

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE

*Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale*  
Classe LM-71 Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**DETERMINAZIONE DI AMMINOTIOLI  
MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE**

*Tesi di Laurea in Chimica Analitica svolta  
presso il laboratorio ISSC University College Cork e il Dipartimento di  
Chimica Fisica e Inorganica di Chimica Industriale di Bologna*

Presentato da:  
**CORINNA ZAMBARDI**

Relatore interno:  
**Prof.ssa ERIKA SCAVETTA**

Relatori esterni:  
**Prof. JEREMY GLENNON**  
**Dott.ssa LIN ZHOU**

Seconda Sessione

---

Anno Accademico 2010-2011



## **Sommario**

<i>1. Introduzione</i> .....	5
1.1 Importanza e ruolo degli amminotoli analizzati .....	5
1.2 Metodi analitici per la determinazione degli amminotoli .....	10
1.3 Obiettivo della tesi .....	16
<i>2. Parte sperimentale</i> .....	17
2.1 Strumenti e reagenti per la tecnica elettroforetica .....	17
2.2 Strumenti e reagenti per lo studio sul rivelatore .....	19
<i>3. Risultati e discussione</i> .....	21
3.1 Prove elettroforetiche preliminari .....	21
3.2 Ottimizzazione delle condizioni sperimentali .....	35
Ottimizzazione del pH .....	35
Ottimizzazione del potenziale di rivelamento .....	37
Ottimizzazione della concentrazione del tampone .....	39
Ottimizzazione del tempo di iniezione .....	42
Ottimizzazione del voltaggio applicato al capillare .....	43
3.3 Rette di taratura .....	46
3.4 Prove su un campione reale di plasma .....	50
3.5 Rivelazione degli analiti mediante l'elettrodo di glassy carbon .....	54
3.6 Rivelazione degli analiti con un elettrodo modificato .....	55
<i>4. Conclusioni</i> .....	57
<i>Allegato 1</i> .....	61
<i>Allegato 2</i> .....	67
<i>Allegato 3</i> .....	70
<i>Allegato 4</i> .....	73
<i>Appendice 1</i> .....	76
<i>Bibliografia</i> .....	78



# 1. Introduzione

## 1.1 Importanza e ruolo degli amminotoli analizzati

Gli amminotoli assumono un ruolo fondamentale in numerose reazioni biochimiche cellulari e la loro importanza consiste principalmente nella loro funzione antiossidante contro i radicali liberi. Tale capacità deriva dall'ossidazione biologicamente reversibile del gruppo tiolico (-SH) a dimeri con ponti disolfurici (-S-S-): il rapporto fra le concentrazioni di tali composti è quindi significativo per la valutazione dello stress ossidativo cellulare, oltre che per la diagnosi di varie malattie e disordini metabolici<sup>(1)</sup>.

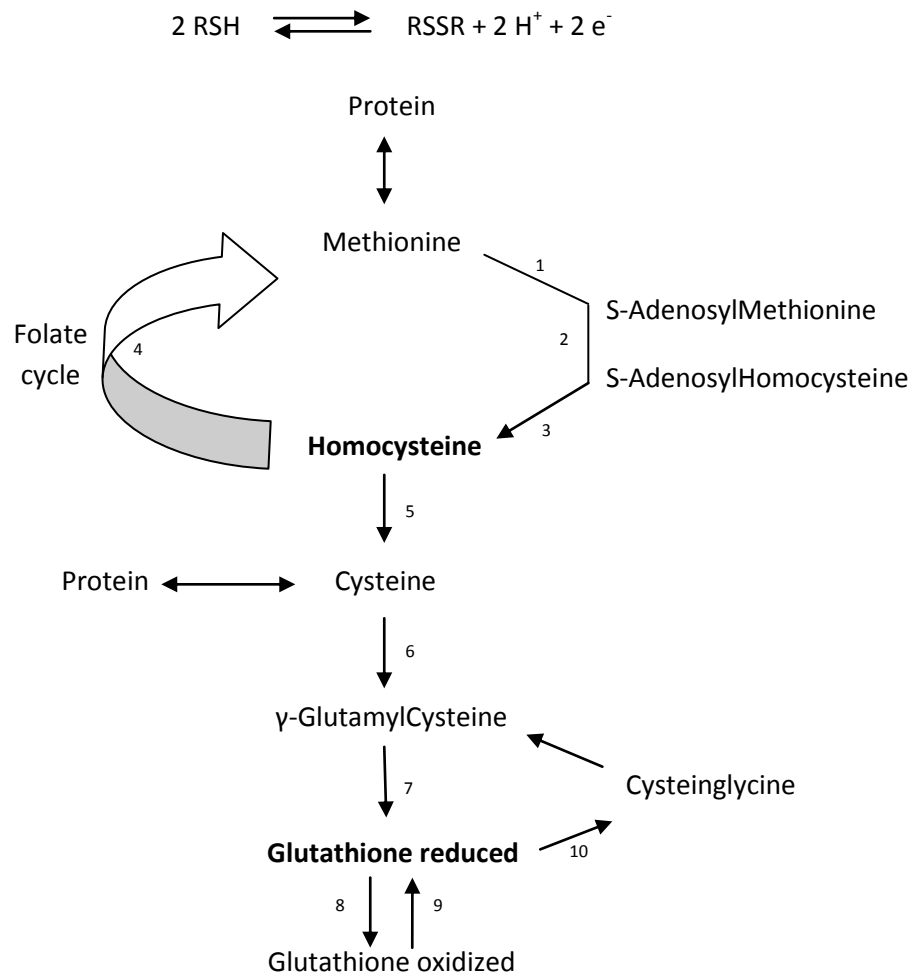
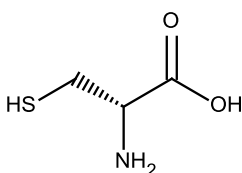


Figura 1: Ciclo del metabolismo intracellulare dell'omocisteina<sup>(2)</sup>. Enzimi coinvolti: 1: metionina adenosiltransferasi, 2: metiltransferasi, 3: adenosilomocisteinasi, 4: metionina sintasi, 5: cistationina-b-sintasi, 6: glutatione-cisteina sintetasi; 7: glutatione sintetasi; 8: glutatione perossidasi; 9: glutatione riduttasi; 10: glutammiltranspeptidasi.

Gli amminotioli considerati in questo lavoro sono i seguenti: L-cisteina, L-metionina, N-acetil-L-cisteina, DL-omocisteina, DL-omocistina, L-cisteinglicina, L-glutazione ridotto e ossidato; la struttura di ogni molecola è raffigurata di seguito, con associati il punto isoelettrico e le  $pK_a$  di ogni gruppo acido stimati dal programma computazionale Marvin Sketch.

La L-cisteina è il tiolo più abbondante nel plasma umano ed è un  $\alpha$ -amminoacido extracellulare non essenziale per il fatto che non deve essere acquisito tramite la dieta, ma è biosintetizzato dall'organismo umano a partire dalla serina e dall'omocisteina. La cisteina è un importante antiossidante a causa della facile ossidazione del gruppo solforato che porta al dimero cistina: cisteina e cistina costituiscono pertanto un sistema biologico di ossido-riduzione che assume un ruolo di grande importanza nell'ambito dei processi chimici cellulari. La deficienza di cisteina è stata associata alla leucemia, alla letargia e a malattie del fegato, mentre alte concentrazioni sono state riscontrate in pazienti con AIDS e il morbo di Parkinson<sup>(3)</sup>; alte concentrazioni di cisteina nelle urine ( $\geq 1$  mM) sono state anche associate alla cistinuria epatica, un disordine ereditario che riguarda il trasporto degli amminoacidi. L'intervallo di concentrazione della cisteina nel sangue in una persona sana è 10-50  $\mu$ M.

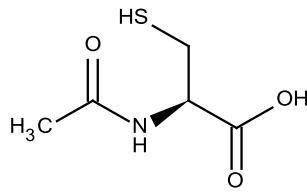
La cisteina viene anche utilizzata in medicina per favorire la cicatrizzazione di ferite e nelle profilassi delle malattie provocate da raggi.



**Figura 2: Struttura della L-cisteina; nome IUPAC: acido (R)2-ammino-3-mercaptopropanoico**

**PM: 121,15 u.m.a.; PI: 5,67;  $pK_a$ : 2,3 (carbossile), 9,3 (gruppo amminico) e 10,2 (tiolo).**

La N-acetil-L-cisteina è il derivato acetilato della cisteina, in cui il gruppo acetile è legato all'atomo di azoto. Come gli altri amminotioli manifesta funzioni antiossidanti e assume perciò un ruolo importante contro lo stress ossidativo, soprattutto in condizioni caratterizzate da basse concentrazioni di glutazione ridotto<sup>(4)</sup>. In medicina è anche somministrato ai pazienti con fibrosi cistica in quanto ha la capacità di ridurre i ponti disolfuro del muco anormalmente denso. I farmaci a base di N-acetil-L-cisteina sono anche degli antidoti specifici in caso di overdose da paracetamolo.



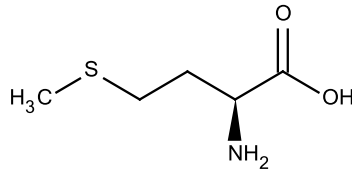
**Figura 3: Struttura della N-acetil-L-cisteina; nome IUPAC:**

**acido (R)2-acetammido-3-mercaptopropanoico**

**PM: 163,19 u.m.a.; PI: 1,15; pKa: 3,8 (gruppo carbossilico), 10,1 (tiolo).**

La L-metionina è un  $\alpha$ -amminoacido essenziale e costituisce pertanto un fattore dietetico indispensabile (gli alimenti in cui è maggiormente presente sono le uova, la carne e il pesce). Questo amminotiolo è coinvolto nella sintesi di proteine e nelle reazioni di transmetilazione, ed è un intermedio per la formazione della cisteina e dell'omocisteina: un suo inefficace metabolismo può portare all'aterosclerosi, all'iperomocisteinemia e ad altri seri problemi cardiovascolari. La concentrazione nel sangue di metionina in un uomo sano può arrivare fino a  $40 \mu\text{M}^{(5)}$ .

La metionina viene adoperata come supplemento dietetico nelle malattie da denutrizione e nei disordini epatici dovuti a insufficiente apporto di proteine alimentari; è inoltre impiegata nella terapia delle epatiti tossiche, nella cirrosi epatica iniziale e nelle anemie secondarie.

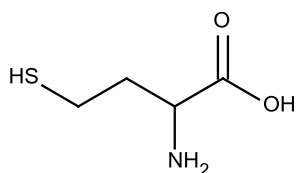


**Figura 4: Struttura della L-metionina; nome IUPAC: acido (S)2-ammino-4-**

**(metilmercapto)butanoico PM: 149,21 u.m.a.; PI: 6,05; pKa: 2,3 (carbossile) e 9,2 (ammina).**

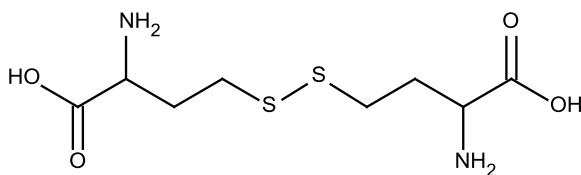
L'omocisteina (HCS) è un  $\alpha$ -amminoacido endogeno omologo della cisteina, dalla quale differisce di un solo gruppo metilico; è biosintetizzata nel fegato e nei muscoli per demetilazione della metionina e può essere convertita a cisteina mediante l'azione della vitamina B o rimetilata a metionina tramite reazioni enzimatiche. Negli uomini ogni giorno si sintetizzano circa 15-20 mmol di omocisteina, di cui la maggior parte viene convertita in cisteina. L'alta concentrazione di omocisteina nel sangue può essere associata a una deficienza di folato e di vitamina B<sub>12</sub>; alti livelli di omocisteina possono

anche essere causati dalla malattia ereditaria omocistinuria. Molti studi clinici ed epidemiologici hanno attestato che alti livelli di omocisteina costituiscono un fattore di rischio per l'aterosclerosi, per la formazione di trombi nelle vene e nelle arterie e per malattie cardiovascolari<sup>(6)</sup>. I valori di concentrazione dell'omocisteina nel sangue sono compresi tra 5 e 15  $\mu\text{M}$  nelle persone sane<sup>(2)</sup>.



**Figura 5: Struttura della DL-omocisteina; nome IUPAC: acido 2-ammino-4-mercaptobutanoico**  
**PM: 135,18 u.m.a.; PI: 5,55; pKa: 2,1 (gruppo carbossilico), 9,4 (tiolo), 10,2 (gruppo amminico).**

L'omocistina (HCY) è il prodotto di ossidazione dell'omocisteina, ed è quindi caratterizzata dal ponte disolfuro.

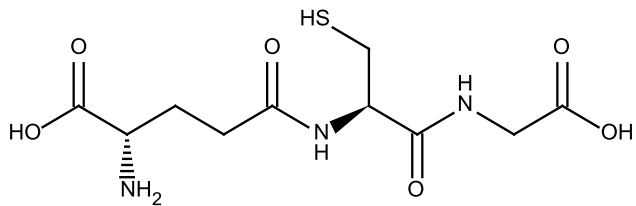


**Figura 6: Struttura della DL-omocistina;**  
**nome IUPAC: acido 2-ammino-4-[(3-ammino-3-carbossipropil)dimercapto]butanoico**  
**PM: 268,40 u.m.a.; PI: 5,81; pKa: 1,8 (gruppi carbossilici) e 9,2 (gruppi amminici).**

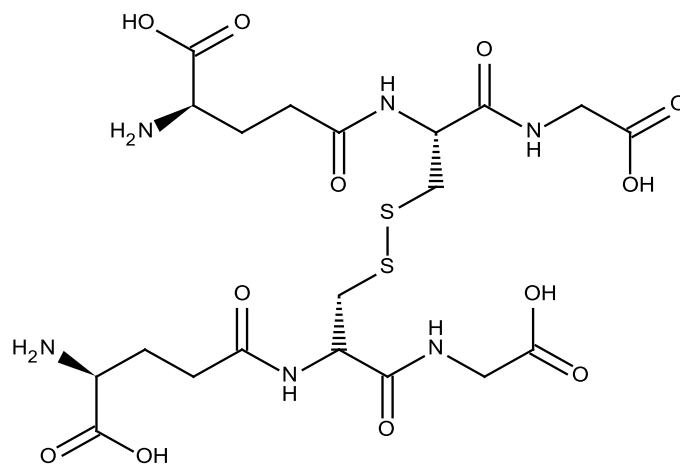
L-glutatione ridotto è un tripeptide intracellulare ed è il più importante antiossidante endogeno prodotto dalla cellula, in quanto partecipa direttamente alla neutralizzazione dei radicali liberi e mantiene gli antiossidanti esogeni, come le vitamine C e E, nella loro forma attiva (ridotta). Il glutatione non è un nutriente essenziale, poiché è sintetizzato nel corpo a partire dalla cisteina, dalla glicina e dall'acido glutammico.

Il gruppo tiolico del glutatione ridotto è capace di donare un equivalente riducibile ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) ad altre molecole instabili, come per esempio specie reattive dell'ossigeno: donando un elettrone il glutatione stesso diventa reattivo, ma dimerizza velocemente con un'altra molecola reattiva formando L-glutatione ossidato mediante l'enzima glutatione perossidasi. Questa reazione è possibile a causa dell'alta concentrazione del glutatione nelle cellule (fino a 5 mM in quelle del fegato).





**Figura 7: Struttura di L-glutatione in forma ridotta; nome IUPAC: acido 2-ammino-5-{1-[(carbossimetilammino)-1-osso-3-solfanilpropan-2-il]ammino}-5-ossopentanoico; PM: 303,33 u.m.a; PI 2,74; pKa: 1,9 e 3,7 (carbossili), 9,2 (gruppo amminico), 9,9 (tiolo).**

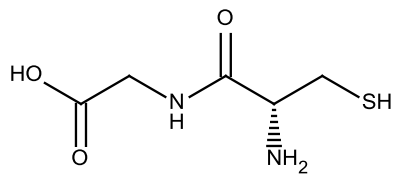


**Figura 8: Struttura di L-glutatione ossidato; nome IUPAC: acido 2-ammino-4-[(2-{[2-(4-ammino-4-carbossibutanammido)-2-[(carbossimetil)carbammil]etil]disolfanil}-1-[(carbossimetil)carbammil]etil)carbammil]butanoico; PM: 612,60 u.m.a; PI: 3,39; pKa: 1,4, 2,0, 3,3, 3,9 (gruppi carbossilici), 9,0 e 9,6 (gruppi amminici).**

Nelle cellule e nei tessuti sani il 90% del glutathione è presente in forma ridotta, mentre il restante 10% è costituito dal glutathione ossidato: un aumento della percentuale della forma ossidata è considerata indicativa di uno stress ossidativo.

La mancanza di glutathione ridotto si riscontra in molte malattie, quali il diabete, l'immunodeficienza umana dall'infezione dal virus HIV e la fibrosi cistica<sup>(7)</sup>.

La L-cisteinglicina è un dipeptide derivante dalla glicina con un gruppo cisteinico in posizione  $\alpha$  al gruppo amminico. Questo amminotiolo deriva dalla degradazione del glutathione (tripeptide) e poiché nel plasma interagisce mediante reazioni redox è un indicatore, come gli altri amminotioli, dello stress ossidativo del sistema.



**Figura 9: Struttura della L-cisteinglicina; nome IUPAC:  
acido 2-(2-ammino-3-mercaptopropanammido)acetico**

**PM: 178,21 u.m.a; pKa: 3,60 (carbossile), 8,08 (gruppo amminico), 9,98 (tiolo); PI 5,99.**

## ***1.2 Metodi analitici per la determinazione degli amminotioili***

La determinazione degli amminoacidi nei fluidi biologici è stata condotta mediante molti metodi di separazione, tra cui la gas cromatografia, l'HPLC<sup>(1)</sup> e la cromatografia a scambio ionico, ma negli ultimi dieci anni ha assunto particolare rilievo la tecnica dell'elettroforesi capillare.

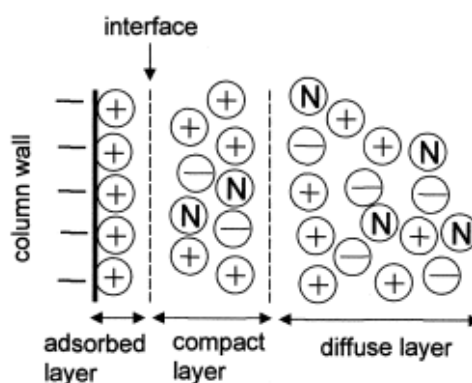
L'elettroforesi è una tecnica di separazione che sfrutta la diversa mobilità delle specie cariche che sono sottoposte a un campo elettrico. Il vantaggio principale dell'elettroforesi è quello di riuscire ad ottenere un'alta efficienza di separazione in tempi brevi e con una strumentazione relativamente semplice; inoltre necessita solo di piccoli volumi sia di campione che di solventi. In pratica le separazioni avvengono all'interno di un capillare di silice fusa a cui è applicato un voltaggio molto alto e in cui le molecole migrano a velocità diverse in base al loro rapporto tra carica e dimensione.

Un importante vantaggio di condurre la separazione in un capillare è quello che si possono applicare voltaggi molto alti per rendere veloce le analisi senza che si sviluppi troppo calore a causa dell'alta resistenza data dalla lunghezza e dal piccolo diametro del capillare. Inoltre l'alto rapporto superficie/volume del capillare favorisce il raffreddamento, rendendo definitivamente trascurabile l'allargamento di banda per il mescolamento convettivo causato dal riscaldamento.

In prossimità della superficie interna del capillare a causa della ionizzazione dei gruppi silanologici, si ha la formazione di un doppio strato elettrico, e l'eccesso delle particelle cariche presenti nella parte diffusa genera il flusso elettrosmotico che trascina tutte le molecole verso il rivelatore. La mobilità di ogni molecola deriva dalla combinazione

dell'entità del flusso elettrosmotico e dalla mobilità elettroforetica specifica di ogni analita.

Il profilo del flusso elettrosmotico è piatto e quindi non contribuisce all'allargamento di banda, ma influenza il tempo in cui gli analiti rimangono nel capillare: sia l'efficienza della separazione che la risoluzione dipendono dalla velocità del flusso elettrosmotico<sup>(8)</sup>.



**Figura 10<sup>(9)</sup>: Rappresentazione del doppio strato elettrico che si forma sulla superficie interna del capillare di silice fusa: gli ioni positivi della soluzione sono attratti dai gruppi silanoli della superficie carichi negativamente ( $pK_a$  2-4). Una parte dei cationi è fermamente assorbita nella regione del doppio strato più vicina alla superficie capillare (strato compatto di Stern). Quando si applica al capillare un campo elettrico i cationi idratati dello strato diffuso del capillare migrano verso il catodo, generando un flusso di tutta la soluzione che ha velocità uniforme lungo il capillare. Il potenziale elettrico sulla parete del capillare è proporzionale alla densità di carica risultante dalla dissociazione dei gruppi silanoli, e decresce linearmente nello strato compatto di Stern, fino ad arrivare al potenziale  $\xi$ : questo è il potenziale elettrico sul piano di taglio tra lo strato di Stern e la regione diffusa del doppio strato. Il potenziale elettrico decade esponenzialmente con la distanza fino a 0 nella parte interna dello strato diffuso del doppio strato.**

La migrazione degli analiti e del flusso elettrosmotico può essere controllata in quanto dipende da molti fattori tra cui:

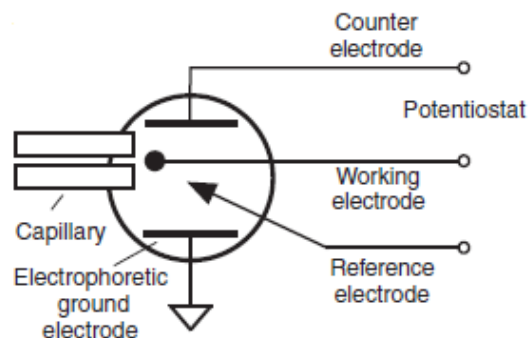
- il pH del tampone, in quanto influenza sia la carica degli analiti che la ionizzazione della superficie. Infatti il potenziale  $\xi$  è determinato dalla densità di carica della parete del capillare: poiché la carica è fortemente dipendente dal pH, l'entità del flusso elettrosmotico varia con il pH;
- la concentrazione del tampone: quando la si aumenta si verifica un effetto di schermo delle cariche superficiali nel doppio strato, il quale subisce così una compressione con la conseguente diminuzione del flusso elettrosmotico e del potenziale  $\xi$ . Se invece viene aumentata troppo si potrebbe avere lo sviluppo di calore per l'aumento della conducibilità;

- il voltaggio a cui è sottoposto il capillare, poiché la velocità del flusso elettrosmotico è direttamente proporzionale al campo elettrico applicato; alti voltaggi comportano lo sviluppo di calore e un aumento del rumore della linea di base, mentre voltaggi troppo bassi permettono all'analita di diffondere maggiormente in quanto rimangono nel capillare per un tempo maggiore;
- la temperatura in quanto influenza la viscosità del mezzo, facilitando o meno la migrazione del flusso elettrosmotico.

Per la rivelazione si possono utilizzare diversi metodi, tra cui quelli che si basano sull'elettrochimica, sulla spettroscopia d'assorbimento o di fluorescenza o sulla spettrometria di massa. Tra i vari tipi di rivelatori quelli elettrochimici rendono possibile la rivelazione anche degli analiti che non presentano gruppi cromofori senza la necessità di derivatizzarli e possiedono molti altri vantaggi: alta sensibilità anche con i piccoli volumi analizzati, bassi limiti di rilevabilità, strumentazione semplice e poco costosa. Inoltre i metodi elettrochimici offrono vantaggi significativi rispetto a quelli spettrofotometrici in quanto il limite di rilevabilità non è compromesso dal piccolo diametro del capillare poiché il processo avviene sulla superficie dell'elettrodo.

Al rivelamento elettrochimico a valle della colonna sono associate però anche delle problematiche, come l'allineamento dell'elettrodo di lavoro all'estremità del capillare, a cui deve stare molto vicino per consentire la rivelazione degli analiti all'uscita della colonna, ma abbastanza lontano per non risentire dell'alto voltaggio applicato per la separazione.

Il rivelamento usato in questo lavoro è stato di tipo amperometrico, in cui l'elettrodo di lavoro è polarizzato a un potenziale costante scelto e viene misurata la corrente determinata dall'ossidazione degli analiti all'uscita del capillare.



**Figura 11: Schema del circuito della rivelazione amperometrica a valle del capillare elettroforetico<sup>(10)</sup>.**

Nella figura 11 è stato riportato lo schema del circuito della cella elettrochimica di rivelazione, la quale è costituita da 4 elettrodi, di cui 3 sono collegati al potenziostato, mentre il quarto è collegato allo strumento elettroforetico ed è messo a terra.

L'elettrodo di lavoro usato è stato il Diamante Drogato Boro (BDD electrode), che si distingue per i suoi importanti vantaggi:

- presenta una bassa e stabile corrente di fondo, che permette bassi limiti di rilevabilità e alta sensibilità;
- può lavorare in un intervallo di potenziale molto ampio in soluzioni acquose a causa dell'elevata sovratensione alla scarica dell'idrogeno e dell'ossigeno come è mostrato in figura 12, in cui il voltammogramma in  $H_2SO_4$  ottenuto con un elettrodo BDD è confrontato con quello di un elettrodo di Platino;
- alta riproducibilità e stabilità a lungo termine della risposta: l'inerzia chimica rende questo tipo di elettrodo molto resistente verso l'assorbimento di molecole polari ed evita la passivazione;
- è molto stabile morfologicamente e microstrutturalmente a potenziali estremamente anodici e catodici e ad alte densità di corrente a causa delle terminazioni  $sp^3$  degli atomi di carbonio<sup>(11)</sup>.

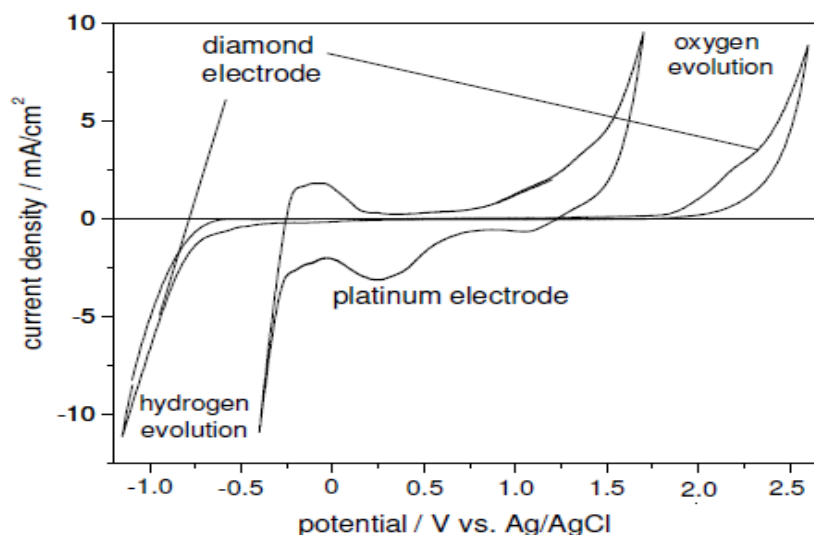
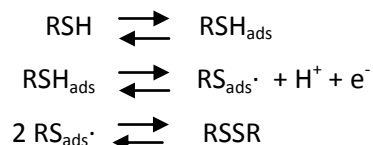
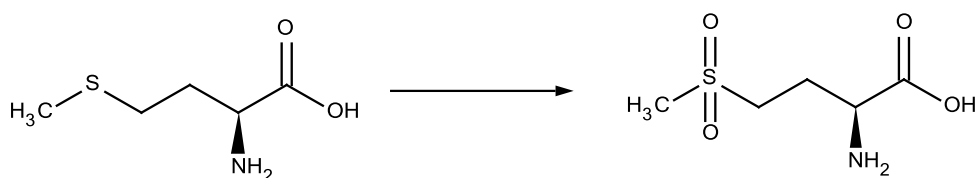


Figura 12: Voltammogrammi ciclici di un elettrodo di platino e del BDD in  $H_2SO_4$  0,2 M, velocità di scansione: 100 mV/s<sup>(12)</sup>.

L'ossidazione elettrochimica degli amminotioili che hanno il gruppo tiolico libero (-SH) porta alla loro dimerizzazione tramite la formazione di un ponte disolfurico (-S-S-), di cui si sono ipotizzati gli stadi<sup>(13)</sup>.



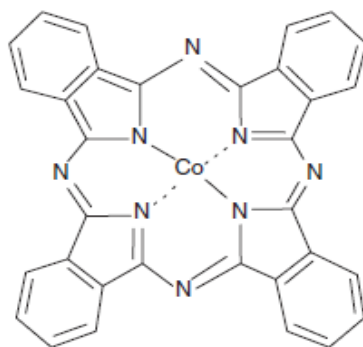
La L-metionina è un amminotioilo che non ha il gruppo tiolico disponibile per la dimerizzazione, e quindi la sua ossidazione elettrochimica all'elettrodo BDD porta alla formazione in un solo stadio del sulfone<sup>(14)</sup>:



La rivelazione dei disolfuri non è possibile mediante gli elettrodi a base di carbonio (come ad esempio quelli di grafite o glassy carbon), mentre quella dei tioili è compromessa da cinetiche di trasferimento elettronico molto lente, che rendono la loro ossidazione più difficile e la spostano verso potenziali molto anodici<sup>(15)</sup>. Inoltre questi tipi di elettrodi subiscono molto la disattivazione e il fouling da parte dei prodotti di ossidazione che si assorbono facilmente sulla loro superficie.

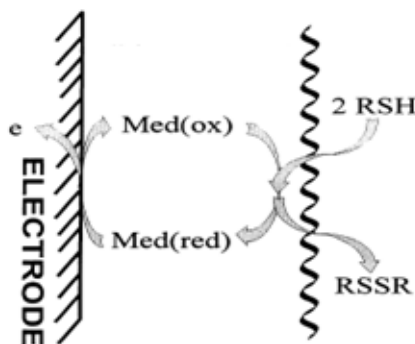
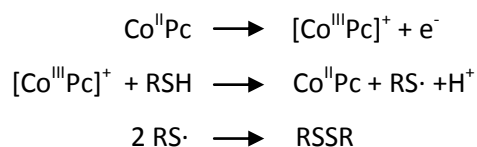
Per superare questi limiti si costruiscono degli elettrodi modificati con un mediatore redox che catalizza l'ossidazione degli analiti e che evita la passivazione: in questo lavoro è stato scelto di usare l'elettrodo a pasta di carbonio (carbon paste) modificato con il complesso di Cobalto(II)-ftalocianina.

Tale complesso è noto per essere un efficace mediatore redox<sup>(16; 17)</sup>, in quanto il metallo complessa l'analita cambiando stato d'ossidazione durante il ciclo catalitico: l'attività catalitica è quindi dipendente dallo ione metallico centrale e dallo stato d'ossidazione totale del complesso. Il trasferimento elettronico eterogeneo avviene tra l'elettrodo e il mediatore al potenziale redox del mediatore, che comporta successivamente la riduzione dell'analita attraverso una reazione chimica con il mediatore ossidato: poiché si tratta di un meccanismo catalitico la rigenerazione del mediatore nella sua forma iniziale deve essere molto veloce.



**Figura 13: Complesso di Cobalto-ftalocianina.**

L'ossidazione dei tioli mediata dalla Cobalto-ftalocianina prevede un processo a tre stadi che inizia con l'elettrossidazione del cobalto, che induce a sua volta la complessazione con il tiolo e infine avviene il trasferimento di un elettrone per formare il radicale tiolico con la rigenerazione della forma ridotta iniziale del mediatore<sup>(18)</sup>:



**Figura 14: Rappresentazione schematica dell'ossidazione elettrocatalitica dei tioli<sup>(3)</sup>.**

Molti metodi sono stati proposti per immobilizzare il mediatore sul supporto elettrodico, tra cui l'adsorbimento diretto, il rivestimento di un film polimerico o la formazione di legami covalenti<sup>(19)</sup>, ma in questo progetto si è utilizzato l'approccio degli elettrodi a pasta di carbonio, in cui il catalizzatore è incorporato in una matrice a base di grafite e olio minerale.

### ***1.3 Obiettivo della tesi***

Il lavoro svolto presso il laboratorio ISSC (Irish Separation Science Cluster) del Dipartimento di Chimica del College UCC di Cork in Irlanda è stato finalizzato alla messa a punto di un metodo valido per la separazione degli amminotioili descritti in precedenza. In particolare le separazioni sono state condotte con la tecnica dell'elettroforesi capillare con rivelatore amperometrico usando un elettrodo BDD: si sono effettuate varie prove con diversi tipi di rivestimento del capillare e in diverse condizioni sperimentali con lo scopo di ottimizzare la separazione e diminuire i tempi di analisi. La metodologia messa a punto è stata provata anche su un campione reale di plasma umano di un individuo maschio sano per verificarne l'applicabilità.

Il progetto ha avuto un proseguimento nel laboratorio di Analitica del Dipartimento di Chimica Fisica e Inorganica di Chimica Industriale di Bologna, in cui lo studio si è focalizzato sul rivelatore: si è cercato un elettrodo alternativo al BDD che permettesse di rivelare in maniera selettiva e sensibile alcuni degli amminotioili esaminati. Le risposte degli elettrodi sono state valutate tramite voltammetria ciclica e cronoamperometria nelle condizioni ottimali di pH e di concentrazione del tampone ricavate dal lavoro sull'elettroforesi.



## 2. Parte sperimentale

### *2.1 Strumenti e reagenti per la tecnica elettroforetica*

Tutte le separazioni di questo lavoro sono realizzate in capillari di silice fusa, rivestiti esternamente da poliammide, di lunghezza 45 cm, di diametro interno ed esterno rispettivamente pari a 50 e 365  $\mu\text{m}$  (colonne VITROCOM della CM Scientifics UK); ogni capillare usato è tagliato della lunghezza voluta tramite la lama di diamante dello SHORTIX Capillary Column Cutter (SGT di Singapore). Ogni nuova colonna capillare è "attivata" facendovi fluire al suo interno sottopressione per 30 minuti una soluzione di NaOH 1 M, per 10 minuti dell'acqua distillata al fine di rendere dissociati i gruppi silanolici della superficie interna, e infine si condiziona per 10 minuti con il tampone scelto per la separazione. Durante le analisi le estremità del capillare sono immerse in cuvette contenenti il tampone e gli elettrodi tramite i quali è applicata la differenza di potenziale utile alla separazione e generata dallo strumento SPELLMAN CZE 1000R.

L'iniezione avviene secondo la modalità elettrocinetica: si immerge la parte iniziale del capillare nella cuvetta del campione e si applica il voltaggio desiderato per il tempo stabilito; successivamente il capillare viene nuovamente immerso nel tampone per far iniziare la separazione. Durante l'iniezione gli analiti entrano nel capillare sia per la loro migrazione elettroforetica che per la spinta del flusso elettrosmotico.

L'estremità finale del capillare è immersa nella cella in cui avviene la rivelazione degli analiti e in cui sono presenti quattro elettrodi: l'elettrodo di lavoro BDD (0,1% di drogaggio, Windsor Scientific, Berkshire, UK), l'elettrodo di riferimento Ag/AgCl (3 M NaCl), il contro elettrodo e l'elettrodo elettroforetico costituiti entrambi da fili di platino di 1 mm come diametro (platino puro al 99,9%).

Prima dell'uso l'elettrodo è pulito meccanicamente su un panno con allumina di granulometria prima di 0,3  $\mu\text{m}$  e poi di 0,05  $\mu\text{m}$ , e messo nel sonicatore per alcuni minuti immerso in acqua, poi etanolo e infine in acqua.

L'area elettroattiva del BDD (diametro pari a 3 mm) è stata diminuita per aumentare la sensibilità delle risposte mediante un tappo di plastica con un foro in centro di circa 1 mm di diametro. Per allineare l'estremità del capillare con l'elettrodo di lavoro, in modo che siano molto vicini ma che non interferiscano i singoli potenziali applicati, si usa un micromanipolatore collegato a un microscopio (HS6, World Precision Instruments,

Sorasota, USA). Infine lo strumento a cui sono collegati gli elettrodi per la rivelazione è il CHI660C, CH Instruments, Austin TX, USA).

Poiché per le analisi di questo lavoro non si è usato uno strumento elettroforetico automatizzato con la possibilità di controllare la temperatura, tutte le prove sono state effettuate alla temperatura ambiente di circa 20° C.

Gli altri strumenti usati per la preparazione delle soluzioni sono stati il pHmetro (pH210, Microprocessor pHmeter) e il Sonicator 5510 della Branson.

Gli amminotioili e gli altri reagenti utilizzati sono stati acquistati tutti dalla Sigma-Aldrich (Dublin, Ireland):

- L-Cysteine:  $C_3H_7NO_2S$ ; 121,16 u.m.a.;  $\geq 97\%$
- L-Methionine:  $C_5H_{11}NO_2S$ ; 149,21 u.m.a.;  $\geq 98\%$
- N-Acetil-L-Cysteine:  $C_6H_{10}N_2O_2S$ ; 162,21 u.m.a.;  $\geq 98\%$
- DL-Homocysteine:  $C_4H_9NO_2S$ ; 135,18 u.m.a.;  $\geq 95\%$
- L-Glutathione reduced:  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ ; 307,32 u.m.a.;  $\geq 98\%$
- L-Glutathione oxidized:  $C_{20}H_{32}N_8O_{12}S_2$ ; 613,63 u.m.a.;  $\geq 98\%$
- DL-homocystine:  $C_8H_{16}N_2O_4S_2$ ; 268,35 u.m.a.;  $\geq 99\%$
- L-Cysteinglycine:  $C_5H_{10}N_2O_3S$ ; 178,21 u.m.a.;  $\geq 85\%$
- Boric acid:  $H_3BO_3$ ; 61,83 u.m.a.;  $\geq 95\%$
- Sodium Hydroxide: NaOH; 40,00 u.m.a.;  $\geq 98\%$
- Hydrochloric acid: HCl; 36,46 u.m.a.; 37%
- Phosphoric acid:  $H_3PO_4$ ; 98,00 u.m.a.;  $d = 1,685$  g/ml; 85% wt in  $H_2O$
- Tris(hidroxymethyl)aminomethane:  $C_4NH_{11}O_3$ ; 121,14 u.m.a.; pKa: 8,1;  $\geq 99\%$
- PDDA poly(dyallildimethylammonium chloride):  $(C_8H_{16}ClN)_n$   $d = 1,04$  g/ml, MW=200000-350000, 20% in acqua
- LUDOX AS: sospensione colloidale di  $SiO_2$ ;  $SiO^-NH_4^+$  30% in acqua; pH 9,1;  $d = 1,25$  g/ml; area superficiale= circa 230  $m^2/g$
- PEI (polyethyleneimine):  $(C_2H_5N)_n$ ; MW= 500000-750000; 50% in acqua
- Ethanol:  $C_2H_5OH$ , MW= 46,07 u.m.a,  $d = 0,789$  g/ml,  $\geq 99,5\%$ .

Le soluzioni standard dei reagenti di concentrazione pari a 5 mM sono state preparate fresche ogni 5 giorni in acqua deionizzata e sottoposte all'omogeneizzazione ad ultrasuoni per 10 minuti prima dell'utilizzo. Anche le soluzioni dei tamponi usate nelle separazioni sono state sottoposte agli ultrasuoni per circa 10 minuti al fine di eliminare le piccole bolle d'aria che potrebbero interferire con le analisi.

## ***2.2 Strumenti e reagenti per lo studio sul rivelatore***

La ricerca di elettrodi alternativi al BDD per la rivelazione degli amminotioili è stata effettuata con lo strumento CHI660C (CH Instruments Electrochemical Workstation), con il quale sono state condotte prove di voltammetria ciclica e di cronoamperometria per verificare la risposta degli analiti. In particolare si è usata una cella a tre elettrodi in cui come elettrodo di lavoro è stato usato un glassy carbon (diametro di 3 mm, TOKAI CARBON), come elettrodo di riferimento un elettrodo a calomelano saturo (S.C.E.) e un filo di platino come contro elettrodo. Poiché il glassy carbon non ha fornito una risposta soddisfacente si è valutato l'utilizzo del mediatore redox Cobalto-ftalocianina. A tale scopo si è costruito un elettrodo modificato di tipo carbon paste inserendo all'estremità di una pipetta Pasteur (5 mm di diametro) un impasto di grafite in polvere e varie concentrazioni in peso di Cobalto(II)-ftalocianina (Sigma-Aldrich Fluka  $C_{32}H_{16}CoN_8$ ; 571,46 u.m.a.;  $\geq 97\%$ ). I due componenti sono stati impastati con poche gocce di olio minerale ( $d=0,84$  g/ml) e mescolati accuratamente in modo da ottenere la miglior omogeneizzazione possibile. Il contatto elettrico con il potenziostato è garantito con un filo di rame inserito nell'impasto. La grafite funge da conduttore, mentre il complesso di Cobalto-ftalocianina implementa il segnale degli analiti mediandone l'ossidazione: il rapporto tra questi due materiali deve essere quindi ottimizzato ai fini di avere una buona conducibilità elettrica e allo stesso tempo un elevato segnale relativo al mediatore (in genere la Co-Pc non supera il 10% in peso). Prima di usare l'elettrodo bisogna lasciare essiccare l'olio per circa 2 giorni e rendere la superficie più liscia possibile mediante lo strofinamento su carta abrasiva.

Gli amminotioili usati per le analisi sono stati: L-cysteine, L-glutathione reduced, L-methionine, DL-homocysteine e DL-homocystine, tutti della Sigma-Aldrich, come quelli descritti nella sezione precedente.

Le prove sono state condotte solo a pH acido, e i reagenti utilizzati per la preparazione dei tamponi sono stati i seguenti:

- Acido fosforico:  $H_3PO_4$ ; 98,00 u.m.a.; Sigma-Aldrich;
- Acido cloridrico: HCl; 36,46 u.m.a.; Sigma-Aldrich; 37%.



### 3. Risultati e discussione

#### 3.1 Prove elettroforetiche preliminari

Le prime prove di separazione sono state condotte senza rivestire il capillare, e quindi a pH basico per rendere dissociati i gruppi silanoliche superficiali e garantire un efficace flusso elettrosmotico verso il catodo. Per verificare la risposta degli amminotoli all'elettrodo di lavoro BDD si sono eseguite le voltammetrie cicliche degli analiti a concentrazione pari a 50  $\mu\text{M}$  in tampone borato 50 mM a pH 9,5 (velocità di scansione: 100 mV/s ed elettrodo di riferimento Ag/AgCl).

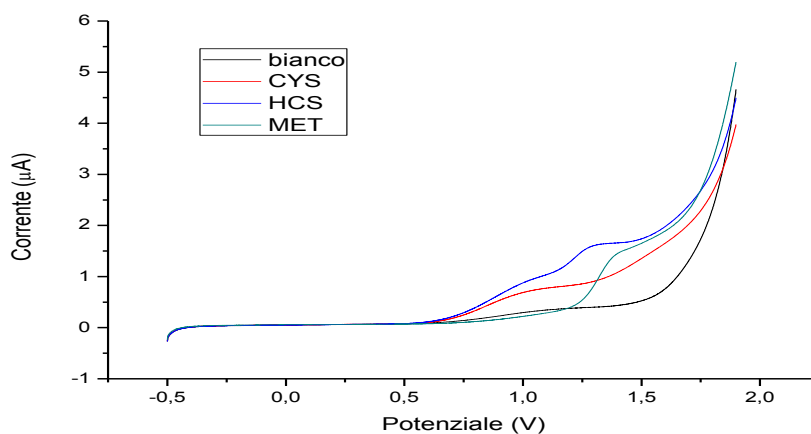


Figura 15: Voltammetrie cicliche della cisteina, dell'omocisteina e della metionina, pH 9,5 in tampone borato, concentrazione degli analiti 50  $\mu\text{M}$ .

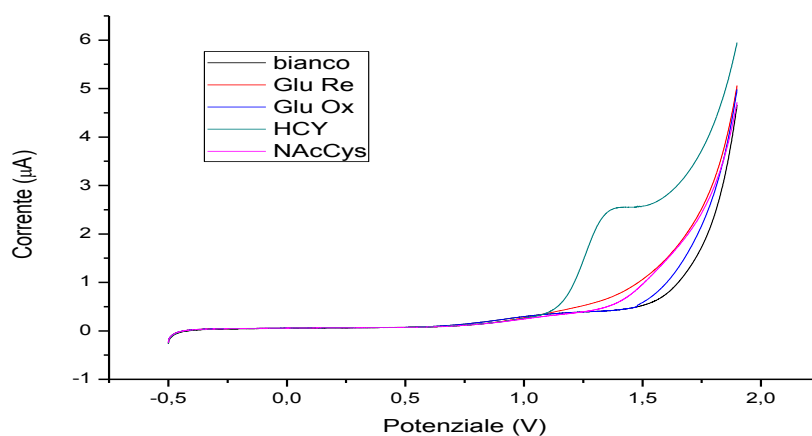


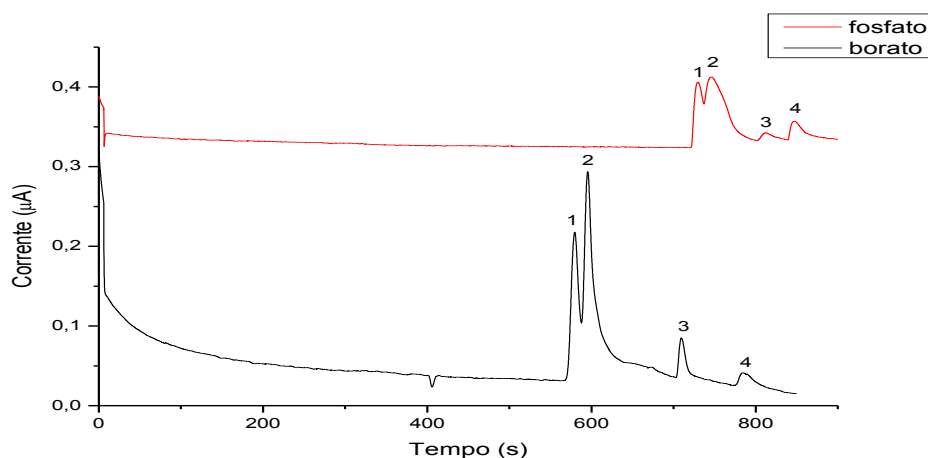
Figura 16: Voltammetrie cicliche del glutazione ridotto e ossidato, dell'omocisteina e dell'acetilcisteina, pH 9,5 in tampone borato, concentrazione degli analiti 50  $\mu\text{M}$ .

Dalle analisi effettuate emerge che tutti gli analiti mostrano una risposta, che appare molto piccola per il glutatione ossidato. Queste prove hanno permesso di scegliere il potenziale di 1,4 V come potenziale di rivelamento per le prove elettroforetiche e in tabella 1 sono riportati i valori di corrente netta a questo potenziale per tutti gli analiti.

	Corrente netta ( $\mu\text{A}$ )
<b>Cisteina</b>	0,652
<b>Omocisteina (HCS)</b>	1,23
<b>Metionina</b>	1,02
<b>Glutathione ridotto</b>	0,533
<b>Glutathione ossidato</b>	0,0073
<b>Omocistina (HCY)</b>	2,11
<b>Acetilcisteina</b>	0,162

**Tabella 1: Correnti nette degli analiti a 1,4 V.**

Le separazioni in tampone fosfato e borato 50 mM a pH basico sono state eseguite applicando in polarità normale alle estremità del capillare un voltaggio pari a 10 kV ( $E=222 \text{ V/cm}$ ), la rivelazione è avvenuta al potenziale di 1,4 V e l'iniezione elettrocinetica è durata 3 secondi. Come previsto dalle prove di voltammetria alcuni analiti presentano un segnale molto basso, da cui derivano degli elettroferogrammi poco definiti. Due prove rappresentative per il confronto tra i due tamponi sono riportati in figura 17, in cui gli analiti sono l'omocisteina, l'omocistina, la cisteina e il glutathione ridotto, tutti alla concentrazione di 500  $\mu\text{M}$ .



**Figura 17: Separazioni effettuate a pH 9,5 con il tampone fosfato e borato (entrambi 50 mM); iniezione elettrocinetica di 3 secondi; potenziale di rilevamento 1,4 V; voltaggio applicato pari a 10 kV; Analiti: 1: HCS; 2: HCY; 3: CYS; 4: Glu Re.**

L'ordine di migrazione delle 4 molecole prese in considerazione è stato identificato da iniezioni successive dei singoli analiti. Da una stima approssimativa delle cariche degli analiti si può provare a giustificare l'ordine e l'andamento della migrazione: come si nota in tabella 2 è confermato il fatto che, poiché la polarità del voltaggio applicato è positiva, il rivelatore si trova al catodo e quindi gli analiti che sono rivelati prima sono quelli meno negativi. L'influenza della dimensione delle molecole è considerata quasi trascurabile, in quanto sono molecole tutte molto piccole rispetto al diametro del capillare.

	<b>Carica totale a pH 9,5</b>
<b>Omocisteina (HCS)</b>	-0,72
<b>Omocistina (HCY)</b>	-1,0
<b>Cisteina</b>	-0,95
<b>Glutazione ridotto</b>	-1,9

**Tabella 2: Cariche a pH 9,5 stimate dal programma Marvin Sketch degli amminotoli analizzati.**

Per i due tamponi in cui si sono condotte le separazioni si sono calcolate le velocità nette e le mobilità apparenti degli analiti, riportate in tabella 3 e 4.

	<b>Tempo di migrazione (s)</b>	<b>Velocità netta (mm/s)</b>	<b>Mobilità apparente (mm<sup>2</sup>/V s)</b>
<b>Omocisteina</b>	580	0,776	0,0349
<b>Omocistina</b>	595	0,756	0,0341
<b>Cisteina</b>	709	0,635	0,0286
<b>Glutazione ridotto</b>	784	0,574	0,0259

**Tabella 3: Velocità e mobilità di ogni analita nella prova di separazione con il tampone borato.**

	<b>Tempo di migrazione (s)</b>	<b>Velocità netta (mm/s)</b>	<b>Mobilità apparente (mm<sup>2</sup>/V s)</b>
<b>Omocisteina</b>	730	0,616	0,0278
<b>Omocistina</b>	746	0,603	0,0272
<b>Cisteina</b>	812	0,554	0,0250
<b>Glutazione ridotto</b>	847	0,531	0,0239

**Tabella 4: Velocità e mobilità di ogni analita nella prova di separazione con il tampone fosfato.**

Le separazioni a pH basico risultano poco soddisfacenti, sia a causa del basso segnale di alcuni analiti che delle somiglianze delle cariche degli analiti a pH 9,5: si è deciso perciò di condurre le analisi a pH acido, rivestendo la parete interna del capillare con un polielettrolita cationico per invertire il flusso elettrosmotico (si inverte la polarità della differenza di potenziale da applicare al capillare). La possibilità di modulare la direzione e l'intensità del flusso elettrosmotico è di particolare interesse nelle separazioni mediante elettroforesi capillare e l'adsorbimento per attrazione elettrostatica dell'additivo sulle pareti interne ha la funzione di modificare il doppio strato elettrico che si genera all'interfaccia tra la parete del capillare e la soluzione elettrolitica. Normalmente applicando il campo elettrico i cationi mobili concentrati in prossimità del doppio strato elettrico migrano verso il catodo ed essendo solvatati producono nel capillare un flusso a profilo piatto dell'elettrolita diretto dall'anodo al catodo. L'adsorbimento di un additivo cationico sulla superficie interna del capillare modifica fino a sopprimere e invertire la densità delle cariche negative superficiali, originando all'interfaccia tra il capillare e la soluzione elettrolitica un flusso elettrosmotico in direzione opposta.

Per verificare la risposta amperometrica degli analiti a pH acido, si sono eseguite delle voltammetrie cicliche tra -0,5 V e 2 V vs Ag/AgCl con velocità di scansione pari a 100 mV/s a diverse concentrazioni: le analisi sono state condotte in tampone fosfato 15 mM portato pH 2 con HCl 1 M (i voltammogrammi sono riportati nell'allegato 1). Prendendo come riferimento la concentrazione di ogni analita 50  $\mu$ M sono stati riportati nella tabella seguente i valori netti della corrente al potenziale di 1,4 V.

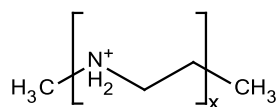
	<b>Corrente netta (<math>\mu</math>A)</b>
<b>Omocisteina (HCS)</b>	0,822
<b>Omocistina (HCY)</b>	0,775
<b>Cisteina</b>	0,533
<b>Glutathione ridotto</b>	0,729
<b>Metionina</b>	0,843
<b>Acetilcisteina</b>	0,0522
<b>Glutathione ossidato</b>	1,67

**Tabella 5: Segnali netti a 1,4 V degli analiti a concentrazione pari a 50  $\mu$ M in ambiente acido.**



Confrontando i dati ottenuti con quelli precedenti, si nota come a pH acido le risposte degli analiti siano minori, ma comunque essi appaiono tutti rivelabili, a differenza dell'ambiente basico che non permette la rivelazione del glutathione ossidato. La maggiore corrente d'ossidazione osservata in ambiente basico trova un riscontro nel meccanismo di ossidazione descritto in precedenza, in quanto il pH acido sfavorisce la formazione del radicale del tiolo adsorbito.

Il primo polimero con cui si è rivestita la parete interna del capillare è la polietilenimina (PEI) di cui è riportata la struttura di seguito. La densità di carica per questo polimero, intesa come rapporto tra cariche positive e numero di atomi diversi dall'idrogeno nell'unità ripetente<sup>(20)</sup>, è pari a 0,33 se tutti i gruppi amminici fossero protonati.



**Figura 18: Struttura della PEI.**

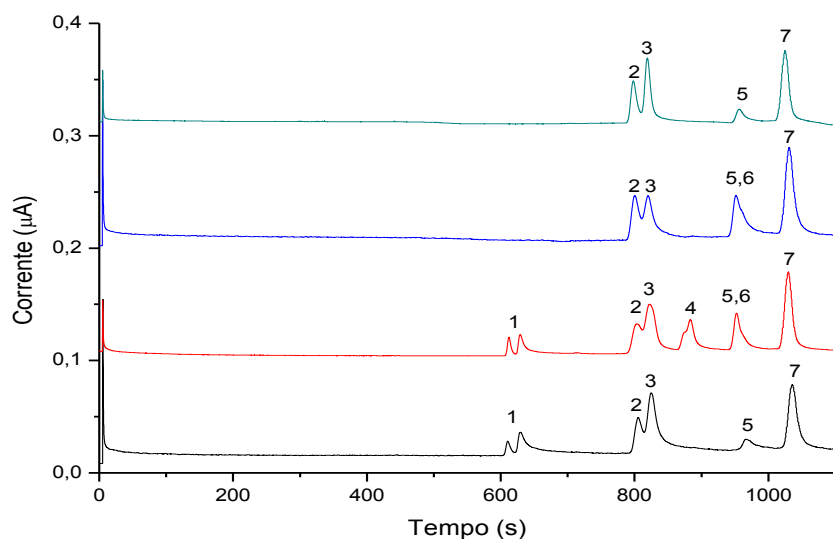
È stato scelto di usare la PEI alla concentrazione 5% in quanto è già dimostrato che genera un flusso elettrosmotico stabile e uniforme, a causa dell'alto grado di protonazione di tutti i gruppi amminici a pH così acidi<sup>(21)</sup>.

Per permettere l'assorbimento del polimero, la soluzione della PEI 5% è stata fatta fluire sotto pressione per 30 minuti all'interno del capillare, dopo che questo fosse stato attivato come descritto nella parte sperimentale. Le separazioni sono state condotte con il tampone fosfato 50 mM portate a pH 2,5 con una soluzione di Tris(idrossimetil)amminometano 1 M; la polarità del voltaggio applicato all'elettrodo è negativa in quanto la superficie interna del capillare è ora carica positivamente e quindi il flusso elettrosmotico è direzionato verso l'anodo.

In figura 19 si riportano alcune analisi svolte nelle medesime condizioni sperimentali cambiando gli analiti iniettati.

Rispetto alle separazioni a pH basico l'omocistina (HCY) è separata alla linea di base con l'omocisteina (HCS), la quale però si sovrappone completamente alla metionina, e neanche le due forme del glutathione sono ben separate. Si nota inoltre dagli elettroferogrammi come l'acetilcisteina si presenti con un doppio picco e la cisteina con

una spalla: queste particolarità potrebbero essere dovute a impurezze o causate dalla formazione di prodotti derivanti dall'ossidazione all'aria di questi analiti.



**Figura 19:** Prove di separazione con il capillare rivestito di PEI 5%. Condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM a pH 2,5; potenziale di rivelazione 1,4 V, voltaggio applicato al capillare 10 kV; iniezione elettrocinetica di 3 secondi. Analiti alla concentrazione di 500 µM: 1: AcCys; 2: Glu re; 3: Glu ox; 4: Cys; 5: HCS; 6: Met; 7: HCY.

Per cercare una spiegazione dell'ordine di migrazione degli analiti si è valutata la carica degli analiti a pH 2,5: N-acetil-L-cisteina è l'unica molecola che presenta una carica totale negativa ed è quindi quella che si muove più velocemente verso l'anodo, mentre le altre sono caratterizzate da una mobilità elettroforetica contraria al flusso elettrosmotico.

	Tempo di migrazione (s)	Carica totale
<b>Acetilcisteina</b>	621 ± 8	-0,050
<b>Glutazione ridotto</b>	800 ± 10	0,16
<b>Glutazione ossidato</b>	825 ± 7	1,1
<b>Cisteina</b>	871 ± 10	0,41
<b>Omocisteina (HCS)</b>	949 ± 12	0,48
<b>Metionina</b>	949 ± 11	0,52
<b>Omocistina (HCY)</b>	1025 ± 12	0,61

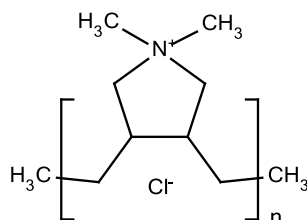
**Tabella 6:** Tempi di migrazione degli analiti in ordine di arrivo in corrispondenza delle cariche stimate dal programma Marvin Sketch a pH 2,5.

Il ricoprimento della parete interna del capillare con questo polielettrolita permette una riproducibilità nei tempi di migrazione degli analiti molto alta, però limitata a poche analisi. Prendendo in considerazione l'omocistina, che presenta sempre un picco molto definito e ben distinguibile dagli altri analiti, si sono calcolati i parametri statistici per 7 prove svolte nelle medesime condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM a pH 2,5, potenziale di rivelazione 1,4 V; voltaggio applicato 10 kV; iniezione elettrocinetica di 3 secondi.

	Valore medio	Deviazione standard del valore medio	CV %
Tempo di migrazione (s)	1025 ± 12	4,63	1,19
Velocità netta (mm/s)	0,439 ± 0,005	1,98·10 <sup>-3</sup>	1,19
Mobilità apparente (mm <sup>2</sup> /s V)	0,0198 ± 0,0002	8,92·10 <sup>-5</sup>	1,19

**Tabella 7: Parametri statistici riferiti alla migrazione dell'omocistina (HCY) nelle prove con il capillare rivestito con PEI 5% per 7 prove effettuate.**

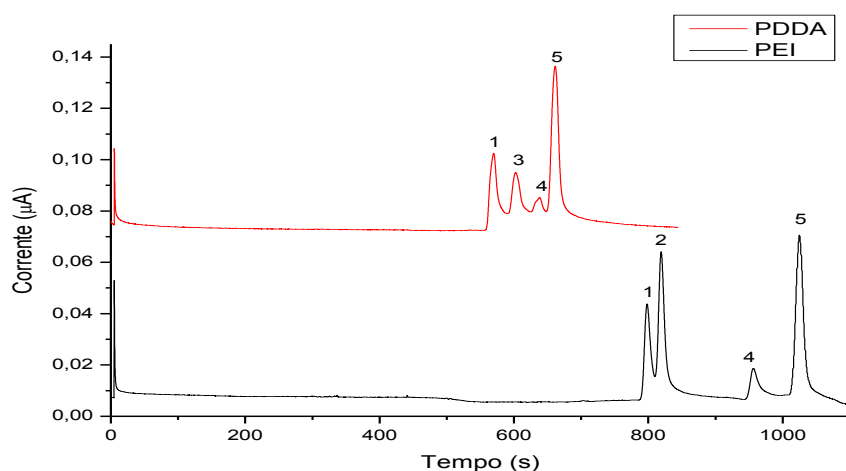
Per migliorare la riproducibilità e l'efficienza della separazione si è deciso di cambiare il polimero cationico con cui rivestire il capillare, e si è scelto il PDDA (poli(diallildimetilammoniocloruro)) (C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>ClN)<sub>n</sub>: questo polimero lineare è composto da gruppi amminici quaternari e ha il grande vantaggio di essere un polielettrolita molto forte, in quanto ha una densità di carica permanente pari a 0,11 e non dipendente dal pH<sup>(22)</sup>. Il rivestimento del capillare è stato effettuato analogamente alla procedura per il rivestimento del PEI: il polimero alla concentrazione 5% è stato fatto fluire sottopressione all'interno del capillare già attivato per 30 minuti.



**Figura 20: Struttura del PDDA.**

L'elettroferogramma ottenuto è rappresentato nella figura 21, ed è stato messo a confronto con uno di quelli ottenuti precedentemente con la PEI nelle stesse condizioni sperimentali per confrontare l'efficienza dei due tipi di rivestimento in termini di mobilità elettrosmotica e di potenziale  $\xi$ . Infatti il rivestimento cambia la densità di carica sulla superficie del capillare e quindi il potenziale  $\xi$ : poiché il flusso elettrosmotico è direttamente proporzionale al potenziale  $\xi$ , la misura del flusso elettrosmotico può essere usata per verificare il rivestimento del capillare.

Nella tabella 8 sono riportati i valori di velocità e di mobilità apparente (somma di quella elettroforetica costante per la stessa molecola e di quella elettrosmotica) calcolati per l'omocistina, presa come molecola riferimento per il suo picco ben definito. I tempi di migrazione degli analiti rivelano come la PEI produca un flusso elettrosmotico più lento, risultante da un potenziale  $\xi$  sulla superficie del capillare minore: si può quindi presupporre che il ricoprimento con il PDDA sia quello più efficiente e che questo polimero si adsorba meglio alla parete del capillare assicurando una forte e stabile carica positiva.

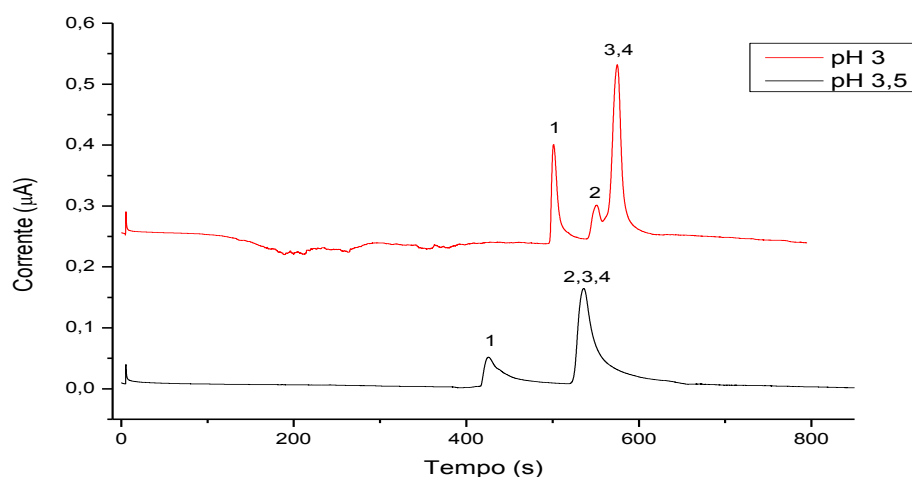


**Figura 21:** Confronto fra i due polielettroliti cationici usati come rivestimento del capillare. Condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM portato a pH 2,5 con TRIS; voltaggio di separazione 10 kV; potenziale di rivelamento 1,4 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi. Analiti alla concentrazione 500  $\mu$ M: 1: Glu Re; 2: Glu Ox, 3: Cys; 4: HCS; 5: HCY.

	Tempo (s)	Velocità netta (mm/s)	Mobilità apparente ( $\text{mm}^2/\text{s V}$ )
<b>PDDA 5%</b>	661	0,681	0,0307
<b>PEI 5%</b>	1025	0,4390	0,01978

**Tabella 8:** Velocità e mobilità dell'HCY relative ai due tipi di rivestimento capillare.

La separazione degli analiti iniettati non è soddisfacente in quanto i picchi non sono risolti alla linea di base ma si sovrappongono, e perciò si sono eseguite altre prove variando il pH del tampone con TRIS e mantenendo il rivestimento di PDDA al 5%: gli elettroferogrammi ottenuti sono raffigurati nella figura 22. Da queste analisi si nota che aumentando il pH del tampone diminuisce il tempo di migrazione di tutti gli analiti e quindi aumenta la mobilità apparente: infatti aumentando il pH le molecole diventano leggermente più negative e arrivano all'anodo (polo rivelatore per l'applicazione del voltaggio inversa) in un tempo minore fino a sovrapporsi. L'effetto della diminuzione del flusso elettrosmotico causata dall'aumento del pH è trascurabile in quanto il PDDA mantiene la sua forte carica positiva anche a pH leggermente meno acidi.



**Figura 22:** Prove effettuate con il PDDA 5% come rivestimento cationico a diversi pH. Condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM, voltaggio di separazione 10 kV, potenziale di rivelamento 1,4 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi. Analiti: 1: Glu Re; 2: Cys; 3: HCS; 4: HCY.

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati dei calcoli riguardanti le velocità e le mobilità apparenti degli analiti.

	Tempo (s)	Velocità netta (mm/s)	Mobilità apparente (mm <sup>2</sup> /V s)
<b>Glutazione ridotto</b>	570	0,789	0,0356
<b>Cisteina</b>	602	0,747	0,0337
<b>Omocisteina (HCS)</b>	638	0,705	0,0318
<b>Omocistina (HCY)</b>	661	0,681	0,0307

**Tabella 9:** Velocità e mobilità degli analiti calcolate a pH 2,5.

	Tempo (s)	Velocità netta (mm/s)	Mobilità apparente (mm <sup>2</sup> /V s)
<b>Glutazione ridotto</b>	501	0,898	0,0405
<b>Cisteina</b>	551	0,817	0,0368
<b>Omocisteina (HCS)</b>	575	0,783	0,0353
<b>Omocistina (HCY)</b>	575	0,783	0,0353

Tabella 10: Velocità e mobilità degli analiti a pH 3.

	Tempo (s)	Velocità netta (mm/s)	Mobilità apparente (mm <sup>2</sup> /V s)
<b>Glutazione ridotto</b>	426	1,06	0,0476
<b>Cisteina</b>	536	0,840	0,0378
<b>Omocisteina (HCS)</b>	536	0,840	0,0378
<b>Omocistina (HCY)</b>	536	0,840	0,0378

Tabella 11: Velocità e mobilità degli analiti a pH 3,5.

Il pH a cui si è ottenuta la separazione migliore è 2,5 poiché a pH maggiori gli analiti si sovrappongono. La spiegazione di questo comportamento e l'ordine di migrazione potrebbero derivare dalle cariche delle molecole ai diversi pH considerati: il glutazione ridotto presenta la carica minore e perciò è quello che migra più velocemente, mentre all'aumentare del pH si ha una diminuzione di differenza tra le cariche degli analiti che motiva la sovrapposizione degli ultimi picchi.

	pH 2,5	pH 3	pH 3,5
<b>Glutazione ridotto</b>	0,16	-0,08	-0,34
<b>Cisteina</b>	0,41	0,18	0,07
<b>Omocisteina (HCS)</b>	0,48	0,22	0,08
<b>Omocistina (HCY)</b>	0,61	0,26	0,09

Tabella 12: Cariche stimate dal programma Marvin Sketch degli analiti ai diversi pH.

Poiché le separazioni ottenute provando a variare il pH non ha portato a buoni risultati neanche con il rivestimento di PEI 5%, si è deciso di ricoprire la parete interna del capillare con un multistrato di PDDA- nanoparticelle di silice- PDDA. Lo strato intermedio di silice ha la funzione di incrementare la superficie su cui far assorbire il polielettrolita cationico ed è carico negativamente. Per inserire questo strato di silice è stata usata la soluzione colloidale in acqua al 30% LUDOX AS-40 (SiONH<sub>4</sub>) in cui la carica negativa della

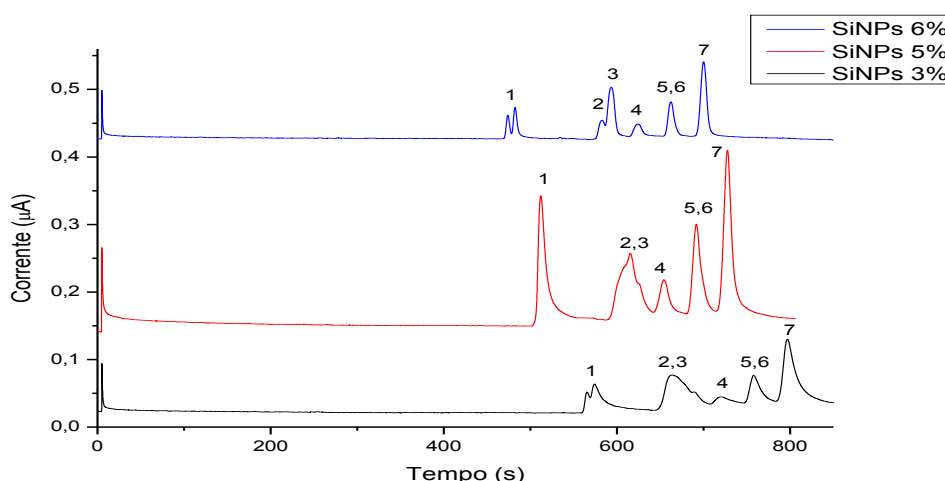
silice è controbilanciata dallo ione ammonio; l'area superficiale di queste particelle è di  $135 \text{ m}^2/\text{g}$  e le dimensioni di circa 12 nm.

È stato scelto il PDDA invece che il PEI come strato positivo in quanto è stato dimostrato come il primo polimero aderisca meglio alle nanoparticelle di silice, formando un film più ordinato e piatto<sup>(23)</sup>.

Il metodo seguito per il rivestimento del capillare è stato quello di farvi fluire sotto pressione le seguenti soluzioni per i rispettivi tempi: NaOH 1 M per 30 minuti, H<sub>2</sub>O per 10 minuti, PDDA per 30 minuti, H<sub>2</sub>O per 10 minuti, SiNPs per 30 minuti, H<sub>2</sub>O per 10 minuti, PDDA per 30 minuti, H<sub>2</sub>O per 10 minuti, e infine il tampone scelto per le analisi per 10 minuti.

A causa della grande differenza di rigidità e di densità di carica tra la silice e il polimero non è facile predire le concentrazioni da usare per formare un multistrato compatto e uniforme: si sono quindi provate diverse concentrazioni di PDDA e di nanoparticelle di silice per individuare quali permettano una buona separazione e garantiscano anche il ricoprimento più stabile ed efficiente.

Nelle prove eseguite qui riportate le concentrazioni degli analiti non sono sempre uguali fra loro, ma sono comunque analisi significative per delle considerazioni sul tempo di migrazione e sulla qualità della separazione. Nella figura seguente sono riportate delle separazioni effettuate a diverse concentrazioni dello strato di silice nel multistrato, e mantenendo la concentrazione di PDDA costante e pari a 2,5%.



**Figura 23:** Prove condotte con rivestimento capillare del multistrato PDDA-SiNPs-PDDA. La concentrazione del polimero è stata tenuta costante e pari a 2,5%, mentre è stata variata la concentrazione delle nanoparticelle di silice. Condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM a pH 2,5; voltaggio di separazione 10 kV; potenziale di rivelazione 1,4 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi. 1: AcCys; 2: Glu Re; 3: Glu Ox; 4: Cys; 5: HCS; 6: Met; 7: HCY.

Queste analisi evidenziano come i tempi di migrazione diminuiscano leggermente all'aumentare della concentrazione delle nanoparticelle di silice, come conferma del fatto che aumenta la densità di carica sulla superficie capillare e di conseguenza il flusso elettrosmotico. Ad alte concentrazioni di silice la qualità e l'efficienza della separazione è migliore; rispetto alle prove effettuate in precedenza con il rivestimento del capillare solo con il policatione si riescono a separare le due forme del glutatione, mentre l'omocisteina è ancora sovrapposta alla metionina. Mediante il confronto dei tempi di migrazione dell'omocistina si può valutare l'efficienza del rivestimento del multistrato e la densità di carica sulla parete capillare dall'andamento del flusso elettrosmotico.

	<b>Tempo (s)</b>	<b>Velocità netta (mm/s)</b>	<b>Mobilità apparente (mm<sup>2</sup>/s V)</b>
<b>SiNPs 3%</b>	794	0,567	0,0256
<b>SiNPs 5%</b>	727	0,619	0,0279
<b>SiNPs 6%</b>	700	0,643	0,0290

**Tabella 13: Confronto tra le diverse velocità di migrazione dell'omocistina per le diverse concentrazioni di nanoparticelle di silice nel multistrato.**

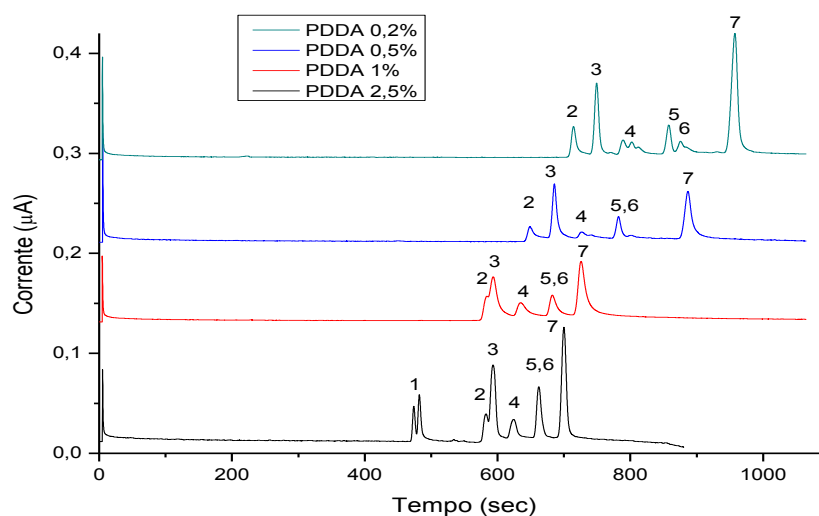
Per valutare l'influenza della concentrazione del PDDA nel rivestimento del multistrato si sono svolte delle prove in cui si è mantenuta costante la concentrazione della silice (6%) e variata quella di PDDA, e gli elettroferogrammi ottenuti sono riportati in figura 24.

Da queste analisi si nota che diminuendo la concentrazione di PDDA si ha un progressivo aumento dei tempi di migrazione degli analiti, in accordo con la diminuzione della densità di carica positiva (e quindi del potenziale  $\xi$ ) sulle pareti del capillare: la conseguente diminuzione di velocità del flusso elettrosmotico verso l'anodo rende i picchi più separati. Come già notato in precedenza i picchi relativi all'acetilcisteina e alla cisteina risultano sdoppiati.

	<b>Tempo (s)</b>	<b>Velocità netta (mm/s)</b>	<b>Mobilità apparente (mm<sup>2</sup>/s V)</b>
<b>PDDA 2,5%</b>	700	0,643	0,0290
<b>PDDA 1%</b>	726	0,620	0,0279
<b>PDDA 0,5%</b>	889	0,506	0,0228
<b>PDDA 0,2%</b>	983	0,458	0,0206

**Tabella 14: Parametri di migrazione dell'omocistina al variare della concentrazione di PDDA nel multistrato di rivestimento del capillare.**





**Figura 24:** Prove condotte variando la concentrazione di PDDA nel multistrato di rivestimento del capillare e mantenendo la concentrazione delle nanoparticelle di Silice pari a 6%. Condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM a pH 2,5; voltaggio di separazione 10 kV; potenziale di rivelamento 1,4 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi. 1: AcCys; 2: Glu Re; 3: Glu Ox; 4: Cys; 5: HCS; 6: Met; 7: HCY.

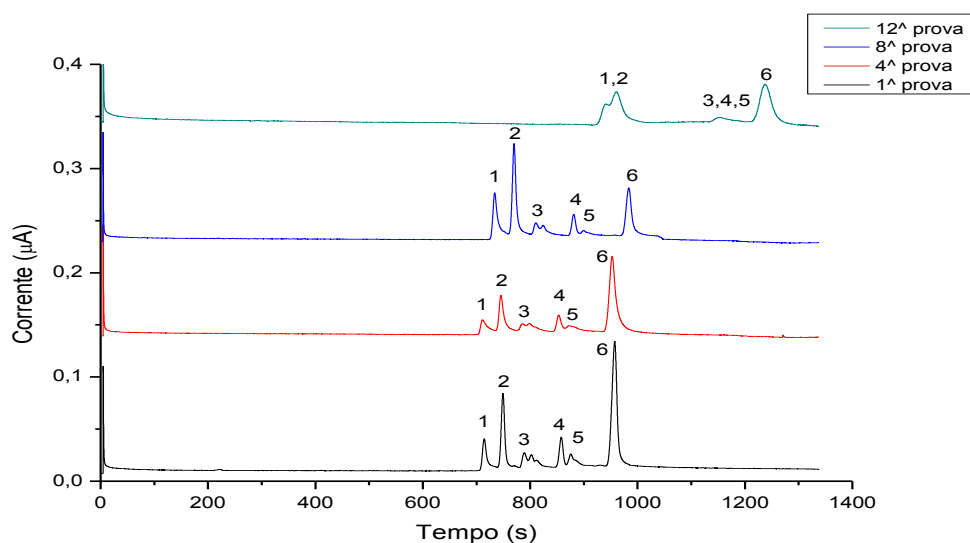
Da tutte le prove effettuate risulta che il rivestimento che produce una separazione migliore è il multistrato PDDA 0,2%- SiNPs 6%- PDDA 0,2% e per valutarne la stabilità e la riproducibilità si sono svolte altre analisi in identiche condizioni sperimentali e riportate nella figura 25. Con lo strumento Zetasizer Malvern 3000 HS si è anche analizzato il potenziale  $\xi$  della soluzione di nanoparticelle di silice al 6%, che è risultato pari a -42,9 mV, e quindi indicativo di una soluzione colloidale stabile e di dispersione uniforme.

Dalle prove svolte si nota che i tempi di migrazione e le aree dei picchi degli analiti sono molto riproducibili e fino alla decima prova si sono calcolati i valori medi delle mobilità apparenti degli analiti e sono riportati nella tabella seguente.

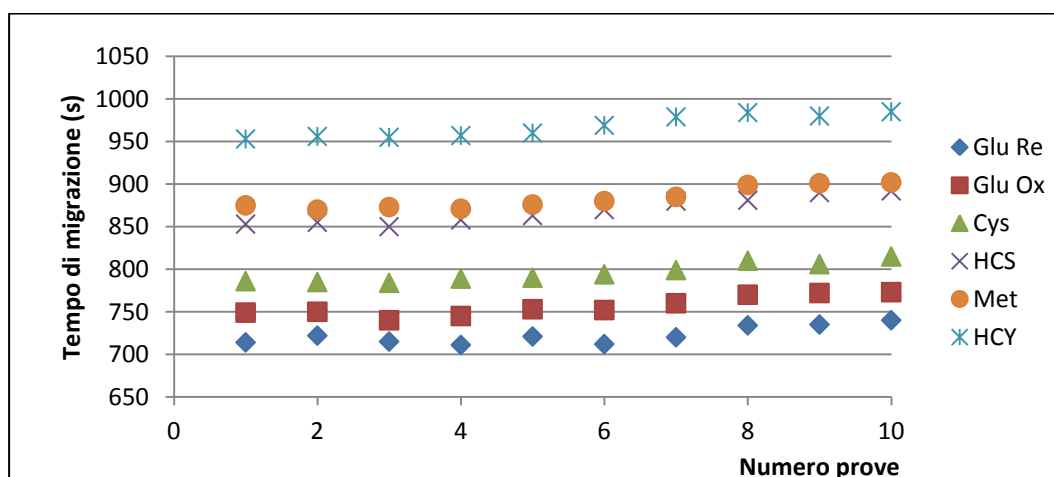
	Tempo di migrazione (s)	CV %	Mobilità apparente ( $\text{mm}^2/\text{s V}$ )
<b>Glu Re</b>	722 ± 10	1,5	0,0281 ± 0,0004
<b>Glu Ox</b>	756 ± 12	1,7	0,0268 ± 0,0004
<b>Cys</b>	796 ± 11	1,4	0,0255 ± 0,0004
<b>HCS</b>	869 ± 17	1,6	0,0233 ± 0,0004
<b>Met</b>	883 ± 13	1,6	0,0230 ± 0,0004
<b>HCY</b>	968 ± 13	1,4	0,0209 ± 0,0003

**Tabella 15:** Parametri statistici per valutare la riproducibilità del rivestimento multistrato per 10 prove consecutive.

Dopo la decima prova i tempi di migrazione aumentano in quanto è probabile che parte della parete capillare perda il rivestimento, lasciando scoperti i gruppi silanici del capillare che a questo pH sono protonati: ne risultano una diminuzione ed instabilità considerevoli del flusso elettrosmotico e quindi la perdita di riproducibilità delle analisi. Un ulteriore motivo per la perdita di stabilità del rivestimento potrebbe derivare dall'aggregazione delle particelle di silice.



**Figura 25: Prove con capillare rivestito con PDDA 0,2%- Si 6%- PDDA 0,2% per valutare la stabilità del multistrato. Condizioni sperimentali: tampone fosfato 50 mM a pH 2,5; voltaggio di separazione 10 kV; potenziale di rivelamento 1,4 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi. Analiti 100 µM: 1: Glu Re; 2: Glu Ox; 3: Cys; 4: HCS; 5: Met; 6: HCY.**



**Grafico 1: Andamento del tempo di migrazione degli analiti nel corso delle prove di riproducibilità.**

Poiché il rivestimento del capillare con il multistrato PDDA 0,2%- SiNPs 6%- PDDA 0,2% risulta essere stabile e permette una buona separazione degli analiti, si cominciano ad ottimizzare le condizioni sperimentali con cui si condurranno le prove di taratura e quelle con il campione reale di plasma.

### ***3.2 Ottimizzazione delle condizioni sperimentali***

Sono state svolte varie prove ai fini di ottimizzare i seguenti parametri: pH del tampone, potenziale di rivelamento, concentrazione del tampone, durata dell'iniezione elettrocinetica e voltaggio di separazione. Le prove di ottimizzazione sono state effettuate variando la condizione sperimentale esaminata e mantenendo costanti le altre; l'effetto di ogni condizione è stato studiato usando un capillare nuovo per rendere le separazioni il più omogenee e uniformi possibili.

In queste analisi la concentrazione degli analiti è pari a 125  $\mu\text{M}$  e il loro ordine di migrazione è: 1: acetilcisteina; 2: glutazione ridotto; 3: glutazione ossidato; 4: cisteina; 5: omocisteina (HCS); 6: metionina; 7: omocistina (HCY); 8: cisteinglicina.

#### *Ottimizzazione del pH*

La prima condizione sperimentale che si è ottimizzata è stato il pH del tampone fosfato di concentrazione pari a 25 mM, e gli elettroferogrammi ottenuti sono riportati nella seguente figura. Il pH è una variabile importante in quanto influenza il segnale e la carica netta della molecola, e di conseguenza la sua velocità di migrazione nell'elettroforesi capillare; la ionizzazione del rivestimento multistrato è invece assunto costante alle piccole variazioni di pH esaminate.

Come si può notare da queste analisi all'aumentare del pH gli analiti migrano più velocemente in quanto vi è un aumento della mobilità elettroforetica dovuta alla minore carica totale delle molecole: nelle tabelle seguenti sono riportati i tempi di migrazione e le mobilità degli analiti valutati per ogni pH analizzato. Si nota inoltre che il segnale della prova condotta a pH 1,6 risulta fortemente disturbato dal rumore, e questo potrebbe essere dovuto dall'alta forza ionica del tampone che aumenta così la conducibilità interferendo con la rivelazione.

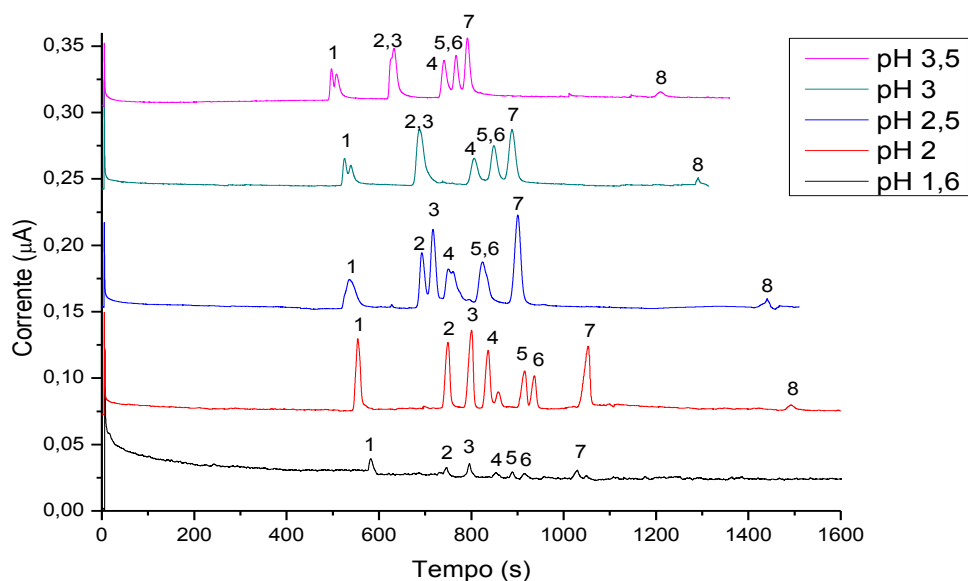


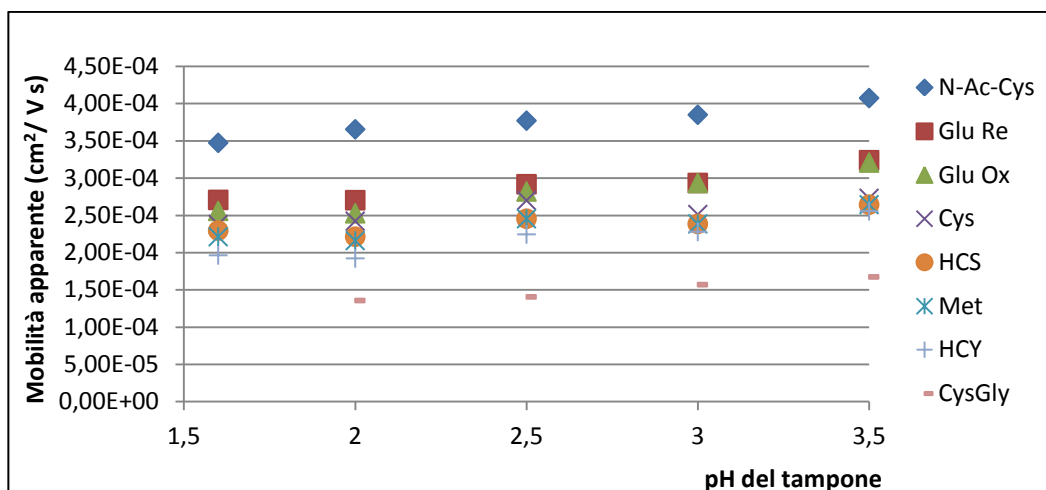
Figura 26: Prove per l'ottimizzazione del pH, condotte mantenendo costanti le altre condizioni sperimentali: tampone fosfato 25 mM; voltaggio di separazione 10 kV; potenziale di rivelamento 1,4 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi.

	pH 1,6	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	pH 3,5
AcCys	583	554	537	526	497
Glu Re	748	749	694	690	625
Glu Ox	791	801	718	690	631
Cys	851	836	750	806	742
HCS	882	915	825	849	766
Met	915	937	825	849	766
HCY	1031	1053	902	888	792
CysGly		1492	1441	1293	1210

Tabella 16: Tempi di migrazione (s) degli analiti ai diversi pH analizzati.

	pH 1,6	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	pH 3,5
AcCys	0,0348	0,0366	0,0377	0,0385	0,0407
Glu Re	0,0271	0,0270	0,0292	0,0293	0,0324
Glu Ox	0,0256	0,0253	0,0282	0,0293	0,0321
Cys	0,0238	0,0242	0,0270	0,0251	0,0273
HCS	0,0230	0,0221	0,0245	0,0239	0,0264
Met	0,0222	0,0216	0,0245	0,0239	0,0264
HCY	0,01966	0,01925	0,0224	0,0228	0,0256
CysGly		0,01359	0,01407	0,01568	0,01675

Tabella 17: Mobilità apparenti ( $\text{mm}^2/\text{V s}$ ) degli analiti ai diversi pH analizzati.

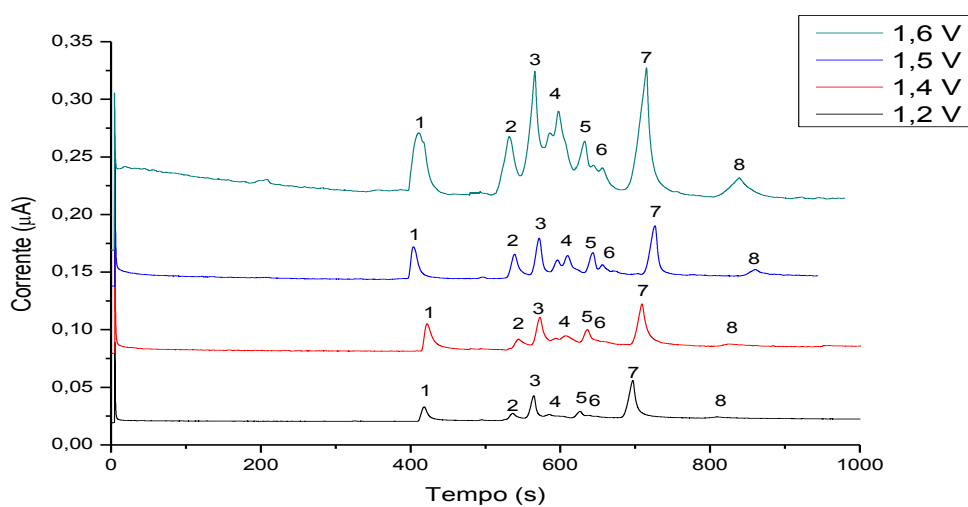


**Grafico 2: Andamento delle mobilità apparenti degli analiti in funzione del pH del tampone.**

Il pH 2 è risultato quello ottimale in quanto per la prima volta il picco dell'omocistina risulta separato da quello della metionina, e l'acetilcisteina non si presenta come un doppio picco.

### Ottimizzazione del potenziale di rivelamento

Le prove di voltammetria ciclica svolte inizialmente rivelano che tutti gli analiti rispondono all'elettrodo a potenziali maggiori di 1 V: per questo motivo il potenziale di rivelamento per le prove di ottimizzazione è stato variato da 1,2 V a 1,6 V.



**Figura 27: Prove per l'ottimizzazione del potenziale di rivelamento, condotte mantenendo costanti le altre condizioni sperimentali: tampone fosfato 25 mM a pH 2, voltaggio di separazione 10 kV; iniezione elettrocinetica di 3 secondi.**

Dalle analisi eseguite si nota che i segnali degli analiti aumentano all'aumentare del potenziale di rivelamento, in accordo con le prove voltammetriche. Parallelamente si osserva un innalzamento della corrente di base legato all'ossidazione dell'elettrolita, e un peggioramento nella forma dei picchi, evidente a 1,6 V, che potrebbe essere anche causato dall'ossidazione di impurezze che si ossidano a potenziali così alti: il potenziale ritenuto migliore è 1,5 V.

Al fine di evidenziare l'andamento dei segnali per ogni potenziale di rivelamento considerato sono state valutate le altezze dei picchi degli analiti e riportate nel grafico 3.

	Altezza picco a 1,2 V ( $\mu\text{A}$ )	Altezza picco a 1,4 V ( $\mu\text{A}$ )	Altezza picco a 1,5 V ( $\mu\text{A}$ )	Altezza picco a 1,6 V ( $\mu\text{A}$ )
<b>AcCys</b>	0,0126	0,0236	0,0278	0,0539
<b>Glu Re</b>	0,00701	0,0106	0,0213	0,0503
<b>Glu Ox</b>	0,0220	0,0296	0,0349	0,107
<b>Cys</b>	0,00583	0,0113	0,0160	0,0516
<b>HCS</b>	0,00838	0,0136	0,0199	0,0708
<b>Met</b>	0,00540	0,0187	0,0226	0,0476
<b>HCY</b>	0,0354	0,0411	0,0462	0,111
<b>CysGly</b>	0,00370	0,00502	0,00723	0,0183

Tabella 18: Altezze dei picchi degli analiti ai diversi potenziali di rivelamento.

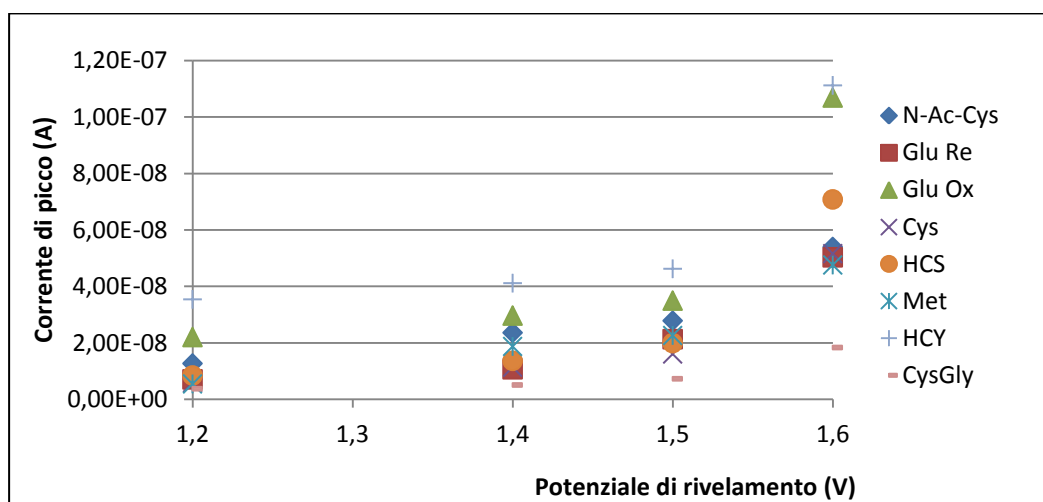
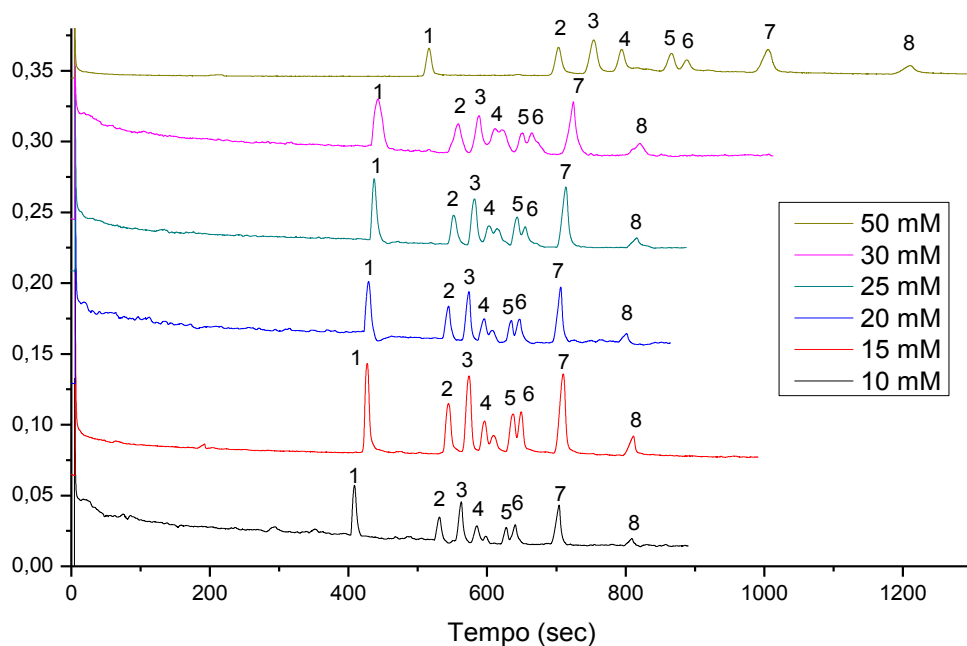


Grafico 3: Massimi dei segnali degli analiti in funzione del potenziale di rivelamento.

### Ottimizzazione della concentrazione del tampone

La concentrazione del tampone è un fattore importante nelle separazioni elettroforetiche in quanto influenza la viscosità e la forza ionica della soluzione, e di conseguenza anche la velocità del flusso elettrosmotico e la risoluzione.



**Figura 28: Prove per l'ottimizzazione della concentrazione del tampone fosfato; le altre condizioni sperimentali sono state mantenute costanti: pH 2; voltaggio di separazione 10 kV; potenziale di rivelamento 1,5 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi.**

Come si nota dalle prove riportate nella figura 28, all'aumentare della concentrazione del tampone si ha un leggero allargamento di banda e un aumento dei tempi di migrazione, accentuato soprattutto alla concentrazione del tampone di 50 mM, in cui i picchi risultano tutti separati ma allo stesso tempo estremamente larghi. Dai tempi di migrazione degli analiti sono state calcolate le mobilità apparenti riportate in tabella 20 e si sono anche valutate le aree dei picchi di tutti gli analiti per stimare la sensibilità e la risoluzione fra le due forme del glutatione e fra l'omocisteina e la metionina, in quanto le loro separazioni sono le più difficili da ottenere. Si sono calcolati infine i piatti teorici riferiti all'omocisteina, riportati in tabella 21.

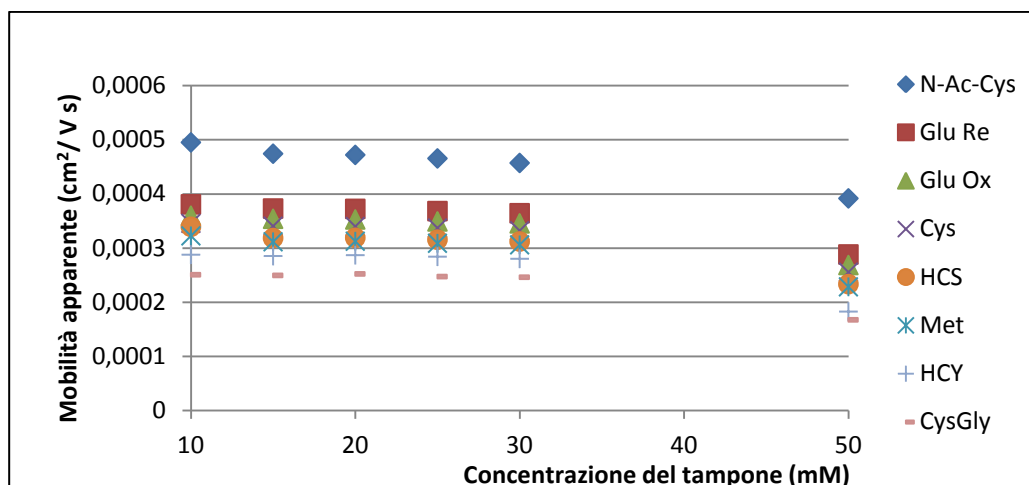


Grafico 4: Mobilità apparenti degli analiti alle concentrazioni del tampone considerate.

	10 mM	15 mM	20 mM	25 mM	30 mM	50 mM
AcCys	409	427	429	435	443	517
Glu Re	532	543	544	550	556	703
Glu Ox	563	572	574	580	586	754
Cys	586	595	596	601	610	793
HCS	597	636	635	642	649	868
Met	628	650	648	656	662	887
HCY	704	710	706	713	723	1109
CysGly	808	812	803	819	823	1210

Tabella 19: Tempi di migrazione (s) degli analiti alle varie concentrazioni del tampone.

	10 mM	15 mM	20 mM	25 mM	30 mM	50 mM
AcCys	0,0495	0,0474	0,0472	0,0466	0,0457	0,0391
Glu Re	0,0381	0,0373	0,0372	0,0368	0,0364	0,0288
Glu Ox	0,0360	0,0354	0,0353	0,0349	0,0346	0,0269
Cys	0,0346	0,0340	0,0340	0,0337	0,0333	0,0255
HCS	0,0339	0,0318	0,0319	0,0315	0,0312	0,0233
Met	0,0322	0,0312	0,0315	0,0309	0,0306	0,0228
HCY	0,0288	0,0285	0,0287	0,0284	0,0280	0,01828
CysGly	0,0251	0,0249	0,0252	0,0247	0,0246	0,01675

Tabella 20: Mobilità apparenti ( $\text{mm}^2/\text{V s}$ ) degli analiti alle varie concentrazioni del tampone.



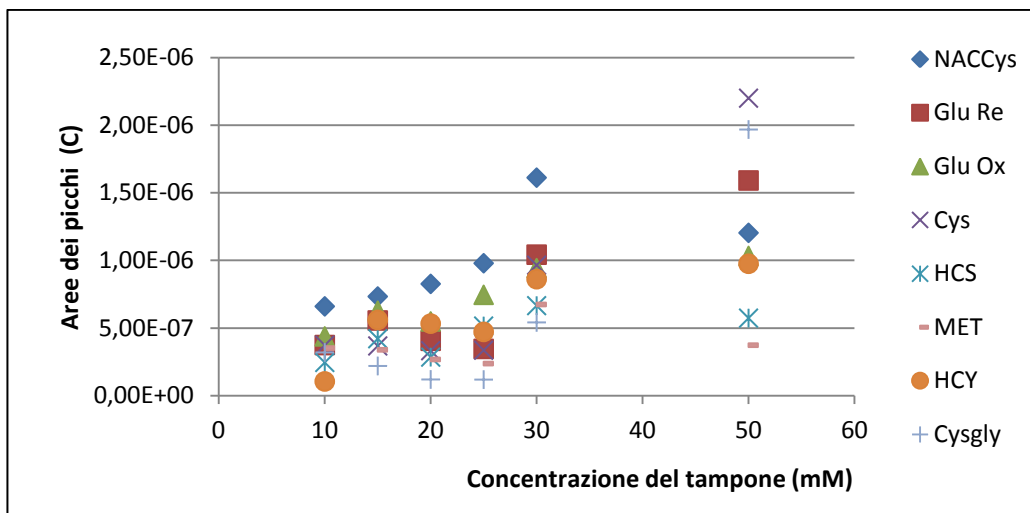


Grafico 5: Andamento delle aree dei picchi in funzione della concentrazione del tampone.

	10 mM	15 mM	20 mM	25 mM	30 mM	50 mM
N	520*10 <sup>2</sup>	857*10 <sup>2</sup>	646*10 <sup>2</sup>	884*10 <sup>2</sup>	365*10 <sup>2</sup>	462*10 <sup>2</sup>

Tabella 21: Numero di piatti teorici per l'omocistina al variare della concentrazione del tampone.

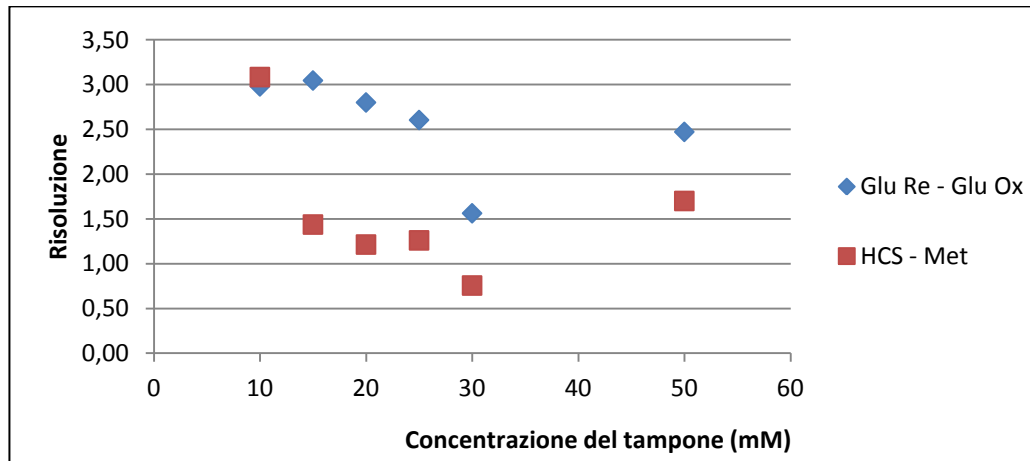
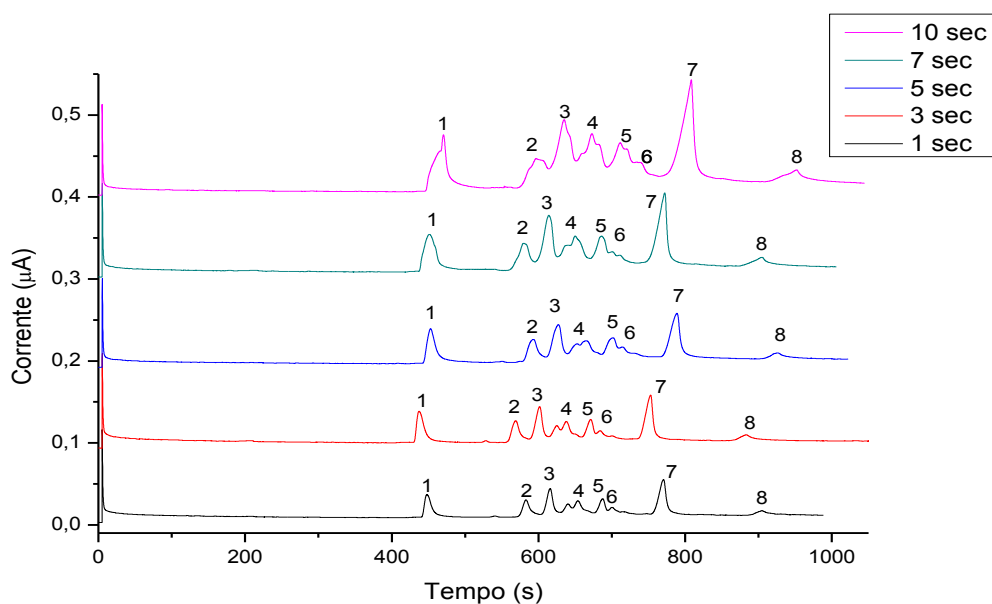


Grafico 6: Risoluzione fra due coppie di analiti: glutazione ridotto e ossidato e omocisteina e metionina.

La concentrazione del tampone scelta per le prove successive, come compromesso tra risoluzione e sensibilità in termini di aree dei picchi, è quella di 15 mM .

### Ottimizzazione del tempo di iniezione

La durata dell'iniezione elettrocinetica è un parametro critico per l'efficienza di una separazione: è quindi importante determinare il giusto volume di campione iniettato per evitare fenomeni di overload e la distorsione e l'allargamento dei picchi.



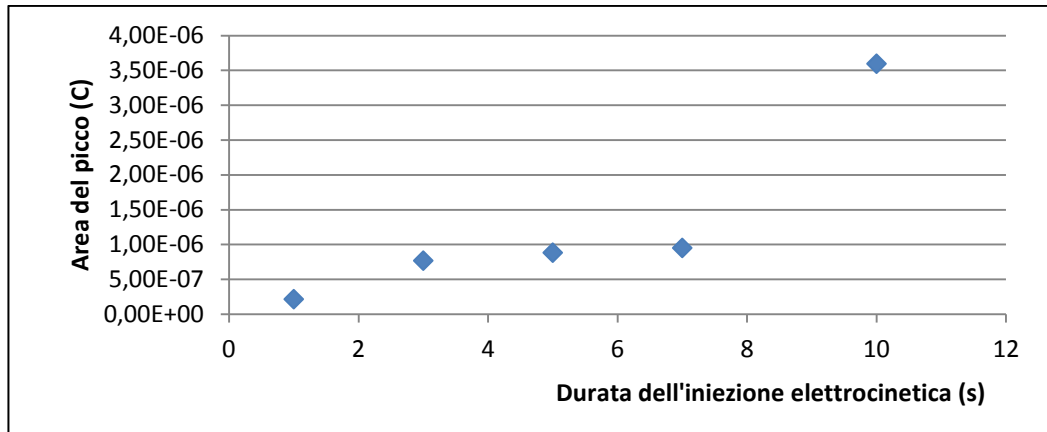
**Figura 29: Prove svolte variando la durata dell'iniezione elettrocinetica; condizioni sperimentali: tampone fosfato 15 mM a pH 2; potenziale di rivelamento 1,5 V; voltaggio di separazione 10 kV.**

Le analisi svolte confermano il fatto che all'aumentare della durata dell'iniezione le aree dei picchi aumentino, ma con il conseguente peggioramento della separazione. Per la scarsa qualità dei picchi ottenuti, si sono eseguiti i calcoli sulla deviazione standard dei picchi e sulla sensibilità solo riferendosi all'omocistina, in quanto è l'analita che presenta il picco più definito.

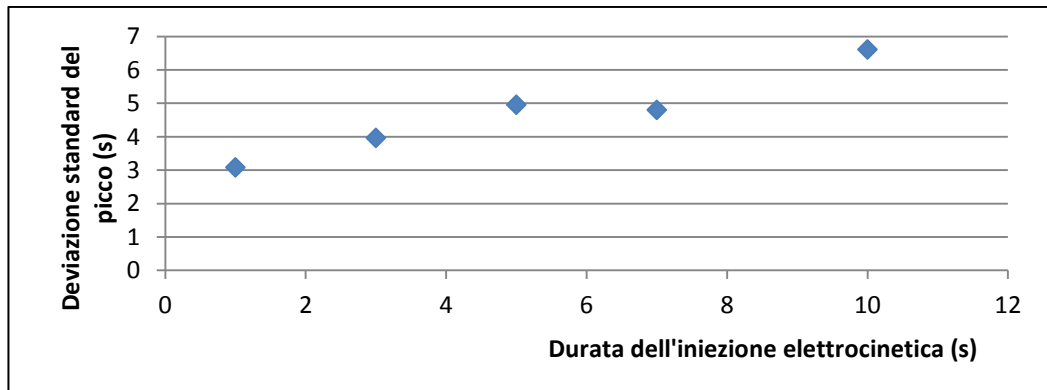
Nella tabella 22 è stato calcolata la quantità iniettata di omocistina nelle prove considerate mediante l'equazione riportata in appendice<sup>(24)</sup>.

Durata iniezione (s)	1	3	5	7	10
Micromoli iniettate	0,46	1,4	2,3	3,1	4,4

**Tabella 22: Quantità di omocistina iniettate per le iniezioni elettrocinetiche.**



**Grafico 7: Area del picco dell'omocistina in funzione della durata della iniezione elettrocinetica.**



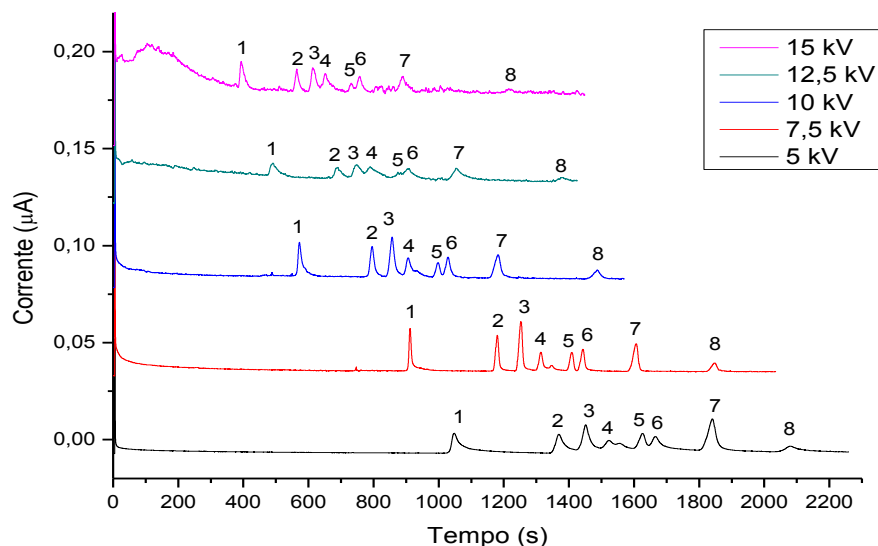
**Grafico 8: Deviazione standard del picco dell'omocistina in funzione della durata della iniezione elettrocinetica.**

La prova che è stata considerata migliore, come compromesso tra sensibilità ed efficienza, è quella condotta iniettando il campione per 3 secondi.

### Ottimizzazione del voltaggio applicato al capillare

Il voltaggio di separazione è una condizione che ha un grande impatto sull'efficienza di separazione, in quanto la velocità di migrazione degli analiti è direttamente correlata alla forza del campo elettrico applicata al capillare. Alti voltaggi aumentano l'efficienza della separazione in quanto gli analiti rimangono nel capillare per un tempo minore e la diffusione risulta di conseguenza limitata. È importante però che il potenziale applicato al capillare non sia troppo alto in quanto potrebbe sia interferire con il rivelamento che

generare calore per l'effetto Joule riducendo l'efficienza della separazione a causa della dispersione termica<sup>(25)</sup>.



**Figura 30: Prove svolte variando il voltaggio di separazione; altre condizioni sperimentali mantenute costanti: tampone fosfato 15 mM a pH 2; potenziale di rivelamento 1,5 V; iniezione elettrocinetica di 3 secondi.**

Le prove svolte evidenziano come la mobilità elettrosmotica sia proporzionale al campo elettrico applicato, e quindi all'aumentare del voltaggio a cui è sottoposto il capillare i tempi di migrazione diminuiscono notevolmente, a scapito però della qualità in termine di rumore e della definizione dei picchi. Nelle tabelle seguenti sono riportati i tempi di migrazione e le mobilità apparenti calcolate per gli analiti al variare del voltaggio di separazione. Si sono anche valutate le aree dei picchi degli analiti nelle varie prove: all'aumentare del voltaggio corrisponde un aumento del segnale degli analiti. Nella tabella 23 sono invece riportati il numero dei piatti teorici riferiti all'omocistina riferiti ai differenti voltaggi.

	5 kV	7,5 kV	10 kV	12,5 kV	15 kV
<b>N</b>	619*10 <sup>2</sup>	929*10 <sup>2</sup>	386*10 <sup>2</sup>	169*10 <sup>2</sup>	126*10 <sup>2</sup>

**Tabella 23: Efficienza in termini di piatti teorici calcolati per l'omocistina.**

	5 kV	7,5 kV	10 kV	12,5 kV	15 kV
AcCys	1048	913	572	490	393
Glu Re	1369	1175	796	690	564
Glu Ox	1452	1260	857	748	613
Cys	1524	1310	906	789	651
HCS	1626	1413	999	875	731
Met	1666	1447	1029	909	757
HCY	1841	1613	1182	1053	890
CysGly	2080	1848	1488	1382	1215

Tabella 24: Tempi di migrazione (s) degli analiti ai diversi voltaggi di separazione.

	5 kV	7,5 kV	10 kV	12,5 kV	15 kV
AcCys	0,01934	0,0222	0,0354	0,0413	0,0515
Glu Re	0,01481	0,01725	0,0254	0,0293	0,0359
Glu Ox	0,01396	0,01609	0,0236	0,0271	0,03303
Cys	0,01330	0,01547	0,0224	0,0257	0,0311
HCS	0,01247	0,01434	0,0203	0,0231	0,0277
Met	0,01217	0,01401	0,01970	0,0223	0,0268
HCY	0,01101	0,01257	0,01715	0,01925	0,0228
CysGly	0,009745	0,01097	0,01362	0,01467	0,01668

Tabella 25: Mobilità apparenti ( $\text{mm}^2/\text{V s}$ ) degli analiti ai diversi voltaggi di separazione.

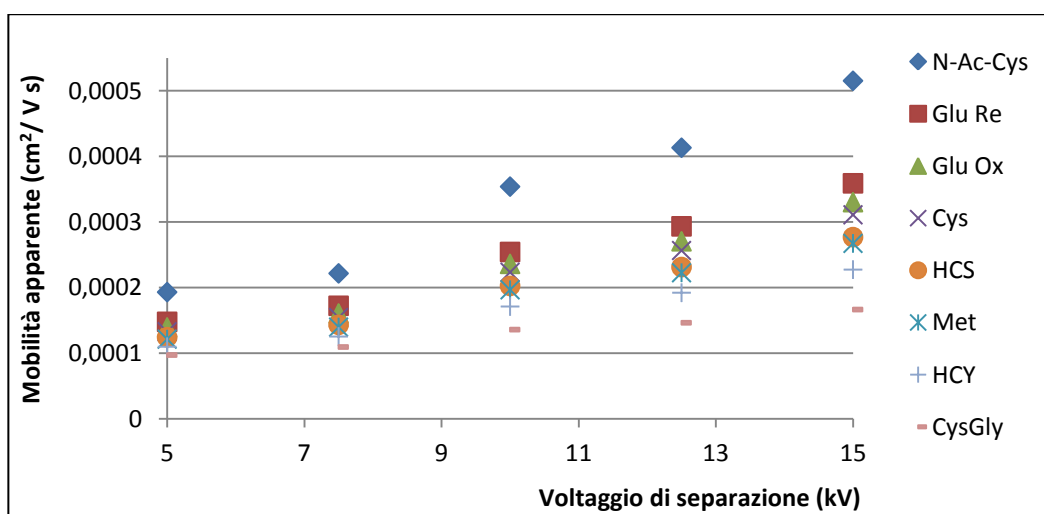


Grafico 9: Andamento delle mobilità apparenti degli analiti in funzione dei voltaggi di separazione analizzati.

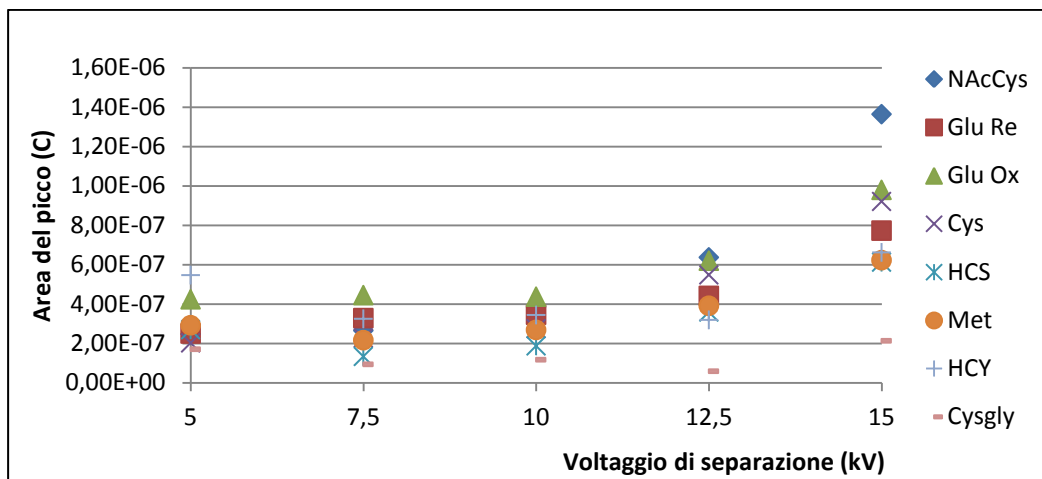


Grafico 10: Andamento delle aree dei picchi degli analiti in funzione del voltaggio di separazione.

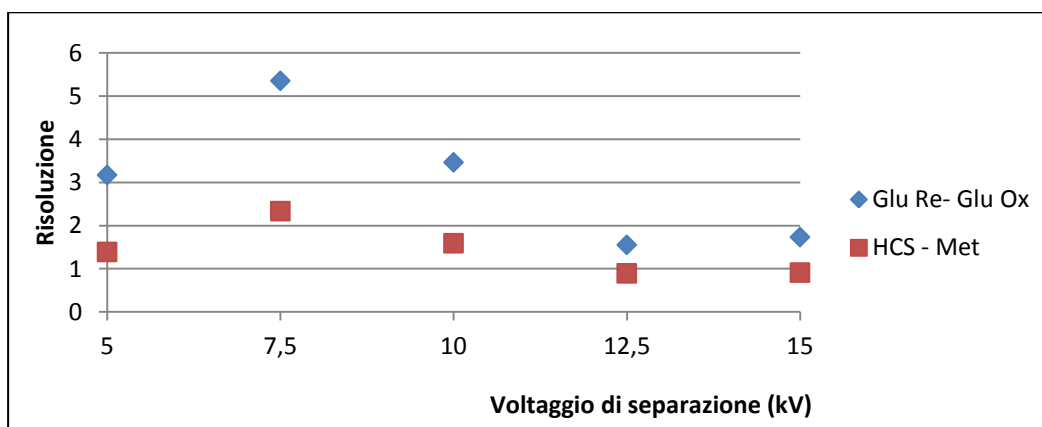


Grafico 11: Risoluzione tra le due forme del glutatione e fra omocisteina e metionina.

Il voltaggio di separazione che è stato scelto per le prove successive è quello di 10 kV, in quanto permette buone sensibilità e risoluzione e rende i tempi di analisi non troppo lunghi.

### 3.3 Rette di taratura

Le rette di tarature sono state costruite mediante l'analisi di soluzioni standard a 10 diverse concentrazioni di analiti (da 10 a 500  $\mu$ M) determinandone l'area dei picchi: si è preferito considerare le aree dei picchi e non le loro altezze per la loro asimmetria e irregolarità. Le condizioni sperimentali scelte per queste analisi sono state quelle che sono risultate migliori dalle prove finora effettuate: rivestimento del capillare con

PDDA0,2%- SiNPs 6%- PDDA 0,2%, tampone fosfato 15 mM portato a pH 2 con TRIS, potenziale di rivelamento 1,5 V, iniezione elettrocinetica di 3 secondi, voltaggio di separazione applicato al capillare pari a 10 kV. Le rette di taratura sono state costruite per ogni analita fino alla concentrazione per cui mostrano ancora linearità e sono riportate nell'allegato 2.

Nella tabella seguente sono riportati i calcoli riguardanti le rette di taratura, in particolare l'equazione della retta con le relative incertezze sulla pendenza e sull'intercetta; si può notare che le rette che meglio approssimano i punti sperimentali sono quelli che si riferiscono ai picchi più separati e di cui il segnale è più elevato.

Il limite di rilevabilità ottenuto con la separazione elettroforetica è stato calcolato a partire dalle rette di taratura e il risultato per ogni analita è riportato nella tabella 27.

	Equazione retta	R <sup>2</sup>	Errore sulla regressione
<b>AcCys</b>	$y=2,7 \cdot 10^{-9} (\pm 1 \cdot 10^{-10})x + 4 \cdot 10^{-8} (\pm 2 \cdot 10^{-8})$	0,988	$4,47 \cdot 10^{-8}$
<b>Glu Re</b>	$y=3,8 \cdot 10^{-9} (\pm 4 \cdot 10^{-10})x - 6 \cdot 10^{-8} (\pm 6 \cdot 10^{-8})$	0,927	$1,16 \cdot 10^{-7}$
<b>Glu Ox</b>	$y=3,9 \cdot 10^{-9} (\pm 1 \cdot 10^{-10})x - 1 \cdot 10^{-8} (\pm 3 \cdot 10^{-8})$	0,993	$6,06 \cdot 10^{-8}$
<b>CYS</b>	$y=3,2 \cdot 10^{-9} (\pm 3 \cdot 10^{-10})x - 4 \cdot 10^{-8} (\pm 5 \cdot 10^{-8})$	0,956	$1,00 \cdot 10^{-7}$
<b>HCS</b>	$y=2,3 \cdot 10^{-9} (\pm 1 \cdot 10^{-10})x - 1 \cdot 10^{-8} (\pm 3 \cdot 10^{-8})$	0,977	$6,42 \cdot 10^{-8}$
<b>Met</b>	$y=2,9 \cdot 10^{-9} (\pm 2 \cdot 10^{-10})x + 4 \cdot 10^{-8} (\pm 4 \cdot 10^{-8})$	0,956	$9,17 \cdot 10^{-8}$
<b>HCY</b>	$y=3,8 \cdot 10^{-9} (\pm 2 \cdot 10^{-10})x + 4 \cdot 10^{-8} (\pm 4 \cdot 10^{-8})$	0,985	$8,58 \cdot 10^{-8}$
<b>Cysgly</b>	$y=1,6 \cdot 10^{-9} (\pm 2 \cdot 10^{-10})x + 1 \cdot 10^{-8} (\pm 3 \cdot 10^{-8})$	0,940	$5,97 \cdot 10^{-8}$

Tabella 26: Parametri statistici delle rette di taratura degli analiti.

	LOD (μM)
<b>Acetilcisteina</b>	58,4
<b>Glutazione Ridotto</b>	115
<b>Glutazione Ossidato</b>	79,1
<b>Cisteina</b>	111
<b>Omocisteina (HCS)</b>	144
<b>Metionina</b>	112
<b>Omocistina (HCY)</b>	115
<b>Cisteinglicina</b>	270

Tabella 27: LOD calcolati dalle rette di taratura.

Per valutare la linearità della risposta dell'elettrodo BDD per gli analiti, sono state costruite delle rette di taratura basandosi sui voltammogrammi ciclici degli analiti effettuati in precedenza in tampone fosfato 15 mM a pH 2 (i grafici sono riportati nell'allegato 1). Al fine di determinare i limiti di rilevabilità si sono eseguite cronoamperometrie a 1,5 V effettuando aggiunte successive di analita in una soluzione mantenuta sotto agitazione (figure riportate nell'allegato 3). Il potenziale a cui si considera il segnale è 1,5 V per tutti gli analiti e si nota come la linearità sia molto elevata: solo l'acetilcisteina, il glutatione ridotto e la cisteinglicina non presentano linearità fino alla concentrazione di 500  $\mu\text{M}$ . Per ogni analita sono state riportate le pendenze delle rette di taratura ottenute dalle prove voltammetriche per valutare la sensibilità della rilevazione.

	<b>Pendenza</b>	<b>Concentrazione massima di linearità (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Acetilcisteina</b>	$1,70 \cdot 10^{-8}$	200
<b>Glutazione ridotto</b>	$4,50 \cdot 10^{-8}$	200
<b>Glutazione ossidato</b>	$5,43 \cdot 10^{-8}$	500
<b>Cisteina</b>	$3,56 \cdot 10^{-8}$	500
<b>Omocistina (HCY)</b>	$9,46 \cdot 10^{-9}$	500
<b>Omocisteina (HCS)</b>	$6,85 \cdot 10^{-8}$	500
<b>Metionina</b>	$4,84 \cdot 10^{-8}$	500
<b>Cisteinglicina</b>	$1,61 \cdot 10^{-8}$	400

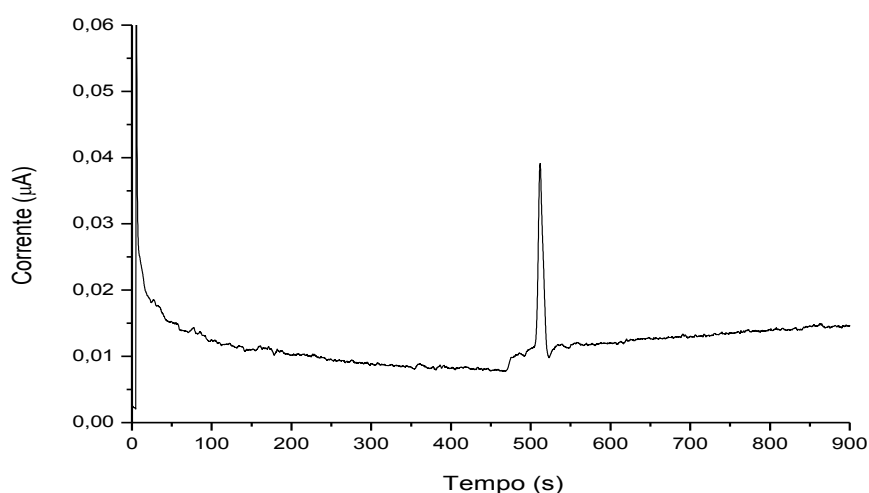
**Tabella 28: Pendenze e range di linearità delle risposte degli analiti all'elettrodo BDD.**

	<b>LOD (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Acetilcisteina</b>	1,90
<b>Glutazione Ridotto</b>	0,784
<b>Glutazione Ossidato</b>	0,210
<b>Cisteina</b>	1,23
<b>Omocisteina (HCS)</b>	0,541
<b>Metionina</b>	0,743
<b>Omocistina (HCY)</b>	3,13
<b>Cisteinglicina</b>	3,53

**Tabella 29: LOD degli analiti calcolati dalle prove cronoamperometriche.**



Nelle stesse condizioni in cui si sono condotte le analisi per le rette di taratura si è iniettata una soluzione di etanolo 100 mM per quantificare il flusso elettrosmotico: dal tempo di migrazione è stata calcolata la mobilità elettrosmotica e di conseguenza quella elettroforetica degli analiti.



**Figura 31: Migrazione di un marcatore neutro (etanolo) per valutare il flusso elettrosmotico.**

	Tempo (s)	Mobilità elettrosmotica (mm <sup>2</sup> /V s)	Velocità netta (mm/s)
<b>EtOH</b>	506	0,0400	0,888

**Tabella 30: Valutazione del flusso elettrosmotico.**

Solamente l'acetilcisteina migra più velocemente dell'etanolo, confermando il fatto che questa molecola a pH 2 è carica negativamente e arriva al rivelatore in un tempo minore delle altre cariche positivamente.

Nella tabella 31 sono riportate le cariche stimate dal programma Marvin Sketch degli analiti a pH 2 correlate alla loro mobilità elettroforetica: tranne l'acetilcisteina che migra nella stessa direzione del flusso elettrosmotico verso l'anodo, tutte le altre molecole, in accordo con le loro cariche positive, hanno invece una mobilità elettroforetica negativa, e quindi il flusso elettrosmotico si oppone alla loro spontanea migrazione verso il catodo. L'ordine delle molecole corrisponde bene a questa approssimazione delle cariche, a parte per il glutatione ossidato, che è anche la molecola più grande e che quindi ci si aspetterebbe arrivare per ultima. Una spiegazione di questa sua veloce migrazione si potrebbe attribuire al fatto che, a differenza degli altri analiti, la carica del

glutazione ossidato è dato dalla combinazione di due gruppi amminici positivi adiacenti a due carbossilici negativi a pH 2, e che quindi questa vicinanza tra siti carichi possa esercitare una sorta di schermo o di localizzazione che diminuisca l'effetto dell'alta carica totale. È da sottolineare però che la stima delle cariche delle molecole è solo un approccio approssimativo per spiegare il loro ordine di mobilità, in quanto sarebbero da considerare anche le possibili interazioni (forze deboli o legami a idrogeno) degli analiti con i gruppi silanologici del capillare non perfettamente rivestito oppure tra gli analiti stessi.

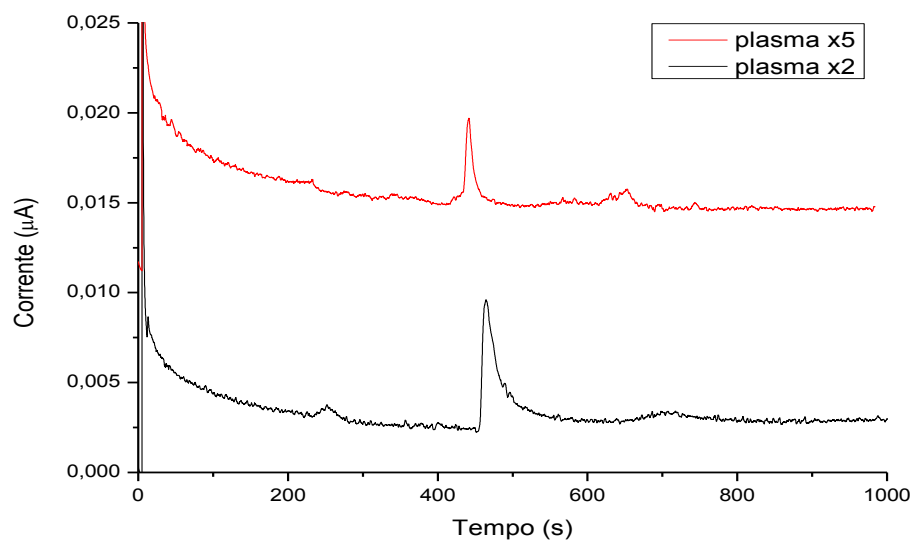
	Carica a pH 2	Mobilità elettroforetica (mm <sup>2</sup> /V s)
Acetilcisteina	-0,01	0,00488
Glutazione Ridotto	0,45	-0,00480
Glutazione Ossidato	1,66	-0,00649
Cisteina	0,69	-0,00746
Omocisteina (HCS)	0,74	-0,00975
Metionina	0,77	-0,0101
Omocistina (HCY)	1,10	-0,0128
Cisteinglicina	0,99	-0,0166

Tabella 31: Mobilità elettroforetiche degli analiti associate alle loro cariche.

### ***3.4 Prove su un campione reale di plasma***

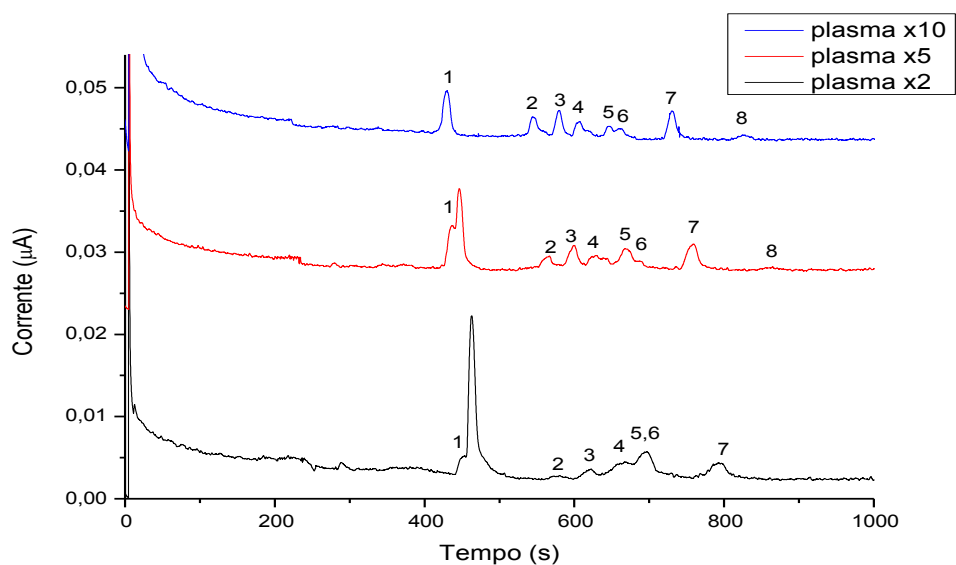
Per avere un riscontro dell'applicabilità del lavoro svolto e quindi di verificare la determinazione degli amminotioili nella matrice reale si sono eseguite delle prove su un campione reale di plasma di un individuo maschio sano di gruppo sanguigno AB.

Le condizioni sperimentali in cui sono state condotte le prove sono le stesse nelle quali si sono effettuate quelle per le rette di taratura: tampone fosfato 15 mM a pH 2, voltaggio di separazione di 10 kV, potenziale di rivelamento 1,5 V, iniezione elettrocinetica di 3 secondi. Inizialmente si è realizzata l'analisi del bianco sul plasma, per vedere se fossero già presenti degli amminotioili: si riscontra un picco bene definito a circa 470 secondi quando il plasma è diluito 5 e 2 volte, come si nota dalla seguente figura.



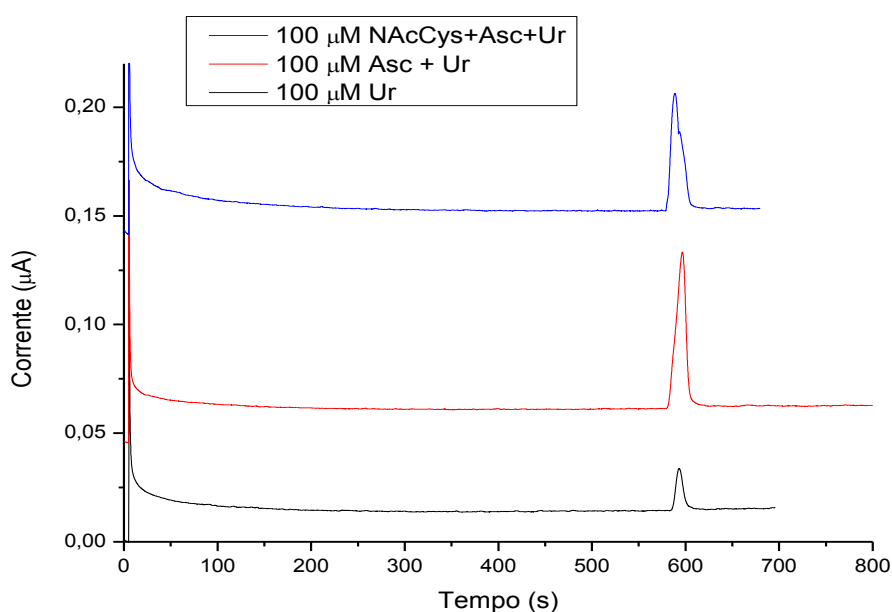
**Figura 32: Prove del bianco sul plasma diluito.**

Successivamente per appurare la possibile determinazione degli amminotoli nel plasma abbiamo aggiunto al campione reale gli analiti a concentrazione pari a 20 µM: i risultati sono riportati nella figura seguente e si nota come i picchi degli amminotoli siano maggiormente definiti nel plasma più lo si diluisce in quanto diminuiscono gli interferenti e la linea di base migliora. Da queste prove si nota inoltre che la migrazione degli analiti risulta molto anticipata nella matrice reale.



**Figura 33: Prove iniettando nei campioni reali diluiti di plasma gli analiti alla concentrazione di 20 µM.**

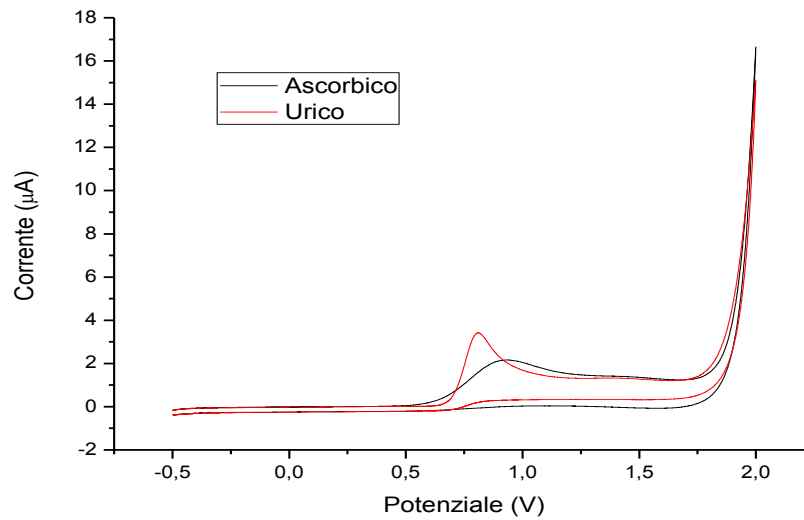
L'acetilcisteina risulta non separata dal picco già riscontrato nel plasma puro, la cui identità è stata attribuita alla migrazione simultanea in queste condizioni dell'acido urico e dell'acido ascorbico, entrambi presenti in grande quantità nel sangue. Per confermare questa ipotesi sono state svolte delle prove iniettando singolarmente gli acidi e poi in una soluzione con l'acetilcisteina: in queste condizioni sperimentali i due acidi arrivano al rivelatore completamente sovrapposti costituendo un unico picco, mentre l'acetilcisteina presenta un velocità di migrazione estremamente simile risultando in un picco non risolto.



**Figura 34: Prove di identificazione del picco presente nel plasma.**

Per confermare il fatto che l'acido ascorbico e quello urico possano essere rivelati dall'elettrodo BDD si eseguono delle voltammetrie cicliche nelle condizioni sperimentali delle separazioni, e i risultati riportati nella figura 35 mostrano delle buone risposte per entrambe le molecole al potenziale di 1,5 V. La migrazione simultanea dei due acidi è confermata dal fatto che sono entrambi neutri a questo pH (come l'acetilcisteina) e hanno un peso molecolare simile (176,12 u.m.a per l'acido ascorbico, 168,11 u.m.a. per l'acido urico e 163,19 u.m.a. per l'acetilcisteina).

Infine si sono determinate le aree dei picchi degli analiti iniettati alla concentrazione di 20 µM nel plasma diluito 10 volte (3 prove eseguite) e si sono calcolate tramite le rette di taratura le concentrazioni a cui corrisponderebbero.



**Figura 35: Risultati delle voltammetrie cicliche per l'acido ascorbico e urico, entrambi 100 µM in tampone fosfato a pH 2.**

I calcoli delle concentrazioni sono riportati nella tabella seguente; si è eseguito il calcolo del test t di Student<sup>(26)</sup> per confrontare i dati ottenuti con il valore noto di concentrazione iniettata e per tutti gli analiti si ha ottenuto che la differenza non è significativa.

	<b>Area picco (C)</b>	<b>Concentrazione calcolata (µM)</b>
<b>AcCys</b>	$7,53 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-9}$	$13 \pm 8$
<b>Glu Re</b>	$3,26 \cdot 10^{-8} \pm 6 \cdot 10^{-10}$	$24 \pm 16$
<b>Glu Ox</b>	$5,966 \cdot 10^{-7} \pm 5 \cdot 10^{-10}$	$18 \pm 8$
<b>Cys</b>	$4,28 \cdot 10^{-8} \pm 8 \cdot 10^{-10}$	$26 \pm 16$
<b>HCS</b>	$2,71 \cdot 10^{-8} \pm 7 \cdot 10^{-10}$	$16 \pm 13$
<b>Met</b>	$7,82 \cdot 10^{-8} \pm 9 \cdot 10^{-10}$	$13 \pm 5$
<b>HCY</b>	$1,114 \cdot 10^{-7} \pm 6 \cdot 10^{-10}$	$19 \pm 5$
<b>Cysgly</b>	$2,18 \cdot 10^{-8} \pm 4 \cdot 10^{-10}$	$7 \pm 7$

**Tabella 32: Concentrazioni calcolate dai picchi presenti nelle prove del plasma diluito 10 volte.**

### ***3.5 Rivelazione degli analiti mediante l'elettrodo di glassy carbon***

Per valutare la risposta degli amminotioili sull'elettrodo di glassy carbon sono state svolte delle prove di voltammetria ciclica e di cronoamperometria nelle condizioni risultate migliori dalle separazioni elettroforetiche, cioè a pH 2 in tampone fosfato 15 mM. Nelle prove voltammetriche il potenziale è stato variato tra 0 e 1,4 V con velocità di scansione pari a 0,6 V/s, usando come elettrodo di riferimento l'elettrodo a calomelano saturo e dalle valutazioni di queste prove si è scelto il potenziale da applicare all'elettrodo di lavoro durante le prove cronoamperometriche.

Le analisi voltammetriche degli analiti alle diverse concentrazioni mostrano delle risposte solo se prima di ogni prova si ripulisce l'elettrodo meccanicamente con carta vetrata e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, in quanto subisce la saturazione e la passivazione dopo ogni analisi. Il fenomeno della passivazione dell'elettrodo da parte degli analiti è ancora più evidente nelle prove cronoamperometriche, in cui dopo la prima aggiunta si ha un forte decremento del segnale e non risponde più alle altre aggiunte.

La formazione di un film di passivazione sull'elettrodo di glassy carbon nelle analisi dei tioili è stata riportata molte volte in letteratura, in quanto i prodotti della loro ossidazione possono essere sia dimeri che altre specie contenenti ossigeno, come gli acidi sulfonico e sulfonico.

Per le analisi voltammetriche è stata costruita la retta di taratura nel range di linearità di ogni analita, e di cui si riportano i valori delle pendenze nella tabella seguente.

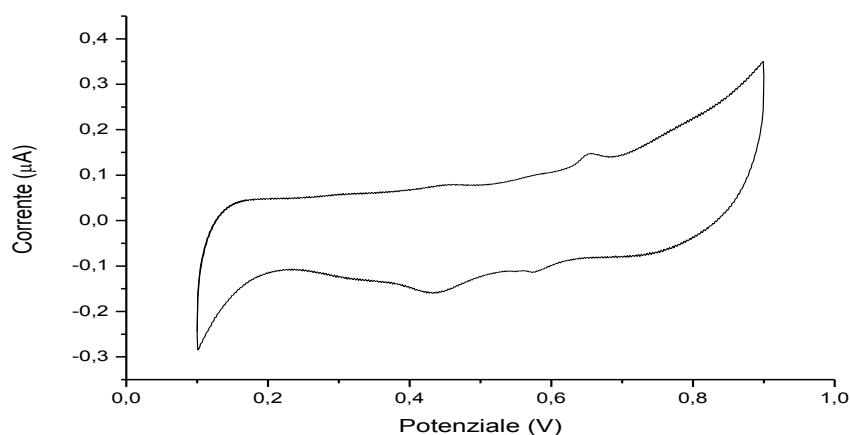
	<b>Potenziale di rilevamento (V)</b>	<b>Pendenza</b>	<b>Concentrazione massima di linearità (μM)</b>
<b>Omocistina (HCY)</b>	1,20	$1,95 \cdot 10^{-8}$	200
<b>Omocisteina (HCS)</b>	1,20	$3,86 \cdot 10^{-8}$	200
<b>Metionina</b>	1,20	$1,80 \cdot 10^{-8}$	100
<b>Glutathione ridotto</b>	1,15	$1,56 \cdot 10^{-8}$	100
<b>Cisteina</b>	0,90	$1,76 \cdot 10^{-8}$	150

**Tabella 33: Pendenze e range di linearità ottenuti dalle rette di taratura per le analisi voltammetriche.**

### 3.6 Rivelazione degli analiti con un elettrodo modificato

Al fine di ottenere un elettrodo che risponda agli analiti senza subire passivazione si è costruito un elettrodo aggiungendo il complesso di Cobalto(II)-ftalocianina in piccole percentuali in peso alla grafite in polvere. Questo tipo di elettrodo modificato dovrebbe permettere la rivelazione dei tioli a un potenziale più basso e in modo più sensibile rispetto agli elettrodi convenzionali (GC, Pt, Au, Ag)<sup>(27)</sup>.

Per valutare il miglior rapporto quantitativo tra Cobalto-ftalocianina e grafite si sono costruiti degli elettrodi con diverse concentrazioni in peso di modificatore: 1%, 5% e 7% e tutte le prove sono state svolte a pH 2 in tampone fosfato 15 mM. In tale soluzione sono stati caratterizzati gli elettrodi costruiti tramite delle voltammetrie cicliche con velocità di scansione pari a 40 mV/s: si riporta l'analisi dell'elettrodo con la percentuale di modificante del 7% in quanto è l'unico che mostra due picchi apprezzabili, dovuti all'ossidazione del Cobalto (da  $\text{Co}^{\text{II}}$  a  $\text{Co}^{\text{III}}$ ) a 0,45 V vs S.C.E. e a quella del legante<sup>(28; 29)</sup> a 0,65 V vs S.C.E.



**Figura 36: Voltammeteria ciclica del bianco in tampone fosfato a pH 2 dell'elettrodo di grafite con Cobalto-ftalocianina al 7%.**

La metionina e l'omocistina non rispondono agli elettrodi costruiti, molto probabilmente perché non hanno il gruppo tiolico libero che possa dimerizzare, mentre gli altri 3 analiti esaminati mostrano una risposta evidente, con l'incremento del picco di ossidazione a 0,45 V vs S.C.E, in accordo con il meccanismo elettrocatalitico riportato nella parte introduttiva. Nelle figure dell'allegato 4 sono riportate come esempio le prove

voltammetriche degli analiti a diverse concentrazioni e di cronoamperometria all'elettrodo modificato con Cobalto-ftalocianina al 5% in peso.

L'omocisteina e il glutatione ridotto mostrano delle alte risposte con due picchi, e si ipotizza che questo comportamento possa derivare dal rinnovo del catalizzatore. Infatti è noto che all'aumentare del potenziale la reazione diventa sempre più veloce e quindi anche la corrente, ma solo se la rigenerazione del catalizzatore è rapida. È perciò possibile che per alti valori di corrente, quando molti siti attivi sono coinvolti, il rinnovo dell'elettrocatalizzatore sia lo stadio che limiti la velocità della reazione, se il potenziale non è sufficientemente alto da riossidarlo rapidamente<sup>(30)</sup>.

Per ogni analita si sono confrontate le risposte ottenute con i diversi elettrodi in termini di sensibilità e di linearità dai voltammogrammi e di limite di rilevabilità dalle prove cronoamperometriche, come riportato nelle seguenti tabelle.

	1%	5%	7%
<b>Glutatione ridotto</b>	$1,19 \cdot 10^{-8}$	$1,29 \cdot 10^{-8}$	$2,01 \cdot 10^{-8}$
<b>Omocisteina (HCS)</b>	$7,71 \cdot 10^{-9}$	$1,14 \cdot 10^{-8}$	$1,32 \cdot 10^{-8}$
<b>Cisteina</b>	$3,01 \cdot 10^{-8}$	$9,71 \cdot 10^{-8}$	$4,81 \cdot 10^{-8}$

**Tabella 34: Confronto fra le pendenze delle rette di taratura delle risposte degli analiti agli elettrodi modificati con diverse concentrazioni in peso di Cobalto-ftalocianina.**

	1%	5%	7%
<b>Glutatione ridotto</b>	200	200	350
<b>Omocisteina (HCS)</b>	200	200	300
<b>Cisteina</b>	200	200	200

**Tabella 35: Confronto fra le concentrazione massima ( $\mu\text{M}$ ) a cui gli analiti presentano linearità agli elettrodi modificati con diverse concentrazioni in peso di Cobalto-ftalocianina.**

	1%	5%	7%
<b>Glutatione ridotto</b>	1,69	4,71	2,70
<b>Omocisteina (HCS)</b>	2,87	7,77	3,63
<b>Cisteina</b>	2,95	1,12	1,62

**Tabella 36: Confronto fra i limiti di rilevabilità ( $\mu\text{M}$ ) degli analiti calcolati per gli elettrodi modificati con diverse concentrazioni in peso di Cobalto-ftalocianina.**

Dalle analisi svolte e dai calcoli qui riportati si nota bene come all'aumentare della concentrazione in peso di Cobalto-ftalocianina si abbia un incremento della sensibilità e dell'intervallo di linearità delle risposte degli analiti. L'elettrodo sviluppato potrebbe quindi prestarsi alla determinazione selettiva di glutatione ridotto, omocisteina e cisteina.



## 4. Conclusioni

Questo progetto è stato finalizzato allo studio di una procedura per determinare simultaneamente otto amminotioili importanti per la valutazione dello stress ossidativo cellulare. La determinazione di questi analiti prevede la separazione mediante la tecnica dell'elettroforesi capillare e il rivelamento di tipo amperometrico con l'elettrodo BDD.

Per definire il miglior metodo sono state svolte molte separazioni in soluzioni acquose standard contenenti gli analiti, studiando diversi tipi di rivestimento del capillare e cambiando le condizioni sperimentali. Ogni analisi è stata valutata in termini di larghezza di banda, sensibilità e risoluzione. L'ordine di migrazione è stato spiegato mediante la stima approssimata (si è usato il programma Marvin Sketch) delle cariche nette al pH considerato in funzione anche della loro localizzazione ed è il seguente: 1: N-acetil-L-cisteina, 2: L-glutazione ridotto, 3: L-glutazione ossidato, 4: L-cisteina, 5: DL-omocisteina, 6: L-metionina, 7: DL-omocistina, 8: L-cisteinglicina.

Nonostante gli analiti non siano risolti alla linea di base, sono comunque ben distinguibili e identificabili e le condizioni in cui si è ottenuta la miglior separazione sono le seguenti:

- rivestimento del capillare con il multistrato PDDA 0,2%- nanoparticelle di silice 6%- PDDA 0,2%;
- tampone fosfato 15 mM a portato a pH 2 con HCl 1 M;
- potenziale di rivelazione di 1,5 V;
- voltaggio applicato al capillare in polarità inversa pari a 10 kV;
- iniezione elettrocinetica di 3 secondi.

Il rivestimento del capillare è un ottimo modo per migliorare una separazione, in quanto la procedura da seguire è molto semplice e poco costosa. In particolare in questo progetto il multistrato PDDA-SiNPs-PDDA è stato utile per poter cambiare il pH di lavoro e sfruttare la maggior differenza di carica degli analiti a pH acido, e presenta l'ulteriore vantaggio della versatilità in quanto è adsorbito alla superficie interna del capillare solo per via elettrostatica. Questo ricoprimento multistrato è risultato molto efficace dalle prove di riproducibilità effettuate, in cui si nota come il flusso elettrosmotico prodotto sia costante per 10 prove e che quindi assicura un buon rivestimento e una densità di carica stabile.

Per ogni analita è stata costruita la retta di taratura nel range di linearità con concentrazione minima pari a 10  $\mu$ M considerando l'area del picco in funzione della

concentrazione. Poiché i picchi risultano sovrapposti e non risolti alla linea di base, per valutare l'area del picco si è usato il programma computazionale PeakFit 4.0, che ne sviluppa la deconvoluzione. Dalle rette di taratura sono stati calcolati i limiti di rilevabilità degli analiti: il LOD più basso è presentato dall'acetilcisteina (58,4  $\mu\text{M}$ ) mentre l'analita con maggior LOD è la cisteinglicina (270  $\mu\text{M}$ ). Questi limiti di rilevabilità sono piuttosto alti rispetto alle concentrazioni che si trovano nei fluidi biologici, in quanto sono affetti da molti fattori non esattamente riproducibili, tra cui il principale è l'allineamento manuale del capillare all'elettrodo di lavoro, che non permette una distanza costante tra i due componenti e che può provocare cambiamenti delle correnti di picco e un allargamento di banda. Un'altra fonte di errore deriva dalla valutazione di picchi così irregolari mediante un programma che li approssima alla forma gaussiana, da cui appunto deriva una stima della sensibilità non perfetta.

Il metodo di separazione è stato provato anche su un campione reale di plasma di un individuo maschio sano per verificarne l'applicabilità: le analisi svolte confermano come in una persona sana queste molecole siano presenti in concentrazioni molto basse (minori del LOD per tutti gli amminotoli) e quindi non siano rivelabili dal metodo elettroforetico studiato. Iniettando gli analiti a concentrazioni più alte nella matrice reale diluita 10 volte si riescono invece a separare e quantificare, e anche se la loro determinazione risulta comunque abbastanza imprecisa, ma la differenza con il valore noto di concentrazione iniettata non è risultata significativa.

Per quanto riguarda il rivelatore, l'elettrodo BDD ha confermato i suoi vantaggi, tra cui soprattutto la bassa e stabile corrente di fondo, l'alta sensibilità, i bassi limiti di rilevabilità per gli analiti e la totale mancanza di passivazione, a differenza di quanto si è verificato analizzando gli amminotoli con un elettrodo di glassy carbon, in cui già dopo pochi secondi si è notata la disattivazione della superficie elettrodica.

L'analisi sul rivelatore è continuata costruendo un elettrodo modificato di carbon paste di grafite in polvere con Cobalto(II)-ftalocianina. L'utilizzo di questo tipo di elettrodo è associato sia al vantaggio di avere una superficie sempre rinnovabile per una semplice abrasione con carta vetrata dell'elettrodo, ma anche allo svantaggio di essere molto delicato in quanto se non è ben costruito ed essiccato, parte del carbon paste si potrebbe staccare con il conseguente cambiamento della superficie attiva e l'invalidazione delle analisi (questo problema si è verificato soprattutto durante le analisi di cronoamperometria, quando la soluzione è agitata). Infatti il limite di questi elettrodi

modificati chimicamente è la bassa riproducibilità associata alla loro costruzione: la diversità fisica di ogni elettrodo è dovuta all'imprecisione nelle proporzioni di modificante e grafite e all'imperfezione nella omogeneità della loro miscela causando un numero di siti attivi variabile con la superficie.

Le analisi svolte dimostrano che questo elettrodo modificato risponde solo agli analiti che hanno un gruppo tiolico libero, e quindi le molecole che non hanno questo gruppo ossidabile non sono rilevabili. Per quanto riguarda gli analiti che rispondono (cisteina, glutatione ridotto e omocisteina) l'elettrodo mostra un'elevata sensibilità e dei limiti di rilevabilità molto bassi, solo leggermente superiori a quelli ottenuti con l'elettrodo BDD. Inoltre tale elettrodo permette la rivelazione amperometrica al potenziale di 0,45 V vs S.C.E., che è molto più basso rispetto a quello a cui decorre l'ossidazione sia al BDD che al glassy carbon.

Le analisi sugli elettrodi modificati sono state svolte costruendo degli elettrodi di carbon paste con tre diverse percentuali in peso di Cobalto-ftalocianina: si è notato un aumento della sensibilità all'aumentare della quantità di modificante, ma i più bassi limiti di rilevabilità si sono ottenuti con l'elettrodo di grafite modificato al 5%.

Lo studio sugli elettrodi modificati è solo preliminare, ma è comunque significativo per poter affermare la notevole capacità del modificante provato nella determinazione dei tioli e potrebbe continuare con delle analisi sulla riproducibilità o nella valutazione del suo uso come elettrodo selettivo per tioli in presenza di composti disolfurici.

In conclusione per l'analisi degli amminotioili considerati il metodo messo a punto per la separazione è valido solo per la determinazione di alti livelli degli analiti nelle matrici reali, mentre per il rivelatore si potrebbe usare l'elettrodo di grafite modificato con la Cobalto-ftalocianina se si fosse interessati a rivelare solo le molecole che hanno il gruppo tiolico libero.

Un modo per migliorare la separazione potrebbe essere quello di provare altri tipi di coating per rendere più stabile il flusso elettrosmotico e l'efficienza del ricoprimento, con la conseguente possibilità di poter usare lo stesso capillare per più analisi.

Infine per evitare i problemi di imprecisione dati dalle operazioni manuali, si potrebbero effettuare delle analisi nelle condizioni sperimentali risultate ottimali in questo progetto usando uno strumento di elettroforesi capillare automatizzato: si renderebbero così più riproducibili sia l'allineamento e il posizionamento del capillare vicino all'elettrodo di lavoro, che la modalità dell'iniezione elettrocinetica degli analiti. Inoltre un vantaggio

considerevole dell'utilizzo di questo tipo di strumento sarebbe quello di poter effettuare il rivestimento del capillare (complessivamente di circa 3 ore) in modo automatizzato senza la presenza dell'operatore, con un conseguente notevole risparmio di tempo.

# Allegato 1

*Analisi voltammetriche degli analiti a diverse concentrazioni con l'elettrodo BDD in tampone fosfato 15 mM a pH 2; velocità di scansione pari a 100 mV/s.*

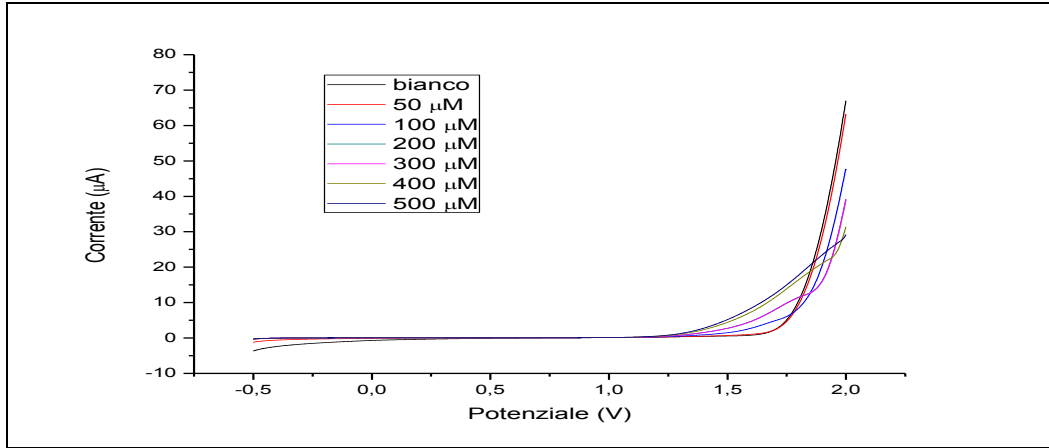


Figura 37: Voltammetrie cicliche relative all'acetilcisteina.

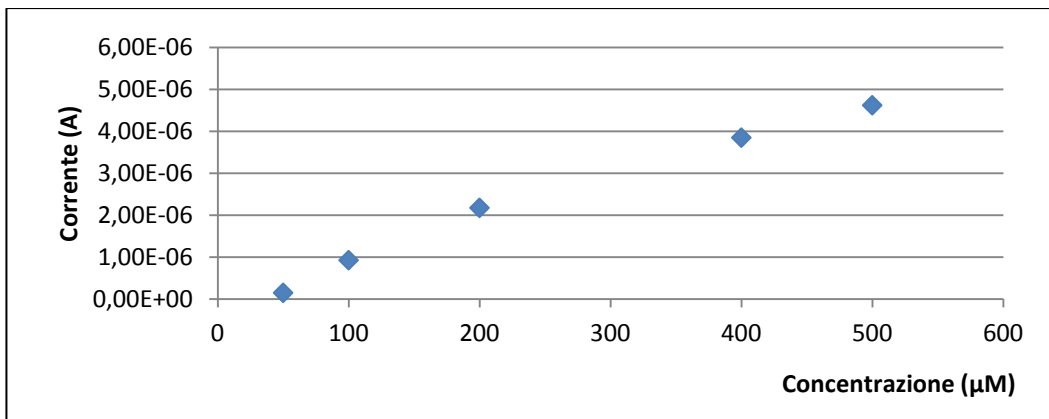


Grafico 12: Segnale dell'acetilcisteina a diverse concentrazioni a 1,5 V.

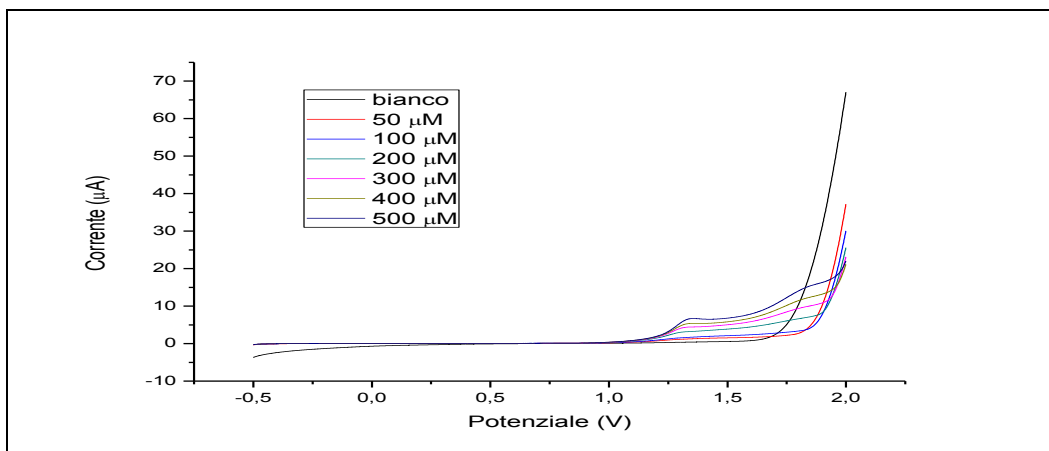


Figura 38: Voltammetrie cicliche relative al glutatione ridotto.

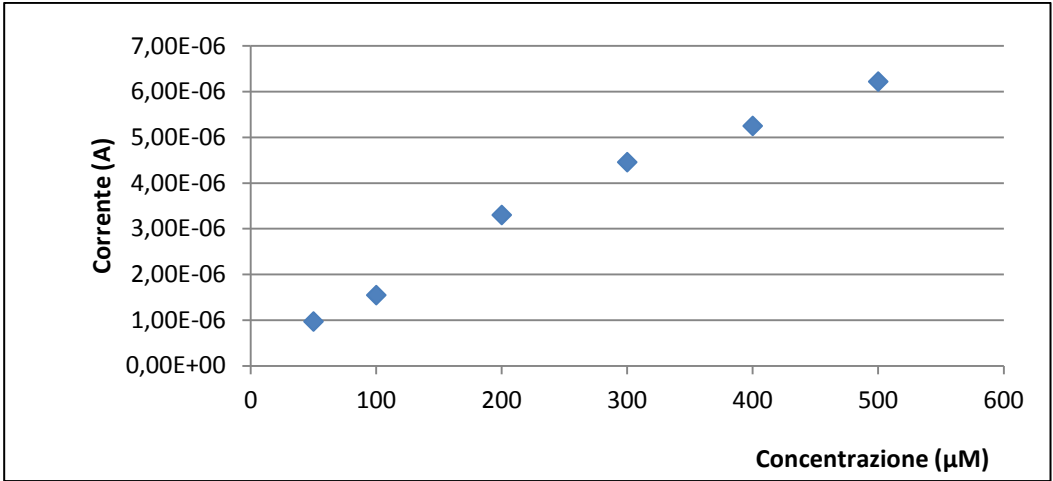


Grafico 13: Segnali del glutatione ridotto a diverse concentrazioni a 1,5 V.

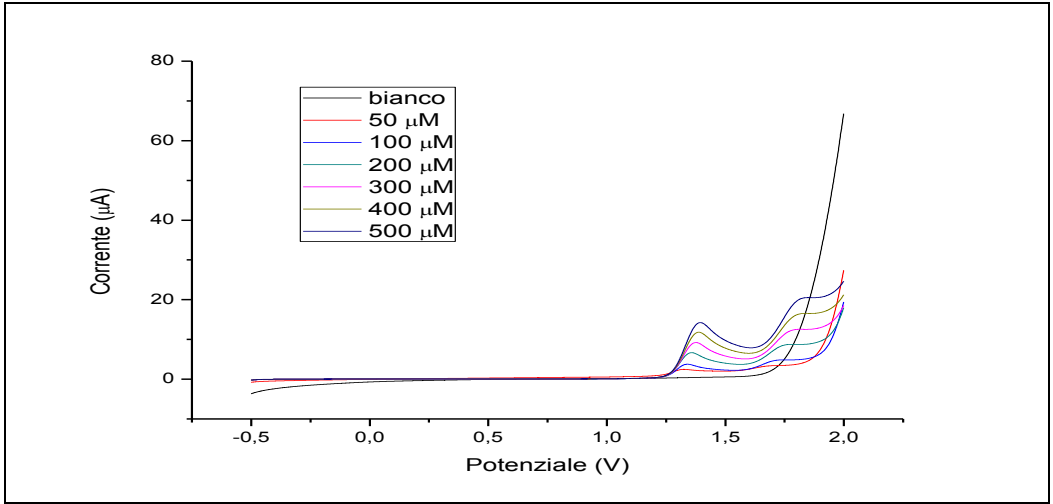


Figura 39: Voltammetrie cicliche relative al glutatione ossidato.

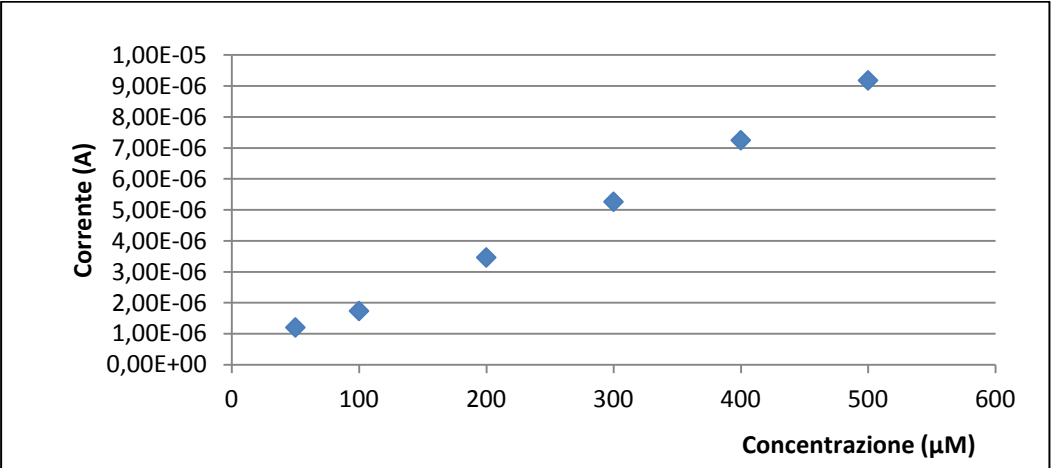


Grafico 14: Segnali del glutatione ossidato a diverse concentrazioni a 1,5 V.

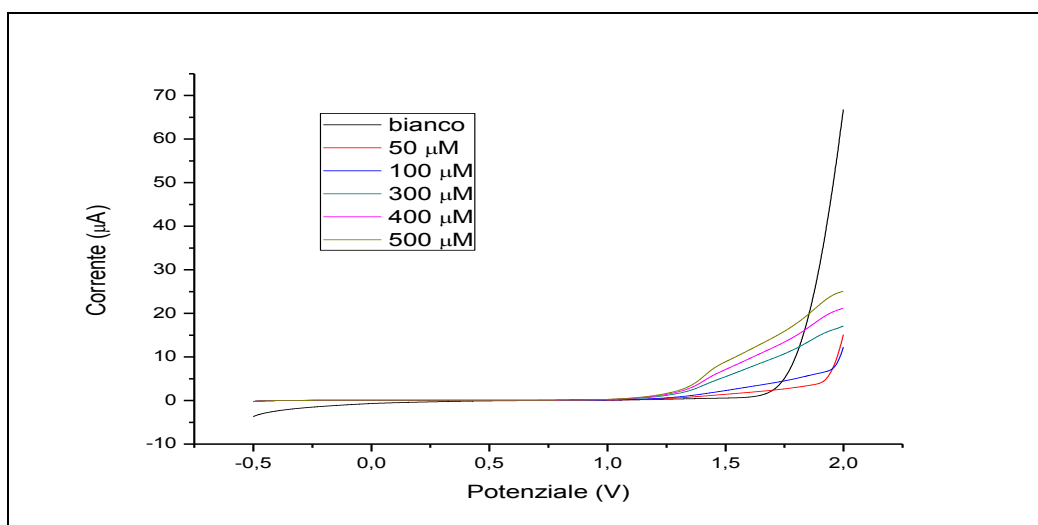


Figura 40: Voltammetrie cicliche relative alla cisteina.

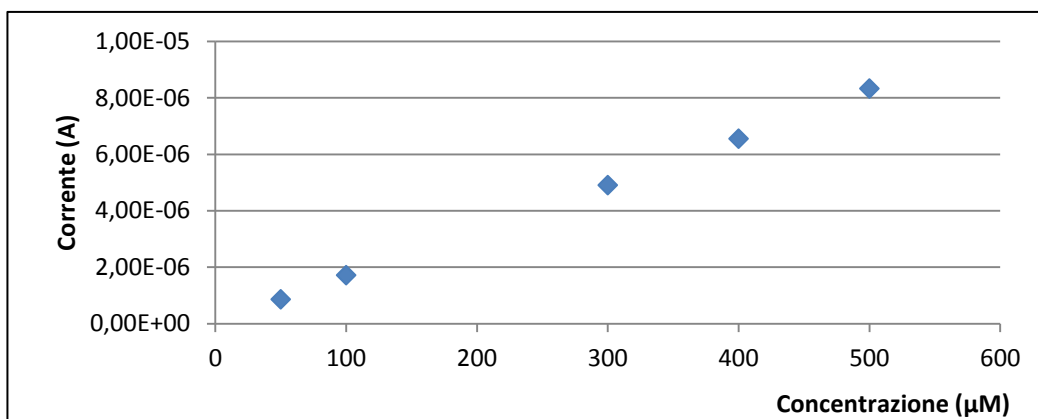


Grafico 15: Segnali della cisteina a diverse concentrazioni a 1,5 V.

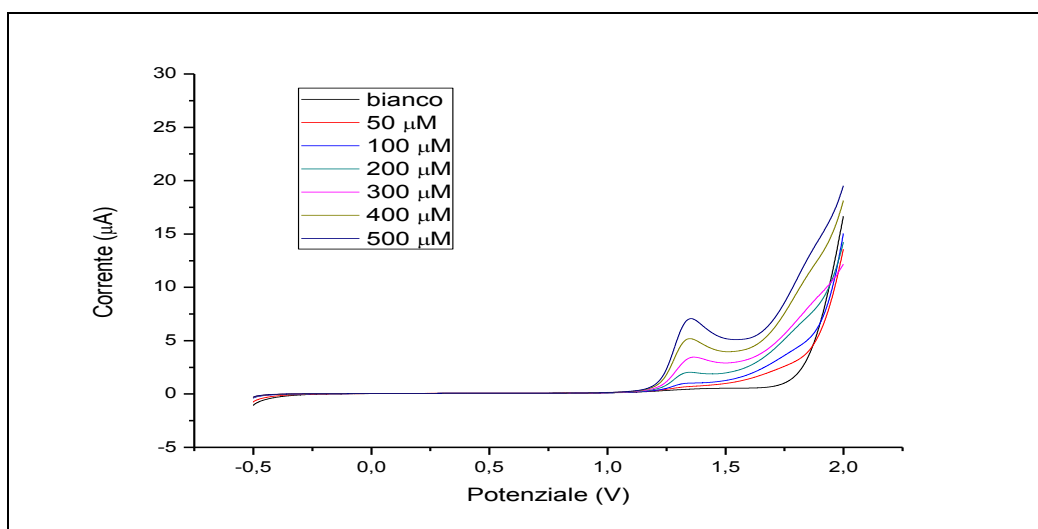


Figura 41: Voltammetrie cicliche relative all'omocistina (HCY).

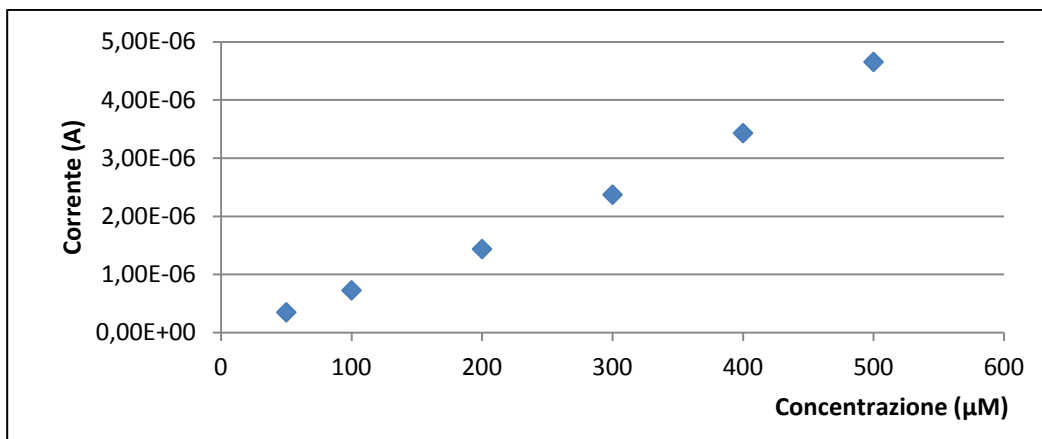


Grafico 16: Segnali dell'omocistina (HCY) a diverse concentrazioni a 1,5 V.

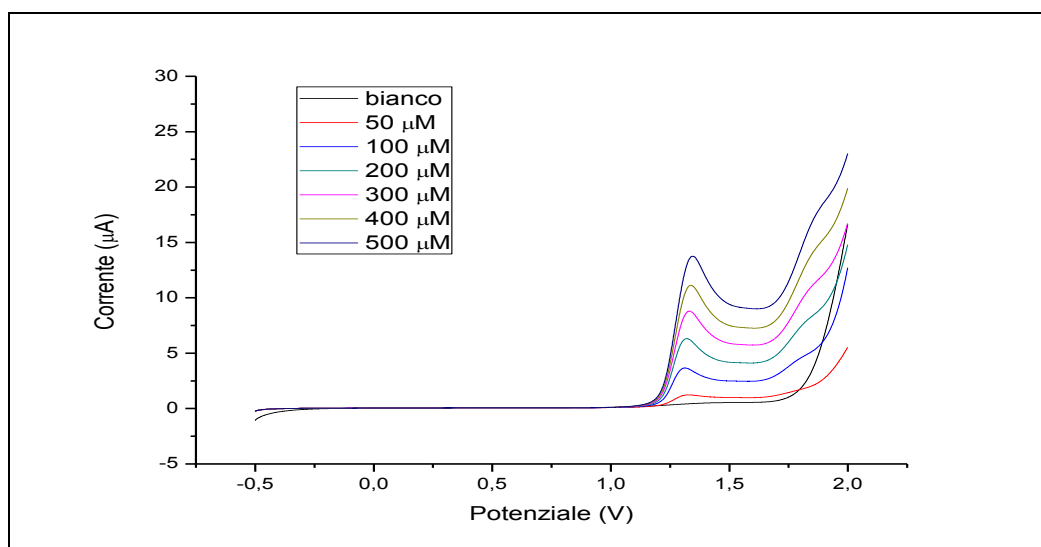


Figura 42: Voltammetrie cicliche relative all'omocisteina (HCS).

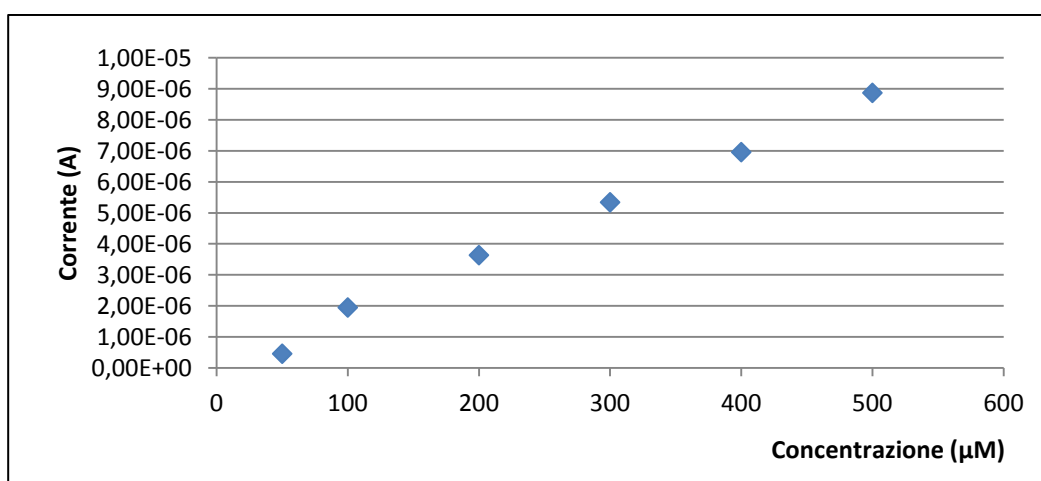


Grafico 17: Segnali dell'omocisteina (HCS) a 1,5 V a diverse concentrazioni.



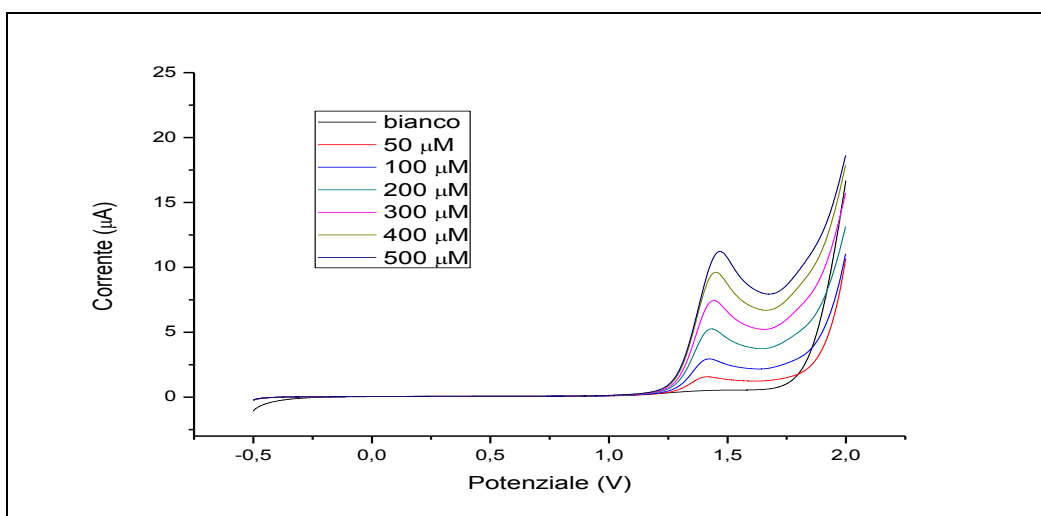


Figura 43: Voltammetrie cicliche relative alla metionina.

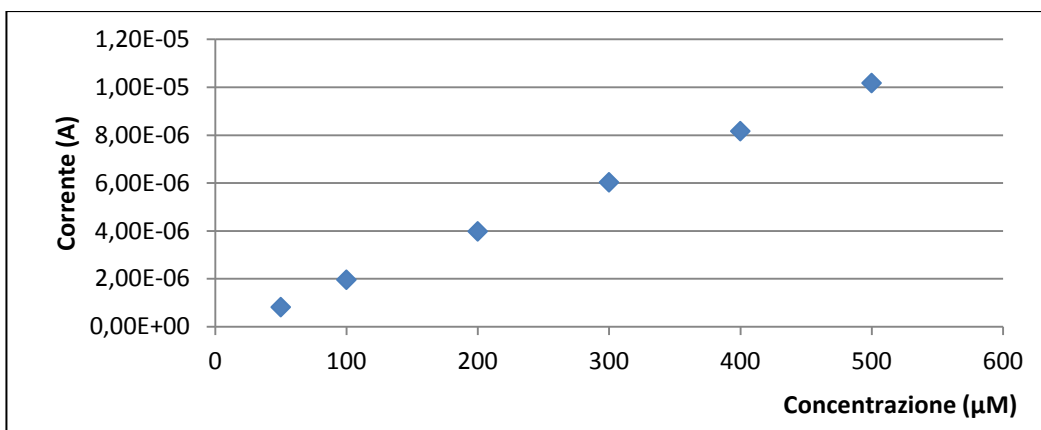


Grafico 18: Segnali della metionina a diverse concentrazioni a 1,5 V.

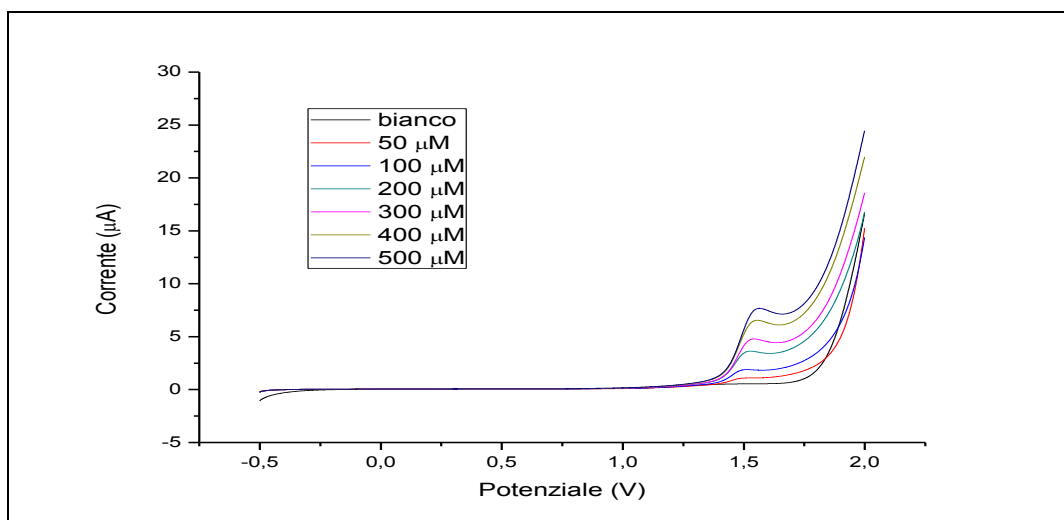


Figura 44: Voltammetrie cicliche relative alla cisteinglicina.

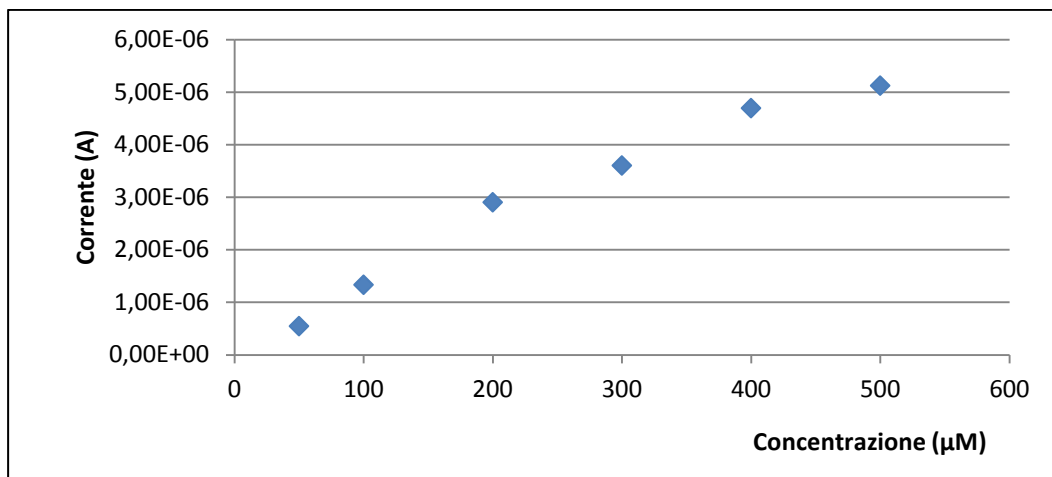


Grafico 19: Segnali della cisteinglicina a diverse concentrazioni a 1,5 V.

## Allegato 2

Rette di taratura relative alle separazioni elettroforetiche.

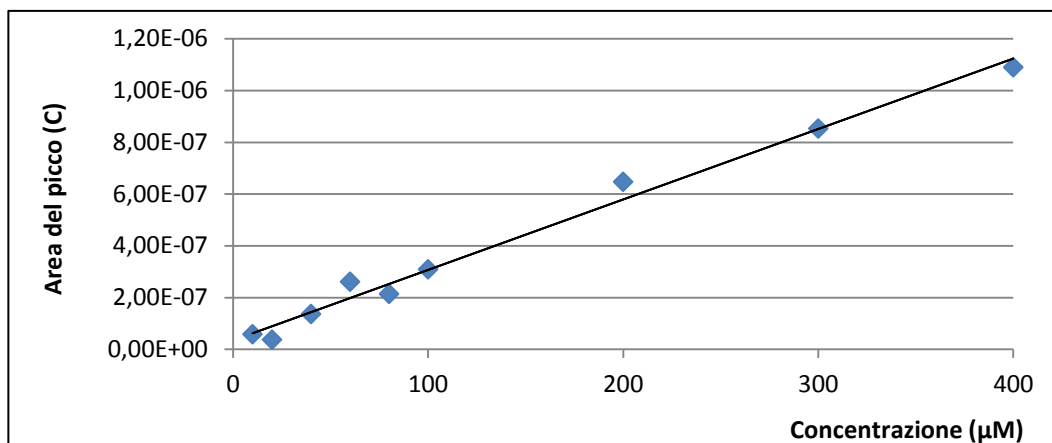


Grafico 20: Retta di taratura dell'acetilcisteina.

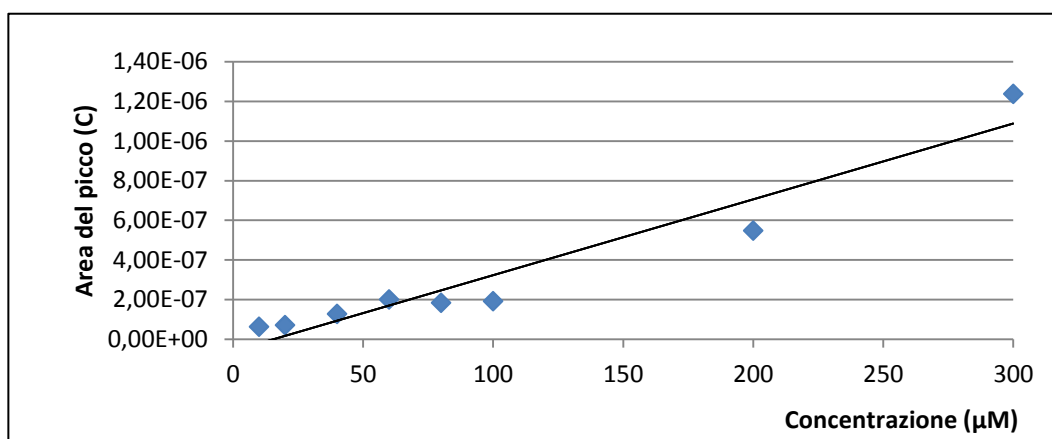


Grafico 21: Retta di taratura del glutathione ridotto.

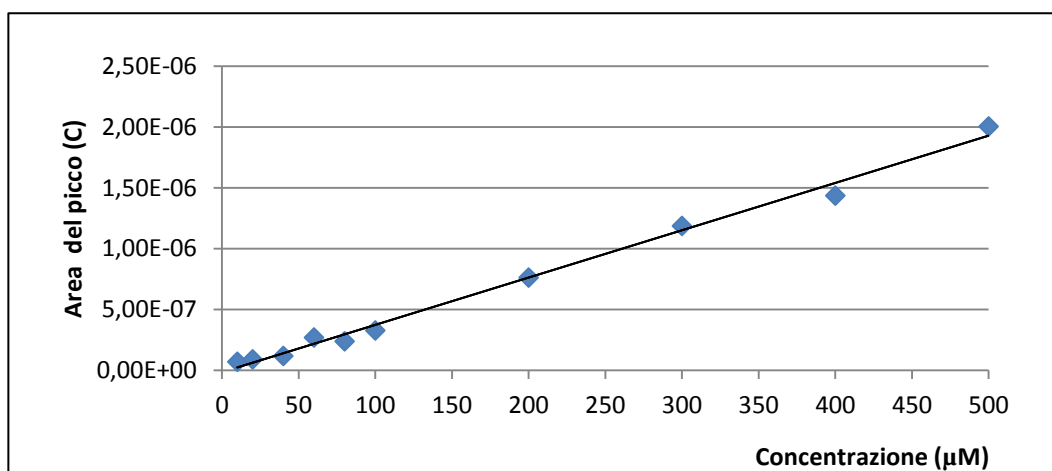


Grafico 22: Retta di taratura del glutathione ossidato.

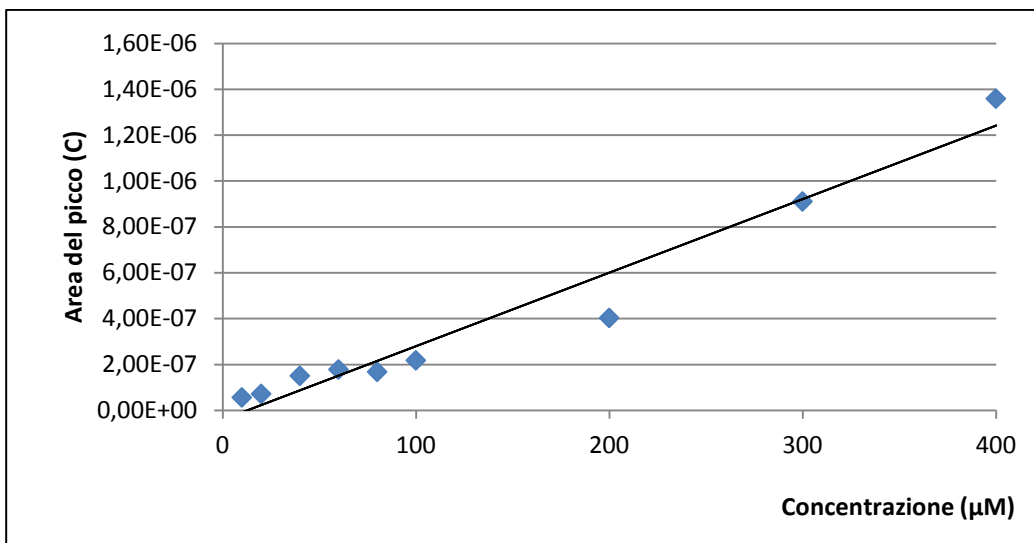


Grafico 23: Retta di taratura della cisteina.

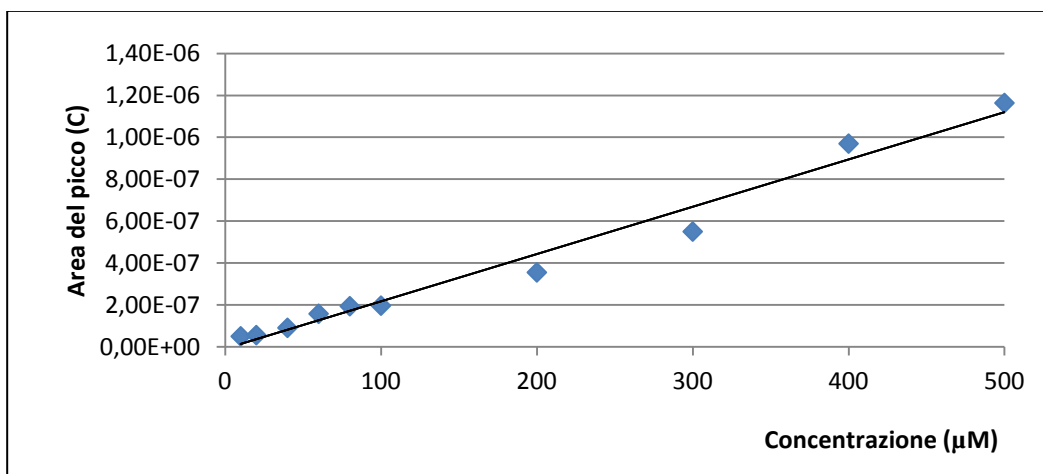


Grafico 24: Retta di taratura dell'omocisteina.

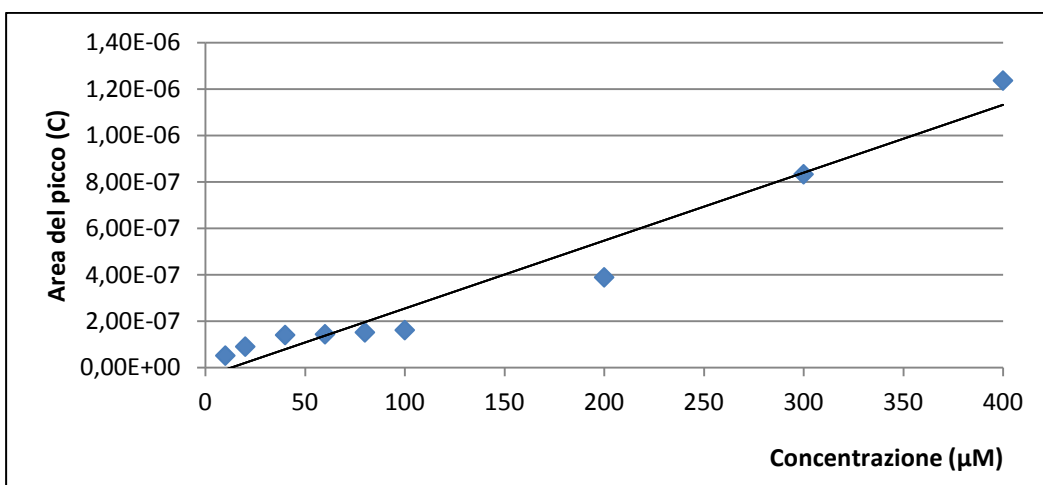


Grafico 25: Retta di taratura della metionina.

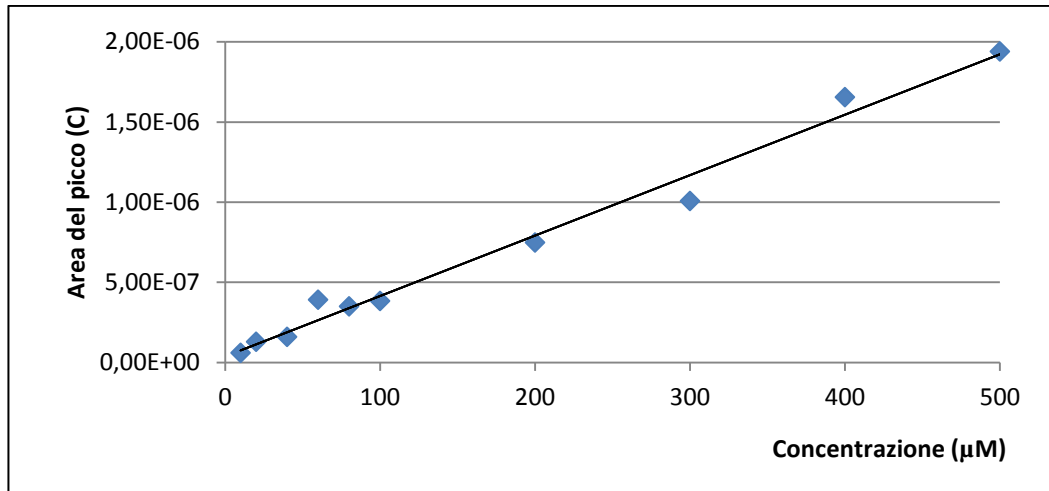


Grafico 26: Retta di taratura dell'omocistina.

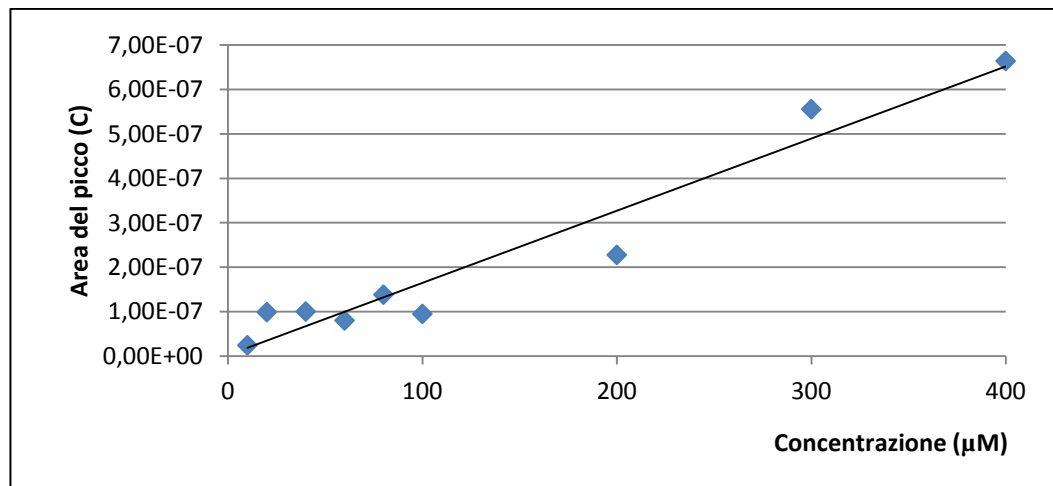


Grafico 27: Retta di taratura della cisteinglicina.

## Allegato 3

Analisi cronoamperometriche svolte con aggiunte degli analiti 5  $\mu\text{M}$  in tampone fosfato 15 mM a pH 2 con l'elettrodo BDD a 1,5 V.

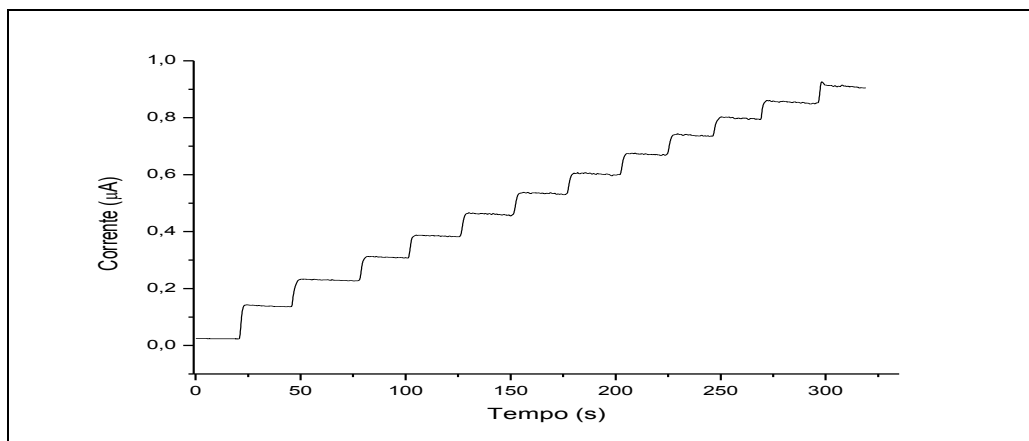


Figura 45: Cronoamperometria dell'acetilcisteina.

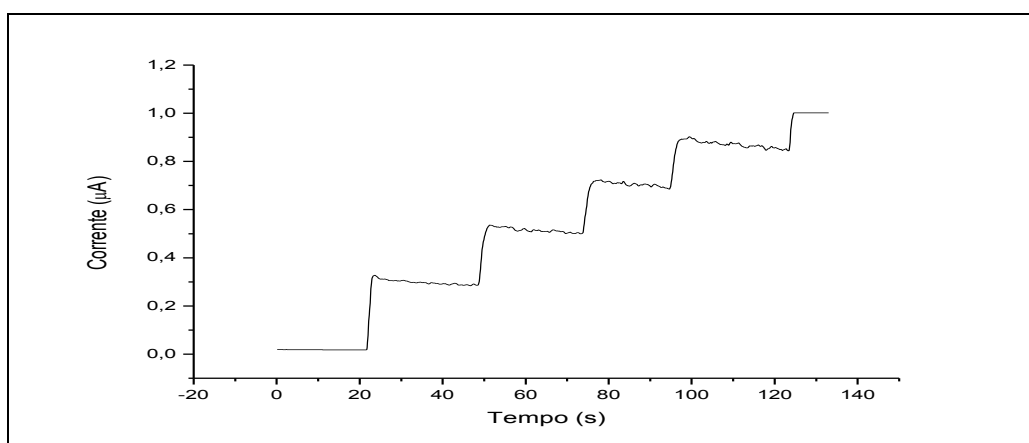


Figura 19: Cronoamperometria del glutatione ridotto.

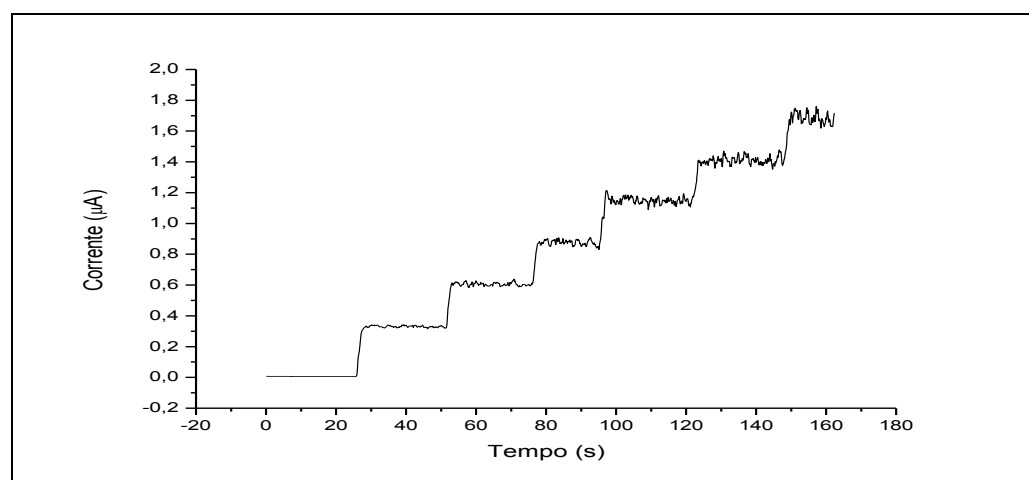
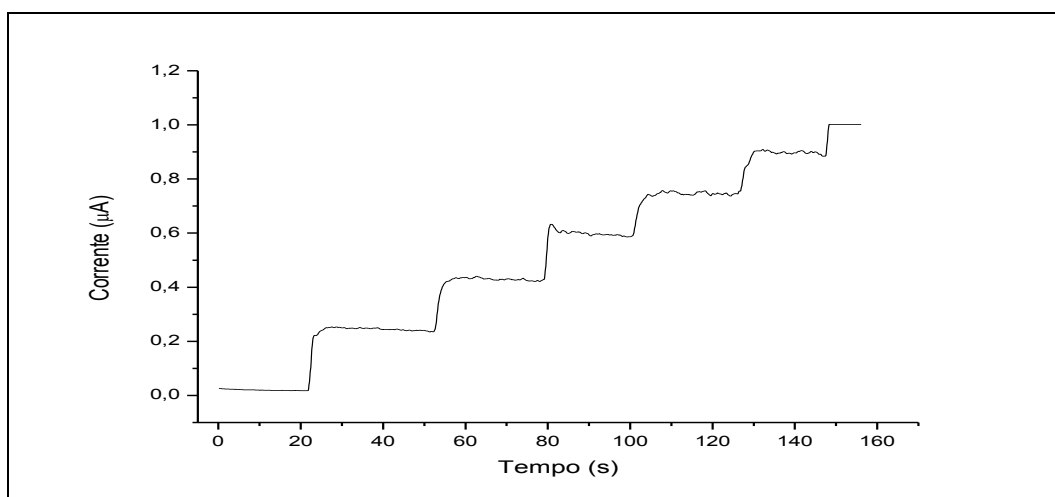
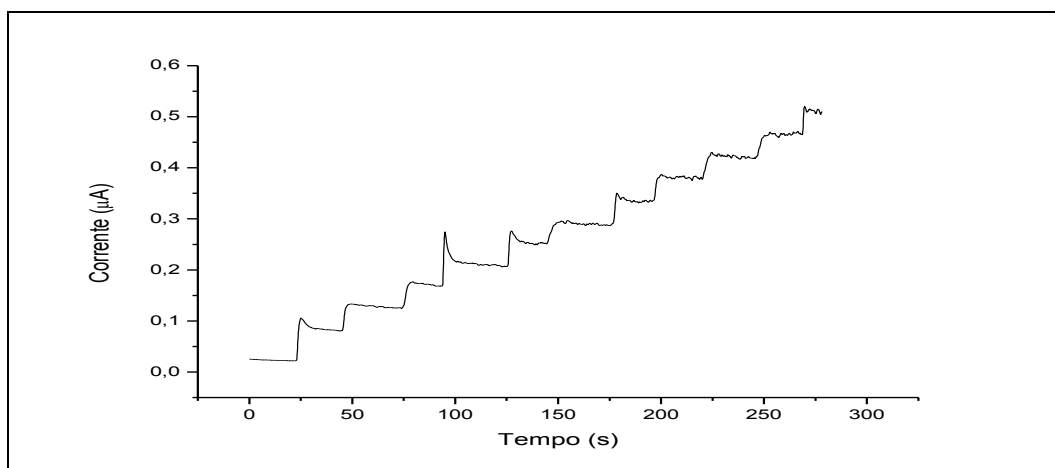


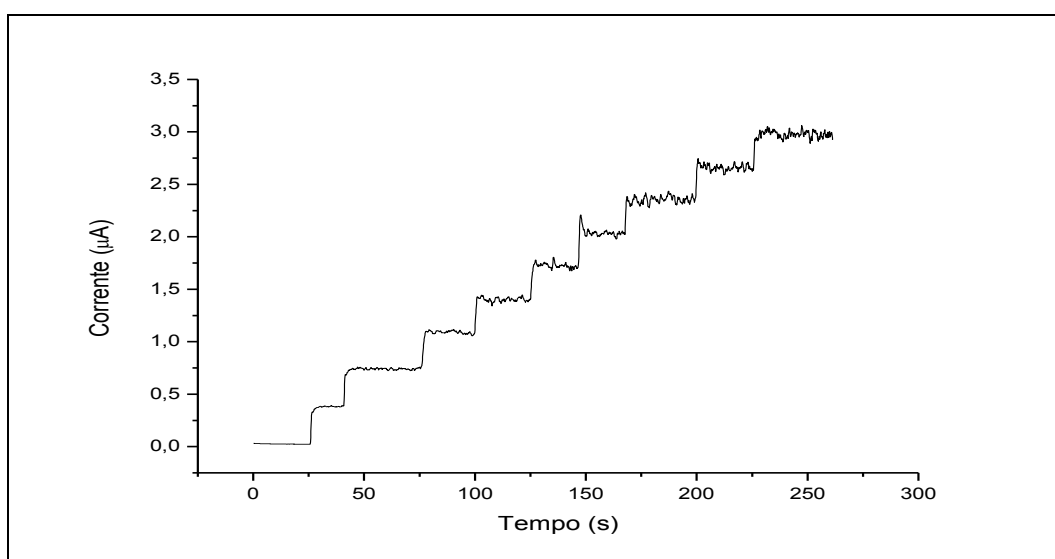
Figura 46: Cronoamperometria del glutatione ossidato.



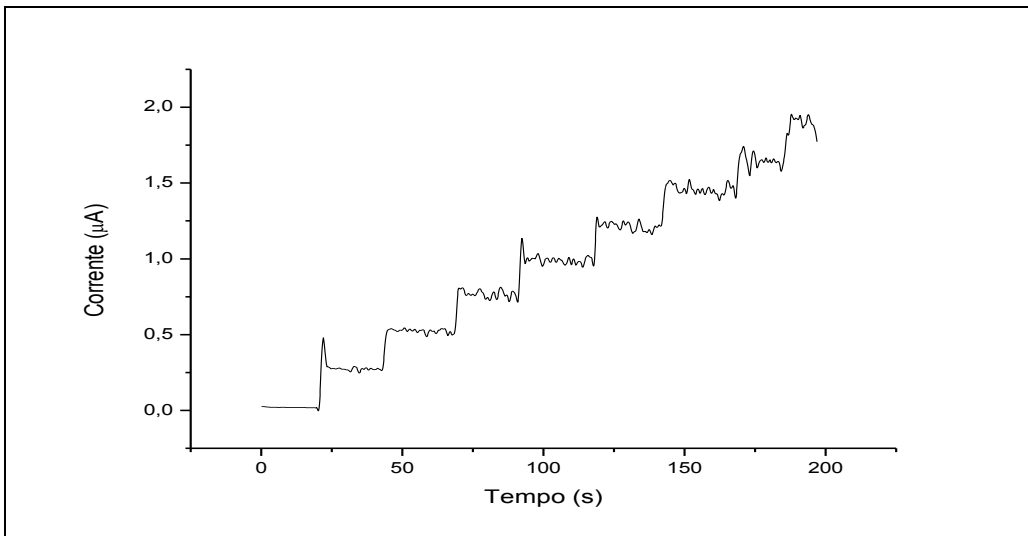
**Figura 47: Cronoamperometria della cisteina.**



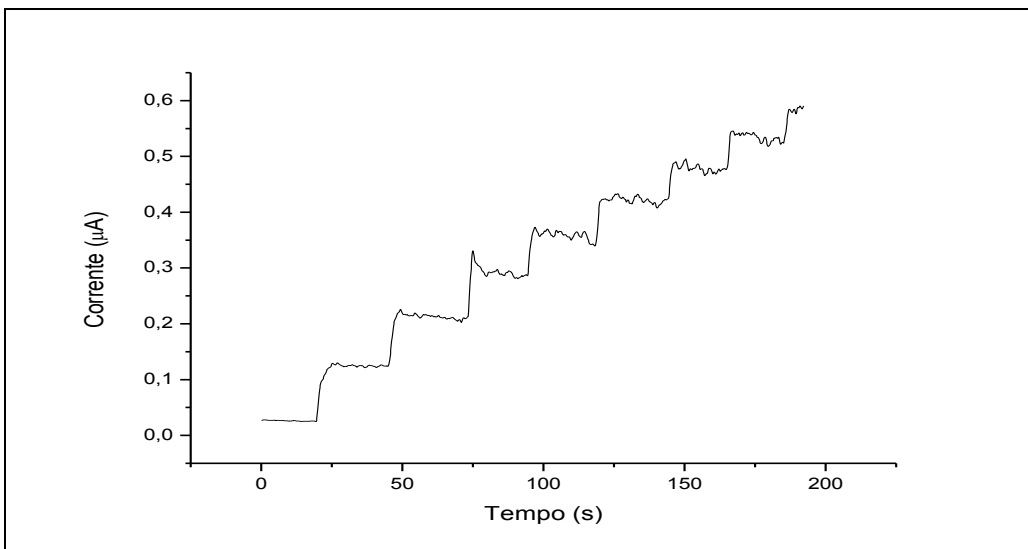
**Figura 48: Cronoamperometria dell'omocistina (HCY).**



**Figura 49: Cronoamperometria dell'omocisteina (HCS).**



**Figura 50: Cronoamperometria della metionina.**



**Figura 51: Cronoamperometria della cisteinglicina.**



## Allegato 4

Analisi di voltammetria ciclica e di cronoamperometria degli analiti condotte in tampone fosfato 15 mM a pH 2 con l'elettrodo modificato di carbon paste con Cobalto-ftalocianina. Le voltammetrie cicliche sono state svolte alla velocità di scansione pari a 40 mV/s, mentre le cronoamperometrie sono state registrate a 0,45 V.

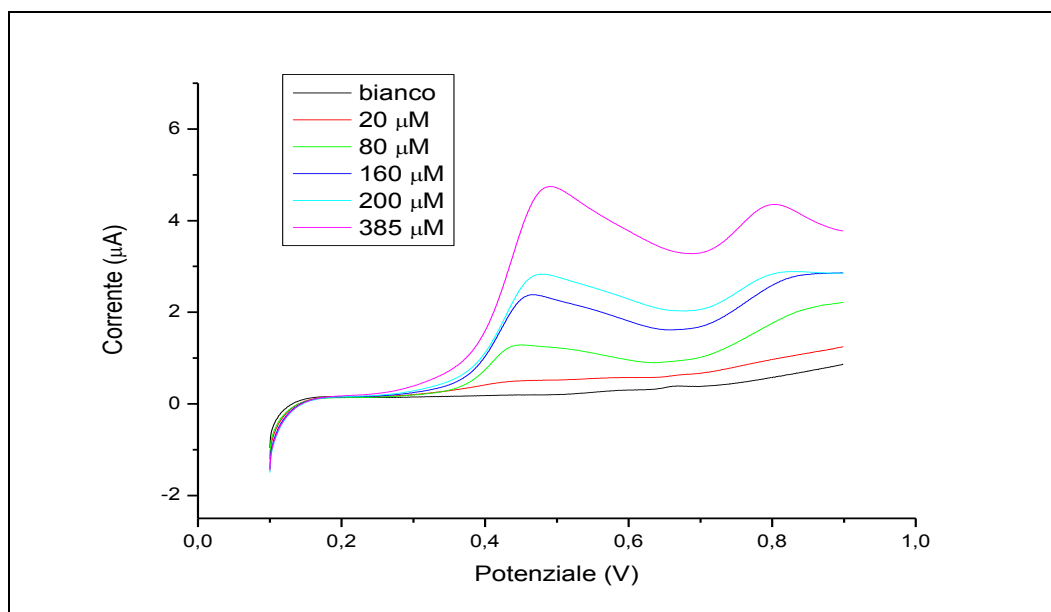


Figura 52: Analisi voltammetriche del glutatione ridotto.

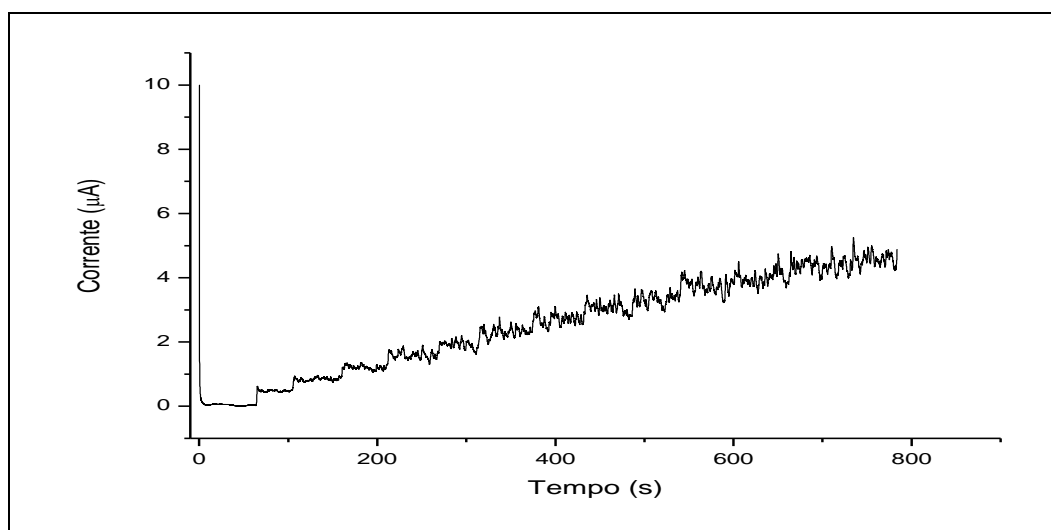
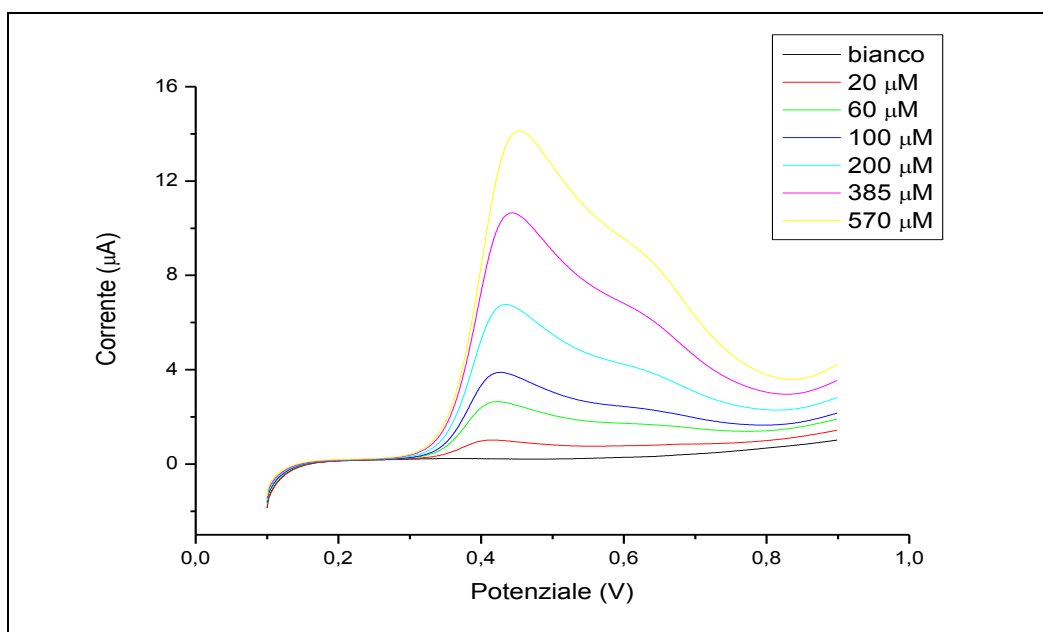
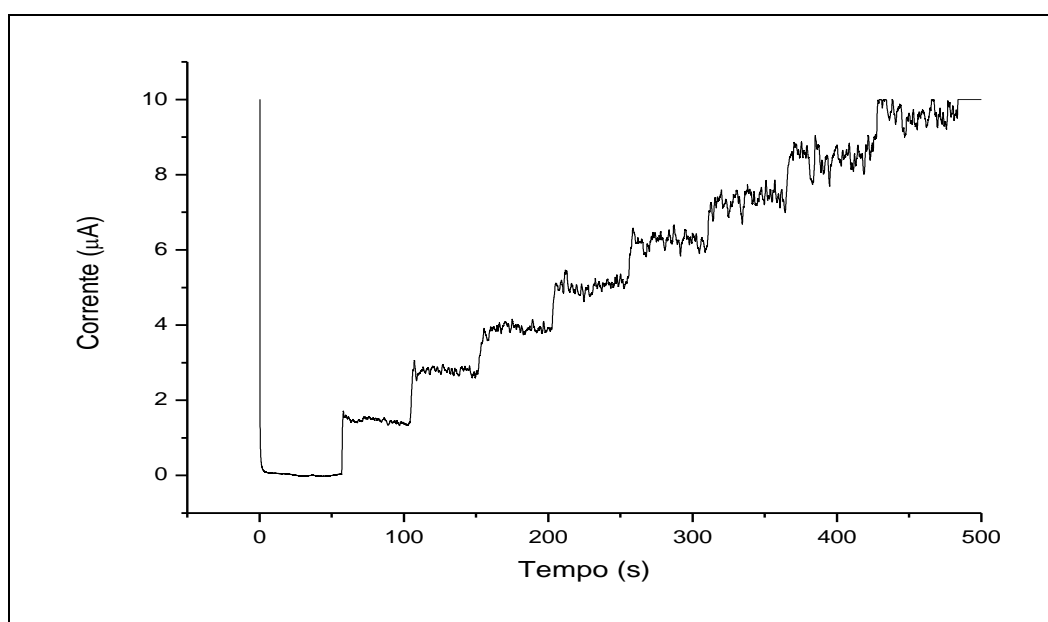


Figura 53: Analisi cronoamperometrica del glutatione ridotto (aggiunte 20 μM).



**Figura 54: Analisi voltammetriche della cisteina.**



**Figura 55: Analisi cronoamperometrica della cisteina (aggiunte 30 μM).**

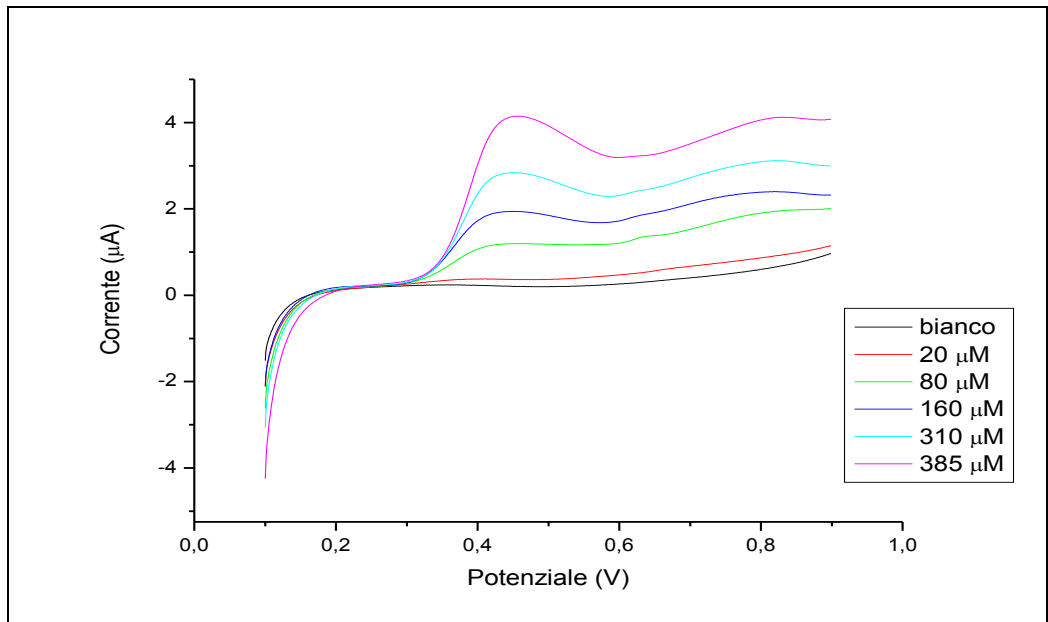


Figura 56: Analisi voltammetriche dell'omocisteina (HCS).

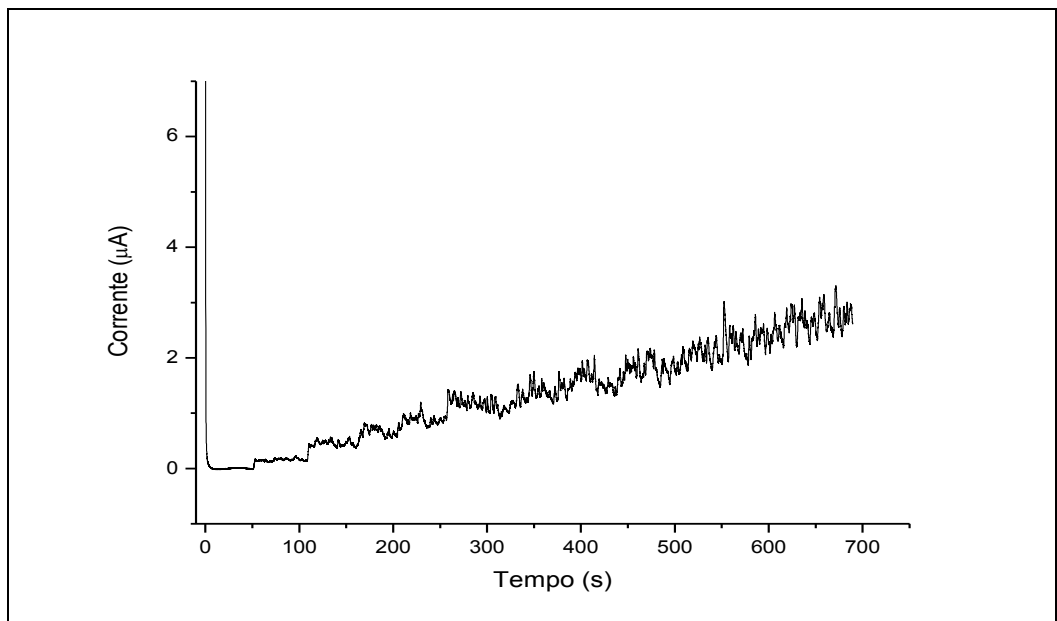


Figura 57: Analisi cronoamperometrica dell'omocisteina (aggiunte 40 µM).

# Appendice 1

## Equazioni dell'elettroforesi capillare

$$v_e = \mu_e E$$

In cui:

$v_e$  : velocità elettroforetica (cm/s)

$\mu_e$  : mobilità elettroforetica (cm<sup>2</sup>/V s)

$E$  : campo elettrico applicato (V/cm)

$$v_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \xi E}{\eta}$$

In cui:

$v_{eo}$  : velocità del flusso elettrosmotico (m/s)

$\epsilon_0$  : permittività nel vuoto (F/m)

$\epsilon_r$  : costante dielettrica (C<sup>2</sup>/J m)

$\xi$  : potenziale zeta (V)

$E$  : campo elettrico (V/m)

$\eta$  : viscosità del mezzo (N s/m<sup>2</sup>)

$$v = \frac{l}{t}$$

In cui:

$v$  : velocità di migrazione dell'analita (cm/s)

$l$  : lunghezza del capillare (cm)

$t$  : tempo di migrazione dell'analita (s)

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_{b1} + w_{b2}}$$

In cui:

$R$  : risoluzione di due picchi

$t_2$  e  $w_{b2}$  : tempo di migrazione e larghezza della base del picco dell'analita più lento (s)

$t_1$  e  $w_{b1}$  : tempo di migrazione e larghezza della base del picco dell'analita più veloce (s)

$$t = \frac{l^2}{\mu_{app} V}$$

In cui:

$t$ : tempo di migrazione (s)

$l$ : lunghezza del capillare (cm)

$\mu_{app}$ : mobilità apparente (somma di quella elettroforetica e elettrosmotica) ( $\text{cm}^2/\text{V s}$ )

$V$ : voltaggio applicato (V)

$$N = 16 \frac{t^2}{w_b^2}$$

In cui:

$N$  = numero di piatti teorici della separazione

$t$  : tempo di migrazione (s)

$w_b$ : ampiezza del picco alla linea di base (s)

$$q = \frac{\mu_{app} \pi r^2 V t C}{l}$$

In cui:

$q$  : quantità di analita iniettato mediante l'iniezione elettrocinetica (mol)

$\mu_{app}$ : mobilità apparente dell'analita ( $\text{cm}^2/\text{V s}$ )

$r$ : raggio interno del capillare ( $\text{cm}^2$ )

$V$  : voltaggio applicato durante l'iniezione (V)

$t$  : durata dell'iniezione (s)

$C$  : concentrazione dell'analita nel campione ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ )

$l$  : lunghezza del capillare (cm)

## Bibliografia

1. **T. D. Nolin, M. E. McMenamin, J. Himmelfarb.** Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. *Journal of Chromatography B*. 2007, 852, p. 554-661.
2. **C. Bayle, E. Caussé, F. Couderc.** Determination of aminothiols in body fluids, cells, and tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004, 25, p. 1457-1472.
3. **P.C. White, N.S. Lawrence, J. Davis, R. G. Compton.** Electrochemical determination of thiols: a perspective. *Electroanalysis*. 2001, 2, p. 89-98.
4. **C. Barus, P. Gros, M. Comtat, S. Daunes-Marion, R. Tarroux.** Electrochemical behaviour of N-acetyl-L-cysteine on gold electrode-A tentative reaction mechanism. *Electrochimica Acta*. 2007, 52, p. 7989-7985.
5. **A. B. Guttormsen, J. Schneede, T. Fiskerstrand, P. M. Ueland, H. M. Refsum.** Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *Human and clinical nutrition*. 1994, p. 1934-1941.
6. **A. Zinellu, S. Sotgia, B. Scanu, E. Pisanu, M. Sanna, S. Sati, L. Deiana, S. Sengupta, C. Carru.** Determination of homocysteine thiolactone, reduced homocysteine, homocystine, homocysteine-cysteine mixed disulfide, cysteine and cystine in a reaction mixture by overimposed pressure/voltage capillary electrophoresis. *Talanta*. 2010, 82, p. 1281-1285.
7. **K. Havel, K. Prittis, T. Wielgos.** Quantitation of oxidized and reduced glutathione in plasma by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1999, 853, p. 215-223.
8. **Melvin, Maureen.** *Electrophoresis*; Wiley, 1987.
9. **J. E. Melanson, N. E. Baryla, C.A. Lucy.** Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis. *Trends in analytical chemistry* 2001, Vol. 20, 6, p. 365-374.
10. **P. Kubà, P. C. Hauser.** Fundamentals of electrochemical detection techniques for CE and MCE. *Electrophoresis* 2009, 30, p. 3305-3314.
11. **Y. Zhou, J. Zhi.** The application of boron-doped diamond electrodes in amperometric biosensors. *Talanta*. 2009, 79, p. 1189-1196.
12. **A. Kraft.** Doped Diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. *Internal Journal of Electrochemical Science*. 2007, 2, p. 355-385.

13. **C. Zhao, J. Zhang, J. Song.** Determination of L-cysteine in amino acid mixture and human urine by flow injection analysis with a bioamperometric detector. *Analytical biochemistry*. 2001, 297, p. 170-176.
14. **T. A. Enache, A. M. Oliveira-Brett.** Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. *Bioelectrochemistry*. 2011, 81, p. 46-52.
15. **P. D. Voegel, R. P. Baldwin.** Electrochemical detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1997, 18, p. 2267-2278.
16. **X. Qi, R. P. Baldwin.** Selective oxidation of thiols to disulfides at polymeric cobalt phthalocyanine chemically modified electrodes. *Journal of electrochemistry society*. 1996, Vol. 143, 4, p. 1283-1287.
17. **S. Maree, T. Nyokong.** Electrocatalytic behaviour of substituted cobalt phthalocyanines towards the oxidation of cysteine. *Journal of electroanalytical chemistry*. 2000, 492, p. 120-127.
18. **M. Sekota, T. Nyokong.** The study of interactions of cobalt tetrasulfophthalocyanine with cystine and histidine. *Polyhedron*. 1997, Vol. 16, 19, p. 3279-3284.
19. **T. J. O'Shea, S. M. Lunte.** Chemically modified microelectrodes for capillary electrophoresis/electrochemistry. *Analytical Chemistry*. 1994, Vol. 66, 2, p. 307-311.
20. **E. Còrdova, J. Gao, G. M. Whitesides.** Noncovalent polycationic coatings for capillaries in capillary electrophoresis of proteins. *Analytical Chemistry*. 1997, 69, p. 1370-1379.
21. **F. B. Erim, A. Cifuentes, H. Poppe, J. C. Kraak.** Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1995, 708, p. 356- 361.
22. **Y. Wang, P.L. Dubin.** Capillary modification by noncovalent polycation adsorption: effects of polymer molecular weight and adsorption ionic strength. *Analytical Chemistry*. 1999, 71, p. 3463-3468.
23. **Y. Lvov, K. Ariga, M. Onda, I. Ichinose, T. Kunitake.** Alternate assembly of ordered multilayers of silica and other nanoparticles and polyions. *Langmuir*. 1997, Vol. 13, 23, p. 6195-6203.
24. **Heiger, David.** *High performance capillary electrophoresis*; Agilent technologies, 2000.

25. **A. J. Zemann.** Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1997, 787, p. 243-251.
26. **Harris, Daniel C.** *Chimica analitica quantitativa*; Zanichelli, 2005. p. 69.
27. **B. Filanovsky.** Electrochemical response of new carbon electrodes bulk modified with cobalt phthalocyanine to some thiols in the presence of heptane or human urine. *Analytica Chimica Acta*. 1999, 394, p. 91-100.
28. **L. G. Shaidarova, S. A. Ziganshina, A. V. Gedmina, I. A. Chelnokova, G. K. Budnikov.** Electrochemical behavior and voltammetric determination of cysteine and cystine at carbon paste electrodes modified with metal phthalocyanines. *Journal of Analytical Chemistry*. 2011, Vol. 6, 66, p. 633-641.
29. **J. Limson, T. Nyokong.** Voltammetric behavior of cysteine and metallothionein on Cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. *Electroanalysis*. 1997, Vol. 9, 3, p. 255-260.
30. **G. Favaro, M. Fiorani.** Determination of pharmaceutical thiols by liquid chromatography with electrochemical detection: use of an electrode with a conductive carbon cement matrix, chemically modified with cobalt phthalocyanine. *Analytica Chimica Acta*. 1996, 332, p. 249-255.



*I miei ringraziamenti più vivi sono rivolti alla mia famiglia, che mi ha sempre incoraggiata durante l'intero percorso universitario e che non ha esitato a sostenermi e ad accompagnarmi nella mia prima esperienza fuori casa.*

*Ringrazio la mia relatrice prof.ssa Erika Scavetta per tutta la disponibilità e attenzione che mi ha prestato con continuità per tutta la preparazione della tesi.*

*Desidero ringraziare inoltre la prof.ssa Domenica Tonelli e tutti i ragazzi del laboratorio di analitica per la loro pronta accoglienza e cordialità.*

*Infine un sincero ringraziamento è per Lin, che ricorderò sempre per la gentilezza e la vicinanza che ha avuto nei miei riguardi.*