

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**VÝVOJ NOVÉ METODY PRO STANOVENÍ BILIRUBINU A JEHO
ESTERŮ**

Bakalářská práce

Tereza Kamišová

Vedoucí práce: prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.
(katedra chemie a biochemie, PŘF JU)

České Budějovice 2013

Kamišová T., 2013: Vývoj nové metody pro stanovení bilirubinu a jeho esterů. [Development of new method for the determination of bilirubin and its esters. Bc. Thesis, in Czech.] – 22 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato práce se v rešeršní části zabývá poznáním bilirubinu, jeho metabolismem v lidském těle a vlastnostmi potřebnými při jeho stanovení metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Je zde shrnuta i jeho podobnost s fykobiliny, díky které by mohly být jeho nepolární estery využity k přípravě umělých světlosběrných antén.

Experimentální část práce zahrnuje úpravu vhodné mobilní fáze pro stanovení bilirubinu a následně jeho esterů, které byly syntetizovány Fisherovou esterifikací.

This work describes present knowledge of bilirubin, its metabolism in human body and attributes necessary to its determination by high performance liquid chromatography (HPLC). Its similarity with phycobilins is summarized. Bilirubin nonpolar esters could be used to prepare self-assembling light-harvesting antennas.

The experimental part involves modification of a mobile phase for HPLC determination of bilirubin and its esters, which were synthesized by Fisher esterification.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznamu o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 25.4.2013

.....

Poděkování

Mé velké poděkování patří vedoucímu mé bakalářské práce prof. RNDr. Františku Váchovi Ph.D. a vedoucímu laboratoře oddělení fotosyntézy RNDr. Radku Litvínovi Ph.D. za cenné rady a připomínky během celé doby mé práce.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Davidu Bínovi Ph.D. a Ing. Josefu Tichému za pomoc při práci na HPLC.

Závěrečný velký dík patří mé rodině, jelikož bez ní bych nikdy neměla možnost tuto práci psát.

Cíl práce

Cílem této práce bylo studium bilirubinu a jeho vlastností za účelem vytvoření vhodné metody pro jeho stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Součástí práce byla i příprava esterů bilirubinu pomocí Fisherovy esterifikace a jejich následné využití na testování vyvinuté metody.

Obsah

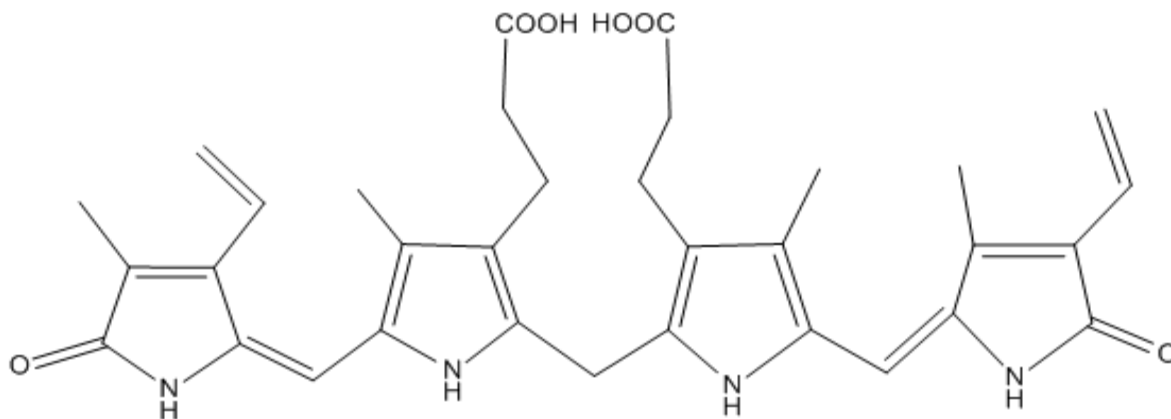
1	Úvod.....	1
1.1	Bilirubin – struktura a metabolismus.....	1
1.1.1	Rozpustnost.....	2
1.1.2	Izomery	3
1.1.3	Stanovení bilirubinu	4
1.2	Fykobiliny	5
1.3	Esterifikace	6
2	Materiál a metody.....	8
2.1	Chemikálie a jejich použití	8
2.1.1	Bilirubin a jeho modifikace	8
2.1.2	Pufry.....	8
2.2	Fisherova esterifikace.....	9
2.3	HPLC.....	11
3	Výsledky.....	13
3.1	HPLC – základní metody.....	13
3.2	Metoda stanovení bilirubinu.....	14
3.2.1	Rozpustnost bilirubinu v pufrech.....	14
3.2.2	Rozpustnost bilirubinu – mobilní fáze.....	15
3.2.3	Velikost nástřiku	16
3.3	Esterifikace bilirubinu.....	17
3.3.1	Vliv alkoholů	17
3.3.2	Stabilita esterů.....	18
4	Diskuze a závěr	20
5	Zdroje a literatura	21

1 Úvod

1.1 Bilirubin – struktura a metabolismus

Bilirubin je žlučové barvivo tvořené lineárním tetrapyrolem o molekulové hmotnosti 584,67 g/mol. Vytváří nejčastěji roztoky žlutého či oranžového odstínu, s absorpcí v oblasti 400 – 490 nm a absorpčním maximem při 450 nm. Při excitaci ultrafialovým světlem má bilirubin červenou fluorescenci. Bilirubin je odpadním produktem nejen lidského metabolismu, ale nachází se u všech placentálních živočichů (1,2,4).

V retikuloendotelovém systému sleziny a jater dochází k vychytávání starých červených krvinek (erytrocytů). Z nich se uvolní hemoglobin a ten je následně rozštěpen na hem a globin. Globin je zařazen do bílkovinného fondu. Katabolismus hemu začíná otevřením kruhu mezi pyroly, což je způsobeno oxidací enzymem hemoxigenázou a uvolněním železa vzniká zelený biliverdin. Dále biliverdinreduktáza redukuje biliverdinový prostřední methinový můstek za vzniku hnědočerveného bilirubinu, znázorněného na Obr. 1 (2,3,4).



Obrázek 1: Přirozeně se v těle vyskytující bilirubin (izomer IX α)

Celý metabolismus vzniku i vylučování bilirubinu v těle je udržován v rovnováze. Při narušení a tedy nadměrném hromadění bilirubinu v plazmě dochází ke stavu zvanému hyperbilirubinémie, která může být způsobena zablokováním odtoku žluči např. žlučovým kamenem nebo poškozením jaterních buněk, dochází k ní i při nadměrném rozpadu

červených krvinek, kdy jaterní buňky nestačí všechen uvolněný bilirubin zpracovat. Navenek se tento stav projeví žloutenkou (3,5).

1.1.1 Rozpustnost

Jelikož bilirubin dostávající se do plazmy je nekonjugovaný a nerozpustný ve vodě při fyziologickém pH, je přenášen sérovým albuminem, který ho solubilizuje navázáním na něj pomocí iontových vazeb. Jeho nerozpustnost ve vodě je dána jeho strukturou v prostoru – (ZZ)-konformace, která je stabilizována vodíkovými můstky mezi dusíky pyrolu a propionátovými zbytky. Toto uspořádání je shodné s jeho prekurzorem – izomerem IX protoporfyrinu, který se nachází v hemu. Tyto konformační změny zablokují expozici polárních skupin molekuly vodnému prostředí, což vysvětluje jeho hydrofobicitu. Vyhovují mu ale organická činidla střední polaritity jako je např. chloroform, jak je vidět v Tab. 1 (1,2,3,5). Bilirubin má značnou rozpustnost i v dimetylsulfoxidu.

Tabulka 1: Rozpustnost bilirubinu v různých rozpouštědlech (6)

Rozpouštědlo	Rozpustnost [μM]	Rozpouštědlo	Rozpustnost [μM]
<i>n</i> -Hexan	0	Metanol	0
Cyklohexan	0	Etanol	0
<i>n</i> -Heptan	0	1-propanol	0
Parafin - kapalina	0	2-propanol	0
Benzen	22	1-butanol	0
Toluen	50	1-pentanol	0
Xylen	45	Cyklohexanol	0
Pyrol	150	Éter	1
Pyridin	580	2-methoxyetanol	15
Dichlormetan	1800	Aceton	10
Chloroform	2500	Etyl(metyl)keton	22
Tetrchlormethan	40	Propyl(metyl)keton	25
Formamid	2300	Isobutyl(metyl)keton	15
<i>N,N</i> - Dimetylformamid	800	Diisobutylketon	8
Dimetylsulfoxid	>10000	Etylacetát	9
Voda-kyselé pH	0	Olivový olej	1,3
Voda-zásadité pH	>10000		

Sloučeniny vázané na albumin, jako je i bilirubin, nejsou filtrovány ledvinami, ale játry sekretovány do žluče. V membráně jaterní buňky dochází k přerušení vazby na albumin, aktivnímu přenosu do buňky a následnému navázání na ligandiny, specifické

Konstitučními izomery bilirubinu jsou IX α , IX β , IX γ a IX δ . V plazmě je nejčastějším IX α a ostatní jsou přítomné jen v nepatrném množství. Naopak bilirubin IX β je ve znatelném množství přítomen u novorozenců. Dalším typem konstitučních izomerů vzniklých náhodným rozštěpením a opětovným spojením tetrapyrolové struktury bilirubinu jsou izomery III α , IX α a XIII α (1).

1.1.3 Stanovení bilirubinu

Stanovení bilirubinu v lidském těle je důležité pro klinickou praxi, ale odlišné od stanovení v této práci, neboť zde byl využit bilirubin čistý, nenasázaný na žádnou další látku (při stanovení v lidském těle je bilirubin vázaný na albumin nebo kyselinu glukuronovou).

V klinické biochemii se setkáváme s diazostanovením bilirubinu – bilirubin reaguje s diazočínidlem (kyselina sulfanilová v chlorovodíku a roztok dusitanu sodného) za vzniku azobarviva, u kterého se fotometricky stanoví absorbance, která je přímo úměrná koncentraci bilirubinu. Při stanovení enzymatickými metodami je bilirubin změněn na biliverdin enzymem bilirubinoxidázou a další již bezbarvé produkty, kdy koncentrace bilirubinu je úměrná poklesu jeho absorbance po enzymatické reakci. U novorozenců při novorozenecké žloutence, u kterých je snaha o co nejmenší odebírání krve se používá tzv. transkutánní stanovení – orientační vyšetření pomocí ikerometru (fotometr měřící reflektanci).

Stanovení bilirubinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) není v rutinní diagnostice příliš využíváno (1,3).

Itoh a kol. popsali HPLC metodu pro stanovení fotoizomerů bilirubinu, které jsou ovšem vázané na albumin. Metoda používá gradient směsi acetonitrilu, 0,01 M fosfátového pufru (pH 5,5) a dimethylformamidu v poměrech 50:300:650 (v/v) do směsi stejných složek v poměru 200:150:650, průtok 1 ml.min⁻¹ (9).

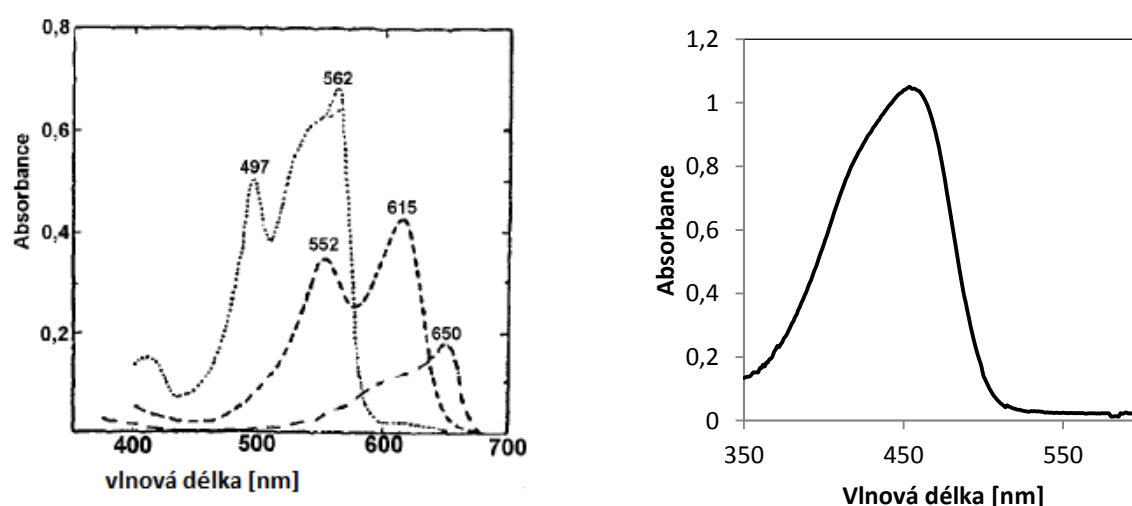
V přehledu HPLC aplikací v tradiční čínské medicíně byla popsána metoda pro stanovení bilirubinu v substanci *Calculus bovis* (drcené sušené hovězí žlučové kameny využívané např. k léčbě hořečnatých stavů), která používá jako mobilní fázi metanol, acetonitril a 2% kyselinu sírovou v poměru 72:25:3, průtok 1 ml.min⁻¹ (10). Tato metoda bude dále nazývána CHINA.

Jako rychlá a účinná byla označena HPLC metoda Spivaka a Yueyho pro stanovení bilirubinu a jeho konjugátů ve žluči. Využívá mobilní fázi ze směsi metanolu, octanu sodného a octanu amonného jako pufru o pH 4,5, průtok 1-2 ml.min⁻¹ (11).

1.2 Fykobiliny

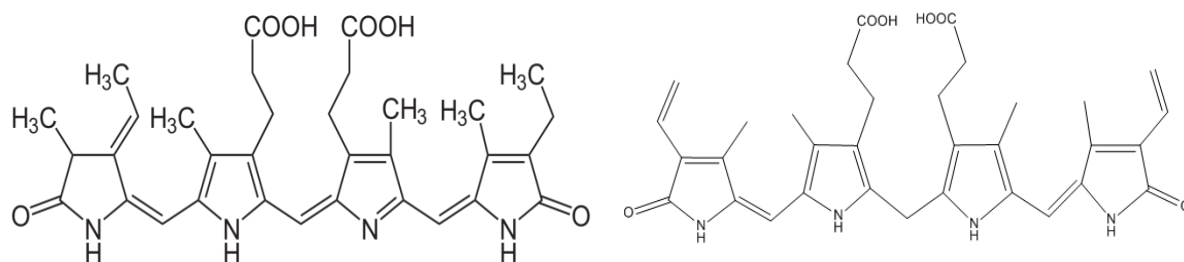
Jedním z úkolů světloběrných antén při fotosyntéze je zachycení fotonů a následný přenos excitace do reakčního centra fotosyntézy. To mimo jiné zajišťují i fykobiliny, jedny z přídatných fotosyntetických pigmentů, vyskytujících se v sinicích a ruduchách. Strukturně jsou to otevřené tetrapyroly, jejichž uhlíkové můstky mají jednu či dvě dvojně vazby. Navázáním na bílkovinu vytvoří fykobiliproteiny a toto vzájemné působení s bílkovinou má za následek rozdílné polohy absorpčních vrcholů u různých druhů fykobiliproteinů (12).

Fykobiliny, z nichž nejvíce fykocyanobilin, jsou strukturně podobné lidským bilinům – biliverdinu a bilirubinu (13). Avšak jejich absorpční maxima pohlcování světla jsou rozdílná, jak je znázorněno na Obr. 3. Ze strukturního hlediska se bilirubin od fykobilinů liší např. přítomností dvojně vazby na můstcích mezi pyrolovými jádry, polohou substituentů (metyly, etyly, vinyly) na koncových pyrolových jádrech a přítomností vodíku na pyrolových jádrech.



Obrázek 3: Vlevo absorpční spektrum fykobilinů z ruduchy *Porphyridium cruentum* (14), vpravo absorpční spektrum bilirubinu použitého v této práci

Díky této podobnosti a absorpčním vlastnostem by mohly být estery bilirubinu použity jako modelový systém pro studium tvorby samoorganizujících se světloběrných antén, založených na samoagregačních vlastnostech molekul bakteriochlorofylu c doplněných fykobiliny. Ester bilirubinu bude méně polární než samotný bilirubin a tato hydrofobicita tak bude stabilizovat interakce potřebné k uspořádání antény, podobně jako jiné nepolární sloučeniny (lipidy, karotenoidy, chinony) (15).



Obrázek 4: Vlevo struktura fykocyanobilinu a vpravo bilirubinu-III α , který byl použit v experimentální části mé práce

1.3 Esterifikace

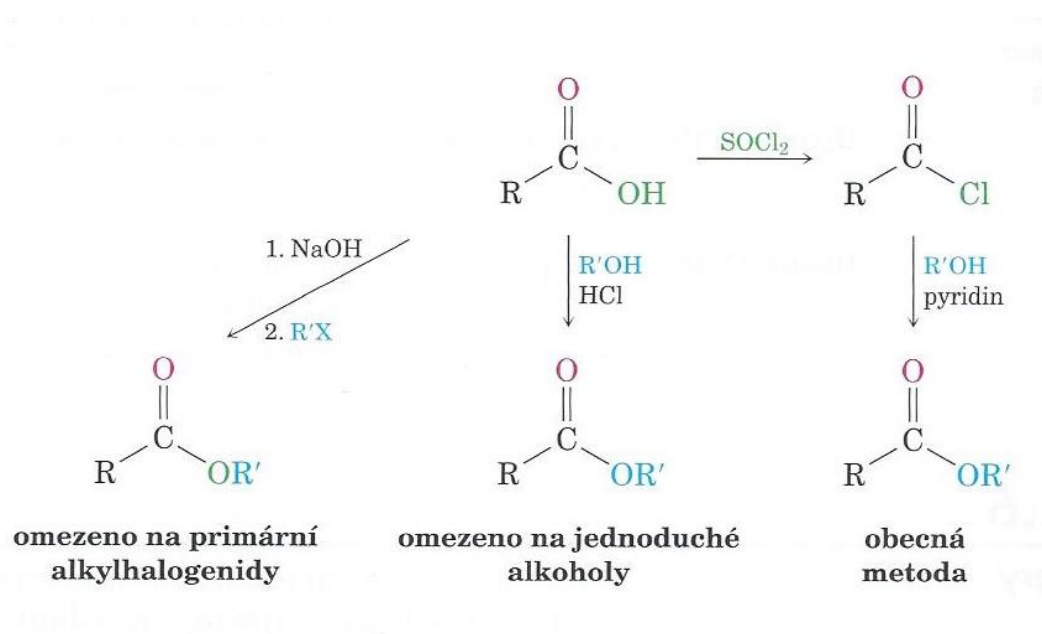
Estery se řadí mezi funkční deriváty karboxylových kyselin, u kterých došlo k záměně atomu vodíku. Hydroxylová skupina karboxylové kyseliny je špatně odstupující skupinou, proto je při reakcích nutné přeměnit ji na lépe odstupující nebo dodat do reakce silnou kyselinu, která protonuje karboxyl a zesílí tak jeho vlastnost přijímat elektron (7).

Z fyzikálního hlediska mají jednoduché estery nižší body varu než jejich výchozí látky (zde pro srovnání myšleno karboxylové kyseliny) díky absenci vodíkových můstků v molekule. Přítomnými interakcemi jsou dipól-dipólová interakce. Estery ale mohou tvořit vodíkové můstky s molekulami vody a proto jsou rozpustné ve vodě, avšak s rostoucí délkou řetězce klesá jejich rozpustnost. Složitými estery jsou v přírodě tuky a oleje, tyto látky samozřejmě ve vodě rozpustné nejsou a jejich teploty varu se rozlišují dle jejich složení (16).

Obecně lze říci, že příprava esterů je nukleofilní substitucí na acylové skupině. Acylovou skupinou je nazývána nahrazená hydroxylová skupina na karboxylové kyselině, bez ohledu na její funkční změnu za vzniku jejího derivátu. Pokud je nukleofilem alkohol, je reakce nazývána alkoholýzou. Mechanismus reakce je dvoustupňový, kdy dochází ke vzniku tetraedrického meziproductu a jeho následné eliminaci za vzniku výsledného produktu. Nukleofilní substituce je stericky ovlivněnou reakcí, tudíž k ní dojde jen na stericky nebráněném atomu uhlíku (17).

Konkrétněji je nejčastější příprava esterů trojího způsobu: substitucí solí karboxylových kyselin s primárními alkylhalogenidy, reakcí alkoholů s acylchloridy za přítomnosti báze nebo pyridinu neboli alkoholýza – u těchto reakcí lze cíleně využít

sterických vlivů při esterifikaci nebráněné hydroxylové skupiny v přítomnosti jiné, stericky bráněné. Pyridin a báze zde slouží k zachycení uvolněného chlorovodíku. Poslední metodou je Fisherova esterifikace – substituce karboxylových kyselin s přebytkem alkoholu za katalýzy silné kyseliny (7). O Fisherově esterifikaci bude podrobněji zmíněno v kapitole Materiál a metody.



Obrázek 5: Schéma přípravy esterů (7)

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie a jejich použití

2.1.1 Bilirubin a jeho modifikace

Bilirubin, který byl použit pro všechny experimenty, pochází od firmy Sigma-Aldrich (USA), v čistotě $\geq 98\%$ v práškovém stavu. Tento bilirubin je směsí α -izomeru III – absorpční maximum 445-458 nm, IX – 453-455 nm a XIII – 449-453 nm. Po celou dobu byl uchováván ve zmraženém stavu, ve tmě, v mrazničce při teplotě -20°C . Pro každou práci bylo 5,0 mg bilirubinu rozpuštěno v 1 ml dimetylsulfoxidu (DMSO). Koncentrace 5,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ se blíží koncentraci nasyceného roztoku (molární koncentrace $0,0086 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Po dobu práce byl bilirubin i reakční směsi chráněny před světlem, experimenty probíhaly při laboratorní teplotě.

DMSO byl použit od firmy Sigma-Aldrich (USA) v čistotě $\geq 99,9\%$. Vysoká rozpustnost bilirubinu v tomto aprotickém bipolárním rozpouštědle je znázorněna v Tab. 1 (18).

2.1.2 Pufry

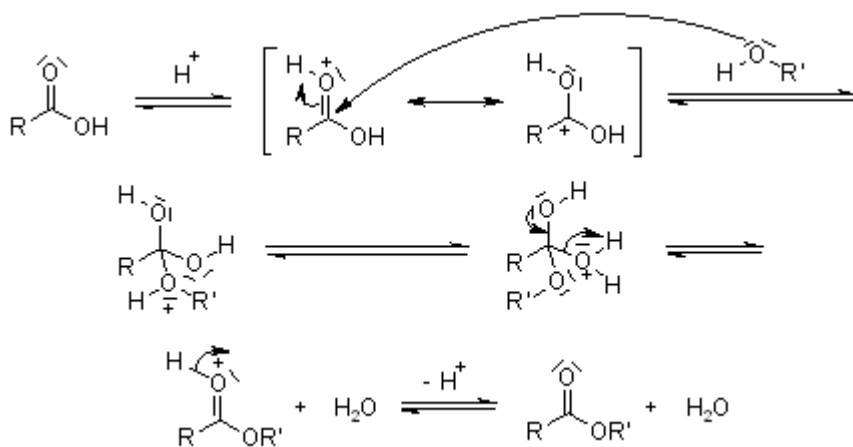
Všechny pufry použité v této práci byly připraveny z redestilované vody a následně zfiltrovány pomocí vodní vývěvy a filtru nasaditelného na hrdlo lahve od firmy Nalgene (USA), objem 500 ml, velikost póru $0,22 \mu\text{m}$. Všechny použité chemikálie na přípravu pufřů pocházely od firmy Lach-Ner s.r.o. (Česká republika). Tyto pufry byly míseny s metanolem v poměrech metanol:pufř 99:1, 90:10 a 70:30 ke zjištění stability (rozpustnost či srážlivost) bilirubinu. Složení jednotlivých pufřů je shrnuto v Tab. 2. Pufry byly zvoleny dle požadované hodnoty pH a jejich příprava následně proběhla podle údajů v tabulkách (19).

Tabulka 2: Složení pufrů

	Název	Molarita	Objem [ml]
pH 2	KCl	0,2	25
	HCl	0,2	6,5
pH 4	CH ₃ COOH	0,1	25,41
	CH ₃ COONa	0,1	4,59
pH 5,5	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,2	200
	Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	0,2	16
pH 6	KH ₂ PO ₄	0,1	25
	NaOH	0,1	2,8
pH 8	KH ₂ PO ₄	0,1	20
	NaOH	0,1	16,86
pH 10	NaHCO ₃	0,05	25
	NaOH	0,05	5,35

2.2 Fisherova esterifikace

Tato metoda byla zvolena vzhledem k jejímu nejčastějšímu využití při přípravě esterů a dobrým výtěžkům. Reakce je kyselě katalyzovaná nukleofilní acylová substituce. Karboxylová kyselina zvýší svojí reaktivitu přidáním vhodné silné kyseliny, zde byla použita kyselina sírová. Ta protonuje atom kyslíku karboxylové skupiny, který se tím stane více pozitivní vzhledem k jeho náboji. Tím je zvýšena elektronakceptorní vlastnost karboxylu, tedy aktivita vůči ataku nukleofilu. Nukleofilem je zde alkohol a po jeho ataku dochází k vytvoření tetraedrického meziprojektu, na němž se přesune proton z jednoho atomu kyslíku na druhý za vzniku druhého tetraedrického meziprojektu, na kterém se hydroxylová skupina tímto změnila na dobře odstupující. Posledním krokem je deprotonace a odštěpení vody za regenerace kyselého katalyzátoru a vzniku esteru (7). Celý mechanismus reakce je shrnut na Obr. 6.



Obrázek 6: Schéma mechanismu Fisherovy esterifikace (20)

Tento mechanismus byl dokázán izotopovým označením ^{18}O , jelikož vzniká molekula vody, která neobsahuje atom kyslíku z alkoholu, nýbrž z karboxylové kyseliny. Dochází tedy ke štěpení vazby CO-OH a ne COO-H v karboxylové skupině a zároveň vazby RO-H a ne R-OH v alkoholu jak by se na první pohled mohlo zdát (7).

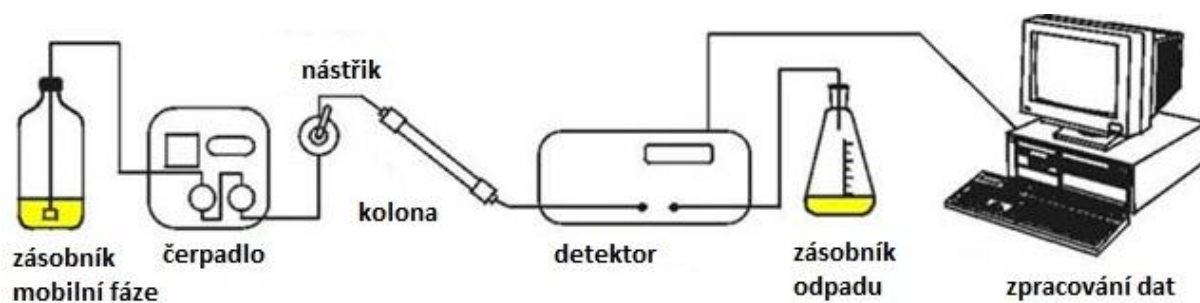
Vzniklá voda jako produkt často způsobí zpětný chod reakce, tudíž bývá reakční směs sušena, či destilována za účelem odstranění vody a zvýšení výtěžku esteru (7).

V této práci byl karboxylovou kyselinou bilirubin, který byl esterifikován metanolem, butan-1-olem a heptan-1-olem. K 1 ml nasyceného roztoku bilirubinu byl přidán nadbytek alkoholu (2 ml) a kyselina sírová tak, aby její výsledná koncentrace byla 2%. Směs byla po celou dobu reakce chráněna před světlem a ponechána při laboratorní teplotě. Doba reakce byla dle pokynů školitele s metanolem 2 hodiny, s butan-1-olem 3 hodiny a s heptan-1-olem 5 hodin. Po uplynutí reakční doby byla směs centrifugována po dobu 4 minut při $10\,000\text{ ot.min}^{-1}$. Vzorek byl naředěn jako pro standardní stanovení bilirubinu (20krát) a automaticky nastříknut pomocí autosampleru do HPLC systému. Nastříkovaný objem $50\ \mu\text{l}$, byl předem stanoven jako optimální podle absorbance produktů ve výsledných chromatogramech.

Mezi alkoholy použité k esterifikaci bilirubinu patří: metanol LC-MS v čistotě 99,95%, který byl od firmy Biosolve Chimie SARL (Francie), butan-1-ol 99,5% a heptan-1-ol 98%, oba pochází od Sigma-Aldrich (USA).

2.3 HPLC

Pro všechna měření byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tato chromatografie je analytická separační metoda, která používá dělení mezi dvěma fázemi. Pohyblivá neboli mobilní fáze unáší vzorek přes kolonu a je jí v tomto případě kapalina. Nepohyblivá stacionární fáze je umístěna v koloně. Při styku těchto dvou fází a vzorku dojde k vzájemným interakcím, nejprve se utvoří zóna všech složek vzorku na koloně, dále dojde k samotné separaci a po výstupu z kolony je zaznamenán na chromatogramu eluční pík pro každou složku vzorku. Čas, po který oddělující se složky vzorku, zůstávají v koloně, závisí na velikosti a četnosti interakcí (21,22).



Obrázek 7: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Metoda probíhá tak, jak je znázorněno na Obr. 7 – mobilní fáze je vedena ze zásobníku přes čerpadlo, následně kolonu, před kterou může být umístěna předklonka pro ochranu samotné kolony, do detektoru připojeného k zapisovacímu zařízení – dnes už nejčastěji počítači a nakonec do zásobníku odpadu (21).

Pulzující pístové (popřípadě membránové) čerpadlo zajišťuje stabilní průtok za vysokého tlaku, v této práci u metod s korekcí pH mobilní fáze okolo 1000 psi (68 atmosfér), u CHINA metody 400 PSI.

Vzorek se na kolonu nastříkuje ručně nebo s pomocí automatického podavače vzorků (autosampleru), který se používá zejména při analýzách velkého množství vzorků. Používané stacionární fáze jsou polární (tzv. normální fáze) nebo nepolární (tzv. reverzní fáze). Na normální fázi nejprve vytékají nepolární látky, následovány látkami s narůstající polaritou, na reverzní fázi je tomu obráceně. Mobilní fáze se používá buď jen jedna (tzv. isokratická eluce) nebo se používá více mobilních fází, které jsou v čerpadle míchány a jejich poměr se v průběhu chromatografie mění (tzv. gradientová eluce). Podle charakteru analyzovaných

látek se vybírají mobilní fáze více či méně polární, v případě gradientové eluce pak jde obvykle o přechod z relativně nepolárního rozpouštědla do relativně polárního (u normální fáze) a naopak (u reverzní fáze).

Pro detekci frakcí se používá obvykle měření absorpce světla či fluorescence vytékajícího eluentu. Dříve používané jednobanální detektory byly nahrazeny mnohobanální detekcí, která současně s chromatogramem (záznam absorpce na jedné vlnové délce v závislosti na čase) zaznamená absorpční spektrum eluentu, což značně usnadňuje identifikaci frakcí.

Pro tuto práci bylo využito systému HPLC Waters 600 s mnohobanálním diodovým detektorem a autosamplrem Waters 2707. Použitá kolona byla Agilent Zorbax SB-C18: 4,6 mm x 150 mm, 5 μ m, využívající efektu reverzní fáze k dělení polárních látek. Jako sorbent slouží silikagel na němž jsou navázány oktadecylové řetězce (23). Velikost nástřiku se pohybovala od 5 μ l do 50 μ l. Průtok byl u každé metody 1 ml.min⁻¹. Data byla zpracována softwarem Millennium 31, chromatogramy exportovány při vlnové délce 450 nm a upraveny jako grafy v programu Microsoft Office Excel 2007.

Jako mobilní fáze byla použita směs – metanol-acetonitril-2% kyselina octová 72:25:3 (10), která byla označena jako metoda CHINA. Acetonitril i kyselina octová pocházely od firmy Lach-Ner s.r.o. (Česká republika).

V práci byl dále použitý systém mobilních fází, založený na směsi metanolu a pufrů o různém pH ke zjištění optimální hodnoty pH pro eluci bilirubinu z kolony.

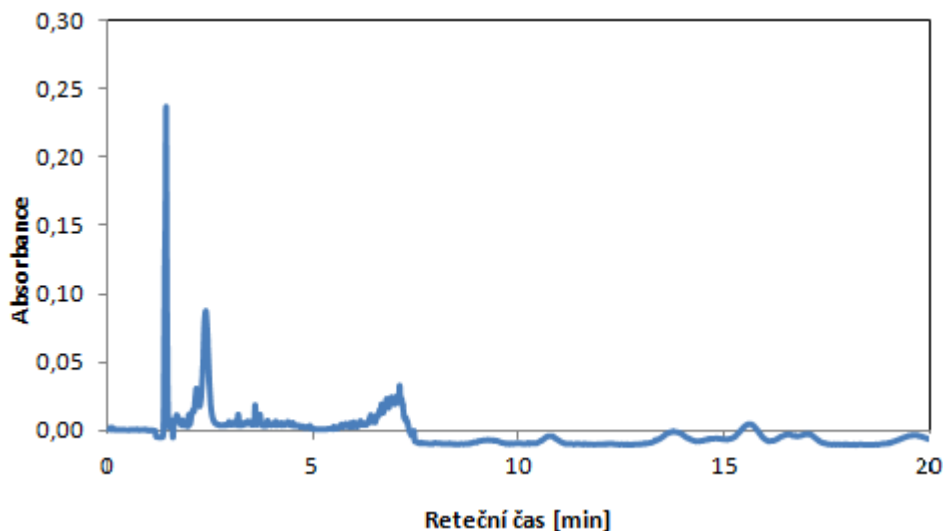
3 Výsledky

3.1 HPLC – základní metody

K další práci bylo nutné vybrat vhodnou mobilní fázi pro HPLC. Inspirací byla CHINA metoda se složením metanol-acetonitril-2% kyselina octová 72:25:3 (10). Avšak výsledný chromatogram pro estery bilirubinu se zdál poněkud nesrozumitelný, což je patrné z Obr. 8.

V dalším kroku byla testována použitelnost metody pro geometrické a strukturní fotoizomery bilirubinu (9). Bylo rozhodnuto upravit hodnotu pH mobilní fáze této metody založené na směsi metanolu v poměru metanol:pufr 70:30 na pH 5,5. Ani tato metoda se nejevila jako vhodná.

U obou metod docházelo k setrvávání vzorku na koloně (následné vypláchnutí bylo velice časově náročné), k ucpávání jehly autosampleru a po každém nástřiku musel být vyměněn filtr předkolony HPLC, díky velké usazenině vzorku. Při užití nižší koncentrace bilirubinu ($3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebyly patrné pozitivní změny týkající se předchozího výčtu problémů. Všechny mobilní fáze byly před každým použitím v HPLC důkladně odzdušněny pomocí vodní vývěvy.



Obrázek 8: Stanovení bilirubinu a jeho esterů CHINA metodou, velikost nástřiku $10\mu\text{l}$

Přesto bylo rozhodnuto setrvat u metanolu jako výchozí složky pro mobilní fázi a byla provedena její modifikace pomocí pufrů se vzrůstajícím pH. Nejprve byly přidány k samotnému nasycenému roztoku bilirubinu a dále míseny s metanolem v poměrech

metanol:pufř 99:1, 90:10 a 70:30. Tímto byla vyzkouřena stabilita (rozpuřnost) bilirubinu v budoucí mobilní fázi.

3.2 Metoda stanovení bilirubinu

3.2.1 Rozpuřnost bilirubinu v pufřech

Byla vytvořena řada pufřů se vzrůstajícím pH a následně byly přidány k nasycenému roztoku bilirubinu v DMSO v poměru 1:1. Z Tab. 3 i Obr. 9 je patrné, že ke sražení bilirubinu dojde až do pH 6 (v původním roztoku je bilirubin rozpuřten – byl použit roztok o koncentraci $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, která se blíží koncentraci nasyceného roztoku). Při pH 8 došlo sice k mírnému zakalení, ale po centrifugaci byl roztok zhodnocen jako bez sedimentu – tedy bez sraženiny.

Tabulka 3: Srážlivost nasyceného roztoku bilirubinu s pufřy o různém pH v poměru 1:1

Pufř	pH 2	pH 4	pH 6	pH8	pH 10
Sraženina	ano	ano	ano	ano/ne	ne



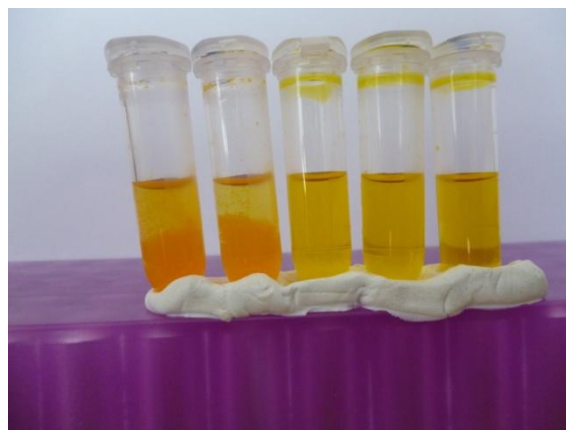
Obrázek 9: Srážlivost nasyceného roztoku bilirubinu, zleva pH 2, 4, 6, 8, 10

3.2.2 Rozpustnost bilirubinu – mobilní fáze

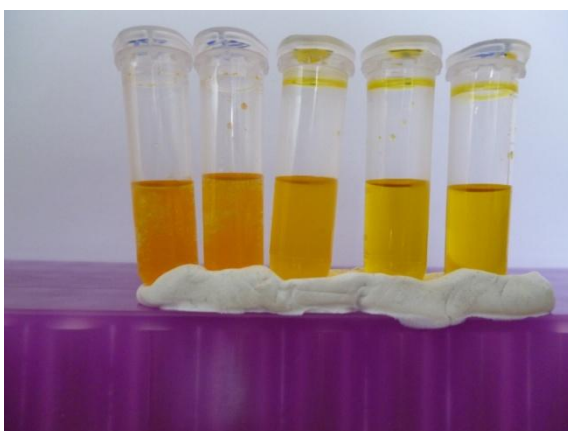
Dále byl smíchán metanol s pufrů v poměru metanol:pufr 99:1, 90:10 a 70:30. A tato směs byla poté přidána k nasycenému roztoku bilirubinu v poměru 1:1. Opět byla pozorována srážlivost. Výsledky vyplývají z Obr. 10, 11, 12 a jsou zaznamenány v Tab. 4. Jako neoptimálnější poměr – neovlivňující rozpustnost se jevil roztok metanolu s pufrům v poměru 70:30 při pH 8 a 10. Jelikož použitá kolona nemůže být použita při vyšším pH než pH 8 (23), byla vybrána jako vhodná mobilní fáze směs metanolu s pufrům o pH 8 v poměru 70:30. Nižší poměr metanolu s pufrům (např. 50:50) byl zamítnut, vzhledem k mírnému zakalení roztoku při smíšení čistého pufrů o pH 8 s nasyceným roztokem bilirubinu.



Obrázek 10: Srážlivost nasyceného roztoku bilirubinu ve směsi metanolu s pufrům (99:1) v poměru 1:1, zleva pH 2, 4, 6, 8, 10



Obrázek 11: Srážlivost nasyceného roztoku bilirubinu ve směsi metanolu s pufrům (90:10) v poměru 1:1, zleva pH 2, 4, 6, 8, 10



Obrázek 12: Srážlivost nasyceného roztoku bilirubinu ve směsi metanolu s pufrům (70:30) v poměru 1:1, zleva pH 2, 4, 6, 8, 10

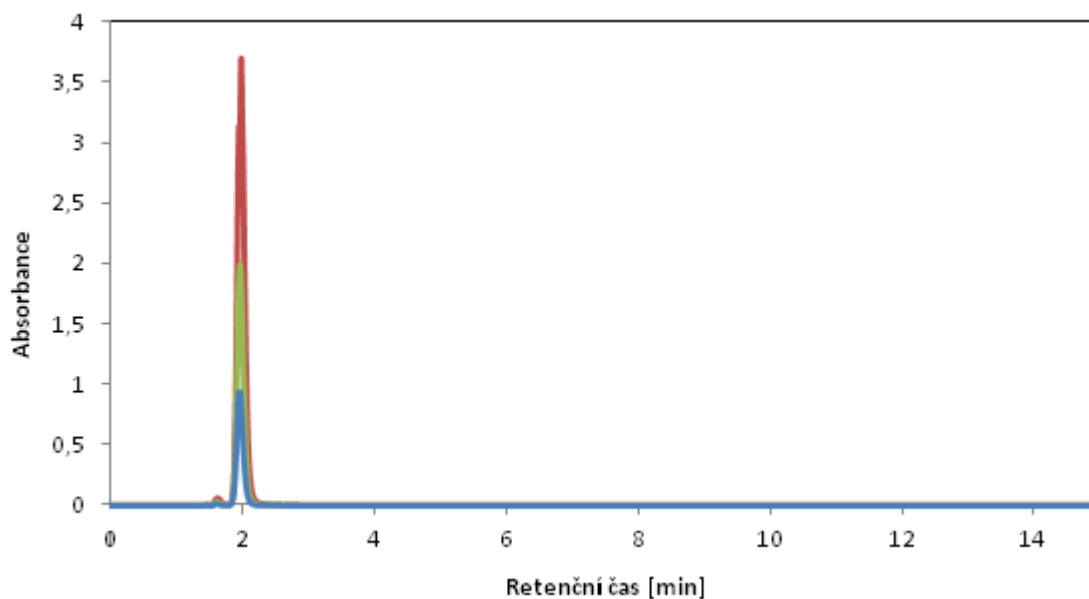
Tabulka 4: Srážlivost nasyceného roztoku bilirubinu ve směsi metanolu a pufru v poměru 1:1

Pufr	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
Metanol 99 %	ano	ano	ano	ano	ano
Metanol 90 %	ano	ano	ano	ano	ne
Metanol 70 %	ano	ano	ano	ne	ne

Mobilní fáze zvolená pro metodu stanovení bilirubinu byla také použita k promývání nástřikové jehly autosampleru. Od výrobce zde byl nastaven metanol, ale jelikož bilirubin v metanolu rozpustný není (Tab. 1), docházelo ke srážení bilirubinu při styku s metanolem v nástřikové jehle a jejímu ucpávání.

3.2.3 Velikost nástřiku

Před nástřikem vzorku do systému HPLC byl bilirubin 20krát naředěn – 50 μ l nasyceného roztoku bilirubinu bylo přidáno k 950 μ l mobilní fáze. Pro stanovení optimálního objemu nástřiku bylo otestováno několik různých nastřikovacích objemů – 5, 10 a 20 μ l (Obr. 13). Přesto, že byl vzorek před nástřikem ředěn, díky vysoké absorpenci bilirubinu jsou při vyšších objemech tyto hodnoty saturující pro HPLC detektor. Optimální velikost nástřiku pro HPLC byla následně zvolena podle výsledných chromatogramů 5 μ l. Tento objem měl vyhovující absorpenci v rámci dynamického rozsahu detektoru, takže nedocházelo ke zkreslení velikosti plochy pod píkem. Jako mobilní fáze byla použita směs metanol:pufr 70:30, pH 8.



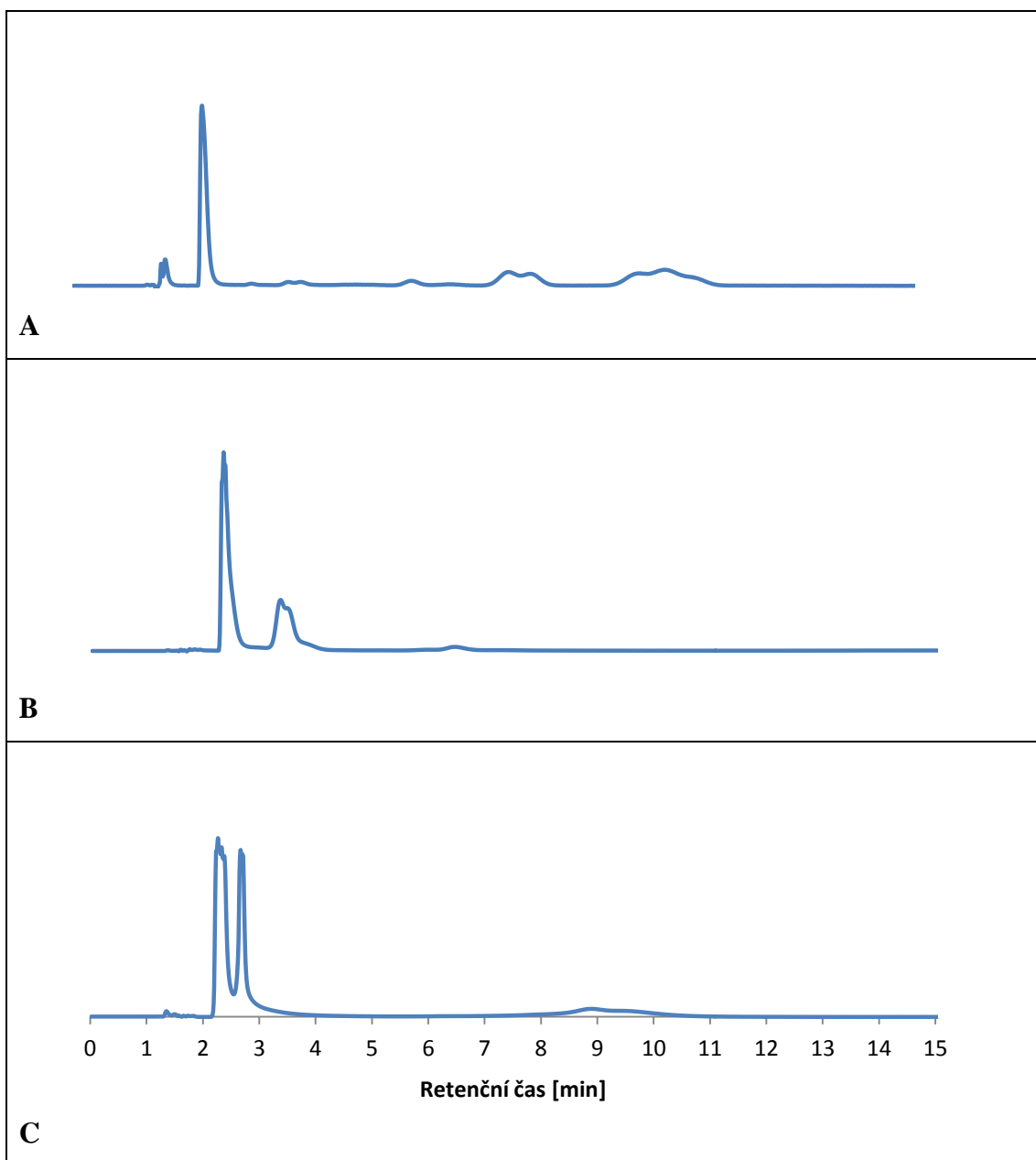
Obrázek 13: Velikost nástřiku 20krát zředěného nasyceného roztoku bilirubinu o objemu 5, 10, 20 μL

3.3 Esterifikace bilirubinu

3.3.1 Vliv alkoholů

Záznamy chromatogramů s jednotlivými alkoholy zachycuje Obr. 14, na kterém je vidět posun píků jednotlivých esterů v závislosti na jejich délce. Na každém z chromatogramů je nejprve ve 2,5 minutě bilirubin a poté estery. V případě metanolu (chromatogram A) se objevily dva majoritní produkty reakce v 8. a 10,5 minutě, každý z nich je navíc zdvojený či ztrojený. Chromatogram obsahuje i několik menších píků v 3. 4. a 6. minutě. Situace u butan-1-olu a heptan-1-olu byla přehlednější – většina produktů tvoří jeden pík. U butan-1-olu (chromatogram B) je nový pík ve 3,5 a 6,5 minutě. Je však vidět, že směs obsahuje dva chemicky blízké produkty – pík v chromatogramu má dva vrcholy. U heptan-1-olu (chromatogram C) je nový pík těsně před 3. minutou a další, již méně patrný v 9. minutě.

Chromatogramy jsou řazeny sestupně vzhledem k délce použitého esteru při reakci, tudíž v pořadí: A – metanol, B – butan-1-ol a C – heptan-1-ol. Všechny nové píky mají absorpční spektrum bilirubinu.



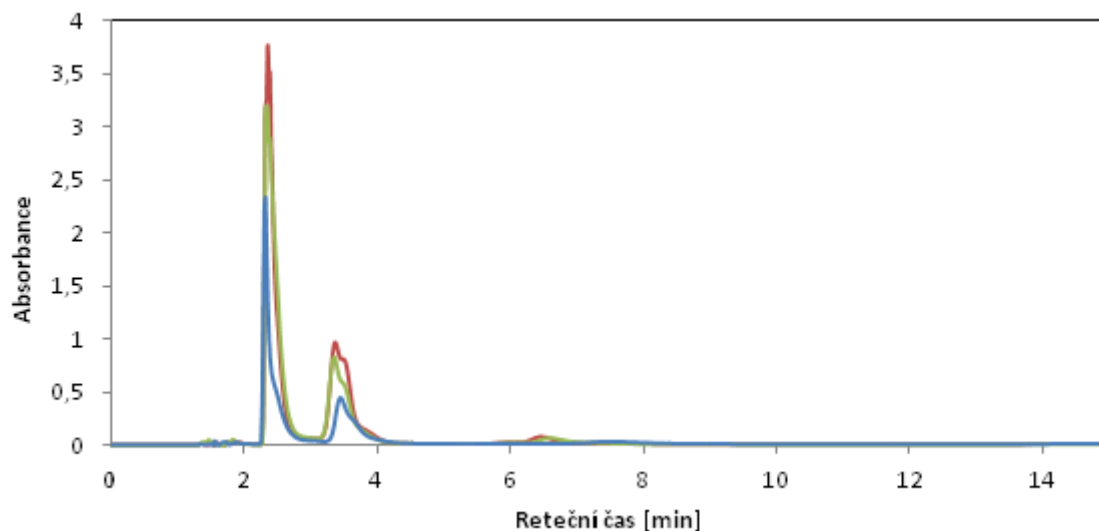
Obrázek 14: Chromatogramy reakční směsi po esterifikační reakci bilirubinu s alkoholy, část A s metanolem, B s butan-1-olem a C s heptan-1-olem

3.3.2 Stabilita esterů

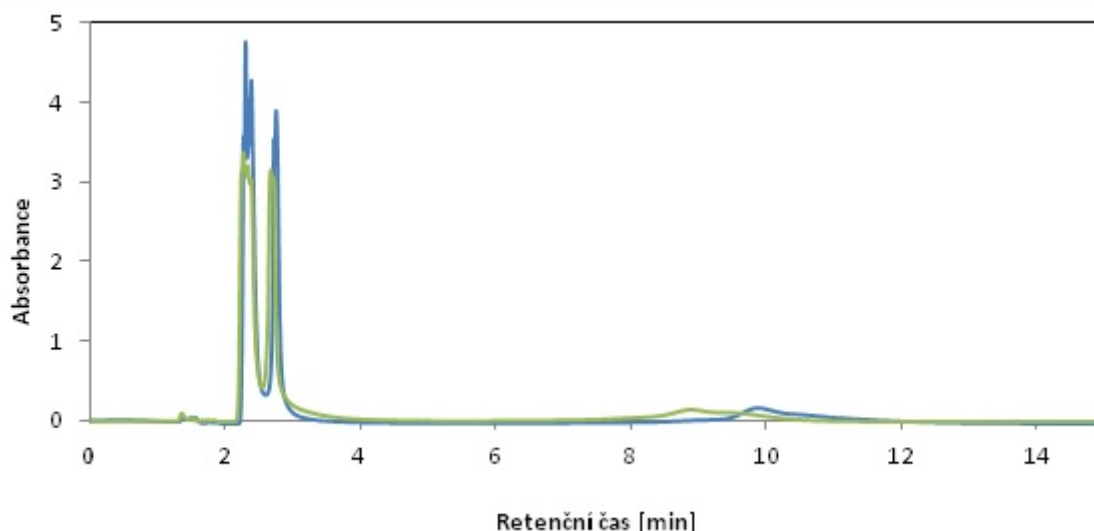
Závěrem práce bylo srovnání stability esterů v reakční směsi na čase. Vzorek byl uchováván v mrazničce při teplotě -20°C po dobu jednoho týdne. Jelikož byl výtěžek esterifikace s metanolem vzhledem k absorbanci malý, nebyl zahrnut do této části práce. U

esterifikace s butan-1-olem (Obr. 15) došlo po prodloužení reakční doby na 4 hodiny ke snížení výtěžku esteru o 14 % a po týdnu o 54 %. U samotného bilirubinu došlo ke snížení po 4 hodinách o 15 %, tedy podobně jako u esteru ale po týdnu jen o 38 %.

S heptan-1-olem (Obr. 16) došlo po týdnu ke snížení výtěžku esteru o 20 % a pro srovnání u bilirubinu o 35 %. Tento ester má tedy větší stabilitu.



Obrázek 15: Stabilita esterů v reakční směsi s butan-1-olem, červená – čerstvý vzorek, zelená – 4 hodiny, modrá – 1 týden



Obrázek 16: Stabilita esterů v reakční směsi s heptan-1-olem, modrá – čerstvý vzorek, zelená – 1 týden

4 Diskuze a závěr

Vyvinutá metoda dělí bilirubin a jeho izomery, jelikož však bilirubin vytéká jen minutu po startu, bylo by vhodné tuto metodu ještě dále upravit. Toto bylo již ale nad časový rámeček této práce. Zpětně se ukázalo, že začít s metanolem jako mobilní fází nebylo nejlepším rozhodnutím i přes zdánlivě uspokojivé výsledky. Možná by bylo vhodnější zvolit dimetylsulfoxid, u kterého je ale oproti metanolu značný finanční rozdíl nebo dichlormetan, ve kterém má bilirubin také dobrou rozpustnost (Tab. 1). Dalším vhodným krokem by mohlo být vyvinutí gradientové metody, protože použitá isokratická metoda kromě brzké eluce bilirubinu trpí poměrně velkým prodlužováním elučních časů produktů esterifikace.

Pro esterifikaci je klíčová přítomnost vody, která pokud je ponechávána v reakční směsi reaguje se vzniklým esterem a reakce tedy probíhá zpětně. K jejímu odstranění se využívá destilace, pokud jsou odlišné teploty varu produktů či její vysušení (7). V tomto případě by bylo vhodnější použít vysušení a to přidavkem vhodného tzv. vysoušedla např. bezvodého chloridu vápenatého nebo síranu hořečnatého, které by bylo dále odstraněno zfiltrováním. Tento fakt vedl k nepříliš velkým výtěžkům reakcí.

Samotná esterifikace s metanolem neposkytovala očekávané výsledky a to díky malému výtěžku (porovnávání velikosti absorbance) a vzniku více píků v chromatogramu. S butan-1-olem a heptan-1-olem už lze metodu hodnotit jako uspokojivou a další úpravy metody diskutované výše by mohly mít i lepší eluční časy esterů. Dvojité píky vyskytující se v chromatogramech mohou být způsobeny buď přítomností monoesterů nebo izomerů bilirubinu. Jelikož bilirubin má dvě karboxylové skupiny, může tedy docházet nejprve ke vzniku monoesteru a až v dalším kroku diesteru.

V rámci této práce nebylo možné ověřit přítomnost esterů pomocí IR spektroskopie, jelikož přítomný IR spektroskop využíval suché vzorky a získání vysušených esterů už bylo nad rámeček práce. Zároveň by ale mohlo být dalším vhodným tématem k pokračování.

Dále bylo zváženo ověření produktů reakce na hmotnostním spektrometru, bohužel ale tato metoda používá v reakčních směsích i v mobilní fázi jen látky, které se beze zbytku odpařují. Pokud by tedy chtěla být tato metoda využita, v esterifikační reakci by se dala nahradit kyselina sírová kyselinou trichloroctovou, také velice silnou kyselinou. A jako mobilní fáze by se dalo uvažovat o chloroformu, ve kterém je bilirubin také značně rozpustný. Ovšem převedení celé mobilní fáze bylo opět nad rámeček práce.

5 Zdroje a literatura

1. L. Vítek (Grada Publishing a.s., Praha 2009), Bilirubin a interní nemoci – význam pro kliniku a praxi
2. Datový standard Ministerstva zdravotnictví, dostupný z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/>
3. M. Čermáková a I. Štěpánová (Institut dovozů a zpracování pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno 2003), Klinická Biochemie
4. D. Voet a J. G. Voetová (Victoria publishing, Praha 1990), Biochemie
5. L. Vítek, L. Sedláčková, P. Branny, T. Ruml (2003), Metabolismus bilirubinu a způsoby eliminace jeho toxicity, Chem. Listy 97, 24 – 28
6. R. Brodersen (1979), Bilirubin – Solubility and interaction with albumin and phospholipid, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 254, No. 7, 2364-2369
7. J. McMurry (VUTIUM, Brno 2007), Organická chemie
8. K. Isobe, S. Itoh, S. Onishi, T. Yamakawa, T. Oginot, T. Yokoyama (1983), Kinetic study of photochemical and thermal conversion of bilirubin IX α and its photoproducts, Biochem. J. 209, 695 – 700
9. S. Itoh, K. Isobe, S. Onishi (1999), Accurate and sensitive high-performance liquid chromatographic method for geometrical and structural photoisomers of bilirubin IX α using the relative molar absorptivity values, Journal of Chromatography A, 848, 169 – 177
10. Bovine bezoar Calculus bovis, Compendium of HPLC Applications for Traditional Chinese Drugs in China Pharmacopoeia (2005), Agilent Technologies, 155
11. W. Spivak a W. Yuey (1986), Application of a rapid and efficient HPLC method to measure bilirubin and its conjugates from native bile and in model bile systems, Biochem. J. 234, 101 – 109
12. I. Šetlík, J. Hála (Praha 1994-1999), Biofyzika fotosyntézy
13. S. B. Brown, A. J. Holroyd, R. F. Troxler (1980), Mechanism of bile-pigment synthesis in algae, Biochem. J., 190, 445-449
14. I. Šetlík, F. Seidlová, J. Šantrůček, Fyziologie rostlin – učební text, dostupné z: http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_S04.pdf
15. J. Pšenčík, M. Torkkeli, A. Župčanová, F. Vácha, R. E. Serimaa a R. Tuma (2010), The lamellar spacing in self-assembling bacteriochlorophyll aggregates is proportional to the length of the esterifying alcohol, Photosynth Res, 104:211-219
16. <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/esters/background.html>

17. <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/crbacid2.htm#react2>
18. H. Igimi, S. Asakawa, R. Tamura, F. Yamamoto, H. Shimura (1994), DMSO preparation as a direct solubilizer of calcium bilirubinate stones, *Hepatogastroenterology* 41(1):65-9
19. <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html#buffer>
20. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fischer-esterification.shtm>
21. K. Drbal a M. Křížek (Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice 1999), *Analytická chemie*
22. D. C. Harris (W. H. Freeman and Company, New York 2007), *Quantitative chemical analysis*
23. <http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820644-002f.pdf>