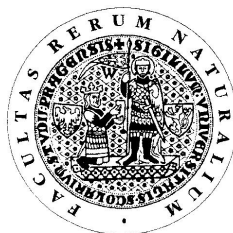


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Kristýna Kupcová

STUDIUM ACIDOBAZICKÝCH VLASTNOSTÍ DERIVÁTŮ
BILIRUBINU METODOU KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ
ELEKTROFORESY

Study of acid-base properties of bilirubin derivatives using
capillary zone electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou 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 17. května 2012

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. za odbornou pomoc a za vytvoření dobrých pracovních podmínek na Katedře analytické chemie. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému, CSc. za syntézu ranarubinu a rodičům i všem přátelům za jejich podporu a pochopení během studia.

Abstrakt v českém jazyce

Předmětem této diplomové práce je stručné shrnutí literárních poznatků o bilirubinu a jeho strukturního derivátu ranarubinu. Experimentální část je věnována prozkoumání některých vlastností těchto dvou látek a jejich vzájemnému srovnání. Sledována byla především rychlost degradace za laboratorních podmínek a určení jejich disociačních konstant, obojí za pomoci kapilární zónové elektroforesy. Získané výsledky poukazují na značné odlišnosti v chování obou látek.

Klíčová slova: bilirubin, ranarubin, kapilární zónová elektroforesa, disociační konstanta

Abstract in English

The concise summary of literary information about bilirubin and its structure derivative ranarubin is the topic of this thesis. The experimental part is dedicated to investigation of some properties of these substances and their comparison. The rate of degradation and acid-base behaviour was monitored under the laboratory conditions using capillary zone electrophoresis. The results point to differences in their behaviour.

Keywords: bilirubin, ranarubin, capillary zone electrophoresis, acidity constant

OBSAH

1. Seznam zkratek a symbolů.....	7
2. Úvod	10
3. Teoretická část.....	11
3.1. Historie.....	11
3.2. Elektromigrační metody.....	12
3.2.1. Zónová elektroforesa	13
3.2.1.1. Elektroforetická migrace	13
3.2.1.2. Elektroosmotický tok.....	16
3.2.1.3. Disperze.....	18
3.2.1.4. Instrumentace.....	20
3.3. Teoretické vztahy k určení disociační konstanty metodou kapilární zónové elektroforesy	23
3.4. Bilirubin	25
3.4.1. Historické mezníky	25
3.4.2. Struktura hemu	25
3.4.3. Biosyntéza hemu.....	26
3.4.4. Metabolity hemu.....	26
3.4.5. Struktura bilirubinu.....	28
3.4.6. Fyzikální vlastnosti bilirubinu	30
3.5. Ranarubin	30
4. Cíle diplomové práce.....	32
5. Experimentální část	33
5.1. Chemikálie	33
5.2. Přístroje	34
5.3. Experimentální podmínky a postupy	35
6. Výsledky a diskuze.....	39

6.1. Monitorování stability UCB.....	39
6.2. Monitorování stability ranarubinu	40
6.3. Určení kalibrační závislosti pro nekonjugovaný bilirubin.....	41
6.4. Stanovení disociační konstanty nekonjugovaného bilirubinu.....	42
6.5. Stanovení disociační konstanty ranarubinu.....	47
7. Závěr	50
8. Seznam citované literatury.....	52

1. Seznam zkratek a symbolů

BACE	Bioafinitní kapilární elektroforesa (Bioaffinity Capillary Electrophoresis)
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
BVR	Biliverdinreduktasa
CE	Kapilární elektroforesa (Capillary Electrophoresis)
CEC	Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (Capillary Electrochromatography)
CGE	Kapilární gelová elektroforesa (Capillary Gel Electrophoresis)
CIEF	Kapilární isoelektrické fokusování (Capillary Isoelectric Focusing)
CITP	Kapilární izotachoforesa (Capillary Isotachophoresis)
CZE	Kapilární zónová elektroforesa (Capillary Zone Electrophoresis)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Elektrochromatografie (Electrochromatography)
HO	Hemoxygenasa
HPCE	Vysokoučinná kapilární elektroforesa (High Performance Capillary Electrophoresis)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar Electrokinetic Chromatography)
THF	Tetrahydrofuran
UCB	Nekonjugovaný bilirubin (Unconjugated Bilirubin)
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast spektra
a	efektivní průměr iontu
a_{A^-}	aktivita aniontu kyseliny
a_{HA}	aktivita neutrální formy kyseliny
$a_{H_3O^+}$	aktivita oxoniových iontů
A^-	anion kyseliny HA
c	analytická koncentrace
c_{A^-}	koncentrace aniontu kyseliny

c_i	koncentrace i-té formy
c_{HA}	koncentrace neutrální formy kyseliny
e	elementární náboj
E	intenzita elektrického pole
ε	permitivita roztoku
F_E	elektrická síla
F_F	viskozitní síla
γ_{A^-}	aktivitní koeficient aniontu kyseliny
γ_{\pm}	střední aktivitní koeficient
HA	neutrální forma kyseliny
I	iontová síla
K_a	termodynamická disociační konstanta
K_a^*	smíšená disociační konstanta
L_c	celková délka kapiláry
L_d	délka kapiláry od vstupního konce k detektoru
α	stupeň disociace
m	elektroforetická mobilita
m_A	aktuální pohyblivost
m_b	efektivní mobilita elektrolytu
m_{EFF}	efektivní elektroforetická pohyblivost
m_i	pohyblivost i-té formy
m_s	efektivní mobilita vzorku
m_0	limitní pohyblivost
m_+	aktuální pohyblivost kationtu
η	viskozitní koeficient
pK_a	záporný dekadický logaritmus termodynamické disociační konstanty
pK_a^*	záporný dekadický logaritmus smíšené disociační konstanty
q	náboj
r	hydrodynamický poloměr
r_s	relativní mobilita
t_{EOF}	migrační čas elektroosmotického toku
t_{mig}	migrační čas analytu
U	napětí

v	rychlost
v_{EOF}	rychlost elektroosmotického toku
z	nábojové číslo
ζ	zeta potenciál
z_i	nábojové číslo i-tého iontu
z_+	nábojové číslo kationtu
z_-	nábojové číslo aniontu

2. Úvod

Bilirubin, hlavní žlučový pigment u člověka, je konečným produktem katabolismu červeného krevního barviva hemu. Jeho produkce, metabolismus i vylučování jsou organismem udržovány v rovnováze. Při narušení této rovnováhy dochází k akumulaci bilirubinu v séru; mluvíme pak o hyperbilirubinemii, která se projevuje žloutenkou.

Ačkoli je bilirubin obvykle vnímán jako potenciálně toxická látka, data z poslední doby naznačují, že díky svým silným antioxidačním vlastnostem může mít i protektivní význam.

Bilirubin se vyskytuje v organismu ve třech iontových formách. Poměr koncentrací těchto iontových forem je pochopitelně závislý na pH okolního prostředí. Každá z iontových forem se liší svými vlastnostmi i funkcemi které vykonává, a proto je dobré vědět, jak lze upravit jejich poměr. Správné určení pK_a vodného roztoku nekonjugovaného bilirubinu má tudíž velký význam pro pochopení jeho chování. Přestože je molekula bilirubinu známá od poloviny 19. století, její disociační konstanty dosud nebyly spolehlivě určeny.

K určení disociační konstanty bilirubinu by mohl dopomoci ranarubin neboli bilirubin-C10-sulfonová kyselina. Díky odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem (především pak pro svou vyšší polaritu a vyšší rozpustnost ve vodě) a velmi podobné struktuře je vhodnějším modelem k určení disociačních konstant karboxylových skupin a dalších fyzikálně chemických charakteristik bilirubinu.

3. Teoretická část

3.1. Historie

Historii elektromigračních metod lze vysledovat až k roku 1807, kdy Reuss poprvé na konferenci v Moskvě představil jev nazvaný elektroosmosa [1]. Teoretické vysvětlení tohoto fenoménu bylo navrženo až roku 1897 Kohlrauschem [2]. Koncem 18. století se ve snaze o separaci nejrůznějších toxinů prováděly pokusy v U-trubicích. Tyto pokusy byly odrazovým můstkem k elektroforese, o jejíž značný rozvoj se zasloužil Tiselius; po mnohaletém zdokonalování ji představil v roce 1937 [3, 4]. Na základě rozdílných elektroforetických mobilit se mu podařilo účinně rozdělit proteiny složité bílkovinné směsi, za což získal v roce 1948 Nobelovu cenu za chemii. Píky však měly nízké rozlišení (díky Jouleovu teplu a molekulární difusi), proto byly následně k prevenci těchto jevů používány škrobový či polyakrylamidový gel a acetát celulosy. Tato opatření minimalizovala problém konvekce, ale docházelo díky nim k jiným nežádoucím jevům, jako jsou např. vznik difusních vírů či interakcí mezi analyty a stabilizátorem. Později Hjertén a Tiselius vyvíjeli elektroforesu v polyakrylamidovém gelu v rotující kapiláře o vnitřním průměru 3 mm; tuto techniku používali k separaci ribozomů a virů [5, 6]. Hjertén myšlenky shrnul v práci z roku 1967, z níž je zřejmé, že stabilizace separovaných zón bylo dosaženo nepřetržitou rotací kapiláry v její podélné ose [7]. Na základě Giddingsovy predikce [8] používají Everaerts a Hoving-Keulemans teflonovou kapiláru o vnitřním průměru 0,5 mm [9] a Virtanen skleněnou kapiláru o vnitřním průměru 0,2-0,5 mm [10], čímž potvrzují, že zmenšení průměru kolony působí proti konvekčnímu proudění, tedy že mezi vnitřním průměrem kolony a účinností je nepřímá úměrnost. V roce 1981 použili Jorgenson a Lukacsová k separaci derivátů aminokyselin skleněné kapiláry o vnitřním průměru 75 μm , délce 1 m a napětí 30 kV [11]. Vysoká účinnost separace odpovídala Giddingsově teoretické predikci.

Spolu s rozvojem kapilárních separačních prostorů byly popsány další odvozené elektromigrační separační metody. V roce 1970 je publikován článek Everaertse a Hoving-Keulemana o použití izotachoforesy (CITP) [13]. V roce 1983 vychází článek Hjerténa o použití kapilární gelové elektroforesy (CGE) k separaci aromátů [14]. Za zakladatele micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) je považován Terabe; s její pomocí dokázal roku 1984 oddělit deriváty fenolu [12]. V roce 1985 Hjertén představuje kapilární

isoelektrické fokusování (CIEF) [15] a v roce 1987 pokládají základy elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CEC) Knox a Grant [16].

Z České republiky pochází řada chemiků, podílejících se na zdokonalování elektromigračních metod, a to zejména v oblasti detekce. Z nejvýznamějších prací jmenuji studii Gaše, Vacíka a Demjanenka, zakladatele bezkontaktní vodivostní detekce v izotachoforese [18] (touto prací se inspirovali Silva a Laga, autoři bezkontaktní vodivostní detekce pro CZE [17]); Boček a kol., zabývající se nepřímou fotometrickou detekcí [19] a chirálními separacemi v CZE [20]; Opekar a kol., autoři bezkontaktní vodivostní detekce pro CZE na bázi mikročipu [21]; Jelínek, Snopek a Smolková-Keulemansová, autoři první chirální separace v izotachoforese [22] a Prusík, Kašička a kol., zabývající se vysokoúčinnou separací peptidů v CZE a izotachoforese [23].

3.2. Elektromigrační metody

Elektromigrační metody patří mezi metody separační. U všech elektromigračních metod dochází k separaci nabitých komponent vzorku vlivem stejnosměrného elektrického pole.

Do skupiny elektromigračních metod řadíme metody prováděné v plošném a v kapilárním formátu. Elektromigrační separační metody, u kterých vlastní separace probíhá v kapiláře, bývají často označovány jako vysokoúčinná kapilární elektroforesa (HPCE).

Separace probíhají obvykle v křemenných kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů, dovolujících použít vysoká napětí. Účinnost těchto metod dosahuje stovek tisíc až milionů teoretických pater a citlivosti na úrovni femtomol – zeptomol (10^{-15} až 10^{-21} mol) analytu v nano až pikolitrových objemech, díky čemuž patří kapilární elektromigrační metody mezi nejúčinnější, nejcitlivější a nejperspektivnější analytické separační metody moderní analytické laboratoře [38].

Mezi zástupce kapilárních elektromigračních separačních metod patří sedm základních technik, které se liší mechanismem separace:

kapilární zónová elektroforesa (CZE),

kapilární gelová elektroforesa (CGE),

kapilární izotachoforesa (CITP),

kapilární isoelektrická fokusace (CIEF),

micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC),

elektrochromatografie (EC, CEC),

bioafinitní kapilární elektroforesa (BACE).

Některé z metod lze využít pouze pro separace iontů (CZE, CGE, CIEF, CITP), ostatní jsou vhodné jak pro ionty, tak i pro neutrální molekuly (MEKC, CEC). Všechny metody mají široké uplatnění v chemických, farmaceutických i biologických analýzách [31, 32] a používají se i ke stanovení fyzikálně-chemických konstant, jako jsou např. disociační konstanta, konstanta stability či limitní pohyblivost [28, 29, 30].

3.2.1. Zónová elektroforesa

Zónová elektroforesa je nejjednodušší elektromigrační metoda, použitelná pro separace a stanovení organických i anorganických látek. K separaci složek vzorku dochází díky rozdílné rychlosti pohybu částic v elektrickém poli; lze tedy analyzovat pouze látky nabitě, tedy ty, které v roztoku podléhají disociaci.

Vzorek je nadávkován do separačního prostředí, do tzv. nosného elektrolytu, a to jako úzká ohraničená zóna, která složení nosného elektrolytu prakticky neovlivní. Nosným elektrolytem je obvykle pufr, protože správné pH separačního prostředí je často pro analýzu stěžejní. Zóna vzorku se pohybuje vlivem elektrického pole, přičemž se jednotlivé komponenty vzorku s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí oddělují a soustřeďují se do samostatných zón. Detektor, zpravidla umístěný u konce separačního prostoru, zaznamenává výsledek separace ve formě časového průběhu odezvy detektoru, tzv. elektroferogramu.

Zónovou elektroforesu lze provádět ve dvou uspořádáních – v provedení plošném či kapilárním.

Kapilární zónová elektroforesa využívá dvou základních transportních jevů – elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou. Následující text je věnován kapilárnímu uspořádání zónové elektroforesy.

3.2.1.1. Elektroforetická migrace

Principem každé elektroforetické separace je pohyb (neboli migrace) nabitých částic v kapalném médiu, vystavenému působení elektrického pole. Částice o hydrodynamickém poloměru r (tedy poloměru iontu včetně první solvatační vrstvy) a náboji q je unášena gradientem elektrického pole o intenzitě E směrem k elektrodě s nábojem opačného znaménka a to rychlostí v ; intenzita pole v kapiláře je dána podílem napětí U připojeného ke koncům kapiláry a její celkové délky L_c , tedy

$$E = \frac{U}{L_c} \quad (1)$$

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita) m , která je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě

$$m = \frac{v}{E} \quad (2)$$

Elektroforetická mobilita je pro jednotlivé ionty charakteristická. Hodnoty elektroforetických pohyblivostí, charakteristické pro jednotlivé ionty (v nekonečně zředěných roztocích a za standardní teploty), lze nalézt ve fyzikálně-chemických tabulkách [26] či odborných člancích [27].

Protože se částice pohybuje v kapalině o viskozitním koeficientu η , je brzděna třecí silou F_F , jejíž velikost je dána Stokesovým zákonem

$$F_F = -6\pi\eta r v \quad (3)$$

Rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou sil; frikční síly F_F a hnací síly F_E , která je rovna součinu

$$F_E = qE \quad (4)$$

přičemž velikost náboje q je dána součinem nábojového čísla iontu z a elementárního náboje e , tedy

$$q = z e \quad (5)$$

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil v ustáleném stavu, tedy

$$F_E = -F_F \quad (6)$$

lze pro elektroforetickou pohyblivost odvodit

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

Ze vztahu je zřejmé, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku. Mobilita iontu, jak dále z rovnice vyplývá, má vždy kladnou hodnotu. Obvykle se však zavádí konvence, podle které má pohyblivost kationtů kladnou hodnotu a pohyblivost aniontů hodnotu zápornou.

Ionty v roztoku nejsou nikdy volné, ale solvované. Velikost a tvar solvatačního obalu závisí na složení systému a experimentálních podmínkách. Částice, lišící se rozměrem a velikostí náboje, se v elektrickém poli pohybují rozdílnou rychlostí, a tudíž je lze od sebe separovat. Pohyblivost iontů regulujeme právě pomocí změny jejich náboje či poloměru; náboj iontů

slabých elektrolytů měníme změnou pH, u silných elektrolytů pak koordinačními reakcemi s vhodnými ligandy. Interakcí iontu s ligandem pak měníme pochopitelně i velikost iontů jak slabých tak silných elektrolytů.

V praxi elektroforetické separace neprobíhají v nekonečně zředěných roztocích, ale v roztocích o konečných koncentracích. V tomto případě není iontová pohyblivost konstantní, ale závisí na koncentraci elektrolytového systému. Rychlost migrace iontů je v takovémto systému menší než v podmínkách nekonečného zředění.

Podstatný vliv na separaci mají (kromě vlastností dělených látek) i vlastnosti prostředí, jak elektrolytu, tak nosiče. Mezi ně patří koncentrace elektrolytu, pH, iontová síla, viskozita, dielektrická konstanta, homogenita pole atd [24].

Elektroforetická pohyblivost iontů v elektrolytu vztažená k dané iontové síle a teplotě se nazývá aktuální pohyblivost, m_A . V případě, že ionty přítomné v roztoku nejsou plně disociované, ovlivňuje jejich disociace α pohyblivost iontu a mluvíme o efektivní pohyblivosti, m_{EFF} ; ta je tedy vztažená k danému pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí. Pokud jsou roztoky iontů nekonečně zředěné, je jejich pohyblivost nazývána limitní ~ absolutní pohyblivostí m_0 ; ta je pro dané ionty (při teplotě 25° C) tabelována.

Závislost aktuální pohyblivosti iontu binárního elektrolytu na iontové síle vyjadřuje rozšířený Onsagerův limitní zákon [33], který má pro aktuální pohyblivost kationtu m_+ a nábojové číslo z_+ tvar

$$m_+ = m_{0,+} - (m_{0,+} z_+ B_1 \frac{k}{1 + \sqrt{k}} + B_2 z_+) (\frac{\sqrt{I}}{1 + Ba \sqrt{I}}), \quad (8)$$

kde B , B_1 a B_2 jsou konstanty a a značí efektivní průměr iontu. Součin Ba je často aproximován hodnotou $1,5 \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{-3/2}$ (viz dále). Koeficientu k odpovídá vztah

$$k = \frac{z_+ z_- m_{0,+} + m_{0,-}}{z_+ z_- m_{0,+} + z_+ m_{0,-}}, \quad (9)$$

pro symetrické ionty je roven hodnotě 0,5. Pro látky, vyskytující se v roztoku ve více formách, mezi kterými se rychle ustavuje rovnováha, platí vztah

$$m_{EFF} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i m_i}{c}, \quad (10)$$

kde m_i je aktuální pohyblivost i -té formy látky a c analytická koncentrace.

Nejúčinnější separace dvou látek (slabých kyselin a zásad) je při pH rovném průměru jejich disociačních konstant, tento způsob se nazývá „separace podle hodnot pK “. Pokud je limitní

pohyblivost separovaných kyselin dostatečně odlišná, lze je separovat za takového pH, kdy jsou plně disociovány. Tento způsob se nazývá „separace podle pohyblivosti“.

Elektroforesa se využívá především k separaci organických látek. Situace je u slabých kyselin a bází komplikovanější; vlivem pH pufru nastává dynamická rovnováha mezi ionizovanou a neionizovanou formou. Látka se při elektroforese nerozdělí na dvě složky, nýbrž putuje jako celek, takže přítomnost neionizované formy má za následek zpomalování (pro kation) či zrychlování (pro anion) pohybu [24].

U amfolytů je vliv pH na dělení těchto látek velmi významný. Při vysokém pH je podpořena disociace a navenek se projevují kyselé vlastnosti karboxylových skupin, vytvářejí se anionty $R-COO^-$. Při nízkém pH je naopak disociace kyselých skupin potlačena a projevují se pouze skupiny bazické. Náboj molekuly je potom kladný, $R-NH_3^+$. Mezi těmito dvěma extrémními stavy existuje takové pH, při němž je ionizován stejný počet kyselých i bazických skupin, takže celkový náboj molekuly je roven nule. Toto pH nazýváme isoelektrický bod a je pro každý amfolyt charakteristickou veličinou. Hodnota isoelektrického bodu je ještě ovlivňována iontovou silou pufru, ve kterém se měření provádí [24].

3.2.1.2. Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok neboli elektroosmosa je měřitelný tok roztoku nosného elektrolytu kapilárou vlivem stejnosměrného elektrického pole na difusní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní mobilní a stacionární fáze u vnitřní stěny kapiláry. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, z hlediska separace se tedy jedná o neselektivní sílu. Významně však ovlivňuje migrační rychlosti přítomných analytů, tím i účinnost separace a dobu analýzy.

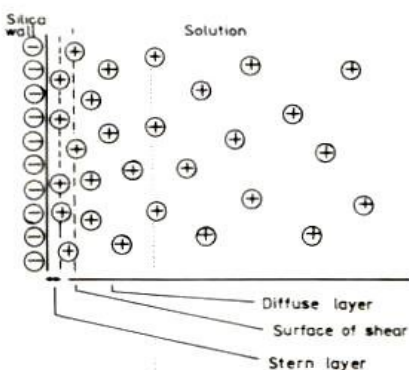
Rychlost elektroosmotického toku je dána rovnicí

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta E}{\eta}, \quad (11)$$

kde ϵ je permitivita roztoku nosného elektrolytu, ζ je potenciál vnitřního povrchu kapiláry.

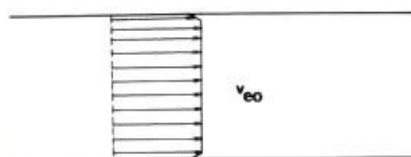
Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem disociace ionogenních skupin na vnitřní stěně kapiláry nebo selektivní adsorpce jednoho druhu iontů. U nejčastěji používaných křemenných kapilár dochází nejprve k hydrolyze siloxanových skupin ($\equiv Si-O-Si \equiv$) za vzniku silanolových skupin ($\equiv Si-OH$) a jejich následné disociaci ($pK_a = 5,5$ [24]). Tím vzniká negativní náboj vnitřního povrchu kapiláry ($\equiv Si-O^-$). Na vnitřním povrchu kapiláry se nachází zhruba pět silanolových skupin na 1 nm^2 [39]; na ně se naváže vrstva kladně nabitých iontů. Vrstva

kationtů tvoří nepohyblivou část elektrické dvojvrstvy, tzv. Sternovu vrstvu. K ní přiléhá difusní vrstva, která již pohyblivá je a její šířka závisí na iontové síle roztoku. Na rozhraní těchto dvou vrstev vzniká elektrokinetický (zeta) potenciál, jehož velikost je úměrná povrchové hustotě náboje na stěně kapiláry. Schéma vnitřního povrchu kapiláry je naznačeno na obr. 1.



Obr. 1 Schéma povrchu křemenné kapiláry s disociovanými silanolovými skupinami, vytvářejícími negativní náboj na vnitřní stěně kapiláry; k ní přiléhající nepohyblivá Sternova vrstva a blíže středu kapiláry pak pohyblivá difusní vrstva (převzato z [25]).

Po vložení elektrického napětí dochází k pohybu hydratovaných vodíkových iontů směrem ke katodě, přičemž s sebou unáší veškerý roztok v kapiláře. Vzniká tak elektroosmotický tok. Nespornou výhodou elektroosmotického toku ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry (zobrazen na obr. 2), díky čemuž je příspěvek elektroosmosy k celkové disperzi separovaných zón minimální.



Obr. 2 Schéma rychlostního profilu elektroosmotického toku kapilárou (převzato z [25]).

Účinkem elektroosmotického toku dochází k migraci všech iontů (bez ohledu na náboj) ve stejném směru. Při negativním náboji na vnitřní stěně kapiláry se všechny ionty pohybují směrem ke katodě. Toto platí i pro anionty, neboť elektroosmotický tok podstatně převyšuje elektroforetickou mobilitu. Nejrychleji migrují kationty, účinek elektroosmosy i

elektroforetické migrace se počítá. Neutrální molekuly se pohybují pouze vlivem elektroosmotického toku, nemohou tedy být separovány navzájem. U aniontů je pohyb zpomalován vlivem elektroforetické migrace, k detektoru se dostanou jako poslední.

Čas potřebný k transportu iontu od startovního ústí kapiláry po detektor se nazývá migrační. Je dán efektivní délkou kapiláry a rychlostí pohybu iontů. Rychlost pohybu závisí na použitém elektrolytu, vloženém napětí, elektroforetické pohyblivosti jednotlivých iontů, jejich tvaru a velikosti, koncentraci elektrolytu, resp. iontové síle, přídavku organického rozpouštědla a na pH elektrolytu.

Rychlost elektroosmotického toku lze regulovat a tím dosáhnout lepšího rozlišení separovaných látek či zkrácení času separace. Se zvyšujícím se pH roztoku roste i negativní náboj u stěny kapiláry a elektroosmosa se zrychluje. Vliv na rychlost elektroosmosy má i koncentrace nosného elektrolytu. S rostoucí koncentrací pufru dochází ke snížení potenciálu dvojvrstvy a tím ke snížení rychlosti elektroosmotického toku. Dalším způsobem, jak modulovat rychlost elektroosmosy, je změna intenzity elektrického pole, aplikace externího pole [34] či přídavek surfaktantů do pufru, které jsou následně buď permanentně nebo dynamicky navázány na vnitřní stěnu kapiláry [35].

3.2.1.3. Disperze

Elektroforetické separace jsou vždy doprovázeny jevy, které vyplývají z principu metody jako takové, či souvisí s použitou instrumentací. U kapilární elektroforesy patří mezi nejdůležitější produkce Jouleova tepla, podélná molekulární difuze, adsorpce na stěnu kapiláry a elektromigrační disperze. Hromadně jsou tyto jevy nazývány disperzními a jejich potlačení je v praxi velmi důležité. Způsobují totiž rozšiřování a deformaci píků, která vyplývá z rozdílů v rychlostech jednotlivých molekul analytu během analýzy.

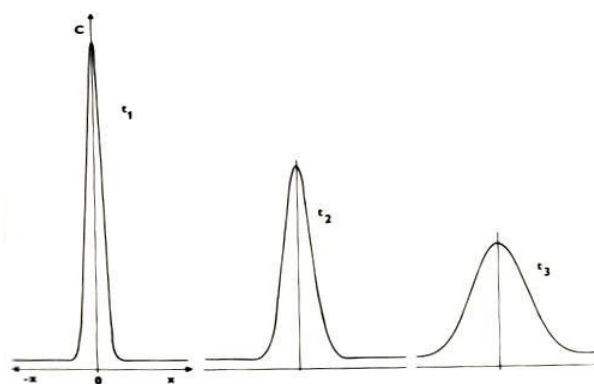
Jouleovo teplo

Jouleovo teplo je teplo vznikající ve vodiči průchodem elektrického proudu. Teplota elektrolytu uvnitř kapiláry není stejná, ale směrem k jejímu středu je vyšší než u stěn; vzniká gradient. Teplotní profil uvnitř kapiláry je parabolický, což má za důsledek nesymetrické rozmytí zóny vzorku. Přehřívání elektrolytu může mít navíc za následek destrukci termolabilních složek vzorku (např. denaturaci), tvorbu bublin a následný kolaps analýzy. Nárůst teploty elektrolytu v kapiláře oproti laboratorní teplotě závisí na vloženém napětí,

vodivosti pufru a rozměrech kapiláry; úpravou těchto veličin se dá generování Jouleova tepla omezit.

Difuse

Podélná molekulární difuze je způsobena koncentračním gradientem analytu v kapiláře s elektrolytem a projevuje se symetrickým rozmytím zón. Nadávkovaná zóna vzorku má zpočátku tvar ostrého schodu a s přibývajícím časem se stále více rozšiřuje podle Gaussova (normálního) rozdělení. Rozmytí píku v závislosti na čase je vidět na obr. 3. Difuze je nedílnou součástí kapilární elektroforesy a nelze ji odstranit; každý pokus o její snížení (např. zvýšením viskozity elektrolytu) má za následek pokles mobility.



Obr. 3 Deformace píku difusí v čase; $t_1 < t_2 < t_3$ (převzato z [25]).

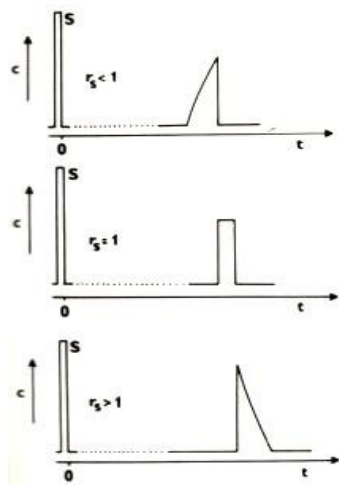
Elektromigrační disperse

Zóna vzorku ovlivněná elektromigrační disperzí má charakteristický tvar pravoúhlého trojúhelníka. Vzniká tehdy, když je analyt natolik koncentrován, že podstatně ovlivní vodivost vzorku a pH elektrolytu. Tento typ disperze vyplývá ze vztahu

$$r_s = \frac{m_s}{m_b}, \quad (12)$$

kde r_s je relativní mobilita, m_s efektivní mobilita vzorku a m_b efektivní mobilita elektrolytu. Pokud je poměr mobilit nižší než 1 (tedy $r_s < 1$), vodivost vzorku je nižší než vodivost základního elektrolytu a pík je frontující. Pokud jsou koncentrace základního elektrolytu a vzorku srovnatelné (tedy $r_s = 1$), elektromigrační disperze nepřispívá k rozmytí vzorku. Pokud je relativní mobilita vyšší než 1 ($r_s > 1$), vodivost zóny vzorku je vyšší než vodivost

základního elektrolytu. Pík je chvostující. Tvary píků v závislosti na jejich relativní mobilitě jsou zobrazeny na obr. 4.



Obr. 4 Typické profily zóny vzorku vzniklé elektromigrací. S značí zónu vzorku v čase 0, r_s relativní mobilitu, c je koncentrace vzorku a t migrační čas (převzato z [25]).

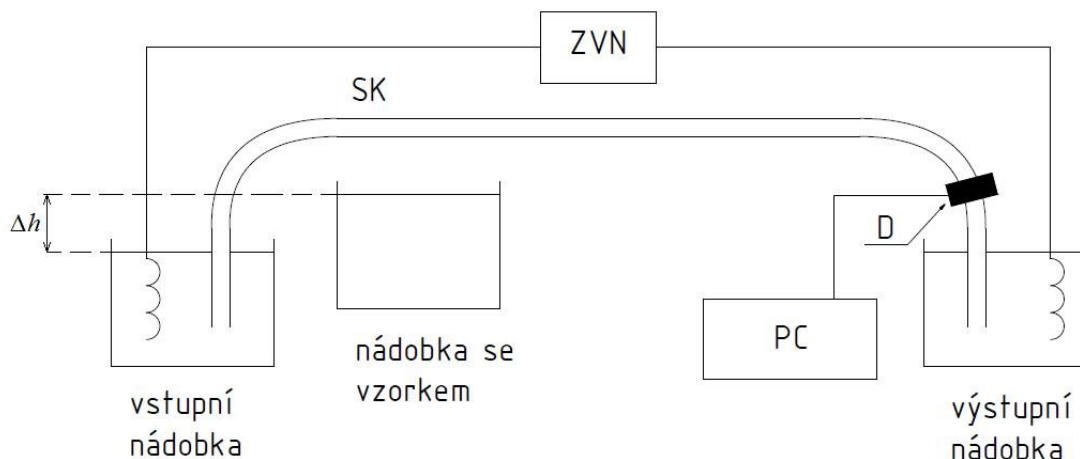
Adsorpce na stěnu kapiláry

Interakce vzorku s vnitřní stěnou kapiláry obvykle není u CZE žádoucí, protože snižuje účinnost separace. Neupravená kapilára s elektrolytem má ionizované skupiny, které z roztoku přitahují ionty opačných nábojů. Částečné navázání vzorku na kapiláru má za následek tvorbu chvostujících píků, úplná adsorpce analytu na vnitřní stěnu kapiláry pak jeho ztrátu. Proto se tento typ disperze obvykle snažíme potlačit.

Někdy se však adsorpce na stěnu naopak využívá u selektivních separací, např. u elektrochromatografie [36].

3.2.1.4. Instrumentace

Výhodou kapilární zónové elektroforesy je jednoduchá instrumentace, CZE je dostupná pro většinu analytických laboratoří. Základními částmi CZE jsou separační kapilára, zdroj vysokého napětí, detektor a počítač s vyhodnocovacím programem. Zjednodušené vyobrazení instrumentálního uspořádání pro provádění CZE je uvedeno na obr. 5. Pro rutinní analýzy je zapotřebí více sofistikovaný, nejlépe automatizovaný přístroj.



Obr. 5 Schéma přístroje pro CZE. ZVN – zdroj vysokého napětí, D – detektor, SK – separační kapilára, PC – počítačová jednotka a Δh rozdíl hladin při gravitačním dávkování (upraveno podle [25]).

Separací kapilára

Separace probíhá v kapiláře, obvykle křemenné (dále např. skleněné či teflonové), pro větší mechanickou odolnost pokryté vrstvou polyimidu. Čím užší a delší kapilára je, tím větší separační účinnosti bývá dosaženo. Běžný vnitřní průměr kapiláry je v rozmezí 50 – 100 μm ; takovéto rozměry snižují difuzi komponent vzorku a usnadňují odvádění tepla, vzniklého průchodem elektrického proudu. Délka kapiláry je nejčastěji v rozmezí 30 – 100 cm, výsledná účinnost je v rozmezí tisíců až milionů teoretických pater. Část kapiláry obvykle funguje jako měrná cela detektoru.

Zdroj vysokého napětí

K maximálnímu využití potenciálu CE je nezbytné vložení napětí z vysokonapěťového stejnosměrného zdroje, řádově v desítkách kilovoltů. Zdroje umožňují měnit polaritu elektrod.

Detektor

Detektorů použitelných v CZE je celá řada. Mezi nejrozšířenější patří absorpční fotometrický detektor, používaný v UV/VIS oblasti (je součástí více než padesáti procent veškerých separací v CZE [25]), dále fluorescenční a vodivostní. Detekční okénko pro UV/VIS spektrofotometrii se vytvoří částečným odstraněním ochranné umělé hmoty na vnější stěně kapiláry (obvykle polyimidu), detekce tedy probíhá přímo uvnitř kapiláry (tzv. online

detekční systém), zpravidla v blízkosti výstupního konce. Vlnovou délku lze nastavit, u detektoru s diodovým polem lze proměřit celé spektrum vzorku. Detekovat lze vzorek v dostatečné koncentraci (tzv. přímá detekce) či, pokud je odezva analytu nedostatečná, využívá se absorpce základního elektrolytu (tzv. nepřímá detekce).

Dávkování

Pro zajištění reprodukovatelnosti stanovení je třeba dávkovat definované malé objemy vzorku. Existují tři základní způsoby dávkování, přičemž žádný z nich není zcela ideální.

Gravitační způsob dávkování

je nejjednodušší a nejméně přesný. Nádoba s pufrem, do které je ponořena separační kapilára, je zaměněna za nádobu se vzorkem. Ta je zvednuta do definované výšky oproti nádobě se separačním pufrem se zanořeným druhým koncem kapiláry. Rozdíl hladin způsobí přetlak a tím i nasátí vzorku do ústí kapiláry. Nadávkovaný objem je přímo úměrný přetlaku.

Dávkování řízené tlakem

je nejčastější způsob dávkování u komerčních přístrojů. Do uzavřené nádoby se separačním pufrem, do které je ponořena kapilára, je přiveden přetlak vzduchu či inertního plynu. Objem nadávkovaného vzorku je dán velikostí přetlaku a dobou dávkování.

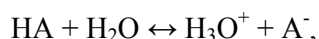
Elektrokinetické dávkování

U elektrokinetického dávkování je kapilára ponořena do nádoby se vzorkem, následně je na dvojici elektroforetických elektrod přivedeno vysoké napětí. Množství nadávkovaného vzorku je úměrné velikosti napětí, době dávkování a elektroforetické pohyblivosti. Nadávkované množství jednotlivých komponent vzorku neodpovídá jejich zastoupení v původní matici, diskriminuje méně pohyblivé ionty.

3.3. Teoretické vztahy k určení disociační konstanty metodou kapilární zónové elektroforesy

Stanovení disociační konstanty metodou CZE patří mezi běžně používané analytické metody. Je založeno na vztahu mezi efektivní mobilitou analytu a pH elektrolytů [37]. Principiálně jde o řešení dvou rovnic se dvěma neznámými; jednou neznámou je disociační konstanta, druhou limitní pohyblivost. Za předpokladu srovnatelné iontové síly elektrolytů jsou obě veličiny konstantami. Technicky se jedná o proměření závislosti efektivní mobility studovaného analytu na pH elektrolytů a následném proložení experimentálních hodnot regresní funkcí. Optimální regresní funkcí je teoreticky odvozený vztah mezi pH, disociační konstantou, limitní pohyblivostí a efektivní pohyblivostí. Grafickým zobrazením této závislosti je sigmoida. Následující odvození platí pro slabou jednosytnou kyselinu.

Pro slabou kyselinu ve vodném roztoku popisuje rovnováhu rovnice



kde HA symbolizuje nedisociovanou formu jednosytné kyseliny a A^- její anion. Této stechiometrické rovnici odpovídá termodynamická disociační konstanta K_a

$$K_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}}, \quad (13)$$

kde a značí aktivitu dané formy. Protože ke stanovení disociační konstanty používáme změřené hodnoty pH a efektivní mobilitu, úměrnou analytické koncentraci obou forem kyseliny, zavádíme smíšenou disociační konstantu K_a^*

$$K_a^* = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} c_{\text{A}^-}}{c_{\text{HA}}}, \quad (14)$$

přičemž termodynamická a smíšená konstanta jsou ve vztahu

$$K_a = K_a^* \gamma_{\text{A}^-}, \quad (15)$$

kde γ_{A^-} představuje aktivitní koeficient univalentního aniontu kyseliny. Vztah je platný za předpokladu jednotkového aktivitního koeficientu nedisociované formy kyseliny. Pro výpočet aktivitního koeficientu lze využít McInnesovy aproximace

$$-\log \gamma_{\pm} = \frac{A|z_+ z_-| \sqrt{I}}{1 + 1,5 \sqrt{I}}, \quad (16)$$

kde A je konstanta, mající pro vodné roztoky a teplotu 25°C hodnotu $0,509 (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$ a I iontová síla roztoku. Použitelnost tohoto vztahu je přibližně do iontových sil $10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$. Iontová síla roztoku I je definována vztahem

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2, \quad (17)$$

kde c_i je molární koncentrace i -tého druhu iontů a z_i nábojové číslo i -tého druhu iontů. Pro efektivní mobilitu platí

$$m_{\text{EFF}} = m_{\text{A}^-} \frac{c_{\text{A}^-}}{c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-}}, \quad (18)$$

kde m_{A^-} je mobilita anionu kyseliny. Kombinací předchozích rovnic získáme vztah

$$K_a^* = 10^{-\text{pH}} \frac{m_{\text{EFF}}}{m_{\text{A}^-} - m_{\text{EFF}}} \quad (19)$$

a z něj po další úpravě

$$m_{\text{EFF}} = \frac{m_{\text{A}^-}}{1 + 10^{\text{p}K_a^* - \text{pH}}}. \quad (20)$$

Za předpokladu konstantní iontové síly jsou μ_{A^-} a $\text{p}K_a^*$ konstanty. Korekcí smíšené disociační konstanty a pohyblivosti aniontu na nulovou iontovou sílu elektrolytu získáme limitní pohyblivost aniontu a pravou termodynamickou disociační konstantu. Tento přepočtení nebyl v experimentální části proveden, protože při iontových silách nosných elektrolytů, běžných v CZE, se $\text{p}K_a$ a $\text{p}K_a^*$ od sebe liší o $\pm 0,01$ jednotek pH (zjištěno podle [92]), což je na hranici přesnosti použité analytické metody. Nadto, v kontextu s výsledky experimentálních prací k určení $\text{p}K_a$ UCB (shrnutý v tabulce 4), poskytuje i smíšená disociační konstanta dostatečně přesný výsledek.

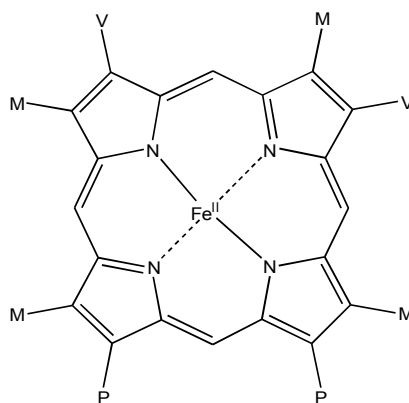
3.4. Bilirubin

3.4.1. Historické mezníky

První zmínky o bilirubinu lze vysledovat až k polovině předminulého století. Název bilirubin použil Städeler v roce 1864 [40]; slovo bilirubin je odvozeno z latinských slov bilis (žluč) a ruber (červený). Strukturu určil Fischer v roce 1933 a v následujících letech jej poprvé syntetizoval [41]. Konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou si všiml Talafant v roce 1956 [42]; enzymy hemoxygenasu a biliverdinreduktasu popsal Tenhunen v letech 1968, resp. 1970. O šest let později byla na základě rentgenové krystalografie odhalena konformace nekonjugovaného bilirubinu se šesti intramolekulárními můstky [43]. Dodnes se díky neustále se zdokonalujícím metodám dovídáme detailnější informace o bilirubinu a jeho vlastnostech. Největší úsilí je vynakládáno na prozkoumání fyzikálně-chemických vlastností bilirubinu, konkrétně na určení jeho disociačních konstant. Jejich znalost objasní chování bilirubinu v organismu za různých podmínek (různá pH, solubilizační podmínky...).

3.4.2. Struktura hemu

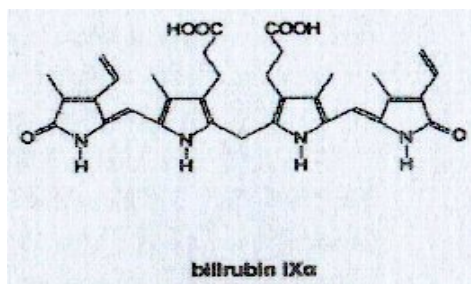
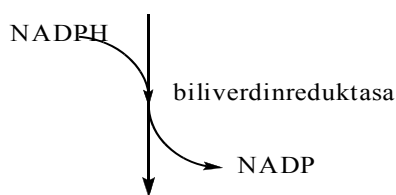
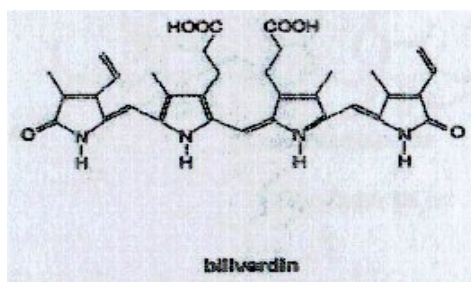
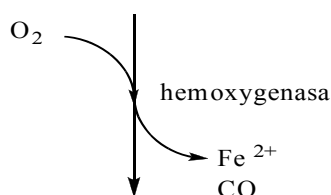
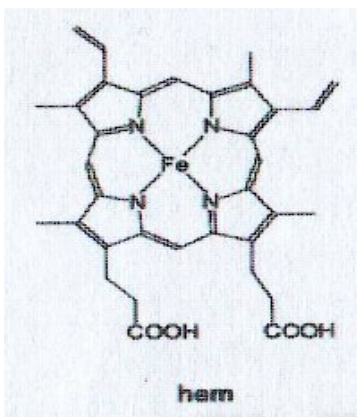
Hem (Fe-protoporfyryl IX) je nebiřkovinná složka krevního barviva hemoglobinu (jehož je bilirubin hlavním rozpadovým produktem), která má schopnost reverzibilně vázat kyslík. Hemoglobin je složen ze čtyř hemových skupin a globinu, bílkovinné části molekuly. Každý hem je tvořen čtyřmi pyrolovými jádry, spojenými methenylovými můstky ($-\text{CH}=\text{}$) a centrálně navázaným kovem (Fe^{2+}). Pyrolová jádra jsou substituována postranními řetězci, v případě nejrozšířenějšího z nich (hem b) jsou substituenty methyl, propionát a vinyl. Rozmístění substituentů molekuly hemu b je zřejmé z obr. 6.



Obr. 6 Strukturální vzorec hemu b. Zkratky: M = $-\text{CH}_3$, P = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, V = $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

3.4.3. Biosyntéza hemu

Výchozími látkami pro syntézu hemu jsou glycin a sukcinyl-CoA, k započetí syntézy je potřeba pyridoxalfosfát. Enzymem, který určuje rychlost syntézy hemu, je ALA-synthasa. Biosyntéza hemu probíhá v mitochondriích a cytosolu, nejvíce hemu vzniká v kostní dřeni a játrech, převážně během vzniku a vývoje červených krvinek [44].



Obr. 7 Odbourávání hemu (upraveno podle [41]).

3.4.4. Metabolity hemu

Fyziologicky dochází k rozpadu hemu ve slezině, odkud se nekonjugovaný bilirubin (UCB) dostává portálním řečištěm k játrům. Kromě UCB při katabolismu hemu vzniká řada odpadních produktů a právě játra je dokáží odstranit. 75-80 % produkce bilirubinu pochází z hemoglobinu z červených krvinek, zbývajících 20-25 % pak z ostatních hemoproteinů, jako jsou např. cytochrom a myoglobin. Denní produkce bilirubinu u dospělého člověka je přibližně $4,4 \pm 0,7$ mg na kg tělesné hmotnosti [45].

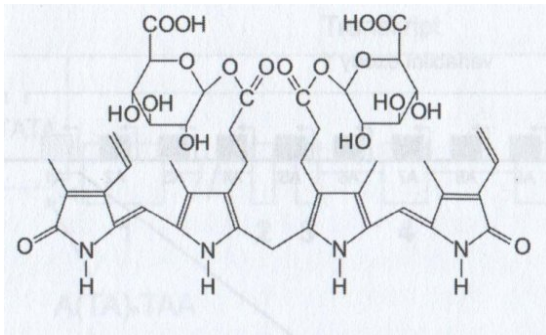
Katabolismus hemoglobinu probíhá podle následujícího schématu: Železo a globin se reutilizují, hemová část je degradována v játrech, slezině a kostní dřeni. Enzym hemoxygenasa (HO) katalyzuje štěpení α -methenylového můstku za vzniku biliverdinu (BV) a uvolnění oxidu uhelnatého. Oxid uhelnatý pochází z oxidace α uhlíku [46], toto místo je ze sterických důvodů nejlépe přístupné HO. Nahodile dochází ke štěpení i na jiném methenylovém uhlíku (viz dále). Poté dochází působením enzymu biliverdinreduktasy (BVR) k redukcí methenylového můstku a tím ke vzniku bilirubinu [44]. Schéma metabolismu hemu je

zobrazeno na obr. 7. Reakce BVR je velmi rychlá, navíc se BVR v lidském těle vyskytuje v blízkosti HO, což vysvětluje, proč v plazmě BV nedetekujeme [41]. Konverze biliverdinu na bilirubin (BR) je energeticky náročný proces, zatížený rizikem metabolických chyb. Pro tento evoluční krok existují vysvětlení: Polární molekula biliverdinu neprostupuje placentou, u plodu by tedy docházelo k hromadění bilirubinu v těle a tím k potencionálnímu poškození organismu. Nepolární bilirubin naproti tomu prostupuje placentou prostou difusí i za pomoci aktivního transportu [47]. Další funkcí bilirubinu je jeho účast na eliminaci volných kyslíkových radikálů [48].

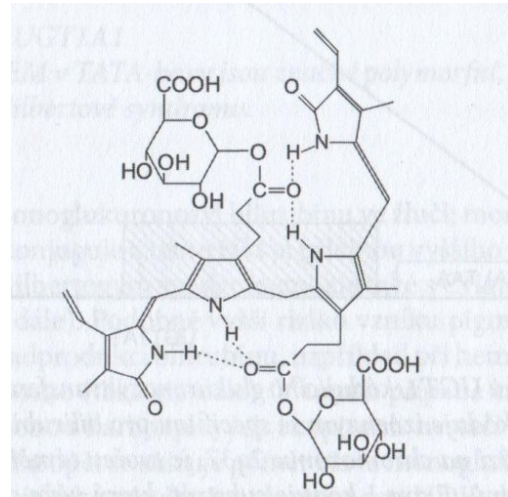
Většina UCB v plazmě (u dospělých 90%) se ihned pevně, ale reverzibilně váže na albumin [49]. Každá molekula albuminu má jedno místo s vysokou afinitou a jedno či více míst s nízkou afinitou (asi patnáctinásobně nižší) k UCB [50]. Zbývajících 10 % UCB je vázáno na apolipoprotein D [49]. Jen velmi malá část UCB není navázána na žádný z přenašečů. Tato frakce se nazývá volný nekonjugovaný bilirubin a při překročení koncentrace 70 nmol.dm^{-3} je toxická pro tkáň, nejvíce pro centrální nervovou soustavu [41].

V játrech BR disociuje od albuminu a pomocí transportérů je dopraven do cytoplasmy jaterních buněk. V cytoplasmě je navázán na jiné transportéry (protein Y a Z) a za jejich pomoci dopraven do endoplasmatického retikula, kde je konjugován [51].

Přirozený isomer bilirubinu je minimálně rozpustný ve vodě a jeho přímá exkrece do žluče je tak znemožněna; musí být převeden na polárnější formu. Děje se tak konjugací se sacharidem a to esterifikací propionátů bilirubinu, což je spojeno s uvolněním dvou vodíkových můstků. Většina konjugovaného bilirubinu je ve formě bisglukuronosylbilirubinu. Tato biotransformace s kyselinou glukuronovou mění trojrozměrnou strukturu bilirubinu a tím zvyšuje jeho rozpustnost ve vodném prostředí. Strukturální vzorec bisglukuronosylbilirubinu je vyobrazen na obr. 8. Bisglukuronosylbilirubin tvoří asi 80% konjugátů bilirubinu, zbývajících část je ve formě monoglukosiduronátů [52]. Celý proces od rozštěpení hemu až po konjugaci bilirubinu je poměrně rychlý, trvá 1-2 minuty [53].



Obr. 8 (a) nahoře: Bismonoglukuronosylbilirubin. Sacharidy zvýšily rozpustnost bilirubinu ve vodném prostředí. (b) vpravo: Reálnější model struktury konjugovaného bilirubinu (převzato z [55]).



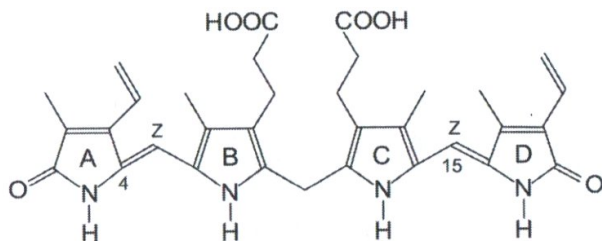
Konjugovaný BR je z hepatocytů (jaterních buněk) vyloučen do žluči proti koncentračnímu gradientu; následně prochází systémem žlučovýchodů do tenkého střeva a odtud do tlustého střeva, kde je dekonjugován [41]. Následuje redukce bilirubinu střevními bakteriemi na urobilinoidy, které jsou spolu s nemetabolizovaným BR vylučovány stolicí [54].

U člověka je prioritní vylučovací cestou bilirubinu exkrece zažívacím traktem. Bilirubinu se vyloučí 10 % z celkové denní produkce, urobilinoidů přibližně 50%. Zbytek bilirubinu je metabolizován na jiné, blíže nespecifikované produkty [55]. Rozklad BR na urobilinoidy tedy představuje hlavní katabolickou cestu bilirubinu.

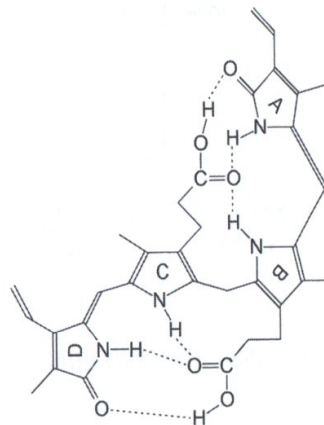
3.4.5. Struktura bilirubinu

Bilirubin je nepolární lineární pigment, tvořený čtyřmi pyrolovými kruhy (A - D), propojenými methenylovými můstky. Kruhy A - B a C - D jsou planární struktury a vůči sobě jsou uspořádány tak, že připomínají vrtuli; lopatky vrtule jsou tvořeny dipyroly a spojeny jsou centrálním methenylovým můstkem, který svírá úhel 95° [56]. Vnější pyrolové struktury (A a D) nesou polární skupinu laktamu, na vnitřní cykly (B a C) je navázán propionát. Zbývá místa na pyrolových kruzích jsou obsazena asymetricky uspořádanými vinylovými a methylovými substituenty [44].

Přirozeně se vyskytující bilirubin je označován jako 4Z, 15Z - bilirubin IX, jeho struktura je zobrazena na obr. 9. 4Z, 15Z - bilirubin IX vzniká z izomeru IX protoporfyrinu rozštěpením α -methenylového můstku hemu, kde stereochemické uspořádání uhlíků v poloze 4 a 15 je v Z konfiguraci.



Obr. 9 Bilirubin IX α - 4Z, 15Z. Nahoře: konvenční tetrapyrrolová struktura přirozeně se vyskytujícího bilirubinu IX α . Vpravo: planární zobrazení trojrozměrné konformace molekuly bilirubinu s vodíkovými můstky (...) (převzato z [55]).



Struktura a konfigurace 4Z, 15Z – bilirubinu IX α umožňuje vznik intramolekulárních vodíkových můstků. Vodíkové vazby vznikají mezi karboxylovými skupinami vnitřních a polárními skupinami vnějších pyrrolových kruhů protilehlé poloviny molekuly, jak je naznačeno na obr. 9. Tyto vodíkové můstky způsobují významné konformační změny, protože brání expozici polárních skupin molekuly vodnému prostředí a zároveň zvyšují rigiditu celé molekuly. Právě tato konformace vysvětluje nepolární charakter bilirubinu a vysvětluje nutnost konjugace bilirubinu kyselinou glukuronovou, aby mohl být z těla vyloučen. Rozpustnost bilirubinu ve vodě je menší než 70 nmol.dm⁻³ [57]. Pokud dojde k ionizaci jedné z karboxylových skupin a jeden vodíkový můstek se přeruší, rozpustnost BR ve vodném prostředí bude částečně vyšší, nicméně ostatní vodíkové vazby drží molekulu ve 3D konformaci [55].

Nekonjugovaný bilirubin se vyskytuje v několika typech izomerů: IX α , IX β , IX γ a IX δ , pojmenovaných podle toho, který methenylový můstek hemu byl rozštěpen. Hlavním isomerem vyskytujícím se v plasmě je isomer IX α . Zbylé isomery nevytvářejí vnitřní vodíkové vazby, jsou proto rozpustnější a pro vyloučení žlučí nevyžadují konjugaci. Isomer IX β byl ve větší míře zaznamenán v plasmě novorozenců [58], zbylé dva isomery jsou přítomny jen ve stopových množstvích [41].

Jiným typem isomerie je konfigurace, která opět vede ke změně polarity molekuly. Přirozený isomer 4Z, 15Z (označení z něm. „zusammen“) se snadno mění fotoexcitací na 4Z, 15E / 4E, 15Z, příp. 4E, 15E isomery (označení z něm. „entgegen“) a to rotací o 180° okolo C4 nebo C15 [59]. Tyto intermediáty samovolně přecházejí zpět na původní 4Z, 15Z isoformu, ale isoforma 4E, 15Z může vytvořit cyklickou strukturu zvanou lumirubin, neschopnou jakékoli

další konfigurační změny. Tohoto principu se využívá u fototerapie patologické novorozenecké žloutenky [59].

Posledním typem isomerie jsou konstituční isomery. Vznikají samovolným rozštěpením molekuly na dva dipyrolové fragmenty a následnou asociací za opětovného vzniku tetrapyrolové struktury [60]. Molekula BR je asymetrická, proto existují konstituční isomery III α , IX α a XIII α .

S výjimkou 4Z, 15Z – bilirubinu IX α nevytváří žádný z isomerů vodíkové můstky.

Byly objeveny dvě enantiomerické formy 4Z, 15Z – bilirubinu IX α , které mohou přecházet jedna ve druhou. Obě formy jsou stabilizovány šesti vodíkovými vazbami a byly popsány na základě krystalografických studií [60]. K přechodu z jednoho enantiomeru ve druhý je nutné zpřetrhat všech šest vodíkových můstků a znovu je sestavit, k čemuž je zapotřebí energie o velikosti $17,9 \pm 0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ [61].

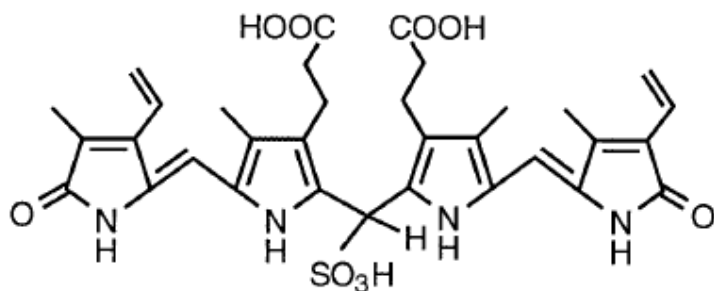
3.4.6. Fyzikální vlastnosti bilirubinu

Bilirubin je nepolární lineární tetrapyrol oranžové až červené barvy, za laboratorních podmínek pevného skupenství, tvořící monoklinické hranoly. Sumární vzorec bilirubinu je C₃₃H₃₆N₄O₆, relativní molekulová hmotnost 584,26348. Rozpustnost ve vodných roztocích je menší než 70 nmol.dm⁻³ [57], se zvyšující se bazicitou roztoku rozpustnost vzrůstá [62]. Ve vodě vytváří koloidní roztoky a filmy. Molekula je dobře rozpustná v nepolárních rozpouštědlech, jako jsou např. DMSO, formamid, acetonitril [63]. Molekula bilirubinu tvoří amidy a estery; estery jsou sloučeniny více polární, protože jejich vznik je spojený s úbytkem vodíkových můstků, které jsou zodpovědné za hydrofobicitu molekuly. Bilirubin je amfolyt, avšak díky vodíkovým intramolekulárním vazbám, spojujícím všechny polární skupiny bilirubinu, se projevuje lipofilně.

3.5. Ranarubin

Ranarubin patří mezi málo prozkoumané deriváty bilirubinu. Svůj název získal podle rodu žab, u kterých byl objeven (*Rana catesbeiana*) [64]; zatím není známo, zda je u nich jediným produktem odbourávání hemu [64, 65]. Zájem o ranarubin (neboli bilirubin-C10-sulfonovou kyselinu) vyplývá právě ze strukturální podobnosti s bilirubinem, která je zřejmá z obr. 10. Rozdíl mezi ranarubinem a bilirubinem je přítomnost sulfonové skupiny u ranarubinu, která zapříčiňuje jeho podstatně větší rozpustnost v polárních rozpouštědlech. Ranarubin je díky své vyšší polaritě nadějným modelem pro studium fyzikálně-chemických vlastností

bilirubinu, jako jsou např. disociační konstanty karboxylových skupin. Předpokladem je, že SO_3H skupina hodnoty disociačních konstant výrazně neovlivňuje. Znalost fyzikálně-chemických charakteristik bilirubinu by usnadnila pochopení interakcí nekonjugovaného bilirubinu s dalšími molekulami a predikci těchto interakcí při změnách pH.



Obr. 10 Strukturální vzorec rhanarubinu (bilirubin-C10-sulfonové kyseliny), hlavního žlučového pigmentu ve žluči skokana volského (převzato z [64]).

4. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost využití kapilární zónové elektroforesy pro určení disociačních konstant bilirubinu a ranarubinu a dále sledování stability vodných roztoků bilirubinu a ranarubinu kapilární zónovou elektroforesou.

5. Experimentální část

5.1. Chemikálie

K přípravě elektrolytu byl použit tetraboritan disodný $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (p. a., Lachema, Česká republika), k upravení pH elektrolytu pak dihydrogenfosforečnan sodný $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (p. a., Lachema, Česká republika) a hydroxid sodný NaOH (p. a., Lachema, Česká republika). Pro proměření mobility v kyselé oblasti byly jako nosné elektrolyty použity roztoky kyseliny octové CH_3COOH (p. a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika) a kyseliny fosforečné H_3PO_4 (p. a. Lachema, Česká republika), upravené NaOH. K určení elektroosmotického toku sloužila thiomocovina $(\text{NH}_2)_2\text{CS}$ (p. a., Lachema, Česká republika). K rozpuštění vzorku bilirubinu byl použit acetonitril CH_3CN (čistota $\geq 99,9\%$, Merck, Spolková republika Německo). Ke kalibraci pH metru byly použity pufrы Fluka Analytical (Sigma-Aldrich Chemie, Spolková republika Německo) o hodnotách 4,00; 7,00; 10,00. Všechny roztoky byly připraveny z deionizované vody.

Vlastní vzorky a jejich příprava

Bilirubin

Nekonjugovaný bilirubin (Frontier Scientific, Inc., Spojené státy americké) byl purifikován A. Čepou (Katedra organické chemie, PřFUK) modifikací metody McDonagha a Assisi [88]. UCB byl rozpuštěn v chloroformu, přiveden k varu, po zchlazení přefiltrován a promyt vodou, 0,1M NaHCO_3 a 0,1M NaCl v objemových poměrech 5:2:2. Po vytvoření rozhraní byl supernatant odstraněn, přidán Na_2SO_4 a roztok s krystalky Na_2SO_4 odstředěn (1800 rpm). Chloroformový roztok s UCB byl následně zfiltrován a opět přiveden k varu. Za stálého míchání byl k roztoku přidáván metanol. Po vychladnutí byl výsledný roztok centrifugován a supernatant byl odstraněn. Vzniklá oranžová sraženina byla promyta metanolem, horní fáze byla opět odstraněna, výsledný UCB lyofilizován, uložen do exsikátoru a na závěr v tmavé nádobě umístěn do mrazícího boxu.

Ranarubin

Ranarubin byl připraven L. Lešetickým (Katedra organické chemie, PřFUK) modifikací metody [83] z biliverdin hydrochloridu (Frontier Scientific, Inc., Spojené státy americké). V atmosféře argonu byl biliverdin hydrochlorid, rozpuštěný v butanolu, smíchán s roztokem

hydrogensířičitanu sodného v butanolu a míchán dvě hodiny. Poté byl přidán síran sodný (srážecí činidlo), druhý den byl roztok zfiltrován, vysrážen THF, odstředěn a převeden do atmosféry argonu. Výsledný ranarubin byl pevného skupenství.

5.2. Přístroje

Měření pH bylo provedeno za pomoci digitálního pH metru 4430 (Jenway LTD, Británie). Kalibrace pH metru byla prováděna třemi pufrů o hodnotách 4,00; 7,00 a 10,00.

Vodivost roztoků byla proměřena konduktometrem IONcheck 30 (Radiometer Analytical S. A., Francie).

Experimenty probíhaly na nekomerčním přístroji pro kapilární zónovou elektroforesu, jehož součástí je spektrofotometrický detektor (Spectra 100 HPLC UV-VIS Detector, Spectral-Physics, Spojené státy americké) s deuteriovou výbojkou a zdroj vysokého napětí (HCN 35-35000, Feg Elektronik GMBH, Spolková republika Německo). Součástí aparatury je počítač s programem LabVIEW 8 (National Instruments, Spojené státy americké) sloužící ke sběru dat a program Clarity 3.0 (DataApex, Česká republika), sloužící k vyhodnocování a zobrazování výsledků. Všechny vzorky byly dávkovány hydrodynamicky s rozdílem hladin 10 cm (tj. přetlak 981 Pa).

K separaci docházelo v křemenných kapilárách (Silica Tubing et Optical Fibers, Slovenská republika) s vnitřním průměrem 75 μm , vnějším průměrem 375 μm , celkovou délkou kapiláry 65 cm a efektivní délkou kapiláry 44 cm.

Kalibrační křivka pro stanovení UCB byla proměřena za pomoci spektrofotometru Evolution 60S UV-Visible (Thermo Scientific, Spojené státy americké) a křemenných květ s šířkou 1,000 cm. Součástí spektrofotometru byl počítač s programem Vision Lite 2.2. (Clemex Technologies inc., Kanada).

Ke zobrazení strukturních vzorců byly použity programy ChemDraw Ultra 11.0. (CambridgeSoft Corporation, Británie) a Inventor Professional 2011 (Autodesk, Spojené státy americké).

5.3. Experimentální podmínky a postupy

Určení disociační konstanty nekonjugovaného bilirubinu

K určení pK_a UCB pomocí kapilární zónové elektroforezy bylo rozpuštěno 1,7 mg přečištěného vzorku bilirubinu v 600 μ l acetonitrilu a doplněno 20mM borátovým pufrům na celkový objem 3 ml. K roztoku UCB byly následně přidány 2 mg thiomocoviny. Před začátkem každé série experimentů byl výsledný roztok zfiltrován přes stříkačkový filtr Anotop 25 (0,02 μ m, Whatman plc, Británie). Nebyl používán roztok bilirubinu a thiomocoviny starší deseti hodin a mezi jednotlivými měřeními byl vzorek v atmosféře argonu. Nosným elektrolytem byl borátový pufr, jehož pH bylo za pomoci pH metru upravováno nasyceným roztokem NaOH nebo pevným hydrogenfosforečnanem sodným. Vodivost elektrolytu byla následně upravena na vodivost rovnou konduktivitě čistě borátového pufru (3,73 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) deionizovanou vodou. Na závěr bylo zkontrolováno pH. Při analýze UCB bylo použito napětí 20 kV a vlnová délka pro detekci 220 nm. Pro každé pH nosného elektrolytu byl vzorek proměřen třikrát, do grafu byl vynesena medián. Složení použitých nosných elektrolytů je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1 Složení nosných elektrolytů, použitých k určení disociační konstanty UCB.

Složení pufrů	pH*
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	8,3
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	8,5
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	8,7
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	8,9
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	9,0
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	9,1
20mM tetraboritan sodný	9,3
20mM tetraboritan sodný + nasycený NaOH	9,5
20mM tetraboritan sodný + nasycený NaOH	9,6

* Hodnota změřena po úpravě vodivosti.

Určení disociační konstanty ranarubinu

K určení pK_a ranarubinu pomocí CZE byl použit vzorek ranarubinu o koncentraci 0,1 mg/ml v deionizované vodě. K proměření škály pH byly jako nosné elektrolyty používány octanový, fosfátový a borátový pufr; pH všech nosných elektrolytů byla stanovena za pomoci pH metru, jejich vodivost byla následně upravena deionizovanou vodou na hodnotu vodivosti nejméně vodivého elektrolytu, tj. 20mM fosfátového pufru o pH 5,05 ($1300 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a na závěr bylo pH opět zkontrolováno pH metrem. Zásobní roztok byl uchován v inertní atmosféře a nebyl používán vzorek starší deseti hodin. Při analýze ranarubinu bylo použito napětí 20 kV a vlnová délka pro detekci 220 nm. Složení použitých nosných elektrolytů je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2 Složení nosných elektrolytů, použitých k určení disociační konstanty ranarubinu.

Složení pufrů	pH*
30mM kyselina octová + nasycený NaOH	4,2
30mM kyselina octová + nasycený NaOH	4,7
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	5,2
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	6,1
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	7,1
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	8,2
20mM tetraboritan sodný + dihydrogenfosforečnan sodný	9,2
20mM tetraboritan sodný + nasycený NaOH	10,4

* Hodnota změřena po úpravě vodivosti.

Pro podrobnější proměření oblasti pH v okolí pK_a ranarubinu byly použity nosné elektrolyty uvedené v tabulce 3.

Tab. 3 Složení nosných elektrolytů, použitých k přesnému určení pK_a ranarubinu.

Složení pufrů	pH*
30mM kyselina octová + nasycený NaOH	4,72
30mM kyselina octová + nasycený NaOH	4,87
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	5,05
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	5,16
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	5,34
20mM kyselina fosforečná + nasycený NaOH	5,61

* Hodnota změřena po úpravě vodivosti.

Monitorování stability UCB pomocí CZE

Ke sledování stability bilirubinu pomocí CZE bylo rozpuštěno 1 mg bilirubinu a 2 mg thiomocoviny v 600 μ l acetonitrilu a doplněno 2,4 ml 20mM borátového pufru. Roztok byl zfiltrován a ihned proměřen na elektroforese, kde byl 20mM borátový pufr nosným elektrolytem. Měření se provádělo ve zvolených časových intervalech, vždy jedenkrát, při vloženém napětí 20 kV a vlnové délce pro detekci 220 nm. Mezi jednotlivými měřeními byl vzorek za běžných laboratorních podmínek.

Monitorování stability ranarubinu pomocí CZE

Ke sledování stability ranarubinu byl jako nosný elektrolyt použit roztok 20mM kyseliny fosforečné a NaOH, upravený na pH 5,05; ranarubin byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 0,1 mg/ml. Měření se provádělo v hodinových intervalech, při vloženém napětí 20 kV a vlnové délce pro detekci 220 nm. Mezi jednotlivými měřeními byl vzorek ponechán za běžných laboratorních podmínek.

Určení kalibrační závislosti nekonjugovaného bilirubinu

Kalibrační závislost pro bilirubin byla dále používána pro hodnocení aktuální rozpustnosti bilirubinu v použitých roztocích. K proměření závislosti absorbance na koncentraci bilirubinu bylo naváženo 0,5 mg bilirubinu, který byl rozpuštěn v 600 μ l acetonitrilu a doplněn

borátovým pufrům na celkový objem 3 ml. Takto připravený zásobní roztok byl dále ředěn na požadované koncentrace. Jako slepý roztok byl použit roztok 600 μ l acetonitrilu a 2400 μ l borátového pufru. Absorpční spektrum bylo proměřeno v oblasti 200 – 500 nm pro každou z koncentrací; hodnota absorbance bilirubinu, použitá k sestavení kalibrační přímky, odpovídala vlnové délce 446 nm (lokální maximum, typické pro bilirubin). Absorpční spektra UCB byla proměřena během 30 minut, mezi jednotlivými měřeními byl vzorek bilirubinu ponechán v běžných laboratorních podmínkách.

Příprava kapiláry pro CZE

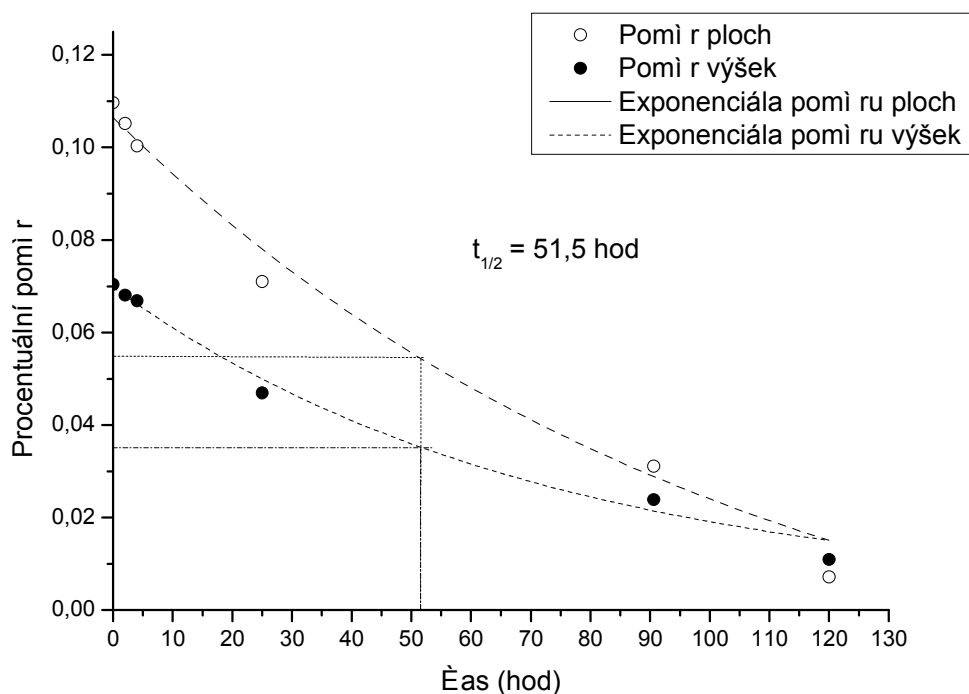
Nová kapilára byla promyta 0,1 M roztokem NaOH po dobu 5 minut a následně stabilizována promytím 20mM borátovým pufrům po dobu 20 minut při vloženém napětí (5 kV). Po stabilizaci byla kapilára krátce propláchnuta aktuálně používaným nosným elektrolytem. Pro konstrukci grafů byl použit program Origin 8 (OriginLab, Spojené státy americké).

6. Výsledky a diskuze

6.1. Monitorování stability UCB

Bilirubin absorbuje ve viditelném spektru. Pokud je exponován vzduchem, dochází k jeho izomerizaci, fotooxidaci bilirubinu na biliverdin a vzniku dalších polárních mono- a dipyrolových produktů. Všechny tyto změny vedou ke zvýšení polarity bilirubinu. Tento princip se využívá při léčbě patologické novorozenecké hyperbilirubinemie, proto je sledování fotodegradace a oxidace bilirubinu věnována značná pozornost [87, 89, 90].

Závislost relativního úbytku bilirubinu v borátovém pufru ve zvolených časových intervalech je uvedena na obr. 11. Byly odečítány poměry velikostí odezev vlastního bilirubinu a standardu (thiomočovina). Analýza byla prováděna v 20mM tetraboritanu sodném, vzorek byl nejprve přefiltrován a následně mezi jednotlivými analýzami ponechán za běžných laboratorních podmínek.



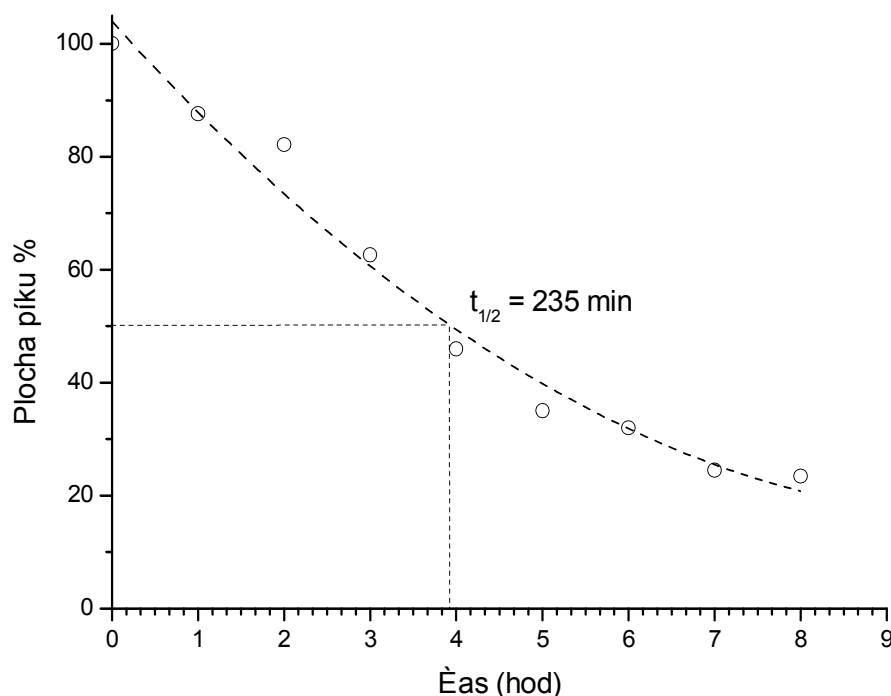
Obr. 11 Graf závislosti relativního úbytku vzorku bilirubinu v borátovém pufru vůči standardu (thiomočovina); měřeno ve zvolených časových intervalech. Použitý nosný elektrolyt 20mM tetraboritan sodný. Vložené napětí 20 kV, použitá vlnová délka pro detekci 220 nm.

Z grafu stability bilirubinu je zřejmý úbytek bilirubinu v čase a to jak relativním snížením intenzity odezvy tak plochy píku. Za 24 hodin dojde k degradaci necelé třetiny bilirubinu, což odpovídá výsledkům získaných spektrální metodou využívající reakci bilirubinu s diazoniovou solí [87].

6.2. Monitorování stability ranarubinu

O stabilitě ranarubinu nebyla dosud publikována žádná studie. Přesto je ranarubinu, jakožto modelové molekule pro zkoumání fyzikálně-chemických vlastností bilirubinu, věnována značná pozornost. Graf závislosti úbytku ranarubinu v čase je uveden na obr. 12.

Ranarubin byl detegován při vlnové délce 220 nm a vloženém napětí 20 kV. Analýza byla prováděna ve fosfátovém pufru o pH 5,05.



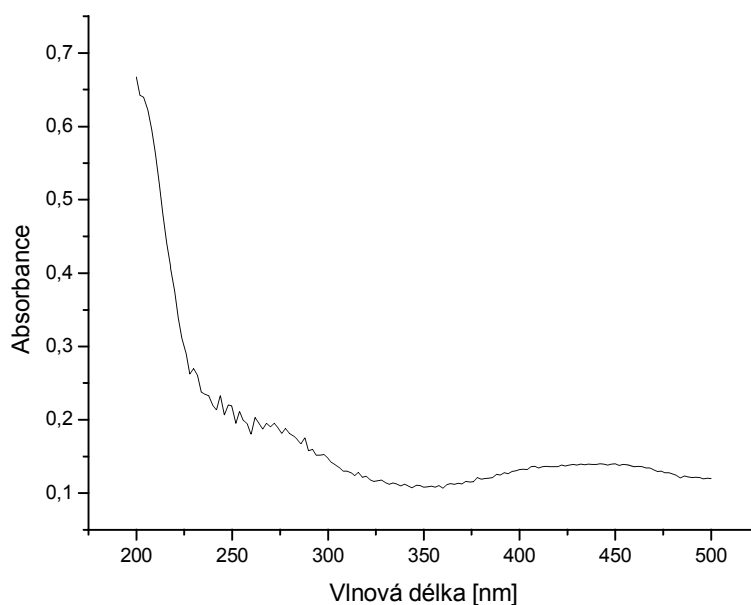
Obr. 12 Graf závislosti úbytku vzorku ranarubinu v destilované vodě ($c = 0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$); měřeno v hodinových intervalech pomocí CZE. Použitý nosný elektrolyt: fosfátový pufr o pH 5,05; vložené napětí 20 kV, použitá vlnová délka pro detekci 220 nm. Mezi jednotlivými analýzami byl vzorek ponechán za běžných laboratorních podmínek.

V grafu je uveden procentuální úbytek z plochy píku ranarubinu. Během 235 minut došlo za běžných laboratorních podmínek ke snížení plochy píku ranarubinu na polovinu.

Z odečtených poločasů rozkladu ranarubinu (235 min) a bilirubinu (51,5 hod) je zřejmé, že degradaci za přístupu světla a vzduchu podléhá ranarubin několikanásobně rychleji. V praxi je proto nezbytné používat metody analyzující ranarubin v řádech minut nebo během experimentu zamezit expozici vzorku světlu a zabránit přístupu vzduchu. Příprava čerstvého roztoku ranarubinu před každým experimentem je důležitá.

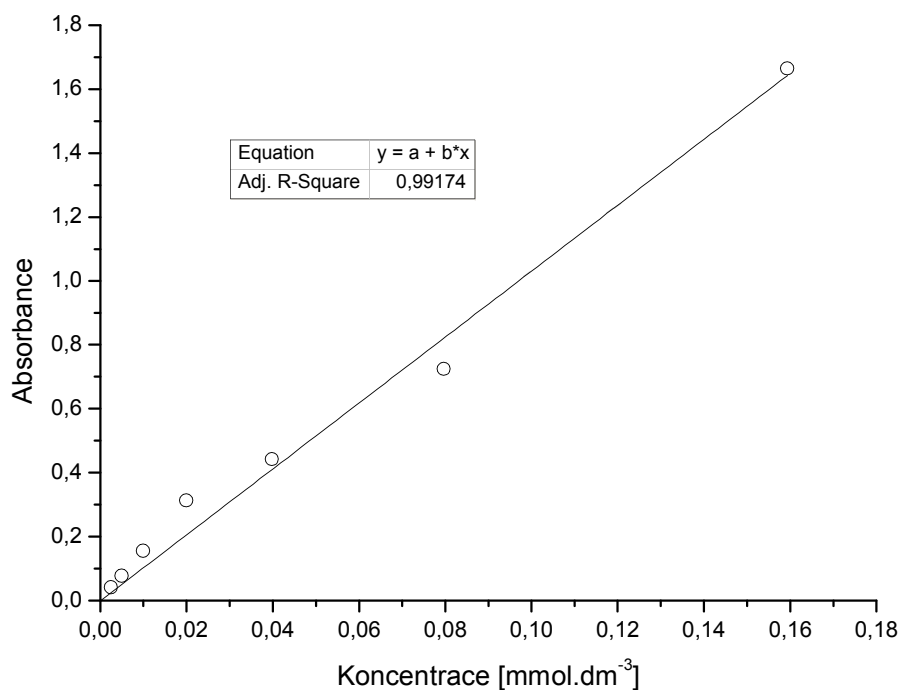
6.3. Určení kalibrační závislosti pro nekonjugovaný bilirubin

Na spektrofotometru byla změřena spektra roztoku bilirubinu ve 20% acetonitrilu, doplněném borátovým pufrům o pH 9,3. Maximální absorbance byla změřena při 446 nm; tato vlnová délka byla použita k odečtu absorbance při určování kalibrační závislosti. Vliv acetonitrilu na rozpustnost BR dosud nebyl publikován, nicméně absorpční spektrum bilirubinu v acetonitrilu odpovídá spektru BR v 1% NH₄OH v metanolu ($\lambda_{\text{max}} = 452 \text{ nm}$) [83]. UV/VIS absorpční spektrum 160 μM roztoku bilirubinu je uvedeno na obr. 13. Zjištěná kalibrační závislost je uvedena na obr. 14.



Obr. 13 UV/VIS spektrum roztoku 160 μM bilirubinu ve 20% acetonitrilu, doplněném 20mM tetraboritanem sodným. Proměřeno rozmezí 200-500 nm, pro bilirubin charakteristické lokální maximum při 446 nm.

Z absorpčního spektra bilirubinu je zřejmá vysoká absorbance v oblasti vlnových délek 200-250 nm. Tato oblast není typická pro molekulu bilirubinu, ale poskytuje větší odezvu, a proto byla vlnová délka 220 nm využita ke studiu vlastností bilirubinu i ranarubinu pomocí CZE.



Obr. 14 Kalibrační závislost roztoku bilirubinu ve 20% acetonitrilu, doplněném 20mM tetraboritanem sodným. Slepý roztok 20% acetonitril a 20mM tetraboritan sodný. K odečtu absorbance použita vlnová délka 446 nm.

6.4. Stanovení disociační konstanty nekonjugovaného bilirubinu

UCB existuje ve vodném roztoku ve třech formách, které jsou neustále v rovnováze: H_2B , HB^- a B^{2-} . Poměr zastoupení jednotlivých forem je pochopitelně závislý na pH roztoku a na pK_a UCB. Každá z forem se liší svými vlastnostmi i funkcemi, které v organismu v různých tkáních a tělních tekutinách vykonává [66]. H_2B volně prochází přes lipidovou membránu [67], HB^- je hlavní substrát pro aktivní přenos UCB ABC transportéry [68] a HB^{2-} se přednostně váže k albuminu [69], apolipoproteinu D [70] i ligandinu [71].

Mezi experimentálně zjištěnými pK_a hodnotami UCB jsou obrovské rozdíly, v závislosti na použité metodě [72]. Ve většině studií jsou určeny pK_a hodnoty UCB nižší než 7,0, v některých dokonce nižší 5,0 [72], zatímco jiné studie naznačují, že hodnoty pK_a budou podstatně vyšší, 8,12 a 8,44 [73, 74], či dokonce 9,3 [75]. Důvodem natolik odlišných výsledků je velmi nízká rozpustnost UCB (pro $pH \leq 7,8$ je rozpustnost $< 0,1 \mu M$ [76]) a rychlá degradace UCB na polárnější deriváty s mnohem vyšší rozpustností ve vodných roztocích a s rozdílnými acidobazickými vlastnostmi [77].

Ačkoli je práce s UCB obtížná, řadě možných chyb měření se dá předcházet striktním dodržováním experimentálních podmínek [78]. Mezi ně patří: 1) Přečištění UCB před jeho experimentálním využitím a následná kontrola kvality chromatografickou či spektrální metodou; 2) Vzorek by neměl být skladován ve formě zásobního roztoku ani inkubován, aby nedocházelo k degradaci UCB na jeho polárnější deriváty; 3) Měření by měla být prováděna až po dosažení rovnováhy všech iontových forem UCB. Ta by měla být ustanovena rychle, aby se zabránilo degradaci UCB; 4) Roztok UCB by neměl být přesycen, aby nedocházelo k ovlivnění výsledků případnými agregáty či nerozpuštěnými částicemi UCB; 5) Vzorek by neměl být vystaven světlu ani kyslíku a být proměřen v krátkém časovém období.

K určení disociačních konstant UCB byla použita řada metod. V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky studií, které většinu výše uvedených podmínek splnily, avšak i přesto zjištěné hodnoty pK_a značně kolísají.

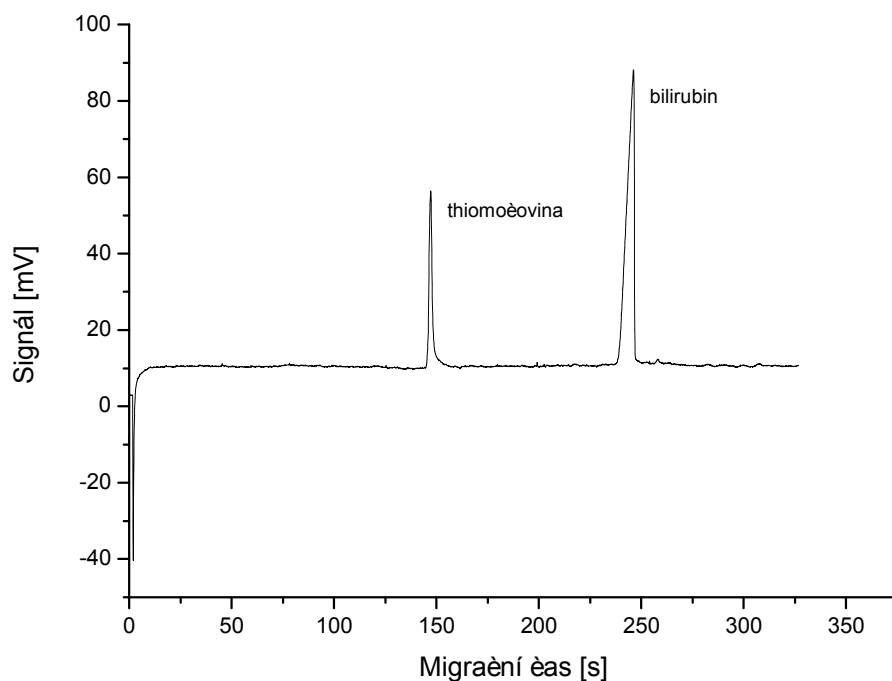
Tab. 4 Seznam experimentálních studií, zabývajících se určováním disociačních konstant UCB. Upraveno podle [78].

Odkaz na studii	Použitá metoda	pK_a	Možná chyba [78]
[79]	Spektrofotometrická titrace	$pK_{a1} = 5,2$; $pK_{a2} = 5,9$	Chybí experimentální údaje
[80]	Spektrofotometrická titrace	$pK_a = 7,1$	Použity deriváty UCB
[81]	Spektrofotometrická titrace	$pK_{a1} = 6,0$; $pK_{a2} = 8,3$	pK_{a1} určeno aproximací
[82]	Potenciometrická titrace	$pK_{a1} = 4,4$; $pK_{a2} = 5,0$	Roztok nebyl přefiltrován
[75]	Měření rozpustnosti UCB v závislosti na pH	$pK_{a1} = 6,8$; $pK_{a2} = 9,3$	Obtížnost dosažení rovnováhy při rozpouštění krystalu UCB
[84]	Titrace v nevodném prostředí (DMF)	$pK_{a1} = 4,3$; $pK_{a2} = 5,3$	Roztok nebyl přefiltrován, použito organické rozpouštědlo
[85]	Titrace v nevodném prostředí (DMSO)	$pK_a = 4,4$	Roztok nebyl přefiltrován, použito organické rozpouštědlo
[86]	Titrace v částečně nevodném prostředí (DMSO)	$pK_{a1} = 4,2$; $pK_{a2} = 4,9$	Použit derivát UCB, dlouhotrvající analýza (NMR), použito organické rozpouštědlo
[74]	Rozdělovací rovnováhy $CHCl_3$ - voda	$pK_{a1} = 8,12$; $pK_{a2} = 8,44$	Použito organické rozpouštědlo
[72]	Spektrofotometrická titrace konjugovaného bilirubinu	$pK_a = 4,4 - 5,4$	Použit konjugát bilirubinu, roztok nebyl přefiltrován

Potíže s jednoznačným určením hodnoty pK_a bilirubinu jsou z výše uvedených studií zřejmé. Důvodem je nízká rozpustnost UCB ve vodných roztocích a jeho rychlá degradace. Problém s nízkou rozpustností je řešen několika způsoby: stanovením v částečně či zcela nevodném prostředí, ve kterém je UCB více rozpustný [84-86], využitím polárnějších derivátů [80] či

konjugátů UCB [72]. Nestabilitu UCB lze minimalizovat uchováváním vzorku ve tmavých nádobách pod inertním plynem a proměřením v krátkém časovém intervalu.

Při určování disociačních konstant nekonjugovaného bilirubinu metodou kapilární zónové elektroforesy byly splněny všechny známé podmínky, popsané výše. Nebylo třeba pracovat s konjugáty či deriváty UCB ani používat organická rozpouštědla, která by případně mohla vést k přerušení vodíkových můstků, změně 3D struktury, odkrytí polárních skupiny molekuly a tím i ke změně pK_a hodnot karboxylových skupin UCB. Jako nesporné výhody CZE ke stanovení disociační konstanty UCB se projevily malá spotřeba vzorku, analýza UCB přímo ve vodném prostředí, vysoká rychlost analýzy, čímž se minimalizuje úroveň degradace bilirubinu a vzhledem ke vzájemné separaci všech složek vzorku je možné v principu pracovat i s ne zcela čistými látkami. Ukázkový elektroferogram UCB a thiomocoviny v nosném elektrolytu o pH 8,8 je uveden na obr. 13.



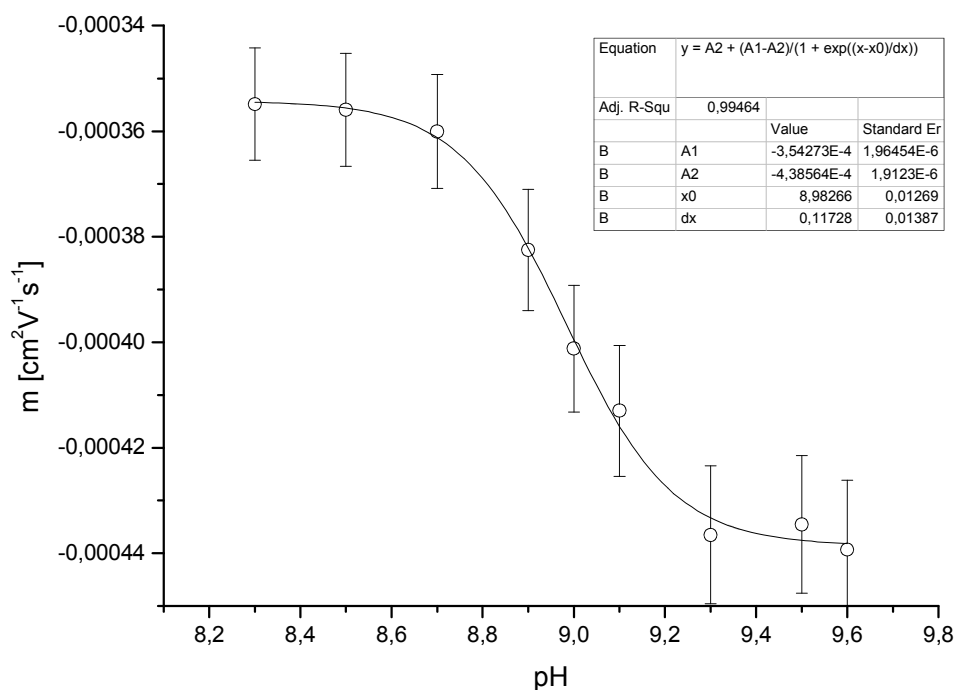
Obr. 15 Elektroferogram UCB a thiomocoviny pro pH nosného elektrolytu 8,8. Vložené napětí 20 kV, detekce při 220 nm.

Ze všech získaných elektroferogramů byly odečteny migrační časy bilirubinu (t_{mig}) a thiomčoviny (t_{EOF}), sloužící jako marker elektroosmotického toku. Efektivní elektroforetické pohyblivosti byly určeny podle vztahu

$$m_{EFF} = \left(\frac{1}{t_{mig}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \frac{L_d L_c}{U} . \quad (21)$$

Závislost efektivní elektroforetické mobility UCB na pH nosného elektrolytu je uvedena na obr. 16. Pro každé pH nosného elektrolytu byla provedena nejméně tři opakování, do grafu byl zanesen medián. Největší odchylka od mediánu odpovídala 3% z naměřené hodnoty, proto jsou v grafu zaneseny chybové úsečky, přičemž skutečná hodnota leží minimálně s 97% pravděpodobností uvnitř stanoveného intervalu.

Z grafu je zřejmá klesající závislost mobility bilirubinu na pH nosného elektrolytu, přičemž hodnota inflexního bodu křivky odpovídá pK_a^* bilirubinu. K proložení naměřených bodů byla použita Boltzmannova sigmoida. Jedná se o nejběžnější sigmoidální funkci, která popisuje naměřené hodnoty s nejmenší odchylkou ($R^2 = 0,99464$). Odečtená hodnota pK_a^* byla 9,0. Vzorek bilirubinu se i při pH 8,3 nepohybuje současně s elektroosmotickým tokem, má zbytkovou mobilitu ($-3,5487 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). To lze vysvětlit tím, že i při pH 8,3 je bilirubin ve formě aniontu; přechod z formy H_2A na HA^- je zřejmě v kyselejší oblasti a naměřená hodnota pK_a^* 9,0 odpovídá druhému disociačnímu stupni bilirubinu, pK_{a2}^* . K určení hodnoty prvního disociačního stupně nekonjugovaného bilirubinu kapilární zónová elektroforesa posloužit nemůže, protože při pH nosného elektrolytu menším než 8,3 dochází díky nedostatečné rozpustnosti k jeho vysrážení a k ucpávání kapiláry. Řešením by bylo použít organické rozpouštědlo jako součást nosného elektrolytu, což by však výrazně ovlivnilo acidobazické chování bilirubinu.



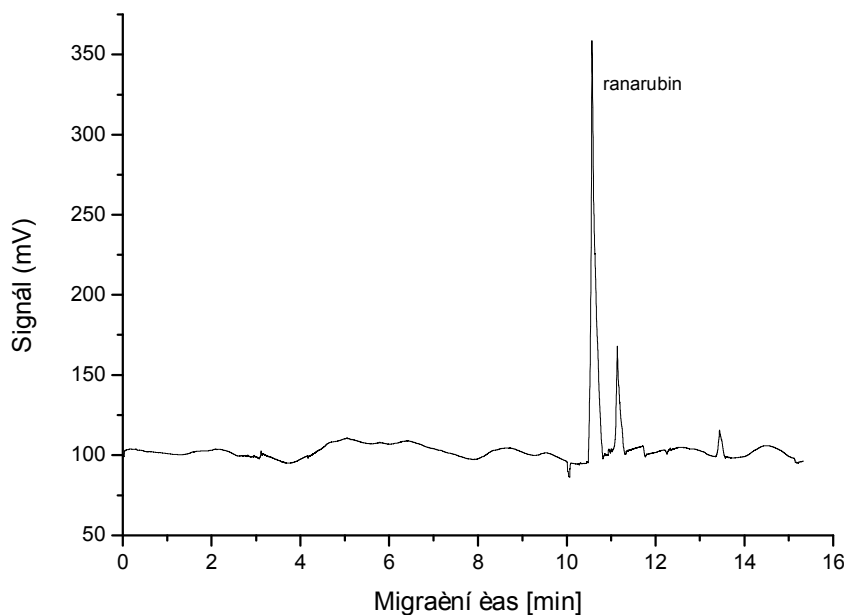
Obr. 16 Závislost mobility UCB na pH nosného elektrolytu. Měřeno 20 kV a detegováno při 220 nm. Odečteno $pK_a^* 9,0$.

Z principu určování disociačních konstant metodou CZE nemohou být inflexní body dokonale odděleny, pokud jsou od sebe vzdáleny méně než dvě jednotky pH [92]. Podle *t*-testu není mezi mediány mobilit BR pro pH 8,3 a 8,5 statisticky významná odlišnost pro koeficient spolehlivosti 0,95 [91], tedy spojnice obou bodů je rovnoběžná s osou *x*. Z toho vyplývá, že pK_{a1}^* je nejméně o dvě jednotky nižší než pK_{a2}^* a A^{2-} a H_2A nekoexistují v roztoku společně. Tomuto závěru odpovídá studie Ostrowa [75], podle které jsou od sebe *pK* konstanty UCB vzdáleny o 2,5 jednotky pH.

6.5. Stanovení disociační konstanty ranarubinu

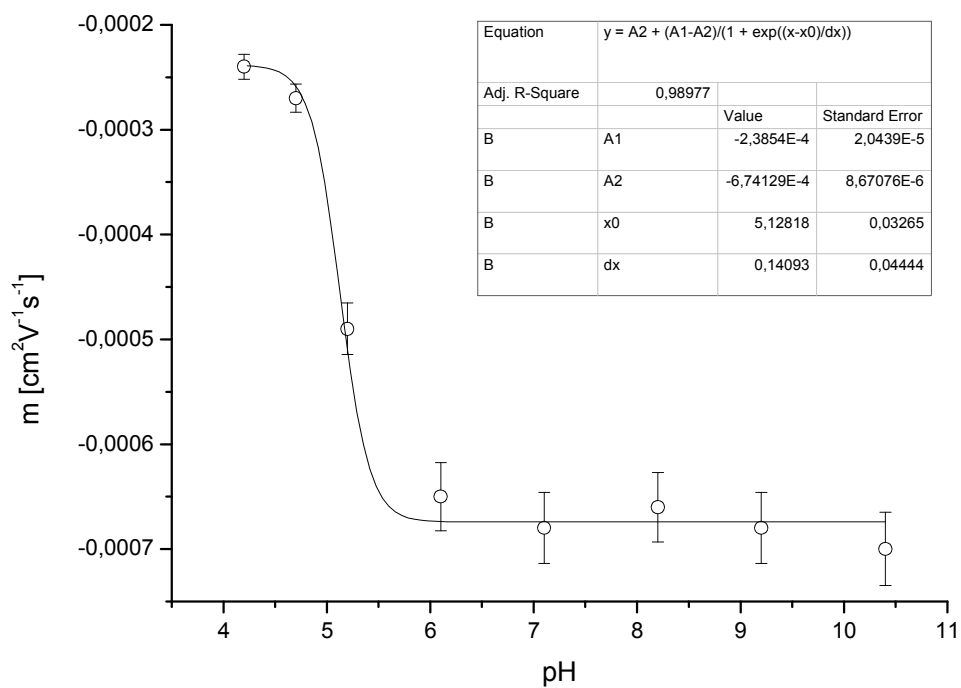
Acidobazické chování ranarubinu v závislosti na pH okolního prostředí bylo sledováno za pomoci kapilární zónové elektroforesy. Během měření byl kladen důraz na minimalizaci kontaktu vzorku ranarubinu se vzduchem a světlem. Testované bylo pH v rozmezí 4,2 – 10,4 a následně podrobněji v oblasti 4,72 – 5,61. Pro každé pH nosného elektrolytu byly provedeny

tři měření a z výsledných elektroferogramů vypočteny efektivní elektroforetické mobility ranarubinu (podle (21)). Ukázkový elektroferogram vzorku ranarubinu pro pH nosného elektrolytu 5,16 je uveden na obr. 17.

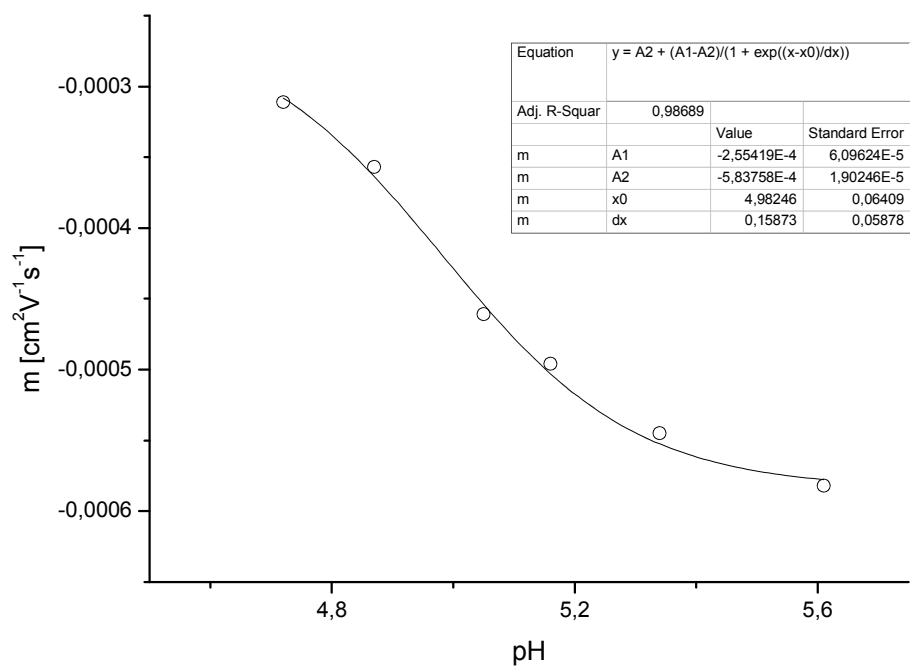


Obr. 17 Elektroferogram ranarubinu, pro pH nosného elektrolytu 5,16. Vložené napětí 20 kV, detekce při 220 nm.

Mediány hodnot efektivních pohyblivostí ranarubinu byly vyneseny do obr. 18 v závislosti na pH hodnotách základních elektrolytů. Pro žádný z mediánů nebyla zaznamenána odchylka větší tři procent. Aplikací regresní funkce (Boltzmannova sigmoida) do grafu s hrubší škálou pH byla získána křivka, jejíž inflexní bod (tedy pK_a^*) nabývá hodnoty pH 5,1. Detailní závislost změny elektroforetické pohyblivosti na pH je uvedena na obr. 19. Naměřenými hodnotami byla proložena Boltzmannova sigmoidální křivka, v inflexu byla odečtena hodnota pK_a^* byla upravena na 4,98. Rozdíl jednoho desetinného místa v určování pK_a^* oproti předchozímu měření je na hranici dosažitelné přesnosti CZE. Další studie, určující pK_a ranarubinu, dosud nebyly publikovány.



Obr. 18 Závislost mobility ranarubinu na pH nosného elektrolytu. Vloženo napětí 20 kV a detegováno při 220 nm.



Obr. 19 Podrobně proměřená závislost mobility ranarubinu na pH nosného elektrolytu. Spektrální detekce při 220 nm, vloženo napětí 20 kV. Odečteno $pK_a * 4,98$.

7. Závěr

V této diplomové práci byly shrnuty nejdůležitější informace o bilirubinu a jeho derivátu ranarubinu a prozkoumány možnosti využití kapilární zónové elektroforesy ke stanovení kyselých disociačních konstant propionátových karboxylů obou molekul a ke sledování stability vodných roztoků nekonjugovaného bilirubinu a ranarubinu.

Bilirubin je v experimentálních studiích obvykle popisován jako nestabilní, snadno oxidovatelná a vysoce fotosenzitivní látka. Toto bylo potvrzeno – poločas rozpadu bilirubinu byl stanoven na 51,5 hodiny. Stabilita ranarubinu, polárnějšího derivátu bilirubinu podobné struktury, nebyla dosud určována; za pomoci CZE se podařilo zjistit, že se jedná o molekulu ještě méně stabilní (poločas rozpadu 235 minut). Při laboratorní praxi je tedy zapotřebí k analýze obou molekul používat dostatečně rychlé analytické metody a zabránit expozici analytu světlem a vzduchem.

K určení disociačních konstant UCB byla dosud použita řada metod, avšak mezi vykazovanými daty jsou značné rozdíly (v rozmezí nejméně pěti jednotek pH). Hlavní důvody jsou zřejmě dva: rychlá degradace molekuly a velmi nízká rozpustnost UCB ve vodných rozpouštědlech. Problém s nízkou rozpustností je řešen několika způsoby: stanovením v částečně či zcela nevodném prostředí, ve kterém je UCB více rozpustný nebo využitím polárnějších derivátů či konjugátů UCB. To však sebou přináší řadu otázek. Dochází vlivem organického rozpouštědla k rozrušení vodíkových můstků bilirubinu? Mají deriváty i konjugáty stejnou disociační konstantu jako vlastní nekonjugovaný bilirubin? Byly analýzy dostatečně rychlé, nedocházelo během nich k degradaci bilirubinu?

Zdá se, že využití kapilární zónové elektroforesy je schopno všechny tyto možné chyby ve stanovení eliminovat. Experimentální měření probíhala v čistě vodném prostředí, přímo s nekonjugovaným bilirubinem a v časovém intervalu v řádech minut. Hodnota smíšené disociační konstanty, získaná za pomoci CZE, je 9,0. Vzhledem ke zbytkové mobilitě pro pH nosného elektrolytu 8,3 se jedná o druhý disociační stupeň. K určení hodnoty prvního disociačního stupně nekonjugovaného bilirubinu kapilární zónová elektroforesa posloužit nemůže, při pH nosného elektrolytu menším 8,3 dochází k vysrážení bilirubinu a k ucpávání kapiláry.

Smíšená disociační konstanta pro ranarubin byla též stanovena pomocí kapilární zónové elektroforesy, a to na hodnotu 4,98.

Z výsledků získaných kapilární zónovou elektroforesou lze jednoznačně říci, že disociační konstanty bilirubinu a ranarubinu jsou odlišné a ranarubin je jakožto modelová molekula pro studium disociačních konstant bilirubinu nevhodná.

Smíšené disociační konstanty a poločasy rozpadu bilirubinu a ranarubinu za pomoci kapilární zónové elektroforesy byly stanoveny, vytyčené cíle se podařilo splnit.

8. Seznam citované literatury

- [1] PFREPPER, R., I. KÄSTNER a D. von ENGELHARDT. *Von Samuel Gottlieb Gmelins Reise durch Russland bis zum Niedergang der Apothekerfamilie Pöhl: Vorträge des Symposiums am Institut für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte Lübeck und der Ostseeademie Travemünde am 30. September bis 1. Oktober 2000*. Aachen: Shaker, 2001, s. 209-226. ISBN 3826589246.
- [2] KOHLRAUSCH, F. Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse in Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen. *Annalen der Physik und Chemie*. 1897, č. 62, s. 209-239.
- [3] TISELIUS, A. *The moving-boundary method of studying the electrophoresis of proteins*. Uppsala (Švédsko), 1930. Doctoral thesis. University of Uppsala.
- [4] TISELIUS, A. New apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*. 1937, č. 33, s. 524-531. Dostupné z: http://siba.unipv.it/fisica/articoli/T/TransactionsFaradaySociety1937_33_524.pdf
- [5] HJERTÉN, S. a A. TISELIUS. Electrophoretic particle sieving in polyacrylamide gels as applied to ribosomes. *Analytical Biochemistry*. 1965, č. 11, s. 211-218.
- [6] TISELIUS, A., S. HJERTÉN a J. JERSTEDT. "Particle-sieve" electrophoresis of viruses in polyacrylamide gels, exemplified by purification of turnip yellow mosaic virus. *Archives of Virology*. 1965, č. 17, s. 512-521. DOI: 10.1007/BF01241208.
- [7] HJERTÉN, S. Free zone electrophoresis. *Chromatographic Reviews*. 1967, roč. 9, č. 2, s. 122-219. ISSN 0009-5907. DOI: 10.1016/0009-5907(67)80003-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009590767800036>
- [8] GIDDINGS, J. C. a J. CALVIN. Generation of variance, theoretical plates, resolution, and peak capacity in electrophoresis and sedimentation. *Separation Science*. 1969, č. 4, s. 181-189. ISSN 0037-2366. DOI: 10.1080/01496396908052249.
- [9] EVERAERTS, F. M. a W. M. L. HOVING-KEULEMANS. Zone electrophoresis in capillary tubes. *Science Tools*. 1970, roč. 17, č. 1, s. 25-28. ISSN 0036-8598.
- [10] VIRTANEN, R. Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection. Theoretical and experimental study. *Acta Polytechnica Scandinavica: Chemistry Including Metallurgy Series*. 1974, č. 123, s. 1-67. ISSN 0001-6853.
- [11] JORGENSON, J. W. a K. D. LUKACS. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry*. 1981, roč. 53, č. 8, s. 1298-1302. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00231a037.
- [12] TERABE, S., K. OTSUKA, K. ICHIKAWA, A. TSUCHIYA a T. ANDO. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry*. 1984, roč. 56, č. 1, s. 111-113. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00265a031.
- [13] EVERAERTS, F. M. a A. J. P. MARTIN. Displacement electrophoresis. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1970, č. 316, s. 493-514. ISSN 1364-5021. DOI: 10.1098/rspa.1970.0092.
- [14] HJERTÉN, S. High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1983, č. 270, s. 1-6. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)96347.
- [15] HJERTÉN, S. a M. D. ZHU. Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. *Journal of Chromatography*. 1985, č. 346, s. 265-270. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)90512.
- [16] KNOX, J. H. a I. H. GRANT. Miniaturization in pressure and electroosmotically driven liquid chromatography: some theoretical considerations. *Chromatographia*. 1987, roč. 24, č. 24, s. 135-143. ISSN 0009-5893. DOI: 10.1007/BF02688476.
- [17] SILVA, J. A. F. da a C. L. do LAGO. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1998, roč. 70, č. 20, s. 4339-4343. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/AC980185G.

- [18] GAŠ, B., M. DEMJANENKO a J. VACÍK. High-frequency contactless conductivity detection in isotachopheresis. *Journal of Chromatography*. 1980, roč. 192, č. 2, s. 253-257. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(80)80001.
- [19] FORET, F., S. FANALI, L. OSSICINI a P. BOČEK. Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography*. 1989, roč. 470, č. 1, s. 299-308. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)83558.
- [20] VESPALEC, R. a P. BOČEK. Calculation of stability constants for the chiral selector-enantiomer interactions from electrophoretic mobilities. *Journal of Chromatography, A*. 2000, roč. 875, 1-2, s. 431-445. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00112.
- [21] PUMERA, M., J. WANG, F. OPEKAR, V. JELÍNEK, J. FELDMAN, H. LOEWE a S. HARDT. Contactless Conductivity Detector for Microchip Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 2002, roč. 74, č. 9, s. 1968-1971. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac011219e.
- [22] JELÍNEK, I., J. SNOPEK a E. SMOLKOVÁ-KEULEMANOVÁ. Use of cyclodextrins in isotachopheresis: Effect of cyclodextrin on the isotachopheretic separation of related penicillins. *Journal of chromatography*. 1987, č. 405, s. 379-384. ISSN 0021-9673.
- [23] KAŠIČKA, V., Z. PRUSÍK, O. SMEKAL, J. HLAVÁČEK, T. BARTH, G. WEBER a H. WAGNER. Application of capillary and free-flow zone electrophoresis and isotachopheresis to the analysis and preparation of the synthetic tetrapeptide fragment of growth hormone-releasing peptide. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*. 1994, roč. 656, č. 1, s. 99-106. ISSN 1387-2273. DOI: 10.1016/0378-4347(94)00042-5.
- [24] BOSÁKOVÁ, Z., P. COUFAL, I. JELÍNEK, V. PACÁKOVÁ, J. ŠEVČÍK a K. ŠTULÍK. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [25] FORET, F., L. KŘIVÁNKOVÁ a P. BOČEK. *Capillary zone electrophoresis*. Weinheim (Federal Republic of Germany): VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993. ISBN 3-527-30019-8.
- [26] ROBINSON, R. A. a R. H. STOKES. *Electrolyte solutions*. 2nd rev. ed. Mineola, NY: Dover Publications, 2002, 571 s. ISBN 04-864-2225-9.
- [27] GEBAUER, Petr, J. POSPÍCHAL a P. BOČEK. Measurement of mobilities and dissociation constants by capillary isotachopheresis. *Chemical Reviews*. 1989, roč. 89, č. 2, s. 419-430. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr00092a011. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00092a011>
- [28] HIROKAWA, T., M. NISHINO, N. AOKI, Y. KISO, Y. SAWAMOTO, T. YAGI a J. AKIYAMA. Table of isotachopheretic indexes. I. Simulated qualitative and quantitative indexes of 287 anionic substances in the range pH 3-10. *Journal of Chromatography*. 1983, roč. 271, č. 2, D1-D106. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)80225.
- [29] HIROKAWA, T. a Y. KISO. Complex-forming equilibria in isotachopheresis. II. Evaluation of stability constants of tartrate and citrate complexes. *Journal of Chromatography*. 1982, roč. 248, č. 3, s. 341-362. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)85045.
- [30] HIROKAWA, T., Y. KISO, B. GAŠ, I. ZUSKOVÁ a J. VACÍK. Simulated quantitative and qualitative isotachopheretic indexes of 73 amino acids and peptides in the pH range 6.4-10. *Journal of Chromatography*. 1993, roč. 628, č. 2. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80012-W.
- [31] DE BOER, T., R. A. DE ZEEUW, G. J. DE JONG a K. ENSING. Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis. *Electrophoresis*. 2000, roč. 21, č. 15, s. 3220-3239. ISSN 0173-0835. DOI: 10.1002/1522-2683(20000901).
- [32] NUCHTAVORN, N. a L. SUNTORNSUK. Simultaneous Analysis of Biologically Active Pyridines in Pharmaceutical Formulations by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science*. 2012, roč. 50, č. 2, s. 151-156. ISSN 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/bmr037. Dostupné z: <http://chromsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/chromsci/bmr037>

- [33] KOVAL, D., V. KAŠIČKA a I. ZUSKOVÁ. Investigation of the effect of ionic strength of Tris-acetate background electrolyte on electrophoretic mobilities of mono-, di-, and trivalent organic anions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2005, roč. 26, č. 17, s. 3221-3231. ISSN 0173-0835. DOI: 10.1002/elps.200500260. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200500260>
- [34] TSAI, P., B. PATEL a C.S. LEE. Direct control of electroosmosis and retention window in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytical Chemistry*. 1993, roč. 65, č. 10, s. 1439-1442. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00058a022. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00058a022>
- [35] DOLNÍK, V. a K.M. HUTTERER. Capillary electrophoresis of proteins 1999-2001. *Electrophoresis*. 2001, roč. 22, č. 19, s. 4163-4178. ISSN 0173-0835.
- [36] TSUDA, T. Electrochromatography using high applied voltage. *Analytical Chemistry*. 1987, roč. 59, č. 3, s. 521-523. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00130a032.
- [37] BECKERS, J.L., F.M. EVERAERTS a M.T. ACKERMANS. Determination of absolute mobilities, pK values and separation numbers by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1991, roč. 537, 1-2, s. 407-428. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88914-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301889147>
- [38] KAŠIČKA, V. Theoretical basis and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 1997, roč. 91, č. 5, s. 320-329. ISSN 0009-2770.
- [39] *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, s. 180-209. ISBN 80-246-0852-9.
- [40] STÄDELER, G. Ueber die Farbstoffe der Galle. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1864, roč. 132, č. 3, s. 323-354. ISSN 00754617. DOI: 10.1002/jlac.18641320311. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlac.18641320311>
- [41] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby: Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 123 s. ISBN 978-802-4723-518.
- [42] TALAFANT, E. Properties and composition of the bile pigment giving a direct diazo reaction. *Nature*. London: Nature Publishing Group, 1956, roč. 178, č. 4528, s. 312. ISSN 0028-0836.
- [43] KUENZLE, C. C., M. H. WEIBEL, R. R. PELLONI a P. HEMMERICH. Structure and conformation of bilirubin: Opposing views that invoke tautomeric equilibria, hydrogen bonding and a betaine may be reconciled by a single resonance hybrid. *The biochemical journal*. 1973, roč. 133, č. 2, s. 364-368. ISSN 0264-6021.
- [44] MURRAY, R. K., D. K. GRANNER, P. A. MAYES a V. W. RODWELL. *Harperova biochemie*. 23. vyd. Jinočany: H+H, 2002, 872 s. ISBN 80-731-9013-3.
- [45] BERK, P. D., F. L. RODKEY, T. F. BLASCHKE, H. A. COLLISON a J. G. WAGGONER. Comparison of plasma bilirubin turnover and carbon monoxide production in man. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1974, roč. 83, č. 1, s. 29-37. ISSN 0022-2143.
- [46] KUTTY, R. K. a M. D. MAINES. Oxidation of heme c derivatives by purified heme oxygenase: Evidence for the presence of one molecular species of heme oxygenase in the rat liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1982, roč. 257, č. 17, s. 9944-9952. ISSN 0021-9258.
- [47] SERRANO, M. A., J. E. BAYÓN, L. PASCOLO, C. TIRIBELLI, J.D. OSTROW, J. GONZALEZ-GALLEGO a J. J. G. MARIN. Evidence for Carrier-mediated Transport of Unconjugated Bilirubin Across Plasma Membrane Vesicles from Human Placental Trophoblast. *Placenta*. 2002, roč. 23, č. 7, s. 527-535. ISSN 01434004. DOI: 10.1053/plac.2002.0838. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400402908386>
- [48] BARANANO, D. E., E. DAVID, M. RAO, C. D. FERRIS, D. CHRISTOPHER a S. H. SNYDER. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, roč. 99, č. 25, s. 16093-16098. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.252626999. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.252626999>

- [49] GOESSLING, W. a S. D. ZUCKER. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *American Journal of Physiology*. 2000, roč. 279, č. 2, G356-G365. ISSN 0002-9513.
- [50] BERDE, C. B., B. S. HUDSON, R. D. SIMONI a L. A. SKLAR. Human serum albumin: Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin. *Journal of Biological Chemistry*. 1979, roč. 254, č. 2, s. 391-400. ISSN 0021-9258.
- [51] WOLKOFF, A. W., C. A. GORESKY, J. SELLIN, Z. GATMAITAN a I. M. ARIAS. Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver. *0002-9513*. 1979, roč. 236, č. 6, E638-E648.
- [52] FEVERY, J., B. V. DAMME, R. MICHIELS, J. D. GROOTE a K. P. M. HEIRWEGH. Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease. *Journal of Clinical Investigation*. 1972-09-1, roč. 51, č. 9, s. 2482-2492. ISSN 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI107062. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/107062>
- [53] BROWN, S. B. a R. F. KING. The mechanism of haem catabolism: Bilirubin formation in living rats by [¹⁸O]oxygen labelling. *The Biochemical journal*. 1978, roč. 170, č. 2, s. 297-311. ISSN 0264-6021.
- [54] GUSTAFSSON, B. E. a L. S. LANKE. Bilirubin and urobilins in germfree, ex-germfree, and conventional rats. *The Journal of experimental medicine*. 1960, č. 112, s. 975-981. ISSN 0022-1007.
- [55] VÍTEK, L. a J. D. OSTROW. Bilirubin Chemistry and Metabolism; Harmful and Protective Aspects. *Current Pharmaceutical Design*. 2009, roč. 15, č. 25, s. 2869-2883. ISSN 1381-6128. DOI: 10.2174/138161209789058237. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- [56] OSTROW, J. *Bile pigments and jaundice: molecular, metabolic, and medical aspects*. New York: Dekker, 1986, s. 7-29. ISBN 0824774280.
- [57] OSTROW, J. D. a P. MUKERJEE. Revalidation and rationale for high pKa values of unconjugated bilirubin. *BMC Biochemistry*. 2007, roč. 8, č. 1, s. 7. ISSN 14712091. DOI: 10.1186/1471-2091-8-7. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/8/7>
- [58] AZIZ, S., S. ANJUM, A. U. REHMAN, S. ATA-UR-REHMAN, D. S. AKRAM, S. A. A. NAQVI a S. A. H. RIZVI. Bilirubin pigments in the first meconium of newborn infants. *The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2005, roč. 55, č. 5, s. 188-192. ISSN 0030-9982.
- [59] MCDONAGH, A. F. a D. A. LIGHTNER. Phototherapy and the photobiology of bilirubin. *Seminars in liver disease*. 1988, roč. 8, č. 3, s. 272-283. ISSN 0272-8087.
- [60] BONNETT, R., J. E. DAVIES, M. B. HURSTHOUSE a G. M. SHELDRIK. The structure of bilirubin. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*. 1978, roč. 202, č. 1147, s. 249-268. ISSN 0080-4649.
- [61] MANITTO, P. a D. MONTI. Free-energy barrier of conformational inversion in bilirubin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1976, č. 4, s. 122-123. ISSN 0022-4936. DOI: 10.1039/c39760000122. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c39760000122>
- [62] BRODERSEN, R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid. *The Journal of biological chemistry*. 1079, roč. 254, č. 7, s. 2364-2369. ISSN 0021-9258.
- [63] FALK, Heinz. *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*. Wien: Springer-Verlag, 1989. ISBN 32-118-2125-2.
- [64] TIRIBELLI, C. a J. D. OSTROW. New concepts in bilirubin and jaundice: report of the Third International Bilirubin Workshop, April 6-8, 1995, Trieste, Italy. *Hepatology*. 1996, roč. 24, č. 5, s. 1296-1311. ISSN 0270-9139.
- [65] COLE, K. D. a G. H. LITTLE. UDP-glucuronosyltransferase activity and bilirubin conjugation in the bullfrog. *Biochemical Journal*. 1983, roč. 212, č. 2, s. 265-269. ISSN 0306-3275.

- [66] OSTROW, J. D., P. MUKERJEE a C. TIRIBELLI. Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function. *Journal of Lipid Research*. 1994, roč. 35, č. 10, s. 1715-1737. ISSN 0022-2275.
- [67] ZUCKER, S. D., W. GOESSLING a A. G. HOPPIN. Unconjugated Bilirubin Exhibits Spontaneous Diffusion through Model Lipid Bilayers and Native Hepatocyte Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, roč. 274, č. 16, s. 10852-10862. ISSN 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.274.16.10852. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.16.10852>
- [68] OSTROW, J. D., L. PASCOLO, D. BRITES a C. TIRIBELLI. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends in Molecular Medicine*. 2004, roč. 10, č. 2, s. 65-70. ISSN 1471-4914. DOI: 10.1016/j.molmed.2003.12.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491403002752>
- [69] JACOBSEN, J. a R. BRODERSEN. Albumin-bilirubin binding mechanism: Kinetic and spectroscopic studies of binding of bilirubin and xanthobilirubic acid to human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*. 1983, roč. 258, č. 10, s. 6319-6326. ISSN 0021-9258.
- [70] GOESSLING, W. a S. D. ZUCKER. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *American Journal of Physiology*. 2000, roč. 279, č. 2, G356-G365. ISSN 0002-9513.
- [71] BRODERSEN, R. Physical chemistry of bilirubin: binding to macromolecules and membranes. *Bilirubin*. 1982, č. 1, s. 75-123.
- [72] BOIADJIEV, S. E., K. WATTERS, S. WOLF, B. N. LAI, W. H. WELCH, A. F. MCDONAGH a D. A. LIGHTNER. PKa and Aggregation of Bilirubin: Titrimetric and Ultracentrifugation Studies on Water-Soluble Pegylated Conjugates of Bilirubin and Fatty Acids. *Biochemistry*. 2004, roč. 43, č. 49, s. 15617-15632. ISSN 0006-2960. DOI: 10.1021/bi0481491. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi0481491>
- [73] HAHM, J. S., J. D. OSTROW, P. MUKERJEE a L. CELIC. Ionization and self-association of unconjugated bilirubin, determined by rapid solvent partition from chloroform, with further studies of bilirubin solubility. *Journal of Lipid Research*. 1992, roč. 33, č. 8, s. 1123-1137. ISSN 0022-2275.
- [74] OSTROW, J. D. a P. MUKERJEE. Revalidation and rationale for high pKa values of unconjugated bilirubin. *BMC Biochemistry*. 2007, roč. 8, č. 1, s. 7. ISSN 1471-2091. DOI: 10.1186/1471-2091-8-7. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/8/7>
- [75] OSTROW, J. D., L. CELIC a P. MUKERJEE. Molecular and micellar associations in the pH-dependent stable and metastable dissolution of unconjugated bilirubin by bile salts. *Journal of Lipid Research*. 1988, roč. 29, č. 3, s. 335-348. ISSN 0022-2275.
- [76] MUKERJEE, P., J. D. OSTROW a C. TIRIBELLI. Low solubility of unconjugated bilirubin in dimethylsulfoxide-water systems: implications for pKa determinations. *BMC Biochemistry*. 2002, č. 3, s. 17. ISSN 1471-2091.
- [77] OSTROW, J. D. a P. MUKERJEE. Solvent partition of ¹⁴C-unconjugated bilirubin to remove labeled polar contaminants. *Translational Research*. 2007, roč. 149, č. 1, s. 37-45. ISSN 19315244. DOI: 10.1016/j.trsl.2006.07.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524406002945>
- [78] MUKERJEE, P. a J. D. OSTROW. Review: bilirubin pKa studies: new models and theories indicate high pKa values in water, dimethylformamide and DMSO. *BMC Biochemistry*. 2010, č. 11, s. 12. DOI: 10.1186/1471-2091-11-16.
- [79] KOLOSOV, I. V. a E. P. SHAPOVALENKO. Study of acid-base equilibriums in aqueous solutions of bilirubin by the method of solubility. *Zhurnal Obshchei Khimii*. 1977, roč. 47, č. 9, s. 2155-2156. ISSN 0044-460X.
- [80] GRAY, C. H., A. KULCZYCKA a D. C. NICHOLSON. Chemistry of the bile pigments. Part IV. Spectrophotometric titration of the bile pigments. *Journal of the Chemical Society*. 1961, č. 1, s. 2276-2285. ISSN 0368-1769. DOI: 10.1039/jr9610002276. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=jr9610002276>

- [81] RUSSELL, M. P., S. J. COULTHURST, J. N. MOORE a R. E. HESTER. Resonance Raman study of the chromophore-specific vibrational and electronic of bilirubin. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 1995, roč. 91, č. 12, s. 1751-1757. ISSN 0956-5000. DOI: 10.1039/ft9959101751. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=ft9959101751>
- [82] OVERBEEK, J. T. G., C. L. J. VINK a H. DEENSTRA. Solubility of bilirubin. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas et de la Belgique*. 1955, č. 74, s. 81-84. ISSN 0370-7539.
- [83] MA, J. S., F. YAN, C. Q. WANG a J. H. CHEN. Addition of sodium bisulfite to biliverdin. *Chinese Chemical Letters*. 1990, roč. 1, č. 2, s. 171-172. ISSN 1001-8417.
- [84] LEE, J. J., L. H. DALY a M. L. COWGER. Bilirubin ionic equilibria: their effects on spectra and on conformation. *0034-5164*. 1974, roč. 9, č. 4, s. 763-770.
- [85] HANSEN, P. E., H. THIESSEN a R. BRODERSEN. Bilirubin acidity. Titrimetric and ¹³C NMR studies. *Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry*. 1979, roč. 33, č. 4, s. 281-293. ISSN 0302-4369.
- [86] LIGHTNER, D. A., D. L. HOLMES a A. F. MCDONAGH. On the acid dissociation constants of bilirubin and biliverdin. pKa values from ¹³C NMR spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*. 1996, roč. 271, č. 5, s. 2397-2405. ISSN 0021-9258.
- [87] REHAK, N. N., S. A. CECCO a G. L. HORTIN. Photolysis of bilirubin in serum specimens exposed to room lighting. *Clinica Chimica Acta*. 2008, roč. 393, č. 2, s. 131. ISSN 0009-8981. DOI: 10.1016/j.cca.2008.03.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898108001198>
- [88] MCDONAGH, A. F. a F. ASSISI. Ready isomerization of bilirubin IX- α in aqueous solution. *Biochemical Journal*. 1972, roč. 129, č. 3, s. 797-800. ISSN 0264-6021.
- [89] TAN, K. L. The pattern of bilirubin response to phototherapy for neonatal hyperbilirubinaemia. *Pediatric research*. 1982, roč. 16, č. 8, s. 670-674. ISSN 0031-3998.
- [90] LYONS, M. A., R. SHUKLA, K. ZHANG, G. J. PYNE, M. SINGH, S. J. BIEHLE a J. F. CLARK. Increase of metabolic activity and disruption of normal contractile protein distribution by bilirubin oxidation products in vascular smooth-muscle cells. *Journal of Neurosurgery*. 2004, roč. 100, č. 3, s. 505-511. ISSN 0022-3085. DOI: 10.3171/jns.2004.100.3.0505. Dostupné z: <http://thejns.org/doi/abs/10.3171/jns.2004.100.3.0505>
- [91] MILLER, J. N. a J. C. MILLER. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5th ed. Harlow (England): Pearson Prentice Hall, 2005, s. 39-73. ISBN 0 131 29192 0.
- [92] ČERNÁ, K. *Stanovení disociačních konstant a limitních pohyblivostí vybraných profenů metodou kapilární zónové elektroforesy*. Praha, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie. Vedoucí práce Zusková, I.