

(19) HU

SZABADALMI LEÍRÁS

(11)

199630 B

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

(22) Bejelentés napja: 1987.12.10.

(21) 5564/87

(51) Int.Cl.₅
G 01 N 33/60
A 61 K 49/02
C 07 C 405/00

(41) (42) Közzététel napja: 1989.10.30.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.02.28.

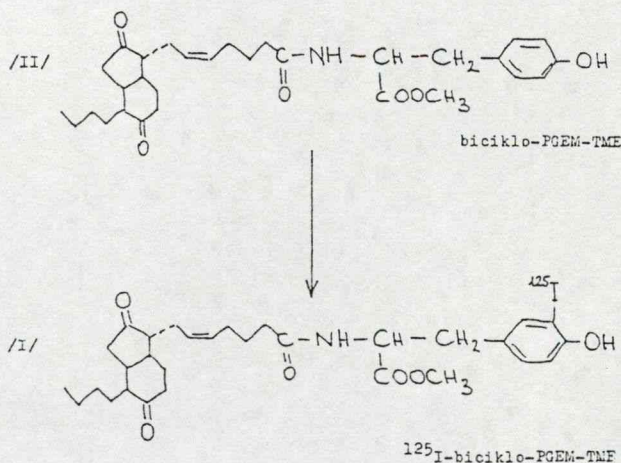
(72) Feltalálók:
dr. MUCHA István, 70%,
HÖRCHER Andrea, 20%,
FAZEKAS Jolán, 10%. Budapest (HU)

(73) Szabadalmas:
MTA Izotópkutató Intézete, Budapest
(HU)

(54) ELJÁRÁS 11-DEOXI-13,14-DIHIDRO-15-KETO-11B,16E- -CIKLOPROSZTAGLANDIN E₂ TARTALOM RADIOIMMUNOLÓGIAI MEGHATÁROZÁSÁRA ÉS AZ EHEZ ALKALMAZOTT JÓD-125 IZOTÓPPAL JELZETT RADIOLIGANDUM ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány megjavítja a közegminták 11-deoxi-13,14-dihidro-15-keto-11B,16E-cikloprosztaglandin E₂ tartalmának (biciklo-PGEM tartalom) antigén-antitest reakciós meghatározását annak révén, hogy a találmány szerint kedvező feltételek között előállítható új szerkezetű radioligandot, (I) általános képletű, jód-125 izotóppal jelzett biciklo-PGEM-jódtirozin-metilésztert alkalmazunk, amelynek fajlagos aktivitása kiemelkedően magas, és ezáltal a meghatározás érzékenysége néhány pikogramm/milliliter. A találmány szerint az (I) képletű radioligandot úgy állíthatjuk elő, hogy a (II) képletű biciklo-PGEM-tirozin-metilésztert nagy fajlagos aktivitású Na¹²⁵I-dal reagáltatjuk.



A találmány tárgya eljárás a prosztaglandin E_2 bomlékony biológiai metabolitja, a 13,14-dihidro-15-keto-prosztoglandin E_2 (továbbiakban: PGEM) radioimmunológiai meghatározására annak kémiai átalakítással stabilizált származékán, a 11-deoxi-13,14-dihidro-15-keto-11B,16E-ciklo-prosztoglandin E_2 -n (továbbiakban: biciklo-PGEM) keresztül, melynek során ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú PGEM oldatokban, illetve a mérendő mintákban a PGEM-et biciklo-PGEM-mé alakítjuk, majd jód-125 izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású biciklo-PGEM származék mint nyomjelző anyag (továbbiakban: radioligandum vagy tracer) specifikus antitesthez való kötődésének változását mérjük a standard oldatok és a meghatározandó minták jelenlétében, és a minták által okozott kötősváltozás alapján számítjuk azok hatóanyagtartalmát.

A találmány szerint ebben az immunokémiai reakcióban tracerként olyan, egyes prosztoglandin típusokra már korábban sikerrel alkalmazott radioligandokkal analóg szerkezetű, származékot használunk, mely a találmány tárgyát képező prosztoglandin típusra még nem ismert.

A találmány tárgya továbbá ezen új szerkezetű radioligand előállítására szolgáló eljárás.

A különböző kémiai szerkezetű prosztoglandinok egyik legfontosabb képviselője a prosztoglandin E_2 (PGE_2). Mivel ez az anyag — a többi prosztoglandinhoz hasonlóan — enzimátikus úton igen gyorsan metabolizálódik, PGEM-mé alakul át, a PGE_2 életani koncentrációjának mérése a PGEM koncentráció meghatározásával célszerű. Maga a PGEM azonban szintén bomlékony vegyület; kémiai úton, vízvesztéssel és intramolekuláris Michael addícióval biciklo-PGEM-mé alakul át. (Prostaglandins 19:917,1980; Prostaglandins 19:933, 1980) A jellemző átalakításokat az A folyamatábra szemlélteti.

Mivel ez az átalakulás önmagában nem teljes, és a minta feldolgozási körülményeitől függően változhat, ezért olyan reakciókörülményeket kell választani, amely mellett a PGEM kvantitatíve biciklo-PGEM-mé alakul át. Az így kapott stabilis származék már radioimmun meghatározásra alkalmas.

Az igen alacsony élettani koncentrációk miatt a radioimmun módszer szinte kizárólagos érvényű. Erre az eddigi források kizárólag trícium izotóppal jelzett tracer alkalmaztak. (Meth. Enzymol. 86:306,1982; J. Pharmacol. Exp. Ther. 220:229,1982; Prosta. Leuk. Med. 9:549,1982; J. Clin. Endocrinol. Metab. 57:101,1983; Prosta. Leuk. Med. 13:249, 1984; Biol. Psychiatry 21:1024,1986.)

A tríciummal jelzett tracer elvi előnye, hogy e módszernél a radioligandum és az inaktív ligandum kémiaileg azonos molekulák (ún. „homológ radioimmunoassay”). További előnye, hogy a módszerhez szükséges megfe-

lelően nagy fajlagos aktivitás biztosítható, ugyanakkor az alkalmazott izotóp felezési ideje nem túl rövid.

Más prosztoglandin típusok esetében a tríciummal jelzett tracer helyett sikerrel alkalmaznak olyan radioligandumokat, amelyek prosztoglandin alapmolekulához kötött funkciós csoporton jód-125 izotópot tartalmaznak. (Eur. J. Clin. Invest. 5:311,1975; Biochim. Biophys. Acta 431:139,1976; Anal. Biochem. 87:343,1978; Prosta. Med. 4:399,1980; Prostaglandins 16:277,1978; Adv. Prosta. Thromb. Res. 6:167,1980; Izotóptechnika, 22:190,1979; J. Chromatography 189:433,1980 Mucha István: Kandidátusi értekezés 1985.)

A jód-125 jelzett tracer előnye a tríciummal jelzethez képest, hogy fajlagos aktivitása annak mintegy tízszerese, és ezáltal a meghatározás érzékenysége jelentősen növelhető, felhasználása ugyanakkor gazdaságos is, mivel mérés technikája gyorsabb, egyszerűbb, és olcsóbb, és a radioimmun meghatározáshoz szükséges specifikus antitest igénye is lényegesen kevesebb.

Alkalmazásának egyik lehetséges hátránya elvi jellegű; mivel ezen meghatározási módszernél a radioligandum és az inaktív ligandum kémiaileg különböznek (ún. „heterológ radioimmunoassay”), a nagyobb fajlagos aktivitás csak abban az esetben párosul érzékenység-növekedéssel, ha a radioligandum immunspecifitása a kémiai átalakítás után is változatlan marad.

A jód-125 izotóppal jelzett tracer felhasználásának gyakorlati hátránya, hogy az izotóp felezési ideje rövid, és a vele való műveletek sugárveszélye nagyobb a tríciuménál.

A találmány alapja az a felismerés, hogy egyéb kismolekulájú anyagokkal, így különböző prosztoglandinokkal is — analóg módon, a biciklo-PGEM radioimmun meghatározása is lehetséges jód-125 izotóp felhasználásával, ha az alapmolekulához tirozin-metilészter csoportot kapcsolunk, és ezt mint prosztetikuss csoportot jód-125 izotóppal szelektíven jelöljük. Az eljárás feltétele, hogy rendelkezünk a módszerhez szükséges alkalmas titerű, biciklo-PGEM-re és annak jód-125-tel jelzett származékára azonos affinitású specifikus antitesttel, valamint a megfelelő nagy fajlagos aktivitású jód-125-tel jelzett tracerrel.

A találmány tárgya tehát antigén-antitest reakciós meghatározás, mely az ismert eljárásoktól abban különbözik, hogy tríciummal jelzett tracer („homológ” radioligand) helyett jód-125-tel jelzett tracer (heterológ” tracer) alkalmazunk.

Ennek során úgy járunk el, hogy ismert mennyiségű különböző koncentrációjú PGEM standard oldatokat, valamint a mérendő mintákat azonos módon lúgos pH-n biciklo-PGEM-mé alakítjuk, majd a radioligandnak specifikus antitesthez való kötődését mérjük ezek jelenlétében. Az így kapott értékekből az ismeretlen minták által okozott kötősváltozások-

hoz tartozó biciklo-PGEM koncentrációkat kiszámítjuk.

A mérést úgy végezzük, hogy a tracert, a hígítási sorozat szerint különböző mennyiségű inaktív biciklo-PGEM-t, illetve mérendő mintát, specifikus antitesttel inkubáljuk, majd az antitesthez kötött, ill. nem kötött frakciókat elválasztjuk, és mérjük a kötött frakció radioaktivitását.

Általában 10000 és 60000, előnyösen 20000 és 40000 cpm közötti beütésszámú tracert alkalmazunk, amelyet célszerűen pufferben oldunk.

A puffer előnyösen 0,1 % zselatint tartalmazó 0,01–0,2 mólos célszerűen 0,05 mólos, 7,4 pH-jú foszfát-puffer.

Az oldat konkrét összetételétől függően az inkubációs hőmérséklet 0 és 40°C közötti, az inkubáció időtartama 1 és 40, előnyösen 3 és 20 óra között változik.

A specifikus antitest célszerűen magas titerű, megfelelően magas (10^9 – 10^{10} M) affinitási együtthatóval rendelkező anti-biciklo-PGEM antiplazma, amelyből annyit alkalmazunk, amennyi az inaktív biciklo-PGEM-t nem tartalmazó mintában a tracer 20–80, előnyösen kb. 50%-át képes megkötni.

A radioligand kötött és szabad frakcióinak elválasztására előnyösen 0,5 % Dextran T-70-et és 1 % csontszén tartalmazó 0,01 mólos foszfát-puffert (pH 7,4) alkalmazunk, amely a szabad radioligandumot megköti, és a centrifugálással kapott felülúszó tartalmazza az antitesthez kötött tracert, melynek radioaktivitását szcintillációs módszerrel mérjük.

A radioimmun meghatározás előtt a minták illetve a standard oldatok PGEM tartalmának biciklo-PGEM-mé történő alakítása a korábban hivatkozott források szerint általánosan alkalmazott módszer szerint történik 9-es pH-értéken, 37°C-on végzett 24 órás reakcióidővel.

A találmány tárgya továbbá eljárás a radioimmun meghatározáshoz szükséges (I) képletű, nagy fajlagos aktivitású, jód-125 izotóppal jelzett biciklo-PGEM- jód-tirozinmetilészter (biciklo-PGEM-TME- 125 I) előállítására.

A találmány szerint az (I) képletű radioligandot úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű biciklo-PGEM-TME származékot előnyösen nagy fajlagos aktivitású, (kb. 2000 Ci/mmol; 74 TBq/mmol) Na 125 I-dal reagáltatjuk célszerűen Klóramin-T (para-toluol-szulfoklóraminnátriumsó) reagens jelenlétében pufferolt közegben (előnyösen 7 fölötti pH értéken) rövid (10–200 másodperc), előnyösen 30–60 másodperc reakcióidővel, úgy, hogy a (II) képletű biciklo-PGEM származékot a Na 125 I-hoz képest 20–200, előnyösen 50×100-szoros molarányban alkalmazzuk, és a reakcióidőt úgy szabályozzuk, hogy megfelelő időpontban a rendszerben Klóramin-T hatására képződő reakcióképes oxidált jódot nátrium-metabiszulfit hozzáadásával jodid-ionná redukáljuk. Az (I) képletű célvegyület szintéziséhez

célszerűen foszfát puffert alkalmazunk, a (II) képletű anyagot pedig etilalkoholos oldatban adjuk a reakcióelegyhez oly módon, hogy az etanol végkoncentrációja a 20 %-ot ne haladja meg. Az (I) képletű célvegyület előállításának legfontosabb lépése az előállítani kívánt mono-jód-származék elválasztása az egyéb jódjelzett származékoktól, valamint a reakció befejeződése után még gyakorlatilag változatlanul nagy feleslegben levő (II) képletű inaktív kiindulási anyagtól. Erre célszerűen adszorpciós oszlopkromatográfiát alkalmazunk, melyet úgy végzünk, hogy a reakcióelegyet Sephadex LH-20 oszlopra felvisszük és növekvő etanol koncentrációjú etanol-nátriumcitrat (pH 4,0) kétkomponensű oldószer-eleggyel eluáljuk a különböző jódjelzett származékokat, miközben az eluens radioaktivitását folyamatosan mérjük, és az ezzel arányos jelet a megfelelő regisztráló készülékkel rögzítjük.

Az eluáló oldószer-elegyek változtatásának találmány szerinti célszerű sorrendje: tiszta citrát-puffer (0,2 mólos pH 4,0); 1 mólos citrát (pH 4,0) és etanol 4:1, végül 1 mólos citrát (pH 4,0) és etanol 6:4 arányú elegye, ahol a tiszta végterméket az utolsó frakcióban kapjuk meg. Az oldószer-elegyek szükséges térfogata az aktuális, és az elválasztás közben folyamatosan regisztrált elúciós profil és a képződött jelzett vegyületek összetételének (arányának) függvénye, általában a tiszta citrát-pufferből 40–70 ml-t, a 4:1 arányú citrát:etanol elegyből 20–40 ml-t, míg a 6:4 arányú elegyből 30–60 ml-t alkalmazunk. Külön előnye a találmány szerinti eljárásnak, hogy az alkalmazott apoláros dextrán gél ebben az eljárásban kizárólag adszorbensként működik, és a jódjelzett származékok adszorpciós készsége nagyságrendekkel magasabb a kiindulási (II) képletű inaktív anyagnál, ily módon az (I) képletű célvegyület — amelyet még hatásos jódbeépülés mellett is jelentős mennyiségű (II) képletű kiindulási anyag szennyez — teljes biztonsággal választható el, és ezzel a találmány szerinti radioimmun meghatározáshoz szükséges magas fajlagos aktivitás biztosítható.

A (II) képletű vegyületet a (III) képletű biciklo-PGEM és tirozin-metilészter reakciójával állítjuk elő oly módon, hogy a biciklo-PGEM-et 1–5, előnyösen 2–3 molarányú tirozin-metilészterrel reagáltatjuk, 1–5, előnyösen 2–3 molarányú 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid reagens jelenlétében, célszerűen vizes tetrahydrofuranban, 0–50°C-on, előnyösen szobahőmérsékleten, 3–40, előnyösen 20–24 óra időtartamig. Az oldószeret vákuumdesztillációval eltávolítjuk, a maradékot célszerűen etil-acetátban oldjuk, majd az etil-acetátos oldatból híg savas extrakcióval, célszerűen 0,1 n sósavval kimossuk a változatlan tirozin-metilésztert, híg lúgos, célszerűen 0,1 n NaOH-dal extrakcióval pedig az el nem reagált (III) képletű vegyületet.

5

A terméket célszerűen vékonyréteg-kromatográfiás úton tisztítjuk, célszerűen olyan szilikagél rétegen, amely fluoreszcens indikátort tartalmaz, a kifejlesztő oldószerkelet pedig célszerűen kloroform:metanol:víz 90:10:1

térfogatarányú elegye. A terméket 254 nm-es UV-fénnyel megvilágítva mutatjuk ki. A találmányt a továbbiakban részletesebben példák keretében magyarázzuk, amelyekre a találmány természetesen nem korlátozódik.

1. Példa

A jódjelzéshez használt (II) képletű közti termék előállítására

1 mg (3 mikromol) (III) képletű biciklo-PGEM-et, 1,5 mg (8,4 mikromól) 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-HCl-ot és 2 mg (10 mikromól) tirozin-metilésztert egyszerre bemérünk, hozzáadunk 100 mikroliter desztillált tetrahidrofuránt és 20 mikroliter desztillált vizet. Az elegyet szobahőfokon 24 órán át kevertetjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, a maradékot 30 ml etil-acetátban feloldjuk, és rázótölcsérbe öntjük. Ezt az oldatot sorrendben 3×2 ml 0,1 n sósavval, 3×2 ml vízzel, 3×2 ml 0,1 n nátriumhidroxiddal és 3×3 ml vízzel összerázzuk. Minden összerázás után a vizes fázist elválasztjuk és elöntjük. Az utolsó mosás után az etil-acetátos oldatot forgóbepárló készüléken (Büchi, svájci gyártmány) vákuumban bepároljuk, a maradékot 100 mikroliter etil-alkoholban oldjuk, és 0,25×200×100 mm méretű Kieselgel 60 F 254 (Merck, NSZK gyártmány) szilikagél rétegre 5 cm széles sávban felvisszük, és benzol:dioxán:ecetsav:hangyasav 82:14:1:1 térfogatarányú elegybe helyezve, a kromatogramot kifejlesztjük. Kifejlesztés után a réteget hideg levegővel szárítjuk, majd 254 nm hullámhosszú ultrabolya fénnel megvilágítva a foltokat láthatóvá tesszük. A 0,4 R_f értékű folt helyén a réteget lekaparjuk, 10 ml etil-alkoholt teszünk rá, és 1 óra várakozás után üvegszűrőn szűrjük. A szűrőn levő gél 2×5 ml etil-alkohollal mossuk, az alkoholos oldatokat egyesítjük, forgóbepárlón szárazra pároljuk, és mérjük a termék súlyát, majd etil-alkohollal törzsoldatot készítünk belőle.

A kapott (II) képletű termék tömege a kromatográfiás tisztítás után 590 mikrogramm, ami 38,5 % kitermelésnek felel meg.

2. Példa

Az (I) képletű céltermék előállítása

Az 1. példa szerint kapott biciklo-PGEM-TME származék 100 mikrogramm/ml koncentrációjú etanolos oldatából 30 mikrolitert (6,5 nmol) 1 ml-es talpas műanyag Eppendorf-csőbe pipettázunk, hozzáadunk 100 mikroliter 50 mM foszfát puffert (pH 7,4) és 57 MBq radioaktivitású hordozómentes Na¹²⁵I-oldatot (MTA Izotópkutató Intézete terméke). Az ele-

6

gyet összerázzuk, majd 50 mikroliter, 7 mg/ml koncentrációjú nátrium-metabiszulfid oldatot pipettába előre felszívunk a reakció leállításához. Az elegyhez ezután hozzápipettázunk 25 mikroliter 4,8 mg/ml koncentrációjú klór-amin-T reagens oldatot, az elegyet összerázzuk és pontosan 60 másodperc múlva az előre elkészített nátrium-metabiszulfid oldat hozzáadásával a reakciót befagyaszttjuk.

Az elegyet ezután oszlopkromatográfiás módszerrel választjuk el a következőképpen:

Sephadex LH-20 (Pharmacia, Svéd gyártmány) gél desztillált vízben 24 órát duzzasztunk, majd 20×1 cm méretű, alul elvezető, felül bevezető polietilén csővel ellátott üvegcsőbe töltjük, alkalmas oldószeradagoló perisztaltikus pumpával (LKB, Svéd gyártmány) összekapcsoljuk, mintegy 10 percig egyensúlyba hozzuk 0,2 mólos citromsavval (pH 4) mintegy 0,5 ml/min áramlási sebességgel. Az így előkészített hordozóra a reakcióelegyet felvisszük, és az elúciót az előző oldószerral folytatjuk. Az eluens radioaktivitását folyamatosan detektáljuk oly módon, hogy az oszlop elvezető csővét ólommal árnyékolat, NaI (Tl) szcintillációs kristály (Gamma gyártmány) előtt vezetjük el, a kristályt pedig számláló berendezéssel (scaler, Gamma gyártmány) és vonalíróval (Gamma gyártmány) kötjük össze. Az eluent mérőhengerbe gyűjtjük, az első eluensből 50 ml-t alkalmazunk, majd 1 mólos citromsav (pH 4) és etil-alkohol 4:1 arányú elegyével folytatjuk, végül az etanol arányát 6:4-re emeljük. A kívánt termék gyűjtését a detektáló készülékben megjelenő csúcs szerint végezzük, a radioimmun meghatározáshoz a csúcs közepének megfelelő mintegy 5 ml-es frakciót választjuk külön. Ennek radioaktivitása 10,2 MBq, ami 17,9% radioaktív hozamnak felel meg. A hozam természetesen az elérhetőnél lényegesen alacsonyabb, mivel a terméknek csak egy része kerül gyűjtésre.

3. Példa

Vérplazma 13,14-dihidro-15-keto-PGE₂ koncentrációjának radioimmun meghatározása nyúl vénás véréből

7,5 ng/ml koncentrációjú biciklo-PGEM törzsoldatból izotóniás sóoldatban hígítási sorozatot készítünk úgy, hogy 1—1 ml térfogatú oldatmintákat kapjunk, melyek hatóanyag-koncentrációja 6—19—56—167—500 pg/ml. A vérplazma mintákat izotóniás sóoldattal tiszteresére hígítjuk, és ezekből is 1—1 ml térfogatú mintákat készitünk. A standard-, illetve mintaoldatokhoz, valamint 1 ml izotóniás sóoldathoz („O” standard) hozzáadunk 40 mikroliter 1 mólos Na₂CO₃ oldatot, a csöveket kémcsőkeverővel néhány másodpercig keverjük, lezárjuk, és 37°C-on tartjuk 20—24 óráig. Ezután a fenti oldatokhoz 60 mikroliter 1 mólos káliumdihidrogén-foszfát olda-

tot adunk, és a csöveket előbbi módon keverjük. Sorszámozott műanyag kémcsövekbe automata pipettával a standard és a minta oldatokból 100—100 mikrolitert bemérünk, majd hozzáadunk 100 mikroliter ^{125}I -biciklo-PGEM-TME tracer, amelynek radioaktivitása 30000—40000 cpm/100 mikroliter, és 100 mikroliter specifikus antiszérumot olyan hígításban, amely a tracer 30—60%-át képes megkötni. Valamennyi kémcsöbe, amely nem a mérendő mintákat tartalmazza, bemérünk 100 mikroliter a mintákkal azonos hígítású de lúggal nem kezelt nyúlplazmát, mely hatóanyagmentes plazmaháttérként szolgál. A nem-specifikus kötődés (NSB) meghatározására további kémcsövekbe az antiszérum helyett 100 mikroliter tiszta pufferoldatot teszünk. A Bo/T és TC érték méréséhez szükséges csövekbe, valamint az NSB — csövekbe a standardokkal együtt kezelt „O”-standard oldatból pipettázunk 100 mikrolitert.

A vérminták meghatározásához szükséges plazmamintákat úgy kapjuk, hogy a vért műanyag kémcsövekbe, 0,1 térfogatrész — 2% etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsót és 1 mmol indomethacint tartalmazó — izotóniás sóoldatra vesszük, majd azonnal 4°C-on, 10 percig, kb. 1000 x g gyorsulással centrifugáljuk, és a tiszta plazmát különválasztjuk. A centrifugálás és a mintavétel közötti időben a vért jeges fürdőben tartjuk.

Ugyanúgy nyerjük a kalibrációs görbéhez háttérként szükséges hatóanyagmentes vérplazmát, de itt több állatból származó vérplazmából keveréket készítünk.

A térfogat valamennyi kémcsöben a művelet végén 0,4 ml lesz. A tracer és az antitest oldásához, valamint a térfogatkiegészítéshez szükséges pufferként 50 mM koncentrációjú 7,4 pH-jú 0,1% zselatint tartalmazó foszfát puffert használunk.

A kémcsövek tartalmát néhány másodpercig kevertetjük, majd lezárjuk, és hűtőszekrényben 4°C körüli hőmérsékleten egy éjszakan át állni hagyjuk. Ezután a TC csövek kivételével minden kémcsöbe folyamatos keverés közben 2—3 perc alatt bepipettázunk 0,5 ml — 0,5% Dextran T-70-et (Pharmacia, Svédország) és 1% csontszén (Norit-A, Serva NSZK) tartalmazó — 0,01 mólos, 7,4 pH-jú foszfát puffer szuszpenziót, a TC csövekbe pedig azonos térfogatú RIA-puffert. A csöveket az előbbieket szerint kevertetjük, majd 0°C-on, 10 percig, 2000 x g gyorsulással centrifugáljuk, és a felülúszókból alkalmas mérőcsövekbe 0,5—0,5 ml-t pipettázunk, majd mérjük ezek radioaktivitását NaI(Tl) szcintillációs kristállyal ellátott automatikus minta — váltó berendezésben (pl.: Minigamma, LKB Svédország gyártmány). A számítást a radioimmun meghatározásokban szokásos módon végezzük.

A fentiekből a szakember felmérheti a találmány előnyeit a technika állásához képest. Az előnyökből kiemeljük:

Az alkalmazott radiokémiai szintézis segítségével kedvező feltételek között előállíthatunk olyan radioligandumot, nevezetesen az (I) képletű ^{125}I -biciklo-PGEM-TME származékot, amelynek nagy moláris aktivitása biztosítja a biciklo-PGEM (illetve PGEM) koncentrációjának az eddig használt tríciummal jelzett tracerhez képest mintegy tízszer érzékenyebb radioimmunológiai meghatározását.

Az alkalmazott adszorpciós oszlopkromatográfiás elválasztástechnika biztosítja a jódjelzett céltermékeknek a kiindulási anyagtól való tökéletes elválasztását, és ezáltal a céltermék fajlagos aktivitása nem csökken a reakció során.

Az alkalmazott szintézis, amelynek célja a PGEM alampolekulának jódjelzésre alkalmas oldallánccal való kapcsolása, nem változtatja meg a PGEM alampolekula immunológiai tulajdonságát (azaz a specifikus antitesthez való kötődésének egyensúlyi állandóját), ezáltal „heterológ assay“-re alkalmassá válik.

Az alkalmazott elválasztástechnika a más források által ismertetett elválasztási módszerekkel szemben a radiojódos jelzés során nagyobb aktivitásmennyiségeknél is biztosítja a szükséges sugárvédelmet, és minimálisra csökkenti a radioaktív inkorporáció veszélyét.

Mindezek alapján a találmány szerinti új, jód-125 izotóppal jelzett radioligand alkalmazása olyan biciklo-PGEM radioimmunoassay megvalósítását teszi lehetővé, amely megőrzi a homológ assay specificitását, de többszörösére növeli annak érzékenységét, miközben a szükséges mérés technika egyszerűbbé, gyorsabbá és olcsóbbá válik, és jelentősen csökkenthető a méréshez szükséges antitest mennyisége is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás biológiai szövetminta 13,14-dihidro-15-keto-PGE₂ (továbbiakban PGEM) tartalmának antigén-antitest reakción alapuló meghatározására, a PGEM kémiaiilag stabil származékán, 11-deoxi-13,14-dihidro-15-keto-11B,16E-ciklo-PGE₂ (továbbiakban biciklo-PGEM) mérésén keresztül ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú biciklo-PGEM és a biológiai szövetminta jelenlétében, amelynek során ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú PGEM-et és a meghatározandó biológiai minták PGEM-hatóanyagát lúgos kezeléssel biciklo-PGEM-mé alakítjuk, majd megmérjük nagy fajlagos aktivitású radioaktív nyomjelző vegyületnek (továbbiakban tracer) specifikus antitesttel való kötődését, és az ismert mennyiségű biciklo-PGEM hígítási sorozat által okozott kötősváltozás alapján számítjuk a mindenkor szövetminta hatóanyagtartalmát, *azzal jellemezve*, hogy tracerként (I) képletű ^{125}I -biciklo-PGEM-tirozin-metilészter származékot alkalmazunk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként olyan anti-bicik-

lo-PGEM antiplazmát használunk, melynek affinitási együtthatója azonos, vagy közel azonos a biciklo-PGEM-re és a tracerre nézve.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy háromezer és százezer, előnyösen harmincezer és ötvenezer cpm beütésszámú tracet alkalmazunk.

4. Az 1—3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a specifikus antitestet olyan mennyiségben alkalmazzuk, amely a biciklo-PGEM nélküli mintában a tracer 25—70, előnyösen 40—60%-át képes megkötni.

5. Az 1—4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pufferoldatként előnyösen zselatint tartalmazó foszfát puffert alkalmazunk, melynek pH-ja 6—9, előnyösen 7,0—7,5; koncentrációja 0,01—0,2 mól/l, előnyösen 0,05—0,1 mól/l közötti.

6. Az 1—5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy reakcióidőnek egy és ötven, előnyösen tizenöt és huszonnégy óra közötti időtartamot, reakcióhőmérsékletnek pedig nulla és negyven Celsius fok közötti hőmérsékletet alkalmazunk.

7. Az 1—6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mérendő

biológiai szövetmintákat előzetes tisztítás nélkül vagy előnyösen oldószeres extrakciót követően használjuk radioimmun meghatározásra.

5 8. Az 1—7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tracer kötött és szabad frakcióinak elválasztására dextránnal fedett aktív szenet alkalmazunk.

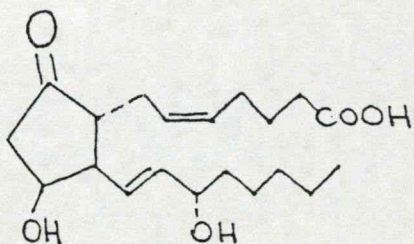
10 9. Eljárás (I) képletű ^{125}I -biciklo-PGEM-TME előállítására, *azzal jellemezve*, hogy (II) képletű biciklo-PGEM-TME-t pufferolt közegben jodid ionokból elektrofil jódot képező reagens, előnyösen pára-toluol-szulfoklór-amin-nátriumsó, jelenlétében Na ^{125}I -dal reagáltatunk.

15 10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) képletű terméket a (II) képletű biciklo-PGEM-TME-től fajlagos aktivitás csökkenése nélkül, kromatográfiás módszerrel választjuk el.

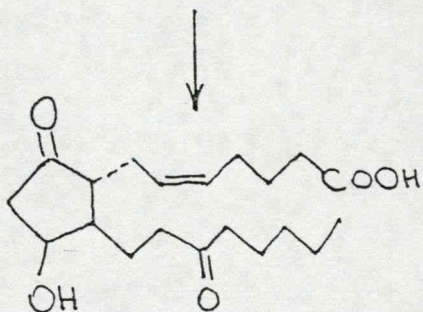
20 11. A 9. vagy a 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biciklo-PGEM, tirozin-metil-észter és 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid vizes tetrahidrofuránban történő reagáltatásával előállított (II) képletű reakciótermékből indulunk ki.

2 lap rajz, képletekkel

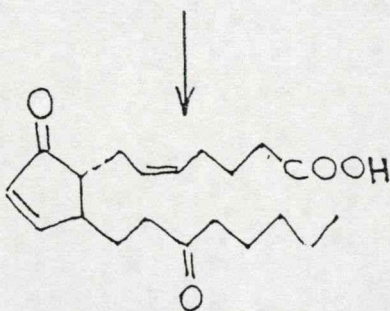
A./ Folyamatábra



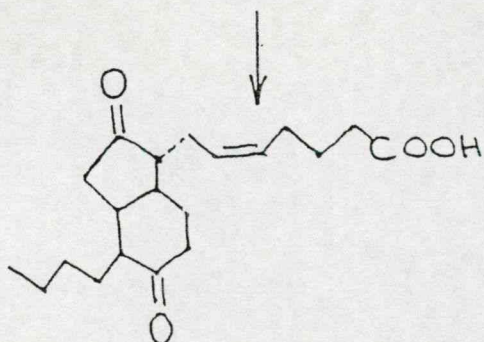
Prosztaglandin E₂ / PGE₂ /



13,14-dihidro-15-keto-
prosztaglandin E₂

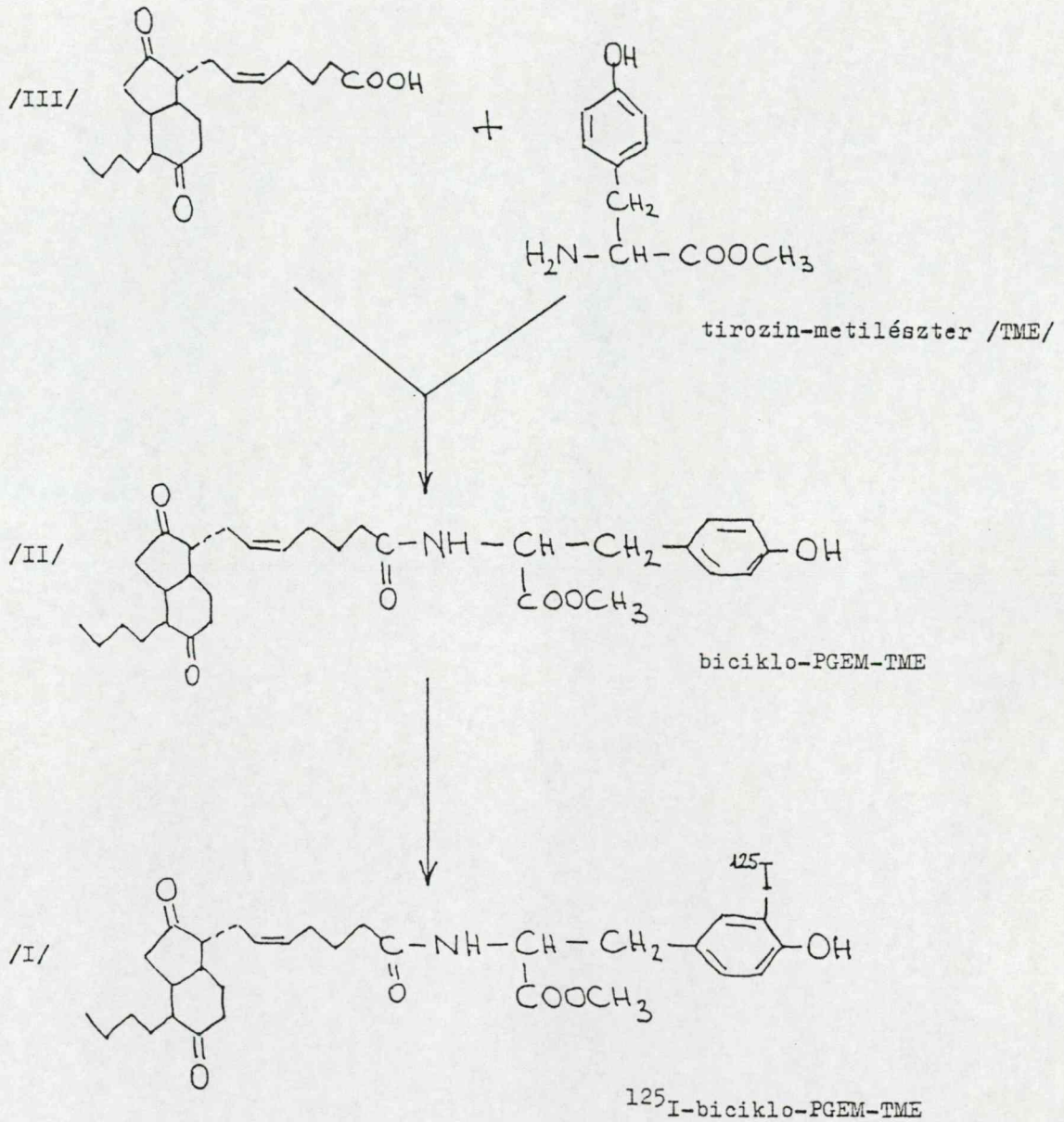


13,14-dihidro-15-keto-
prosztaglandin A₂



11-deoxi-13,14-dihidro-
15-keto-11B,16E-ciklo PGE₂
/ biciklo-PGEM /

B./ Folyamatábra



Mucha I, Tóth G: Separation of ^{125}I -prostaglandin E₂-tyrosine methyl ester by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 438: 111-116, 1988

CHROM. 20 222

Note

Separation of ^{125}I -labelled prostaglandin E_2 -tyrosine methyl ester by reversed-phase high-performance liquid chromatography

I. MUCHA and G. TÓTH*

Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 77, H-1525 Budapest (Hungary)

(Received October 12th, 1987)

Prostaglandin molecules, especially prostaglandin E_2 (PGE_2) labelled with ^{125}I through their histamine, tyramine¹ or tyrosine methyl ester² derivatives have a widespread use in radioimmunoassay (RIA). To obtain radioiodine-labelled material suitable for use in RIA, *i.e.*, having only one ^{125}I atom per molecule with as high a specific activity as possible, it is necessary to achieve perfect separation of the labelled material from its parent compound. As shown previously, adsorption column chromatography on Sephadex LH-20 gel is an efficient tool not only for the separation of ^{125}I -prostaglandin E_2 -tyrosine methyl ester ($[^{125}\text{I}]\text{PGE}_2\text{-TME}$) from $\text{PGE}_2\text{-TME}$ ³, but also for the separation with high specific activity of various labelled steroid derivatives^{4–8}. Although this method has a lot of advantages over thin-layer chromatography, which is the usual method of laboratory-scale separation, it suffers from the drawback of needing a relatively large amount of solvent and also the separation time is inconveniently long.

The aim of the present work was to elaborate an alternative procedure for the isolation with high specific activity of $[^{125}\text{I}]\text{PGE}_2\text{-TME}$ from the labelling mixture by the use of reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), with the expectation that this new method would eliminate the disadvantages of the Sephadex LH-20 procedure.

For this purpose a simple ternary eluent was applied, which proved to be suitable for both monitoring of the labelling reaction and the isolation of pure $[^{125}\text{I}]\text{PGE}_2\text{-TME}$ of high specific activity on a preparative scale. The baseline separation of the monoiodo derivative from other labelled by-products and from the inactive parent compound ($\text{PGE}_2\text{-TME}$) was verified by monitoring the β -radioactivity and UV absorbance simultaneously with the ^{125}I -radioactivity. $[^{125}\text{I}]\text{PGE}_2\text{-TME}$ separated by this RP-HPLC procedure proved to be suitable for use as tracer in RIA, as demonstrated by comparing some RIA parameters obtained with this material with those measured with a tracer separated on Sephadex LH-20 gel.

MATERIALS AND METHODS

PGE_2 was coupled to tritium-labelled tyrosine methyl ester (TME) by the carbodiimide method as described previously². $[^3\text{H}]\text{TME}$ was prepared in our laboratory with high specific activity as described⁹, and diluted in inactive TME to specific activity about $100 \mu\text{Ci}/\text{mg}$.

PGE₂-TME was labelled with Na¹²⁵I by the use of the chloramine-T method and separated on Sephadex LH-20 gel as described³. For RP-HPLC separation a two-pump (LKB, Type 2150) gradient system controlled by an HPLC controller (LKB, Type 2152) was used. A μ Bondapak C₁₈ column (300 mm \times 3.9 mm, Waters Assoc.) was attached on-line to a variable wavelength monitor (LKB, Type 2151), to a sodium iodide (thallium) scintillation crystal and to a fraction collector (LKB, Super-Rac, Type 2211), respectively. Samples dissolved in the HPLC solvent were injected through a Rheodyne sample injector equipped with a 200- μ l sample loop. The solvent system was water-acetonitrile (2:1, v/v) with 30–50% methanol.

UV absorbance was monitored at 280 nm, the γ -radioactivity counted by a ratemeter attached to the scintillation crystal, while β -radioactivity of eluent fractions was determined with a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer. γ -Radioactivity and UV absorbance was registered simultaneously with a dual-channel potentiometric recorder (LKB, Type 2210).

Experiments with ³H-labelled materials were made on the same system but separately from ¹²⁵I-labelled materials.

Anti-PGE₂ antiplasma was developed in rabbits against PGE₂-thyroglobulin conjugate and radioimmunoassay performed according to conventional RIA methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Radioiodination of PGE₂-TME by the use of the chloramine-T method en-

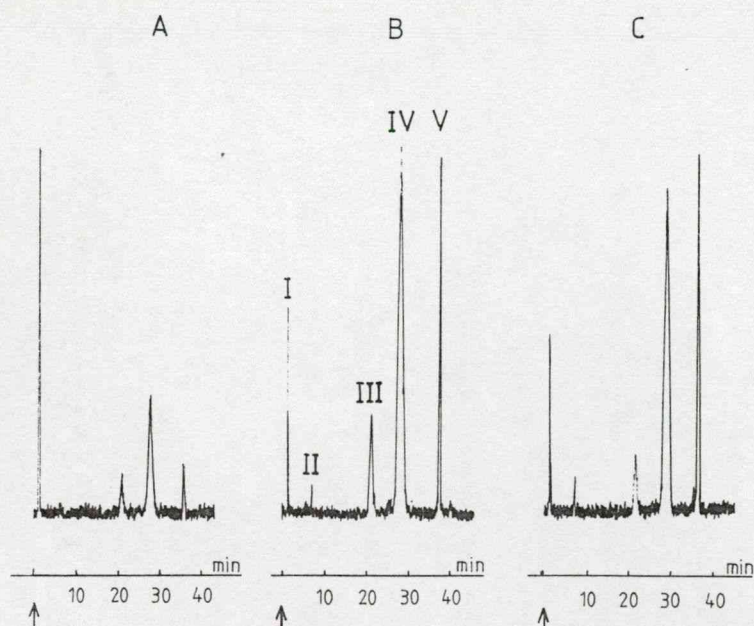


Fig. 1. Time course of radioiodination of PGE₂-TME and the composition of the reaction mixture as monitored by RP-HPLC. A 20- μ l volume (0.5 μ Ci) of reaction mixture after labelling for 5 (A), 60 (B) and 120 s (C) was eluted isocratically with water-acetonitrile (2:1, v/v)-methanol. The methanol concentration was 35% and increased to 60% after 30 min. Flow-rate 1 ml/min. Pressure: 80 bar. Peaks: I = free ¹²⁵I⁻; II and III = unidentified labelled compounds; IV = monoiodo- and V = diiodo derivative.

sure high incorporation of ^{125}I into the organic molecule. Under our experimental conditions, a labelling time of about 60 s proved optimal. As is seen from Fig. 1, an increase in labelling time failed to improve the yield of monoiodine-labelled target compound.

In full accordance with our previous data, beside free iodine, three different labelled products were observed in the HPLC profile (Fig. 1), which had originated under normal conditions during the labelling procedure. In some instances, however, two further labelled by-products could be detected in large amounts by HPLC, whose retention times differed only slightly from that of the target compound. In these cases the Sephadex LH-20 procedure was inefficient in separating the immunoactive material from these unidentified non-immunoactive by-products, and the tracer thus prepared would give poor results in RIA. However, RP-HPLC separation using isocratic elution with water-acetonitrile-methanol could be applied with good results even in these cases.

For separation on a preparative scale, *i.e.*, from about 100 μCi to a few mCi radioactivity, a reasonably low methanol content, *i.e.*, 30–35%, is suggested in order to achieve a baseline separation of each labelled component even at a relatively high fraction volume *e.g.*, 1 ml.

Data summarized in Table I indicate that the recovery of radioactivity is practically quantitative on a preparative scale.

For routine monitoring of the iodination reaction, an higher methanol content is preferred. Perfect separation of labelled components can be achieved with as high a methanol content as 50% and thus the analysis time can be decreased to about 10–15 min (Fig. 2). This is a valuable benefit as compared, *e.g.*, to the very long separation times for RP-HPLC separation of prostaglandins¹⁰.

During radioiodination the starting material is added to radio-labelled iodine in high molar excess in order that the production of the diiodo derivative is suppressed. Considering this reagent ratio and the separation techniques employed to prepare the monoiodine-labelled derivative for use in RIA, the main point is that the labelled target compound has been separated efficiently from the inactive parent compound. In the case of inefficient separation, a considerable decrease in specific activity is expected which results in a decrease in RIA sensitivity.

However, as illustrated on Fig. 2, with the application of the present RP-HPLC procedure, the difference between the retention time of PGE₂-TME as determined by simultaneous monitoring and measurement of the ^3H -radioactivity of

TABLE I
RECOVERY OF RADIOACTIVITY

A labelling reaction mixture (200 μCi) was separated by RP-HPLC with 40% methanol. Flow-rate: 1 ml/min. Fraction size: 1 ml. For peak numbers see Fig. 1.

	Fraction					Total
	I	III	IV	V	Remainder	
Radioactivity (μCi)	15.8	41.4	77.7	25.6	18.1	178.6
% of total activity	8.8	23.2	43.5	14.3	10.1	100.0

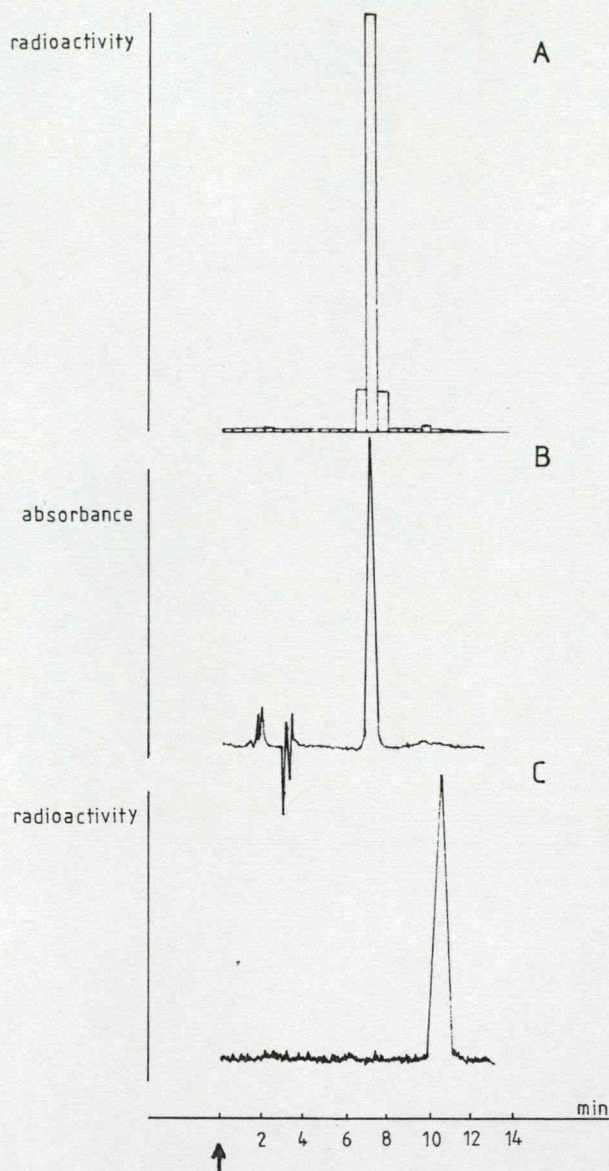


Fig. 2. Separation by RP-HPLC of [^{125}I]PGE₂-TME from PGE₂-TME. Isocratic elution was performed with 50% methanol. (A) ^3H -radioactivity of [^3H]PGE₂-TME (2 μCi , 20 μl injected); (B) UV absorbance of [^3H]PGE₂-TME (2 μg , 20 μl injected); (C) [^{125}I]PGE₂-TME isolated by RP-HPLC from a preparative-scale experiment (0.5 μCi , 10 μl injected). For other parameters see Fig. 1.

[^3H]PGE₂-TME and that of [^{125}I]PGE₂-TME confirmed a perfect separation even at an high methanol concentration. Under these conditions, [^3H]TME, had a retention time of 6 min, while different prostaglandins were eluted at about 5 min. On a preparative scale, *i.e.*, with a lower methanol concentration, the separation is of course much more effective as a consequence of the increase in retention time of each component.

The adsorption-elution patterns of the individual labelled components are essentially similar in RP-HPLC to that reported previously for Sephadex LH-20 ad-

sorption chromatography³, *i.e.*, free iodine is eluted with the dead volume, while organic labelled products are eluted in the same sequence as from Sephadex LH-20 gel. This was verified by determining the HPLC retention times of the individual fractions separated on Sephadex LH-20 (not shown). However, contrary to the Sephadex LH-20 technique which differentiates mainly according to the number of iodine atom(s) per molecule^{11,12}, this RP-HPLC method is also selective according to the structural differences of prostaglandin molecules. It is worth mentioning that data are also available which support an elution pattern of various iodothyronines according to the number of iodine atoms also in RP-HPLC with binary eluents¹³. Contrary to RP-HPLC procedures used for the separation of prostanoids as free acids, with the eluent we applied to the iodinated derivatives the presence of an organic acid in the medium is not required. This lack of acid does not affect the separation efficiency or reproducibility, but eliminates either the pronounced tendency of the radioiodine labelled product to decompose in acidic media or the possibility of conversion PGE₂ into PGA₂.

We also checked the RIA quality of [¹²⁵I]PGE₂-TME prepared by RP-HPLC separation. As is seen in Fig. 3, the standard dose-response curves obtained with an HPLC tracer and with a tracer separated on Sephadex LH-20 gel, respectively, were essentially identical and there were no significant differences in the typical RIA parameters.

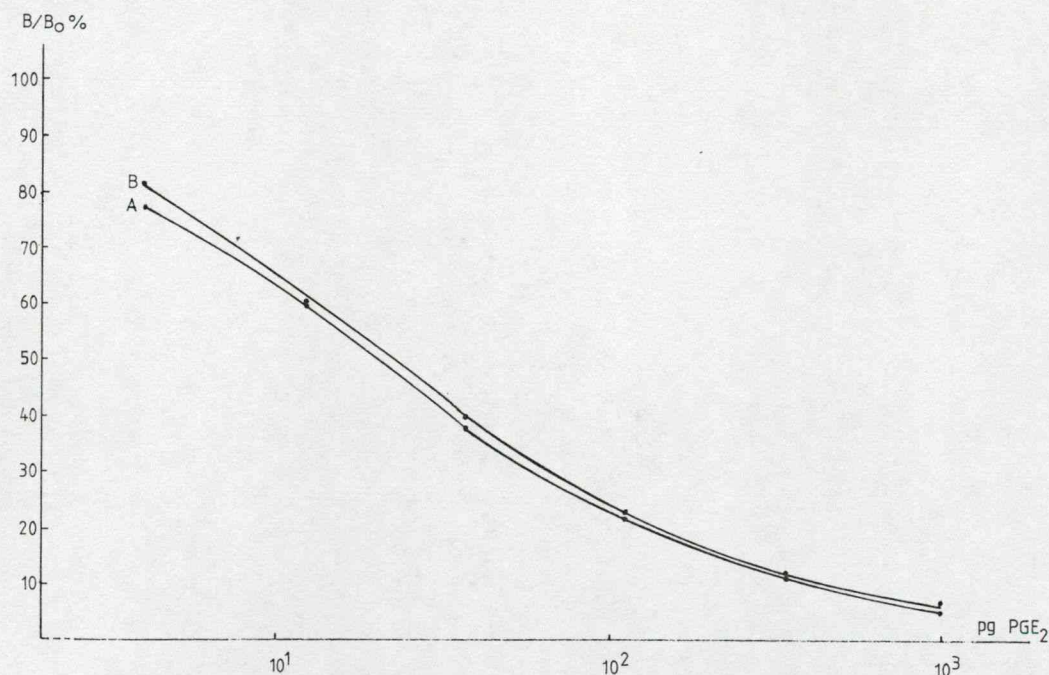


Fig. 3. PGE₂ radioimmunoassay with different [¹²⁵I]PGE₂-TME tracers. [¹²⁵I]PGE₂-TME was separated either by RP-HPLC (A) or by Sephadex LH-20 column chromatography (B). Values of the specific binding of tracer in the absence of PGE₂ standard material were 40.4 (A) and 34.7% (B), the non-specific binding expressed as per cent of the total radioactivity was 2.8 (A) and 2.2% (B), while the amounts of PGE₂ necessary to cause 50% inhibition of tracer, *i.e.*, IC-50 values, were 20.1 (A) and 20.8 pg (B) respectively.

While retaining the advantages over thin-layer chromatography of the Sephadex LH-20 column chromatography separation method, *i.e.*, most efficient peak resolution, suitability for use in RIA, effective protection during handling radioactive materials on a preparative scale, etc., this simple RP-HPLC method also makes it possible to save solvent and to decrease the separation time considerably. In addition, it ensures a radioactive concentration high enough for use in RIA even under conventional laboratory conditions, when the total radioactivity used in a single labelling reaction usually does not exceed 100 μCi , a value which is too low to achieve a suitable RIA concentration by the use of column chromatography.

REFERENCES

- 1 J. Maclouf, M. Pradel, Ph. Pradelles and F. Dray, *Biochim. Biophys. Acta*, 431 (1976) 139.
- 2 I. Mucha, G. Tóth and B. Tanács, *Izotóptechnika*, 22 (1979) 190.
- 3 G. Tóth, I. Mucha and B. Tanács, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 433.
- 4 G. Tóth, M. Wéber and F. Kling, *J. Chromatogr.*, 213 (1981) 511.
- 5 G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 238 (1982) 476.
- 6 G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 267 (1983) 420.
- 7 G. Tóth and J. Zsadányi, *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, 86 (1984) 25.
- 8 G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 258.
- 9 I. Mucha, A. Seregi, P. Serfözö, B. Tanács and J. Benkő, *Hung. Pat.*, 193 381 (1987).
- 10 D. C. Henke, S. Kouzan and T. E. Eling, *Anal. Biochem.*, 140 (1984) 87.
- 11 G. Tóth, *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 29 (1977) 207.
- 12 G. Tóth, *J. Radioanal. Chem.*, 46 (1978) 201.
- 13 B. R. Hepler, S. G. Weber and W. C. Purdy, *Anal. Chim. Acta*, 138 (1982) 221.

Mucha I, Tóth G: Separation of ¹²⁵I-labelled prostanoid derivatives by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 483, 419-426, 1989

CHROM. 21 911

Note

Separation of ^{125}I -labelled prostanoid derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography

I. MUCHA* and G. TÓTH

Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 77, H-1525 Budapest (Hungary)

(First received February 28th, 1989; revised manuscript received July 10th, 1989)

Prostaglandin molecules labelled with ^{125}I through their histamine and tyramine¹ or tyrosine methyl ester^{1,2} derivatives are widely used in radioimmunoassay (RIA). Sephadex LH-20 column chromatography used to separate ^{125}I -labelled prostaglandin E_2 monoiodotyrosine methyl ester from the non-radioactive parent compound³ enabled the high specific activity required for RIA to be achieved. Recently we have shown that reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) can be used as an efficient alternative to Sephadex LH-20 column chromatography for the same purpose⁴.

In this study, we extended the RP-HPLC method to the analytical separation of ^{125}I -labelled monoiodotyrosine methyl ester (TME) derivatives of various prostanoids, including thromboxane B_2 , from each other and from their non-radioactive parent compounds used as target materials for the preparation of labelled derivatives. We report here the separation of TME and [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of 6-ketoprostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (6KPGF), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaglandin E_2 (PGE_2), thromboxane B_2 (TXB_2), 13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (DHKPGF) and 11-deoxy-13,14-dihydro-15-keto-11 β ,16 E -cyclo- PGE_2 (bicyclo- PGE_2) (Fig. 1).

For this purpose, a water-acetonitrile-methanol ternary eluent was used and the retention values of [^{125}I]monoiodo-TME derivatives as a function of the methanol concentration in the solvent mixture were determined. Isocratic elution proved to be suitable for the separation of the compounds in the polarity range from the 6KPGF to the DHKPGF derivatives. To cover a wider range of polarity, *i.e.*, to include more hydrophobic derivatives in a single run, a linear gradient of methanol was applied. We found that either isocratic or gradient elution RP-HPLC ensured the separation of [^{125}I]monoiodo-TME from unlabelled TME derivatives.

We also studied the effect of low pH on the separation process and found that it decreased the retention time of 6KPGF derivatives (both TME and [^{125}I]monoiodo-TME derivatives), but had only a moderate effect on the retention time of other PG derivatives.

EXPERIMENTAL

Prostanoids were coupled to TME according to general procedure⁵ as modified previously for PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ ². Bicyclo- PGE_2 was prepared from 13,14-dihydro-15-keto- PGE_2 according to the method of Granström and Kindahl⁶.

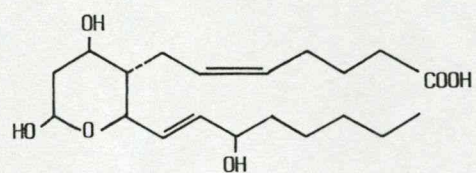
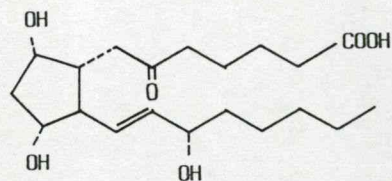
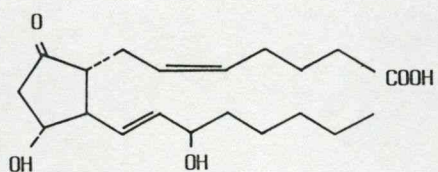
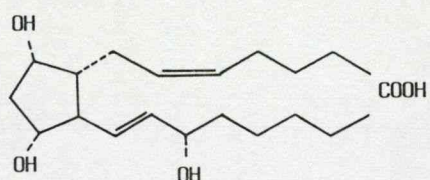
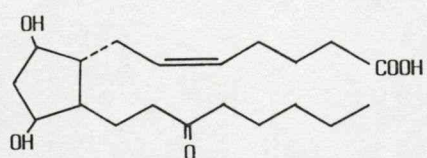
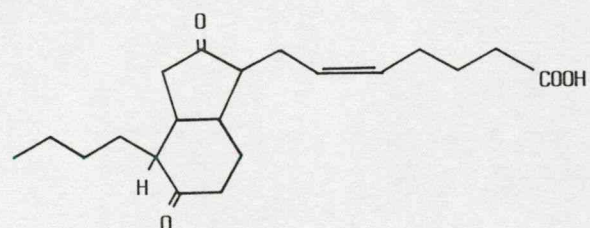
Thromboxane B₂6-keto-PGF_{1α}Prostaglandin E₂Prostaglandin F_{2α}13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}Bicyclo-Prostaglandin E₂

Fig. 1. Structures of prostanoids.

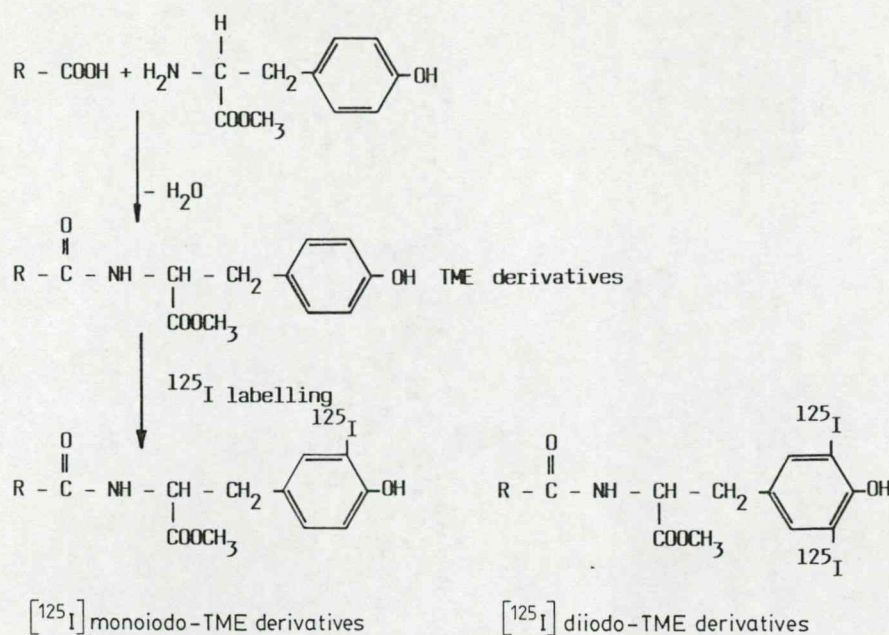


Fig. 2. Reaction scheme for the preparation of [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of prostanoids. For RCOOH, see Fig. 1.

TME derivatives were labelled with Na^{125}I by the use of the chloramine-T method and separated for RP-HPLC analysis on Sephadex LH-20 gel by slight modifications of the separation procedure elaborated for TME derivatives of PGE_2 and PGF_{2a}^3 .

For RP-HPLC separation, a two-pump (LKB Type 2150) gradient system controlled by an HPLC controller (LKB Type 2152) was used. An Aquapore Cartridge column, RP-18 (Spheri-5), 100×4.6 mm I.D. (Pierce) equipped with a guard cartridge was attached on-line to a variable-wavelength monitor (LKB Type 2151) and to a sodium iodide (thallium) scintillation crystal. Non-radioactive samples dissolved in the HPLC solvent and labelled materials dissolved in 30–50% ethanol were injected through a Rheodyne sample injector equipped with a 200- μl sample loop. The solvent system was water-acetonitrile (2:1, v/v) mixed with methanol in various ratios.

UV absorbance was monitored at 280 nm and the gamma radioactivity counted by a ratemeter attached to the scintillation crystal. The two signals were registered with a dual-channel potentiometric recorder (LKB Type 2210).

RESULTS AND DISCUSSION

We determined the elution times of individual ^{125}I -labelled derivatives in the polarity range from the appropriate 6KPGF derivatives to DHKPGF derivatives as a function of methanol concentration in solvent mixtures using isocratic elution. Table I demonstrates that when the solvent contained 45% methanol the separation time was reasonably short (less than 20 min) and the resolution of various derivatives was efficient enough for analytical purposes.

TABLE I
RETENTION VOLUMES (ml) OF VARIOUS PROSTANOID DERIVATIVES

Each derivative was run separately. Solvent A, water-acetonitrile (2:1, v/v); solvent B, methanol. Dead volume, 1.0 ml; flow-rate, 1.0 ml/min.

Prostanoid	B(%)					
	40		45		50	
	TME	[¹²⁵ I]TME	TME	[¹²⁵ I]TME	TME	[¹²⁵ I]TME
6KPGF	2.5	5.6	1.9	4.5	1.7	3.8
TXB ₂	3.8	7.0	2.9	5.4	2.5	4.2
PGE ₂	4.6	8.6	3.5	6.4	3.1	4.9
PGF _{2a}	4.8	9.3	3.6	7.0	3.4	5.4
DHKPGF	6.2	12.0	4.7	9.0	4.1	6.3
Bicyclo-PGE ₂	9.8	22.9	7.5	16.2	5.2	10.7

The capacity factors calculated from the retention volumes of individual peaks and from the dead volume (1 ml) were at least 1, except for 6KPGF derivatives with eluents containing more than 40% of methanol. The resolution determined by calculating the separation factor according to Meyer⁷ was found to be the smallest for PGE₂ and PGF_{2a}, but even in this instance an average resolution of about 1, which led to overlap of neighbouring peaks of only a few per cent⁷, could be achieved. This was demonstrated by separation experiments performed with a two-component mixture containing identical amounts of PGE₂ and PGF_{2a} derivatives.

As shown previously⁴ for [¹²⁵I]PGE₂-TME, an RP-HPLC method using isocratic solution with a water-acetonitrile-methanol ternary eluent could be used for the efficient separation of the ¹²⁵I-labelled monoiodo derivative from the non-radioactive PGE₂-TME. The present observations show that this also holds for all other [¹²⁵I]monoiodo-TME derivatives and their non-radioactive parent compounds. Moreover, the TME derivatives can be separated not only from ¹²⁵I-labelled compounds, but also from each other, as demonstrated in Fig. 3 (in order to improve the separation factor for non-radioactive TME compounds, we used 40% methanol in the eluent in these experiments).

It can be seen from Fig. 3 that certain less polar TME derivatives co-migrate with certain more polar [¹²⁵I]TME derivatives, *e.g.*, PGE₂-TME and PGF_{2a}-TME with [¹²⁵I]6KPGF-TME and DHKPGF-TME with [¹²⁵I]TXB₂-TME. This overlap, however, cannot be regarded as a substantial drawback to the utility of this separation system, as in laboratory practice the labelled derivatives are not usually analysed together with the non-radioactive parent compounds. In a normal labelling procedure, the reaction mixture to be analysed contains one unlabelled prostanoid species as a target compound and the labelled derivative(s) produced. In this respect, the separation system is efficient, *i.e.*, there is a baseline separation for each pair of unlabelled-labelled derivatives.

This efficiency allowed us to employ the method for the separation of individual monoiodo derivatives of various prostanoids from their non-radioactive parent compounds also on a preparative scale in a similar manner to that reported previously for PGE₂⁴.

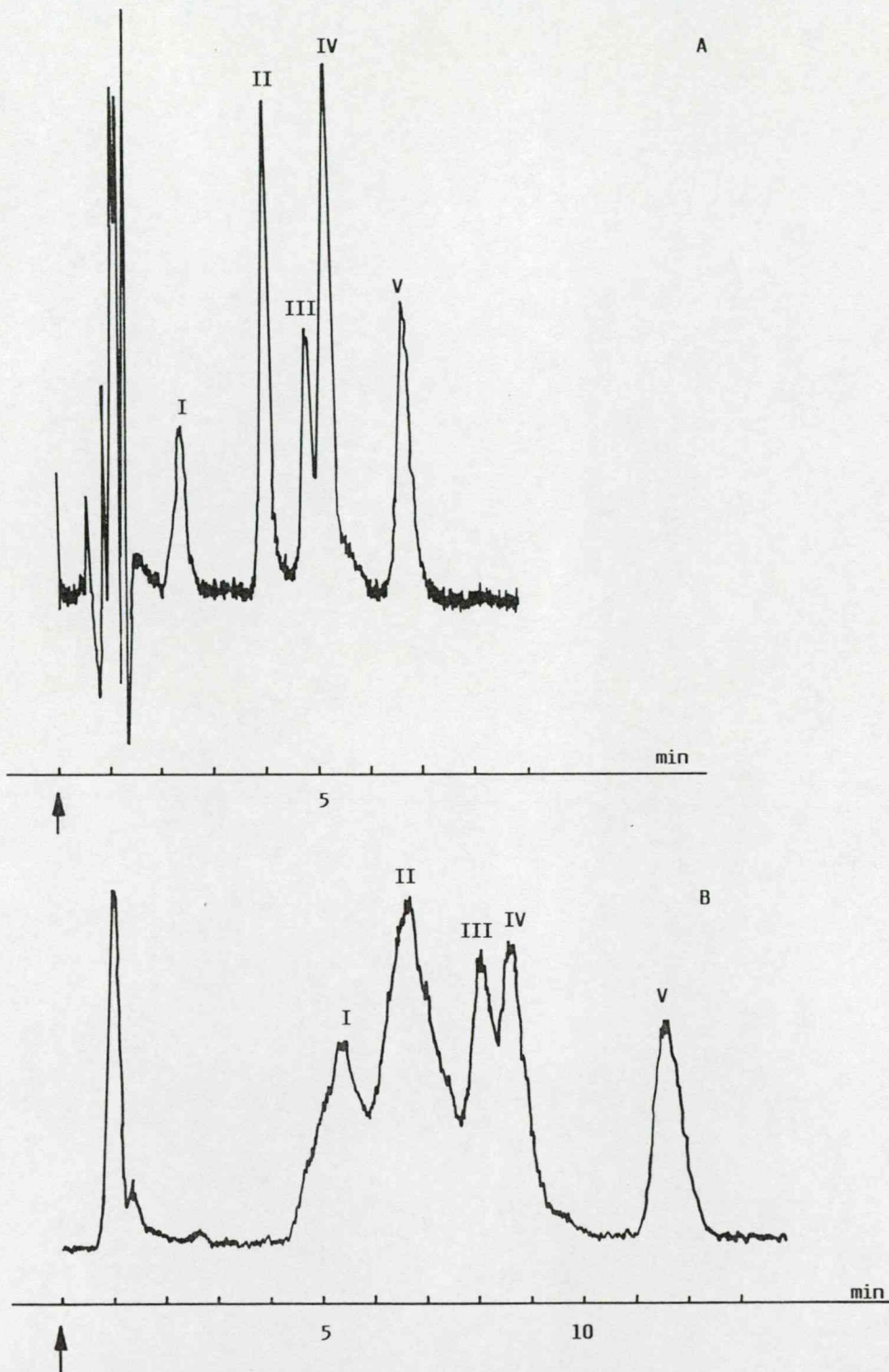


Fig. 3. Separation by RP-HPLC of (A) TME and (B) [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of prostanoids. [^{125}I]Monoiodo-TME (injected amount 10–20 μl , 0.5–1 μCi) and TME derivatives (injected amount 1–2 μg , 5–10 μl) of 6KPGF (I), TXB₂ (II), PGE₂ (III), PGF_{2a} (IV) and DHKPGF (V) were eluted isocratically with water-acetonitrile (2:1, v/v) containing 40% (v/v) methanol at a flow-rate of 1 ml/min. Free radioiodine elutes with the dead volume at 1.0 min.

Normally during the labelling of a particular TME derivative, one would not expect the conversion of the original prostanoid structure into another type to occur, and therefore the reaction mixture usually cannot contain the [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of other types of prostanoids. However, the fact that [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of various prostanoids that have only slight structural differences can be separated so efficiently makes it likely that the RP-HPLC method reported here will work even more efficiently in typical real applications, *i.e.*, when the separation from labelled by-products and parent material of only a particular monoiodinated derivative is required.

It can also be seen from Fig. 3 that the band spreads for the radioiodinated compounds are larger than those for the unlabelled compounds. This peak broadening, however, in contrast to that caused by low pH as discussed below, originates from the relatively high volume (50 μl) of the flow cell of the scintillation detector. However, to achieve an appropriate sensitivity at the flow-rate (1 ml/min) involved for as low as 0.5–1 μCi of radioactivity injected, this high volume is necessary. Higher resolution for labelled compounds can be achieved by decreasing the volume of the flow cell and increasing the amount of radioactivity injected.

To decrease the separation time while retaining an acceptable resolution, a linear methanol gradient in the same solvent system can be applied. Gradient elution is also useful with respect to the polarity range of derivatives to be separated. Fig. 4

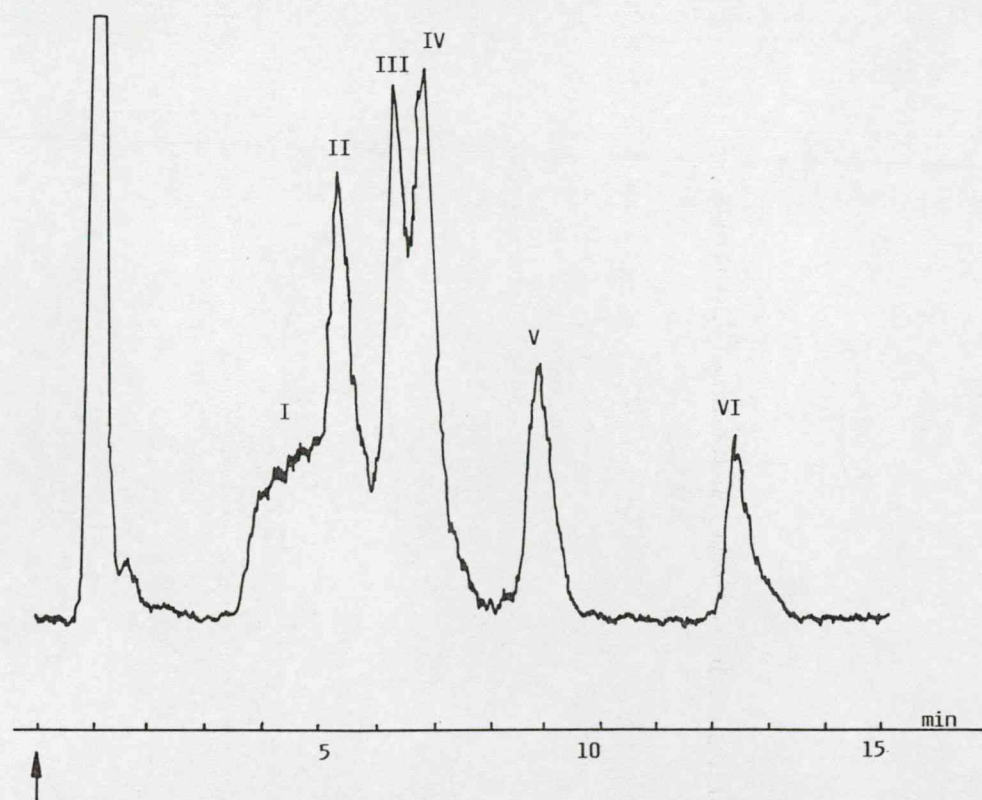


Fig. 4. Separation by RP-HPLC of [^{125}I]monoiodo-TME derivatives using a linear gradient. Elution was started with 45% methanol in water-acetonitrile (2:1, v/v), increasing to 80% from 8 to 13 min. Flow-rate, 1 ml/min. VI = bicyclo-PGE₂; other compounds as in Fig. 3.

demonstrates that the hydrophobic [^{125}I]monoiodo-TME derivative of bicyclo-PGE₂, which would require an inconveniently long separation time in isocratic elution (Table I), can be eluted in less than 15 min in a single run with the more polar [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of 6KPGF, TXB₂, PGE_{2a} and DHKPGF. Under these conditions, the elution volumes of the non-radioactive TME derivatives are unchanged (Table I), and therefore the good separation from target compounds of [^{125}I]monoiodo derivatives is subsequently guaranteed. In addition to its use reported here, gradient elution is used routinely in our laboratory for the follow-up of labelling procedures for various prostanoid derivatives, so that the retention volumes of the hydrophobic diiodo derivatives produced during the iodination process are decreased.

In contrast to the RP-HPLC separation of free prostanoids, which is generally performed in acidic eluents, with the TME and [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of PGE₂ we found it disadvantageous to acidify the ternary eluent⁴. In this work, the effect of pH on the separation time and efficiency was studied further by using the same isocratic solvent system. For this purpose, the solvent was acidified to pH 3.0 with acetic acid. The retention times obtained with 40% and 50% methanol concentrations are summarized in Table II. Comparing these values with those obtained with an unacidified solvent mixture (apparent pH 6.0) (Table I), it can be seen that with a decrease in pH the retention times of both the TME and [^{125}I]monoiodo-TME derivatives of 6KPGF doubled, but only a 10–20% increase was observed with the other prostanoid derivatives. The large increase in retention times of 6KPGF derivatives was accompanied by a simultaneous very strong peak broadening. A pronounced tendency for peak broadening was also observed with other TME and [^{125}I]monoiodo-TME derivatives, although to a much smaller extent than that observed with 6KPGF derivatives. Still, this peak broadening results in an undesirable decrease in the separation factors, and makes it disadvantageous to apply an acidified solvent mixture for analytical purposes.

To explain the significant change in the retention volumes of 6KPGF derivatives, it is worth mentioning that 6KPGF itself is known to isomerize to a hemiketal

TABLE II
RETENTION VOLUMES (ml) IN AN ELUENT MIXTURE OF pH 3.0

Each derivative was run separately. Solvent A, water–acetonitrile (2:1, v/v) containing 0.1% (v/v) of acetic acid; solvent B, methanol. Dead volume, 1.0 ml; flow-rate, 1.0 ml/min.

Prostanoid	B (%)			
	40		50	
	TME	[^{125}I]TME	TME	[^{125}I]TME
6KPGF	4.3	7.9	3.1	5.3
TXB ₂	4.2	7.9	2.7	4.5
PGE ₂	5.1	9.9	2.6	4.7
PGF _{2a}	5.6	10.7	3.2	5.2
DHKPGF	7.3	14.2	4.1	6.3
Bicyclo-PGE ₂	9.3	27.5	5.2	12.2

form, which results in a peak broadening on silica gel thin layers⁸. It is also interesting that the [¹²⁵I]histamine derivative of 6KPGF could be isolated in two interconvertible forms, that had the same immunoactivity⁹.

These observations raise the possibility that a changed equilibrium at pH 3 between the ketone and hemiketal forms of 6KPGF may account for the significant increase in the retention volume of 6KPGF-[¹²⁵I]monoiodo-TME that we observed. This phenomenon suggests that the structure of an eicosanoid may play a determining role in the chromatographic properties of [¹²⁵I]monoiodo-TME derivatives of prostanoids. If so, the contribution to the elution pattern of the TME and [¹²⁵I]TME derivatives of the parent prostanoid structure may have a beneficial effect with regard to RP-HPLC selectivity. Considering the relatively high pK value of the phenolic OH group in *ortho*-monoiodo derivatives (pK = 8.0), the decrease in pH from 6.0 to 3.0 cannot be considered to affect the ionization pattern of the tyrosine function, but only that of prostanoid skeleton. It can be concluded that it is the definitive role of the prostanoid structure that underlies the good selectivity, which is superior to those of other separation methods, in this RP-HPLC system. Accordingly, we always obtained a better resolution for various derivatives with the RP-HPLC system than with the use of either Sephadex LH-20 adsorption chromatography or silica gel thin-layer chromatography.

REFERENCES

- 1 J. Maclouf, M. Pradel, Ph. Pradelles and F. Dray, *Biochim. Biophys. Acta*, 431 (1976) 139.
- 2 I. Mucha, G. Tóth and B. Tanács, *Izotóptechnika*, 22 (1979) 190.
- 3 G. Tóth, I. Mucha and B. Tanács, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 433.
- 4 I. Mucha and G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 438 (1988) 111.
- 5 E. Granström, M. Kumlin and H. Kindahl, in *Prostaglandins and Related Substances: a Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1987, p. 167.
- 6 E. Granström and H. Kindahl, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 6 (1980) 181.
- 7 V. R. Meyer, *Practical High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1988.
- 8 S. E. Barrow, K. A. Waddell, M. Ennis, C. T. Dollery and J. A. Blair, *J. Chromatogr.*, 239 (1982) 71.
- 9 F. Dray, *Methods Enzymol.*, 86 (1982) 297.

Mucha I, G. Losonczy: Prostaglandin E2 and gestational hypotension in rabbits. *Prostaglandins*, 40: 143-153, 1990

PROSTAGLANDIN E₂ AND GESTATIONAL HYPOTENSION IN RABBITS
I. Mucha¹ and G. Losonczy²

¹Institute of Isotopes Hungarian Academy of Sciences,
Box 77, H-1525
Budapest, Hungary
and
Department of Pathophysiology
Semmelweis University Medical School,
Box 370, H-1445,
Budapest, Hungary

ABSTRACT Arterial levels of 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂ (PGE₂-M), a stable metabolite of prostaglandin E₂ (PGE₂) were compared between unanesthetized pregnant (n=12) and nonpregnant (n=8) rabbits with the aim of elucidating the role PGE₂ in the development of physiological hypotension associated with pregnancy. On the 20th and 22nd days of the 30 day gestation period the mean arterial concentrations of PGE₂-M were about 10-times higher (p < 0.05) and largely variable as compared to that of nonpregnant rabbits. Mean arterial pressure was not lower on either the 20th (69±4 mmHg, mean±SD) or the 22nd (70±3 mmHg) days of gestation (dg) than in nonpregnant rabbits (69±4 and 73±6 mmHg, respectively). On the 23rd dg hypotension was invariably present (61±5 mmHg vs 72±4 in nonpregnants, p < 0.001), but arterial levels of PGE₂-M (31.0±31.6 ng/ml) did not overcome those measured on earlier, normotensive days of gestation. Hypotension was also evident in a subgroup of pregnant rabbits (n=4) with low PGE₂-M concentrations in the nonpregnant range (3.2±1.5 ng/ml vs 1.9±1.2 in nonpregnant rabbits, ns). Since the arterial level of PGE₂-M proved to correlate (p < 0.001) with both the uteroplacental venous and renal venous PGE₂ concentrations, we suggest that a key role of uteroplacental and renal PGE₂ played in the development of gestational hypotension is not probable in rabbits.

INTRODUCTION Gestation in humans (1), rabbits (2), rats (3) and dogs (4) is associated with arterial hypotension. Blood pressure decreases during pregnancy in spite of a marked increase of cardiac output (5). Accordingly, the development of gestational hypotension may be ascribed

PROSTAGLANDINS

to the reduction of peripheral vascular resistance. Blood (6-9) and urine (10-15) contain increased amounts of prostaglandin E_2 (PGE_2), a vasodilator autacoid, during gestation. The combination of high PGE_2 production and low blood pressure may support the concept of PGE_2 contributing to the gestational decrease of vascular resistance. In order to study the involvement of PGE_2 in the development of pregnancy induced arterial hypotension we measured blood pressure and the arterial concentration of PGE_2 and 13,14-dihydro-15-keto- PGE_2 (PGE_2 -M), a stable metabolite of PGE_2 in conscious, unstressed pregnant rabbits. Blood pressure and prostaglandin levels were studied on the 20th, 22nd and 23rd days of the 30-32 day gestation, respectively. A similar experimental protocol was followed in a control group of nonpregnant rabbits.

METHODS Pregnant and nonpregnant New Zealand white rabbits weighing 3.5-4.0 kg were used. The animals had free access to synthetic food (Labor-K rabbit chow, containing 1% NaCl, LATI Hungary) and tap water and were housed in individual cages. The gestation of the rabbit is 30-32 days; studies were performed at the beginning of the 3rd trimester between the 20th and 23rd gestational days. This period of gestation was chosen, because in earlier studies (2) we have found that the onset of the physiological, pregnancy induced hypotension did not occur before the 20th but was invariably present on the 23rd day of pregnancy.

Mean arterial pressure (MAP) was measured directly in the central ear artery (2). In order to induce vasodilation of the ear artery and thereby level the local intraarterial pressure with the pressure in the carotid artery rabbits were kept warm ($37-38^{\circ}C$) for 30 min before MAP measurements. In preliminary studies using 7 rabbits instrumented by an indwelling microprobe thermocouple (Columbus Instruments, Columbus Ohio) in the carotid artery we compared blood temperature before and after the 30 min warming period using Cardiomax II (Columbus Instruments, Columbus Ohio). Blood temperature was increased by $0.70 \pm 0.32^{\circ}C$ (mean \pm SD). Local anesthesia was induced by lidocain (2%) applied subcutaneously at the root of the ear. Then, rabbits were placed in a restraining cage and after the elapse of 8-10 minutes following arterial puncture by a 22-G needle catheter, three subsequent MAP (diastolic pressure plus one third of pulse pressure) recordings were taken 5 min apart (2). The average of these values was taken as representative. MAP of our nonpregnant rabbits corresponded to previous reported values detected either in the catheterized abdominal aorta (16,17) or the central ear artery (18-20) of nonpregnant rabbits. In a preliminary study using 8 nonpregnant and 4 pregnant unanesthetized rabbits instrumented with a chronic indwelling catheter in the right carotid artery, carotid and contralateral ear artery MAP-s were recorded simultaneously. MAP in the carotid artery of these 12 animals ranged from 59 mmHg to 115 mmHg (a range corresponding to previous reported data, refs. 17, 21). The linear regression analysis indicated strong correlation between ear and carotid arterial pressures: MAP (carotid, mmHg) = $1.04 \times MAP$ (ear, mmHg) + 3.43 mmHg, $n=96$, $r=0.962$, $p<0.0001$).

After MAP recordings 4 ml arterial blood was collected in chilled plastic tubes containing 250 units of heparin (Gedeon-Richter Budapest) and 20 ug indomethacin (Sigma) each. Samples were promptly centrifuged (2000g, 15 min, 4°C) and plasma was stored at -20°C until assay for PGE₂ and 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂ (PGE₂-M) concentrations. Plasma prostaglandins were extracted according to Powell et al (22) with slight modification. Acidified plasma samples (1 ml) were slowly pushed through ethanol and water (20 ml each) pretreated Sep-Pak C18 cartridges (Waters Associates, Milford, Maryland) after the addition of ³H-PGE₂ to assess recovery. Inactive prostaglandins were purchased from Upjohn Co. (Kalamazoo, MI). Cartridges were washed with 10 ml water, 10 ml 10 % ethanol and 10 ml n-hexane. Prostaglandins were eluted with 10 ml ethyl-acetate. This fraction was washed with 2 x 1 ml water, then evaporated under vacuum at 40°C and dissolved in 1 ml isotonic saline. Phosphate buffer subjected to similar procedure served as reagent blank. Average recovery of radioactive tracer was 60.6±11.7 % (SD)(n=7), and an average reagent blank (n=14) of 4.1±1.2 pg was observed. Immunoreactivity of plasma samples was corrected by the value of the reagent blank. ¹²⁵I-PGE₂-tyrosine-methyl-ester served as tracer. Antiserum was raised against PGE₂-bovine serum albumin conjugate in rabbits. Cross-reactivity of the antiserum was as follows: PGE₂:100%, PGF_{2α}:2%, 6-keto-PGE₁:1.6%, PGF_{1α}:1.4%, PGA₂:0.35%, PGD₂:0.15%, 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{1α}:0.05%, 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂:0.05%, 6-keto-PGF_{1α}, TxB₂, 11-dehydro-TxB₂, 13,14-dihydro-6,15-diketo-PGF_{1α}, 9α,11β-PGF₂ and arachidonic acid less than 0.01%. Measuring range of the assay: 1.4-300.0 pg/tube; detection limit: 2-3 pg/tube; the amount of cold PGE₂ sufficient to displace 50% of bound ligand (IC50): 12-20 pg/tube. To 100 ul saline containing plasma prostaglandins, 100 ul radioactive tracer (20,000-40,000 cpm) and 100 ul antiserum (diluted to 1:10,000) was added. The above mixture was adjusted to 400 ul with phosphate buffer (50 mM pH 7.3) containing gelatine (0.1%)(Sigma) and the tubes were incubated overnight at 4°C. The unbound tracer was adsorbed using 0.5% dextrane (Dextrane F-70 Serva) and 1% charcoal (Norit A Serva) suspended in phosphate buffer (10 mM pH 7.3). After centrifugation, the radioactivity of the bound fraction in the supernatant was counted. The intra- and inter-assay coefficient of variation was below 10 and 20 %, respectively.

Validation of PGE₂ radioimmunoassay (RIA) by immuno-thin-layer-chromatography. Extracted plasma samples were chromatographed on Kieselgel 60 plates (Serva) in water-saturated ethyl-acetate as developing solvent. After development 0.5 lanes were scraped and eluted with ethanol. Aliquots of ethanolic solutions were evaporated, the residue dissolved in assay buffer and measured by PGE₂-RIA. As it can be seen on Figure 1A, 100% of PGE-like immunoactivity² of plasma extracts co-migrated with authentic PGE₂. This proved that the solid phase extraction applied could efficiently remove cross-reacting immunoreactive materials from plasma.

PROSTAGLANDINS

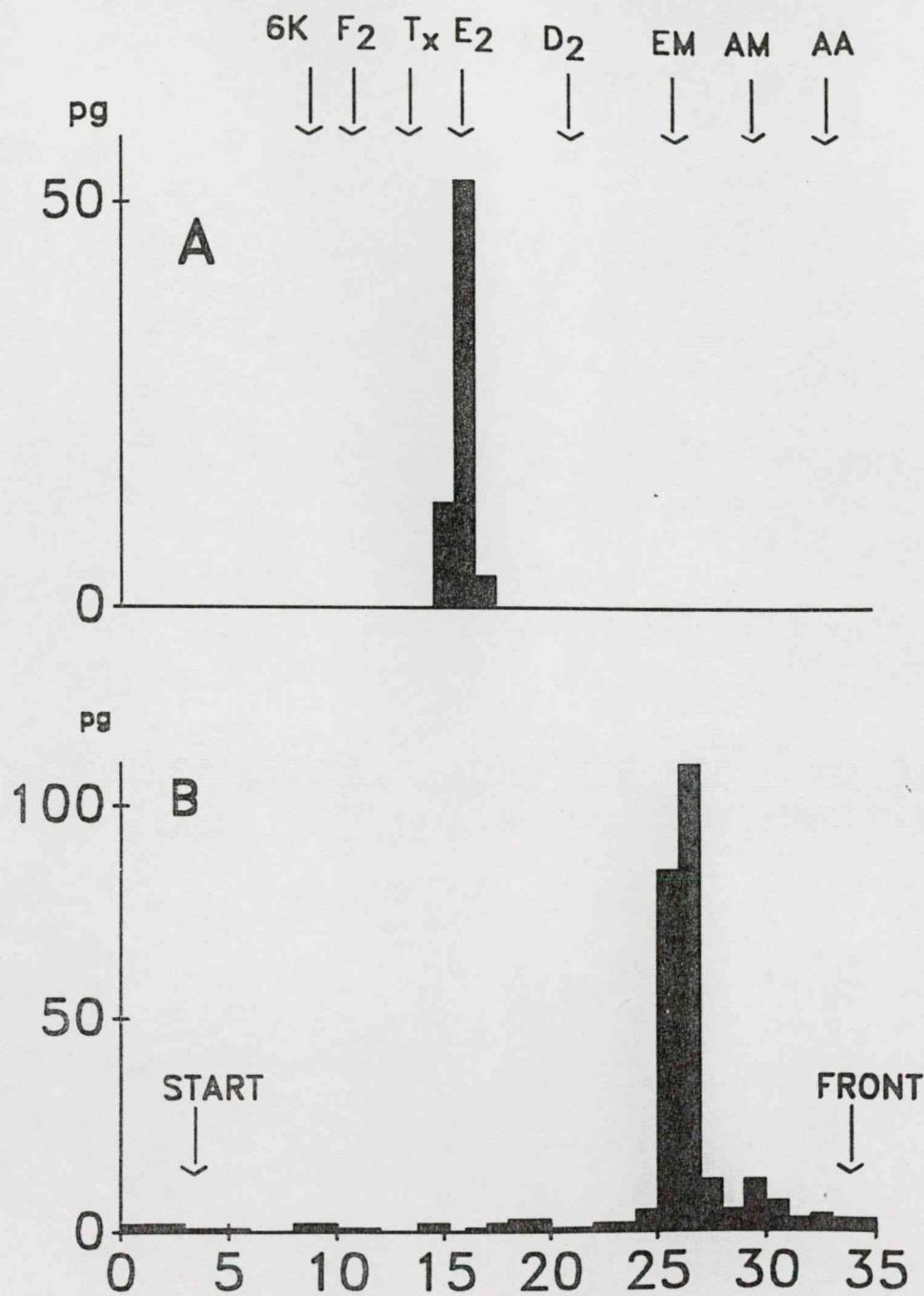


Fig 1. Immuno-thin-layer-chromatography of plasma extracts (coloumns) and authentic prostanoids (arrows). Numbers on abscissa indicate centimeters. Abbreviations: 6k - 6-keto-PGF_{1α}, F₂ - PGF₂, T_x - TxB₂, E₂ - PGE₂, D₂ - PGD₂, EM - 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂, AM - 13,14-dihydro-15-keto-PGA₂, AA - arachidonic acid.

PGE_2 -M 13,14-dihydro-15-keto- PGE_2 (PGE_2 -M) concentration was measured after converting PGE_2 -M to the stable derivative, 11-deoxy-13,14-dihydro-15-keto-11 β ,16E-cycloprostaglandin E_2 (bicyclo- PGE_2 , Ref. 23). For the measurement of bicyclo- PGE_2 , we developed a sensitive and specific radioimmunoassay using ^{125}I -labelled bicyclo- PGE_2 -tyrosine-methyl ester as a radioligand. Antiserum was raised in rabbits against bicyclo- PGE_2 conjugated to bovine serum albumin (BSA). Bicyclo- PGE_2 -BSA (1 mg/0.5 ml saline) was mixed 1:1 with complete Freund adjuvant and injected intradermally at 50-70 sites on the back. Boosters (half of the initial amount) were similarly administered 3 months later and monthly thereafter. Antibody production was first detected following the 2nd and an appropriate antiserum could be harvested following the 7th booster. Antiserum selectivity was as follows: 13,14-dihydro-15-keto- PGE_2 : 0.15%, PGA_2 : 0.02%, and less than 0.001 % for PGD_2 , PGE_2 , PGE_1 , $PGF_{2\alpha}$, $PGF_{1\alpha}$, 6-keto- $PGF_{1\alpha}$, TxB_2 , 11-dehydro- TxB_2 , $9\alpha,11\beta$ - PGF_2 , 13,14-dihydro-6,15-diketo- $PGF_{1\alpha}$ and arachidonic acid. Detection limit: 1 pg/tube; average dose corresponding to IC_{50} from 16 independent calibrations: 7.39 ± 1.29 pg/tube. Intra- and interassay coefficients of variation using 5.6 pg pure substance were 7 and 8 % (16 determinations), and for plasma samples in the range of $IC_{50} \pm 20$ concentrations were under 10 and 20 %, respectively.

Plasma samples were extracted as described above for PGE_2 extraction. Extraction recovery was assessed by the addition of 3H - PGE_2 -M (68.3 ± 11.3 % $n=7$). Reagent blank was always under detection limit. One ml saline containing the crude plasma extract was diluted 1:5 with saline and alkalinized by the addition of 40 μ l 1 M Na_2CO_3 (17). Following a 16-20 hour incubation period at 36°C, 60 μ l KH_2PO_4 was added. Standard 13,14-dihydro-15-keto- PGE_2 solution was similarly treated. To 100 μ l samples of plasma extracts or standards, 100 μ l tracer (20,000-40,000cpm), 100 μ l diluted (1:60,000) antiserum and 100 μ l phosphate buffer (50 mM, pH 7.30) containing 0.1 % gelatine was added. Incubation lasted overnight at 4°C. Bound and unbound tracer were separated as described under PGE_2 assay.

Validation of bicyclo- PGE_2 RIA by immuno-thin-layer-chromatography.

Chromatographic procedure was the same as that described for PGE_2 . Aliquots of ethanolic eluates of individual lanes were evaporated to dryness, then redissolved in saline and treated according to RIA procedure. The PGE_2 -M immunoactivity of plasma extracts co-migrated with standard PGE_2 -M (Fig 1B). Only a few per cent of immunoactivity was detected in the zone corresponding to 13,14-dihydro-15-keto- PGA_2 , a dehydrated product of PGE_2 -M, which also forms bicyclo- PGE_2 after alkaline treatment. This observation provides evidence that the new ^{125}I -bicyclo- PGE_2 RIA described here is suitable for the measurement of PGE_2 -M in rabbit plasma after solid-phase extraction without further purification of crude extract.

Experimental protocol

Arterial blood pressure measurements and collection of arterial blood were carried out on the 20th, 22nd and 23rd day of gestation in 12 pregnant rabbits. In a total of 22 pregnant rabbits, on the 23rd day of gestation, median laparotomy was performed under pentobarbital anesthesia and blood was collected from a large uterine and the left renal vein for PGE_2 assay. Nonpregnant rabbits

PROSTAGLANDINS

(n=8) served as controls.

Statistical analysis Levels of significance were calculated by the Wilcoxon-test (24). Linear regression was employed for the analysis of correlation. A "p" value less than 0.05 was used as the level of significance. Data are presented as means \pm standard deviation.

RESULTS As compared to the nonpregnant levels the arterial concentration of 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂ (PGE₂-M) was higher in pregnant rabbits on each of the 20th, 22nd and 23rd days of gestation (dg) (Table 1). In pregnant rabbits the arterial PGE₂-M concentration ranged from 0.5 to 92.7 ng/ml. In contrast to PGE₂-M, the difference in the arterial concentration of PGE₂ between nonpregnant and pregnant rabbits did not reach statistical significance.

On the 20th and 22nd dg mean arterial pressure (MAP) in pregnant rabbits did not differ from values measured in nonpregnant controls (Table 1). Gestational hypotension, however, appeared in each of the pregnant rabbits by the 23rd dg with MAP values lower by about 11 mmHg ($p < 0.001$) in average than in nonpregnant animals. On the 20th and 22nd dg unchanged MAP was associated with highly variable but in average a markedly elevated arterial PGE₂-M level (Table 1). On the 23rd dg, when hypotension was present in each pregnant rabbit, the arterial PGE₂-M (and PGE₂) concentrations were not higher than those measured on the 20th and 22nd dg. At the same time hypotension was fully manifested in some pregnant rabbits with arterial PGE₂-M concentrations not significantly differing from the nonpregnant values (Table 1). The mean PGE₂-M concentration in these pregnant rabbits (# 1-4) was 3.2 ± 1.5 ng/ml.

On the 23rd dg the uterine venous blood contained largely variable but in average higher amounts of PGE₂ than in nonpregnant rabbits (352.0 ± 356.2 ng/ml vs 1.4 ± 0.6 ng/ml, $p < 0.001$). The uterine venous PGE₂ concentration varied from 0.9 ng/ml to 995.0 ng/ml and there was a positive correlation ($r = 0.909$, $p < 0.001$) between the uterine venous PGE₂ and the arterial PGE₂-M levels. The renal venous PGE₂ concentration was also higher in pregnant than in nonpregnant rabbits (7.8 ± 7.8 ng/ml vs 1.1 ± 0.7 ng/ml, $p < 0.001$). In pregnant rabbits, a positive correlation ($r = 0.893$, $p < 0.001$) could be revealed between the renal venous PGE₂ and the arterial PGE₂-M concentrations, too.

These findings indicate that during rabbit gestation the markedly increased uteroplacental and renal PGE₂ release may not necessarily be associated with arterial hypotension, and additionally, that arterial hypotension may develop in the absence of increased PGE₂ formation.

DISCUSSION According to a popular but unproven hypothesis vasodilator prostaglandins - PGE₂ and prostacyclin - may be responsible for the dilated vascular space and lower arterial pressure characterizing normal pregnancy (7,25). The urinary excretion of PGE₂ (10) and prostacyclin metabolites (11) were demonstrated to be higher in pregnant than in nonpregnant women. Venuto and Donker (12) and Paller (13) have re-

Table 1. Prostaglandin E₂ and gestational hypotension in rabbits

	gestational day								
	20.			22.			23.		
	arterial			arterial			arterial		
	PGE ₂	PGE ₂ -M	pressure ^a	PGE ₂	PGE ₂ -M	pressure	PGE ₂	PGE ₂ -M	pressure
	ng/ml	ng/ml	mmHg	ng/ml	ng/ml	mmHg	ng/ml	ng/ml	mmHg
rabbit #									
1	0.49	0.50	68	0.59	2.70	70	0.10	0.70	61
2	1.17	0.70	72	-	2.81	71	0.34	3.81	63
3	2.05	6.42	75	-	2.91	72	0.13	3.89	62
4	1.94	9.50	70	0.23	4.80	72	0.39	4.65	65
5	2.71	20.90	67	1.56	5.60	70	1.34	7.50	59
6	0.82	25.00	64	0.53	15.50	66	2.12	31.61	60
7	2.12	25.70	67	1.99	21.50	68	3.19	21.60	57
8	3.16	30.80	75	2.22	22.50	70	1.62	22.00	48
9	0.22	38.30	65	2.45	36.10	70	1.98	41.60	58
10	0.57	39.80	70	0.48	69.80	73	-	68.40	68
11	-	57.50	62	1.02	76.20	71	1.07	74.50	64
12	0.72	69.40	73	2.12	90.50	68	2.32	92.70	66
pregnant									
mean±	1.45	27.00	69	1.32	29.20	70	1.33	31.00	61
SD	0.99	21.70	4	0.84	31.90	3	1.02	31.61	5
nonpregnant									
mean±	0.56	2.75	69	0.68	2.34	73	0.60	1.91	72
SD (n=8)	0.27	1.70	4	0.29	1.01	6	0.30	1.29	4
level of significance	ns	<0.02	ns	ns	<0.05	ns	ns	<0.05	<0.001

^a mean arterial pressure

PROSTAGLANDINS

PROSTAGLANDINS

ported increases of urinary PGE₂ excretion in pregnant rabbits and rats, respectively. Some investigators have reported circulating levels of these prostaglandins during pregnancy (7,9,12,25) which perhaps originated from the fetoplacental unit (7,9). In in vitro studies the kidney (26) and especially the placental tissue (27) of pregnant rabbits were found to be rich sources of PGE₂. Our present data further substantiate the elevation of uterine (uteroplacental and fetal) and renal release of PGE₂ during rabbit gestation reported earlier (2,6,8,9,12,14,15). Despite the dramatic rise in venous influx, the arterial levels of this primary prostaglandin did not become significantly higher, than in nonpregnant rabbits. In contrast, the arterial concentration of 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂ (PGE₂-M), a stable metabolite of PGE₂, was higher in pregnant than in nonpregnant rabbits, which provided the opportunity of studying the possible relationship between changing PGE₂ release and blood pressure in conscious noninstrumented rabbits, during gestation. In this study, positive correlations were demonstrated between venous (uterine/renal) PGE₂ and arterial PGE₂-M concentrations. Since we could also find a significant positive correlation between the uterine venous and renal venous PGE₂ concentrations ($r=0.92$ $p<0.001$), we speculate that high/low uteroplacental PGE₂ excretion may be coupled with proportionately high/low PGE₂ release at other sites of production like the kidneys or the arterial vasculature, both participating in blood pressure regulation. If so, based on the arterial PGE₂-M concentration one can evaluate systemic PGE₂ production in pregnant rabbits repeatedly at any given time of gestation. If the pregnancy induced elevation of PGE₂ release has a role in the development of pregnancy induced hypotension, highly elevated arterial PGE₂-M concentrations should be associated with lower blood pressure, and no hypotension should develop in the absence of PGE₂ overproduction. We could not identify a clear relationship between arterial PGE₂-M levels and arterial pressure during the 20-23rd days of the 30 day gestation of rabbits. On the 20th and 22nd days as high as 20-30 times of the nonpregnant mean PGE₂-M concentrations were evidenced in several pregnant animals without the presence of lower blood pressure. During the same gestational days, other pregnant rabbits had much lower arterial PGE₂-M (and uterine as well as renal venous PGE₂) concentrations, close to or within the nonpregnant range. These large differences in PGE₂ release were not reflected in the level of arterial pressure, "low PGE₂ excretor" pregnant rabbits (#1,2,3,4, see Table 1) did not have higher arterial pressures than the rest of the pregnant animals with much higher PGE₂-M values. Another finding not supporting a primary role of PGE₂ in pregnancy induced hypotension in rabbits was that hypotension characterizing the 23rd day of gestation was equally present in those four pregnant rabbits which had PGE₂-M levels as low as the nonpregnant values.

The large variation of uterine venous PGE₂ concentration is in good agreement with data published earlier (8). In the latter study, uterine venous PGE₂ concentrations as determined by gas chromatography combined with mass-spectrometry were found to vary over the range of 0.2-600.0 ng/ml in rabbits on the 19th - 29th days of gestation. Venuto et al (9) have determined uterine venous PGE₂ in pregnant rabbits and the published values were also high and largely variable (41.1 - 500.0 ng/ml)..

We have no clear explanation for the great scatter of uterine and renal venous PGE₂ concentrations. All our pregnant rabbits had live feti as evidenced at cesarean section. The number and body weight of feti in "high and low PGE₂ excretor" rabbits was similar. The site of blood sampling was identical in each rabbit used in this experiment. Based on the significant correlations between the uterine and renal venous PGE₂, as well as between venous PGE₂ and arterial PGE₂-M concentrations, methodological errors in sample processing or radioimmunoassay do not seem probable.

When the participation of prostaglandins is studied in physiological phenomena, drugs inhibiting their biosynthesis are frequently used. Prostaglandin synthesis inhibition is generally not more efficient than 50-80% decrease of blood and urinary levels (28). In addition, indomethacin and other non-steroidal antiinflammatory drugs have several effects besides the prostaglandin synthesis inhibitory one (28,29) making drug induced physiological effects difficult to evaluate. We think our data are of interest because they describe that particular period of rabbit gestation, in which endogenous PGE₂ release is highly variable and gestational hypotension is just under development. The differences in PGE₂ and PGE₂-M concentrations between individual pregnant rabbits were larger than that can be induced by prostaglandin synthesis inhibitors. This variability in PGE₂ release was not at all associated with a similar variability in blood pressure. On the contrary, in each of the 12 pregnant rabbits arterial pressure has been maintained on the normal nonpregnant level until the 22nd day of gestation. One day later, on the 23rd day of gestation, all pregnant rabbits evidenced a significant fall of blood pressure. This sudden and uniform change in blood pressure was not associated with a further elevation of arterial PGE₂-M concentration and was fully manifested in pregnant rabbits with PGE₂-M levels not differing from that of nonpregnant rabbits.

Conrad and Colpoys (30) administered cyclooxygenase inhibitors to conscious pregnant rats. Indomethacin failed to decrease renal hemodynamics. Neither indomethacin, nor meclophenamate affected the blunted vascular pressor response to intravenous administration of norepinephrine and angiotensin II. In agreement with these, Baylis (3) could neither demonstrate inhibitory effects of indomethacin on renal blood flow and glomerular filtration rate in pregnant rats. Using pregnant sheep Naden et al (31) have found that indomethacin produced uteroplacental vasoconstriction for about 20 min after administration during which period no appreciable inhibition of prostaglandin production could be verified. Prostaglandin synthesis inhibition became apparent only 2-4 hours later when, however, no vasospasm was present. Lately, we administered two subsequent indomethacin suppositories (15 mg/kg each, 32) to pregnant rabbits, one on the 22nd and one on the 23rd day of gestation. Indomethacin treatment decreased the 24 hour urinary excretion of PGE₂ to 30% ($p < 0.05$) of pretreatment value. Mean arterial pressure was measured before the first (22nd day) and two hours after the second dose (23rd day). As compared to pretreatment values, arterial pressure was decreased by day 23 in all pregnant rabbits receiving indomethacin, in average by 5 ± 7 mmHg ($p < 0.001$, $n=10$). On this day, arterial pressure of indomethacin treated pregnant rabbits (61 ± 9 mmHg) did not differ from that of control pregnant rabbits (58 ± 8 mmHg $n=12$) receiving the vehicle (butyrum ca-

PROSTAGLANDINS

cao).

Thus it appears that a key role of the vasorelaxant prostaglandins played in the mechanism of uteroplacental, renal and systemic arterial vasodilation in pregnancy is doubtful.

REFERENCES

1. Weinberger, N.H., J.N.Kramer, L.P.Peterson, R.E.Cleary and P.C.Young In Hypertension in Pregnancy (M.D.Lindheimer, A.I.Katz, R.Zuspan eds), Wiley, New York 1976, p.263.
2. Losonczy, Gy., H.Todd, D.C.Palmer and F.Hertelendy. Prostaglandins, Norepinephrine, Angiotensin II and Blood Pressure Changes Induced by Uteroplacental Ischemia in Rabbits. Clin exp Hypert B5:271,1987.
3. Baylis, C. Renal Effects of Cyclooxygenase Inhibition in the Pregnant Rat. Am J Physiol 253:F158,1987.
4. Woods, L.L. and V.L.Brooks. Role of the Renin-Angiotensin System in Hypertension During Reduced Uteroplacental Perfusion Pressure. Am J Physiol 257:R204,1989.
5. Chesley, L.C. Hypertension in Pregnancy. Appleton-Century-Crofts, New York, 1978.
6. Donker, A.J.M., I.Min and R.C.Venuto. The Conscious Instrumented Rabbit: a Model for the Study of Mechanisms of Blood Pressure Regulation During Pregnancy. Hypertension 5:514,1983.
7. Gerber, J.G., N.A.Payne, R.C.Murphy and A.S.Nies. Prostacyclin Produced by the Pregnant Uterus in the Dog May Act as a Circulatory Vasodepressor Substance. J Clin Invest 67,632,1981.
8. Lytton, F.D.C. and N.L.Poyser. Concentrations of PGF₂ and PGE₂ in the Uterine Venous Blood of Rabbits During Pseudopregnancy and Pregnancy. J Reprod Fert 64: 421,1982.
9. Venuto, R.C., T.O'Dorisio, F.H.Stein and T.F.Ferris. Uterine Prostaglandin E Secretion and Uterine Blood Flow in the Pregnant Rabbit. J Clin Invest 55:193,1975.
10. Pedersen, E.B., N.J.Christensen, P.Christensen, P.Johannesen, H.J.Korne-rup, S.Kristensen, J.G.Lauritsen, P.P.Leyssac, A.Rasmussen and M. Wohlert. Preeclampsia - a State of Prostaglandin Deficiency? Hypertension 5:105,1983.
11. Goodman, R.P., A.P.Killam, A.R.Brash and R.A.Branch. Prostacyclin Production During Pregnancy: Comparison of Production During Normal Pregnancy and Pregnancy Complicated by Hypertension. Am J Obstet Gynecol 142:817,1982.
12. Venuto, R.C. and A.J.M.Donker. Prostaglandin E₂, Plasma Renin Activity, and Renal Function Throughout Rabbit Pregnancy. J Lab Clin Med 99:239, 1982.
13. Paller, M.S. Mechanism of Decreased Pressor Responsiveness to Ang II, NE and Vasopressin in Pregnant Rats. Am J Physiol 247:H100,1984.
14. Bay, W.H. and T.F.Ferris. Factors Controlling Plasma Renin and Aldosterone During Pregnancy. Hypertension 1: 410,1979.
15. Ferris, T.F. and E.K.Weir. Effect of Captopryl on Uterine Blood Flow and Prostaglandin Synthesis in the Pregnant Rabbit. J Clin Invest

- 71:809,1983.
16. Schadt, J.C. and R.R. Gaddis. Renin-Angiotensin System and Opioids During Acute Hemorrhage in Conscious Rabbits. *Am J Physiol* 258: R543,1990.
 17. Matsukawa, S, Keil, L.C. and I.A. Reid. Role of Renal Nerves in Regulation of Vasopressin Secretion and Blood Pressure in Conscious Rabbits. *Am J Physiol* 258: F821,1990.
 18. Romero, J.C. and C.G. Strong. The Effect of Indomethacin Blockade of Prostaglandin Synthesis on Blood Pressure of Normal Rabbits and Rabbits with Renovascular Hypertension. *Circ Res* 40:35,1977.
 19. Beilin, L.J. and J. Bhattacharya. The Effect of Prostaglandin Synthesis Inhibitors on Renal Blood Flow Distribution in Conscious Rabbits. *J Physiol* 269:395,1977.
 20. Miyamori, I., T. Morise, M. Ikeda, H. Koshida, Y. Takeda, S. Yasuhara, H. Takimoto and R. Takeda. Role of Prostacyclin in Blood Pressure Regulation and Aldosterone Production in Conscious Rabbits. *Clin Sci* 66,33,1984.
 21. Kozma, C., W. Macklin, L.M. Cummins and R. Mauer. Anatomy, Physiology and Biochemistry of the Rabbit. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Weisbroth, S.H., Flatt, R.E. and A.L. Kraus. Academic, New York, 1974, p.58.
 22. Powell, W.S. Rapid Extraction of Oxygenated Metabolites of Arachidonic Acid from Biological Samples Using Octadecylsilyl Silica. *Prostaglandins* 20:947,1980.
 23. Fitzpatrick, F.A., R. Aguirre, J.E. Pike and F.H. Lincoln. The stability of 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂. *Prostaglandins* 19:917,1980.
 24. Golgstein, A. *Biostatistics: An Introductory Text*. McMillan, New York, 1964, p.55.
 25. Whalen, J.B., C.J. Clancey, D.B. Farley and D.E. Van Orden. Plasma Prostaglandins in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 51:52,1978.
 26. Brown, G.P. and R.C. Venuto. In Vitro Renal Eicosanoid Production During Pregnancy in Rabbits. *Am J Physiol* 254: E687,1988.
 27. Brown, G.P. and R.C. Venuto. Eicosanoid Production in Rabbit Vascular Tissues and Placentae. *Am J Physiol* 258:E418,1990.
 28. Flower, R.J. Drugs Which Inhibit Prostaglandin Biosynthesis. *Pharmacol Rev* 26:33,1974.
 29. Keeton, T.K. and W.B. Campbell. The Pharmacological Alteration of Renin Release. *Pharmacol Rev* 32:81,1980.
 30. Conrad, K.P. and M.C. Colpoys. Evidence Against the Hypothesis that Prostaglandins Are the Vasodepressor Agents of Pregnancy. *J Clin Invest* 77:236,1986.
 31. Naden, R.P., C.A. Iliya, B.S. Arant, Jr., N.F. Gant, Jr. and C.N. Rosenfeld. Hemodynamic Effects of Indomethacin in Chronically Instrumented Pregnant Sheep. *Am J Obstet Gynecol* 151:484,1985.
 32. Losonczy, Gy. and I. Mucha. Indomethacin Exaggerates Reduced Uteroplacental Perfusion Pressure Hypertension. Submitted for publication.

Editor: H.R. Behrman

Received: 1-29-90

Accepted: 6-5-90

Mucha I, Riutta A and Vapaatalo H: Factors affecting the reliability of direct radioimmunoassay for urinary 11-dehydrothromboxane B2 with 125I-labelled ligand: albumin and heterogeneous immunoreactivity. Eicosanoids 4: 1-7, 1991

Original articles

Factors affecting the reliability of direct radioimmunoassay for urinary 11-dehydrothromboxane B₂ with ¹²⁵I-labelled ligand: albumin and heterogeneous immunoreactivity

István Mucha¹, Asko Riutta², and Heikki Vapaatalo²

¹ Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 77, H-1525 Budapest, Hungary

² Department of Biomedical Sciences, University of Tampere, Box 607, SF-33101 Tampere, Finland

Received August 7, 1990 / Accepted in revised form October 2, 1990

Abstract. The determination of 11-dehydrothromboxane B₂ (11-dehydro-TXB₂) from unextracted human urine was studied by means of a specific radioimmunoassay based on the use of the ¹²⁵I-labelled tyrosine methyl ester derivative of 11-dehydro-TXB₂ as radioligand. The assay was evaluated in various incubation media by either dextran-coated charcoal (DCC) or polyethylene glycol (PEG) separation. Both the non-specific and the specific binding showed high variation in different assay media with DCC separation but with the use of PEG separation, however, the non-specific binding was constant. The verification tests carried out in both separation systems revealed a high variation of equilibrium with the individual samples. The albumin content of urine is proposed to be one important factor underlying poor reliability of direct radioimmunoassay. Both the immunoreactivity profiles observed after HPLC separation and the apparent 11-dehydro-TXB₂-like immunoreactivity values determined by direct radioimmunoassay demonstrated that the unextracted urine contained a high ratio of interfering materials. It is concluded that efficient purification of human urine before determination is essential when this type of ¹²⁵I-labelled radioligand is employed in radioimmunoassay.

Key words: Radioimmunoassay - 11-dehydrothromboxane B₂ - Urine - Albumin - Immunochromatogram

Thromboxane A₂, a potent platelet-aggregating and vasoconstrictor agent [8] is of functional importance in various physiological and pathophysiological processes in man. Measurement of thromboxane B₂ (TXB₂), a stable hydration product of thromboxane A₂ in plasma as well as in urine is often used as an indicator of thromboxane biosynthesis *in vivo*. However, artefactual formation of TXB₂ during sampling [5-7] gives high concentrations in

plasma, while urinary TXB₂ derives largely from the kidneys [15].

Two major pathways of TXB₂ metabolism have been described [16]: one involves beta-oxidation which results in 2,3-dinor-TXB₂ and the other involves dehydrogenation of the hemiacetal group at C-11 to produce a series of metabolites (e.g. 11-dehydro-TXB₂) with a delta-lactone ring structure. 11-dehydro-TXB₂ is now established as an abundant break-down product in plasma and in urine which reflects endogenous TXB₂ production [2, 4, 20].

Analytical procedures based on radioimmunoassay (RIA) or GC-MS have been reported [1-4, 10-13, 17, 20] for the measurement of 11-dehydro-TXB₂ in biological fluids. Since 11-dehydro-TXB₂ can occur in an acyclic (open) and a closed (lactone) form and the equilibrium between the two forms is pH-dependent [10], it is necessary to ensure complete equilibration in measurement by RIA. Tritiated 11-dehydro-TXB₂ has been used as tracer for RIA in the overwhelming majority of cases [1, 3, 10, 20], but as an alternative, Lecompte et al. [12] reported the use of a ¹²⁵I-labelled histamine derivative of 11-dehydro-TXB₂ for the measurements in human fluids. Recently another radioiodinated tracer, ¹²⁵I-tyrosine methyl ester (TME) derivative of 11-dehydro-TXB₂, has been applied in commercial assay systems, but no data on its use in measurements in biological fluid exist.

Since the direct RIA is preferred in clinical studies, the aim of the present work was to study the applications of ¹²⁵I-TME tracer for the direct radioimmunological determination of 11-dehydro-TXB₂ concentration from unextracted human urine.

Materials and methods

Unlabelled material

Unlabelled 11-dehydro-TXB₂ used for the coupling procedure was from Ultrafine Chemicals (Manchester, England). 11-Dehydro-TXB₂ used in RIA standard, 2,3-dinor-thromboxane B₂ and 2,3-dinor-6-keto-prostaglandin F_{1α} were from the Cayman Chemical

Co. (Ann Arbor, Michigan USA). Other prostanoids were from Upjohn Co. (Kalamazoo, Michigan, USA).

Bovine serum albumin (fatty acid free), human serum albumin and bovine gamma globulin were from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA). Tyrosine-methyl ester, 1-ethyl-3(3-dimethyl-amino)-propylcarbodiimide (EDCI) and Norit-A activated charcoal were from Serva (Heidelberg, FRG). Dextran T-70 was from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden).

Labelled materials

Carrier-free Na¹²⁵I (74 TBq/mmol) (Institute of Isotopes, Budapest, Hungary) was used for labelling procedures. ³H-11-Dehydro-TXB₂ (6.47 TBq/mmol) was from Amersham International (Amersham, Buckinghamshire, England).

Production of specific antiplasma

For the production of immunogenic conjugate, 11-dehydro-TXB₂ was coupled to bovine serum albumin according to the method of Kirton et al. [9], with *i*-butyl-chloroformate as coupling reagent. Three male New Zealand rabbits were immunized according to the method of Vaitukaitis et al. [19]. Two weeks after the administration of 2,000 I.U. killed *Bordetella pertussis* (i.m.) the animals were inoculated with 1 mg immunogen at multiple sites in the interscapular region. Prior to injection the immunogen (in 0.5 ml saline) was emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant. Injections were boosted every four weeks thereafter with a half of this quantity, and incomplete Freund's adjuvant. Plasma samples were collected 10 days after booster injections and tested for binding properties.

Preparation of ¹²⁵I-labelled radioligand

11-Dehydro-TXB₂ was coupled to tyrosine-methyl ester (TME) with the water-soluble EDCI as coupling reagent and purified by thin-layer chromatography on silica gel. Pure 11-dehydro-TXB₂-TME was labelled with Na¹²⁵I by the chloramine-T method, and radioiodinated monoiodo-derivative was separated on a Sephadex LH-20 column as described for the labelling and separation of the analogous derivatives of prostaglandin E₂ [14, 18]. Labelled material used as tracer in RIA was stored in 50% ethanol at -20°C.

Radioimmunoassay procedure

Prior to performing the assay, the tracer and 11-dehydro-TXB₂ standards (19 - 56 - 167 - 500 - 1,500 pg/ml) were prediluted with buffer and allowed to incubate overnight at room temperature to convert 11-dehydro-TXB₂ into an open form [10].

RIA was carried out in polystyrene test tubes in 50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.3, containing 0.1% gelatin. The assay mixture contained 0.1 ml antiplasma, 0.1 ml tracer and 0.1 ml of either 11-dehydro-TXB₂ standards or the unknown samples. The final assay volume was adjusted to 0.4 ml by the addition of buffer. This assay composition is referred to as the "buffer-only" throughout the text. Determinations were performed in triplicate. The mixture was allowed to incubate overnight at 4°C, then 0.5 ml of dextran-coated charcoal (DCC) suspension (1% Norit-A and 0.5% Dextran T-70 in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) under continuous stirring was added to each assay tube except for the total count tubes. The tubes were vortexed and incubated (10 min, 4°C), then centrifuged (2,000 × g, 10 min, 4°C). Radioactivity was measured from supernatant aliquots of 0.6 ml in a Clinigamma counter (LKB/Wallac, Turku, Finland).

For RIA by polyethylene glycol (PEG) separation the assay buffer consisted of 50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 0.3% bovine gamma-globulin and 0.005% Triton X-100. To separate bound from free fraction, 1 ml PEG solution (16% w/v PEG in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8) was added to each tube (except for the total count tubes), the mixture incubated (20-min, 4°C) and centrifuged (3,000 × g, 20 min, 4°C). The supernatants were removed by suction and the precipitates measured as in the DCC assay.

Characteristics of radioimmunoassay

An antiplasma at a final dilution of 1/8,000 which bound about 30% of the tracer was used in both separation systems. The cross-reactivity values at both 50% and 80% binding of tracer were: PGD₂ 0.5%, 2,3-dinor-TXB₂ 0.04%, other prostanoids and *o*-hydroxyhippuric acid (salicylic acid; the main urinary metabolite of ASA) all less than 0.01%. Doses of unlabelled 11-dehydro-TXB₂ necessary to displace 50% of bound tracer (ID₅₀ value) were 20 pg/tube and 15 pg/tube in DCC and in the PEG separation system, respectively.

Direct radioimmunoassay of urine samples

Twentyfour-hour urine samples were collected, before and after three days of acetylsalicylic acid (ASA) treatment (0.5 g/day), from healthy volunteers. After measurement of urine volumes, the pH of a 20 ml aliquot was adjusted to 8.3 by 5 M sodium hydroxide, then incubated at room temperature for 24 h. Samples were distributed and single-use aliquots stored at -20°C until RIA measurements. Prostaglandin-free (PG-free) urine was prepared by the addition of 5% (w/v) Norit-A to normal pooled urine, the suspension shaken (60 min) and centrifuged (5,000 × g, 15 min). The supernatant was filtered and the pH adjusted to 8.3 as above.

In the direct assay of urine samples, PG-free urine in the same dilution as that used for unknown samples was added to each tube of the standard curve, while in the PEG separation system the total count tubes contained 0.1 ml tracer solution only.

Immunochemistry and high-performance liquid chromatography

Urine samples (0.15-0.20 ml) acidified to pH 3.0 by 50% trifluoroacetic acid were injected through a Rheodyne sample injector equipped with a 200 µl loop into a Hamilton PRP-1 (4.1 × 150 mm, particle size 5 µm) column. Isocratic separation was achieved in a water/acetonitrile (75:25, v/v) mixture with an LKB 2150 solvent delivery system at a flow rate of 0.7 ml/min. One-minute fractions were collected, the solvent evaporated under nitrogen and lyophilized. Dry residues were redissolved in assay buffer and incubated at room temperature for 24 h before RIA determinations performed in the buffer-only system.

Retention volumes of the two chemical forms of 11-dehydro-TXB₂ were determined by running 1,000-ng of reference materials monitored by their UV absorbance at 196 nm in the same HPLC system. For the preparation of open form, 11-dehydro-TXB₂ was treated with 0.063 M ammonium bicarbonate overnight [10].

Results

Influence of PG-free urine on the standard curve

In the presence of PG-free urine the shape of the dose-response curve remained unchanged as compared to the buffer-only in both separations (Fig. 1). In spite of the

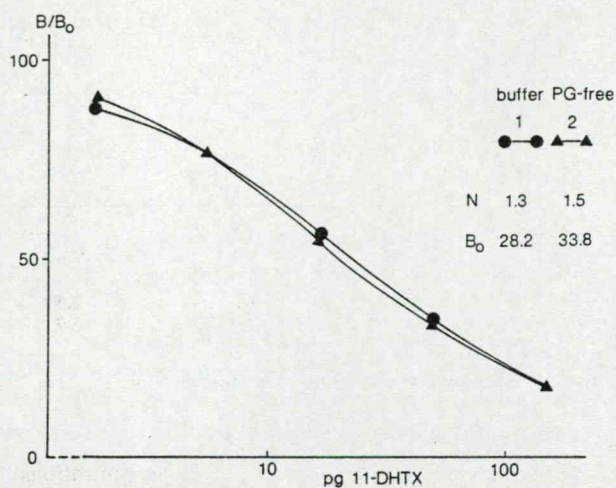


Fig. 1. Influence of PG-free urine on the standard curve. Standard curve set-ups containing buffer only or PG-free urine of 2-fold dilution were compared in a dextran-coated charcoal separation system. Non-specific (N) and specific (B_0) binding are expressed as per cent of total count. B/B_0 is per cent of specific reference binding

Table 1. Effect of the variation of non-specific binding (NSB) on the calculated concentrations of 11-dehydrothromboxane B_2 in direct assay with dextran-coated charcoal separation

Samples	NSB cpm	Calculated amount pg/tube		
		A	B	C
PG free	320			
ASA	852	21.7	13.5	0
Normal (1)	1,369	38.2	15.3	12.8
Normal (2)	2,015	51.5	16.5	20.5
Normal (3)	1,560	65.0	19.5	30.5

For the calculations, different standard curves were prepared in the presence of either PG-free or ASA urine. The amounts of 11-dehydro-TXB₂ were calculated from PG-free standard curve with individual NSBs (A), from PG-free standard curve with PG-free NSB (B) and from ASA urine standard curve with individual NSBs (C). Normal (3) is normal pooled urine, Normal (2) and Normal (3) are urine samples collected from the healthy volunteers

Table 2. Parallelism upon dilution and the recovery of authentic 11-dehydrothromboxane B_2 in normal pooled urine as measured by direct assay with dextran-coated charcoal separation

added (pg)	Reciprocal dilution		
	2	5	10
Measured (pg)			
0	92.5	66.0	42.5
5	82.5	73.0	50.0
20	90.5	93.0	67.0
50	75.0	114.0	97.0

apparent identity of standard curve parameters, the specific reference binding was considerably increased in the presence of the PG-free urine, indicating that the omission of this matrix would result in a considerable underestimation of the real concentration.

The influence of non-specific binding (NSB) in direct radioimmunoassay

NSB values were determined for several samples of identical dilutions. The influence of individual variation of NSB values on the calculated apparent 11-dehydro-TXB₂ concentrations is illustrated in Table 1. Two types of standard curves were prepared for the calculation of unknown concentrations, one containing PG-free and another ASA urine. The calculated apparent concentrations were much lower when the NSB of PG-free urine was taken as valid for unknown concentrations (Table 1). The NSB showed a high variation not only between different samples, but also for the same sample tested in various dilutions. When a single urine sample was assayed in a dilution range from 2- up to 50-fold, the NSB (per cent of total count) varied from 10.6 to 2.0.

When DCC separation was substituted for PEG separation, a low and constant NSB was found in each type of incubation medium tested and no variation of individual NSBs was observed. These data were in accordance with the assumption that the tracer was bound to certain urinary components of non-globulin nature that would not co-precipitate with the tracer bound to antibody.

Parallelism tests

Parallelism was checked by a combination of dilution with the recovery for known amounts of 11-dehydro-TXB₂. Three different dilutions of a normal urine sample were spiked with three different amounts of 11-dehydro-TXB₂. The binding value of each unknown was corrected for individual NSB, each determined at the appropriate dilution (DCC separation). No parallelism was found for unspiked samples (Table 2), therefore the apparent initial concentration of 11-dehydro-TXB₂ was 1.95 ng/ml from 2-fold and 4.25 ng/ml from 10-fold dilution. Recovery was improved by dilution of the sample.

To study parallelism in the PEG separation system, two dilutions of a normal urine sample were spiked with five different amounts of 11-dehydro-TXB₂. Measured values were evaluated by fitting regression lines for measured (y) versus added (x) amounts (pg/tube). The equations were $y = 0.952x \pm 80.3$ and $y = 0.949x \pm 3.62$ for 5- and 20-fold dilutions, respectively. The respective values of the correlation coefficients were 0.9106 and 0.9931, and the measured amounts from unspiked samples 72.5 and 32.7. These data reflect the same trend as that observed with DCC separation. However, the parallelism upon dilution of unspiked samples does not meet the criteria. Accordingly, when samples were assayed directly from a 10-fold dilution with PEG separation, the

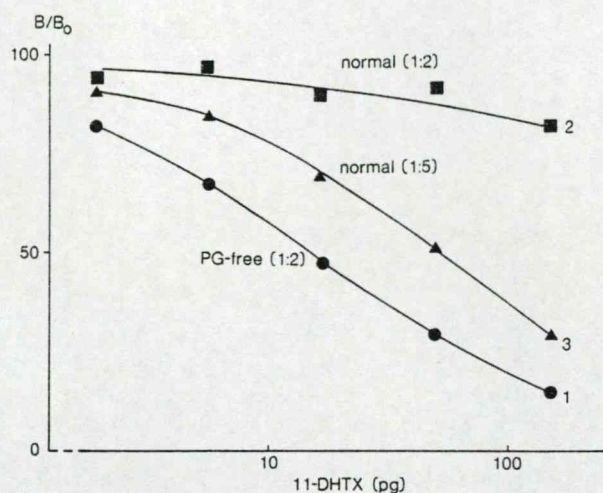


Fig. 2. Change in RIA equilibrium with the dilutions of urine using dextran-coated charcoal separation. The non-specific and specific binding values, expressed as per cent of total count, were 1.0–29.4, 10.6–13.2 and 5.8–13.4 for curve-1, curve-2 and curve-3, respectively

Table 3. Effects of human serum albumin (HSA) on the specific (B) and non-specific (NSB) binding in normal urine with dextran-coated charcoal separation

Medium	HA mg/ml	B %	NSB %
buffer	0	28.2	1.5
normal urine	0	8.7	6.8
(4-fold dilution)	0.1	2.8	14.4
	1	0	38.9
	5	0	58.2

Binding values are expressed as per cent of total count

11-dehydro-TXB₂ excretion rate (ng/24 h, mean \pm S.D.) was $5,410 \pm 1,371$ ($n=7$) for normal and $4,671 \pm 845$ ($n=5$) for ASA urine. These values far exceeded those obtained with DCC separation from 2-fold dilutions (3.17 ± 184 for normal and 190 ± 87 for ASA urine).

The lack of parallelism observed in both separations can be explained by the sample-to-sample variation of equilibrium constants. In Fig. 2 the standard curves for PG-free and a single normal urine sample of different dilutions, are compared in the DCC separation system. As reflected by the slope of the standard curves, the equilibrium constants were different for PG-free and normal urine, and for the same normal urine of different dilutions. Since B/B_0 values (about 45%) of both normal urine samples were within the most sensitive range of PG-free standard curve, the failure of either superimposability or parallelism of dose-response curves could not be attributed to the high difference between endogenous 11-dehydrothromboxane B₂ content of normal urine samples and the amount of 11-dehydrothromboxane B₂ added.

Table 4. Effect of human serum albumin (HSA) on the specific (B) and non-specific (NSB) binding in different incubation media with polyethylene glycol separation

HSA mg/ml	buffer		PG-free urine	
	B	NSB	B	NSB
0	28.4	3.3	29.5	3.0
0.1	16.5	3.0	16.8	2.4
0.5	6.4	3.1	7.9	2.4
1.0	4.4	3.2	4.5	2.5
2.0	2.0	3.2	1.4	2.9

Binding values are expressed as per cent of total count

The discrepancy for 11-dehydro-TXB₂ concentrations measured by direct RIA was due to different reasons, including the variation of both NSB values and binding equilibrium and the particular dilution employed. All these factors were assumed to originate from the presence of urinary components which counteracted the specific binding of tracer to antibody.

Effect of albumin on direct radioimmunoassay

The effects of albumin on the main parameters of direct RIA were studied in different incubation media which contained buffer only, PG-free or normal urine. Table 3 shows the data (DCC separation) in urine which contained various amounts of human serum albumin (HSA). With the effect of a moderately high (0.1 mg/ml) concentration of HSA a dramatic decrease in specific binding with a simultaneous increase in NSB was observed, and no specific binding could be achieved at a highly elevated (1 mg/ml) concentration.

When the urine sample of a patient with renal insufficiency, containing 2 mg/ml albumin, was ultrafiltered, the NSB values in 5-fold dilutions were 18% before and 7% after ultrafiltration. In spite of the removal of 80% of urinary albumin the NSB remained higher than the value for either buffer-only or for PG-free urine.

Decreased absorption efficacy of charcoal because of albumin might account for both the decrease in specific binding and the increase in NSB. Therefore the effect of albumin was also studied in the PEG separation (Table 4). The specific binding changed, dose-dependently, with the albumin concentration, indicating that albumin did counteract the specific binding to the antibody.

Immuno-HPLC validation of direct radioimmunoassay

Pooled normal untreated urine was separated by reversed-phase HPLC, and the 11-dehydro-TXB₂-like immunoreactivity of the fractions measured. Two immunoreactive peaks were detected (Fig. 3), one co-migrating with the lactone and the other with the open form of 11-dehydro-

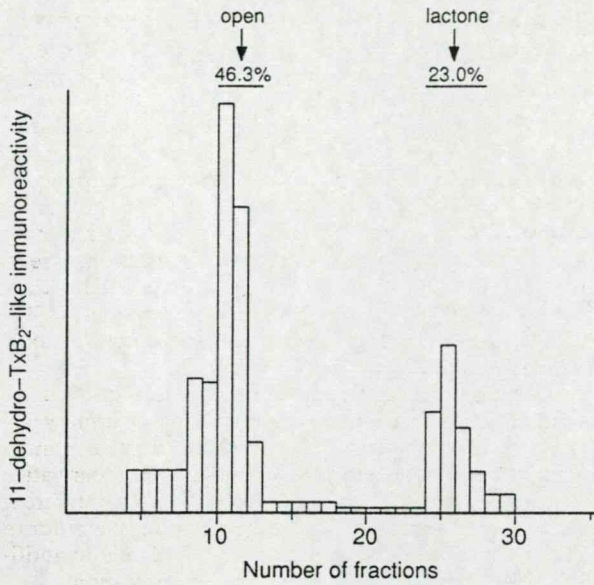


Fig. 3. Immunochromatography of untreated urine. Pooled normal urine was separated by reversed-phase HPLC and the 11-dehydrothromboxane B_2 -like immunoreactivity of each fraction determined by RIA. Arrows indicate the retention times of open and lactone form of authentic 11-dehydrothromboxane B_2 and the horizontal lines represent the respective volumes of fractions containing reference material. Ratios of immunoreactivity for the fractions co-migrating with standard material were calculated as per cent of the total 11-dehydrothromboxane B_2 -like immunoreactivity

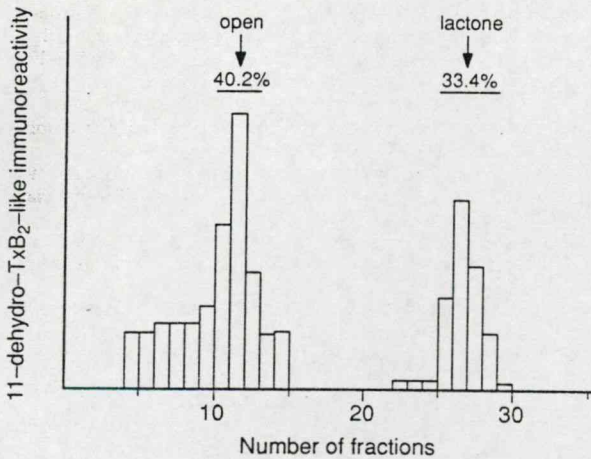


Fig. 4. Immunochromatography of urine after acidic treatment. Pooled normal urine had been incubated at pH 3.0 for 48 h before separation by reversed-phase HPLC. Arrows indicate the retention times of open and lactone form of authentic 11-dehydrothromboxane B_2 and the horizontal lines represent the respective volumes of fractions containing reference material. Ratios of immunoreactivity for the fractions co-migrating with standard material were calculated as per cent of the total 11-dehydrothromboxane B_2 -like immunoreactivity

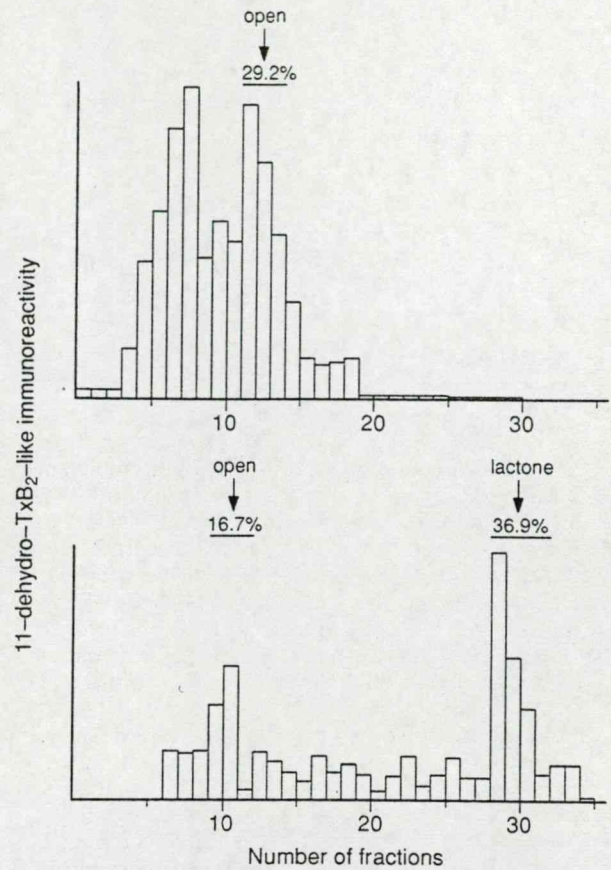


Fig. 5. Immunochromatograms obtained by two-step HPLC separation of normal urine. Pooled normal urine containing tritiated 11-dehydrothromboxane B_2 was preincubated for 24 h at pH 8.3 and separated by reversed-phase HPLC. The fractions containing tritiated material were combined, then incubated for 48 h at pH 3.0 and subjected to a second HPLC separation. Arrows indicate the retention times of open and lactone form of authentic 11-dehydrothromboxane B_2 and the horizontal lines represent the respective volumes of fractions containing tritiated marker. Ratios of immunoreactivity obtained after the first (upper panel) and the second (lower panel) separation were calculated as per cent of the total 11-dehydrothromboxane B_2 -like immunoreactivity

TXB $_2$. These two peaks contained about 70% of the total 11-dehydro-TXB $_2$ -like immunoreactivity recovered.

Immunochromatographic analysis was also carried out with the same pooled normal urine preincubated at pH 3.0 for 48 h to convert the open 11-dehydro-TXB $_2$ into the lactone form [10]. There was about a 10% increase in the ratio of immunoreactivity co-migrating with the lactone form, with a concomitant decrease in immunoreactivity measured in open form fractions (Fig. 4).

A two-step reversed-phase HPLC separation of normal urine containing 10 nCi of tritiated 11-dehydro-TXB $_2$ after incubation (pH 8.3, room temperature, 24 h) was performed to find out the contribution of interfering substances co-migrating with the open form of 11-dehydro-TXB $_2$. The immunoreactivity profiles from the

aliquots of HPLC fractions (Fig. 5, upper panel) showed 29% of total 11-dehydro-TXB₂-like immunoreactivity in the fractions containing 95% of tritiated marker. In contrast to the profile for untreated urine (Fig. 3), no immunoreactivity co-migrating with the lactone form was detected. Fractions of open form from the first separation were combined, allowed to incubate (pH 3.0, room temperature, 48 h), and separated by HPLC for a second time. Ninety per cent of ³H-radioactivity was detected in the fractions corresponding to the lactone form, but they contained only 37% of total immunoreactivity (Fig. 5, lower panel).

Discussion

Urinary 11-dehydro-TXB₂ is the metabolite which most closely reflects the systemic production of thromboxane in man [2, 4, 20]; therefore a reliable assay is important in the study of changes in thromboxane synthesis. In addition to mass-spectrometric determination, the specific RIA with tritiated 11-dehydro-TXB₂ as tracer has been developed and applied to the measurement of 11-dehydro-TXB₂ in human urine with [1, 3] or without [20] the extraction of urine. As an alternative to tritiated tracer, Lecompte et al. [12] reported on preliminary applications to direct RIA from human fluids including urine, the ¹²⁵I-labelled histamine derivative 11-dehydro-TXB₂. To date, no data on applications of another type of specific RIA tracer, the ¹²⁵I-tyrosine methyl ester derivative of 11-dehydro-TXB₂, have been reported.

We developed a specific RIA of this type and studied its application to direct assay on unextracted human urine. A standard curve set-up in the presence of PG-free urine as matrix gave positive results. The direct assay, however, was found unreliable when PG-free urine was substituted for normal urine as matrix. The non-specific binding values showed individual variation in DCC separation system, but were constant in PEG separation system. Furthermore, the correction of binding values with individual nonspecific binding was without benefit, since the different samples had individual binding equilibria resulting in the lack of fundamental RIA criteria. The parallelism tests carried out in the both separation systems revealed that the apparent 11-dehydro-TXB₂-like immunoreactive concentration was either underestimated or overestimated, depending on the given dilution of samples.

In an attempt to identify the urinary factors underlying the poor reliability of direct RIA we found that urinary albumin may have a basic role in the unreliability of direct assay. Considering the high variation of its concentration in urine especially in pathological conditions, the albumin content may lead to various degrees of error in direct assay. It should be stressed, however, that albumin seems to be only one of the urinary factors accounting for the discrepancy observed. Another important factor responsible for the unreliability of direct assay is the heterogeneity of 11-dehydro-TXB₂-like immunoreactivity, as proved by immunochromatograms after separation by HPLC. The immunoreactivity profile of untreated normal urine after

one-step HPLC-separation showed 70% of total immunoreactivity co-migrating with the two chemical forms of 11-dehydro-TXB₂. With further analysis, however, the open form fraction turned out to contain a high ratio of interfering substance(s), as demonstrated by immunochromatograms obtained for samples after acidic treatment or two-step HPLC separation. The heterogeneity of 11-dehydro-TXB₂ immunoreactivity was also supported by the apparent lack of inhibitory effect of ASA treatment on the measured 11-dehydro-TXB₂ concentration, a trend that was unchanged with either low or high apparent 11-dehydro-TXB₂-like concentration. Lecompte et al. [12] reported the same observation with urine samples assayed directly or after extraction.

In summary, direct radioimmunoassay proved an unsuitable method for the determination of urinary 11-dehydro-TXB₂ concentration in unextracted human urine, when a ¹²⁵I-labelled tyrosine-methyl ester derivative of 11-dehydro-TXB₂ was used as tracer in two different separation systems. An efficient purification step prior to radioimmunoassay is essential for the reliable quantification of urinary 11-dehydro-TXB₂ concentration.

Acknowledgements. This study was supported by grants from the University of Tampere, Finland, The Sigrid Jusélius Foundation, Finland and the Academy of Finland.

References

1. Catella F, FitzGerald GA (1987) Paired analysis of urinary thromboxane B₂ metabolites in humans. *Thromb Res* 47:645-656
2. Catella F, Healy D, Lawson JA, FitzGerald GA (1986) 11-Dehydrothromboxane B₂: A quantitative index of thromboxane A₂ formation in the human circulation. *Proc Nat Acad Sci USA* 83:5861-5865
3. Ciabattoni G, Maclouf J, Catella F, FitzGerald GA, Patrono C (1987) Radioimmunoassay of 11-dehydrothromboxane B₂ in human plasma and urine. *Biochim Biophys Acta* 918:293-297
4. Ciabattoni G, Pugliese F, Davi G, Pierucci A, Simonetti BM, Patrono C (1989) Fractional conversion of thromboxane B₂ to urinary 11-dehydrothromboxane B₂ in man. *Biochim Biophys Acta* 992:66-70
5. Dollery CT, Barrow SE (1985) Problems with measurement of eicosanoids in biological fluids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 15:91-94
6. FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C (1983) Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular diseases. *Circulation* 67:1174-1177
7. Granström E, Westlund P, Kumlin M, Nordenström A (1985) Measurement of thromboxane production in vivo: Metabolic and analytical aspects In: Berti F, Folco G, Velo GP (eds) *Drugs affecting leukotrienes and other eicosanoid pathways*. NATO Adv Studies, Ser. A95, Plenum Press, New York, pp 5-17
8. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Nat Acad Sci USA* 72:2994-2998
9. Kirton KT, Cornette JC, Barr KL (1972) Characterization of antibodies to prostaglandin F_{2α}. *Biochem Biophys Res Commun* 47:903-909
10. Kumlin M, Granström E (1986) A method for monitoring thromboxane production in vivo. *Prostaglandins* 32:741-765
11. Lawson JA, Patrono C, Ciabattoni C, FitzGerald GA (1986) Long-lived enzymatic metabolites of thromboxane B₂ in the human circulation. *Anal Biochem* 155:198-205

12. Lecompte T, Nicolas P, Mamas S, Dray F (1987) Radioimmunoassay for 11-dehydro-thromboxane B₂ using a iodinated ligand: Preliminary applications to human fluids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 17:595-597
13. Lorenz R, Helmer P, Uedelhoven W, Zimmer B, Weber PC (1989) A new method using simple solid phase extraction for the rapid gas-chromatographic mass-spectrometric determination of 11-dehydro-thromboxane B₂ in urine. *Prostaglandins* 38:157-170
14. Mucha I, Tóth G, Tanács B (1979) Prostaglandins labelled with iodine-125. *Izotóptechnika* 22:190-195
15. Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P, Filabozi P, Pinca E, Satta MA, Van Dorne D, Cinotti GA, Pugliese E, Pierucci A, Simonetti BM (1983) Evidence for a renal origin of urinary thromboxane B₂ in health and disease. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 11:493-498
16. Roberts LJ, Sweetman BJ, Oates JA (1981) Metabolism of thromboxane B₂ in man: Identification of the major urinary metabolite. *J Biol Chem* 256:8384-8393
17. Schweer H, Meese CO, Fürst O, Kühl PG, Seyberth HW (1987) Tandem mass spectrometric determination of 11-dehydrothromboxane B₂, as an index metabolite of thromboxane B₂ in plasma and urine. *Anal Biochem* 164:156-163
18. Tóth G, Mucha I, Tanács B (1980) Adsorption chromatographic separation of ¹²⁵I-labelled prostaglandin F_{2α} and prostaglandin E₂ tyrosine methyl ester. *J Chromat* 189:433-435
19. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab* 33:988-991
20. Westlund P, Granström E, Kumlin M, Nordenström A (1986) Identification of 11-dehydro-TXB₂ as a suitable parameter for monitoring thromboxane production in the human. *Prostaglandins* 31:929-960

Mucha I, Paluska-Ferenc I and Tóth G: Separation of ¹²⁵I-
Labelled Derivatives of 5-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic
acid (5-HETE). J. Chromatography 543: 307-314, 1991

Separation of ^{125}I -labelled derivatives of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid

I. MUCHA*, ILDIKÓ PALUSKA-FERENCZ and G. TÓTH

Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 77, H-1525 Budapest (Hungary)

(First received July 5th, 1990; revised manuscript received January 14th, 1991)

ABSTRACT

Monoiodinated tyrosine methyl ester, a derivative of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid containing ^{125}I in the phenolic *ortho* position was prepared with high specific radioactivity and separated by column chromatography on a Sephadex LH-20 gel. The adsorption behaviour of the labelled product was studied both by adsorption chromatography using a Sephadex LH-20 adsorbent with ethanol-water as a binary eluent and by reversed-phase high-performance liquid chromatography using C_{18} -silica as a stationary phase with aqueous binary eluents containing ethanol, methanol or acetonitrile. In both separation systems, a linear relationship was found between the logarithmic capacity factor or distribution coefficient and the logarithmic concentration of the organic solvent.

INTRODUCTION

Various prostanoids can be labelled with ^{125}I through their histamine and tyramine [1] or tyrosine methyl ester (TME) [1,2] and these derivatives have widespread use in radioimmunoassay (RIA). 5-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid [5-HETE] is a key intermediate produced in the lipoxygenase pathway of arachidonic acid, and therefore the ^{125}I -labelled derivative of this compound may be useful in specific RIA, although no such RIA has previously been reported.

In the course of labelling through TME derivatives radioiodine may be incorporated via electrophilic substitution into the aromatic ring in the 3'- and/or 5'-positions, but only the monosubstituted derivatives are suitable as tracers for RIA. As we have shown previously, adsorption chromatography on Sephadex LH-20 is an efficient method for the isolation, with high specific activity, of the monoiodinated derivatives of prostanoids [3], steroids [4–8] and other bioactive compounds [9–11].

In this paper we report on the adsorption chromatographic separation of ^{125}I -labelled 5-HETE-TME from the inactive parent compound using Sephadex LH-20 as adsorbent, a method that permits a high specific activity suitable for RIA to be achieved.

According to a widely accepted model of adsorption, the displacement of solute molecules from a sorbent involves the participation of a stoichiometric number of solvent molecules used as organic modifier. Solutes that behave according to this stoichiometric displacement model are expected to give linear plots of log (distribution



coefficient) or \log (capacity factor) vs. \log (concentration of organic solvent), with a slope that reflects the stoichiometric number of solvent molecules participating in displacement.

The adsorption behaviour of various iodinated compounds has been studied previously on Sephadex LH-20 adsorbent and a linear $\log k$ vs. $\log X$ relationship was found with an ethanol-water binary eluent [3-11], where k and X are the distribution coefficient and the molar fraction of ethanol, respectively. On the other hand, numerous investigations related to the mechanism of adsorption in high-performance liquid chromatography have also demonstrated a linear relationship between $\log k'$ and $\log X$, where k' is the capacity factor. This relationship, originally verified for normal-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using silica as stationary phase, was extended also to reversed-phase (RP) systems using binary mobile phases consisting of water and an organic solvent modifier [12-16].

In previous work, RP-HPLC was found to be an efficient alternative to Sephadex LH-20 adsorption chromatography for the separation of various ^{125}I -labelled prostanoid derivatives and a similar chromatographic behaviour of these derivatives was observed in RP-HPLC and in Sephadex LH-20 chromatography [17,18].

In this work, the chromatographic behaviour of ^{125}I -labelled 5-HETE-TME was studied using both adsorption chromatography with Sephadex LH-20 as adsorbent and ethanol-water as eluent and RP-HPLC using C_{18} -bonded silica as stationary phase with aqueous binary eluents containing ethanol, methanol or acetonitrile as organic modifier. Highly significant linear relationships for $\log k$ vs. $\log X$ (Sephadex LH-20) and $\log k'$ vs. $\log X$ (RP-HPLC) were obtained. To our knowledge, this paper is the first to report on the linearity of $\log k'$ vs. \log (molar fraction of organic modifier) in RP-HPLC for a representative of an important family of small molecules containing the monoiodo-TME functional group.

EXPERIMENTAL

5-(\pm)-HETE was synthesized from arachidonic acid according to the method of Corey *et al.* [19] (since the racemic form was used throughout this study, the chirality will not be indicated any further). In order to study the chromatographic behaviour of 5-HETE-TME used for the radioiodination, this compound was synthesized using tritium-labelled TME. [^3H]TME prepared as described [20] was diluted with non-radioactive TME to a specific activity of about 100 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ and coupled to 5-HETE using the carbodiimide method.

5-HETE-TME was labelled with ^{125}I by the use of the chloramine-T method. To 2-3 μg (3-4.5 nmol) of 5-HETE-TME in 50 μl of buffer, 1-2 mCi (0.5-1 nmol) of carrier-free Na^{125}I (Institute of Isotopes, Budapest, Hungary) was added, followed by the addition of 50 μl of 0.5% chloramine-T solution. After 60 s, the reaction was quenched with 100 μl of 0.7% sodium metabisulphite solution. All reagents were dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4).

Monoiodinated [^{125}I]5-HETE-TME was isolated from the labelling reaction mixture by column chromatography on a preparative scale. Sephadex LH-20 dextran gel (Pharmacia, Uppsala, Sweden) swollen in distilled water was packed in a column (130 \times 10 mm I.D.) to a height of 100 mm. The reaction mixture was administered on

the top of gel and allowed to soak in. After equilibration for 10 min, the elution was started with 150 ml of water, followed by 80–100 ml of 20% ethanol, and the monoiodinated product eluted with 30–35 ml of 30% ethanol. The flow-rate was 45–50 ml/h. In order to suppress the dissociation of the phenolic OH group, which would lead to a decrease in adsorption on dextran gel, the pH was adjusted to 4.0 with 0.1 *M* citrate buffer.

The effluent was passed over an NaI(Tl) scintillation crystal and its radioactivity was counted by a ratemeter and recorded by an *X-Y* plotter.

In order to measure the elution volume of [^3H]5-HETE-TME, the effluent was collected with a fraction collector and the ^3H radioactivity determined by liquid scintillation counting.

For RP-HPLC separation, a two-pump (LKB, Type 2150) gradient system controlled by an HPLC controller (LKB, Type 2152) was used. An RP-18 (Spheri-5) Aquapore Cartridge column (100 × 4.6 mm I.D.) (Pierce) equipped with a guard cartridge was attached to an NaI(Tl) scintillation crystal. Radioactive samples (0.5–1.0 μCi) dissolved in 5–10 μl of mobile phase were injected through a Rheodyne sample injector equipped with a 200- μl sample loop. The ^{125}I radioactivity of the effluent was counted by a ratemeter attached to the scintillation crystal and registered with a potentiometric recorder (LKB, Type 2210).

The elution volumes in various binary eluents were determined in duplicate. The dead volume (1 ml) was determined using Na^{125}I as the non-retained compound. In preliminary experiments the effect of pH on the retention time was studied in acetonitrile–10 mM citrate buffer (60:40, v/v) mobile phase in the pH range 4.0–9.0. As the retention volume remained unchanged throughout this range, the pH was unadjusted for the experiments with different binary eluents of various composition.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of radioiodinated [^{125}I]5-HETE-TME by Sephadex LH-20 column chromatography

Labelling of 5-HETE-TME with ^{125}I led to the production of a complex reaction mixture. As illustrated in Fig. 1, several labelled products could be detected in the effluent collected from the Sephadex LH-20 column. Omitting the free $^{125}\text{I}^-$ eluting at the dead volume, of the three elution peaks peak 2 was assigned to an unidentified labelled by-product. Peak 3 was attributed on the basis of the immunoreactivity to the monoiodinated [^{125}I]5-HETE-TME. On the basis of the decrease or lack of peak 4, when a large molar excess of target material was employed (*i.e.*, 40–100 nmol of 5-HETE-TME to 1 nmol of Na^{125}I), this peak can be attributed to the disubstituted derivative, [^{125}I]5-HETE-TME.

In order to achieve high specific activity, when a ^{125}I -labelled derivative is intended for use as a tracer in radioimmunoassay, perfect separations from the parent compound is of the utmost importance. When run in the same separation system as that used for the isolation of the labelled compound, tritiated 5-HETE-TME, the parent compound of monoiodinated [^{125}I]5-HETE-TME was found to elute with water near the dead volume. This experiment demonstrated that the monoiodinated product eluted with ethanol would not contain any of the unreacted parent compound. At the same time, however, when water was replaced immediately for the final eluent of

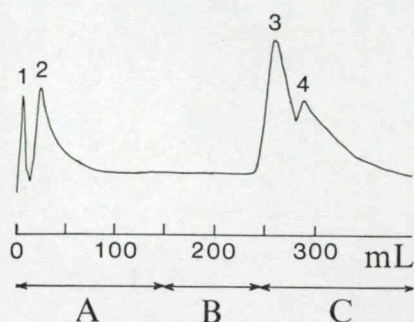


Fig. 1. Separation of ^{125}I -labelled 5-HETE-TME by column chromatography. Sorbent: Sephadex LH-20. Eluent: (A) water; (B) ethanol-water (20:80); (C) ethanol-water (30:70). Peaks: 1 = free $^{125}\text{I}^-$; 2 = unidentified labelled product; 3 = ^{125}I 5-HETE-TME; 4 = $^{125}\text{I}_2$ -5-HETE-TME.

30% ethanol, the monoiodinated product to be isolated was usually contaminated with labelled by-products. So as to ensure the removal of these radioactive impurities, the final elution with 30% ethanol was preceded with an intermediate elution using a lower concentration of ethanol. This elution pattern, illustrated in Fig. 1, led to the isolation of monoiodinated ^{125}I 5-HETE-TME free from both the unreacted parent compound and labelled by-products. The efficacy of this separation procedure and the structure of the labelled product were further supported by the specific binding of the separated material to an antibody raised against 5-HETE-bovine serum albumin conjugate.

The monoiodinated ^{125}I 5-HETE-TME thus purified was used for studying its chromatographic properties in both column chromatography on Sephadex LH-20 and RP-HPLC on alkylated silica as the stationary phase.

Chromatographic behaviour on Sephadex LH-20

The chromatographic behaviour of monoiodinated ^{125}I 5-HETE-TME on Sephadex LH-20 was studied using aqueous ethanol eluents. As can be seen from

TABLE I

DEPENDENCE OF ELUTION VOLUME OF ^{125}I -LABELLED 5-HETE-TME ON THE COMPOSITION OF ELUENT

Sorbent: Sephadex LH-20. Eluent: aqueous ethanol-water.

Ethanol concentration		Elution volume, ml	Distribution coefficient
% (v/v)	Molar fraction, X		
35	0.144	126.7	83.05
40	0.172	60.2	37.51
45	0.203	35.8	20.79
50	0.238	21.8	11.20
55	0.276	17.3	8.12

Table I, the elution volume decreased with increasing ethanol concentration. The distribution coefficient (k) was calculated according to the equation

$$k = \frac{v_e - v_0}{w} = \frac{v_e - 5.44}{1.46} \quad (1)$$

where v_e , v_0 and w are the elution volume, the dead volume and the weight of the adsorbent, respectively.

In the range 30–55% (v/v) ethanol, the distribution coefficient as a function of ethanol concentration was calculated according to the equation

$$\log k = \log k_0 - n \log X \quad (2)$$

where X is the molar fraction of ethanol, k_0 is the distribution coefficient extrapolated to 100% ethanol and n is a constant.

As illustrated in Fig. 2, a highly significant (correlation coefficient 0.9945) linear relationship was found, with the regression line

$$\log k = -1.167 - 3.610 \log X \quad (3)$$

Chromatographic behaviour in RP-HPLC

In RP-HPLC using C_{18} -bonded silica as the stationary phase, the chromatographic behaviour of the pure monoiodinated [^{125}I]5-HETE-TME was identical with that observed with Sephadex LH-20 separation, *i.e.*, the retention time decreased with increasing proportion of organic solvent (ethanol, methanol or acetonitrile) in the aqueous binary eluent (Table II). In order to obtain a parameter suitable for direct comparison of RP-HPLC data with those determined for Sephadex LH-20, the

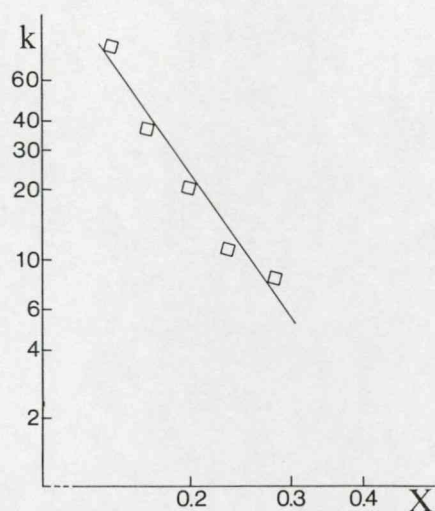


Fig. 2. Distribution coefficient of [^{125}I]5-HETE-TME as a function of ethanol concentration (x) in adsorption column chromatography. Sorbent: Sephadex LH-20. Eluent: ethanol-water. Scale: log-log.

TABLE II

CAPACITY FACTOR OF ^{125}I -LABELLED 5-HETE-TME IN RP-HPLC WITH BINARY ELUENTSStationary phase: C_{18} -bonded silica. Mobile phase: aqueous mixtures of organic modifiers.

Concentration			Capacity factor, k'			
% (v/v)	Molar fraction, X			Methanol	Ethanol	Acetonitrile
	Methanol	Ethanol	Acetonitrile			
50		0.238			32.5	
55		0.276	0.296		8.2	17.7
58			0.322			12.7
60		0.319	0.340		5.5	9.7
63			0.369			7.4
65		0.367	0.390		3.0	5.8
68			0.422			4.8
70		0.421	0.445		1.9	3.7
75	0.546		0.508	16.2		2.4
78	0.587			9.4		
80	0.615		0.579	6.7		1.7
82	0.646			4.8		
84	0.677			3.4		
85	0.694		0.661	2.9		1.2

capacity factor, which is directly proportional to the distribution coefficient, was calculated according to the equation

$$k' = \frac{v_e - v_0}{v_0} = \frac{v_e - 1.0}{1.0} \quad (4)$$

where k' , v_e and v_0 are the capacity factor, the elution volume and the dead volume, respectively.

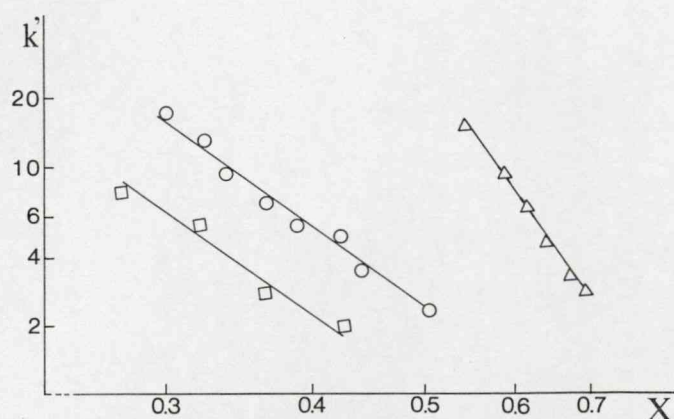


Fig. 3. Capacity factor of ^{125}I 5-HETE-TME as a function of the concentration of organic modifiers (x) in RP-HPLC. Sorbent: C_{18} -bonded silica. Mobile phase: binary mixtures of water and organic solvents (Δ = methanol; \square = ethanol; \circ = acetonitrile). Scale: log-log.

Within the approximate capacity factor range 2–10, a linear relationship was found according to the equation

$$\log k' = \log k'_0 - m \log X \quad (5)$$

where X is the molar fraction of organic solvent, k'_0 is the capacity factor extrapolated to 100% organic solvent and m is constant. The regression lines fitted for different binary eluents (Fig. 3) gave the following equations:

$$\log k' = -1.052 - 3.55 \log X \text{ (ethanol)} \quad (6)$$

$$\log k' = -0.715 - 3.68 \log X \text{ (acetonitrile)} \quad (7)$$

$$\log k' = -0.674 - 7.13 \log X \text{ (methanol)} \quad (8)$$

The linearity was highly significant, with correlation coefficients of 0.9966, 0.9980 and 0.9999, respectively.

The widely accepted displacement model of adsorption predicts that solute molecules that behave according to this model will give linear plots of \log (concentration) vs. \log (distribution coefficient) and \log (capacity factor). Although it cannot be regarded as direct evidence of a displacement mechanism of solute retention, the linear relationship between the concentration of organic solvents and the capacity factor (eqns. 6–8) observed in our experiments is not inconsistent with this model.

The slope of $\log k'$ vs. $\log X$ curve is said to be an indicator of the strength of a pure solvent used as the mobile phase. The larger slope found with methanol, which leads to a faster decrease in k' with increase in methanol concentration, may underly the good resolution obtained in RP-HPLC of the analogous monoiodo-TME derivatives of various prostanoids using a ternary eluent containing water, acetonitrile and methanol [18]. Further studies could be useful to check how the differences in elution strength could be utilized to optimize the selectivity of the separation of this family of compounds.

Comparing the slopes of fitted lines obtained from the elution on Sephadex LH-20 and RP-HPLC, the ratio was 3.61 (eqn. 3):3.55 (eqn. 6):3.68 (eqn. 7):7.13 (eqn. 8) = 1:1:1:2. The solute showed similar behaviour in terms of the retention dependence on the concentration of ethanol, as indicated by the identical slope of the plots obtained on Sephadex LH-20 (eqn. 3) and C₁₈-bonded silica (eqn. 6). Although the agreement occurred in a different range of composition for the two systems, the results are not inconsistent with the displacement model.

Linearity is normally obtained with capacity factors in the range 0.5–10. Outside this range, at extremes of k' , non-linearity is frequently observed and different theoretical approaches were considered to account for this phenomenon [15,16], but none of these interpretations affected the validity of displacement mechanism. The non-linearity was observed in our experiments also in ethanol and acetonitrile below 55 and 60%, respectively, but this phenomenon was not studied in more detail. However, the divergence from linearity observed at extremes of capacity factor is not expected to affect the predictive value of solute retention based on the equations presented, as the linearity was found to be valid in the capacity factor range 2–10, a range that meets the practical requirements for applications of RP-HPLC.

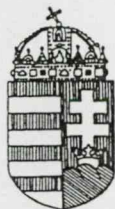
REFERENCES

- 1 J. Maclouf, M. Pradel, Ph. Pradelles and F. Dray, *Biochim. Biophys. Acta*, 431 (1976) 139.
- 2 I. Mucha, G. Tóth and B. Tanács, *Izotóptechnika*, 22 (1979) 190.
- 3 G. Tóth, I. Mucha and B. Tanács, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 433.
- 4 G. Tóth, M. Wéber and F. Kling, *J. Chromatogr.*, 213 (1981) 511.
- 5 G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 238 (1982) 476.
- 6 G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 267 (1983) 420.
- 7 G. Tóth and J. Zsádányi, *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, 86 (1984) 25.
- 8 G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 258.
- 9 G. Tóth, *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 29 (1977) 207.
- 10 G. Tóth, *Radioanal. Chem.*, 46 (1978) 201.
- 11 I. Mucha, B. Tanács and G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 478 (1989) 280.
- 12 E. Soczewinski and T. Dzido, *Chromatographia*, 22 (1986) 25.
- 13 E. Soczewinski, *J. Chromatogr.*, 388 (1987) 91.
- 14 F. Murakami, *J. Chromatogr.*, 178 (1979) 393.
- 15 X. Geng and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 147.
- 16 A. Kalbara, T. Nakagawa, Ch. Hohda, N. Hirata and H. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.*, 27 (1989) 716.
- 17 I. Mucha and G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 438 (1988) 111.
- 18 I. Mucha and G. Tóth, *J. Chromatogr.*, 483 (1989) 419.
- 19 E. J. Corey, J. O. Albright, A. E. Barton and S. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 1435.
- 20 I. Mucha, A. Seregi, P. Serfőző, B. Tanács and J. Benkő, *Hung. Pat.*, 193 381 (1987).

Mucha I, Ferenczné Paluska I: Eljárás biológiai minták 5-hidroxi-6,8,11,14-ejkozatetraénsav tartalmának radioimmunológiai meghatározására. Hung. Pat. 209849, 1995 március 29, bejelentés 1991 július 24.

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

**SZABADALMI
LEÍRÁS**
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(21) A bejelentés száma: 2473/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 07. 24.

(40) A közzététel napja: 1993. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1994. 11. 28. SZKV 94/11

(11) Lajstromszám:

209 849 B

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 33/50
G 01 N 33/537
G 01 N 33/60

(72) Feltalálók:

Ferenczné Paluska Ildikó 30%, Érd (HU)
dr. Mucha István 70%, Budapest (HU)

(73) Szabadalmas:

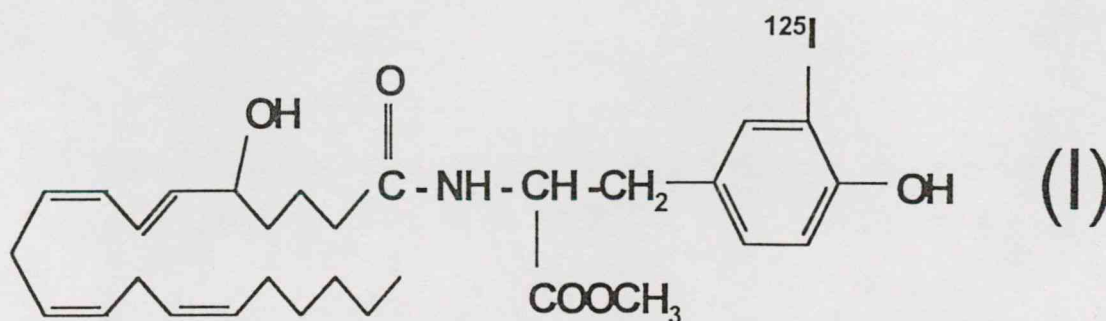
Izotóp Intézet Kft., Budapest (HU)

**(54) Eljárás biológiai minták 5-hidroxi-6,8,11, 14-ejkozatetraénsav tartalmának
radioimmunológiai meghatározására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás biológiai minták 5-(S)-hidroxi-6(transz),8(cisz),11(cisz),14(cisz)-ejkozatetraénsav [5-(S)-HETE] tartalmának antigén-antitest reakción alapuló radioimmun meghatározására. Az

eljáráshoz tracerként az új típusú (I) képletű, ¹²⁵I-izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású 5-HETE-monojód-tirozin-metilészter származékot alkalmaz-
zák.



A találmány tárgya eljárás biológiai minták 5-(S)-hidroxi-6(transz),8(cisz),11(cisz),14(cisz)-ejkozatetraéns av [továbbiakban 5-(S)-HETE] tartalmának radioimmunológiai meghatározására, melynek során megmérjük ^{125}I -izotóppal jelzett nagy fajlagos aktivitású 5-HETE származék mint nyomjelző anyag (továbbiakban radioligandum vagy tracer) specifikus antitesthez való kötődést ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú standard oldatok és a meghatározandó minták jelenlétében, majd a standardokhoz tartozó kötődésváltozások ismeretében a mintákhoz tartozó kötődésváltozásokból kiszámítjuk azok hatóanyagtartalmát.

A találmány szerint ebben az immunokémiai reakcióban tracerként új típusú, (I) képletű, ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású 5-(±)-HETE-monójód-tirozin-metilészter származékot (továbbiakban ^{125}I -5-HETE-TME) alkalmazunk.

Ismert, hogy az arachidonsavból az ún. 5-lipoxigenáz kaszkádban különböző szerkezetű, nagyhatású bioaktív anyagok keletkeznek. Ezek közös intermedierje az 5-hidroperoxi-6,8,11,14-ejkozatetraénsav, melynek egyik stabilis származéka az 5-(S)-HETE. Mennyiségének ismerete a különböző szervek, szövetek 5-lipoxigenáz aktivitásának meghatározásában fontos. Az 5-(S)-HETE a biológiai rendszerekben – más arachidonsav-metabolitokhoz hasonlóan – igen kis koncentrációban (kiseb mint 10^{-12} mol/l) fordul elő, így mérésére csak a legérzékenyebb eljárások alkalmasak.

Kis koncentrációjú bioaktív anyagok gyors, olcsó, kellő érzékenységgel és megfelelő pontossággal meghatározására legalkalmasabb az antigén-antitest kötődésen alapuló radioimmunoassay (RIA) eljárás. A módszerhez a mérendő molekula kellően magas fajlagos aktivitású, radioizotóppal jelzett formája szükséges. Ilyen célra a különböző szakirodalmi forrásokban (pl.: Prostaglandins 29: 481, 1985; Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine 18: 272, 1985; J. Immunology 136: 3455, 1986; Prostaglandins 32: 857, 1986; J. Immunology 144: 2696, 1990) eddig kizárólag olyan kereskedelmi RIA készletet alkalmaztak (Advanced Magnetics, Inc., USA), amely tríciummal jelzett 5-(S)-HETE-t alkalmaz tracerként. A tríciummal jelzett tracer alapvetően megfelel a meghatározás fenti követelményeinek, alkalmazásánál előnyt jelent, hogy az izotóp viszonylag hosszú (mintegy 12 év) felezési ideje miatt a tracer stabilnak tekinthető, és az ilyen traceren alapuló RIA-k pontossága, reprodukálhatósága ennek eredményeképpen általában igen jó. Hátránya azonban, hogy a tracer előállítása egyedi, többlépéses kémiai-radiokémiai szintézist igényel, amelyben az elérhető fajlagos aktivitás a beépíthető trícium-atomok száma alapján elméletileg maximálisan 220 Ci/mmol, de a gyakorlatban a 150 Ci/mmol-t meghaladó fajlagos aktivitás már kiemelkedőnek számít. További hátrány, hogy a trícium mérése költséges és munkaigényes. A találmány célja olyan RIA eljárás kidolgozása, mellyel az 5-HETE koncentrációja egyszerűen, pontosan és érzékenyen meghatározható, úgy, hogy tríciummal jelzett 5-(S)-HETE helyett az 5-(±)-HETE-nek új típusú, ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású származékát al-

kalmazzuk tracerként. Tríciummal jelzett tracer helyett számos kismolekulájú bioaktív anyag esetében eredményesen alkalmaznak ^{125}I -izotóppal jelzett tracereket is. Ezeket oly módon nyerik, hogy az alampolekulából előzetesen olyan – rendszerint aromás csoportot tartalmazó – származékot állítanak elő, amelyekre a ^{125}I -izotóp irányítottan építhető be. Ilyen típusú vegyület az 5-(±)-HETE-tirozin-metilészter is, melyből a ^{125}I -jelzett nagy fajlagos aktivitású monójód származék előállítását ismertettük (J. Chromatography 543: 307, 1991).

A ^{125}I -izotóppal jelzett tracer alkalmazásának igen nagy előnye, hogy a jelölendő alampolekula tríciummal jelzett formájának bonyolult, költséges előállítására nincs szükség. A ^{125}I -izotóp alkalmazásával olyan laboratóriumokban is lehetővé válik a mérés, ahol a trícium-izotóp méréséhez szükséges drága berendezés nem áll rendelkezésre.

A találmány alapja az a felismerés, hogy az 5-HETE koncentrációjának meghatározása antigén – antitest kötődésen alapuló radioimmun módszerrel úgy is lehetséges, ha az immunokémiai reakcióban (I) képletű, ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású, új típusú 5-HETE származékot alkalmazunk. Ez a felismerés nem magától értetődő, ugyanis míg a tríciummal jelzett tracer kémiai szerkezete azonos az inaktív ligandummal, addig a ^{125}I -radioligand előállítása az alampolekula kémiai átalakulásával jár, tehát a radioligandum és az inaktív ligandum kémiaiilag különböznek. Ennek alapján nem szükségszerű, hogy a ^{125}I -izotóppal jelzett származékot a specifikus antitest antigénként felismeri.

Felismerésünk szerint az 5-HETE-monójód-tirozin-metilészter származék specifikus tracerként való alkalmazása a szerkezeti eltérés ellenére lehetséges, és ezáltal a ^{125}I -izotóp alkalmazásából adódó már említett előnyök kedvezőtlen kiaknázzhatók az 5-HETE radioimmun meghatározásában is.

További lényegi felismerés, hogy nemcsak a származékképzésből adódó szerkezeti változás, de magának az alampolekulának a C_5 szénatom szerinti királitása sem befolyásolja a jóddal jelzett származék immunokémiai reaktivitását. Ily módon előnyösen olyan radioligandum alkalmas a meghatározásra, amelynek szintézise az 5-(S)-HETE helyett a lényegesen egyszerűbben előállítható, és így olcsóbb racém 5-(±)-HETE-re mint szintézis-alapanyagra épülhet.

A találmány tárgya tehát eljárás biológiai minta 5-(S)-hidroxi-6(transz),8(cisz),11(cisz),14(cisz)-ejkozatetraénsav [5-(S)-HETE] tartalmának antigén-antitest reakciós meghatározására ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú standard 5-HETE és a meghatározandó biológiai minták jelenlétében, melynek során megmérjük tracernek specifikus antitesttel való kötődését, és az ismert mennyiségű standard 5-(S)-HETE, illetve a találmány szerint előnyösen 5-(±)-HETE, hígítási sorozat által okozott kötődésváltozásból számítjuk a minta hatóanyagtartalmát, olyan módon, hogy tracerként ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású, (I) képletű 5-(±)-HETE származékot használunk.

A találmány szerint úgy járunk el, hogy hígítási sorozat szerint különböző, ismert mennyiségű inaktív 5-HETE standard oldatokat, valamint az ismeretlen mintákat specifikus antitesttel és ^{125}I -5-HETE-TME tracerrel inkubáljuk, majd az antitesthez kötött, illetve nem kötött frakciókat elválasztjuk, és mérjük a kötött frakció radioaktivitását. A kapott radioaktivitás értékekből az ismeretlen minták által okozott kötődésváltozásokhoz tartozó koncentrációkat kiszámítjuk.

A radioimmun meghatározások előtt a különböző típusú mérendő biológiai mintákból a hatóanyagot megfelelő módszerrel kivonjuk, és a méréshez szükséges mértékig tisztítjuk.

Általában 10 000 és 60 000, előnyösen 20 000 és 40 000 cpm közötti beütésszámú tracert alkalmazunk, melyet célszerűen pufferben oldunk.

A puffer-oldat előnyösen 0,1% zselatint tartalmazó, 0,01–0,2 mólos, célszerűen 0,05 mólos, 7,4 pH-jú vizes foszfát-puffer.

Az oldat konkrét összetételétől függően az inkubációs hőmérséklet 0 és 40 °C közötti, előnyösen 0 °C körüli, az inkubálás ideje az adott hőmérséklettől függően 0,5 és 24 óra közötti, előnyösen 15–25 óra között változik.

A módszerhez szükséges specifikus antitestet előnyösen nyúlban termelhetjük. Ehhez 5-HETE-t, előnyösen 5-(±)-HETE-t, alkalmas hordozófehérjéhez – előnyösen pl. szarvasmarha szérum albuminhoz – kötünk, és a nyulakat ezzel ismételtelen beoltjuk. Az immunizált nyulakból kapott anti-5-HETE antiszérum koncentrációját úgy választjuk meg, hogy az adott elválasztó reagens és inkubációs idő mellett a standard 5-HETE-t nem tartalmazó mintákban a tracer 10–80, előnyösen 30–60%-a kötődjön az antitesthez.

A módszerhez szükséges standard anyag 5-(S)-HETE vagy 5-(±)-HETE lehet, előnyösen az utóbbit alkalmazzuk. A kétféle kiralitású anyag egyenértékű alkalmazását az teszi lehetővé, hogy a találmány szerinti tracert mindkét forma azonosan szorítja le a specifikus antitest kötéshelyeiről. Így bár a biológiai mintában mindig 5-(S)-HETE található, standardként a lényegesen olcsóbb 5-(±)-HETE is előnyösen felhasználható.

A radioligand kötött és szabad frakcióinak elválasztására előnyösen 0,5% dextránt és 1% csontszenet tartalmazó 0,01 mólos foszfát-puffert (pH 7,4) alkalmazunk, amely a szabad radioligandumot megköti, és a centrifugálással kapott felülúszó tartalmazza az antitesthez kötött tracert, amelynek radioaktivitását szcintillációs módszerrel mérjük.

A találmány szerinti eljárás előnyeit a következőkben foglaljuk össze:

Az eljárás az 5-HETE tartalom meghatározására olyan radioimmun módszert alkalmaz, amely racém 5-HETE ^{125}I -tel jelzett monojódd-tirozin-metilészter származékán mint nyomjelző anyagon alapul. Ezáltal egyrészt szükségtelessé válik a tríciummal jelzett 5-(S)-HETE előállításához szükséges soklépéses, költséges és munkaigényes szintézisút alkalmazása, másrészt a ^{125}I -izotóp alkalmazásából adódó általános előnyök – azaz a magas érzékenység, egyszerű, gyors és olcsó

méréstechnika – az 5-HETE radioimmun meghatározásában is kiaknázzhatóvá válnak.

Előny továbbá az is, hogy a találmány szerinti eljárásban alkalmazott radioliganddal az 5-(±)-HETE ugyanúgy reagál, mint a mintákban lévő 5-(S)-HETE, így standardként nem szükséges a drágább 5-(S)-HETE alkalmazása.

A találmányt részletesebben konkrét példák alapján ismertetjük, amelyre a találmány oltalmi köre természetesen nem korlátozódik.

1. példa

Humán vérplazma 5-(S)-HETE tartalmának meghatározása ionofór ingerlés után

Az előzőleg kalcium-ionofórral (pl. az A-23 187 márkanévű, Sigma, USA készítménnyel, pl. a Prostaglandins 42: 279, 1991. szakirodalmi forrás szerinti módszerrel) stimulált vérből kapott plazma-mintákat a meghatározás előtt szilárd fázisú extrakciónak vetjük alá a következő módon: 1 ml plazmához hozzáadunk 100 µl 2 mólos citromsav-oldatot, majd az elegyet injekciós fecskendőbe pipettázzuk, és átnyomjuk a fecskendőre helyezett, ún. „fordított fázisú” szilikagél tartalmazó műanyag patronon, vagy miniatűr oszlopon (Sep-Pak C_{18} , Waters Ass., USA, illetve Bond-Elut C_{18} , Varian, USA gyártmány), amelyet előzőleg a gyártó cég használati utasítása szerint előkészítettünk. A töltés után ugyanazon fecskendővel átnyomunk 10 ml desztillált vizet és 10 ml 5%-os vizes etilalkoholt. Ezeket a folyadékokat elöntjük, majd a patronon 10 ml etil-acetátot nyomunk át, amelyet műanyag kémcsőbe gyűjtünk, hozzáadunk 1 ml desztillált vizet, kémcsőkeverővel néhány másodpercig kevertetjük, majd a vizes fázist pipettával alulról kiszívjuk, és elöntjük. Ezt a műveletet még egyszer megismételjük, majd az etil-acetátos oldatot Rotavapor típusú forgóbepárló készüléken (Büchi, Svájc) 30–35 °C hőmérsékleten vákuumban szárazra pároljuk és RIA pufferben (összetételét ld. később) oldjuk. Az ismeretlen mintákkal párhuzamosan, a fentiekkel teljesen azonosan olyan plazmamintát is feldolgozunk, amely nem-stimulált vérből származik („blank”). A fentiek szerint elkészített mintákból közvetlenül a RIA-mérés előtt százsoros hígítást készítünk, szintén RIA-pufferrel.

A RIA-méréshez 10 ng/ml koncentrációjú standard 5-(±)-HETE törzsoldatból pufferes hígítást készítünk úgy, hogy 1-1 ml térfogatú mintákat kapjunk, amelyek hatóanyagkoncentrációja 0,12–0,37–1,11–3,33–10 ng/ml. A standard oldatokból és a meghatározandó mintákból 100–100 µl-t sorszámozott műanyag kémcsővekbe automata pipettával bemérünk, majd hozzáadunk 100 µl antiszérumot olyan hígításban, amely a tracernek 30–40%-át képes megkötni. Ezután valamennyi csőbe bepipettázunk 100 µl (I) képletű tracert, amelynek radioaktivitása 30 000–40 000 cpm/100 µl. A nem-specifikus kötődés (NSB) meghatározására további kémcsővekbe az antiszérum helyett 100 µl tiszta puffer oldatot teszünk, míg a specifikus kötődés (B_0/T) és a teljes radioaktivitás (TC) meghatározására a standard oldatok helyett is tiszta pufferoldatot adunk az antitesthez.

Minden egyes mérési ponthoz három párhuzamost (három azonos reagensösszetételű kémcsövet) használunk, és valamennyi kémcsőben a reakcióelegy térfogatát a szükséges térfogatú puffer hozzáadásával 400 µl-re egészítjük ki. Valamennyi reagens (tracer, antitest, standardok és minták) oldásához és a térfogatkiegészítéséhez 0,05 mólos, 7,4 pH-jú, 0,1% zselatint tartalmazó vizes foszfát-puffert (RIA-puffert) használunk.

A reagensek összemérése után a kémcsövek tartalmát kémcsőkeverővel néhány másodpercig kevertetjük, majd lezárjuk, és hűtőszekrényben 0–4 °C közötti hőmérsékleten éjszakán át állni hagyjuk. Ezután a TC csövekhez hozzáadunk 500 µl hideg RIA-puffert, a többi csőhöz pedig 500 µl csontszén-szuszpenziót, amelyet a hozzáadás közben jeges-vizes fürdőn mágneses keverővel erősen kevertetünk. A szén-szuszpenzió összetétele: 0,01 mólos foszfát-puffer (pH 7,4) 0,5% Dextran T-70 (Pharmacia, Finnország) és 1% Norit-A (Serva, NSZK). A kémcsöveket 10 percig 0 °C-on centrifugáljuk. Ezután a felülúszókból alkalmas mérőcsövekbe 0,5 ml-t pipetázunk, és ezek radioaktivitását NaI(Tl) szcintillációs kristállyal ellátott automatikus mintaváltó, pl. Minigamma (LKB, Svédország) berendezések megmérjük. A számítást a radioimmun meghatározásoknál szokásos módon elvégezve, a hígítási faktoral korrigálva, és a blankre kapott értéket az ismeretlen mintákra kapott értékekből levonva, megkapjuk a plazmaminták 5-HETE koncentrációját, amely méréseink szerint 100–300 ng/mg között változik.

2. példa

Izolált sejtek 5-HETE bioszintézisének meghatározása

Mindenben az 1. példa szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy mintaként izolált sejtek, vagy sejtenyészetek vizes, puffertolt tápfolyadékait alkalmazzuk, „blank” mintaként pedig a sejtmentes tápfolyadék szolgál. Ezzel a módszerrel elsősorban kísérleti állatok, vagy ember különböző fehérvérsejt-típusainak (neutrofil és eozinofil granulociták, monociták, immunociták) 5-HETE bioszintetizáló képessége határozható meg. A várt koncentrációk a vizsgált sejttypus, a kísérleti körülmények, és az alkalmazott kezelések szerint tág határok közt változhatnak, a méréshez szükséges mintahígítást ennek megfelelően előkísérletekben állítjuk be, úgy, hogy a mért értékek a kalibrációs görbére essenek. A pontos koncentráció számításához a RIA mérésekben kapott adatokat ebben az esetben is korrigálni kell a hígítási faktoral, valamint a „blank” értékével.

Saját vizsgálatainkban emberi neutrofil granulocitákon, 10 perces kalcium-inofór (Ionophore-A₂₃ 187, Sigma, USA gyártmány) kezelés után az 5-HETE bioszintézis értéke 10–30 ng/10⁷ sejt, ennek megfelelően az extrakció után kapott puffertes oldat célszerűen 10–50-szeres hígításban mérhető.

3. példa

Tüdőszövet 5-HETE tartalmának meghatározása

1 g tüdőszövetet 5 ml metil-alkoholban homogenizálunk, majd ennek 1 ml-éhez 5 ml 0,1 mólos (pH 7,4) nátrium-foszfát-puffer és 10 000 cpm radioaktivitású

tríciummal jelzett 5-HETE-t [(³H)-5-(S)-HETE, Amersham International plc, Anglia terméke] adunk. Az oldatból 0,5 ml-t félreteszünk az extrakciós határfok mérésére („A minta”), további 1 ml-t pedig az 1. példa szerinti szilárd fázisú extrakcióval tisztítunk. Az extrakció utáni 1 ml RIA-puffertes mintából 0,1 ml-t félreteszünk („B minta”), a többiből – előkísérletek alapján optimalizált hígításban – RIA meghatározást végzünk. A pontos szöveti koncentrációkat a hígítási faktor és a feldolgozási veszteség figyelembevételével számítjuk ki. Utóbbit oly módon határozzuk meg, hogy az „A” és a „B” minták radioaktivitását folyadékszcintillációs módszerrel megmérjük, és a B/A hányadost képezzük. Ennek értéke a példa szerinti feldolgozási módszerre általában nagyobb, mint 0,8, vagyis a feldolgozási veszteség kisebb, mint 20%.

A fenti módszer különféle kísérleti állatok (pl. patkány, egér, nyúl) tüdőszöveti 5-HETE tartalmának meghatározására általánosan alkalmazható. A szöveti koncentráció állatfajonként és a kezeléstől függően tág határok között változik, így a feldolgozandó szövet célszerű tömegét, és az optimális hígításokat előkísérletekben meg kell határozni. Saját méréseink szerint patkányban, 1 g nedves tüdőszövetben, endotoxinkezelés (Escherichia coli endotoxin, Sigma, USA gyártmány) után 6–12 ng 5-HETE mérhető, amelyhez a példa szerint 1 g szövet elegendő, és az extrakció utáni minták tízszeres hígításából történt a RIA-meghatározás.

4. példa

Specifikus 5-HETE antiszérum előállítása nyúlban

Az eljáráshoz 5 mg szintetikus 5-(±)-HETE-t (Cayman Company, USA gyártmány) alkalmazzunk, amelyet 20 mg szarvasmarha-szérumalbuminhoz (BSA, lyophilized and crystallized powder, Sigma, USA gyártmány) kémiaiilag kötünk, az Eicosanoids 4, 1, 1991. irodalommal megegyező eljárás szerint. Az így nyert immunogén fehérjével 3 db hím, új-zélandi fehér nyulat kezelünk az alábbiak szerint:

1 mg fehérjét 0,5 ml fiziológiás sóoldatban (0,9%-os vizes NaCl-oldat) oldva, 0,5 ml komplett Freund-adjuvánssal (Sigma, USA) intenzíven összekeverünk, majd a kapott emulziót a kísérleti állat hátbőrébe oltjuk 40–60 oltási ponton egyenletesen elosztva. 1 hónapos időközönként a fenti kezelést megismételjük olyan módon, hogy 1 mg helyett 0,5 mg fehérjét alkalmazzunk, és a komplett Freund-adjuvánst inkomplett Freund-adjuvánssal (Humán Oltóanyagtermelő Vállalat, Gödöllő) helyettesítjük. Ezt a kezelést havonta megismételjük, és a kezelése után 10 nappal az állatok fülvenájából 1/2 ml vérmintát veszünk, amelyeket a vérvétel után 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugálunk, és a vérsavót elválasztjuk. Az így kapott vérsavókat az általános RIA-eljárásoknak megfelelően az alábbiak szerint minősítjük:

– Megmérjük a minta kötőképességét („titerét”) nagy fajlagos aktivitású [³H]-5-(S)-HETE (Amersham International plc., Anglia) és a találmány szerinti ¹²⁵I-jelzett tracerrel.

- Ugyanezen tracerekkel a fentiek szerint meghatározott antiszérum-hígításban standard görbékét készítünk, úgy, hogy standard anyagként 5-(S)-HETE-t és 5-(±)-HETE-t (mindkettő a Cayman Chemical Co., USA gyártmánya) alkalmaztunk.

A mérési adatok alapján az oltásokat mindaddig folytatjuk a fent leírtak szerint, amíg olyan antiszérumot nem nyerünk, amely mindkét tracer képes megkötni, ugyanakkor a ¹²⁵I-jelzett tracer kötődése 5-HETE-vel gátolható, és a gátlóképesség azonos az 5-(S)-HETE-re és 5-(±)-HETE-re vonatkozóan.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás biológiai minta 5-(S)-hidroxiz-6(transz),8(cisz),11(cisz),14(cisz)-ejkozatetraénsav [5-(S)-HETE] tartalmának antigén-antitest reakciós meghatározására ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú standard 5-HETE és a meghatározandó biológiai minták jelenlétében, melynek során megmérjük a tracernek a specifikus antitesttel való kötő-

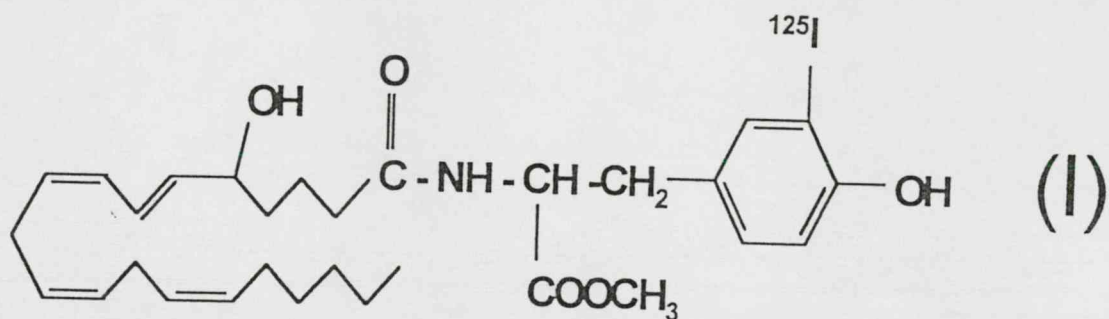
dését, és az ismert mennyiségű standard 5-(S)-HETE, illetve 5-(±)-HETE, hígítási sorozat által okozott kötődés-elváltozásból számítjuk a minta hatóanyagtartalmát, *azzal jellemezve*, hogy tracerként ¹²⁵I-izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású, (I) képletű 5-(±)-HETE-monójód-tirozin-metilészter származékot alkalmazunk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3000 és 100 000, előnyösen 10 000 és 60 000 cpm közötti beütésszámú, nagyobb, mint 10 40 TBq/mmol, előnyösen 74 TBq/mmol fajlagos aktivitású, (I) általános képletű tracer alkalmazunk.

10 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként nyúlban – előnyösen szarvasmarha szérum albuminhoz kötött 5-(±)-HETE mint immunogén anyag ellen – keletkezett specifikus anti-5-HETE immunplazmát vagy immunsavót alkalmazunk, az inaktív 5-HETE-t nem tartalmazó mintában a tracer 10–80, előnyösen 30–60%-át megkötni képes koncentrációban.

20 4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy standard anyagként az 5-(S)-HETE-t vagy előnyösen az 5-(±)-HETE-t alkalmazzuk.

HU 209 849 B
Int. Cl.⁵: G 01 N 33/50

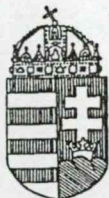


Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: dr. Szvoboda-Dománszky Gabriella osztályvezető
ARCANUM Databases - BUDAPEST

Mucha I: Eljárás 9alfa,11béta-PGF2 tartalom radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jód-125 izotóppal jelzett radioligandum előállítására. Hung. Pat. 208747, 1994 július 6, bejelentés 1991 szeptember 18.

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

**SZABADALMI
LEÍRÁS**
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) Lajstromszám:

208 747 B

(21) A bejelentés száma: 2997/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 09. 18.

(51) Int. Cl.⁵

G 01 N 33/88
G 01 N 33/60
A 61 K 49/00

(40) A közzététel napja: 1993. 08. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 12. 28. SZKV 93/12

(72) Feltaláló:

dr. Mucha István, Budapest (HU)

(73) Szabadalmaz:

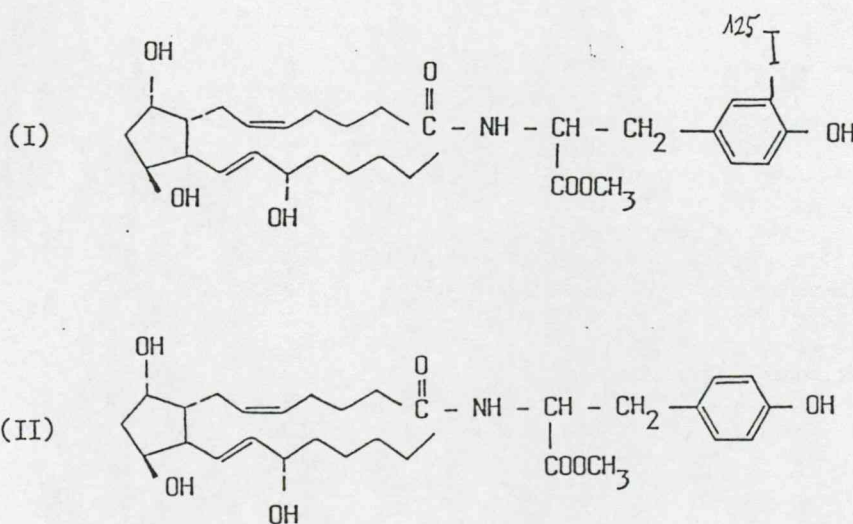
Izotóp Intézet Kft., Budapest (HU)

(54) **Eljárás 9 α , 11 β - PGF₂ tartalom radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jód-125 izotóppal jelzett radioligandum előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány megjavítja a közegminták 9 α , 11 β -PGF₂ tartalmának antigén-antitest reakciós meghatározását annak révén, hogy a találmány szerint kedvező feltételek között előállítható új szerkezetű radioligandumot, (I) általános képletű, jód-125 izotóppal jelzett 9 α , 11 β -PGF₂-jód-tirozin-metilésztert alkalmazunk, amelynek

fajlagos aktivitása kiemelkedően magas, és ezáltal a meghatározás érzékenysége néhány pikogram/milliliter. A találmány szerint az (I) képletű radioligandumot úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű 9 α , 11 β -PGF₂-tirozin-metilésztert nagy fajlagos aktivitású NA¹²⁵I-dal reagáltatjuk.



A leírás terjedelme: 8 oldal (ezen belül 1 lap ábra)

HU 208 747 B

A találmány tárgya eljárás biológiai minták $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ koncentrációjának radioimmunológiai meghatározására, melynek során megmérjük jód-125 izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ származék mint nyomjelző anyag (továbbiakban: radioligandum vagy tracer) specifikus antitesthez való kötődését ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú standard $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ oldatok és a meghatározandó minták jelenlétében, majd a standardokhoz tartozó kötészváltozások ismeretében a mintákhoz tartozó kötészváltozásokból kiszámítjuk azok hatóanyagtartalmát.

A találmány szerint ebben az immunokémiai reakcióban tracerként olyan, egyes prosztoglandin típusokra már korábban sikerrel alkalmazott radioligandumokkal analóg szerkezetű származékot használunk, amely a találmány tárgyát képező prosztoglandin típusra még nem ismert.

A találmány tárgya továbbá ezen új szerkezetű radioligandum előállítására szolgáló eljárás.

Ismert, hogy a prosztoglandin D₂ (PGD₂) enzimátikus átalakulása során – más prosztoglandinoktól eltérően – nemcsak biológiailag hatástalan, hanem az anyavegyülettől eltérő biológiai aktivitással rendelkező származékok is keletkeznek. Ezek egyik fontos képviselője a néhány éve felfedezett $9\alpha,11\beta$ -PGF₂, vagy 11-epi-PGF_{2 α} , amely a régóta ismert, legáltalánosabban elterjedt prosztoglandin típusnak, a PGF_{2 α} -nak szerkezeti izomerje. Biológiai aktivitása mint a PGD₂-től, mind a PGF_{2 α} -tól eltér. Az elsődlegesen keletkező prosztanoidoktól (pl. PGE₂, PGF_{2 α} , TXB₂) eltérően a különböző szövetekben nem általánosan elterjedt, ennek megfelelően koncentrációja még ezen prosztanoidok igen alacsony koncentrációjánál is kisebb. Emiatt megfelelő érzékenységű mérőmódszer kidolgozása még a többi prosztanoidénál is lényegesebb.

Kis koncentrációjú bioaktív anyagok gyors, olcsó, kellő érzékenységű és megfelelő pontosságú meghatározására legalkalmasabb az antigén-antitest kötéssel alapuló radioimmunoassay (RIA) eljárás. A módszer olyan radioizotópos nyomjelzés, amelynek kulcsreaktív a mérendő molekula kellően magas fajlagos aktivitású radioizotóppal jelzett formája (tracer).

Ilyen célra eddig kizárólag tríciummal jelzett $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-t alkalmazták. A kutatási alkalmazásról csak kevés szakirodalmi forrás ismert (pl. Prostaglandins 33:517, 1987; Brain Res. 385:321, 1986; Anal. Biochem. 182:1, 1990), és mindössze egy gyártó, az Amersham International plc. (Anglia) gyárt kereskedelmi forgalomban kapható mérőkészletet.

A tríciummal jelzett tracer előnye, hogy az izotóp viszonylag hosszú felezési ideje alapján (12 év) a tracer gyakorlatilag stabilnak tekinthető, és az ezen alapuló RIA-k pontossága, reprodukálhatósága általában igen jó. Az elérhető fajlagos aktivitás (kb. 200 Ci/mmol) általában megfelelő érzékenységet biztosít. Hátránya azonban, hogy a tracer előállítása egyedi, soklépcsős kémiai-radiokémiai szintézist igényel, és a trícium mérése költséges és munkáigényes.

Számos kismolekulájú bioaktív anyag, így a prosztoglandinok esetében is a tríciummal jelzett tracer he-

lyett sikerrel alkalmaznak olyan radioligandumokat, amelyek az alpmolekulához kötött funkció csoporton jód-125 izotópot tartalmaznak. (Eur. J. Clin. Invest. 5:311, 1975; Biochim. Biophys. Acta 431:139, 1976; Anal. Biochem. 87:343, 1978; Prosta. Med. 4:399, 1980; Prostaglandins 16:277, 1978; Adv. Prosta. Thromb. Res. 6:167, 1980; Izotóptechnika 22:190, 1979; J. Chromatography 189:433, 1980; Mucha István: Kandidátusi értekezés 1985.)

A jód-125-tel jelzett tracer alkalmazásának nagy előnye, hogy nem magát az alpmolekulát kell jelzett formában előállítani, hanem egy mindössze kétféle egyszerű szintézissel jutunk a tracerhez. További lényeges előny, hogy az így nyert tracer fajlagos aktivitása a tríciummal jelzett tracerének akár tízszerese is lehet, és ezáltal a meghatározás érzékenysége jelentősen növelhető. A jód-125 izotóp alkalmazása ugyanakkor gazdaságos is, mivel mérés technikája gyorsabb, egyszerűbb, és olcsóbb, és a radioimmun meghatározáshoz szükséges specifikus antitest igénye is lényegesen kevesebb.

A jód-125 izotóppal jelzett tracer felhasználásának gyakorlati hátránya, hogy az izotóp felezési ideje rövid, és a vele való műveletek sugárveszélye nagyobb a tríciuménál.

A találmány célja olyan RIA eljárás kidolgozása, mellyel a $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ koncentrációja egyszerűen, pontosan és az ismert eljárásnál nagyobb érzékenységgel határozható meg trícium helyett jód-125 izotóppal jelzett tracer felhasználásával. A találmány további célja az ehhez szükséges új típusú, a szakirodalomban nem ismert, jód-125 izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-monojód-tirozin-metilészter származék előállítására szolgáló eljárás kidolgozása.

A találmány alapja az a felismerés, hogy egyéb kismolekulájú anyagokkal – így különböző prosztoglandinokkal is – analóg módon, a általános képletű vegyület radioimmun meghatározása is lehetséges jód-125 izotóp felhasználásával, ha az alpmolekulához tirozin-metilészter csoportot kapcsolunk és ezt mint prosztetikus csoportot jód-125 izotóppal szelektíven jelöljük.

A találmány tárgya tehát biológiai minták $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ koncentrációjának radioimmun meghatározása, mely az ismert eljárásoktól abban különbözik, hogy tríciummal jelzett tracer helyett jód-125-tel jelzett, nagy fajlagos aktivitású $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-monojód-tirozin-metilésztert alkalmazunk radioaktív nyomjelző anyagként.

Ennek során úgy járunk el, hogy megmérjük a tracernek specifikus antitesttel való kötődését ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú standard oldatok, valamint a mérendő minták jelenlétében. Az így kapott értékekből az ismeretlen minták által okozott kötészváltozásokhoz tartozó $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ koncentrációkat kiszámítjuk.

A találmány szerint a mérést úgy végezzük el, hogy a mérendő biológiai mintákból a hatóanyagot megfelelő módszerrel kivonjuk, majd a tracerrel, a hígítási sorozat szerint különböző mennyiségű standard $9\alpha,11\beta$ -

PGF₂-t, illetve a mérendő mintákat specifikus antitesttel reagáltatjuk, majd az antitesthez kötött, ill. nem kötött frakciókat elválasztjuk, és mérjük a kötött frakció radioaktivitását. Az így kapott értékekből az ismeretlen minták által okozott kötészváltozásokhoz tartozó hatóanyag-koncentrációkat kiszámítjuk.

Általában 10 000 és 60 000, előnyösen 20 000 és 40 000 cpm közötti beütésszámú tracer alkalmazunk, amelyet célszerűen pufferben oldunk.

A puffer előnyösen 0,1% zselatint tartalmazó 0,01–0,2 mólos, 7,4 pH-jú foszfát-puffer.

Az oldat konkrét összetételétől függően az inkubációs hőmérséklet 0 és 40 °C közötti, az inkubáció időtartama 1 és 40, előnyösen 3 és 20 óra között változik.

A specifikus antitest célszerűen magas titerű, megfelelően magas (10⁹–10¹⁰ M) affinitási együtthatóval rendelkező anti-9α,11β-PGF₂ anti-plazma. Ezt olyan hígításban alkalmazzuk, amely a standard 9α,11β-PGF₂-t nem tartalmazó mintában a tracer 20–80, előnyösen kb. 40–50%-át képes megkötni.

A tracer kötött és szabad frakcióinak elválasztására előnyösen 1% csontszén szuszpenziót használunk, melyet előnyösen 0,5% dextránt tartalmazó 0,01 mólos foszfát-pufferrel (pH 7,4) készítünk. A csontszén a szabad radioligandumot megköti, és a centrifugálással kapott felülülő tartalmazza az antitesthez kötött traceret, melynek radioaktivitását szcintillációs módszerrel mérjük.

A találmány szerinti eljárás igen lényeges előnye, hogy alkalmazásával nagyon alacsony kimutatási határ érhető el; 23 független mérésből kapott statisztikai adatok alapján a legkisebb kimutatható dózis 0,855 pg (a relatív szórás 42%), míg az 50%-os tracer-kiszorításhoz tartozó koncentráció – az ID₅₀ érték – 6,45 pg (a relatív szórás 22,5%). Ezzel szemben a kereskedelmi forgalomban kapható RIA-készlet ugyanezen paramétereit 4, illetve 20 pg, a korábban említett szakirodalmi forrásokban pedig – ha az érzékenységi adatokat egyáltalán közlik – még kedvezőtlenebb értékeket találunk, így pl. a Prostaglandins 33, 517, 1987 közleményben a közölt kimutatási határ 20 pg, az ID₅₀ érték pedig 150 pg.

A minél nagyobb érzékenység elérése elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt kulcsfontosságú, mert az érzékenység növekedésének arányában csökkenthető a meghatározáshoz szükséges mintatérfogás is. Ez a 9α,11β-PGF₂ esetében azért különösen is fontos, mivel annak természetes szöveti koncentrációja olyan alacsony, hogy kevésbé érzékeny módszer alkalmazásakor túlságosan nagy térfogatú biológiai mintára van szükség elegendő hatóanyag kinyeréséhez. Ez nemcsak a meghatározás költségeit növeli jelentősen, hanem korlátozza számos olyan szövettípus kísérleti felhasználását, amelyek a kívánt térfogatban nem is gyűjthetők össze (pl. kistestű laboratóriumi állatok vérmintái stb.). A nagy mintatérfogás alapvető elvi hátránya, hogy a nagyobb térfogattal együtt nemcsak a mérendő hatóanyag, hanem a szennyező anyagok mennyisége is arányosan növekszik, és ezáltal romlik a meghatározás specifikitása. Ennek kiküszöbölése további tisztítási

műveletek alkalmazását igényelheti, és ez újabb jelentős többletköltséggel és munka-ráfordítással járhat. A találmány szerinti eljárás alkalmazásával mindezen hátrányok a lehetséges minimumra csökkenthetők.

5 A találmány tárgya továbbá eljárás a radioimmun meghatározáshoz szükséges (I) képletű, nagy fajlagos aktivitású, jód-125 izotóppal jelzett 9α,11β-PGF₂-monojódtirozin-metilészter (9α,11β-PGF₂-TME-¹²⁵I) előállítására.

10 A találmány szerint az (I) képletű radioligandót úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű 9α,11β-PGF₂-TME származékot előnyösen nagy fajlagos aktivitású, (kb. 2000 Ci/mmol; 74 TBq/mmol) Na¹²⁵I-dal reagáltatjuk célszerűen klóramin-T (para-toluol-szulfoklóramin-nátriumsó) reagens jelenlétében pufferolt közegben (előnyösen 7 fölötti pH értéken) rövid (10–200 másodperc), előnyösen 30–60 másodperc reakcióidővel, úgy, hogy a (II) képletű 9α,11β-PGF₂-TME származékot a Na¹²⁵I-hoz képest 20–200, elő-

20 nyösen 30–50-szeres molarányban alkalmazzuk, és a reakcióidőt úgy szabályozzuk, hogy megfelelő időpontban a rendszerben klóramin-T hatására képződő reakcióképes oxidált jódot nátrium-metabiszulfít hozzáadásával jodid ionná redukáljuk. Az (I) képletű célvegyület szintéziséhez célszerűen foszfát puffert alkalmazunk, a (II) képletű anyagot célszerűen etilalkoholos oldatban adjuk a reakcióelegyhez oly módon, hogy az etanol végkoncentrációja a 20%-ot ne haladja meg. Az (I) képletű célvegyület előállításának leg-

30 fontosabb lépése az előállítani kívánt monojód-származék elválasztása az egyéb jódjelzett származékoktól, valamint a reakció befejeződése után a nagy kiindulási mólfelesleg miatt még mindig nagy feleslegben lévő (II) képletű kiindulási anyagtól. Erre célszerűen adszorpciós oszlop-kromatográfiát alkalmazunk, melyet úgy végzünk, hogy a reakcióelegyet Sephadex LH-20 oszlopra felvisszük, és növekvő etanol koncentrációjú etanol : nátrium-citrát (pH 4,0) kétkomponensű oldószereleggyel eluáljuk a különböző jódjelzett származékokat, miközben az effluens radioaktivitását folyamatosan mérjük, és az ezzel arányos jelet regisztráló készülékkel rögzítjük.

35 A találmány szerint célszerűen a következő oldószereket alkalmazzuk: tiszta citrát puffer (0,2 mólos, pH 4,0), majd 1 mólos citrát (pH 4,0) és etanol 4 : 1 arányú elegyet, ahol a tiszta végterméket az utóbbi frakcióban kapjuk meg. Az oldószerek szükséges térfogata az aktuális, és az elválasztás közben folyamatosan regisztrált elúciós profil és a képződött jelzett vegyületek összetételének (arányának) függvénye, általában a tiszta citrát pufferből 40–70 ml-t, a 4 : 1 arányú citrát : etanol elegyből pedig 30–60 ml-t alkalmazzunk.

40 Külön előnye a találmány szerinti eljárásnak, hogy az alkalmazott apoláros dextrán gélen a jódjelzett származékok adszorpciós készsége jelentősen meghaladja a kiindulási (II) képletű inaktív anyagét, ily módon az (I) képletű célvegyület – amelyet még hatásos jódbeépülés mellett is jelentős mennyiségű (II) képletű kiindulási anyag szennyez – teljes biztonsággal választható el, és ezzel a találmány szerinti radioimmun meghatá-

45 50 55 60

rozáshoz szükséges magas fajlagos aktivitás biztosítható.

A (II) képletű vegyületet a (III) képletű $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ és tirozin-metilészter reakciójával állítjuk elő oly módon, hogy a $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-t 1–5 előnyösen 2–3 mólárányú tirozin-metil-észterrel reagáltatjuk, 1–5, előnyösen 2–3 mólárányú 1-etil-e-(3' dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid reagens jelenlétében, célszerűen vizes tetrahydrofuranban, 0–50 °C-on, előnyösen szobahőmérsékleten, 3–40, előnyösen 20–24 óra időtartamig. Az oldószert vákuum-desztillációval eltávolítjuk, a maradékot célszerűen etil-acetátban oldjuk, majd az etil-acetátos oldatból híg savas extrakcióval, célszerűen 0,1 n sósavval kimossuk a változatlan tirozin-metilésztert, híg lúgos, célszerűen 0,1 n NaOH-os extrakcióval pedig az el nem reagált (III) képletű vegyületet.

A terméket célszerűen vékonyréteg-kromatográfiás úton tisztítjuk, célszerűen olyan szilikagél rétegen, amely fluorezcensz indikátort tartalmaz, a kifejlesztő oldószerelegye pedig célszerűen kloroform : metanol : víz 90 : 10 : 1 térfogatarányú elegye. A terméket 254 nm-es UV-fénnyel megvilágítva mutatjuk ki.

A találmányt a továbbiakban részletesebben példák keretében magyarázzuk, amelyekre a találmány természetesen nem korlátozódik.

1. példa

A jódjelzéshez használt (II) képletű köztitermék előállítás

1 mg (2,74 mikromól) (III) képletű $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-t, 1,5 mg (8,4 mikromól) 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid-ot és 2 mg (10,5 mikromól) tirozin-metilésztert egyszerre bemérünk, hozzáadunk 100 mikroliter desztillált tetrahydrofuránt és 20 mikroliter desztillált vizet. Az elegyet szobahőfokon 24 órán át kevertetjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, a maradékot 30 ml etil-acetátban feloldjuk, és rázóüvegcsőbe öntjük. Ezt az oldatot sorrendben 3x2 ml 0,1 n sósavval, 3x2 ml vízzel, 3x2 ml 0,1 n nátrium-hidroxiddal és 3x3 ml vízzel összekeverjük. Minden összekeverés után a vizes fázist elválasztjuk és elöntjük. Az utolsó mosás után az etil-acetátos oldatot forgóbepárló készüléken (Büchi, Svájci gyártmány) vákuumban bepároljuk. A maradék fehér, kristályos anyagot 100 mikroliter etil-alkoholban oldjuk, majd 0,25x200x100 mm méretű Kiesegel 60 F 254 (Merck, NSZK gyártmány) szilikagél rétegre 3 cm-es sávban felvisszük, és kloroform : metanol : víz 90 : 10 : 1 térfogatarányú elegye helyezésre a kromatogramot kifejlesztjük. Kifejlesztés után a réteget hideg levegővel szárítjuk, majd 254 nm hullámhosszú ultrabolya fénnyel megvilágítva a foltokat láthatóvá tesszük. A 0,255 Rf értékű folt helyén a réteget lekaparjuk, 10 ml etil-alkohollal teszünk rá, és 1 óra várakozás után üveg-szűrőn szűrjük. A szűrőn lévő gél 2x5 ml etil-alkohollal mossuk, az alkoholos oldatokat egyesítjük, forgóbepárló szárzáró pároljuk, és mérjük a termék súlyát, majd etil-alkohollal törzsoldatot készítünk belőle.

A kapott (II) képletű termék tömge a kromatográ-

fiás tisztítás után 212 mikrogramm, ami 14,6% kitermelésnek felel meg.

2. példa

Az (I) képletű céltermék előállítása

Az 1. példa szerint kapott $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-TME származék 100 mikro-gramm/ml koncentrációjú etanolos oldatából 30 mikrolitert (6,5 nmol) 1 ml-es talpas Eppendorf csőbe pipettázunk, hozzáadunk 100 mikroliter 50 mM foszfát puffert, (pH 7,4) és 57 MBq radioaktivitású hordozómentes Na¹²⁵I oldatot (MTA Izotópkutató Intézete terméke). Az elegyet összekeverjük, majd 50 mikroliter, 7 mg/ml koncentrációjú nátrium-metabiszulfid oldatot előre felszívunk a reakció leállításához. Az elegyhez ezután hozzápipettázunk 25 mikroliter 4,8 mg/ml koncentrációjú klóramin-T reagens oldatot, az elegyet összekeverjük, és pontosan 60 másodperc múlva az előre elkészített nátrium-metabiszulfid oldat hozzáadásával a reakciót befagyaszthatjuk.

Az elegyet ezután oszlopkromatográfiás módszerrel választjuk el, a következőképpen:

Sephadex LH-20 (Pharmacia, Svéd gyártmány) gél desztillált vízben 24 órát duzzasztunk, majd 20x1 cm méretű, alul elvezető, felül bevezető csővel ellátott üvegcsőbe töltjük, alkalmas oldószerezadagoló perisztaltikus pumpával (LKB, Svéd gyártmány) összekapcsoljuk, mintegy 10 percig egyensúlyba hozzuk 0,2 mólos citromsavval (pH 4,0) mintegy 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az így előkészített hordozóra a reakcióelegyet felvisszük, és az elúciót az előző oldószerezellel folytatjuk. Az eluens radioaktivitását folyamatosan detektáljuk oly módon, hogy az oszlop elvezető csővét ólommal árnyékolat NaI(Tl) szcintillációs kristály (Gamma gyártmány) előtt vezetjük el, a kristályt pedig számláló berendezéssel (Gamma gyártmány) és vonalíróval (Gamma gyártmány) kötjük össze. Az effluent mérőhengerbe gyűjtjük, az előző eluensből 50–100 ml-t alkalmazunk, majd 1 mólos citromsav (pH 4) és etil-alkohol 4 : 1 arányú elegyével gyűjtjük a kívánt terméket a detektáló készülékben megjelenő csúcs szerint. A radioimmun meghatározáshoz a csúcs közepének megfelelő mintegy 5 ml-es frakciót választjuk külön. Ennek radioaktivitása 13,8 MBq, ami 24,2% radioaktív hozamnak felel meg. A hozam természetesen az elérhetőnél lényegesen alacsonyabb, mivel a terméknek csak egy rész kerül gyűjtésre.

3. példa

Vérplazma $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ koncentrációjának radioimmun meghatározására nyúl vénás vérből

A meghatározáshoz előbb plazmamintákat gyűjtünk úgy, hogy a kísérleti állatokból a vért műanyag kémcsövekbe, 0,1 térfogatrészt – 2% etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsót és 1 mmol indometacin tartalmazó – izotóniás sóoldatra vesszük, majd azonnal 4 °C-on, 10 percig, kb. 1000 xg gyorsulással centrifugáljuk, és a tiszta plazmát különválasztjuk. A centrifugálás és a mintavétel közötti időben a vért jeges fűdőben tartjuk.

A plazmamintákat ezután oldószeres extrakciónak

vetjük alá, a következő módon, 1 ml plazmához hozzáadunk 100 mikroliter 2 mólos citromsav oldatot, majd az elegyet injekciós fecskendőbe pipetázzuk, és átnyomjuk a fecskendőre helyezett ún. „fordított fázisú” szilikagélt tartalmazó műanyag patronon (Amrep C₂, Amersham, Anglia gyártmány), amelyet előzőleg a gyártó cég használati utasítása szerint előkészítettünk. A tölteten ezután átnyomunk 5 ml desztillált vizet, 5 ml 10%-os etilalkoholt és 5 ml n-hexánt. Ezeket a folyadékokat elöntjük, majd a patronon 5 ml etil-acetátot nyomunk át, amelyet műanyag kémcsőbe gyűjtünk. Az oldószert nitrogén gázáramban szobahőmérsékleten bepárooljuk, a maradékot pedig RIA pufferben oldjuk.

7,5 ng/ml koncentrációjú 9 α ,11 β -PGF₂ törzsoldatból hígítási sorozatot készítünk úgy, hogy 1–1 ml térfogatú mintákat kapjunk, melyek hatóanyag-koncentrációja 6–19–56–167–500 pg/ml. Sorszámozott műanyag kémcsővekbe automata pipettával a standard és a minta oldatokból 100–100 mikrolitert bemérünk, majd hozzáadunk 100 mikroliter ¹²⁵I–9 α ,11 β -PGF₂–TME tracer, amelynek radioaktivitása 30 000–40 000 cpm/100 mikroliter, és 100 mikroliter specifikus antiszérumot olyan hígításban, amely a tracer 30–60%-át képes megkötni. A nem-specifikus kötődés (NSB) meghatározására további kémcsővekbe a tracerhez csak tiszta pufferoldatot teszünk, míg a specifikus kötés (B_s/T) és a teljes radioaktivitás meghatározására a standard oldatok helyett is tiszta pufferoldatot adunk az antitesthez. A térfogat valamennyi kémcsőben a művelet végén 0,4 ml lesz. A tracer és az antitest oldásához, valamint a térfogatkiegészítéshez szükséges pufferként 50 mM koncentrációjú, 7,4 pH-jú, 0,1% zselatint tartalmazó foszfát puffert használunk.

A kémcsővek tartalmát néhány másodpercig kevertetjük, majd lezárjuk, és hűtőszekrényben 4 °C körüli hőmérsékleten egy éjszakán át állni hagyjuk. Ezután a TC csövek kivételével minden kémcsőbe folyamatos keverés közben 2–3 perc alatt bepipetázzunk 0,5 ml – 0,5% Dextran T–70-et (Pharmacia, Svédország) és 1% csontszén (Norit-A, Serva, NSZK) tartalmazó – 0,01 mólos, 7,4 pH-jú foszfát puffert szuszpenziót, a TC csövekbe pedig azonos térfogatú RIA puffert. A csöveket az előbbieket szerint kevertetjük, majd 0 °C-on, 10 percig, 2000 xg gyorsulással centrifugáljuk, és a felülszóból alkalmas mérőcsővekbe 0,5–0,5 ml-t pipetázzunk, majd mérjük ezek radioaktivitását NaI(Tl) szcintillációs kristállyal ellátott automatikus mintaváltó berendezésben (pl.: Minigamma, LKB, Svédország gyártmány). A számítást a radioimmun meghatározásokban szokásos módon végezzük.

A fentiekből a szakember felmérheti a találmány előnyeit a technika állásához képest. Az előnyökből kiemeljük:

A találmány szerinti eljárás segítségével elkerülhető a tríciummal jelzett 9 α ,11 β -PGF₂ előállításához szükséges soklépcsős szintézissor alkalmazása, ehelyett kedvező feltételek között előállíthatunk olyan radioligandumot, nevezetesen az (I) képletű ¹²⁵I–9 α ,11 β -PGF₂–TME származékot, amelynek egy moláris aktivitása biztosítja a 9 α ,11 β -PGF₂ koncentrációjá-

nak az eddig használt tríciummal jelzett tracerhez képest mintegy tízszer érzékenyebb radioimmunológiai meghatározását.

A nagyobb érzékenység eredményeképpen kisebb térfogatú biológiai minta elegendő a meghatározáshoz, és ez nemcsak gazdaságos, de elvileg is előnyös a minél jobb specifititás elérése szempontjából.

Az alkalmazott adszorpciós oszlopkromatográfiai elválasztástechnika biztosítja a jódjelzett célterméknek a kiindulási anyagtól való tökéletes elválasztását, és ezáltal a céltermék fajlagos aktivitása nem csökken a tisztítás során.

Az alkalmazott elválasztástechnika fontos gyakorlati előnye, hogy a radiojódos jelzés során nagyobb aktivitás-mennyiségeknél is biztosítja a nyitott radioizotópokkal végzett műveletekre előírt sugárvédelmet és minimálisra csökkenti a radioaktív inkorporáció veszélyét.

Mindezek alapján a találmány szerinti új, jód–125 izotóppal jelzett radioligand alkalmazása olyan új 9 α ,11 β -PGF₂ radioimmunoassay megvalósítását teszi lehetővé, amely miközben megőrzi a tríciummal jelzett tracer alkalmazó assay specifitását, egyúttal jelentősen növeli annak érzékenységét is. A találmány gyorsabbá és olcsóbbá válik, és jelentősen csökkenthető a méréshez szükséges antiszérum mennyisége is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás biológiai szövetminta 9 α ,11 β -PGF₂ tartalmának radioimmunológiai reakción alapuló meghatározására ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú 9 α ,11 β -PGF₂ és a biológiai szövetminta jelenlétében, amelynek során megmérjük nagy fajlagos aktivitású radioaktív nyomjelző vegyületnek (továbbiakban tracer) specifikus antitesttel való kötődését, és az ismert mennyiségű 9 α ,11 β -PGF₂ hígítási sorozat által okozott kötéstváltozás alapján számítjuk a mindenkor szövetminta hatóanyagtartalmát, *azzal jellemezve*, hogy tracerként új típusú, (I) képletű ¹²⁵I–9 α ,11 β -PGF₂-monojódtirozin-metilészter származékot alkalmazunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy háromezer és százezer, előnyösen harmincezer és ötvenzezer cpm becütésszámú tracer alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként nyúlban, előnyösen szarvasmarha-szérumalbuminhoz kötött 9 α ,11 β -PGF₂ mint immunogén anyag ellen keletkezett, anti-9 α ,11 β -PGF₂ antiplazmát használunk, olyan hígításban, amely a standard 9 α ,11 β -PGF₂-t nem tartalmazó mintában a tracer 25–70, előnyösen 40–60%-át képes megkötni.

4. Az 1–3. igénypont bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy puffercoldatként előnyösen zselatint tartalmazó foszfát puffert alkalmazunk, melynek pH-ja 6–9, előnyösen 7,0–7,5; koncentrációja 0,01–0,2 mol/l, előnyösen 0,05–0,1 mol/l közötti.

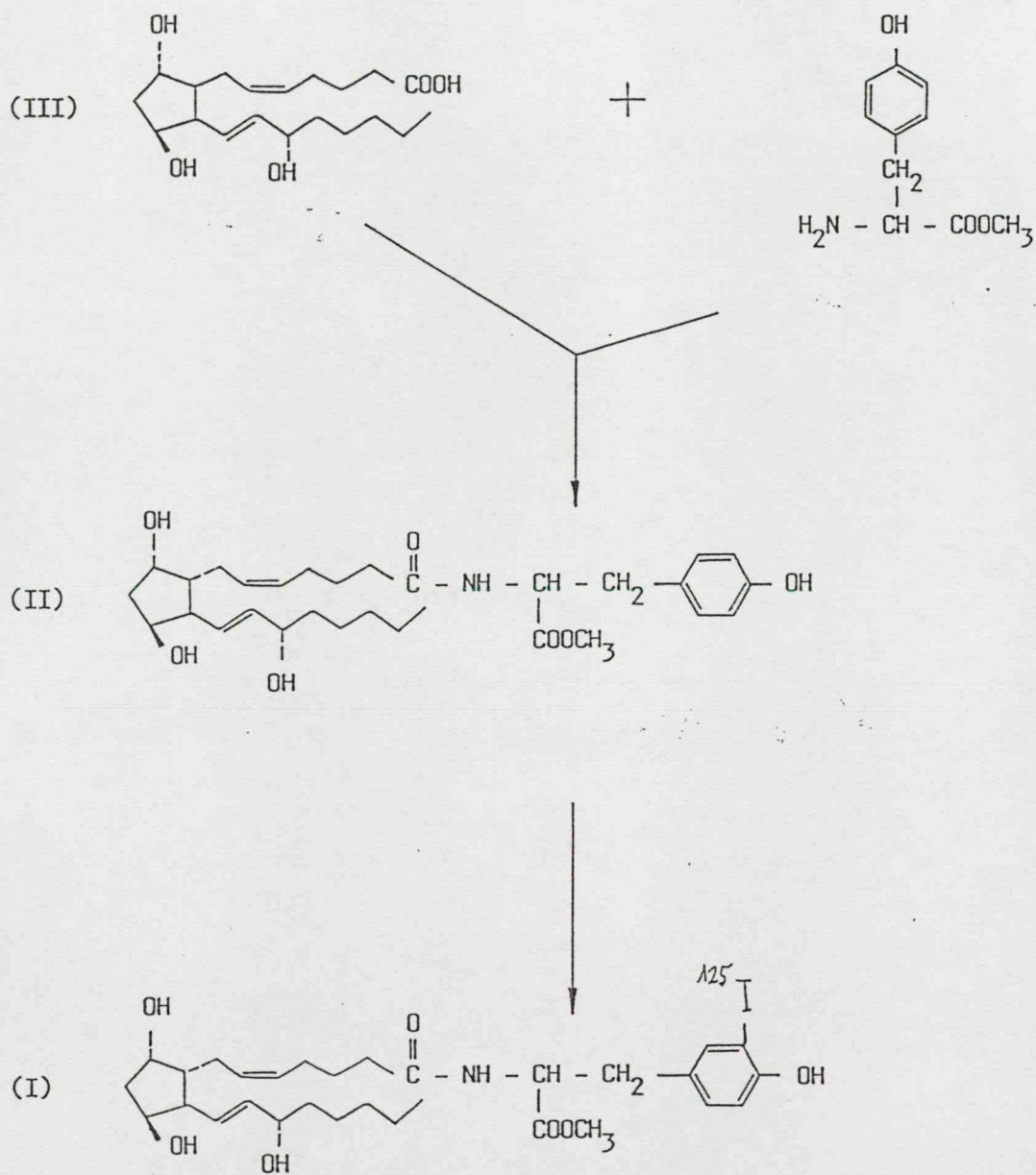
5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás,

azzal jellemezve, hogy reakcióidőnek egy és ötven, előnyösen tizenöt és huszonnégy óra közötti időtartamot, reakcióhőmérsékletnek pedig nulla és negyven Celsius-fok közötti hőmérsékletet alkalmazunk.

6. Eljárás (I) képletű ^{125}I - $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-TME előállítására, *azzal jellemezve*, hogy (II) képletű $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-TME-t puffertolt közegben jodid ionokból elektrofil jódot képező reagens, előnyösen para-toluol-szulfoklóramin-nátriumsó jelenlétében Na^{125}I -dal reagáltatjuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) képletű terméket a (II) képletű $9\alpha,11\beta$ -PGF₂-TME-től a fajlagos aktivitás csökkenése nélkül, kromatográfiás módszerrel választjuk el.

5 8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) képletű célvegyület előállításához $9\alpha,11\beta$ -PGF₂, tirozin-metilészter és 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid vizes tetrahidrofuránban történő reagáltatásával előállított (II) 10 képletű reakciótermékből indulunk ki.



Mucha I: Eljárás 9-deoxi- δ 9,12-13,14-dihidro-prosztaglandin D2 (Delta12-PGJ2) tartalom radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jód-125 izotóppal jelzett radioligandum előállítására. Hung. Pat. 208746, 1994 június 14, bejelentés 1991 szeptember 18.

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) Lajstromszám:

208 746 B

(21) A bejelentés száma: 2996/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 09. 18.

(51) Int. Cl.⁵

G 01 N 33/88

G 01 N 33/60

A 61 K 49/00

(40) A közzététel napja: 1993. 08. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 12. 28. SZKV 93/12

(72) Feltaláló:

dr. Mucha István, Budapest (HU)

(73) Szabadalmas:

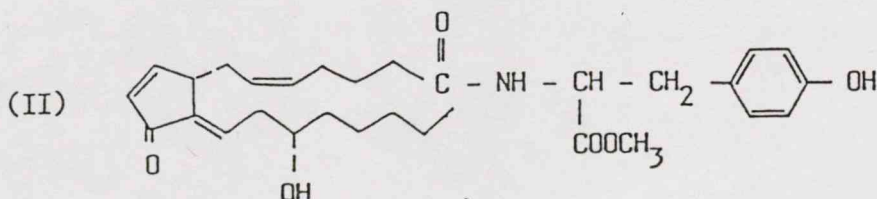
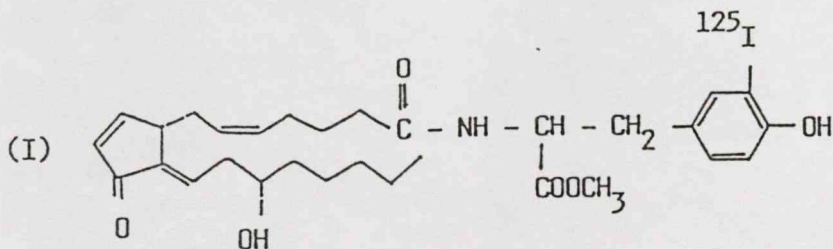
Izotóp Intézet Kft., Budapest (HU)

(54) **Eljárás 9-deoxi- $\delta^{9,12,13,14}$ -dihidro-proszttaglandin D₂(delta¹²-PGJ₂)
tartalom radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jód-125
izotóppal jelzett radioligandum előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány megjavítja a közegminták δ^{12} -PGJ₂ tartalmának radioimmun meghatározását annak révén, hogy ehhez az antigén-antitest kötésen alapuló immunokémiai reakcióhoz a találmány szerint kedvező feltételek között előállítható új szerkezetű radioligandot, (I) általános képletű, jód-125 izotóppal jelzett δ^{12} -PGJ₂-monojódtirozin-metilésztert alkalmazunk,

amelynek fajlagos aktivitása kiemelkedően magas, és ezáltal a meghatározás érzékenysége néhány tized pikogram. A találmány szerint az (I) képletű radioligandot úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű δ^{12} -PGJ₂-tirozin-metilésztert nagy fajlagos aktivitású Na¹²⁵I-dal reagáltatjuk.



A találmány tárgya eljárás biológiai minták δ^{12} -PGJ₂ koncentrációjának radioimmunológiai meghatározására, melynek során megmérjük jód-125 izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású δ^{12} -PGJ₂ származék, mint nyomjelző anyag (továbbiakban: radioligandum vagy tracer) specifikus antitesthez való kötődését ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú standard δ^{12} -PGJ₂ oldatok és a meghatározandó minták jelenlétében, majd a standardokhoz tartozó kötészváltozások ismeretében a mintákhoz tartozó kötészváltozásokból kiszámítjuk azok hatóanyagtartalmát.

A találmány szerint ebben az immunokémiai reakcióban tracerként olyan, egyes proszttaglandin típusokra már korábban sikerrel alkalmazott radioligandumokkal analóg szerkezetű származékot használunk, amely a találmány tárgyát képező proszttaglandin típusra még nem ismert.

A találmány tárgya továbbá ezen új szerkezetű radioligand előállítására szolgáló eljárás.

Ismert, hogy a proszttaglandin D₂ (PGD₂) részben kémiai, részben enzimatis úton vízvesztéssel olyan ciklopentenon szerkezetű származékokká alakul át, amelyek közös tulajdonsága, hogy a daganatos sejtek növekedését erősen gátolják, azaz citosztatikus hatásúak (Cancer Research 46:3538, 1986; Cancer Chemotherapy: Challenges for the Future. Vol. 2, Excerpta Medica, Tokyo, 1987, 91–98. oldal). Ezen vegyületcsoport egyik fontos képviselője a 9-deoxi- $\delta^{9,12}$ -13,14-dihidro-PGD₂, más néven δ^{12} -PGJ₂, amely a PGD₂-ből keletkezik szérumfehérjék hatására (J. Biol. Chem. 258:11713, 1983; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1317, 1984). Szöveti koncentrációja igen alacsony, egyrészt azért, mert az endogén PGD₂-nek csak igen kis hányada alakul át δ^{12} -PGJ₂-vé (J. Biol. Chem. 263:16619, 1988), másrészt azért is, mert a keletkezett δ^{12} -PGJ₂-t a sejtmag megkötii, így a testfolyadékokba csak kis hányada kerül (Adv. Prosta. Thromb. Leuk. Res. Vol. 17, Raven Press, New York, 1987, 972–975. oldal). Mindezek miatt megfelelő pontosságú mérése csak igen érzékeny módszer alkalmazásával lehetséges.

Kis koncentrációjú bioaktív anyagok gyors, olcsó, kellő érzékenységgű és megfelelő pontosságú meghatározására leggyakrabban antigén-antitest kötésen alapuló immunokémiai módszereket használnak, amelyeknek leginkább elterjedt változata a radioimmunoassay (RIA). Az eljárás lényegében radioizotópos nyomjelzés, amelynek kulcsreagense a mérendő molekula kellően magas fajlagos aktivitású radioizotóppal jelzett formája (tracer). Valamennyi gyakorlati követelményt figyelembe véve a radioimmun meghatározásokhoz két radioizotóp jön számításba, az egyik a hidrogén béta-sugárzó izotópja, a trícium, a másik a 125-ös tömegszámú, gamma-sugárzó jódiotóp.

A δ^{12} -PGJ₂ radioimmun meghatározására alkalmas RIA-készlet kereskedelmi forgalomban nem kapható, és a szakirodalomból is csupán egy olyan közlemény ismeretes, amelyben tracerként tríciummal jelzett δ^{12} -PGJ₂-t alkalmaztak (Eicosanoids 1:111, 1988).

A tríciummal jelzett tracer előnye, hogy az izotóp

viszonylag hosszú felezési ideje alapján (12 év) a tracer gyakorlatilag stabilnak tekinthető, így az ezen alapuló RIA-k pontossága, reprodukálhatósága általában igen jó. Az elérhető fajlagos aktivitás (prostanoidok esetében elméletileg nagyobb mint 200 Ci/mmol) általában megfelelő érzékenységet biztosít. Hátránya azonban, hogy a tracer előállítása egyedi, soklépéses kémiai – radiokémiai szintézist igényel, és a trícium mérése költséges és munkaigényes.

Számos kismolekulájú bioaktív anyag, így a proszttaglandinok esetében is, a tríciummal jelzett tracer helyett sikerrel alkalmaznak olyan radioligandumokat, amelyek az alpmolekulához kötött funkciók csoporton jód-125 izotópot tartalmaznak. (Eur. J. Clin. Invest. 5:311, 1975; Biochim. Biophys. Acta 431:139, 1976; Anal. Biochem. 87:343, 1978; Prosta. Med. 4:399, 1980; Prostaglandins 16:277, 1978; Adv. Prosta. Thromb. Res. 6:167, 1980; Izotóptechnika 22:190, 1979; J. Chromatography 189:433, 1980; Mucha István: Kandidátusi értekezés 1985.)

A jód-125-tel jelzett tracer alkalmazásának nagy előnye, hogy nem magát az alpmolekulát kell jelzett formában előállítani, hanem egy mindössze kétlépéses egyszerű szintézissel jutunk a tracerhez. További lényeges előny, hogy az így nyert tracer fajlagos aktivitása a tríciummal jelzett tracerének akár tízszerese is lehet, és ezáltal a meghatározás érzékenysége jelentősen növelhető. A jód-125 izotóp alkalmazása ugyanakkor gazdaságos is, mivel mérés technikája gyorsabb, egyszerűbb, és olcsóbb, és a radioimmun meghatározáshoz szükséges specifikus antitest igénye is lényegesen kevesebb.

A jód-125 izotóppal jelzett tracer felhasználásának gyakorlati hátránya, hogy az izotóp felezési ideje rövid, és a vele való műveletek sugárveszélye nagyobb a tríciuménál.

A teljesség kedvéért meg kell említeni, hogy a radioizotópokra épülő RIA módszer számos esetben eredményesen helyettesíthető nem-radioizotópos eljárással is. Ennek egyik változatában, az enzim-immunoassay-ben, a radioaktív tracer helyett enzimekkel jelölt molekulákat alkalmaznak. A δ^{12} -PGJ₂ esetében ugyanaz a munkacsoport, amely a tríciummal jelzett traceren alapuló RIA-t kidolgozta, ilyen, enzim-immuno-assay-t is kifejlesztett (J. Biol. Chem. 263:16619, 1988). Ennek segítségével a tríciumos módszerhez képest jelentős érzékenységnövekedést értek el; így pl. az 50%-os kötés-gátláshoz tartozó koncentráció, az ún. IC₅₀ érték a tríciumos RIA esetében 150 pikogram, míg az enzimikus módszerénél 20 pikogram volt.

A találmány szerinti eljárás kidolgozásához fontos kiindulópont volt, hogy az enzimikus módszerrel kapott fenti érzékenység tapasztalatunk szerint – mint azt számos, eddig kidolgozott RIA módszerünk bizonyítja – a jód-125 izotóp alkalmazásával is többnyire nehézség nélkül elérhető, sőt megfelelő feltételek mellett jelentősen növelhető is.

Mindezekre figyelemmel a találmány célja olyan RIA eljárás kidolgozása, mellyel a δ^{12} -PGJ₂ koncentrációja egyszerűen, pontosan és az ismert eljárásnál

nagyobb érzékenységgel határozható meg hagyományos radioimmun módszerrel, de trícium helyett jódt-125 izotóppal jelzett tracer felhasználásával. A találmány további célja az ehhez szükséges új típusú, a szakirodalomban nem ismert, jódt-125 izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású δ^{12} -PGJ₂-monojód-tirozin-metilészter származék előállítására szolgáló eljárás kidolgozása.

A találmány alapja az a felismerés, hogy egyéb kismolekulájú anyagokkal – így különböző prosztataglandinokkal is – analóg módon, a δ^{12} -PGJ₂ radioimmun meghatározása is lehetséges jódt-125 izotóp felhasználásával, ha az alapmolekulához tirozin-metilészter csoportot kapcsolunk és ezt mint prosztetikus csoportot jódt-125 izotóppal szelektíven jelöljük. Az eljárás feltétele, hogy rendelkezünk a módszerhez szükséges alkalmas titerű, a δ^{12} -PGJ₂-re és annak jódt-125 izotóppal jelzett származékára egyaránt megfelelő affinitású specifikus antitesttel, valamint elegendően nagy fajlagos aktivitású jódt-125-tel jelzett tracerrel.

A találmány tárgya tehát biológiai minták δ^{12} -PGJ₂ koncentrációjának radio-immunológiai meghatározása, mely az ismert eljárástól abban különbözik, hogy tríciummal jelzett tracer helyett jódt-125-tel jelzett, nagy fajlagos aktivitású δ^{12} -PGJ₂-monojód-tirozin-metilésztert alkalmazunk radioaktív nyomjelző anyagként.

Ennek során úgy járunk el, hogy megmérjük a tracernek specifikus antitesttel való kötődését ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú standard oldatok, valamint a mérendő minták jelenlétében. Az így kapott értékekből az ismeretlen minták által okozott kötésváltozásokhoz tartozó δ^{12} -PGJ₂ koncentrációkat kiszámítjuk.

A találmány szerint a mérést úgy végezzük, hogy a mérendő biológiai mintákból a hatóanyagot megfelelő módszerrel kivonjuk, majd a traceret, a hígítási sorozat szerint különböző mennyiségű standard δ^{12} -PGJ₂-t, illetve a mérendő mintákat specifikus antitesttel reagáltatjuk, majd az antitesthez kötött, ill. nem kötött frakciókat elválasztjuk, és mérjük a kötött tracer radioaktivitását. Az így kapott értékekből az ismeretlen minták által okozott kötésváltozásokhoz tartozó hatóanyag-koncentrációkat kiszámítjuk.

Általában 10 000 és 60 000, előnyösen 20 000 és 40 000 cpm közötti beütésszámú tracert alkalmazunk, amelyet célszerűen pufferben oldunk.

A puffer előnyösen 0,1% zselatint tartalmazó 0,01–0,2 mólos, 7,4 pH-jú foszfát-puffer.

Az oldat konkrét összetételétől függően az inkubációs hőmérséklet 0 és 40 °C közötti, az inkubáció időtartama 1 és 40, előnyösen 3 és 20 óra között változik.

A specifikus antitest célszerűen magas titerű, megfelelően magas (10^9 – 10^{10} M) affinitási együtthatóval rendelkező anti- δ^{12} -PGJ₂ anti-plazma. Az antiplazmát hordozó-fehérjéhez kötött immunogén ellen nyulakban termeltetjük. Immunogén anyagként nemcsak magát a δ^{12} -PGJ₂-t alkalmazhatjuk, hanem célszerűen PGD₂-t is. Erre az ad lehetőséget, hogy a PGD₂ az immunizált állatban nagy mértékben δ^{12} -PGJ₂-vé alakul át, ezért a keletkezett antitestek gyakran jobban kötik a δ^{12} -PGJ₂-t,

mint magát a PGD₂-t. Az antiplazmát olyan hígításban alkalmazzuk, amely a standard δ^{12} -PGJ₂-t nem tartalmazó mintában a tracer 20–80, előnyösen 40–50%-át képes megkötni.

A tracer kötött és szabad frakcióinak elválasztására előnyösen 1% csontszén szuszpenziót használunk, melyet előnyösen 0,5% dextránt tartalmazó 0,01 mólos foszfát-pufferrel (pH 7,4) készítünk. A csontszén a szabad radioligandumot megköti, és a centrifugálással kapott felülúszó tartalmazza az antitesthez kötött tracert, melynek radioaktivitását szcintillációs módszerrel mérjük.

A találmány szerinti eljárás igen lényeges előnye, hogy alkalmazásával nagyon alacsony kimutatási határ érhető el; 29 független mérésből kapott statisztikai adatok alapján a legkisebb kimutatható dózis 0,377 pg (a relatív szórás 36%), míg az 50%-os tracer-kiszorításhoz tartozó koncentráció – az IC₅₀ érték – 4,59 pg (a relatív szórás 20,2%). Összehasonlítva ezen értékeket a korábban említett szakirodalmi adatokkal, megállapítható, hogy a találmány szerinti eljárás alkalmazásával a tríciumos radioimmun meghatározáshoz képest több mint harmincszoros, de az érzékeny enzim-immunassay-hez képest is mintegy négyszeres érzékenységnövekedés érhető el.

A minél nagyobb érzékenység elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt kulcsfontosságú, mert az érzékenység növekedésének arányában csökkenthető a meghatározáshoz szükséges mintatérfogó is. Ez a δ^{12} -PGJ₂ esetében azért különösen is fontos, mivel annak természetes szöveti koncentrációja olyan alacsony, hogy más, kevésbé érzékeny módszer alkalmazásakor túlságosan nagy térfogatú biológiai mintára van szükség elegendő hatóanyag kinyeréséhez. Ez nemcsak a meghatározás költségeit növeli jelentősen, hanem korlátozza számos olyan szövettípus kísérleti felhasználását, amelyek a kívánt térfogatban nem is gyűjthetők össze (pl. kisméretű laboratóriumi állatok vérmintái. stb.). A nagy mintatérfogó elvi hátránya, hogy a nagyobb térfogattal együtt nemcsak a mérendő hatóanyag, hanem a szennyező anyagok mennyisége is arányosan növekszik, és ezáltal romlik a meghatározás specifitása. Ennek kiküszöbölése további tisztítási műveletek alkalmazását igényelheti, és ez újabb jelentős többletköltséggel és munka-ráfordítással járhat. A találmány szerinti eljárás alkalmazásával mindezen hátrányok a lehetséges minimumra csökkenthetők.

A találmány tárgya továbbá eljárás a radioimmun meghatározáshoz szükséges (I) képletű, nagy fajlagos aktivitású, jódt-125 izotóppal jelzett δ^{12} -PGJ₂-jódtirozin-metilészter (δ^{12} -PGJ₂-TME-¹²⁵I) előállítására.

A találmány szerint az (I) képletű radioligandot úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű δ^{12} -PGJ₂-TME származékot előnyösen nagy fajlagos aktivitású, (kb. 2000 Ci/mmol; 74 TBq/mmol) Na¹²⁵I-dal reagáltatjuk célszerűen klóramin-T (para-toluol-szulfoklóramin-nátriumsó) reagens jelenlétében pufferolt közegben (előnyösen 7 fölötti pH értéken) rövid (10–200 másodperc), előnyösen 30–60 másodperc reakcióidővel, úgy, hogy a (II) képletű δ^{12} -PGJ₂-TME származékot a

Na¹²⁵I-hoz képest 20–200, előnyösen 30–50-szeres molarányban alkalmazzuk, és a reakcióidőt úgy szabályozzuk, hogy megfelelő időpontban a rendszerben klóramin-T hatására képződő reakcióképes oxidált jód-ot nátrium-metabiszulfít hozzáadásával jodid ionná redukáljuk. Az (I) képletű célvegyület szintéziséhez célszerűen foszfát puffert alkalmazunk, a (II) képletű anyagot célszerűen etilalkoholos oldatban adjuk a reakcióelegyhez oly módon, hogy az etanol végkoncentrációja a 20%-ot ne haladja meg. Az (I) képletű célvegyület előállításának legfontosabb lépése az előállítani kívánt monojódszarmazék elválasztása az egyéb jódjelzett származékoktól, valamint a reakció befejeződése után a nagy kiindulási mólfelesleg miatt még mindig nagy feleslegben lévő (II) képletű kiindulási anyagtól. Erre a találmány szerint célszerűen oszlop-kromatográfiát alkalmazunk, melyet úgy végzünk, hogy a reakcióelegyet Sephadex LH-20 oszlopra felvisszük, és növekvő etanol koncentrációjú etanol: nátrium-citrát pH 4,0) kétkomponensű oldószerelleggyel eluáljuk a különböző jódjelzett származékokat, miközben az effluens radioaktivitását folyamatosan mérjük, és az ezzel arányos jelet regisztráló készülékkel rögzítjük.

A találmány szerint célszerűen a következő oldószereket alkalmazzuk: tisztá citrát puffert (0,2 mólos, pH 4,0), majd 1 mólos citrát (pH 4,0) és etanol 4:1, és 3:1 arányú elegye, ahol a tisztá végterméket az utóbbi frakcióban kapjuk meg. Az oldószerek szükséges térfogata az aktuális, és az elválasztás közben folyamatosan regisztrált elúciós profil és a képződött jelzett vegyületek összetételének (arányának) függvénye, általában az első eluensből 50–100 ml-t, a másodikból 30–60 ml-t, a harmadikból 15–25 ml-t alkalmazunk.

Külön előnye a találmány szerinti eljárásnak, hogy az alkalmazott apoláros dextrán gélen a jódjelzett származékok adszorpciós készsége jelentősen meghaladja a kiindulási (II) képletű inaktív anyagét, ily módon az (I) képletű célvegyület – amelyet még hatásos jódbeépülés mellett is jelentős mennyiségű (II) képletű kiindulási anyag szennyez – teljes biztonsággal választható el, és ezzel a találmány szerinti radioimmun meghatározáshoz szükséges magas fajlagos aktivitás biztosítható.

A (II) képletű vegyületet a (III) képletű δ^{12} -PGJ₂ és tirozin-metilészter reakciójával állítjuk elő oly módon, hogy a δ^{12} -PGJ₂-t 1–5, előnyösen 2–3 molarányú tirozin-metilészterrel reagáltatjuk, 1–5, előnyösen 2–3 molarányú 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid reagens jelenlétében, célszerűen vizes tetrahydrofuránban, 0–50 °C-on, előnyösen szobahőmérsékleten, 3–40, előnyösen 20–24 óra időtartamig. Az oldószert vákuum-desztillációval eltávolítjuk, a maradékot célszerűen etil-acetátban oldjuk, majd az etil-acetátos oldatból híg savas extrakcióval, célszerűen 0,1 n sósavval kimossuk a változatlan tirozin-metilésztert, híg lúgos, célszerűen 0,1 n NaOH-os extrakcióval pedig az el nem reagált (III) képletű vegyületet.

A terméket célszerűen vékonyréteg-kromatográfiás úton tisztítjuk, célszerűen olyan szilikagél rétegen, amely fluoreszcens indikátort tartalmaz, a kifejlesztő

oldószerelgy pedig célszerűen kloroform : metanol : víz 120 : 10 : 10 : 1 térfogatarányú elegye. A terméket 254 nm-es IV-fénnyel megvilágítva mutatjuk ki.

A találmányt a továbbiakban részletesebben példák keretében magyarázzuk, amelyekre a találmány természetesen nem korlátozódik.

1. példa

A jódjelzéshez használt (II) képletű köztitermék előállítása

1 mg (2,97 mikromól) (III) képletű δ^{12} -PGJ₂-t és 1,66 mg (9,3 mikromól) 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid-ot és 2,1 mg (11 mikromól) tirozin-metilésztert egyszerre bemérünk, hozzáadunk 100 mikroliter desztillált tetrahydrofuránt és 20 mikroliter desztillált vizet. Az elegyet szobahőfokon 24 órán kevertetjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, a maradékot 30 ml etil-acetátban feloldjuk, és rázóüvegsérbe öntjük. Ezt az oldatot sorrendben 3×2 ml 0,1 n sósavval, 3×2 ml vízzel, 3×2 ml 0,1 n nátrium-hidroxiddal és 3×3 ml vízzel összerázzuk. Minden összerázás után a vizes fázist elválasztjuk és elöntjük. Az utolsó mosás után az etil-acetátos oldatot forgóbepárló készüléken (Büchi, Svájci gyártmány) vákuumban bepároljuk. A maradék fehér, kristályos anyagot 100 mikroliter etil-alkoholban oldjuk, majd 0,25×200×100 mm méretű Kieselgel 60 F 254 (Merck, NSZK gyártmány) szilikagél rétegre 3 cm-es sávban felvisszük, és kloroform : metanol : víz 120 : 10 : 1 térfogatarányú elegybe helyezve a kromatogramot kifejlesztjük. Kifejlesztés után a réteget hideg levegővel szárítjuk, majd 254 nm hullámhosszú ultraibolya fénnyel megvilágítva a foltokat láthatóvá tesszük. A 0,356 Rf értékű folt helyén a réteget lekaparjuk, 10 ml etil-alkoholt teszünk rá, és 1 óra várakozás után üvegszűrőn szűrjük. A szűrőn lévő gél 2×5 ml etil-alkohollal mossuk, az alkoholos oldatokat egyesítjük, forgóbepárlón szárazra pároljuk, és mérjük a termék súlyát, majd etil-alkohollal törzsoldatot készítünk belőle.

A kapott (II) képletű termék tömege a kromatográfias tisztítás után 198 mikrogram, ami 13% kitermelésnek felel meg.

2. példa

Az (I) képletű céltermék előállítása

Az 1. példa szerint kapott δ^{12} -PGJ₂-TME származék 100 mikrogram/ml koncentrációjú etanolos oldatából 30 mikrolitert (6,5 nmol) 1 ml-es talpas Eppendorf csőbe pipettázunk, hozzáadunk 100 mikroliter 50 mM foszfát puffert, (pH 7,4) és 57 MBq radioaktivitású hordozómentes Na¹²⁵I oldatot (MTA Izotópkutató Intézete terméke). Az elegyet összerázzuk, majd 50 mikroliter, 7 mg/ml koncentrációjú nátrium-metabiszulfit oldatot előre felszivunk a reakció leállításához. Az elegyhez ezután hozzápipettázunk 25 mikroliter 4,8 mg/ml koncentrációjú klóramin-T reagens oldatot, az elegyet összerázzuk, és pontosan 60 másodperc múlva az előre elkészített nátrium-metabiszulfit oldat hozzáadásával a reakciót befagyaszttjuk.

Az elegyet ezután oszlopkromatográfiás módszerrel választjuk el, a következőképpen:

Sephadex LH-20 (Pharmacia, Svéd gyártmány) gélt desztillált vízben 24 órát duzzasztunk, majd 20×1 cm méretű, alul elvezető, felül bevezető csővel ellátott üvegcsőbe töltjük, alkalmas oldószeradagoló perisztaltikus pumpával (LKB, Svéd gyártmány) összekapcsoljuk, mintegy 10 percig egyensúlyba hozzuk 0,2 mólos citromsavval (pH 4,0) mintegy 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az így előkészített hordozóra a reakcióelegyet felvisszük, és az elúciót az előző oldószerrel kezdjük, majd 1 mólos citromsav (pH 4) és etil-alkohol 4 : 1 arányú elegyével folytatjuk, végül 3 : 2 arányú eleggyel gyűjtjük a kívánt terméket a detektáló készülékben megjelenő csúcs szerint. Az eluens radioaktivitását folyamatosan detektáljuk oly módon, hogy az oszlop elvezető csővét ólommal árnyékolt NaI(Tl) szcintillációs kristály (Gamma gyártmány) előtt vezetjük el, a kristályt pedig számláló berendezéssel (Gamma gyártmány) és vonalíróval (Gamma gyártmány) kötjük össze. Az egyes effluenseket mérőhengerbe gyűjtjük, az első eluenséből 50–100 ml-t, a másodikból 30–60 ml-t alkalmazunk, míg a kívánt terméket összesen 15–26 ml elegyben oldjuk le, de a radioimmun meghatározáshoz csak a csúcs közepének megfelelő mintegy 5 ml-es frakciót használjuk fel. Ennek radioaktivitása 13,8 MBq, ami 24,2% radioaktív hozamnak felel meg. A hozam természetesen az elérhetőnél lényegesen alacsonyabb, mivel a terméknek csak egy része kerül gyűjtésre.

3. példa

Emberi vizelet δ^{12} -PGJ₂ koncentrációjának radioimmun meghatározása nyúl vénás vérből

A meghatározáshoz az alanyokból 24 órán át gyűjtjük a vizeletet, amelyet a gyűjtés befejeztéig hűtőszekrényben tartunk. A vizelet térfogatát megmérjük, majd 10 ml mintát veszünk belőle, amelyet 2 mólos citromsav oldattal pH 3-ra megsavanyítunk. Ezután az oldatot injekciós fecskendőbe pipettázuk, és átnyomjuk a fecskendőre helyezett ún. „fordított fázisi” szilikagél tartalmazó műanyag patronon (Amprep C₂, Amersham, Anglia gyártmány), amelyet előzőleg a gyártó cég használati utasítása szerint előkészítettünk. A tölteten ezután átnyomunk 5 ml desztillált vizet, 5 ml 10%-os etilalkoholt és 5 ml n-hexánt. Ezeket a folyadékokat elöntjük, majd a patronon 5 ml hexán : etiléter 3 : 7 térfogatarányú elegyet nyomunk át, amelyet műanyag kémcsőbe gyűjtünk. Az oldószert nitrogén gázáramban szobahőmérsékleten bepároljuk, a maradékot pedig RIA puffertben oldjuk.

7,5 ng/ml koncentrációjú δ^{12} -PGJ₂ törzsoldatból hígítási sorozatot készítünk úgy, hogy 1–1 ml térfogatú mintákat kapjunk, melyek hatóanyag-koncentrációja 6–19–56–167–500 pg/ml. Sorszámozott műanyag kémcsővekbe automata pipettával a standard és a minta oldatokból 100–100 mikrolitert bemérünk, majd hozzáadunk 100 mikroliter ¹²⁵I- δ^{12} -PGJ₂-TME tracer, amelynek radioaktivitása 30 000–40 000 cpm/100 mikroliter, amely a tracer 30–60%-át képes megkötni. A nem-specifikus kötődés (NSB) meghatározására to-

vábbi kémcsővekbe a tracerhez csak tiszta pufferoldatot teszünk, míg a specifikus kötés (B_0/T) és a teljes radioaktivitás meghatározására a standard oldatok helyett is tiszta pufferoldatot adunk az antitesthez. A térfogat valamennyi kémcsőben a művelet végén 0,4 ml lesz. A tracer és az antitest oldásához, valamint a térfogatkiegészítéshez szükséges pufferként 50 mM koncentrációjú, 7,4 pH-jú, 0,1% zselatint tartalmazó foszfát puffert használunk.

A kémcsővek tartalmát néhány másodpercig kevergetjük, majd lezárjuk, és hűtőszekrényben 4 °C körüli hőmérsékleten egy éjszakán át állni hagyjuk. Ezután a TC csövek kivételével minden kémcsőbe folyamatos keverés közben 2-3 perc alatt bepipettázunk 0,5 ml – 0,5% Dextran T-70-et (Pharmacia, Svédország) és 1% csontszén (Norit-A, Serva, NSZK) tartalmazó – 0,01 mólos, 7,4 pH-jú foszfát puffer szuszpenziót, a TC csővekbe pedig azonos térfogatú RIA puffert. A csöveket az előbbieket szerint kevertetjük, majd 0 °C-on, 10 percig, 2000 xg gyorsulással centrifugáljuk, és a felülszökből alkalmas mérőcsővekbe 0,5–0,5 ml-t pipettázunk, majd mérjük ezek radioaktivitását NaI(Tl) szcintillációs kristállyal ellátott automatikus mintaváltó berendezésben (pl. Minigamma, LKB, Svédország gyártmány). A számítást a radioimmun meghatározásokban szokásos módon végezzük. A fentiekből a szakember felmérheti a találmány előnyeit a technika állásához képest. Az előnyökből kiemeljük:

A találmány szerinti eljárás segítségével elkerülhető a tríciummal jelzett δ^{12} -PGJ₂ előállításához szükséges soklépéses szintézissor alkalmazása, ehelyett kedvező feltételek között előállíthatunk olyan radioligandumot, nevezetesen az (I) képletű ¹²⁵I- δ^{12} -PGJ₂-TME származékot, amelynek nagy moláris aktivitása biztosítja a δ^{12} -PGJ₂ koncentrációjának az eddig használt tríciummal jelzett tracerhez képest mintegy tízszer érzékenyebb radioimmunológiai meghatározását.

A nagyobb érzékenység eredményeképpen kisebb térfogatú biológiai minta elegendő a meghatározáshoz, és ez nemcsak gazdaságos, de elvileg is előnyös a minél jobb specificitás elérése szempontjából.

Az eljárás a szakirodalomból ismert nem-radioizotópos, enzim-immunoanalitikai eljáráshoz képest is előnyös, mert a radioimmun meghatározásból adódó általános előnyöket (egyszerűség, olcsóság, tartósabb reagensek stb.) úgy őrzi meg, hogy egyúttal nagyobb érzékenységet is biztosít.

Az alkalmazott adszorpciós oszlopkromatográfiás elválasztástechnika biztosítja a jódjelzett céltémeknek a kiindulási anyagtól való tökéletes elválasztását, és ezáltal a céltermék fajlagos aktivitása nem csökken a tisztítás során.

Az alkalmazott elválasztástechnika fontos gyakorlati előnye, hogy a radiojódos jelzés során nagyobb aktivitás-mennyiségeknél is biztosítja a nyitott radioizotópokkal végzett műveletekre előírt sugárvédelmet, és minimálisra csökkenti a radioaktív inkorporáció veszélyét.

Mindezek alapján a találmány szerinti új, jód-125 izotóppal jelzett radioligand alkalmazása olyan új δ^{12} -

PGJ₂ radioimmunoassay megvalósítását teszi lehetővé, amely miközben megőrzi a tríciummal jelzett tracet alkalmazó assay specificitását, egyúttal jelentősen növeli annak érzékenységét is. A találmány szerinti módszer felhasználásával a mérés technika is egyszerűbbé, gyorsabbá és olcsóbbá válik, és jelentősen csökkenthető a méréshez szükséges antiszérum mennyisége is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás biológiai szövetminta δ^{12} -PGJ₂ tartalmának radioimmunológiai reakción alapuló meghatározására ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú δ^{12} -PGJ₂ és a biológiai szövetminta jelenlétében, amelynek során megmérjük nagy fajlagos aktivitású radioaktív nyomjelző vegyületnek (továbbiakban tracer) specifikus antitesttel való kötődését, és az ismert mennyiségű δ^{12} -PGJ₂ hígítási sorozat által okozott kötés változás alapján számítjuk a mindenkor szövetminta hatóanyag tartalmát, *azzal jellemezve*, hogy tracerként új típusú, (I) képletű $^{125}\text{I}-\delta^{12}$ -PGJ₂-monojódtirozin-metilészter származékot alkalmazunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy háromezer és százezer, előnyösen harmincezer és ötvenezer cpm beütésszámú tracet alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként nyúlban, előnyösen szarvasmarha-szérumalbuminhoz kötött δ^{12} -PGJ₂,

vagy célszerűen PGD₂ mint immunogén anyag ellen keletkezett anti- δ^{12} -PGJ₂ antiplazmát használunk, olyan hígításban, amely a standard δ^{12} -PGJ₂-t nem tartalmazó mintában a tracer 20–70, előnyösen 40–60%-át képes megkötni.

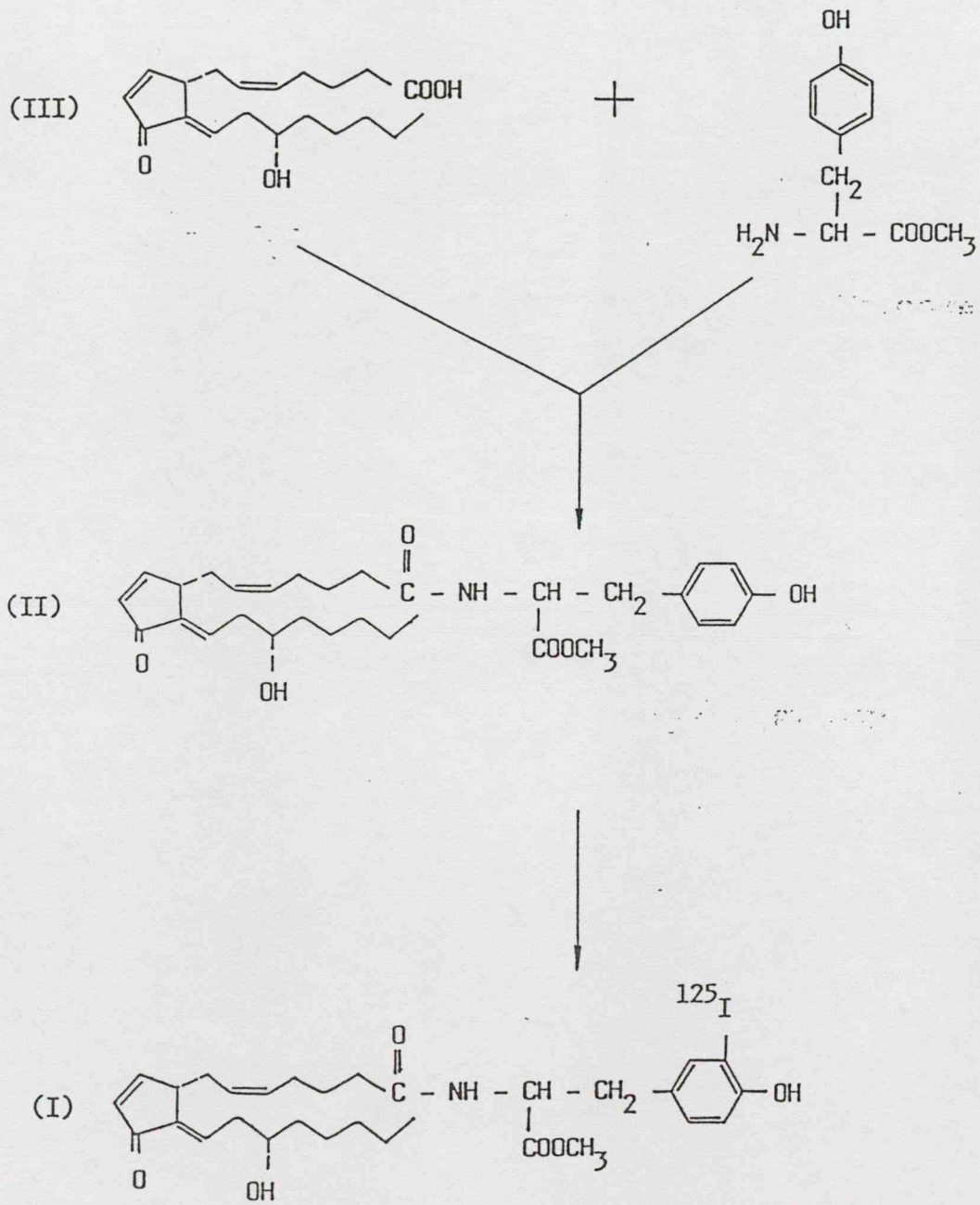
5 4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pufferoldatként előnyösen zselatint tartalmazó foszfát puffert alkalmazunk, melynek pH-ja 6–9, előnyösen 7,0–7,5; koncentrációja 0,01–10 0,2 mó/l, előnyösen 0,05–0,1 mó/l közötti.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy reakcióidőnek egy és ötven, előnyösen tizenöt és huszonnégy óra közötti időtartamot, reakcióhőmérsékletnek pedig nulla és negyven 15 Celsius-fok közötti hőmérsékletet alkalmazunk.

6. Eljárás (I) képletű $^{125}\text{I}-\delta^{12}$ -PGJ₂-TME előállítására, *azzal jellemezve*, hogy (II) képletű δ^{12} -PGJ₂-TME-t pufferolt közegben, jodid ionokból elektrofil jódot képező reagens, előnyösen para-toluolszulfoklóramin-nátriumsó jelenlétében Na¹²⁵I-dal reagáltatjuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) képletű terméket a (II) képletű δ^{12} -PGJ₂-TME-től a fajlagos aktivitás csökkenése nélkül, kromatográfias módszerrel választjuk el.

8. A 6. vagy a 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) képletű célvegyület előállításához δ^{12} -PGJ₂, tirozin-metilészter és 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid vizes tetrahidrofuránban történő reagáltatásával előállított (II) képletű reakciótermékből indulunk ki.



Riutta A, Mucha I, Vapaatalo H: Solid-Phase Extraction of Urinary 11-dehydrothromboxane B2 for Reliable Determination with Radioimmunoassay. *Analytical Biochemistry*, 202: 299-305, 1992

Solid-Phase Extraction of Urinary 11-Dehydrothromboxane B₂ for Reliable Determination with Radioimmunoassay¹

Asko Riutta,* István Mucha,† and Heikki Vapaatalo*

*Department of Biomedical Sciences, University of Tampere, P.O. Box 607, SF-33101, Tampere, Finland; and †Institute of Isotopes, P.O. Box 77, H-1525, Budapest, Hungary

Received October 10, 1991

In this paper we elaborate a one-step procedure for the selective extraction of urinary 11-dehydrothromboxane B₂ on octylsilyl silica cartridges for reliable determination with radioimmunoassay. The immunoreactivity profile of nonselectively extracted urine after HPLC separation showed that as much as 70% of the total 11-dehydrothromboxane B₂ immunoreactivity comigrates with polar interfering material. Its amount could be considerably decreased using acetonitrile:water (18:82, v/v) as wash solvent before elution of 11-dehydrothromboxane B₂ from the cartridge. Alternatively, very high immunoreactive purity was achieved without the preceding wash step by selective elution of the analyte with dichloromethane:hexane (70:30). After both optimized steps in the extraction procedure were combined, immunoreactivity was found only in HPLC fractions corresponding to the retention volume of authentic 11-dehydrothromboxane B₂. The homogeneity of this immunoreactivity was confirmed by two-step HPLC separation. A significant correlation of values was observed between samples measured after extraction and those measured after subsequent HPLC purification. A high correlation was also found with concentrations determined by radioimmunoassay using four different antisera. The values of 24 h excretion of 11-dehydrothromboxane B₂ in 10 male volunteers (595 ± 114 ng/g creatinine, mean ± SD) as well as the inhibitory effect of acetylsalicylic acid (80 ± 13%) closely correspond with those reported in the literature. This selective extraction procedure provides a high validity in radioimmunoassay without

requiring any further purification step. © 1992 Academic Press, Inc.

Thromboxane A₂ (TXA₂),² a cyclo-oxygenase product of arachidonic acid, has a potent proaggregatory activity on platelets and a contractile activity on vascular smooth muscle (1,2). It is assumed to be of functional importance in cardiovascular diseases in man (3,4). The short half-life of TXA₂ (1) has precluded its direct quantitation in biological fluids. Therefore its production has been monitored by measuring thromboxane B₂ (TXB₂), the chemically stable hydration product of TXA₂. However, urinary TXB₂ originates predominantly from kidney under physiological conditions (5,6) and does not reflect the total body production of TXA₂.

Two major metabolic pathways of TXB₂ have been described (7): one involves β-oxidation, which results in 2,3-dinor-TXB₂, and the other involves dehydrogenation of the hemiacetal group at C-11 to produce a series of metabolites, including 11-dehydrothromboxane B₂ (11-dehydro-TXB₂) with a δ-lactone ring structure. 11-Dehydro-TXB₂ is now established as the most abundant breakdown product of TXB₂, and it is considered the index metabolite of systemic TXA₂ production (8,9). Since dehydrogenation at C-11 converts the thromboxane ring into the δ-lactone form of dicarboxylic acid, 11-dehydro-TXB₂ can exist in an acyclic (open) and a closed (lactone) ring form, with different physicochemical properties. At pH near neutrality, both forms exist in equilibrium. Lactonization is favored by low pH,

¹ Part of this work was presented at the 7th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence, Italy, May 28-June 1, 1990.

² Abbreviations used: TXA₂, thromboxane A₂; TXB₂, thromboxane B₂; SPE, solid-phase extraction; RIA, radioimmunoassay; ASA, acetylsalicylic acid.

while high pH favors hydrolysis into a more polar, open-form structure (10).

Analytical procedures based on immunoassay or gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) have been employed in the quantitation of 11-dehydro-TXB₂ in biological fluids (8-17,20). The commonest method used for the (pre)purification of prostanoids from biological fluids before quantitation is solid-phase extraction (SPE) on alkyl silica cartridges. In its original form (18), the procedure was optimized on octadecyl silica sorbent to achieve an efficient group separation of prostanoids, but it was not recommended as a substitute for a subsequent chromatographic purification to isolate a particular analyte. However, as suggested by Powell (18), the specificity of SPE for certain prostanoids can be increased by using a more selective elution sequence. This has not been utilized in the case of 11-dehydro-TXB₂. Nonselective SPE with only slight modifications of the original procedure, followed by one or more chromatographic steps, has been used before quantitation of 11-dehydro-TXB₂ by either GC-MS or immunoassay (8,9,12,13,15,17). Such multistep purifications are time-consuming and often result in a considerable loss of sample yield. As an alternative to alkyl silica sorbent Lorenz *et al.* (14) reported the use of phenylboronate columns for the extraction of urinary 11-dehydro-TXB₂, without the need of other chromatographic steps prior to GC-MS.

In the present study we elaborated a one-step SPE procedure for the extraction of urinary 11-dehydro-TXB₂ on octyl silica cartridges. This method provides good recovery and high immunoreactive purity of the urinary 11-dehydro-TXB₂ extract without the requirement of any additional chromatographic step(s) prior to radioimmunoassay (RIA).

EXPERIMENTAL

Materials

Nonlabeled prostanoids were obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). 11-[³H]Dehydro-TXB₂ (6.47 TBq/mmol) was purchased from Amersham International (Amersham, Buckinghamshire, England).

HPLC-grade solvents were from J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, Holland). Amprep C₈ (100 mg of sorbent) silica cartridges were from Amersham International and Sep-Pak C₁₈ (400 mg of sorbent) silica cartridges from Waters Associates (Milford, MA).

Antisera

Antisera AI and AII for 11-dehydro-TXB₂ were prepared as described previously (19). Antiserum AIII was obtained from 11-dehydro-TXB₂ assay kit of DuPont (Boston, MA), and antiserum AIV was a generous gift

from Dr. Carlo Patrono (Catholic University, Rome, Italy).

Sample Collection

Twenty-four-hour urine was collected from 10 healthy male volunteers who had abstained from any drug intake during the preceding 2 weeks. An additional 10 24-h urine samples were received from the same volunteers after a 3-day acetylsalicylic acid (ASA) treatment (0.5 g/day). Aliquots from urine were frozen and stored at -20°C until extraction. Pooled normal and ASA urines (before and after ASA treatment, respectively) were prepared by combining identical aliquots of individual samples.

Extraction Procedure

After thawing, the urine samples were vortexed and centrifuged (3000g, 5 min); 10,000 dpm of 11-[³H]dehydro-TXB₂ open form was added to 1-2 ml of supernatant, its pH was set to 2 with HCl, and it was incubated at room temperature (20-22°C) for 4 h. The open form of 11-[³H]dehydro-TXB₂ was prepared by an overnight incubation (16-20 h) of commercial 11-[³H]dehydro-TXB₂ in 0.063 M ammonium bicarbonate (10). All solvent mixtures used in the extraction procedure were prepared daily. C₈ silica cartridge was conditioned with 2 ml of methanol followed by 4 ml of water. Urine was diluted with water (1:5) and applied to the cartridge. The cartridge was rinsed with 3 ml of water followed by a wash with 3 ml of organic solvent:water mixture, and then rinsed with 3 ml of water and 3 ml of *n*-hexane. 11-Dehydro-TXB₂ was eluted with 3 ml of pure organic solvent or solvent mixtures. When the extraction was made on a C₁₈ silica cartridge, the volumes of solvents were 10 ml in each step. The fraction of final eluent was collected and evaporated under nitrogen at room temperature, and the dry residue was stored at -20°C until further analysis.

High-Pressure Liquid Chromatography

The HPLC system consisted of an LKB 2249 pump, an LKB fraction collector FRAC-100, an LKB 2141 variable-wavelength monitor (LKB, Bromma, Sweden), a Hewlett-Packard 3380S recorder (Hewlett-Packard, Avondale, PA), a Rheodyne Model 7125 injector (Rheodyne, Cotati, CA) equipped with a 100-μl loop, and a PRP-1 (4.1 × 150 mm, 5-μm spherical particles) column (Hamilton, Reno, NV). Samples were dissolved in the mobile phase containing 0.01% trifluoroacetic acid, and isocratic separation was carried out in a water:acetonitrile (75:25, v/v) solvent system at a flow rate of 0.7 ml/min. The retention volumes of prostanoids were determined by their uv absorbance at 196 nm.

Radioimmunoassay

RIA was carried out as described previously (19), using an 11-[¹²⁵I]dehydro-TXB₂-tyrosine methyl ester tracer and polyethylene glycol separation. Unless otherwise indicated, antiserum AI was used throughout the experiments.

RESULTS

11-Dehydro-TXB₂ Concentrations after Nonselective Extraction

Pooled normal and ASA urine was extracted on C₁₈ and C₈ silica cartridges. Ethanol:water (15:85, v/v) was used as wash solvent before the final elution of 11-dehydro-TXB₂ with ethyl acetate. The recovery of 11-[³H]dehydro-TXB₂ after extraction was 90 ± 5% (mean ± SD) from C₁₈ and 93 ± 7% from C₈ cartridge (n = 4). The measured apparent 11-dehydro-TXB₂ concentrations after C₁₈ and C₈ SPE of normal urine were 2600 ± 250 and 2300 ± 200 pg/ml, respectively (n = 4). In ASA urine, the apparent 11-dehydro-TXB₂ concentrations were, after C₁₈ SPE, 1750 ± 265 and, after C₈ SPE, 1625 ± 224 pg/mL (n = 4).

The method blank did not contribute to the apparent concentrations of urine samples, as indicated by the values found with water as sample, which were under the detection limit (2 pg) of the assay.

The Nature of Immunoreactivity after Nonselective Extraction

After the nonselective SPE procedure (above), the urinary extracts were subjected to HPLC separation. Immunoreactivity and radioactivity were measured from each fraction collected during the run (0–30 min). All radioactivity was detected in fractions comigrating with the lactone form of authentic 11-dehydro-TXB₂, indicating that the endogenous analyte was in pure lactone form during extraction. Figure 1 shows the immunoreactivity profile of pooled normal urine after extraction on a C₈ silica cartridge using ethyl acetate as eluent. No immunoreactivity was found in the area of low polar material, as demonstrated by the lack of any immunoreactivity eluted after the lactone form. Most (70%) of the immunoreactivity was found in the area of polar material overlapping with the authentic open form of 11-dehydro-TXB₂; only 30% coeluted with the lactone form.

When urine was extracted on C₁₈ silica cartridge using methylformiate (instead of ethyl acetate) as eluent and subjected to immuno-HPLC, 75% of the immunoreactivity was found in the area of polar material.

Effect of Wash Solvents on the Immunoreactive 11-Dehydro-TXB₂ Concentration

The difference in polarity between nonspecific immunoreactive material and the lactone form of 11-dehy-

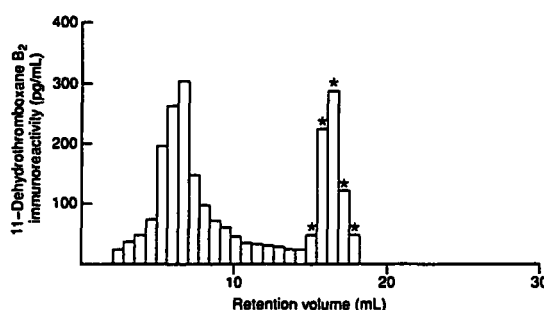


FIG. 1. Immunochromatogram of pooled normal urine after nonselective extraction on a C₈ silica cartridge. The sample was injected in a mobile phase containing 0.01% trifluoroacetic acid, and isocratic separation was made in a water:acetonitrile (75:25, v/v) solvent system delivered at a flow rate of 0.7 ml/min. Fractions were collected for every 1 min (0–30 min), and the concentration of 11-dehydro-TXB₂ was measured by RIA in each fraction. The retention volume of 11-[³H]dehydro-TXB₂ added in urine is indicated by an asterisk. The retention volumes (ml) of prostanoids were 2,3-dinor-6-keto-prostaglandin F_{1α}, 3.1–5.7; 6-keto-prostaglandin F_{1α}, 3.9–4.9; 2,3-dinor-thromboxane B₂, 3.7–5.7; 11-dehydrothromboxane B₂ (open form), 4.9–7.7; prostaglandin F_{2α}, 9.1–10.5; prostaglandin E₂, 13.2–15.7; 11-dehydrothromboxane B₂ (lactone form), 14.7–18.2; prostaglandin D₂, 15.6–17.5.

dro-TXB₂ encouraged us to attempt separation of the specific analyte in pure immunoreactive form using SPE alone. For these optimization experiments, the C₈ silica cartridge was used. Various water-miscible organic solvents (acetone, acetonitrile, ethanol, isopropanol, methanol) were tested for efficacy in the removal of polar interfering substances. The eluent strength of solvents was modified by addition of water in such a range of concentrations that the loss of 11-[³H]dehydro-TXB₂ did not exceed 20%. The material retained on the sorbent after wash was eluted with methanol and immunoreactivity measured. The values were compared with those obtained with methanol elution without a preceding wash step.

By decreasing the volume ratio of water in the wash solvent, the amount of colored material in the methanol fraction was diminished with a concomitant decrease of recovery for 11-dehydro-TXB₂. The highest decrease (corrected with recovery) in the 11-dehydro-TXB₂ concentration measured after wash was achieved with 18% acetonitrile (Table 1). This was the preferred wash solvent in the complete extraction procedure.

Effect of Elution Solvents on the Immunoreactive 11-Dehydro-TXB₂ Concentration

Urine was adsorbed onto a C₈ silica cartridge and 11-dehydro-TXB₂ was eluted with various organic solvents of different selectivity properties, without employing wash solvent before elution. The elution strength of solvents was modified by adding *n*-hexane in such a ratio

TABLE 1
Effect of Wash Solvents on the Immunoreactive
11-Dehydro-TXB₂ Concentration

Solvent	Volume (%)	Concentration (pg/ml)	Recovery (%)
No		2973	100.0
Methanol	20	2000	80.0
	18	1975	82.0
	15	2005	88.6
Ethanol	25	2211	83.2
	20	2125	89.4
	15	2143	96.1
<i>i</i> -Propanol	20	2027	85.5
	15	1972	94.3
Acetone	25	1819	84.7
	15	2083	93.2
Acetonitrile	21	1599	85.6
	18	1434	90.3
	15	1699	95.3

Note. One milliliter of pooled normal urine, containing 10,000 dpm of 11-³H]dehydro-TXB₂ as a marker of extraction efficiency, was extracted on a C₈ silica cartridge. The solvents used were mixed with water in the volume ratio listed. After the wash step carried out with aqueous solvent mixtures, pure methanol was applied on the cartridge. 11-Dehydro-TXB₂-like concentration (composed of 11-dehydro-TXB₂ + nonspecific interfering material and corrected with the value of recovered 11-³H]dehydro-TXB₂) and radioactivity were measured from the methanol eluate. The mean values of duplicate extractions are indicated.

that the recovery of 11-³H]dehydro-TXB₂ exceeded 80%. The degree of coelution of interfering material was characterized by measuring immunoreactivity in the eluates. For comparison, 11-dehydro-TXB₂ concentration was measured from a sample eluted with 100% methanol (Table 2).

The lowest immunoreactive 11-dehydro-TXB₂ concentration was observed by the use of dichloromethane:hexane (70:30, v/v); this was preferred as the eluent in the complete extraction procedure. This solvent was also easy to evaporate, giving rise to pale or colorless residue. By contrast, the residue obtained after nonselective extraction was usually of a deep yellow color.

Evaluation of Selective Extraction by Immuno-HPLC

The extract of pooled normal urine obtained with the selective extraction method, i.e., 18% acetonitrile as wash and dichloromethane:hexane (70:30) as elution solvent, was subjected to HPLC and immunoreactivity in each fraction (0–30 min) measured by RIA. Only one immunoreactive peak, comigrating with the lactone form of 11-dehydro-TXB₂, was found (Fig. 2, top). When the extraction was carried out without the 18% acetonitrile wash step, an identical immunochromatogram was obtained.

In order to evaluate the homogeneity of the immunoreactive peak, fractions of the lactone form were collected, treated with 0.063 M ammonium bicarbonate overnight, and separated by HPLC for a second time. Both the radioactivity and the immunoreactivity comigrated with the open form of 11-dehydro-TXB₂ (Fig. 2, bottom). There was a high correlation ($r > 0.99$, $n = 4$) between concentrations measured after the first (lactone form collected) and the second HPLC separation (open form collected).

Further evaluation was made by comparison of selective extraction and HPLC purification. Urine samples collected from male volunteers before ($n = 7$) and after ($n = 3$) ASA treatment were extracted and aliquots of eluates were subjected to HPLC separation. A highly significant correlation ($r > 0.99$) of values was observed between samples measured after extraction and after subsequent HPLC purification (Fig. 3).

Accuracy and Reproducibility

Urine was spiked with different amounts (100–400 pg) of 11-dehydro-TXB₂. After extraction followed by RIA, the measured values were estimated by fitting a regression line for measured (y) versus added (x) amounts (Fig. 4). A highly significant correlation ($r > 0.99$) was obtained. The endogenous level in the urine pool as calculated from the intercept of the regression

TABLE 2
Effect of Elution Solvents on the Immunoreactive
11-Dehydro-TXB₂ Concentration

Solvent	Volume (%)	Concentration (pg/ml)	Recovery (%)
Methanol	100	3124	100.0
Acetone	50	2334	95.2
	40	2386	90.1
	30	2400	85.0
Ethyl acetate	50	2258	87.2
	40	2309	80.0
Diethyl ether	90	2158	90.2
	80	1650	86.7
	70	1037	82.3
Chloroform	90	2212	88.9
	80	1518	85.4
	70	1204	81.2
Dichloromethane	90	1109	90.2
	80	948	84.4
	70	817	81.6

Note. One milliliter of pooled normal urine, containing 10,000 dpm of 11-³H]dehydro-TXB₂ as a marker of extraction efficiency, was extracted on a C₈ silica cartridge. The solvents used were mixed with hexane in the volume ratio listed and applied on the cartridge. 11-Dehydro-TXB₂-like concentration (composed of 11-dehydro-TXB₂ + nonspecific interfering material and corrected with the value of recovered 11-³H]dehydro-TXB₂) and radioactivity were measured from the eluate. The mean values of duplicate extractions are indicated.

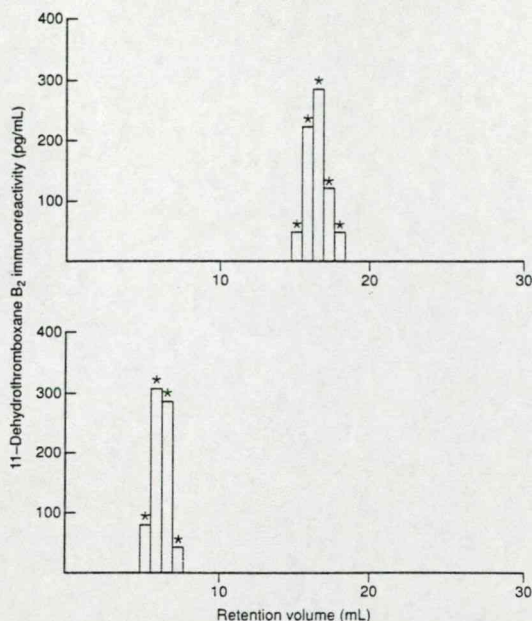


FIG. 2. Immunochromatogram of pooled normal urine after selective extraction on a C₈ silica cartridge. The sample was injected in a mobile phase containing 0.01% trifluoroacetic acid, and isocratic separation was made in a water:acetonitrile (75:25, v/v) solvent system delivered at a flow rate of 0.7 ml/min. Fractions were collected for every 1 min (0–30 min), and the concentration of 11-dehydro-TXB₂ was measured by RIA in each fraction. Immunoreactivity (top) was found only in fractions comigrating with the lactone form of tritiated 11-dehydro-TXB₂ (asterisks). These fractions were combined, treated with 0.063 M ammonium bicarbonate overnight, and separated for a second time. Immunoreactivity (bottom) was found only in fractions comigrating with the open form of tritiated 11-dehydro-TXB₂ (asterisks). The retention volumes of other prostanoids are listed in the legend to Fig. 1.

line (739 pg/ml) showed a strong correlation with the value measured from the unspiked sample (737 pg/ml).

The recovery for 11-dehydro-TXB₂ was very reproducible, as demonstrated by the extraction efficiency of $77 \pm 5\%$ (mean \pm SD, $n = 50$) determined with the tritiated open form of 11-dehydro-TXB₂ added to urine as recovery marker. The reproducibility of the selective procedure was further evaluated in 20 independent assays by extracting urine samples containing low (100 pg/ml), medium (300 pg/ml), and high (800 pg/ml) concentrations of 11-dehydro-TXB₂. The coefficient of variation was 7.0, 4.8, and 10.5% for low, medium, and high concentrations, respectively.

Evaluation of Selective Extraction by the Use of Multiple Antisera and by the Effect of Acetylsalicylic Acid

Urine samples from eight volunteers, before and after ASA treatment, were extracted and 11-dehydro-TXB₂

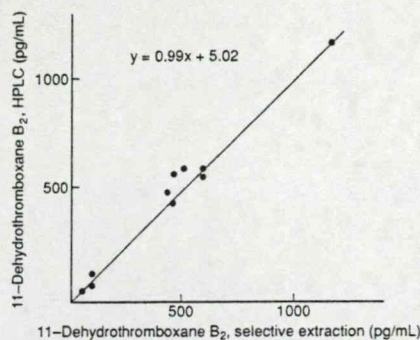


FIG. 3. Correlation of 11-dehydrothromboxane B₂ values obtained in RIA after selective extraction of urine on a C₈ silica cartridge with or without subsequent HPLC purification.

concentration measured by RIA using four different antisera (Table 3). The correlation coefficient calculated for each pair of series was >0.99 for each pair of data.

The efficacy of selective extraction to result in a specific immunoreactivity was demonstrated by the appearance of an inhibitory effect of ASA treatment in measured concentrations. In contrast to the apparently high contents of 11-dehydro-TXB₂ found in pooled ASA urine after nonselective extraction (1625 ± 224 pg/ml, see under *11-Dehydro-TXB₂ Concentrations after Nonselective Extraction*), the respective value measured after selective extraction was 52 ± 5 pg/ml ($n = 4$). In certain ASA urine samples the figures measured were as low as 10 pg/ml. In the 10 male volunteers, the 24-h excretion rates of 11-dehydro-TXB₂, before and after ASA treatment, were 595 ± 114 and 100 ± 60 ng/g creatinine, respectively. The inhibitory effect of ASA on 11-dehydro-TXB₂ excretion, calculated for each individual volunteer, was $80 \pm 13\%$. The values obtained after extraction without the wash step were 615 ± 120 and 90 ± 55

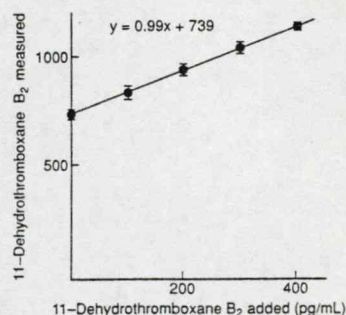


FIG. 4. Linearity obtained with known amounts of standard 11-dehydro-TXB₂ in pooled normal urine. Mean values (\pm SD) of three extractions on a C₈ silica cartridge are indicated. The y-intercept of the regression line represents the endogenous concentration of 11-dehydro-TXB₂.

TABLE 3

Urinary 11-Dehydro-TXB₂ Concentrations (ng/g creatinine) after Selective Extraction Measured by RIA Using Four Different Antisera

Sample	AI	AII	AIII	AIV
1	1381	1200	1359	1350
2	874	956	978	900
3	334	384	372	300
4	232	211	169	250
5	112	118	89	100
6	104	132	88	110
7	37	50	22	30
8	20	30	24	22

Note. Eight urine samples (four normal, four ASA urine) were extracted on a C₂ silica cartridge and each sample was measured with four (AI-AIV) different antisera. Extractions were made in duplicate, and the mean values are presented. The correlation coefficient calculated for each pair of series is >0.99 for each pair of data (AI vs AII, AI vs AIII, AI vs AIV, etc.).

ng/g creatinine before and after ASA treatment, respectively.

DISCUSSION

In a recent study on the reliability of direct RIA for the determination of urinary 11-dehydro-TXB₂, we demonstrated that approximately 70% of total immunoreactivity resulted from the presence of material other than 11-dehydro-TXB₂ (19), necessitating an efficient purification of human urine before RIA. Since published (18), solid-phase extraction of prostanoids from biological fluids on octadecyl silica cartridges has been widely used. However, additional chromatographic steps have been required before quantitation of urinary 11-dehydro-TXB₂ (8,9,13,15,17) because of its unsatisfactory cleanup with the nonselective SPE method on C₁₈ silica cartridges.

Effective purification of urinary 11-dehydro-TXB₂ prior to analysis by GC-MS has been achieved on phenylboronate columns (14). However, GC-MS analysis itself includes an extra sample preparation step during gas chromatography. The physicochemical background underlying extraction procedures on various sorbents can also be different; thus the efficiency of purification evaluated by a certain type of quantitation method will not necessarily parallel that evaluated by another method. Regardless, the suitability of the phenylboronate method for the purification of urinary 11-dehydro-TXB₂ prior to analysis by RIA has not been reported in the literature. It might be of interest to test vice versa the efficiencies of the phenylboronate and the C₈ purification procedures presented here as sample preparation steps prior to RIA and GC-MS, respectively.

Immunoaffinity extraction has also been used for the purification of 11-dehydro-TXB₂ prior to analysis by

RIA or GC-MS (16,20). However, the preparation of immunoaffinity columns is laborious and relatively expensive, and a quite large and constant supply of antibody is needed. Hayashi *et al.* (16) produced a specific and sensitive monoclonal antibody for 11-dehydro-TXB₂ that they used in immunoaffinity purification and in RIA. On the other hand, both the production and the purification of monoclonal antibody are laborious and time-consuming. In another paper, Barrow *et al.* (20) used a polyclonal antibody of low specificity for 11-dehydro-TXB₂ in immunoaffinity chromatography and GC-MS in quantitation. The authors regard, in contrast to RIA, the low specificity of the antibody as an advantage in immunoaffinity purification, since cross-reactivity with metabolites of interest makes simultaneous extraction possible.

To avoid these different limitations our aim was to elaborate an inexpensive, simple, and selective procedure for the extraction of urinary 11-dehydro-TXB₂ on commonly used alkyl silica cartridges for reliable determination with RIA. In pilot experiments the extraction procedure employed by Powell (18) was tested on both C₁₈ and C₈ silica cartridges. The immuno-HPLC profile revealed that the main part of immunoreactivity consisted of nonspecific interfering material of polar nature. However, as suggested by Powell (18), when the SPE procedure is aimed at the isolation of a certain prostanoid rather than prostanoids as a group, a more selective elution pattern can be employed. This was the approach used in the present study with special emphasis on the elimination of additional chromatographic purification step(s) before RIA. The different physicochemical properties of the two chemical forms of 11-dehydro-TXB₂ served as an important clue for the optimization studies on C₈ silica cartridges. We assumed, on the basis of the differences in polarity between interfering material and the lactone form of 11-dehydro-TXB₂, that the extraction of a specific analyte in lactone form enabled the use of solvents with a higher elution strength for considerable removal of polar nonspecific immunoreactive substances without remarkable loss of analyte. We also expected that removal of analyte in lactone form from the sorbent could be achieved by using solvents of elution strength lower than that required for the elution of analyte in open form.

The wash and elution steps optimized separately were combined in a complete extraction procedure that resulted in an apparently unique immunoreactive substance comigrating with authentic 11-dehydro-TXB₂. In fact, the optimized elution step alone resulted in a remarkable decrease in 11-dehydro-TXB₂-like immunoreactivity. Moreover, the immuno-HPLC profile obtained after extraction without the wash step was identical to that obtained after combined extraction. The extraction on the Bond-Elut C₈ silica cartridge (Bond-

Elut, Analytichem International, Harbor City) resulted in an identical immuno-HPLC chromatogram and in the same concentration of pooled normal and ASA urine as those measured after extraction on the Amprep C₈ cartridge (data not shown). These observations indicate that on C₈ silica, sorbent dichloromethane has a unique selectivity toward 11-dehydro-TXB₂; this is probably due to the contributions of various molecular forces to defining the interaction between solvent and solute molecules (21).

Despite the immunoreactive purity achieved with selective elution alone, the use of the wash step was not without benefit. As observed in the HPLC chromatogram, high amounts of uv-absorbing substances were coeluted with the specific analyte when elution was not preceded by the wash step (data not shown). Although these substances did not interfere with RIA applied in the present study, their removal would be advantageous when a less specific antibody or another type of quantitation method (e.g., GC-MS) is used.

The existence of 11-dehydro-TXB₂ in two equilibrium forms also offered an experimental tool to preclude the presence of nonspecific immunoreactive material (either prostanoids or nonprostanoids) in the eluate. When lactone form fractions were separated by HPLC for a second time after alkaline treatment, only one immunoreactive and radioactive peak corresponding to the open form was observed. Since the retention volumes of those prostanoids that comigrated with the lactone form in the first separation remained unchanged, their contribution to the immunoreactivity was precluded. Similarly, two-step HPLC validation made it highly unlikely that nonprostanoid substances comigrating with lactone form could interfere with 11-dehydro-TXB₂ immunoreactivity.

The reliability of selective extraction was supported by the good linearity obtained with known amounts of 11-dehydro-TXB₂ added and by the high reproducibility achieved in a wide range of analyte concentrations. Its validity was further evaluated by comparing the concentrations measured with four different antisera. The high correlations observed gave further proof that the selectivity achieved in the extraction, rather than the unique specificity of a particular antiserum, accounted for the homogeneous immunoreactivity found.

The substantial improvement in specificity was clearly demonstrated by the low concentrations measured in ASA urine samples. In keeping with the observation reported on the use of direct RIA (19), the inhibitory effect of ASA was hidden by a high ratio of nonspecific substances after the nonselective SPE procedure. The excretion rates of 11-dehydro-TXB₂, measured in 10 male volunteers before and after ASA treatment (595 ± 114 and 100 ± 60 ng/g creatinine, respectively) showed excellent correlation with those

measured after HPLC and were also in good agreement with those measured by GC-MS (9,14).

In conclusion, although the elaborated selective SPE procedure does not necessarily result in the isolation of analyte in a chemically pure form, the amount of contaminate in the final sample is low enough to allow a reliable subsequent quantitation of 11-dehydro-TXB₂ by RIA without an additional purification step.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Research Foundation of Tampere City, the Foundation of the University of Tampere, the Yrjö Jahnsson Foundation, and the Academy of Finland.

REFERENCES

1. Hamberg, M., Svensson, J., and Samuelsson, B. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2994-2998.
2. Ellis, E. F., Oelz, O., Roberts, L. J., II, Payne, N. A., Sweetman, B. J., Nies, A. S., and Oates, J. A. (1976) *Science* **193**, 1135-1137.
3. Fitzgerald, D. J., Roy, L., Catella, F., and FitzGerald, G. A. (1986) *N. Engl. J. Med.* **315**, 983-989.
4. Vesterqvist, O., Green, K., and Johnsson, H. (1987) *Thromb. Res.* **45**, 393-402.
5. Patrono, C., Ciabattoni, G., Patrignani, P., Filabozzi, P., Pinca, E., Satta, M. A., Van Dorne, D., Cinotti, G. A., Pugliese, E., Pierucci, A., and Simonetti, B. M. (1983) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **11**, 493-498.
6. Seyberth, H. W., Tulassay, T., Kühl, P. G., Soeding, K., Rascher, W., and Schweer, H. (1988) *Prostaglandins* **35**, 221-232.
7. Roberts, L. J., II, Sweetman, B. J., and Oates, J. A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8384-8393.
8. Schweer, H., Meese, C. O., Fürst, O., Kühl, P. G., and Seyberth, H. W. (1987) *Anal. Biochem.* **164**, 156-163.
9. Catella, F., and FitzGerald, G. A. (1987) *Thromb. Res.* **47**, 647-656.
10. Kumlin, M., and Granström, E. (1986) *Prostaglandins* **32**, 741-765.
11. Lawson, J. A., Patrono, C., Ciabattoni, G., and FitzGerald, G. A. (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 198-205.
12. Ciabattoni, G., Maclouf, J., Catella, F., FitzGerald, G. A., and Patrono, C. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **918**, 293-297.
13. Lecompte, T., Nicolas, P., Mamas, S., and Dray, F. (1987) *Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res.* **17**, 595-597.
14. Lorenz, R., Helmer, P., Uedelhoven, W., Zimmer, B., and Weber, P. C. (1989) *Prostaglandins* **38**, 157-170.
15. Uedelhoven, W. M., Meese, C. O., and Weber, P. C. (1989) *J. Chromatogr.* **497**, 1-16.
16. Hayashi, Y., Shono, F., Yamamoto, S., Takasaki, W., Nakagawa, A., Watanabe, K., Yamashita, K., and Miyazaki, H. (1990) *Anal. Biochem.* **187**, 151-159.
17. Lellouche, F., Fradin, A., FitzGerald, G., and Maclouf, J. (1990) *Prostaglandins* **40**, 297-310.
18. Powell, W. S. (1980) *Prostaglandins* **20**, 947-957.
19. Mucha, I., Riutta, A., and Vapaatalo, H. (1991) *Eicosanoids* **4**, 1-7.
20. Barrow, S. E., Ward, P. S., Sleightholm, M. A., Ritter, J. M., and Dollery, C. T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **993**, 121-127.
21. Bakalyar, S. R., McIlwrick, R., and Roggendorf, E. (1977) *J. Chromatogr.* **142**, 353-365.

Mucha I: Vazoaktív prosztanoidok meghatározása emberi vizeletben radioimmunoassay (RIA) módszerrel.
Immunkromatográfiás módszer alkalmazása az immunreaktivitás szerkezetének tanulmányozására.
Izotóptechnika, Diagnosztika 36(2): 33-41, 1993

Vazoaktív prosztanoidok meghatározása emberi vizeletben radioimmunoassay (RIA) módszerrel. Immunkromatográfiás módszer alkalmazása az immunreaktivitás szerkezetének tanulmányozására.

Mucha István

·Izotóp Intézet Kft., Budapest, Pf 77, 1525

A legfontosabb prosztanoidok, a prosztaciklin és a tromboxán bioszintézisének változásait a vizelet 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, illetve 2,3-dinor-TXB₂ és/vagy 11-dehidro-TXB₂ koncentrációjának meghatározásával jellemezhetjük. Normál férfi vizelet 6-keto-PGF_{1α}, tromboxán B₂ és 11-dehidro-TXB₂ immunreaktivitásának szilárd-fázisú extrakció után nagy nyomású folyadék-kromatográfiával kombinált radioimmunoassay vizsgálatából megállapítható, hogy a 6-keto-PGF_{1α} és a tromboxán B₂ immunreaktivitás jelentős mértékben a megfelelő dinor-metabolitokból (2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, illetve 2,3-dinor-TXB₂) ered. A RIA-hoz használt antiszérumok dinor-származékokkal mutatott magas keresztreaktivitása lehetővé teszi, hogy a dinor-metabolitokat az anyavegyületekre rendelkezésre álló 6-keto-PGF_{1α}, illetve tromboxán B₂ RIA készletekkel határozzuk meg. Ehhez a 6-keto-PGF_{1α}/2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} esetében a szilárd-fázisú extrakció után HPLC elválasztás szükséges, és a standardizálást 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}-val is el kell végezni. Ezzel szemben a tromboxán B₂/2,3-dinor-TXB₂ esetében sem HPLC elválasztásra, sem kétféle standardizálásra nincs szükség. A hagyományos módszer szerint extrahált vizelet 11-dehidro-TXB₂ immunreaktivitása rendkívül heterogén. Megfelelő szorbens és kellő szelektivitású mosó/eluáló oldószerkelet alkalmazásán alapuló szelektív szilárd-fázisú extrakciós mintaelőkészítési módszerrel azonban kromatográfiás tisztítás nélkül is egységes immunreaktivitás érhető el.

DETERMINATION OF VASOACTIVE PROSTANOIDS IN HUMAN URINE, USING SPECIFIC RADIOIMMUNOASSAY. APPLICATION OF IMMUNO-CHROMATOGRAPHY TO THE STUDY OF IMMUNOREACTIVITY PROFILES OBTAINED AFTER SOLID-PHASE EXTRACTION

Extrarenal production of prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ can be monitored by quantitation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, and 2,3-dinor-TXB₂/11-dehydro-TXB₂, respectively, the urinary index metabolites of the active species. Immunoreactivity profiles of these metabolites have been studied in 24-hour pooled normal human urine after solid-phase extraction (SPE) on C₂-silica mini-columns. Separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) followed by 6-keto-PGF_{1α} and thromboxane B₂ radioimmunoassay (RIA) revealed that a considerable (6-keto-PGF_{1α}) or major (thromboxane B₂) part of immunoreactivity was contributed by respective dinor-metabolites rather than by parent compounds themselves. When evaluated in terms of their cross-reactivities towards dinor-derivatives, anti-6-keto-PGF_{1α} and anti-thromboxane B₂ antisera were both demonstrated to be suitable for quantitation of dinor-metabolites and parent compounds (6-keto-PGF_{1α}/2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, and thromboxane B₂/2,3-dinor-TXB₂, resp.), using RIA systems of respective parent compounds. To achieve a reliable quantitation, 6-keto-PGF_{1α} and 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} should be separated by RP-HPLC, then assayed individually, using respective standard curves for each. By contrast, immunoreactive thromboxane B₂ is dominated by the contribution of 2,3-dinor-TXB₂, therefore chromatographic separation is not a prerequisite for reliable determination. Furthermore, the unique 100% cross reaction of thromboxane B₂ antisera with 2,3-dinor-TXB₂ makes the assay procedure very simple; precise quantities of both thromboxane B₂ and 2,3-dinor-TXB₂ can be obtained by using only one calibration curve with thromboxane B₂. As an alternative to 2,3-dinor-TXB₂, 11-dehydro-TXB₂ is suggested as another suitable urinary index metabolite that represents extrarenal thromboxane production. Although the commonly used SPE procedure resulted in a very heterogeneous 11-dehydro-TXB₂ immunoreactivity, the substitution of C₂ for C₈-minicolumns, combined with an optimized wash/elution pattern, enabled both reasonable recovery and homogeneous immunoreactivity to be achieved without chromatographic purification.

Bevezetés

A sejtmembránok foszfolipideiben kötött többszörösen telítetlen zsírsav, az arachidonsav (5,8,11,14-(cisz)-ejkozatetraénsav), a sejtet érő sokféle inger hatására felszabadul, és enzimatis úton különböző kémiai szerkezetű, változatos biológiai aktivitásokkal rendelkező vegyületekké, ejkozánoidokká alakul át. A lehetséges bioszintézis utak közül elsőként fölfedezett, és fontosságában ma is kiemelkedő egyik enzimatis lánc az ún. ciklo-oxigenáz út. Ennek során az arachidonsavból előbb endoperoxidok képződnek, majd ezekből mint közös prekursorokból specifikus szintetáz, enzimek közreműködésével prosztaglandinok és tromboxánok keletkeznek (1-5). A prosztanoidok szinte minden állati sejtben megtalálható, nagyhatású bioaktív anyagok. Biológiai szerepüket az biztosítja, hogy az élő szervezetben magasabb szerveződési szinten érvényesülő szabályozott egyensúly, a homeosztázis, elsődleges, sejt szintű szabályozó mechanizmusainak fontos láncszemei.

A magasabbrendű szervezetek homeosztázisának egyik alapvető összetevője a szív- és érrendszerrel kapcsolatos élettani funkciók szabályozása. Ez a folyamat igen sokféle elemi szabályozó mechanizmus bonyolult, érzékeny egyensúlyát feltételezi, ahol az egyes regulációs rendszerek kölcsönösen összefüggenek egymással. Ebbe a szabályozó rendszerbe illeszkednek azok az arachidonsav-metabolitok, amelyeket vazoaktív prosztanoidokként foglalunk össze. Biológiai szempontból legfontosabb két képviselőjük a tromboxán A_2 (TXA_2), valamint a prosztaciklin (PGI_2). Mindkét vegyület elsődleges támadáspontja azonos; a simaizmok és a vérlemezkék. Ezen keresztül hatnak a véráramlásra, vérkeringésre, vérnyomásra, stb. A két vegyület egymás antagonistája, és a TXA_2/PGI_2 egyensúly felborulása fontos szerepet játszik számos - a szív- és érrendszerrel kapcsolatos - emberi kórfolyamatban, így az érlemezésben, szívizom-infarktuszban, koszorúér-betegségben, alvadási rendellenességekben, terhességi magas vérnyomásban, cukorbetegségben, stb (6).

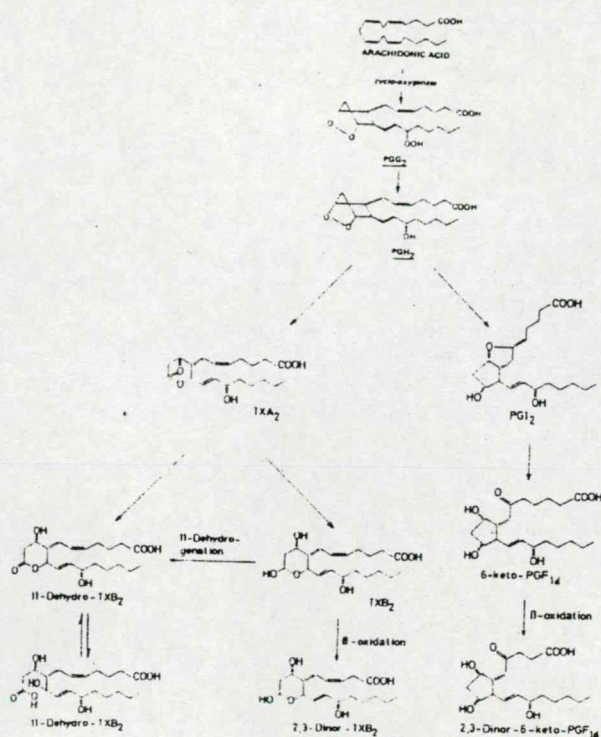
Mind a TXA_2 , mind a PGI_2 kémiaiilag bomlékony anyagok; vizes közegben rövid felezési idővel biológiaiilag inaktív termékekké hidrolizálnak. Kimutatásuk és mennyiségi meghatározásuk ezért nem a hatóanyag, hanem az elsődleges hidrolízis-termékek; a tromboxán B_2 (TXB_2), illetve 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ kimutatásával/mérésével történik. Mennyiségi meghatározásra mindmáig leggyakrabban használt eljárás a specifikus radioimmunoassay (RIA). Az elmúlt mintegy másfél évtized alatt több kutatócsoport - köztük magunk

is - dolgozott ki ilyen módszereket, és számos mérőkészlet kereskedelmi forgalomban is kapható.

A prosztanoidok biológiai szerepének vizsgálatára irányuló kísérletekben hosszú időn át a humán plazmában RIA módszerrel mért koncentrációkat a szervezetben zajló prosztanoid-bioszintézis mértékének tekintették. Napjainkra azonban általánosan elfogadott, hogy a plazmakoncentrációk sem a TXB_2 , sem a 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ esetében nem megfelelő indikátorai a hemosztázis szempontjából fontos ún. egész-test produkciónak. A számos elvi és módszertani ellenérv közül három külön is kiemelendő (7,8):

- (i) Az elsődleges hidrolízis-termékek maguk sem stabilisak, hanem enzimatis kaszkád-reakciókban gyorsan metabolizálódnak, így a keringésbe folyamatosan bekerülő aktív prosztanoidnak csak igen kis hányada található TXB_2 , illetve 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ formában.
- (ii) A prosztanoidok bioszintézise a vérvétel után "ex vivo" tovább folyik, és ennek mértéke többnyire jelentősen felülmúlja az "in vivo" bioszintézisét, ami a mérési eredmények hitelességét alapvetően megkérdőjelezi. Szélsőséges példaként említhető a vérlemezkék tromboxán bioszintézisének aktiválódása, amelynek következtében a vérszérumban a TXB_2 mennyisége a plazmában mért endogén mennyiség százezerszeresét is elérheti.
- (iii) A rendkívül alacsony plazmakoncentrációk, rossz jel-zaj viszony miatt fokozottan érvényesül a minta nem-specifikus és nem-immun eredetű zavaró hatása (matrix-hatás). Prosztanoidok esetében nem ritka, hogy ennek következtében a mért látszólagos immunreaktivitásnak csak elhanyagolható hányada származik magától a vizsgálandó anyagtól, a zömét egyéb komponensek (pl. fehérjék, lipidek, stb) okozzák.

Mіндеzen elvi és módszertani szempontok alapján a korszerű prosztanoid kutatásban általánosan elfogadott irányelv, hogy a tromboxán- és prosztaciklin-produkció monitorozása a vizeletben történik, az elsődleges hidrolízis-termékek helyett olyan enzimatis metabolitok mérésével, amelyek mennyisége bizonyítottan korrelál a szervezetben keletkezett hatóanyagok mennyiségével. A vizeletben természetesen maga a TXB_2 és 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ is megtalálható, ezek azonban a ma általánosan elfogadott álláspont szerint a veséből származnak, így az endogén bioszintézis (nem-vese eredetű, ún. "extrarenális" produkció) jellemzésére nem alkalmasak.



1. ábra

Prostaciklin és tromboxán keletkezése és metabolizmusa
Metabolic pathways of thromboxane and prostacyclin

A TXB₂ enzimatiszus metabolizmusának két fő útja ismert:

Béta-oxidáció, amelynek terméke a 2,3-dinor-TXB₂ (9).

Dehidrogenálódás, amelynek terméke a 11-dehidro-TXB₂ (10-12).

Mindkét metabolit megtalálható a vizeletben, és bármelyikük mennyisége az extrarenális tromboxán bioszintézis mennyiségi jellemzésére felhasználható. Módszertani jelentősége miatt megemlítendő, hogy a 11-dehidro-TXB₂-nek két egyensúlyi formája létezik, a savas pH a gyűrűs δ-lakton forma, míg a lúgos pH a nyitott, szabad sav forma keletkezésének kedvez (1. ábra).

A 6-keto-PGF_{1α} esetében a béta-oxidáció a meghatározó lebomlási út, így az extrarenális prostaciklin produkció a vizelet 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} mennyiségével jellemezhető (13).

A tárgyalt prosztanoidok keletkezését és átalakulásait az 1. ábra szemlélteti.

Bár a mennyiségi meghatározásra leggyakrabban RIA-t alkalmaznak, a korábbiakban már érintett speciális elvi és módszertani problémák miatt a prosztanoidok radioimmun analitikája különleges nehézségeket támaszt. A RIA elvéből következően az elméletileg tökéletes mérés feltétele, hogy a mérendő anyagot kémiai tisztaságban izoláljuk a biológiai mintából. Ezen alapelv figyelembe vétele a prosztanoidok esetében különösen fontos. Maradékalan érvényesítése azonban a mérést elfogadhatatlanul bonyolulttá és költségessé tenné, így a gyakorlatban követett eljárások mindig kompromisszumosak; a tisztítást csak addig a határig végezzük, amelynél - a kémiai tisztaságtól teljesen függetlenül - a kapott minta immunreaktivitás szempontjából homogénnek tekinthető. A prosztanoidok esetében elfogadható immunreaktív tisztaság eléréséhez rendszerint legalább extrakcióra, de igen gyakran kromatográfias tisztításra is szükség van. A korszerű kísérleti módszerek elsősorban szilárd-fázisú extrakciót (SPE) alkalmaznak, többnyire Powell módszerét (14), illetve annak valamely módosított változatát, míg a kromatográfias módszerek közül szinte egyeduralgó a fordított fázisú szilikagél szorbenseken végzett nagynyomású folyadék-kromatográfia (RP-HPLC) (7).

Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk,

- (i) milyen a TXB₂, a 11-dehidro-TXB₂ és a 6-keto-PGF_{1α} immunreaktivitás spektruma a szakirodalomban általánosan használt szilárd fázisú extrakciós mintaelőkészítés után, és ennek ismeretében megállapítsuk,
- (ii) alkalmasak-e, és hogyan, a munkacsoportunk által a korábbi években kidolgozott és kereskedelmi forgalomban is kapható TXB₂, 11-dehidro-TXB₂ és 6-keto-PGF_{1α} RIA készletek a tromboxán- és prostaciklin-metabolitok mérésére emberi vizeletben.

Anyagok és módszerek

Anyagok

Radioimmun meghatározáshoz az Izotóp Intézet Kft (illetve jogelődje, az MTA Izotópkutató Intézete) 6-keto-PGF_{1α} (RK-16), tromboxán B₂ (RK-17) és 11-dehidro-TXB₂ (RK-67) ¹²⁵I-RIA készleteit használtuk.

A tríciummal jelzett prosztaglandinok az Amersham International plc (Anglia), a nem-radioaktív 6-keto-PGF₁α és tromboxán B₂ az Upjohn Diagnostics (USA), a 11-dehidro-TXB₂, 2,3-dinor-6-keto-PGF₁α és 2,3-dinor-TXB₂ a Cayman Chemical Co. (USA) termékei voltak. A szilárd-fázisú extrakcióhoz használt minioszlopok (Bond-Elut C₂ és Bond-Elut C₈) a Varian Group Ltd (USA) termékei.

Szilárd-fázisú extrakció

A meghatározáshoz egészséges férfiakból 24 óras vizeletet gyűjtöttünk, és ezek azonos térfogataival keveréket készítettünk. A keverékből aliquot térfogatokat -20 °C-on fagyasztva tároltuk, és egy mintát csak egyszer felolvasztva használtunk. A vizeletmintákat 3000 g-vel 5 percig centrifugáltuk, majd 1 ml felülúszóhoz 5 - 10000 cpm tríciummal jelzett prosztanoidot adtunk, és ln sósavval pH 3-ra megsavanyítottuk. A mintát vízzel 1:5 térfogatarányban hígítottuk, majd az előzetesen 2 ml metanollal, és 4 ml vízzel előkezelt oszlopokon injekciós fecskendő segítségével kb. 2ml/perc sebességgel átnyomtuk. Az oszlopot ezután sorrendben 4 ml vízzel, 4 ml 10 %-os etanollal, 4 ml n-hexánnal mostuk, majd a prosztanoid frakciót 4 ml etil-acetáttal leoldottuk. Utóbbi oldatot szobahőmérsékleten nitrogén gázzal szárazra pároltuk, és a további vizsgálatokig -20 °C-on tároltuk.

11-dehidro-TXB₂ szelektív szilárd-fázisú extrakciója

Az eljárást részleteiben korábban publikáltuk (15). Az előző pontban leírtaktól röviden az alábbiakban különbözik:

A mintát előzetesen 4 órán át pH 2-n inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd Bond-Elut C₈ mini-oszlopra visszük. A 10 % etanos mosás helyett 18 %-os acetonnitrilt, eluensként pedig diklórmétán : n-hexán 70:30 térfogatarányú elegyet alkalmazunk, a többi lépés az előzőekkel azonos.

Nagynyomású folyadék-kromatográfia

A kísérletekhez LKB 2152 típusú szabályozó egységgel vezérelt kétpumpás (LKB 2150) gradiens rendszert használtunk, amelyhez LKB 2151 ultraibolya detektor, Super-Rac (LKB-2211) frakciószedő és kétcsatomás rekorder (LKB 2210) csatlakozott. A minta felvitele 200 µl-es mintahurokkal ellátott Rheodyne 7125 injektoron, az elválasztás pedig Spheri-5 C₁₈ Microbore (2.1x220 mm, Pierce, USA), oszlopon történt.

A 0.2 - 2.0 ml kiindulási vizelet-térfogatnak megfelelő extrakciós maradékokat 100 - 150 µl mozgó fázisban feloldva vittük be a kromatográfiás rendszerbe és 0.1 % ecetsavat tartalmazó víz : acetonnitril mozgó fázissal, 0,4 ml/perc áramlási sebességgel, lineáris gradienssel eluáltuk a következőképpen: az acetonnitril koncentráció 0 és 10 perc között 28 %, 10 és 20 perc között 80 %-ra növeljük, 20 és 25 perc között 28 %-ra csökkentjük, majd 25 és 30 perc között ismét 28 %-on tartjuk. A gradiens elúciós rendszert előzetesen tríciummal jelzett és/vagy nem-radioaktív prosztaglandinokkal standardizáltuk, előbbieket radioaktivitás detektorral (Reeve, Glasgow, Skócia), utóbbiakat 195 nanométeres hullámhosszon ultraibolya detektorral azonosítottuk. Az extraktumokból kapott HPLC-frakciókat -20 °C-on liofilizáltuk, és a RIA mérésig -20 °C-on tároltuk.

A radioimmunoassay menete

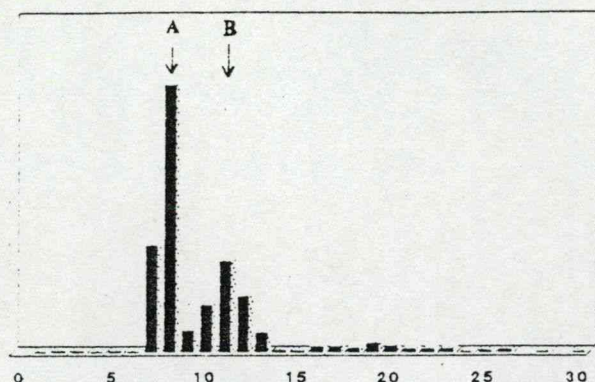
A meghatározáshoz a szilárd-fázisú extrakció, illetve nagynyomású folyadék-kromatográfia után kapott száraz maradékokat RIA-pufferben oldottuk. A radioimmun meghatározás a készletekhez tartozó használati utasítások szerint, három párhuzamossal történt.

Kísérleti eredmények

Humán vizelet 6-keto-PGF₁α immunreaktivitása

A szilárd-fázisú extrakciót követő HPLC-elválasztással normál humán vizeletmintában két fő immunreaktív komponens mutatunk ki (2. ábra). A polárosabb frakció (A-csúcs) a 6-keto-PGF₁α, míg a kevésbé poláros frakció (B-csúcs) a 2,3-dinor-6-keto-PGF₁α referencia-anyagokkal azonos retenciós idővel eluálódott.

Az ábrán nem tüntettük fel számos további prosztaglandin retenciós idejét, de az alkalmazott gradiens-rendszert triciált vagy nem-radioaktív prosztaglandinok segítségével az alábbi prosztanoidokra standardizáltuk: 6-keto-PGF₁α, 2,3-dinor-6-keto-PGF₁α, tromboxán B₂, 2,3-dinor-TXB₂, 11-dehidro-TXB₂, 8-epi-prosztaglandin F₂α, 11-epi-prosztaglandin F₂α, prosztaglandin E₂, prosztaglandin F₂α, prosztaglandin D₂, 13,14-dihidro-15-keto-prosztaglandin F₂α, 13,14-dihidro-15-keto-prosztaglandin E₂, biciklo-PGE₂.

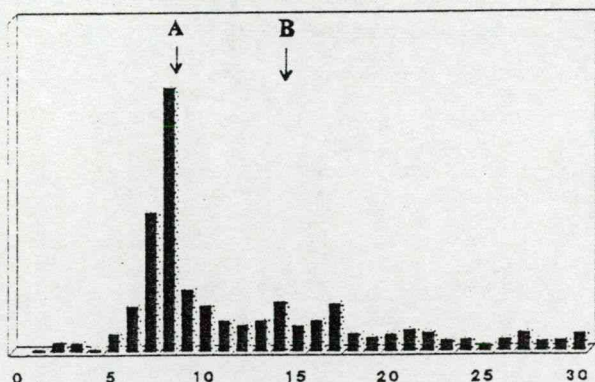


2. ábra

Extrahált humán vizelet 6-keto-PGF_{1α} immunreaktív profilja

HPLC profile of immunoreactive 6-keto-PGF_{1α} in human urine after solid-phase extraction

Minta: 24-órás kevert férfi vizelet
 Extrakció: Bond-Elut C₂, a kísérleti rész szerint
 Elválasztás: fordított fázisú HPLC, gradiens elúcióval (Ld. Kísérleti rész)
 A: standard 6-keto-PGF_{1α} retenciós idő
 B: standard 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} retenciós idő



3. ábra

Extrahált humán vizelet tromboxán B₂ immunreaktív profilja

HPLC profile of immunoreactive thromboxane B₂ in human urine after solid-phase extraction

Minta: 24-órás kevert férfi vizelet
 Extrakció: Bond-Elut C₂, a kísérleti rész szerint
 Elválasztás: fordított fázisú HPLC, gradiens elúcióval (Ld. Kísérleti rész)
 A: standard 2,3-dinor-TXB₂
 B: standard TXB₂

Humán vizelet tromboxán B₂ immunreaktivitása

Az extrahált minta HPLC elválasztása utáni RIA mérés közel homogén immunreaktivitás-eloszlást mutatott (3. ábra). A fő immunreaktív frakciók retenciós ideje azonban nem a tromboxán B₂, hanem a 2,3-dinor-TXB₂ referencia-anyaggal (A-csúcs) volt azonos. A tromboxán B₂-nek megfelelő frakciókban (B-csúcs) csak igen kismértékű immunreaktivitás volt kimutatható.

Anti-6-keto-PGF_{1α} és anti-tromboxán B₂ antiszérumok keresztreaktivitása a dinor-metabolitokkal

A fenti adatokból megállapítható, hogy a szilárd-fázisú extrakcióval tisztított normál humán vizeletben a 6-keto-PGF_{1α} immunreaktivitás jelentős mértékben, a tromboxán B₂ immunreaktivitás pedig túlnyomórészt a megfelelő dinor-metabolitokból származik. A mennyiségi viszonyok pontosabb jellemzése érdekében ezért nagyszámú független mérésből meghatároztuk a radioimmunoassay készletekben használt specifikus antiszérumok keresztreaktivitását a dinor-származékokra. Az anti-6-keto-PGF_{1α} antiszérumra kapott adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. A kétféle anyaggal (vagyis 6-keto-PGF_{1α}-val, illetve 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}-val) kapott dózis - válasz görbék meredeksége különbözött, ezért a szokásos eljárás helyett - amely szerint a relatív keresztreakciót az 50 %-os specifikus kötéshez tartozó dózisok arányával jellemezzük - három különböző dózisa-t tüntettük fel a keresztreakciót (CR). A táblázat adatai egyértelműen bizonyítják, hogy a 6-keto-PGF_{1α} antiszérumnak 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}-val való keresztreakciója nem konstans, hanem dóziszfüggő érték.

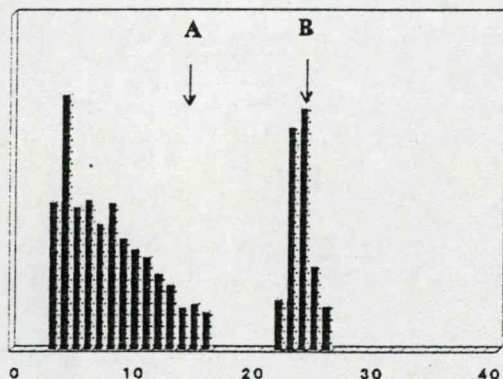
6-keto-PGF _{1α} (c ₁)	2,3-dinor-6-keto-PGF _{1α} (c ₂)	relatív CR (%)
ED-80 2,65 ± 0,32	3,70 ± 0,82	71,6
ED-50 11,2 ± 1,13	22,2 ± 2,16	50,4
ED-20 50,9 ± 3,49	172 ± 26,2	29,6

1. táblázat

A 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} keresztreakciójának dóziszfüggése
 Dose-dependent cross reactivity of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}

A táblázat 3 párhuzamosan végzett 10 független meghatározás alapján a 80, 50 és 20 %-os specifikus kötésekhez tartozó dózisokat és a szórást tünteti fel. A relatív keresztreakciók számítása a középértékek hányadosaiból történt, a CR % = (c₁/c₂)*100 képlet szerint.

A tromboxán B₂ antiszérum esetében a 2,3-dinor-TXB₂-val, és a tromboxán B₂-vel kapott dózis-válasz görbék meredeksége megegyezett, igazolva azt, hogy a relatív keresztreakció független a keresztreakáló koncentrációjától. Három párhuzamossal végzett hat független mérés alapján az 50 %-os specifikus kötéshez tartozó dózisokból számított relatív keresztreakció értéke $97,6 \pm 3,4$ % volt (átlag \pm szórás).



4. ábra

Extrahált humán vizelet 11-dehidrotromboxán B₂ immunreaktivitás profilja nem-szelektív szilárd-fázisú extrakcióval

HPLC profile of immunoreactive 11-dehydro-TXB₂ after non-selective solid-phase extraction

Minta: 24-órás kevert férfi vizelet

Extrakció: Bond-Elut C₂, a kísérleti rész szerint

Elválasztás: fordított fázisú HPLC, gradiens elúcióval (Ld. Kísérleti rész)

A: standard 11-dehidro-TXB₂ szabad sav forma

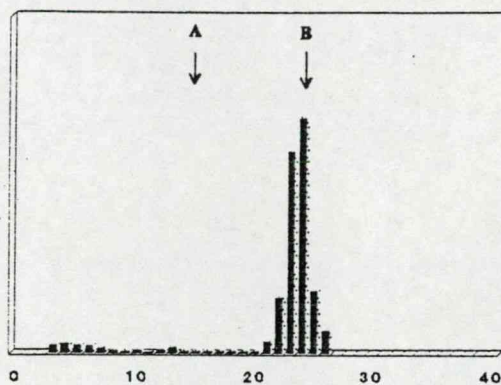
B: standard 11-dehidro-TXB₂ laktón forma

Humán vizelet 11-dehidro-TXB₂ immunreaktivitása

Az előbbiekkal azonos módon végzett szilárd-fázisú extrakció után a normál humán vizelet 11-dehidro-TXB₂ immunreaktivitása rendkívül heterogénnek bizonyult (4. ábra). Az egyértelműen 11-dehidro-TXB₂-ként azonosítható (vagyis a standard 11-dehidro-TXB₂ laktón formájával azonos retenció idejű) frakcióban az összes immunreaktivitásnak kevesebb mint 25 %-a található (B-csúcs). Az immunreaktivitás zöme poláros anyagokból származik, amely a 11-dehidro-TXB₂ szabad sav formájával is nagymértékben átfed. A szabad savnak megfelelő frakciókban csúcs-szerű immunreaktivitás nem észlelhető.

Humán vizelet 11-dehidro-TXB₂ immunreaktivitása szelektív szilárd-fázisú extrakció után

A vizeletből Bond-Elut C₈ mini-oszlopon, 18 %-os acetonitrilrel végzett előmosás után diklórometán:hexán (70:30 térfogatarányú) eluenssel kapott minták HPLC elválasztása egységes immunreaktivitást mutat (5. ábra). Az immunreaktivitás csak a 11-dehidro-TXB₂ laktón



5. ábra

Humán vizelet 11-dehidrotromboxán B₂ immunreaktivitás profilja szelektív szilárd-fázisú extrakcióval

HPLC profile of immunoreactive 11-dehydro-TXB₂ after selective solid-phase extraction

Minta: 24-órás kevert férfi vizelet

Extrakció: Bond-Elut C₈, a kísérleti rész szerint

Elválasztás: fordított fázisú HPLC, gradiens elúcióval (Ld. Kísérleti rész)

A: standard 11-dehidro-TXB₂ szabad sav forma

B: standard 11-dehidro-TXB₂ laktón forma

formájának megfelelő frakciókban észlelhető (B-csúcs), mivel a mintában esetleg szabad sav formában jelenlévő 11-dehidro-TXB₂ az extrakciót megelőző savas előkezelés következtében laktónná alakul.

A kísérleti eredmények értékelése

Laboratóriumunkban a RIA mérések előtti mintaelőkészítésre a prosztanoidok szilárd-fázisú extrakciójára elsőként használt Sep-Pak C₁₈ patronok (14) helyett több éve jó eredménnyel használunk etil-szilil-szilika (C₂) mini-oszlopokat. Nagyszámú különféle biológiai matrixon többféle prosztanoidra kapott - jelen közleményben nem részletezett - többéves kísérleti tapasztalataink azt bizonyítják, hogy az extrakciós hatások, az extrakció után kapott immunreaktív kon-

centrációk, valamint az immunreaktív tisztaság a kísérleti hibahatáron belül lényegében azonos a kétféle szorbens esetében. A Sep-Pak-hez képest kedvezőbb ár és kisebb oldószerükséglet miatt a C_2 minioszlopok használata gazdaságosabb, így egyes gyártók (pl. Amersham International plc, Izotóp Intézet) a kereskedelemben kapható prosztanoid RIA készleteikben is ezek használatát javasolják. Ennek tudatában jelen vizsgálatokat is C_2 minioszlopokra koncentráltuk. A vizeletre vonatkozóan itt részletesen nem ismertetett kísérleti eredményeink igazolták, hogy a C_2 minioszlopokon az extrakciós hatások mindhárom vizsgált prosztanoidra 90 %-nál nagyobb volt. Ennek gyakorlati előnye, hogy megtakarítható az extrakciós hatások mintánkénti egyedi meghatározása, amely csak tríciummal jelzett, igen drága prosztanoidokkal lehetséges.

Az ismertetett immunkromatográfiai kísérletek fontos adatokat szolgáltatottak a prosztanoid bioszintézis mennyiségi jellemzésére használt egyes vizelet-metabolitok RIA meghatározásának lehetséges módszereire vonatkozóan.

Elterjedt vélemény szerint a vizeletben található 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ a renális, míg a 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ az extrarenális prosztaciklin termelését tükrözi (10), bár egyes szerzők vitatják ennek általános érvényét (16). A két metabolit előzetes kromatográfiai tisztítás nélkül csak abban az esetben volna mérhető, ha mindkettőre külön-külön specifikus antiszérummal rendelkezniük. Ennek hiányában kromatográfiai elválasztásra van szükség. Az itt leírt kísérleti eredmények igazolják, hogy a prosztanoidok elválasztására kiterjedten használt fordított fázisú nagynyomású folyadék-kromatográfia a 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ /2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ szeparálására is jó eredménnyel használható.

A 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ antiszérum vizsgálatával kapott eredmények igazolták azt a várakozást, hogy a RIA-hoz elterjedten használt poliklonális antiszérumok specifitása általában igen alacsony a dinor-származékokkal szemben. Az aspecifitás azonban nem szükségképpen hátrány - ellenkezőleg, a gyakorlatban előnyösen használható fel. A magas 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ keresztreakció módot ad ugyanis arra, hogy a HPLC módszerrel izolált tiszta 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ -t is 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ RIA segítségével határozhatjuk meg. Ilyenkor úgy járunk el, hogy 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ helyett 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ -val készítünk standard görbét, és a 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ frakciók mennyiségét ennek alapján adjuk meg. Megjegyzendő, hogy hasonló elven működő RIA készletek egyes gyártóktól a kereskedelmi forgalomban is kaphatók (pl. Seragen (Advanced Magnetics), Izotóp Intézet). Módszertani szempontból igen fontos annak

hangsúlyozása, hogy a keresztreaktív meghatározás egyszerű módszere - amely szerint a keresztreaktív anyag mennyiségét a keresztreakció táblázatos értékéből egy konstans szorzófaktorral számítjuk ki - a 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ esetében nem alkalmazható; a keresztreakció erős dózis-függése (1. táblázat) miatt ez a kis koncentrációknál jelentős alámérésre ("underestimation"), míg a magas koncentrációknál jelentős fölmérésre ("overestimation") vezetne. Pontos mérés csakis teljes 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ standard görbe alapján végezhető. Mivel az általunk vizsgált RIA készlet 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ standardot is tartalmaz, ugyanazon készlet a 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ és a 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ meghatározására egyaránt felhasználható. A módszer megbízhatóságát igazolja, hogy a néhány normál vizeletmintában HPLC elválasztás után RIA módszerrel mért 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ koncentráció értéke (86 ± 12 pg/ml, $n=5$) jól egyezik a szakirodalomban közölt, referencia-módszernek számított GC/MS/MS módszerrel nyert értékekkel (17, 18).

A vizelet tromboxán B_2 immunreaktivására kapott kísérleti eredmények (3. ábra) teljes összhangban vannak azzal a már ismert irodalmi adattal, hogy a vizelet tromboxán B_2 immunreaktivitása valójában nem a tromboxán B_2 -től, hanem a 2,3-dinor-TXB $_2$ -től származik (19). Ez pedig azt jelenti, hogy - a korábbi véleményekkel szemben - a vizeletben mért immunreaktív tromboxán B_2 mégis az extrarenális, nem pedig a renális tromboxán-bioszintézis mértékének tekintendő (19). Pontos mennyisége azonban minden olyan esetben, ahol a tromboxán B_2 antiszérum keresztreaktivitása kisebb mint 100 %, csak 2,3-dinor-TXB $_2$ -ra végzett standardizálással határozható meg, a 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ /2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ mérésével analóg módon. Az irodalomban ismertetett számos különböző antiszérum ugyan erősen keresztreaktív a 2,3-dinor-TXB $_2$ -vel, de értéke általában 40 - 60 % között mozog. Éppen ezért az általunk vizsgált RIA-rendszer rendkívüli előnye, hogy a tromboxán B_2 antiszérum aspecifitása a 2,3-dinor-TXB $_2$ -re nézve teljes; a keresztreakció gyakorlatilag 100 %. Ennek köszönhetően a leírt extrakciós tisztítás után, kromatográfiai elválasztás nélkül, a standard assay szerint kapott immunreaktív tromboxán B_2 koncentráció számszerűen jó közelítéssel azonos a 2,3-dinor-TXB $_2$ koncentrációjával. A kapott érték valójában csak a tromboxán B_2 - és 2,3-dinor-TXB $_2$ - immunreaktivitás összegét adja meg, ezen belül a két vegyület pontos aránya elvileg csak kromatográfiai elválasztással adható meg. A tromboxán B_2 -től származó immunreaktivitás pontos ismerete azonban két okból is elhanyagolható:

- (i) Az irodalmi adatok (19) és a jelen kísérleti eredmények is (3. ábra) azt bizonyítják, hogy az

összes immunreaktivitásnak általában kevesebb mint 20 %-a származik a tromboxán B₂-től.

- (ii) Számos újabb irodalmi adat utal arra, hogy a vizelet 2,3-dinor-TXB₂ és tromboxán B₂ koncentrációja között pozitív korreláció van (20,21), azaz a tromboxán B₂ maga is - ellentétben a korábbi általános véleménnyel - az extrarenális tromboxán bioszintézis indikátorának tekinthető.

Fentiekkel összhangban a néhány normál vizeletmintában HPLC elválasztás nélkül, RIA módszerrel mért immunreaktív tromboxán B₂ koncentráció értéke (296 ± 32 pg/ml, n=5) jól egyezik a szakirodalomban közölt, referencia-módszernek számító GC/MS/MS módszerrel nyert értékkel (17).

A vizsgált metabolitok közül a 11-dehidro-TXB₂ immunreaktivitása bizonyult leginkább heterogénnek a C₂-minioszlopon végzett extrakció után (4. ábra). A Sep-Pak C₁₈-on észlelt hasonló heterogenitás vizsgálata során korábban olyan szelektív szilárd-fázisú extrakciót dolgoztunk ki, amely a megfelelő szorbens kiválasztásán, szelektív mosó és eluáló oldószerkeverék használatán, valamint a 11-dehidro-TXB₂ lakton és szabad sav formái eltérő polaritásának kihasználásán alapul (15). Az itt leírt kísérleti eredmények (5. ábra) bizonyítják, hogy a módszer a jelen vizsgálatokhoz alkalmazott RIA készlettel hasonlóan jó eredményt ad; külön kromatográfiás tisztítás nélkül, egy lépéses szilárd-fázisú extrakcióval homogén immunreaktivitás érhető el. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ez a nagyfokú immunreaktív tisztaság bizonyos mértékig a visszanyerés rovására érhető csak el; az extrakciós hatások 70 - 80 % között változik. Ennek következtében pontos mérésekhez elkerülhetetlen az extrakciós hatások egyidejű meghatározása minden egyes mintában.

Míndezek alapján az extrarenális tromboxán produkció jellemzésére két kísérleti módszer is felhasználható; a 2,3-dinor-TXB₂ és/vagy a 11-dehidro-TXB₂ vizelet-koncentrációinak radioimmun meghatározása. A két metabolit jelen ismereteink szerint egyenértékűnek tekinthető, bár a szakirodalmi adatok elsősorban a 2,3-dinor-TXB₂ mérésén alapulnak, és a meghatározáshoz zömmel nem RIA-t, hanem gáz-kromatográfiás/tömeg-spektrometriás (GC/MS) módszert használnak. Teljesítőképessége, és ára alapján a RIA meghatározás lényegesen előnyösebb. A két metabolit közül a 11-dehidro-TXB₂ mérése kedvezőbbnek látszik, nemcsak azért, mert vizelet-koncentrációja lényegesen magasabb a 2,3-dinor-TXB₂-jénél, hanem azért is, mert a 2,3-dinor-TXB₂ mennyiségi meghatározására általunk javasolt fenti eljárás a szakirodalomban még nem általánosan elfogadott, noha ismerünk már olyan adatokat, amelyek hasonló mérési elven alapulnak (20, 21).

Irodalom

1. *Bergström, S., Danielsson, H., Samuelsson, B.* The Enzymatic Formation of Prostaglandin E₂ from Arachidonic Acid. Prostaglandins and Related Factors. 32. Biochim. Biophys. Acta, 1964/a, 90: 207-210,
2. *Bergström, S., Danielsson, H., Klenberg, D., Samuelsson, B.* The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins. Prostaglandins and Related Factors 34. J. Biol. Chem., 1964, 239: 4006-4008,
3. *Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B.* Thromboxanes: A New Group of Biologically Active Compounds Derived from Prostaglandin Endoperoxides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72: 2994-2998.
4. *Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S., Vane, J.R.* Arterial Walls Generate from Prostaglandin Endoperoxides a Substance (Prostaglandin X) which Relaxes Strips of Mesenteric and Coeliac Arteries and Inhibits Platelet Aggregation. Prostaglandins, 1976, 12: 897-913
5. *Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R.* An Enzyme Isolated from Arteries Transforms Prostaglandin Endoperoxides to an Unstable Substance that Inhibits Platelet Aggregation. Nature, 1976,
6. *Pace-Asciak, C., Granström, E.* Prostaglandins and Related Substances. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1983, ISBN: 0444 80517 6.
7. *Benedetto, C., McDonald-Gibson, R.C., Nigam, S., Slater, T.F.* Prostaglandins and Related Substances. A Practical Approach. Oxford: IRL Press Ltd., 1987, ISBN: 1-85221-031-1.
8. *Patrono, C., Peskar, B.A.* Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 82. Berlin: Springer-Verlag, 1987, ISBN: 3-540-17413-3.
9. *Roberts, L.J., Sweetman, B.J., Oates, J.A.* Metabolism of Thromboxane B₂ in Man: Identification of the Major Urinary Metabolite. J. Biol. Chem., 1981, 256: 8384-8393.
10. *Westlund, P., Granström, E., Kumlin, M., Nordenström, A.* Identification of 11-Dehydrothromboxane B₂ as a Suitable Parameter for Monitoring Thromboxane Production in the Human. Prostaglandins, 1986, 31: 929-960.
11. *Catella, F., Healy, D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.* 11-Dehydrothromboxane B₂: A Quantitative Index of Thromboxane A₂ Formation in the Human

- Circulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83: 5861-5865.
12. *Ciabattoni, G., Pugliese, F., Davi, G., Pierucci, A., Simonetti, B.M., Patrono, C.* Fractional Conversion of Thromboxane B₂ to Urinary 11-Dehydrothromboxane B₂ in Man. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 992: 66-70.
 13. *Falardeau, P., Outes, J. A., Brash, A. R.*, Quantitative Analysis of Two Dinor Urinary Metabolites of Prostaglandin I₂. *Anal. Biochem.* 115, 359-367, 1981.
 14. *Powell, W.S.* Rapid Extraction of Oxygenated Metabolites of Arachidonic Acid from Biological Samples Using Octadecylsilyl Silica. *Prostaglandins*, 1980, 20: 947-956,
 15. *Riutta, A., Mucha, J., Vapaatalo, H.* Solid-Phase Extraction of Urinary 11-Dehydrothromboxane B₂ for Reliable Determination with Radioimmunoassay. *Analytical Biochemistry*, 1992, 202: 299-305.
 16. *Chiabrando, C., Rivoltella, L., Martelli, L., Valzacchi, S., Funelli, R.* Urinary Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites during Chronic Low-Dose Aspirin: Evidence for an Extrarenal Origin of Urinary Thromboxane B₂ and 6-keto-Prostaglandin F₁alpha in Healthy Subjects. *Biochim Biophys. Acta*, 1992, 1133: 247-254,
 17. *Leonhardt, A., Bush, C., Schweer, H., Seyberth, H.W.* Reference Intervals and Developmental Changes in Urinary Prostanoid Excretion in Healthy Newborns, Infants and Children. *Acta Paediatr.*, 1992, 81: 191-196,
 18. *Seyberth, H.W., Schweer, H., Tonshoff, B., Leonhardt, A.* The Role of Prostanoids in Pediatric Diseases Employing Mass Spectrometric Techniques. *Eicosanoids*, 1992: S4-S6.
 19. *Lorenz, R.L., Uedelhoven, W.M., Fischer, S., Ruetzel, A., Weber, P.C.* A Critical Evaluation of Urinary Immunoreactive Thromboxane: Feasibility of its Determination as a Potential Vascular Risk Indicator. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 993: 259-265,
 20. *Jorres, A., Chiabrando, C., Kordonouri, O., Schiessler, A., Hess, S., Farke, S., Gahl, G.M., Muller, C., Rivoltella, L., Djurup, R.* Thromboxane-B₂ Urinary Metabolites in Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass. *Eicosanoids*, 1992, 5: 147-151.
 21. *Reilly, I. A. G., Doran, J. B., Smith, B., FitzGerald, G. A.* Increased Thromboxane Biosynthesis in a Human Preparation of Platelet Activation: Biochemical and Functional Consequences of Selective Inhibition of Thromboxane Synthase. *Circulation* 73, 1300-1309, 1986.

(Érkezett: 1993. május 12.)

Mucha I: Measurement of Prostanoids by Specific Radioimmunoassay Using ¹²⁵I-labelled Radioligands. pp. 803-806 in "Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, 1994" (Eds. J. Allen & R. Voges), John Wiley and Sons, Chichester, UK., ISBN 0-471-95143-9

MEASUREMENT OF PROSTANOIDS BY SPECIFIC RADIOIMMUNOASSAY USING ^{125}I -LABELLED RADIOLIGANDS

I. Mucha

Institute of Isotopes, Co., Ltd.
P. O. Box 851, H-1525 Budapest, Hungary

SUMMARY

Radioimmunoassay (RIA) has been a widely used method for sensitive determination of prostanoids, a group of bioactive compounds produced from arachidonic acid and found in biological systems at the low picomolar range of concentration. In our laboratories, specific rabbit antisera combined with radioiodinated monoiodo-tyrosine methyl ester derivatives of prostanoids have been used for the measurement, by heterologous RIA, of prostaglandin E_2 , prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, thromboxane B_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, bicyclo-prostaglandin E_2 , 11-dehydro-TXB $_2$, 11-epi-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, 8-epi-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ and Δ^{12} -prostaglandin J_2 . Large-scale preparation of ^{125}I -radiotracers has been routinely carried out by open column chromatography on Sephadex LH-20 sorbent. In spite of satisfactory sensitivity obtained with ^{125}I -RIAs, reliable quantification in biological media requires laborious purification procedures including solid-phase extraction (SPE) followed by chromatography (usually HPLC). As a simple yet effective alternative of these multi-step SPE/HPLC purifications, SPE alone, even without chromatographic separation, can produce satisfactory immunoreactive (ir) purity, provided that it is optimized for the particular analyte to be determined. As an example of the utility of this methodological strategy, a selective SPE procedure elaborated for purification of immunoreactive (ir) $\text{PGF}_{2\alpha}$ from human plasma and urine is presented.

METHODS

Prostanoids were coupled to tyrosine methyl ester (TME) by using mixed anhydride or carbodiimide methods according to general procedures and

labelled with carrier-free Na¹²⁵I by chloramine-T method. Monoiodo-derivatives are isolated from labelling mixture by column chromatography on Sephadex LH-20 using ethanol-water binary eluents of different composition. In standard RIA procedure 2-4 pg of ¹²⁵I-tracer is incubated with polyclonal antisera (raised in rabbits against bovine serum albumin conjugates of prostanoids) and unlabelled standard/sample at 4 °C overnight, then bound fraction is separated by charcoal. For standard, non-selective SPE, plasma or urine samples were extracted on C₁₈-Bond-Elut minicolumns according to Powell [1]. For selective extraction of ir-PGF_{2α} from plasma and urine C₂-Bond-Elut minicolumns were used according to the following elution scheme: Samples acidified to pH 3 were diluted 1:5 with water and applied to columns, then washed with 4 ml each of water, 14 % acetonitrile, water and n-hexane. Sample is obtained by using diethylether:hexane (70:30, v/v) as final eluent. Immunochromatographic analyses were carried out by separation of SPE-eluates on HPLC, followed by RIA of HPLC fractions as detailed elsewhere [2].

RESULTS

¹²⁵I-labelled TME derivatives of a wide range of prostanoids can be efficiently purified on Sephadex LH-20 column using ethanol:water binary eluents. Table 1 shows elution peak maxima of monoiodo-derivatives and the per cent composition of aqueous ethanol used as the mobile phase. In Table 2 the main RIA parameters collected upon long-term use of ¹²⁵I-tracers from 10-40 independent runs are summarized.

Table 1

	PGF _{2α}	PGE ₂	TxB ₂	KPGF	DHTX	DHKPGF	bicyclo-PGE ₂	11-epi-PGE _{2α}	Δ ¹² -PGJ ₂
% EtOH	20	20	20	0	20	20	30	20	30
V _e , ml	110	120	112	75	110	118	112	138	120

KPGF = 6-keto-PGF_{1α}; DHTX = 11-dehydro-TxB₂; DHKPGF = 13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}

Table 2

	PGE _{2α}	PGE ₂	TxB ₂	KPGF	DHTX	DHKPGF	bicyclo-PGE ₂	11-epi-PGE _{2α}	Δ ¹² -PGJ ₂
MDD (pg)	0.9	1.9	1.4	1.1	1.5	1.4	1.1	0.86	0.36
IC50 (pg)	11	21	12.5	11.5	26.4	12.3	8.2	6.45	4.57

For abbreviations see Legend to Table 1.

Pooled human plasma and urine samples containing $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$ as the recovery marker were subjected to SPE on C_{18} minicolumns by using standard elution scheme. Although an excellent recovery ($>95\%$) was obtained, HPLC-RIA analysis of the eluates revealed very heterogeneous immunoreactivity in both plasma and urine (Fig. 1A). As illustrated in Fig. 1B, however, more homogeneous immunoreactivity profile (without considerable loss of recovery) could be achieved on C_2 -silica sorbent by using an optimized elution pattern as described under *Materials and Methods*.

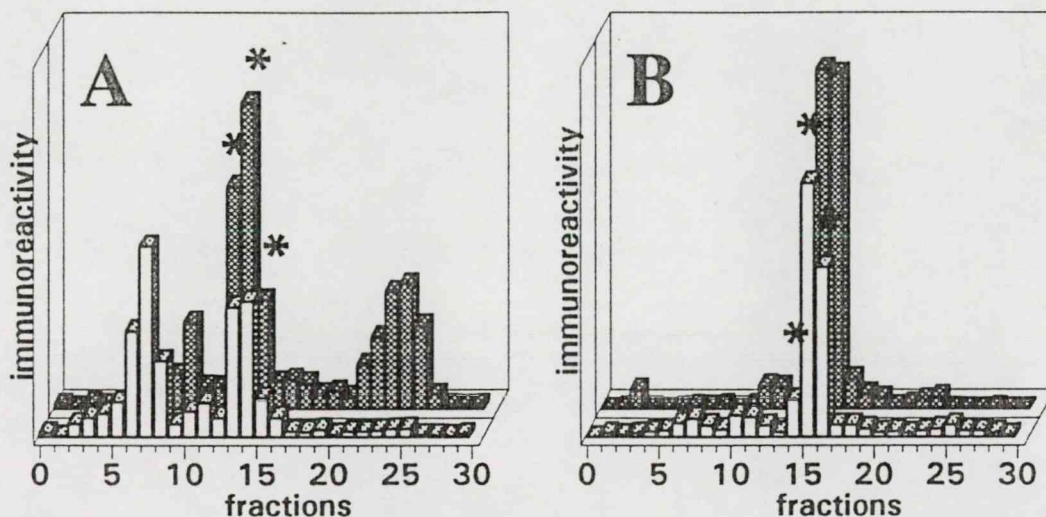


Figure 1

Immunoreactive $\text{PGF}_{2\alpha}$ obtained with different SPE procedures

Plasma (solid bars) and urine (open bars) samples were extracted on C_{18} (A) and C_2 (B) minicolumns, using non-selective (A) and selective (B) elution scheme, and HPLC fractions measured in $\text{PGF}_{2\alpha}$ RIA. Fractions containing tritiated $\text{PGF}_{2\alpha}$ are indicated by asterisks.

DISCUSSION

^{125}I -labelled monoiodo-tyrosine methylester derivatives of a wide range of prostanoids can be efficiently separated on Sephadex LH-20 by using ethanol:water binary eluents. It is demonstrated in detail that selectivity of this sorbent is chiefly determined by the number of iodine atoms in aromatic ring of tyrosine [3]. This is of particular benefit for the complete separation of labelled materials from unreacted non-labelled target compound, a prerequisite to achieve high specific activity required for RIA. For analyses of iodinated prostanoids based on structural moieties

of parent prostanoid rather than those of aromatic side-chain, RP-HPLC was reported to be the adequate method of choice [4].

Due to the high specific activity of ^{125}I , heterologous prostanoid RIAs based on ^{125}I -monoiodo-TME derivatives show outstanding sensitivity, which is principally high enough to determine prostanoids in majority of biological samples. Still, these determinations suffer from low specificity and reliability due to the presence of non-specific interfering materials. To have reliable results in RIA determinations, laborious and sophisticated purification procedures should be used, which results in a low sample through-put capacity. Solid-phase extraction (SPE) has been used for a long time as the universal clean-up method employed in both RIA and mass-spectrometric determinations. In its initial form this method is suitable for a nonselective group-isolation of prostanoids with maximum recovery [1]. In certain types of biological samples containing relatively high concentration of prostanoids this extraction alone may provide satisfactory immunoreactive purity, as it did in the case of uterine venous plasma in pregnant rabbit [5]. In majority of cases, however, this standard SPE should be, and could be, improved, in order to avoid the need for further chromatographic purification. Optimization of SPE can be performed according to following general concept:

- removal of polar interfering materials by polar solvents before eluting the analyte,
- fine adjustment of elution strength of eluting solvent to obtain fine selectivity in a narrow range of polarity,
- search for sorbent/solvent/analyte combinations, whose selectivity is contributed by interactions specific for the particular analyte/sorbent/solvent system.

This strategy was found successful in the elaboration of even more complex selective extraction of different prostanoids from human urine [6,7]. The present procedure suitable for selective isolation of ir-PGF $_{2\alpha}$ from human plasma or urine provides further evidence of the utility of this concept.

REFERENCES

1. Powell, W.S., Prostaglandins, 20, 947, (1980)
2. Mucha, I., Riutta, A., and Vapaatalo, H., Eicosanoids, 4, 1, (1991)
3. Toth, G., J. Radioanal. Chem., 46, 201, (1978)
4. Mucha, I., and Toth, G., J. Chromatogr., 483, 419, (1989)
5. Mucha, I., and Losonczy, G., Prostaglandins, 40, 143, (1990)
6. Riutta, A., Mucha, I., and Vapaatalo, H., Anal. Biochem., 202, 299, (1992)
7. Riutta, A., Nurmi, E., Weber, C., et al., Anal. Biochem., 220, (1994) in press

Riutta A, Nurmi, E, Hansson, G., Weber, C, Mucha I: Selective
Solid-Phase Extraction of Urinary 2,3-Dinor-6-keto-
Prostaglandin F_{1α} for Determination with Radioimmunoassay.
Analytical Biochemistry 220(2): 351-359, 1994

Selective Solid-Phase Extraction of Urinary 2,3-Dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} for Determination with Radioimmunoassay

Asko Riutta,^{*1} Eeva Nurmi,^{*} Claudia Weber,[†] Göran Hansson,[‡] Heikki Vapaatalo,^{*} and István Mucha[§]

^{*}Department of Biomedical Sciences, University of Tampere, P.O. Box 607, FIN 33101, Tampere, Finland; [†]Janssen Research Foundation, 41470, Neuss, Germany; [‡]Astra Hässle Research Laboratories, S-43183, Mölndal, Sweden; and

[§]Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 77, H-1525, Budapest, Hungary

Received January 31, 1994

This paper describes a method for selective two-step solid-phase extraction of urinary 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} for reliable determination with radioimmunoassay. In the immunoreactivity profile of nonselectively extracted urine after HPLC separation, over 90% of the total 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} immunoreactivity consisted of interfering material coeluting with 6-ketoprostaglandin F_{1 α} and 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} . Among the alkyl silica sorbents studied (methyl, butyl, octyl, and octadecyl), an efficient separation of 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} from 6-ketoprostaglandin F_{1 α} and the lowest immunoreactive concentration of analyte were achieved in extraction on the methyl silica sorbent by elution of 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} with chloroform:hexane (85:15, v/v) from the cartridge. The proportion of specific immunoreactivity could be further increased by two-step extraction of sample on methyl silica cartridges, first at pH 3 and then at pH 10 using diethyl ether:hexane (85:15, v/v) and chloroform as eluent, respectively. After this, a high correlation was found with concentrations of samples determined by radioimmunoassay using three different antisera. A significant correlation of values was also observed between samples measured by radioimmunoassay and those measured by GC-MS. The values of 12-h excretion of 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} in eight volunteers (268 ± 204 ng/g creatinine, mean ± SD) as well as the inhibitory effect of acetylsalicylic acid (74 ± 12%) are in accordance with those reported in the literature. This selective extraction procedure provides a high validity in

radioimmunoassay without requiring subsequent TLC or HPLC purification. © 1994 Academic Press, Inc.

Prostacyclin (PGI₂),² the main cyclooxygenase product of arachidonic acid in vascular endothelial cells, is a powerful anti-aggregatory and vasodilatory agent (1). On the basis of its biological properties, PGI₂ may be of importance in cardiovascular physiology and disease. Direct chemical measurement of PGI₂ is difficult because it is unstable under conditions prevailing in the body and is rapidly converted into 6-ketoprostaglandin F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α}) (2). The measurement of 6-keto-PGF_{1 α} in plasma is questionable because of the risk of its artifactual formation during blood collection (3,4). In urine, 6-keto-PGF_{1 α} is mainly produced by the kidneys rather than filtrated from plasma and does not reflect the total body production of PGI₂ (5,6). Therefore, to assess the endogenous production of PGI₂, 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1 α} (2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α}), the major metabolite of prostacyclin in urine in man (7,8) and a noninvasive index of PGI₂ biosynthesis, should be measured.

Various purification methods have been used prior to the quantitation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} in urine by immunoassay (IA) or gas chromatography-mass spectrometry. Selective liquid-liquid extraction has been used to remove urinary contaminants before the determination of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} (9). Immunoaffin-

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: 358-31-2156170.

² Abbreviations used: PGI₂, prostacyclin; 6-keto-PGF_{1 α} , 6-ketoprostaglandin F_{1 α} ; 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} , 2,3-dinor-6-keto-prostaglandin F_{1 α} ; SPE, solid-phase extraction; IA, immunoassay; RIA, radioimmunoassay; ASA, acetylsalicylic acid; PG, prostaglandin.

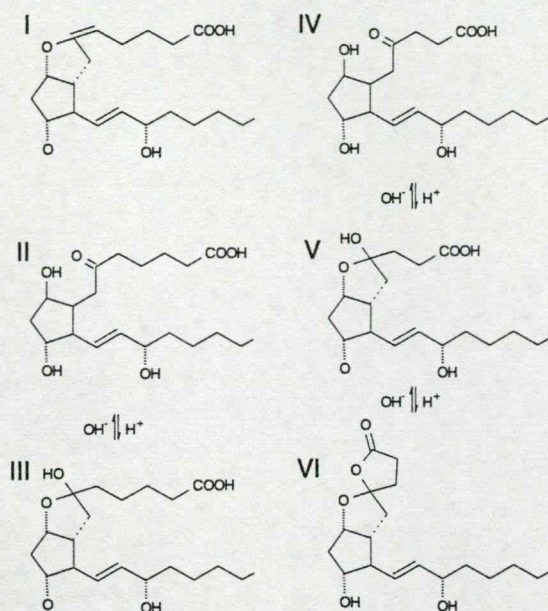


FIG. 1. The structures of prostacyclin (I) and pH-dependent forms of 6-keto-PGF_{1α} (II, free acid; III, hemiketal) and 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} (IV, free acid; V, hemiketal; VI, γ-lactone).

ity extraction has been utilized before the quantitation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} by GC-MS (10,11), but the most common purification method has been nonselective solid-phase extraction (SPE) on octadecyl silica cartridges, followed by a subsequent thin-layer or liquid chromatographic step (12-18). Due to the lack of specific antibody for 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, TLC or HPLC purification has been necessary for the separation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} from 6-keto-PGF_{1α} (12,14,17-19), a prerequisite in IA determination based on 6-keto-PGF_{1α} antiserum cross-reacting with 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}.

As suggested by Powell (20), if SPE is not aimed at separation of prostanoids as a group, then its specificity for certain prostanoids can be increased by applying a more selective elution sequence. Actually, an effective purification of urinary 11-dehydrothromboxane B₂ prior to analysis by radioimmunoassay (RIA) has been obtained on C₈ silica cartridges by the use of optimized eluent and by taking advantage of the existence of analyte in two pH-dependent isomeric forms with different physicochemical properties (21).

In the present work the applicability of this strategy was extended to the SPE of urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, which exists in three isomeric forms: upon acidification the free acid, favored at alkaline pH, is converted through the hemiketal intermediate into the γ-lactone form (9,22) (Fig. 1). To optimize the proper-

ties of the sorbent for the isolation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} and the immunoreactive purity of SPE eluate, the effects of sample pH, the use of hydrocarboneous ligands other than the octadecyl moiety, and the solvent environment around the solid phase were investigated. The elaborated two-step extraction procedure on methyl silica cartridges, by combining the effects of sample pH with selective elution solvents, not only separates urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} from 6-keto-PGF_{1α}, but also gives high immunoreactive purity of the 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} extract without requiring any subsequent chromatographic purification step prior to RIA.

EXPERIMENTAL

Materials

Nonlabeled prostanoids were obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). 2,3-Dinor-6-[³H]keto-PGF_{1α} was prepared from 6-[³H]keto-PGF_{1α} (New England Nuclear, Boston, MA) by β-oxidation *in vitro* using washed mitochondria from guinea pig liver (23,24). Other ³H-labeled prostanoids were purchased from Amersham International (Amersham, Buckinghamshire, England). HPLC-grade solvents were from J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, The Netherlands), and alkyl silica cartridges (500 mg of sorbent) were from Applied Separations (Allentown, PA).

Sample Collection

Twelve-hour urine (8 PM-8 AM) was collected from eight healthy volunteers (four men, four women) who had abstained from any drug intake during the preceding 2 weeks. An additional eight 12-h urine samples were received from the same volunteers after a 3-day acetylsalicylic acid (ASA) treatment (3 × 0.5 g/day). Aliquots from urine were frozen and stored at -20°C until extraction. Pooled normal and ASA urines (before and after ASA treatment, respectively) were prepared by combining identical aliquots of individual samples.

Prostaglandin-Free Urine

Prostaglandin-free (PG-free) urine was prepared by the addition of 5% (w/v) activated charcoal (Sigma, St. Louis, MO) to pooled normal urine, and the suspension was shaken (60 min) and centrifuged (5000g, 15 min). The supernatant was filtered and stored at -20°C.

Extraction Procedure

After thawing, the samples were vortexed and centrifuged (3000g, 5 min). Ten thousand dpm of 2,3-dinor-6-[³H]keto-PGF_{1α} or 10,000 dpm of 6-[³H]keto-PGF_{1α} was added to 2 ml of urine, and 1000 pg of nonlabeled 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} together with 10,000 dpm of 6-[³H]-

keto-PGF_{1α} was added to 2 ml of PG-free urine supernatant. To convert the analyte into the γ -lactone form, the pH of the supernatant was set to 3 with HCl and incubated at room temperature (20–22°C) overnight. For the conversion of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} into free acid form, the pH of the supernatant was set to 10 with NaOH and incubated at room temperature for 1 h.

An automated SPE sample preparation system, capable of processing up to 30 cartridges simultaneously (Spe-ed Wiz 6010; Applied Separations, Allentown, PA) was employed in extractions. All solvent mixtures used in the extraction procedures were prepared daily. Alkyl silica cartridges were conditioned with 5 ml of methanol followed by 5 ml of water. Samples incubated at pH 10 were set to pH 3 with HCl immediately before application into cartridges for conversion of the carboxylate group of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} and 6-keto-PGF_{1α} into the acid form to adsorb analytes on sorbents. Cartridges were rinsed with 5 ml of water followed by 5 ml of *n*-hexane, and 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} was eluted with 5 ml of pure organic solvent or solvent mixtures. The fraction of final eluent was collected and evaporated under nitrogen at room temperature, and the dry residue was dissolved into RIA buffer. After incubation overnight at room temperature, 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} concentration, corrected with the value of recovered 2,3-dinor-6-[³H]keto-PGF_{1α}, and radioactivities were measured by RIA and liquid scintillation counting, respectively.

High-Pressure Liquid Chromatography

The HPLC system consisted of two LKB 2150 pumps controlled by an LKB 2152 HPLC controller, an LKB 2211 fraction collector, an LKB 2151 variable-wavelength monitor (LKB, Bromma, Sweden), a Rheodyne Model 7125 injector (Rheodyne, Cotati, CA) equipped with a 200- μ l loop, an RP-18 (3.2 \times 150 mm) guard column (Pierce, Oud-Beijerland, The Netherlands), and a Spheri-5 (2.1 \times 220 mm) RP-18 column (Pierce). Samples were dissolved in the mobile phase consisting of water:acetonitrile:acetic acid (72:28:0.1, v/v/v), which was delivered at 0.4 ml/min. The separation was carried out with water:acetonitrile (72:28, v/v) over 10 min and then with a linear gradient of acetonitrile to 80% over 10 min and back to 28% over 5 min. The retention volumes of prostanoids were determined by their uv absorbance at 195 nm.

Radioimmunoassay

RIA was carried out in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, containing 0.05% bovine serum albumin and 0.01% thiomersal, using 6-[¹²⁵I]keto-PGF_{1α}-tyrosine methyl ester (Institute of Isotopes, Budapest, Hungary) as labeled radioligand and nonlabeled 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} for the calibration of the standard curve. The assay mixture contained 0.1 ml of antiserum, 0.1 ml of

tracer, and 0.1 ml of either 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} standards or the unknown. The final assay volume was adjusted to 0.4 ml by the addition of assay buffer. After incubation at 4°C overnight, dextran-coated charcoal was used for the separation of bound from free fraction as described elsewhere (25).

Polyclonal 6-keto-PGF_{1α} antisera were used at final dilutions which bound 30% of the tracer. Antiserum I was from the Institute of Isotopes, and antisera II and III were developed in-house in rabbits. The cross-reactions of antisera against 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} at the whole range of the standard curve were 100, 51, and 39% for antiserum I, II, and III, respectively. Unless otherwise indicated, antiserum AI was used throughout the experiments.

Gas Chromatography–Mass Spectrometry

The purification and GC–MS determination of samples were performed as described earlier (26). Briefly, after methoximation, urine (spiked with 2,3-dinor-6-[²H]keto-PGF_{1α}) was applied to a phenylboronic acid cartridge (Varian, Harbor City, CA), and 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} was eluted with water (adjusted to pH 9 with NaOH):methanol (60:40, v/v). The eluate was diluted with water to a water:methanol ratio of 85:15 (v/v), adjusted to pH 3.5 with formic acid, and applied to a C₁₈ silica cartridge. The cartridge was washed with water:methanol (85:15, v/v), and 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} was eluted with ethyl acetate. This was evaporated under nitrogen, and the dry residue was dissolved in ethanol and applied on a silica gel TLC plate, which was developed in the organic phase of ethyl acetate:acetic acid:hexane:water (54:12:25:100, v/v/v/v). 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1α} was eluted from the plate with ethyl acetate:acetic acid:hexane (54:12:25, v/v/v).

After evaporation under nitrogen, the dry residue of the methoxime derivative of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} was converted into pentafluorobenzyl ester trimethylsilyl ether derivative, and GC–MS analysis was carried out using negative ion chemical ionization.

RESULTS

Effects of Sorbent–Solvent Combination and Sample pH on the Separation of 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1α} from 6-Keto-PGF_{1α} and on the Immunoreactive 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1α} Concentration

In studies with PG-free urine, spiked with nonlabeled 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} together with 6-[³H]keto-PGF_{1α}, most solvents (acetone, acetonitrile, ethanol, ethyl acetate, methanol, methyl formiate, and tetrahydrofuran) gave >75% recovery of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} from columns with different alkyl chain lengths (C₁, C₄, C₈, and C₁₈) at either pH 3 or pH 10 and did not separate 2,3-

dinor-6-keto-PGF_{1 α} from 6-keto-PGF_{1 α} . At both incubation pH values an extraction efficiency of over 75% for 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} together with a separation ratio of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} /6-keto-PGF_{1 α} > 2 was achieved on a C₁ silica cartridge eluted with chloroform or diethyl ether and on a C₁₈ silica cartridge eluted with chloroform. The method blank did not contribute to the recovery values of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} obtained after extractions, as indicated by the values found with unspiked PG-free urine as sample, which remained below the detection limit (1 pg) of the assay.

After C₁ SPE of pooled normal urine, the immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} concentration was 50% lower ($P < 0.01$) in a sample eluted with chloroform than with diethyl ether, and the value measured in C₁ chloroform eluate was half of that ($P < 0.01$) measured in C₁₈ chloroform eluate. The effect of sorbent type on the amount of immunoreactive material was also seen in a sample eluted with methanol from C₁, C₄, C₈, and C₁₈ cartridges: the decrease in the sorbent alkyl chain length resulted in a decrease in the immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} concentrations (C₁ vs C₄, 24%; C₁ vs C₈, 47%; and C₁ vs C₁₈, 50%, $P < 0.01$). The dependence on the amount and/or the nature of coeluting interfering substances on sample pH was found in extractions on all sorbents: in urine extracted after incubation at pH 3, 20–30% lower ($P < 0.02$) immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} concentrations in eluates were measured than after incubation at pH 10.

Optimization of One-Step Extractions

Lowering the elution strength of chloroform and diethyl ether with *n*-hexane (added in such a ratio that the recovery of 2,3-dinor-6-[³H]keto-PGF_{1 α} exceeded 75%) in extractions on a C₁ silica cartridge diminished the degree of coelution of interfering material in the eluate by 25–50%. The value measured in chloroform:hexane (85:15, v/v) eluate was 29% lower ($P < 0.01$) than that measured in diethyl ether:hexane (85:15, v/v) eluate (Table 1). Removal of coeluting material by ethanol:water (15:85, v/v) wash (the loss of 2,3-dinor-6-[³H]keto-PGF_{1 α} did not exceed 25%) before elution with chloroform or diethyl ether resulted in decreases in the immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} concentrations similar to those obtained with the fine adjustment of the eluent strength with *n*-hexane. After the wash step, the immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} concentration measured in chloroform eluate was 24% lower ($P < 0.01$) than that measured in diethyl ether eluate.

In optimized one-step C₁ SPE the use of chloroform instead of diethyl ether was preferred. To achieve an extraction efficiency in excess of 75%, urine samples incubated at pH 3 overnight were extracted on a C₁ silica cartridge without employing a wash solvent before

TABLE 1

Effect of Fine Adjustment of Solvent Elution Strength on the Immunoreactive 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1 α} Concentration

Solvent	Volume (%)	Incubation pH	Recovery (%)		Concentration (pg/ml)
			6-K	D-6-K	
Chloroform	100	3	14.1	83.6	457
	100	10	6.4	92.3	544
	90	3	12.8	80.9	396
	90	10	6.1	88.2	465
	85	3	9.4	78.8	345
Diethyl ether	85	10	4.5	85.4	393
	100	3	46.0	99.0	880
	90	3	40.2	97.5	765
	85	3	34.0	90.4	488
	80	3	24.0	80.2	456

Note. Pooled normal urine was incubated at pH 3 overnight or at pH 10 for 1 h at room temperature and extracted on a C₁ silica cartridge. The elution solvents used were mixed with hexane in the volume ratio listed. The mean values of two independent extractions are indicated. The relative standard deviations are all less than 4%. The extraction procedure is described under Experimental.

the elution of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} with chloroform:hexane (85:15, v/v) from the cartridge. For C₁ SPE of urine incubated at pH 10 for 1 h, an ethanol:water (15:85, v/v) wash step was included before the elution of analyte with pure chloroform from the sorbent. Correlation coefficients in addition and dilution experiments after extractions at pH 3 or at pH 10 were >0.99. However, the values of individual volunteer samples (four normal, four ASA urines), determined with two other antisera (AII and AIII), were two- to fivefold higher than those obtained with antiserum AI, suggesting the presence of nonspecific immunoreactive material in SPE eluates.

Selective Two-Step Extraction Method

An additional improvement in the immunoreactive purity of analyte could be achieved with a combination of the effects of sample pH and selective solvents in two-step extractions on a C₁ silica cartridge (Fig. 2). After thawing, urine samples were vortexed and centrifuged. 2,3-Dinor-6-[³H]keto-PGF_{1 α} was added to supernatants, their pH was set to 3, and the mixtures were incubated overnight at room temperature. The first extraction was made on a C₁ silica cartridge conditioned with 5 ml of methanol followed by 5 ml of water. After application of the sample, the cartridge was rinsed with 5 ml of water followed by 5 ml of *n*-hexane, and 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} was eluted with 5 ml of diethyl ether:hexane (85:15, v/v). It was evaporated under nitrogen and the dry residue dissolved in 2 ml of PG-free urine. PG-free urine was adjusted to pH 10, incubated 1

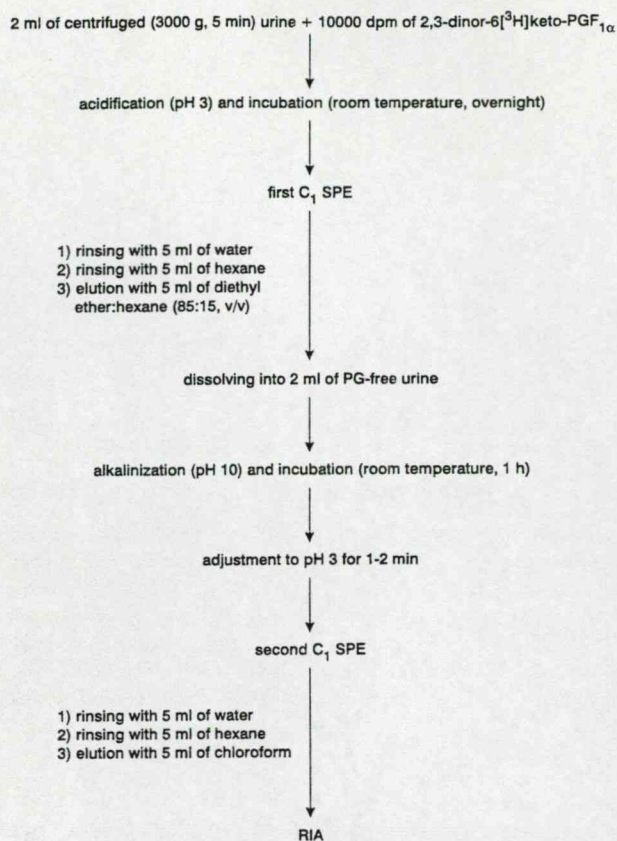


FIG. 2. Summary of the steps involved in two-step C₁ SPE of urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} prior to RIA.

h at room temperature, and set to pH 3 just before the second extraction on a C₁ silica cartridge. The extraction procedure was the same as in the first step, with the exception that 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} was eluted with 5 ml of chloroform from the cartridge.

The effects of the change of sample pH and solvent in two-step extractions are presented in Table 2. When sample pH was changed, the immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} concentration was reduced 25-30% ($P < 0.02$) compared with values after two-step extraction at pH 3 or at pH 10. The change of solvent together with the change of pH resulted in a 40-45% ($P < 0.01$) decrease in 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} concentration. Also, the results of the comparisons of immunoreactive 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} concentrations in pooled normal and ASA urines, measured after C₁₈ SPE and after one- and two-step C₁ SPE (Table 3), demonstrate the selectivity of the optimized two-step SPE method.

Evaluation of Assay

Immuno-HPLC profiles after the selective two-step C₁ SPE procedure and, for comparison, after nonselective

TABLE 2

Effects of Sample pH and Elution Solvent in Two-Step C₁ SPE on the Immunoreactive 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1α} Concentration

Combination	pH	Solvent	Recovery (%)		Concentration (pg/ml)
			6-K	D-6-K	
	pH 3-pH 3	I + II	8.7	78.9	282
	pH 3-pH 10	I + II	2.8	86.5	210
		I + I	18.6	90.4	395
		II + II	1.5	73.6	336
	pH 10-pH 10	I + II	3.2	85.2	313

Note. Pooled normal urine was incubated at pH 3 overnight or at pH 10 for 1 h at room temperature before extraction on a C₁ silica cartridge using diethyl ether:hexane (85:15) (I) or pure chloroform (II) as eluent. The dry residue obtained in the first extraction was dissolved in PG-free urine and incubated either at pH 3 overnight or at pH 10 for 1 h at room temperature before the second extraction on a C₁ silica cartridge. The mean values of two independent extractions are indicated. The relative standard deviations are all less than 5%. The extraction procedure is described under Experimental and in Fig. 2.

tive extraction on a C₁₈ silica cartridge and optimized one-step extraction on a C₁ silica cartridge are shown in Fig. 3. In all SPE eluates most of the immunoreactivity was found in fractions comigrating with the authentic 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}. Ratios of immunoreactivity in

TABLE 3

Immunoreactive 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1α} Concentrations (ng/g Creatinine) in Normal and ASA Urines after Different Extraction Procedures

SPE	Recovery (%)		Urine		Drop after ASA (%)
	6-K	D-6-K	Normal	ASA	
Nonselective	91.3	89.7	3270	2200	33
Optimized one-step, pH 3	9.9	75.1	404	132	67
Optimized one-step, pH 10	5.9	85.2	407	136	67
Selective two-step	2.4	82.1	268	74	72

Note. 2,3-Dinor-6-keto-PGF_{1α} concentrations were measured in pooled normal and ASA urines after different extraction procedures. In nonselective SPE, urines were incubated at pH 3 overnight at room temperature and extracted on a C₁₈ silica cartridge. The cartridge was washed with 5 ml of ethanol:water (15:85, v/v) before the elution of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} with ethyl acetate. In optimized one-step SPE, urines incubated at pH 3 were extracted on a C₁ silica cartridge using chloroform:hexane (85:15, v/v) as eluent. In optimized one-step C₁ SPE of urines incubated at pH 10, the cartridge was washed with 5 ml of ethanol:water (15:85, v/v) before the elution of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} with chloroform. The extraction procedure is described under Experimental and in Fig. 2. The mean values of two independent extractions are indicated. The relative standard deviations are all less than 5%.

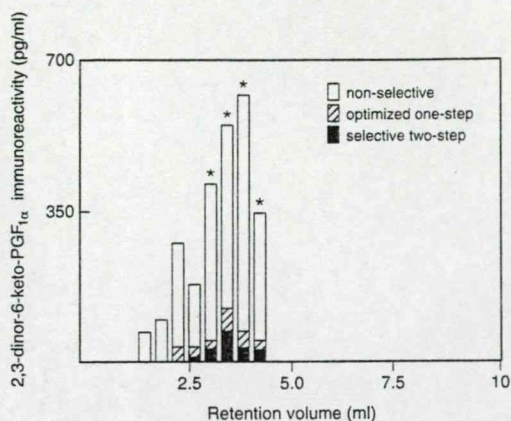


FIG. 3. Immunochromatogram of pooled normal urine after non-selective C_{18} SPE (open bars), optimized one-step C_1 SPE at pH 3 (crossed bars; both described in Table 3), and selective two-step (solid bars) C_1 SPE (described in Fig. 2). HPLC conditions are described under Experimental. Fractions were collected for every 1 min (0–25 min) and the concentration of 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ was measured by RIA in each fraction. The retention volume of authentic 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ is indicated by an asterisk. The retention volumes (ml) of prostanoids were 6-ketoprostaglandin $F_{1\alpha}$ (hemiketal form), 1.9–2.1; 2,3-dinor-thromboxane B_2 , 1.7–2.3; 11-dehydrothromboxane B_2 (acyclic form), 2.4–2.7; 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin $F_{1\alpha}$ (lactone form), 2.9–4.2; 8-epiprostaglandin $F_{2\alpha}$, 3.6–4.0; 11-epiprostaglandin $F_{2\alpha}$, 3.9–4.3; thromboxane B_2 , 3.9–4.8; prostaglandin $F_{2\alpha}$, 5.3–5.6; 11-dehydrothromboxane B_2 (lactone form), 5.5–5.7; prostaglandin E_2 , 5.6–5.8; prostaglandin D_2 , 6.0–6.2; 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin $F_{2\alpha}$, 6.3–6.5; and 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin E_2 , 6.8–7.0.

this area, calculated as percentage of total 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ immunoreactivity, were 75 and 80% in the eluates obtained after nonselective and optimized one-step extraction, respectively, and 95% in the eluate obtained after two-step extraction. However, the immunoreactive concentration measured from the fractions comigrating with the authentic 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ was 90% lower in the eluate obtained after optimized one-step extraction than the value measured after non-selective extraction. The immunoreactive concentration in respective fractions after selective two-step extraction was half the value measured after optimized one-step extraction.

The selective extraction method was also evaluated by the use of multiple antisera. 2,3-Dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ concentrations were measured in 16 samples (eight normal, eight ASA urine) after selective two-step C_1 SPE. Each sample was determined with three (AI–AIII) different antisera after duplicate extractions. The correlation coefficient calculated for each pair of series was >0.97 for each pair of data (AI vs AII, AI vs AIII, etc.).

Further validation of the assay was made by comparing the results obtained by RIA after extraction of urine samples collected from eight volunteers before and after ASA treatment, with the results obtained by gas chro-

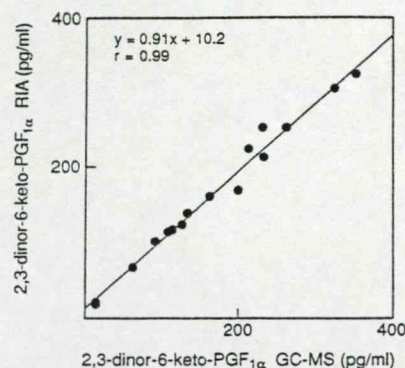


FIG. 4. Correlation of 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ values in 16 samples (8 normal, 8 ASA urine) obtained in RIA after selective two-step C_1 SPE (described in Fig. 2) with values obtained in GC-MS.

matography–negative ion chemical ionization–mass spectrometry. A significant correlation ($r > 0.99$) was observed between samples measured by these two techniques (Fig. 4). The 12-h excretion rates of 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ in the eight volunteers before and after ASA treatment were 268 ± 204 and 83 ± 65 ng/g creatinine, respectively. The inhibitory effect of ASA on the excretion of 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$, calculated for each individual volunteer, was $74 \pm 12\%$.

The accuracy of the method was studied by spiking urine with different amounts (50–1500 pg) of 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$. After extraction followed by RIA, the measured values were estimated by fitting a regression line for measured (y) versus added (x) amounts (Fig. 5). A highly significant correlation ($r > 0.99$) was obtained. The endogenous level in the urine pool as calculated from the intercept of the regression line (204 pg/ml)

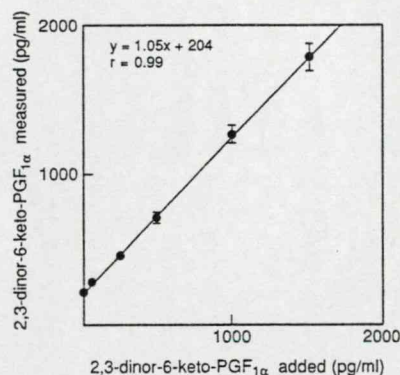


FIG. 5. Linearity obtained with known amounts of standard 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ in pooled normal urine. Mean values (\pm SD) after three selective two-step C_1 SPE (described in Fig. 2) obtained in RIA are indicated. The y -intercept of the regression line represents the endogenous concentration of 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$.

showed a strong correlation with the value measured from the unspiked sample (210 pg/ml).

The reproducibility of the recovery for 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} was demonstrated by the extraction efficiency of $79 \pm 12\%$ (mean \pm SD, $n = 20$) determined with the tritiated 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} added to urine as recovery marker. The reproducibility of the selective procedure was further evaluated in 10 independent assays by extracting urine samples containing low (20 pg/ml), medium (160 pg/ml), and high (540 pg/ml) concentrations of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}. The coefficients of variation were 9, 6, and 7% for low, medium, and high concentrations, respectively.

DISCUSSION

Immunoaffinity extraction utilizing 6-keto-PGF_{1α} antiserum cross-reacting with 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} has been employed prior to the determination of urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} by GC-MS (10,11), which separates 6-keto-PGF_{1α} and other cross-reacting compounds present after extraction from the analyte during the gas chromatography step. However, due to the lack of a specific antibody, other purification methods are needed for the isolation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} from 6-keto-PGF_{1α} and other interfering substances prior to analysis by IA.

Under acidic conditions (pH 2–4) the hemiketal hydroxyl at C-4 and the carboxyl group of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} are in favorable positions for the formation of the five-membered ring (γ -lactone). In alkaline medium (pH 8–10) the hemiketal structure hydrolyzes to the free acid form (9,22). The existence of these pH-dependent isomeric forms has been utilized in selective liquid-liquid extraction, resulting in the removal of acidic, neutral, and basic contaminants from urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} (9). However, after extraction an additional HPLC or TLC step has usually been applied prior to analysis (19,27,28).

The most common method used in the prepurification of urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} before quantitation is a nonselective solid-phase extraction on octadecyl silica cartridges, optimized for high recovery of a wide range of prostanoids varying in polarity (20). Further sample cleanup has been achieved by a subsequent TLC or HPLC step (12–18). Our aim in this study was to optimize the properties of the stationary phase for the isolation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, with special emphasis on the elimination of additional chromatographic purifications before RIA. To avoid differences between sorbent materials obtained from different manufacturers, alkyl silica cartridges from the same producer were used.

The first step involved the separation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} from 6-keto-PGF_{1α}. To exclude the simultaneous presence of the different chemical forms of ana-

lyte under the conditions used during extraction, potentially affecting the recovery, samples were incubated overnight at pH 3 or for 1 h at pH 10. From solvents belonging to different selectivity groups (29), separation was achieved on a C₁ silica cartridge with chloroform and diethyl ether and on a C₁₈ silica cartridge with chloroform. The similar behavior of methyl and octadecyl silica and the differing behavior of butyl silica, seen here with chloroform, have been reported earlier with dichloromethane (30). The separation achieved at pH 3 is probably based on the polarity difference between the apolar γ -lactone of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} and the hemiketal structure of 6-keto-PGF_{1α} which, due to the location of its hydroxyl at C-6, is unable to form the five-membered ring. As the retention on reversed-phase separations increases with increasing the solute chain length (31), the separation at pH 10 may be due to the additional two carbons in 6-keto-PGF_{1α}.

In the second step, our emphasis was on the immunoreactive concentration of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}. In urine extracted after incubation at pH 10, higher concentrations were measured than after incubation at pH 3, indicating pH dependence on the amount and/or the nature of coeluting interfering substances. The increase in the sorbent alkyl chain length resulted in an increase in immunoreactive concentration after extraction. C₁₈ silica seems to adsorb the highest amount of substances, which are coeluted with the analyte and interfere in the RIA. The lowest concentration, measured after C₁ SPE with chloroform as eluent, suggests that methyl silica chloroform has a unique selectivity toward 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}. This is probably due to the contributions of various molecular forces in defining the interaction between solvent and solute molecules (32).

After optimization of the elution solvent for C₁ SPE, the wash step had no effect on the measured immunoreactivity. The interfering material, which could be removed by wash, was retained on the sorbent and did not coelute with the analyte. The immunoreactive concentration after optimized one-step SPE on a C₁ silica cartridge was one-eighth of that found after nonselective SPE on a C₁₈ silica cartridge. However, the values measured after optimized one-step extraction with different antisera were not similar, suggesting the presence of nonspecific material in the eluates.

The immunoreactive purity of SPE eluate could be increased in two-step extraction on a C₁ silica cartridge by changing both the elution solvent and the incubation pH of sample after the first extraction. In the immunohPLC profile after two-step extraction, 95% of the total immunoreactivity comigrated with the authentic 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}. The respective values after nonselective and optimized one-step SPE were 75 and 80%, the rest of the immunoreactivity being found in the area of authentic 6-keto-PGF_{1α}. However, the immunoreac-

tive concentration measured in the fractions of authentic 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} after nonselective and optimized one-step SPE was approximately 10 and 2 times higher than the respective values after two-step extraction, indicating the contribution of nonspecific interfering substances. The low immunoreactive concentration found after selective two-step SPE supports the assumption that the interfering material present in the diethyl ether:hexane (85:15, v/v) eluate at pH 3 differs from that present after optimized one-step extraction and, after incubation at pH 10, it does not coelute with the analyte in the second extraction with chloroform.

The change of elution solvent and the incubation pH of sample in the two-step SPE resulted in an overall recovery of >75% and almost complete separation of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} from 6-keto-PGF_{1α} (>97%). In addition, prostaglandins D₂, E₂, F_{2α}, 11-dehydrothromboxane B₂, and thromboxane B₂, representing fairly different chemical functionalities and polarities, were all poorly recovered (extraction efficiencies of 5–25%, data not shown), supporting the selectivity of the present method.

The reliability of two-step extraction was demonstrated by the good linearity obtained with known amounts of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} added and by the high reproducibility achieved in a wide range of analyte concentrations. The validity of the method was further evaluated by comparing the concentrations measured with three different antisera. In contrast to optimized one-step SPE, after which the concentrations obtained in RIA were dependent on the antiserum reflecting the unsatisfactory purification capacity of the method, the high correlations observed after two-step extraction indicated that the selectivity achieved in the extraction, rather than the unique specificity of a particular antiserum, accounted for the immunoreactivity found. The concentrations of samples measured in RIA after two-step extraction showed also an excellent correlation with those measured by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry.

Considerable (up to 13-fold) interindividual variations in excretion rates of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} have been reported by different groups (9,16,33,34); smoking (11,35) and the amount of daily sodium intake (27) are possible explanations for variations. Excretion of 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} measured by GC-MS has been in the range of 38–570 ng/g creatinine (11,15,16,28,33) and the inhibitory effect of treatment with a high dose of ASA in the range of 67–77% (33,36). Thus, the values obtained by our C₁ SPE-RIA method in human volunteers fall well within the range reported by other groups using GC-MS quantitation.

The foremost advantages of IA methods lie in their high-sample capacities and high sensitivities. In urine, due to the presence of a large number of potentially cross-reacting products of arachidonic acid metabolism

and unidentified contaminants interfering differently with different antibodies, the introduction of a purification step prior to IA is a prerequisite for obtaining reliable results. The elaborated two-step SPE procedure is a simple and selective method that makes possible the valid quantitation of urinary 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} in a large series of samples by RIA without the need of an additional TLC or HPLC purification step.

This type of sample preparation strategy, i.e., optimization of the properties of the sorbent and the solvent environment around the solid phase, could also be applied to purification of leukotrienes, lipoxins, and cytochrome P450 products of arachidonic acid metabolism.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Yrjö Jahnsson Foundation, the Emil Aaltonen Foundation, and the Science Foundation of the City of Tampere.

REFERENCES

- Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S., and Vane, J. R. (1976) *Prostaglandins* 12, 897–913.
- Johnson, R. A., Morton, D. R., Kinner, J. H., Gorman, R. R., McGuire, J. C., and Sun, F. F. (1976) *Prostaglandins* 12, 915–928.
- Butt, R. W., and Buchanan, M. R. (1983) *Thromb. Res.* 29, 469–470.
- Roy, L., Knapp, H., Robertson, R. M., and FitzGerald, G. A. (1985) *Circulation* 71, 434–440.
- Fischer, S., Scherer, B., and Weber, P. C. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 710, 493–501.
- Seyberth, H. W., Tulassay, T., Köhl, P. G., Soeding, K., Rascher, W., and Schweer, H. (1988) *Prostaglandins* 35, 221–232.
- Rosenkrantz, B., Fischer, C., Reimann, I., Weimer, K. E., Beck, G., and Frölich, J. C. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 619, 207–213.
- Rosenkrantz, B., Fischer, C., Weimer, K. E., and Frölich, J. C. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10194–10198.
- Falardeau, P., Oates, J. A., and Brash, A. R. (1981) *Anal. Biochem.* 115, 359–367.
- Chiabrando, C., Pinciroli, V., Campoleoni, A., Benigni, A., Piccinelli, A., and Fanelli, R. (1989) *J. Chromatogr.* 495, 1–11.
- Barrow, S. E., Ward, P. S., Sleightholm, M. A., Ritter, J. M., and Dollery, C. T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 993, 121–127.
- Ciabattoni, G., Boss, A. H., Daffonchio, L., Daugherty, J., FitzGerald, G. A., Catella, F., Dray, F., and Patrono, C. (1987) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 17, 598–602.
- Alessandrini, P., McRae, J., Feman, S., and FitzGerald, G. A. (1988) *N. Engl. J. Med.* 319, 208–212.
- Morio, H., Hirai, A., Terano, T., and Yoshida, S. (1993) *Thromb. Haemostas.* 69, 276–281.
- Fischer, S., Scherer, B., and Weber, P. C. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 750, 127–133.
- Vesterqvist, O., and Green, K. (1984) *Prostaglandins* 28, 139–154.
- Castagnoli, M.-N., Belucci, S., Maclouf, J., and Pradelles, P. (1987) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 17, 603–607.
- Zureick, S., Nadler, J., Yamamoto, J., and Horton, R. (1990) *Clin. Chem.* 36, 1978–1980.

19. Larsson, P. T., Olsson, G., Granström, E., Hansson, G., and Hjerdahl, P. (1992) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 413-421.
20. Powell, W. S. (1980) *Prostaglandins* **20**, 947-957.
21. Riutta, A., Mucha, I., and Vapaatalo, H. (1992) *Anal. Biochem.* **202**, 299-305.
22. Bundy, G. L., Lin, C. H., and Sih, J. C. (1981) *Tetrahedron* **37**, 4419-4429.
23. Hamberg, M. (1968) *Eur. J. Biochem.* **6**, 135-146.
24. Hansson, G., and Granström, E. (1976) *Biochem. Med.* **15**, 95-113.
25. Mucha, I., Riutta, A., and Vapaatalo, H. (1991) *Eicosanoids* **4**, 1-7.
26. Weber, C., Höller, M., Beetens, F., de Clerk, F., and Tegtmeier, F. (1991) *J. Chromatogr.* **562**, 599-611.
27. Watson, M. L., Goodman, R. P., Gill, J. R., Branch, R. A., Brash, A. R., and FitzGerald, G. A. (1984) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**, 304-308.
28. Wennmalm, Å. (1992) *Clin. Physiol.* **12**, 107-115.
29. Snyder, L. R. (1978) *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 223-234.
30. Karch, K., Sebastian, I., Halasz, I., and Engelhardt, H. (1976) *J. Chromatogr.* **122**, 171-184.
31. Karch, K., Sebastian, I., and Halasz, I. (1976) *J. Chromatogr.* **122**, 3-16.
32. Bakalyar, S. R., McIlwrick, R., and Roggendorf, E. (1977) *J. Chromatogr.* **142**, 353-365.
33. FitzGerald, G. A., Oates, J. A., Hawiger, J., Maas, R. L., Roberts, L. J., II, Lawson, J. A., and Brash, A. R. (1983) *J. Clin. Invest.* **71**, 676-688.
34. Ritter, J. M., Cockcroft, J. R., Doktor, H. S., Beacham, J., and Barrow, S. E. (1989) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **28**, 573-579.
35. Nowak, J., Murray, J. J., Oates, J. A., and FitzGerald, G. A. (1987) *Circulation* **76**, 6-14.
36. Edlund, A., Musatti, L., and Wennmalm, Å. (1990) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **39**, 37-41.

Mucha I: Eljárás biológiai minták 8-izo-prostaglandin F_{2α} tartalmának radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jód-125 izotóppal jelzett radioligandum előállítására. Hung. Pat. Appl. 2001. 01. 25., ügyszám: P010038

Szolgálati találmány

**Eljárás biológiai minták 8-izo-prostaglandin F_{2α} tartalmának
radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jód-125
izotóppal jelzett radioligandum előállítására**

Bejelentő:

Izotóp Intézet Kft., Budapest

Feltaláló:

Dr. Mucha István, Budapest

A bejelentés napja:

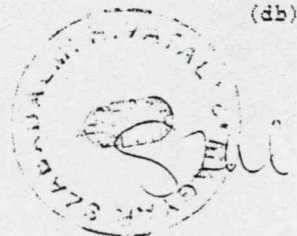
2001. január 25.



MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

Budapest V., Garibaldi utca 2.
Postacím: 1370 Budapest, Pf. 552
Tel.: 312 4400

	Iktatás	
Iktatási szám	Dátum	Iktatás
0104088	2001.01.25.	323332
Szabadalom / Bejelentés *		
Ügyszám: P0100381		
Ugyintéző:		
Benyújtó: IZOTÓP INTÉZET KFT.		
Képviselő:		
Tárgy: ELJÁRÁS BIOLÓGIAI MINTÁK 8-IZO-PRO		
Benyújtott iratok:		
Kérelm	(db)	1
Leírás	(db)	3
Kivonat	(db)	3
Rajz	(db)	3



A találmány tárgya eljárás biológiai minták 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ tartalmának radioimmunológiai meghatározására, melynek során megmérjük ^{125}I -izotóppal jelzett nagy fajlagos aktivitású 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ -származék mint nyomjelző anyag (továbbiakban radioligandum vagy tracer) specifikus antitesthez való kötődését ismert mennyiségű, különböző koncentrációjú standard oldatok és a meghatározandó minták jelenlétében, majd a standardokhoz tartozó kötődésváltozások ismeretében a mintákhoz tartozó kötődésváltozásokból kiszámítjuk azok hatóanyagtartalmát.

A találmány szerint ebben az immunkémiai reakcióban tracerként új típusú, (I) képletű, ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ -monojód-tirozin-metilészter származékot (továbbiakban ^{125}I -8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -TME) alkalmazunk.

A találmány tárgya továbbá ezen új szerkezetű radioligandum előállítására szolgáló eljárás.

Ismert, hogy az élő szervezetekben arachidonsavból enzimatis úton több, mint száz nagyhatású bioaktív anyag (prostaglandinok, tromboxánok, leukotriének, lipoxinok, más hidroxizsírsavak) keletkezik. Az utóbbi évek jelentős kutatási eredményeként azonban ismertté vált az is, hogy arachidonsavból prosztanoidok nemcsak enzimatis úton keletkezhetnek, hanem közvetlen oxidációval is. Az így keletkező vegyületek az enzimatisan képződő prosztanoidok enantiomer formái, amelyeket izoprosztanoid általános névvel jelölnek. Mennyiségük egyenes arányban áll a szervezetben lévő oxidatív szabadgyökök mennyiségével, ezért meghatározásuk a korszerű orvosi biológiai kutatásokban kiemelt fontosságú. Az izoprosztanoidok, éppen úgy, mint maga az arachidonsav, foszfolipid-észter formában is létezhetnek, tehát szabad és kötött frakciójuk is van, míg az enzimatis úton keletkező prosztanoidok a biológiai rendszerekben összetett lipidekben nem fordulnak elő, csak szabad savként. Az oxidatív státusz kísérletes vizsgálatában mind a szabad, mind a totál (szabad + foszfolipidben kötött) izoprosztanoid koncentráció mérését alkalmazzák.

Az izoprosztanoidok legkorábban felfedezett képviselője a (III) képlet szerinti 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (a továbbiakban 8-izo-PGF $_{2\alpha}$). (A szakirodalomban használt egyéb megnevezései: 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$, iPF $_{2\alpha}$ -III). A biológiai rendszerekben enzimatis úton keletkező prosztanoid $F_{2\alpha}$ -tól abban tér el, hogy a hepténsav oldallánc a ciklopentán gyűrűhöz (a C8 pozícióban) nem alfa, hanem béta térállásban kapcsolódik.

Az 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ a biológiai rendszerekben - más arachidonsav-metabolitokhoz hasonlóan - igen kis koncentrációban (kisebb, mint 10^{-12} mol/l) fordul elő, így mérésére csak a legérzékenyebb eljárások alkalmasak.

Az ismert műszeres analitikai módszerek közül ilyen a tömeg-spektrometria, amelynek nagyon sok kivitelezési formája terjedt el. Ezt tekintik a legpontosabb, legmegbízhatóbb mennyiségi analitikai módszernek. Az eljárás azonban igen drága berendezéseket igényel, és a biológiai anyagok méréshez való előkészítése is költség- és időigényes.

A tömegspektrometriás mérés fenti hátrányai miatt az ilyen kis koncentrációjú bioaktív anyagok nagy számban végzendő gyors, olcsó, kellő érzékenységű és megfelelő pontosságú meghatározására csak az antigén - antitestkötődésen alapuló immunoassay módszerek jöhetnek számításba. Kis molekulájú anyagok esetében az ún. „vetélkedő” eljárás alkalmazható, amelyben állandó (és limitált) koncentrációjú antitestet állandó koncentrációjú jelzett antigénnel (tracerrel) és változó koncentrációjú jelzetlen antigénnel (standarddal, illetve a mérendő mintában lévő antigénnel) reagáltatva, a tracer antitesthez való kötődési aránya a rendszerben lévő jelzetlen antigén mennyiségének függvényében változik.

A vetélkedő immunoassay módszerek legrégebben ismert, elterjedt változata a radioimmunoassay (RIA) eljárás, amelyben az antigén jelzésére magas fajlagos aktivitású radioizotópot használnak.

Ilyen célra eddig kizárólag tríciummal jelzett 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -t alkalmazták, amelynek kidolgozására két szakirodalmi forrás ismert (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 58: 319, 1998; J Pharmacol Exp Ther 275: 94, 1995). A tríciummal jelzett traceren alapuló RIA módszer sikeres kutatási felhasználásáról ugyancsak ismertek szakirodalmi adatok (pl. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 61: 203, 1999; J Vasc Res 36, 486, 1999; Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 63: 149, 2000).

A tríciummal jelzett tracerek általában jól alkalmazhatók RIA meghatározásra. Elméleti előnyük, hogy ún. „homológ” immunoassay rendszert képeznek, mivel a tracer és a jelületlen ligandum kémiai azonosak. További előnyük, hogy a tríciummal általában elérhető az a fajlagos aktivitás, amely a szükséges és elvárt érzékenységet biztosítja. A prosztanoidok ebből a szempontból különösen előnyösek, mert megfelelő bioszintetikus módszerrel egyetlen molekulába akár 8 tríciumatom is beépíthető, így a tracer magas (mintegy 8 TBq/mmol; nagyobb, mint 200 Ci/mmol) fajlagos aktivitással állítható elő.

A gyakorlati alkalmazásnál előnyt jelent, hogy az izotóp viszonylag hosszú (mintegy 12 év) felezési ideje miatt a tracer stabilnak tekinthető, és az ilyen traceren alapuló RIA-k pontossága, reprodukálhatósága ennek eredményeképpen általában igen jó.

A tríciummal jelzett RIA-k általános hátránya, hogy a tracerek előállítása bonyolult, soklépéses kémiai szintézist igényel, amely csak speciálisan erre alkalmas laboratóriumban végezhető. Általános hátrány az is, hogy a trícium mérése költséges, munkaigényes, a környezeti radioaktív háttér-szennyezésekre igen érzékeny, és a mérési idő is hosszú.

A 8-izo-PGF_{2α} célvegyületre a fenti szakirodalmi forrásokban ismertetett tríciumos RIA rendszer esetében speciális hátrány, hogy a tracer előállításához használt szintézis-módszerrel csak egy tríciumatom épül be a célvegyületbe, ezért a fajlagos aktivitás alig több, mint egytizede (0,888-0,925 TBq/mmol; 24-25 Ci/mmol) a fent említett maximumnak.

A teljesség kedvéért meg kell említeni, hogy a radioizotópokra épülő RIA módszer számos esetben eredményesen helyettesíthető nem-radioizotópos eljárással is. Ennek egyik változatában, az enzim-immunoassayben (EIA), a radioaktív tracer helyett enzimmel jelölt antigén-származékot alkalmaznak. A 8-izo-PGF_{2α} mennyiségi meghatározására ilyen módszert ismerünk a szakirodalomból (J Pharmacol Exp Ther 275: 94, 1995), illetve az ugyanezen eljárásra épülő mérőrendszer kereskedelmi terméként is kapható (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, Michigan, USA). Az EIA módszer alkalmazásáról több szakirodalmi forrást (pl.: J Pharm Exp Therap., 269: 1280, 1994; J Neurosci Methods 68: 133, 1996; Methods Mol Biol 105: 201, 1998; Anal Biochem 272: 209, 1999; Am J Respir Crit Care Med 162: 1175, 2000) ismerünk. Az ismert ELISA módszer előnye, hogy kellően érzékeny, és nem igényel radioaktív anyagot. A mérési elvéből következően azonban pontossága nem éri el a RIA pontosságát, gyakorlati hátránya pedig az, hogy a csak radioizotópos mérés technikával ellátott laboratóriumnak ilyen technikára való felszerelése jelentős beruházást igényel.

Tríciummal jelzett tracer helyett számos kismolekulájú bioaktív anyag esetében eredményesen alkalmaznak ¹²⁵I-izotóppal jelzett tracereket is. Ezeket oly módon nyerik, hogy az alapmolekulából előzetesen olyan - rendszerint aromás csoportot tartalmazó - származékot állítanak elő, amelyekre a ¹²⁵I-izotóp irányítottan építhető be.

A ¹²⁵I-izotóppal jelzett tracer alkalmazásának igen nagy előnye, hogy a jelölendő alapmolekula tríciummal jelzett formájának bonyolult, költséges előállítására nincs szükség. A radiojódos jelzés feltételei a biológiai-kémiai kutatóhelyek nagy részében rendelkezésre állnak, míg a tríciummal végzett szerveskémiai műveletek csak erre speciálisan felszerelt izotóp-laboratóriumban (méginkább izotóp-üzemben) végezhetőek el.

RIA-felhasználás szempontjából a ¹²⁵I-izotóp rövid (60 nap) felezési ideje némileg kedvezőtlen a tríciumhoz képest, ezt a hátrányt azonban az elérhető 37 – 74 TBq/mmol (1000 - 2000 Ci/mmol) fajlagos aktivitásból adódó rendszerint nagyobb érzékenység és az egyszerű, olcsó mérés technika kompenzálja. A ¹²⁵I-izotóp alkalmazása gazdaságos; a tracer viszonylag alacsony előállítási költséggel közvetlenül a RIA felhasználás helyén előállítható, míg a tríciummal jelzett tracereket általában igen drágán, kereskedelmi terméként kell megvásárolni. A jód-125 jelzés továbbá olyan laboratóriumokban is lehetővé teszi a RIA módszer használatát, ahol a trícium-izotóp méréséhez szükséges drága berendezés nem áll rendelkezésre, vagy ahol a RIA mérés-technikai feltételeit az egyéb anyagok mérése miatt eleve csak ¹²⁵I-izotópra hozták létre.

A találmány célja tehát olyan RIA eljárás kidolgozása, mellyel a 8-izo-PGF_{2α} koncentrációja egyszerűen, pontosan és érzékenyen meghatározható, úgy, hogy tríciummal jelzett 8-izo-PGF_{2α} helyett ¹²⁵I-izotóppal jelzett tracer alkalmazunk.

A találmány alapja az a felismerés, hogy a 8-izo-PGF_{2α} radioimmun meghatározása is lehetséges jód-125 izotóp felhasználásával, ha az alpmolekulához tirozin-metilészter csoportot kapcsolunk, és ezt mint prosztetikus csoportot jód-125 izotóppal jelöljük, majd az így kapott (I) képletű, ¹²⁵I-izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású, új típusú 8-izo-PGF_{2α}-TME származékot alkalmazzuk az immunkémiai reakcióban. Ez a felismerés nem magától értetődő, ugyanis míg a tríciummal jelzett tracer kémiai szerkezete azonos az inaktív liganduméval, addig a ¹²⁵I-tracer előállítás az alpmolekula kémiai átalakulásával jár, tehát a radioligandum és az inaktív ligandum kémiaiilag különböznek (ún. „heterológ radioimmunoassay”). Ennek alapján nem szükségszerű, hogy a ¹²⁵I-izotóppal jelzett származékot a specifikus antitest antigénként felismeri.

A találmány tárgya tehát eljárás biológiai minták 8-izo-prostaglandin F_{2α} tartalmának radioimmunológiai reakción alapuló meghatározására ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú standard 8-izo-prostaglandin F_{2α} és a meghatározandó biológiai minták jelenlétében, melynek során megmérjük tracernek specifikus antitesttel való kötődését, és az ismert mennyiségű standard 8-izo-prostaglandin F_{2α} hígítási sorozat által okozott kötődésváltozából számítjuk a minta hatóanyagtartalmát, olyan módon, hogy tríciummal jelzett tracer helyett a találmány szerint előállított, új típusú, ¹²⁵I-izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású, (I) képletű 8-izo-prostaglandin F_{2α}-monojód-tirozin-metilészter származékot alkalmazunk.

A találmány szerint a mérést úgy végezzük, hogy a mérendő biológiai mintákból a hatóanyagot megfelelő módszerrel kivonjuk (illetve a szükséges mértékig tisztítjuk), majd a hígítási sorozat szerint különböző, ismert mennyiségű inaktív 8-izo-PGF_{2α} standard oldatokat, valamint az ismeretlen mintákat specifikus antitesttel és ¹²⁵I-8-izo-PG F_{2α}-TME tracerrel inkubáljuk, majd az antitesthez kötött, illetve nemkötött frakciókat elválasztjuk, és mérjük a kötött frakció radioaktivitását. A kapott radioaktivitás értékekből az ismeretlen minták által okozott kötődésváltozásokhoz tartozó koncentrációkat kiszámítjuk.

Általában 10000 és 60000, előnyösen 20000 és 40000 cpm közötti beütésszámú tracert alkalmazunk, melyet célszerűen pufferben oldunk.

A puffer-oldat előnyösen 0,1 % zselatint tartalmazó, 0,01 - 0,2 mólos, célszerűen 0,05 mólos, 7,4 pH-jú vizes foszfát puffer.

Az oldat konkrét összetételétől függően az inkubációs hőmérséklet 0 és 40 °C közötti, előnyösen 0 °C körüli, az inkubálás ideje az adott hőmérséklettől függően 0,5 és 24 óra közötti, előnyösen 15-24 óra között változik.

A módszerhez szükséges specifikus antitestet előnyösen nyúlban termelhetjük. Ehhez 8-izo-PGF_{2α}-t alkalmas hordozófehérjéhez - előnyösen pl. szarvasmarha szérum albuminhoz - kötünk, és a nyulakat ezzel ismételtelen beoltjuk. Az immunizált nyulakból kapott anti-8-izo-PGF_{2α} antiplazma koncentrációját úgy választjuk meg, hogy az adott elválasztó reagens és inkubációs idő mellett a standard 8-izo-PGF_{2α}-t nem tartalmazó mintákban a tracer 20-80, előnyösen 30-60%-a kötődjön az antitesthez.

A módszerhez standard anyagként 8-izo-PGF_{2α}-t alkalmazunk, amelyet hígítási sorozat szerint készítünk el.

A tracer kötött és szabad frakcióinak elválasztására előnyösen 0,5 % dextrans és 1 % csontszén tartalmazó 0,01 mólos foszfát-puffert (pH 7,4) alkalmazunk, amely a szabad radioligandumot megköti, és a centrifugálással kapott felülúszó tartalmazza az antitesthez kötött tracert, amelynek radioaktivitását scintillációs módszerrel mérjük.

A találmány tárgya továbbá eljárás a radioimmun meghatározáshoz szükséges (I) képletű, nagy fajlagos aktivitású, jód-125 izotóppal jelzett 8-izo-PGF_{2α}-monojódtirozin-metilészter (8-izo-PGF_{2α}-TME-¹²⁵I) előállítására.

A találmány szerint az (I) képletű radioligandumot úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű 8-izo-PGF_{2α}-TME származékot nagy fajlagos aktivitású, (kb. 74 TBq/mmol; 2000 Ci/mmol) Na¹²⁵I-dal reagáltatjuk, célszerűen klóramin-T (para-toluol-szulfoklóramin-nátriumsó) reagens jelenlétében, pufferolt közegben (előnyösen 7 fölötti pH értéken), rövid (10 - 200 másodperc), előnyösen 30 - 60 másodperc reakcióidővel, úgy, hogy a (II) képletű 8-izo-PGF_{2α}-TME származékot a Na¹²⁵I-hoz képest 20 - 200, előnyösen 30 - 50-

szeres mólarányban alkalmazzuk, és a reakcióidőt úgy szabályozzuk, hogy megfelelő időpontban a rendszerben klóramin-T hatására képződő reakcióképes oxidált jódot nátrium – metabiszulfid hozzáadásával jodid ionná redukáljuk. Az (I) képletű célvegyület szintéziséhez célszerűen foszfát puffert alkalmazunk, a (II) képletű anyagot célszerűen etilalkoholos oldatban adjuk a reakcióelegyhez oly módon, hogy az etanol végkoncentrációja a 20 %-ot ne haladja meg. Az (I) képletű célvegyület előállításának legfontosabb lépése az előállítani kívánt monojód-származék elválasztása az egyéb jódjelzett származékoktól, valamint a reakció befejeződése után a nagy kiindulási mólfelesleg miatt még mindig nagy feleslegben lévő (II) képletű kiindulási anyagtól. Erre célszerűen adszorpciós oszlop-kromatográfiát alkalmazunk, melyet úgy végzünk, hogy a reakcióelegyet Sephadex LH-20 oszlopra felvisszük, és növekvő etanol koncentrációjú etanol:nátrium-citrát (pH 4,0) kétkomponensű oldószerkeleggyel eluáljuk a különböző jódjelzett származékokat, miközben az effluens radioaktivitását folyamatosan mérjük, és az ezzel arányos jelet regisztráló készülékkel rögzítjük.

A találmány szerint célszerűen a következő oldószereket alkalmazzuk: tiszta citrátpuffer (0,2 mól, pH 4,0), majd 1 mól citrátpuffer (pH 4,0) és etanol 4:1 arányú elegye, ahol a tiszta végterméket az utóbbi frakcióban kapjuk meg. Az oldószerek szükséges térfogata az aktuális, és az elválasztás közben folyamatosan regisztrált elúciós profil és a képződött jelzett vegyületek összetételének (arányának) függvénye, általában a tiszta citrátpufferből 40 - 70 ml-t, a 4:1 arányú citrátpuffer:etanol elegyből pedig 30 - 60 ml-t alkalmazunk.

A (II) képletű vegyületet a (III) képletű 8-izo-PGF_{2α} és a (IV) képletű tirozin-metilészter reakciójával állítjuk elő oly módon, hogy a 8-izo-PGF_{2α}-t 1-5, előnyösen 2-4 mólarányú tirozin-metilészterrel reagáltatjuk, 1-5, előnyösen 2-3 mólarányú 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid reagens jelenlétében, célszerűen vizes tetrahidrofuránban, 0-50 °C-on, előnyösen szobahőmérsékleten, 3-40, előnyösen 20-24 óra időtartamig. Az oldószert vákuum-desztillációval eltávolítjuk, a maradékot célszerűen etil-acetátban oldjuk, majd az etil-acetátos oldatból híg savas extrakcióval, célszerűen 0,1 n sósavval kimossuk a változatlan tirozin-metilésztert, híg lúgos, célszerűen 0,1 n NaOH-os extrakcióval pedig az el nem reagált (III) képletű vegyületet.

A nyersteget célszerűen vékonyréteg-kromatográfiás úton tisztítjuk, célszerűen olyan szilikagél rétegen, amely fluoreszcens indikátort tartalmaz, a kifejlesztő oldószerkeleg pedig célszerűen kloroform:metanol:víz 90:10:1 térfogatarányú elegye. A terméket 254 nm-es UV-fénnyel megvilágítva mutatjuk ki.

A találmányt részletesebben konkrét példák alapján ismertetjük, amelyekre a találmány oltalmi köre természetesen nem korlátozódik.

1. példa

A jódjelzéshez használt (II) képletű köztitermék előállítása

1,95 mg (5,5 mikromól) (III) képletű 8-izo-PGF_{2α}-t, 3,35 mg (17,5 mikromól) 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid-ot és 4 mg (21 mikromól) tirozin-metilésztert egyszerre bemérünk, hozzáadunk 200 µl desztillált tetrahidrofuránt és 50 µl desztillált vizet. Az elegyet szobahőfokon 24 órán át kevertetjük, majd az oldószert csökkentett nyomáson ledesztilláljuk, a maradékot 30 ml etil-acetátban feloldjuk, és rázóüvegsérbe öntjük. Ezt az oldatot sorrendben 3x2 ml 0,1 n sósavval, 3x2 ml vízzel, 3x2 ml 0,1 n nátrium-hidroxiddal és 3x3 ml vízzel összerázzuk. Minden összerázás után a vizes fázist elválasztjuk és elöntjük. Az utolsó mosás után az etil-acetátos oldatot forgóbepárló készüléken (Büchi, Svájci gyártmány) vákuumban bepároljuk. A maradék fehér, kristályos anyagot 100 µl etil-alkoholban oldjuk, majd 0,25x200x100 mm méretű Kieselgel 60 F 254 (Merck, NSZK gyártmány) szilikagél rétegre 3 cm-es sávban felvisszük, és kloroform:metanol:víz 90:10:1 térfogatarányú elegybe helyezve a kromatogramot kifejlesztjük. Kifejlesztés után a réteget hideg levegővel szárítjuk, majd 254 nm hullámhosszú ultraibolya fényel megvilágítva a foltokat láthatóvá tesszük. A 0,245 R_f értékű folt helyén a réteget lekaparjuk, 10 ml etil-alkohollal teszünk rá, és 1 óra várakozás után üvegszűrőn szűrjük. A szűrőn lévő gél 2x5 ml etil-alkohollal mossuk, az alkoholos oldatokat egyesítjük, forgóbepárlón szárazra pároljuk, és mérjük a termék súlyát, majd etil-alkohollal törzsoldatot készítünk belőle.

A kapott (II) képletű termék tömege a kromatográfias tisztítás után 412 µg, ami 14,2 % kitermelésnek-felel meg.

2. példa

Az (I) képletű céltermék előállítás

Az 1. példa szerint kapott 8-izo-PGF_{2α}-TME származék 100 µg/ml koncentrációjú etanolos oldatából 30 µl-t (6,5 nmol) 1 ml-es talpas Eppendorf csőbe pipettázunk, hozzáadunk 100 µl 50 mM foszfát puffert, (pH 7,4) és 74 MBq radioaktivitású hordozómentes Na¹²⁵I oldatot (Izotóp Intézet kft. terméke). Az elegyet összerázzuk, majd 50 µl, 10 mg/ml koncentrációjú nátrium-metabiszulfid oldatot előre felszívunk a reakció leállításához. Az elegyhez ezután hozzápipettázunk 25 µl 5 mg/ml koncentrációjú klóramin-T reagens oldatot, az elegyet összerázzuk, és pontosan 60 másodperc múlva az előre elkészített nátrium-metabiszulfid oldat hozzáadásával a reakciót befagyaszttjuk.

Az elegyet ezután oszlopkromatográfias módszerrel választjuk el, a következőképpen:

Sephadex LH-20 (Pharmacia, Svéd gyártmány) gélt desztillált vízben 24 órát duzzasztunk, majd 20x1 cm méretű, alul elvezető, felül bevezető csővel ellátott üvegcsőbe töltjük, alkalmas oldószer-adagoló perisztaltikus pumpával (LKB, Svéd gyártmány) összekapcsoljuk, mintegy 10 percig egyensúlyba hozzuk 0,2 mólos citromsavval (pH 4,0) mintegy 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az így előkészített hordozóra a reakcióelegyet felvisszük, és az elúciót az előző oldószerrel folytatjuk. Az eluens radioaktivitását folyamatosan detektáljuk oly módon, hogy az oszlop elvezető csövét ólommal árnyékolat NaI(Tl) szcintillációs kristály (Gamma gyártmány) előtt vezetjük el, a kristályt pedig számláló berendezéssel (Gamma gyártmány) és vonalíróval (Gamma gyártmány) kötjük össze. Az effluent mérőhengerbe gyűjtjük, az előző eluensből 40 - 70 ml-t alkalmazunk, majd 1 mólos citromsav (pH 4) és etil-alkohol 4:1 arányú elegyével gyűjtjük a kívánt terméket a detektáló készülékben megjelenő csúcs szerint. A radioimmun meghatározáshoz a csúcs közepének megfelelő mintegy 5 ml-es frakciót választjuk külön. Ennek radioaktivitása 16,3 MBq, ami 22 % radioaktív hozamnak felel meg. (A hozam természetesen az elérhetőnél lényegesen alacsonyabb, mivel a terméknek csak egy része kerül gyűjtésre.)

3. példa:

Humán vérplazma totál 8-izo-PGF_{2α} tartalmának meghatározása

a) lépés Teljes-lipid extrakció

1 ml plazmához hozzáadunk 5 ml kloroform:metanol (3:1 térfogatarányú) elegyet, majd rázótölcsérbe öntjük, összerázzuk, és a szerves oldószeres fázist elválasztjuk, a vizes fázist pedig elöntjük. A kloroformos oldatot forgóbepárló készüléken (Büchi, Svájci gyártmány) vákuumban bepároljuk, majd a maradékot oldjuk 2 ml metanolban. A metanolos oldathoz hozzáadunk 2 ml 15 %-os kálium-hidroxid oldatot, és 40 °C-os vízfürdőn 1 órán át kevertetjük. Ezután az oldathoz 1N sósav-oldatot adunk olyan térfogatban, hogy a pH érték 3 legyen. Az oldatot rázótölcsérbe öntjük, és 3x10 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az etil-acetátos fázisokat egyesítjük, 3x2 ml vízzel mossuk, majd szárazra pároljuk forgóbepárló készüléken az előbbiek szerint.

b) lépés Szilárd fázisú extrakció

A maradékot feloldjuk 4 ml vízben, amelynek pH értéke 3, majd az elegyet injekciós fecskendőbe pipettázunk, és átnyomjuk a fecskendőre helyezett, ún. "fordított fázisú" szilikagélt tartalmazó miniatűr oszlopon (Bond-Elut C₁₈, Varian, USA gyártmány), amelyet előzőleg a gyártó használati utasítása szerint előkészítettünk. A tölteten ezután ugyanazon fecskendővel átnyomunk 5 ml desztillált vizet, 5 ml 10 %-os vizes etilalkoholt, majd 5 ml n-hexánt. Ezeket a folyadékokat elöntjük, majd az oszlopon 5 ml etil-acetátot nyomunk át, amelyet műanyag kémcsőbe gyűjtünk. A kémcső fölé nitrogén gázhoz csatlakozó pipettahegyet helyezünk, és enyhe gázárammal az oldószert elpároljuk. A száraz maradékot feloldjuk 1 ml RIA pufferben (összetételét ld. később).

c) lépés RIA meghatározás

A RIA-méréshez 10 ng/ml koncentrációjú standard 8-izo-PGF_{2α} törzsoldatból pufferes hígítást készítünk úgy, hogy 1-1 ml térfogatú mintákat kapjunk, amelyek hatóanyag-koncentrációja 0,04 - 0,12 -

0,37 - 1,11 - 3,33 - 10 ng/ml. A standard oldatokból és a meghatározandó mintákból 100-100 µl-t sorszámozott műanyag kémcsövekbe automata pipettával bemérünk, majd hozzáadunk 100 µl antiplazmát olyan hígításban, amely a tracernek 30 - 40 %-át képes megkötni. Ezután valamennyi csöbe bepipettázunk 100 µl (I) képletű tracet, amelynek radioaktivitása 30000 - 40000 cpm/100 µl. A nem-specifikus kötődés (NSB) meghatározására további kémcsövekbe az antiplazma helyett 100 µl tiszta puffer oldatot teszünk, míg a specifikus kötődés (B_0/T) és a teljes radiokativitás (TC) meghatározására a standard oldatok helyett is tiszta pufferoldatot adunk az antitesthez.

Minden egyes mérési ponthoz három párhuzamost (három azonos reagens összetételű kémcsövet) használunk, és valamennyi kémcsőben a reakcióelegy térfogatát a szükséges térfogatú puffer hozzáadásával 400 µl-re egészítjük ki. Valamennyi reagens (tracer, antitest, standardok és minták) oldásához és a térfogatkiegészítéséhez 0,05 mólos, 7,4 pH-jú, 0,1 % zselatint tartalmazó vizes foszfát puffert (RIA-puffert) használunk.

A reagensok összemérése után a kémcsövek tartalmát kémcsökeverővel néhány másodpercig kevertetjük, majd lezárjuk, és hűtőszekrényben 0 - 4 °C közötti hőmérsékleten éjszakán át állni hagyjuk. Ezután a TC csövekhez hozzáadunk 500 µl hideg RIA-puffert, a többi csövhöz pedig 500 µl csontszén-szuszpenziót, amelyet a hozzáadás közben jeges-vizes fürdőn mágneses keverővel erősen kevertetünk. A szén-szuszpenzió összetétele: 0,01 mólos foszfát puffer (pH 7,4) 0,5 % Dextran T-70 (Pharmacia, Finnország) és 1 % Norit-A (Serva, NSZK). A kémcsöveket 10 percig 0 °C-on centrifugáljuk. Ezután a felülúszókból alkalmas mérőcsövekbe 0,5 ml-t pipettázunk, és ezek radioaktivitását 10 mérőhelyes Multicalc (LKB, Svédország) berendezésen megmérjük. A számítást a mérőberendezéssel összekapcsolt számítógépes kiértékelő rendszer automatikusan elvégzi, és megadja a plazmaminták totál 8-izo-PGF_{2α} koncentrációját.

Saját vizsgálataink alapján emberi vérplazmában a totál 8-izo-PGF_{2α} koncentráció 100 – 500 pg/ml között változik, tehát az 1 ml plazmából készült 1 ml pufferes oldat hígítás nélkül, közvetlenül mérhető.

4. példa:

Humán vérplazma szabad 8-izo-PGF_{2α} tartalmának meghatározása

A 3. példa szerint járunk el, az alábbi eltérésekkel.

a) lépés *Teljes-lipid extrakció*

Ez a lépés elmarad.

b) lépés *Szilárd fázisú extrakció*

Ehhez a lépéshez 1 ml plazmamintát az oszlopra felvitel előtt 4 ml pH 3-as vízzel hígítunk, egyebekben a 3. példa b) lépése szerint járunk el.

c) lépés *RIA meghatározás*

Mindenben a 3. példa c) lépése szerint végezzük.

Saját vizsgálataink alapján emberi vérplazmában a szabad 8-izo-PGF_{2α} koncentráció 50 – 150 pg/ml között változik, tehát az 1 ml plazmából készült 1 ml pufferes oldat hígítás nélkül, közvetlenül mérhető.

5. példa:

Humán vizelet szabad 8-izo-PGF_{2α} tartalmának meghatározása

A 3. példa szerint járunk el, az alábbi eltérésekkel.

a) lépés *Teljes-lipid extrakció*

Ez a lépés elmarad.

b) lépés *Szilárd fázisú extrakció*

Ehhez a lépéshez 1 ml vizelet-mintát az oszlopra felvitel előtt 4 ml pH 3-as vízzel hígítunk, egyebekben a 3. példa b) lépése szerint járunk el.

c) lépés RIA meghatározás

Mindenben a 3. példa c) lépése szerint végezzük.

Saját vizsgálataink alapján egészséges emberek vizeletében a 8-izo-PGF_{2α} koncentrációja 200 – 1200 pg/ml között változhat, tehát az 1 ml vizeletből kapott 1 ml pufferes oldat hígítás nélkül, közvetlenül mérhető. Extrém esetekben (pl. erős dohányosokban) ez az érték akár tízszeresére is megnőhet, ebben az esetben a RIA mérés előtt a mintát célszerű öt-tízszeresére hígítani. Más kezelések esetén a szükséges hígítást előkísérletek alapján kell megállapítani.

6. példa

Total 8-izo-PGF_{2α} tartalom meghatározása patkány májszövetben

Lényegében a 3. példa szerint járunk el, az alábbi változtatásokkal.

a) lépés Teljes lipid extrakció

A kiinduló minta 0,5 g szövet, amelyet 5 ml kloroform:metanol (3:1 térfogatarányú) eleggyel homogenizálunk, a homogenizátumot centrifugáljuk, majd a felülúszóval elvégezzük a 3. példa a) lépésében leírt további műveleteket.

b) lépés Szilárd fázisú extrakció

Mindenben a 3. példa b) lépése szerint járunk el.

c) lépés RIA meghatározás

Mindenben a 3. példa c) lépése szerint járunk el.

A fenti módszer különféle kísérleti állatok (pl. patkány, eger, nyúl) szöveti 8-izo-PGF_{2α} tartalmának meghatározására általánosan alkalmazható. A szöveti koncentráció állatfajonként és a kezeléstől függően tág határok között változik, így a feldolgozandó szövet célszerű tömegét, és az optimális hígításokat előkísérletekben meg kell határozni. A példa szerinti patkány májban saját méréseink szerint 1 g nedves szövetben 6 - 12 ng 8-izo-PGF_{2α} mérhető, amelyhez a példa szerint 0,5 g szövet elegendő, és az extrakció utáni minták ötszörös hígításából történhet a RIA-meghatározás. (Oxidatív anyagok (pl. szén-tetraklorid) hatására ugyanezen szövetben ez az érték akár százszorosára nőhet, ebben az esetben a vizsgálandó szövet mennyisége csökkenthető, illetve a hígítás arányosan növelhető.)

7. példa

Specifikus 8-izo-PGF_{2α} antiplazma előállítás nyúlban

Az eljáráshoz 5 mg szintetikus 8-izo-PGF_{2α} -t (Cayman Company, USA gyártmány) alkalmazunk, amelyet 20 mg szarvasmarha-szérumalbuminhoz (BSA, lyophilized and crystallized powder, Sigma, USA gyártmány) kémiaiilag kötünk, az Eicosanoids 4, 1, 1991 irodalommal megegyező eljárás szerint. Az így nyert immunogén fehérjével 3 db hím, új-zélandi fehér nyulat kezelünk az alábbiak szerint:

1 mg fehérjét 0,5 ml fiziológiás sóoldatban (0,9 %-os vizes NaCl-oldat) oldva, 0,5 ml komplett Freund adjuvánssal (Sigma, USA gyártmány) intenzíven összekeverünk, majd a kapott emulziót a kísérleti állat hátbőrébe oltjuk 40 - 60 oltási ponton egyenletesen elosztva. 1 hónapos időközönként a fenti kezelést megismételjük olyan módon, hogy 1 mg helyett 0,5 mg fehérjét alkalmazunk, és a komplett Freund adjuvánst inkomplett Freund adjuvánssal (Sigma, USA gyártmány) helyettesítjük. Ezt a kezelést havonta megismételjük, és a kezelések után 10 nappal az állatok fülvenájából 10 ml-es műanyag kémcsőbe előre előszitett - a leveendő vértérfogat egytizedének megfelelő - 20 %-os etilén-diamin-tetraecetsav-nátriumsó (EDTA, Reanal gyártmány) oldatra 1 - 2 ml vérmintát veszünk. A levett vért 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, a vérplazmát elválasztjuk, és az általános RIA-eljárásoknak megfelelően az alábbiak szerint minősítjük:

- Megmérjük a minta kötőképességét ("titerét") a találmány szerinti ¹²⁵I-jelzett tracerrel.
- A fentiek szerint meghatározott antiplazma-hígításban standard görbéket készítünk, úgy, hogy standard anyagként 8-izo-PGF_{2α}-t (a Cayman Chemical Co., USA gyártmánya) alkalmazunk.

A mérési adatok alapján az oltásokat mindaddig folytatjuk a fent leírtak szerint, amíg olyan antiplazmát nem nyerünk, amely a találmány szerinti ^{125}I -jelzett tracer esszerűen nagy (pl. nagyobb, mint tízezerszeres) hígításban képes megkötni, ez a hígítási fok ismételt oltások hatására tovább már nem nő, és a ^{125}I -jelzett tracer kötődése standard 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -val gátolható.

A találmány szerinti eljárás előnyeit a következőkben foglaljuk össze:

Az alkalmazott radiokémiai szintézis segítségével kedvező feltételek között előállítható az (I) képletű 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ monojódtirozin-metilészter származék, és ez szükségtelenné teszi a tríciummal jelzett 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ előállítását. A találmány szerinti szintézismódszerekhez szükséges műszaki feltételek a korszerű laboratóriumokban széles körben rendelkezésre állnak, ellentétben a tríciumra épülő eljárásokkal, amelyek speciális műszaki feltételeket igényelnek. A találmány szerinti tracer tehát közvetlenül a felhasználás helyén, gazdaságosan előállítható, míg a tríciummal jelzett tracer kereskedelmi forgalomból kell jelentős költségen beszerezni.

Az alkalmazott szintézis, melynek során a 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ alpmolekulát jódjelzésre alkalmas oldallánccal kapcsoljuk, megőrzi az alpmolekula immunológiai tulajdonságait, tehát a 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ alpmolekulára specifikus antitestek a ^{125}I -8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -TME származékot is képesek megkötni.

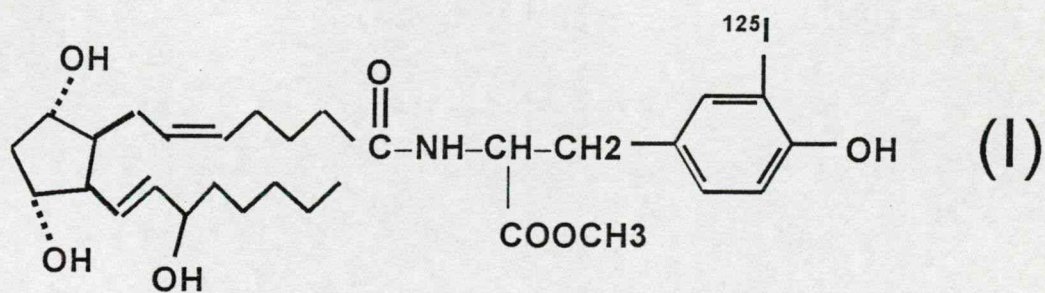
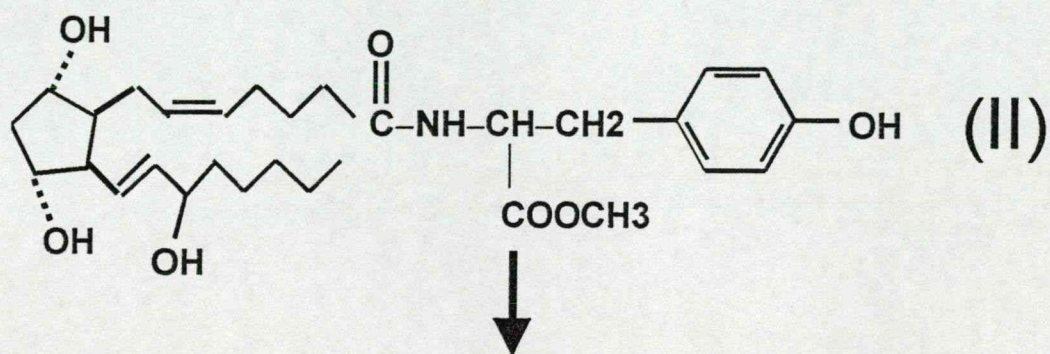
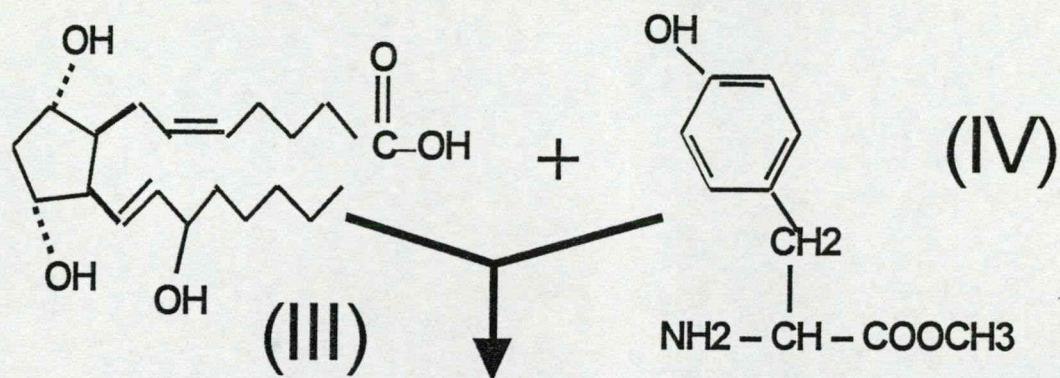
A találmány szerinti elválasztási módszer előnye, hogy az alkalmazott apoláros dextrán gélen a jódjelzett származékok adszorpciós készsége jelentősen meghaladja a kiindulási (II) képletű inaktív anyagét, ily módon az (I) képletű célvegyület - amelyet még hatásos jódbeépülés mellett is jelentős mennyiségű (II) képletű kiindulási anyag szennyez - teljes biztonsággal választható el, és ezzel a találmány szerinti radioimmun meghatározáshoz szükséges magas fajlagos aktivitás biztosítható.

Külön előnye a találmány szerinti elválasztási módszernek, hogy a radiojódos jelzés során a nyitott radioizotópos műveleteknél kiemelten fontos sugárvédelmi biztonsági előírások könnyen teljesíthetők, és a radioaktív inkorporáció veszélye minimálisra csökkenthető.

Mindezek alapján a találmány szerinti új, jódt-125 izotóppal jelzett tracer alkalmazása lehetővé teszi, hogy a ^{125}I -izotóp alkalmazásából adódó általános gyakorlati előnyök - egyszerűség, gyorsaság, gazdaságosság, elterjedt mérés technikai feltételek, automatizáltság - a 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ tartalom radioimmunológiai meghatározásában is kiaknázzhatóvá váljanak.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás biológiai szövetminta (testszövet, vérplazma, vészérum, vizelet, stb) 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ tartalmának radioimmunológiai reakción alapuló meghatározására ismert mennyiségű, hígítási sorozat szerint különböző koncentrációjú standard 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ és a meghatározandó biológiai minták jelenlétében, melynek során megmérjük tracernek specifikus antitesttel való kötődését, és az ismert mennyiségű standard 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ hígítási sorozat által okozott kötődésváltozásból számítjuk a minta hatóanyagtartalmát, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy tracerként új típusú, ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású, (I) képletű 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ -monojód-tirozin-metilészter származékot alkalmazunk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy 3000 és 10000, előnyösen 10000 és 60000 cpm közötti beütésszámú, nagyobb, mint 40 TBq/mmol, előnyösen 74 TBq/mmol fajlagos aktivitású, (I) általános képletű tracert alkalmazunk.
3. Az 1. vagy 2. igénypontok szerinti eljárás, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy antitestként nyúlban - előnyösen szarvasmarha szérum albuminhoz kötött 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ mint immunogén anyag ellen - keletkezett specifikus anti-8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ immunplazmát vagy immunsavót alkalmazunk, az inaktív 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$ -t nem tartalmazó mintában a tracer 20 - 80, előnyösen 30 - 60 %-át megkötni képes koncentrációban.
4. Eljárás (I) képletű ^{125}I -8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -TME előállítására, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy (II) képletű 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -TME-t pufferolt közegben jodid ionokból elektrofil jódot képező reagens, előnyösen para-toluol-szulfoklóramin-nátriumsó jelenlétében Na^{125}I -dal reagáltatjuk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy az (I) képletű terméket a (II) képletű 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ -TME-től a fajlagos aktivitás csökkenése nélkül, kromatográfias módszerrel választjuk el.
6. A 4. vagy az 5. igénypont szerinti eljárás, **a z z a l j e l l e m e z v e**, hogy az (I) képletű célvegyület előállításához 8-izo-prostaglandin $F_{2\alpha}$, tirozin-metilészter és 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid-hidroklorid vizes tetrahidrofuránban történő reagáltatásával előállított (II) képletű reakciótermékből indulunk ki.



Szolgálati találmány

**Eljárás biológiai minták 8-izo-prosztaglandin $F_{2\alpha}$ tartalmának
radioimmunológiai meghatározására és az ehhez alkalmazott jódt-125
izotóppal jelzett radioligandum előállítására**

Bejelentő:

Izotóp Intézet Kft., Budapest

Feltaláló:

Dr. Mucha István, Budapest

A bejelentés napja:

2001. január 25.

K I V O N A T

A találmány megjavítja a biológiai közegminták 8-izo-prosztaglandin $F_{2\alpha}$ tartalmának radioimmun meghatározását, annak révén, hogy ehhez az antigén-antitest kötésen alapuló immunkémiai reakcióhoz a találmány szerint kedvező feltételek között előállítható új szerkezetű radioligandumot, az (I) képletű, ^{125}I -izotóppal jelzett, nagy fajlagos aktivitású 8-izo-prosztaglandin $F_{2\alpha}$ -monojód-tirozin-metilészter származékot alkalmazunk. A találmány szerint az (I) képletű radioligandumot úgy állítjuk elő, hogy a (II) képletű 8-izo-prosztaglandin $F_{2\alpha}$ -monojód-tirozin-metilésztert nagy fajlagos aktivitású Na^{125}I -dal reagáltatjuk.

Mucha I, Riutta A.: Determination of $9\alpha,11\beta$ -prostaglandin F2 in human urine. Combination of solid-phase extraction and radioimmunoassay. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, közlésre beküldve 2001

DETERMINATION OF $9\alpha,11\beta$ -PROSTAGLANDIN F_2 IN HUMAN URINE. COMBINATION OF SOLID-PHASE EXTRACTION AND RADIOIMMUNOASSAY

Istvan Mucha^{1*} and Asko Riutta²

¹Institute of Isotopes Co., Ltd., POB 851, H-1535, Budapest, Hungary

²Department of Pharmacological Sciences, University of Tampere, POB 607, Fin 33101, Tampere, Finland

*Correspondence: István Mucha, Institute of Isotopes Co., Ltd., POB 851, H-1535, Budapest, Hungary.

Fax: +36-1-3959082

e-mail: mucha@izotop.kfkpark.hu

This work was supported in part by grants from the Research Fund of Tampere University Hospital, and the Yrjö Jahnsson Foundation.

Running title: *Urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ by [¹²⁵I] RIA, and solid-phase extraction.*

Keywords: Prostaglandin D₂, Urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂, Radioimmunoassay, Solid-phase extraction, High-performance liquid chromatography

SUMMARY

This paper describes a new iodine-125 radioimmunoassay of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂, and its use for the determination of urinary $9\alpha,11\beta$ -prostaglandin F_2 after a selective one-step solid-phase extraction.

The newly reported immunoassay is based on the use of ¹²⁵I-tyrosyl methyl ester derivative of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ and specific polyclonal antibody raised in rabbits. The assay detected as low as 0.85 pg/tube $9\alpha,11\beta$ -PGF₂, and the antibody showed less than 0.01 cross-reaction with PGF-ring metabolites (e.g., 8-iso-PGF_{2 α} , PGF_{2 α} , 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} , and 5 more PGF-ring compounds). Both the intra-assay, and inter-assay CVs were less than 20 % for internal controls containing low, medium and high concentrations of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂.

Immuno-HPLC analysis showed a very low ratio of specific immunoreactivity in both non-extracted urine (6.5 %), and in urine extracted on C₁₈-silica cartridge (14.8 %). By contrast, approximately 80 % specific immunoreactivity could be achieved by using C₂-silica as the sorbent, acetonitrile:water (15:85, v/v) as wash solvent, and ethyl acetate as eluent of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. This extraction procedure enabled a reasonably high extraction efficiency of 80.4 ± 0.855 (mean \pm SEM, n = 82), as determined by ³H- $9\alpha,11\beta$ -PGF₂.

The new SPE/RIA method was applied for the determination of urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ values in 50 healthy human volunteers. For the concentration and for the excretion rate 37.52 ± 4.61 pg/ml (mean \pm SEM), and 3.50 ± 0.35 ng/mmol creatinine (mean \pm SEM), respectively, was measured. The specificity of the SPE/RIA method was supported by the observed 69 % decrease in $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ excretion rate after acetylsalicylic acid treatment.

The effect of nicotinic acid, a PGD₂-stimulatory agent, was monitored by the urinary excretion of 9 α ,11 β -PGF₂ in 6 patients, by using the new SPE/RIA method. In patients responding with flushing symptoms nicotinic acid induced an increase of the urinary excretion of 9 α ,11 β -PGF₂ in the range between 11 % and 187 %.

In summary, the combination of the newly developed specific [¹²⁵I] radioimmunoassay with solid-phase extraction on C₂-silica cartridges enables the specific, sensitive, and reliable determination of 9 α ,11 β -PGF₂ in human urine without the need for further laborious chromatographic purification before radioimmunoassay.

Abbreviations: PG, prostaglandin; Tx, thromboxane; PGD₂, prostaglandin D₂; 9 α ,11 β -PGF₂, 9 α ,11 β -prostaglandin F₂; SPE, solid-phase extraction; RIA, radioimmunoassay, HPLC, high-performance liquid chromatography, GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry

INTRODUCTION

9 α ,11 β -Prostaglandin F₂ (9 α ,11 β -PGF₂, 11-epi-PGF_{2 α}) is a primary metabolite of prostaglandin D₂ (PGD₂). Unlike other primary metabolites, 9 α ,11 β -PGF₂ is a bioactive substance, with an activity profile different from PGD₂ and PGF_{2 α} ¹⁻⁵. The metabolic transformation of PGD₂ to 9 α ,11 β -PGF₂ represents a potential pathway for the generation of a biologically active prostanoid in different human¹⁻⁸ and animal⁹⁻¹³ tissues.

9 α ,11 β -PGF₂ has long been used for monitoring PGD₂ production in mast cells. Mastocytosis and other disorders characterized by a significant overproduction of PGD₂ were demonstrated to be associated with an increased urinary excretion of 9 α ,11 β -PGF₂^{6,7,14}. Mast cell activation was also monitored in asthma patients¹⁵⁻²⁰, by the measurement of 9 α ,11 β -PGF₂.

The possible role of PGD₂ in allergic response has been suggested by multiple groups which found increased 9 α ,11 β -PGF₂ upon allergen challenge in sheep bronchoalveolar fluid²¹, at cutaneous site of allergic inflammation^{22,23}, and in human blood²⁴.

PGD₂ has also been demonstrated to be the principal mediator of episodes of flushing and vasodilatory hypotension after nicotinic acid. Accordingly, an increased 9 α ,11 β -PGF₂ plasma level was found in patients after niacin or methylnicotinate²⁵⁻²⁷.

9 α ,11 β -PGF₂ has an extremely low concentration in biological samples, and its quantification has been predominantly made by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)^{1,4-9,13-16,20-22,24-26,28-33}. GC-MS methods, however, suffer from the drawback of relatively small sample capacity and the need of multi-step sample preparation. Immunoassay methods have been introduced as potent alternatives to GC-MS determinations. Out of different immunoassay versions, radioimmunoassay (RIA) based on tritium labeled tracer was the first type to be used. Several studies used commercial assay kits^{27,31,34}, others applied in-house developed RIA system¹⁰⁻¹². After the introduction of commercial enzyme immunoassay (EIA), this method has been used in multiple studies for the determination of urinary 9 α ,11 β -PGF₂^{15-17,19,33}. Until currently, however, no RIA system based on the use of iodine-125 labeled tracer has been reported.

In the present study we aimed at the development of a new 9 α ,11 β -PGF₂ RIA system by the use of iodine-125 as the label, and its application for the determination of urinary 9 α ,11 β -PGF₂ concentration. To this end, we studied the immunoreactive purity of different sample preparation procedures, with the final objective of finding a solid-phase extraction method that

provides high enough immunoreactive purity without the need of further chromatographic separation.

MATERIALS AND METHODS

Materials

9 α ,11 β -PGF₂ was purchased from Ultrafine Chemicals (Manchester, England), other non-labeled prostanoids were obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). Tritiated 9 α ,11 β -PGF₂ and PGD₂ were from Amersham International (Amersham, Buckinghamshire, England), other ³H-prostanoids were produced in the Institute of Isotopes (Budapest, Hungary). 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Acetonitrile was obtained from J.T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, The Netherlands), ethyl acetate and n-hexane from Fluka (Buchs, Switzerland); other solvents were from Sigma (St. Louis, MO, USA). C₂ and C₈ silica cartridges (100 mg of sorbent) were purchased from Amersham International, and SepPak-C₁₈ silica cartridges (400 mg of sorbent) from Waters Associates (Milford, MA, USA).

Sustained-release nicotinic acid (Lipolyt retard[®]) was from Leiras Pharmaceuticals (Turku, Finland). All other reagents whose origins are not mentioned here were commercial products and of the highest purity available.

Production of specific antiplasma

For the production of immunogenic conjugate, 9 α ,11 β -PGF₂ was coupled to bovine serum albumin, using i-butyl-chlorocarbonate as coupling reagent. Three male New Zealand rabbits were immunized. Two weeks after administration of 2000 I.U. killed Bordetella pertussis (i.m.), the animals were inoculated with 1 mg immunogen at multiple sites in the inter-scapular region. Prior to injection the immunogen (in 0.5 ml saline) was emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant. Injections were boosted every four weeks thereafter with a half of this quantity emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Plasma samples were collected 10 days after booster injections.

Preparation of ¹²⁵I-labeled radioligand

9 α ,11 β -PGF₂ was coupled to tyrosine methyl ester (TME), using 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl (EDCI) as coupling reagent and purified by thin layer chromatography. Pure 9 α ,11 β -PGF₂-TME was labeled with Na¹²⁵I by the chloramine-T method, and radioiodinated monoiodine derivative was separated on a Sephadex LH-20 column according to a general method³⁴. Labeled material used as tracer in RIA was stored in 50 % ethanol at -20 °C.

Radioimmunoassay procedure

RIA was carried out in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, including 0.1 % gelatine and 0.01 % thiomersal. The assay mixture contained 0.1 ml of antiplasma, 0.1 ml of tracer and 0.1 ml of either 9 α ,11 β -PGF₂ standards or the unknowns. The final assay volume was adjusted to 0.4 ml by the addition of assay buffer. After incubation at 4 °C overnight, dextrane-coated charcoal was used for the separation of bound from free fraction.

Study design with nicotinic acid

Six healthy non-smoking male volunteers (age 25-40 years) participated in the nicotinic acid study. All subjects were apparently healthy. The subjects abstained from all drugs for at least 14 days before and during the study, and avoided any major changes in diet or other living

habits (i.e. alcohol and coffee consumption, dietary and exercise habits) during the investigation. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Tampere University Hospital, and informed consent was obtained from the subjects. Twelve-hour overnight urine (control urine samples) was collected from all subjects before drug administration.

1000 mg nicotinic acid was administered orally at 7 p.m., 500 mg at 10 p.m., and 1000 mg at 7 a.m. the next morning. Twelve-hour overnight urines were collected during the drug administration between 7 p.m. and 7 a.m.

Excretion of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ was correlated to creatinine excretion. Urinary creatinine was determined spectrophotometrically by the picric acid method using a commercial assay kit (Orion, Espoo, Finland).

Sample collection for pooled normal and ASA-urine

Twelve-hour urine (8 p.m.- 8 a.m.) was collected from 8 healthy volunteers (4 men, 4 women) who had abstained from any drug intake during the preceding two weeks. An additional eight 12-hour urine was collected from the same volunteers after a 3-day acetylsalicylic acid treatment (3 x 5 g/day). Pooled urine was prepared by combining identical aliquots of individual samples, then aliquotted, and stored frozen at -20 °C until extraction.

Extraction procedure

After thawing, the urine samples were vortex mixed and centrifuged (1000g, 5 min), and 10000 dpm of [³H]- $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ or 200 pg/0.1 ml $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ standard was added as recovery marker to 1 ml of supernatant. Alkyl silica cartridges were conditioned with 5 ml of methanol followed by 5 ml of water. Urine supernatants were diluted with pH 3 water (1:4) and applied onto cartridges. Cartridges were rinsed with 5 ml of water followed by a wash with 5 ml of organic solvent:water mixture, and then rinsed with 5 ml of n-hexane. $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ was eluted with 5 ml of organic solvent. For SPE on SepPak-C₁₈ according to Powell³⁴, 20 ml each of preconditioning and 10 ml each of wash/elution solvents were used. The final eluent fraction was collected, evaporated under nitrogen at room temperature, and the dry residue was dissolved in RIA buffer. After incubation overnight at 4 °C, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentrations were measured by RIA.

Determination of extraction efficiency

In experiments using ³H- $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ as the recovery marker, aliquots from the starting urine sample, and from the final RIA sample were measured by liquid scintillation counter (Betarack-1241, LKB, Bromma, Sweden), and the recovery was calculated from the two radioactivity values.

In experiments, using known amount of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ as a recovery marker, the same sample with ("spiked" sample), and without ("non-spiked" sample) added marker was measured by RIA. Extraction efficiency was expressed as percent of spiked minus non-spiked value divided by the added amount.

High-pressure liquid chromatography

Solvents were delivered by a two-pump (LKB 2150) gradient system controlled by an LKB 2152 HPLC controller. The HPLC system consisted of an LKB 2211 fraction collector, an LKB 2151 variable-wavelength monitor (LKB, Bromma, Sweden), a Rheodyne Model 7125 injector (Rheodyne, Cotati, CA) equipped with a 200- μ l loop, an RP-18 guard column (Pierce, Oud-Beijerland, The Netherlands) and a Spheri-5 RP-18 column (Pierce, Oud-Beijerland, The Netherlands). Samples were dissolved and separated in the mobile phase consisting of a water:acetonitrile-mixture and 0.1 % acetic acid. The retention volumes of prostanoids were

determined either by tritiated materials using an on-line radioactivity monitor operating with homogeneous flow cell detector (type 9701) and precision mixer (type 9702) (both from Reeve, Glasgow, Scotland), or by non-labeled standards (5-25 ng/sample) with the UV-monitor at 195 nm wavelength.

RESULTS

Characteristics of RIA

The best antiplasma at a final dilution of 1:600000 (about 40 % maximum specific binding) gave a working calibration range between 0.6 and 50 pg/tube. The dose of non-labeled $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ necessary to displace 50 % of bound tracer (IC₅₀) was 6.5 ± 1.45 pg/tube (mean \pm SD; n = 23). The detection limit of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ was 0.85 ± 0.4 pg/tube (mean \pm SD; n = 23), defined as the dose corresponding to $B_0 - 2 * SD$ specific binding of tracer. The intra- and inter-assay coefficients of variation at the IC₅₀ value were 10.4 % and 20.0 %, respectively. A typical standard curve is shown in Figure 1.

The specificity of the RIA system was characterized with cross reactivity towards a wide range of prostanoids. Out of substances tested, only PGD₂ (0.02 %), PGE₁ (0.02 %), and 5-(\pm)-HETE (0.03 %) showed measurable cross reactivity. All other compounds tested (PGF_{2 α} , PGF_{1 α} , 8-iso-PGF_{2 α} , 15-keto-PGF_{2 α} , 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2 α} , 6-keto-PGF_{1 α} , 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} , 13,14-dihydro-6,15-diketo-PGF_{1 α} , PGE₂, PGA₂, TXB₂, 15-keto-PGE₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGD₂, 6-keto-PGE₁, 11-dehydro-TXB₂, 2,3-dinor-TXB₂, Delta-12-PGJ₂, arachidonic acid, indomethacin, acetylsalicylic acid) showed much less than 0.01 % cross reactivity.

The precision and reproducibility of the RIA system was evaluated by internal controls of low (25 pg/ml), medium (80 pg/ml), and high (300 pg/ml) concentrations. Values of intra- and inter-assay CV were 8.7/17.8, 5.4/11.4, and 9.1/16.3 % for low, medium, and high concentrations, respectively.

The nature of immunoreactivity in non-extracted and nonselectively extracted urine

For pilot tests 12-hour urine samples from two males showing higher than 400 pg/ml apparent $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentration by direct RIA were selected, and combined. The nature of immunoreactivity was studied both in non-extracted urine (direct assay), and in the same urine sample purified by the commonly used SPE procedure, using C₁₈-silica cartridge, and the sequential addition of water, ethanol:water, n-hexane, and ethyl acetate (referred to as "nonselective extraction" or "group separation").

For the direct assay, PG-free urine in the same dilution as that used for unknown samples was added to each tube of the standard curve. The measured apparent $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentration in urine sample was 587 pg/ml.

The same sample was extracted on C₁₈ silica cartridge using ethanol:water (15:85, v/v) as wash solvent, and ethyl acetate as the final eluent of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. An aliquot from the eluate was taken, evaporated to dryness, and redissolved in buffer for the determination of extraction efficiency by liquid scintillation counting, and for RIA-measurement. After C₁₈-SPE 342 pg/ml apparent $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentration was determined, at 93.9 % recovery (monitored by tritiated $9\alpha,11\beta$ -PGF₂).

Both the non-extracted urine, and the eluate fraction of C₁₈-SPE sample were subjected to HPLC separation, and 0.5-min fractions were collected between 0 - 30 min. After lyophilizing each fraction, dry residues were dissolved in RIA buffer and aliquots taken for the determination of extraction efficiency by liquid scintillation counting, and for RIA-measurement.

Figure 2 shows the immunoreactivity profile of urine without and after extraction on a C₁₈ silica cartridge. Values are expressed as the urinary 9 α ,11 β -PGF₂ concentration (pg/ml) in each fraction, such that the distribution of immunoreactivity is comparable directly. The major part of the immunoreactivity (93.5 % for direct, 85.2 % for C₁₈-SPE) was found in fractions other than those co-eluting with the tritiated 9 α ,11 β -PGF₂. Only 6.5 % (direct) and 14.8 % (C₁₈-SPE) of total immunoreactivity could be assigned to specific fractions. Although the immunoreactivity remained heterogeneous after C₁₈-SPE purification, in comparison with the non-extracted urine the ratio of polar interference decreased considerably, with a concomitant minor increase in apolar fractions.

Modified extraction on C₂-silica

In an attempt to increase the specificity and selectivity of nonselective SPE, we compared the concentrations obtained for the same urine sample extracted on different SPE-sorbents. Using the same elution scheme as that described above the respective concentrations obtained for C₁₈-, C₈-, and C₂-silica were 342 (see above), 387, and 265 pg/ml, with no difference in the extraction efficiency (about 95 % for each sorbent).

C₂-silica that gave the lowest apparent concentration after nonselective elution scheme was tested further for the removal of residual interference of polar nature. To these studies different polar organic solvents mixed with water in various ratios were used instead of the 15 % ethanol wash solvent used in the nonselective SPE. After the application of wash solvent the column was eluted with ethyl acetate, and concentrations in both fractions measured by RIA. The ratio of interfering material removed by the wash solvent was estimated as the percent of sum of immunoreactivity obtained in the two fractions. From various organic solvents tested (ethanol, methanol, i-propanol, n-butanol, and acetonitrile), acetonitrile showed the highest efficacy. With the use of 15 % acetonitrile:water (v/v), approximately 67 % of the immunoreactivity was found in the acetonitrile-fraction, and the recovery for the tritiated marker was 80 % (data not shown).

In order to study the effect of elution solvents the same urine sample was adsorbed onto a C₂ silica cartridge and various organic solvents of different selectivity properties (i-propanol, tetrahydrofurane, dichloromethane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform) were used as eluents without employing wash solvent before elution. Ethyl acetate, isopropanol and tetrahydrofurane gave over 90 % recovery of tritiated 9 α ,11 β -PGF₂, whereas with other solvents the recovery varied between 20 % and 70 %. The lowest apparent concentration was observed by the use of ethyl acetate.

Based on these preliminary results, the best sorbent (C₂-silica), wash solvent (15 % acetonitrile), and final eluent (ethyl acetate) was combined in a modified SPE procedure. An aliquot of the same urine sample as used for previous experiments were thawed, vortexed and centrifuged. ³H-9 α ,11 β -PGF₂ was added to 10x1 ml of urine supernatants, their pH set to 3 and diluted (1:4) with pH 3 water. Extraction was made on a C₂-silica cartridge conditioned with 5 ml of methanol followed by 5 ml of water. After application of the sample, the cartridge was rinsed with 5 ml of water followed by a wash with 5 ml of acetonitrile:water (15:85, v/v). After rinsing with 5 ml of n-hexane, 9 α ,11 β -PGF₂ was eluted with 5 ml ethyl acetate.

From each eluate 1 ml was taken, and 2x1 ml was combined to have 5 samples of double concentration. These five samples were then evaporated by nitrogen, and dissolved in RIA buffer for RIA-determination before HPLC. The rest of the 10 ethyl acetate eluate was pooled, evaporated to dryness by nitrogen, and dissolved in HPLC mobile phase, before being subjected to HPLC separation.

With this work-up procedure, 9 α ,11 β -PGF₂ concentrations and recovery before HPLC were determined from 5 combined samples of 10 separate extractions, while the HPLC-separation

was made from a mixture of the same 10 extractions, using a sample volume that corresponded to 6 ml urine.

For the five samples before HPLC 104.1 ± 22.8 pg/ml (mean \pm SD) average concentration was obtained with 81.6 % recovery (monitored by ^3H - $9\alpha,11\beta$ -PGF₂). This represents 17.7 %, and 30.4 % of values obtained with non-extracted, and C₁₈-extracted urine, respectively.

Results of the HPLC analysis are shown in Figure 3. After selective SPE, most of the immunoreactivity was found in fractions co-migrating with the authentic $9\alpha,11\beta$ -PGF₂. Ratio of immunoreactivity in this area, calculated as per cent of total $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ immunoreactivity, was 80.3 %. The urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentration obtained from the specific HPLC peak was 90.2 pg/ml.

Evaluation of the modified SPE procedure

RIA-values measured for samples purified with the modified SPE procedure showed good linearity upon serial dilution of samples, as well as for the recovery of known amount of cold material added (data not shown). The accuracy was estimated by extracting and measuring by RIA, 3 different samples 6 times independently. For the low (24.9 pg/ml), medium (45 pg/ml), and high (107 pg/ml) concentrations, the respective within-assay precision (characterized by the relative SD, or CV %) were 12.1, 6.9, and 9.25 %, and those for between-assay CV-s were 19.3, 19.4, and 14.8 %.

The extraction efficiency was determined by the tritiated marker method from a large set of individual urine samples (n=82). The calculated statistical parameters were 80.4 ± 0.855 % for the mean \pm SEM, with 7.75 % SD, and 80.3 % median value. The 95 % confidence range for recovery was thus 78.69–82.11 %. In addition, we also evaluated the suitability of determining recovery by using non-labeled $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ as the recovery marker (see under experimental) in the case, when tritium-labeled $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ was not available. The statistical parameters of the extraction efficiency determined by the non-labeled $9\alpha,11\beta$ -PGF₂, were 87.8 ± 1.08 % for the mean \pm SEM, with 8.40 % SD, 90.95 % median value, and 85.66–90.0 confidence interval (n=60).

The selective extraction procedure was evaluated by comparison of values before and after ASA-treatment from urine samples pooled from 8 healthy volunteers. From duplicate SPE-procedure and RIA-measurement, 26.8 pg/ml and 9.0 pg/ml, for normal and ASA-pool, respectively, was determined. Normalized excretion rates for the same pair of data were 2.294 versus 0.716 ng/mmol creatinine. These figures indicate 66.5 %, and 69 %, inhibition of acetylsalicylic acid, as calculated from concentrations, and excretions, respectively.

Urinary excretion of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ in normal subjects

In addition to concentrations determined from pooled urine, which had been collected from 8 volunteers for the development of the selective SPE/RIA method, the excretion of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ in urine was analyzed in individual samples collected from 50 human volunteers on a 24 h/12 h period. The concentrations varied considerably, from 10 pg/ml to 300 pg/ml. Because of this, samples of concentrations under 10 pg/ml had to be re-extracted from 5 ml volume, and assayed repeatedly. For the average concentration 37.52 ± 4.61 pg/ml (mean \pm SEM, n=50) was obtained with a SD of 32.57, and with a 95 % confidence range of 28.3–46.74 pg/ml. The average excretion value calculated for the same samples was 3.50 ± 0.35 ng/mmol creatinine (mean \pm SEM, n= 50), with a SD of 2.50, and with a 95 % confidence interval of 2.80 – 4.20 ng/mmol creatinine. This excretion rate corresponds to 30.89 ± 3.12 ng/g creatinine (mean \pm SEM, n= 50). Median values showed significant difference from the mean in the case of

concentrations (25.6 pg/ml compared to 37.52 pg/ml), but were in good agreement with normalized excretion values (3.16 ng/mmol creatinine compared to 3.50 ng/mmol creatinine).

Effect of nicotinic acid

Nicotinic acid was administered to 6 male volunteers, and 12-h urine samples were collected before and after the drug administration according to the study protocol. Concentrations were determined by RIA after the modified C₂-SPE purification. Values are summarized in Table 1.

Nicotinic acid induced about 44 % increase in the urinary excretion of 9 α ,11 β -PGF₂. The excretion rate remained unchanged (subject-1), or even decreased (subject-2) in two volunteers who showed no symptoms on niacin administration. In the other four subjects who showed typical symptoms of niacin, i.e., flushing, or even urticaria, the excretion rate increased in a range between 12 % and 187 %. In this subgroup the excretion rate (84.5 \pm 7.65 ng/g creatinine; mean \pm SEM) was 1.7-fold higher than in the control group.

DISCUSSION

Prostaglandin D₂ (PGD₂), a prominent member of prostanoid family produced in the cyclooxygenase cascade, has a widespread biological effects in several tissues and cell types^{37,38}. One of its primary metabolites, 9 α ,11 β -PGF₂, also has a unique biological activity, which is different from that of the parent compound¹⁻⁵. Several pathophysiological processes, or pharmacological actions, which are characterized by the overproduction of PGD₂ (mastocytosis, allergic inflammation, niacin flushing, asthmatic attack), are also associated with an increased production of 9 α ,11 β -PGF₂. Due to this direct relationship 9 α ,11 β -PGF₂ has been used for the assessment of primary PGD₂ production, which is difficult to monitor because of its short half-life, and poor stability.

Gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has long been used as the predominant method for the quantification of 9 α ,11 β -PGF₂. However, GC-MS methods suffer from the drawback of small sample capacity. To overcome the limitations of GC-MS, immunoassay methods are important tool of clinical or pharmacological studies requiring high sample capacity. Out of various immunoassay versions, radioimmunoassay using tritiated tracer¹⁰, and enzyme immunoassay (EIA) using acetyl-cholinesterase as reporter enzyme³⁹ have been developed. These assay versions are available as commercial products too, and have been used successfully in various biological studies^{15,19,27,34,31,33}. Until currently, however, no RIA system based on ¹²⁵I-label has been reported.

In the present study we developed a specific RIA for the determination of 11-9 α ,11 β -PGF₂, which benefits from the high specific activity of the ¹²⁵I-label. The specificity of the newly developed polyclonal antiserum showed an outstanding discrimination of structurally related compounds. The high titer of the antiplasma is another sign of outstanding specificity and sensitivity. This is of particular importance with 9 α ,11 β -PGF₂, because in certain biological media the concentration of other F-ring substances, for instance isoprostanoids, might be orders of magnitude higher than is 9 α ,11 β -PGF₂-level. The introduction of ¹²⁵I-labeled tracer resulted in a significant increase of the sensitivity of the new assay system, as compared to the RIA using tritiated tracer. The detection limit (8.5 pg/ml) is considerably higher than the value (20 pg) reported for tritiated RIA¹⁰, and is virtually the same as that certified by the manufacturer, and confirmed in multiple studies^{15-17,33}, for the commercial EIA system (10 pg/ml). This sensitivity enables the accurate determination of 9 α ,11 β -PGF₂ in the exceptionally low concentration range of 10 pg/ml, which is often found in normal urine (see below). As for the precision and

reproducibility, the performance of the new assay system is the same as commonly seen with other competitive immunoassays.

$9\alpha,11\beta$ -PGF₂ has been quantitated in various biological fluids including blood plasma^{25,31}, bronchoalveolar lavage fluid^{21,34}, and urine^{7,14-20,24,28-30,32,33}. Out of different biological materials, urine has long been regarded as the ideal non-invasive medium to monitor the in-vivo production of prostanoids. However, $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ represents a very low ratio of total PGD₂ metabolites. After the infusion of tritiated PGD₂ into a healthy male volunteer, 0.3 % of radioactivity was recovered as $9\alpha,11\beta$ -PGF₂². In the urine of a patient with systemic mastocytosis PGD₂ metabolites were shown to be predominated (about 80 %) by PGF₂-ring compounds other than $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ which represented only about 1.1 % of total metabolites⁷. Accordingly, the urinary concentration of this metabolite is very low, and its determination is hampered by the poor signal-to-noise ratio. To overcome this, biological samples have to be subjected to multi-step purification before quantitation by either GC-MS, or immunoassay. These purifications include SPE, followed by one or more chromatographic steps (TLC and/or HPLC). Such multi-step purifications are time-consuming and often result in a considerable loss of sample yield. In certain cases, however, direct determination by EIA without sample purification have also been reported^{15-17,19}.

According to our results the immunoreactivity of non-extracted urine is very heterogeneous, and the apparent immunoreactive $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ concentration is contributed in major part by nonspecific interfering factors, mostly of polar nature (Figure 2). This is in good agreement with a similar observation reported for 11-dehydrothromboxane B₂⁴⁰. These results demonstrate that the direct assay is unsuitable with the present RIA, therefore the reliable determination of urinary $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ requires the purification of urine samples prior to RIA.

The most common method for the pre-purification of urine or other biological media before quantitation is a nonselective solid-phase extraction on octadecyl silica (ODS) cartridges, optimized for high recovery of a wide range of prostanoids varying in polarity³⁶. This SPE procedure is then commonly followed by a subsequent TLC or HPLC purification step. Our results demonstrate that the immunoreactivity remained heterogeneous after the non-selective extraction procedure carried out on ODS silica. Although the ratio of interfering materials after ODS extraction decreased considerably as compared to non-extracted urine, only 15 % of the total immunoreactivity could be assigned to the specific analyte. Therefore we aimed in this study at modifying the original non-selective SPE procedure on ODS-silica such that a reasonably homogeneous immunoreactive purity could be achieved without the need for additional chromatographic purification before RIA. In earlier studies we demonstrated that more efficient cleanup for a particular analyte can be achieved by using alkyl-silica sorbents other than ODS-silica in combination with various wash and eluent solvent compositions matched for a particular prostanoid. This strategy resulted in a reliable selective SPE for 11-dehydrothromboxane B₂⁴¹, 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} ⁴², PGF_{2 α} ³⁴, and Δ^12 -PGJ₂⁴³, which eliminated the need for HPLC-separation before RIA.

Results of the present study indicated that the absorption of interfering contamination decreased with the chain length of the alkyl silica sorbent. Even with the non-selective elution scheme, the measured immunoreactive concentration (i.e., the ratio of interference) was significantly lower on C₂ silica than was on ODS silica. With fine-tuning the composition of the polar wash solvent on C₂ silica, 15 % acetonitrile was capable of removing the major part of polar interfering substances, while keeping reasonably high (about 80 %) extraction efficiency. The average extraction efficiency obtained by non-labeled $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ (87.8 %) appeared to be higher than the value determined with tritiated marker (80.4 %), although the difference remained

insignificant statistically. Some degree of tritium exchange of the tritiated marker, a phenomenon that results in the overestimation of starting, and a proportional underestimation of recovered, radioactivity might explain this difference.

The elution pattern we employed with the selective C₂ SPE is similar to that used by Wendelborn et al²⁹, or O'Sullivan et al³³. They also used 15 % acetonitrile as the polar washing solvent, and ethylacetate:heptane (50:50, v/v) as the eluent of prostanoids. The higher immunoreactive purity, which we obtained, is therefore most likely due to the lower affinity for interfering materials of the on C₂ silica stationary phase we used instead of C₁₈-silica.

In an elegant study on the nature of 9 α ,11 β -PGF₂ immunoreactivity in human urine, O'Sullivan et al³³ demonstrated the presence of isomeric 2,3-dinor-9 α ,11 β -PGF₂ compounds, and determined their contribution to the overall immunoreactive concentration measured by EIA. According to their immuno-HPLC chromatogram, two dinor-derivatives accounted for about 50 % of immunoreactivity, in contrast with the parent compound, which represented approximately 40 % of total immunoreactivity. Our results also showed a minor immunoreactivity (about 20 %) in fractions other than 9 α ,11 β -PGF₂. Based on the similar HPLC separation we used, the more polar species seen in our HPLC-profile (Figure 3), which accounted for about 10 % of total immunoreactivity, might be identical with these dinor-metabolites. The fact that the ratio of this fraction was significantly lower than that reported by O'Sullivan et al³³ can be due to the different specificity of our RIA. The identity of the second minor fraction, which is less polar than 9 α ,11 β -PGF₂ is unclear. This peak is overlapping in part with both PGF_{2 α} and 11-dehydrothromboxane B₂. However, the concentration of these compounds as determined separately by the respective specific RIA were both under 1 ng/ml (data not shown), which is much lower than the concentration (50 ng/ml) required, at the particular cross-reaction with these metabolites, to induce this amount of apparent 9 α ,11 β -PGF₂ immunoreactivity.

As for the urinary concentration of 9 α ,11 β -PGF₂, relatively few data are available in the literature, because the majority of studies focused on pathological or pharmacological effects, and worked with a few human subjects. Obata et al¹⁸ studied four children, and found, by GC-MS, 230, 170, 0.32, 40, and 342,1673, 116, 215 ng/24 h excretion before, and after asthmatic attack, respectively. By using a direct EIA Butterfield et al¹⁹ measured in one aspirin-sensitive patient an extremely high value (490 ng/ml), which was dropped to 125 pg/ml after desensitization. Using the same specific EIA with non-extracted urine O'Sullivan et al¹⁵ reported on an excretion rate of 54 \pm 9 ng/mmol creatinine in 9 healthy volunteers. In a more recent study of the same group³³ on 3 healthy females, 364, 485, 361, and 510, 647, 364 ng/24h values by GC-MS, and EIA, respectively, were determined. Consequently, the excretion values for normal human subjects in these studies varied between 0.32 and 647 ng/24 h.

The average excretion rate which we determined by the present C₂-SPE/[¹²⁵I] RIA method (3.5 ng/mmol creatinine) tends to be lower than those measured in the above studies. The broad range of concentration which we observed (from less than 10 pg/ml up to over 300 pg/ml) is in agreement with the above mentioned variations, and can be one factor to account for this difference. On the other hand, the difference in the number of samples, and in the sample purification method can be other factors of deviation. Furthermore, results obtained for cross-reactivities, and immunoreactive homogeneity are indicative of an outstanding differentiating capacity of the new [¹²⁵I] RIA, that could be a key factor to account for lower concentration/excretion rate we found.

In the present study urinary concentrations tend to deviate from normal distribution, as indicated by the difference between the mean value and the median value, but the deviation decreases, when normalized excretion rates are calculated.

PGD₂ was demonstrated to be the principal mediator of episodes of flushing and vasodilatory hypotension provoked by nicotinic acid, or methylnicotinate²⁵⁻²⁷. The increased PGD₂ production is associated with an enhanced level of 9 α ,11 β -PGF₂ as well. Accordingly, after the administration of niacin, 58-122-fold, and 25-33-fold increase of PGD₂, and 9 α ,11 β -PGF₂, respectively, was detected in plasma²⁶. In our studies we wanted to find out whether the highly increased PGD₂ production could also be followed-up in the urinary 9 α ,11 β -PGF₂ excretion. To the best of our knowledge, this is the first report on monitoring urinary 9 α ,11 β -PGF₂ following niacin administration. By using the new SPE/RIA method 1.7-fold increase in the excretion rate of urinary 9 α ,11 β -PGF₂ was observed in a group of human subjects who showed typical symptoms of niacin, i.e., flushing, or even urticaria. The fold change, as well as its high variation, seems to be in contradiction with the substantial increase observed in circulatory level²⁶. However, this is in good agreement with the low metabolic rate of 9 α ,11 β -PGF₂⁷, and with the magnitude of changes observed in other studies. For example, the increase of urinary 9 α ,11 β -PGF₂ on the effect of asthma showed a great variation, ranging from as low as 1.15-fold up to 360-fold^{15-20,33} in individual patients. The apparent change of urinary 9 α ,11 β -PGF₂ excretion after niacin is virtually in the same range as those (2 - 2.5-fold) obtained for other urinary eicosanoids (11-dehydrothromboxane B₂, 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} , leukotriene E₄) after niacin intake⁴⁴, and also fits with the ratio (about 2:1) of 9 α ,11 β -PGF₂ excretion observed in smokers and non-smokers⁴⁵.

In summary, a sensitive and specific [¹²⁵I] radioimmunoassay for 9 α ,11 β -PGF₂ has been developed, and applied for the determination of 9 α ,11 β -PGF₂ from human urine in combination with a simple solid-phase extraction without further chromatographic purification. This procedure can be used as a suitable alternative of other quantification methods for the non-invasive monitoring of increased in-vivo PGD₂ production by the measurement of urinary 9 α ,11 β -PGF₂ concentration.

REFERENCES

1. Liston, T. E., Roberts L. J. II.: Transformation of prostaglandin D2 to 9 α ,11 β -15(S)-trihydroxyprosta-(5Z,13E)-dien-1-oic acid (9 α ,11 β -prostaglandin F₂): A unique biologically active prostaglandin produced enzymatically in vivo in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6030-6034
2. Liston TE, Roberts LJ II. Metabolic fate of radiolabeled prostaglandin D2 in a normal human male volunteer. *J Biol Chem* 1985; 260(24):13172- 13180.
3. Pugliese G., Spokas E. G., Marcinkiewicz E. and Wong Py-K. Hepatic transformation of prostaglandin D2 to a new prostanoid, 9 α ,11 β -prostaglandin F₂, that inhibits platelet aggregation and constricts blood vessels. *J Biol Chem* 1985; 260: 14621-14625
4. Seibert K., Sheller J. R., and Roberts L. J. II. (5Z,13E)-(15S)-9 α ,11 β ,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid (9 α ,11 β -prostaglandin F₂): Formation and metabolism by human lung and contractile effects on human bronchial smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 256-260
5. Beasley C. R. W., Robinson C., Featherstone R. L., et al. 9 α ,11 β -PGF₂, a novel metabolite of prostaglandin D2, is a potent contractile agonist of human and guinea pig airways. *J Clin Invest* 1987;79: 978-983

6. Roberts L. J. II, Sweetman B. J., Lewis R. A., Austen K. F., and Oates J. A. Increased production of prostaglandin D₂ in patients with systemic mastocytosis. *N Engl J Med* 1980; 303: 1400-1404
7. Roberts L. J. II., and Sweetman B. J. Metabolic fate of endogenously synthesized prostaglandin D₂ in a human female with mastocytosis. *Prostaglandins* 1985; 30: 383-400
8. Robinson C., Hardy C. C., Holgane S. T. The metabolism of prostaglandin D₂ after inhalation or intravenous infusion in normal man. *Biochim Biophys Acta* 1988; 963: 151-161
9. Wolfe L. S., Rostworowski K., Pellerin L., Sherwin A. Metabolism of prostaglandin D₂ by human cerebral cortex into 9 α ,11 β -prostaglandin F₂ by an active NADPH-dependent 11-ketoreductase. *J Neurochem* 1989; 53: 64-70
10. Hayashi H., Ito S., Tanaka T., et al. Determination of 9 α ,11 β -prostaglandin F₂ by stereospecific antibody in various rat tissues. *Prostaglandins* 1987; 33: 517-530
11. Hayashi H., Ito S., Watanabe K., Negishi M., Shintani T., Hayaishi O. Metabolism of prostaglandin D₂ in isolated rat lung: The stereospecific formation of 9 α ,11 β - prostaglandin F₂ from prostaglandin D₂. *Biochim Biophys Acta* 1987; 917: 356-364
12. Urade Y., Watanabe K., Eguchi N., Fujii Y., Hayaishi O. 9 α ,11 β -Prostaglandin F₂ formation in various bovine tissues. Different isozymes of prostaglandin D₂ 11-ketoreductase, contribution of prostaglandin F synthetase and its cellular localization. *J Biol Chem* 1990; 265: 12029-12035
13. Hoult J. R., Bacon K. B., Osborne D. J., Robinson C. Organ selective conversion of prostaglandin D₂ to 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F₂ and its subsequent metabolism in rat, rabbit and guinea pig. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3591-3599
14. Morrow J. D., Guzzo G., Lazarus G., Oates J. A., Roberts L. J. Improved diagnosis of mastocytosis by measurement of the major urinary metabolite of prostaglandin D₂. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 937-940
15. O'Sullivan S., Dahlen B., Dahlen S. E., Kumlin M. Increased urinary excretion of the prostaglandin D₂ metabolite 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F₂ after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 421-432
16. O'Sullivan S, Roquet A, Dahlén B, et al. Evidence for mast cell activation during exercise-induced bronchoconstriction. *Eur Respir J* 1998; 12(2): 345-350.
17. O'Sullivan S, Roquet A, Dahlén B, Larsson L, Dahlén S-E, Kumlin M. Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1332-1339.
18. Obata T., Nagakura T., Kammuri M., Masaki T., Maekawa K., Yamashita K. Determination of 9 α ,11 β -PGF₂ in human urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1994; 655: 173-178
19. Butterfield J. H., Kao P. C., Klee G. G., Yocum M. W. Aspirin idiosyncrasy in systemic mast cell disease: A new look at mediator release during aspirin desensitization. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 481-487
20. Nagakura T., Obata T., Shichijo K., et al. GC/MS analysis of urinary excretion of 9 alpha,11 beta-PGF(2) in acute and exercise-induced asthma in children. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 181-186

21. Dworski R., Sheller J. R., Wickersham N. E., et al. Allergen-stimulated release of mediators into sheep bronchoalveolar fluid. Effect of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 46-51
22. Massey W. A., Hubbard W. C., Liu M. C., Kagey-Sobotka A., Cooper P., Lichtenstein L. M. Profile of prostanoid release following antigen challenge in vivo in the skin of man. *Br J Dermatol* 1991; 125: 529-534
23. Wagenmann M., Baroody F. M., Desrosiers M., et al. Unilateral nasal allergen challenge leads to bilateral release of prostaglandin D₂. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 371-378
24. Awad J. A., Morrow J. D., Roberts L. J. II. Detection of the major urinary metabolite of prostaglandin D₂ in the circulation: Demonstration of elevated levels in patients with disorders of systemic mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 817-824
25. Morrow J. D., Parsons W. G. III., Roberts L. J. II. Release of markedly increased quantities of prostaglandin D₂ in vivo in humans following the administration of nicotinic acid. *Prostaglandins* 1989; 38: 263-274
26. Morrow J. D., Awad J. A., Oates J. A., Roberts L. J. II. Identification of skin as a major site of prostaglandin D₂ release following oral administration of niacin in humans. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 812-815
27. Stern R. H., Spence J. D., Freeman D. J., Parbtani A. Tolerance to nicotinic acid flushing. *Clin Pharm Therap* 1991; 50: 66-70
28. Roberts L. J., Oates J. A. Quantification of thromboxane and PGD₂ metabolites in biological fluids. *Prostaglandins* 1984; 27: 352-355
29. Wendelborn D. F., Seibert K., Roberts L. J. II. Isomeric prostaglandin F₂ compounds arising from prostaglandin D₂: A family of icosanoids produced in vivo in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 304-308
30. Wendelborn D. F., Morrow J. D., Roberts L. J. II. Quantification of 9 α ,11 β -prostaglandin F₂ by stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Methods Enzymol* 1990; 187:51-62
31. Morrow J. D., Harris T. M., Roberts L. J. II. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990; 184: 1-10
32. Morrow J. D., Prakash C., Awad J. A., et al. Quantification of the major urinary metabolite of prostaglandin D₂ by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal Biochem* 1991; 193: 142-148
33. O'Sullivan S., Mueller M., Dahlen S. E., Kumlin M.: Analyses of prostaglandin D₂ metabolites in urine: comparison between enzyme immunoassay and negative ion chemical ionisation gas chromatography-mass spectrometry. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999; 57: 149-165
34. Zijlstra F. J., Vincent J. E., Mol W. M., Hoogsteden H. C., VanHal P. T. W., Jongejan R. C. Eicosanoid levels in bronchoalveolar lavage fluid of young female smokers and non-smokers. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 301-306
35. Mucha I. Measurement of Prostanoids by Specific Radioimmunoassay Using ¹²⁵I-labeled Radioligands. In: Allen J. & Voges R, eds. *Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds*, 1994. Chichester: John Wiley and Sons, 1995: 803-806

36. Powell W. S. Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandins* 1980; 20: 647-656
37. Giles H., Leff P. The biology and pharmacology of PGD₂. *Prostaglandins* 1988; 35: 277-300
38. Ito S., Narumiya S., Hayaishi O. Prostaglandin D₂: A biochemical perspective. *Prostaglandins Leukotriens Essential Fatty Acids* 1989; 37: 219-234
39. Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 57:1170-1173, 1985
40. Mucha I., Riutta A., Vapaatalo H. Factors affecting the reliability of direct radio-immunoassay for urinary 11-dehydrothromboxane B₂ with ¹²⁵I-labeled ligand: albumin and heterogeneous immunoreactivity. *Eicosanoids* 1991; 4: 1-7
41. Riutta A., Mucha I., Vapaatalo H. Solid-Phase Extraction of Urinary 11-dehydrothromboxane B₂ for Reliable Determination with Radioimmunoassay. *Anal Biochem* 1992; 202: 299-305
42. Riutta A., Nurmi E., Hansson G., Weber C., Mucha I. Selective Solid-Phase Extraction of Urinary 2,3-Dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α} for Determination with Radioimmunoassay. *Anal Biochem* 1994; 220: 351-359
43. *Hung. Pat.* 208746, Appl. Sep, 1991.
44. Saareks V., Ylitalo P., Mucha I., Riutta A. Effects of nicotinic acid and pyridoxine on systemic prostacyclin, thromboxane and leukotriene production in man. *Pharmacol Toxicol*, submitted for publication.
45. To be published.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. Standard curve of 9α,11β-PGF₂ immunoassay by ¹²⁵I-RIA.

Cumulative standard curve of 23 independent runs. Bars represent SD values.

Figure 2. Immunochromatogram of pooled urine without extraction (open bars) and after extraction on a C₁₈ silica cartridge (solid bar).

The separation was carried out on C₁₈ (Spheri-5, 4.6x 100 mm column) at a flow rate of 1.0 ml/min with 25 % acetonitrile until 20 min, then with a linear gradient of acetonitrile to 100 % in 10 min, and back to 25 % over 5 min. Fractions were collected for every 0.5 min (0-30 min), and the concentration of 9α,11β-PGF₂ was measured by RIA in each fraction. Fractions containing ³H-9α,11β-PGF₂ added in urine are indicated by asterisks. Standard prostanoids eluted in the following 0.5-min fractions; 6-keto-PGF_{1α} (hemiketal form) 11-12; 2,3-dinor-TxB₂ 10-14; 11-dehydro-TxB₂ (free acidic form) 14-15; 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} (lactone form) 16-20; TxB₂ and 9α,11β-PGF₂ 23-26; 8-iso-PGF_{2α} 25-29; PGF_{2α} 32-35; 11-dehydro-TxB₂ (lactone form) 34-37; PGE₂ 34-38; PGD₂ 37-41; 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂ 43-48. Values are corrected for method blank (ranging 1-2 pg/tube), determined from a separate run of PG-free urine processed according to the same method as that used with urine samples.

Figure 3. Immunochromatogram of pooled urine after modified SPE on C₂ cartridge.

Samples were dissolved in the mobile phase consisting of water:acetonitrile:acetic acid (70:30:0.1, v/v/v). The separation was carried out on C₁₈ (Spheri-5, 2.1 x 220 mm column) at a

flow rate of 0.4 ml/min with 30 % acetonitrile until 15 min, then with a linear gradient of acetonitrile to 80 % in 7 min, back to 30 % over 4 min, and 30 % until 4 min. Fractions containing ^3H - $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ added in urine are indicated by asterisks. Non-labeled standard prostanoids eluted in the following 0.5-min fractions; 6-keto-PGF_{1 α} (hemiketal form) 10-13; 2,3-dinor-TxB₂ 11-14; 11-dehydro-TxB₂ (free acidic form) 14-15; 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1 α} (lactone form) 16-20; TxB₂ 16-21; $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ 17-22; 8-iso-PGF_{2 α} 20-23; PGF_{2 α} 24-27; 11-dehydro-TxB₂ (lactone form) 26-28; PGE₂ 29-33; PGD₂ 33-37; 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂ 44-45. Values are corrected for method blank blank (ranging 1-2 pg/fraction), determined from a separate run of PG-free urine processed according to the same method as that used with urine samples.

Table 1. Effect of nicotinic acid on the excretion of $9\alpha,11\beta$ -PGF₂

Patient	Before niacin		After niacin		Note
	pg/ml	ng/g creatinine	pg/ml	ng/g creatinine	
1	82.8	56.7	92.1	162.7	
2	52.3	56.3	52.6	51.1	No symptoms
3	67.5	38.5	92.9	43.4	
4	50.6	36.0	73.3	75.3	
5	127.3	50.0	79.2	56.0	
6	102.1	59.7	56.4	38.3	No symptoms
mean	80.4	49.5	74.4	71.1	
SEM	12.27	3.86	6.09	6.04	

