

ANALYSIS OF CYSTEINE, GLUTATHIONE AND PHYTOCHELATINS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION

ANALÝZA CYSTEINU, GLUTATHIONU A FYTOCHELATINU POMOCÍ VYSOKO-ÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S ELEKTROCHEMICKOU DETEKCÍ

Adam¹ V., Kizek² R., Vacek² J., Klejdus² B., Trnková³ L., Havel⁴ L.

¹Katedra analytické chemie PŘF MU Brno, ²Ústav chemie a biochemie MZLU Brno, ³Katedra teoretické a fyzikální chemie PŘF MU Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ⁴Ústav botaniky a fyziologie rostlin Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

New method for determination Cystein (Cys), reduced (GSH), eventually oxidized (GSSG) glutathione and phytochelatin (PC₂) by high performance liquid chromatography with electrochemical detection was optimised. The thiol compounds were analysed and separated on chromatographic column Polaris C18A (150x2.0x3 µm) using isocratic mobile phase containing 92 % 80 mM trifluoric acid (solvent A) and 8 % acetonitrile (solvent B). Optimal flow rate of mobile phase was 0.4 ml/min. Electrochemical detector scanned responses at applied potential on electrodes 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630 and 720 mV. Suitable analytical potential for real time analysis of Cys, GSH, GSSG and PC₂ was 540 mV. Dependences of current response of electrochemical detector on concentration of individual thiol compounds were linearly with relative standard deviation about 5 %. Detection limits were for cystein 10 ng/ml, GSH 80 ng/ml, GSSG 250 ng/ml and PC₂ 500 ng/ml, respectively.

Keywords: glutathione, phytochelatin, high performance liquid chromatography, electrochemical detector

ABSTRAKT

Byla optimalizována nová metoda pro stanovení cysteinu (Cys), redukováného (GSH), případně oxidovaného (GSSG) glutathionu a fytochelatinu (PC₂) pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Thiolové sloučeniny byly analyzovány a separovány na chromatografické koloně Polaris C18A (150x2.0x3 µm) při použití isokratické mobilní fáze obsahující 92 % 80 mM kyseliny trifluoroctové (solvent A) a 8% acetonitrilu (solvent B). Optimální průtok mobilní fáze byl 0.4 ml/min. Elektrochemický detektor snímal odezvy při aplikovaném potenciálu na elektrody 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630 a 720 mV.

Vhodným analytickým potenciálem pro simultánní nebo souběžnou analýzu Cys, GSH, GSSG a PC₂ bylo 540 mV. Závislosti proudové odezvy elektrochemického detektoru na koncentraci jednotlivých thiolových sloučenin byly lineární s relativní chybou stanovení kolem 5 %. Limity detekce byly pro cystein 10 ng/ml, GSH 80 ng/ml, GSSG 250 ng/ml a PC₂ 500 ng/ml.

Klíčová slova: glutathion, fytochelatin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektrochemický detektor

ÚVOD

Jednou z životních podmínek je udržení stálého prostředí - homeostázy. Při jejím narušení, např. působením toxických látek, může v organismu docházet velmi rychle k ukončení životně důležitých funkcí. Jednou skupinou toxických látek jsou těžké kovy. Do organismů vstupují z okolního prostředí nejčastěji potravou a na jejich detoxifikaci v organismu pracuje celá řada specializovaných peptidů a proteinů. Především u savců, ale i jiných živočišných druhů, tuto roli detoxifikačního proteinu zastává metalothionein (MT). U rostlin je mechanismus interakce jednodušší, dochází k vazbě kovu molekulami fytochelatinů, které jsou především transportovány do vakuoly [1-3]. Výchozím substrátem těchto, na síru bohatých peptidů, je molekula glutathionu a aminokyselina cystein [4]. Glutathion je nejrozšířenější neproteinový thiol, vyskytující se prakticky ve všech buňkách rostlinných i živočišných organismů. Jeho hlavní funkce spočívá v detoxifikaci celé řady organických i anorganických sloučenin, antioxidační obraně a buněčné signalizaci [5]. Glutathion je součástí významných peptidů se základním vzorcem (\square -Glu-Cys)_nGly, (n = 2–11), označované jako fytochelatiny a reprezentující skupinu látek, které na sebe opět vážou těžké kovy [1-3,6,7]. Proto má jejich analytické stanovení pro biology, molekulární biology, biochemiky, zemědělce a vědce, zabývající se ochranou životního prostředí, velký význam[8].

Pro běžnou analýzu různých biologicky významných látek v biologických vzorcích většinou postačí nanesení intracelulárního obsahu buněk na chromatografickou kolonu (Sephadex 50) bez derivatizace. Ovšem pro analýzu získané buněčné frakce v případě fytochelatinů je nezbytné peptidy obsahující sulfhydrylové skupiny (SH) nejprve derivatizovat [9]. Nejběžnější způsob derivatizace je pomocí Elmanova činidla [10]. Vzniklý barevný produkt je možné měřit pomocí spektrálních metod při vlnové délce 410 nm a automatizovat za využití snímání signálu diodovým polem [9]. Popsaná metoda byla modifikována pro citlivější fluorimetrickou detekci peptidů [11].

Selektivní a citlivé stanovení bez předchozí derivatizace je sice obtížné, avšak v poslední době se ukazuje, že bez derivatizace by mohla být velmi vhodným nástrojem studia proteinů elektrochemie. Klasické elektrochemické metody splňují požadavek na dobrou citlivost [12-15], ale ve složité matrici může docházet vlivem interferujících látek ke snížení selektivity. Nedostatek lze odstranit pomocí technik umožňující celý pracovní postup výrazně zjednodušit a

automatizovat využitím detekce analytu po jeho rozdělení na koloně multielektrodovými detektory. Jedná se o systém, kde je sériově zapojeno osm až 32 kanálů s průtočnými coulometrickými elektrodami. Kombinace vybrané citlivé elektrochemické metody a vysokoúčinné kapalinové chromatografie nabízí vhodný nástroj pro studium malých proteinů a peptidů, jakými jsou fytochelatiny.

V naší práci jsme se zaměřili na optimalizaci stanovení cysteinu, redukovaného případně oxidovaného glutathionu a fytochelatinu PC₂ za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

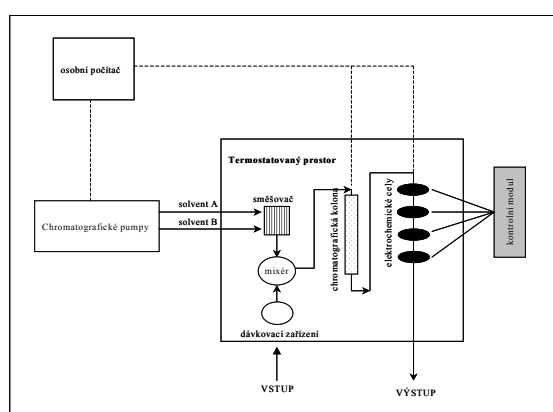
MATERIÁL A METODY

Chemikálie

Všechny chemikálie byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (USA). Acetonitril (HPLC-čistota) a methanol byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Germany). Zásobní roztoky standardů v koncentraci 1 µg/mL byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při 4 °C. Pracovní roztoky byly ze zásobního připravovány každý den nové. Všechny roztoky byly před HPLC separací filtrovány přes teflonový filtr 0.45 µm (MetaChem, Torrance, CA, USA).

HPLC-ED

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0.001-9.999 mL/min), a chromatografické kolony Polaris C18A (150x2.0x3 µm) a osmi-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující referenční, pomocnou (Pd) a osm porézních grafitových elektrod. V řídicím modulu je uložena chromatografická kolona, elektrochemický detektor, prostor je termostatovaný. Vzorek (5 µL) byl injektován manuálně (Obr. 1).



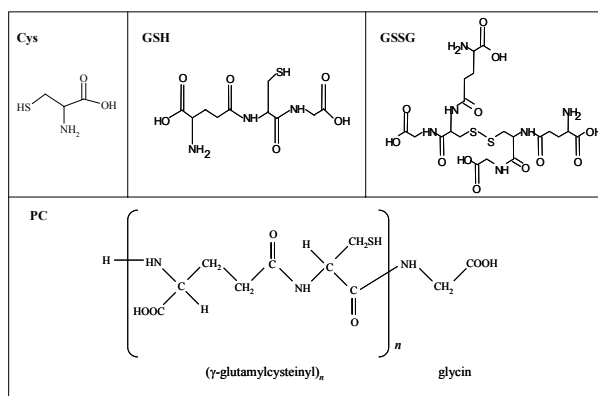
Obr. 1: Základní schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickým detektorem.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Elektrochemické měření

Elektroanalytické stanovení má řadu výhod, mezi které zcela jistě patří rychlost, velmi dobrá citlivost, reprodukovatelnost a levnost. Nevýhodou je však horší selektivita v přítomnosti interferujících látek ze složité biologické matrice. Jak je ukázáno v řadě prací, elektrochemické metody jsou vhodné pro stanovení nukleových kyselin [13,16], proteinů [12,17], antibiotik [18] a kovů v relativně složité biologické matici [19].

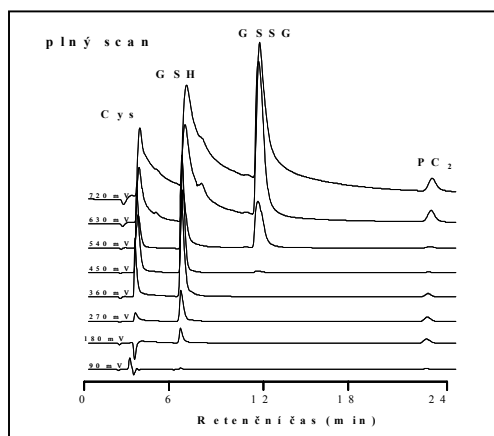
Základní elektrochemické chování cysteinu (Cys), redukovaného (GSH) případně oxidovaného (GSSG) glutathionu a fytochelatinu (PC₂) jsme uskutečnili na rtuťové kapkové elektrodě pomocí cyklické voltametrie. Všechny studované látky obsahují ve své molekule atomy síry (Obr.2), které jsou elektroaktivní. Získané výsledky jsme využili při optimalizaci elektrochemického stanovení těchto thiolových látek po jejich chromatografickém rozdělení pomocí HPLC (není ukázáno).



Obr. 2: Chemická struktura cysteinu (Cys), redukovaného glutathionu (GSH), oxidovaného glutathionu (GSSG) a fytochelatinu (PC).

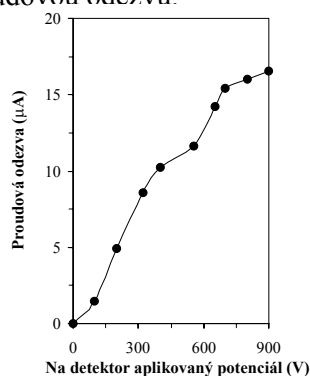
Vliv aplikovaného potenciálu na pracovní elektrody

V průběhu celého experimentu jsme se snažili o co nejjednodušší separační podmínky za využití kolony Polaris C18A (150x2.0x3 μm) při použití isokratické mobilní fáze obsahující 92 % 80 mM kyseliny trifluorooctové (solvent A) a 8% acetonitrilu (solvent B). Průtok mobilní fáze se pohyboval kolem 0.2 mL/min., kolona i detektor byly termostatovány na 35 °C. Analyt byl do průtokového systému injektován přes 5 μL dávkovací ventil. Pro nalezení podmínek co nejcitlivějšího stanovení studovaných látek bylo nejdříve nezbytné nalézt optimální odpověď elektrochemického detektoru. Na grafitové porézní elektrody elektrochemického detektoru jsme vkládali potenciály 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630 a 720 mV a záznam celkového scanu je ukázán na obrázku 3. Pro volbu vhodného analytického potenciálu vycházíme z hydrodynamického voltampérogramu (Obr. 4). Ten je získán po opakovaném dávkování analytu o konstantní koncentraci do průtokového systému.



Obr. 3: HPLC-ED chromatografický záznam Cys, GSH, GSSG a PC₂ (1 µg/ml). Na elektrody byl vložen potenciál 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630 a 720 mV, kolona (USA) (50.0 x 3.0 mm I.D.) plněná XTerra™ MS C18, isokratická mobilní fáze: 92 % 80 mM kyseliny trifluoroctové (solvent A) a 8% acetonitrilu (solvent B), průtok mobilní fáze 0.2 mL/min., kolona i detektor byly termostatovány na 35 °C. Analyt byl do průtokového systému injektován přes 5 µl dávkovací ventil.

Výsledný voltampérogram má charakteristický sigmoidní průběh. Pro měření jednotlivých vzorků se volí potenciál s oblasti limitního proudu, případně z místa nejmenšího potenciálového rozdílu (oblast stoupající části vlny)[20]. Potenciál v místě nejmenšího potenciálového rozdílu jsme zvolili jako nejvhodnější detekční potenciál pro další měření (Obr. 4). Zjistili jsme, že potenciál 540 mV je vhodným analytickým potenciálem jak pro současnou analýzu Cys, GSH, GSSG a PC₂ tak pro dobrou proudovou odezvu.

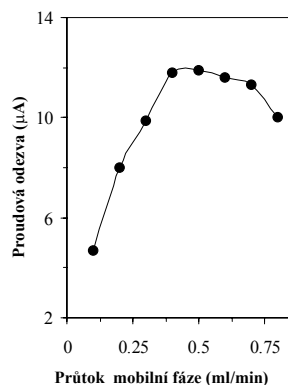


Obr. 4: Hydrodynamický voltampérogram fytochelatinu PC₂. Ostatní podrobnosti jsou uvedeny na obrázku 3.

Vliv celkového průtoku mobilní fáze a koncentrace acetonitrilu

Významným parametrem pro získání maximální odezvy na elektrochemickém detektoru je celkový průtok mobilní fáze. Maximální odezvy jsme získali při průtoku 0.4 mL/min. Při vyšším průtoku se již odezva snižuje na 80 – 90 % maxima a to pravděpodobně díky menšímu času prekoncentrace. Nižší průtok tedy pravděpodobně souvisí s možností nasycení aktivního povrchu elektrody (při dané koncentraci) a tím dochází ke snížení sledovaného signálu (Obr. 5).

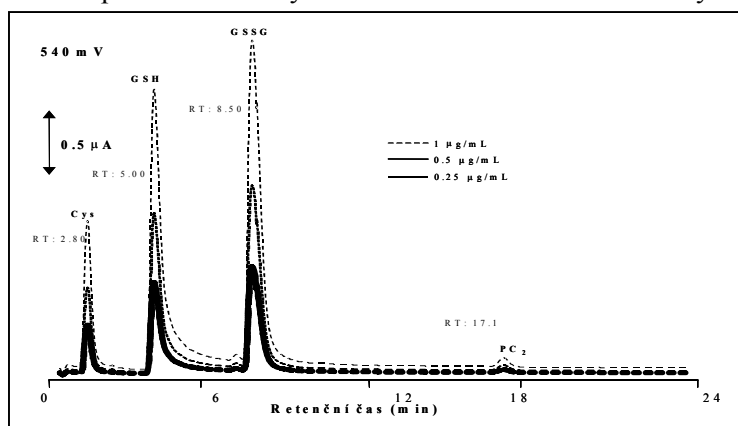
Protože elektrochemické stanovení vyžaduje přítomnost elektrolytu, testovali jsme vliv acetonitrilu na elektrochemickou odpověď analytu. Získaná závislost ukazuje negativní vliv vyšší koncentrace acetonitrilu na studovaný signál (není ukázáno).



Obr. 5: Závislost výšky píku fytochelatinu PC₂ na průtoku isokratické mobilní fáze. Ostatní podrobnosti jsou uvedeny na obrázku 3.

Chromatografická separace Cys, GSH, GSSG a PC₂

Na chromatografické koloně při použití isokratické mobilní fáze obsahující 92 % 80 mM kyseliny trifluoroctové (solvent A) a 8% acetonitrilu (solvent B) a optimálním průtoku mobilní fáze 0.4 ml/min byly dokonale separovány Cys – RT: 2.80 min., GSH – RT: 5.00 min., GSSG – RT: 8.50 min. a PC₂ – RT: 17.10 min. (Obr. 6). Na obrázku je ukázán chromatogram thiolových sloučenin při třech rozdílných koncentracích (0.25, 0.5 a 1 µg/ml). Z obrázku je velmi dobře patrný lineární trend závislosti proudové odezvy na koncentraci studovaného analytu.

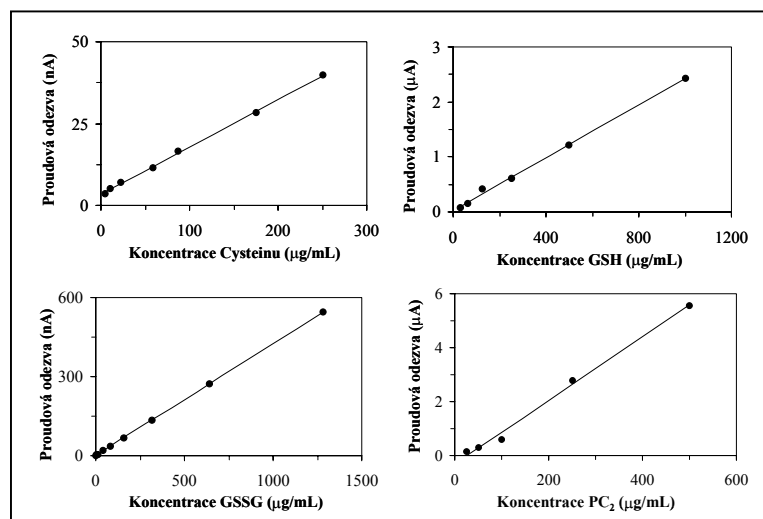


Obr. 6: HPLC-ED chromatografický záznam Cys, GSH, GSSG a PC₂ (1 µg/ml) při 540 mV a průtoku mobilní fáze 0.4 ml/min. Ostatní podrobnosti jsou uvedeny na obrázku 3.

Vliv koncentrace

Při nastavení všech optimálních parametrů metody jsme testovali možnosti citlivého stanovení thiolových látek na elektrochemickém detektoru. Závislosti proudové odezvy elektrochemického detektoru na koncentraci jednotlivých thiolových sloučenin byly lineární a

relativní střední chyba (R.S.D.) se pohybovala kolem 5% ($n = 5$). Rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti závislosti proudové odezvy na koncentraci byly pro Cys: $y = 0.1449x + 3.3061$, $R^2 = 0.9989$; GSH: $y = 0.0024x + 0.0295$, $R^2 = 0.9973$; GSSG: $y = 0.4251x + 0.9715$, $R^2 = 0.9959$, PC_2 : $y = 0.0118x - 0.3081$, $R^2 = 0.9943$ (Obr. 7). Limity detekce byly pro cystein 10 ng/ml, GSH 80 ng/ml, GSSG 250 ng/ml a PC_2 500 ng/ml.



Obr. 7: HPLC-ED závislosti proudové odezvy elektrochemického detektoru na koncentraci jednotlivých thiolových sloučenin (Cys, GSH, GSSG a PC_2). Ostatní podrobnosti jsou uvedeny na obrázku 6.

ZÁVĚR

Analytická chemie se velmi intenzivně rozvíjí a přináší nové metody pro biochemické a molekulárně biologické studium proteinů a peptidů. V naší práci jsme optimalizovali rychlé, selektivní a citlivé stanovení cysteinu (Cys), redukovaného (GSH) případně oxidovaného (GSSG) glutathionu a fytochelatinu (PC_2) pomocí kombinované techniky vysoko-účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Elektrochemická determinace těchto thiolových sloučenin je srovnatelná s ostatními analytickými technikami.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na této publikaci byla financována z dlouhodobého záměru Agronomické fakulty MZLU č. 4321 00001, FRVŠ 1203/2003 a Národního výzkumného centra LN00A081 a Grantu 203/02/0422 od GA ČR.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] C.S. Cobbett, *Plant Physiol.* 123 (2000) 825–832.
- [2] C.S. Cobbett, *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (2000) 211–216.
- [3] C.S. Cobbett, *IUBMB Life* 51 (2001) 183–188.
- [4] C.S. Cobbett, M.J. May, R. Howden, B. Rolls, *Plant J.* 16 (1998) 73–78.
- [5] J. Jamison, *Nature Biotechnol.* 18 (2000) 586.

- [6] C.S. Cobbett, *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 335–337.
- [7] C.S. Cobbett, P.B. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53 (2002) 159–181.
- [8] J.E. Gawel, B.A. Ahner, A.J. Friedland, F.M.M. Morel, *Nature* 381 (1996) 64–65.
- [9] R.C. Fahey, G.L. Newton, *Methods Enzymol.* 143 (1987) 85–97.
- [10] G. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [11] E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, *Methods Enzymol.* 205 (1991) 333–341.
- [12] R. Kizek, L. Trnková, E. Paleček, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4801–4807.
- [13] L. Trnková, R. Kizek, J. Vacek, *Bioelectrochem.* 56 (2002) 57–61.
- [14] J. Vacek, J. Petřek, L. Havel, D. Koutná, V. Adam, L. Trnková, R. Kizek, In: VI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů Brno (2002).
- [15] J. Vacek, J. Petřek, R. Kizek, L. Havel, B. Klejdus, L. Trnková, F. Jelen, *Biochemistry* in press (2003).
- [16] E. Paleček, S. Billova, L. Havran, R. Kizek, A. Miculkova, F. Jelen, *Talanta* 56 (2002) 919.
- [17] M. Masarik, R. Kizek, K.J. Kramer, S. Billova, M. Brazdova, J. Vacek, M. Bailey, F. Jelen, J.A. Howard, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2663.
- [18] S. Billova, R. Kizek, F. Jelen, P. Novotna, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 362.
- [19] R. Kizek, L. Trnkova, S. Sevcikova, J. Smarda, F. Jelen, *Anal. Biochem.* 301 (2002) 8.
- [20] K. Markušová, *Elektrochemické metody*, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice, 2000.