UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Mária Kanásová

SEPARÁCIA TOXIKOLOGICKY VÝZNAMNÝCH ŠPÉCIÍ ARZÉNU PRE ŠPECIAČNÚ ANALÝZU POMOCOU RP-HPLC-ICP-MS

Separation of toxicologically relevant arsenic species for speciation analysis by RP-HPLC-ICP-MS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultanti: doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.; Inga Petry-Podgórska, Ph.D.

Praha 2013

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

Prohlášení

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

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

V Praze dne 28.5.2013 .....

Mária Kanásová

Abstrakt

Cieľom tejto práce bolo previesť prvotné experimenty separácie toxikologicky významných špécií arzénu v komplexoch s peptidmi pomocou kombinovanej techniky využívajúcej vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu na obrátených fázach v spojení s hmotnostnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (RP-HPLC-ICP-MS). Pre separáciu bola použitá C_{18} chromatografická kolóna a gradientová elúcia mobilnej fázy, ktorá obsahovala 0,1% kyselinu mravčiu a premenné zastúpenie acetonitrilu. Separácia jednoduchých arzénových špécií – arzenitanu (As(III)), arzeničnanu (As(V)), metylarzenitanu (MA(III)), metylarzeničnanu (MA(V)), dimetylarzenitanu (DMA(III)) a dimetylarzeničnanu (DMA(V)) bola za týchto podmienok neúspešná. Lepšie výsledky boli získané separáciou zložitejších arzénových špécií – arzén triglutatiónu (ATG), metylarzén diglutatiónu (MADG) a dimetylarzén glutatiónu (DMAG), kedy sa za použitia vyššieho obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze podarilo zaznamenať niekoľko chromatografických píkov zložitejších arzénových špécií. Bola taktiež prevedená analýza dvoch in vitro metylačných zmesí, obsahujúcich arzenitan (As(III)), S-(5'-adenozyl)metionín chlorid (SAM), tris(2-karboxyetyl)fosfán (TCEP) a enzým arzén(3+)metyltransferáza (AS3MT) pravdepodobne sa zúčastňujúci metabolizmu anorganického arzénu v ľudskom tele. V jednej zo zmesí bol taktiež prítomný glutatión (GSH). Analýzou oboch zmesí bolo získaných niekoľko chromatografických píkov zložitejších špécií, ktoré boli eluované za použitia vysokého obsahu organickej zložky v mobilnej fáze. V budúcnosti bude nutné jednotlivé špécie ďalej charakterizovať.

Kľúčové slová:

Arzén, špeciačná analýza, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach, hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou.

Abstract

The thesis is mapping possibilities of separation of toxicologically relevant arsenic species complexed with peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (RP-HPLC-ICP-MS). The C_{18} chromatography column and gradient elution of the mobile phase (0,1% formic acid with gradient of acetonitrile) was used. At these conditions the separation of simple arsenic species – arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), monomethylarsenic acid (MA(III)), monomethylarsenous acid (MA(V)), dimethylarsenic acid (DMA(III)) and dimethylarsenous acid (DMA(V)) was not successful. However, separation of arsenic--glutathione complexes – arsenic triglutathione (ATG), methylarsenic diglutathione (MADG) and dimethylarsenic glutathione (DMAG) was obtained. Several chromatographic peaks were observed at higher concentration of acetonitrile in mobile phase. The analysis of two in vitro methylation mixtures was also examined. Mixtures contained arsenite (As(III)), S-(5'-adenosyl)methionine chloride (SAM), tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and arsenic(3+)methyltrasferase enzyme (AS3MT) probably participating in human arsenic metabolism. Second mixture also included glutathione (GSH). Several chromatographic peaks of complex species were obtained by analyzing these mixtures (eluted with higher content of organic component in mobile phase). Thus, separation was successful, but the further characterization of individual species is necessary.

Key words:

Arsenic, speciation analysis, reversed-phase high-performance liquid chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry.

Poďakovanie

Na tomto mieste by som rada poďakovala pánovi RNDr. Tomášovi Matouškovi, Ph.D. a pani Inge Pétry-Podgorskej, Ph.D. za odborné vedenie pri experimentálnej činnosti, cenné rady, kritické pripomienky a čas, ktorý mi venovali pri vypracovávaní bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať pánovi doc. RNDr. Petrovi Rychlovskému, CSc. za všestrannú pomoc. Moja vďaka patrí taktiež celému vedeckému tímu z Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za umožnenie spolupráce.

Ďakujem pánom Williamovi Cullenovi, Ph.D. a Ing. Liborovi Havlíčkovi, CSc. za prípravu štandardných látok a pánovi Miroslavovi Stýblovi, Ph.D. za prípravu enzýmu.

Veľká vďaka patrí aj mojej rodine za ich podporu a umožnenie štúdia na vysokej škole.

Obsah

Zoznam skratiek a symbolov **8**
Úvod **9**
1. Teoretická časť **10**
1.1 Arzén 10
1. 1. 1 Toxicita 10
1. 1. 2 Toxikologicky významné špécie 11
1. 1. 3 Metabolizmus 12
1. 1. 3. 1 Klasická reduktívne – oxidatívna metylačná dráha navrhnutá Challengerom 12
1. 1. 3. 2 Metabolická dráha uvažujúca tvorbu komplexov arzénu s glutatiónom navrhnutá Hayakawom 12
1. 1. 3. 3 Nová metabolická dráha arzénu 13
1. 2 Špeciačná analýza arzénu 14
1. 2. 1 HPLC-ICP-MS 14
1. 2. 1. 1 Iónovo-výmenná chromatografia 15
1. 2. 1. 2 Chromatografia na obrátených fázach 15
1. 2. 2 Stabilita špécií 16
2. Experimentálna časť **18**
2.1 Použité chemikálie 18
2.2 Príprava štandardných roztokov 18
2.3 Príprava in vitro metylačných zmesí 20
2.4 Použité metódy merania 20
2.4.1 Prístrojové vybavenie 20
2.4.2 Experimentálne usporiadanie 21
2.4.3 Mobilná fáza 22
2.5 Spracovanie nameraných dát 22
3. Výsledky a diskusia **23**
3.1 Sledovanie citlivosti detekcie pri rozličných percentuálnych zastúpeniach acetonitrilu v mobilnej fáze 23
3.2 Separácia štandardných roztokov jednoduchých arzénových špécií 24

3.2 Separácia roztokov komplexov arzénu s glutatiónom..... 24
3.4 Analýza in vitro metylačných zmesí 28
4. Záver 32
Zoznam použitej literatúry 33

Zoznam skratiek a symbolov

As(III)	arzenitan
As(V)	arzeničnan
AS3MT	arzén(3+)metyltransferáza
ATG	arzén triglutatión
DIV	deionizovaná voda
DMA(III)	dimetylarzenitan
DMA(V)	dimetylarzeničnan
DMAG	dimetylarzén glutatión
e^-	elektrón
GSH	glutatión
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
I (^{75}As)	intenzita signálu ^{75}As (cps)
I (^{34}S)	intenzita signálu ^{34}S (cps)
ICP-MS	hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou
IS	vnútorný štandard
MA(III)	metylarzenitan
MA(V)	metylarzeničnan
MADG	metylarzén diglutatión
M_r	relatívna molekulová hmotnosť
m/z	efektívna hmotnosť iónu
P (B)	percentuálne zastúpenie zložky B v zmesi (%)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxóniových iónov
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach
SAM	S-(5´-adenozyl)-L-metionín chlorid
t	čas (min)
T	teplota (°C)
TCEP	tris(2-karboxyetyl)fosfán
Tris HCl	tris(hydroxymetyl)aminometán hydrochlorid

Úvod

Toxicita arzénu a jeho zlúčenín je predmetom skúmania už od dôb prvých otráv. Súčasťou výskumu toxicity je nevyhnutnosť poznať metabolickú dráhu daného xenobiotika. Takmer pred pol storočím bol publikovaný mechanizmus metabolizmu arzénu v ľudskom tele, ktorý bol po dlhú dobu všeobecne prijímaný. V poslednej dobe však boli navrhnuté nové mechanizmy. Časť rozsiahleho výskumu skúmajúceho toxicitu arzénu sa teda zamerala na definovanie presnej biotransformačnej dráhy tohto prvku. Aby však bolo možné určiť produkty jednotlivých krokov metabolizmu, je nutné vyvinúť techniku schopnú separovať jednoduché aj zložitejšie arzénové špécie v biologických matriciach. Analýza týchto špécií bola skúmaná za rôznych podmienok s použitím rozličných metód. Za využitia iónovej chromatografie, metódy často využívanej pre špeciačnú analýzu arzénu, sa podarilo úspešne separovať jednoduché špécie. Separácia zložitejších špécií touto metódou však nebola úspešná. Logicky teda bolo navrhnuté použitie iných techník.

Predkladaná bakalárska práca mala za úlohu preskúmať možnosti separácie týchto zložitejších špécií arzénu za použitia kombinovanej techniky spájajúcej vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu na obrátených fázach s detekciou pomocou hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou.

1. Teoretická časť

1.1 Arzén

Arzén a jeho zlúčeniny hrali významnú rolu v ľudských životoch už od nepamäti. Do povedomia sa dostali ako liečivá, ale slávu si vyslúžili najmä ako známe jedy stredovekých travičov. Dnes sú skoro všetky liečivá obsahujúce arzén (okrem tých, ktoré sú využívané na liečbu akútnej promyelocytovej leukémie) nahradené menej toxickými látkami[1]. Preto sa s otravou arzénom stretávame menej často ako v minulosti a prevažne len v podobe chronických otráv. V poslednej dobe sa záujem o arzén opäť zvýšil najmä v dôsledku zistenia karcinogénnych účinkov anorganického arzénu obsiahnutého v pitnej vode na človeka[2]. Tieto účinky a ďalšie zdravotné problémy, ktoré zlúčeniny arzénu spôsobujú, majú následky na ľudstvo žijúce v oblastiach so zvýšeným obsahom arzénu v pitnej vode.

1. 1. 1 Toxicita

Jedna z najdôležitejších oblastí výskumu arzénu sa v súčasnosti venuje sledovaniu jeho metabolizmu a biotransformačných produktov[3]. V moči človeka chronicky vystaveného anorganickému arzénu boli nájdené organické metylované zlúčeniny arzénu – MA(III), MA(V), DMA(V) a DMA(III) a taktiež pozostatky nepremeneného anorganického arzénu – As(III) a As(V). Na základe týchto výsledkov bol obecne prijímaný fakt, že metylácia je hlavným procesom detoxifikačnej dráhy arzénu. Nedávne štúdie však dokázali, že za toxické účinky spojené s vystavením organizmu anorganickému arzénu môžu byť čiastočne zodpovedné práve trojmocné metylované metabolity[4].

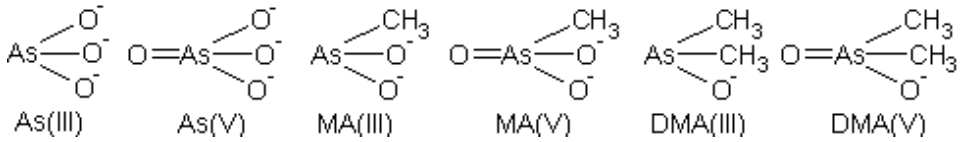
Je známe, že toxicita a biodostupnosť jednotlivých špécií arzénu závisí na ich chemickej forme a oxidačnom stave[5,6] a bolo dokázané, že toxicita jednotlivých špécií v ľudských hepatocytoch nasleduje poradie: MA(III) > DMA(III) = As(III) > As(V) > DMA(V) = MA(V)[7]. Trojmocné metylované špécie teda vykazujú vyššiu alebo rovnakú toxicitu ako samotný anorganický arzén a preto im môžeme pripísať úlohu v otravách indukovaných arzénom[8]. Tento poznatok potvrdzuje aj fakt, že trojmocné zlúčeniny

arzénu majú vyššiu afinitu pre tiolové skupiny proteínov obsiahnutých v orgánoch ako päťmocné metabolity[9].

Citlivosť na chronickú otravu arzénom sa však výrazne líši aj medzi jednotlivcami a vplyv má taktiež efektivita a spôsob metabolizmu[10]. Aby bolo možné tieto rozdiely skúmať a definovať, je nutné analyzovať jednotlivé metabolity v biologickej matrici. Taktiež je nevyhnutné objasniť metabolickú dráhu arzénu.

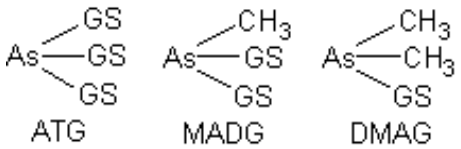
1. 1. 2 Toxikologicky významné špécie

Toxikologicky významné a z hľadiska výskumu metabolizmu relevantné špécie arzénu sú najmä biotransformačné produkty metabolizmu anorganického arzénu. Väčšina špécií arzénu sa vyskytuje v prírode a biologických vzorkách vo forme iónov[3], preto pre zjednodušenie uvažujeme ich deprotonizované formy. Štruktúrne vzorce jednotlivých špécií s príslušnými skratkami používanými v tejto práci sú uvedené na obrázku 1.1.



Obr. 1.1 Toxikologicky významné jednoduché špécie arzénu – zľava : arzenitan, arzeničnan, metylarzenitan, metylarzeničnan, dimetylarzenitan, dimetylarzeničnan[3].

Okrem týchto jednoduchých špécií arzénu vznikajú počas metabolizácie anorganického arzénu pravdepodobne aj komplexy arzénu s glutatiónom[11]. Tieto boli nájdené v žlči potkanov akútne vystavených (orálne alebo intravenózne) roztoku obsahujúcemu As(III), MA(III) a DMA(III) v destilovanej vode a ich význam je predmetom mnohých diskusí[12]. Schémy komplexov s príslušnými skratkami používanými v tejto práci sú uvedené na obrázku 1.2.



Obr. 1.2 Toxikologicky významné komplexy arzénu s glutatiónom – zľava : arzén triglutatión, metylarzén diglutatión, dimetylarzén glutatión[12].

1. 1. 3 Metabolizmus

Ako už bolo uvedené, metylácia je po dlhú dobu považovaná za detoxifikačný proces metabolizmu arzénu[4]. Predpokladá sa, že prebieha za pomoci enzýmu arzén(3+)metyltransferáza (AS3MT)[13]. V jeho prítomnosti a súčasnej prítomnosti darcu metylovej skupiny S-adenozylmetionínu (SAM) a kofaktoru glutatiónu (GSH) dochádza k formácií metylovaných trojmocných a päťmocných zlúčenín arzénu[5].

Aby bolo však možné aspoň čiastočne pochopiť princíp toxicity arzénu, je dôležité poznať presné metabolické dráhy tohto polokovu[14]. V súčasnosti sú navrhované tri mechanizmy: klasický mechanizmus z roku 1945 navrhnutý Challengerom[15], mechanizmus uvažujúci komplexy arzénu s glutatiónom navrhnutý v roku 2005 Hayakawaom[11] a nový mechanizmus navrhnutý Naranmandurom a Suzukim z roku 2006[9].

1. 1. 3. 1 Klasická reduktívne – oxidatívna metylačná dráha navrhnutá Challengerom

Donedávna všeobecne prijímaný mechanizmus biotransformácie anorganického arzénu uvažuje sériu redukcií a oxidácií spojených s metyláciou[15]. Najprv dochádza k redukcií As(V) na As(III), ktorý je v takejto podobe schopný podstúpiť oxidatívnu metyláciu, ktorej produktom je MA(V). Podobne dochádza k redukcií MA(V) na MA(III) a ďalšej oxidatívnej metylácií na DMA(V). Ten sa môže následne zas redukovať na DMA(III). Schéma metabolizmu je načrtnutá na obrázku 1.3.

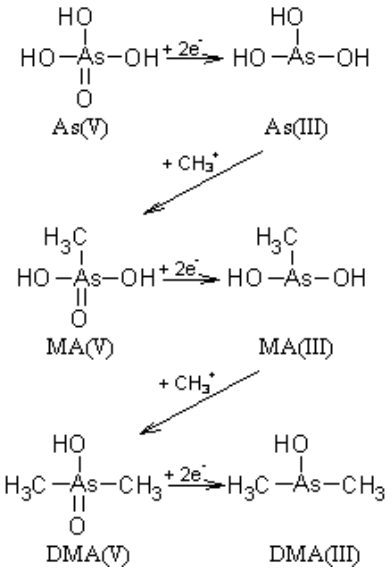
Tento mechanizmus je protichodný s poznatkami, ktoré boli v posledných rokoch nadobudnuté. Bolo totiž dokázané, že premena päťmocných špécií na trojmocné prebieha len s malou pravdepodobnosťou[16] a štúdie taktiež dokázali, že konečným produktom metabolizmu sú zrejme päťmocné špécie, ktoré boli vylučované močom vo väčšej miere ako trojmocné[14]. Ďalšie navrhnuté mechanizmy biotransformácie arzénu sa preto pokúšajú tieto nové poznatky zohľadniť.

1. 1. 3. 2 Metabolická dráha uvažujúca tvorbu komplexov arzénu s glutatiónom navrhnutá Hayakawom

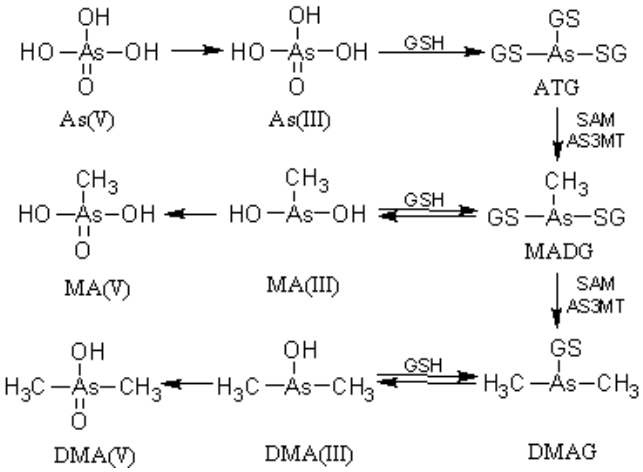
Táto metabolická dráha uvažuje vznik komplexov arzénu s glutatiónom, pričom glutatión považuje za povinnú zložku reakčnej zmesi, ktorá podporuje metyláciu

anorganického arzénu pomocou enzýmu AS3MT[11]. Predpokladá sa, že nukleofilná tiolová skupina arzénových komplexov (As-GS) atakuje kation síry SAM a tým sa metylová skupina zo SAM premiestni na komplexy arzénu s glutatiónom. Metyláciou komplexu ATG teda vzniká komplex MADG , ktorý môže byť ďalej metylovaný na DMAG. Tieto trojmocné komplexy arzénu sa považujú za veľmi nestabilné a preto môžu byť oxidované na MA(V) a DMA(V), ktorý je hlavným metabolitom vyskytujúcim sa v moči živočíchov[5]. Mechanizmus je načrtnutý na obrázku 1.4.

Aj táto dráha sa stretla s určitými protinávrhmi. Autori jedného z nich preto navrhli nový mechanizmus biotransformácie anorganického arzénu.



Obr. 1.3 Schéma metabolizmu navrhnutá Challengerom (1945)[14].

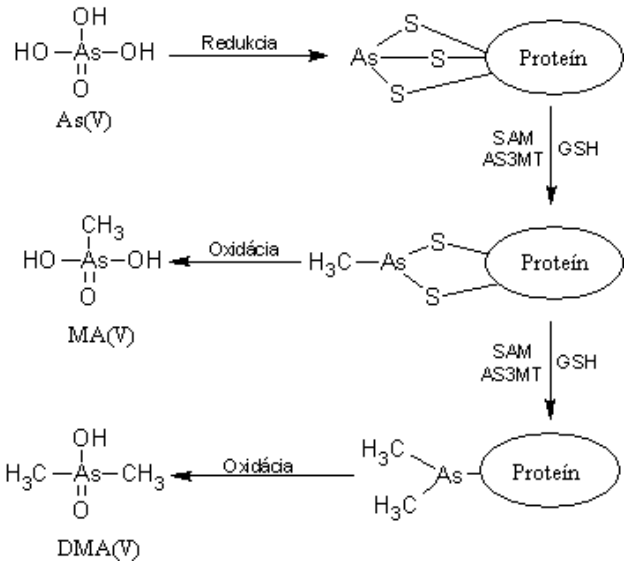


Obr. 1.4 Schéma metabolizmu navrhnutá Hayakawom (2005)[14].

1. 1. 3. 3 Nová metabolická dráha arzénu

Najnovší návrh metabolizmu arzénu je založený na skutočnosti, že trojmocný arzén má väčšiu afinitu k proteínom ako ku glutatiónu[5,9]. Je teda načrtnutá predstava, že sa v tele metabolizuje viazaný na proteíny. V tejto podobe dochádza k jeho postupnej metylácií enzýmom AS3MT v prítomnosti GSH a SAM[9]. Po vstupe As(III) do tela dochádza pravdepodobne k väzbe na proteín a následne k reduktívnej metylácií konjugáciou s tiolovými skupinami cysteínových rezíduí. Týmto spôsobom postupne vznikajú zložité mono- a dimetylované špécie arzénu, ktorých oxidáciou vznikajú konečné produkty – päťmocné metabolity MA(V) a DMA(V) prítomné v ľudskom

moči[5]. Schéma metabolizmu je zobrazená na obrázku 1.5.



Obr. 1.5 Schéma metabolizmu navrhnutá Naranmandurom a Suzukim (2006)[14].

1. 2 Špeciačná analýza arzénu

V prírode a v biologických systémoch sú prítomné skoro dva tucty arzénových špécií líšiace sa vlastnosťami a toxicitou[17]. V dôsledku týchto odlišností, je nutné tieto špécie stanovovať individuálne a nie ako celok. K tomuto dobre slúži špeciačná analýza, ktorá je v analytickej chémií definovaná ako identifikácia a/alebo určovanie množstva jednej alebo viacerých individuálnych chemických špécií vo vzorku[18], a ktorá za posledné desaťročia zaznamenala významný pokrok[17]. Boli vyvinuté hlavne kombinované techniky spojujúce efektívne separačné metódy s vysoko citlivými detekčnými metódami.

1. 2. 1 HPLC-ICP-MS

Kombinovanou technikou, ktorá v špeciačnej analýze arzénu zaznamenala najväčší úspech je spojenie vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) a hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS)[17]. Táto kombinácia metód je všestranne použiteľná pre analýzu organických aj anorganických zlúčenín arzénu[19]. Jej nevýhodou je však, že je možné používať len obmedzené druhy mobilnej fáze[3]. Metóda

HPLC totiž mnohokrát vyžaduje použitie vysokého obsahu organických zlúčenín, čo môže viesť k destabilizácií plazmy a následne k zníženiu detekčnej účinnosti detektoru.

Samotná detekcia pomocou ICP-MS ponúka množstvo výhod, ktorými sú napríklad nízke limity detekcie, široký dynamický rozsah, schopnosť stanovovať množstvo rôznych prvkov naraz a taktiež schopnosť určovať izotopové pomery[17, 20].

Techniky HPLC sú zas vysoko špecifické a schopné identifikovať široké spektrum arzénových špécií[10]. Sú teda veľmi univerzálne, čo je dané tým, že využívajú množstvo rôznych separačných mechanizmov a preto môžu byť použité pre separáciu rozličných analytov[21].

1. 2. 1. 1 Iónovo-výmenná chromatografia

Separačný mechanizmus používaný po dlhé roky a považovaný za štandardnú metódu pre separáciu anorganických a organických špécií arzénu je iónová výmena[22]. Základ metódy je v tom, že dochádza k interakcií medzi nabitými analytmi a iónmi viazanými na povrchu stacionárnej fáze[6]. Iónovo-výmenná chromatografia je teda používaná výhradne pre separáciu iónov a ionizovaných molekúl[19]. Veľkú úlohu tu hrá správna voľba mobilnej fázy, ktorej pH a iónová sila sú hlavné parametre ovplyvňujúce zadržiavanie analytov na kolóne[6]. Bolo dokázané, že separácia As(III), As(V), MA(V) a DMA(V) je úspešná na aniónovo-výmenných kolónach s použitím mobilnej fáze o vysokej hodnote pH. Naopak, pre separáciu MA(III) a DMA(III) je najvhodnejšie použiť katiónovo-výmennú kolónu a nízku hodnotu pH mobilnej fáze, pri ktorej tieto špécie tvoria katióny.

Raab et al. študovali chromatografické správanie komplexov arzénu s glutatiónom (ATG, MADG, DMAG)[22]. V rámci rôznych pokusov testovali aj separáciu týchto komplexov pomocou aniónovo-výmennej chromatografie s použitím bázickej a kyslej mobilnej fáze. Za použitia oboch podmienok dochádzalo k elúcií glutatiónu alebo individuálnych arzénových špécií a teda k rozkladu pôvodných komplexov. Pri analýze na katiónovo-výmennej kolóne neboli dosiahnuté žiadne významné poznatky, pretože takmer nedochádzalo k separácií.

1. 2. 1. 2 Chromatografia na obrátených fázach

Ďalšou separačnou technikou používanou pre špeciačnú analýzu arzénu v spojení

s ICP-MS je chromatografia na obrátených fázach. Jej podstatou je, že sa používa stacionárna fáza, ktorá je takmer nepolárna (uhľovodíkové reťazce C_4-C_{18} kovalentnými väzbami viazané na silikagél) a mobilná fáza, ktorá je polárna[20]. Je teda umožnené zadržiavanie menej polárnych a nenabitých analytov, ktorých vymytie z kolóny môžeme následne podporiť prídavkom nepolárnych organických rozpúšťadiel do mobilnej fázy.

Raab et al. testovali separáciu komplexov arzénu s glutatiónom aj pomocou chromatografie na obrátených fázach[22]. Jedinými separačnými podmienkami, ktoré umožnili separáciu všetkých troch komplexov na C_{18} kolóne, bolo použitie gradientovej elúcie mobilnej fázy, ktorú tvorila 0,1% kyselina mravčia a premenné percentuálne zastúpenie acetonitrilu. Rovnaké výsledky boli zaznamenané aj Yehiayan et al., ktorí pre separáciu použili C_8 kolónu[23]. Zistili však, že separácia jednoduchých arzénových špécií na kolónach s obrátenými fázami je problematická. Všetky špécie totiž boli vymývané bez zadržania a výnimku tvorili len DMA(III) a DMA(V).

Prídavok iónovo-párového činidla do mobilnej fázy umožňuje rozšírené využitie chromatografie na obrátených fázach na nabité analyty[20]. Takéto usporiadanie predstavuje samostatnú metódu, ktorá sa nazýva iónovo-párová chromatografia. Bežne používanými činidlami sú dlhé reťazce alkylových iónov alebo tetraalkylamóniové soli, ktoré sú na jednej strane nabité a ich druhý koniec je hydrofóbny, teda môže interagovať so stacionárnou fázou[19]. Prítomnosť týchto činidiel v mobilnej fáze umožňuje zadržiavanie nabitých analytov, ktoré s nimi tvoria iónové páry.

Pre separáciu jednoduchých arzénových špécií bol vyvinutý chromatografický systém používajúci tetrabutylamónium hydroxid ako iónovo-párové činidlo[24]. Tento systém v mobilnej fáze taktiež obsahuje kyselinu malonovú a metanol a za týchto podmienok je možné separovať As(III), As(V), MA(III), MA(V), DMA(III) a taktiež DMA(V) na kolóne na obrátených fázach.

Separácia komplexov arzénu s glutatiónom pomocou iónovo – párovej chromatografie doteraz nebola uskutočnená.

1. 2. 2 Stabilita špécií

Pri špeciačnej analýze arzénu je dôležité sledovať stabilitu špécií. Často totiž dochádza k ich rozkladu a premene na iné špécie, čo môže vyvolať problémy

pri analýze týchto zlúčenín. Preto je nutné správne zaobchádzať so vzorkami a venovať veľkú pozornosť aj ich skladovaniu.

Stabilita jednoduchých metylovaných arzénových špécií bola intenzívne sledovaná. Gong et al. pozorovali stabilitu MA(III) a DMA(III) v deionizovanej vode a v ľudskom moči[25]. Bolo zistené, že skladovanie pri nižších teplotách (T = –20 °C) spomaľuje premenu MA(III) na MA(V) a v menšej miere taktiež premenu DMA(III) na DMA(V). Zároveň bolo zistené, že vzorky v deionizovanej vode boli stabilnejšie ako vzorky v moči. Bol taktiež navrhnutý predpoklad, že pozorovaná vysoká nestabilita DMA(III) bola spôsobená nárastom elektrónovej hustoty špécie v dôsledku prítomnosti metylových skupín a teda vyššej tendencie tejto špécie sa oxidovať.

Currier et al. skúmali stabilitu týchto špécií v pečeňových bunkách myší[26]. Zistili, že tieto špécie skladované pri teplote až –80 °C sú v tomto prostredí veľmi stabilné. Na stabilitu trojmocných metylovaných špécií má teda veľký vplyv teplota skladovania a matrica, v ktorej sa analyt nachádza[25].

Dôležitý je taktiež výskum stability komplexov arzénu s glutatiónom. Význam má najmä sledovanie stability týchto špécií v žlči, do ktorej sú vylučované. Kobayashi et al. dospeli k záveru, že ATG a MADG sú v žlči nestabilné a dochádza k ich hydrolýze na As(III) a MA(III)[27]. Taktiež zistili, že prítomnosť glutatiónu v reakčnej zmesi výrazne podporuje stabilitu týchto špécií[22,27,28]. Stabilita komplexov bola skúmaná taktiež pri rôznych hodnotách pH[23]. Yehiayan et al. pozorovali, že komplexy sú veľmi nestabilné a najstabilnejšie boli za použitia nízkej hodnoty pH pufru, v ktorom boli pripravené. Taktiež zistili, že DMAG vykazoval najväčšiu stabilitu, zatiaľ čo TAG najnižšiu. Bol teda pozorovaný opačný trend ako pri sledovaní stability jednoduchých arzénových špécií. Ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje stabilitu komplexov je ich samotná koncentrácia[28]. Výskum ukázal, že zvýšenie stability TAG môže byť dosiahnuté zvýšením jeho koncentrácie.

Všetky tieto experimenty ukázali, že so vzorkami obsahujúcimi arzénové špécie, je nutné zaobchádzať veľmi opatrne[22]. Aby sme mohli očakávať úspešnú detekciu, je nutné vzorky neustále chladiť, udržovať v prostredí o nízkej hodnote pH a hlavne analyzovať čo najskôr, ako je to možné.

2. Experimentálna časť

2.1 Použité chemikálie

- Deionizovaná voda (DIV; z prístroja Ultrapure (Watrex, USA))
- Kyselina mravčia, 98% p. a. (HCOOH; M_r = 46,03; Penta, Česká Republika)
- Kyselina dusičná, 65% (HNO_3; M_r = 63,01; Merck, Nemecko)
- Hydroxid draselný, chemicky čistý (KOH; M_r = 56,11; Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika)
- Acetonitril, min. 99,9% (C_2H_3N; M_r = 41,05; Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán hydrochlorid, ≥ 99,0% (Tris HCl; $NH_2C(CH_2OH)_3$. HCl; M_r = 157,60; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Tris(2-karboxyetyl)fosfán (TCEP; $C_9H_{15}O_6P$; M_r = 286,60; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Glutatión (GSH; $C_{10}H_{17}N_3O_6S$; M_r= 307,32; Sigma-Aldrich, Nemecko)
- S-(5´-adenozyl)-L-metionín chlorid (SAM; $C_{15}H_{23}CN_6O_5S$; M_r = 434,90; Sigma--Aldrich, Nemecko)
- Arzén(3+)metyltransferáza (AS3MT; pripravené skupinou Miroslava Stýbla, Ph.D. z Univerzity v Severnej Karolíne,USA[29])
- Argón, 99,996 % (SIAD S.p.A., Česká Republika)
- Hélium, 99,998 % (SIAD S.p.A., Česká Republika)
- Kalibračný pH pufer, 4,01±0,02 (Mettler-Toledo, Švajčiarsko)
- Kalibračný pH pufer, 7,00±0,02 (Mettler-Toledo, Švajčiarsko)
- Triton ® X-100 (SERVA Electrophoresis, Nemecko)

2.2 Príprava štandardných roztokov

- Štandardné roztoky jednoduchých špécií arzénu o koncentráciách 20 μg L^{-1} a 40 μg L^{-1} boli pripravené riedením 0,1% kyselinou mravčou zo zásobných roztokov jednotlivých špécií:

* Zásobný roztok As(III) o koncentrácií 1000 mg L^{-1} bol pripravený rozpustením oxidu arzenitého (As_2O_3; M_r = 197,84; Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika) v 0,5 ml 10% roztoku hydroxidu draselného (M_r = 56,11; Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika) a doplnený DIV.

* Zásobný roztok As(V) o koncentrácií 1000 mg L^{-1} v kyseline dusičnej (0,5 mol L^{-1}) bol komerčný roztok (As_2O_5; M_r = 229,84; Merck, Nemecko) pripravený na použitie.

* Zásobný roztok MA(III) o koncentrácií 1000 mg L^{-1} bol pripravený z oxidu metylarzenitého ($(CH_3AsO)_4$; M_r = 105,95; syntetizovaný Williamom Cullenom, Ph.D. z Univerzity Britskej Kolumbie, Kanada[30]) v DIV vždy tesne pred analýzou.

* Zásobný roztok MA(V) o koncentrácií 1000 mg L^{-1} bol pripravený z hexahydrátu metylarzeničnanu disodného (($Na_2CH_3AsO_3$. 6 H_2O; M_r = 291,99; Chem Service, Inc., USA) v DIV.

* Zásobný roztok DMA(III) o koncentrácií 100 mg L^{-1} bol pripravený vždy tesne pred analýzou rozpustením presnej navážky dimetylarzén jodidu ($(CH_3)_2AsI$; M_r = 231,90; syntetizovaný Ing. Liborom Havlíčkom, CSc. z Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR, v.v.i.) v DIV a bol neustále držaný na ľade.

* Zásobný roztok DMA(V) o koncentrácií 1000 mg L^{-1} bol pripravený z kyseliny dimetylarzeničnej ($(CH_3)_2AsO(OH)$; M_r = 137,99; Chem Service, USA) v DIV.

- Roztoky komplexov ATG, MADG a DMAG o koncentrácií 100 µg L^{-1} v 0,1% kyseline mravčej boli pripravené vždy tesne pred analýzou riedením 0,1% kyselinou mravčou z roztokov o koncentráciách 100 mg L^{-1} pripravených navážením presného množstva jednotlivých komplexov (syntetizované Ing. Liborom Havlíčkom, CSc., z Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR, v.v.i., podľa publikovaného postupu[22,30,31]) a rozpustením v DIV. Výsledné roztoky aj medziroztoky boli neustále držané na ľade.
- Roztok telúru o koncentrácií 100 µg L^{-1} použitý ako vnútorný štandard (IS) bol pripravený riedením zásobného roztoku o koncentrácií 1000 mg L^{-1} (M_r = 127,60; BDH Prolabo, Anglicko) 0,2% kyselinou dusičnou.

2.3 Príprava in vitro metylačných zmesí

Zmesi na metyláciu As(III) pomocou enzýmu AS3MT boli pripravené podľa postupu Ding et al.[29]. Bolo napipetovaných 74 µL Tris HCl pufru o pH 7,41; 1 µL reduktantu TCEP a 14 µL enzýmu AS3MT. Zmes bola dôkladne premiešaná a inkubovaná pri teplote 37 °C po dobu 10 minút. Následne boli do reakčnej zmesi pridané ďalšie zložky v nasledujúcom poradí: 1 µL GSH podporujúceho metyláciu[2] (len v prípade zmesi A), 10 µL SAM - darcu metylovej skupiny, a 5 µL As(III) o koncentrácií 1,5 mg L^{-1}. Reakčná zmes bola udržovaná pri teplote 37 °C po dobu 2 hodín. Okamžite po inkubácií bola okyslená prídavkom 10 µL 10% kyseliny mravčej a bola neustále držaná na ľade. Takto pripravené zmesi boli analyzované v čo najkratšej dobe po ich príprave.

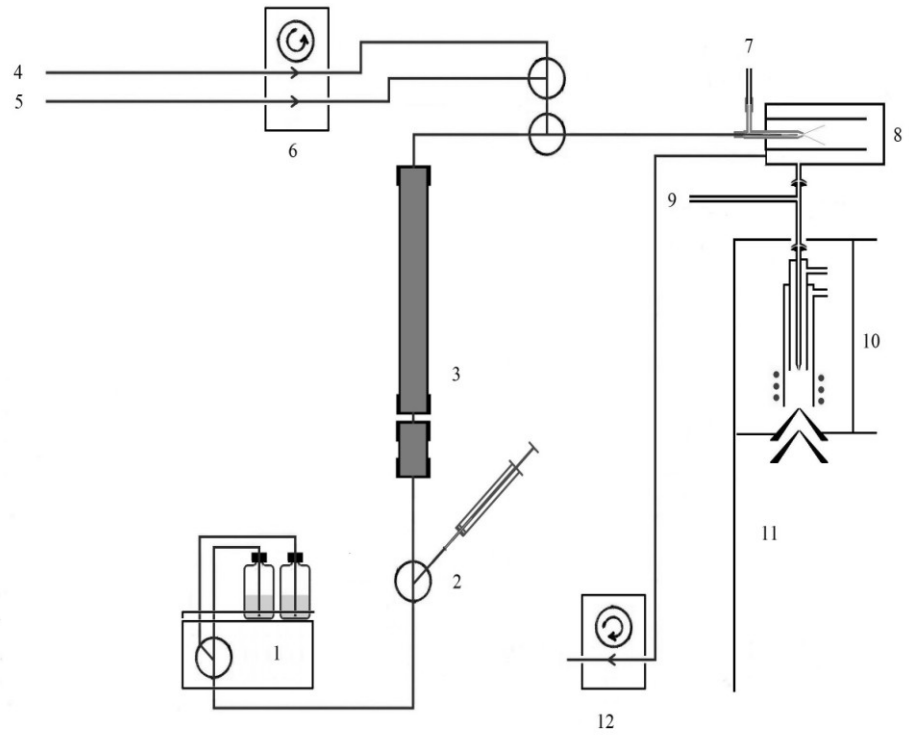
2.4 Použité metódy merania

2.4.1 Prístrojové vybavenie

- Separačná kolóna s predkolónou Aeris™ 3,6 µm XB-C_{18} 100 Å, o veľkosti 250 x 2,10 mm (Phenomenex, USA)
- HPLC pumpa 1200 Series, Quaternary Pump (Agilent Technologies, USA)
- Hmotnostný spektrometer s indukčne viazanou plazmou 7700 Series (Agilent Technologies, USA)
- Autosampler ASX-500 Series (Agilent Technologies, USA)
- Injekčný šesťcestný ventil 7725i s dávkovacou slučkou z nerezovej ocele (Rheodyne, USA)
- Analytické váhy R160P, s presnosťou na 0,00001 g (Sartorius, Nemecko)
- Predvážky 600-2M, s presnosťou na 0,01 g (KERN, Nemecko)
- pH meter, Seven easy pH (Mettler-Toledo, Švajčiarsko)
- pH membránová elektróda, InLab®413 pH (Mettler-Toledo, Švajčiarsko)
- Magnetická miešačka lab disc (IKA®, Nemecko)
- Systém na čistenie vody Ultrapure (Watrex, USA)
- Automatické pipety (Biohit, Fínsko)

2.4.2 Experimentálne usporiadanie

Mobilná fáza bola čerpaná na kolónu pomocou HPLC binárnej pumpy s manuálnym injekčným ventilom (rýchlosťou 0,25 mL min^{-1}), cez ktorý boli vstrekované jednotlivé vzorky. Pred vstupom do ICP-MS systému bola pred zhmlovačom riedená DIV s prietokom 0,66 mL min^{-1} a IS (100 µg L^{-1} Te v 0,2% kyseline dusičnej) s prietokom 0,05 mL min^{-1}. Schéma systému je zobrazená na obrázku 2.1. Použité podmienky merania sú zhrnuté v tabuľke 2.1.



Obr. 2.1 Schéma použitého HPLC-ICP-MS systému (1 – HPLC pumpa, 2 – injekčný šesťcestný ventil, 3 – separačná kolóna s predkolónou, 4 – prívod DIV, 5 – prívod IS, 6 – peristaltická pumpa, 7 – zhmlovač, 8 – hmlová komora, 9 – prívod riediaceho plynu, 10 – plazmový horák, 11 – ICP-MS spektrometer, 12 – peristaltická pumpa odvádzajúca odpad).

Tab. 2.1 Podmienky merania použité pri analýze.

HPLC	
Kolóna	Aeris™ 3,6 µm XB-C_{18} 100 Å, o veľkosti 250 x 2,10 mm (Phenomenex, USA)
Prietoková rýchlosť mobilnej fázy	0,25 mL min^{-1}
Dávkovaný objem vzorku	30 µL
ICP-MS	
Vnútorný štandard	100 µg L^{-1} Te v 0,2% kyseline dusičnej
Príkon do plazmy	1600 W
Priemer injektoru plazmového horáku (pre organické rozpúšťadlá)	1,50 mm
Prietok nosného plynu (argón)	0,60 L min^{-1}
Prietok riediaceho plynu	0,25 L min^{-1}
Prietok vnútorného štandardu	0,05 mL min^{-1}
Prietok kolízneho plynu (hélium)	3,50 mL min^{-1}

2.4.3 Mobilná fáza

Pre analýzu bola použitá gradientová elúcia mobilnej fázy, ktorú tvorili 0,1% kyselina mravčia a 80% acetonitril. Gradientový program bol vopred optimalizovaný a je zobrazený v tabuľke 2.2.

Tab. 2.2 Program gradientovej elúcie mobilnej fázy použitý pri meraní na kolóne Aeris (Phenomenex, USA), roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril.

t min	Obsah A obj. %	Obsah B obj. %
0,0	100	0
5,0	100	0
20,0	75	25
25,0	100	0
35,0	100	0

2.5 Spracovanie nameraných dát

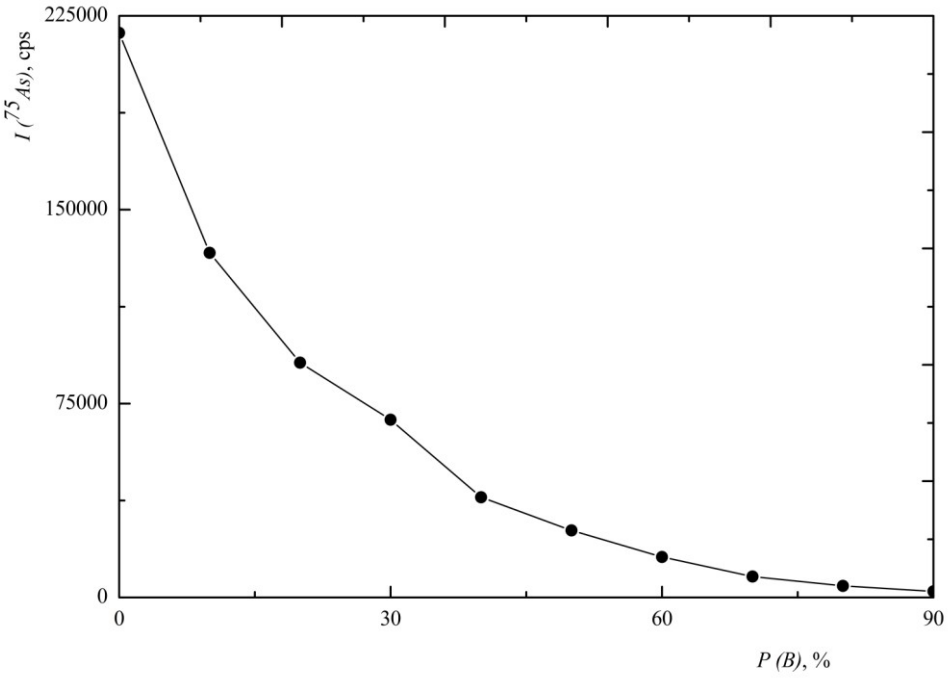
Namerané signály boli zaznamenávané pomocou počítačového softwaru MassHunter Workstation (Agilent Technologies, USA), v ktorom boli ihneď integrované. Následne boli dáta exportované do programu OriginPro 8.5 (OriginLab, USA), kde boli ďalej spracované.

3. Výsledky a diskusia

3.1 Sledovanie citlivosti detekcie pri rozličných percentuálnych zastúpeniach acetonitrilu v mobilnej fáze

Pred samotným experimentom bola zisťovaná citlivosť stanovenia pri použití rozličných gradientov mobilnej fázy. Pomocou systému ICP-MS boli prevedené analýzy roztoku As(V) o koncentrácií 20 μg L^{-1}, pričom boli použité rôzne zloženia mobilnej fázy (menil sa obsah 80% acetonitrilu v roztoku 0,1% kyseliny mravčej).

Jednotlivé merania ukázali, že citlivosť stanovenia exponenciálne klesala so vzrastom zastúpenia acetonitrilu v roztoku mobilnej fázy (závislosť je zobrazená na obrázku 3.1.) Pri použití mobilnej fázy s 40% zastúpením acetonitrilu klesla intenzita zaznamenaného signálu ^{75}As približne na 10 % pôvodnej hodnoty (0 % acetonitrilu), pri použití 72 % acetonitrilu dokonca až na 1 % pôvodnej hodnoty.



Obr. 3.1 Závislosť intenzity signálu ^{75}As na percentuálnom zastúpení roztoku B v mobilnej fáze získaná priamym stanovením As(V) o koncentrácií 20 μg L^{-1} pomocou ICP-MS. Mobilná fáza bola tvorená roztokom A: 0,1% kyselina mravčia, roztokom B: 80% acetonitril, jej prietoková rýchlosť bola 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom bola riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}.

Z tejto skutočnosti vyplýva, že údaje poskytované výstupom z ICP-MS získané analýzou za takýchto podmienok, sú problematické z hľadiska kvantifikácie. Taktiež môže dochádzať k tomu, že chromatografické píky minoritných špécií za použitia vyššieho obsahu organického rozpúšťadla v mobilnej fáze nemusia byť vôbec pozorované.

3.2 Separácia štandardných roztokov jednoduchých arzénových špécií

Separácia štandardných roztokov arzénových špécií (As(III), As(V), MA(III), MA(V), DMA(III) a DMA(V)) o koncentráciách 40 μg L^{-1} v roztoku 0,1% kyseliny mravčej bola prevedená pomocou chromatografickej C_{18} kolóny na obrátených fázach. Jednotlivé špécie boli následne detegované pomocou ICP-MS.

Analýza ukázala, že použitá kolóna nie je pre separáciu jednoduchých špécií arzénu vhodná. Z obrázku 3.2, zobrazujúceho jednotlivé chromatogramy, je zrejmé, že k separácií takmer nedošlo a všetky špécie boli eluované takmer v rovnakom čase (bez zadržania na kolóne). Jedinou výnimkou bola analýza roztoku DMA(III), pri ktorej boli zaznamenané dva chromatografické píky. Prvý pík (t_R = 2,1 min) predstavoval DMA(V) vzniknutý oxidáciou DMA(III) (nestabilita DMA(III) vo vodných roztokoch bola dokázaná Gongom et al.[25]), druhý pík predstavoval pôvodný DMA(III). Retenčné časy chromatografických píkov zaznamenaných detektorom sú zobrazené v tabuľke 3.1.

Dosiahnuté výsledky sú v zhode s poznatkami nadobudnutými Yehiayan[23]. Tá pre separáciu jednoduchých špécií použila podobný gradientový program, avšak C_8 kolónu. Pomocou tejto kolóny sa takisto podarilo separovať len DMA(III) a DMA(V), ostatné špécie boli eluované z kolóny súčasne.

3.2 Separácia roztokov komplexov arzénu s glutatiónom

Za rovnakých podmienok boli separované a detegované aj komplexy arzénu s glutatiónom (ATG, DMAG, MADG) o koncentráciách 100 μg L^{-1} v roztoku 0,1% kyseliny mravčej.

Analýzou týchto komplexov boli získané vždy tri chromatografické píky (retenčné

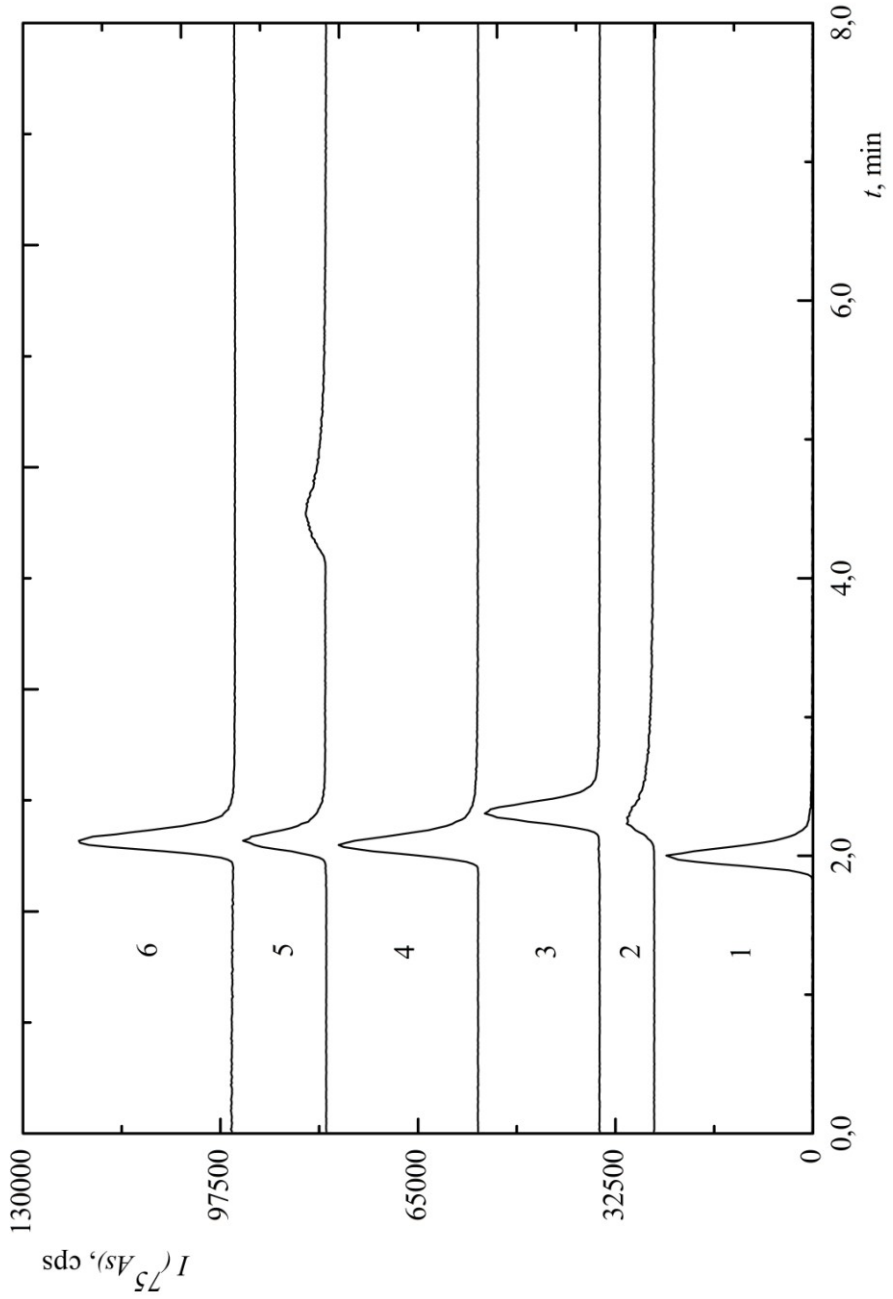
časy sú uvedené v tabuľke 3.1). V prvom píku boli eluované jednoduché nezadržiavané špécie. V prípade komplexu ATG šlo pravdepodobne o As(III), v prípade komplexu MADG o MA(III) alebo MA(V) a v prípade komplexu DMAG bol v prvom píku eluovaný pravdepodobne DMA(V). Druhý pík prítomný v chromatograme DMAG predstavoval DMA(III), pretože jeho retenčný čas (t_R = 4,5 min) bol zhodný s retenčným časom píku získaného pri separácií DMA(III). Tieto jednoduché špécie vznikli hydrolýzou nestabilných komplexov (ich nestabilita bola študovaná v prácach Yehiayan et al.[23]).

Píky eluované s neskorším retenčným časom ako 10 minút pravdepodobne predstavujú pozostatky komplexov. Raab et al. za použitia hmotnostnej spektrometrie s ionizáciou elektrosprejom potvrdili, že pri separácií na C_{18} kolóne s využitím gradientového programu, sú jednotlivé komplexy skutočne eluované až pri vyšších obsahoch acetonitrilu v mobilnej fáze[22].

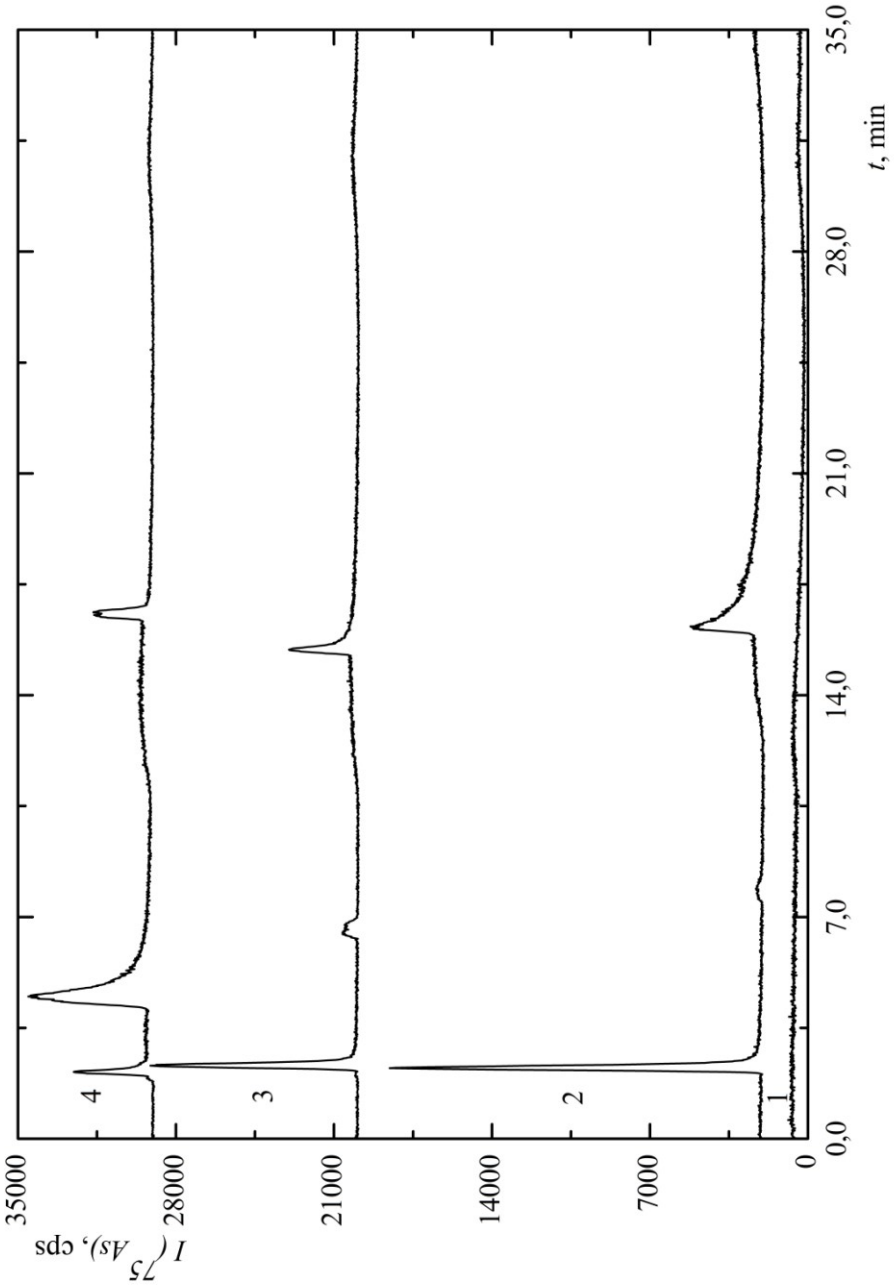
Píkom s retenčnými časmi 6,5 min a 8,0 min získaným analýzou ATG a MADG sa nepodarilo priradiť špécie. Preto bude potrebné previesť ďalšie analýzy. Chromatogramy sú pre názornosť uvedené na obrázku 3.3.

Tab. 3.1 Retenčné časy pozorované pri analýze As(III), As(V), MA(III), MA(V), DMA(III), DMA(V), ATG, MADG a DMAG pomocou HPLC-ICP-MS na kolóne Aeris™ XB-C_{18}, roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril, prietok mobilnej fáze 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom bola riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}, gradient 5–20 min, 0–20% B, 20–25 min 0% B; *m/z* 75 (As) merané pomocou ICP-MS. Prítomnosť chromatografického píku s daným retenčným časom je označená symbolom +, neprítomnosť symbolom –.

	t_R, min								
Špécia	2,0	2,1	2,3	4,5	6,5	8,0	14,3	15,4	16,6
As(III)	+	–	–	–	–	–	–	–	–
As(V)	–	–	+	–	–	–	–	–	–
MA(III)	–	–	+	–	–	–	–	–	–
MA(V)	+	–	–	–	–	–	–	–	–
DMA(III)	–	+	–	+	–	–	–	–	–
DMA(V)	–	+	–	–	–	–	–	–	–
ATG	+	–	–	–	–	+	+	–	–
MADG	–	–	+	–	+	–	–	+	–
DMAG	–	+	–	+	–	–	–	–	+



Obr. 3.2 HPLC-ICP-MS chromatogramy (1 – As(III), 2 – As(V), 3 – MA(III), 4 – MA(V), 5 – DMA(III), 6 – DMA(V)) získané separáciou arzénových špécií o koncentráciách 40 μg L^{-1} na kolóne Aeris™ XB-C_{18}, roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril, prietok mobilnej fáze 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}, gradient 5–20 min 0–20% B, 20–25 min 0% B; *m/z* 75 (As) merané pomocou ICP-MS. Zobrazených je len prvých 8 minút analýzy (neskôr neboli eluované žiadne píky) a základná línia chromatogramov je posunutá.



Obr. 3.3 HPLC-ICP-MS chromatogramy (2 – ATG, 3 – MADG, 4 – DMAG) získané separáciou arzénových špécií o koncentráciách 100 μg L^{-1} na kolóne Aeris™ XB-C_{18}, roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril, prietok mobilnej fáze 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}, gradient 5–20 min 0–20% B, 20–25 min 0% B; *m/z* 75 (As) merané pomocou ICP-MS. Zobrazená je taktiež základná línia (1) a pre názornosť je posunutá.

3.4 Analýza in vitro metylačných zmesí

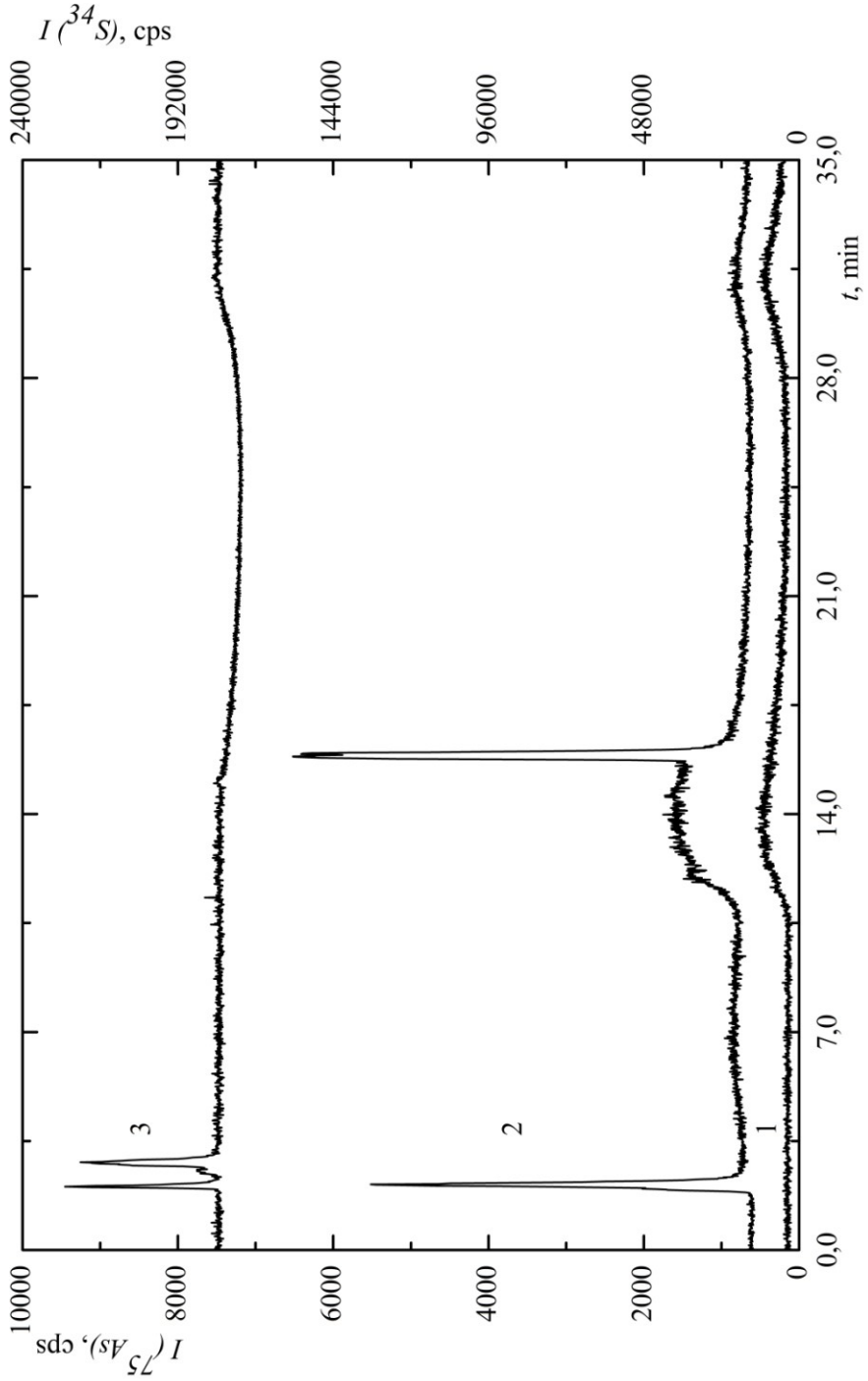
Separácia metylačných zmesí A a B bola prevedená v čo najkratšej dobe po ich príprave pomocou chromatografickej C_{18} kolóny na obrátených fázach. Jednotlivé špécie boli následne detegované pomocou ICP-MS.

V zmesi A (s glutatiónom) boli zaznamenané dva chromatografické píky arzénu. Prvý pík arzénu pravdepodobne predstavoval jednu alebo viacero jednoduchých arzénových špécií, ktoré sa na kolóne nezadržujú. Druhý pík arzénu bol zaznamenaný v čase 15,8 min a predstavuje teda zrejme akúsi zložitejšiu špéciu arzénu, ktorú sa z kolóny podarilo vymyť až vyšším podielom acetonitrilu v mobilnej fáze. Analýzou tejto zmesi boli taktiež zaznamenané dva píky síry. Prvý pík bol eluovaný bez zadržania na kolóne spoločne s jednoduchou arzénovou špéciou, druhý pík bol čiastočne zadržaný na kolóne.

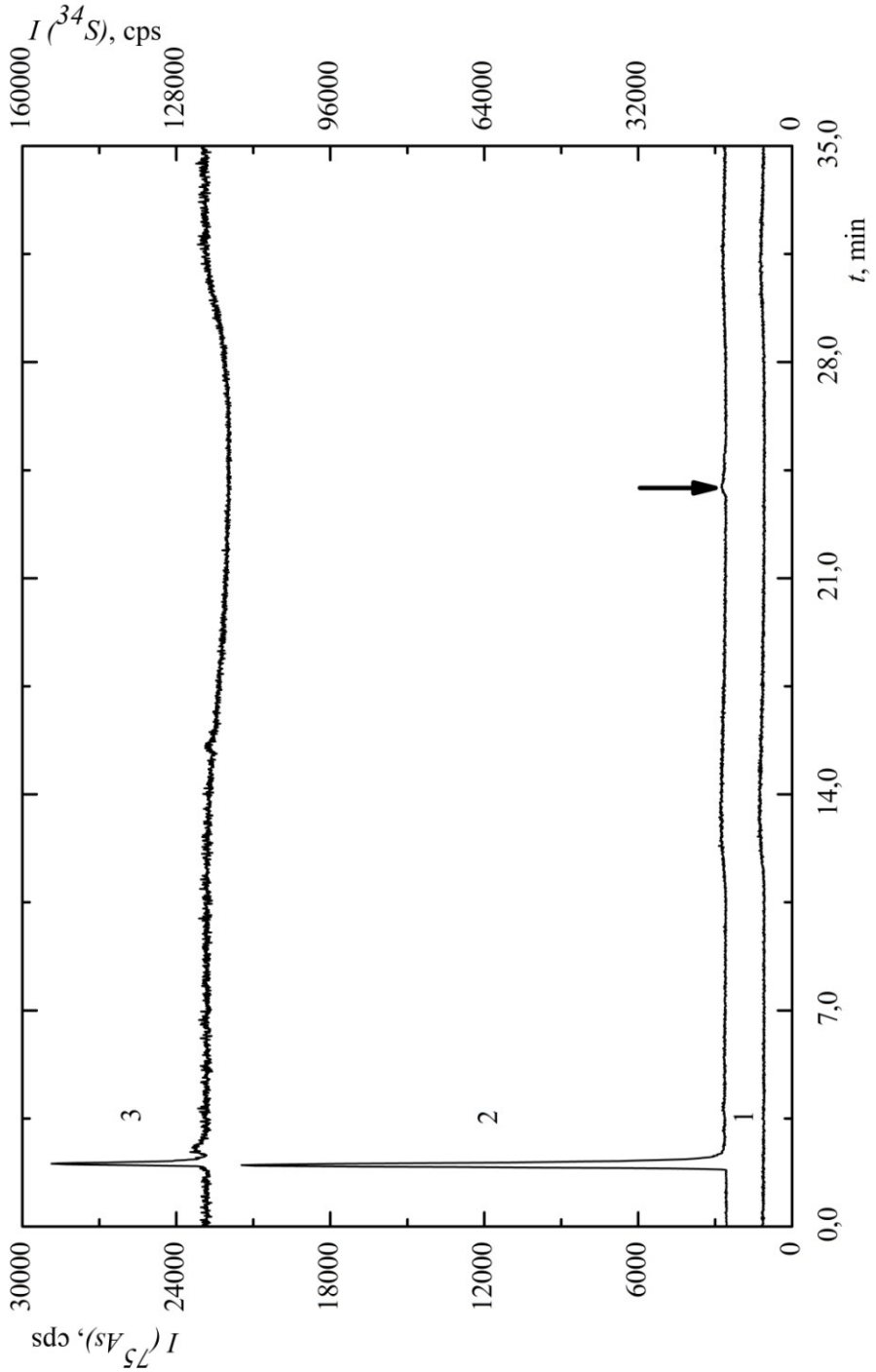
V metylačnej zmesi B (bez prítomnosti glutatiónu) boli taktiež zaznamenané dva chromatografické píky arzénu. Retenčný čas prvého píku zodpovedal retenčnému času neseparovaných jednoduchých arzénových špécií. Druhý pík bol zaznamenaný v čase 24,0 min, kedy bol obsah organickej zložky v mobilnej fáze veľmi vysoký. Síra poskytla v tejto zmesi len jeden pík, eluovaný bez zadržania na kolóne súčasne s jednoduchými arzénovými špéciami. Citlivosť stanovenia síry však bola veľmi nízka a preto je možné, že niektoré chromatografické píky neboli pozorovateľné.

Žiadnemu zo zaznamenaných píkov sa nepodarilo priradiť špéciu. Preto bude vyžadované podrobnejšie preskúmanie týchto zmesí pomocou inej detekčnej metódy, schopnej identifikovať jednotlivé špécie. Je však predpokladané, že arzénové špécie eluované pri vysokom obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze prítomné v oboch zmesiach predstavujú komplexy arzénu s proteínom alebo s ostatnými zložkami metylačnej zmesi.

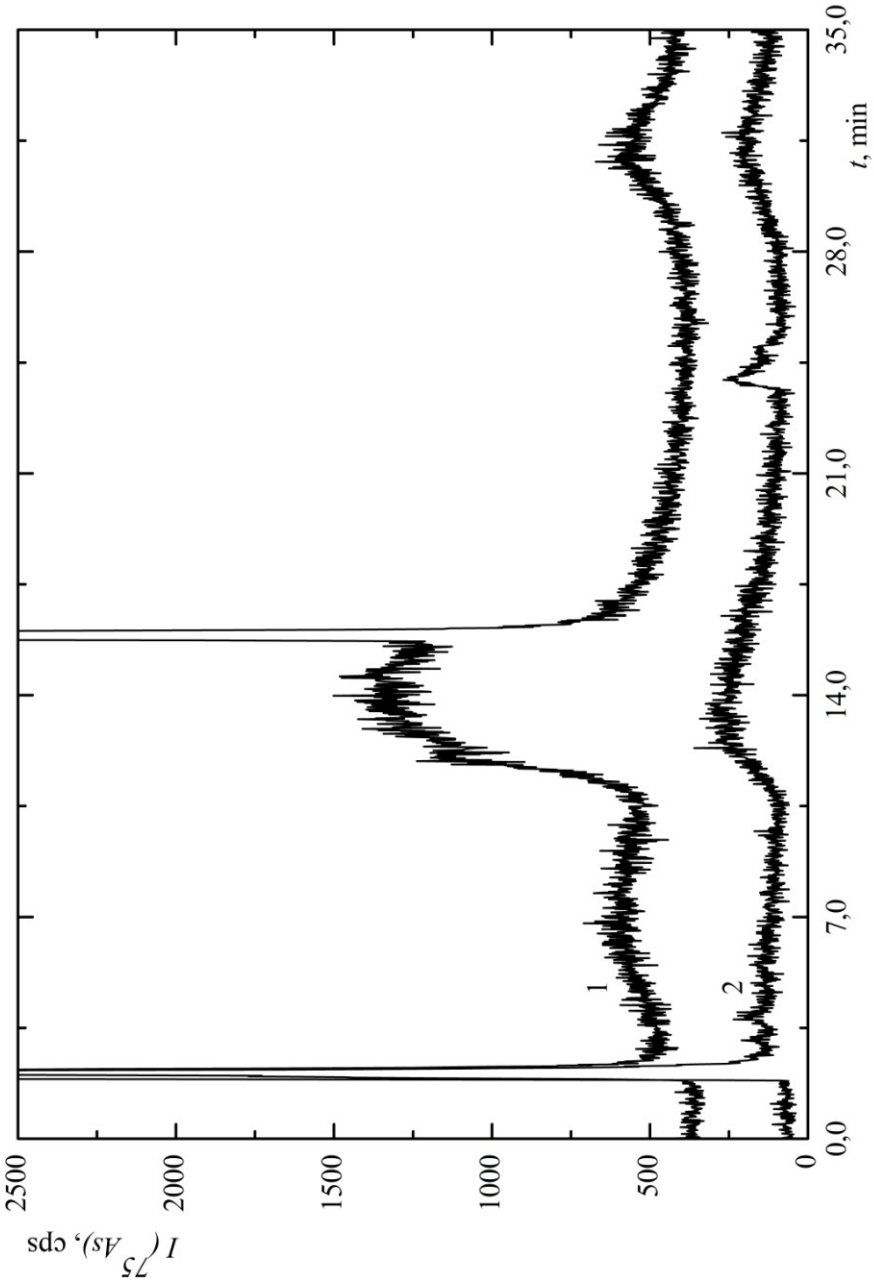
Chromatogramy získané z jednotlivých analýz sú zobrazené na obrázkoch 3.4, 3.5 a detailne na obrázku 3.6.



Obr. 3.4 HPLC-ICP-MS chromatogram metylačnej zmesi A (koncentrácia As ~ 71,4 μg L^{-1}) získaný separáciou na kolóne Aeris™ XB-C_{18}, roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril, prietok mobilnej fáze 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}, gradient 5–20 min 0–20% B, 20–25 min 0% B; *m/z* 75 (As) (2) a 34 (S) (3) merané pomocou ICP-MS. Zobrazená je taktiež základná línia As (1), ktorá je pre názornosť posunutá.



Obr. 3.5 HPLC-ICP-MS chromatogram metylačnej zmesi B (bez GSH; koncentrácia As ~ 71,4 μg L^{-1}) získaný separáciou na kolóne Aeris™ XB-C_{18}, roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril, prietok mobilnej fáze 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}, gradient 5–20 min 0–20% B, 20–25 min 0% B; *m/z* 75 (As) (2) a 34 (S) (3) merané pomocou ICP-MS. Zobrazená je taktiež základná línia As (1), ktorá je pre názornosť posunutá. Šípka ukazuje na málo viditeľný pík, ktorý je detailne zobrazený na obrázku 3.6.



Obr. 3.6 HPLC-ICP-MS chromatogramy metylačných zmesí A (1) a B (2) (koncentrácia As ~ 71,4 μg L^{-1}) získané separáciou na kolóne Aeris™ XB-C_{18}, roztok A: 0,1% kyselina mravčia, roztok B: 80% acetonitril, prietok mobilnej fáze 0,25 mL min^{-1}, pred zhmlovačom riedená DIV 0,66 mL min^{-1} a IS 0,05 mL min^{-1}, gradient 5–20 min 0–20% B, 20–25 min 0% B; *m/z* 75 (As) merané pomocou ICP-MS. Základná línia chromatogramov je pre názornosť posunutá.

4. Záver

Cieľom tejto práce bolo separovať jednoduché a taktiež zložitejšie arzénové špécie pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie na obrátených fázach. Separácia týchto špécií je významná z hľadiska dlhodobého výskumu toxicity arzénu. Aby bolo možné charakterizovať presnú metabolickú dráhu tohto polokovu, je nutné vyvinúť metódu schopnú úspešne separovať a následne i detegovať stopové množstvá jednotlivých špécií prítomné v biologických matriciach zúčastňujúcich sa tohto metabolizmu.

Separácia bola vo všeobecnosti úspešná. Jednoduché arzénové špécie sa pomocou použitej kolóny separovať nepodarilo, čo bolo pozorované už Yehiayan et al.[23]. Ako výstup z analýzy komplexov arzénu s glutatiónom a metylačných zmesi sa však podarilo získať niekoľko chromatografických píkov. Okrem jednoduchých špécií boli za použitia gradientového programu z kolóny vymyté aj zložitejšie arzénové špécie. Týmto špéciám sa však nepodarilo priradiť štruktúru a preto bude potrebné ich ďalej charakterizovať pomocou vhodnejších metód, napríklad s použitím generovania hydridov. Inou možnosťou by mohlo byť použitie hmotnostnej spektrometrie s ionizáciou elektrosprejom, pomocou ktorej je možné priamo získať aj štruktúrnu informáciu.

Problém pri stanovení predstavovala zmena citlivosti detekcie so vzrastom zastúpenia organického rozpúšťadla v mobilnej fáze. Riešením by mohlo byť zaradenie generovania hydridov za chromatografickú kolónu a tým čiastočné odstránenie vplyvu zloženia mobilnej fázy na analýzu.

Zoznam použitej literatúry

1. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. preprac. vyd. Praha, Grada 2004.

2. IARC: Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 2: Some Inorganic and Organometallic Compounds. *WHO*, 181 (1973).

3. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* **129**, 373-395 (2004).

4. Vega, L.; Styblo, M.; Patterson, R.; Cullen, W.; Wang, Ch.; Germolec, D.: Differential Effects of Trivalent and Pentavalent Arsenicals on Cell Proliferation and Cytokine Secretion in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **172**, 225-232 (2001).

5. Mandal, B. K.; Suzuki, K. T.: Arsenic round the world: A review. *Talanta* **58**, 201-235 (2002).

6. Xie, R.; Johnson, W.; Spayd, S.; Hall, G. S.; Buckley, B.: Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **578**, 186-194 (2006).

7. Petrick, J. S.; Ayala-Fierro, F.; Cullen, W. R.; Carter, D. E.; Aposhian, H. V.: Monomethylarsonous Acid (MMA^{III}) Is More Toxic Than Arsenite in Chang Human Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **163**:2, 203-207 (2000).

8. Ebert, F.; Weiss, A.; Bültemeyer, M.; Hamann, I.; Hartwig, A.; Schwerdtle, T.: Arsenicals affect base excision repair by several mechanism. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **715**, 32-41 (2011).

9. Naranmandura, H.; Suzuki, N.; Suzuki, K. T.: Trivalent Arsenicals Are Bound to Proteins during Reductive Methylation. *Chemical Research in Toxicology* **19**, 1010-1018 (2006).

10. Currier, J. M.; Saunders, R. J.; Ding, L.; Bodnar, W.; Cable, P.; Matoušek, T.; Creed, J. T.; Stýblo, M.: Comparative oxidation state specific analysis of arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and hydride generation--cryotrapping-atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**:6, 843-852 (2013).

11. Hayakawa, T.; Kobayashi, Y.; Cui, X.; Hirano, S.: A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology* **79**, 183-191 (2005).

12. Kala, S. V.; Neely, M. W.; Kala, G.; Prater, Ch. I.; Atwood, D. W.; Rice, J. S.; Lieberman, M. V.: The MRP2/cMOAT Transporter and Arsenic-Glutathione Complex Formation Are Required for Biliary Excretion of Arsenic. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:34, 33404-33408 (2000).

13. Smedley, P. L.; Kinniburgh, D. G.: A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* **17**, 517-568 (2002).

14. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals. *Metallomics* **4**, 881-892 (2012).

15. Challenger, F.: Biological methylation. *Chemical Reviews* **36**, 315-361 (1945).

16. Cohen, S. M.; Arnold, L. L.: Methylated Arsenicals: The Implications of Metabolism and Carcinogenicity Studies in Rodents to Human Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* **36**, 99-133 (2006).

17. Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Le, X. Ch.: Arsenic speciation analysis. *Talanta* **58**, 77-96 (2002).

18. Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; Van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R.: Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry* **72**:8, 1453-1470 (2000).

19. B´Hymer, C.; Caruso, J. A.: Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1045**, 1-13 (2004).

20. Szpunar, J.: Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *The Analyst* **125**, 963--988 (2000).

21. Komorowicz, I.; Barałkiewicz, D.: Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry – Last decade review. *Talanta* **84**, 247-261 (2011).

22. Raab, A.; Meharg, A. A.; Jaspars, M.; Genney, D. R.; Feldmann, J.: Arsenic-glutathione complexes – their stability in solution and during separation by different HPLC modes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19**, 183-190 (2004).

23. Yehiayan, L.; Pattabiraman, M.; Kavallieratos, K.; Wang, X.; Boise, L. H.; Cai, Y.: Speciation, formation, stability and analytical challenges of human arsenic metabolites. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **24**, 1397-1405 (2009).

24. Aposhian, A. V.; Gurzau, E. S.; Le, X. C.; Gurzau, A.; Healy, S. M.; Lu, X.; Ma, M.; Yip, L.; Zakharyan, R. A.; Maiorino, R. M.; Dart, R. C.; Tircus, M. G.; Gonzales-Ramirez, D.; Morgan, D. L.; Avram, D.; Aposhian, M. M.: Occurrence of Monomethylarsonous Acid in Urine of Humans Exposed to Inorganic Arsenic. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 693-697 (2000).

25. Gong, Z.; Lu, X.; Cullen, W. R.; Le, X. Ch.: Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **16**, 1409-1413 (2001).

26. Currier, J. M.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M.: Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues. *Metallomics* **3**, 1347-1354 (2011).

27. Kobayashi, Y.; Cui, X.; Hirano, S.: Stability of arsenic metabolites, arsenic triglutathione [$As(GS)_3$] and methylarsenic diglutathione [$CH_3As(GS)_2$], in rat bile. *Toxicology* **211**, 115-123 (2005).

28. Bluemlein, K.; Raab, A.; Feldmann, J.: Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 357-366 (2009).

29. Ding, L.; Saunders, R. J.; Drobná, Z.; Walton, F. S.; Pencheng, X.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.: Methylation of arsenic by recombinant human wild-type arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and its methionine 287 threonine (M287T) polymorph: Role of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology* **264**, 121-130 (2012).

30. Cullen, W. R.; McBride, B. C.; Reglinski, J.: The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *Journal of Inorganic Biochemistry* **21**:3, 179-194 (1984).

31. Scott, N.; Hatlelid, K. M.; MacKenzie, N. E.; Carter, D. E.: Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chemical Research in Toxicology* **6**:1, 102-106 (1993).