

Analýza thiolových sloučenin

I. Fabrik, V. Adam, R. Kizek

Novinka v analýze thiolových sloučenin – Automatizovaný elektrochemický analyzátor

ÚVOD

V klinicky zaměřených laboratořích se s elektrochemickými analyzátoři téměř nepotkáme. Důvodů tohoto jevu je několik, ale mezi ty nejdůležitější patří potřeba kvalifikované obsluhy takového analyzátoru, a s tím spojená náročnost provozu a údržby, přičemž trendem ve výrobě klinických přístrojů je zvyšování tzv. uzavřenosti takových zařízení. Důvod je zcela jasný: pro zaručení správného chodu přístroje garantovaného výrobcem je nezbytné, aby přístroj byl oprostěn veškerým vnějším vlivům, včetně toho lidského. Je však také otázkou, zdali je takový přístup vždy ku prospěchu věci či nikoliv. Vraťme tedy pozornost k elektrochemickým zařízením a jejich možnému využití v klinické praxi.

ELEKTROCHEMIE

Elektrochemické stanovení, v našem případě je myšlena voltametrická anebo amperometrická detekce, by z klinických laboratořích vymizet jistě neměla. Hlavními důvody, proč by elektrochemie měla zůstat i v klinických laboratořích, jsou výborná opakovatelnost, nízký limit detekce, nízké náklady jak na pořízení přístroje, tak na provoz, a u některých postupů je to i selektivita stanovení. Je potřebné upozornit, že elektrochemická analýza přináší jeden z nejsenzitivnějších a nejselektivnějších analytických postupů pro analýzu thiolových sloučenin v reálném vzorku tělních tekutin a tkání bez jeho náročné přípravy a úpravy (např. derivatizace). Díky tomu je možné provádět analýzy do 60 minut od přijmutí vzorku do laboratoře. Výhody elektrochemické detekce jako takové lze ještě vylepšit spojením s vhodnou separační technikou jako např. vysoce účinnou kapalinovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou. Takové spojení přináší výhody obou použitých technologií.

AUTOMATIZACE JE TAKÉ MOŽNÁ

Pro naše účely analýzy thiolových látek v biologických vzorcích byl testován elektrochemický analyzátor od společnosti Metrohm (zařízení unikátní v oblasti celé střední Evropy). Zařízení je koncipováno jako automat, který je tvořen elektrochemickým modulem (potenciostat/galvanostat, VA Stand 747), na němž je umístěna elektrochemická nádobka, do níž jsou umístěny tři elektrody (pracovní, referentní, pomocná).

Další součástí zařízení je speciální podavač vzorků (Autosampler 695), který splňuje náročný požadavek na minimalizaci odběru vzorku. Vzorek je odebírán do teflonové kapiláry naplněné hydraulickou kapalinou. Kapilára je napojena na vzduchovou pumpu, která zabezpečuje přesné dávkování vzorku. Množství vzorku, které je možné pomocí této technologie dávkovat, se pohybuje od 1 do 100 μ l. Kapilára je umístěna na pohyblivém rameni, které má možnost pohybu ve směru x, y a z. Vzorky a případné další reagenty jsou umístěny ve třech různých karuselech. Jednotlivé karusely zařízení identifikuje podle polohy magnetů na jejich spodní straně. U našeho testovaného zařízení bylo potřebné vzorky umístit do chlazeného prostoru. Pro tento účel byl navržen a následně v naší laboratoři konstruován jednoduchý vodou chlazený zásobník vzorků, do kterého lze umístit až 80 různých vzorků. Zbylé karusely slouží jako zásobníky pro chemikálie, které mohou být využity při analýze. Otevírá se tak prostor pro nepřehledné možnosti modifikace elektrochemické analýzy, díky kterým můžeme zajistit vyšší selektivitu stanovení popř. nižší detekční limity. Pro zabezpečení výměny základního elektrolytu a nezbytných oplachových kroků jsou k dispozici tři čerpadla (700 Dosino). Dvě z těchto čerpadel zabezpečují dokonalé vymytí pracovní nádobky (maximální objem 50 ml) a třetí čerpá základní elektrolyt (maximální objem 20 ml). Přístroj je řízen pomocí mikroprocesoru (746 VA Trace Analyser). Automatický analyzátor umožňuje dávkování menšího množství základního elektrolytu (do 2 ml), což u elektrochemické analýzy není tak běžné. Navíc nastavit a upravovat se dá téměř vše, od objemů elektrolytu, vzorku či promývací vody, až po automatické naměření kalibrační křivky, její vyhodnocení a následné vyhodnocení reálných vzorků.

JAK TO TEDY CELÉ FUNGUJE?

Po výběru vhodné metody, která je zadána do řídicího modulu, dochází nejdříve k napaštění základního elektrolytu do elektrochemické nádobky. V našem uspořádání byla množství použitých roztoků výrazně minimalizována. Maximální objem potřebný pro analýzu nepřekročil 2 ml. Dávkovací rameno je inicializováno, následuje promytí dávkovací jehly a načtení objemu vzorku pro odběr. Poté dávkovací rameno nalezne určenou pozici se vzorkem a nasaje jej. Následuje krok omytí dávkovací jehly a pohyb ramena do elektrochemické nádobky. Po dávkování vzorku do nádobky je zahájena elektrochemická analýza. V našem případě je doba od promytí nádobky do aplikace vzorku asi 5 minut, ale jistě by se tento interval mohl více zkrátit, ale zřejmě především na povaze analytu a metodice detekce.

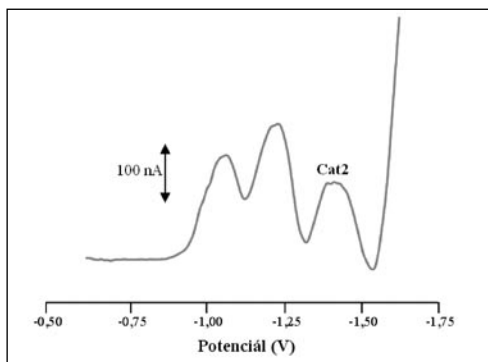


Uspořádání automatického elektrochemického analyzátoru

CO JE MOŽNÉ ANALYZOVAT?

Odpověď na otázku v nadpisu této kapitoly je velmi prozaická, teoreticky lze analyzovat vše, co je možné oxidovat nebo redukovat na povrchu pracovní elektrody. Od relativně jednoduchých analýz vzorků iontů kovů v roztocích, přes náročnější detekce peptidů, až po tolik dnes diskutovanou analýzu proteinů. Jelikož má každý ion charakteristickou hodnotu elektrického potenciálu, ve kterém se redukuje (či oxiduje), lze pomocí velikosti proudu při daném potenciálu ion nejen identifikovat, ale také kvantifikovat. Navíc, velké množství možností kterak modifikovat elektrochemické analyzátorů značně rozšiřuje pole látek vhodných pro analýzu. Trendy v dnešní organické elektrochemii mluví zejména o elektropolymerizaci, tedy vývoji elektrod s tenkou vrstvou polymeru anebo vývoji nanočástic. Pro analýzu proteinů vycházíme z postupu profesora Rudolfa Brdičky, že proteiny s $-SH$ skupinami mohou v kombinaci s komplexem kovu rozpuštěným v elektrolytu (pufru) a rtuťovou kapkou vytvářet katalytické odezvy. Jako komplexní sloučeniny je používáno trojmocného komplexu kobaltu $[Co(NH_3)_6]Cl_3$, nicméně podobné vlastnosti v katalytické elektrochemii, jak se zdá, mají i jiné

látky. Vzniklý voltamogram je složen ze signálů, z nichž poslední (Cat2) katalytického charakteru (signál redukce vodíku) je využíván k odečítání koncentrace proteinu. Naše analýza thiolových sloučenin je zaměřena na protein metalothionein. Důležité je, že tato bílkovina obsahuje cysteiny a je tedy ideální pro tento typ elektrochemické detekce. Metalothionein je intracelulární protein zastávající zejména metal-transportní a antioxidační funkce. Buňky jsou nicméně schopny jej exkretovat i do extracelulárního prostoru. My se zabýváme analýzou zejména krve, séra a plazmy. Vzorek je nejprve naředěn ve vhodném poměru fosfátovým pufrům (pH 6,98), poté následuje zahřátí na 99 °C. Metalothionein je termostabilní a změny sekundární struktury jsou velmi malé. Větší proteiny jsou denaturovány a ze vzorku odstraněny centrifugací. Analýza poté probíhá ze supernatantu, kdy pro samotnou analýzu dostačuje 10 μ l. Pomocí tohoto postupu byly analyzovány stovky klinických vzorků. Soustředujeme se zejména na detekci u pacientů s nádorovým onemocněním s různou lokalizací. Výsledky nejenom potvrzují použitelnost elektrochemie klinické praxi, ale i potvrzují roli metalothioneinu jako markeru zhoubných nádorů.



Voltametrický záznam krve pacienta se zhoubným nádorem v oblasti laryngu. Cat2 pík je přímo úměrný koncentraci metalothioneinu.

ZÁVĚR

Elektroanalytické metody jsou velmi senzitivní, ale pro jejich nasazení v klinické chemii je několik závažných překážek, mezi které patří zvýšené nároky na obsluhu a nedostatečná automatizace. Tuto mezeru by snad mohlo zaplnit zařízení představené v tomto příspěvku.

Poděkování: zařízení, které jsme mohli testovat, bylo poskytnuto za laskavé podpory Výzkumného ústavu pletařského.

Literatura

- [1] V. Adam, M. Beklova, J. Pikula, J. Hubalek, L. Trnkova and R. Kizek Shapes of differential pulse voltammograms and level of metallothionein at different animal species, *Sensors* 7 (2007) 2419-2429.
- [2] V. Adam, S. Krizkova, O. Zitka, L. Trnkova, J. Petrlova, M. Beklova and R. Kizek Determination of apo-metallothionein using adsorptive transfer stripping technique in connection with differential pulse voltammetry, *Electroanalysis* 19 (2007) 339-347.
- [3] S. Krizkova, O. Zitka, V. Adam, M. Beklova, A. Horna, Z. Svobodova, B. Sures, L. Trnkova, L. Zeman and R. Kizek Possibilities of electrochemical techniques in metallothionein and lead detection in fish tissues, *Czech J. Anim. Sci.* 52 (2007) 143-148.
- [4] J. Kukacka, D. Vajtr, D. Huska, R. Prusa, L. Houstava, F. Samal, V. Diopan, K. Kotaska and R. Kizek Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury, *Neuroendocrinol. Lett.* 27 (2006) 116-120.
- [5] J. Petrlova, D. Potesil, R. Mikelova, O. Blastik, V. Adam, L. Trnkova, F. Jelen, R. Prusa, J. Kukacka and R. Kizek Attomole voltammetric determination of metallothionein, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5112-5119.
- [6] 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, *Clinical Chemistry* 51 (2005) A56-A56.
- [7] R. Prusa, R. Kizek, L. Trnkova, J. Vacek and J. Zehnalek Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method, *Clinical Chemistry* 50 (2004) A28-A29.
- [8] R. Prusa, J. Petrlova, J. Kukacka, V. Adam, B. Sures, M. Beklova and R. Kizek Study of interaction of glutathiones and metallothionein with cytostatics, *Clinical Chemistry* 52 (2006) A175-A175.
- [9] R. Prusa, M. Svoboda, O. Blastik, V. Adam, O. Zitka, M. Beklova, T. Eckschlager and R. Kizek Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment, *Clinical Chemistry* 52 (2006) A174-A175.