

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE

Prírodovedecká fakulta

Katedra analytickej chémie

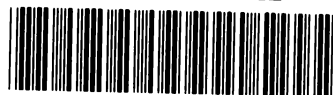
ANALÝZA AMINOKYSELÍN A PEPTIDOV
OBSAHUJÚCICH SÍRU METÓDOU
KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZY

Bakalárska práca

študijného programu Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK

KNĚHOVNA CHEMIE



3233218508

Praha 2008

Sabína Čujová

ANALÝZA AMINOKYSELÍN A PEPTIDOV OBSAHUJÚCICH
SÍRU METODOU
KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZY

Sabína Čujová

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kapilárna zónová elektroforéza

cystein

cystín

glutation redukovaný

glutation oxidovaný

metalotionein

polarografia

konštanta stability

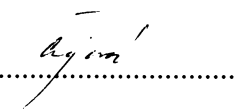
Tato bakalárska práca vznikla v súvislosti s riešením výskumného zámeru MSM0021620857.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalárskou prácu vypracovala samostatne, pod vedením školiteľky Prof. RNDr. Věry Pacákovéj, CSc. a že som všetky použité pramene riadne citovala.

Som si vedomá toho, že prípadné využitie výsledkov, získaných v tejto práci, mimo Univerzitu Karlovu v Prahe je možné len po písomnom súhlase tejto univerzity.

V Prahe dňa 28. apríla 2008.


.....
podpis

Obsah

| | |
|---|----|
| Zoznam skratiek | 5 |
| Úvod | 6 |
| 1 TEORETICKÁ ČASŤ | 7 |
| 1.1 Kapilárna zónová elektroforéza CZE | 8 |
| 1.1.1 História vývoju CZE | 8 |
| 1.1.2 Princíp fungovania CZE | 8 |
| 1.1.3 Kapilárne elektromigračné separačné metódy | 11 |
| 1.2 Metalotioneiny MT | 12 |
| 1.2.1 Merané analyty: cystein (Cys), cystín, glutation redukovaný (GSH), glutation oxidovaný (GSSH) | 13 |
| 1.2.2 Elektromigračné vlastnosti peptidov | 14 |
| 1.3 Určenie konštanty stability polarograficky | 15 |
| 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 16 |
| 2.1 Prístroje | 17 |
| 2.2 Chemikálie | 18 |
| 2.3 Príprava roztokov a analytov | 19 |
| 2.4 Úprava vnútorného povrchu kapiláry pred a po meraní | 19 |
| 2.5 Všeobecný postup analýzy jednotlivých analytov a ich zmesi kapilárnou elektroforézou CZE | 20 |
| 2.6 Všeobecný postup pre polarografiu | 20 |
| 2.7 Cieľ práce | 21 |
| 3 VÝSLEDKY A DISKUSIA | 22 |
| 3.1 Uskutočnené experimenty na CZE | 23 |
| 3.2 Uskutočnené experimenty na polarografii | 23 |
| 3.3 Stanovenie optimálnych podmienok merania jednotlivých analytov CZE | 24 |
| 3.3.1 Určenie vlnovej dĺžky | 24 |
| 3.3.2 Určenie elektrolytu, napätia a dávkovania | 25 |
| 3.4 Analýza cystínu, Cys, GSSH, GSH a ich zmesi | 26 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3.5 | Reprodukovateľnosť metódy | 28 |
| 3.6 | Kalibračná závislosť plochy píku na koncentrácií zmesi | 29 |
| 3.7 | Určenie konštanty stability z polarografického merania | 30 |
| | Záver | 31 |
| | Literatúra | 32 |

Zoznam skratiek

| | |
|------|--------------------------------|
| CE | kapilárna elektroforéza |
| CZE | kapilárna zónová elektroforéza |
| Cys | cystein |
| EOF | elektroosmotický tok |
| GSH | glutation redukovaný |
| GSSH | glutation oxidovaný |
| MT | metalotionein |

Úvod

Pojem kapilárna elektroforéza CE zahrňuje súbor procesov založených na migrácií častíc. Keď Tiselius¹ ako prvý použil túto metódu na analytické účely pre separáciu bielkovín, nebola táto separácia veľmi efektívna. V dnešnej dobe, keď sú dostupné kremenné kapiláry s priemerom niekoľko μm a komerčné prístroje, dochádza k prudkému rozvoju CE, o čom svedčí jej uplatnenie v rozličných oblastiach a tiež množstvo publikovaných článkov o aplikácií CE.² Výhodou tejto techniky je rýchla analýza, vysoká selektivita a enatiioselektivita, vysoká citlivosť a malá spotreba analytu.³ CE je schopná separovať široké spektrum látok, od jednoduchých anorganických iónov až po živé bunky, pričom nedochádza k porušeniu biologického materiálu. Použitie CE na separáciu peptidov a proteínov je jeden z najnáročnejších problémov v aplikácií tejto vysoko účinnej separačnej techniky.⁴

Ťažké kovy čoraz viac ohrozujú životné prostredie. I keď mechanizmy, ktorými ťažké kovy vykazujú svoje toxické vlastnosti nie sú dobre definované, prevláda obecný názor že ťažké kovy sú toxické vďaka svojej afinite k esenciálnym ligandom.⁵ Pretože sa niektoré z týchto kovov nevyučujú okamžite, biologické mechanizmy ich detoxifikácie sú predmetom intenzívneho výskumu.⁵ Štúdium komplexov aminokyselín a nízkych peptidov obsahujúcich síru s kovmi je dôležité pre pochopenie funkcie kovových iónov v organizme za fyziologických podmienok.

Predkladaná bakalárska práca je venovaná vývoji CE metódy pre separáciu a štúdium komplexov cysteinu a glutationu kademnatými iónmi.

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Kapilárna zónová elektroforéza CZE

1.1.1 História vývoju CZE

Po objavení galvanického článku ľudia začali sledovať chovanie rôznych látok pri prechode elektrického prúdu. Zistili, že môže dochádzať k reakciám (elektrolýza) a tiež k pohybu nabitých častíc medzi elektródami.⁶ Ukázalo sa, že každý druh častíc pohybujúci sa v elektrickom poli má svoju charakteristickú rýchlosť. Táto skutočnosť je využitá pri analýze a separácii rôznych zmesí metódou nazývanou elektroforéza.⁷

V tridsiatich rokoch dvadsiateho storočia švédsky elektrochemik Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902 – 1971) zostrojil zariadenie, ktoré umožnilo rozdeliť proteíny krvného séra na základe ich rôznej pohyblivosti v elektrickom poli⁸ (v r. 1948 získal za tento objav Nobelovu cenu).¹

V polovici šesťdesiatych rokov vznikla elektroforetická metóda izotachoforéza, ktorá bola určená na analýzu zmesi malých iónov (anorganických a organických).⁸

V roku 1981 J. W. Jorgenson a K. D. Lukacsová popísali separáciu rôznych iónov zónovou elektroforézou vo veľmi tenkej sklenenej kapiláre.⁸

Posledným veľkým úspechom elektroforézy bolo v roku 2003 zavŕšenie desaťročnej práce, ktorá sa zaoberala kompletným rozlúštením ľudského genómu.⁹

1.1.2 Princíp fungovania CZE^{2, 10}

Kapilárna zónová elektroforéza patrí medzi elektromigračné metódy, ktoré sú založené na rozdielnej rýchlosti pohybu rôzne nabitých častíc v elektrickom poli. Sila F_1 pôsobiaca na nabitú časticu v elektrickom poli je úmerná náboju častice z_i a intenzite elektrického poľa E .

$$F_1 = z_i \cdot E \quad (1.1)$$

Sila reprezentujúca odpor prostredia pôsobí proti sile F_1 a je úmerná okamžitej rýchlosti nabitej častice v_i .

$$-F_2 = k \cdot v_i \quad (1.2)$$

Keď dôjde k vyrovnaniu oboch síl ($F_1 = -F_2$), nabitá častica sa začne pohybovať konštantnou rýchlosťou v_i .

$$v_i = \frac{z_i \cdot E}{k} \quad (1.3)$$

k označuje konštantu úmernosti iónu guľovitého tvaru a podľa Stokesového zákona platí:

$$k = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \quad (1.4)$$

Charakteristickou konštantou každého iónu je jeho pohyblivosť (mobilita) μ_i , čo predstavuje rýchlosť vzt'azenu na jednotkovú intenzitu elektrického poľa. Tak rovnicu (1.3) potom môžeme napísať ako:

$$v_i = \mu_i \cdot E \quad (1.5)$$

kde v_i je rýchlosť [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$], μ_i elektroforetická pohyblivosť iónu [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] a E je intenzita elektrického poľa [$\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$]. Elektroforetická pohyblivosť μ_i je pre daný ión a prostredie konštantná a kombináciou rovníc (1.3, 1.4, 1.5) je vyjadrená ako:

$$\mu_i = \frac{z_i}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (1.6)$$

kde z_i je náboj iónu, r_i je polomer iónu a η je viskozita prostredia. Z rovnice vyplýva, že nabitá častica budú v elektrickom poli migrovať čím rýchlejšie, čím budú mať väčší náboj a čím budú menšie. V nekonečne zriedených roztokoch je iónová mobilita pre daný ión konštantná a nazýva sa absolútna mobilita μ_0 . Elektroforetické separácie neprebiehajú v nekonečne zriedených roztokoch, ale v roztokoch o konečných koncentráciách. Takže iónová pohyblivosť nieje konštantná, ale závisí na koncentrácií elektrolytu. Rýchlosť migrácie iónu v tomto prostredí je daná:

$$v_i = \mu_a \cdot E \quad (1.7)$$

kde μ_a je aktuálna pohyblivosť. Odchýlka od ideálnych podmienok je vyjadrená ako korekčný faktor f , ktorý je funkciou náboja častice a iónovej sily prostredia. Aktuálnu pohyblivosť potom môžeme vyjadriť ako:

$$\mu_a = f \cdot \mu_0 \quad (1.8)$$

Pohyblivosť iónov v roztokoch, ktoré nie sú úplne disociované, je ovplyvnená stupňom disociácie α . V tomto prípade hovoríme o efektívnej pohyblivosti μ_{eff} , ktorú je možné pre monovalentné látky vyjadriť takto:

$$\mu_{eff} = \mu_a \cdot \alpha = \mu_0 \cdot f \cdot \alpha \quad (1.9)$$

Pre monovalentné slabé elektrolyty (kyseliny a zásady) platí, že stupeň disociácie závisí na ich disociačnej konštante pK_a a na pH pufrujúceho prostredia.

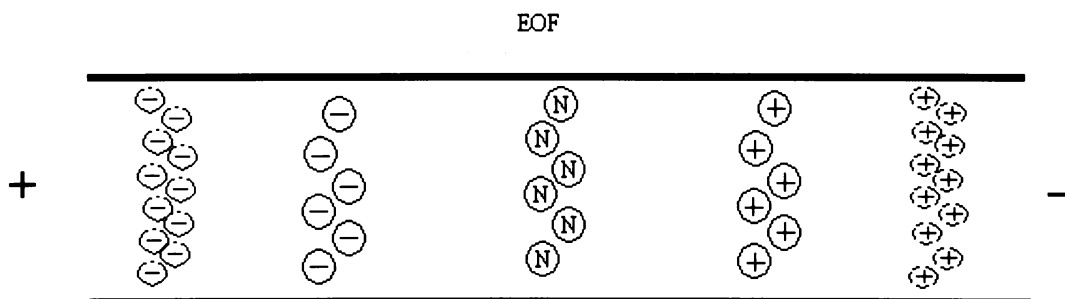
$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{slabý elektrolyt – kyselina} \quad (1.10)$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad \text{slabý elektrolyt – zásada} \quad (1.11)$$

Princíp elektroforetickej separácie je teda založený na rozdielnych pohyblivostiach iónov.

Dôležitým faktorom v kapilárnej elektroforéze je existencia elektroosmotického toku. Elektroosmotický tok EOF je tok kvapaliny kapilárou, v ktorej je elektrické pole vytvorené vložení napätia medzi elektródy na koncoch kapiláry. Vo vnútri kremennej kapiláry dochádza vplyvom prítomnosti elektrolytu k hydrolyze siloxanových skupín za vzniku skupín silanových a následne k ich disociácii (v závislosti na pH). Vnútorý povrch kapiláry má tak záporný náboj, ktorý sa ale adsorpciou iónov v roztoku mení. V elektrickom poli sú ióny prítomné v difúznej vrstve ťahané k opačne nabitkej elektróde. Keďže ióny v roztoku sú solvatované a prostredníctvom solvatovaných obalov je k pohybu nútený celý objem roztoku. V kapiláre takto vzniká elektroosmotický tok, ktorý je závislý na pH a koncentrácií elektrolytu. Čím vyššie je pH roztoku, tým rýchlejší je EOF a čím vyššia koncentrácia roztoku, tým nižší je EOF.

Katióny i anióny môžu byť separované súčasne behom jednej analýzy. Ako prvé budú migrovať najmenšie katióny s najväčším nábojom, pričom rýchlosť sa znižuje so znižujúcim nábojom, po katiónoch nasledujú všetky neutrálne látky. Anióny migrujú ako posledné, pričom najväčšie s najmenším nábojom migrujú skôr než malé a viac nabité (obr.: 1.1)



Obrázok 1.1: Migrácia iónov

Veľkosť EOF sa dá vyjadriť ako rýchlosť alebo pohyblivosť pomocou rovníc:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (1.12)$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (1.13)$$

kde ζ je zeta potenciál, ε je dielektrická konštanta a η je viskozita

Pohyblivosť analytu v systéme s EOF je daná:

$$\mu = \mu_{eff} + \mu_{EOF} \quad (1.14)$$

Pohyblivosť analytu z experimentálnych dát určíme:

$$\mu = \left(\frac{1}{t_{mig}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \cdot \frac{l_d \cdot l_c}{U} \quad (1.15)$$

kde t_{mig} je migračný čas analytu [s], t_{EOF} je migračný čas markera [s], l_d je dĺžka kapiláry k detektoru [m] a l_c je celková dĺžka kapiláry [m]

1.1.3 Kapilárne elektromigračné separačné metódy¹¹

Separčné princípy sú v jednotlivých variantoch dosť odlišné, v podstate rozlišujeme šesť mód – technik elektroforézy:

a) Kapilárna zónová elektroforéza CZE

delí molekuly s nábojom, ktoré sa líšia svojou molekulovou hmotnosťou, tvarom a nábojom vo voľnom roztoku.

b) Kapilárna gélová elektroforéza CGE

delí vysokomolekulárne biologicky aktívne látky ako peptidy, bielkoviny, štiepy DNA a RNA v gelu.

c) Micelárna elektrokinetická kapilárna chromatografia MECC, MEKC

využíva micely, ktoré sú tvorené povrchovo aktívnymi látkami, je vhodná na separáciu neutrálnych molekúl.

d) Elektrochromatografia v naplnených kapilárach EC, CEC

ide o kombináciu elektroforetických a chromatografických separačných mechanizmov, ktoré umožňujú deliť nabitú i neutrálne molekuly.

e) Kapilárne izoelektrické fokusovanie CIEF, IEF

delí látky amfolytickej povahy v lineárnom pH gradiente

f) Kapilárna izotachoforéza CITP, ITP

separuje ióny podľa rozdielných elektroforetických mobilit, pričom separovaný analyt sa dávkuje na rozhranie dvoch pufrov s rôznou elektroforetickou pohyblivosťou, ale s rovnakým znamienkom ako má analyt, čiže behom jednej analýzy sa dá separovať len jeden druh iónov.

1.2 Metalotioneiny MT

Metalotioneiny (MT) sú nízkomolekulové proteíny a polypeptidy, s bohatým obsahom cysteinu a schopnosťou tvoriť s iónmi ťažkých kovov komplexy.¹² Tieto proteíny sa nachádzali vo všetkých eukaryotických bunkách, ktoré boli skúmané.¹³ Dôležitou úlohou MT je v chránení pred toxickými neesenciálnymi kovmi (Cd, Zn, Cu...) a tiež sa javia ako antioxidanty pod rôznymi podmienkami.¹⁴

Na základe chemickej štruktúry boli MT rozdelené do troch skupín:¹⁵

a) MT I. triedy – živočíšne metalotioneiny

boli izolované zo živočíšnych buniek rôznych organizmov, ďalej je táto trieda členená na štyri izoformy, kde MT-1 a MT-2 sú bežne prítomné vo väčšine orgánov, MT-3 bola izolovaná z neurónov a gliových buniek a MT-4 bola pozorovaná v dlaždičkovom epitelu¹⁶

b) MT II. triedy – polypeptidy podobné živočíšnym metalotioneínom

boli nájdené v kvasinkách, siniciach a hubách

c) MT III. triedy – rastlinné metalotioneiny (fytochelatiny)

vyskytujú sa v rastlinných organizmoch ako sekundárne metabolity, pričom hlavnými zložkami sú nízke peptidy obsahujúce síru

Výskum živočíšnych MT je sústredený najmä na štúdium metabolizmu zinku, medi, kadmia a ortuti v orgánoch s akumuláčnými a metaloregulačnými schopnosťami, ako sú pečeň, gonády, slezina alebo nervové tkanivo.¹⁶

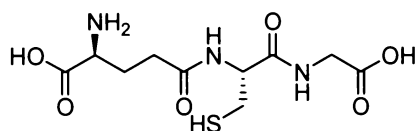
1.2.1 Merané analyty: cystein (Cys), cystín, glutation redukovaný (GSH), glutation oxidovaný (GSSH)

Na veľmi dôležitom mechanizme, chrániaci bunky pred oxidačným stresom, ktorý je spustený peroxidom vodíka a biologicky reaktívnymi formami kyslíka, sa podieľa vnútrobunkový tripeptid glutation (GSH γ -glutamylcysteinylglycin) (obr.: 1.2).¹⁷ Rovnováha medzi redukovanou formou GSH a oxidovanou GSSH (obr.: 1.3) napomáha udržiavať správny oxidačný stav sulfhydrylových skupín proteínov v bunkách, pričom GSH je syntetizovaný z glutamátu, cysteinu a glycinu za katalýzy γ -glutamylcysteinsynthetasou a GSH-syntehtasou.¹⁸

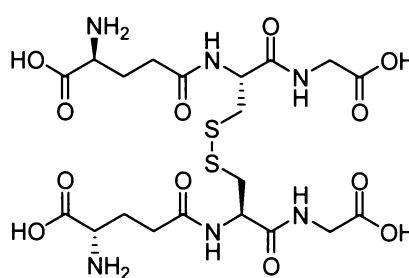
Bolo zistené, že GSH je schopné tvoriť cheláty a tým detoxikovať kovy okamžite po vstupe do bunky.¹⁹ Glutation ako chelatačné činidlo sa skladá z jednej sulfhydrylovej skupiny, ktorá vytvára väzbu s ťažkými kovmi ako napr.: Zn, Cu, Cd, Pb a Ag. Štruktúra $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ a $\text{Zn}(\text{GSH})_2$, založená na koordinačnej väzbe so sírou je považovaná za veľmi pravdepodobnú.²⁰

Štúdie ukázali, že HIV infikovaní ľudia majú tendenciu k úbytku vnútrobunkového GSH, čím dôjde k zmene funkcie T-buniek, čo zapríčini zvýšenie HIV replikácie.²¹

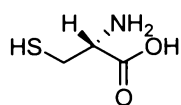
Cystein (obr.: 1.4) je aminokyselina (AMK) s polárnym postranným reťazcom. SH-skupina sa ľahko oxiduje za tvorby disulfidových mostíkov –S-S-. Cystín (obr.: 1.5) je zložený z dvoch cysteinových zbytkov, spojených kovalentnou disulfidovou väzbou, ktorá je štiepateľná v alkalickom prostredí.²²



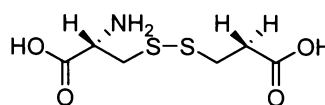
Obrázok: 1.2: glutation redukovaný



Obrázok: 1.3: glutation oxidovaný



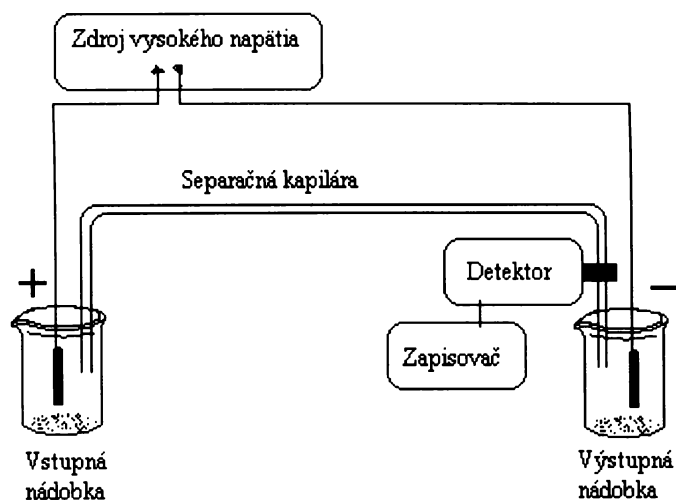
Obrázok: 1.4: cystein



Obrázok: 1.5: cystín

1.2.2 Elektromigračné vlastnosti peptidov²³

Aplikácia kapilárnej elektroforézy (obr.: 1.6) na separáciu peptidov je spojená s niekoľkými problémami. Najväčším problémom je adsorpcia analytu na povrch kapiláry. Táto interakcia spôsobuje rozširovanie a rozmývanie pík (tvorba nesymetrických chvostových pík), ďalej je táto interakcia príčinou nízkej separačnej výkonnosti a slabej separačnej reprodukovateľnosti. Adsorpcia sa môže znížiť: prídavkom chemického činidla do pufru, deaktiváciou kremenného povrchu fyzikálnym alebo chemickým ovrstvením steny kapiláry a úpravou pH pufru. Tieto úpravy redukovujú adsorpčný problém a zlepšujú separáciu proteínov. Medzi ďalšie problémy patrí výber vhodného elektrolytu a jeho pH, veľkosť dávkovania a napätia.

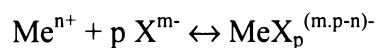


Obrázok 1.6: Schéma kapilárnej elektroforézy

1.3 Určenie konštanty stability polarograficky²⁴

Polarografia je spôsob stanovenia látok, kde sa sleduje závislosť prúdu, ktorý preteká analyzovaným roztokom elektrolytu na plynulé sa zvyšujúcom napätí, ktoré sa vkladá na dvojicu elektród, pričom je jedna dokonale polarizovaná a druhá referenčná – nepolarizovaná. Závislosť prúdu od napätia sa znázorňuje graficky ako polarografická krivka, ktorá ma tvar vlny. Polarograficky môžeme stanoviť všetky látky schopné oxidácie alebo redukcie.

Ak sú katióny kovov viazané v komplexe, je k ich redukcii potrebné vynaložiť viac energie, čím dôjde k posunu polarografickej vlny k negatívnejším potenciálom. Posun polvlnového potenciálu proti hodnote pre voľné ióny závisí na konštante stability komplexu a na koncentracii komplexotvorného činidla. Na základe posunu polvlnových potenciálov môžeme určiť konštantu stability komplexu a jeho zloženie. Ak tvorí kov Me^{n+} komplex s ligandom X^{m-}



$$E_{1/2komp} - E_{1/2vol} = \frac{R.T}{n.F} \ln \sqrt{\frac{D''}{D}} - \frac{R.T}{n.F} \ln K - \frac{R.T}{n.F} \ln [\text{X}^{m-}]^p \quad (1.16)$$

kde $E_{1/2komp}$ je polvlnový potenciál komplexu, $E_{1/2vol}$ je polvlnový potenciál voľného kovu, D'' je difúzny koeficient voľného kovu v roztoku, D je difúzny koeficient komplexu v roztoku, K je konštantu stability komplexu, X je koncentrácia komplexotvorného činidla. Pomer D''/D sa stanoví ako pomer difúzných prúdov voľného kovu a komplexu pri konštantnej koncentracii kovu (I_{vol}/I_{kom}).

2 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

2.1 Prístroje

Vzorky jednotlivých analytov a navážky na prípravu zásobných roztokov boli vážené na analytických váhach Precisa 262 SMA-FR (Precisa Instrument AG–Dietikon, Švajčiarsko).

pH elektrolytov bolo merané konduktometer/pH-meterom JENWAY 4330 Conductivity & pH Meter (JENWAY Ltd., Veľká Británia) s elektródou JENWAY (sklenená).

UV spektrá jednotlivých analytov boli zmerané na UV/VIS spektrofotometru PYE UNICAM PU 8800 UV/VIS spectrophotometer (PHILIPS, Veľká Británia) s 1 cm kremennými kvetami.

Analýza všetkých analytov sa uskutočnila v kapilárnej elektroforéze PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko), k detekcii bol použitý UV/VIS spektrofotometrický detektor Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). Na vyhodnotenie dát sa používal software Clarity v.2.4.04.095 (DataApex, s. r.o., Praha, ČR). Programy použité na spracovanie dát boli Origin® 6.1 v6.1052 (B232) (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Office Excel 2003 v10.0.2701.12 (Copyright© Microsoft Corporation, USA).

Kapilára použitá počas celého merania bola nemodifikovaná kremenná kapilára od firmy CACO s.r.o. (Slovensko) s parametrami: vnútorný priemer $d_i = 75 \mu\text{m}$, vonkajší priemer $d_o = 380 \mu\text{m}$, dĺžka kapiláry k detekčnému okienku $L_D = 59 \text{ cm}$ a celková dĺžka kapiláry $L_C = 70 \text{ cm}$.

Polarografia bola meraná na polarografe Polariter type PO4d No 54990 (radiometer Copenhagen NV, Denmark).

2.2 Chemikálie

| | | |
|------------------------------|----------|----------------|
| chlorid draselný p.a. | Lach-Ner | Neratovice, ČR |
| chlorid kademnatý | Lachema | Brno, ČR |
| hydroxid sodný p.a. | Lach-Ner | Neratovice, ČR |
| kyselina chlorovodíková p.a. | Lach-Ner | Neratovice, ČR |
| kyselina ortofosforečná p.a. | Lach-Ner | Neratovice, ČR |
| Analyty: | | |
| cystein | Sigma | St. Louis, USA |
| cystín | Sigma | St. Louis, USA |
| glutation redukovaný | Sigma | St. Louis, USA |
| glutation oxidovaný | Sigma | St. Louis, USA |
| glutation oxidovaný | Fluka | Švajčiarsko |

2.3 Príprava roztokov a analytov

Tabuľka 2.1: Pripravené roztoky

| | |
|--------------------------------|--------|
| NaOH | 1 M |
| HCl | 1 M |
| H ₃ PO ₄ | 100 mM |
| | 50 mM |
| KCl | 10 mM |
| CdCl ₂ | 0,5 mM |

Tabuľka 2.2: Pripravené roztoky analytov

| | |
|---------|-------------------|
| Cystín | 5mg/0,5 ml 1M HCl |
| Cystein | 5mg/0,5 ml 1M HCl |
| GSH | 5mg/0,5 ml 1M HCl |
| GSSH | 5mg/0,5 ml 1M HCl |

Roztoky (tab.: 2.1) boli skladované v chladničke pri teplote 4 °C a analyty v mrazničke pri teplote -18 °C. Roztoky analytov (tab.: 2.2) boli skladované v chladničke pri teplote 4 °C

2.4 Úprava vnútorného povrchu kapiláry pred a po meraní

Pred vlastným meraním sa kapilára každé ráno premývala, aby sa odstránili nečistoty z vnútorného povrchu kapiláry, čím sa vnútorný povrch kapiláry upravil do štandardného stavu. Kapilára na začiatku merania bola premytá vždy pri tlaku 1000 mBar 10 minút deionizovanou vodou, 10 minút 1M NaOH, 10 minút deionizovanou vodou, 10 minút vlastným elektrolytom používanom pri danom meraní. Po tejto úprave bolo možné uskutočniť merania. Na konci dňa, po uskutočnení všetkých meraní sa kapilára opäť premyla pri tlaku 1000 mBar 10 minút deionizovanou vodou, 10 minút 1M NaOH, 10 minút deionizovanou vodou a 10 minút vzduchom. Takto mohla byť kapilára skladovaná aj niekoľko dní.

2.5 Všeobecný postup analýzy jednotlivých analytov a ich zmesi kapilárnou elektroforézou CZE

Na prípravu jednotlivých roztokov analytov bolo vždy odvážené na analytických váhach 5 mg vzorky. Vzorka bola rozpustená v 0,5 ml 1M HCl. Takto upravená vzorka bola použitá k meraniu. Samotné meranie na úplnom začiatku začínalo úpravou kapiláry (kap.: 2.4). Pred každým ďalším meraním sa kapilára premývala 3 minúty daným elektrolytom. Elektrolyt a jednotlivé vzorky sa podľa potreby napipetovali do príslušných vialiek, ktoré sa vsadili do prístroja. Nastavením príslušnej metódy na prístroji prebiehalo dané meranie. V jednotlivých metódach bolo podľa potreby nastavený čas a tlak premývania elektrolytom, čas a tlak dávkovania vzorky, napätie a celkový čas merania.

Pri analýze zmesi analytov, bola táto zmes pripravená zmiešaním roztokov v rovnakom pomere. Analýza prebiehala rovnako.

Po skončení analýz bola kapilára opäť premytá (kap.: 2.4).

2.6 Všeobecný postup pre polarografiu

Nastavila sa výška rezervoáru ortuti na konštantnú výšku, ktorá bola celú dobu merania rovnaká. Napätie sa vkladalo na článok, ktorý sa skladal z polarizovanej ortuťovej kvapkovej elektródy a nepolarizovanej argentschloridovej elektródy. Do polarografickej nádoby sa napipetovalo 100 μ l 0,5 mM Cd^{2+} , 0,9 ml 10 mM KCl. Na polarografe sa nastavila vhodná rýchlosť posunu papiera a citlivosť. Nakoniec sa zaznamenal polarogram. V druhom kroku sa do polarografickej nádoby odpipetovalo 100 μ l 0,5 mM Cd^{2+} , 10 μ l vzorky analytu a 0,9 ml 10 mM KCl. Pri vhodnej rýchlosti posunu papiera citlivosti sa zaznamenal polarogram.

2.7 Cieľ práce

Cieľom práce je vypracovať analytickú metódu pre stanovenie cysteinu, cystínu, glutationu redukovaného a oxidovaného. Za týmto účelom bolo nutné nájsť optimálne podmienky pre separáciu Cys, cystínu, GSH, GSSH a ich zmesi v kapilárnej elektroforéze.

Zistiť reprodukovateľnosť tejto metódy za optimálnych podmienok separácie zmesi analytov.

Určiť kalibračnú závislosť plochy píkov na koncentrácií zmesi analytov za optimálnych podmienok.

Zistiť konštantu stability kovu s GSH a Cys z polarografického merania.

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

3.1 Uskutočnené experimenty na CZE

Dôležitou úlohou pri separácii analytov a ich zmesi bolo určiť optimálne podmienky merania. Optimálne podmienky spočívali v určení: vlnovej dĺžky, vhodného elektrolytu, jeho koncentrácií a pH, napätia a dávkovania vzorky.

Optimálna vlnová dĺžka bola stanovená spektrofotometricky, meraním absorbancie vo viditeľnej oblasti spektra pri rôznej vlnovej dĺžke. Vhodná vlnová dĺžka bola určená z maxima absorbancie jednotlivých analytov.

Ako elektrolyt sa použila kyselina fosforečná. Meranie sa uskutočnilo pri dvoch koncentráciách.

Napätie záležalo na použitej koncentrácií elektrolytu. Pričom napätie muselo byť také, aby prúd nepresiahol viac než 100 μA . V prípade prekročenia mohlo dôjsť k poškodeniu kapiláry.

Dávkovanie vzorky sa určilo z vzhľadu pík v elektroforeograme. Pík mal byť nerozmytý a čo najviac symetrický.

Po stanovení optimálnych podmienok bolo uskutočnených niekoľko meraní jednotlivých analytov a zmesi. Určili sa migračné časy analytov a v akom poradí sa analyty separujú v zmesi. Bola stanovená reprodukovateľnosť metódy a kalibračná závislosť plochy pík v zmesi na koncentrácii zmesi.

3.2 Uskutočnené experimenty na polarografii

Úlohou polarografie bolo určiť konštantu stability komplexu analyt-Cd. Na určenie konštanty stability bolo treba určiť polvlnový potenciál a limitný difúzny prúd kadmiových iónov a komplexu analyt-Cd.

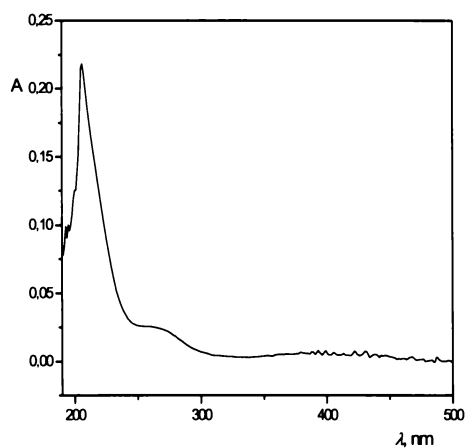
Polvlnové potenciály a limitné difúzne prúdy kadmiových iónov a komplexu analyt-Cd boli odčítané z polarogramu.

Konštantu stability sa určovala u GSH a Cys.

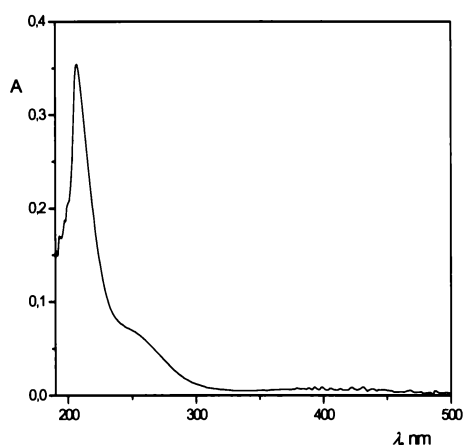
3.3 Stanovenie optimálnych podmienok merania jednotlivých analytov CZE

3.3.1 Určenie vlnovej dĺžky

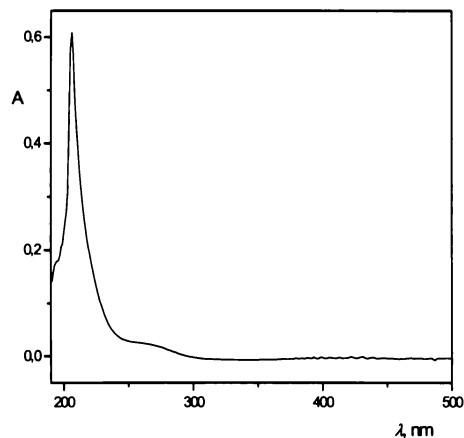
Spektrá analytov Cys (obr.: 3.1), cystín (obr.: 3.2), GSH (obr.: 3.3), GSSH (obr.: 3.4) boli zmerané v oblasti UV (od 200 nm do 400 nm). Z jednotlivých spektier je vidieť, že všetky analyty majú jedno absorpčné maximum. Všetky štyri analyty majú absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke $\lambda=206$ nm. Táto vlnová dĺžka bola zvolená na detekciu analytov počas celej analýzy.



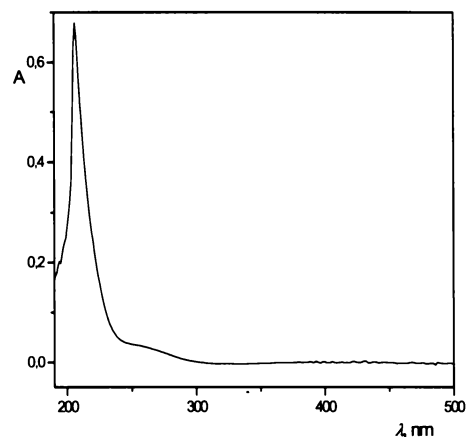
Obrázok 3.1: UV-spektrum Cys



Obrázok 3.2: UV-spektrum cystínu



Obrázok 3.3: UV-spektrum GSH



Obrázok 3.4: UV-spektrum GSSH

3.3.2 Určenie elektrolytu, napätia a dávkovania

Ako vhodný elektrolyt bola podľa literatúry²⁵ určená kyselina fosforečná. Meranie bolo uskutočnené za použitia 100 mM a 50 mM kyseliny. Z migračných časov analytov (tab.: 3.1 a 3.2) sa zistilo, že pri použití 50 mM kyseliny sa migračné časy analytov skrátili, oproti migračným časom analytov v 100 mM kyseliny. pH 100 mM kyseliny bolo 2,03 a 50 mM bolo 2,64. Tento posun je spôsobený tým, že pri tak nízkom pH dochádza len k elektroforetickej migrácii. Kladné ióny analytov budú vplyvom elektrického poľa putovať ku katóde elektroforetickou rýchlosťou tým rýchlejšie,

čím menšia bude iónová sila (čiže čím menšia bude koncentrácia elektrolytu). Ako vhodná koncentrácia elektrolytu bola zvolená 50 mM kyselina fosforečná o pH = 2,64 počas celej analýzy.

Napätie bolo zvolené na maximálnu hodnotu, pri ktorej prúd nebol vyšší než 100 μ A. Hodnota napätie bola ovplyvnená koncentráciou elektrolytu. Pri 100 mM elektrolyte je napätie 15 kV a pri 50 mM elektrolyte je 25 kV. Tento rozdiel je ovplyvnený intenzitou elektrického poľa.

Dávkovanie prebiehalo 0,08 min pri tlaku 10 mBar. Toto dávkovanie sa ukázalo ako optimálne, pretože vznikali symetrické píky analytov. Dávkovanie bolo totožné počas celého merania.

Tabuľka 3.1: Analýza pri 100 mM elektrolyte, pH = 2,03, U = 15 kV

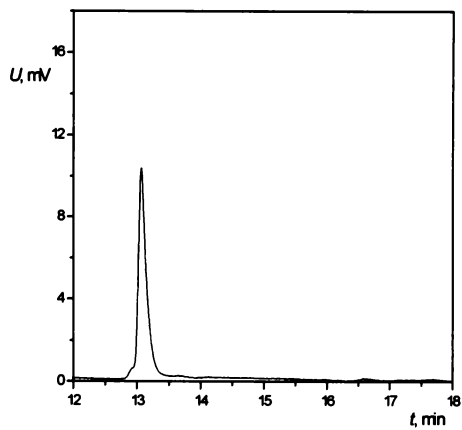
| | Cystín | Cys | GSSH | GSH |
|------------------|--------|-------|-------|-------|
| t_{mig} [min.] | 15,45 | 15,92 | 20,25 | 22,19 |

Tabuľka 3.2: Analýza pri 50 mM elektrolyte, pH = 2,64, U = 25kV

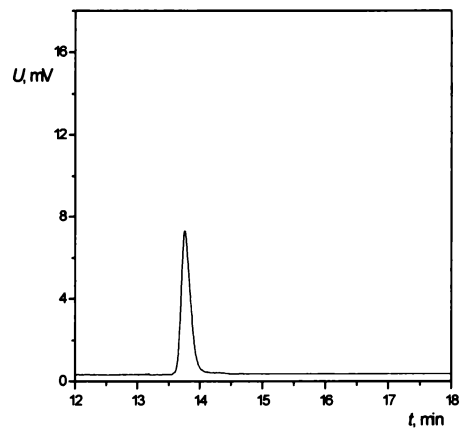
| | Cystín | Cys | GSSH | GSH |
|------------------|--------|-------|-------|-------|
| t_{mig} [min.] | 13,06 | 13,64 | 14,54 | 16,69 |

3.4 Analýza cystínu, Cys, GSSH, GSH a ich zmesi

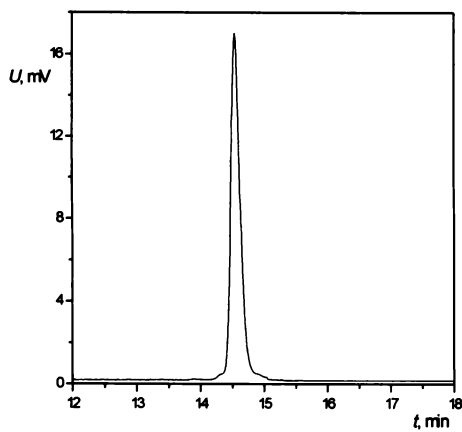
Pri analýze jednotlivých analytov: cystín (obr.: 3.5), Cys (obr.: 3.6), GSSH (obr.: 3.7) a GSH (obr.: 3.8) za optimálnych podmienok bolo zistené, že migrujú v poradí cystín, Cys, GSSH a GSH (obr.: 3.9). Pri analýze ich zmesi (obr.: 3.10) sa na základe jednotlivých migračných časov určilo, ktorý pík je daný analyt. Zmena plochy a migračných časov analytov v zmesi oproti samotným analýzám je zrejme spôsobené vzájomným nariedením sa.



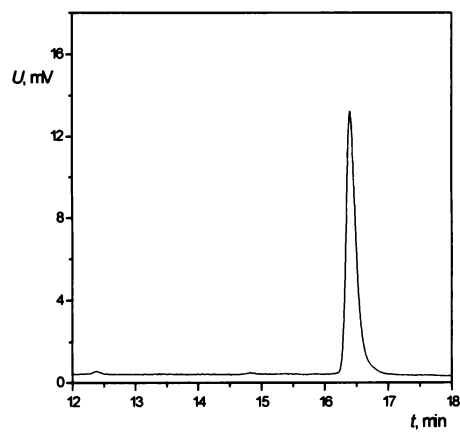
Obrázok 3.5: elektroforeogram cystínu



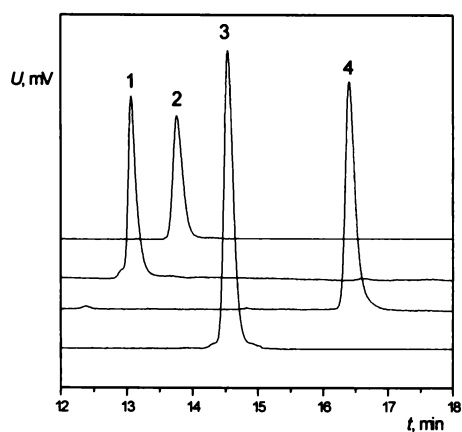
Obrázok 3.6: elektroforeogram Cys



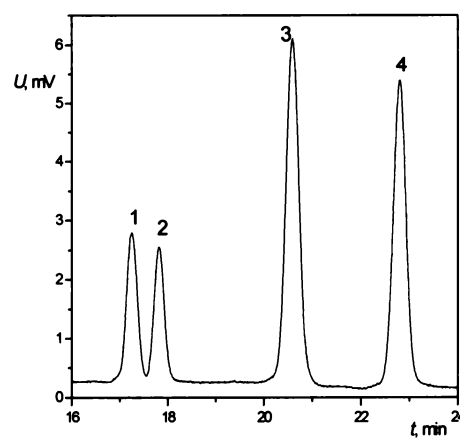
Obrázok 3.7: elektroforeogram GSSH



Obrázok 3.8: elektroforeogram GSH



Obrázok 3.9: elektroforeogram jednot. analytů: 1.cystín, 2.Cys, 3.GSSH, 4.GSH



Obrázok 3.10: elektroforeogram zmesi 1.cystín, 2.Cys, 3.GSSH, 4.GSH

3.5 Reprodukovateľnosť metódy

Reprodukovateľnosť metódy bola určená na meraní analytov v zmesi. Keďže pri každom meraní dochádzalo k posunu migračných časov, zmeny výšok a plôch píkov, reprodukovateľnosť nebola ideálna. Tabuľky 3.3 – 3.5 ukazujú štatistické spracovanie jednotlivých meraní.

Tabuľka 3.3: Štatistické vyhodnotenie z plôch píkov

| | cystín | Cys | GSSH | GSH |
|-------------------------|--------|------|------|------|
| medián [mV.s] | 32,1 | 28,6 | 99,2 | 88,8 |
| R [mV.s] | 9,3 | 6,6 | 22,8 | 17,2 |
| SD [mV.s] | 5,5 | 3,9 | 13,5 | 10,2 |
| RSD [%] | 17,1 | 13,6 | 13,6 | 11,5 |
| L _{1,2} [mV.s] | 12,1 | 8,6 | 29,6 | 22,4 |

Tabuľka 3.4: Štatistické vyhodnotenie z výšky píkov

| | cystín | Cys | GSSH | GSH |
|-----------------------|--------|-------|------|------|
| medián [mV] | 2,13 | 1,91 | 5,17 | 4,63 |
| R [mV] | 0,40 | 0,41 | 0,87 | 0,59 |
| SD [mV] | 0,24 | 0,24 | 0,51 | 0,35 |
| RSD [%] | 11,23 | 12,81 | 9,92 | 7,56 |
| L _{1,2} [mV] | 0,53 | 0,54 | 1,13 | 0,77 |

Tabuľka 3.5: Štatistické vyhodnotenie z migračných časov píkov

| | cystín | Cys | GSSH | GSH |
|------------------------|--------|-------|-------|-------|
| medián [min] | 17,25 | 17,81 | 20,59 | 22,80 |
| R [min] | 0,30 | 0,32 | 0,45 | 0,47 |
| SD [min] | 0,18 | 0,19 | 0,27 | 0,28 |
| RSD [%] | 1,04 | 1,05 | 1,30 | 1,21 |
| L _{1,2} [min] | 0,39 | 0,41 | 0,59 | 0,61 |

Z tabuliek je vidieť, že najviac reprodukovateľné je meranie migračných časov, kde RSD je nižší než 1,30%. Vyhodnotenie výšok i plôch je menej presné. Presnejšie je vyhodnocovať výšku píku než plochu. Kolísanie hodnôt je pravdepodobne spôsobené nereprodukovateľným povrchom kapiláry, nereprodukovateľným dávkovaním a kolísaním teploty merania, pretože kapilára nieje termostatovaná.

3.6 Kalibračná závislosť plochy píku na koncentrácií zmesi

Jednotlivé závislosti analytov boli merané v zmesi pri piatich rôznych koncentráciách v rozsahu od 1,11 mg/ml do 2,00 mg/ml. Nasledujúca tabuľka 3.6 zobrazuje parametre jednotlivých kalibračných kriviek.

$$Y = A + B * X$$

kde y – plocha píku [mV.s], x – koncentrácia zmesi [mg/ml]

Tabuľka 3.6: Kalibračné závislosti

| | cystín | Cys | GSSH | GSH |
|---------|--------|--------|--------|--------|
| A | -5,2 | -9,7 | -18,3 | -17,5 |
| chyba A | 3,7 | 2,7 | 11,2 | 11,9 |
| B | 20,2 | 19,7 | 55,7 | 50,1 |
| chyba B | 2,4 | 1,8 | 7,3 | 7,8 |
| R | 0,9790 | 0,9882 | 0,9750 | 0,9657 |
| SD | 1,7 | 1,2 | 5,2 | 5,5 |

Ako vyplýva z hodnôt korelačného koeficientu R uvedených v tabuľke 3.6, je závislosť plochy píku na koncentrácií lineárna pre všetky štyri študované látky v rozsahu od 1,11 mg/ml do 2,00 mg/ml.

3.7 Určenie konštanty stability z polarografického merania

Konštantu stability bola metódou polarografie určená u komplexu $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ a $\text{Cd}(\text{Cys})_2$ pri laboratórnej teplote 21°C . Podľa vzťahu (1.16) bola konštantu pre oba komplexy vypočítaná. Jednotlivé hodnoty potrebné pre výpočet uvádza tabuľka 3.7 a 3.8.

Tabuľka 3.7: Komplex $\text{Cd}(\text{GSH})_2$

| | $E_{1/2\text{kom}}$ [mV] | $E_{1/2\text{vol}}$ [mV] | I_{kom} [μA] | I_{vol} [μA] | konc. GSH [mol/l] | K |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ | -0,530 | -0,540 | 0,150 | 0,181 | 0,001 | $5,45 \cdot 10^5$ |

Tabuľka 3.8: Komplex $\text{Cd}(\text{Cys})_2$

| | $E_{1/2\text{kom}}$ [mV] | $E_{1/2\text{vol}}$ [mV] | I_{kom} [μA] | I_{vol} [μA] | konc. Cys [mol/l] | K |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| $\text{Cd}(\text{Cys})_2$ | -0,590 | -0,540 | 0,129 | 0,181 | 0,001 | $7,16 \cdot 10^7$ |

Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo vypracovať CZE metódu stanovenia cystínu, cysteinu, glutationu redukovaného a glutationu oxidovaného a určiť konštanty stability $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ a $\text{Cd}(\text{Cys})_2$.

Boli testované nasledujúce elektrolyty: 50 a 100 mM kyselina fosforečná v celom rozsahu pH, napätie sa volilo od 10 kV do 30 kV a boli zmerané UV spektrá.

Optimálnymi podmienkami sa stali: vlnová dĺžka 206 nm, elektrolyt 50 mM kyselina fosforečná o $\text{pH} = 2,64$, napätie 25 kV, dávkovací čas 0,08 min pri tlaku 10 mBar.

Na základe opakovaných meraní pri optimálnych podmienkach zmesi, sa určila reprodukovateľnosť metódy, pričom relatívne smerodajné odchýlky migračných časov boli cystín 1,04 %, Cys 1,05 %, GSSH 1,30 %, GSH 1,21 %, výšok cystín 11,23 %, Cys 12,81 %, GSSH 9,92 %, GSH 7,56 % a plôch cystín 17,1 %, Cys 13,6 %, GSSH 13,6 %, GSH 11,5 %.

Zistila sa kalibračná závislosť plochy pík na koncentrácií analytov v zmesi v rozsahu od 0,11 mg/ml do 2,00 mg/ml, kde jednotlivé parametre kalibračných kriviek sú cystín $y = 20,199x - 5,246$, Cys $y = 19,749x - 9,700$, GSSH $y = 55,691x - 18,278$, GSH $y = 50,138x - 17,511$.

Metódou polarografie sa určila konštanta stability komplexu $\text{Cd}(\text{GSH})_2$, ktorá má hodnotu $5,45 \cdot 10^5$ a konštanta stability komplexu $\text{Cd}(\text{Cys})_2$ je $7,16 \cdot 10^7$.

Literatúra

- ¹ The official Web Site of the Nobel Foundation. Dostupné na URL: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/>[cit. 17.4.2008].
- ² Dušek M.: *Dizertačná práca*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2004.
- ³ Parta C.; Bonnafaus P.; Frayse N.; Treilhou M.; Poinso V.; Couderc F.: *Electrophoresis* **22**, 4129 (2001).
- ⁴ Kašička V.: *Electrophoresis* **22**, 4139 (2001).
- ⁵ Durman D.; Palmiter R.: *J. Biol. Chem.* **256**, 5712 (1981).
- ⁶ Atkins P.; de Paula J.: *Atkin's Physical Chemistry*. 7. New York, Oxford University Press 2002.
- ⁷ Kellner R.; Mermet J.-M.; Otto M.; Valcárcel M.; Widmer H. M.: *Analytical Chemistry*. 2. Weinheim, Wiley-vch 2004.
- ⁸ Gaš B.: *Vesmír* **80**, 370 (2001).
- ⁹ Pospíchal J.: *Habilitačná práca*. Ústav chémie a biochémie MZLU, Brno 2003.
- ¹⁰ Štulík K. a kol.: *Analytické separačné metody*. 1. Praha, Karolinum 2005.
- ¹¹ Coufal P.: *Prednášky zo separčných metod*. Dostupné na URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html>>[cit. 17.4.2008].
- ¹² Vodičková H.; Pacáková V.; Šestáková I.; Mader P.: *Chem. Listy* **95**, 477 (2001).
- ¹³ Masters B.; Quaipe C.; Erickson J.; Kelly E.; Froelick G.; Zambrowicz B.; Brinster R.; Palmiter R.: *J. Neurosci.* **14**, 5844 (1994).
- ¹⁴ Pearce L.; Gandley R.; Han W.; Wasserloos K.; Stitt M.; Kanai A.; McLaughlin M.; Pitt B.; Levitan E.: *PNAS* **97**, 477 (2000).
- ¹⁵ Vodičková H.; Pacáková V.; Šestáková I.; Mader P.: *Chem. Listy* **95**, 477 (2001).
- ¹⁶ Kizek R.; Vacek J.; Trnková L.; Klejdus B.; Havel L.: *Chem. Listy* **98**, 166 (2004).
- ¹⁷ Zinellu A.; Sotgia S.; Posadino A.M.; Pasciu V.; Zinellu E.; Usai M.; Scanu B.; Chessa R.; Gaspa L.; Tadolini B.; Deiana L.; Carru C.: *Electrophoresis* **28**, 3277 (2007).
- ¹⁸ Voet D.; Voetová J.: *Biochemie*. 1, Praha, Victoria Publishing 1995.
- ¹⁹ Freedman J.; Ciriolo M.; Peisach J.: *J. Biol. Chem* **264**, 5598 (1988).
- ²⁰ Poleć-Pawlak K.; Ruzik R.; Lipiec E.: *Talanta* **72**, 1564 (2007).
- ²¹ Henzerberg L.; De Rosa S.; Dubs J.; Roederer M.; Anderson M.; Ela S.; Dereskinski S.: *Proc. Natl. Acad. Sci* **94**, 1967 (1997).

²² Sofrova D.; Tichá M.; Barthová J.; Entlicher G.; Stiborová M.; Novák F.; Hudeček J.; Hladík J.; Krajhanzl A.: *Biochemie – Základní kurz 3*, Praha, Karolinum 2005.

²³ Sun P.; Hoop A.; Hartwick R.: *J. Chromatogr. B* **661**, 335 (1994).

²⁴ Štulík K.; Barek J.: *Elektrochemické analytické metody 1*, Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1985.

²⁵ Pacáková V.; Štulík K.: *J. AOAC Int.* **83**, 549 (2000).

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som chcela poďakovať svojej školiteľke Prof. RNDr. Věře Pacákovéj, CSc. za odborné vedenie, všestrannú pomoc, ochotu a cenné pripomienky k mojej bakalárskej práci.

Ďalej ďakujem Prof. Ing. Karelovi Štulíkovi, DrSc. a Mgr. Jánovi Fischerovi, Ph.D. za odborné vedenie pri polarografickom meraní.

Ďakujem Mgr. Eve Svobodovej za príjemnú spoluprácu a ochotu pomôcť pri celom mojom meraní.

Tiež ďakujem Bc. Tomášovi Křížkovi za príjemnú spoluprácu.

Rada by som poďakovala svojej rodine, ktorá mi pomáhala pri štúdiu na tejto vysokej škole.