

Wykorzystanie metod planowania eksperymentu do optymalizacji procedury ekstrakcji modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów w celowanej analizie metabolomicznej



Małgorzata Artymowicz¹, Szymon Macioszek¹, Julia Jacyna¹, Joanna Dawidowska^{1,2}, Gracjana Stachewicz^{1,2}, Wiktoria Struck-Lewicka¹, Michał J. Markuszewski¹, Danuta Siluk¹

Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

E-mail: malgorzata.artymowicz@gumed.edu.pl

www.gumed.edu.pl

Wstęp

Modyfikowane nukleozydy i deoksynukleozydy są uważane za potencjalne markery różnych chorób. Ze względu na różnice w strukturze tych związków, ich jednoczesna ekstrakcja jest utrudniona. Celem badania było opracowanie procedury ekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*, SPE) 12 modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów. Wykorzystano mieszane złożo SPE, składające się z sorbentu fenylboranowego i kationowyminnego. Procedurę zoptymalizowano z użyciem metod planowania eksperymentu (ang. *Design of Experiment*, DoE). Częściowy plan czynnikowy (ang. *Fractional Factorial Design*) użyto do optymalizacji rozwaru do kondycjonowania, przemywania i elucji. Następnie zastosowano pełny plan czynnikowy (ang. *Full Factorial Design*). Optymalizowanymi czynnikami były czasy trwania etapów dozowania próbki, przemywania złoża i elucji. Odpowiedzią w obu planach było pole powierzchni analizów. W wyniku analiz ustalono poziomy ocenianych czynników.

Materiały & Metody

Wybrane modyfikowane nukleozydy i deoksynukleozydy: 2-deoksyguanozyna (2dG), 3-metylourydyna (3mU), 5-deoksyadenozyna (5dA), 6-metyloadenozyna (6mA), 8-bromoguanozyna-8 (8BrG), 8-hydroksy-2-deoksyguanozyna (8OH2dG), inozyna (I), metyltioadenozyna (MTA), N2-metyloguanozyna (N2mG), N2,N2-dimetyloguanozyna (N2,N2-dmG), pseudouridyna (Pse), urydyna (U)

Aparatura: Ultra wysokosprawny chromatograf ciekłowy z detektorem UV z matrycą fotodiodową (UHPLC-DAD, 1290 Infinity, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)

Parametry metody chromatograficznej

- Kolumna: Zorbax SbAq (3,0 x 100 mm, 3,5 μm), (Agilent Technologies)
- Faza ruchoma: A: woda+0,1% kwas mrówkowy
B: metanol+0,1% kwas mrówkowy
- Objętość dozowanej próbki do kolumny: 2 μl
- Analityczna długość fali: 254 nm
- Czas ekwilibracji kolumny: 7 min

Tabela 1. Parametry metody chromatograficznej.

Czas [min]	% A	% B	Prędkość przepływu fazy ruchomej [ml/min]	Temperatura kolumny [°C]
0	99	1	0,35	45
13	83	17		
17	75	25		
18	10	90		
20	10	90		

Złożo SPE: Bond Elut PBA 200 mg/PCX 60 mg, 3 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)

Pierwotnie opracowana procedura SPE:

- Kondycjonowanie:** 3 ml 0,5% kwasu mrówkowego w mieszaninie metanol: woda (1:1, v/v); 3 ml 0,25M octanu amonu o pH 9,5
- Nanoszenie próbki:** 1 ml mieszaniny standardów o pH 9,5 (czas: 10 min)
- Przemywanie:** 1 ml 0,2% kwasu mrówkowego w wodzie (czas: 3 min)
- Elucja:** 1 ml 0,5% kwasu mrówkowego w mieszaninie metanol: woda (1:1, v/v; czas: 5 min); 1 ml NH₃ w roztworze metanol: acetonitryl (1:1, v/v; czas: 5 min)

Optymalizacja procedury SPE

Częściowy plan czynnikowy (32 eksperymenty + 6 powtórzeń punktu centralnego) - czynniki:

- Stężenie procentowe roztworu kwasu mrówkowego (kondycjonowanie)
- Wartość pH octanu amonu (kondycjonowanie)
- Stężenie procentowe roztworu kwasu mrówkowego (przemywanie)
- Stężenie procentowe roztworu kwasu mrówkowego (elucja)
- Objętość roztworu kwasu mrówkowego (elucja)
- Objętość roztworu amoniaku (elucja)

Pełny plan czynnikowy (16 eksperymentów + 4 powtórzenia punktu centralnego) - czynniki:

- Czas trwania etapu nanoszenia próbki
- Czas trwania etapu przemywania złoża
- Czas trwania etapu elucji roztworem kwasu mrówkowego
- Czas trwania etapu elucji roztworem amoniaku

Odpowiedź: pola powierzchni 12 analizów (cel: wzrost) + pole powierzchni 2 produktów rozkładu (ang. *Contaminant 1* i *Contaminant 2*) zaobserwowanych podczas etapu opracowywania pierwotnej metody SPE (cel: spadek)

Plany eksperymentów opracowano z wykorzystaniem programu JMP (SAS, wersja 8.0, SAS Institute, Cary, NC, USA)

Tabela 2. Plan eksperymentalny użyty do optymalizacji procedury ekstrakcji SPE: (+): najwyższy poziom testowanego czynnika, (-): najniższy poziom ocenianego czynnika, (0): punkt centralny ze średnią wartością testowanego czynnika.

Nr eksperymentu	Kondycjonowanie: % kwasu mrówkowego (1:1, v/v)	Kondycjonowanie: pH 0,25M buforu octanu amonu	Przemywanie: % kwasu mrówkowego w wodzie	Elucja: % kwasu mrówkowego w MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Elucja: objętość kwasu mrówkowego w MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Elucja: objętość 5% NH ₃ w MeOH:ACN (1:1, v/v)
1	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
2	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
3	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
4	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
5	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
6	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
7	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
8	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
9	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
10	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
11	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
12	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
13	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
14	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
15	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
16	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
17	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
18	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
19	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
20	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
21	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
22	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
23	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
24	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
25	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
26	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
27	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
28	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
29	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
30	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
31	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
32	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
33	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
34	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
35	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
36	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
37	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75
38	0,5	10,5	0,2	0,5	1,25	0,75

Tabela 3. Plan eksperymentalny użyty do optymalizacji czasu etapów procedury SPE: (+): najwyższy poziom testowanego czynnika, (-): najniższy poziom ocenianego czynnika, (0): punkt centralny ze średnią wartością testowanego czynnika.

Nr eksperymentu	Schemat eksperymentu	Czas nanoszenia próbki [min]	Czas przemywania [min]	Czas elucji kwasowej [min]	Czas elucji zasadowej [min]
1	0	7,5	2	3,5	3,5
2	- + - -	5	3	2	2
3	- + - -	5	3	2	5
4	- + - -	10	3	2	5
5	- + - -	5	3	5	5
6	- + - -	10	3	5	5
7	- + - -	5	1	2	2
8	- + - -	10	1	2	5
9	- + - -	10	3	2	2
10	- + - -	10	3	5	2
11	- + - -	5	1	5	5
12	0	7,5	2	3,5	3,5
13	- + - -	5	1	2	5
14	- + - -	10	3	2	5
15	- + - -	5	3	5	2
16	- + - -	10	1	5	2
17	0	7,5	2	3,5	3,5
18	- + - -	5	1	2	5
19	- + - -	10	1	5	5
20	- + - -	5	1	5	2

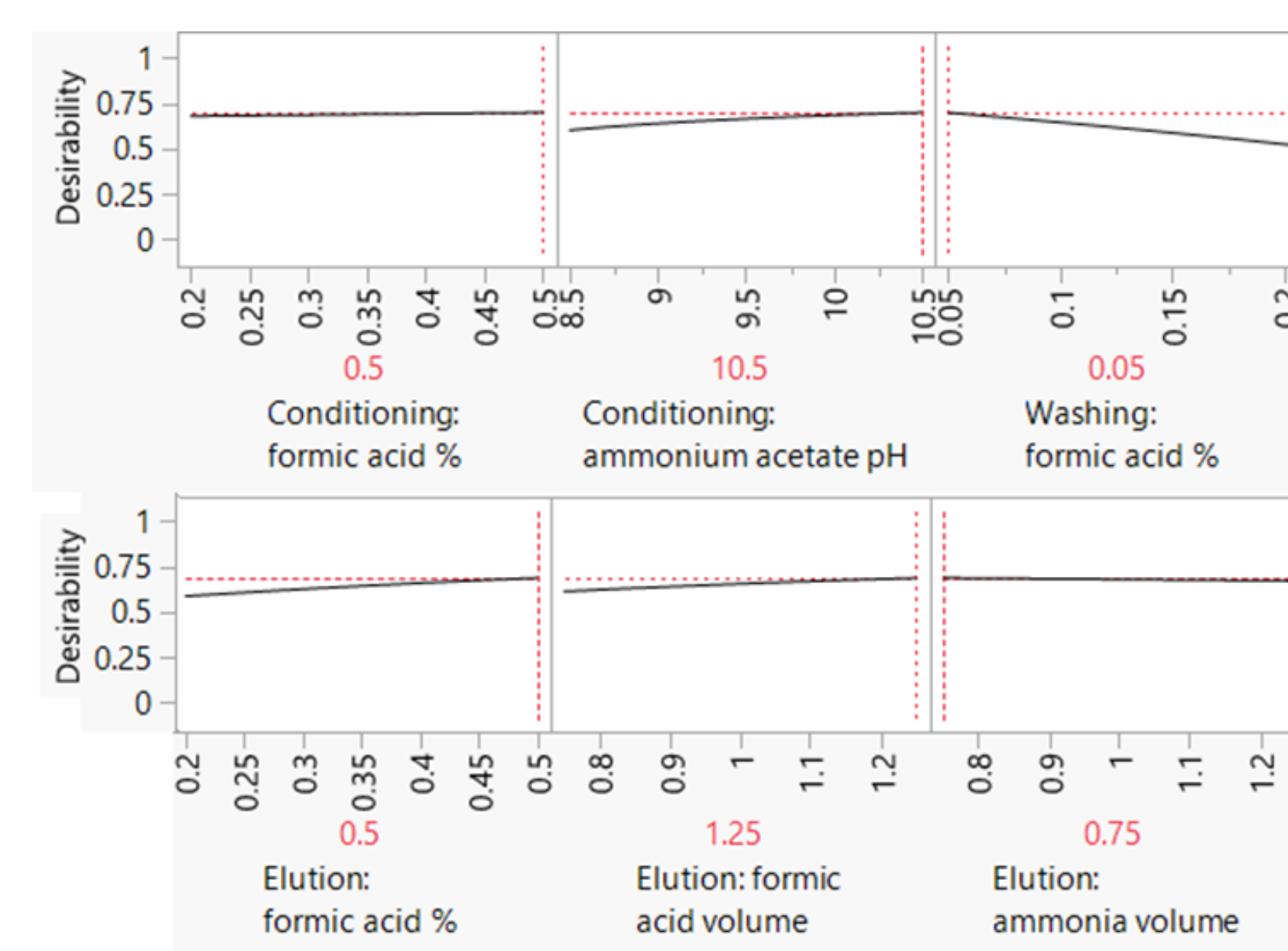
Wyniki

Częściowy plan czynnikowy

- Dla każdej odpowiedzi, istotność modelu prognostycznego została udowodniona, jeżeli wartość p była mniejsza niż 0,05 oraz wynik testu braku dopasowania (ang. *lack of fit*) był nieistotny.
- W wyniku analiz statystycznych, otrzymano 7 istotnych modeli.
- Dla modeli istotnych statystycznie wykorzystano funkcję użyteczności (ang. *desirability function*), aby wybrać optymalne wartości czynników w testowanych zakresach.
- Wybrane wartości optymalizowanych czynników:
 - Kondycjonowanie- % kwasu mrówkowego w MeOH:H₂O (1:1, v/v): **0,5**
 - Kondycjonowanie- pH 0,25M buforu octanu amonu: **10,5**
 - Przemywanie- % kwasu mrówkowego w wodzie: **0,05**
 - Elucja- % kwasu mrówkowego w MeOH:H₂O (1:1, v/v): **0,5**
 - Elucja- objętość kwasu mrówkowego MeOH:H₂O (1:1, v/v): **1,25**
 - Elucja- objętość 5% NH₃ w MeOH:ACN (1:1, v/v): **0,75**

Tabela 4. Czynniki, które znacząco wpływają na wybrane odpowiedzi dla istotnych modeli.

Odpowiedź	Czynnik istotny	Obliczone	Wartość p
2dG	Kondycjonowanie: pH octanu amonu	17,03	< 0,0001
	Przemywanie: % kwasu mrówkowego	-47,82	< 0,0001
	Elucja: objętość kwasu mrówkowego	13,75	< 0,0001
2mG	Kondycjonowanie: % kwasu mrówkowego	6,44	0,0249
	Elucja: % kwasu mrówkowego	5,62	0,0499
	Elucja: objętość kwasu mrówkowego	-4,45	0,027
2,2dmG	Kondycjonowanie: pH octanu amonu	-51,70	< 0,0001
	Elucja: % kwasu mrówkowego	46,22	< 0,0001
	Elucja: objętość kwasu mrówkowego	23,39	0,0002
8BrG	Kondycjonowanie: pH octanu amonu * Elucja: objętość kwasu mrówkowego	16,49	0,0008
	Elucja: % kwasu mrówkowego	-14,48	0,0081
	Elucja: objętość kwasu mrówkowego	-11,33	0,019
MTA	Kondycjonowanie: pH octanu amonu	-7,79	0,0052
	Elucja: % kwasu mrówkowego	23,47	< 0,0001
	Elucja: objętość kwasu mrówkowego	22,42	< 0,0001
Zanieczyszczenie 1	Kondycjonowanie: pH octanu amonu	-189,7	< 0,0001
	Elucja: % kwasu mrówkowego	-15,89	0,0486
	Przemywanie: % kwasu mrówkowego	-16,13	0,0006
Zanieczyszczenie 2	Kondycjonowanie: pH octanu amonu	-189,7	< 0,0001
	Elucja: % kwasu mrówkowego	-15,89	0,0486
	Przemywanie: % kwasu mrówkowego	-16,13	0,0006



Rycina 1. Optymalne wartości czynników wybrane przez funkcję użyteczności.

Całkowity plan czynnikowy

- Zbudowano model regresji wielorakiej obejmujący 15 efektów (efekty główne i interakcje do czwartego rzędu) dla każdej z 13 odpowiedzi, tj. 12 nukleozydów i 1 produktu rozkładu.
- Obliczone modele miały istotną statystycznie wartość p dla 7 badanych odpowiedzi: Ino, 3mU, 2dG, 2mG, 5dA, 6mA oraz produktu rozkładu i zostały wykorzystane do dalszej analizy.
- Jednakże dla Ino oraz 3mU test braku dopasowania był istotny, z tego powodu te dwa modele zostały wykluczone z dalszych analiz.
- W badanym obszarze eksperymentalnym jako najkorzystniejsze ustawienia dla istotnych modeli wybrano: czas trwania etapu nanoszenia próbki- **5 min**, czas przemywania próbki- **3 min** oraz czas elucji kwasowej i zasadowej- **5 min**.
- Optymalne ustawienia czynników zapewniają najwyższe wartości pola powierzchni pików średnio dla wszystkich badanych analizów, przy jednoczesnym utrzymaniu pola powierzchni produktu rozkładu na możliwie najniższym poziomie.
- Zoptymalizowana metoda pozwoliła na całkowite skrócenie czasu trwania ekstrakcji z ok. 23 min do 18 min.

Tabela 5. Modele istotne statystycznie uzyskane podczas optymalizacji czasu trwania poszczególnych etapów procedury SPE.

Odpowiedź	Wartość p	Wartość p testu braku dopasowania
2dG	0,02	0,66
2mG	0,03	0,14
5dA	0,05	0,41
6mA	0,03	0,10
Zanieczyszczenie 1	0,02	0,74

Tabela 6. Wartości odzysku uzyskane dla procedury ekstrakcji przed oraz po optymalizacji czasu trwania poszczególnych etapów.

Związek	Odzysk: procedura przed optymalizacją czasu trwania etapów ekstrakcji [%]	Odzysk: procedura po optymalizacji czasu trwania etapów ekstrakcji [%]
Pse	98,5	82,7
U	91,2	94,2
Ino	87,1	88,7
3mU	85,9	88,0
2dG	42,6	50,2
2mG	79,9	82,1
5dA	76,2	80,4
8OH2dG	21,3	26,6
6mA	79,7	85,9
2,2dmG	73,5	76,9
8BrG	76,8	80,1
MTA	73,2	76,6
Średnia	73,8	76,0

Wnioski

DoE stanowi cenne narzędzie do opracowywania i optymalizacji procedur ekstrakcji. Ekstrakcję nukleozydów i deoksynukleozydów przeprowadzono przy użyciu komercyjnego sorbentu składającego się z dwóch złóż: kwasu fenylboranowego i żywicy kationowymiennych. Średni odzysk ostatecznie zoptymalizowanej procedury ekstrakcji wynosił 76%. Dla dwóch deoksynukleozydów (2dG, 8OH2dG) uzyskany odzysk był na niższym poziomie, odpowiednio 50% i 26,6%. W przypadku większości badanych substancji korzystne okazało się zastosowanie podejścia DoE. Opracowana metoda zostanie zastosowana do analizy próbek moczu pobranych od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego poddawanych zabiegom chirurgicznym.

Uwagi: Badanie finansowane z budżetu Narodowego Centrum Nauki, grant Preludium nr 2018/29/N/NZ7/02299.

Ostatecznie zoptymalizowana procedura SPE

- Przygotowanie próbki: próbkę zmieszać z 0,1M mrówczanem amonu o pH 9,5
- Kondycjonowanie: 3 mL 0,5% kwasu mrówkowego w MeOH:H₂O (1:1, v/v), 3 mL 0,25M octanu amonu o pH 10,5
- Nanoszenie próbki: 1 mL przygotowanej próbki, czekać 5 min
- Przemywanie: 1 mL 0,05% kwasu mrówkowego w H₂O, czekać 3 min
- Elucja: 1,25 mL 0,5% kwasu mrówkowego w MeOH:H₂O (1:1, v/v), czekać 5 min; 0,75 mL 5% NH₃ w MeOH:ACN (1:1, v/v), czekać 5 min