

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

UNIVERZITY KARLOVY

Katedra analytické chemie

**Stanovení sirných
biologicky aktivních látek metodou HPLC
s elektrochemickou detekcí**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní obor : Chemie v přírodních vědách

Běla Hušáková

Praha 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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 3. 6. 2007

... Radim Čabala

podpis

prac. 12. 6. 07 stud.
UNIVERZITA KARLOVÁ v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
VK 22

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Radomírovi Čabalovi Ph.D. za jeho profesionální vedení.

Současně bych ráda poděkovala i Mgr. Karolíně Peckové Ph.D., Mgr. Hance Dejmkové a Mgr. Zuzaně Jemelkové.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za psychickou podporu během studia.

Tato práce byla finančně podporována z výzkumného záměru MŠMT ČR, VZ MSM 0021620857.

Obsah:

1	Úvod	7
2	Cíl práce	7
3	Teoretická část	8
3.1	Charakteristika studovaných látek	8
3.1.1	Glutathion	8
3.1.2	Homocystein	11
3.2	Metody stanovení sirných biologicky aktivních látek	13
3.2.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	13
3.2.2	Kapilární elektroforéza	14
3.2.3	Elektrochemické metody	15
3.3	Charakteristiky elektroanalytických metod	18
3.3.1	Cyklická voltametrie	18
3.3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí	18
3.4	Elektrodové materiály na bázi uhlíku	19
3.4.1	Borem dopovaný diamant	19
3.4.2	Uhlíková pasta	20
4	Experimentální část	21
4.1	Reagencie	21
4.2	Zařízení	21
4.2.1	Cyklická voltametrie	21
4.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	22
4.3	Pracovní postupy	23
4.3.1	Příprava uhlíkové pastové elektrody	23
4.3.2	Cyklická voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě a borem dopované diamantové filmové elektrodě	23
4.3.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	26
5	Výsledky a diskuze	26
5.1	Cyklická voltametrie	26
5.1.1	Cyklická voltametrie oxidovaného a redukovaného glutathionu na uhlíkové pastové elektrodě	26

5.1.2 Porovnání odezvy elektrochemického detektoru s odezvou spektrometrického detektoru	26
5.1.3 Cyklická voltametrie oxidovaného glutathionu na borem dopované diamantové filmové elektrodě	29
5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou a spektrometrickou detekcí	30
5.2.1 Zjištění optimálního pracovního potenciálu	30
5.2.2 Zjištění optimálního složení mobilní fáze a výběr kolony	32
5.2.3 Porovnání odezvy elektrochemického detektoru s odezvou spektrometrického detektoru	35
6 Shrnutí	36
7 Použitá literatura	37

Seznam použitých zkrátek a symbolů:

GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
HCys	homocystein
CPE	uhlíková pastová elektroda
CP	uhlíková pasta
BDDFE	borem dopovaná diamantová filmová elektroda
BDDF	borem dopovaný diamantový film
CV	cyklická voltametrie
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
ZE	základní elektrolyt
ACN	acetonitril
TFA	trifluoroctová kyselina
<i>k</i>	retenční faktor

1 Úvod

Nízkomolekulární thioly jsou fyziologicky významné molekuly, které mají v organismu mnoho důležitých funkcí, mezi které patří např. vychytávání radikálů, ochrana proti oxidativnímu a teplotnímu stresu a stresu vyvolanému těžkými kovy.

Ovšem analytičtí chemici se jimi neradi zabývají jakožto nevděčnou skupinou analytů, protože jsou na vzduchu většinou nestálé, mnohdy páchnou a v elektrochemii rychle pasivují elektrodu. Příčinou těchto vlastností je relativně vysoká reaktivita funkční SH skupiny.

V poslední době jsou v elektrochemii zaváděny nové druhy elektrod, jako např. borem dopovaná diamantová filmová elektroda, které by postupně měly nahradit klasickou rtuťovou kapkovou elektrodu z důvodu eliminace práce s jedovatou rtutí.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo otestovat borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodu pro elektrochemickou analýzu malých biogenních thiolů a srovnat jí s uhlíkovou pastovou elektrodou. Jako modelové trioly byly vybrány oxidovaný a redukovaný glutathion a jako modelová aminokyselina homocystein.

Po ověření vhodnosti borem dopované diamantové filmové elektrody je obecným cílem vypracování elektroanalytické metody stanovení nízkomolekulárních biologicky aktivních thiolů.

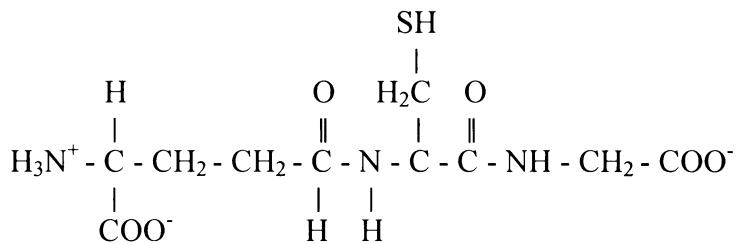
3 Teoretická část

3.1 Charakteristika studovaných látek

3.1.1 Glutathion

Redukovaný glutathion (GSH):

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$

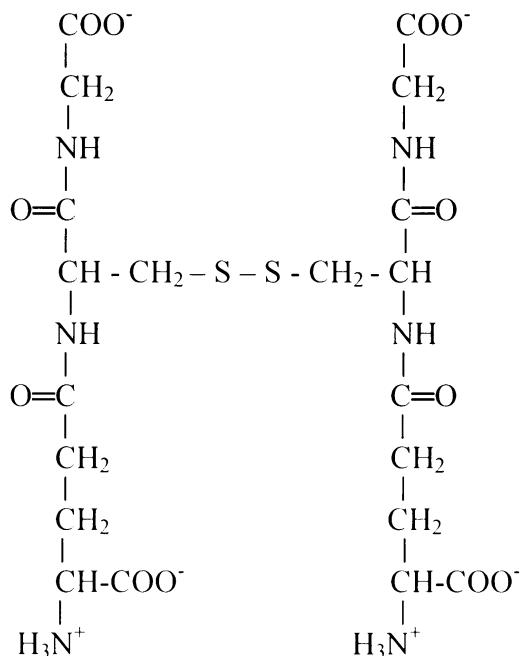
Relativní molekulová hmotnost: 307,32

C.A.S. název: γ -glutamyl-cysteinyl-glycine

C.A.S. registrační číslo: 70-18-8

Oxidovaný glutathion (GSSG):

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₂₀H₃₂N₆O₁₂S₂

Relativní molekulová hmotnost: 612.63

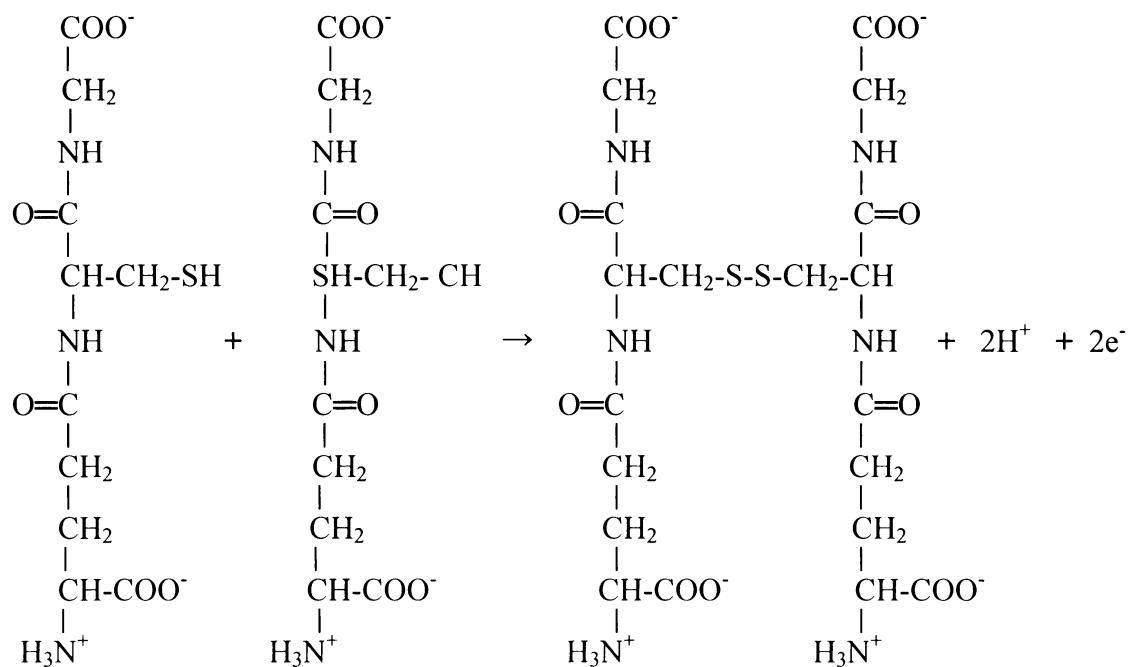
C.A.S. název: Bis(γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) Disulfide

C.A.S. registrační číslo: 27025-41-8

Glutathion je nejrozšířenější neproteinový thiol. Je to tripeptid složený z kyseliny glutamové, cysteingu a glycinu obsahující neobvyklou γ -amidovou vazbu. Nachází se prakticky ve všech buňkách živočichů a většiny rostlin i bakterií v poměrně vysoké koncentraci (0,1 – 10 mmol/l). Mezi potraviny s největším obsahem glutathion patří avokádo, chřest a vodní meloun.

Bylo u něj prokázáno mnoho důležitých biologických funkcí. U glutathionu byly potvrzeny významné antioxidační a detoxikační vlastnosti související s ochranou buněk před oxidačním stresem a abiotickými vlivy (UV-záření, různá xenobiotika, kyselé prostředí, anoxické podmínky, teplotní extrémy, atd.). Podstatou biologické účinnosti tohoto peptidu je přítomnost redukované thiolové skupiny (-SH).

V případě, že je buňka vystavena oxidačním činidlům, je GSH oxidován a vzniká glutathiondisulfid (GSSG). Princip antioxidačního účinku glutathionu je založen na skutečnosti, že GSH je slabé redukční činidlo, protože aminokyselina cystein, která je součástí molekuly, nese redukovanou skupinu síry. V případě, že je buňka vystavena stresovým podmínkám, začíná, mimo jiné, generovat volné kyslíkové radikály. Tyto volné kyslíkové radikály, ale i jiné druhy kyslíku exogenního nebo endogenního původu (např. peroxid vodíku), oxidují SH skupinu GSH a výsledkem reakce je disulfidická vazba mezi dvěma molekulami glutathionu (viz Obr. 1). Tímto způsobem může být peroxid vodíku redukován na vodu.



Obr.1 Oxidace glutathionu

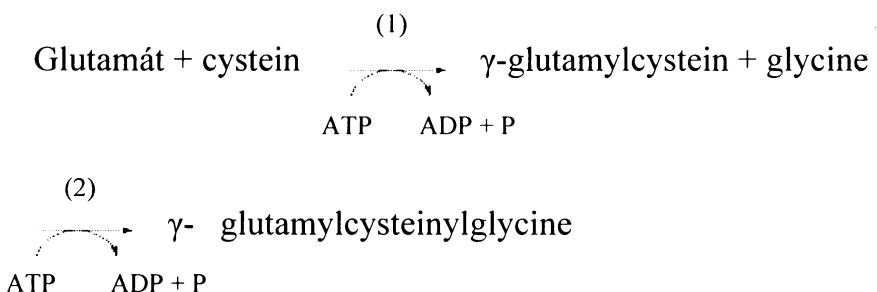
Existuje také mechanismus, který umožňuje redukovat zpět GSSG a obnovovat tím pro buňky potřebnou redukovanou formu glutathionu (GSH). Konverze GSSG na GSH je možná díky enzymu glutathionreduktase.

Těmito dvěma mechanismy dochází k udržování redoxních poměrů uvnitř buňky. Přítomnost xenobiotik v cytoplasmě buněk mnohdy způsobuje změnu koncentrace glutathionu, což může být způsobeno jeho konjugací s xenobiotikem nebo xenobiotikum samotné způsobuje redoxní nerovnováhu, která se projeví v nevyváženém poměru GSH/GSSG.

Thiolová skupina přítomná v molekule GSH je obecně reaktivní skupina vykazující značnou afinitu k těžkým kovům a celé řadě ligandů (xenobiotika), které jsou pro buněčný metabolismus toxické. Důležitý je také význam GSH pro řízení redoxního prostředí buňky, které napomáhá udržování buněčné homeostasy. Vyjma toho je diskutován význam GSH v reakci organismu na patogeny. Glutathion se též uplatňuje v buněčné signalizaci a regulaci buněčného cyklu.

Biosyntéza GSH probíhající ve dvou krocích za účasti dvou enzymů je znázorněna na Obr.2. V prvním kroku biosyntézy hraje klíčovou roli enzym γ -glutamylcysteinsynthetasa (1). Tento enzym je schopen za účasti ATP syntetizovat z glutamové kyseliny a cysteinu dipeptid γ -glutamyl-cystein. Druhý krok biosyntézy spočívá v reakci γ -glutamylcysteinu s glicinem.

Zde se uplatňuje enzym glutathionsynthetasa (2) a reakce je, podobně jako biosyntéza γ -glutamyl-cysteinu, energeticky závislá na ATP.

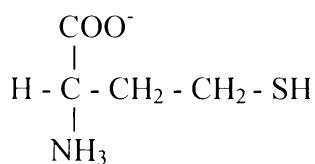


Obr.2 Biosyntéza glutathionu

Molekula glutathionu je společně s aminokyselinou cysteinem výchozím substrátem fytochelatinů a methalothioneinů. Fytochelatiny jsou přítomny v rostlinných buňkách a methalothioneiny v buňkách živočichů. Za hlavní biologickou funkci metahalothioneinů je považována detoxikace těžkými kovy. U fytochelatinů byla dosud prokázána pouze funkce detoxikační, jejich význam pro rostlinný metabolismus esenciálních kovů není dostatečně znám.

3.1.2 Homocystein

Strukturní vzorec



Sumární vzorec: C₄H₉NO₂S

Relativní molekulová hmotnost: 135,19

C.A.S. název: 2-amino-4-sulfanyl-butanoic acid

C.A.S: registrační číslo: 454-29-5

Homocystein (HCys) je neesenciální aminokyselina obsahující thiolovou funkční skupinu. Je to analog cysteingu a má oproti němu navíc jednu skupinu -CH₂- . Vyskytuje se

v buňkách a tělesných tekutinách všech vyšších organismů. Byl nalezen i v rostlinách a bakteriích.

Homocystein není přítomen v potravě, vzniká z methioninu odštěpením methylskupiny a je meziproduktem při biosyntéze cysteingu z methioninu a serinu.

Homocystein je metabolizován na methionin nebo cystein. Přeměna na cystein je irevezibilní a probíhá v přítomnosti vitamínu B6, zatímco k přeměně na methionin dochází pomocí folátu a enzymu methioninsyntetázy v přítomnosti kobalaminu a methyltetrahydrofolátu. K vylučování a akumulaci homocysteingu dochází při blokádě těchto reakcí nebo při deficitu vitaminu.

Kondenzací homocysteingu se serinem vzniká cystathionin, který je deaminován na cystein. Cystein je dále odbouráván přímo na pyruvát, ten je oxidační dekarboxilací přeměněn na acaetylkoenzym A, který vstupuje do citrátového cyklu.

Volné skupiny SH homocysteingu ohrožují buněčný metabolismus tím, že snadno reagují s látkami rozpuštěnými v tělních tekutinách (včetně molekulárního kyslíku) i s molekulami na povrchu tkání.

U zdravého organismu je koncentrace homocysteingu oproti ostatním aminokyselinám nízká. Jestliže homocystein v krvi stoupne, souvisí to hlavně s jeho nedostatečnou přeměnou na methionin nebo cystein v buňkách některého orgánu. Přičinou může být nedostatek kyseliny listové nebo vitaminu B12 v potravě, jejich špatné vstřebávání, popřípadě neschopnost buněk přeměnit jednouhlíkový zbytek na methylovou skupinu a následně ji předat homocysteingu. To může být způsobeno např. nedostatečnou aktivitou enzymu methylentetrahydrofoláreduktázy, který je zodpovědný za vznik metylové skupiny. K zlepšení jeho funkcí jsou podávány vysoké dávky kyseliny listové. Pokud porucha v transmethylationi vyvolaná místním nedostatkem S-adenosylmethioninu zasáhne nervovou tkáň, vede to k neuropatiím a demenci. Buňky srdce jsou zase citlivé na nedostatečnou tvorbu karnitinu, neboť mastné kyseliny patří mezi hlavní zdroje energie srdečního svalu. Hromadění homocysteingu může být vyvoláno také nedostatečnou aktivitou cystathioninsyntázy, v tom případě je třeba zvyšovat její aktivitu podáváním vitaminu B6.

Podle učebnic toxikologie vede již mírně zvýšená hladina HCys k arteroskleróze a žilním trombosám. Jeho toxicita může vyvolat oxidační poškození endoteliálních či hladkých svalových buněk [1].

Ať jsou poruchy, které vyvolají vzestup homocysteingu v krvi, jakéhokoliv původu, mají vždy na metabolismus postiženého orgánu neblahé účinky. Nárůst homocysteingu v každém případě ukazuje na poruchu metabolismu síry v buňkách postiženého orgánu. To se

obrazí na sníženém výkonu cyklu kyseliny citronové, snížené spotřebě kyslíku buňkami, a tedy i snížené tvorbě energie. To může znamenat, že člověk je ohrožen cévními a srdečními chorobami, únavovým syndromem, popřípadě Parkinsonovou a Alzheimerovou chorobou.

3.2 Metody stanovení sirných biologicky aktivních látek

Tyto látky se stanovují v biologických vzorcích, jako např. v práci Fernanda Ramia a kol. [2], kde ke stanovení docházelo v čerstvě izolovaných buňkách krysích jater a srdce, nebo v práci Marjana Gučeka a kol. [3] v jehličí jedle a také např. v práci A.R.Ivanova a kol. [4, 5] v lidské krvi.

Toto stanovení je důležité, jelikož určení množství těchto látek v biologicky aktivním materiálu může být hlavní metodou pro vyhodnocení toxikologických studií.

Separační a detekční podmínky u vybraných prací summarizují tabulky č. 1, 2 a 3.

3.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Sirné biologicky aktivní látky se dají dělit metodou HPLC, kdy mobilní fáze obsahuje iontově párové činidlo, jako např. v práci L.Manny a kol. [6], kde jím je kyselina trifluorooctová, nebo např. v práci F.Ramia a kol. [2], kde jím je kyselina 1 - oktansulfonová.

Většina nízkomolekulárních thiolů neobsahuje žádný chromofor, proto se pro stanovení v HPLC se spektrometrickou detekcí často využívá derivatizace, a to např. monobromobimanem, jak je tomu v práci A.R.Ivanova a kol. [4], nebo Ellmanovým činidlem jako tomu je v práci M.A.Raggiho a kol.

V práci J.Raftery a kol. [7] se autoři zabývali stanovením proteinů a peptidů obsahujících disulfidickou vazbu. Před HPLC autoři nechali tyto peptidy a proteiny zreagovat se siřičitanem sodným (Na_2SO_3), čímž došlo k rozštěpení S-S vazby a vzniklo přibližně ekvimolární množství volných thiolů (-SH) a thiosiřičitanů (-S-SO₃H). Tomuto procesu se říká sulfitolýza. Směs peptidů, proteinů a thiosiřičitanů poté autoři rozdělili metodou HPLC.

Po rozdělení metodou HPLC je v mnoha pracech využíváno elektrochemické detekce, která na rozdíl od spektrometrické nepotřebuje derivatizaci, protože thiolová skupina je elektrochemicky aktivní.

V práci F.Ramia [2] autoři řešili současnou detekci oxidovaného a redukovaného glutathionu v čerstvě izolovaných buňkách krysího srdce a jater. Jako elektrochemickou detekci využívali coulometrie.

V práci V.Adama a kol. [8] se skupina autorů zabývala detekcí cysteinu, glutathionu a fytochelatinu prováděnou cyklickou voltametrií.

V práci W.R.LaCourse [9] se autoři zabývali stanovením antibiotik obsahujících síru a to konkrétně penicilinu G, lincomycinu a cefalosporinu C, detekcí byla pulsní ampérometrie s předchozím elektrochemickým čištěním elektrody.

Kromě elektrochemické detekce je pro stanovení těchto hojně užíváno optické a hmotnostní detekce.

Detekce MS/MS bylo užíváno v práci M.Gučeka a kol. [3], kde se autoři zabývali stanovením glutathionu v jehličí jedle. V této práci byla nejkritičtější částí příprava vzorku, protože GSH může být přítomný ve vzorku v různých formách a také může být vázaný v buněčném materiálu. Ionizace v této práci byla prováděna elektrosprejem.

Optická detekce se objevila v práci A.R.Ivanova a kol. [5], kde se autoři zabývali stanovením homocysteinu, cysteinu a glutathionu v lidské krvi metodou HPLC s fotometrickou a fluorescenční detekcí. Tato metoda je vhodná zejména pro klinické studie.

3.2.2 Kapilární elektroforéza

Metoda kapilární elektroforézy s fotometrickou detekcí je použita v práci A.R.Ivanova a kol. [4], kde se autoři zabývají stanovením nízkomolekulárních thiolů v lidské krvi. Autoři převedli disulfidy na volné thioly redukcí trifenylfosfínem a proteiny byly vysráženy sulfosalicylovou kyselinou. Na závěr přípravy vzorku byly thioly derivatizovány monobromobimanem. Tato metoda je rychlá, jednoduchá a velmi citlivá s limitem detekce 5 mmol/ml.

Kapilární zónová elektroforéza bylo využito v práci M.Perez-Rama a spol. [10] pro analýzu fytochelatinů a jeho prekursorů (γ – Glu – Cys; Cys; Glu) v komplexu biologických vzorků. V této práci také docházelo k předchozí derivatizaci monobromobimanem. Látky byly stanovovány optickou detekcí při 390 nm a limit detekce byl 2,5 μ mol/ml.

V práci J.J.Harta a kol. [11] autoři prováděli separaci metodou kapilární elektroforézy s detekcí laserem indukovanou fluorescencí s excitační vlnovou délkou 488 nm a emisní vlnovou délkou 515 nm. Jako fluorescenční činidlo byl použit 5-bromomethylfluorescein.

Metoda je velmi citlivá pro cystein, cysteiny - glycine, γ – glutamyl - cysteine a glutathion, pro fytochelatiny byla citlivost této metody nižší. Limit detekce byl 25 nmol/l. Vzorkem v této práci byla biologická tkáň.

3.2.3 Elektrochemické metody

Sirné biologicky aktivní látky mohou být stanovovány také elektrochemickými metodami a to hlavně voltametricky či potenciometricky.

V práci B. Yosephuka a kol. [12] byla prováděna detekce aminokyselin obsahujících síru a fytochelatinu (PC_2). Bylo použito voltmetrické detekce, přičemž bylo užito nového typu pevné měděně amalganové elektrody (CuSAE). Stanovení je založeno na tvorbě měďných komplexů v pufru o pH 8,1. Kvůli reprodukovatelnosti byl povrch elektrody elektrochemicky čištěn.

V práci S.Grecheva a kol. [13] byla prováděna selektivní potenciometrie. Metoda byla založena na reakci redukovaných thiolů s benzochinonem. Touto metodou můžeme zjistit pouze celkovou koncentraci RSH (mono i makromolekulární), což ovšem často stačí pro farmaceutické využití.

Tab. I - Separační podmínky vybraných ciaci pro separaci silných biologicky aktivních látek

Separ. metoda	práce	typ kolony; kapiláry	rozměry kolony; kapiláry	složení mobilní fáze; základního elektrolytu	G/I	teplota separace	průtoková rychlosť; napětí	detekce
	8	C18A	150 mm x 2,0 mm	92 % 80 mmol/l kyseliny trifluoroctové, 8% acetonitrilu 25 mmol/l NaH ₂ PO ₄ ; 0,05 mmol/l kyselina 1-oktansulfonová, 2,2 % acetonitril, upraveno na pH 2,5 kyselinou fosforečnou	I	35°C	0,4 ml/min	cyklická voltammetrie
	2	S5 ODS2	250 mm x 4,6 mm		I	pokojová	1 ml/min	coulometrie
	6	LC 18 DB	100 mm x 4,6 mm	0,1 % TFA: acetonitril (98: 2, v/v)	I	pokojová	1,2 ml/min	ampérometrická s 2 elektrodami
HPLC	3	C18	3,9 mm x 150 mm	80 % TFA, 20 % methanol – 20 % TFA, 80 % methanolu	G	4°C	0,3 ml/min	hmotnostní spektroskopie
	14	C18	250 mm x 4,6 mm	93,25 % 0,1 mol/l chloroctová kyselina, 5 % methanol 1,75 % N,N-dimethylformamid a 2,25 mmol/l heptansulfonová kys. upraveno na pH 2,8 hydroxidem sodným	I	0 - 4°C	1 ml/min v noci 0,2 ml/min	ampérometrická s 2 elektrodami
	11	C18	4,6 mm x 250 mm	5-75 % CH ₃ CN; 0,1 % TFA	G	23°C	1 ml/min	hmotnostní spektroskopie
	7	C8	150 mm x 4,6 mm	A = methanol : voda (90:10; v/v) B = NaAC pufr (pH = 3,75; 0,5 mol/l) C = voda D = acetonitril: voda (90: 10, v/v)	G	30°C	-----	pulsní ampérometrická
	5	ODS	75 mm x 4,6 mm	-----	G	25°C	0,75 ml/min	fotoometrická fluorescenční
	4	křemenná	65 cm x 50 µm	80 mmol/l fosforečnan sodný (pH 9)	---	30°C	250 V/cm	fotometrická
HPCE	11	křemenná	50 cm x 75 µm	50 mmol/l kyseliny boritě titrované NaOH na pH 9,7-10,6	---	30°C	30 kV	fluorescenční
CZE	10		30 cm x 50 µm	150 mmol/l fosforečnanový pufr (pH 1,6)	---	25°C	12 kV	UV

G – gradientová eluce; I - isokratická eluce

Tab. 2 – Detekční podmínky u vybraných prací stanovujících sinné biologicky aktivní látky elektrochemickými metodami

práce	metoda	pracovní elektroda	pracovní potenciál	rychlosc scannu	detekční limity	kalibrace v rozsahu koncentrace
8	cyklická voltametrije	rtutová kapková elektroda	90, 180, 270, 360, 450, 540, 630 a 720 mV	-----	GSH – 80 ng/ml GSSG - 250 ng/ml PC ₂ – 500 ng/ml Cys – 10 ng/ml	GSH: 0 - 1100 µg/ml GSSG: 0 - 1300 µg/ml PC ₂ : 0 - 1300 µg/ml Cys: 0 - 250 µg/ml
2	coulometrie	-----	GSH: 0,25 V - 0,85 V GSSG: 0,75 V - 1 V	-----	GSH: 40 pg GSSG: 300 pg	-----
6	ampérometrická s 2 elektrodami	2 porézní grafitové	E ₁ = 0,450 V E ₂ = 0,750 V	-----	GSH: 0,60 ng/ml GSSG: 0,15 ng/ml	-----
12	voltametrije	CuSAE	E _{ac} = -280 mV (t _{ac} = 300 s) E _{reg} = -1600 mV(t _{reg} = 30 s) E _m = -550 mV E _{fin} = -1200 mV	DCV: 1000 mV/s DPV: 20 mV/s	PC ₂ : DCV: 2,6x10 ⁻⁹ DPV: 2,7x10 ⁻⁹ PC ₃ : DCV, 2,1x10 ⁻⁹ DPV: 1x10 ⁻⁹	PC _x : 10 - 100 nmol/l
13	potenciometrie	skelná uhlíková	-----	-----	-----	-----
14	ampérometrická s 2 elektrodami	tenkovrstvá dvojitá Au/Hg	-----	-----	-----	-----
9	pulsní elektrochemická	-----	0 – 1450 mV	250 mV/s	10 ppb a méně	-----

Tab.3 – Detekční podmínky pro stanovení sinných biologicky aktivních látok u vybraných prací s detekcí kapilární elektroforezou

práce	ionizace	koncentrace	optimální parametry			
			mobilní fáze	m/z	teplota kapiláry	napětí kapiláry
3	elektrospej	GSH: 500 µg/l	50:50 voda:methanol	GSH: 308 GSSG: 613	25°C	17 V
7	elektrospej	-----	50:50 voda:acetonitril (0,1 % kyseliny octové)	79,9568	900 V	-----

3.3 Charakteristika elektroanalytických metod

3.3.1 Cyklická voltametrie

Při CV je registrována závislost proudu v obvodu pracovní elektrody a pomocné elektrody na napětí vkládaném mezi pracovní a referentní elektrodou. Vkládané napětí se mění s časem tak, že nejprve lineárně vzrůstá až do určité hodnoty a potom lineárně klesá. V první části experimentu tedy probíhá reakce v jednom směru (např. Ox + ne → Red) a při druhé části jsou produkty elektrodrových reakcí převáděny zpět na výchozí látky (např. Red + ne → Ox) [15].

Přímé analytické využití je malé, hlavní význam má CV při studiu elektrodrových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek je možno usuzovat na mechanismus elektrodrových reakcí, např. posuzovat její reverzibilitu.

Pro reverzibilní reakci platí, že rozdíl potenciálů anodického a katodického píku je nezávislý na rychlosti změny potenciálu, a je o $28,5/n$ mV negativnější (u katodických) či pozitivnější (u anodických) než půlvlnový potenciál. Pro ireverzibilní děj závisí rozdíl potenciálů anodického a katodického píku na rychlosti polarizace, na hodnotě rychlostní konstanty a hodnotě koeficientu přenosu náboje [16].

3.3.2 HPLC s elektrochemickou detekcí

Elektrochemická detekce získala od svého zavedení v průtokových metodách v 70. letech minulého století nezastupitelné místo mezi ostatními detekčními metodami [17]. K detekci v proudících kapalinách se používá řady elektrochemických metod, jednak metod založených na elektrických vlastnostech roztoků, tj. nízkofrekvenční konduktometrie a vysokofrekvenční měření impedance, dále elektrolytických metod, tj. rovnovážná potenciometrie, polarografie, voltametrie a coulometrie [18]. Velké uplatnění v detektorech průtokových systémů zastávají materiály obsahující různé formy uhlíku (modifikované uhlíkové pasty, skelný uhlík, inkousty, porézní grafit, uhlíková vlákna), platiny, zlata a stříbra.

3.4 Elektrodové materiály na bázi uhlíku

3.4.1 Borem dopovaný diamant

Vlastnosti diamantových filmů a možnosti jejich využití v elektroanalýze jsou intenzivně studovány posledních 15 let. Vývoj této problematiky je přehledně shrnut v práci [19].

Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou . Atomy uhlíku jsou s dalšími 4 atomy uhlíku vázány sp^3 hybridizovanými orbitaly. Pro jeho elektroanalytické využití je nutné diamant dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji borem a to proto, že čistý diamant je výborný přírodní izolátor. Podle koncentrace dopantu lze získat diamant s polovodivými vlastnostmi nebo s vodivostí dosahující poloviny hodnoty vodivosti kovu. Diamantové elektrody se používají ve formě tenkých polykrystalických filmů připravovaných chemickou depozicí par. Nosičem diamantového filmu je destička z křemíku, případně wolframu či molybdenu. Nosnou destičku je třeba nejdříve očistit a přeleštit brusnou směsí složenou z diamantového prášku a B_2O_3 . K depozici diamantového filmu se nejčastěji používá směs methanu a vodíku při tlaku 10 až 100 torr, přičemž teplota nosiče je 800 – 1000°C. Dopování borem je dosaženo přidáním diboranu do směsi plynů, může se také použít pevný nitrid bóru, kterých za daných podmínek v plazmovém hořáku postupně reaguje s atomárním vodíkem na diboran.

Ve srovnání s ostatními uhlíkovými materiály se diamantové elektrody vyznačují velmi vysokou stabilitou, nevykazují známky poškození při anodické polarizaci v kyselých, neutrálních ani zásaditých roztocích.

Potenciálové okno, definované jako rozdíl potenciálů, při kterých dosahuje anodický i katodický proud hodnoty 50 μA [20], činí u elektrod na bázi diamantového filmu v kyselých a neutrálních roztocích nejčastěji 3,5 V (-1 V až +2,5 V) a je silně závislé na kvalitě diamantového filmu. Kvalitní filmy mají potenciálové okno až 4,4 V a umožňují provádět elektrochemická měření při potenciálech, kterých běžně nelze dosáhnout jiným způsobem [16], protože např. skelná uhlíková elektroda má potenciálové okno zhruba 1,5 V (-0,5 až +1 V) a uhlíková pastová elektroda asi 2,5 V (-1 až 1,5 V).

3.4.2 Uhlíková pasta

Uhlíkové pasty jsou v elektrolýze používány od 60.let minulého století [21] a v následujících letech nastal jejich rozvoj a to jak nemodifikovaných, tak chemicky či biologicky modifikovaných. V současnosti se elektrody s uhlíkovou pastou (Carbon Paste Electrode, CPE) využívají hlavně pro stanovení stopových množství iontů kovů a při analýze organických látek. Vhodné jsou především techniky voltametrické rozpouštěcí analýzy, ale i ampérometrie, potenciometrie, chronopotenciometrie a coulometrie [22].

Uhlíková pasta se připravuje důkladnou homogenizací uhlíkového (grafitového) prášku s vhodným pojivem pomocí třecí misky a tloučku. Jako uhlíkový prášek je většinou používán spektroskopický grafitový prášek nebo příbuzné materiály. U uhlíkových prášků je vyžadována vysoká čistota, stejná velikost částic a snížená adsorpční schopnost. Vhodným pojivem je nejčastěji organická kapalina neiontového charakteru. Nejčastěji je používán spektroskopický minerální olej Nujol (Aldrich) a Uvasol (Merk), nebo také různé typy silikonových olejů. Dispergující kapalina musí být s vodou nemísitelná, chemicky inertní, netěkavá a elektrochemicky inaktivní.

Výhodou CPE proti jiným elektrodám je její snadno obnovitelný povrch a velmi nízké zbytkové proudy v oblasti anodických potenciálů. V záporných potenciálech je hodnota do které mohou být polarizovány limitována nižším přepětím vůči vodíku. Často se nepříznivě uplatňuje kyslík rozpouštěný v pastě. Pro zlepšení vlastností CPE se využívá její modifikace, díky níž se oblast využití stále zvětšuje.

4 Experimentální část

4.1 Reagencie

Zásobní roztoky GSH, GSSG a HCys o koncentraci 10 mg/ml jsem připravovala z přesně odváženého množství vzorku, který jsem poté převedla do 10 ml odměrné baňky a rozpustila pomocí ultrazvuku v deionizované vodě.

Pro voltametrická měření jsem jako pracovní roztoky používala 10x naředěný zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml a pro HPLC jsem si pracovní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml připravila ze 100 μ l zásobního roztoku, které jsem doplnila v 10 ml odměrné baňce směsi acetonitrilu (ACN) s deionizovanou vodou v poměru 98:2 (v/v). Všechny roztoky jsem uchovávala v chladu v lednici.

Pro přípravu Brittonova-Robinsonova (BR) pufru jsem si připravila jeho kyselou a zásaditou složku, jejichž smísením v určitém poměru jsem mohla připravit tlumivý roztok o potřebném pH. Alkalickou složku jsem připravila rozpuštěním 8 g NaOH v 1 l odměrné baňce (0,2 mol/l NaOH), doplněné po rysku deionizovanou vodou. Kyselou složku jsem připravila z 2,744 g H_3BO_3 , 2,7 ml H_3PO_4 ($\rho = 1,71$ g/mL) a 2,30 ml CH_3COOH ($\rho = 1,069$ g/ml).

Mezi další použité chemikálie patří 2-propanol a acetonitril v chromatografické čistotě (Merck, Praha).

4.2 Zařízení

4.2.1 Cyklická voltametrie

Přesnou hodnotu pH jsem měřila na digitálním pH-metru Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních vodních pufrů.

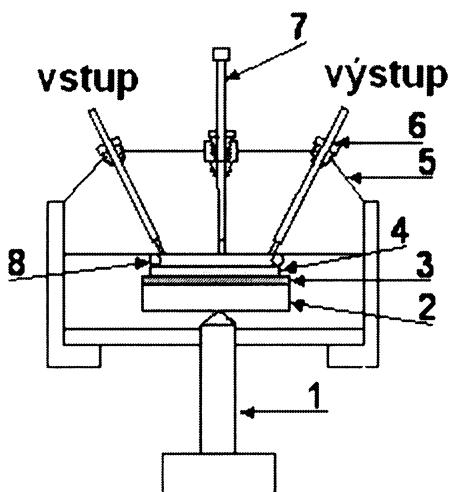
Pro voltametrická měření jsem používala Palmsens (tj.elektrochemický detektor) v tříelektrodovém zapojení ve spojení s kapesním počítačem PC HP Microsoft Windows Mobile 5,0.

Jako referentní elektrodu jsem používala argentchloridovou elektrodu a pomocná elektroda byla realizována platinovým drátkem. Pro měření jsem používala 2 typy pracovních elektrod, a to CPE o průměru 2 mm a borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodu (Boron Doped Diamond Film Electrode, BDDFE) v diskovém uspořádání (viz Obr.5). Pří CV jsem používala rychlosť nárstu potenciálu 20 mV/s a 50 mV/s.

4.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Měření technikou HPLC jsem prováděla na kapalinovém chromatografu složeném z gradientové pumpy L-7100, autosampleru L-7200, spektrofotometrického detektoru L-7400 a řídící jednotky D-7000 (vše Merck-Hitachi, USA). Obsluhu systému, sběr a vyhodnocení dat zajišťoval osobní počítač s programem HSM (Merck-Hitachi, SRN) pracující v operačním systému MS Windows NT. Byla použita kolona Chromolith (100 x 4,6 mm, Merck) a také kolona Synergi Hydro – RP (150 x 2 mm, 4 µm, 80 Å, Phenomenex).

Měření jsem prováděla za laboratorní teploty, kolona nebyla termostatována. Používané mobilní fáze jsem odvzdušňovala v ultrazvukové lázni PS 02000 A (Powersonic). Spektrofotometrický detektor jsem nastavila na 200 nm. Ampérometrický detektor (viz Obr.3) pracující v tříelektrodovém uspořádání byl zapojen jako druhý za výstup ze spektrofotometrického detektoru. Ampérometrický detektor byl připojen k potenciostatu ADLC 2 (Laboratorní přístroje, ČR).



- 1 nástavný šroub stlačující spodní 2 a svrchní 5 část pláště Kel-F cely
 3 Cu kontakt
 4 BDDF na křemíkové podložce
 6 pomocná Pt elektroda
 7 referentní elektroda
 8 těsnění z vitonu

Obr. 3 Schéma elektrochemické tenkovrstvé detekční cely s borem dopovaná diamantová filmová elektroda

4.3 Pracovní postupy

4.3.1 Příprava uhlíkové pastové elektrody

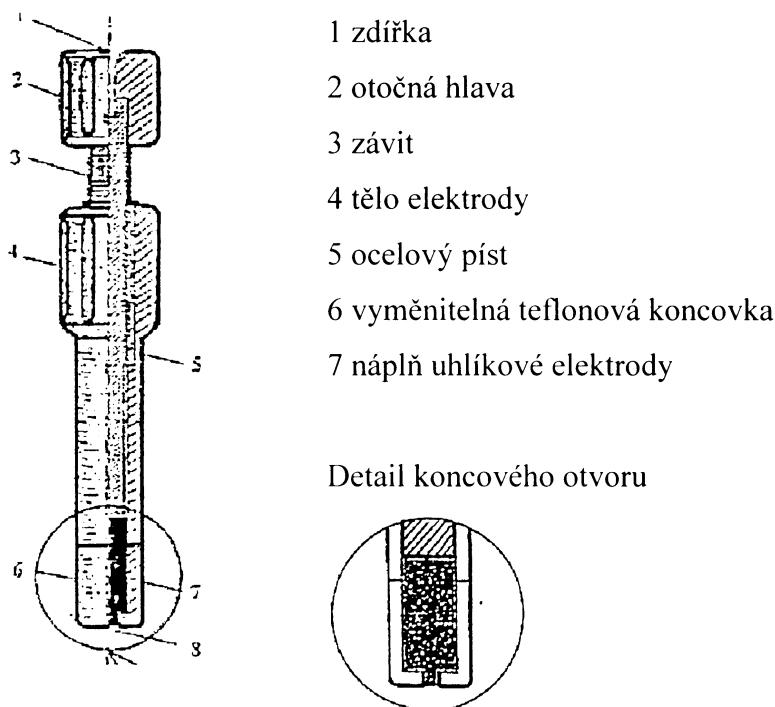
Před vlastním voltmetrickým měřením jsem si nejdříve připravila CPE (viz Obr.4). Uhlíkovou pastu (CP) jsem vyrobila homogenizací 0,25 g uhlíkového prášku CR2 (maziva Týn spol s.r.o.) a 100 µl minerálního oleje (Fluka) v třecí misce. Dokonale homogenizovanou pastou jsem plnila elektrodové pouzdro elektrody o vnějším průměru 10 mm a průměru disku 2 mm.

4.3.2 Cyklická voltametrije na uhlíkové pastové elektrodě a borem dopované diamantové filmové elektrodě

Při voltmetrických měřeních jsem do kádinky na 10 ml odpipetovala příslušné množství roztoku studované látky ve vodě a pak jsem odpipetovala k roztoku BR pufr o příslušném pH, tak, aby výsledný objem byl 6 ml. Připravený roztok jsem po promíchání přelila

do polarografické nádobky a před každým měřením nechala po dobu 5 minut probublávat dusíkem. Poté jsem spustila voltmetrické měření.

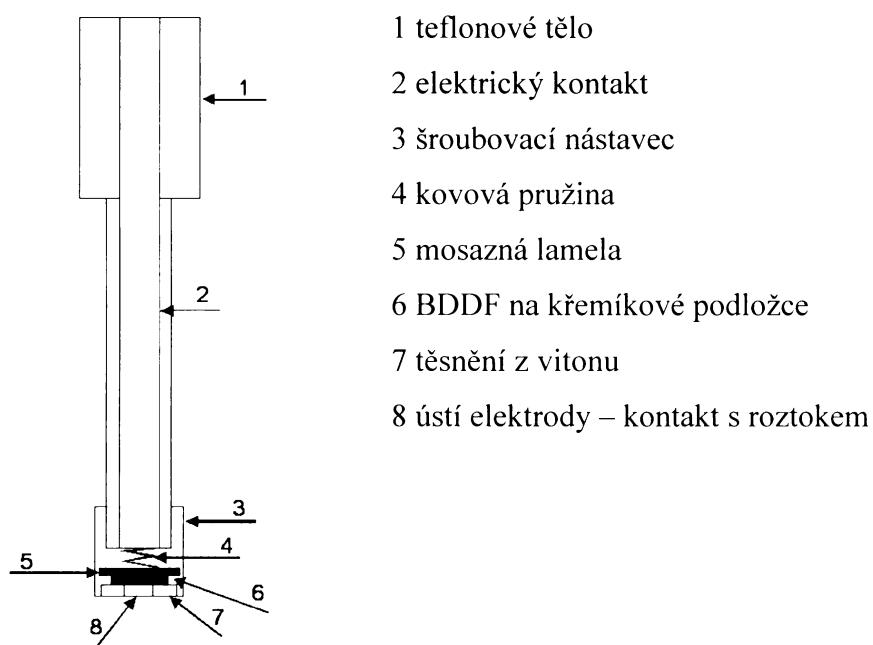
Při měření na CPE jsem okamžitě po každém měření elektrodu odpojila a vyndala z měřeného roztoku, opláchla deionizovanou vodou a vytlačila malé množství uhlíkové pasty, které jsem otřela vlhkým filtračním papírem, tak aby povrch uhlíkové pasty byl opět hladký. Mezi jednotlivými měřeními jsem CPE nechávala ponořenou v kádince s deionizovanou vodou, abych předešla vysychání CP.



Obr. 4 Schéma uhlíkové pastové elektrody

Při práci s BDDFE (viz Obr.5) jsem elektrodu po každém měření opláchl deionizovanou vodou a ponořila jí do methanolu ve kterém jsem ji nechala 5 minut probublávat dusíkem. Poté jsem ji znova opláchl deionizovanou vodou. Po každém dni měření, jsem elektrodu rozebrala a všechny její části opláchl methanolem a nechala na filtračním papíře usušit do druhého dne. Následující den, jsem před měřením BDDF aktivovala ponořením do 2-propanolu po dobu 20 minut.

Veškerá měření jsem prováděla za běžné laboratorní teploty.



Obr. 5 Schéma borem dopované diamantové filmové elektrody (BDDFE) v diskovém uspořádání

4.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Mobilní fáze jsem připravovala smísením příslušného objemu deionizované vody s ACN a TFA. Mobilní fázi jsem před každým měřením nechala na 10 minut odvzdušnit v ultrazvuku a poté ještě 10 minut probublávat heliem.

Dávkování vzorku o objemu 20 μ l zajišťoval automatický dávkovač, který jsem každý den před měřením nechala propláchnout směsí deionizované vody a acetonitrilu v poměru (98:2, v/v). Po každém dni měření jsem nechala vždy celý systém promývat směsí deionizované vody a acetonitrilu (98:2, v/v), abych předešla ucpání některé části systému. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě.

5 Výsledky a diskuze

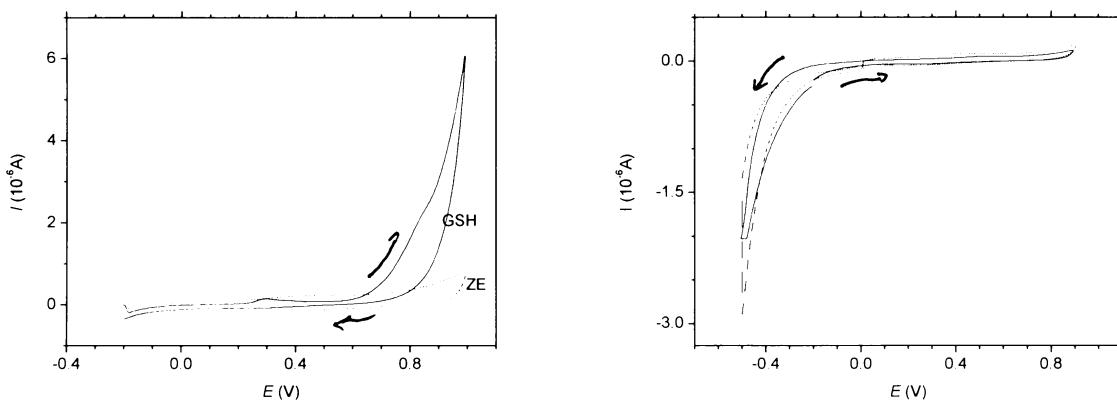
5.1 Cyklická voltametrie

Metodou cyklické voltametrie jsem studovala chování GSH a GSSG, abych vyzkoušela, která z použitých elektrod je vhodnější pro měření metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrodemickou detekcí.

Při cyklické voltametrii byl sledován vliv pH na voltamerické chování GSH a GSSG v BR pufru. Koncentrace studovaných látek byla 1 mg/ml. Pro cyklickou voltametrii jsem používala jako pracovní elektrodu CPE a BDDFE.

5.1.1 Cyklická voltametrie oxidovaného a redukovaného glutathionu na uhlíkové pastové elektrodě

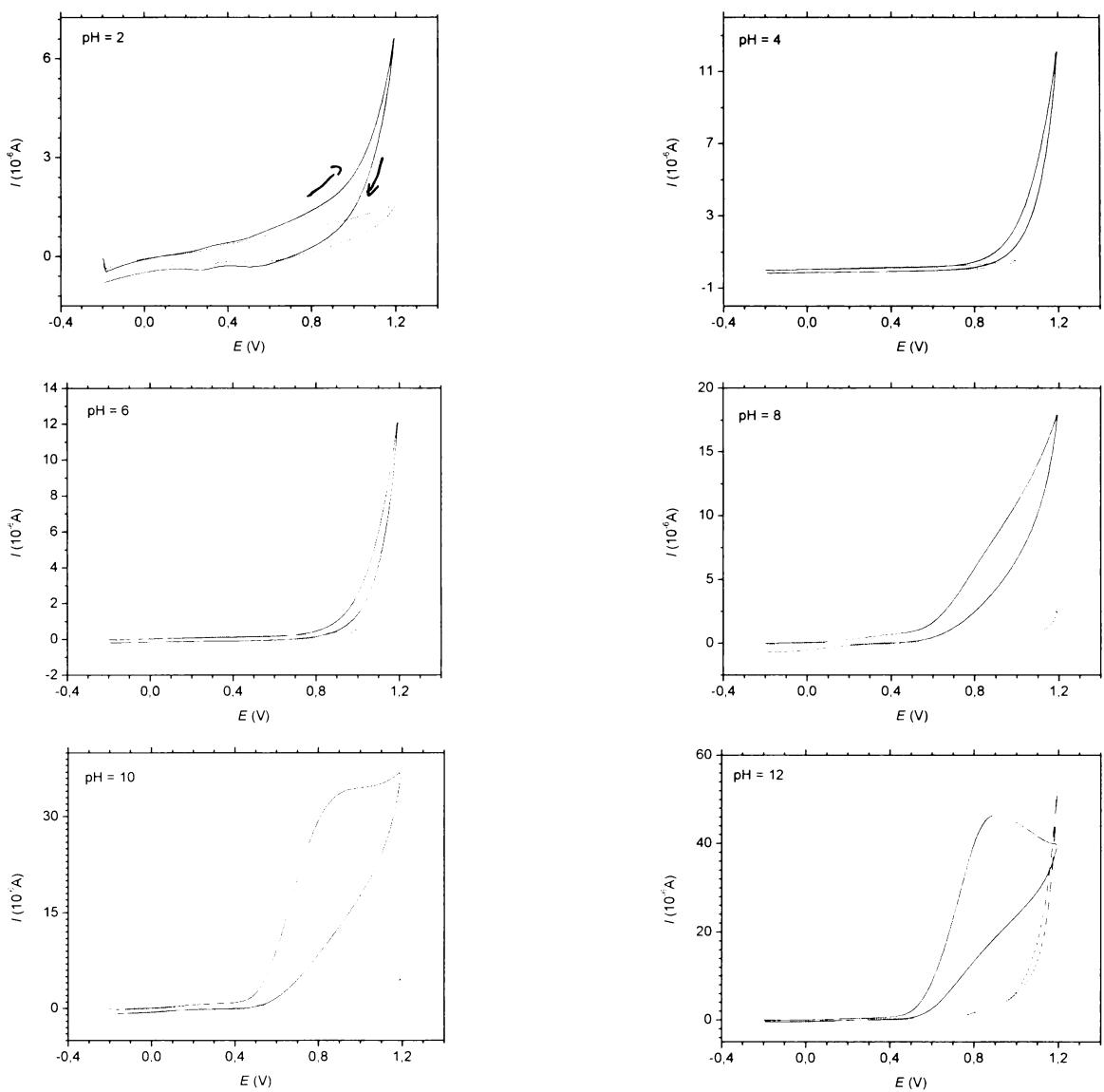
CV s CPE jsem měřila cyklické voltamogramy GSH a GSSG při pH 2, 7 a 12. CV s CPE neposkytla uspokojivé výsledky pro GSH a GSSG. Pro názorný příklad jsou na Obr.6 zobrazeny cyklické voltamogramy GSH a GSSG společně se základním elektrolytem (ZE) při pH 2. Pro GSH je vidět pouze malý rozdíl signálu CV křivky oproti CV křivce samotného ZE a tento rozdíl se s rostoucím pH výrazně nemění. Pro GSSG je situace podstatně horší (viz Obr.6), CV křivka GSSG se od CV křivky ZE téměř neliší a to i při pH 7 a 12.



Obr. 6 Cyklické voltamogramy redukovaného (vlevo) a oxidovaného (vpravo) glutathionu (1 mg/ml) a základního elektrolytu měřené rychlostí 20 mV/s na uhlíkové pastové elektrodě v Brittonově-Robinsonově pufru při hodnotách pH 2. Referentní elektrodou byla argentchloridová a pomocnou byl Pt – drátek. Křivky základního elektrolytu jsou na obrázku znázorněny čárkováně. Směr polarizace je na voltamogramu znázorněn šipkami.

5.1.2 Cyklická voltametrie redukovaného glutathionu na borem dopované diamantové filmové elektrodě

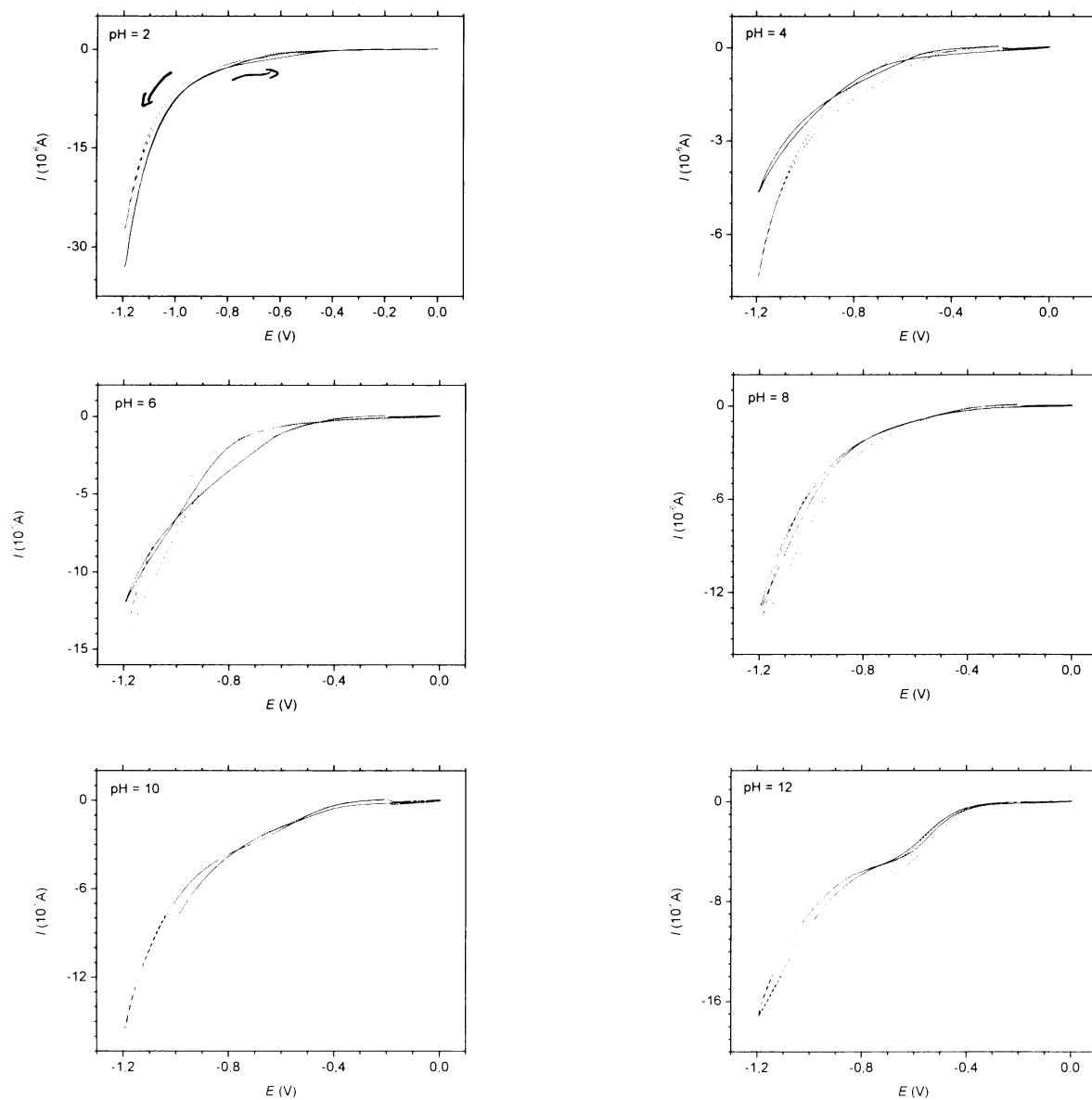
Na BDDFE jsem měřila cyklické voltamogramy pro GSH při pH od 2 až po 12. Voltamogramy GSH pro jednotlivá pH jsou znázorněny na Obr.7. Z cyklických voltamogramů je patrné, že s rostoucím pH dochází k nárustu proudu od přibližně 0,5 V a tento trend je výraznější pro pH vyšší než 7. Z cyklických voltamogramů bylo současně zjištěno že oxidace redukovaného glutathionu je proces ireverzibilní.



Obr.7 Cyklické voltamgramy redukovaného glutathionu (1 mg/ml) a základního elektrolytu měřené rychlosí 50 mV/s na borem dopované diamantové filmové elektrodě v Brittonově-Robinsonově pufru při pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda a pomocnou Pt-drátek. Směr polarizace je na voltamogramu při pH 2 znázorněn šipkami.

5.1.3 Cyklická voltametrie oxidovaného glutathionu na borem dopované diamantové filmové elektrodě

Na BDDFE jsem měřila cyklické voltamogramy pro GSSG při pH od 2 až po 12. Voltamogramy GSSG jsou znázorněny na Obr.8. Z cyklických voltamogramů není nárůst proudu oproti ZE příliš zjevný.



Obr.8 Cyklické voltamogramy oxidovaného glutathionu (1 mg/ml) a základního elektrolytu měřené rychlostí 50 mV/s na borem dopované diamantové filmové elektrodě v Brittonově-Robinsonově pufru při pH 12, 10, 8, 6, 4 a 2. Referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda a pomocná byla realizována Pt-drátkem. Směr polarizace je na voltamogramu při pH 2 znázorněn šipkami.

5.2 HPLC s elektrochemickou detekcí a spektrometrickou detekcí

Všechny tři vybrané analyty jsou metabolicky spřízněné, vyskytují se společně v biologických materiálech, a proto bylo jejich separaci věnováno již několik studií. Z přehledu těchto prací zabývajících se stanovením i jiných biologicky aktivních sirných látek v tabulce 1, jsem si vybrala pro separaci homocysteingu, oxidovaného a redukovaného glutathionu jako mobilní fázi směs 0,1% TFA:ACN v objemovém poměru 98:2. Ze změřeného chromatogramu (viz Obr.10 b) s tímto poměrem složek MF je vidět, že první pík odpovídající HCys téměř koeluuje se systémovým píkem nástřiku. Proto jsem dále prováděla optimalizaci tohoto poměru a následně jsem i pro lepší separaci píku zkusila výměnu kolony a i odpojení spektrofotometrického detektoru. Pro dosažení optimální separace by bylo zřejmě potřeba dalších experimentů s použitím gradientové eluce.

Používala jsem kolony Chromolith a Synergie Hydro – RP. Průtok mobilní fáze jsem zvolila 1,2 ml/min pro kolonu Chromolith a 0,4 ml/min pro kolonu Synergi.

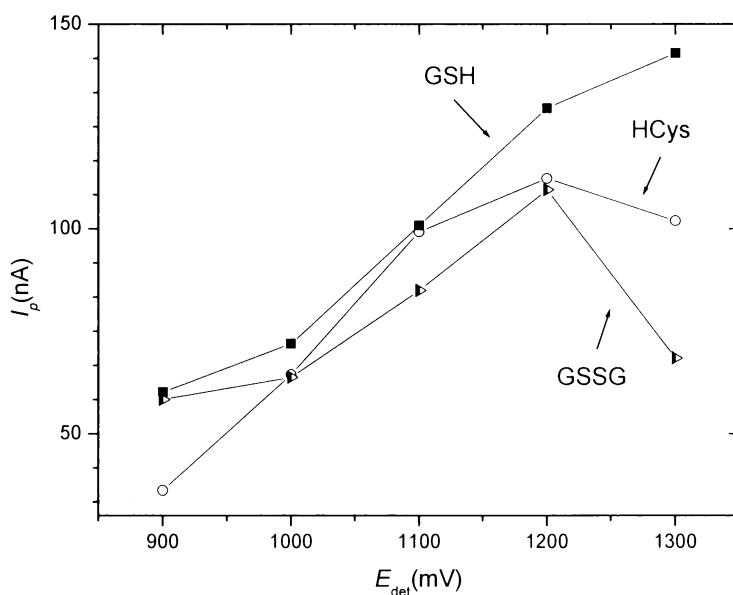
UV detekci jsem používala pouze jako doplňkovou, pro srovnání s detekcí elektrochemickou. Vlnovou délku jsem si zvolila 200 nm.

5.2.1 Zjištění optimálního pracovního potenciálu

Optimální potenciál pro stanovení oxidovaného a redukovaného glutathionu a homocysteingu jsem zjistila na základě změření závislosti signálu detektoru na vkládaném napětí na pracovní elektrodu. Optimální potenciál je takový potenciál, při kterém dosahuje poměr signálu k šumu maximální hodnoty. Tuto závislost jsem proměřila pro roztoky, které obsahovaly mnou studované látky o koncentraci 0,1 mg/ml. Průtoková rychlosť byla 1,2 ml/min. Závislost signálu na vkládaném napětí jsme proměřovala v rozmezí od $E_{det} = +900$ až po $+1300$ mV. V Tab. 4 je zaznamenána velikost šumu a proudu pozadí v rozmezí $+900$ až $+1300$ mV. Velikost šumu se byla měřena jako absolutní velikost rozkmitu základní linie v jednotkách proudu. Proud pozadí pak jako velikost proudu základní linie odečítaná od nulového proudu při rozpojeném elektrickém obvodu. Závislost výšky píku analytů na vloženém potenciálu ukazuje Obr.9. Jako optimální pracovní potenciál pro další měření jsem zvolila $+1200$ mV, protože při vyšším potenciálu již dochází u 2 analytů a to HCys a GSSG k poklesu výšky píku.

Tab. 4 Závislost šumu a proudu pozadí pro BDDFE na vloženém potenciálu. Průtoková rychlosť byla 1,2 ml/min, používaná MF: 0,1 % TFA:ACN v objemovém poměru 98:2.

E_{det} (mV)	Šum (nA)	Proud pozadí (nA)
1300	6	3650
1200	10	3350
1100	6	3040
1000	25	2970
900	20	2563



Obr. 9 Závislost signálu elektrochemického detektoru na potenciálu vkládaného na borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodu pro oxidovaný a redukovaný glutathion a homocystein o koncentraci 0,1 mg/ml. Výška píku je odečtena od proudu pozadí. Vyhodnocováno z výšky píku. Průtoková rychlosť byla 1,2 ml/min, používaná MF: 0,1 % trifluorooctová kyselina:acetonitril v objemovém poměru 98:2.

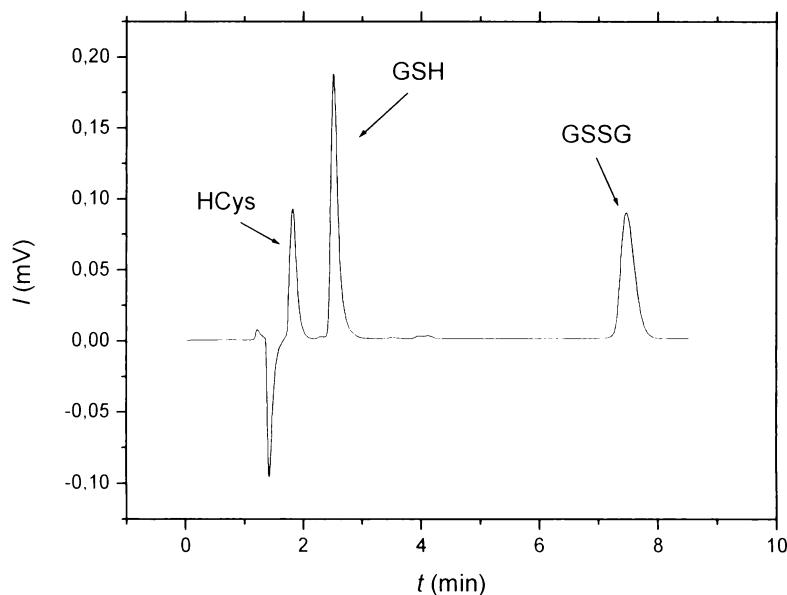
5.2.2 Zjištění optimálního složení mobilní fáze a výběr kolony

Z přehledu vybraných prací (viz Tab.1), jsem si jako mobilní fází zvolila 0,1% trifluorooctovou kyselinu:acetonitril v objemovém poměru 98:2. Aby došlo k lepšímu oddělení píků, a to konkrétně systémového píku nástřiku a homocysteinu, tak jsem složení MF měnila. Vyzkoušela jsem MF s objemovými poměry kyseliny 0,1% TFA: ACN 98:2; 99:1 a 96:4. Zaznamenané chromatogramy jsou na Obr. 10 a retenční charakteristiky jednotlivých analytů jsou shrnuty v Tab. 5. Jako nejlepší složení MF se pro separaci ukázala směs 0,1% TFA:ACN v objemovém poměru 99:1.

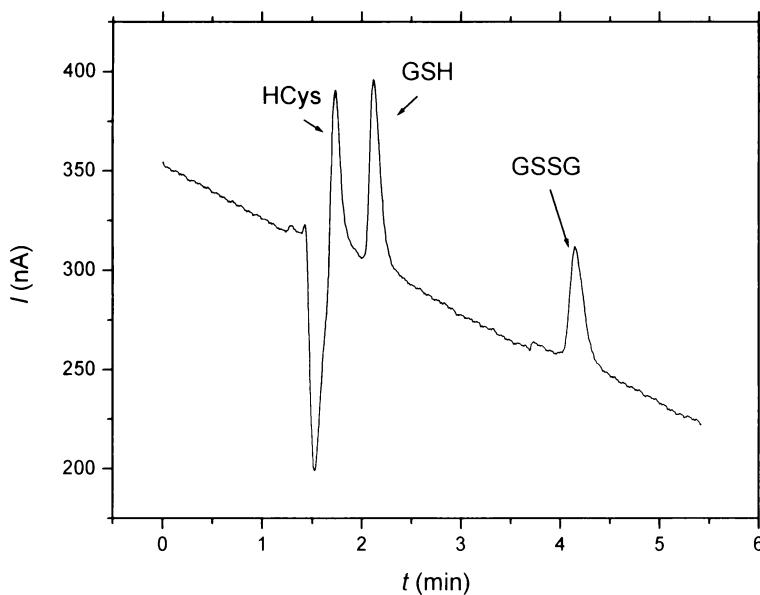
Při složení MF 0,1% TFA:ACN v poměru 96:4 došlo k separaci mnou stanovených látek za čas 2 minut a 48 vteřin, při objemovém poměru 98: 2 za čas 4 minut a 27 vteřin a při objemovém poměru 99: 1 za dobu 8 minut.

Dále jsem vyzkoušela kolonu Synergi a to při objemovém poměru 99:1, přičemž se první používaná kolona Chromolith ukázala jako lepší. Chromatogram získaný na koloně Chramolit je uveden na Obr.11.

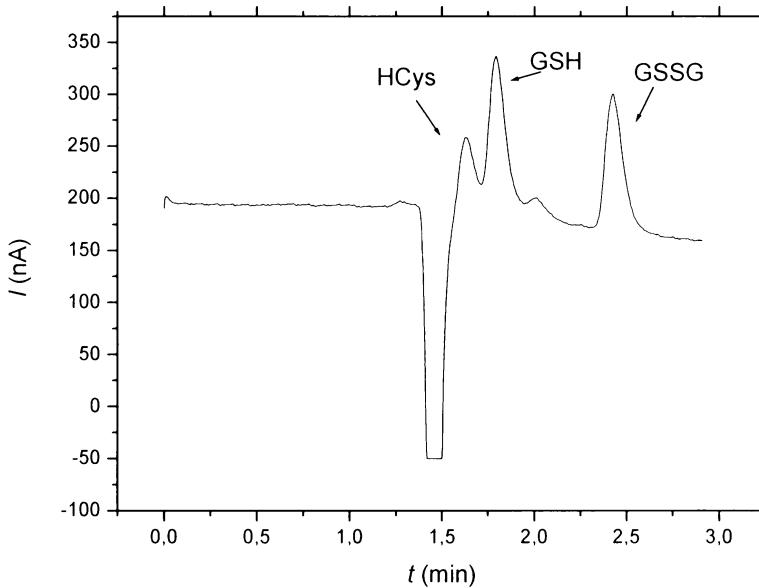
a) 99: 1



b) 98: 2



c) 96: 4



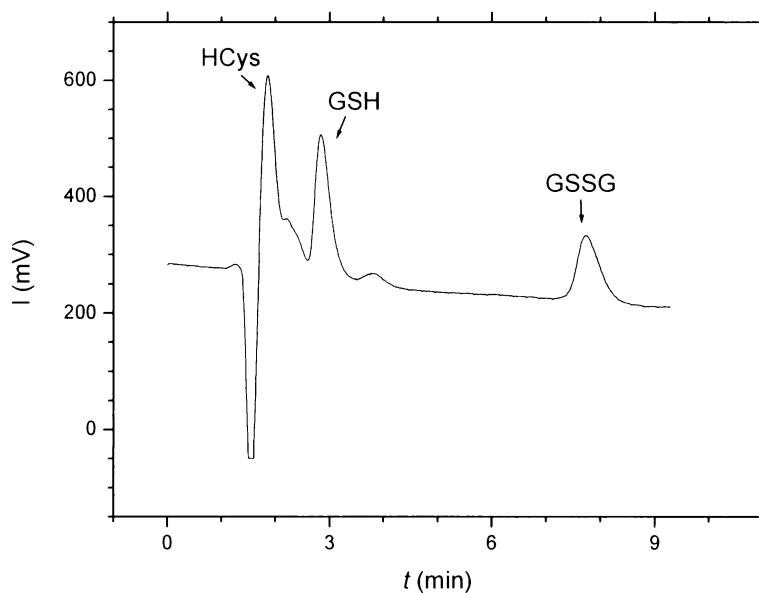
Obr. 10 Chromatogramy směsi oxidovaného a redukovaného glutathionu a homocysteinu o koncentracích 0,1 mg/ml zaznamenané elektrochemickým detektorem s borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou v mobilní fázi obsahující

- 0,1% trifluorooctovou kyselinu: acetonitril v objemovém poměru 99: 1
- 0,1% trifluorooctovou kyselinu: acetonitril v objemovém poměru 98: 2
- 0,1% trifluorooctovou kyselinu: acetonitril v objemovém poměru 96: 4.

$E_{det} = +1,2V$; průtoková rychlosť 1,2 ml/min; kolona Chromolith

Tab. 5 Závislost retenčních faktorů (k) oxidovaného a redukovaného glutathionu a homocysteinu na mobilní fázi složené z 0,1% trifluorooctové kyseliny a acetonitrilu v objemových poměrech 99:1, 98:2 a 96:4

Objemový poměr 0,1% TFA: ACN	k		
	96: 4	98: 2	99: 1
Homocystein	0,11	0,15	0,28
Redukovaný glutathion	0,23	0,44	0,77
Oxidovaný glutathion	0,67	1,75	4,16

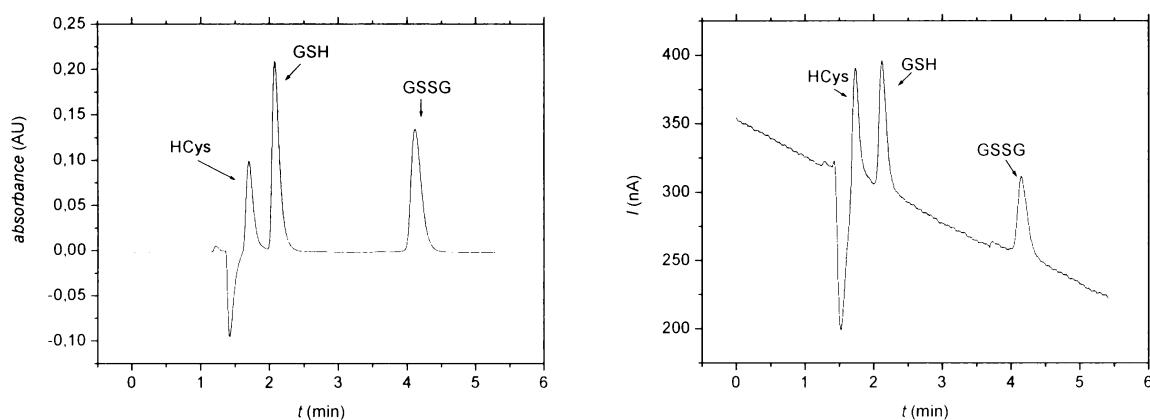


Obr. 11 Chromatogram směsi oxidovaného a redukovaného glutathionu a homocysteinu o koncentracích 0,1 mg/ml zaznamenaný elektrochemickým detektorem s borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou v mobilní fázi obsahující 0,1 % trifluorooctovou kyselinu a acetonitril v objemovém poměru 99:1. Průtoková rychlosť byla 0,4 ml/min a používaná kolona byla Synergi.

5.2.3 Porovnání odezvy elektrochemického detektoru s odezvou spektrometrického detektoru

Překvapivě jsem zjistila že GSH, GSSG i HCys, přestože nemají žádný chromofor, byly detekovatelné i spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 200 nm, což bylo tím, že jsem měření prováděla při vysokých koncentracích analytů (0,1 mg/ml).

Detekce: spektrofotometrická elektrochemická



Obr.12 Chromatogramy směsi oxidovaného a redukovaného glutathionu a homocysteinu o koncentracích 0,1 mg/ml zaznamenaný elektrochemickým detektorem s borem dopovanou filmovou diamantovou elektrodou a spektrometrickým detektorem v MF obsahující 0,1% TFA: ACN v objemovém poměru 98:2. Průtoková rychlosť byla 1,2 ml/min a používaná kolona byla Chromolit

U chromatogramu s elektrochemickým detektorem je vidět drift základní linie, který byl po vyčištění průtokové cely odstraněn. Tento drift však neměl vliv na mou práci, protože cílem práce bylo zjistit zda touto metodou lze GSH, GSSG a HCys detegovat.

Při HPLC jsem také vyzkoušela odpojit spektrofotometrický detektor, který byl zapojen před detektorem elektrochemickým, aby došlo k menšímu rozmytí píků. Situace ovšem i po odpojení spektrofotometrického detektoru zůstala stejná.

6 Shrnutí

1. Metodou CV bylo provedeno porovnání uhlíkové pastové elektrody a borem dopované diamantové filmové elektrody při detekci oxidovaného a redukovaného glutathionu v Brittonově-Robinsonově pufru. Bylo zjištěno, že uhlíková pastová elektroda se nehodí pro detekci GSH ani GSSG a borem dopovaná diamantová filmová elektroda je vhodná jen pro detekci GSH. Ovšem při elektrochemické detekci v HPLC, přestože CV ukázala nevhodnost BDDFE pro detekci GSSG, bylo praktickým měřením zjištěno, že tato detekce možná je. Dále bylo zjištěno, že oxidace GSH na BDDFE je proces ireverzibilní.
2. Bylo zjištěno optimální složení MF pro separaci GSH, GSSG a HCys jejíž složení je 99:1, v/v, 0,1 % TFA: ACN.
3. Ze srovnání kolon Chromolit a Synergie byla vybrána Chramolit pro lepší separaci oxidovaného a redukovaného glutathionu a homocysteinu.
4. Bylo zjištěno, že odpojení spektrofotometrického detektoru který byl připojen před detektorem elektrochemickým v HPLC nemělo vliv na rozmytí píků GSH, GSSG a HCys.
5. Bylo zjištěno, že GSG, GSSG a HCys o koncentracích 0,1 mg/ml lze detektovat bez předchozí derivativizace spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 200 nm.

7 Použitá literatura

1. Harpel P.C.
Homocysteine, atherogenesis and thrombosis
Fibrinolysis Proteolysis 11 **77** (1997) (suppl 1)
2. Fernando Remiao, Helena Carmo, Felix Carvalho and Maria L. Bastos
Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection
Biomed. Chromatogr. **14** (2000) 468–473
3. Marjan Guček, Simon Makuc, Anita Mlakar, Julija Beričnik-Vrbovšek, Jože Marsel
Determination of glutathion in sprše needles by liquid chromatography/tandem mass spectrometry
Rapid Commun. Mass spectrom. **16** (2002) 1186-1191
4. A.R. Ivanov , I.V. Nazimov , L.A. Baratova
Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood II.
High-performance capillary electrophoresis with photometric detection
Journal of Chromatography A **895** (2000) 167–171
5. A.R. Ivanov , I.V. Nazimov , L. Baratova
Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood
I. Fast qualitative and quantitative, gradient and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometric and fluorescence detection
Journal of Chromatography A **895** (2000) 157–166
6. L. Manna , L. Valvo, P. Betto
Determination of oxidized and reduced glutathione in pharmaceuticals by reversed-phase high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection
Journal of Chromatography A **846** (1999) 59–64
7. Mark J. Raftery
Selective detection of thiosulfate-containing peptides using tandem mass spectrometry
Rapid Commun. Mass Spectrom. **19** (2005) 674–682

8. Vojtěch Adam, René Kizek, Jan Vacek, Bořivoj Klejdus, Libuše Trnková, Ladislav Havel
Analýza cysteinu, glutathionu, a fytochelatinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí
CHEMagazín **6** (2003) 8 – 11
9. William R. LaCourse, Catherine O. Dasenborck
Pulsed electrochemical detection of sulfur-containing antibiotics following high performance liquid chromatography
Jurnal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **19** (1998) 239-252
10. Mónica Perez-Rama, Enrique Torres Vaamonde, Julio Abalde Alonso
Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in komplex biological samples derivatized with monobromobimane
Electrophoresis **26** (2005) 610–620
11. Jonathan J. Hart, Ross M. Welch, Wendell A. Novell, Leon V. Kochian
Measurement of thiol-containing amino acids and phytochelatin (PC2) via capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection
Electrophoresis **23** (2002) 81–87
12. B. Yosypchuk, I. Šestáková, L. Novotný
Voltammetric determination of phytochelatins using copper solid amalgam electrode
Talanta **59**, Issue 6 (2003) 1253-1258
13. Svetlana Gracheva, Alkmini Digga, Callum Livingstone, James Davis
Selective potentiometric measurement of physiologically significant thiols
Electroanalysis 17, No. 3 (2005), 205-209
14. Wayne A. Kleinman, John P. Richie Jr.
Determination of thiols and disulfides using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection
Journal of Chromatography B, **672** (1995), 73-80
15. Karel Štulík, Jiří Barek
Elektrochemické analytické metody
Praha; Státní pedagogické nakladatelství
16. J. Barek, F. Opekar, K. Štulík
Elektroanalytické metody
Praha 2005; Nakladatelství Karolinum

17. K. Štulík, V. Pacáková
Elektroanalytická měření v proudících kapalinách
Praha 1989; SNTL – nakladatelství technické literatury
18. V. Pacáková, K. Štulík
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Praha 1986, Státní pedagogické nakladatelství
19. Fujishima A., Einaga Y., Rao T. N., Tryk D. A
Diamond Electrochemistry.
Amsterdam 2005; Elsevier
20. Josef Cvačka, Greg M. Swain, Jiří Barek a Jiří Zíma
Stanovení aminoftalenů a amino bifenylů kapalinovou chromatografií s ampérometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě
Chem. Listy **96** (2002) 33-38
21. I. Švancara, K. Vytřas
Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod
Chem. Listy **88** (1994) 136-146
22. K. Vytřas, I. Švancara, K. Barek, J. Zima
Carbon paste electrodes in modern electroanalysis
Crit. Rev. Anal. Chem. **31 (4)** (2001) 311-345