

UNIVERSITAS MASARYKIANA BRNO SCIENTIA POTENTIALIS CUNCTAS RERUM NATURALIUM



# Využití kapilární elektroforézy při studiu enzymů

Zdeněk Glatz

---

---

---

---

---

---


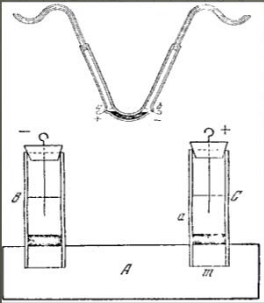
---

---

# Frederic Reuss

(1807)

## Katoforéza



---

---

---

---

---

---

---

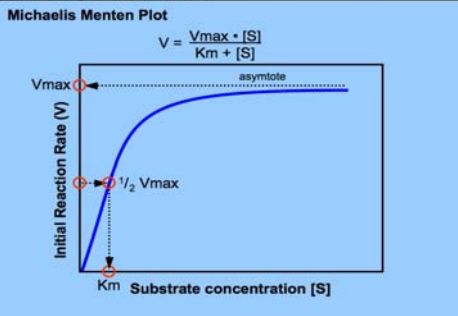
---

# Elektroforéza

(1909)

## Leonor Michaelis

Michaelis Menten Plot

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$


Initial Reaction Rate (V)

Substrate concentration [S]

$v_{max}$

asymtote

$\frac{1}{2} v_{max}$

$K_m$

---

---

---

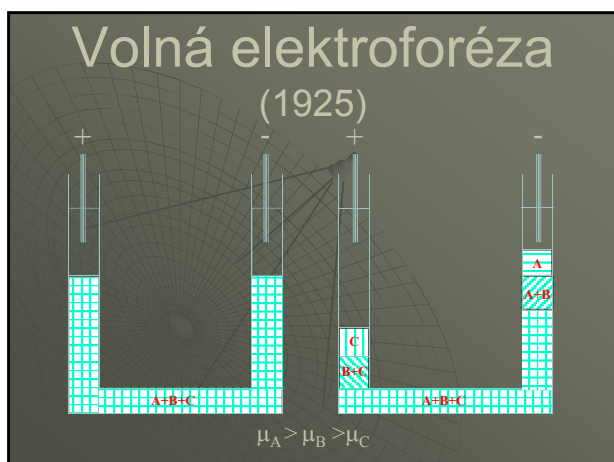
---

---

---

---

---



---

---

---

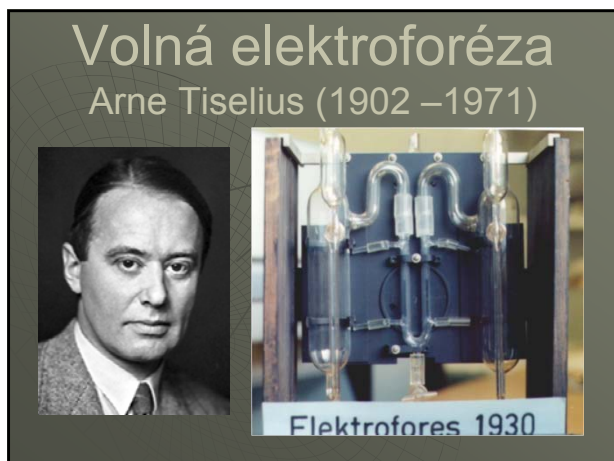
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

---

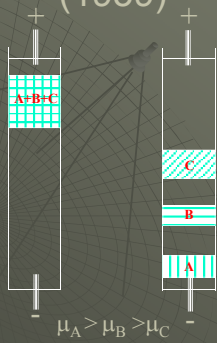
---

---

---

---

# Zónová elektroforéza (1939)



---

---

---

---

---

---

---

---

# Skylab



---

---

---

---

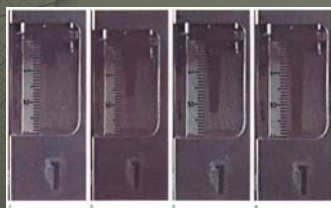
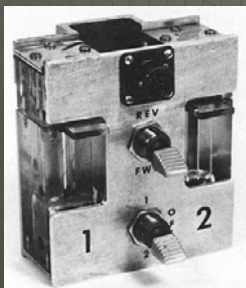
---

---

---

---

# Skylab



---

---

---

---

---

---

---

---

## Stabilizace

- ◆ Porézní media
- ◆ Kapilára

---

---

---

---

---

---

---

---

## Porézní media

- ◆ 1939 *Papír*
- ◆ 1950 *Agarový gel*
- ◆ 1955 *Škrobový gel*
- ◆ 1957 *Acetát celulosy*
- ◆ **1959 Polyakrylamidový gel**
- ◆ 1979 *Agarosový gel*

---

---

---

---

---

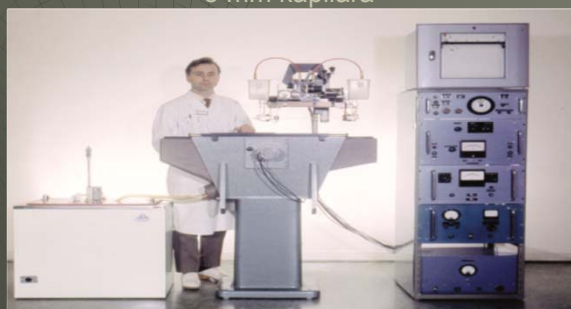
---

---

---

## Kapilární elektroforéza

1967 - Hjerten  
3 mm kapilára



---

---

---

---

---

---

---

---

# Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová  
75 μm kapilára

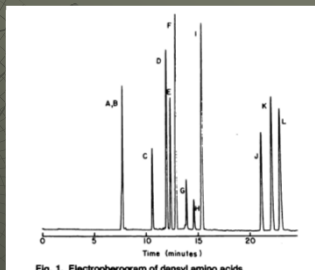


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

---

---

---

---

---

---

---

---

# Beckman 1987



---

---

---

---

---

---

---

---

# 2003 - Projekt lidského genomu



---

---

---

---

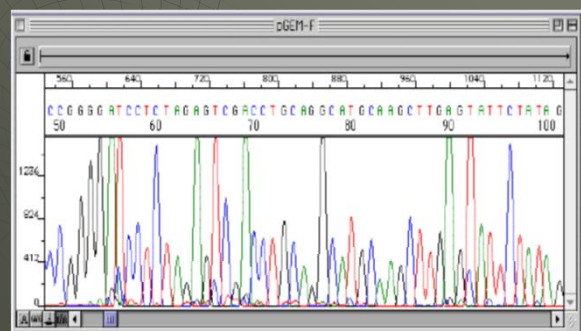
---

---

---

---

### 2003 - Projekt lidského genomu



---

---

---

---

---

---

---

---

### Proč enzymy ?

---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy – molekulární stroje



---

---

---

---

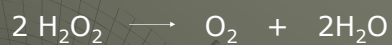
---

---

---

---

## Enzymy – molekulární stroje



Rychlostní konstanta :

- Bez katalýzy -  $0,23 \text{ s}^{-1}$
- Pt -  $1,3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$
- Enzym - katalasa -  $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

---

---

---

---

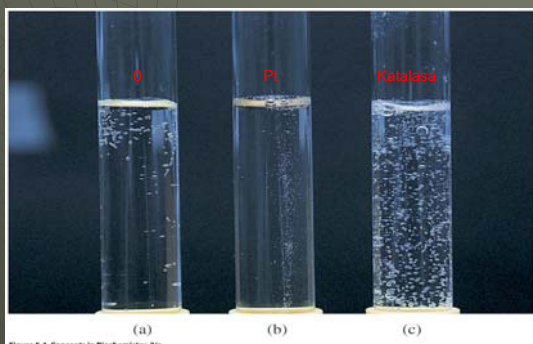
---

---

---

---

## Enzymy – molekulární stroje




---

---

---

---

---

---

---

---

## Enzymy – molekulární stroje

*Katalasa*



Číslo přeměny 40 000 000



1 molekula enzymu přemění  
40 000 000 molekul substrátu za 1 s

---

---

---

---

---

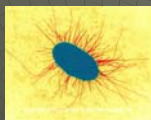
---

---

---

## Enzymy – stanovení koncentrace

*Escherichia coli*



3 000 bílkovin

*Homo sapiens*



25 000 bílkovin

Koncentrace ↔ Katalytická aktivita

Substrát ↔ Produkt

---

---

---

---

---

---

---

---

## Stanovení aktivity enzymů

- *Biochemie*
- *Molekulární biologie*
- *Klinická diagnostika*
- *Farmakologie – vývoj léčiv*
- *Biotechnologické procesy*
- *Bioanalytická chemie*

---

---

---

---

---

---

---

---

## Metody používané pro stanovení aktivity enzymů

- ◆ Spektrofotometrické
- ◆ Spektrofluorimetrické
- ◆ Elektrochemické
- ◆ Radiochemické
- ◆ Separační – HPLC, GC, **CE**

---

---

---

---

---

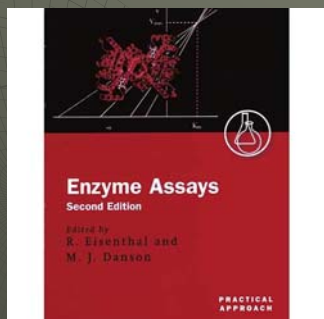
---

---

---



## Enzyme Assays R. Eisinger and M.J. Danson



---

---

---

---

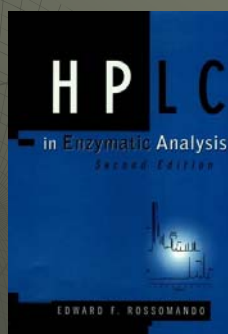
---

---

---

---

## HPLC in Enzymatic Analysis E.F. Rossomando



---

---

---

---

---

---

---

---

Proč enzymy a CE ?

---

---

---

---

---

---

---

---

## Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**
  - nabité i neutrální látky
  - nízkomolekulární i vysokomolekulární látky
  - chirální i achirální látky
  - bakterie i viry

---

---

---

---

---

---

---

---

## Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**
- ◆ **Jednoduchá instrumentace**




---

---

---

---

---

---

---

---

## Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**
- ◆ **Jednoduchá instrumentace**
- ◆ **Vysoké rozlišení a účinnost separací**
- ◆ **Malá spotřeba vzorku**
- ◆ **Rychlost analýzy**
- ◆ **Malá spotřeba chemikálií a malé množství odpadů**

---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

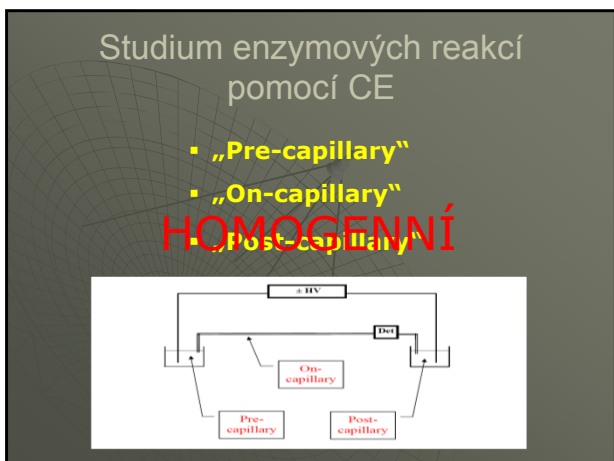
---

---

---

---

---




---

---

---

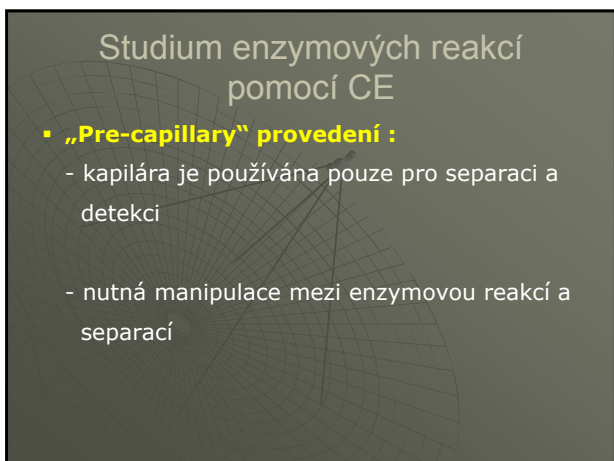
---

---

---

---

---




---

---

---

---

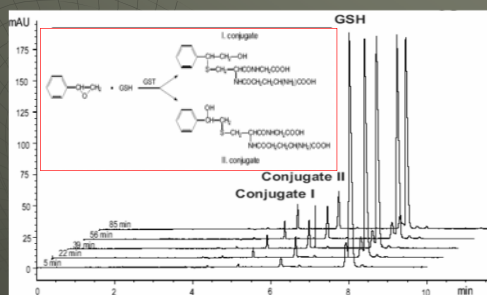
---

---

---

---

## Kinetické stanovení glutathion S-transferasa



Šišková, Z. et al. *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 1357.

---

---

---

---

---

---

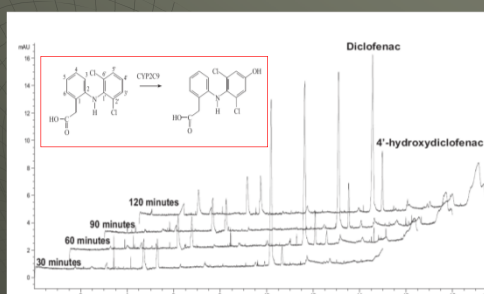
---

---

---

---

## „End point“ stanovení cytochrom P450 2C9



Konečný, J. et al. *Electrophoresis*, 2007, 28, 1229.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Studium enzymových reakcí pomocí CE

### ▪ „On-capillary“ provedení :

- kapilára je navíc využita i jako reakční prostředí
- stanovení je automatizováno – dávkování, smíšení, inkubace, separace, detekce ⇒ CE

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Elektroforeticky zprostředkovaná  
mikroanalýza

Electrophoretically Mediated MicroAnalysis  
**EMMA**

J. Bao, F.E. Regnier, J. Chromatogr. 608, 217 (1992).

rozdílná elektroforetická **mobilita** enzymu a jeho substrátu(ů)  
pro vyvolání reakce **přímo** v kapiláře

---

---

---

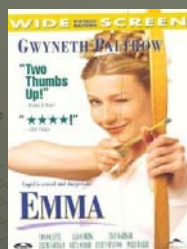
---

---

---

---

---




---

---

---

---

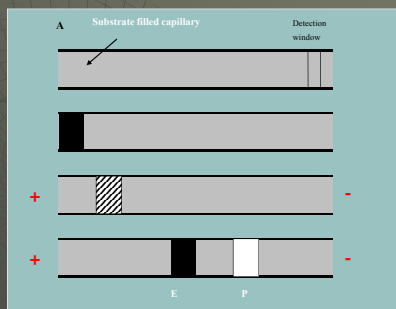
---

---

---

---

EMMA - kontinuální mód




---

---

---

---

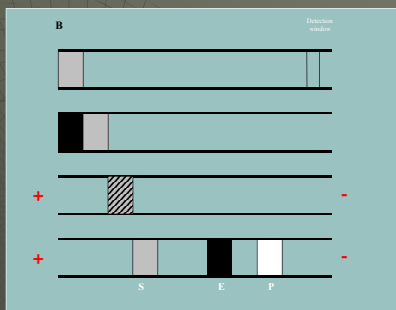
---

---

---

---

### EMMA – zonální mód




---

---

---

---

---

---

---

---

### EMMA – zonální mód

Výhody :

- > Menší spotřeba vzorků – enzym, substráty, inhibitory
- > Vyhodnocování

---

---

---

---

---

---

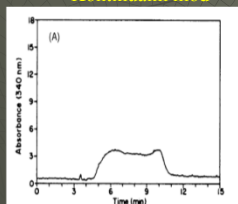
---

---

### EMMA – vyhodnocení

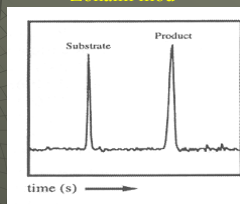


Kontinuální mód



B.J. Harmon et al., J. Chromatogr. A 726, 193 (1996).

Zonální mód



E.S. Kwak et al., Anal. Chim. Acta 397, 183 (1999).

---

---

---

---

---

---

---

---

### EMMA – zonální mód

$$t_{reaction} = \frac{\varpi_1 + \varpi_2}{\Delta \mu_{EP} E}$$

$$t_{merge} = \frac{\delta}{\Delta \mu_{EP} E}$$

vypnutí el. napětí: "zero potential amplification"

---

---

---

---

---

---

---

---

### Studium enzymových reakcí pomocí CE

- **„Post-capillary“ provedení :**
  - vzorek je nejprve separován pomocí CE, na konci kapiláry je reaktor, kde probíhá enzymová reakce
  - uvedenou variantu nelze použít u komerčních CE zařízení

---

---

---

---

---

---

---

---

A. Emmer, J. Roeraade, Chromatographia 39 (1994) 271.

---

---

---

---

---

---

---

---

# Studium enzymů pomocí CE ? (pre-capillary versus on-capillary)

---

---

---

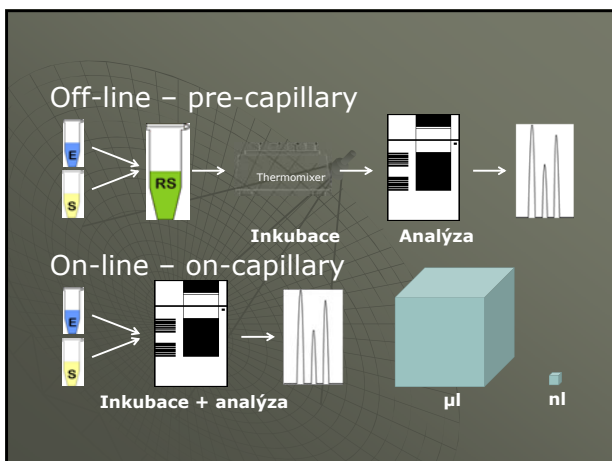
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## Rhodanasa (EC 2.8.1.1)

$$\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$$

*Homo sapiens*  
 Detoxikace kyanidu - otravy  
 - cigaretový kouř  
 - glykosinoláty *Brassicaceae*

*Acidithiobacillus ferrooxidans*  
 Biohydrometalurgie

Životní prostředí

---

---

---

---

---

---

---

---



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity  
Volba separačních podmínek



0.1 mM TTAB - 15 mM borát pH 9.0  
blžká mobilita  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$   
vysoká koncentrace  $\text{CN}^-$  v reakční směsi



Glatz, Z. et al. *J. Chromatogr. A*, 1999, 838, 139.

---

---

---

---

---

---

---

---

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity  
Volba separačních podmínek



100 mM  $\beta$ -alanin - HCl, pH 3.5  
nízký EOF  
 $\text{CN}^- = \text{HCN}$




---

---

---

---

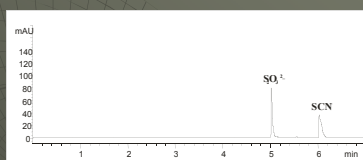
---

---

---

---

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity  
Analýza standardů



**Kapilára:** křemenná, vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ ,  
celková délka 64.5 cm, efektivní  
délka 56 cm  
**Dávkování:** 50 mbar/6s  
**Separací napětí:** 18 kV (negativní polarita)  
**Teplota kapiláry:** 25  $\pm$  0,1  $^\circ\text{C}$   
**Detekce:**  $\lambda = 200$  nm (šířka pásu 20 nm)  
**Vzorek:** 1 mM  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , 1 mM  $\text{SCN}^-$ , 25 mM  $\text{CN}^-$   
v 25 mM HEPES pufru (pH 8.5)

---

---

---

---

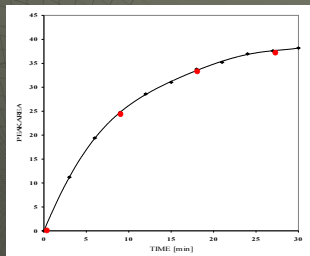
---

---

---

---

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity  
Stanovení aktivity




---

---

---

---

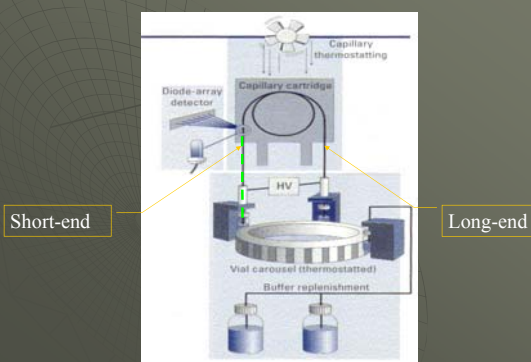
---

---

---

---

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity  
Dávkování




---

---

---

---

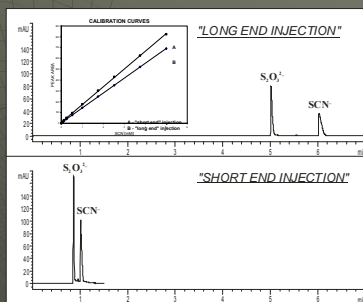
---

---

---

---

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity  
„Short end“ versus „Long end injection“




---

---

---

---

---

---

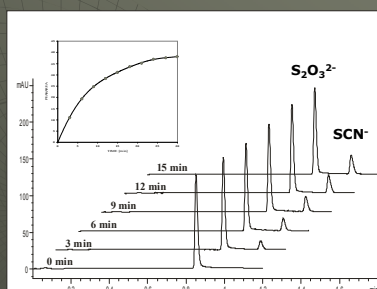
---

---

## rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity „Short end“ versus „Long end injection“

	Short-end injection	Long-end injection
Doba analýzy	1,5 min	7 min
Přesnost migračních časů (n=10)	0.11 %	0.04 %
Přesnost plochy píků (n=10)	0.33 %	0.82 %
Linearita	50 - 5000 $\mu\text{M}$	50 - 5000 $\mu\text{M}$
Korelační koeficient	0.9993	0.9998
Limit detekce	2,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$

## rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity Stanovení aktivity



## rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů Volba separačních parametrů

Stejný pufr použit jak pro enzymovou reakci,  
tak pro separaci produktů

pH optimum rhodanasy: 8.5

BGE pH 8.5 – (nepokrytá kapilára, PVA – pokrytá kapilára)



Nováková, S. et al. *Electrophoresis*, 2002, 23, 1063.

## rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Volba separačních parametrů

Separace anorganických aniontů ( $S_2O_3^{2-}$ ,  $SCN^-$ )  
probíhá nejlépe při nízkém pH základního elektrolytu  
⇒ eliminace EOF

pH optimum rhodanasy: 8.5



Kombinace metody EMMA s "partial filling technique"




---

---

---

---

---

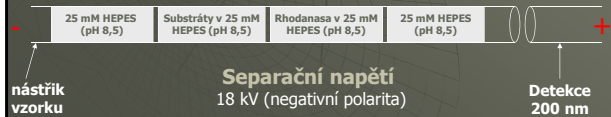
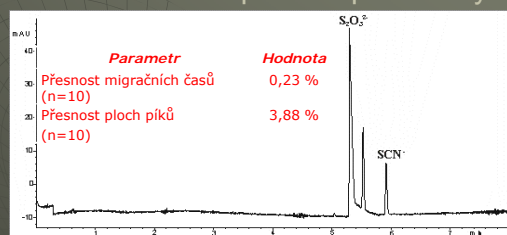
---

---

---

## rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Dávkovací a separační parametry




---

---

---

---

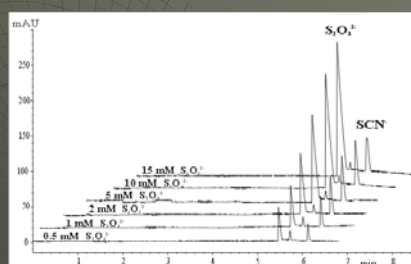
---

---

---

---

## rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Stanovení Michaelisových konstant  $K_m$ 


---

---

---

---

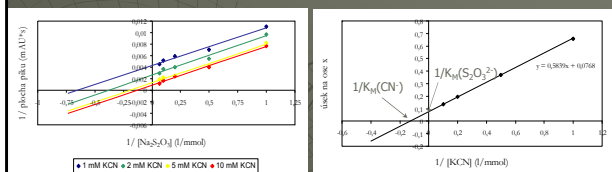
---

---

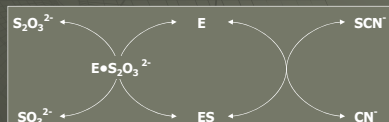
---

---

### rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů Stanovení Michaelisových konstant Km



$K_M(\text{CN}^-) = 7.60 \text{ mM}$      $K_M(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = 13.02 \text{ mM}$




---

---

---

---

---

---

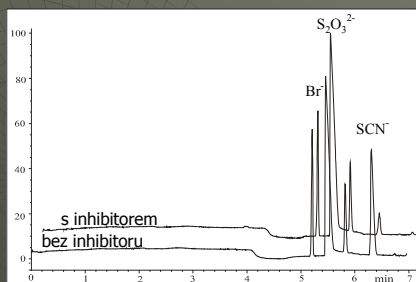
---

---

---

---

### rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů Inhibice rhodanasy 2-oxoglutarátem (inhibitor přidán do zóny substrátů)



Nováková, S. et al *J. Chromatogr. A*, 2003, 990, 189.

---

---

---

---

---

---

---

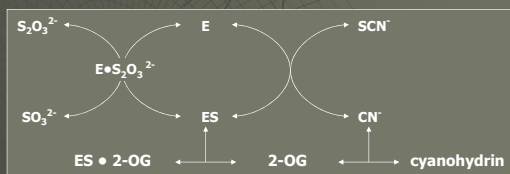
---

---

---

### rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů Diagnostika typu inhibice

	2-OG $K_i$ (mM)	inhibice
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	1.40	akompetitivní
$\text{CN}^-$	$3.62 \times 10^{-1}$	kompetitivní




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Haloalkandehalogenasa (EC 3.8.1.5)



- Odbourávání halogenovaných derivátů uhlovodíků
- Enantioselektivní organické syntézy

---

---

---

---

---

---

---

---

## haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení Volba separačních podmínek



100 mM  $\beta$ -alanin - HCl, pH 3.5  
UV 200 nm

Separační napětí 18 kV (negativní polarita)



Glatz, Z., et al. *J. Chromatogr. A*, 2000, 895, 219.

---

---

---

---

---

---

---

---

## haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení Volba separačních podmínek



Nepřímá detekce




---

---

---

---

---

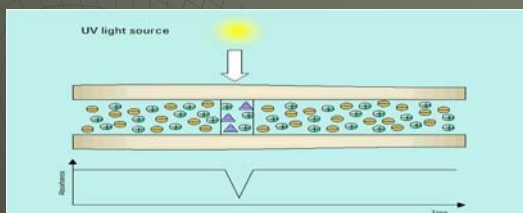
---

---

---

## haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

## Nepřímá detekce



**5 mM chroman 0.5 mM TTAB pH 8.5**  
 Nepřímá detekce – 315 nm / 375 nm  
 Separáčnı́ napětı́ 15 kV (negativnı́ polarita)

---

---

---

---

---

---

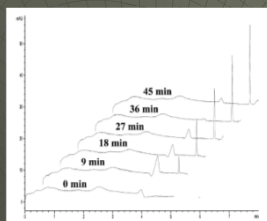
---

---

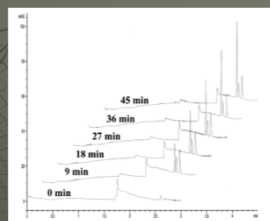
---

---

## haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

Stanovení aktivity  
substrát 1-brombutan

Přímá detekce



Nepřímá detekce

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## haloalkandehalogenasa – EMMA

Dávkovací a separáčnı́ parametry  
Základnı́ elektrolyt

**20 mM  $\beta$ -alanin - HCl, pH 3.5 - přímá detekce**  
 separáčnı́ napětı́ 29,9 kV (negativnı́ polarita)

nebo

**10 mM chroman 0.1 mM CTAB pH 9.2 - nepřímá detekce**  
 separáčnı́ napětı́ 18 kV (negativnı́ polarita)

## Dávkování

1. 20 mM glycinátový puřr (pH 8.6) : 50 mbar/4s
2. Enzym ve 20 mM glycinátovém puřru (pH 8.6) : 50 mbar/4s
3. Substrát ve 20 mM glycinátovém puřru (pH 8.6) : 50 mbar/4s
4. 20 mM glycinátový puřr (pH 8.6) : 50 mbar/4s

Telharová, M. et al. *Electrophoresis*, 2004, 25, 290.

---

---

---

---

---

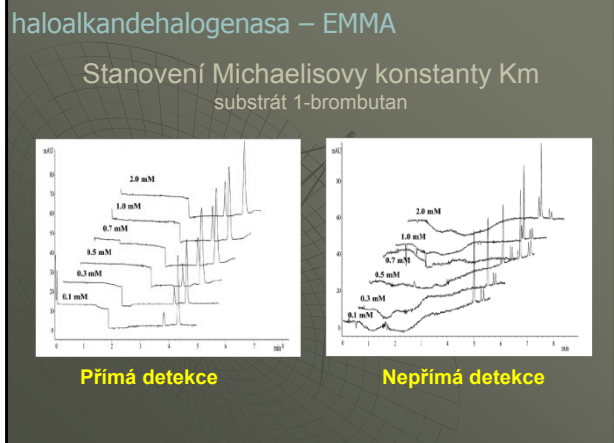
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

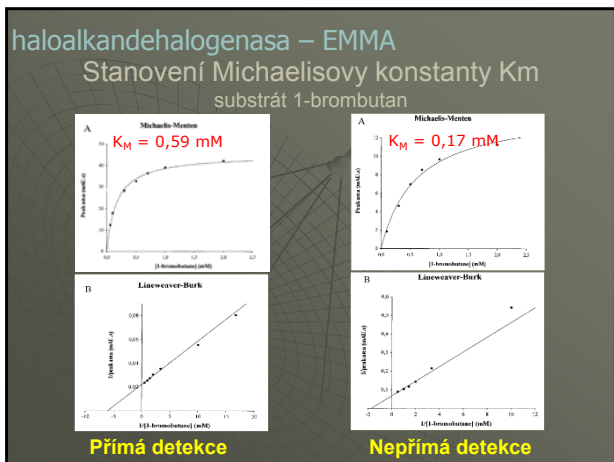
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

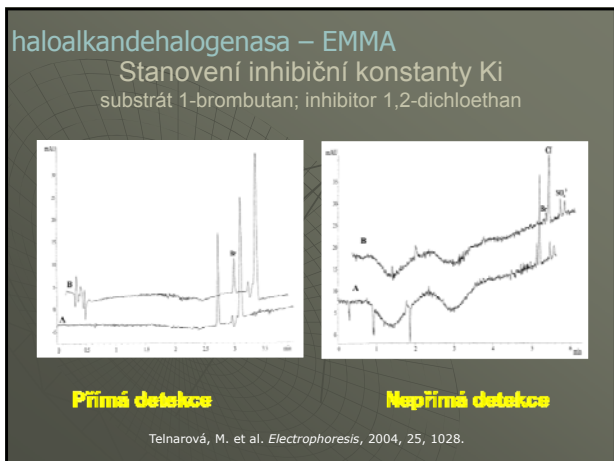
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

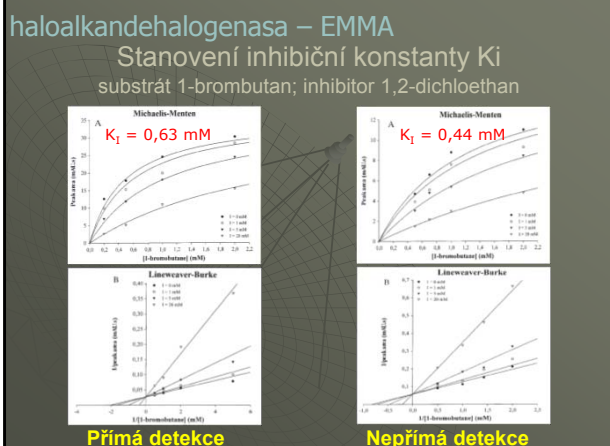
---

---

---

---






---

---

---

---

---

---

---

---

„Pre-capillary“ enzymové stanovení  
 stanovení aktivity

- ◆ Vysoká účinnost
- ◆ Vysoké rozlišení
- ◆ Rychlost analýzy

---

---

---

---

---

---

---

---

„On-capillary“ enzymové stanovení  
 studium kinetiky

- ◆ Vysoká účinnost
- ◆ Vysoké rozlišení
- ◆ Rychlost analýzy
- ◆ **Automatizace**
- ◆ **Malá množství vzorku**

**Studium kinetiky dvousubstrátové enzymové reakce**  
 (60 experimentů)

\* spotřeba vzorku enzymu – 20  $\mu\text{l}$  !!  
 \* doba studie – 3 hodiny SE !! (10 hodin LE)

---

---

---

---

---

---

---

---

EMMA  
současně jako předseparační  
metoda ?

---

---

---

---

---

---

---

---

Sulfotransferasa (EC 2.8.2.1)

- cytosolická
  - biotransformace/detoxikace xenobiotik (II fáze)
- membránově vázaná
  - sulfatace glykoproteinů

---

---

---

---

---

---

---

---

sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

Reakce

C1=NC2=C(N1)N=CN=C2COP(=O)([O-])OP(=O)([O-])[O-] + Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1
 $\xrightleftharpoons{\text{SULT1A1}}$ 
C1=NC2=C(N1)N=CN=C2COP(=O)([O-])O + O=S(=O)([O-])Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1

PAPS                      4-Nitrophenol                      PAP                      4-Nitrophenyl sulfate

Velmi nestabilní  
 80 % (20 % PAP)  
 ~1 mg 4900 Kč

Velmi silný inhibitor reakce  
 $K_i = 0.4 \mu\text{M}$

274 nm

Vytisková, S. et al. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1032, 319.

---

---

---

---

---

---

---

---

### sulfottransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

#### Předseparace PAP od PAPS – MEKC (cholát)

**Separáční podmínky:**  
 BGE: 150 mM HEPES, pH 6.5 + 20 mM kyselina cholová  
 Kapilára:  $L_T=31.2$  cm ( $L_E = 21$ cm),  $75\mu\text{m}$  I.D.  
 Napětí: + 10 kV  
 Teplota kapiláry: 37 °C  
 Detekce: 260 nm  
 Dávkování: 0.3 psi/ 5 s 1mM PAP nebo 115 mM PAPS

Standard	Migrační čas (s)	Mobilita ( $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Rychlost ( $\text{cm s}^{-1}$ )
PAP	246	$-3.90 \times 10^{-4}$	-0.106
PAPS	339	$-4.03 \times 10^{-4}$	-0.130

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### sulfottransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

#### Dávkování a inkubace

Krok	Zóna	Tlak $p_i$ (psi)	Čas (s)	Napětí (kV)
1. Dávkování PAPS	PAPS	0.5	5	/
2. Předseparace od PAPS	/	/	60	15
3. Dávkování S	4-NP	0.3	5	/
4. Dávkování E	SULT1A1	0.3	5	/
5. Smísení a enzymová reakce	/	/	60	5
6. Inkubace	/	/	120	0
7. Separace	/	/	300	10

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### sulfottransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

#### Stanovení Michaelisovy konstanty pro 4-nitrofenol

$K_M = 0.8 \mu\text{M}$

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Stanovení substrátů metodou EMMA ?

---

---

---

---

---

---

---

---

### stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan



Papežová, K. et al. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1120, 268.

---

---

---

---

---

---

---

---

### stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan

#### Dávkování a inkubace

Krok	Tlak (mbar)	Čas (s)	Napětí (kV)
1. Dávkování HEPES pufru	50	4	0
2. Dávkování rhodanasy	50	4	0
3. Dávkování vzorku	50	4	0
4. Dávkování HEPES pufru	50	4	0
5. Smíchání vzorku a rhodanasy	0	3	18
6. Inkubace	0	21	0
7. Separace	0	420	18

---

---

---

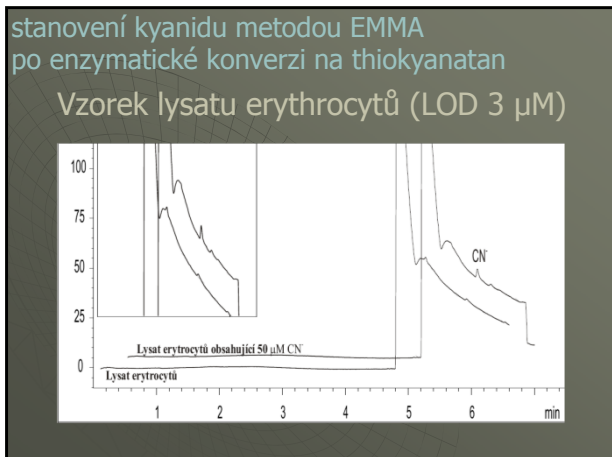
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

Využití metody EMMA  
v proteomice ?

---

---

---

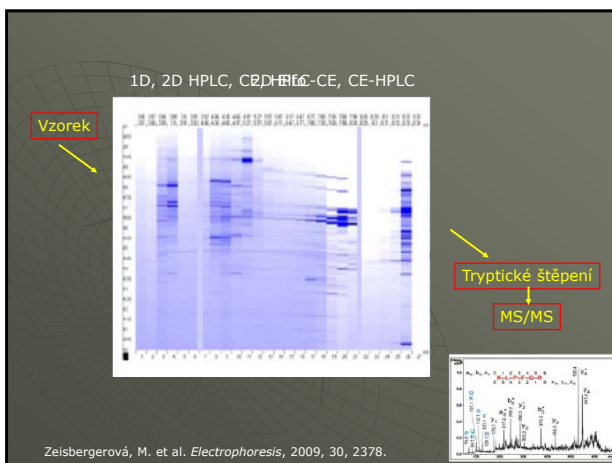
---

---

---

---

---




---

---

---

---

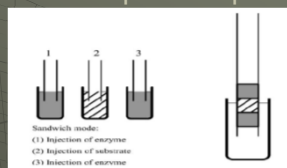
---

---

---

---

integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE  
Dávkovací a separační parametry



25 mM Tris-HCl (pH 8,5)    Trypsin ve 25 mM Tris HCl (pH 8,5)    Protein ve 25 mM Tris HCl (pH 8,5)    Trypsin ve 25 mM Tris HCl (pH 8,5)    25 mM Tris-HCl (pH 8,5)

**Základní elektrolyt**  
0,1 M fosfátový pufr pH 2,5  
nebo  
0,1 M mravenčanový pufr pH 2,5

**Separací napětí**  
18 kV (negativní polarita)

nástřik vzorku      Detekce 200 nm

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE

- Optimalizace  
β-kasein, cytochrom c
- Teplota kapiláry  
↓  
35 °C
- Množství trypsinu  
↓  
0,1 mg/ml
- „Zero potential amplification“  
↓  
0 s

---

---

---

---

---

---

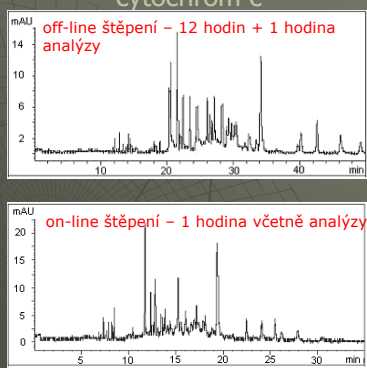
---

---

---

---

integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE  
cytochrom c




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## EMMA – využití

- **Enzymové systémy**
  - Aktivita enzymů
  - Koncentrace substrátů a inhibitorů
  - Michaelisovy a inhibiční konstanty
- **Neenzymové systémy**
  - GSH, HCys, Cys, DTT
  - Ca(II)
  - Gentamycin a kanamycin
  - Kreatin
  - Cr(VI) a Co(II)

---

---

---

---

---

---

---

---

## Využití metody CE při studiu metabolismu léčiv

---

---

---

---

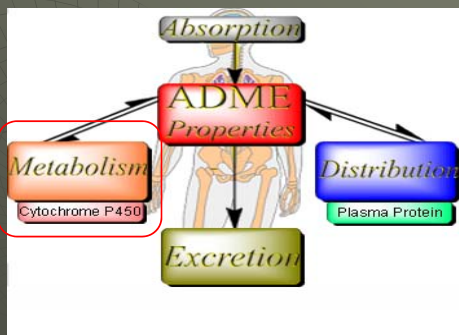
---

---

---

---

## Vývoj nového léčiva - LADME




---

---

---

---

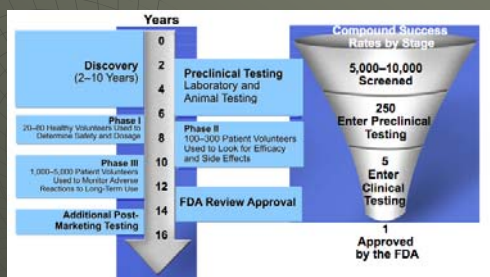
---

---

---

---

## Vývoj nového léčiva




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

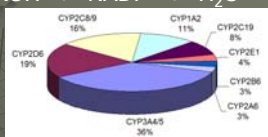
## Cytochromy P450 (CYP)



*Homo sapiens*

50 různých CYP izoforem

podíl na metabolismu 80 % známých léčiv



Jaterní plátky, hepatocyty, mikrosomy, rekombinantní enzymy

promývání mezi analýzami - dynamické pokrytí kapiláry!!!

---

---

---

---

---

---

---

---

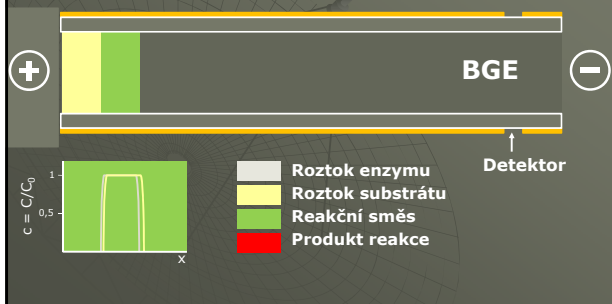
---

---

---

---

## EMMA – CYP3A4 + dextrometorfan




---

---

---

---

---

---

---

---

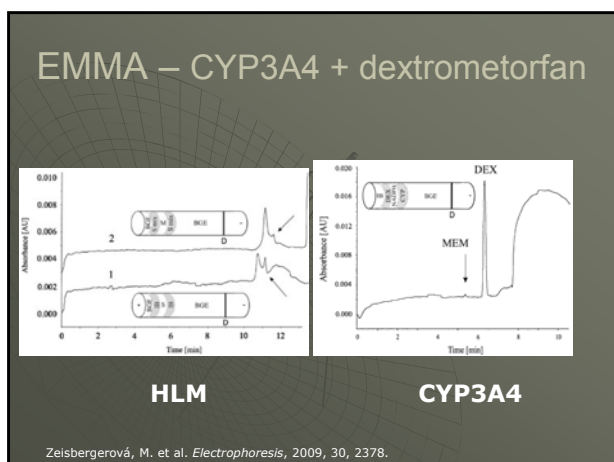
---

---

---

---






---

---

---

---

---

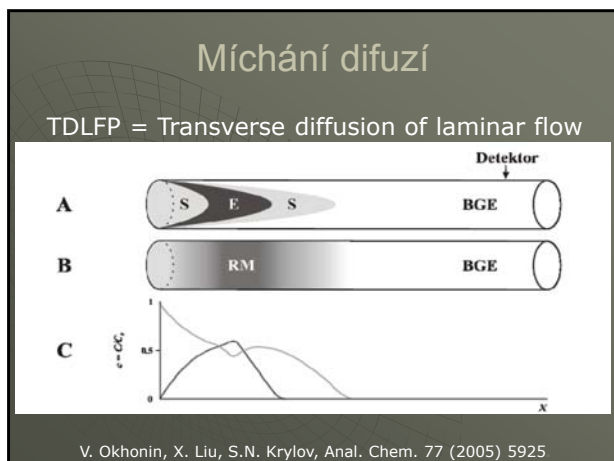
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

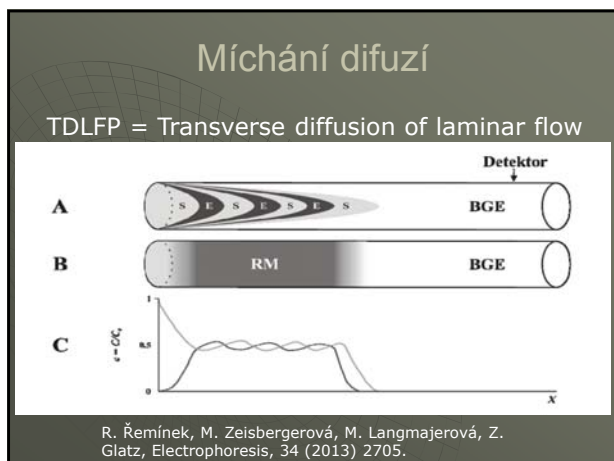
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

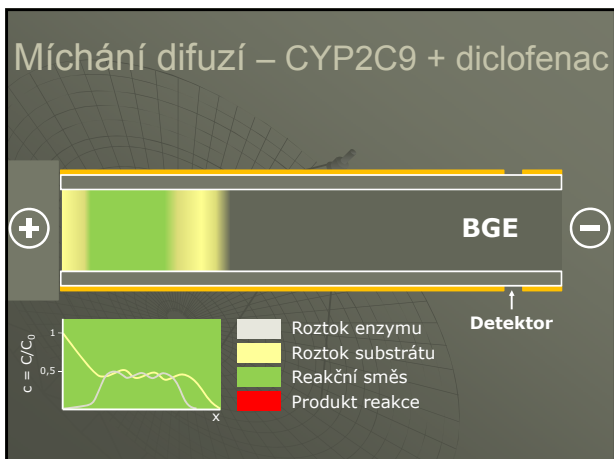
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

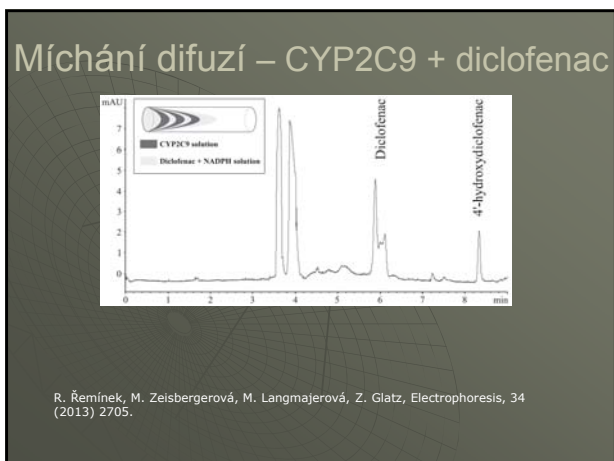
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

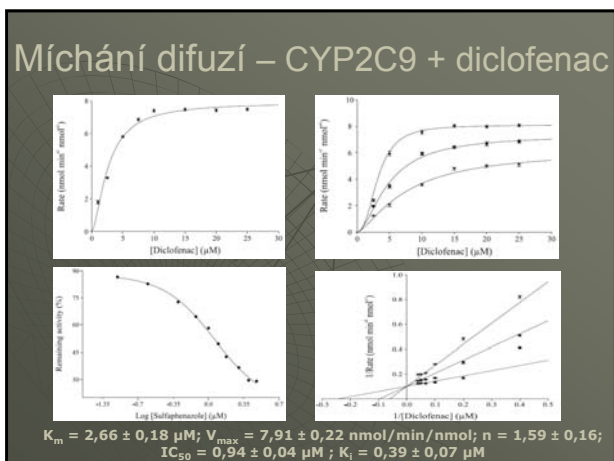
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

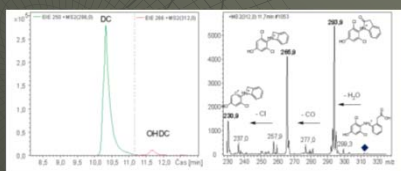
---

---

---

---

### Kombinace TDLFP s MS detekcí



Langmajerová, et al. Electrophoresis, v tisku.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Chiralita – chirální separace ? pomocí CE

---

---

---

---

---

---

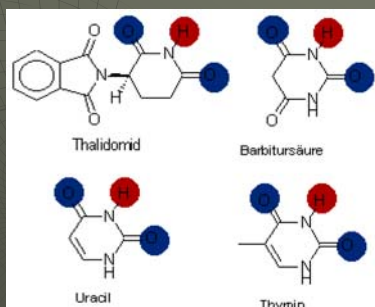
---

---

---

---

### Thalidomid




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Thalidomid



---

---

---

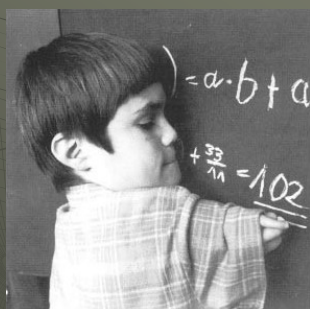
---

---

---

---

---



---

---

---

---

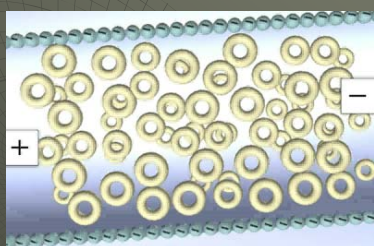
---

---

---

---

### Chirální separace



---

---

---

---

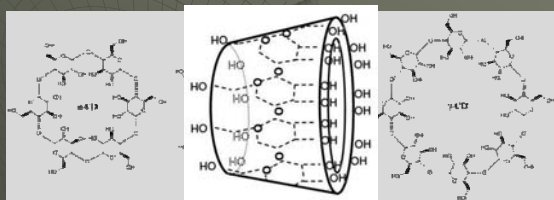
---

---

---

---

### Cyklodextriny




---

---

---

---

---

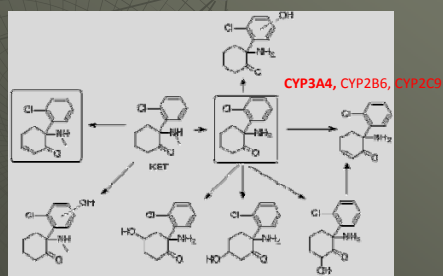
---

---

---

### Ketamin

anestetikum a analgetikum v humánní a veterinární medicíně




---

---

---

---

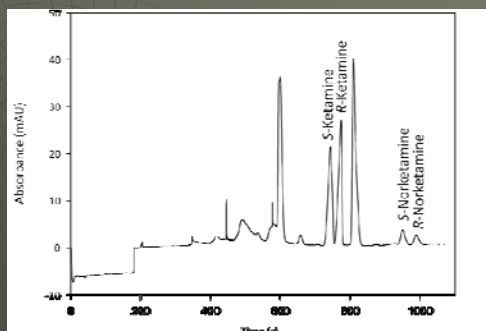
---

---

---

---

### TDLFP ketaminu



50 mM TRIS-fosfátový pufr (pH 2.5) obsahující 3 % (w/v) vysoce sulfatovaný  $\gamma$ -cyclodextrin

---

---

---

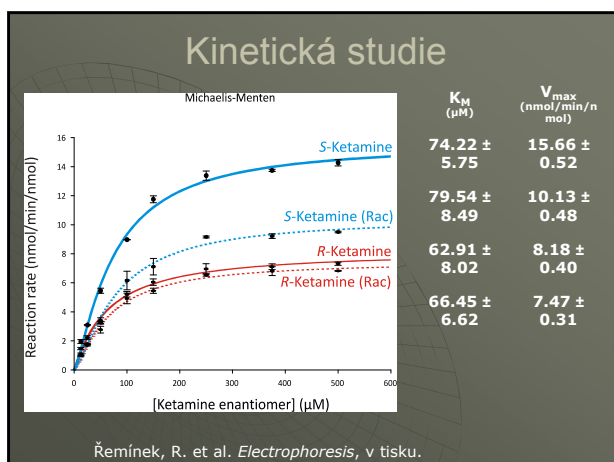
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

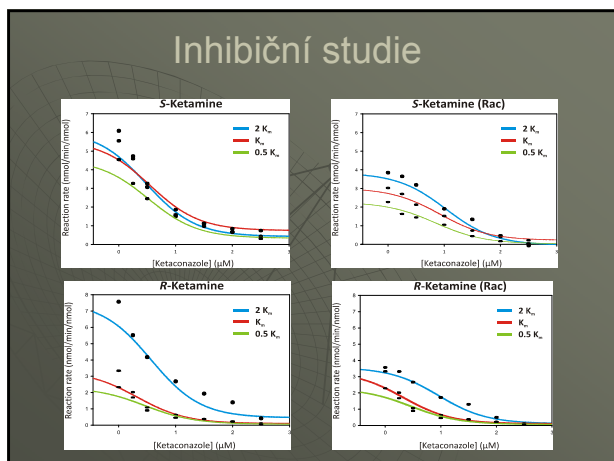
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### EMMA versus TDLFP

- ◆ EMMA + homogenní reakční směs  
- nutné optimalizovat
  
- ◆ TDLFP + universálnost  
- homogenita ???

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Studium enzymových reakcí pomocí CE

**Enzymový reaktor**

**IMER**

---

---

---

---

---

---

---

---

**IMER**

- ◆ Vyšší stabilita enzymu
- ◆ Možnost kombinace se separačními metodami – HPLC, CE
- ◆ Výhodnější poměr substrát/enzym → vyšší citlivost, selektivita, reprodukovatelnost atd.
- ◆ Možnost opakovaného použití

---

---

---

---

---

---

---

---

**CYP 2CD IMER**

Schejbal, J. et al. *Electrophoresis*, v tisku.

---

---

---

---


---

---

---

---

Studium enzymových reakcí pomocí CE



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Chromatography B, 841 (2006) 25–37

Review

Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis<sup>☆</sup>

Zdeněk Glutz<sup>\*</sup>

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamelík 5, 602 00 Brno, Czech Republic

Received 10 January 2006; accepted 21 February 2006  
Available online 30 March 2006

---

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (2010) 1076–1090

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

Review

Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays

Yi Fan, Gerhard K.E. Scriba<sup>\*</sup>

Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Philosophieweg 14, D-07743 Jena, Germany

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Chem. Listy 107, xxx–yyy (2013) Referát

STUDIUM ENZYMOVÝCH REAKCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU V ON-LINE USPOŘADÁNÍ

ROMAN ŘEMÍNEK, MARTA ZEISBERGEROVÁ  
a ZDENĚK GLATZ

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta a Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno  
[romik@mail.muni.cz](mailto:romik@mail.muni.cz)

Došlo 19.3.13, přijato 29.5.13.

---

---

---

---

---

---

---

---


---

---

---

---

EMMA



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Chromatography A, 1012 (2004) 173–184

Review

Electrophoretically mediated microanalysis

Sofia Nováková<sup>a,b</sup>, Sigrid Van Dyck<sup>a</sup>, Ann Van Schepdael<sup>a</sup>,  
Jos Hoogmartens<sup>a</sup>, Zdeněk Glutz<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory for Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, K.U. Leuven, Van Everaude 4, B-3000 Leuven, Belgium

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Koteláček 2, 602 00 Brno, Czech Republic

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



**Record 1 of 4**  
**Title:** Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis  
**Author(s):** Van Dyck, S (Van Dyck, S), Kade, E (Kade, E), Navakova, S (Navakova, S), Olatz, Z (Olatz, Z), Hoogenartens, J (Hoogenartens, J), Van Schepdael, A (Van Schepdael, A)  
**Source:** ELECTROPHORESIS Volume: 24 Issue: 22-23 Pages: 3868-3878 DOI: 10.1002/elps.200305636 Published: DEC 2003

---

**Record 2 of 4**  
**Title:** Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis: An update  
**Author(s):** Zhang, J (Zhang, J), Hoogenartens, J (Hoogenartens, J), Van Schepdael, A (Van Schepdael, A)  
**Source:** ELECTROPHORESIS Volume: 27 Issue: 1 Pages: 35-43 DOI: 10.1002/elps.200500492 Published: JAN 2006

---

**Record 3 of 4**  
**Title:** Advances in CE mediated microanalysis: An update  
**Author(s):** Zhang, J (Zhang, J), Hoogenartens, J (Hoogenartens, J), Van Schepdael, A (Van Schepdael, A), Anz  
**Source:** ELECTROPHORESIS Volume: 29 Issue: 1 Pages: 56-65 DOI: 10.1002/elps.200700475 Published: JAN 2008

---

**Record 4 of 4**  
**Title:** Recent developments and applications of EMMA in enzymatic and derivatization reactions  
**Author(s):** Zhang, J (Zhang, J), Hoogenartens, J (Hoogenartens, J), Van Schepdael, A (Van Schepdael, A), Anz  
**Source:** ELECTROPHORESIS Volume: 31 Issue: 1 Special Issue: SI Pages: 65-77 DOI: 10.1002/elps.200903373 Published: JAN 2010

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**TDLFP**

742 J. Sep. Sci. 2008, 32, 742–756

**Svetlana M. Krylova**  
**Victor Okhonin**  
**Sergey N. Krylov**

Department of Chemistry, York University, Toronto, Ontario, Canada

**Review**  
**Transverse diffusion of laminar flow profiles – a generic method for mixing reactants in capillary microreactor**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**IMER**

706 J. Sep. Sci. 2009, 32, 706–718

**Jana Krenkova**  
**František Švec**

The Molecular Foundry, E. O. Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA

**Review**  
**Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology**

---

3550 Electrophoresis 2004, 25, 3550–3563

**Review**  
**Immobilized microfluidic enzymatic reactors**

Jana Krenkova<sup>1</sup>  
František Švec<sup>1</sup>

Institute of Analytical Chemistry, Brno, Czech Republic

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Příspěvek Čechů k  
separačním metodám



---

---

---

---

---

---

---

---

Příspěvek Čechů k  
separačním metodám



---

---

---

---

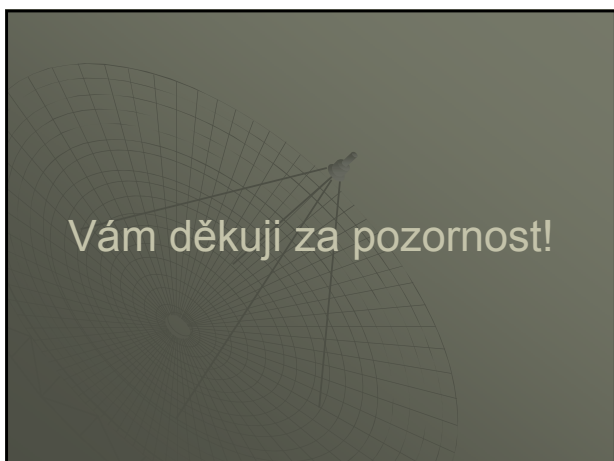
---

---

---

---

Vám děkuji za pozornost!



---

---

---

---

---

---

---

---