdile, mis on näidatud Joonis 9 [38]. Saadud ioonid suunatakse läbi räbueemaldi koonuse ja seejärel kiirendatakse massianalüsaatorisse [35]. ESI on sobiv polaarsete

molekulide ioniseerimiseks ning kõige sobivam liides suurte molekulide, nagu peptiidid ja oligonukleotiidid, ioniseerimiseks [38].



Joonis 9. ESI ionide moodustumise mehhanismi skeem. [39]

Atmosfäärirõhul keemilise ionisatsiooni APCI korral lastakse HPLC eluent läbi pneumaatilise aurustaja, kus piisakesed samaaegselt tekitatakse ja kuivatatakse [34]. Erinevus ESI-st on piisakeste moodustumise viis ja ionide tekitamise moodus [34]. Gaasiline eluent ja proov ioniseeritakse koroonalahendusega, see tähendab, et kõrge laenguga elektrood tekitab piisavalt tugeva elektrivälja, et ioniseerida lähedalolevaid molekule, APCI skeem on näidatud Joonis 10 [40]. Mitmekilovoldine potentsiaal on piisav, et eemaldada elektron neutraalsest molekulist seda lõhustamata [40]. Koroonalahendus võib otse ioniseerida uuritava aine molekuli või ioniseerib eluendi, mis põrkudes neutraalse analüüdiga annab oma laengu ära [40]. APCI eelis ESI ees on, et see võimaldab ioniseerida mittepolaarseid ja vähepolaarseid molekule [40].



Joonis 10. APCI komponentide ja proovi liikumise skeem. [40]

3.3.2 Massianalüsaatorid

Pärast ionide moodustamist on vajalik eraldada erineva m/z suhtega ionid, määrata need m/z suhted ja mõõta iga ionigrupi relatiivne intensiivsus [34]. Analüsaatori eesmärk on hoida ioone, valida raadiosagedusliku pinge tulemusel kindla massiga ionid ja liigutada valitud ionid tuvastamiseks detektorisse [36]. Erinevatel massianalüsaatoritel on omad eelised ja puudused, kuid populaarsemad on kvadrupool- ja lennuaja (ingl *Time-of-Flight*, TOF) massianalüsaatorid [34].

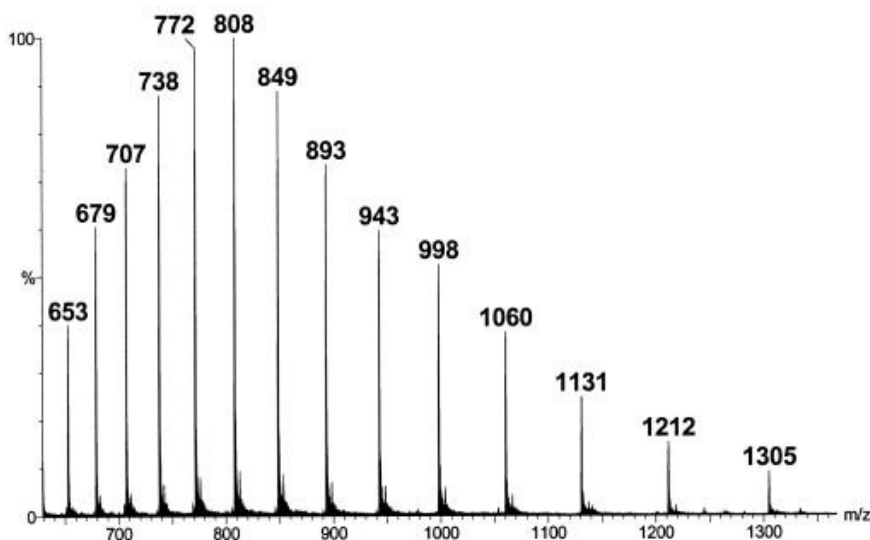
Kvadrupoolmassianalüsaator koosneb enamasti neljast metallvardast, mis on üksteisest võrdsel kaugusel [35]. Varrastest lastakse läbi nii alalispinge kui ka ostsilleeriv raadiosageduslik vahelduvpinge samal ajal, kõrvuti olevate varraste vahel on vastandpolaarsused [36]. Raadiosageduslik komponent on kahe vardapaari vahel 180° faasist väljas [34]. Ioonide juga, mis juhitakse varraste vahele, liigub alalispinge ja vahelduvpinge koostoimel spiraalselt läbi varraste [36]. Kindla alalis- ja vahelduvpingete väärtuste korral liiguvad kindla m/z suhtega ionid stabiilse trajektooriga läbi varraste ja jõuavad detektorini [34]. Ioonid, mis ei läbi varraste vahelist vahemaad antud pingeväärtuse juures, liiguvad mööda ebastabiilset trajektoori, põrkuvad lõpuks varraste pinnaga ja neutraliseeruvad [36]. Tõstes järjestikku raadiosagedusliku pinge sagedust, saab juhtida järjest suurema massi-laengu suhtega ioone detektorini [36].

Lennuaja massianalüsaatori tööpõhimõte tugineb sellele, et kui ionidele anda sama kineetiline energia, siis nende kiirus on pöördvõrdeline massi ruutjuurega [34]. Ioonidele antakse kineetiline energia kõrgepinge impulssidega [37]. Sellepärast on lennuajainstrumendis tähtis, et kõik allikas olevad ionid suunataks samaaegselt ja korraga massianalüsaatorisse teatud hetkel, et oleks teada nende lennuaeg ja sellest tulenevalt m/z suhe [34]. Selle tulemusel saadakse kindla ajahetke täielik massispekter, mis koosneb kõikidest m/z suhetest [34]. Kergemad ionid jõuavad detektorini kiiremini [36]. Protsessi saab korrata niipea kui kõige raskem ioon on jõudnud detektorini [34]. Lennuaeg on väga lühike, olles 90 nanosekundit kahemeetrise lennutoru kohta [36]. Ioonipeeglite kasutamine võimaldab pikendadaiooni lendamise teekonda, nii saab eristada paremini ioone, millel on sarnane lennuaeg [34].

3.3.3 Detektor ja massispekter

Kui laetud osake põrkub detektori membraani pinnaga, põhjustab see elektroni väljalöömise membraani teisel poolel. See elektron põrkub siis detektori siseseina kattega, vabastades iga põrkega mitmeid elektrone. Selline elektronide ahelreaktsioon võimendab ühe põrke signaali, mida on siis võimalik saata andmesüsteemi. [36]

Massispekter on graafik, kus y-teljel on ionide suhteline sisaldus ja x-teljel on m/z suhted. Tavaliselt võrdsustatakse kõige tugevam signaal 100%-ga ja kõiki teisi signaale väljendatakse protsendina sellest. ESI poolt tekitatud ionide lõhustumine on üldiselt piiratud ja massispekter näeb suhteliselt lihtne välja. Kuid ESI tekitatud mitme laenguga valkude ja peptiidide spekter võib olla keerulisem, nagu näidatud Joonis 11. [35]



Joonis 11. Näide hobuse müoglobiinvalgu standardlahuse ionide kogumi massispektrist. [35]

4 Materjalid ja meetodid

Töös kasutatud bioloogiliseks materjaliks oli heitdialüsaat. Proovid on saadud Põhja-Eesti Regionaalhaigla nefroloogia osakonnast. Dialüüsiproovid võtsid haigla protseduuriõed dialüüsiaparaadi väljavoolust 10 min pärast dialüüsi algust ja vahetult enne dialüüsi lõppu (tähistatud vastavalt 10 min ja 240 min). Kromatografeerimiseks ja parema säilivuse tagamiseks hapustati proovid kohe proovivõtu päeval kuni pH-ni 4,25. Selleks sisestati proovilahusesse pH-meetri mõõteelektrood ja proovi pidevalt magnetsegajal segades tilgutati sellesse sipelghapet kuni vajaliku pH-väärtuse saavutamiseni. Töös kasutati 50 patsiendi proovi, mis olid kodeeritud. Patsientide isikuandmeid pole töö autorile avaldatud. Uuringud on heaks kiidetud Tervise Arengu Instituudi juures asuva Tallinna Meditsiinieetika Komitee poolt, otsus nr. 2349 (15.03.2011).

Pentosidiini tuvastamiseks ja hindamiseks kasutati standardlahust, mis on valmistatud puhtast ($\geq 98\%$) pulbrilisest pentosidiinist ning on toodetud firma Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA) poolt. Standardlahuste kontsentratsiooni määramiseks kasutati pentosidiini neelduvuse koefitsienti. Selleks lahustati teadmata kogus pentosidiini puhvris ja mõõdeti selle UV-sumbuvalt 320 nm juures UV-spektromeetriga Shimadzu UV-3600 mida juhiti programmiga UVProbe, mida kasutati vastavalt kasutusjuhendile. Sumbuvuse põhjal arvutati lahuse kontsentratsioon natiivse pentosidiini neelduvuskoeffitsiendi $4522 \text{ AU}/[(\text{mol/l}) \text{ cm}]$ põhjal [15]. Standardlahuse lahjenduste tabel on toodud lisa 1.

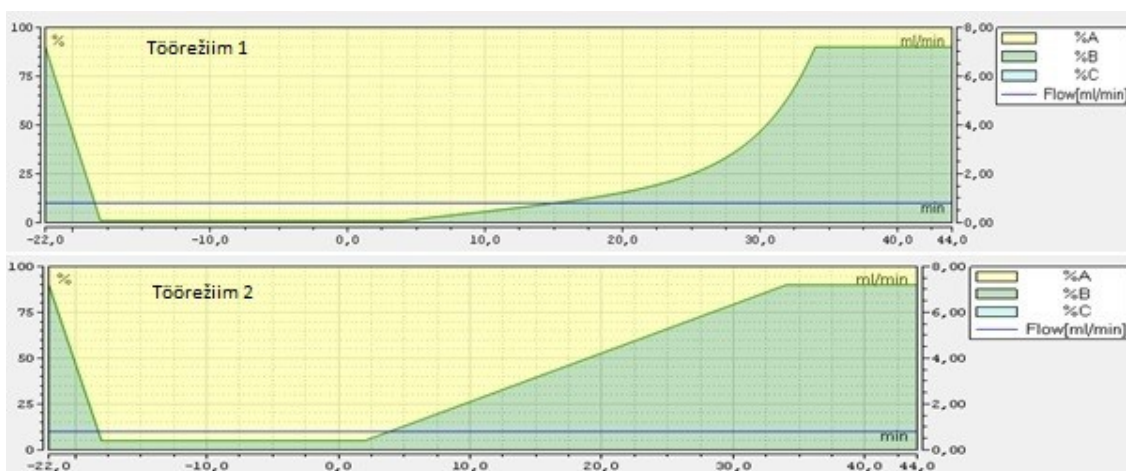
Standardlahust, heitdialüsaati ja hüdrolüsaati analüüsiti kõrgsurvevedelik-kromatograafiaga ja massispektromeetriga. Enne kromatografeerimist tsentrifuugiti kõik proovid kiirusel 12358 pöört/minutis 15 minuti jooksul. See on vajalik, et kromatograafi ei satuks tahkeid aineosakesi, mis ummistaksid kolonni või kahjustaksid kromatograafi mõnda teist seadet.

4.1 HPLC ja MS uuring

TTÜ Tervisetehnoloogia instituudi kromatograafialaboris on kaks kromatograafisüsteemi. Kromatograaf 1 (lisa 2-1) koosneb gradiendivõimelisest pumbast, automaatselt proovidosaatoriga, kolonniahjust, mille sees on kolonn Kinetex 2,6µ C18 150*4,6 mm ja kaitsekolonn C18 4*3 mm (mõlema tootja on Phenomenex (Torrance, Kalifornia, USA)), diodrividetektorist ja RF 2000 fluorestsentsdetektorist. Kromatograafi tööd juhib programm Chromeleon, versioon 7.1.2.1478, mida kasutati vastavalt kasutusjuhendile. Kromatograaf 2 (lisa 2-2) süsteem koosneb gradiendivõimelisest pumbast, automaatselt proovidosaatoriga, kolonniahjust (sama kolonn ja eelkolonn, mis esimeses kromatograafis), voolu jaotamise ventiilist, kust 1/8 eraldatud proovist läheb massispektromeetrisse micrOTOF-QII (Bruker, Saksamaa) ja 7/8 proovist läheb diodrividetektorisse ja fluorestsentsdetektorisse RS. Kromatograafi 2 juhitakse programmiga Chromelion 6.80 SR8 ja massispektromeetrit kontrollitakse programmiga Compass 1.3, mõlemaid kasutati vastavalt kasutusjuhendile. Kõigi seadmete, v.a massispektromeetri, tootja on Dionex (Sunnyvale, Kalifornia, USA), kõik kromatograafiaseadmed peale RF 2000 fluorestsentsdetektori kuuluvad tootesarja Ultimate 3000. Standardlahuse ja SPE tulemuste mõõtmiseks kasutati ka spektrofluorofotomeetrit Shimadzu RF-5301PC, mis võimaldab mõõta fluorestsentsspektrit, seda juhiti programmiga Panorama Fluorescence 1.2, mida kasutati vastavalt kasutusjuhendile.

Kromatograferimisel kasutatavateks kemikaalideks olid atsetonitriil, metanool, MilliQ vesi ja ammooniumformiaat. Atsetonitriil (AcN) on puhas ($\geq 99,9\%$) HPLC *grade* vedelik, mille tootja on Honeywell (Morris planes, New Jersey, USA) ja selle aegumiskuupäev oli 31.08.2019. Metanool (MeOH) on puhas ($\geq 99,9\%$) HPLC *grade* vedelik, mis on toodetud Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) poolt ja selle aegumiskuupäev oli 18.10.2019. Puhas vesi saadi laboris veepuhastussüsteemist Millipore Synergy UV (Ultrapure (Type 1) water). Süsteem kontrollib vee puhtust takistuse mõõtmisega, vee takistus ei tohi olla väiksem kui 18,2 MΩ. Ammooniumformiaat (NH₄ form) (puhtusaste 97%) on kristalsel kujul, ning see lahustati MilliQ vees (2,08 g/L) ja reguleeriti pH-ni 4,25 sipelghappega (puhtusaste 98%) kasutades pH-meetrit Knick Portamess (Saksamaa). Mõlemad puhverlahuse komponendid on Honeywelli (Morris planes, New Jersey, USA) toodang.

Käesoleva töö läbiviimisel kasutati kahte erinevat kromatograafilist eraldusmeetodit, milleks on pöördfaasmeetod (töörežiim 1 – TR1), mis on laborisisene standard dialüsaadi analüüsimisel ja ioonpaarmetod (töörežiim 2 – TR2), milles kasutati heptafluorovõihapet (HFBA) ioonpaarreagendina, mis on kirjandusest leitud meetod pentosidiini analüüsimiseks [11, 15, 16, 17]. Mõlemal meetodil on samad uuritavad fluorestsentsi lainepikkused, mis on Ex330/Em373 nm, mis vastab pentosidiini emissiooni maksimumile happelises keskkonnas. Meetoditel oli ka sama voolukiirus 0,8 ml/min terve meetodi kestusel ja kolonni temperatuur 35 ± 1 °C. Meetodite erinevuseks on gradiendi erisused (Joonis 12) ja kasutatavad eluendid (Tabel 1) kromatograafilise eralduse saavutamiseks.



Joonis 12. Gradientide erinevus erinevate kromatograafimeetodite puhul. Pildi ülemises osas on eksponentsiaalgradient (töörežiim 1), alumises osas on lineaargradient (töörežiim 2).

Tabel 1. Töörežiimides kasutatud eluendide nimistu.

	Töörežiim 1	Töörežiim 2
Puhver A	NH ₄ form H ₂ O pH 4,25	0,005M HFBA H ₂ O pH 2,38
Puhver B	MeOH/AcN 9:1	0,005M HFBA AcN
Puhver C (pesu)	MeOH/AcN 9:1	MeOH/H ₂ O 9:1

MicrOTOF-QII on MS/MS tüüpi kvadрупool/TOF-massispektromeeter, millel on ESI ionisatsiooniallikas. Ionisatsiooniallika kapillaari pingeline on seatud 4500 V peale ja aurustava gaasi (lämmastik) rõhk on 1,2 bar. Proovi tilkade kuivatamine toimub 200 °C juures ja kuivatava gaasiga N₂, mille pealevoolu kiirus on 8 l/min. Valitud detekteeritavate massi-laengu suhete vahemik oli 50–1200 m/z.

4.2 Tahke faasi ekstraktsioon (SPE) ja hüdrolüüs

Peptiidide kontsentreerimiseks dialüsaadist kasutati SPE-kolonne [41] selle erinevusega originaalmetoodikast, et Strata-X kolonne asemel valiti suurema poorsusega adsorbent Strata-XL 100µm 500 mg/6ml (Phenomenex), mis on näidatud lisas 3. SPE läbiviimise meetodika on toodud Tabel 2. Mõõdeti kolonnist läbi tulnud dialüsaadi kui ka originaaldialüsaadi fluorestsentspektreid.

Tabel 2. Strata-XL meetod [41].

Nr	Etapp	Strata-XL
1	Kolonne stabiliseerimine	4 ml MeOH
2	Kolonne pesu	4 ml 0,5% AcOH
3	Proovi lisamine	30 ml dialüsaati (pH 4–5)
4	Kolonne pesu	8 ml 0,5% AcOH
5	Väljapesu 1	4 ml 6/4 AcN/H ₂ O + 0,5% AcOH

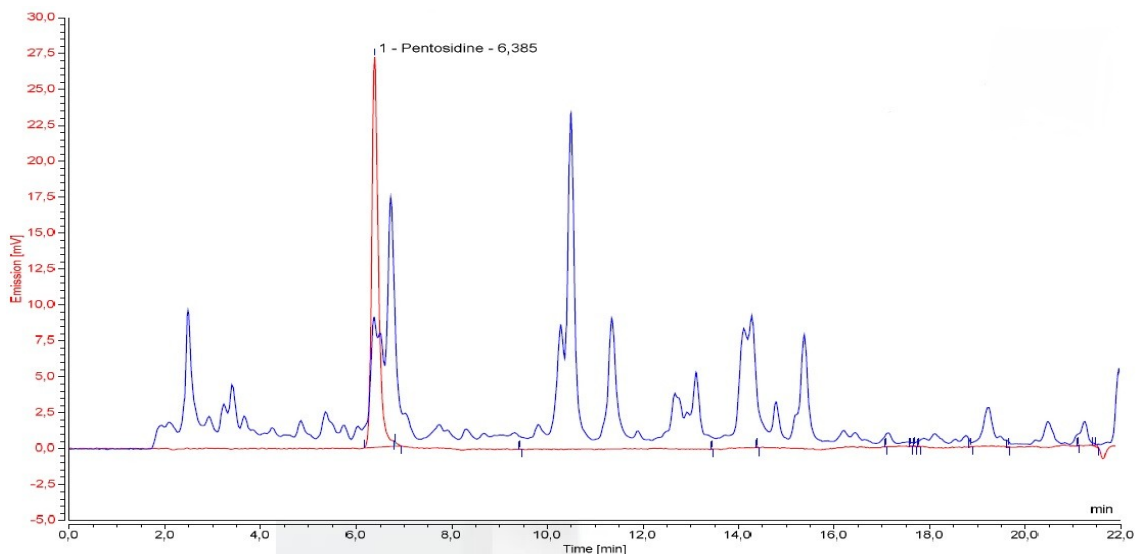
Hüdrolüüsi teostamisel kasutati üldlevinud meetodikat [11, 14, 15, 17]. Peptiidide fraktsioon kuivatati N₂ voolus temperatuuril 50 °C, jääk lahustati 6 M soolhappes ja kanti üle hüdrolüüsinoõudesse. Hüdrolüüsiks kasutati spetsiaalseid vaakumhüdrolüüsiviaale mahuga 6 ml (Thermo Scientific katalooginumber 29571), jälgides täpselt firma hüdrolüüsijuhendit ja kasutades firma spetsiaalset „6 M *constant boiling*“ soolhapet (kat. nr. 24308). Hüdrolüüs viidi läbi vaakumis, mis saavutati membraanpumbaga. Pärast vakumeerimist lasti hüdrolüüsi viaali lämmastik hapniku eemaldamiseks. Seda tsüklit korrati 10 korda 2 min vakumeerimisega enne lõplikku 5-minutilist vakumeerimist. Hüdrolüüsiti temperatuuril 110 °C 20 tundi. Jahtunud hüdrolüsaati lisati 100 µl metüüloranži lahust (100 mg/l) ja neutraliseeriti 12 M NaOH-ga indikaatori värvimuutuse alguseni. Katsetati ka hüdrolüsaadi kuivaks aurutamist N₂ voolus temperatuuril 50 °C ja teostati hüdrolüüsi katse pentosidiini standardlahusega, et näha võimalikke hüdrolüüsi mõjusid pentosidiini hulga.

5 Tulemused ja arutelu

Töörežiim 1 on TTÜ Tervisetehnoloogia instituudi kromatograafialabori standardmeetod heitdialüsaadi uuringuks. See oli esimene meetod, millega katsetati vaba pentosidiini eraldamist ja tuvastamist kromatograafia abil. Töörežiim 2 valiti Slowik-Zylka *et al.* [15] artikli põhjal, kuigi sama meetodikat on pentosidiini analüüsimiseks kasutatud varemgi [11, 16].

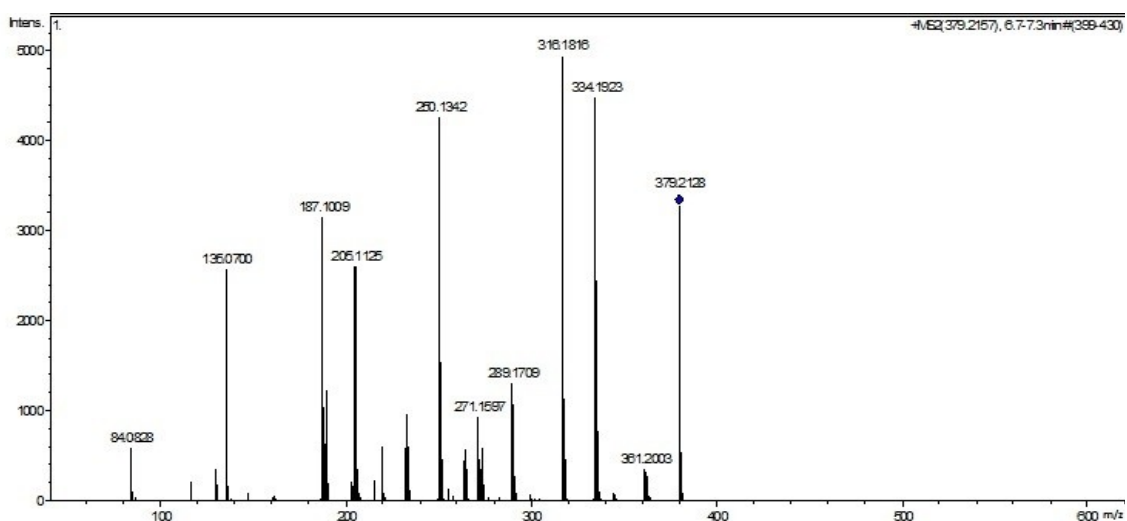
5.1 Töörežiim 1

Pentosidiini tuvastamiseks dialüsaadi kromatogrammilt võrreldakse seda standardproovi kromatogrammiga. Joonis 13 on näidatud TR1 dialüsaadi (siniselt) ja standardlahuse (punaselt) kromatogrammide võrdlus. Antud meetodiga oli pentosidiini väljumisaeg $6,5 \pm 0,2$ minutit ning programm Chromelion määras automaatselt pentosidiiniks suurema piigi. Jooniselt on näha, et pentosidiini tuvastamise teevad keeruliseks tundmatud segavad ained, millel on lähedane väljumisaeg kolonnist. Analüüsitud 10. minuti dialüsaadi kromatogrammidel esines enam või vähem sellist segavat lisandit 9-1 patsiendil 10-st. See meetod ei sobi pentosidiini uurimiseks halva eralduse tõttu, sest segav aine võidakse ekslikult tuvastada pentosidiiniks ning selle suur kogus võib muuta pentosidiini piigipindala määramise vea väga suureks.



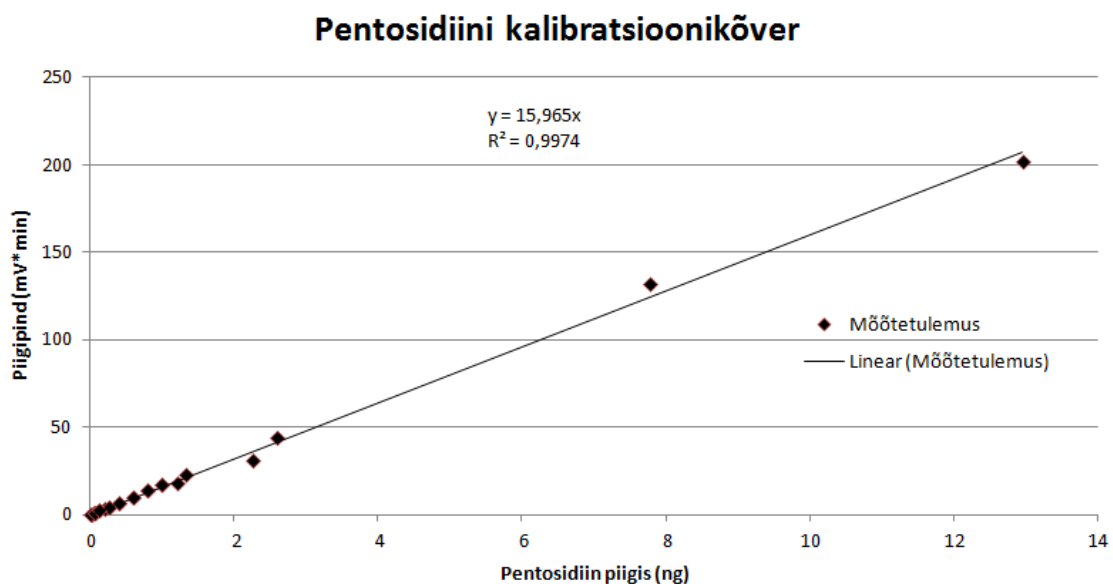
Joonis 13. TR1 P4 dialüsaadi (sinine) ja standardlahuse (punane) kromatogrammide võrdlus. Pentosidiini piiki dialüsaadis tuvastada võimalik ei ole.

Antud meetodiga tehti massispektromeetri uuring pentosidiini standardlahusele. Massispekter on kujutatud Joonis 14. Massispektri joonisel on näha pentosidiinile iseloomulikke ionifragmente. Sama m/z suhtega piigid 361, 334, 316, 250, 205, 187 ja 135 on valdavalt ka teiste autorite pentosidiini massispektrites [11, 18]. Fluorestsentsdetektori ja massispektromeetri signaali vahel esineb 0,4 minutine ajanihe, mis tuleneb neid detektoreid kolonniga ühendavate kapillaaride erinevast pikkusest. Massispektri analüüsi vaba pentosidiini uurimiseks ei olnud võimalik teha, sest vaba pentosidiini kogus dialüsaadis osutus massispektromeetri jaoks liiga väikeseks.



Joonis 14. Pentosidiini standardlahuse massispekter: kõige iseloomulikumat ionifragmentid pentosidiinile on m/z 334, 316 ja 250.

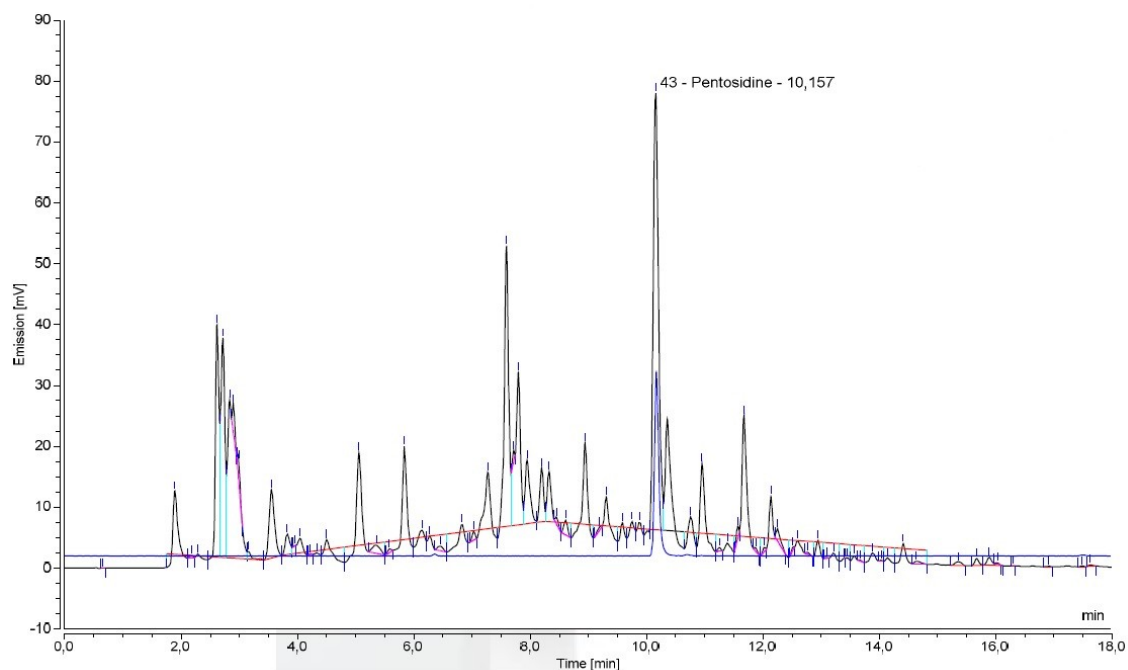
Pentosidiini koguse hindamiseks tehti kalibratsioonikõver. Selleks mõõdeti eri kogustes ja kontsentratsioonides standardlahust. Mõõtetulemuste tabel on toodud lisas 4 ja kalibratsioonigraafik on näidatud Joonis 15. Jooniselt on näha, et meetod on mõõdetud vahemikus lineaarne ($R^2 = 0,9974$). Antud graafiku põhjal on võimalik leida pentosidiini kogus, kui on teada piigipindala (pentosidiini kogus = piigipind/15,965).



Joonis 15. TR1 kalibratsioonikõver. Piigipinna vahemik on 0,08 – 202 mV*min. Joonisele on lisatud linearsuse joon.

5.2 Töörežiim 2

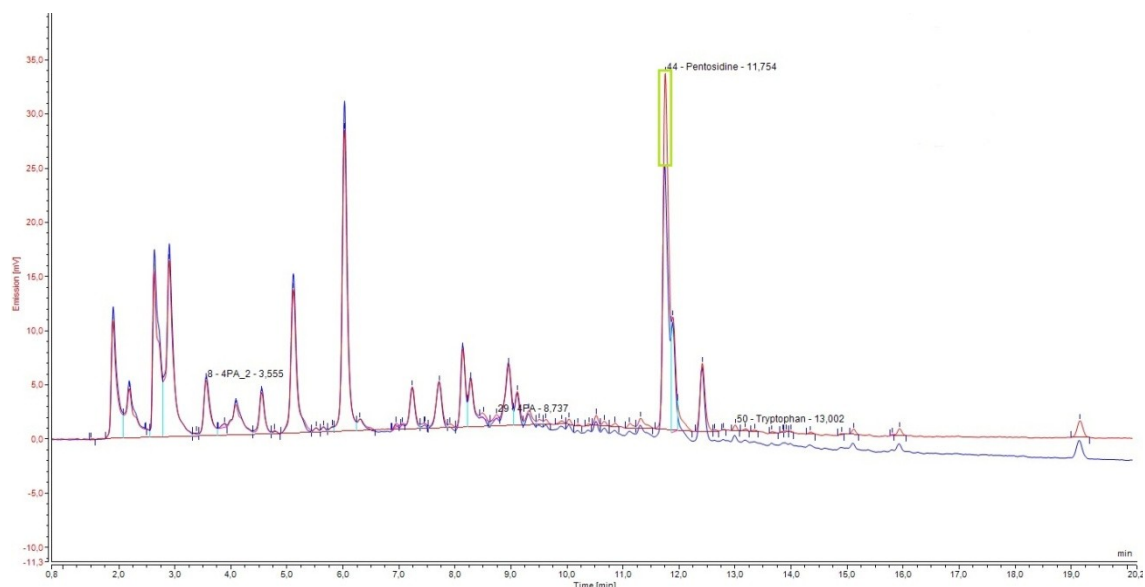
TR2 dialüsaadi (must) ja standardlahuse (sinine) kromatogrammid on näidatud Joonis 16. Võrreldes dialüsaati standardlahusega, on joonistelt näha, et pentosidiini standardlahuse piigiga langeb ajaliselt kokku dialüsaadi piik väljumisajaga 10,157 min. Pentosidiini väljumisaeg selle meetodi puhul oli $10,15 \pm 0,04$ min, mis saadi 10 selle meetodiga kromatografeeritud dialüsaatide väljumisaegade võrdlusel.



Joonis 16 TR2 P9 dialüsaadi (mustalt) ja standardlahuse (siniselt) võrdlus. Võrreldavate piikide väljumisaeg on 10,15 min.

Dialüsaadi P1 kromatograafiliste meetodite võrdlus on näidatud lisa 5, kus ülemine on TR1 ja alumine on TR2. Meetodite võrdlusest on näha, et sama dialüsaadi kromatografeerimisel eristub pentosidiini piik TR2 korral paremini, kuigi esineb väike lisapiik pentosidiini piigi lõpus. Samuti on signaali tugevus TR2 korral parem, piigi maksimum on 14 mV võrreldes TR1 piigi maksimumiga 8,8 mV (TR2 signaal 1,6 korda suurem).

Katse pentosidiinistandardi lisamisest dialüsaati on näidatud Joonis 17. Selle katsega on võimalik tuvastada pentosidiini piik kromatogrammilt paremini kui võrdlusel standardlahuse kromatogrammiga. Kuna TR2 puhul esineb ka pentosidiinil – olenevalt dialüsaadist – kas suurem või väiksem lisapiik piigi lõpus, siis on selle katsega võimalik tuvastada pentosidiini õige piik. Nagu joonisel näha ei muuda lisatud pentosidiin dialüsaadi vastava piigi sümmeetriat, mis tõendab mõlema väljumisaja väga täpset kokkulangevust. Pentosidiini piik oli hea sümmeetriaga ja piisavalt eraldunud järgnevast tunduvalt väiksemast piigist. Selle põhjal võib järeldada, et TR2 on sobiv dialüsaatide vaba pentosidiinisalduse omavaheliseks võrdluseks.

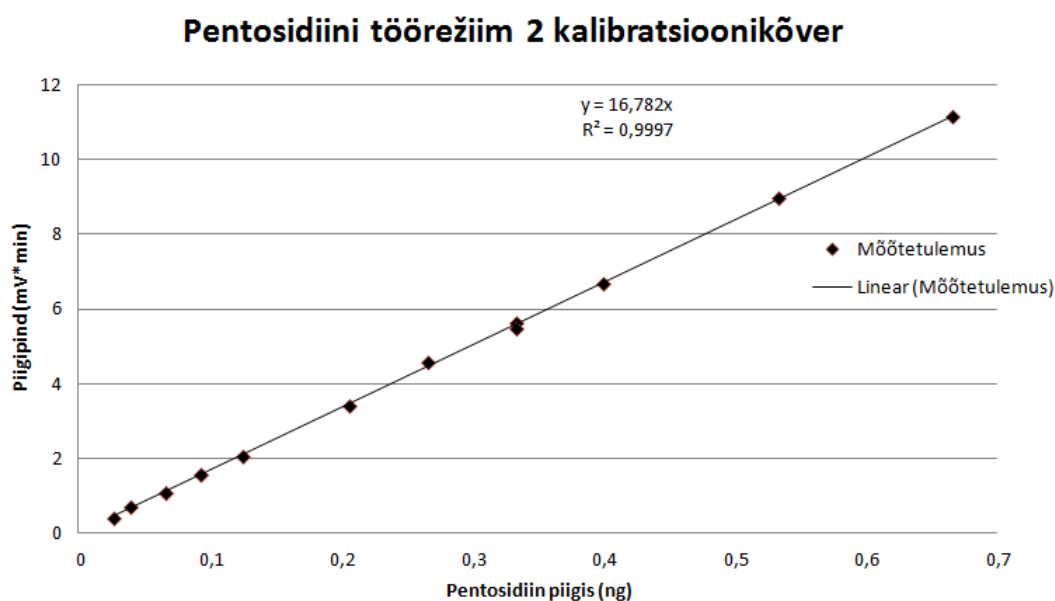


Joonis 17. Pentosidiini lisamine dialüsaati: siniselt on dialüsaat P4, punaselt on dialüsaat P4+St4. Rohelise kastiga on tähistatud lisatud pentosidiini osa punasel kromatogrammil.

Patsientide TR2 meetodi kromatogrammide varieeruvuse näited on toodud lisa 6. Üldiselt 10. ja 240. minuti dialüsaatide kromatogrammide vahel olulisi erinevusi, peale üldise lahjenduse 240. min kromatogrammidel, ei täheldatud. Hea lahutuse etaloniks on patsiendi P11 kromatogramm, kus pentosidiini piik on hästi eraldunud ja selle hindamist ei sega mõni teine fluorofoor. Sellised olid valdava enamuse analüüsitud proovide kromatogrammid. Rahuldavaks võib hinnata ka patsiendi P21 kromatogrammil oleva lahutuse, selles dialüsaadis on tundmatut fluorofoori rohkem, mis teeb baasjoone korrigeerimise keerulisemaks ja pentosidiini piigipindala määramise vähem täpseks. Problemaatiline on patsiendi P27 kromatogramm, kus teiste fluorofooride signaalide intensiivsused on suhteliselt suured ja pentosidiinile järgnev halvasti lahutunud piik on pentosidiiniga võrdväärne. Sellised kromatogrammid olid uuritud 50 patsiendist kahel. Neil kahel patsiendil oli pentosidiini väljumisajaga piigipindala *ca* 2 kuni 10 korda suurem kui enamusel teistest patsientidest (vt P27 ja P46 lisa 7). Kokkuvõtteks võib järeldada, et meetod TR2 sobib vaba pentosidiini uurimiseks dialüsaadis, välja arvatud mõne erandiga (nagu näiteks P27 ja P46). Pentosidiini halva eralduse korral pakkusid Slowik-Zylka *et al.* välja, et pärast gradient kromatograafiat tuleb suunata eraldunud fraktsioonid teise kromatograafi, kus eraldus toimub alternatiivse meetodiga samal pöördfaas kolonnil [15]. Mõned autorid on teise meetodina kasutanud ka kromatograafiat Hypercarb täidisega (aktiveeritud söe) kolonni [19, 20]. Viimane on

perspektiivne edasiarendus meetodile, kuid vajab Hypercarb kolonni soetamist, mis maksab ligikaudu 900–1000 dollarit.

Ka selle meetodi puhul tehti kalibratsioonikõver, et oleks võimalik piigipindala põhjal hinnata pentosidiini sisaldust dialüsaadis. Kalibratsioonikõver on kujutatud Joonis 18 ja mõõtetulemuste tabel on lisas 8. Meetod on antud mõõtepiirkonnas lineaarne ($R^2 = 0,9997$). Sarnaselt TR1 kalibratsioonigraafikule on võimalik antud graafiku põhjal leida pentosidiini kogus, kui piigipindala on teada (pentosidiini kogus = piigipind/16,782).



Joonis 18. TR2 kalibratsioonikõver. Mõõtmiste piigipinna vahemik on 0,4 – 4,2 mV*min. Joonisele on lisatud lineaaruses joon.

TR2 meetodi korratavus leiti proovide paralleelmõõtmiste meetodil (Magnusson *et al* käsiraamatu peatükk 4.4) [42]. Selleks jaotati mõõdetud paralleelid kahte gruppi: 10. minuti dialüsaadid ja 240. minuti dialüsaadid. Selline jaotus tehti lähtudes fluorofooride kontsentratsioonide erinevusest dialüüsi alguses ja lõpus. Mõõtmiste algandmed on toodud lisas 9. Korratavus oli 10. minuti dialüsaatidel 7,8% ja 240. minuti dialüsaatidel 5%.

5.3 Tahke faasi ekstraktsioon

Võimalike analüüdi kadude arvestamiseks teostati pentosidiini vastupidavuse kontrollkatsed, mis on toodud Tabel 3. Tabelist on näha, et proovi külmutamine ja sulatamine ning aurutamine 50 °C juures pentosidiini ei lagunda. 6 M HCl pentosidiini lahuse muutmiseks kromatograferimise jaoks sobilikuks on kirjeldatud kahte erinevat moodust. Nendeks moodusteks on aurutamine kõrgendatud temperatuuril lämmastiku pealevoolu all [11, 15] ja seejärel lahustamine puhver A-s või neutraliseerimine NaOH-ga [14, 17]. Antud kontrollkatsete käigus esines suuremaid kadusid aurustamisega, tabelis on näha protsentuaalne vahe võrreldes töötlemata pentosidiiniga.

Tabel 3. Pentosidiini stabiilsuse kontrollkatsed

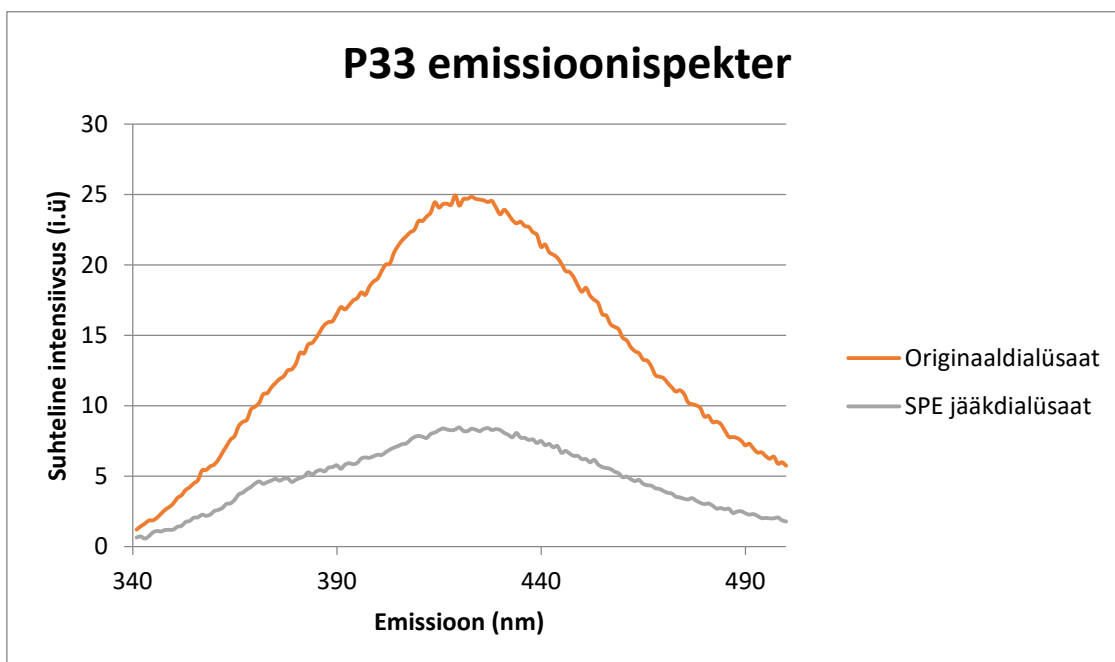
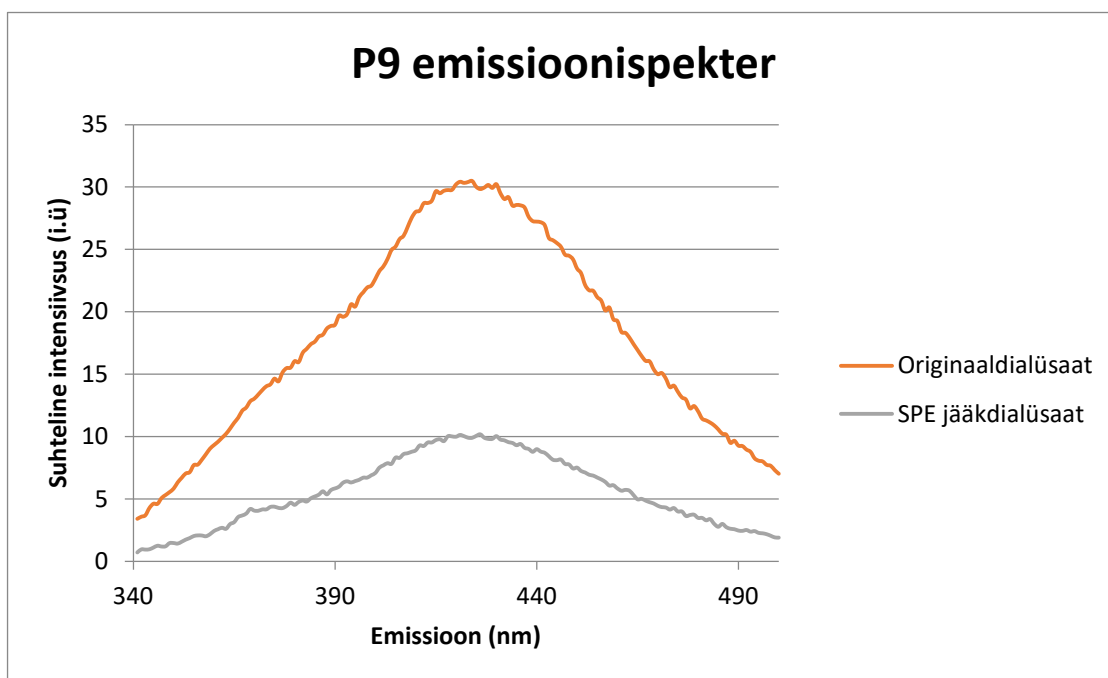
Katse Nimi	Piigi pindala (mV*min)	Protsent (%)
st3_10ul	44,1	100
sulatatud	44,0	99,9
aurutatud	43,4	98,5
aurutatud HCl	35,0	79,4
neut NaOH	42,1	95,5

Pentosidiini vastupidavuse kontrollkatse hüdrolyüsil on toodud Tabel 4. Tabelist on näha, et hüdrolysaadi kuivatamisel 50 °C N₂ pealevoolu all on kaod palju suuremad kui neutraliseerimisel NaOH-ga. Selle katse põhjal kasutatakse patsientide dialüsaatide hüdrolyüsimisel neutraliseerimist NaOH-ga. Neutraliseerimismeetod vajab täiendamist: minielektroodidega pH-meetrit või indikaatorainet, et seada täpne uuritava aine pH kromatograferimiseks.

Tabel 4. Pentosidiini hüdrolyüsi kontrollkatse tulemused

Katse nimi	Piigi pindala (mV*min)	Pinna korrektuur (mV*min)	Protsent (%)
St4	5,679	177,52156	100
Hydrol_kuiv	2,6506	81,10836	45,6893
Hydrol_neut	4,9769	152,29314	85,78853

Peptiidide ja valkude fraktsiooni eraldamist dialüsaadist katsetati patsientide P9 ja P33 proovidega. Dialüsaatide ja nende fraktsioonide fluorestsentspektrite võrdlus on toodud Joonis 19. Graafikutelt on näha, et dialüsaadi ja selle fraktsioonide emissioonispektrid on kujult samad ja erinevad ainult intensiivsuse poolest. Sellest võib järeldada, et mingi erineva grupi fluorofooride väljaselekteerimist Strata-XL kolonniga ei toimunud. Mõlema patsiendi korral jäi 75% algsest fluorestsentsist kolonni kinni.



Joonis 19. P9 ja P33 emissioonispektrid ergastus lainepikkusel 330 nm.

Dialüsaatide P9 ja P33 peptiidifraktsioonide hüdrolüsaatide pentosidiinisisaldused ümber arvutatuna algdialüsaadi süstimahule on toodud Tabel 5. Tabelist on näha, et peptiididega seotud pentosidiini osakaal kogu pentosidiinis on väike. Kontsentreerimismetoodika kontrolliks viidi läbi katse fluorestseeruva mudelpeptiidiga Fibrinopeptiid B (molekulkaal 1570 Da). Selle katse tulemused näitasid, et SPE metoodika seda peptiidi ei sidunud ja selle põhjal võib järeldada, et tabelis 5 toodud vaba ja peptiididega seotud pentosidiini suhtarvud ei pruugi olla lõplikud.

Tabel 5. P9 ja P33 dialüsaadi hüdrolüüsi tulemuste kokkuvõte.

Patsiendi kood	Vaba pentosidiin (mV*min)	Peptiididega seotud pentosidiin (mV*min)	Kogu pentosidiin (mV*min)	Seotud pentosidiini suhe kogu pentosidiiniga (%)
P9 (100 µl)	7,53	2,01	9,54	21,1
P33 (100 µl)	5,94	2,04	7,98	25,6

6 Järeldused

TTÜ Tervisetehnoloogia instituudi kromatograafialabori heitdialüsaadi uurimise standardmeetod ei sobinud vaba pentosidiini hindamiseks. Pentosidiini väljumisajal oli näha mitmeid segavaid aineid ja seetõttu ei olnud väga täpselt võimalik tuvastada pentosidiini piiki. Vaba pentosidiini väikese koguse pärast ei olnud võimalik teha dialüsaadile massispektri analüüsi.

Kirjandusest leitud ioonpaarpöördfaasmeetod oli sobilik heitdialüsaadi vaba pentosidiini leidmiseks. Vaba pentosidiini piik oli hea sümmeetriaga ja piisavalt eraldunud segavatest fluorofooridest ning dialüsaadi piik langes täpselt kokku pentosidiini standardlahuse piigiga. Eranditeks olid mõned patsiendid, kelle dialüsaadis olid teiste fluorofooride signaalide intensiivsused suhteliselt suured. Meetod oli mõõdetud piirkonnas lineaarne.

Peptiididega seotud pentosidiini uuringul tuli välja, et Strata-XL kolonn ei seo endaga kõiki peptiide ja selle põhjal ei saa kindel olla, et leitud peptiididega seotud pentosidiini hulk (20–25% kogu dialüsaadi pentosidiini hulgast) vastab tegelikult dialüsaadis olevale peptiididega seotud pentosidiini hulgale. Selle põhjal saab öelda, et meetod vajab täiendavat uurimist.

7 Kokkuvõte

AGE ehk glükatsiooni lõpp-produktid on heterogeenne aineühendite grupp, mis tekib mitte-ensümaatilisel valkude, lipiidide või aminohapete glükatsiooni tulemusel. Kõik AGE-d on seondunud kas valgu peptiidahela külge (adukt) või valgusiseste peptiidahelate vahele (ristühendus). AGE-de teke on keeruline ja pikk molekulaarne protsess, mis sisaldab endas lihtsaid ja keerukamaid mitmeastmelisi reaktsioone, mida nimetatakse Maillard'i reaktsiooniks. AGE-de markeriks on pentosidiin, mis korreleerub tugevalt karbonüülühendite tasemega, mis on AGE-de eelained. Peamiseks pentosidiini määramistehnikaks oli kõrgsurvevedelikkromatograafia pöördfaas C18 kolonniga ioonpaarmetodil.

Vaba pentosidiini määramiseks kasutati kahte kromatograafiameetodit: TR1 – pöördfaas meetod (pH 4,25) eksponentsiaalse gradientväljapesuga C18 kolonnil ja TR2 – ioonpaarmetod (pH 2,3) lineaarväljapesuga C18 kolonnil. Mõlemal meetodil on samad uuritavad fluorestsentsi lainepikkused, mis on Ex330/Em373 nm, mis vastavad pentosidiini emissiooni maksimumile happelises keskkonnas. Massispektri mõõtmised teostati MicrOTOF-QII MS/MS tüüpi kvadрупool/TOF-massispektromeetriga, detekteeritavate massi-laengu suhete vahemikul 50–1200 m/z. Tahke faasi ekstraktsioon viidi läbi Strata-XL kolonniga ning eraldatud peptiidide fraktsioon hüdrolüüsiti vastavalt kirjandusest leitud meetodiga.

Pentosidiini tuvastamiseks dialüsaadi kromatogrammilt võrreldi seda standardlahuse väljumisajaga. TR1 korral ei saavutatud piisavat pentosidiini eraldust teistest fluorofooridest, et seda saaks usaldusväärselt hinnata. Vaba pentosidiini massianalüüsi analüüdi väikese koguse tõttu teostada ei saanud. Kirjandusest leitud TR2 meetodiga oli pentosidiini eraldus teistest fluorofooridest piisav ja võrdlusel standardlahusega joendusid piigid hästi. Tahke faasi ekstraktsioonil leiti, et Strata-XL kolonn ei seo endaga kõiki peptiide ja selle põhjal ei saa kindel olla, et leitud peptiididega seotud pentosidiini hulk vastab tegelikult dialüsaadis olevale peptiididega seotud pentosidiini hulgale.

Kasutatud kirjandus

- [1] J. Arund, Major Chromophores and Fluorophores in the Spent Dialysate as Cornerstones for Optical Monitoring of Kidney Replacement Therapy, Tallinn: TUT Press, 2016.
- [2] M. Oleniuc, I. Secara, M. Onofriescu, S. Hogas, L. Voroneanu, D. Siroopol ja A. Covic, „Consequences of Advanced Glycation End Products Accumulation in Chronic Kidney Disease and Clinical Usefulness of Their Assessment Using a Non-invasive Technique - Skin Autofluorescence,“ *Maedica*, kd. 6, nr 4, pp. 298-307, 2011.
- [3] J. M. Bohlender, S. Franke, G. Stein ja G. Wolf, „Advanced glycation end products and the kidney,“ *American Journal of Physiology*, kd. 289, pp. 645-659, 2005.
- [4] P. Gkogkolou ja M. Böhm, „Advanced glycation end products - Key players in skin aging?,“ *Dermato Endocrinology*, kd. 4, nr 3, pp. 259-270, 2012.
- [5] N. J. McIntyre, L. J. Chesterton, S. G. John, H. J. Jefferies, J. O. Burton, M. W. Taal, R. J. Fluck ja C. W. McIntyre, „Tissue - Advanced Glycation End Product Concentration in Dialysis Patients,“ *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, kd. 5, nr 1, pp. 51-55, 2010.
- [6] V. P. Singh, A. Bali, N. Singh ja A. S. Jaggi, „Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications,“ *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, kd. 18, nr 1, pp. 1-14, 2014.
- [7] J. Uribarri, M. Peppas, W. Cali, T. Goldberg, M. Lu, S. Baliga, J. A. Vassalotti ja H. Vlassara, „Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients,“ *American Journal of Kidney Diseases*, kd. 42, nr 3, pp. 532-538, 2003.
- [8] S. Arsov, R. Graaff, W. v. Oeveren, B. Stegmayr, A. Sikole, G. Rakhorst ja A. J. Smit, „Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review,“ *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, kd. 52, nr 1, pp. 11-20, 2014.

- [9] S. K. Mallipattu ja J. Uribarri, „Advanced glycation end product accumulation: A new enemy to target in chronic kidney disease?“, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, kd. 23, pp. 547-554, 2014.
- [10] R. Singh, A. Barden, T. Mori ja L. Beilin, „Advanced glycation end-products: a review“, *Diabetologia*, kd. 44, pp. 129-146, 2001.
- [11] D. R. Sell ja V. M. Monnier, „Structure Elucidation of a Senescence Cross-Link from Human Extracellular Matrix“, *The Journal of Biological Chemistry*, kd. 264, nr 36, pp. 21597-21602, 1989.
- [12] M. E. Suliman, O. Geimbürger, P. Barany, B. Anderstam, R. Pecoits-Filho, E. R. Ayala, A. R. Qureshi, I. Fehrman-Ekholm, B. Lindholm ja P. Stenvinkel, „Plasma Pentosidine Is Associated with Inflammation and Malnutrition in End-Stage Renal Disease Patients Starting on Dialysis Therapy“, *Journal of the American Society of Nephrology*, kd. 14, nr 6, pp. 1614-1622, 2003.
- [13] „PubChem“, National Center for Biotechnology Information, 2017. [Võrgumaterjal]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pentosidine#section=Top>. [Kasutatud 29 04 2017].
- [14] G. Stein, S. Franke, A. Mahiout, S. Schneider, H. Sperschneider, S. Borst ja J. Vienken, „Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients“, *Nephrology Dialysis Transplantation*, kd. 16, nr 5, pp. 999-1008, 2001.
- [15] D. Slowik-Zylka, K. Safranow, V. Dziedziejko, H. Bukowska, K. Ciechanowski ja D. Chlubek, „A sensitive and specific HPLC method for the determination of total pentosidine concentration in plasma“, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, kd. 61, pp. 313-329, 2004.
- [16] P. Odetti, J. Fogarty, D. R. Sell ja V. M. Monnier, „Chromatographic Quantitation of Plasma and Erythrocyte Pentosidine in Diabetic and Uremic Subjects“, *Diabetes*, kd. 41, pp. 53-59, 1992.
- [17] T. Miyata, Y. Ueda, T. Shinzato, Y. Iida, S. Tanaka, K. Kurokawa, C. van Ypersele de Strlhou ja K. Maeda, „Accumulation of Albumin-Linked and Free-Form Pentosidine in the Circulation of Uremic Patients with End-Stage Renal Failure: Renal Implications in the

- Pathophysiology of Pentosidine," *Journal of the American Society of Nephrology*, kd. 7, pp. 1198-1206, 1996.
- [18] P. G. Peiretti, C. Medana, S. Visentin, V. Giacotti, V. Zunino ja G. Meineri, „Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species," *Food Chemistry*, kd. 126, pp. 1939-1947, 2011.
- [19] J. Ni, X. Yuan, J. Gu, X. Yue, X. Gu, R. H. Nagaraj ja J. W. Crabb, „Plasma Protein Pentosidine and Carboxymethyllysine, Biomarkers for Age-related Macular Degeneration," *Molecular & Cellular Proteomics*, kd. 8, nr 8, pp. 1921-1933, 2009.
- [20] J. I. Barzilay, K. A. Jablonski, V. Fonseca, S. E. Shoelson, A. B. Goldfine, C. Strauch ja V. M. Monnier, „The Impact of Salsalate Treatment on Serum Levels of Advanced Glycation End Products in Type 2 Diabetes," *Diabetes Care*, kd. 37, nr 4, pp. 1083-1091, 2014.
- [21] M.-L. Kasemets, *Pentosidiin-spetsiifilise antikehade testi sobivus pentosidiini analüüsiks neeruhaigete hemodialüsaadis*, Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool, 2014.
- [22] D. Giri, „High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications," *Laboratoryinfo.com*, 28 07 2015. [Vörgumaterjal]. Available: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>. [Kasutatud 01 04 2017].
- [23] „HPLC Separation Modes," Waters, 2017. [Vörgumaterjal]. Available: http://www.waters.com/waters/en_EE/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_EE. [Kasutatud 05 04 2017].
- [24] M.-I. Aguilar, „Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography," %1 *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*, Totowa, Humana Press Inc., 2004, pp. 9-22.
- [25] P. Stanton, „Ion-Exchange Chromatography," %1 *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*, Totowa, Humana Press Inc., 2004, pp. 23-43.
- [26] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004.
- [27] M. C. McMaster, *HPLC: A Practical User's Guide*, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc,

2007.

- [28] „How Does High Performance Liquid Chromatography Work?“, Waters, 2017. [Võrgumaterjal]. Available: http://www.waters.com/waters/en_EE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_EE. [Kasutatud 07 04 2017].
- [29] J. W. Dolan, „Mobile-Phase Degassing: What, Why and How“, *LCGC North America*, kd. 32, nr 7, pp. 482-487, 2014.
- [30] J. W. Dolan, „LC Pumps“, *LCGC North America*, kd. 26, nr 12, pp. 1168-1174, 2008.
- [31] J. W. Dolan, „How Does It Work? Part III: Autosamplers“, *LCGC North America*, kd. 34, nr 7, pp. 472-478, 2016.
- [32] D. Harvey, „Image and Video Exchange Forum“, 2 August 2013. [Võrgumaterjal]. Available: <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/page/4/>. [Kasutatud 14 04 2017].
- [33] J. W. Dolan, „How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors“, *LCGC North America*, kd. 34, nr 9, pp. 710-719, 2016.
- [34] R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003.
- [35] C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen ja H. L. Tai, „Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications“, *The Clinical Biochemist Reviews*, kd. 24, nr 1, pp. 3-12, 2003.
- [36] M. C. McMaster, *LC/MS: A Practical User's Guide*, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2005.
- [37] J. J. Pitt, „Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry“, *The Clinical Biochemist Reviews*, kd. 30, nr 1, pp. 19-34, 2009.
- [38] „Ionization Source Technology Overview“, ThermoFisher Scientific, 2016. [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology->

overview/ionization-source-technology-overview.html. [Kasutatud 23 04 2017].

[39] „High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS),“ University of Bristol, 2005. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>. [Kasutatud 23 04 2017].

[40] „Atmospheric Pressure Chemical Ionization,“ National High Magnetic Field Laboratory, 17 11 2015. [Võrgumaterjal]. Available: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/apci>. [Kasutatud 23 04 2017].

[41] G. L. Hortin, B. Meilinger ja S. K. Drake, „Size-Selective Extraction of Peptides from Urine for Mass Spectrometric Analysis,“ *Clinical Chemistry*, kd. 50, pp. 1092-1095, 2004.

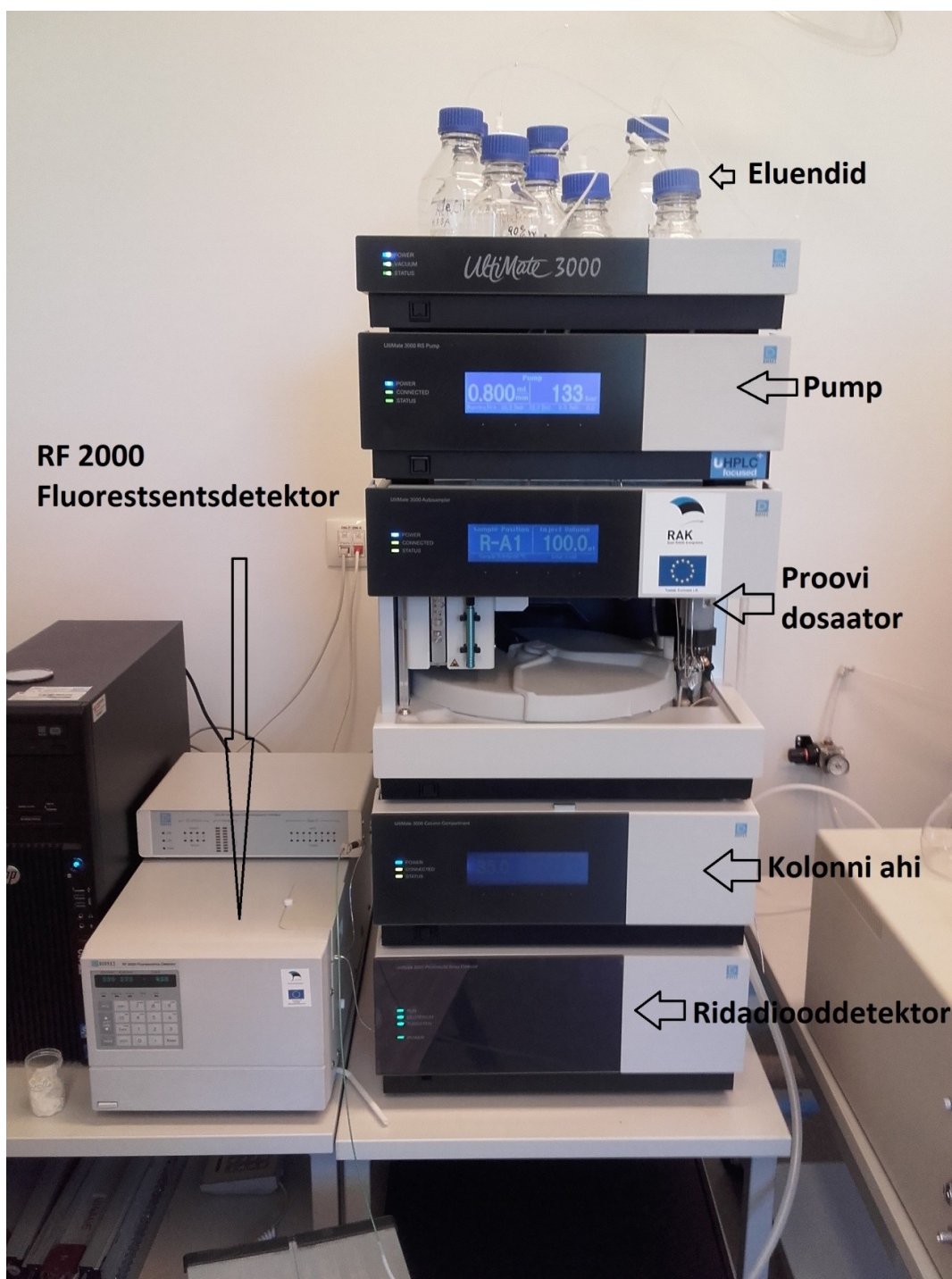
[42] B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind ja K. Mikael, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Oslo: Nordic Innovation, 2012.

Lisa 1 – Standardlahuse lahjenduste tabel

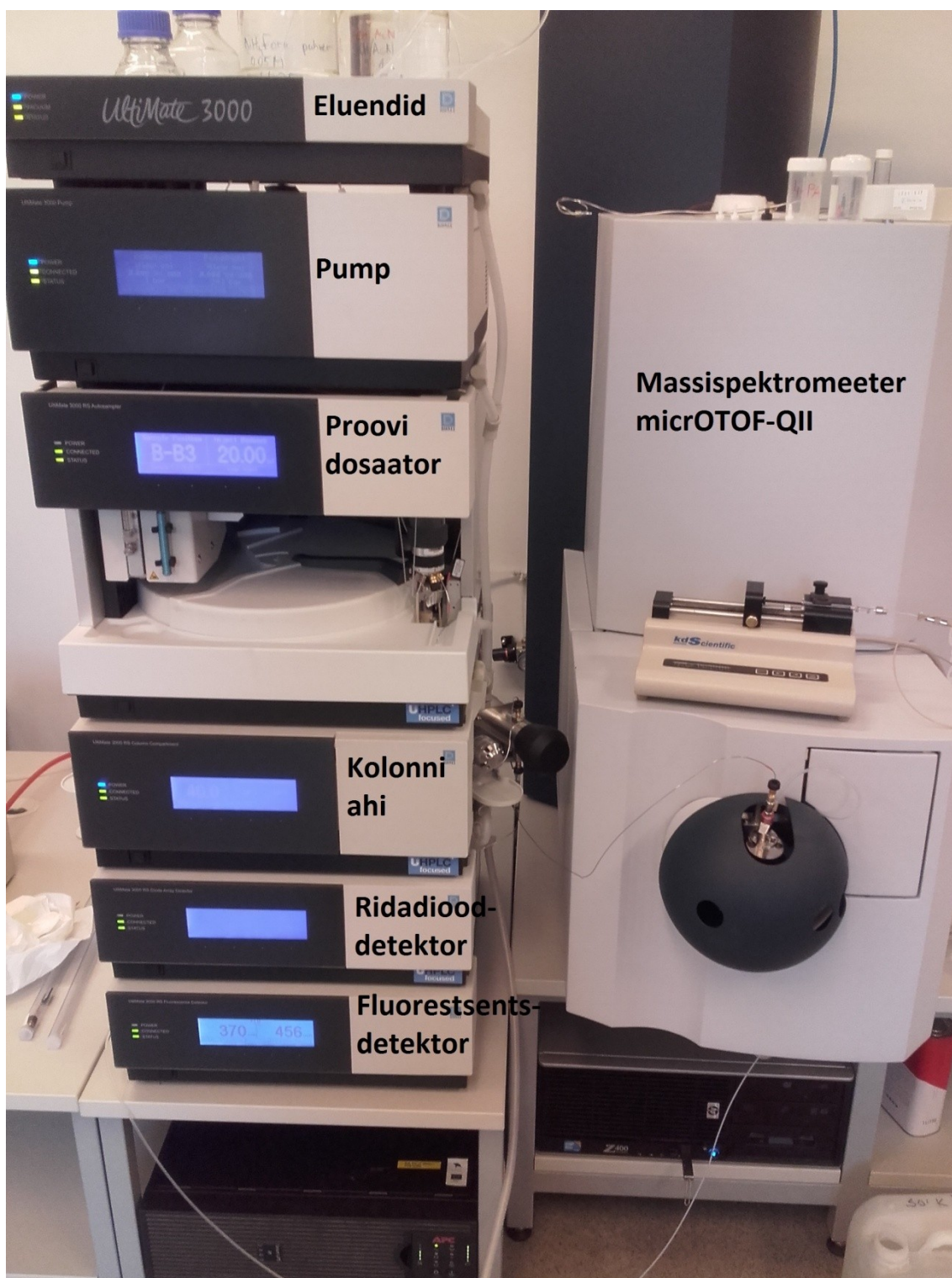
Lahuse nimi	Lahuse kogus (g)	Lisatud A puhver (g)	Lahjenduskoefitsient (korda)	Kontsentratsioon
Alglahus	-	-	-	2,53 mg/ml
St1	0,0483 (Stock)	4,9888	102,33	24,75 ng/ml
St2	0,5266 (St1)	5,0245	9,54	2,59 ng/ml
St3	0,5004 (St2)	5,0099	10,01	0,26 ng/ml
St4	0,3076 (St3)	5,9811	19,45	13,32 pg/ml
St5	0,6768 (St1)	5,2831	7,81	2,81 ng/ml
St6	0,1127 (St5)	1,3951	12,38	0,23 ng/ml
St7	0,1383 (St6)	1,4190	10,26	0,02 ng/ml
St8	0,0995 (St7)	1,4177	14,24	1,32 pg/ml

Lisa 2 – Kromatograafid

1) Kromatograafi süsteem number 1.



2) Kromatograafi süsteem number 2.



Lisa 3 – SPE kolonn

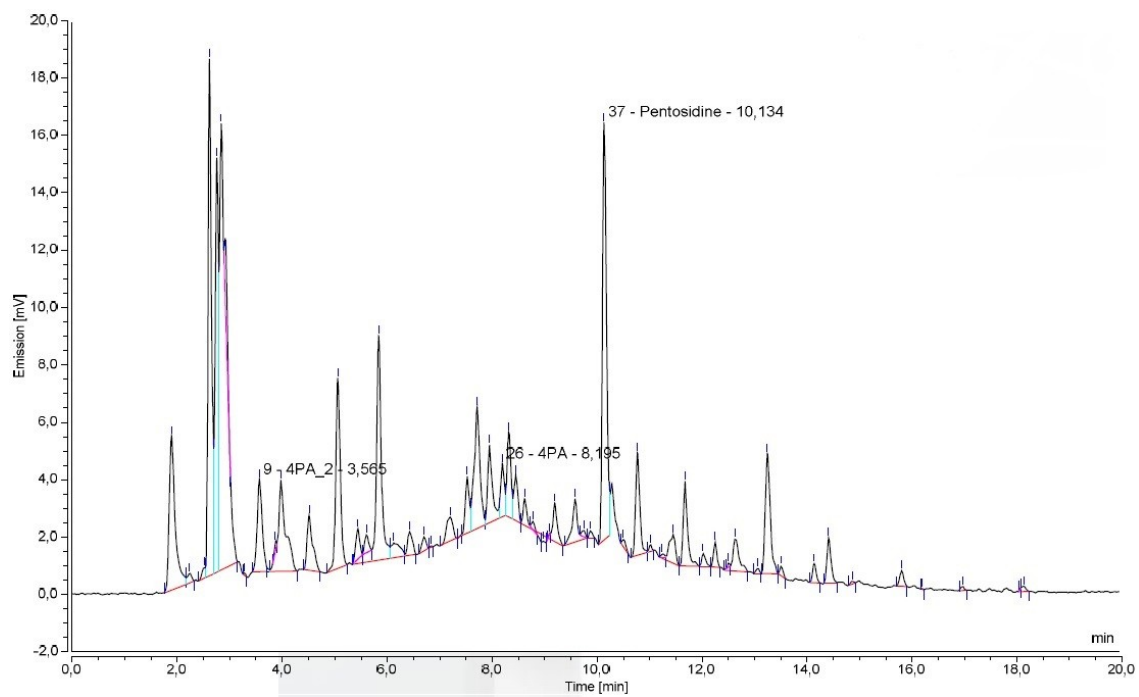
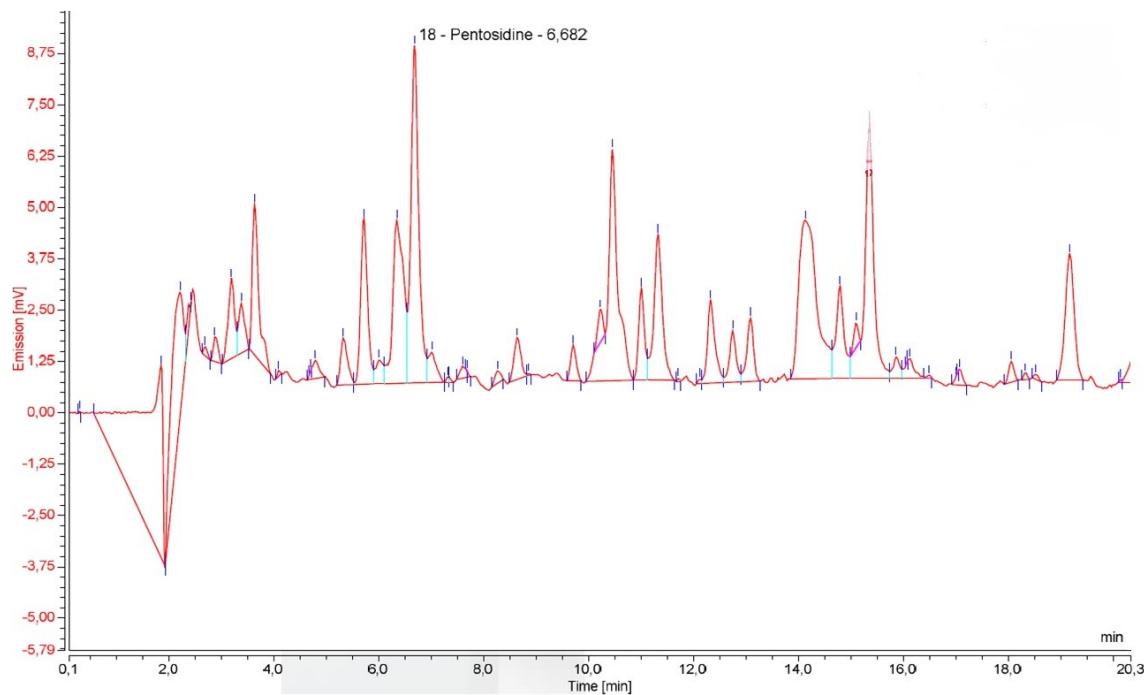
1) Strata-XL 100 µm 500 mg/6 ml



Lisa 4 – TR1 kalibratsioonikõvera mõõtetulemuste tabel

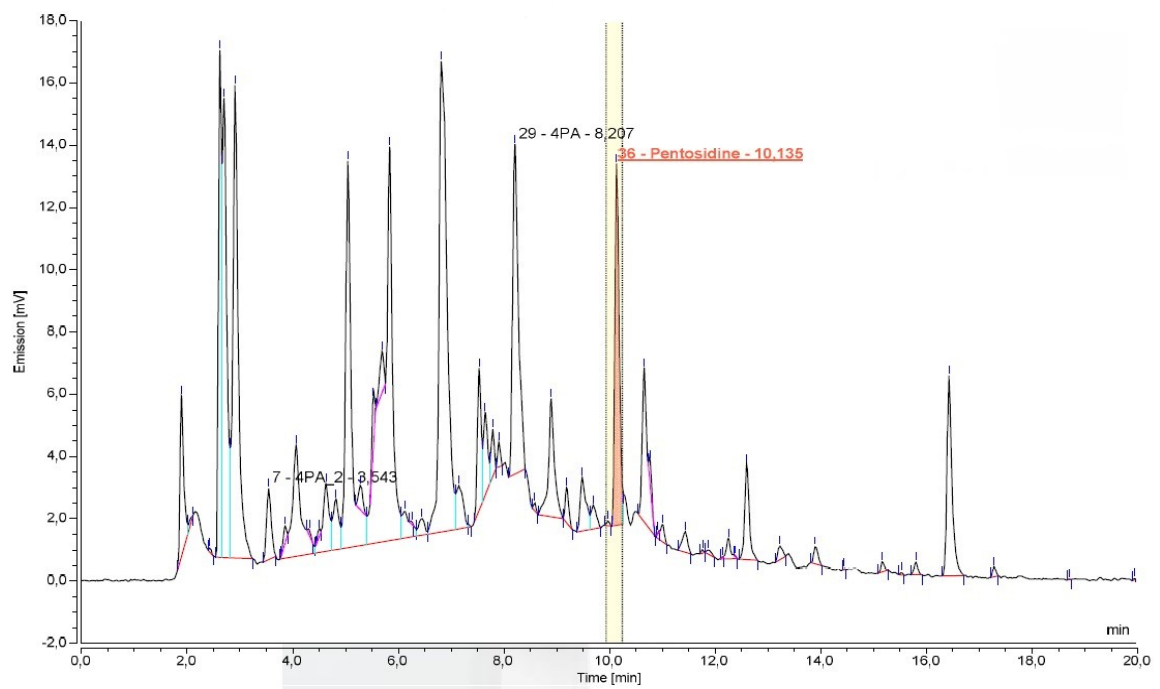
Krom. ID	Süst (µl)	Konts. (ng/µl)	Pentosidiin piigis (ng)	Piigipind (mV*min)
ST8_RD2	45	0,0013228	0,0595254	0,9315
ST8_RD2	30	0,0013228	0,0396836	0,5705
ST8_RD2	15	0,0013228	0,0198418	0,269
ST8_RD2	5	0,0013228	0,0066139	0,0793
ST7_RD1	10	0,0201631	0,2016312	3,0551
ST6_RC4	10	0,2270429	2,2704289	30,9046
ST7_RE5	60	0,0201631	1,2097874	17,8694
ST4_RB1	10	0,0133246	0,1332457	2,1129
ST4_RB1	5	0,0133246	0,0666228	1,1427
ST4_RB1	5	0,0133246	0,0666228	1,0797
ST4_RB1	20	0,0133246	0,2664913	4,3865
ST4_RB1	30	0,0133246	0,399737	6,6383
ST4_RB1	45	0,0133246	0,5996055	10,0611
ST4_RB1	60	0,0133246	0,799474	13,5016
ST4_RB1	75	0,0133246	0,9993425	16,9707
ST4_RB1	100	0,0133246	1,3324567	22,4291
ST4_RB1	75	0,0133246	0,9993425	17,0353
ST4_RB1	60	0,0133246	0,799474	13,5577
ST4_RB1	45	0,0133246	0,5996055	10,0883
ST4_RB1	30	0,0133246	0,399737	6,6918
ST4_RB1	20	0,0133246	0,2664913	4,3282
ST4_RB1	10	0,0133246	0,1332457	2,1508
ST3_RA6	10	0,2591127	2,5911272	44,1041
ST3_RA6	30	0,2591127	7,7733816	132,1248
ST3_RA6	50	0,2591127	12,955636	202,098

Lisa 5 – P1 dialüsaadi TR1 ja TR2 võrdlus

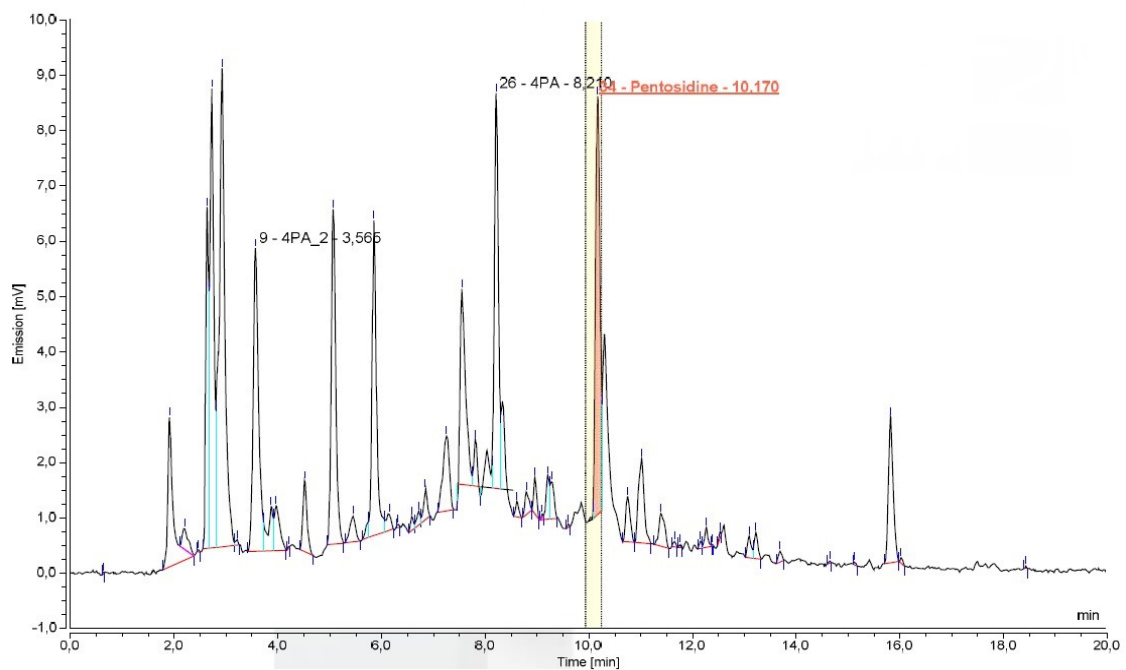


Lisa 6 – Dialüsaatide kromatograafilise eralduse võrdlused

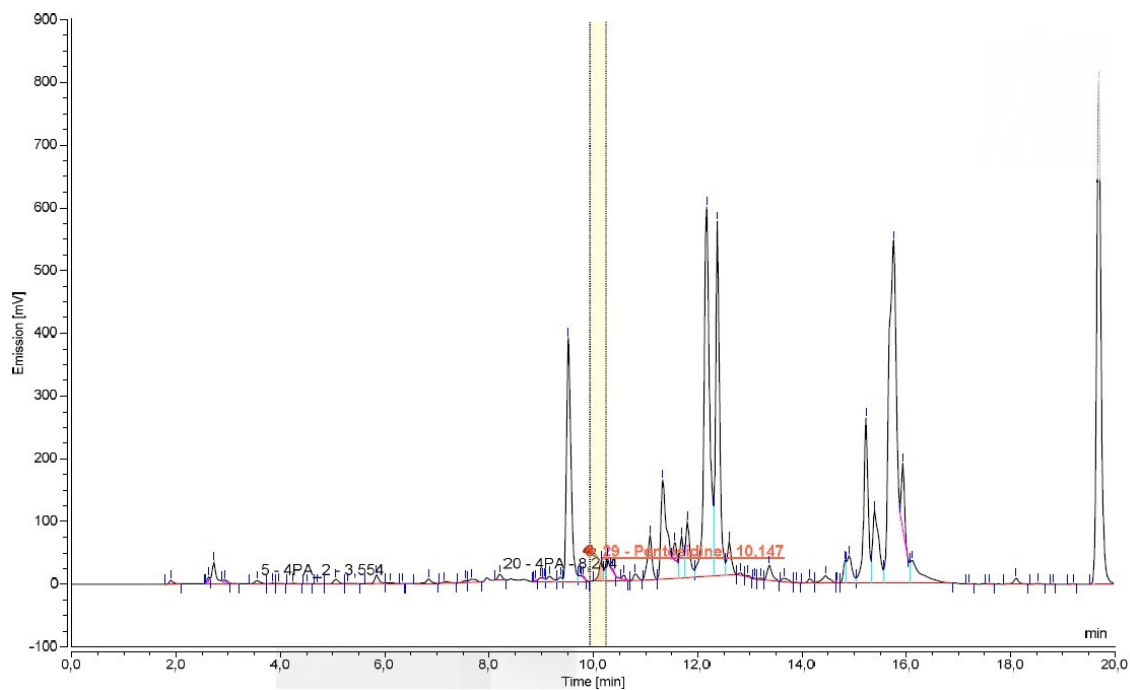
1) Dialüsaat P11 240. minuti proov, hea eraldus.



2) Dialüsaat P21 240. minuti proov, rahuldav eraldus.



3) Dialüsaat P27 240. minuti proov, problemaatiline eraldus.



**Lisa 7 – Patsientide 10. ja 240. minuti dialüsaatide
pentosidiini tulemuste tabel**

P kood	10. minuti (mV*min)	240. minuti (mV*min)	P kood	10. minuti (mV*min)	240. minuti (mV*min)
P1	1,4743	0,576	P26	6,9396	1,6965
P2	1,6247	0,2786	P27	14,5612	3,0541
P3	4,2172	0,8191	P28	3,3453	1,3427
P4	3,245	0,2571	P29	2,6555	0,0824
P5	3,0229	1,2249	P30	3,4672	0,7009
P6	5,8973	–	P31	3,199	0,8121
P7	11,9168	1,621	P32	2,4837	0,3103
P8	1,0151	0,2723	P33	1,689	1,8932
P9	8,0092	2,6836	P34	3,8492	1,2503
P10	4,6471	1,0154	P35	0,766	0,3474
P11	3,0535	1,0863	P36	2,0196	0,8422
P12	4,4225	0,9667	P37	1,2362	0,4194
P13	1,056	0,303	P38	2,0172	0,6129
P14	5,5403	0,9457	P41	6,7346	1,0973
P15	7,294	1,5707	P42	8,0591	3,6433
P16	1,409	0,4723	P43	4,9737	0,9646
P17	3,0774	1,1381	P44	5,0305	1,2216
P18	1,8561	0,3522	P45	2,8964	0,7273
P19	0,1813	0,6478	P46	17,1575	0,2779
P20	2,4097	0,2846	P47	4,697	1,1717
P21	4,5285	0,8195	P48	3,6073	0,625
P22	4,8434	2,1485	P49	2,9021	0,6262
P23	1,5171	–	P50	4,7484	0,5166
P24	2,0115	0,6573	P51	5,0409	1,3822
P25	1,7527	0,4663	P52	0,9025	0,2076

Lisa 8 – TR2 kalibratsioonikõvera mõõtetulemuste tabel

Krom. ID	Süst (µl)	Konts. (ng/µl)	Pentosidiin piigis (ng)	Piigipind (mV*min)
st4_RA5	9,4	0,0133246	0,1252509	2,0651
st4_RA5	15,5	0,0133246	0,2065308	3,4207
st8_BA5	20	0,0013228	0,0264557	0,3979
st4_GD1	3	0,0133246	0,0399737	0,6946
st4_GD1	5	0,0133246	0,0666228	1,0925
st4_GD1	7	0,0133246	0,093272	1,5624
st4_2 RA1	20	0,0133246	0,2664913	4,5701
st4_2 RA1	25	0,0133246	0,3331142	5,6581
st4_2 RA1	25	0,0133246	0,3331142	5,4713
st4_RA5	50	0,0133246	0,6662283	11,1841
st4_RA5	30	0,0133246	0,399737	6,684
st4_RA5	40	0,0133246	0,5329827	8,9747
st4_GD1	5	0,0133246	0,0666228	1,0925
st4_GD1	7	0,0133246	0,093272	1,5624

Lisa 9 – Korratavuse algandmed

10. min dialüsaadid				240. min dialüsaadid			
P kood	Paralleel 1 (mV*min)	Paralleel 2 (mV*min)	Erinevus (abs) (mV*min)	P kood	Paralleel 1 (mV*min)	Paralleel 2 (mV*min)	Erinevus (abs) (mV*min)
P1	1,474	1,267	0,207	P1	0,576	0,609	0,033
P2	1,625	1,552	0,073	P3	0,819	0,819	0,000
P5	3,023	2,923	0,100	P4	0,257	0,259	0,002
P7	11,917	11,465	0,452	P5	1,225	1,192	0,033
P9	8,009	7,531	0,479	P7	1,621	1,726	0,105
P14	5,540	5,497	0,043	P8	0,272	0,228	0,045
P20	2,410	2,394	0,016	P9	2,684	2,598	0,085
P23	1,517	1,434	0,083	P10	1,015	1,013	0,002
P26	6,940	6,301	0,638	P13	0,303	0,273	0,030
P27	14,561	12,653	1,908	P14	0,946	0,925	0,021
P28	3,345	3,281	0,064	P15	1,571	1,435	0,135
P35	0,766	0,682	0,084	P17	1,138	1,112	0,027
P46	17,158	14,416	2,742	P21	0,820	0,757	0,063
				P27	3,054	2,776	0,278
				P37	0,419	0,345	0,075
				P41	1,097	1,139	0,041
				P44	1,222	1,304	0,082
				P52	0,208	0,211	0,003
				P51	1,382	1,480	0,097