

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Michaela Bradyová

Rozvoj postkolonového generování hydridů pro analýzu
glutathionových komplexů arsenu pomocí HPLC-(HG)-ICP-MS

Development of post-column hydride generation for analysis of
glutathione complexes of arsenic by HPLC-(HG)-ICP-MS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.
Konzultanti: doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.; Inga Petry-Podgórska, Ph.D

Praha 2015

Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci s Oddělením stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. jako součást výzkumného záměru MSM0021620857 a RVO: 68081715 a s podporou programu MŠMT Kontakt II, č. projektu LH 12040.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15.5.2015.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá metodou kapalinové chromatografie s postkolonovým generováním hydridů ve spojení s hmotnostní detekcí s indukčně vázaným plazmatem (HPLC-HG-ICP-MS) pro analýzu glutathionových komplexů arsenu v biologických vzorcích. Cílem bylo ověřit vhodnost metody a provést pilotní studie na enzymatické methylační směsi arsenu s glutathionem a v moči.

Zařazení kroku postkolonového generování hydridů řeší problém změny citlivosti ICP-MS při použití gradientové eluce. Pomocí standardů glutathionových komplexů bylo ověřeno, že metoda HPLC-HG-ICP-MS umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu těchto komplexů. Mez detekce byla stanovena na 5 pg/ml. Analýzou methylační směsi arsenu s glutathionem bylo zjištěno, že ve směsi se v průběhu methylace vyskytuje pouze komplex dimethylarsen glutathion (DMAs(GS)) a bylo ověřeno, že přítomnost enzymu je pro vznik komplexu nezbytná. Ve vzorcích moči neexponovaných lidí analyzovaných metodami HPLC-HG-ICP-MS a generováním hydridů s vymrazováním ve spojení s hmotnostní detekcí s indukčně vázaným plazmatem (HG-CT-ICP-MS) byla zjištěna pouze přítomnost volných pětimocných arsenových specií, glutathionové komplexy ani trojmocné specie pozorovány nebyly.

Klíčová slova

Speciační analýza, Arsen, Generování hydridů

Abstract

This thesis develops high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-HG-ICP-MS) method used for the analysis of glutathione arsenic complexes in biological samples. The aim of the thesis was to verify the suitability of this methods and to perform pilot studies on analysis of the enzymatic methylation assay containing glutathione and urine.

Inclusion of post-column hydride generation step resolves the problem of changing sensitivity of ICP-MS with gradient elution. Using the standards of glutathione complexes, it was verified that the HPLC-HG-ICP-MS method can provide both qualitative and quantitative analysis of these complexes. The limit of detection was found at 5 pg/ml. Analysis of the methylation assay of arsenic with glutathione showed that only DMAsGS complex occurs in the assay during methylation. It was verified that the presence of the enzyme is required for the complex formation. In the samples of urine from unexposed people analyzed by HPLC-HG-ICP-MS and hydride generation-cryotrapping-inductively coupled plasma mass spectrometry (HG-CT-ICP-MS), only the presence of free pentavalent arsenic species was found, whereas neither glutathione complexes nor trivalent species could be observed.

Key words

Speciation analysis, Arsenic, Hydride generation

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a čas který mi věnoval během mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Inze Petry-Podgórské, Ph.D a doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za cenné rady.

Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod	- 10 -
2	Teoretická část	- 11 -
2.1	Arsen	- 11 -
2.2	Metabolity arsenu a jejich toxicita	- 12 -
2.3	Metabolismus arsenu.....	- 13 -
2.3.1	Funkce enzymu arsen(3+)metyltransferáza	- 15 -
2.4	Stabilita arsenových specií	- 16 -
2.5	Metody analýzy arsenových specií.....	- 16 -
2.5.1	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	- 17 -
2.5.2	Metody kapalinové chromatografie pro speciální analýzu arsenu v biologických vzorcích.....	- 18 -
2.5.3	Metody kapalinové chromatografie pro separaci arsenových komplexů s glutathionem	- 19 -
3	Experimentální část.....	- 20 -
3.1	Použité chemikálie a roztoky.....	- 20 -
3.2	Metody měření.....	- 22 -
3.2.1	Instrumentace	- 22 -
3.2.2	HPLC-HG-ICP-MS a HPLC-ICP-MS	- 22 -
3.2.3	HG-CT-ICP-MS.....	- 25 -
3.3	Postupy experimentů	- 26 -
3.3.1	Standardy komplexů As(GS) ₃ a MAs(GS) ₂	- 27 -
3.3.2	Methylační směs	- 27 -
3.3.3	Tvorba komplexu z iAs ^{III} , MAs ^V a DMAs ^V a glutathionu.....	- 29 -
3.3.4	Vzorky moči	- 29 -
4	Výsledky a diskuse	- 31 -
4.1	Optimalizace koncentrace kyseliny thioglykolové pro HPLC-HG-ICP-MS....	- 31 -
4.2	Generování hydridů z MAs ^V a DMAs ^V bez předredukce.....	- 32 -
4.3	Citlivost a meze detekce metod HPLC-ICP-MS a HPLC-HG-ICP-MS.....	- 33 -
4.4	Standardy komplexů As(GS) ₃ a MAs(GS) ₂	- 35 -
4.5	Methylační směs	- 37 -
4.6	Tvorba komplexu z iAs ^{III} , MAs ^V a DMAs ^V a glutathionu.....	- 43 -

4.7	Analýza moči	- 47 -
5	Závěr.....	- 49 -

Seznam zkratek a symbolů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie.
AS3MT	arsen(3+)metyltransferáza
Cyt19	arsen(3+)metyltransferáza
GSH	glutathion
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HG	generování hydridů
HG-CT	generování hydridů s vymrazováním
ICP-MS	hmotnostní detekcí s indukčně vázaným plazmatem
Tris pufr	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
SAM	S-(5'-adenozyl)-L-methionin chlorid
c	koncentrace
t	čas

1 Úvod

Chronická otrava arsenem je považována za celosvětový problém. Dosud však není zcela objasněn jeho metabolismus v lidském těle, jehož hlavní drahou je methylace. V moči exponovaných jedinců byly nalezeny tyto arsenové specie: iAs^{III} , iAs^V , MAs^{III} , MAs^V , $DMAs^{III}$ a $DMAs^V$. Pro toxikologické studie těchto metabolitů je nezbytné použití speciálních analytických metod. Vyvíjení těchto metod je velmi obtížné vzhledem k různorodosti matric biologických vzorků a zejména vzhledem k nestabilitě některých arsenových metabolitů. Nejvíce používanou metodou je HPLC-ICP-MS. Separace je nejčastěji prováděna aniontově výměnnou chromatografií, méně často pak iontově párovou chromatografií. Tyto v současnosti používané metody však při stanovení nestabilních specií trpí závažnými problémy.

Některé teorie předpokládají, že pro metabolismus arsenu jsou významné komplexy arsenu s glutathionem. Již bylo zjištěno, že tyto komplexy nelze separovat pomocí iontově výměnné a iontově párové chromatografie [1] [2]. Tato práce navazuje na úspěšný výzkum metody separace komplexů na koloně s reverzní fází s organickým gradientem mobilní fáze [3] [4]. Problémem této metody je změna citlivosti během analýzy s indukčně vázaným plazmatem vlivem organické složky mobilní fáze, která může být odstraněna zařazením postkolonového generování hydridů. Cílem této práce bylo rozvinout metodu HPLC-HG-ICP-MS pro účely analýzy komplexů arsenu s glutathionem. Dalším cílem práce byla analýza in vitro připravené enzymatické methylační směsi arsenu s glutathionem [5] a ověření, zda v této směsi vznikají glutathionové komplexy. Cílem bylo také zjistit, zda lze potvrdit výskyt těchto komplexů nebo volných trojmocných arsenových specií ve vzorcích moči.

Tato práce vznikla jako součást dlouhodobé spolupráce analytické laboratoře Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., a skupiny Prof. Stýbla na Department of Nutrition, Gillings School of Global Public Health University of North Carolina at Chapel Hill, která se věnuje účinkům chronické expozice arsenu. Navazuje tak na předchozí vývoj metodik pro stopovou speciální analýzu arsenu v biologických materiálech.

2 Teoretická část

2.1 Arsen

Arsen je prvek, který se přirozeně vyskytuje ve vodě, půdě, ovzduší i potravinách a v lidském těle je dvanáctým nejběžnějším prvkem. Přesto není dosud zcela jasný způsob, jakým probíhá jeho metabolismus v lidském těle. Z hlediska toxicity lze otravu arsenem rozdělit na chronickou a akutní.

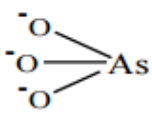
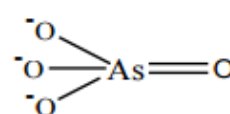
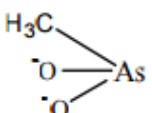
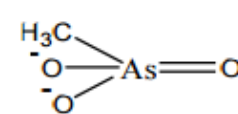
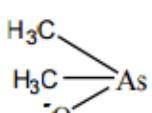
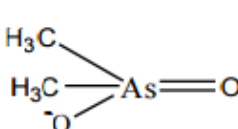
Arsenu bylo již v dobách středověku přezdíváno "král jedů" - "jed králů" pro jeho rychlé účinky a snadný způsob podání, neboť je bez chuti a zápachu [6]. Akutní otrava se projevuje nevolností, bolestí břicha a krvavým průjmem. Z důvodu, že nebyla známa kvalitativní zkouška pro důkaz arsenu, byly příznaky akutní otravy přisuzovány jiným nemocem. V roce 1836 publikoval James Marsh první analytickou metodu, kterou lze provést důkaz arsenu, což vedlo k výraznému omezení ve zneužívání arsenu k otravám

Teprve v poslední době bylo zjištěno, že nepříznivý vliv na zdraví člověka má také dlouhodobá expozice i velmi nízkých dávek arsenu. Nejčastějším zdrojem chronické intoxikace je podzemní pitná voda. Světová zdravotnická organizace doporučuje jako optimální koncentraci arsenu v pitné vodě do 10 ng/ml. Tato hodnota je však v mnoha zemích několikanásobně překročena [7] [8]. Na asijském kontinentu je nejhorší situace v Bangladéši, kde bylo v pitné vodě, která je zdrojem pro 30 milionu lidí, zjištěno až 2500 ng/ml arsenu, což je také celosvětově největší problém. V Severní Americe (USA) a Jižní Americe (Mexiko, Argentina, Chile) je celkově kolem čtyř milionů lidí, kteří jsou vystaveni pitné vodě s obsahem arsenu přes 50 ng/ml. V Evropě je nejhorší situace v Maďarsku, kde bylo zjištěno až 170 ng/ml arsenu, v pitné vodě pro přibližně 400 tisíc lidí. V České republice nejsou dlouhodobě zvýšené limitní hodnoty arsenu v pitné vodě.

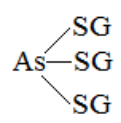
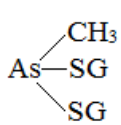
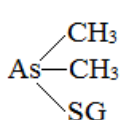
Arsen se vyskytuje ve více než 200 minerálech, z nichž nejobvyklejší je arsenopyrit (FeAsS), který je pravděpodobně nejdůležitějším zdrojem arsenu v podzemních vodách [8]. Arsenopyrit je v zemské kůře stabilní, pokud se nachází pod hladinou podzemní vody. Octne-li se výše, v zóně nenasycené vodou, dochází k jeho oxidaci a tím i k uvolňování prvků. Arsen je nejčastěji uvolňován ve formě arseničnanů. Člověk se na znečištění podílí hlavně důlní a hutní činností a herbicidy.

2.2 Metabolity arsenu a jejich toxicita

Lidská moč je jednou z matric, ve které lze identifikovat metabolické produkty arsenu a charakterizují je následující specie:

Anorganický arsenitan	(iAs ^{III})	
Anorganický arseničnan	(iAs ^V)	
Methylarsenitan	(MAs ^{III})	
Methylarseničnan	(MAs ^V)	
Dimethylarsenitan	(DMAs ^{III})	
Dimethylarseničnan	(DMAs ^V)	

Kromě těchto jednoduchých specií je také předpoklad, že během metabolismu arsenu vznikají komplexy arsenových specií s glutathionem [9]. Pro metabolismus arsenu v lidském těle jsou významné tyto komplexy:

Arsen triglutathion	(As(GS) ₃)	
Methylarsen diglutathion	(MAs(GS) ₂)	
Dimethylarsen glutathion	(DMAs(GS))	

Komplexy MAs(GS)₂ a As(GS)₃ byly nalezeny ve žluči potkanů, kterým byl intravenózně podáván arsenitan sodný [10].

Předmětem mnoha epidemiologických studií bylo prokázání trojmocných arsenových specií v moči. Výsledky nejsou jednoznačné a byly předmětem kritiky [11]. Několik příkladů epidemiologických studií:

Tyto studie byly prováděny na skupinách lidí, které byly vystaveny arsenu v pitné vodě o koncentraci vyšší než 50 ng/ml. Pro speciální analýzu arsenu ve vzorcích moči sledovaných lidí byly použity metody HPLC-ICP-MS nebo HG-CT-AAS. Trojmocné arsenové specie byly zjištěny ve studii v Mexiku [12] a Bengálsku [13], naopak pouze pětímocné arsenové specie uvádí studie v Chile [14] a Bangladéši [15].

Možné vysvětlení těchto rozdílů je zaměnění dimethylthioarseničné kyseliny za DMAs^{III} v případě studií, které provádějí analýzu metabolitů pomocí HPLC-ICP-MS a identifikují specie na základě porovnání retenčních časů standardů [16]. V případě měření technikou generování hydridů, může být chyba způsobena špatně zvolenou hodnotou pH roztoku vzorku. Při hodnotě pH 6 dochází ke generování pouze z trojmocných specií, pokud je $\text{pH} \leq 1$ dochází k redukci i u pětímocných specií.

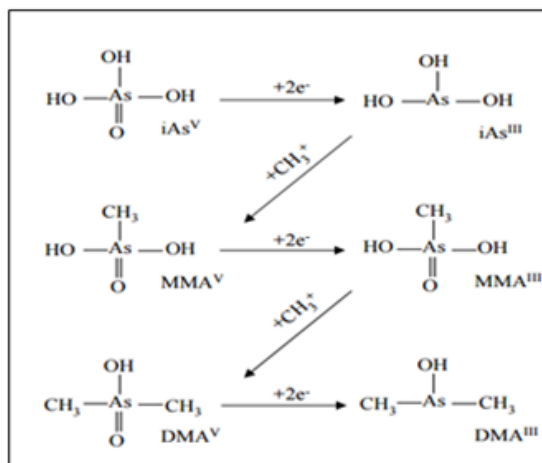
Bylo zjištěno, že toxicita těchto specií klesá v pořadí $\text{MAs}^{\text{III}} > \text{DMAs}^{\text{III}} = \text{iAs}^{\text{III}} > \text{iAs}^{\text{V}} > \text{DMAs}^{\text{V}} = \text{MAs}^{\text{V}}$ [17] [18]. Trojmocné methylované sloučeniny arsenu jsou více toxické, než pětímocné, což může být způsobeno tím, že mají vyšší afinitu pro vytvoření specifické vazby v buněčných proteinech a mohou působit jako inhibitory enzymů. [19]

Arsen a anorganické sloučeniny arsenu jsou prokázané karcinogeny, které způsobují rakovinu plic, kůže, močového měchýře, ledvin a jater [20]. Výsledky studie zabývající se vlivem koncentrace arsenu v pitné vodě na riziku vzniku rakoviny močového měchýře a ledvin poukazují, že toto riziko vzroste minimálně o 40 % u lidí dlouhodobě přijímajících arsen v koncentracích 10 ng/ml, oproti neexponovaným jedincům [21].

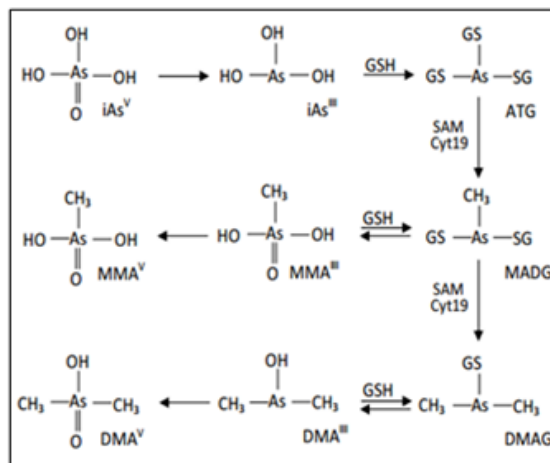
2.3 Metabolismus arsenu

Methylace iAs^{III} je hlavní metabolická dráha arsenu, která probíhá v játrech. Donorem methylové skupiny je s-adenosylmethionin, enzymem této reakce je arsen(3+)metyltransferaza (Cyt19) a kofaktorem glutathion [22].

Obecně přijímaná metabolická dráha arsenu, navržená v roce 1945 Challengerem [23], viz obr. 2.1, předpokládá řadu po sobě jdoucích redukcí a methylací spojených s oxidací, kdy konečným produktem je DMAs^{III} [24]. K tomuto mechanismu byly vytvořeny alternativní teorie, které předpokládají, že konečným produktem metabolismu jsou pětimocné specie MAs^{V} a DMAs^{V} [22].



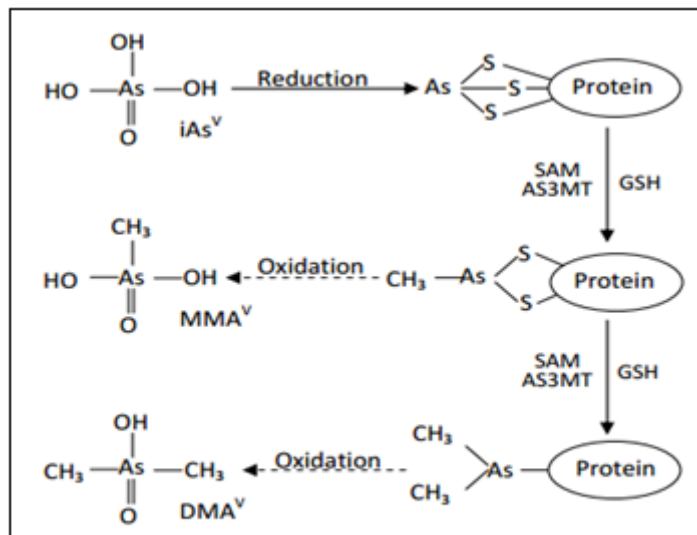
Obr. 2.1 Metabolická dráha arsenu (Challenger) [23]



Obr. 2.2 Metabolická dráha arsenu (Hayakawa) [9]

Novější teorie, zveřejněná v roce 2005 Hayakawou [9], viz obr. 2.2, předpokládá vznik komplexu $\text{As}(\text{GS})_3$, který je substrátem pro následnou enzymatickou metylaci. Takto vzniklý komplex $\text{MAs}(\text{GS})_2$ je opět enzymaticky methylován na $\text{DMAs}(\text{GS})$. Tyto komplexy jsou nestabilní a mohou být oxidovány na MAs^{V} a DMAs^{V} .

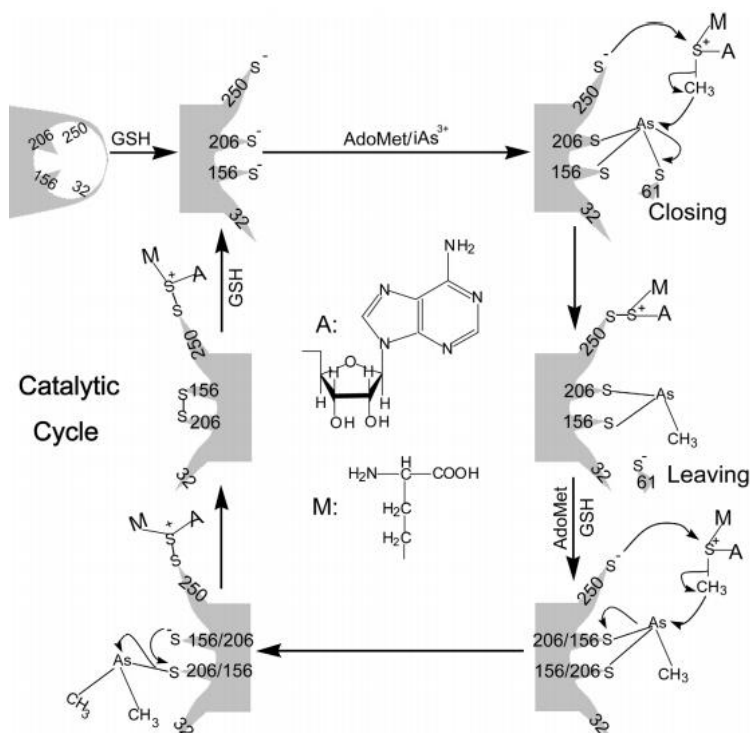
Teorie z roku 2006, kterou navrhl Naranmandura [25], viz obr. 2.3, zohledňuje vysokou afinitu trojmocného arsenu k proteinům. Trojmocné sloučeniny jsou navázány na protein a postupně enzymaticky methylovány. V prvním a druhém kroku methylace může být arsen vyváznán z proteinu glutathionem ve formě $\text{As}(\text{GS})_3$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$ a ty mohou přecházet do žluči. DMAsGS , který jako jediný nebyl ve žluči potkanů identifikován [10], může být vylučován do krevního oběhu a odkud do moči.



Obr.2.3 Metabolická dráha arsenu (Naranmandura) [25]

2.3.1 Funkce enzymu arsen(3+)metyltransferáza

Mechanismus enzymatické methylace arsenu byl pozorován experimentálně [26]. Tento na cystein bohatý enzym obsahuje specifické disulfidové vazby, na které je po rozštěpení navázán SAM a iAs^{III}. Bylo zjištěno, že disulfidová vazba je štěpena glutathionem, nebo jiným redukčním činidlem. Na základně tohoto experimentu byl vytvořen teoretický mechanismus methylace arsenu, viz obr. 2.4, který předpokládá, že arsen je během methylace navázán na enzym AS3MT.



Obr.2.4 Enzymatická methylace arsenu (Wang) [26]

2.4 Stabilita arsenových specií

Pro správné provedení speciální analýzy je důležité znát stabilitu zkoumaných specií. Při nesprávném zacházení se vzorkem, nebo při špatně zvolených podmínkách měření může docházet k rozpadu zjišťovaných specií, nebo k jejich přeměně na jiné specie.

Experimentálně byla porovnána stabilita MAs^{III} a DMAs^{III} v prostředí deionizované vody a moči při teplotách 25, 4 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [27]. Bylo zjištěno, že stabilita těchto arsenových specií roste se snižující se teplotou, při které jsou uchovávány [28]. Vzorky v deionizované vodě jsou stabilnější oproti vzorkům v moči. Nejméně stabilní je DMAs^{III} v moči, který při pokojové teplotě zcela oxiduje na DMAs^{V} během 90 minut, při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je tato doba prodloužena na 12 hodin.

Stabilita $\text{As}(\text{GS})_3$, $\text{MAs}(\text{GS})_2$ a $\text{DMAs}(\text{GS})$ byla testována při hodnotách pH 2,5; 8,5; 6,3 a teplotách 4 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejvyšší stabilita komplexů byla zjištěna při hodnotě pH 2,5, které odpovídá roztok 0,1% kyselina mravenčí, a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [1]. Nejdelší poločas rozpadu, 23 minut, při hodnotě pH 2 byl pozorován u $\text{DMAs}(\text{GS})$. Celkově lze komplexy seřadit podle stability takto: $\text{DMAs}(\text{GS}) > \text{MAs}(\text{GS})_2 > \text{As}(\text{GS})_3$ [29].

Nízkou stabilitu vykazují také $\text{As}(\text{GS})_3$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$ nalezené ve žluči potkanů. K jejich úplné hydrolyze a oxidaci na MAs^{V} a As^{V} došlo během šesti hodin od odebrání z těla potkanů [30]. Poměr $\text{As}(\text{GS})_3$ ku $\text{MAs}(\text{GS})_2$ závisí na podané dávce arsenu, se zvyšující se dávkou se také zvyšuje poměr $\text{As}(\text{GS})_3$ ku $\text{MAs}(\text{GS})_2$. Po podání arsenu byl pozorován samovolný vzrůst koncentrace glutathionu ve žluči, při dalším umělém navýšení koncentrace glutathionu, byla pozorována vyšší stabilita komplexů.

Vzhledem k těmto zjištěným skutečnostem je třeba k biologickým vzorkům arsenových specií přistupovat velmi opatrně a analýzu provést co nejdříve po jejich odběru.

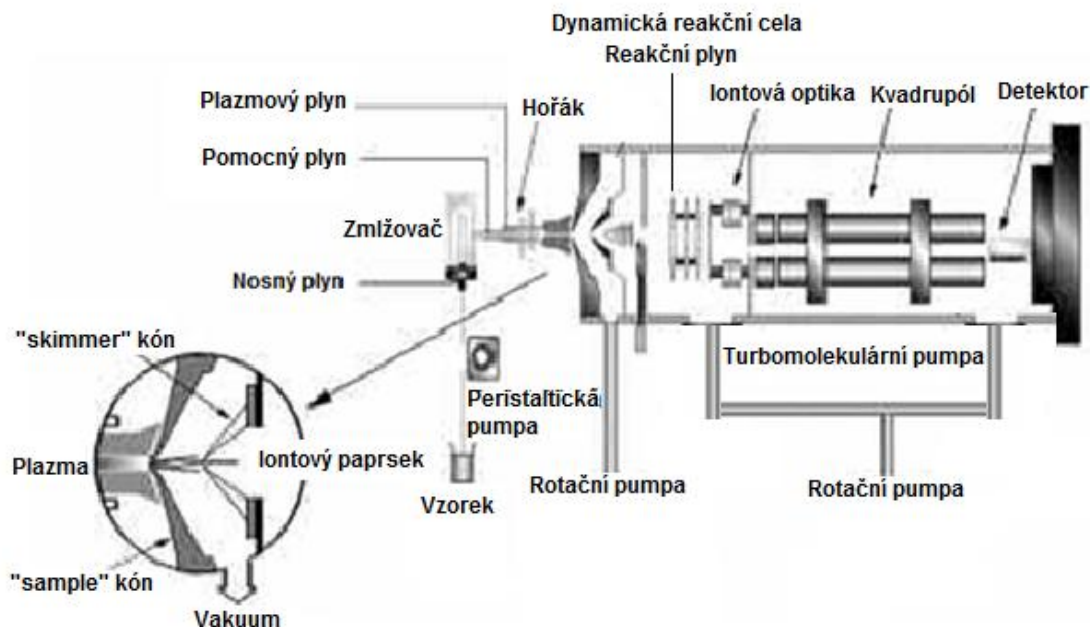
2.5 Metody analýzy arsenových specií

Problematika pitné vody znečištěné arsenem a snaha objasnit metabolismus arsenu v lidském těle dala podnět pro mnoho prací, které se zabývají speciální analýzou arsenu v různých maticích vod, potravin a biologických vzorků.

Nejpoužívanější technikou pro separaci arsenových specií je aniontově výměnná kapalinová chromatografie, méně často je používána také iontově párová chromatografie [11]. Tato technika je kombinována se spektrometrickou detekcí, nejčastěji s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem, jejíž výhodou je vysoká citlivost. Alternativou, která byla také použita v mnoha publikacích, je převedení arsenových specií technikou generování hydridů na příslušné hydridy. Tato technika je nejčastěji kombinována s AAS, ICP-MS nebo atomovou fluorescenční spektrometrií.(AFS) Žádná z těchto metod není univerzální pro všechny arsenové specie, proto je nutné techniky kombinovat a hledat optimální podmínky stanovení.

2.5.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Technika ICP-MS je v dnešní době hojně rozšířena a představuje běžnou techniku stopové elementární analýzy. Principem je ionizace atomů přítomných ve vzorku v argonovém indukčně vázaném plazmatu, které dosahuje teploty okolo 7500 10000 K a poskytuje stabilní proud iontů [31]. Právě tato stálost toku iontů a samotného plazmatu zaručuje dobrou reprodukovatelnost a stabilitu výsledků. Vzniklé ionty jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru skrz dva speciální kónusy. Ty oddělují prostor mezi plazmatem, kde je atmosférický tlak, a hmotnostním analyzátozem, který pracuje ve vysokém vakuu (10^{-3} Pa) viz obr. 2.5. Jako hmotnostní analyzátor se nejčastěji používá kvadrupól, před který je předřazena iontová optika, která fokusuje iontový paprsek a zároveň zajišťuje odstínění fotonů pocházejících z plazmatu, které by zvyšovaly pozadí měřeného signálu. Jako každá analytická metoda, tak i ICP-MS vykazuje určité druhy interferencí, které dělíme na spektrální a nespektrální. Jednou ze zásadních spektrálních interferencí je překryv izotopů různých atomů se stejným poměrem hmotnosti a náboje (m/z), případně překryvem s polyatomickými ionty. Překryv izotopu analytu s izotopem interferujícího iontu lze efektivně odstranit použitím dynamické reakční cely nebo kolizní cely. Kolizním plynem je nejčastěji helium. Atomy helia naráží do interferujících polyatomických iontů a mění jejich kinetickou energii. V reakčním módu podléhá interferent nebo analyt reakci s plynem. Pro analýzu arsenu (m/z 75) je nejzávažnější interferencí ion $[^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$.



Obr. 2.5 Schéma ICP-MS Agilent Technologies [31]

2.5.2 Metody kapalinové chromatografie pro speciační analýzu arsenu v biologických vzorcích

Většina metod vyvíjených pro speciační analýzu arsenu v biomedicínském výzkumu je zaměřena na analýzu moči [32]. V moči jsou arsenové specie, tedy iAs^{III} , iAs^V , MA^{III} , MA^V , DMA^{III} a DMA^V přítomny v iontové formě, proto je nejpoužívanější technikou právě iontově výměnná chromatografie. Separace je založena na interakci mezi nabitými molekulami analytu a nabitými funkčními skupinami vázanými na povrchu stacionární fáze. Hodnota pH a iontová síla mobilní fáze jsou primární parametry, které ovlivňují zadržování analytu na koloně. Pomocí aniontově výměnné kolony s mobilní fází o vysoké hodnotě pH lze separovat iAs^{III} , iAs^V , MA^V , DMA^V a DMA^{III} [33]. Specie MA^{III} a DMA^{III} mohou být naopak separovány při nízké hodnotě pH mobilní fáze na kationtově výměnné koloně.

Chromatografie s reverzní fází může být pro jednoduché arsenové specie použita pouze s přidavkem iont-párového činidla do mobilní fáze. Isokratickou elucí mobilní fází složené z roztoků terabutylammonium hydroxidu, kyseliny malonové a methanolu bylo dosaženo separace těchto specií: iAs^{III} , iAs^V , MA^V , DMA^V , MA^{III} a DMA^{III} [34].

2.5.3 Metody kapalinové chromatografie pro separaci arsenových komplexů s glutathionem

Pro úspěšnou analýzu glutathionových komplexů musí být zohledněna jejich nízká stabilita. Roztoky těchto komplexů musí být stále udržovány v chladu a při nízké hodnotě pH. Analýza musí být provedena co nejdříve po přípravě roztoku, případně co nejdříve po odebrání biologických vzorků.

Bylo zjištěno, že při separaci glutathionových komplexů na iontové výměnné koloně dochází k jejich rozpadu pravděpodobně již na začátku kolony a to v případě nízké i vysoké hodnoty pH mobilní fáze. Na výstupu z kolony byly detekovány pouze jednoduché arsenové specie. [1]

Podobné výsledky byly pozorovány také při separaci komplexů pomocí iontové párové chromatografie s mobilní fází tetrabutylammonium hydroxidem, kyselinou jablečnou a metanolem. Komplexy jsou zadržovány na koloně, kde dochází k jejich rozpadu a z kolony vychází pouze volné arsenové specie [2].

Úspěšná separace glutathionových komplexů byla provedena pouze na koloně s nepolární stacionární fází [3]. Jako mobilní fáze byla zvolena 0,1% kyselina mravenčí, také kvůli vhodné hodnotě pH (2,7), při které jsou komplexy stabilní. Byla testována také kyselina mravenčí o vyšší koncentraci (0,2%), ale tato změna neměla vliv na výsledek separace. Při izokratické separaci nebylo dosaženo eluce $\text{DMAs}^{\text{III}}(\text{GS})$. K eluci tohoto komplexu nedošlo ani s gradientem methanolu. Dokonalého rozdělení komplexů bylo dosaženo až elucí s gradientem acetonitrilu. V tomto provedení byla zjištěna stoprocentní výtěžnost arsenových specií. [1], [29].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a roztoky

Kyselina mravenčí >98% p.a. (Penta, Česká Republika)

Kyselina dusičná 65% Suprapur (Merck, Německo)

Hydroxid draselný chemicky čistý (Lachner, Česká Republika)

Tetrahydridoboritan sodný >97% (Aldrich, Německo)

Kyselina thioglykolová (TGA) >99% (Aldrich, Německo)

L-cystein HCl monohydrát, pro biochemii (Merck, Švýcarsko)

Tellur 1000 mg/l standardní roztok pro AAS (BDH, Velká Británie)

Acetonitril >99,9% (Lachner, Česká Republika)

Tris (hydroxymethyl)aminomethan HCl (Tris) >99% (Carl Roth, Německo)

Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP).(Aldrich, USA)

Glutathion (GSH) >98% (Sigma Aldrich, Japonsko)

S-(5'-adenozyl)-L-methionin chlorid (SAM) >75% (Sigma, USA)

Arsen(3+)metyltransferaza (AS3MT) (Enzym byl připraven v laboratoři skupinou

Dr. M. Stýbla z University of North Carolina at Chapel Hill)

Argon >99,996 % (SIAD S.p.A., Česká Republika)

Helium 99,998 % (SIAD S.p.A., Česká Republika)

Arsenové specie

iA^V komerční standardní roztok 1000 µg/ml (As₂O₅, Merck, Německo)

Roztoky arsenových specií, používané při experimentech, byly připravovány ze zásobních roztoků o koncentraci 1000 µg/ml. Zásobní roztoky o přesné koncentraci byly připraveny rozpuštěním naváženého množství standardní látky ve vodě v odměrné baňce.

Standardní látky pro přípravu zásobních roztoků:

iAs^{III} (As₂O₃, Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika) Rozpouštěný v 0,5 ml 10% KOH.

MAs^{III} (CH₃AsI₂, [29] Syntetizoval, Ing. L.Havlíček, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.)

MAs^V (Na₂CH₃AsO₃ · 6 H₂O, Chem Service, Inc., USA)

DMAs^{III} ((CH₃)₂AsI, [29] Syntetizoval Ing. L.Havlíček, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.)

DMAs^V ((CH₃)₂AsO(OH), Chem Service, USA)

Standardy komplexů

MAs(GS)₂ a As(GS)₃ (Syntéza [29] [35], Ing L.Havlíček, Ústav experimentální botaniky AV ČR, vvi) Pro přípravu zásobního roztoku o koncentraci 100 µg/ml byla navážka 9,38 mg MAs(GS)₂ a 13,26 mg As(GS)₃ rozpuštěna v 10 ml v 0,1% kyselině mravenčí chlazené na ledu. Zásobní roztoky byly připravovány vždy bezprostředně před experimentem

Tris pufr

Tris pufr byl připraven o koncentraci 0,75 mol/l v deionizované vodě. Za míchání a měření pH bylo pomocí 10% hydroxidu draselného upraveno pH roztoku na požadovanou hodnotu 6. Tento roztok byl připravován denně čerstvý.

Kyselina thioglykolová

Byl používán 2,5% roztok v deionizované vodě, který byl připravován denně čerstvý.

Tetrahydridoboritan sodný

Roztok byl připraven rozpuštěním 1g NaBH₄ v 100 ml deionizované vody s přídavkem 1 ml 10% hydroxidu draselného. Tento roztok byl připravován denně čerstvý.

3.2 Metody měření

3.2.1 Instrumentace

- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, 7700x (Agilent Technologies, USA)
- Kvarternární gradientový HPLC systém 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA) s temperovaným autosamplerem a kolonovým termostatem.
- Autosampler ASX – 500 Series, (Agilent Technologies, USA)
- Separální kolona Aeris Widepore XB-C₁₈. Velikost kolony 250x2,10 mm, pórovitost náplně kolony 3,6 µm. (Phenomenex, USA)
- Digitální průtokoměr pro helium, argon (Omega, USA)
- pH metr Seven easy pH (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Analytické váhy ABT 220-5DM (Kern, Německo)
- Automatické pipety (Biohit, Finsko)

3.2.2 HPLC-HG-ICP-MS a HPLC-ICP-MS

Vzorky byly dávkovány pomocí autosampleru, který je součástí systému HPLC. Separace vzorků byla realizována na koloně s reverzní fází Aeris Widepore XB-C₁₈, která byla během analýzy chlazená na teplotu 5 °C. Separace byla prováděna izokratickou elucí s mobilní fází o složení 0,1% kyselina mravenčí s 2 % acetonitrilu, nebo gradientovou elucí, jejíž průběh je popsán v tab. 3.1. Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min.

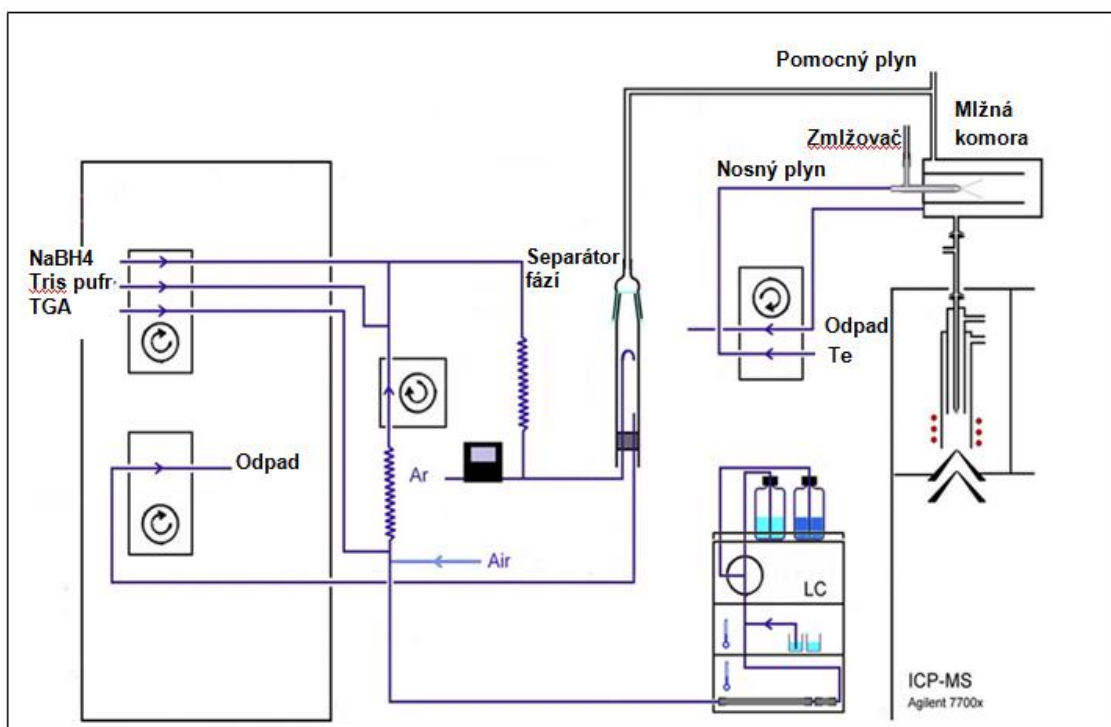
Tab. 3.1 Složení mobilní fáze během gradientové eluce

(A) 2 % acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí

(B) 80 % acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí

Čas (min)	A (obj.%)	B (obj.%)
0-5	100	0
5-20	70	30
20-21	70	30
21-22	100	0
22-35	100	0

Za výstup z kolony bylo zapojeno zařízení pro generování hydridů s online předredukcí pětimocných arsenových specií kyselinou thioglykolovou. Systém, schéma viz obr. 3.1, byl sestaven z polytetrafluorethylenových hadiček a křemenného separátoru fází, který je ve spodní části utěsněn pryžovým septem. V septu jsou vytvořeny dva otvory, jeden pro hadičku, kterou je přiváděn vzorek a druhý pro hadičku, kterou je odčerpáván kapalný odpad. V horní části separátoru je hadička pro odvod plynných hydridů. Po výstupu z kolony byly separované arsenové specie redukovány 2,5% kyselinou thioglykolovou v reakční cívce po dobu 120 s. Průtok kyseliny byl 0,15 ml/min. Za výstupem z reakční cívky byl vzorek mísen s Tris pufrům a tetrahydridoboritanem sodným, průtok těchto reakčních činidel byl 0,5 ml/min. Kyselina, pufr a boritan byly čerpány peristaltickou pumpou, která je součástí techniky ICP-MS. Takto vzniklá směs pro generování hydridů reagovala v reakční cívce. K výstupu z reakční cívky byl připojen nosný plyn pro hydridový generátor, argon o průtoku 200 ml/min. Těkavé hydridy byly nosným plynem unášeny do detektoru ICP-MS. Hodnoty nastavené pro ICP-MS jsou uvedené v tab. 3.2. Pro tuto metodu byl používán plazmový hořák s injektorem o vnitřním průměru 2,5 mm. Jako srovnávací prvek měření byl použit roztok telluru o koncentraci 100 ng/ml v 0,2% HNO₃ s 4% methanolu.



3.1 Schéma systému HPLC-HG-ICP-MS (online zapojení)

Tab. 3.2 Nastavení ICP-MS v parametřích pro metodu HPLC-HG-ICP-MS

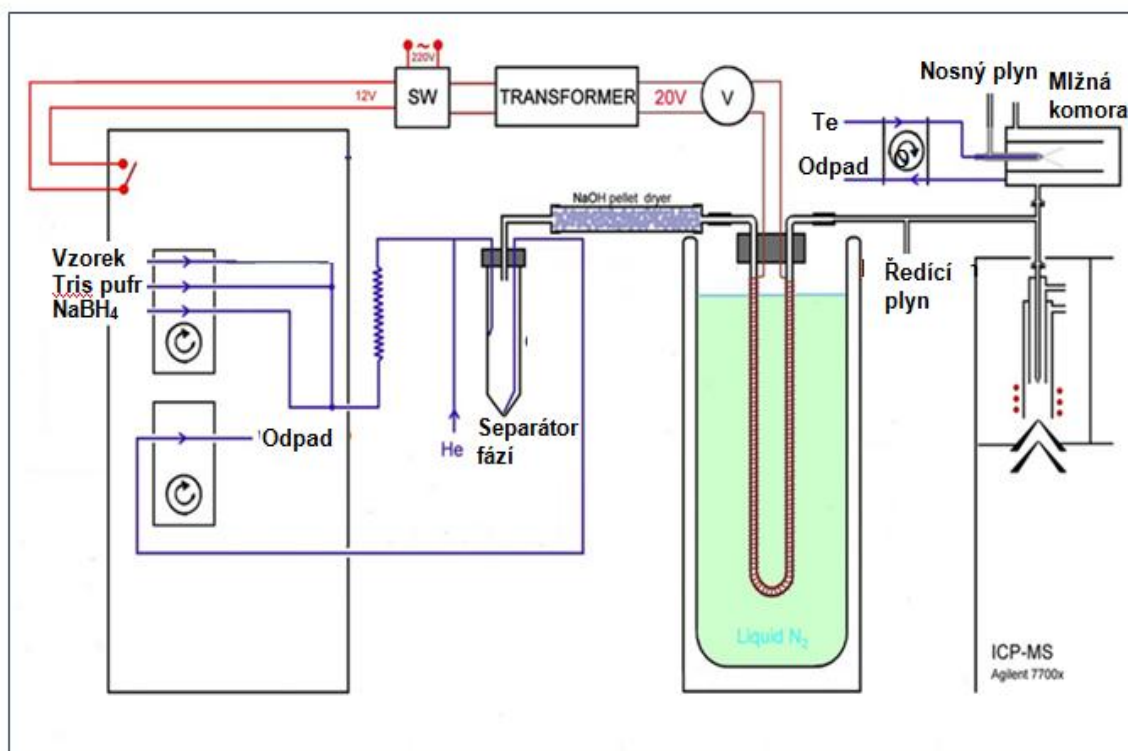
Parametr	Nastavená hodnota pro ICP-MS
Nosný plyn (Ar)	0,6 l/min
Pomocný plyn (Ar)	0,35 l/min
Reakční cela (He)	3,5 ml/min
Průtok Te	0,3 ml/min
Příkon do plazmatu	1600 W

Některé vzorky byly analyzovány bez postkolonového generování hydridů, tedy metodou HPLC-ICP-MS. Nastavené parametry byly stejné jako pro metodu HPLC-HG-ICP-MS. Byl použit plazmový hořák pro organická rozpouštědla s vnitřním průměrem injektoru 1,5 mm. Srovnávacím prvkem měření byl roztok telluru o koncentraci 100 ng/ml v 0,2% HNO₃

3.2.3 HG-CT-ICP-MS

System pro generování hydridů s vymrazováním byl podrobně popsán v citaci [36] a diplomové práci [37], schéma systému je na obr. 3.2. Byl sestaven z polytetrafluorethylenových hadiček a separátorem fází, vytvořeného z polypropylenové zkumavky. Víčko zkumavky má tři otvory, kterými prochází hadičky pro vstup vzorku, odvádění plynné fáze a odčerpání kapalného odpadu.

Vzorek byl dávkován ručně automatickou pipetou do pipetovací špičky spojené s hadičkou, kterou byl vzorek po spuštění měřicího cyklu odčerpán peristaltickou pumpou. Vzorek se mísí nejprve s Tris pufrem a poté s tetrahydridoboritanem sodným. Tato směs pro generování hydridů reaguje v reakční cívce. Za reakční cívku je připojen nosný plyn, helium o průtoku 75 ml/min. V separátoru fází jsou odděleny hydridy arsenu od kapalně části vzorku a přes sušicí trubici přechází do kryogenní pasti. Kryogenní past je tvořena křemennou U-trubicí, která je po celé délce ovinuta odporovým drátem U-trubice a ponořena z tří čtvrtin do nádoby s kapalným dusíkem. Nosný plyn a vodík, uvolněný při reakci volně prochází trubicí, zatímco hydridy jsou zachyceny na jejím začátku. Po dokončení generování byla sejmuta nádoba s dusíkem a trubice byla ohřívána odporovým drátem. Jednotlivé hydridy z trubice postupně odchází s nosným plynem do ICP-MS v pořadí určeném jejich teplotou varu: AsH_3 (-55 °C), CH_3AsH_2 (2 °C) a $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$ (36 °C) [38]. Hodnoty nastavené pro ICP-MS jsou uvedené v tab. 3.3. Jako srovnávací prvek měření byl použit roztok telluru v 0,2% HNO_3 o koncentraci 100 ng/ml. Cyklus měření je podrobně popsán v citaci [36].



Obr. 3.2 Schéma metody HG-CT-ICP-MS

Tab. 3.3 nastavení ICP-MS při metodě HG- ICP- MS

Parametr	Nastavená hodnota pro ICP-MS
Nosný plyn (Ar)	0,6 l/min
Zředovací plyn (Ar)	0,55 l/min
Reakční cela (He)	3,5 ml/min
Příkon do plazmatu	1600 W

3.3 Postupy experimentů

Pro experimenty, jejichž výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.1, 4.2 a 4.3 byl dávkovaný objem vzorku shodně 25 μ l.

3.3.1 Standardy komplexů As(GS)₃ a MAs(GS)₂

Kalibrační roztoky iAs^V a MAs^V o koncentraci 50 ng/ml byly připraveny v 0,1% kyselině mravenčí. Roztoky standardů byly ihned po přípravě analyzovány metodou HPLC-HG-ICPMS s organickým gradientem mobilní fáze. Vzorokly byly dávkovány o objemu 50 µl. Kolona i autosampler byly chlazeny na teplotu 5 °C. Obsah celkového arsenu v roztocích komplexů byl ověřen technikou ICP-MS s kapalným zmlžováním za doporučených podmínek.

3.3.2 Methylační směs

Reagencie pro in vitro methylační směs

Složky reakční směsi enzymatické methylace byly rozpuštěny v Tris pufru o koncentraci 0,1 mol/l a hodnotě pH 7,4. [5] Koncentrace těchto roztoků byla:

TCEP a GSH 0,1 mol/l a SAM 0,01 mol/l.

Směs 1 a 2

Směs a reakční roztoky byly v průběhu připraveny chlazeny na ledu. Blanky a standardy byly připravovány do nových plastových mikrozkušavek, kompletní vzorek methylační směsi byl připraven v plastové mikrozkušavce, která obsahovala 20µg/35µl enzymu AS3MT, přídavky ostatních reakčních činidel jsou uvedeny v tab. 3.4.

Tab.3.4 Složení směsi a blanku enzymatické methylace

Reagencie	Blank (µl)	Směs(µl)
Tris HCl pufr (0,1 mol/l)	225	225
TCEP (0,1 mol/l)	3	3
GSH (0,1 mol/l)	3	3
10 min inkubace při 37 °C		
SAM (0,01 mol/l)	30	30
iAs ^{III} (1 µg/ml)	-	13,5

Takto připravené dvě duplicitní směsi byly inkubovány 2,5 hodiny při 37 °C. Ihned po ukončení inkubace byly směsi analyzovány technikou HPLC-ICP-MS s organickým gradientem mobilní fáze. Doba analýzy byla 35 min a dávkovaný objem vzorku byl 50 µl. Autosampler byl chlazen na 5 °C. Analýza byla opakována dvakrát pro každou směs. Po ukončení analýzy byly vzorky uloženy při teplotě -20°C.

Následující den byly směsi 1 a 2 analyzovány technikou HG-CT-ICP-MS. Kalibrační standardy iAs^{III} o koncentraci 25 a 50 ng/ml a MAs^V a $DMAs^V$ o koncentraci 2,5 a 5 ng/ml byly připraveny v deionizované vodě. Standardy byly hodinu před měřením předredukovány přidáním 0,1 g L-cysteinu k 5 ml standardu. Standardy o objemu 10 µl byly dávkovány pipetou do pipetovací špičky, ihned po jejím vyprázdnění bylo do špičky pipetováno 100 µl deionizované vody, aby bylo zajištěno kvantitativní přenesení vzorku. Stejným způsobem byly měřeny směsi, které byly předredukovány smícháním 50 µl směsi (blanku) s 50 µl 4% L-cysteinu.

Směs 3 a 4

Směs 3 a 4 byla připravena stejným způsobem jako směs 1 a 2. Ihned po ukončení inkubace byly vzorky analyzovány metodou HPLC-HG-ICP-MS s organickým gradientem mobilní fáze. Po ukončení analýzy byly vzorky uloženy při teplotě -20°C

Směs 5 a 6

Směs 5 a 6 byla připravena a analyzována stejným postupem, jako směs 3 a 4, ale glutathion byl ve směsi nahrazen Tris pufrem. Po ukončení analýzy byly vzorky uloženy při teplotě -20°C

Směs 3 a 4 byla analyzována metodou HG-CT-ICP-MS týden po přípravě vzorků stejným postupem jako směsi 1 a 2. Obdobně také směsi 5 a 6, které byly tímto způsobem analyzovány už druhý den po přípravě.

Průběh methylace iAs^{III}

Reakční směs 7 a 8 byla připravena podle již popsaného postupu viz tab. 3.4 a ihned po přípravě byla opakovaně analyzována metodou HPLC-HG-ICP-MS po celou dobu inkubace. Autosampler byl temperován na teplotu 37 °C, tedy na teplotu vhodnou k inkubaci, kolona byla chlazená na 5 °C a objem dávkovaného vzorku byl 25 µl.

3.3.3 Tvorba komplexu z iAs^{III} , MAs^V , $DMAs^V$ a glutathionu

Komplexy byly připraveny smícháním dané specíe s glutathionem viz tab. 3.5 a rozpuštěním v 0,1 molárním Tris pufru o hodnotě pH 7,4.

Tab. 3.5 příprava komplexu arsenové specíe s glutathionem

Reagencie	Standard (μl)	Blank (μl)	Směs (μl)
Tris HCl pufr (0,1 mol/l)	280	280	280
GSH (0,1 mol/l)	-	3	3
As specíe (1 μ g/ml)	14	-	14

Vzorky byly měřeny metodou HPLC-HG-ICP-MS s organickým gradientem mobilní fáze. Reakční směs byla analyzována okamžitě po přípravě, měření byla několikrát opakována ihned po sobě. Autosampler byl temperován na teplotu 37 °C, kolona byla chlazená na 5 °C, dávkovaný objem vzorku byl 25 μ l.

3.3.4 Vzorky moči

Vzorky moči byly separovány s organickým gradientem mobilní fáze. Autosampler i kolona byly chlazeny na 5 °C, dávkovaný objem vzorku byl 25 μ l.

Vzorek 1

Z prvního vzorku moči (vzorek 1) byly před analýzou odebrány dva duplicitní vzorky, které byly měřeny metodou HPLC-HG-ICP-MS. Kalibrační roztoky iAs^V , MAs^V a $DMAs^V$ byly připraveny v deionizované vodě o koncentraci 2,5 a 5 ng/ml. Roztoky byly ředredukovány 2% L-cysteinem hodinu před analýzou metodou HG-CT-ICP-MS. Vzorky byly hodinu před měření smíchány s 4% L-cysteinem v poměru 1:1. Pipetou bylo dávkováno 25 μ l vzorku, po nasátí byla pipetovací špička propláchnuta 100 μ l deionizované vody.

Vzorek 2

Vzorek moči (vzorek 2) byl analyzován ihned po odebrání metodou HPLC-HG-ICP-MS bez předredukce kyselinou thioglykolovou, dvě opakovaná měření a poté dvakrát s redukcí kyselinou thioglykolovou. Byly měřeny dva duplicitní vzorky.

Kalibrační roztoky iAs^V , MAs^V a $DMAs^V$ byly připraveny v deionizované vodě o koncentraci 1 a 2 ng/ml. Roztoky byly předredukovány 2% L-cysteinem hodinu před analýzou metodou HG-CT-ICP-MS. Neredukované vzorky byly před analýzou ředěny 1:4 s deionizovanou vodou a předredukovány vzorky 1:9 s 2% L-cysteinem hodinu před analýzou. Bylo dávkováno 200 μ l vzorku, pipetovací špička byla propláchnuta 200 μ l deionizované vody.

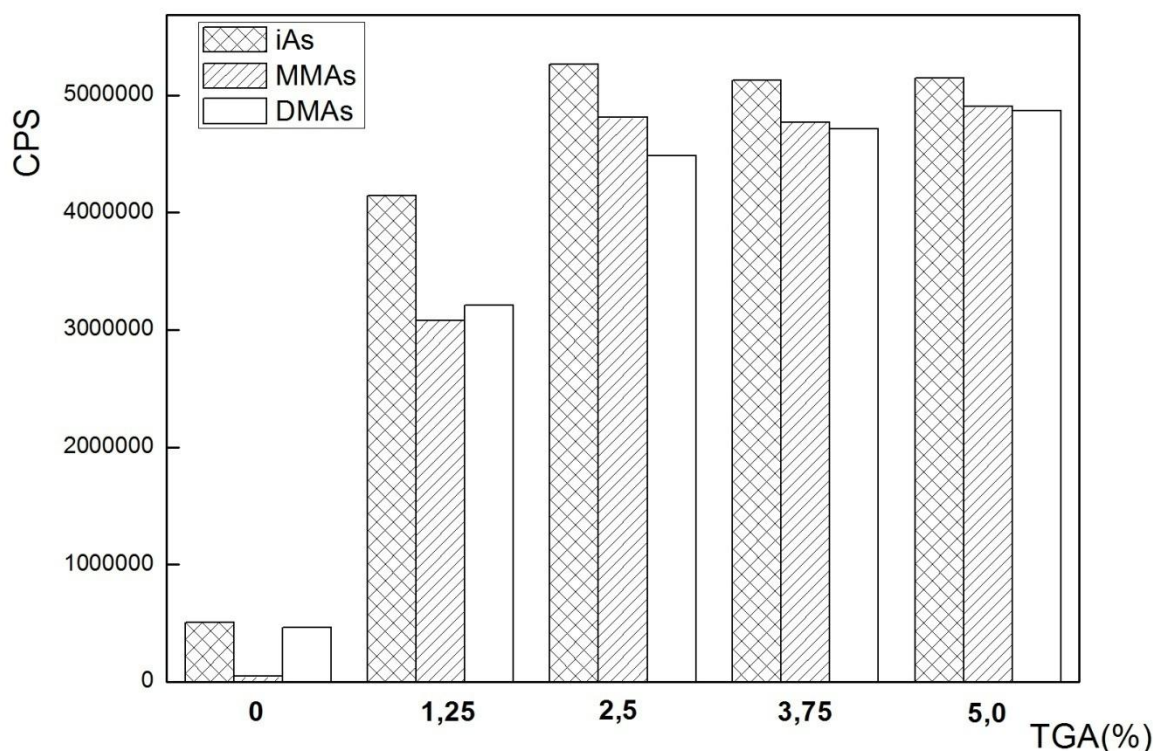
Vzorek 3 a 4

Další vzorky (vzorek 3 a 4) byly měřeny pouze metodou HG-CT-ICP-MS, kalibrační roztoky byly připraveny stejně jako v případě vzorku 2. Předredukováný vzorek byl ředěn 1:4 s 2% L-cysteinem hodinu před měřením. Bylo dávkováno 100 μ l vzorku, pipetovací špička byla propláchnuta 200 μ l deionizované vody.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace koncentrace kyseliny thioglykolové pro HPLC-HG-ICP-MS

Studie online systému generování hydridů arsenových specií s předredukcí kyselinou thioglykolovou uvádí jako dostatečnou dobu pro redukcí dvě minuty a optimální výslednou koncentrací kyseliny 1% (m/v) [39]. Na základě této publikace byl proměřen vliv kyseliny thioglykolové o původní koncentraci 0;1,25; 2,5; 3,75; 5 % (m/v) na výsledné plochy píků v chromatogramu vodných roztoků iAs, MAs a DMAs viz obr 4.1. Roztoky specií byly připraveny o koncentraci 25 ng/ml, která byla ověřena technikou ICP-MS s kapalným zmlžováním. Výsledky měření byly použity ke korekci hodnot získaných metodou HPLC-HG-ICP-MS.



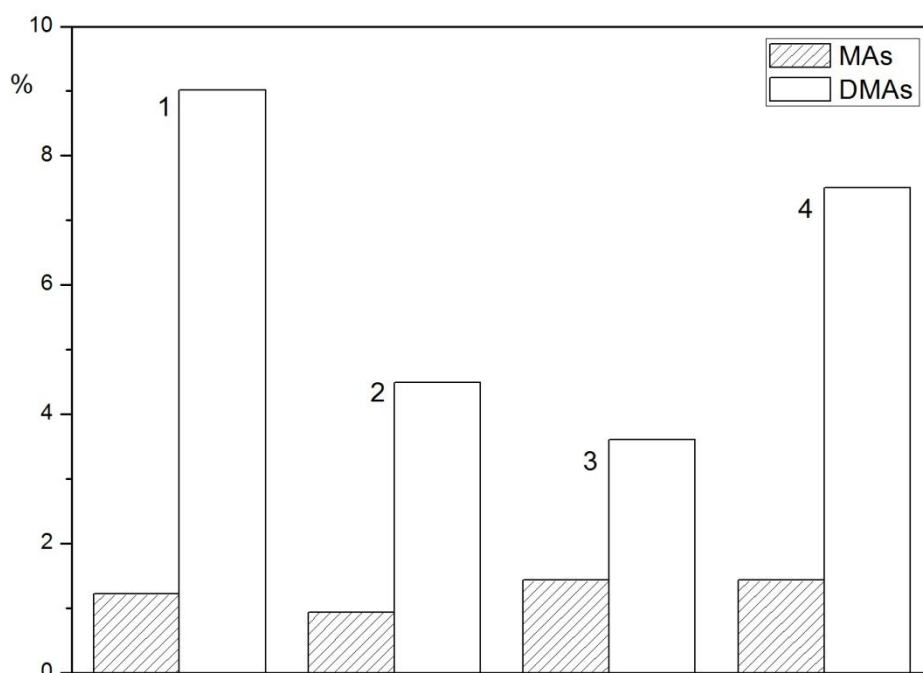
Obr. 4.1 Vliv koncentrace kyseliny thioglykolové na plochy píků iAs, MAs a DMAs

Z obr.4.1 je patrné, že koncentrace kyseliny thioglykolové menší jak 2,5% (m/v) není dostatečná pro účinnou předredukcí. Naopak vyšší koncentrace kyseliny nemá vliv na plochu píků.

Pro všechna následující měření byla použita koncentrace 2,5% (m/v). Průtok kyseliny thioglykolové byl 0,15 ml/min a mísí se se vzorkem unášeným mobilní fází rychlostí 0,25 ml/min. Vzorek je tedy redukován koncentrací přibližně 1% (m/v), tento závěr je v dobré shodě s výsledky práce [39].

4.2 Generování hydridů z MAs^{V} a DMAs^{V} bez předredukce

Při generování hydridů z reakční směsi o hodnotě pH 6 by nemělo docházet ke vzniku těkavých hydridů z pětimocných specií. Na obr. 4.1 je však vidět, že ke generování hydridů z pětimocných specií dochází i bez předredukce kyselinou thioglykolovou. Pro vysvětlení tohoto artefaktu byly porovnány dvě složení mobilní fáze použité pro metodu HPLC-HG-ICP-MS: 0,1% kyselina mravenčí a deionizovaná voda. Testovány byly roztoky dvou specií o stejné koncentraci 10 ng/ml: MAs^{V} , u kterého byly redukovány nanejvýš 2 % a DMAs^{V} , který byl redukován až z 10 %. Signály < 6 % DMAs^{V} během generování hydridů při pH 6 byly pozorovány také v práci [36]. Signál vzorku iAs^{V} v obr. 4.1 byl způsoben částečnou samovolnou redukcí standardu na iAs^{III} .



Obr. 4.2 Plochy píků MAs^{III} a DMAs^{III} v závislosti na složení rozpouštědla a mobilní fáze (v tomto pořadí): (1) kys.mravenčí a kys.mravenčí (2) kys.mravenčí a voda (3) voda a voda (4) voda a kys.mravenčí.

Obrázek 4.2 ukazuje, že signál DMAs^{V} bez předredukce závisí na složení rozpouštědla a mobilní fáze, respektive na jejich pH. Experimentálně byly zjištěny hodnoty pH reakční směsi pro generování hydridů bez předredukce kyselinou thioglykolovou. Pokud je složení mobilní fáze pouze deionizovaná voda, pH směsi má hodnotu 6,4. V případě, že mobilní fáze je složena z 0,1% kyseliny mravenčí, klesne hodnota pH směsi na 5,3.

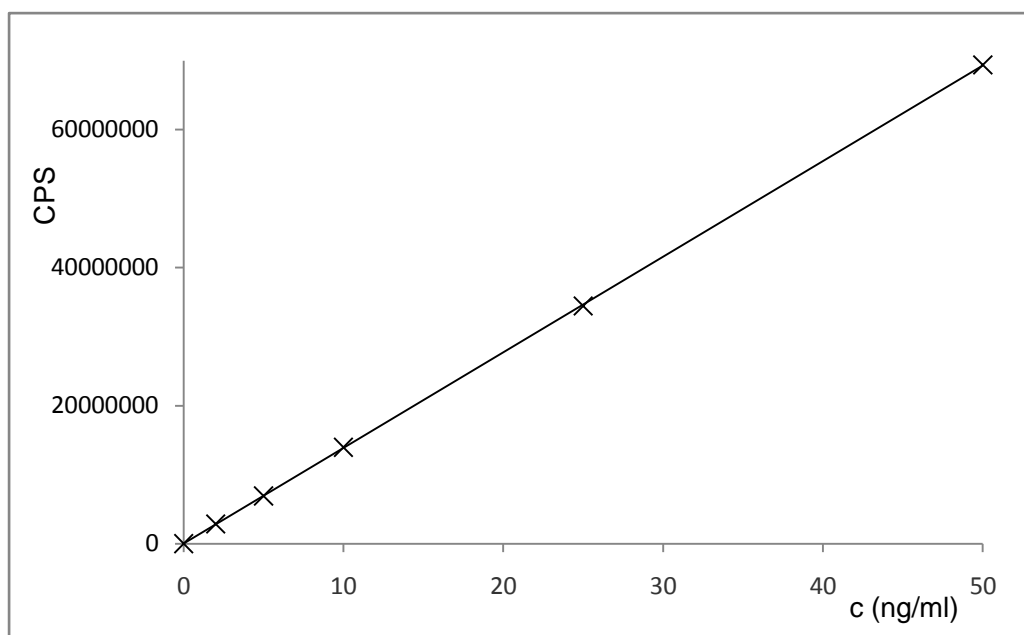
Příčinou redukce DMAs^{V} bez kyseliny thioglykolové je tedy pravděpodobně nižší hodnota pH, způsobená 0,1% kyselinou mravenčí. Pro další měření byla použita mobilní fáze o složení: 0,1% kyselinou mravenčí/2 % acetonitrilu, které je optimální pro stabilitu trojmocných arsenových specií. Při speciální analýze, s postkolonovým generováním bez předredukce kyselinou thioglykolovou, je tedy nutné zohlednit 10% redukci DMAs^{V} vlivem $\text{pH} < 6$, způsobenou nedostatečnou selektivitou generování hydridů.

4.3 Citlivost a meze detekce metod HPLC-ICP-MS a HPLC-HG-ICP-MS

Pro speciální analýzu arsenových sloučenin metodou HPLC-ICP-MS a HPLC-HG-ICP-MS byly určeny a porovnány meze detekce.

Nejprve byly měřeny technikou HPLC-ICP-MS kalibrační roztoky iAs^{V} , MAs^{V} a DMAs^{V} v deionizované vodě s vodou místo mobilní fáze a kalibrační roztoky připravené v 0,1% kyselině mravenčí s mobilní fází 0,1% kyselinou mravenčí. Koncentrace kalibračních roztoků byla 10, 25 a 50 ng/ml. Takto byly získány směrnice kalibrační přímky roztoků iAs^{V} , MAs^{V} a DMAs^{V} . Sestavené kalibrační závislosti měly lineární průběh. Citlivost pro MAs^{V} a DMAs^{V} je téměř stejná, pro iAs^{V} je citlivost nižší, ale rozdíly nepřesáhly 8 %. Na základě těchto výsledků můžeme předpokládat, že volba rozpouštědla pro arsenové specie, deionizovaná voda nebo 0,1% kyselina mravenčí, neovlivní výsledek měření. Z devíti opakování měření slepého pokusu byla vypočítána směrodatná odchylka, jejíž trojnásobek po přepočtení na koncentraci odpovídá mezi detekce uvedené v tab. 4.1.

Obdobně byla proměřena kalibrační závislost a určeny meze detekce pro metodu HPLC-HG-ICP-MS. Kalibrační standardy iAs^{III} byly připraveny o v 0,1% kyselině mravenčí. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.1 a na obr. 4.3.



Obr. 4.3 Kalibrační závislost roztoků iAs^{III} získaná metodou HPLC-HG-ICP-MS

Tab. 4.1 směrnice kalibračních přímků získané metodou HPLC-HG-ICP-MS a HPLC-ICP-MS

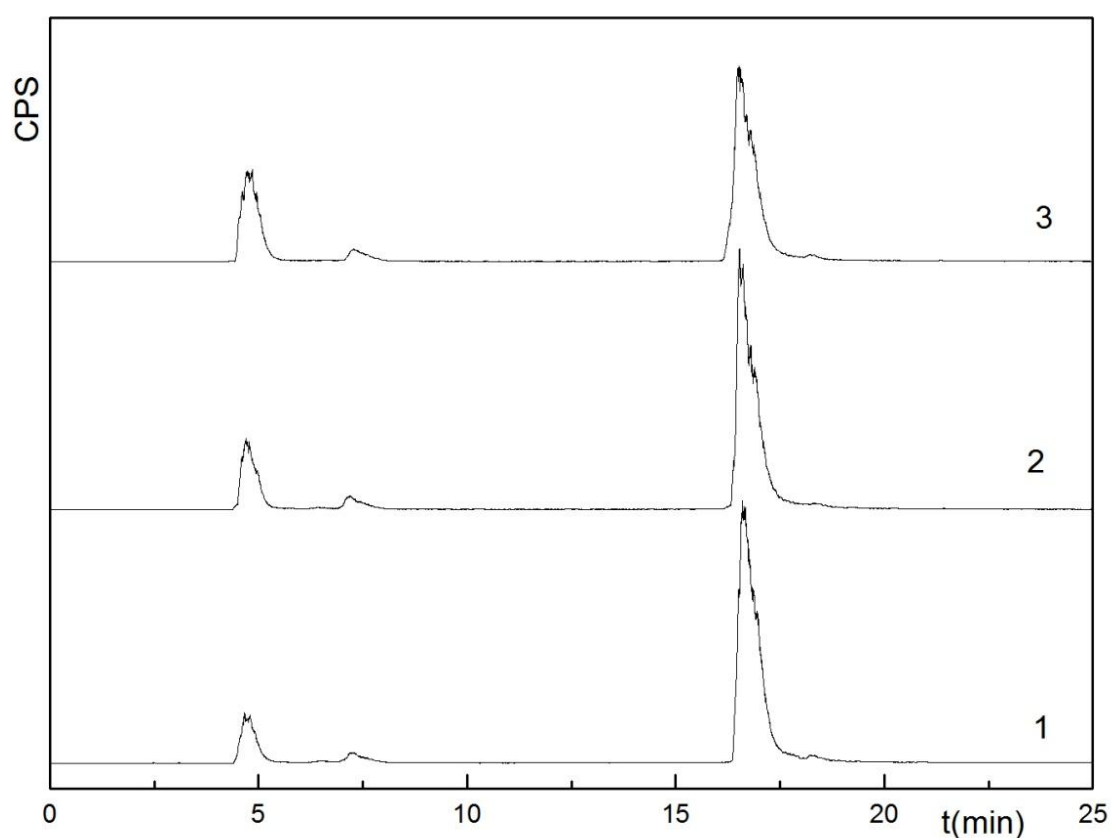
HPLC-ICP-MS	iAs^V	MAs^V	$DMAs^V$
Směrnice přímků (Deionizovaná voda)	32776	36536	35245
Směrnice přímků (0,1% kyselina mravenčí)	32379	35215	35226
Mez detekce [pg/ml]	185	170	170
HPLC-HG-ICP-MS			
Směrnice přímků (0,1% kyselina mravenčí/2 % acetonitril)	1 385 194	-	-
Mez detekce [pg/ml]	5	-	-

Z výsledků lze konstatovat, že zapojením postkolonového generování bylo dosaženo přibližně 42násobného zvýšení citlivosti, a 37násobně nižší meze detekce oproti přímému zmlžování mobilní fáze metodou HPLC-ICP-MS. Shodná citlivost pro methylované specie byla ověřena dalšími experimenty, lze tedy předpokládat, že meze detekce jsou podobné [40].

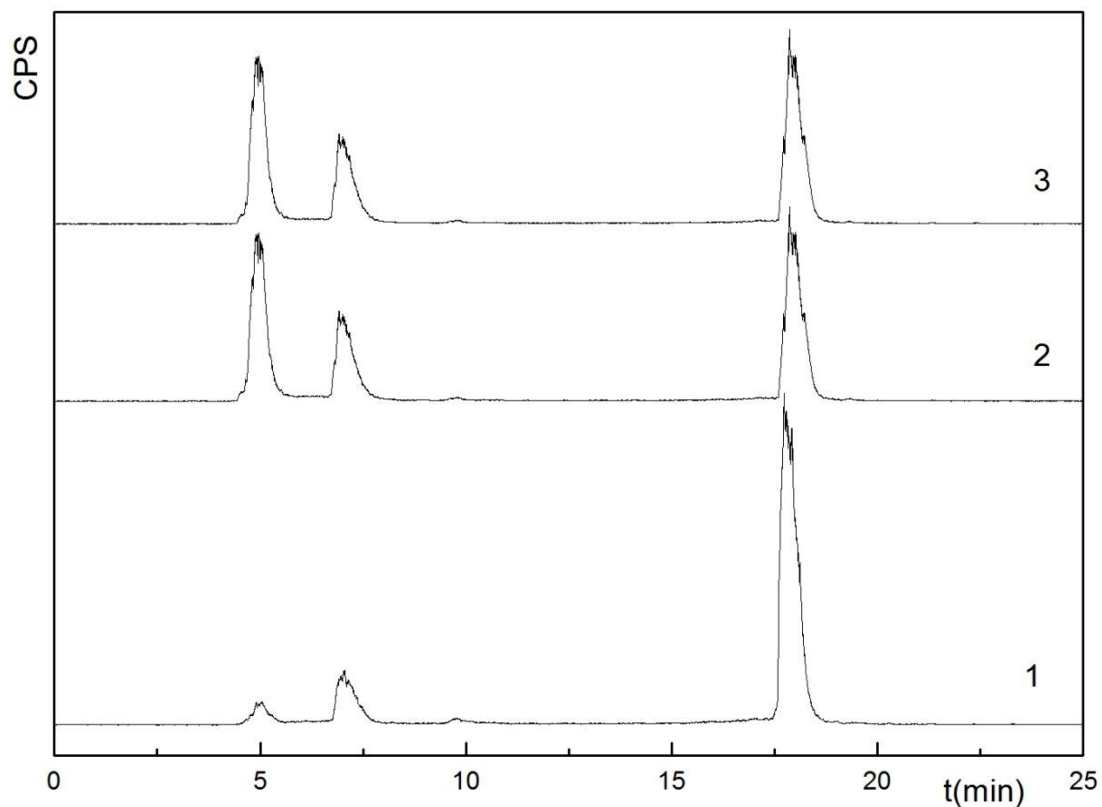
4.4 Standardy komplexů $\text{As}(\text{GS})_3$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$

Bylo třeba ověřit, zda při analýze glutathionových komplexů metodou HPLC-HG-ICP-MS dochází ke generování hydridů a zda jsou komplexy zcela eluovány z kolony. Pomocí standardů $\text{As}(\text{GS})_3$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$ byla testována účinnost této metody a stabilita komplexů při analýze. Syntéza komplexu $\text{DMAs}(\text{GS})$ je obtížná a v době provádění těchto experimentů nebyl standard k dispozici.

Vzhledem k nízké stabilitě komplexů $\text{MAs}(\text{GS})_2$ a $\text{As}(\text{GS})_3$ byla teplota autosampleru nastavena na 4 °C. Standardy byly ihned po přípravě opakovaně analyzovány technikou HPLC-HG-ICP-MS, získané chromatogramy jsou na obr. 4.4 a obr. 4.5.



Obr. 4.4 Chromatogramy standardu $\text{As}(\text{GS})_3$ získané technikou HPLC-HG-ICP-MS. Chromatogram okamžitě po přípravě (1), 35 minut (2) a 110 minut (3) od přípravy roztoku.



Obr. 4.5 Chromatogramy standardu MAs(GS)_2 získané technikou HPLC-HG-ICP-MS, doba analýzy 35 minut. Chromatogram okamžitě po přípravě (1), 35 minut (2) a 180 minut (3) od přípravy roztoku.

Z obr. 4.4 a 4.5 je patrné, že k rozpadu komplexů dochází už po první analýze. Komplex As(GS)_3 byl během těchto měření stabilnější než MAs(GS)_2 . První pík v chromatogramu přísluší nenavázaným arsenovým speciím a poslední pík je glutathionový komplex. Druhý pík nebyl identifikován a bude předmětem dalších experimentů například pomocí techniky ES-ICP-MS. Tyto komplexy, včetně standardu DMAs(GS) , byly už dříve analyzovány metodou HPLC-ICP-MS [4]. Druhý pík v chromatogramu tohoto komplexu byl identifikován jako DMAs^{III} [3].

Tab. 4.2 Retenční časy píku v chromatogramu $\text{As}(\text{GS})_3$, $\text{MAs}(\text{GS})_2$ a $\text{DMAs}(\text{GS})$, měřeno metodou HPLC-ICP-MS a HPLC-HG-ICP-MS. * [4]

metoda	Retenční čas (min)								
	$\text{As}(\text{GS})_3$			$\text{MAs}(\text{GS})_2$			$\text{DMAs}(\text{GS})$		
HPLC-ICP-MS*	2,3	4,4	13	2,6	4,4	14,8	2,5	4,2	16,3
HPLC-HG-ICP-MS	4,7	7,3	16,5	5	7	17,9	-	-	-

Posun retenčních časů u metody HPLC-HG-ICP-MS oproti HPLC-ICP-MS je způsoben setrváním vzorku v předredukční cívce a v generátoru hydridů.

Obsah celkového arsenu (jako součet ploch jednotlivých píků) ve standardech komplexů byl porovnán se standardy iAs^{V} a MAs^{V} . Výsledné koncentrace byly porovnány s obsahem celkového arsenu těchto roztoků získaných technikou ICP-MS s kapalným zmlžováním. Výsledky těchto měření jsou v tab. 4.3.

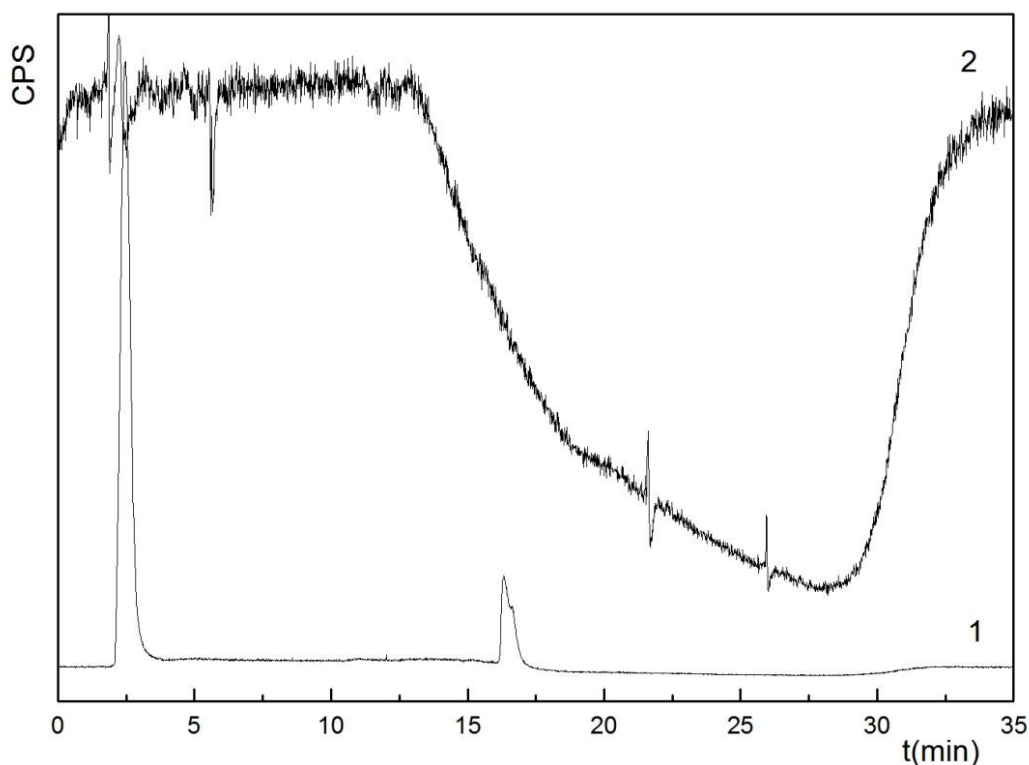
Tab. 4.3 porovnání nalezeného obsahu arsenu ve standardech $\text{As}(\text{GS})_3$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$ technikou HPLC-HG-ICP-MS a ICP-MS.

Celkový obsah As (HPLC-HG-ICP-MS/ ICP-MS)	
$\text{As}(\text{GS})_3$	118%
$\text{MAs}(\text{GS})_2$	127%

Bylo ověřeno, že metoda HPLC-HG-ICP-MS je vhodná pro analýzu komplexů arsenových specií s glutathionem a že nedochází ke ztrátám těchto komplexů během separace na koloně.

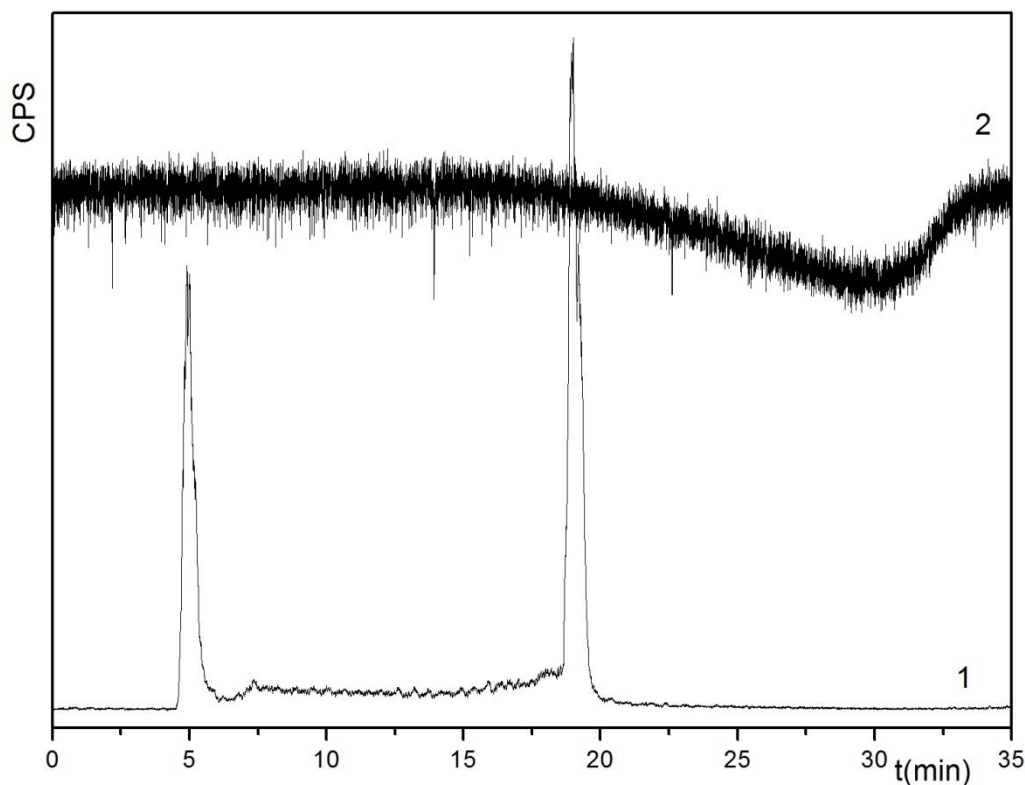
4.5 Methylační směs

Jedním z cílů této práce bylo analyzovat in vitro methylační směsi iAs^{III} s glutathionem a ověřit, zda při methylaci vznikají komplexy arsenu s glutathionem. Duplicitně připravené směsi 1 a 2 byly testovány metodou HPLC-ICP-MS po ukončení inkubace (150 min). Výsledný chromatogram je na obr. 4.6.



Obr. 4.6 Chromatogram směsi enzymatické methylace iAs^{III} s glutathionem (1). Srovnávací prvek Te (2). Metoda HPLC-ICP-MS. Směs .2.

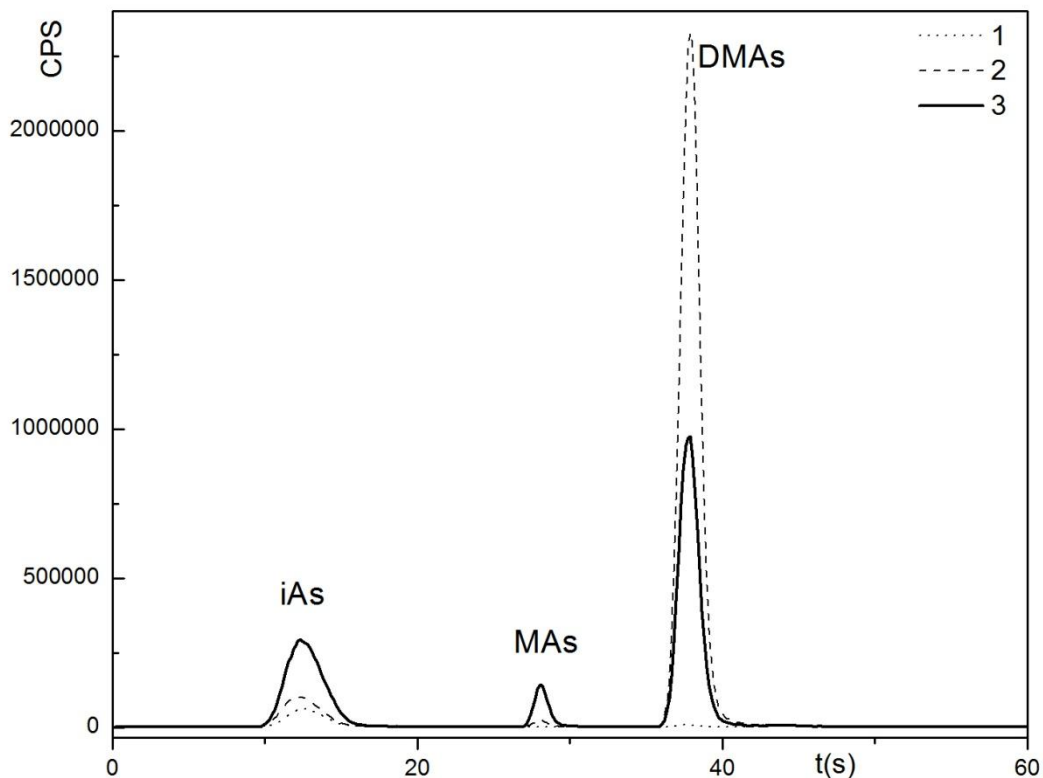
První pík v chromatogramu patří nenávaným arsenovým speciím, které se během separace neoddělí. Druhý pík je komplex arsenové specie s glutathionem. Na křivce telluru je patrné, že v průběhu gradientové eluce dochází vlivem zvyšujícího se podílu organické složky mobilní fáze k výraznému snížení citlivosti měření. Bylo ověřeno, že citlivost telluru se vlivem organického rozpouštědla mění stejně jako citlivost arsenu [40]. Retenční čas druhého píku v chromatogramu je 16,3 minut. Na základě srovnání retenčních časů uvedených v tab. 4.2, byl tento pík identifikován jako komplex $DMA_s(GS)$. Další připravené směsi byly analyzovány se zapojením postkolonového generování hydridů. Duplicitní vzorky směs 3 a 4 byla identická se směsí 1 a 2. Do duplicitních vzorků směsí 5 a 6 nebyl přidán glutathion.



Obr. 4.7 Chromatogram enzymatické methylační směsi iAs^{III} s glutathionem (1). Srovnávací prvek Te (2). Metoda HPLC-HG-ICP-MS. Směs 3

Analýzy duplicitních vzorků poskytovaly shodné chromatogramy. V chromatogramu směsi 3 na obr. 4.7 jsou opět dva píky, první pík neseparovaných volných specií arsenu a druhý pík komplexu DMAs(GS). Chromatogram směsi bez glutathionu (bez obrázku) obsahoval pouze volné arsenové specie, žádné další specie nebyly pozorovány.

Citlivost během měření byla sledována pomocí srovnávacího prvku telluru. Porovnání křivky telluru na obr. 4.7 a obr. 4.6 ukazuje výrazné snížení vlivu obsahu organické fáze na citlivost. Na obr. 4.7 je vidět, že během detekce volných specií a DMAs(GS), jehož retenční čas je ze sledovaných arsenových specií nejvyšší, zůstává citlivost prakticky neměnná. To umožňuje kvantitativní stanovení vzorků komplexů arsenových specií s glutathionem. Ve směsích 3 a 4 bylo ve formě DMAs(GS) nalezeno 61 % respektive 63 %. As Alikvoty methylačních směsí byly předredukovány a analyzovány metodou HG-CT-ICP-MS, pro ověření průběhu methylace, získaný chromatogram směsi 3 je znázorněn na obr. 4.8.



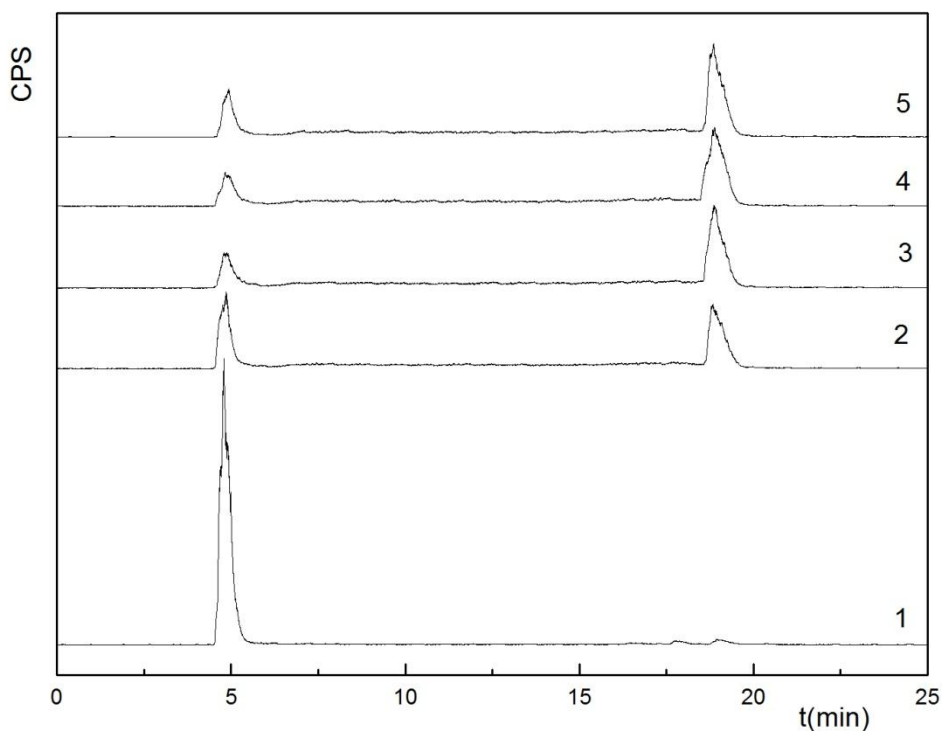
Obr. 4.8 Chromatogram methylační směsi 3 iAs^{III} s glutathionem (3) a methylační směsi 5 bez glutathionu (2).blank: 2% L-cystein (1). Metoda HG-CT-ICP-MS.

Stejnou metodou byly měřeny také kalibrační roztoky iAs^{III}, MAs^V a DMAs^V. Z takto získaných kalibračních přímků byly vypočítány koncentrace těchto specií ve vzorcích methylační směsi, které byly vztaženy k původnímu množství iAs^{III} ve směsi. Tímto způsobem byla vypočítána výtěžnost arsenových specií v methylační směsi.

Tab. 4.4 Výtěžnost arsenových specií ve směsích 1-6. *nedetekováno.

	Výtěžnost (%)		
	iAs	MAs	DMAs
Směs 1	ND*	0,3	81
Směs 2	ND*	0,5	84
Směs 3	ND*	0,4	87
Směs 4	ND*	0,4	86
Směs 5 (bez glutathionu)	12	5	44
Směs 6 (bez glutathionu)	10	4	46

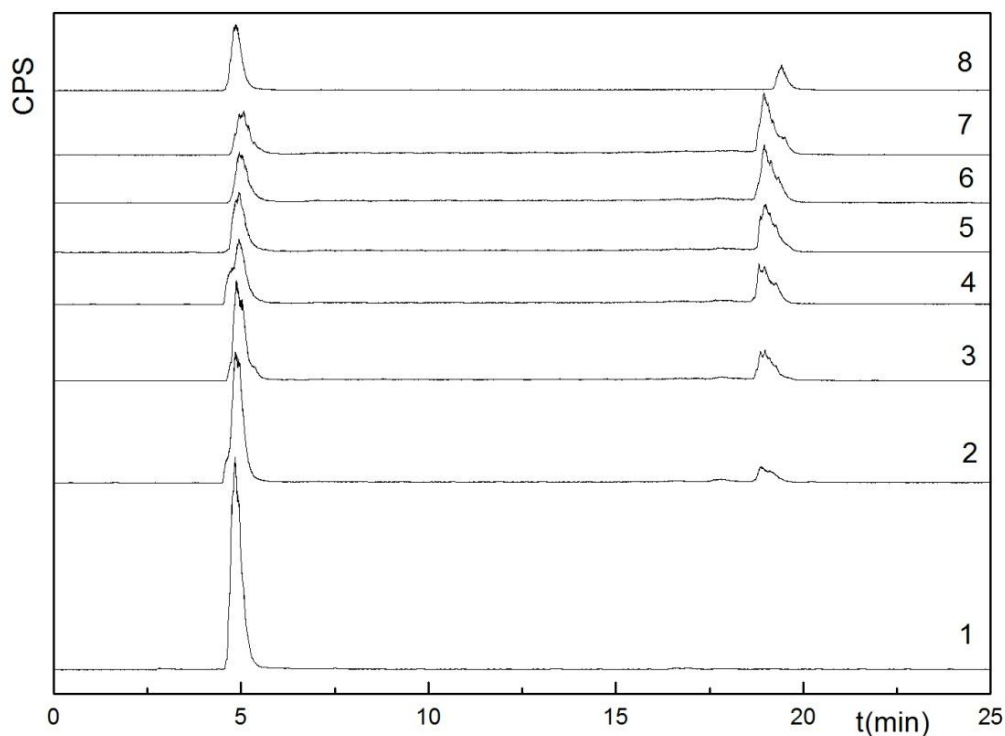
Metodou HG-CT-ICP-MS bylo zjištěno, že methylace arsenu ve vzorku methylační směsi po inkubaci je kompletní a arsen je přítomen ve formě dimethylovaných specií. Také metodou HPLC-HG-ICP-MS byl v inkubované směsi pozorován pouze komplex DMAs(GS). Abychom získali informaci o přítomnosti jednotlivých komplexů v průběhu methylace, reakce v enzymatické methylační směsi 7 byla v dalším experimentu sledována opakovaným měřením po celou dobu inkubace.



Obr. 4.9 Chromatogramy získané v průběhu inkubace methylační směsi 7. Opakované měření vzorku, čas jedné analýzy 35 minut. Chromatogramy jsou řazeny podle doby inkubace 1 (začátek inkubace) – 5 (konec inkubace).

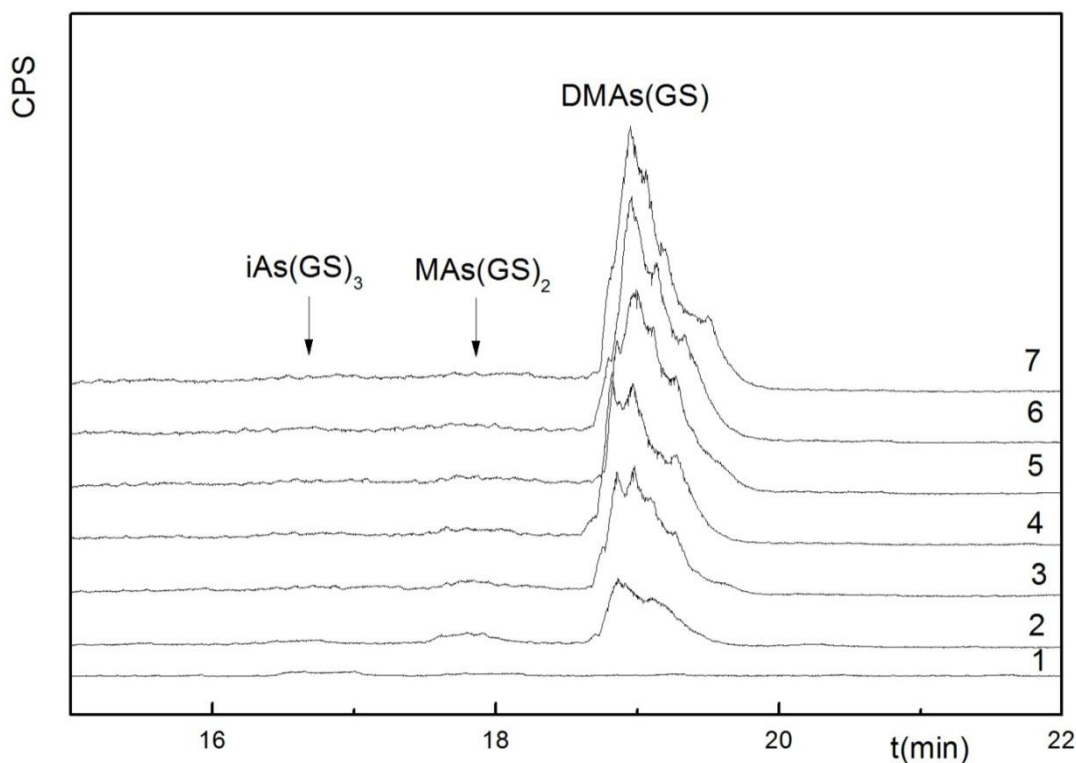
Na obr. 4.9 je záznam průběhu reakce v methylační směsi, která obsahovala $20\mu\text{g}/35\mu\text{l}$ enzymu AS3MT. Doba jedné analýzy byla 35 minut. Je vidět, že po třetí analýze se složení směsi výrazně nemění, DMAs(GS) tedy vznikne do 70 minut od začátku inkubace.

Protože reakce za těchto podmínek je stále velmi rychlá a trvání analýzy nedokáže postihnout podrobnější průběh, v další směsi (směs 8) bylo pro zpomalení methylační reakce sníženo množství enzymu přibližně o třetinu.



Obr. 4.10 Průběh inkubace methylační směsi 8 se sníženým množstvím enzymu. Opakované měření vzorku, čas jedné analýzy 35 minut. Chromatogramy jsou řazeny podle doby inkubace 1 (začátek inkubace) –7 (210 min) a dva měsíce od přípravy vzorku (chromatogram 8).

Bylo provedeno sedm opakovaných analýz. Až na šestém chromatogramu můžeme pozorovat ustálení složení směsi. Ve vzorku jsou separovány stále dva zřetelné píky, první patří volným speciím arsenu, tj. převážně iAs^{III} na začátku inkubace a $DMAs^V$ na jejím konci. Druhý pík je komplex $DMAs(GS)$. Je zajímavé, že v chromatogramech nejsou prakticky vidět píky komplexů $iAs(GS)_3$ ani $MAs(GS)_2$ s nižším retenčním časem než $DMAs(GS)$ ani pík volného $DMAs^{III}$, viz tab.4.2.

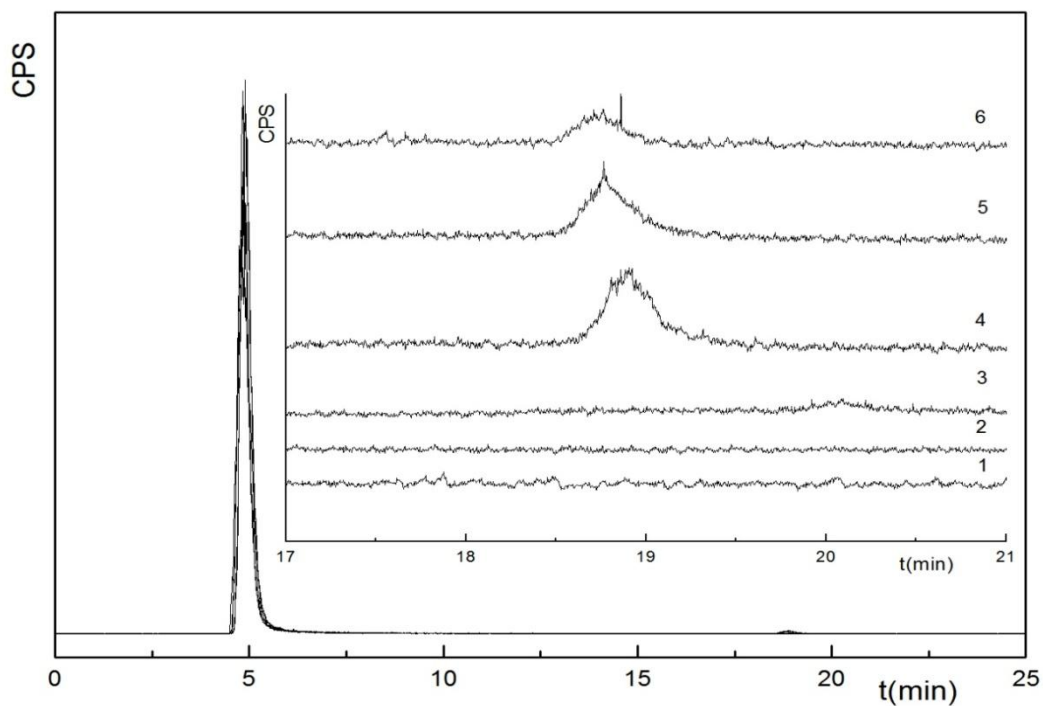


Obr. 4.11 Výřez chromatogramu průběhu inkubace methylační směsi 8 se sníženým množstvím enzymu. Opakovaná analýza vzorku, čas jedné analýzy 35 minut. Chromatogramy jsou řazeny podle doby inkubace 1 (začátek inkubace) – 7 (210 min).

Na chromatogramu číslo 2 a 3, obr. 4.11, můžeme předpokládat jen malý pík odpovídající komplexu $iAs(GS)_3$ a $MAs(GS)_2$. Z toho lze usuzovat, že pokud komplex $DMAs(GS)$ vzniká postupnou methylací $iAs(GS)_3$ a $MAs(GS)_2$, probíhají tyto děje velice rychle a kvantitativně.

4.6 Tvorba komplexu z iAs^{III} , MAs^V a $DMAs^V$ a glutathionu.

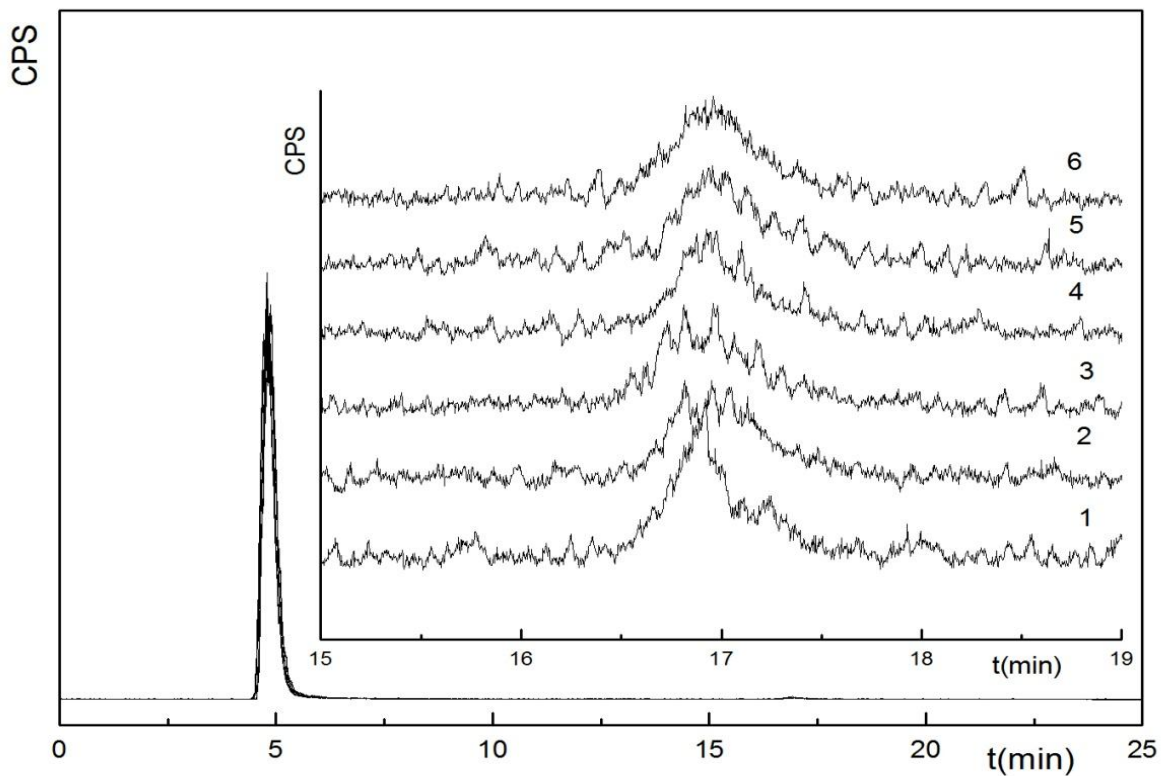
Ve vzorcích enzymatických methylačních směsí arsenu s glutathionem, které byly připraveny a analyzovány během této práce, byl vždy pozorován komplex $DMAs(GS)$. Abychom ověřili vliv enzymu na vznik tohoto komplexu, byly připraveny směsi pouze z iAs^{III} , MAs^V nebo $DMAs^V$ a glutathionu. Příprava vzorků byla realizována při stejných koncentracích těchto reagentů, jako v enzymatické methylační směsi. Směsi byly analyzovány metodou HPLC-HG-ICP-MS ihned po přípravě a opakovaným měřením byl sledován průběh reakce. Na obr. 4.12 je znázorněn záznam analýzy směsi $DMAs^V$ s glutathionem.



Obr. 4.12 Průběh reakce směsi DMAs^{V} s glutathionem, doba analýzy 35 minut. Chromatogramy řazené od začátku (1) po 140 min (5) a 24 hodin po ukončení inkubace (6)

V chromatogramech je na začátku intenzivní pík, pravděpodobně DMAs , po třetí analýze přibyl v chromatogramu druhý pík, který odpovídá svým retenčním časem komplexu $\text{DMAs}(\text{GS})$, který však byl mnohem menší, než v případě methylačních směsí s enzymem. Po 24 hodinách po ukončení inkubace se intenzita tohoto píku nezvětšila, můžeme tedy předpokládat, že k dalšímu vzniku komplexu nedochází

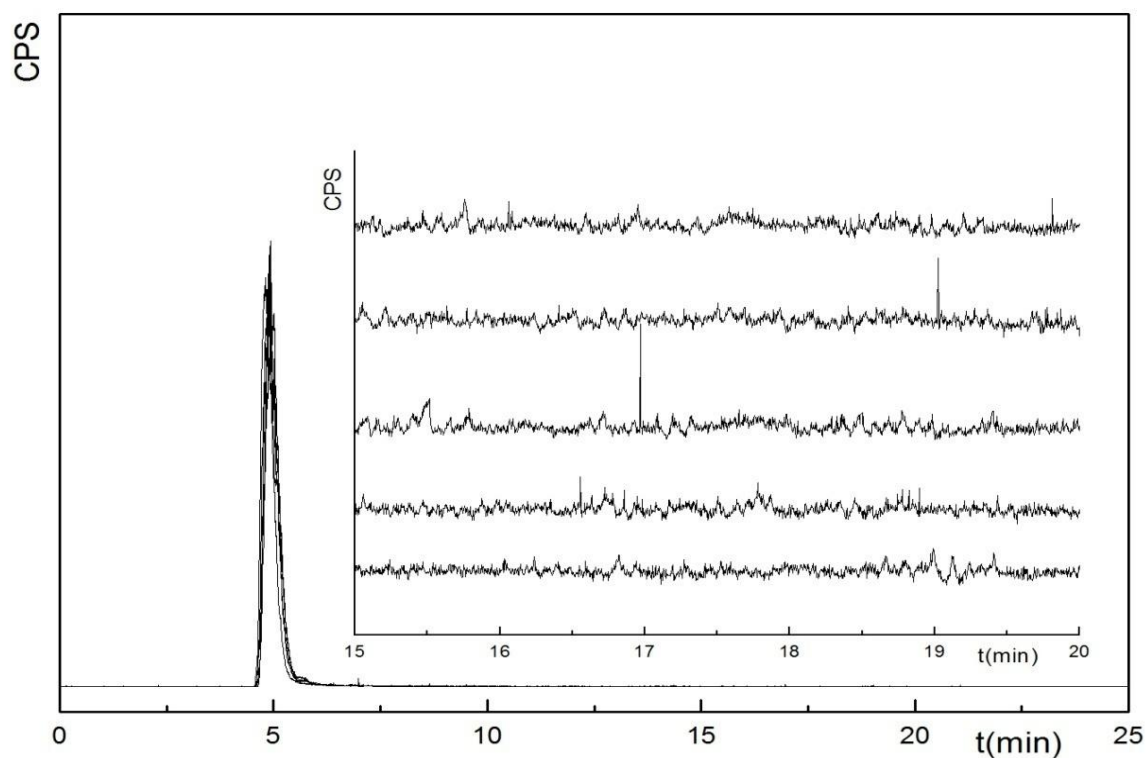
Analýza směsi iAs^{III} s glutathionem je znázorněna na obr. 4.13.



Obr. 4.13 Průběh reakce směsi iAs^{III} s glutathionem, doba analýzy 35 minut. Chromatogramy řazeny od začátku (1) po 175 min (6).

V chromatogramech je na začátku intenzivní pík, který patří pravděpodobně iAs , druhý pík může být na základě srovnání retenčního času se standardem identifikován jako $As(GS)_3$.

Na obr. 4.14 je chromatogram analýzy směsi MAs^V s glutathionem



Obr. 4.14 Průběh reakce směsi MAs^{V} s glutathionem, doba analýzy 35 minut. Chromatogramy řazené od začátku (1) po konec inkubace (6)

Na obr. 4.14 je vidět, že ve směsi jsou pouze volné neseparované arsenové specie, pravděpodobně převážně MAs .

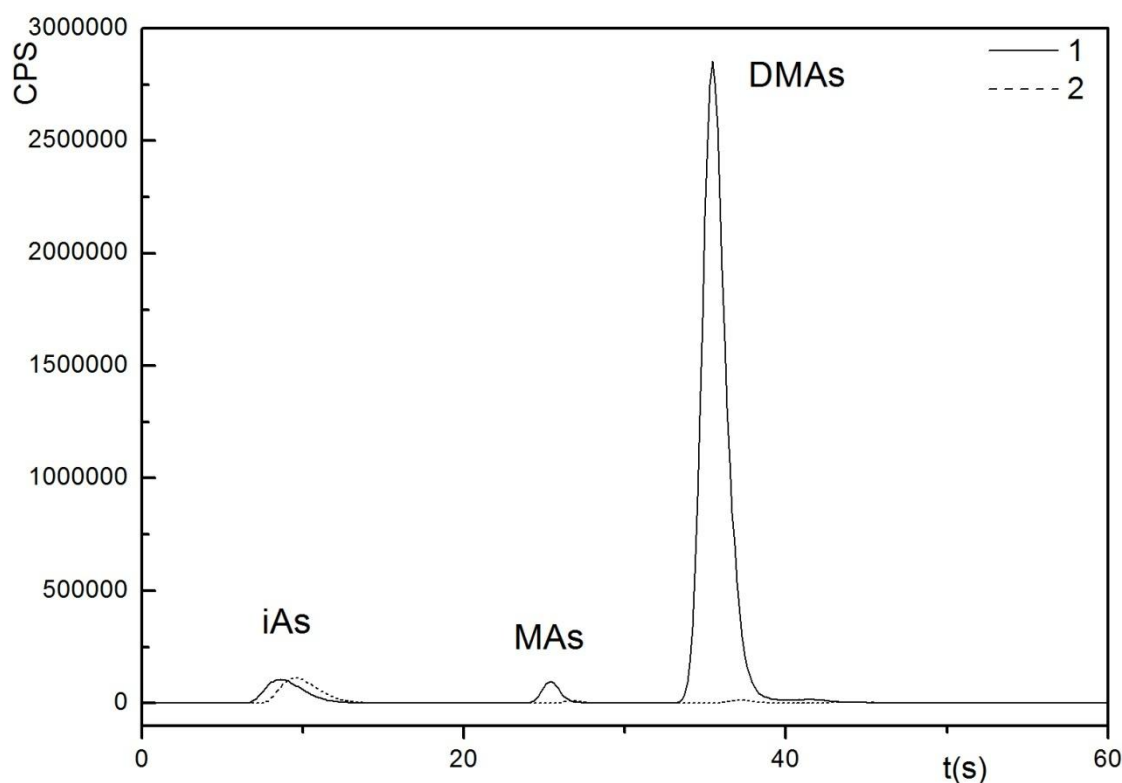
V porovnání s výsledkem enzymatické methylační směsi lze říci, že ve směsi arsenových specií s glutathionem vznikají komplexy v mnohem menší míře. Můžeme tedy vyloučit, že při experimentech s enzymatickou methylací docházelo ke vzniku komplexu jen na základě reakce arsenu s thiolovou skupinou glutathionu [41].

4.7 Analýza moči

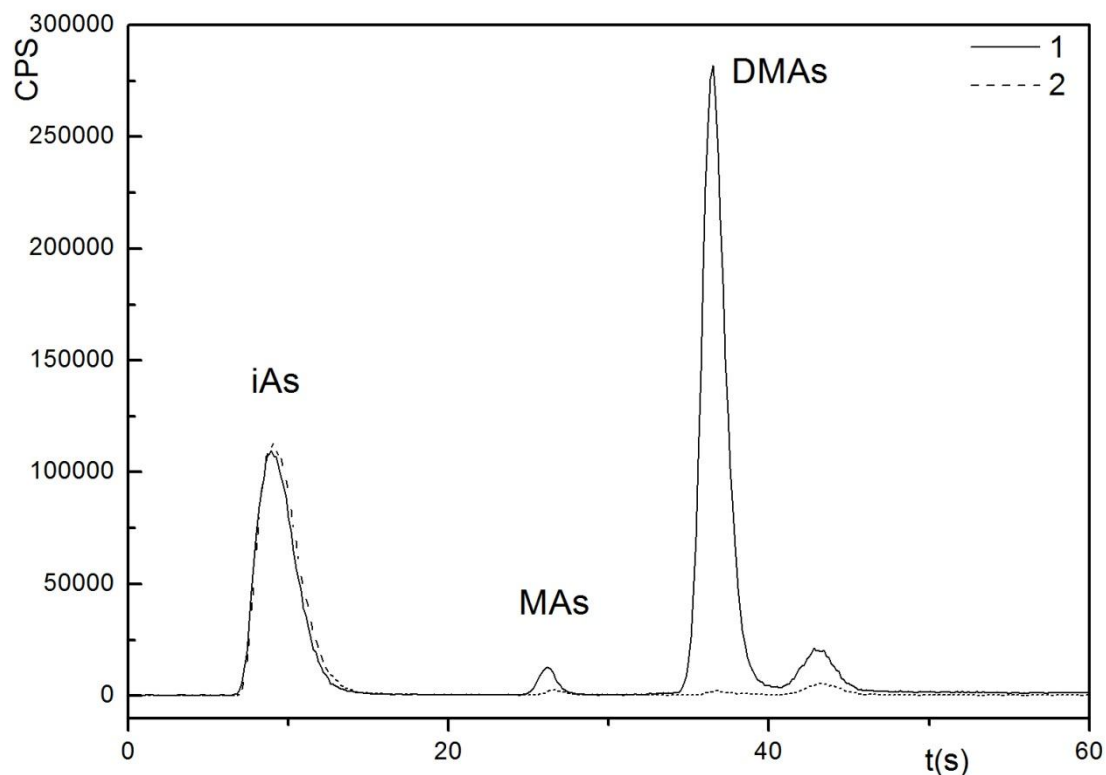
Jedním z cílů této práce bylo otestovat, zda použitím metody HPLC-HG-ICP-MS bude možné nalézt glutathionové nebo jiné komplexy, případně volný DMAs^{III} ve vzorcích moči. Analyzovány byly vzorky moči čtyř různých lidí ihned po odběru metodami HPLC-HG-ICP-MS a HG-CT-ICP-MS.

Tyto vzorky byly analyzovány metodou HPLC-HG-ICP-MS s předredukcí kyselinou tioglykolovou. Výsledné chromatogramy všech vzorků obsahovaly pouze jeden intenzivní pík, který odpovídá neseparovaným volným arsenovým speciím. Přítomnost žádných komplexů arsenu v těchto vzorcích tedy nebyla zjištěna.

Analýza trojmocných arsenových specií v těchto vzorcích provedena metodou HG-CT-ICP-MS bez předredukce, do 20 minut po odebrání vzorku a s předredukcí také neprokázala výskyt trojmocných arsenových specií. Ukázka chromatogramu vzorku moči je na obr 4.15 a obr. 14.16.



Obr.4.15 Chromatogram vzorku moči s předredukcí 2% L-cysteinem (1). Blank: 2% L-cystein (2).



Obr. 4.16 Chromatogram vzorku moči bez předredukce L-cysteinem.(1). Blank: deionizovaná voda (2).

Vzorky byly připraveny duplicitně, jeden byl analyzován přímo, druhý byl odstředěn a analyzován byl supernatant. Rozdíly výsledků duplicitních vzorků pro nejvíce zastoupený DMAs nepřesáhly 6 %. Koncentrace arsenových specií stanovených v neodstředěných vzorcích jsou uvedeny v tab. 4.5.

Tab. 4.5 Koncentrace arsenových specií ve vzorcích moči. *Nedetekováno

Číslo vzorku	Koncentrace [ng/ml] s předredukci / bez předredukce		
	iAs	MAs	DMAs
1	0,9 / 1,1	1,5 / 0,1	24,5 / 2,0
2	0,9 / 0,3	0,3 / ND*	16 / 0,7
3	ND* / 0,1	0,5 / ND*	2 / 0,1
4	ND*	0,2 / ND*	1,4 / 0,1

Ve vzorcích moči nebyla zjištěna přítomnost trojmocných arsenových specií. Nalezeného DMAs^{III} bylo méně než 8 % z DMAs^V. Jedná se tedy o artefakt způsobený nedostatečnou selektivitou generování hydridů, která byla pozorována viz kapitola 4.2.

5 Závěr

Cílem této práce bylo rozvinout metodu HPLC-HG-ICP-MS pro analýzu komplexů arsenu s glutathionem při použití organického gradientu mobilní fáze. Metoda byla ověřena pomocí standardů glutathionových komplexů. Bylo zjištěno, že tato metoda umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu těchto komplexů, které se bezzbytku eluují z kolony. Mez detekce metody HPLC-HG-ICP-MS byl stanoven na 5 pg/ml. Zařazením postkolonového generování bylo dosaženo zvýšení citlivosti a snížení meze detekce přibližně čtyřicetkrát oproti metodě HPLC-ICP-MS.

Touto metodou byla provedena analýza *in vitro* připravených enzymatických methylačních směsí. Ve směsi byly pozorovány pouze jednoduché arsenové specie a komplex DMAsGS, který byl identifikován na základě retenčního času. Ani v průběhu inkubace methylační směsi nebyly pozorovány další komplexy ve významné koncentraci. Analýzou této směsi metodou HG-CT-ICP-MS bylo zjištěno, že anorganický arsen ve směsi byl kompletně methylován na DMAs. Nezbytnost enzymu pro vznik DMAsGS byla ověřena přípravou směsi bez enzymu, pouze z iAs^{III} , MA_s^V a $DMAs^V$ a glutathionu. Tyto směsi byly analyzovány během inkubace, ve srovnání s enzymatickou methylační směsí byl pozorován vznik komplexů ve velmi nízké koncentraci. Tyto poznatky jsou zajímavé v kontextu s teoriemi o mechanismu methylylace As v organismu a počítá se s pokračováním experimentů s využitím popsané analytické metody HPLC-HG-ICP-MS.

Byly provedeny pilotní pokusy s analýzami vzorků moči. Metodou HPLC-HG-ICP-MS nebyla ani při analýzách bezprostředně po odběru pozorována přítomnost glutathionových komplexů ani jiných než jednoduchých specií. Byla provedena i speciální analýza vzorků metodou HG-CT-ICP-MS, která také neprokázala přítomnost trojmocných arsenových specií. Ve všech případech se však jednalo o vzorky od jedinců s nízkou expozicí, vzorky exponovaných jedinců nebyly pro tuto práci k dispozici. Hlavní nalezenou specií v moči byl $DMAs^V$, a koncentrace ve vzorku s nejvyšším obsahem arsenu byla 24,5 ng/ml.

Citovaná literatura

1. Raab, A., a další. Arsenic–glutathione complexes—their stability in solution and during separation by different HPLC modes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.**19**,183–190. (2004)
2. Zušťáková, V. Speciašná analýza glutathionových komplexů arsenu pomocí ion-párové HPLC-ICP-MS.. *Bakalářská práce*. Praha (2013)
3. Kanásová, M. Separacia toxikologicky významných špecií arzenu pre špeciálnu analýzu pomocou RP-HPLC-ICP-MS. *Bakalářská práce*. (2013).
- 4 Petry-Podgórská I.. Nepublikovaná data.
5. Ding, L., a další. Methylation of arsenic by recombinant human wild-type arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and its methionine 287 threonine (M287T) polymorph: Role of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*.**264**,121–130. (2012)
6. Hughes, M.F., a další. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological science*.**123**, 305-332 (2011).
7. Petrusovski, B., a další. Arsenic in Drinking Water (2007). Přístupné z: <http://www.depurazioneacquarrigoni.it/pdf/technologies-for-the-purification-of-polluted-water-by-arsenic.pdf>.
8. Basu, A., a další. A review on sources, toxicity and remediation. *Research on Chemical Intermediates*.**40**, 447–485 (2014).
9. Hayakawa, T., Kobayashi, Y. a Cui, X. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic–glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology*.**79**, 183–191 (2005).
10. Kala, S. V., a další. The MRP2/cMOAT Transporter and Arsenic-Glutathione Complex Formation Are Required for Biliary Excretion of Arsenic. *The Journal of Biological Chemistry*.**275**, 33404-33408 (2000).
11. Francesconi, K A a Kuehnelt, D. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. *Analyst*.**129**, 373–395. (2004)
12. Valenzuela, O. L., a další. Urinary Trivalent Methylated Arsenic Species in a Population Chronically. *Environmental health perspectives*.**113**,250-254. (2005)
13. Mandal, B. K., Orga, Y. a Suzuki, K. T. Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chemical Research in Toxicology*.**14**,371-378. (2001)

14. Hopenhayn-Rich, C., a další. Methylation Study of a Population Environmentally Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*.**104**,620-628 (1996).
15. Kalman, D. a., a další. Occurrence of trivalent monomethyl arsenic and other urinary arsenic species in a highly exposed juvenile population in Bangladesh. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*.**24**,113–120.(2014)
16. Hansen, H. R., a další. Sulfur-Containing Arsenical Mistaken for Dimethylarsinous Acid [DMA(III)] and Identified as a Natural Metabolite in Urine: Major Implications for Studies on Arsenic Metabolism and Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*.**17**,1086-1091. (2004)
17. Styblo, M., a další. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology*. **74**,289-299. (2000)
18. Petrick, J. S., a další. Monomethylarsonous Acid (MMAIII) Is More Toxic Than Arsenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*.**163**,203–207. (2000)
19. Stýblo, M. a Thomas, D. J. Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicology and applied pharmacology*.**147**,1-8. (1997)
20. Hsin-Su, Y., Wei-Ting, L. a Chee-Yin, Ch. Arsenic carcinogenesis in the skin. *Journal of Biomedical Science.*, **13**,657–666. (2006)
21. Saint-Jacques, N., a další. Arsenic in drinking water and urinary tract cancers: a systematic review of 30 years of epidemiological evidence. *Environmental Health.*, **13**. (2014)
22. Rehman, K. a Naranmandura, H. Arsenic Metabolism and Thioarsenicals. *Metallomics*. **4**,881-892. (2012)
23. Challenger, F. Biological Methylation. *Chemical Reviews*. **36**,315-361. (1945)
24. Cullen, W R. Chemical Mechanism of Arsenic Biomethylation. *Chemical Research in Toxicology*.**27**, 457–461. (2014)
25. Naranmandura, H., Suzuki, N. a Suzuki, K. T. Trivalent Arsenicals Are Bound to Proteins during Reductive Methylation. *Chemical Research in Toxicology*.**19**,1010-1018. (2006)
26. Wang, S., a další. The Functions of Crucial Cysteine Residues in the Arsenite Methylation Catalyzed by Recombinant Human Arsenic (III) Methyltransferase. *Public Library of Science.*, **9**,1-13. (2014)
27. Gong, Z., a další. Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.**16**,1409–1413.(2001)
28. Matoušek, T, a další. Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multi. *Spectrochimica Acta Part B*. **63**,396–406. (2008)

29. Yehiayan, L., a další. Speciation, formation, stability and analytical challenges of human arsenic metabolites. **24**,1397–1405. (2009)
30. Kobayashi, Y., Cui, X. a Hirano, S. Stability of arsenic metabolites, arsenic triglutathione [As(GS)₃] and methylarsenic diglutathione [CH₃As(GS)₂], in rat bile. **211**,115–123. (2005)
31. Technologies Agilent, USA ICP-MS A Primer. *Uživatelská Příručka*. (2005). 5989-3526EN.
32. Hsu, K, Sun, Ch a Huang, Y. Arsenic speciation in biomedical sciences: Recent advances and applications. **27**,382-389.(2011)
33. Xie, R, a další. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **578**, 186–194. (2006)
34. Rabieh, S, Hirner, A V a Matschullat, J. Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **23**,544–549. (2008)
35. Scott, C., a další. Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chemical Research in Toxicology*. **6**,102-106. (1993)
36. Matoušek, T., a další. Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at picogram levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **28**,1456–1465. (2013)
37. Trojánková, Nikola. Speciační analýza toxikologicky významných forem arsenu: rozvoj a porovnání technik využívajících generování těkavých hydridů s detekcí ICP-MS. *Diplomová práce* (2012)
38. Currier, J. M., a další. Comparative oxidation state specific analysis of arsenic species by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **28**,843–852 (2013)
39. Musil, S. a Matoušek, T. On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation–cryotrapping–atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. **63**,685–691. (2008)
40. Matoušek. T. Nепublikovaná data.
41. Cullen, W R, Mc Bride, B C a Reglinsky, J. The Reaction of Methylarsenicals with Thiols: Some Biological Implication. *Jcutrrd of inorganic Biedtemiscry*. **21**,179-194 (1984)

42. Mandal, B. K. a Suzuki, K. T. Arsenic round the world: a review. *Talanta*.**58**, 201–235. (2002)
43. Suzuki, , T. K., a další. Glutathione-conjugated Arsenics in the Potential Hepato-enteric Circulation in Rats. *Chemical Research in Toxicology*.**14**,1604-1611. (2001)
44. Gong, Z., a další. Arsenic speciation analysis. *Talanta*., **58**,77–96.(2002)