SIMULTANEOUS DETERMINATION OF THIOL COMPOUNDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION

SOUČASNÉ STANOVENÍ THIOLOVÝCH SLOUČENIN POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S ELEKTROCHEMICKOU DETEKCÍ

Stejskal K.^{1,2)}, Kleckerová A.¹⁾, Zítka O.^{1,3)}, Adam V.^{1,2)}, Mikelová R.^{1,4)}, Havel L.⁵⁾, Kizek R.¹⁾

¹Department of Chemistry and Biochemistry and ⁵Department Plant Biology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Analytical Chemistry, ³Department of Biochemistry, and ⁴Department of Theoretical and Physical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: karel_stejskal@yahoo.com, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Thiol compounds play an important role in a number of physiological processes, especially in heavy metal detoxification at plants. Here, we report the using of high performance liquid chromatography with electrochemical detection (CoulArray) for simultaneous determination of biologically important thiol compounds (Cysteine, N-AcetylCysteine, Homocysteine, Cystine, Reduced glutathione, Oxidized glutathione, and Phytochelatins). We studied the electrochemical responses of the studied thiols in the range of 300 mV to 1 000 mV. The height of signals of cysteine and phytochelatins (PC₂, PC₅ and desGly–PC) were low at potential of 300 mV. We observed well developed peaks of all thiols at potential 500 mV. But the highest responses were observed at 900 – 1 000 mV. On the base of the obtained results we selected 900 mV as the most suitable potential for simultaneous determination of the studied thiols. In addition we applied the technique to study of content of thiols in blood serum.

Keywords: Thiol coupounds, Heavy metals, Blood serum, Flow injection analysis, High performance liquid chromatoraphy, Electrochemical detection.

ABSTRAKT

Thiolové sloučeniny hrají roli v řadě fyziologických pochodů a velmi významná je jejich schopnost vázat do své struktury těžké kovy. V této práci je popsána metoda pro současné stanovení thiolových sloučenin (cysteinu, N-acetylcysteinu, homocysteinu, cystinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu, a fytochelatinů) pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (CoulArray). Odpověď elektrochemického detektoru byla sledována od 300 mV do 1000 mV. Při počátečním potenciálu 300 mV byly pozorovány velmi nízké signály u cysteinu a fytochelatinů (PC₂, PC₅ a desGly–PC). Při aplikovaném potenciálu nad 500 mV byly již dobře pozorovatelné signály všech studovaných

thiolových sloučenin. U všech studovaných thiolů bylo dosaženo maximální proudové odpovědi při potenciálu 900 – 1000 mV. Na základě výše popsaných výsledků byl pro současnou analýzu všech studovaných thiolových sloučenin vybrán potenciál 900 mV. Dále byla vyvinutá metodika aplikována na studium obsahu thiolových sloučenin v krevním séru.

Klíčová slova: Thiolové sloučeniny, Těžké kovy, Krevní sérum, Průtoková injekční analýza, Vysoko-účinná kapalinová chromatografie, Elektrochemická detekce.

ÚVOD

Síra existuje stabilně v mnoha oxidačních stavech, díky čemuž je univerzální složkou mnoha biologických systémů [1]. Vysoce aktivní a velmi redukčně významné formy síry v biologických molekulách jsou thiolové sloučeniny [2]. Thioly prezentuje je široká skupina biologicky aktivních látek jako například aminokyselina cystein, homocystein a všudypřítomný tripeptid glutathion a řada dalších [3-7]. V naší práci jsme pro simultánní stanovení thiolových sloučenin (redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG), fytochelatin (PC₂), fytochelatin (PC₅) L-cystein (Cys), L-cystin, DL-homocystein a N-acetyl-L-cystein) využili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s elektrochemickou detekcí. Nejprve bylo nezbytné použít systém průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED) pro optimalizaci maximální odpovědi elektrochemického detektoru. Dále byla vyvinutá metodika aplikována na studium obsahu thiolových sloučenin v krevním séru.

MATERIÁLY A METODY

Chemikálie

Acetonitril a methanol (HPLC-čistota) byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Germany). Standardy PC₂, PC₅ a DesGlyPC jsme získali od firmy Clonestar Brno. Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA) pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 100 μ g.ml⁻¹) 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 analýzou filtrovány přes teflonový filtr 0.45 μ m (MetaChem, Torrance, CA, USA). Hodnoty pH byly stanoveny pomocí MV870 pH meter (Praecitronic, Německo). pH metr byl pravidelně kalibrován pomocí sady NBS pufrů. Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěná pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18 MΩ) (pro kultivační medium).

Krevní sérum

Lidské krevní sérum bylo získáno z Ústavu klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ponávka, Brno. Vzorky séra byly před vlastní analýzou 100 × zředěny ACS vodou.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

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 s reverzní fází Polaris C18A (150 × 4,6 ; 3 μm velikost částic, Varian Inc., CA, USA) a osmi-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA), popřípadě reakční smyčky (1 m) pro průtokovou injekční analýzu (FIA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující referentní (hydrogen paládiová), pomocnou a osm porézních grafitových elektrod. V řídícím modulu je uložena chromatografické kolona, elektrochemický detektor, prostor je termostatovaný. Vzorek (5 μl) byl injektován manuálně.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vliv průtoku mobilní fáze a koncentrace methanolu

Významným parametrem pro získání maximální odezvy na elektrochemickém detektoru je průtok mobilní fáze. Maximální odezvy studovaných thiolů jsme získali při průtoku 0.8 ml/min. Při vyšším průtoku se již odezva snižuje na 80 – 90 % maxima a to pravděpodobně díky menšímu času pre-koncentrace. Nižší průtok než 0.8 ml/min také snižuje pozorované signály o více jak 20 % při porovnání s nejvyšší odezvou, což pravděpodobně souvisí s možností nasycení aktivního povrchu elektrody (při dané koncentraci), a tím dochází ke snížení sledovaného signálu. Protože elektrochemické stanovení analytu vyžaduje přítomnost elektrolytu, testovali jsme vliv organického rozpouštědla (methanolu) na elektrochemickou odpověď analytu. Zjistili jsme, že 15% obsah methanolu v mobilní fázi, která jako vodní fázi obsahovala 80 mM kyselinu trifluoroctovou, vede k více jako 50% poklesu oxidačních signálů všech studovaných thiolů. Výrazně strmý pokles proudové odpovědi, byl pozorován u oxidovaných thiolů (GSSG a Cystin). Zajímavé bylo také chování fytochelatinu PC₅, kde pokles signálu byl s rostoucím obsahem methanolu pozvolný. Pozorovaná změna, pravděpodobně souvisí s velikostí či strukturním uspořádáním molekuly PC₅. Jako nejvhodnější poměr 80 mM kyseliny trifluoroctové a metanolu v mobilní fázi byl 99:1 (v/v) [8].

Chromatografická separace – izokratická a gradientová eluce

V průběhu celého experimentu bylo využito chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A ($150 \times 4,6 \ 3 \mu m$ velikost částic). Při optimalizaci výše uvedených chromatografických podmínek jsme používali mobilní fázi skládající se z 80 mM kyseliny trifluorooctové (solvent A) a methanolu (solvent B) v isokratickém módu. Byly získány signály jednotlivých thiolových sloučenin cystin v retenčním čase 3.1 min; cystein 3.2 min; homocystein 5.4 min; PC₅ 6.9 min; GSH 7.0 min; NAcCystein 8.4 min; DesGlyPC 24.5 min; GSSG 34.5 min a PC₂ 44.1 min. Signály PC₅ a GSH, a cystinu a cysteinu nejsou dokonale separovány, a navíc doba jedné analýzy trvá téměř 45 minut. Proto jsme se rozhodli využít pro separaci thiolů gradientové eluce. První použitý gradient vycházel z 3 % methanolu v mobilní fázi a po 8 minutách došlo k nárůstu obsahu methanolu na 20 % během jedné minuty. Po té zůstal obsah methanolu na konstantní výši (20 %) po dobu 8 minut. V 16 minutě došlo ke snížení obsahu methanolu na 3 % během jedné minuty. Při tomto gradientu, však došlo k horší separaci a senzitivitě pro thioly DesGlyPC, GSSG a PC₂. Na základě těchto výsledků jsme snížili v dalších experimentech maximální obsah methanolu na 15 % a průběh gradientové eluce zůstal zachován (jak je popsáno výše). V případě, že byl použit námi nově navržený postup chromatografické separace, bylo možné získat velmi dobře oddělené a symetrické chromatografické píky všech devíti thiolových sloučenin s velmi dobrou reprodukovatelností a senzitivitou. Navíc se nám podařilo pomocí nově zvoleného postupu zkrátit čas analýzy na méně jak 16 minut, což je oproti výsledkům získaným pomocí isokratické eluce snížení o 30 minut.

Obr. 1 Závislost výšek elektrochemických signálů studovaných thiolů na různém obsahu metanolu v mobilní fázi, která obsahovala jako vodní fázi 80 mM kyselinu trifluoroctovou. Průtok mobilní fáze 0.8 ml/min, aplikovaný potenciál na všechny elektrody 900 mV.



Vliv koncentrace thiolů

Při optimálních chromatografických a detekčních parametrech (mobilní fáze: 80 mmol.l⁻¹ kyselina trifluoroctová (solvent A) a metanol (solvent B); gradient: 3% metanol konstantní pod dobu 8 minut, poté nárůst metanolu na 15% během 1 minuty, po 8 minutách konstantního obsahu metanolu (15%) pokles na 3% během jedné minuty; průtok mobilní fáze 0.8 ml.min⁻¹, kolona i detektor byly termostatovány na 25 °C) byla studována závislost výšky signálů thiolů na jejich koncentraci. Získané koncentrační závislosti byly striktně lineární (R² = 0.9978 až 0.9993). Nárůst obsahu methanolu, však snížil maximální proudové odpovědi na elektrochemickém detektoru o 20–50 %. I přes tento negativní vliv zvýšeného obsahu methanolu, bylo možné dosáhnout velmi dobré senzitivity, protože limity detekce se

pohybovaly v desítkách femtomolů na 5 μ l nástřik, vyšší limity detekce byly pozorovány pouze u cystinu GSSG a PC₅, kde byl limit detekce 2 pikomoly na 5 μ l nástřik. Vyšší pozorované limity detekce pravděpodobně souvisí s velikostí molekul stanovovaných thiolů a rozdílnou interakcí s povrchem pracovních elektrod.

Thiol	Retenční		Korelační	Detekční limit	Detekční limit	RSD
	čas (min.)	Regresní přímka	koeficient	(ng/ml)	(fmoly na 5 µl)	(%) ^a
Cystein	3.15	y = 1.952x + 0.263	0.9993	0.4	14	1.8
Cystin	2.84	y = 0.111x + 0.052	0.9990	6	127	3.5
Homocystein	7.88	y = 0.665x + 0.133	0.9987	1	38	2.2
NAcCystein	7.25	y = 1.002x + 0.343	0.9995	0.7	21	3.2
GSH	5.92	y = 0.593x - 0.053	0.9992	1	19	1.9
GSSG	14.20	y = 0.069x - 0.003	0.9979	10	80	3.3
DesGlyPC	13.60	y = 0.691x + 0.0501	0.9978	1	10	3.8
PC_2	15.40	y = 0.093x - 0.0293	0.9971	7	67	2.2
PC ₅	5.58	y = 0.0013x - 0.0063	0.9995	519	2104	3.0

Tabulka 1: Kalibrační data pro HPLC-ED stanovení thiolů (n = 5).

^a ... Relativní standardní odchylka (%)

Analýza thiolů v krevním séru

Pomocí vyvinuté HPLC-ED techniky byl analyzován obsah thiolů v ředěném lidském krevním séru. Na získaném HPLC-ED chromatogramu bylo možné pozorovat signály cysteinu, cystinu, homocysteinu, GSH, GSSG a signál cysteinylglycinu. Zjištěné koncentrace v krevním séru byly pro cystein $8 \pm 0.2 \mu$ M, cystin $10 \pm 0.5 \mu$ M, homocystein $9 \pm 0.1 \mu$ M, GSH $11 \pm 0.3 \mu$ M, GSSG $4 \pm 0.2 \mu$ M a cysteinylglycin $35 \pm 0.4 \mu$ M. Ze získaných výsledků je zřejmé, že senzitivní HPLC-ED metodu lze využít pro analýzu thiolů v krevním séru. Avšak vliv použité biologické matrice na elektrochemické odezvy pouze naředěného vzorku na standardní přídavky je značný (pokles signálu o více jak 80%). Vysvětlení pozorovaného chování není jasné, ale pravděpodobně dochází interakci thiolů s proteiny přítomnými v krevní plazmě. Tento efekt je možné snížit tepelnou a chemickou denaturací proteinů přítomných v séru, čehož využívá řada analytických postupů. Zůstává, ale otázkou jak tento postup přípravy vzorku ovlivní výsledné koncentrace thiolů ve sledovaném vzorku.

ZÁVĚR

Vzrůstající množství polutantů různého druhu a původu v životním prostředí vede organismy k potřebě vytvářet nové detoxikační mechanismy. Studium způsobu adaptace na jednotlivé druhy znečištění je velmi důležitým úkolem moderní analytické chemie, biochemie a molekulární biologie. Jak je ukázáno, elektrochemické stanovení v průtokovém systému umožňuje velmi senzitivní, rychlé a automatizované měření řady thiolových sloučenin [8-17].

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, INCHEMBIOL 0021622412 a FRVŠ 2348/F4a.

LITERATURA

- [1] G.I. Giles and C. Jacob Reactive sulfur species: An emerging concept in oxidative stress, Biol. Chem. 383 (2002) 375-388.
- [2] J. Vacek, J. Petrek, R. Kizek, L. Havel, B. Klejdus, L. Trnkova and F. Jelen Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture, Bioelectrochemistry 63 (2004) 347-351.
- [3] D.G. Savage, J. Lindenbaum, S.P. Stabler and R.H. Allen Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diganosing cobalamin and folate deficiencies, Am. J. Med. 96 (1994) 239-246.
- [4] H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygard and S.E. Vollset Homocysteine and cardiovascular disease, Annu. Rev. Med. 49 (1998) 31-62.
- [5] J.G. Ray and C.A. Laskin Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review, Placenta 20 (1999) 519-529.
- [6] I.K. Smith, A.C. Kendall, A.J. Keys, J.C. Turner and P.J. Lea Increased leavels of glutathione in a catalse-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare L.*), Plant Sci. Lett. 37 (1984) 29-33.
- [7] D.M. Townsend, K.D. Tew and H. Tapiero The importance of glutathione in human disease, Biomed. Pharmacother. 57 (2003) 145-155.
- [8] D. Potesil, J. Petrlova, V. Adam, J. Vacek, B. Klejdus, J. Zehnalek, L. Trnkova, L. Havel and R. Kizek Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays L.*) kernels using highe-performance liquid chromatography with electrochemical detection, J. Chrom. A 1084 (2005) 134-144.
- [9] P.C. White, N.S. Lawrence, J. Davis and R.G. Compton Electrochemical determination of thiols: A perspective, Electroanalysis 14 (2002) 89-98.
- [10] L. Trnkova, R. Kizek and J. Vacek Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping, Bioelectrochemistry 56 (2002) 57-61.
- [11] E. Palecek, M. Masarik, R. Kizek, D. Kuhlmeier, J. Hassmann and J. Schulein Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA, Anal. Chem. 76 (2004) 5930-5936.
- [12] D. Potesil, R. Mikelova, V. Adam, R. Kizek and R. Prusa Change of the protein p53 electrochemical signal according to its structural form - quick and sensitive distinguishing of native, denatured, and aggregated form of the "Guardian of the Genome", Protein Journal in press (2005).
- [13] R. Prusa, D. Potesil, M. Masarik, V. Adam, R. Kizek and F. Jelen Fast and sensitive electrochemical detection of native denaturated, and aggregated forms of tumor suppressor protein p53, Mol. Biol. Cell 15 (2004) 249A-249A.
- [14] R. Prusa, O. Blastik, D. Potesil, L. Trnkova, J. Zehnalek, V. Adam, J. Petrlova, F. Jelen and R. Kizek Analytic method for determination of metallothioneins as tumor markers, Clin. Chem. 51 (2005) A56-A56.
- [15] B. Klejdus, J. Zehnalek, V. Adam, J. Petrek, R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova, R. Rozik, L. Havel and V. Kuban Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (Zea mays L.) kernels exposed to cadmium, Anal. Chim. Acta 520 (2004) 117-124.
- [16] R. Kizek, L. Trnkova and E. Palecek Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, Anal. Chem. 73 (2001) 4801-4807.
- [17] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova and F. Jelen Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine, Bioelectrochemistry 63 (2004) 19-24.