

HPLC-FLD-DAD KARAKTERISTIKE DERIVATA S-NITROZOGlutATIONA DOBIJENIH SA O-FTALALDEHIDOM

Nataša Trutić¹, Radmila Pavlović¹, Goran Nikolić², Maja Srećković¹ i Tatjana Jovanović³

S-nitrozoglutation (GSNO) nastaje S-nitrozilacijom najrasprostranjenijeg endogenog neproteinskog tiola, glutationa (GSH). Predstavlja glavni rezervoar neproteinskih S-nitrozotiola (RSNO) koji se smatraju prirodnim depoom i transportnim oblikom azot monoksida (NO). Njihova fiziološka uloga je da oslobađaju NO koji stimuliše vazodilataciju, sprečava agregaciju trombocita i nastajanje oštećenja u ishemiji/reperfuziji. Cilj rada bio je pronaći specifičnu i dovoljno osetljivu metodu za određivanje GSNO u fiziološkim uzorcima. Zato je bilo neophodno obezbediti čist GSNO standard, što je predstavljalo problem, s obzirom na to što GSNO nije hemijski stabilan. Trebalo je pronaći brz i pouzdan sintetički postupak kojim bi se dobila potrebna količina GSNO i njegovih fluorescentnih derivata sa o-ftalaldehidom (OPA). Takođe, trebalo je izvršiti spektroskopsku karakterizaciju dobijenih derivata i ispitati njihovo ponašanje u sistemu tačne hromatografije visokih performansi (HPLC). Postavili smo sintezu kojom smo dobili GSNO u čvrstom, anhidrovanom obliku sa zadovoljavajućim prinosom. Nakon UV karakterizacije dobijenog GSNO izvršena je derivatizacija GSH i GSNO sa OPA reagensom sa i bez merkaptoetanol (ME) i nastali proizvodi su analizirani HPLC uz "diode array" (DAD) i fluorescentnu (FLD) detekciju. Stvorili smo optimalne uslove reakcije koja je dovela do formiranja stabilnog i fluorescentnog tricikličnog izoindolnog derivata GSNO sa OPA-ME reagensom, čime je stvoren preduslov za razvoj HPLC metode, kojom bi se izvršila kvantifikacija GSNO-a u realnim biološkim sistemima. *Acta Medica Medianae* 2010;49(1):27-32.

Ključne reči: S-nitrozoglutation, HPLC, DAD, FLD, o-ftalaldehid

Organska hemija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu¹
Fizička hemija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu²
Fizika, Odsek za farmaciju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu³

Kontakt: Trutić Nataša
Medicinski fakultet, Katedra Hemija
Bulevar Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija
E-mail: trutic@medfak.ni.ac.rs

Uvod

Azot-monoksid (NO) nastaje in vivo iz arginina katalitičkim dejstvom NO-sintaza. Predstavlja važan intracelularni signalni molekul. Učestvuje u regulaciji brojnih fizioloških procesa u organizmu i ima ulogu medijatora u mnogim molekulskim mehanizmima koji dovode do patoloških stanja (1,2). Veoma je reaktivan slobodni radikal. Liofilan je, pa lako difunduje kroz ćelijske membrane i stvara komplekse sa mnogim „target“ molekulima u skoro svim sistemima organa. Postoji neusaglašenost stavova o učestvu NO u fiziološkim ali i patofiziološkim stanjima. Tip hemijske reakcije kojoj je podvrgnut, a koja zavisi od njegovog fluksa i okolne mikrosredine, određuje ulogu NO kao signalnog molekula ili snažnog citotoksina (3,4).

NO učestvuje u najmanje tri osnovna metabolička puta. Reaguje u cirkulaciji sa hemom hemoglobina, pri čemu nastaju nitrati i methemoglobin. U oksido-redukcionim reakcijama oksiduje se u nitrozijum katjon (NO⁺) ili se redukuje u

nitrozil anjon (NO⁻), što za posledicu ima stvaranje više reaktivnih vrsta azota, uključujući NO², N²O³ i/ili peroksinitrin anjon (ONOO⁻). Njegova primarna uloga je da aktivira enzim guanil-ciklazu (sGC) vezivanjem za hem komponentu njenog aktivnog centra i da na taj način direktno podstakne nastajanje cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP), jednog od najvažnijih medijatora lokalne i globalne ćelijske signalizacije. Uzajamno dejstvo između NO i sGC je zaslužno za mnoge biološke funkcije NO, pre svega, relaksaciju glatkih mišića i vazodilataciju, regulaciju agregacije trombocita, neurotransmisiju itd (5).

Danas je zastupljeno mišljenje da su jedinjenja sa tiolnom funkcijom (RSH) glavne mete azot-monoksida (6). Naime, nitrozonijum katjon (NO⁺), nastao oksidacijom azot-monoksida, može reagovati sa brojnim nukleofilima, kao što su amidna ili karboksilna funkcija, hidrosilna grupa, aromatični prstenovi. Međutim, u biološkim sistemima, ipak, najznačajnija je reakcija sa tiolima, pri čemu nastaju S-nitrozotiole (RSNO) (7). Ova jedinjenja se smatraju prirodnim depoom i transportnim oblikom azot monoksida. Dokazano je da učestvuju u kontroli fluksa NO kroz ćeliju, a samim tim i regulišu dostupnost NO za brojne metaboličke procese (8). Po hemijskoj strukturi su, pre svega, derivativi aminokiselina, peptida i proteina i mnogi od njih se endogeno stvaraju, kao što su S-nitrozalbumin, S-nitrozocistein i S-nitrozoglutation

(GSNO). Osim toga, sintetički RSNO derivativi, kao što su S-nitrozo-N-acetil-penicilamin (SNAP) i S-nitrozocaptopril, proizvode se u terapijske svrhe (9). Svoje farmakološko dejstvo ova jedinjenja ostvaruju oslobađajući azot-monoksid, čime se stimuliše vazodilacija, sprečava agregacija trombocita i oštećenja nastala u ishemiji/reperfuziji (10).

Zahvaljujući složenoj hemijskoj strukturi, biološki efekat S-nitrozotiola može se povezati kako sa heterolitičkim tako i sa homolitičkim mehanizmima razlaganja. Njihova biološka aktivnost dovodi ili do oslobađanja NO i/ili transfera azot-monoksida između različitih tiola putem procesa kao što je transnitrozilacija. Smatra se da je transnitrozilacija odgovorna za aktivnost mnogih RSNO in vivo (3).

S-nitrozoglutation (GSNO) je glavni rezervoar neproteinskih S-nitrosotiola koji nastaje S-nitrozilacijom glutationa (GSH) (10). Za razliku od drugih donora azot oksida, GSNO je arterio-selektivni vazodilatator i može štiti mozak poboljšavajući cerebralni krvotok i smanjujući inflamaciju u toku moždanog udara (11). Zato se javila potreba za analognim jedinjenjima koja imaju sličnu ili poboljšanu terapijsku efikasnost bez pratećih štetnih dejstava (12).

Zbog njegove važne uloge i nerazjašnjenih mehanizama koji se nalaze u osnovi njegovog nastanka i funkcije, javila se izuzetna potreba za pronalaženjem osetljive i specifične metode određivanja GSNO u fiziološkim uzorcima. Jedan od preduslova za razvoj dobre analitičke metode je posedovanje čistog GSNO standarda. Međutim, kako je hemijski nestabilan, treba ga svežeg napraviti u dovoljnoj količini brzim i pouzdanim sintetičkim postupkom. Zato je i cilj ovog rada bio da se najpre optimizuju uslovi hemijske sinteze S-nitrozoglutationa, izvrši njegova spektroskopska karakterizacija i ispita njegovo ponašanje u sistemu tečne hromatografije visokih performansi (HPLC). Zatim, da se ispita mogućnost stvaranja fluorescentnih derivata GSNO sa o-ftalaldehidom (OPA), imajući u vidu da su fluorimetrijske metode detekcije veoma ostljive i da se njima mogu određivati jedinjenja čija je koncentracija veoma niska (reda veličine nekoliko μM), što je i najčešće slučaj sa S-nitrozoglutationom.

Materijal i metode

Reagensi

Glutation (GSH), natrijum-nitrit, 2-merkaptoetanol (ME), o-ftalaldehid (OPA), dietilentriamin pantasirćetna kiselina (DTPA) su naručeni od kompanije Sigma-Aldrich Chemical Co), dok su

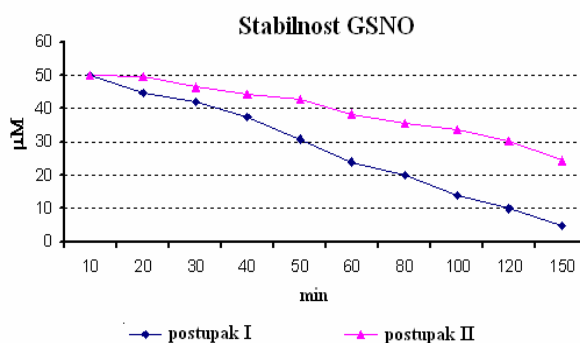
metanol i acetonitril (HPLC grade) dobijeni od Merck-a. Dva različita OPA reagensa su pripremljena i svaki je sadržao 50 mM OPA u boratnom puferu (100 mM, pH-9,4) u 10% metanolu. OPA reagens A nije sadržao druge hemikalije, dok je OPA reagens B dodatno sadržao 15 mM ME. Rastvor GSH (1 mM) je pripreman dnevno u destilovanoj vodi koja je sadržala 0,5 mM DTPA, dok je rastvor GSNO (1 mM), koji je sintetisan postupkom II, takođe, pripreman dnevno u razblaženoj HCl (10 mM). Neposredno pre derivatizacije sa OPA reagensom, matični rastvori GSH i GSNO su razblaženi do koncentracije 50 μM u fosfatnom puferu pH-7,4.

OPA Derivatizacija

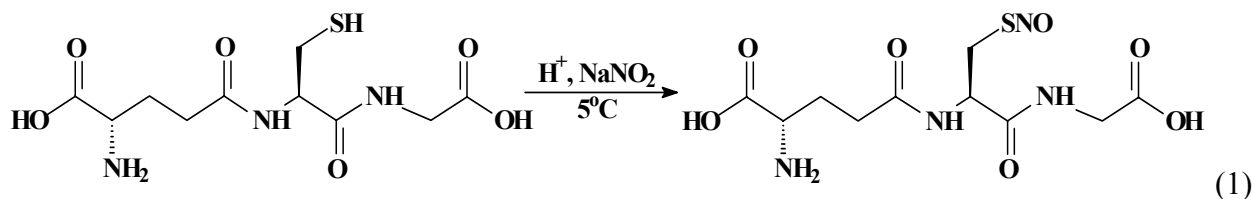
Derivatizacija GSH i GSNO sa OPA reagensom izvedena je na sobnoj temperaturi vortex-mešanjem 500 μL rastvora 50 μM GSH ili GSNO sa 100 μL odgovarajućim OPA reagensom. Alikvot od 20 μL je upotrebljen za HPLC analizu. GSH i GSNO derivatizacioni proizvodi analizirani su HPLC tehnikom uz UV i FLD detekciju i prikazani su u odeljku Rezultati i diskusija.

Sinteza GSNO

S-Nitrozoglutation je sintetisan na dva načina po originalnoj Hart-ovoj metodi (13) i uz izvesne modifikacije. Prvi postupak podrazumeva reakciju ekvimolarnih količina glutationa i natrijum-nitrita (100 mM) u 0,25 M HCl i u prisustvu 0,1 mM DTPA kao helatnog reagensa u toku 30 min na konstantnoj temperaturi od 5°C (jednačina 1). Crveno obojeni rastvor konačnog proizvoda je neutralisan 5 M rastvorom NaOH i razblažen u 20 mM fosfatnom puferu (pH-7,4).



Grafikon 1. Stabilnost GSNO sintetisanog postupkom I (u vodenom rastvoru) i postupkom II (taloženjem). Smanjenje koncentracije GSNO je praćeno u fosfatnom puferu (pH-7,4) spektrofotometrijskim određivanjem apsorbanije na λ_{max} -334 nm



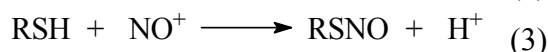
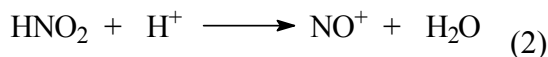
Efikasnost S-nitrozilacije je proverena HPLC sistemom A. Molarna koncentracija GSNO je izračunata pomoću Beer-Lambert-ovog zakona ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) koristeći molarni koeficijent ekstinkcije ($\epsilon_{334\text{nm}}$) od 0,85 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Koncentracija sintetisanog GSNO, kao i praćenje njegove stabilnosti, urađeno je spektrofotometrijskim određivanjem apsorpcije ($\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$) na spektrofotometaru Beckman DU 300. Drugi način sinteze GSNO (postupak II) je takođe zasnovan na reakciji glutatona sa nitritom u kiselj sredini, s tom razlikom što su uslovi reakcije promenjeni, tako da je dobijen crveni talog GSNO u anhidrovanom obliku. Ukratko, promešanom ledenom rastvoru L-glutaciona (1,228 g; 4 mmol) u vodi (5 mL) koja sadrži 2,5 M HCl (1,5 mL) dodat je u porcijama NaNO_2 (0,276 g; 4 mmol) uz stalno kontrolisanje temperature reakcione smeše (5°C). Nakon 30 minuta, crveni rastvor nastalog GSNO je tretiran acetonom (2,5 mL) a zatim acetonitrilom (2 mL) i mešan sledećih 20 min. Izdvojen je fini bledo-crveni prah koji je onda odvojen vakum filtracijom i ispran ledenom vodom (5 x 1 mL), acetonom (3 x 10 mL) i etrom (3 x 10 mL). Sintetisani GSNO (0,98 g, 2,9 mmol, 72%) se do upotrebe čuva na -20°C . Identifikacija nastalog proizvoda je izvršena pomoću HPLC metode A, a na osnovu karakterističnog UV spektra, sa apsorpcionim maximumom na 334nm.

DAD i FLD HPLC analiza

HPLC analiza je izvršena na instrumentu Agilent 1200 Series opremljenim fluorescentnim (FLD) i diode array (DAD) detektorima. Hromatografsko odvajanje i analiza sintetisanog GSNO je izvršena pomoću HPLC sistema A: kolona Zorbax Eclipse-XDB C18 RR 4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm ; izokratska mobilna faza (1 mL/min) 90% citratni pufer (50 mM, pH-6), 5% metanol i 5% acetonitril. OPA derivati GSH i GSNO su analizirani HPLC sistemom B: kolona Zorbax -SB C18 4,6 mm x 50 mm, 3,6 μm ; izokratska mobilna faza (1 mL/min) 92% fosfatni pufer (50 mM, pH-6) i 8% metanol.

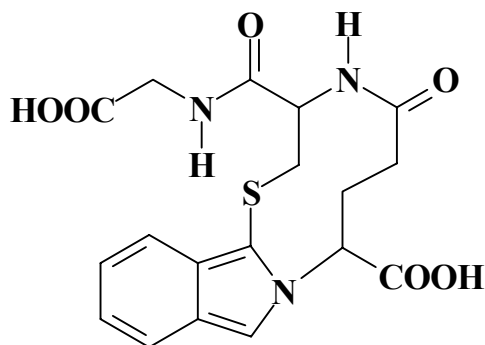
Rezultati i diskusija

Sinteza GSNO podrazumeva nitrozilaciju redukovanih glutatona, gde se kao donor NO^+ grupe koristi nitritna kiselina stvorena in situ iz natrijum-nitrita u kiselj sredini (jednačina 2 i 3).



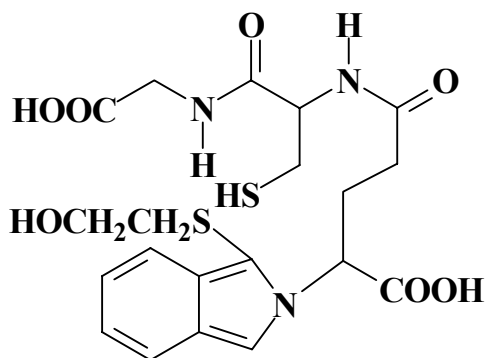
U zavisnosti od koncentracije tiola i ostalih komponenata reakcione smeše uslovi se mogu podesiti tako da se dobije ili vodeni rastvor GSNO (postupak I) ili GSNO talog (postupak II). HPLC hromatogram GSNO dobijen postupkom I, ukazuje da je efikasnost S-nitrozilacije 82% bez količina polaznih reagenasa, glutatona i/ili nitrita, koje bi se mogle detektovati. Ovako dobijen rastvor GSNO može naći svoju primenu u brojnim hemijskim sistemima, ali je njegova upotreba ograničena u biološkim modelima. Razlog tome leži u činjenici

da se u kiselom rastvoru iz GSNO stalno oslobađa izvesna količina azot-monoksida, što bi dalje ugrozilo pravilnu interpretaciju rezultata koji bi se odnosili na metaboličku ulogu egzogeno unetog GSNO. Naime, sam NO ne reaguje sa redukovanim tiolima u fiziološkim uslovima, ali u prisustvu čak i tragova kiseonika, oksiduje se do anhidrida nitritne kiseline N_2O_3 , koji je snažan nitrozilacioni reagens (3). Međutim, iako neutralisan i čuvan u fosfatnom puferu na pH-7,4, uz prisustvo DTPA kao helatnog reagensa, GSNO se na sobnoj temperaturi razlaže u toku 1h do polovine njegove početne koncentracije (Grafikon 1). Alternativna sinteza (postupak II) uz upotrebu acetona i acetonitrila omogućila je da dobijemo čvrst, anhidrovan oblik GSNO u zadovoljavajućem prinosu, za koji je HPLC analizom, takođe, utvrđeno da se može koristiti bez naknadnog prečišćavanja (Slika 1). Osim toga, rastvor GSNO pripremljen rastvaranjem odgovarajuće količine anhidrovanog oblika u fosfatnom puferu (pH-7,4) pokazao je veću stabilnost na sobnoj temperaturi – početna koncentracija se smanji za polovinu tek nakon 2,5 h (Grafikon 1).



a) OPA – GSH derivat

U odsustvu ME, GSH reaguje sa OPA i formira triciklični izoindolni derivativ (OPA-GSH).



b) OPA – GSH – ME derivat

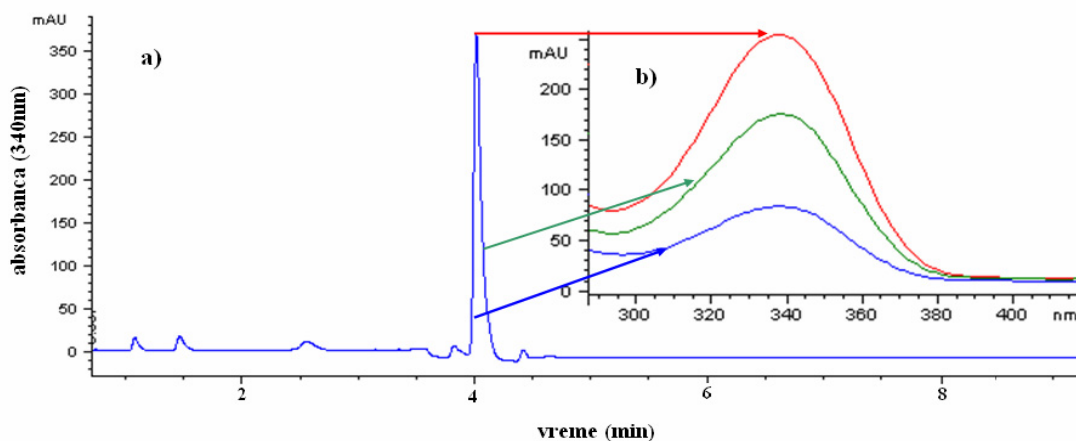
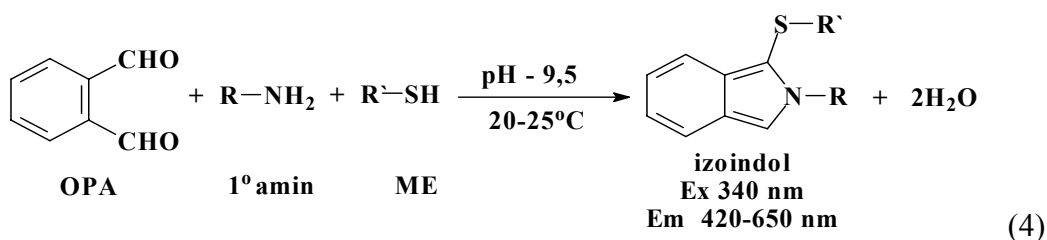
U prisustvu ME, nastaje OPA-GSH derivat, ali može nastati i izoindolni derivativ koji nosi jedan molekul GSH i ME (OPA-GSH-ME). Spori intra-molekulski nukleofilni napad merkaptogrupe glutatona na atom ugljenika sa 2-merkaptoetanolom dovodi do formiranja OPA-GSH derivativa.

Slika 2. Hemijske strukture UV-apsorpcionih i fluorescentnih derivata koji se formiraju reakcijom glutatona (GSH) sa OPA u boratnom puferu na pH 9,5 bez (a) i sa (b) ME.

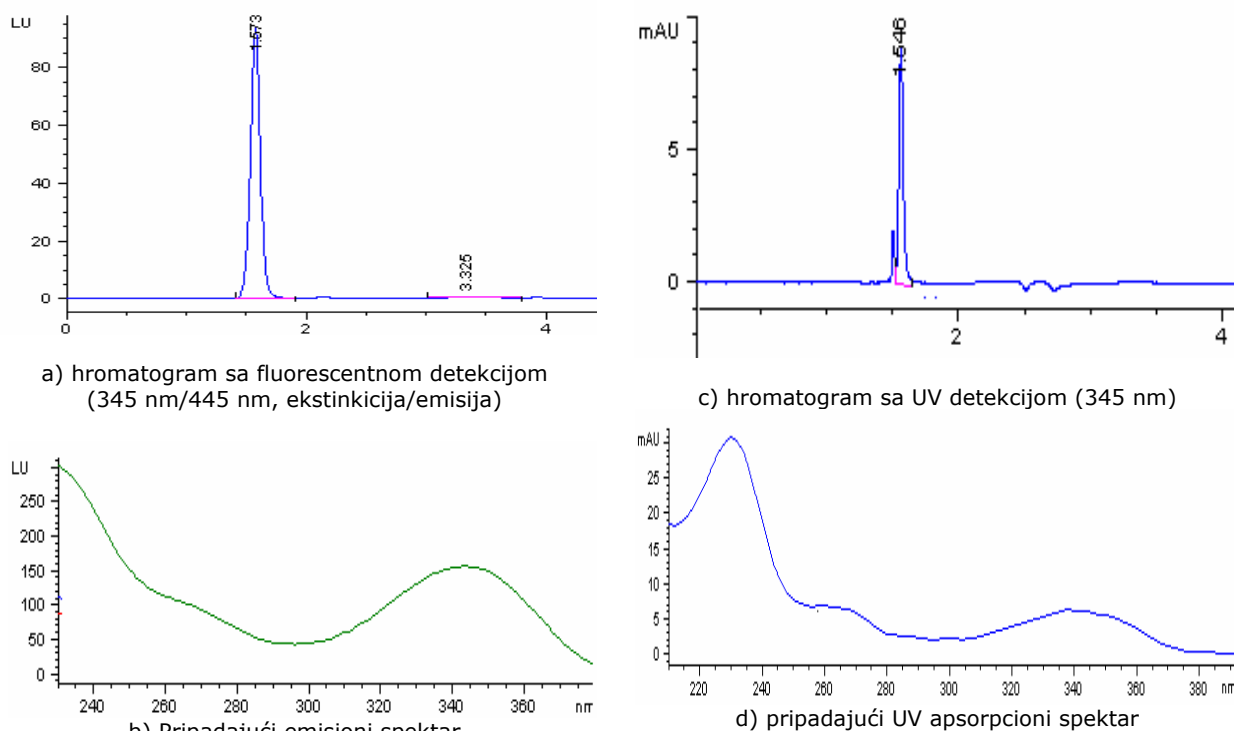
Potencijalna biološka uloga GSNO kao potentnog NO donora, pokrenula je čitavu seriju

istraživanja koja se bave razvijanjem analitičkih metoda kojima bi se odredila njegova fiziološka koncentracija (14,15). Mada, do danas ne postoji konsenzus o referentnim koncentracijama GSNO u fiziološkim tečnostima, smatra se da se kreću u intervalu od 25 nM do 80 nM u humanoj plazmi (15). Zbog toga što je molarna apsorptivnost S-nitrozo grupe GSNO mala (oko $0,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na 334 nm), UV detekcija autentičnog GSNO, nakon hromatografskog odvajanja, dozvoljava određivanje mikromolarnih koncentracija. Alternativni postupak je fluorescentna detekcija, koja je osetli-

vija i kojom se mogu dostići nanomolarne koncentracije ispitivanog jedinjenja. Sam glutation i/ili njegov metabolit GSNO ne fluoresciraju, pa ih je neophodno prevesti u odgovarajuće derivate. Jedan od najčešće korišćenih postupaka za određivanje aminokiselina i peptida pomoću fluorimetrije je derivatizacija primarne amino grupe o-ftalaldehidom (OPA) u prisustvu merkaptometanola (ME) (16), pri čemu nastaje izoindolna struktura, koja u fluorescentnom spektru ima karakterističnu ekstinciju na $\lambda_{\text{ex}}=340 \text{ nm}$ i emisiju na $\lambda_{\text{em}}=420$ (jednačina 4).



Slika 1. a) HPLC hromatogram rastvora GSNO sintetisanog postupkom II b) apsorpcioni spektar pika S-nitrozoglutationa



Slika 3. HPLC hromatogrami GSNO-OPA-ME. 500 μL GSNO (50 μM) + 100 μL OPA reagens B (OPA + ME), injektovano 20 μL

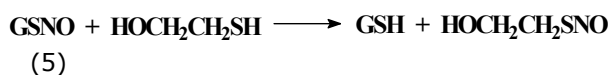
Tabela 1. Površina i karakteristike pikova dva derivata GSNO sa OPA – ME reagensom

Vreme derivatizacije	Vrsta derivata	RT (min)	Površina pika	% ukpne površine	Simetrija pika
5min	GSH-OPA	1.573	510.2	88.7	1.1
	GSH-OPA-ME	3.325	70	11.3	0.48
15min	GSH-OPA	1.572	542.2	94.3	1.047
	GSH-OPA-ME	3.330	69.4	11.9	0.488
30min	GSH-OPA	1.57	556	96.7	1.037
	GSH-OPA-ME	3.32	19	3.5	0.482
45min	GSH-OPA	1.573	553	97.5	1.033
	GSH-OPA-ME	3.325	14.5	2.552	0.484
60min	GSH-OPA	1.573	563	99.5	1.029
	GSH-OPA-ME	3.325	3.4	0.3	0.48

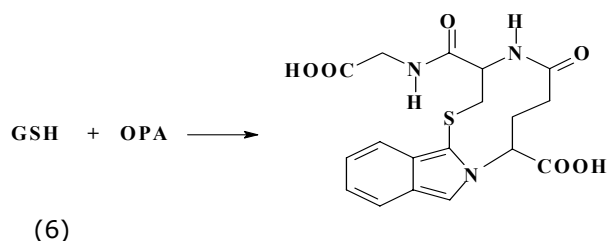
Neuschwander-Tetri i Roll (17) su pokazali da u slučaju GSH nije neophodno prisustvo ME, s obzirom na to što ovaj tripeptid već poseduje slobodnu SH grupu. Prema tome, u zavisnosti od sastava derivatizacionog reagensa GSH može dati dva derivata. Tsikas i saradnici (14) su iskoristili ovako specifično ponašanje glutaciona u reakciji njegove OPA derivatizacije, da bi razvili metodu za određivanje GSNO u humanoj plazmi.

Imajući u vidu publikacije koje se bave fluorimetrijskim određivanjem GSH i GSNO OPA derivata, mi smo u našem radu, uz izvesne modifikacije, ponovili ove procedure i dobijene produkte analizirali našim HPLC sistemom B. U reakciji GSH sa OPA dobijen je 1-alkilto-2-alkilisoindol, triciklični izoindolni derivativ (OPA-GSH) (slika 2a). Retenciono vreme (RT) ovog jedinjenja u uslovima našeg HPLC sistema B (kolona Zorbax –SB C18 4,6mm x 50 mm, 3,6 μ m; izokratska mobilna faza (1 mL/min) 92% fosfatni pufer (50 mM, pH-6) i 8% metanol) je 1,57 min. Reakcijom GSH sa OPA reagensom A nastao je gotovo trenutno (1 min) fluorescentni derivat GSH-OPA sa karakterističnom ekstincijom na λ_{ex} =345 nm i emisijom na λ_{em} =445 i maksimumom u UV spektru od 345 nm. Interesantno je da je reakcija GSH sa OPA reagensom B (u prisustvu ME) sporija nego sa OPA reagensom A, što ukazuje na to da 2-merkaptetanol ometa reakciju GSH sa OPA i dovodi prvenstveno do stvaranja derivata GSH-OPA-ME čije je retenciono vreme 3,325.

Nasuprot tome, GSNO u reakciji samo sa OPA (bez ME, reagens A) reaguje veoma sporo: nakon 120 min inkubacije, manje od 10% GSNO je pretvoreno u derivat sa retencionim vremenom 1,57. Razlog tome je blokada tiolne funkcije NO grupom i nemogućnost brzog stvaranja GSH-OPA derivata. Međutim, koristeći OPA reagens B, tj. u prisustvu 2-merkaptetanola, nastajanje UV-apsorpcionog i fluorescentno aktivnog derivativa sa RT-1,57 min je dosta ubrzano (Tabela 1, Slika 3). U slučaju GSNO 2-merkaptetanol ima specifičnu funkciju: ne da učestvuje u formiranju fluorescentnog derivata kao u slučaju opšte reakcije primarnih amina sa OPA i ME, već da reakcijom S-transnitrozilacije preuzme NO grupu od S-nitrozoglutaciona pri čemu oslobađa GSH i 2-(nitrozomerkapto)-etanol (jednačina 5).



Nastali redukovani glutation se kondenzuje sa o-ftaldehidom dajući stabilni OPA-GSH derivat (jednačina 6).



Optimalno vreme za potpunu, kvantitativnu derivatizaciju GSNO je 60 min (Tabela 1). Primećeno je da se na početku reakcije, osim željenog derivata na RT-3,325 min, pojavljuje pik jedinjenja GSH-OPA-ME ali i da nakon 60 min gotovo potpuno nestaje. Razlog tome je verovatno činjenica da je intramolekulski nukleofilni napad SH grupe ostatka cisteina OPA-derivatizovanog glutaciona na drugu aldehidnu funkciju o-ftalaldehida favorizovan u odnosu na 2-merkaptetanol (Slika 2b). Osim toga, moguće je i da je GSH-OPA-ME derivat nestabilan usled mogućih sternih smetnji. Na osnovu ove jedinstvene reakcije GSH sa OPA, prilikom koje se formira visoko stabilni i fluorescentnog triciklični izoindolni derivativ, stvorili smo uslove HPLC koji mogu biti osnova za dalji razvoj HPLC metode za određivanje GSNO u fiziološkim uzorcima.

Zaključak

Imajući u vidu veliki značaj S-nitrozoglutaciona kao potencijalnog fiziološkog vazodilatatora i inhibitora agregacije trombocita, ustanovili smo sintetičku proceduru kojom je ovo jedinjenje dobijeno u čvrstom, anhidrovanom obliku sa zadovoljavajućim prinosom. Pošto se S-nitrozoglutacion u fiziološkim uzorcima nalazi u namnomolarnim koncentracijama, javila se potreba za uvođenjem visoko osetljive HPLC metode sa fluorimetrijskom detekcijom. Za tu svrhu je neophodno bilo derivatizovati GSNO o-ftalaldehidom u prisustvu merkaptetanola i optimalizovati uslove ove reakcije koja je dovela do formiranja stabilnog i fluorescentnog tricikličnog izoindolnog derivata, čime je i stvoren preduslov za razvoj HPLC metode kojom bi se izvršila kvantifikacija GSNO u realnim biološkim sistemima.

Literatura

1. Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 12-22.
2. Sokolović D, Đinđić B, Krstić D, Petković D, Marković V, Jovanović J, Dunjić O i Jocić M Uticaj ω -nitro-L-arginin metil estera na metabolizam arginina i poliamina u moždanom tkivu pacova u toku izlaganja mikrotalasnom zračenju. *Acta Medica Medianae* 2009; 48(1): 5-11.
3. Jourdeheuil D, Jourdeheuil F, Kutchukian PS, Musab RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. *J Biol Chem* 2001; 276: 28799-805.
4. Pavlović R, Santaniello E. Peroxynitrite and nitrosoperoxycarbonate, a tightly connected oxidizing-nitrating couple in the reactive nitrogen-oxygen species family: new perspectives for protection from radical-promoted injury by flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(12): 1687-95.
5. Ozben T, Tomasi A, Free Radicals. Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, Biochemical and Clinical Aspects. 334 NATO, Science Series IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, 2003
6. Zhang Y, Hogg N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Rad Biol & Med* 2005; 38 (7): 831-8.
7. Foster MW, McMahon T, Stamler JT. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9 (4): 160-8.
8. Deljanin Ilic M, Ilic S, Lazarevic G, Kocic G, Pavlovic R, Stefanovic V. Impact of interval versus steady state exercise on nitric oxide production in patients with left ventricular dysfunction *Acta Cardiologica*, 2009; 64(2): 219-24.
9. Al Sadoni H, Ferro A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci* 2000; 98: 507-20.
10. Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 585-600.
11. Godoy R, Gonzalez-Duarte R, Albalat G. Nitrosogluthathione reductase activity of amphioux ADH3: insights into the nitric oxide metabolism. *Inter J Bio Sci* 2006; 2(3): 117-24.
12. Heikal L, Martin GL, Dailey LA. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosogluthathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelutins. *Nitric Oxide* 2009; 20(3): 157-65.
13. Hart TW. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett* 1985; 26: 2013-16.
14. Tsikas D, Sandmann J, Holzberg D, Pantazis P, Raida M, Frolich JC. Determination of s-nitrosogluthathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 1999; (273): 32-40.
15. Jourdeheuil D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Rad Biol & Med* 2000; 38 (7): 409-17.
16. Jones BN. Amino acid analysis by o-phthalaldehyde precolumn derivatization and reverse-phase HPLC. In: Shively JE, editor. *Methods of Protein Microcharacterization: A Practical Handbook*. Springer Protocols; 1986; p. 121-51.
17. Neuschwander-Tetri, BA, Roll FJ. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Anal Biochem* 1989; 179: 236-41.

HPLC-FLD-DAD CHARACTERISATION OF THE S-NITROSOGLUTATHIONE DERIVATIVES OBTAINED WITH O-PHTHALALDEHYDE

Nataša Trutić, Radmila Pavlović, Goran Nikolić, Maja Srećković and Tatjana Jovanović

S-nitrosothiols (RSNO) are considered to be natural depo and a transport form of nitric oxide (NO); their physiological activity is realized by releasing NO, which stimulates vasodilatation, prevents platelet aggregation and damages originating from ischemia/reperfusion injury. The main reservoir of non-protein RSNO is S-nitrosogluthathione (GSNO) created by S-nitrosylation of glutathione (GSH), most widespread endogenous non-protein thiol. The aim of this study was to set up an efficient GSNO synthesis and to examine the possibility of creating fluorescent derivatives of GSNO with o-phthalaldehyde (OPA), perform their spectroscopic characterization and behavior in the system of high performance liquid chromatography (HPLC). Synthesized GSNO and its OPA derivative were analyzed by HPLC system by using fluorescent (FLD) and "diode array" (DAD) detection. We developed the synthetic procedure by which GSNO was obtained in a solid, anhydrous form with a good yield. After UV characterization of the obtained GSNO, derivation of GSH and GSNO with OPA reagent, with or without mercaptoethanol (ME), was performed, and the derived products were analyzed by HPLC-FLD-DAD system. We optimized the reaction conditions that had lead to the formation of a stable and fluorescent tricyclic isoindole derivative of GSNO with OPA-ME reagent, which is essential for the development of HPLC method that would be used for the quantification of GSNO in real biological systems. *Acta Medica Medianae* 2010;49(1):27-32.

Key words: S-nitrosogluthathione, HPLC, DAD, FLD, o-phthalaldehyde