



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



Studium metabolismu xenobiotik pomocí moderních elektromigračních metod

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Monika Langmajerová

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.

BRNO 2012

BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM

Autorka: Bc. Monika Langmajerová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: Studium metabolismu xenobiotik pomocí moderních elektromigračních metod

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Analytická biochemie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.

Akademický rok: 2011/2012

Počet stran: 60

Klíčová slova: Kapilární elektroforéza, Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza, Cytochromy P450, Isoforma 2C9, Ionizace elektrosprejem, Iontová past.

BIBLIOGRAPHIC ENTRY

Author: Bc. Monika Langmajerová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Study of xenobiotic metabolism by means of CE

Degree Programme: Biochemistry

Field of Study: Analytical Biochemistry

Supervisor: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.

Academic Year: 2011/2012

Number of Pages: 60

Keywords: Capillary electrophoresis, Electrophoretically mediated microanalysis, Cytochrome P450, 2C9 isoform, Electrospray ionization, Ion trap.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na využití kapilární elektroforézy pro on-line studie enzymových reakcí. Byla sledována biotransformace diclofenaku prostřednictvím cytochromu P450 2C9. Pro mísení reakční směsi uvnitř kapiláry byly využity dva způsoby. První z použitých technik byla elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza, druhý přístup využíval příčnou difuzi laminárního profilu toku. Vznikající látky byly detekovány diodovým polem a hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí.

Vyšších výtěžků enzymové reakce bylo dosaženo s druhým způsobem mísení reakční směsi, který byl aplikován při analýze spojující všechny kroky od enzymatické reakce, přes separaci vzniklých produktů až k identifikaci těchto sloučenin pomocí iontové pasti.

ABSTRACT

The objective of this study was to introduce a method for on-line studies of enzyme reactions by means of capillary electrophoresis. Reaction of cytochrome P450 isoform 2C9 with diclofenac was used as model system. Two ways of reactants' mixing inside the capillary were used: electrophoretically mediated microanalysis and technique utilizing transverse diffusion of laminar flow profiles. Products of enzymatic reaction were detected by diode array detection or mass spectrometry with ion trap.

Higher yields of the enzyme reaction products was achieved with the second method. For this reason, this way of mixing was applied within method integrating incubation of enzymatic reaction, separation of emerged reaction products to their identification by ion trap mass spectrometry.



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta
Ústav biochemie
Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: **Biochemie**

Studijní obor: **Analytická biochemie**

Student(ka): **Bc. Monika Langmajerová**

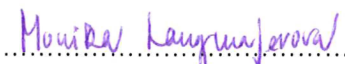
Název tématu: **Studium metabolismu xenobiotik pomocí moderních elektromigračních metod.**

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc

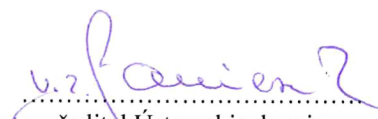
Odborný konzultant: Mgr. Marta Zeisbergerová, PhD

Datum zadání diplomové práce: 1.10.2010

Datum odevzdání diplomové práce: duben 2012


.....
zpracovatel diplomové práce


.....
vedoucí diplomové práce


.....
ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 1.10.2010

Zásady pro vypracování:

Hlavním cílem této diplomové práce je vývoj miniaturizovaného systému pro "on-line" studie metabolismu léčiv založeného na kapilární elektroforéze. Práce bude orientována na nejdůležitější skupinu detoxikačních enzymů I. fáze metabolismu léčiv – cytochromy P450. Díky tomu by měl být k dispozici systém umožňující analýzu velkého množství vzorků, což rovněž omezí množství in vivo experimentů na laboratorních zvířatech. Hlavní pozornost přitom bude zaměřena na metodu elektroforeticky zprostředkované mikroanalýzy EMMA (Electrophoretically Mediated MicroAnalysis), neboť ji lze plně automatizovat. Klasické "pre-capillary" stanovení bude použito pouze jako podpůrná metoda. Speciální pozornost bude věnována možnosti kombinaci kapilární elektroforézy s detekcí pomocí MS.

Seznam odborné literatury:

Zhang, Jie - Konečný, Jiří - Glatz, Zdeněk - Hoogmartens, Jos - Van Schepdael, Ann. Review: Application of capillary electrophoresis in drug metabolism studies. *Current Analytical Chemistry*, USA : BENTHAM SCIENCE PUBL LTD, 3, 3, od s. 197-217, 21 s. ISSN 1573-4110. 2007.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu mé diplomové práce prof. RNDr. Zdeňku Glatzovi, CSc. za odborné vedení, čas i ochotu při konzultacích a rady při zpracování práce. Také bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Martě Zeisbergerové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, všechny rady a připomínky a Mgr. Romanovi Řemínkovi za předání praktických zkušeností při práci s enzymovým systémem v on-line upořádání. Rovněž děkuji panu Ing. Karlu Klepárníkovi, CSc. za pomoc při broušení špičky kapiláry a celému kolektivu v Centru bioanalytických technologií.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně dne 14. května 2012

.....

Monika Langmajerová

OBSAH

Seznam používaných zkratk	9
Úvod	10
1 Kapilární elektroforéza	11
1.1 Teoretické principy	11
1.2 Základní charakteristiky	12
1.3 Kapilára využitá jako reakční prostor	13
1.3.1 Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza	13
1.3.2 Difuzí zprostředkovaná mikroanalýza	15
2 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií	17
2.1 ESI ionizace	17
2.1.1 Rozhraní pro CE-ESI-MS	18
2.1.2 Přídavná kapalina	19
2.1.3 Typy iontů	20
2.2 Vznik laminárního toku	20
2.3 Výběr BGE pro CE-MS	20
2.4 Iontová past	20
3 Metabolismus xenobiotik	22
3.1 Cytochromy P450	22
3.1.1 Názvosloví a struktura CYP	22
3.1.2 Funkce CYP	23
3.1.3 Interakce s dalšími složkami	24
3.1.4 Podrodina 2C	24
3.2 Diclofenak	24
4 Cíle diplomové práce	27
5 Praktická část	28
5.1 Chemikálie	28
5.2 Biologický materiál	28
5.3 Přístroje	28
5.4 Příprava roztoků	29
5.5 Příprava kapiláry	29
6 Výsledky	30
6.1 On-line reakce DC a CYP 2C9	30
6.1.1 Promývání kapiláry	30

6.1.2	Výběr separačních podmínek pro inkubační reakci vedenou v kapiláře	31
6.1.3	Uskutečnění inkubační reakce v kapiláře	34
6.1.4	Optimalizace míchání metodou EMMA.....	37
6.1.5	Prodloužení doby inkubace	41
6.1.6	Prodloužení zóny enzymu	41
6.1.7	Opakovatelnost	42
6.1.8	Metoda TDLFP	43
6.2	Spojení CE-MS.....	46
6.2.1	Analýza standardů DC a OHDC.....	46
6.2.2	Studium vlivu složení přídavné kapaliny	48
6.2.3	Promývání kapiláry při on-line inkubaci	51
6.2.4	Separace reakční směsi	52
6.2.5	On-line enzymová reakce	53
6.2.6	Opakovatelnost	55
6.3	Diskuze	56
	Závěr	58
	Použité informační zdroje.....	59

SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

AcA	Kyselina octová – Acetic Acid
BGE	Základní elektrolyt – BackGround Electrolyte
CE	Kapilární elektroforéza – Capillary Electrophoresis
CYP	Cytochrom P450 – CYtochrome P450
DC	Diclofenak
EMMA	Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza – Electrophoretically Mediated MicroAnalysis
EOF	Elektroosmotický tok – ElektroOsmotic Flow
ESI	Ionizace elektrosprejem – ElectroSpray Ionization
FoA	Kyselina mravenčí – Formic Acid
IB	Inkubační pufr – Incubation Buffer
MS	Hmotnostní spektrometrie – Mass Spectrometry
OHDC	4'-Hydroxydiclofenak
TDLFP	Příčná difuze laminárně dávkovaných zón – Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles

ÚVOD

Při vývoji nového léku je nejprve nutné vybrat vhodné látky z obsáhlé database. Tento výběr je podmíněn vlastnostmi těchto látek, především rychlostí absorpce a distribuce, mírou jejich metabolismu, rychlostí eliminace a jejich toxicitou. Cytochromy P450 se řadí mezi hemoproteiny podílející se na metabolismu přibližně tří čtvrtin běžně předepisovaných léčiv. A proto je součástí farmakologického výzkumu i stanovení, je-li zkoumaná látka substrátem cytochromů P450, případně jaké metabolity jejich působením vznikají. Vzhledem k velkému počtu testovaných látek při prvních fázích vývoje je snaha vytvořit automatizované metody, které umožňují tato rozsáhlá měření.

Jednou z možností automatizace je využití kapilární elektroforézy samostatně nebo například ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Kapilární elektroforéza nabízí výhody jako je velmi malá spotřeba vzorku, rychlá separace a možnost automatizace. Navíc kapiláru lze využít nejen jako separační kolonu, ale také jako reakční prostor s objemem v řádech nanolitřů. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci látek a poskytuje i strukturní informace. Kombinací kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie se získá vysoká separační účinnost současně s možností identifikace neznámých látek. Integrací enzymatické reakce, separace a identifikace pomocí MS vzniká plně automatizovaný systém.

1 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Kapilární elektroforéza CE (Capillary Electrophoresis) je elektromigrační separační metoda, při které se analyty dělí v kapiláře naplněné separačním pufrům vlivem stejnosměrného elektrického pole. Metoda je vhodná pro širokou škálu látek a lze ji uplatnit jak při separaci malých molekul, tak makromolekul. Umožňuje rozdělit současně léčiva, jejich metabolity a enzymy. Navíc kapilára může být využita nejen k separaci, ale její část může sloužit jako reakční prostor. V této kapitole budou popsány základní charakteristiky a principy CE a poté budou popsány některé ze způsobů provedení reakce v kapiláře.

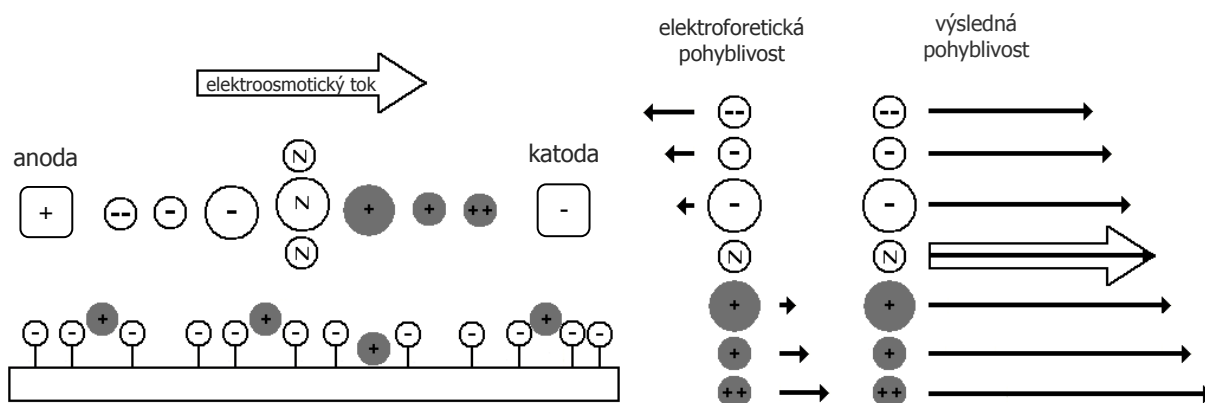
1.1 TEORETICKÉ PRINCIPY

Separace při **elektroforéze** je založena na rozdílech v migraci analytů v elektrickém poli. Rychlost iontu popisuje rovnice (1):

$$v = \mu_e E = \frac{q}{6\pi\eta r} E \quad (1)$$

kde v je rychlost iontu, μ_e elektroforetická pohyblivost a E intenzita elektrického pole. Elektroforetická pohyblivost iontu je závislá na náboji q , viskozitě okolního prostředí η a poloměru iontu r . Hodnota μ_e je konstantní při definovaném médiu a popisuje daný ion.

Elektroosmotický tok EOF (ElectroOsmotic Flow) je tok kapaliny v kapiláře. Tento tok vzniká díky náboji na vnitřní stěně kapiláry. V obvyklém případě ve křemenných kapilárách při pH vyšším než 4 dochází k disociaci silanolových skupin a vzniku záporného náboje. Takto nabitá stěna přitahuje volné kationty z roztoku. V elektrickém poli se pohybují tyto kationty ke katodě, a protože jsou solvatované, je dosaženo proudění celého objemu kapiláry ve směru ke záporné elektrodě. Díky tomu dochází ke snížení nutné separační délky kapiláry a při jediné analýze lze separovat kationty i anionty, protože EOF je řádově vyšší než efektivní elektroforetické pohyblivosti většiny iontů. Rychlostní profil kapaliny je pístový, na rozdíl od parabolického rychlostního profilu, který vzniká v důsledku pohybu kapaliny pomocí pumpy. Díky pístovému profilu EOF dosahuje CE vysokého rozlišení. Na Obr. 1 je znázorněna výsledná pohyblivost částic v závislosti na elektroforetické pohyblivosti a EOF.



Obr. 1 Znáznornění směru elektroosmotického toku, směru elektroforetické pohyblivosti nabitých a neutrálních částic, a výsledné pohyblivosti částic.

1.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY

Nejjednodušší formou CE je kapilární zónová elektroforéza CZE (Capillary Zone Electrophoresis), při které je kapilára naplněna jen roztokem separačního pufru neboli základním elektrolytem BGE (BackGround Electrolyte). Do vstupního konce kapiláry se dávkuje malý objem vzorku. Součástí přístroje je zdroj vysokého napětí. Elektrody jsou umístěny společně s kapilárou v elektroodových nádobkách s BGE. Složky vzorku se vlivem elektrického pole pohybují každá jinou rychlostí. Vznikají oddělené zóny jednotlivých analytů. Na druhém konci kapiláry je detektor.

Kapilára je křemenná a propustná pro UV záření. Křemen je křehký, a proto se pro zvýšení odolnosti pokrývá polyimidem. Vnitřní průměr kapiláry se pohybuje od 25 do 100 μm .

Vzorek je dávkován do kapiláry z nádoby, která se umístí na vstupní konec kapiláry. Poté se využije buď tlaku, nebo elektrického pole. **Dávkování tlakem** je univerzální způsob, při kterém nevzniká rozdíl ve složení nadávkovaného a původního vzorku. Lze dávkovat přetlakem na vstupním konci, nebo podtlakem na konci výstupním. Vzhledem k tomu, že objem hydrodynamicky nadávkovaného vzorku závisí na viskozitě pufru uvnitř kapiláry, je nutné udržovat stálou teplotu kapiláry. Naopak viskozita vzorku významně neovlivňuje nadávkovaný objem, protože jeho zóna tvoří jen velmi malý objem vůči objemu kapiláry [1]. Dávkovaný objem V_{inj} lze vypočítat podle Hagen-Poiseuillovi rovnice:

$$V_{\text{inj}} = \frac{\Delta P \pi d^4 t_{\text{inj}}}{128 \eta L_{\text{tot}}} \quad (2)$$

kde vystupuje rozdíl tlaku na začátku a konci kapiláry ΔP , vnitřní průměr kapiláry d , doba dávkování t_{inj} , viskozita pufru η a celková délka kapiláry L_{tot} .

Elektrokinetické dávkování uplatňuje při zavádění vzorku do kapiláry elektrické pole. Tento způsob dávkování závisí na elektroforetické mobilitě analytu, elektroosmotickém toku, koncentraci analytu i vodivosti matrice vzorku, a proto je obecně méně reprodukovatelné než dávkování tlakem. Dochází k přednostnímu dávkování rychle se pohybujících iontů. Výhodou obou způsobů dávkování je malá spotřeba vzorku v řádech desítek nL.

Po nadávkování vzorku se vymění vialka se vzorkem za vialku s BGE a zahájí se separace vložení napětí. V pufru se při aplikaci napětí generuje elektrický proud a **Jouleovo teplo**. Dochází k ohřívání BGE, tvorbě gradientu teploty a případně až vzniku bublinek plynu. Ve středu kapiláry má kapalina vyšší teplotu než na okrajích a mění se její viskozita. Změna viskozity vytváří nerovnoměrné proudění kapaliny a tím se snižuje rozlišení separace. Vznikající teplo se proto v komerčních přístrojích odvádí chladičím zařízením, které využívá buď vzduch, nebo kapalinu. Chlazení dovoluje aplikovat elektrické pole 100 až 500 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ na kapiláru. Obvykle se používá napětí 5 až 30 kV.

Chladičím zařízením nezajišťuje stabilní teplotu ve všech částech kapiláry, ale zůstávají tři netemperované oblasti: vstupní a výstupní konec kapiláry a část s detekční celou. Pozorovaná změna teploty po aplikaci napětí je závislá na vodivosti použitého BGE, vložení napětí, vnitřním průměru kapiláry a požadované teplotě. Změnu teploty v temperované i netemperované části kapiláry lze i stanovit [2]. Pro málo vodivé pufrů je tato změna teploty zanedbatelná a teplota v netemperované oblasti závisí na teplotě okolí. Vzhledem k malé

možnosti kontrolovat teplotu netemperované oblasti kapiláry jsou tyto úseky nevhodné pro uskutečnění inkubačních reakcí, protože není zajištěna opakovatelnost této reakce.

Detekce separovaných zón probíhá nejčastěji spektrofotometricky. Polyimidová vrstva je v místě průchodu světelného paprsku odstraněna a vzniká tak „detekční okénko“. Vzdálenost od počátku kapiláry po místo detekce se nazývá efektivní délka kapiláry L_{eff} . Detekční dráha se shoduje s vnitřním průměrem kapiláry. Další typy detekce jsou například laserem indukovaná fluorescence, která dosahuje nižších limitů detekce než spektrofotometrická, a univerzální vodivostní. Hmotnostně spektrometrická detekce poskytuje nižší detekční limity a nabízí i strukturní informace. Detailnější popis tohoto spojení je v kapitole 2.

Pro CE je typické všestranné uplatnění, které je umožněno existencí různých elektromigračních metod. Řada z ostatních režimů je obměnou CZE. Jde o **micelární elektrokinetickou chromatografii**, kde se do pufru přidávají povrchově aktivní látky, ze kterých se v roztoku tvoří micely, s jejichž pomocí lze separovat i nenabitě molekuly. Další je **kapilární gelová elektroforéza**, při které se navíc uplatňuje síťový efekt gelu. V **chirální kapilární elektroforéze** se přidáním chirálního selektoru do pufru docílí rozdělení opticky aktivních látek. Kombinace elektromigračních a chromatografických principů se uplatňuje u náplňových kolon využívaných **kapilární elektrochromatografií**. **Afinitní kapilární elektroforéza** umožňuje studium interakcí biomolekul. Další typy elektromigračních kapilárních metod jsou **kapilární isoelektrická fokusace**, která dělí v gradientu pH amfolyty, a **kapilární izotachoforéza** sloužící k separaci aniontů nebo kationtů v prostředí vedoucího a koncového elektrolytu.

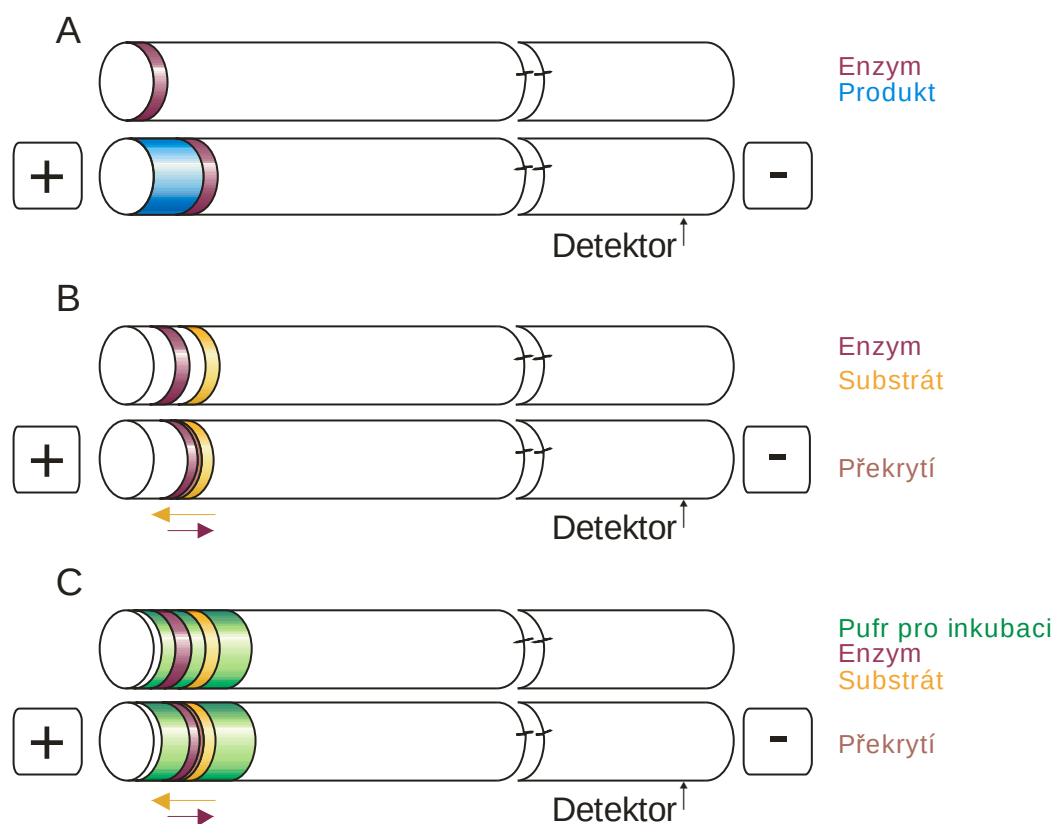
1.3 KAPILÁRA VYUŽITÁ JAKO REAKČNÍ PROSTOR

Obecně lze enzymy a jejich reakce s využitím CE studovat off-line nebo on-line metodou. U off-line reakce probíhá inkubace v reakčních nádobkách v objemu řádově stovek μL , na rozdíl od toho při on-line metodě dochází k reakci přímo v kapiláře, v objemu řádově desítek nL. Existují dva způsoby uskutečnění reakce v kapiláře: **heterogenní** nebo **homogenní** enzymovou analýzou. Při heterogenní analýze je jeden z reaktantů imobilizován na stěnu kapiláry, obvykle se imobilizuje enzym. Naopak při homogenním uspořádání jsou všechny reaktanty volně v roztoku. Účelem enzymových reakcí je stanovení kinetiky reakce [3], nebo určení aktivity enzymu [4], [5]. V kapiláře je také možné provádět další typy reakcí jako je chelatace kationtů [6], derivatizace aminokyselin [7], [8] a jiné chemické reakce např. stanovení kreatininu Jaffého reakcí [9].

1.3.1 ELEKTROFORETICKY ZPROSTŘEDKOVANÁ MIKROANALÝZA

Jeden ze způsobů uskutečnění reakce v kapiláře využívající k vytvoření homogenní směsi enzymu se substrátem elektroforetického pohybu těchto složek, se nazývá elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza EMMA (Electrophoretically Mediated MicroAnalysis). EMMA je technika, kterou poprvé popsali Bao a Regnier roku 1992 [4]. V citované práci byla stanovena aktivita enzymu glukosa-6-fosfát dehydrogenasy prostřednictvím přeměny NADP a glukosa-6-fosfátu. Substrátem a koenzymem byla naplněna celá kapilára a poté byla dávkována zóna enzymu. Autoři využili elektroforetické mobility enzymu. Po sepnutí napětí procházel enzym kapilárou a docházelo k tvorbě produktu NADPH. Schematicky je postup znázorněn na Obr. 2-A. Jde o kontinuální mód EMMA.

Při zónovém módu EMMA, se dávkuje pouze zóny substrátu a enzymu, které musí mít rozdílnou elektroforetickou mobilitu. K jejich míchání dochází vlivem elektrického pole jak je znázorněno na Obr. 2-B. Po překrytí zón dochází k zahájení reakce. Následuje inkubační fáze nutná pro vznik dostatečného množství produktu a separace jednotlivých komponent a jejich detekce. Existují různé variace této techniky. V případě, že separace vyžaduje odlišný pufr než je nutný pro separaci, je kapilára částečně naplněna inkubačním pufrem, který může mít rozdílné složení a pH [10], což je zobrazeno na Obr. 2-C. U enzymů s nízkým číslem přeměny se uplatňuje amplifikace s nulovým potenciálem, při které se po protnutí zón napětí vypne a reaktanty se přestanou pohybovat vlivem elektrického pole. Separace se znovu zahájí až po čase potřebném pro inkubaci [11]. Při amplifikaci s nulovým potenciálem se může začít projevovat vliv podélné difuze. Při prodlužování doby reakce dochází k zvýšení difuze vznikajícího produktu v podélném směru, což vede ke snížení rozlišení separace.



Obr. 2 Schéma různých módů EMMA; **A** kontinuální mód EMMA; **B** zónový mód EMMA; **C** mód EMMA s částečným plněním

VÝPOČET DOBY APLIKACE NAPĚTÍ PRO MÍCHÁNÍ

Výpočet doby míchání je založen na pozorovaných migračních časech reagensů. Pro jednoduchost lze pracovat s rychlostí pohybu těchto reagensů namísto elektroforetických mobilit, jestliže se ve zkoumaném systému nemění délka kapiláry, použité napětí a vnitřní průměr kapiláry. Rychlost reagensů se počítá z migračních časů a efektivní délky kapiláry (vzdálenost mezi vstupním koncem kapiláry a detekčním okénkem). Dále je potřeba popsat počáteční pozici enzymu a substrátu. Nejprve se vypočítá délka dávkované zóny l_z odvozením z rovnice (2).

$$V_{inj} = \frac{\Delta P \pi d^4 t_{inj}}{128 \eta L_{tot}} \quad V_{válec} = \frac{\pi d^2 l_z}{4}$$

$$l_z = \frac{\Delta P d^2 t_{inj}}{32 \eta L_{tot}} \quad (3)$$

Pro účel popisu počáteční pozice se využije střed dávkované zóny. Pozice středu zón enzymu a substrátu na počátku se označí P_E^0 a P_S^0 . Při sepnutí napětí se zóny pohybují svými rychlostmi a pozice jejich středu (P_E , P_S) se v čase mění podle rovnic:

$$P_E = v_E t + P_E^0$$

$$P_S = v_S t + P_S^0 \quad (4)$$

Při rovnosti pozic P_E a P_S , dochází k maximálnímu překrytí zón. Lze vypočítat čas nutný pro optimální míchání.

$$v_E t + P_E^0 = v_S t + P_S^0$$

$$v_E t - v_S t = P_S^0 - P_E^0$$

$$t = \frac{P_S^0 - P_E^0}{v_E - v_S} \quad (5)$$

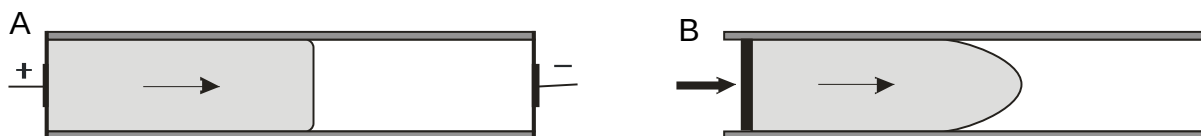
Poté lze spočítat i místo v kapiláře kde bude reakce probíhat.

$$P_S = v_S \frac{P_S^0 - P_E^0}{v_E - v_S} + P_S^0 \quad (6)$$

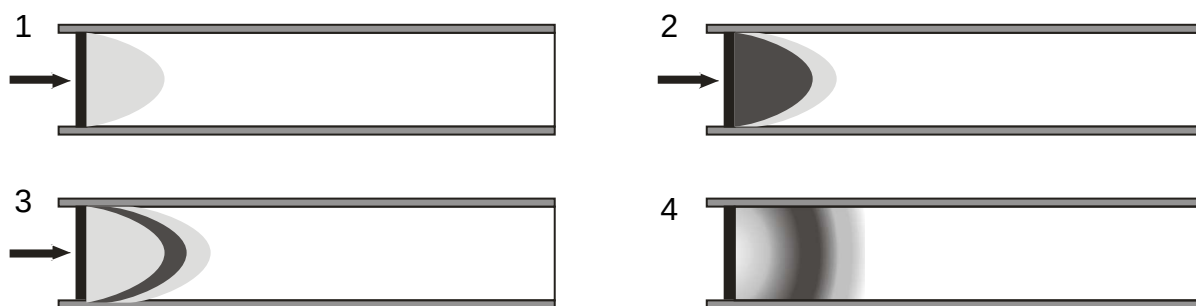
V případě, že nelze určit migrační čas jednoho z reagentů, lze optimální čas míchání určit postupným zvyšováním doby aplikace napětí. Jde o časově náročnější metodu.

1.3.2 DIFUZÍ ZPROSTŘEDKOVANÁ MIKROANALYSA

Druhý způsob míchání reaktantů v kapiláře využívá jevu, který popsal Krylov a kolektiv jako TDLFP (Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles) [12]. Při tomto míchání se uvažuje i parabolický profil tlakem dávkovaných zón, který je znázorněn na Obr. 3. Pomocí tlaku se dávkuje postupně zóna substrátu, enzymu a substrátu jak je znázorněno na Obr. 4-1,-2,-3. Následně dochází k promíchání těchto zón prostřednictvím příčné difuze Obr. 4-4. Reakce probíhá na vstupním konci kapiláry. Problémem je zaručení homogenity vzniklé směsi a stanovení reakčního objemu, nicméně jde o univerzální přístup nevyžadující zdoluhavé optimalizace, který byl již využit pro stanovení kinetických parametrů enzymových reakcí [13], disociační konstanty mezi proteinem a DNA [14] a k lyzování buněk [15].



Obr. 3 Srovnání rychlostních profilů toku. A – profil vyvolaný elektrickým polem; B – profil vznikající následkem tlaku.



Obr. 4 Znázornění dávkování zón tlakem. 1 – dávkování substrátu; 2 – dávkování enzymu; 3 – dávkování substrátu; 4 – idealizované míchání příčnou difúzí. Vytvořeno podle [12].

2 SPOJENÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

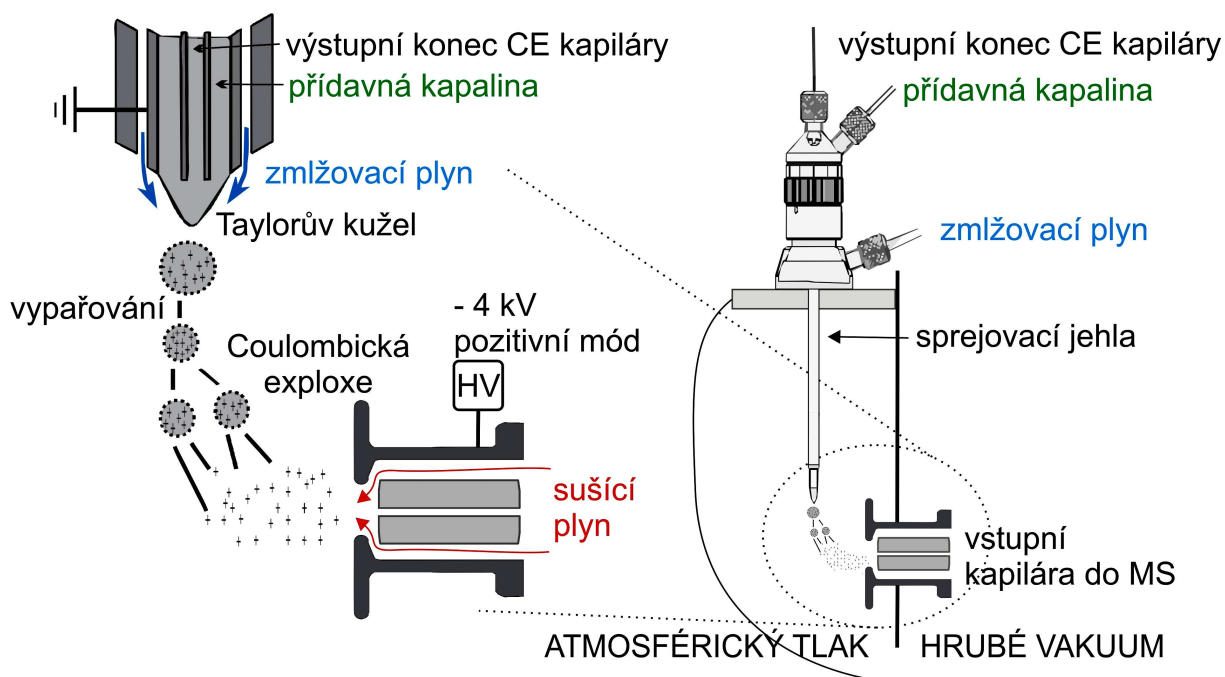
Hmotnostní spektrometrie MS (Mass Spectrometry) je fyzikálně-chemická analytická metoda, při které se převádí zkoumaná látka na ion v plynném stavu a separuje podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Metoda je vhodná pro téměř všechny typy vzorků. Ionty mohou vznikat různými mechanismy, přičemž způsob tvorby iontů výrazně ovlivňuje výsledné spektrum. Separace iontů je založena na interakci iontů s elektrickým nebo i magnetickým polem. Detekované ionty poskytují signál, který je převeden do formy hmotnostního spektra. Informace z něj lze využít k identifikaci sloučenin porovnáváním spektra se známými spektry v knihovnách a také ke zjištění přítomnosti prvků, které mají výrazné zastoupení dvou izotopů (př. Br, Cl). V případě dostatečně vysoké přesnosti a vysokém rozlišení stanovení hmotnosti iontu lze zjistit i pravděpodobné elementární složení sloučeniny. K získání podrobnějších informací o struktuře se využívají fragmentační reakce. Při nich se mateřský ion rozpadá na ionty dceřiné, které se poté detekují.

Kombinací CE a MS se získá vysoká separační účinnost současně s informací o hmotnosti analyzované látky s vysokou citlivostí detekce. Navíc MS poskytuje doplňující strukturní informace o analytu, které pomáhají identifikovat neznámé látky. Problémem při propojení těchto metod je, že využívají pohyb iontů ve zcela rozdílných prostředích. CE dělí ionty podle jejich migrace v roztoku, zatímco MS analyzuje ionty na základě jejich m/z v plynné fázi. Při separaci pomocí CE se využívá mírně vodivý vodný pufr, naproti tomu MS pracuje za vysokého vakua. Primární rolí rozhraní mezi CE a MS je vytvoření "mostu" mezi těmito odlišnými prostředími. Další funkcí je ionizace látek.

Kombinace CE a MS může být uskutečněna jak offline, tak online. Při online propojení je výstupní konec kapiláry napojen přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Hmotnostní analýza probíhá neprodleně po separaci a eluci látky z kapiláry na rozdíl od offline spojení, kde mohou být procesy separace v CE a analýzy pomocí MS časově a prostorově odděleny. Příkladem ionizace využívané při offline CE-MS je MALDI. U online uspořádání se využívá různých druhů ionizace, ale obvykle jde o ionizaci za atmosférického tlaku API (Atmospheric Pressure Ionization), při kterých se vakuum nutné pro MS analýzu vytváří diferenciálním pumpováním. Mezi API techniky patří např. chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), fotoionizace za atmosférického tlaku APPI (Atmospheric Pressure PhotoIonization), a také techniky jako je termosprej TSI (ThermoSpray Ionization) a především elektrosprej ESI (ElectroSpray Ionization).

2.1 ESI IONIZACE

Při této ionizační technice dochází ke sprejování kapaliny, která obsahuje i analyzovanou látku, do jemného aerosolu pomocí elektrického pole. Součástí ESI ionizace je sprejovací jehla umístěná v ionizační komoře, viz Obr. 5. Jehla může být v různém úhlu vzhledem ke vstupnímu otvoru MS. Mezi jehlu a vstupní otvor detektoru se vkládá stejnosměrné napětí 2-5 kV. Pro zvýšení účinnosti rozprašování je jehlou přiváděn koaxiální proud inertního plynu, obvykle se používá dusík. Vznikající drobné kapky mají vysoký povrchový náboj, který zabraňuje jejich shlukování a usnadňuje jejich disperzi. Odpařováním rozpouštědla se zvyšuje povrchový náboj kapičky, až dojde k jejímu roztrhnutí - coulombické explozi. Opakováním tohoto procesu dochází ke snižování objemu kapek, desolvaci a vzniku iontů.

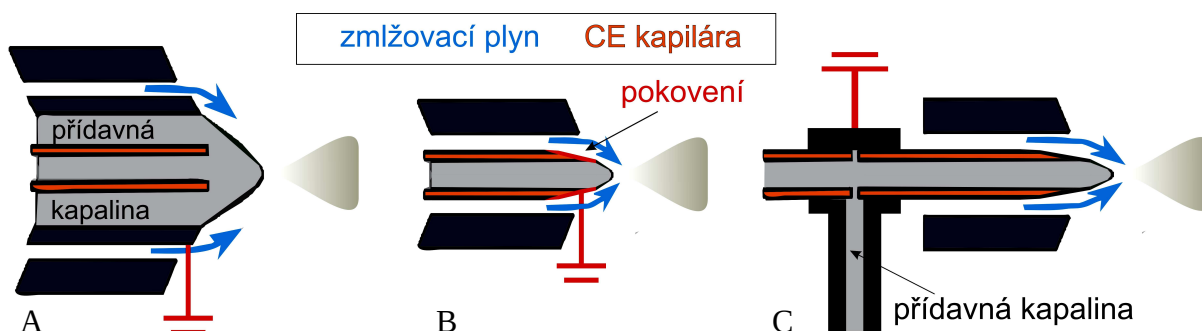


Obr. 5 Schéma ESI ionizace. Orthogonální uspořádání sprejovací jehly a vstupního otvoru MS. Vytvořeno na základě obrázků v literatuře [1].

2.1.1 ROZHRAŇÍ PRO CE-ESI-MS

V běžném uspořádání CE jsou oba konce kapiláry ponořené ve vialkách s BGE. Pomocí elektrod připojených k oběma koncům kapiláry je zajištěn gradient napětí. Při detekci ESI-MS není zachována výstupní vialka. Rozhraní mezi CE a MS musí zajistit elektrický gradient jak pro separaci mezi oběma konci kapiláry, tak pro ionizaci mezi výstupním koncem kapiláry a vstupním otvorem do MS. Nejvhodnějším řešením jsou dva oddělené elektrické obvody. Sprejovací jehla je uzemněná a napětí se vkládá na elektrodu ve vstupní vialce CE a na „capillary shield“. Takto je možné nastavit napětí pro elektroforézu a elektrosprej jednotlivě.

U rozhraní založeného na ESI se ionty tvoří přímo z roztoku proudícího z kapiláry za atmosférického tlaku. Průtoky v kapilární elektroforéze záleží na EOF a obecně jsou velmi malé (v řádu stovek nL/min) a pro tvorbu stabilního spreje je vhodné zajistit dostatečné množství kapaliny. Existují tři způsoby spojení CE a MS, které jsou znázorněny na Obr. 6.



Obr. 6 Různé typy ESI rozhraní: A - s **přídavným tokem**; sheath flow, B - **bez přídavného toku**; sheathless, C - **kapalinový spoj**; liquid junction. Vytvořeno na základě obrázků v literatuře [1].

První způsob řešení přímého propojení CE a MS bylo **rozhraní bez přídavného toku** [16]. Elektrický obvod pro elektroforetickou separaci je uzavřen přímo mezi křemennou kapilárou a vstupní elektrodou. Konec kapiláry se zúží leptáním, pokoví se a připojí do obvodu. Nevýhodou při tomto způsobu spojení je krátká životnost pokoveného konce kapiláry a problémy s udržení stabilního proudu v CE kvůli elektrodovým procesům probíhajícím na konci kapiláry. Na druhou stranu nedochází k žádnému ředění analytů, jako u spojení s přídavným tokem, a tím se snižují limity MS detekce. V roce 2007 publikoval Moini nový způsob spojení CE-MS prostřednictvím porézního konce kapiláry [17]. Z konce kapiláry se odstraní dlouhý úsek polyimidu a křemen je odleptán až na vnější průměr přibližně 90 μm , přičemž vznikne porézní kapilára. Ta umožňuje elektrický kontakt mezi separačním elektrolytem uvnitř kapiláry a elektrolytem, který tuto kapiláru obklopuje. Elektrodotové procesy probíhají až v tomto elektrolytu, a proto neovlivňují separaci. Tento spoj uvedla společnost BeckmanCoulter a bude dostupný komerčně [18].

V dnešní době lze využít komerčně dostupné **rozhraní s přídavným tokem**. Konstrukce rozhraní vychází z uspořádání navrženého pro spojení kapalinové chromatografie a MS. Součástí spojení je přívod pro přídavnou kapalinu a zmlžovací plyn a mechanismus pro přesné nastavení konce kapiláry od konce jehly. Sprejování je díky přístupu přídavné kapaliny nezávislé na průtoku CE. Průtok v CE se odvíjí od rychlosti EOF. Přídavná kapalina slouží i k vymývání produktů elektrolyzy složek BGE, protože elektrodové procesy probíhají na středové kovové kapiláře a neovlivňují separaci. Na druhou stranu dochází díky ředění přídavnou kapalinou k dosažení vyšších limitů detekce MS přístroje.

Při nulovém EOF nebo EOF s obráceným směrem (od detektoru směrem ke vstupní vialce) mohou být pozorovány problémy s udržení stabilního proudu elektroforetické separace [19]. Dochází pravděpodobně k migraci iontů přídavné kapaliny nebo přídavné kapaliny samotné do separační kapiláry. Tento problém se řeší vytvořením pohybu kapaliny v separační kapiláře ve směru k MS pomocí externí pumpy [20].

Kapalinový spoj je tvořen nádobkou s elektrolytem, ve které jsou v těsné blízkosti umístěny separační kapilára a kapilára sprejovací [1]. Mezera mezi těmito kapilárami umožňuje dostatečný přístup kapaliny zajišťující stabilní sprejování. Mezera musí být přesně nastavena, jinak hrozí ztráta teoretických pater při separaci. Nevýhodou je že, BGE musí být zvolen s ohledem jak na separaci, tak na ionizaci. Sprejovací kapilára ale může být zúžena a lze sprejovat s nižšími průtoky a dosáhnout nižších limitů detekce ve srovnání s rozhráním s přídavnou kapalinou. Spoj není komerčně dostupný.

2.1.2 PŘÍDAVNÁ KAPALINA

Složení této kapaliny významně ovlivňuje MS detekci. Kapalina slouží k zajištění elektrického kontaktu mezi BGE a jehlou, a proto musí být vodivá. Hlavní podíl tvoří voda a organické rozpouštědlo, které slouží k zvýšení těkavosti směsi a usnadnění odpařování při sprejování. Obvykle se používá methanol, isopropanol a acetonitril. Vznik kladných nebo záporných iontů je zajištěn přídavkem těkavé kyseliny nebo baze na výslednou koncentraci 0,1 - 1 %. Použití kyseliny je vhodné pro vznik kladných iontů v pozitivním ionizačním módu, obvykle se používají kyselina octová nebo kyselina mravenčí. Naopak baze se přidávají pro vytvoření záporných iontů v módu negativním, využívá se amoniak a byl použit i triethylamin [21].

2.1.3 TYPY IONTŮ

U ESI často vznikají nejen molekulární ionty $[M]^+$, pseudomolekulární ionty $[M + H]^+$ a adukty $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M + NH_4]^+$; ale i vícenásobně nabité ionty $[M + zH]^{z+}$ popřípadě zdvojené molekuly typu $[2M + H]^+$, $[2M + Na]^+$. U záporných iontů lze očekávat $[M - H]^-$ a $[M - zH]^{z-}$ ale i adukty $[M - HCOO]^-$, $[M - CH_3COO]^-$. Vícenásobně nabité ionty se objevují také.

2.2 VZNIK LAMINÁRNÍHO TOKU

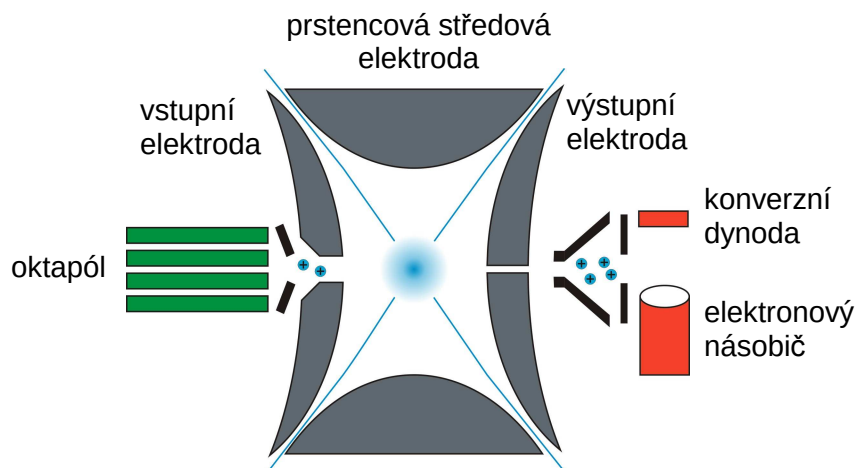
Laminární tok díky svému parabolickému rychlostnímu profilu snižuje separační účinnost. Tok může vznikat sifonovým efektem. Proto musí být oba konce kapiláry ve stejné výšce. Další okamžik, kdy může docházet ke vzniku laminárního toku, je při dávkování. V tomto okamžiku ještě není sepnuté napětí, a proto se neuplatňuje pohyb kapaliny pomocí EOF. Na výstupním konci vzniká díky sprejovacímu plynu podtlak. Proto je vhodné před začátkem separace snížit průtok zmlžovacího plynu na minimum. Průtok zmlžovacího plynu má vliv i na rozlišení při separaci [22]. Při vyšším průtoku nebulizačního plynu dochází ke zkrácení času nutného k separaci, což ale zároveň vede ke snížení počtu teoretických pater. Tento jev se projevuje jak u elektroforetické separace, tak u MS detekce.

2.3 VÝBĚR BGE PRO CE-MS

Při volbě pufru se obvykle volí kompromis mezi podmínkami vhodnými pro separaci a pro ionizaci. Obecně je dosaženo nejnižších limitů detekce MS přístroje při použití nízkých koncentrací těkavých pufrů jako je kyselina octová, kyselina mravenčí, octan amonný, mravenčan amonný a hydrogenuhličitán amonný. Zpravidla se do BGE nepřidávají surfaktanty, jako je dodecylsulfát sodný, protože zhoršují ionizaci analytu a sami poskytují silný signál jak v negativním, tak v pozitivním módu. Pokud z důvodů nedostatečné separace nelze použít těkavé pufrů, lze využít i netěkavých pufrů [23]. Ty se používají v koncentracích nižších, než je obvyklé v samotné CE. Byly použity například fosfát, boritan nebo citrát sodný. V tomto případě jsou dosaženy limity detekce vyšší, iontový zdroj je nutné častěji čistit a je potřeba vhodně zvolit přídatnou kapalinu, která tento BGE ředí.

2.4 IONTOVÁ PAST

Po ionizaci analytu se pomocí iontové optiky ionty transportují do hmotnostního analyzátoru, který separuje ionty podle jejich m/z . Iontová past využívá radiofrekvenčního pole k zachycení a vypuzení iontů. Schematický náčrt je na Obr. 7, zařízení je ve skutečnosti velké zhruba jako tenisový míček. Skládá se ze vstupní a z výstupní elektrody, které tvoří uzávěry, a z prstencové středové elektrody. Krajní elektrody jsou uzemněny, na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Pohyb iontů vyvolaný elektrickým polem zajišťuje zachycení těchto iontů nebo jejich vypuzení z pasti. Zachycené ionty se pohybují po uzavřených kruhových drahách. Při zvýšení frekvence vysoko frekvenčního pole dochází k zachycení iontů s nižším m/z .



Obr. 7 Schéma iontové pasti. Vytvořeno na základě obrázků v literatuře [1].

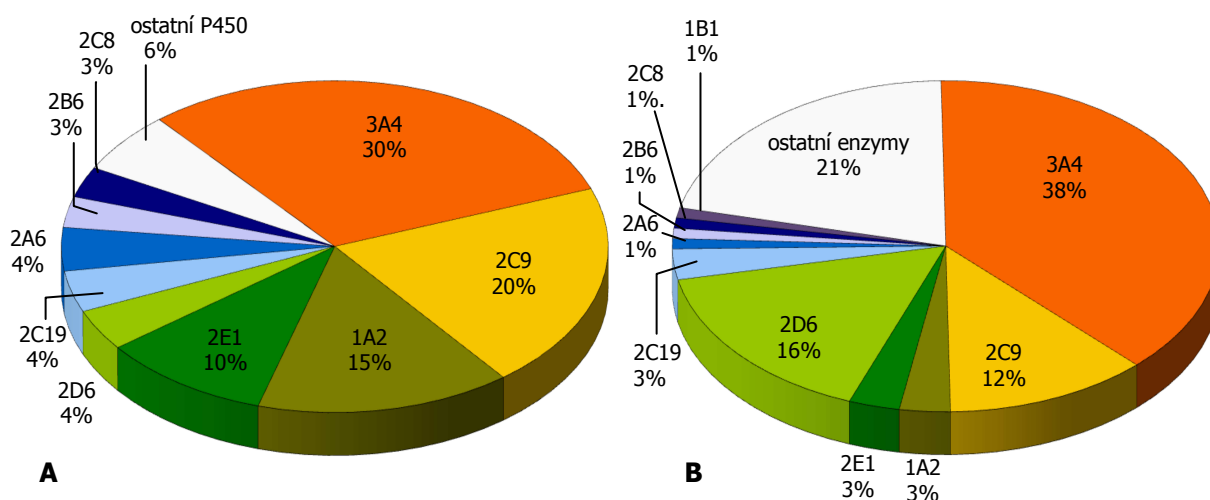
Velmi užitečná je možnost zachycení jednoho konkrétního iontu, ostatní jsou vlivem pole vypuzeny z pasti. Izolovaný ion může být následně fragmentován kolizí s inertním plynem (He , N_2) a fragmenty po vypuzení z pasti detekovány. Výhodou iontové pasti je, že umožňuje provádět několikanásobné fragmentace v jednom hmotnostním analyzátoru. Fragmentace a izolace je oddělená časem. Další výhodou je možnost zachycení a akumulace iontů, což zvyšuje intenzitu signálu.

3 METABOLISMUS XENOBIOTIK

Živý organismus při eliminaci cizorodých látek využívá celou řadu metabolických drah, které zajišťují degradaci polutantů, pesticidů, léčiv, karcinogenů a dalších látek. Vzhledem k lipofilní povaze většiny léčiv je nutné tyto látky přeměnit na sloučeniny více rozpustné ve vodě, aby mohlo docházet k jejich vyloučení (především močí). Při metabolismu léčiv dochází nejprve k zvýšení jejich polarizity při první fázi. Při druhé fázi se s těmito polárními látkami konjugují sloučeniny, které zvyšují jejich rozpustnost ve vodě. Ve třetí fázi dochází pomocí membránových transportérů k vyloučení sloučeniny z buňky. První fáze probíhá ve většině tkání, ale největší podíl mají na tomto metabolismu játra, ledviny, trávicí trakt a plíce. Nejčastěji uplatňované reakce první fáze metabolismu jsou oxidace, redukce a hydrolýza.

3.1 CYTOCHROMY P450

Na oxidačním metabolismu léčiv se významnou měrou podílí cytochromy P450, které tvoří superrodinu hemoproteinů s monooxygenasovou funkcí. Jejich největší výskyt je v játrech. Podílí se na metabolismu xenobiotik i endogenních látek např. biosyntéze steroidů. Cytochromy P450 se často označují zkratkou CYP (CYtochrome P450). U člověka bylo nalezeno 57 CYP a z nich se přibližně 15 podílí na metabolismu léčiv a ostatních xenobiotik [24], [25]. Biotransformaci zhruba 90 % léčiv zprostředkovává pět enzymů: CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6 a CYP 3A4 [24]. Množství těchto enzymů v jednotlivých tkáních se může lišit v závislosti na genetickém polymorfismu, a v případě inducibilní formy i na vlivu vnějšího prostředí, výživě, kouření, konzumaci alkoholu a spolupůsobení podávaných léčiv. Obr. 8 znázorňuje výskyt cytochromů a jejich podíl na metabolismu léčiv.



Obr. 8 **A** Zastoupení hlavních jaterních CYP podílejících se na metabolismu léčiv. **B** Podíl těchto CYP na první fázi metabolismu léčiv. Enzymy neobsahující CYP jsou zahrnuty v kategorii ostatní enzymy. Grafy vytvořeny na základě údajů z literatury [24], [25].

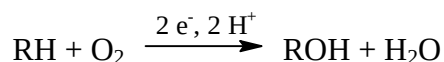
3.1.1 NÁZVOSLOVÍ A STRUKTURA CYP

Pojmenování jednotlivých CYP je založeno na podobnosti v primární struktuře. Za písmeny CYP následuje číslo, které enzymy rozděluje do rodiny. Enzymy zařazené do stejné rodiny mají společné více jak 40 % aminokyselinové sekvence. Příslušnost do podrodiny se značí

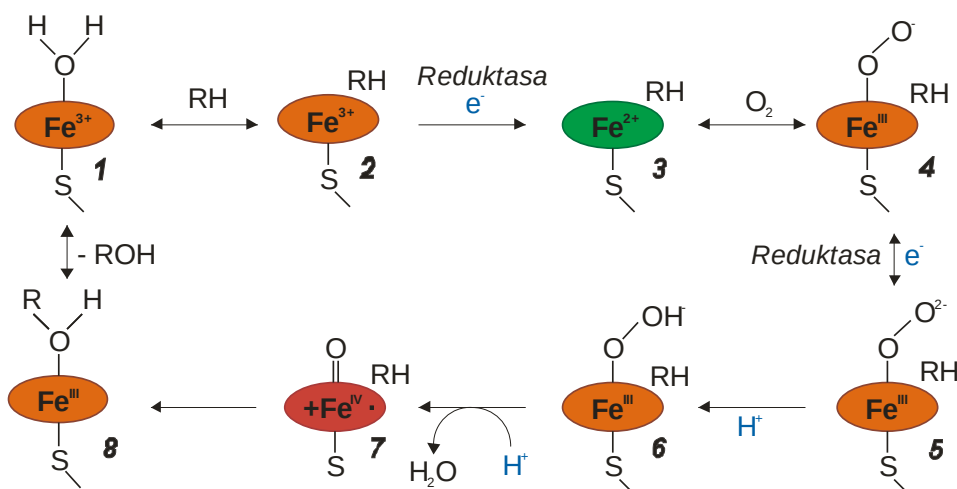
prostředním písmenem. V podrodině musí být více jak 55 % shoda aminokyselinové sekvence. Konkrétní enzym je označen posledním číslem. Jednotlivé enzymy se od sebe musí lišit alespoň ve 3 %. Nejkonzervovanější aminokyselinou všech CYP je cysteinový zbytek, který se váže jako pátý ligand na hemové železo. Tento ligand má klíčovou roli při štěpení kyslíkové vazby. Thiolátová skupina je součástí konzervované výdutě nazývané β -bulge. Sekvence této oblasti je F-XX-G-K(R)-XX-C-X-G [26].

3.1.2 FUNKCE CYP

CYP oxidují strukturně rozdílné substráty (RH) prostřednictvím molekuly kyslíku. Oba atomy kyslíku jsou redukovány pomocí 4 redukčních ekvivalentů ($2e^-$, $2H^+$). Jeden z atomů kyslíku je vnesen do molekuly substrátu a vzniká hydroxylovaný produkt (ROH). Z druhého atomu kyslíku vzniká molekula vody. Přenos elektronů z hemového železa na kyslík je popsán v katalytickém cyklu na Obr. 9. Děje popisuje souhrnná rovnice:



Na začátku cyklu je hemové železo v oxidačním stavu Fe^{3+} koordinováno šesti ligandy (1). Čtyřmi atomy dusíku z hemu, SH skupinou z cysteinu a šestým slabě vázaným ligandem je kyslík vody. Po vniknutí substrátu RH do aktivního místa dochází k vytlačení vody (2). Vazbou substrátu dochází k usnadnění přijetí elektronu od reduktasy a redukci hemového železa na Fe^{2+} (3). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík a vzniká ferrisuperoxidový komplex (4). Tento komplex není příliš stabilní a snadno přijímá od reduktasy druhý elektron, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (5). Jde o aktivní formu cytochromu P450, která je schopná štěpit vazbu mezi kyslíky. Po přijetí dvou protonů je jeden z kyslíků redukován za vzniku molekuly vody. Druhý atom kyslíku zůstává navázaný na železe v oxyferrylovém radikálovém komplexu (7). Tento reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 (1) a hydroxyderivátu substrátu ROH [26].



Obr. 9 Katalytický cyklus cytochromu P450 [26].

3.1.3 INTERAKCE S DALŠÍMI SLOŽKAMI

Tyto enzymy se v eukaryotických buňkách vyskytují vázané na membránu. Ačkoli bylo nalezeno několik CYP vázaných na membránu mitochondrií, většina jich je vázaná na cytoplasmatickou stranu membrány endoplasmatického retikula. Na membráně hemoproteiny ke své funkci vyžadují interakci s dalšími proteiny, které tvoří redoxní partnery CYP a poskytují elektrony k redukci hemového železa. Enzymy mohou být podle reduktasy rozděleny na 4 skupiny [26].

1. V bakteriích i eukaryotech se na mitochondriálních membránách nacházejí CYP, které přijímají elektrony od feredoxinu prostřednictvím Fe-S klastru obsaženém ve feredoxin reduktase.
2. U eukaryot se na endoplasmatickém retikulu nachází CYP, který elektrony získává od NADPH. Jde o dva jedoelektronové přenosy. Předání prvního elektronu z NADPH probíhá pomocí cytochrom P450:NADPH oxidoreduktasy označované CPR. CPR je diflavoprotein, který obsahuje FAD i FMN. Tok elektronů je ve směru $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{Hem}$. Druhý elektron je poskytován buď opět s využitím CPR anebo pomocí cytochromu b_5 , který přenáší elektrony z NADH.
3. U bakterií byly objeveny i fúzané enzymy, ve kterých je CYP spojen s CPR polypeptidovým řetězcem.
4. Některé organismy obsahují CYP schopné přijmout elektron přímo od NADPH.

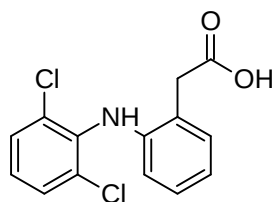
Nejjednodušší systém závislý na NADPH obsahuje CYP, CPR, fosfolipidovou membránu, NADPH a substrát.

3.1.4 PODRODINA 2C

V lidských játrech jsou z CYP nejvíce obsaženy isoformy podrodiny 3A a 2C. Enzymy z podrodiny CYP 2C tvoří v průměru 18 % celkového obsahu jaterních CYP [24]. Podrodinu 2C tvoří 4 isoformy: CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C18 a CYP 2C19, ze kterých jsou pro metabolismus léčiv důležité zejména CYP 2C9 a CYP 2C19. I přes strukturní homologii v rámci podrodiny vykazují tyto enzymy rozdílnou substrátovou specifitu. Například CYP 2C9 se liší jen v 43 aminokyselinách ze 490 od CYP 2C19. Kvantitativně nejvíce je exprimován CYP 2C9 a jeho obsah v játrech zhruba pětkrát převyšuje expresi CYP 2C19. Mezi substráty CYP 2C9 patří především S-warfarin, tolbutamid, protizánětlivá léčiva (diclofenak, ibuprofen) a některá antiepileptika (fenytoin).

3.2 DICLOFENAK

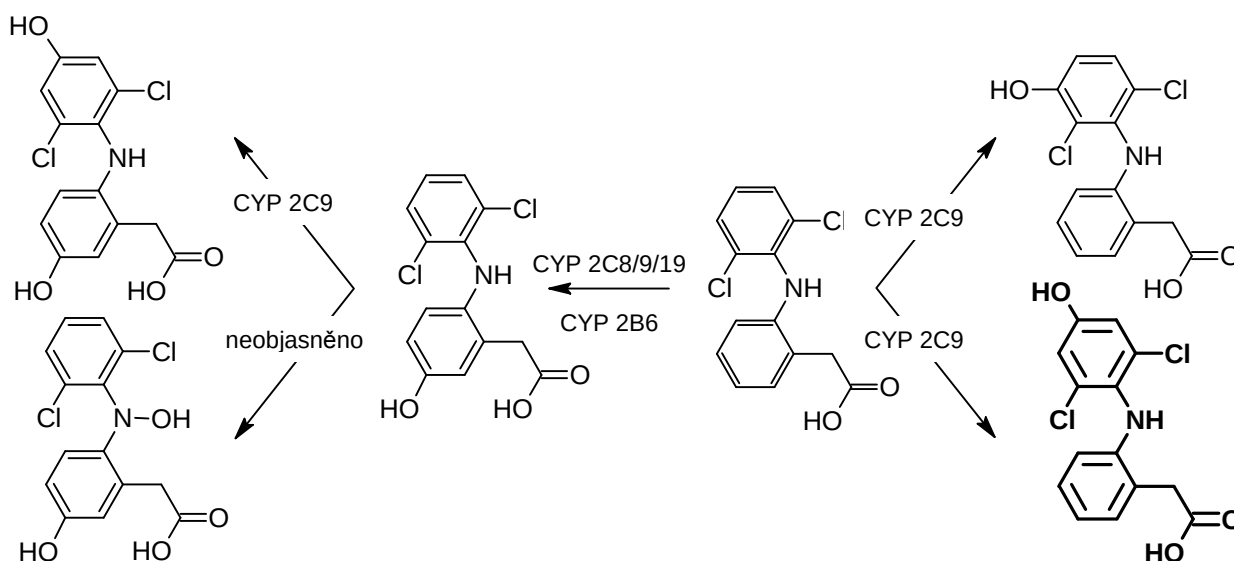
Diclofenak (DC) je derivát aryloctové kyseliny. Na Obr. 10. je strukturní vzorec této látky se systematickým názvem {2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}octová kyselina.



Obr. 10 Struktura diclofenaku.

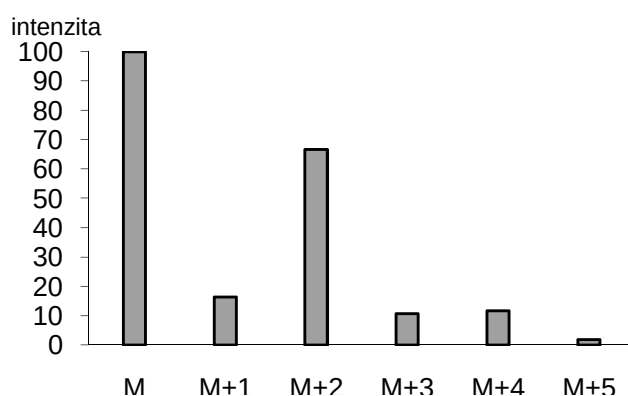
Jde o nesteroidní protizánětlivé léčivo. Představuje účinnou látku v lécích určených k léčbě revmatických onemocnění (revmatická artritida, osteoartritida) a v analgetických. Po podání DC dochází u člověka k rozsáhlému metabolismu DC v játrech zahrnující hydroxylaci zprostředkovanou CYP a může také docházet ke konjugacím reakcím s kyselinou glukuronovou a glutathionem [27]. Metabolity se nachází v plasmě a žluči, vylučují se z organismu močí.

Při metabolismu DC prostřednictvím cytochromů dochází ke vzniku hydroxyderivátů, na jejichž vzniku se podílí různé isoformy: 1A2, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2B6, 3A4 [28]. Majoritním produktem je 4'-hydroxydiclofenac (OHDC), který je v metabolické dráze na Obr. 11 zvýrazněn tučně. Za jeho vznik je téměř výhradně zodpovědný CYP 2C9 (99,5 %) [28]. Specifické přeměny DC na OHDC 4'-hydroxylací se využívá ke stanovení obsahu aktivní formy CYP 2C9.

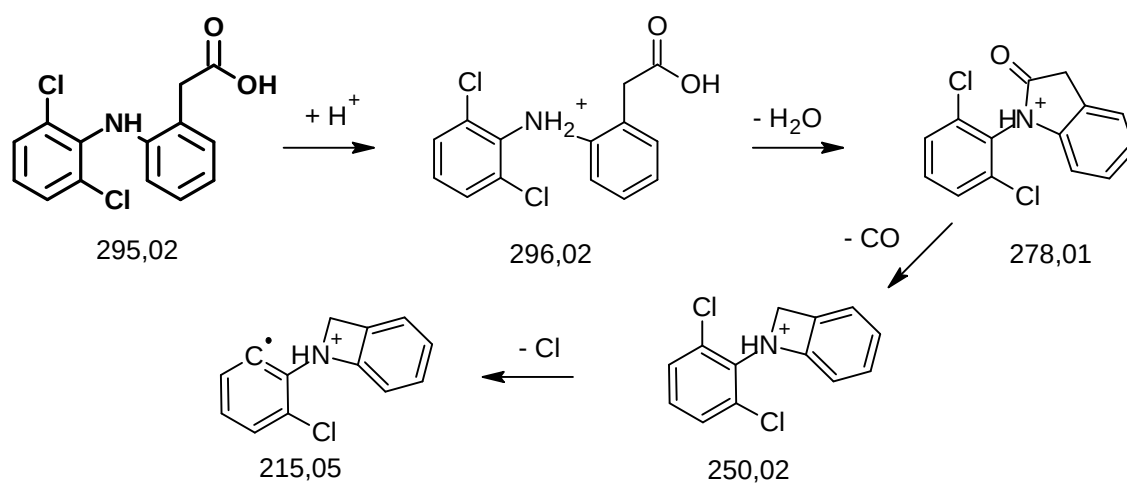


Obr. 11 Metabolismus diclofenaku zprostředkovaný cytochromy P450 v lidských hepatocytech. Hlavní produkt 4'-hydroxydiclofenak je zvýrazněn tučně. Převzato z literatury [28].

Monoisotopická molekulová hmotnost DC je 295,02. Při ESI ionizaci v kladném módu vzniká především molekulární kladně nabitý ion $m/z = 296$ [29]. Ve sloučenině jsou přítomny dva atomy chloru, které se v přírodě přirozeně vyskytují ve dvou isotopech ^{35}Cl a ^{37}Cl . Molekula DC je v hmotnostním spektru charakteristická výskytem isotopických píků M , $M + 2$ a $M + 4$ ve vzájemném poměru 9:6:1 a lze očekávat 2 hlavní isotopické píky s rozdílem dvou jednotek m/z . Intenzita druhého píku bude 2/3 intenzity prvního píku, jak je znázorněno na Obr. 12. Navržené schéma fragmentace DC je převzato z literatury a je uvedeno na Obr. 13. a lze očekávat, že podobné fragmentační reakce budou platit i pro OHDC.



Obr. 12 Isotopický výskyt DC a OHDC v případě $z = 1$. Graf sestaven z hodnot free software Molecular Weight Calculator.



Obr. 13 Schéma fragmentace diclofenaku převzaté z literatury [29]. Pod sloučeninami jsou uvedené monoisotopické hmotnosti

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vytvoření metody, která využívá prostor v kapiláře jak pro uskutečnění inkubační reakce, tak pro separaci produktů od reaktantů pomocí kapilární elektroforézy. V těchto on-line inkubačních reakcích byly uplatňovány enzymy první fáze metabolismu léčiv, konkrétně CYP 2C9 a jako modelový substrát sloužil diclofenak. K míchání reakční směsi byla použita technika elektroforeticky zprostředkované mikroanalýzy EMMA (Electrophoretically Mediated MicroAnalysis). Dalším krokem bylo využití on-line inkubační metody při spojení kapilární elektroforézy s detekcí hmotnostním spektrometrem.

5 PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 CHEMIKÁLIE

- Sodná sůl diclofenaku, Sigma-Aldrich, Německo
- Sodná sůl 4'-hydroxydiclofenaku, čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- NADPH, čistota 93 – 100 %, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan baze, $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Kyselina chlorovodíková, p. a., Fluka, Německo
- Kyselina boritá, purum, Lachema-Chemapol, Česká republika
- Hydroxid sodný, p. a., ONEX, Česká republika
- Octan amonný, p. a., Fluka, Nizozemí
- Amoniak, p. a., Fluka, Německo
- Kyselina octová, p. a., Fluka, Německo
- Kyselina mravenčí, p. a. pro MS, Fluka, Německo
- Voda, LC-MS, Fluka, Švýcarsko
- Kalibrační roztoky pufrů pro pH-metr, Hanna Instruments, Rumunsko
- Deionizovaná voda z přístroje Millipore, Millipore, Francie

5.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Lidský mikrosomální CYP 2C9 s cytochrom P450 reduktasou připravený expresí v hmyzích buňkách Sf9 (Sigma-Aldrich, Massachusetts, USA)

5.3 PŘÍSTROJE

- Agilent 3D Kapilární elektroforetický systém, detektor: diodové pole s UV-VIS detekcí s rozsahem 190 - 600 nm (Waldbronm, Německo), software: Agilent 3D CE ChemStation
- Agilent 6320 Iontová past (Waldbronm, Německo), software: Bruker Daltonik 6300 Series TrapControl
- Agilent interface sprejovací jehla pro CE-MS využívající Agilent IsoPump 1200 Series opatřená Agilent Degasser 1620 Infinity (Waldbronm, Německo)
- Křemenné kapiláry: vnitřní průměr 50 a 75 μm (Polymicro Technologies, Arizona, USA)
- pH-metr: EA 940 (Orion Research, Massachusetts, USA)
- Ultrazvuková lázeň: Branson 1510 (Branson Ultrasonic, Connecticut, USA)
- Třepačka: Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga: miniSpin (Eppendorf, Německo)
- Chladicí box s keramickými kuličkami: N°ICE (Techne, Velká Británie)
- Digitální váhy: Sartorius 2004 MP (Sartorius, Švýcarsko)
- Stříkačkový filtr s nylonovou membránou, velikost pórů 0,45 μm
- Automatické pipety

5.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Při přípravě všech BGE použitých pro kapilární elektroforézu byl roztok na závěr zfiltrován buď přes stříkačkový filtr nebo pomocí filtrační aparatury a před použitím byl odplyněn 10 minut v ultrazvukové lázni. Hodnota pH BGE, které byly upravovány titrací, byla pro zajištění stabilního pH kontrolována každý den pomocí pH-metru a v případě neshody s požadovanou hodnotou opět upravena. Pufry byly přes den uchovávány při laboratorní teplotě a přes noc v chladničce. Další roztoky pro elektroforézu např. hydroxid sodný a kyseliny pro promývání byly po přípravě pouze filtrovány.

Jako inkubační pufr (IB) pro průběh reakce substrátu a cytochromu byl zvolen na základě literatury [30] 50 mM TRIS-HCl o pH 7,50. Pufr se připravoval z 50 mM roztoku TRIS baze a požadované pH bylo nastaveno titrací koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou pomocí pH-metru. Na závěr byl roztok filtrován. Tento pufr se používal k přípravě všech měřených vzorků.

Preparát s enzymem CYP 2C9 byl po dodání rozmražen, rozpipetován do alikvotů po 10 anebo 20 μ l a uchováván při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. V den použití byl enzym po rozmražení naředěn inkubačním pufrem na požadovanou koncentraci a uchováván při teplotě $2 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ v chladicím boxu. Do karuselu pro vzorky byla mikrovialka s roztokem enzymu vkládána těsně před jeho dávkováním do kapiláry.

Roztok NADPH byl chystán čerstvý každý den a během dne byl uchováván společně s enzymem v chladicím boxu.

Při přípravě přídavné kapaliny pro CE-MS analýzu bylo využíváno pouze skleněné laboratorní nádobí, byla používána voda čistoty LC-MS a roztok nebyl filtrován ani odplyňován. Roztoky pro CE-MS analýzu byly připravovány do skleněných vialek s výjimkou hydroxidu sodného, který byl připravován do plastové vialky z polypropylenu.

5.5 PŘÍPRAVA KAPILÁRY

Vnitřní povrch každé kapiláry byl nejprve aktivován promýváním při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí série roztoků v pořadí uvedeném v Tab. 1:

Tab. 1 Kroky při aktivaci nové kapiláry

Pořadí	Příkaz	Roztok	Doba [min]
1	promytí - flush	deionizovaná voda	2
2	promytí - flush	1 M NaOH	20
3	čekání - wait	-	5
4	promytí - flush	deionizovaná voda	15
5	promytí - flush	BGE	20
6	promytí - flush	deionizovaná voda	15

promytí – flush: promývání kapiláry pomocí tlaku přibližně 950 mbar

Kapilára byla používána nejdéle měsíc v případě měření, při kterých byl do kapiláry dávkován protein. Poté byla nahrazena kapilárou novou.

6 VÝSLEDKY

6.1 ON-LINE REAKCE DC A CYP 2C9

Tato práce navazuje na diplomovou práci A. Mádra [31], který zjistil, že enzymatická reakce CYP 2C9 a diclofenaku je v kapiláře pravděpodobně znemožněna přidáním surfaktantu dodecylsulfátu sodného (SDS) do BGE. Největší vliv má SDS na proteiny, protože způsobuje jejich denaturaci a z tohoto důvodu se SDS do BGE nepřidával. Další jev, který mohl ovlivnit enzymatickou reakci, je pokrytí vnitřního povrchu kapiláry proteiny z enzymového preparátu, a z tohoto důvodu byla kapilára intenzivně promývána.

6.1.1 PROMÝVÁNÍ KAPILÁRY

Každý den měření byl zahájen následujícími kroky při 37 °C popsanými v Tab. 2, které zajišťovaly, že vnitřní povrch kapiláry bude mít i pro první analýzu co nejpodobnější předchozí podmínky:

Tab. 2 Kroky při prvním promývání daného dne.

Pořadí	Příkaz	Roztok	Doba [min]
1	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
2	promytí - flush	0,5 M HCl	2
3	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
4	promytí - flush	1 M NaOH	2
5	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
6	promytí - flush	BGE	3
7	aplikace napětí 14 kV	BGE	3
8	promytí - flush	BGE	3

promytí – flush: promývání kapiláry pomocí tlaku přibližně 950 mbar

Promývání během dne před a po analýze při 37 °C je popsáno v Tab. 3:

Tab. 3 Kroky při promývání před a po analýze.

Pořadí	Příkaz	Roztok	Doba [min]
Před analýzou:			
1	promytí - flush	BGE	2
2	aplikace napětí 14 kV	BGE	1
3	promytí - flush	BGE	2
Po analýze:			
4	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
5	promytí - flush	0,5 M HCl	2
6	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
7	promytí - flush	1 M NaOH	2
8	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5

promytí – flush: promývání kapiláry pomocí tlaku přibližně 950 mbar

Na závěr dne byla kapilára promyta 10 min vodou při 50 °C.

6.1.2 VÝBĚR SEPARAČNÍCH PODMÍNEK PRO INKUBAČNÍ REAKCI VEDENOU V KAPILÁŘE

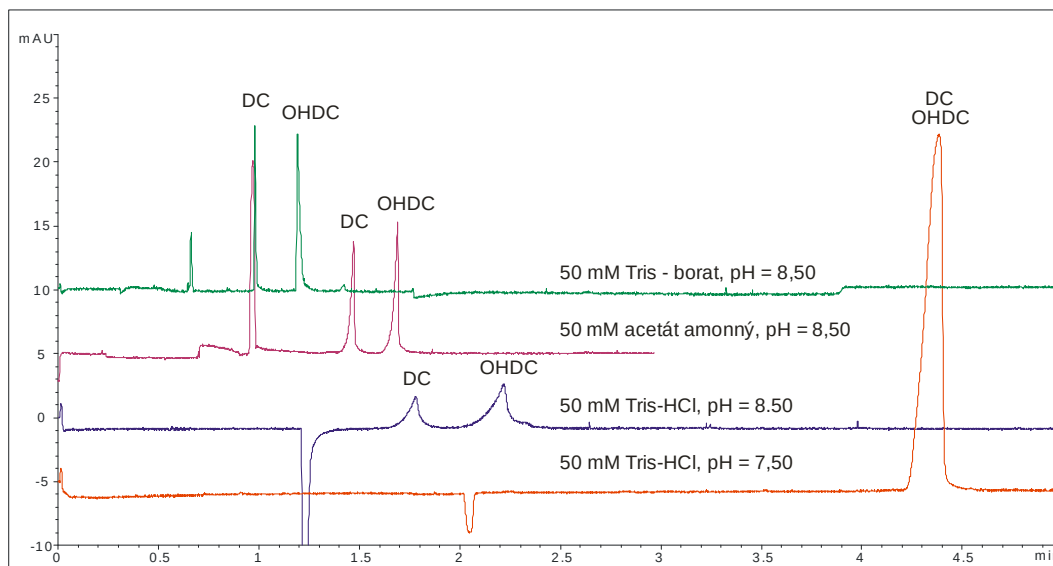
Pro separaci látek byla nejprve zvolena teplota 37 °C, a to hlavně kvůli enzymatické reakci. Jak již bylo zmíněno výše do BGE se nepřidával SDS. Dalším kritériem při výběru BGE byla možnost dávkovat dlouhou zónu vzorku a tím umožnit nadávkovat co největší objem inkubační směsi do kapiláry. Během měření se ukázalo, že výběr BGE ovlivňuje i možnost ponechání vzorku v kapiláře na dobu nutnou pro inkubaci.

VÝBĚR BGE

Při volbě BGE byl vyzkoušen k separaci standardů substrátu a produktu i inkubační pufr 50 mM TRIS-HCl, pH 7,50 a stejný pufr s hodnotou pH upravenou na 8,50, což je pH vhodné pro separaci těchto látek. Jako další BGE byl vyzkoušen roztok TRIS-borátu o koncentraci 50 mM TRIS baze upravované roztokem 0,8 M kyseliny borité na pH 8,50. Vzhledem k možnému pozdějšímu spojení s hmotnostní spektrometrií byl vyzkoušen i těkavý pufr acetát amonný o koncentraci 50 mM a pH 8,50. Záznamy při těchto podmínkách jsou na Obr. 14.

Podmínky separace:

Vzorek:	100 μ M DC, 100 μ M OHDC v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Dávkování:	tlakem 150 mbar·s
Teplota v kazetě:	37 °C
Kapilára:	vnitřní průměr 50 μ m, L_{tot} 34 cm, L_{eff} 25,5 cm
Napětí:	30 kV
DAD:	UV detekce v 25,5 cm při 200 nm



Obr. 14 Vliv složení BGE na separaci směsi standardů diclofenacu DC a 4'-hydroxydiclofenacu OHDC o koncentraci 100 μ M rozpuštěných v inkubačním pufru.

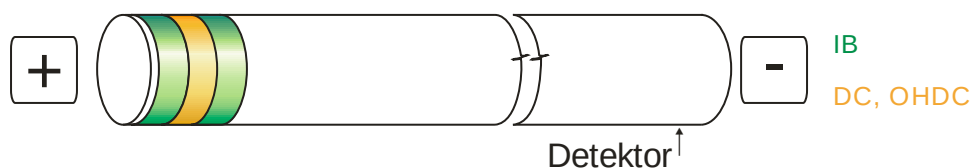
Při použití inkubačního pufru jako BGE nedocházelo k separaci standardů, proto byl poté použit tento BGE s hodnotou pH upravenou na 8,50. Separace s tímto BGE je možná, nicméně má nedostatečnou účinnost. Při použití acetátu amonného a TRIS-borátu jako BGE dochází k separaci standardů a účinnost separace je dostačující, proto byly k dalším měřením vybrány tyto roztoky.

ČÁSTEČNÉ PLNĚNÍ INKUBAČNÍM PUFREM

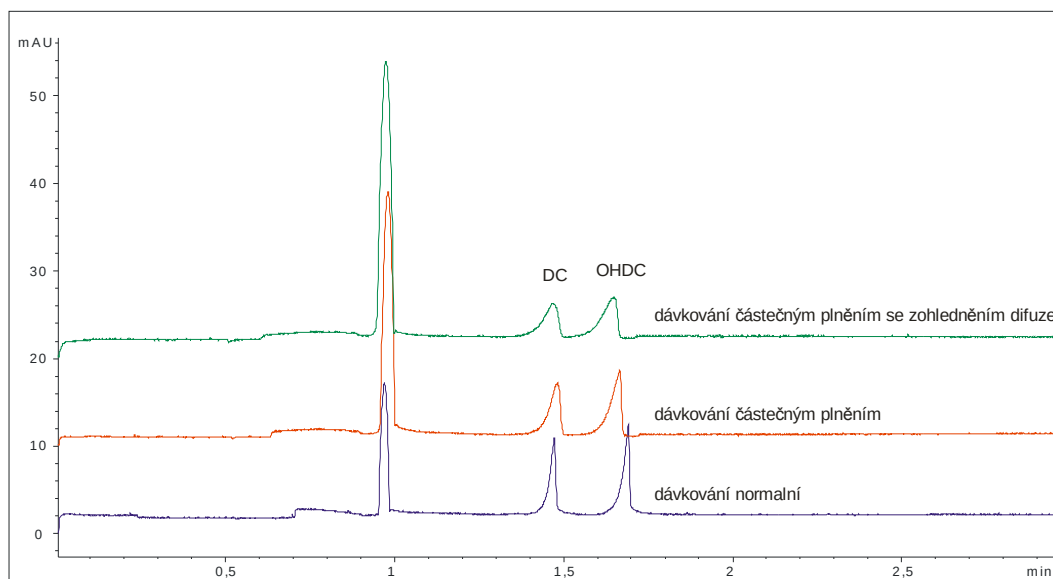
Vzhledem k tomu, že nebylo možné použít k separaci stejný pufr jako k inkubační reakci bylo nutné pro budoucí uskutečnění reakce v kapiláře využít mód částečného plnění, při kterém se před a za zónu vzorku přidá zóna inkubačního pufru. Schéma dávkování pro částečné plnění je na Obr. 15. Zároveň byl zkoumán i vliv difuze při budoucí inkubační reakci a to desetiminutovým čekáním před sepnutím napětí a startem analýzy. Vliv přidání zóny před a za zónu vzorku a vliv difuze byl proměřen s 50 mM acetátem amonným (pH 8,50) a 50 mM TRIS-borátem (pH 8,50). Závislosti jsou uvedeny v elektroforeogramu na Obr. 16 a Obr. 17.

Podmínky separace:

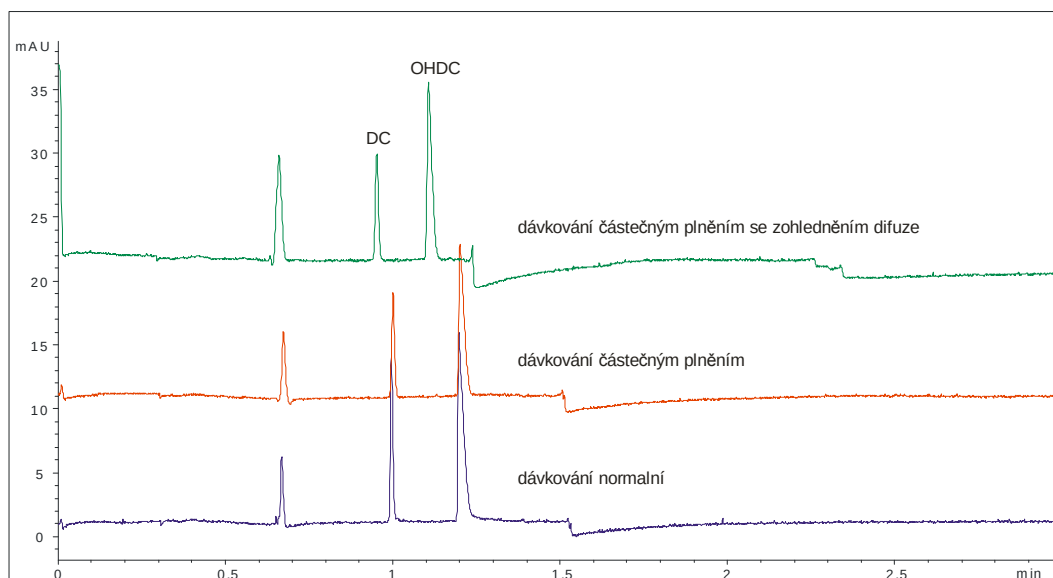
Vzorek:	100 μ M DC, 100 μ M OHDC v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Inkubační pufr zn. IB:	TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Dávkování:	tlakem 10 mbar:
<i>Normální:</i>	10 s vzorek
<i>Částečné plnění:</i>	10 s IB, 15 s vzorek, 10 s IB
<i>Částečné plnění se zohledněním difuze:</i>	10 s IB, 15 s vzorek, 10 s IB, čekání 10 min
Teplota v kazetě:	37 °C
Kapilára:	vnitřní průměr 50 μ m, L_{tot} 34 cm, L_{eff} 25,5 cm
Napětí:	30 kV
DAD:	UV detekce v 25,5 cm při 200 nm



Obr. 15 Schéma dávkování pro zjištění vlivu částečného plnění a difuze při čekání 10 min na separaci



Obr. 16 Vliv částečného plnění a difuze při čekání 10 min na separaci s acetátem amonným jako BGE.

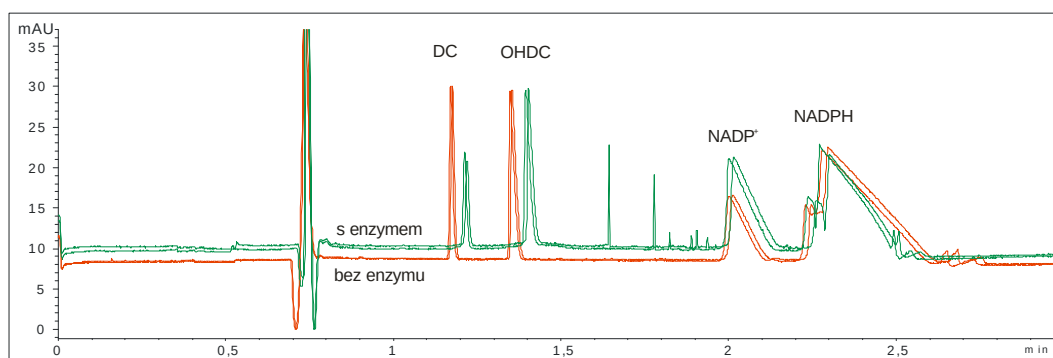


Obr. 17 Vliv částečného plnění a difuze při čekání 10 min na separaci s TRIS-borátem jako BGE.

Při použití acetátu amonného jako BGE docházelo při využití částečného plnění a při 10 minutovém čekání ke snížení účinnosti separace, na rozdíl od toho se při použití TRIS-borátu jako BGE neprojevovali žádné významné změny při separaci standardů. Na základě těchto výsledků byl pro separaci látek zvolen TRIS-borátový pufr.

SEPARACE S CELOU INKUBAČNÍ SMĚSÍ

Dále bylo ověřeno, že dochází i k separaci standardů substrátu a produktu od kofaktorů NADPH a NADP⁺, které jsou součástí reakční směsi. Do vzorku bylo přidáno NADPH o výsledné koncentraci 2 mM, z něj vzniká při inkubaci nebo degradaci v inkubačním pufru jeho oxidovaná forma. Tyto látky se v záznamu objevují až za DC a OHDC. Dále byl do vzorku přidán enzym o koncentraci 52 nM. Přidáním enzymu došlo ke ztrátě separace, a proto bylo upraveno pH BGE z 8,50 na 8,10. Separace při nových podmínkách je na Obr. 18. Schéma dávkování je shodné jako v předchozím pokusu. Podmínky při těchto měřeních byly rovněž stejné až na jiné pH BGE a prodlouženou dobu čekání (15 min) před spuštěním analýzy. Při těchto podmínkách je separace úspěšná.



Obr. 18 Separace celé inkubační směsi s enzymem a bez enzymu. Po nadávkování se čekalo 15 min a pH BGE bylo 8,10.

6.1.3 USKUTEČNĚNÍ INKUBAČNÍ REAKCE V KAPILÁŘE

Po zajištění podmínek pro separaci celé inkubační směsi byla ověřena možnost uskutečnit inkubační reakci v kapiláře. Vzhledem k různým způsobům uskutečnění reakce byly využívány 3 postupy.

1) Off-line inkubace na třepačce:

Reakční směs byla připravena tak, aby obsahovala požadovanou výslednou koncentraci substrátu a NADPH (100 μ M a 2 mM). Tato směs se nechala pre-inkubovat 5 minut na třepačce při teplotě 37 °C a 450 rpm. Reakce byla odstartována přidáním enzymu, tak aby výsledná koncentrace byla 52 nM. Po uplynutí času inkubace byla reakční směs zastavena zmražením na -70 °C. Při analýze byl vzorek rozmražen těsně před dávkováním a převeden do dávkovací vialky.

2) On-line inkubace v kapiláře s ručně míchanou směsí:

Reakční směs byla připravena tak, aby obsahovala požadovanou výslednou koncentraci substrátu a NADPH (100 μ M 2 mM). Reakce byla odstartována přidáním enzymu těsně před dávkováním, tak aby výsledná koncentrace byla 52 nM. Poté byla směs převedena do dávkovací vialky, umístěna do karuselu a nadávkována. Směs byla inkubována v přímo v kapiláře a po uplynutí inkubačního času byla analyzována.

3) Off-line inkubace v karuselu:

K tomuto účelu byla využita reakční směs připravená pro on-line inkubaci míchanou ručně. Po nadávkování směsi do kapiláry byla dávkovací vialka ponechána v karuselu, kde byla teplota 27 °C, a po uplynutí času inkubace byla reakční směs zastavena zmražením na -70 °C. Při analýze byl vzorek rozmražen a promíchán těsně před dávkováním.

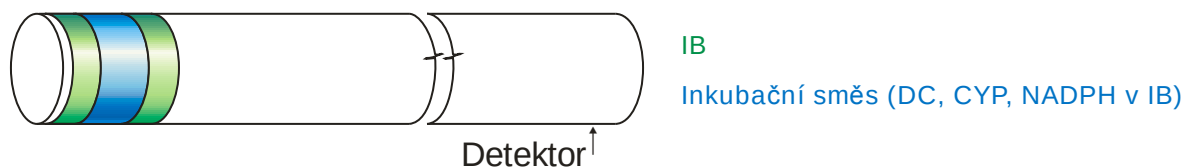
Z roztoku připraveného pro on-line inkubaci míchanou ručně byl také po nadávkování reakční směsi do kapiláry odebrán alikvot a okamžitě zamražen. Tato směs sloužila jako kontrola, kolik produktu vzniklo při všech manuálních operacích.

Tyto postupy sloužily k různým účelům. Postup 1) ověřoval, že reakční směs je funkční při standardních podmínkách. Postupem 2) se zjišťovalo, jestli inkubace může probíhat i uvnitř kapiláry. Postup 3) zajišťoval velmi podobné podmínky které byly při postupu 2), tedy nehomogenizovaná reakční směs a stejná teplota při inkubaci.

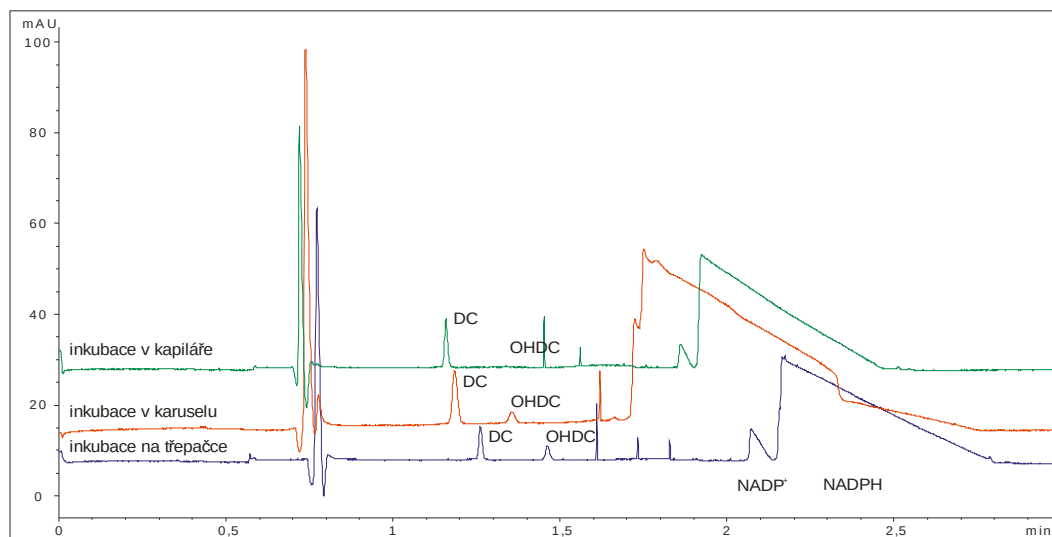
Podmínky separací pro všechny postupy:

Vzorek:	100 μ M DC, 52 nM CYP, 2 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Dávkování:	tlakem 10 mbar: 10 s IB, 15 s vzorek, 10 s IB
Inkubace:	15 min
Teplota v kazetě:	37 °C
Teplota v karuselu:	27 °C
Kapilára:	vnitřní průměr 50 μ m, L_{tot} 34 cm, L_{eff} 25,5 cm
Napětí:	30 kV
DAD:	UV detekce v 25,5 cm, 200 nm
BGE:	50 mM TRIS-borát, pH 8,10

Při těchto měřeních bylo dávkováno do kapiláry podle schématu na Obr. 19. Elektroforeogramy se záznamy jsou na Obr. 20. Zelená křivka odpovídá záznamu pro separaci po inkubaci v kapiláře. Vzniklý produkt byl pod limitem detekce. Při normálních podmínkách na třepačce a v karuselu reakce probíhala a byl detekován pík produktu.



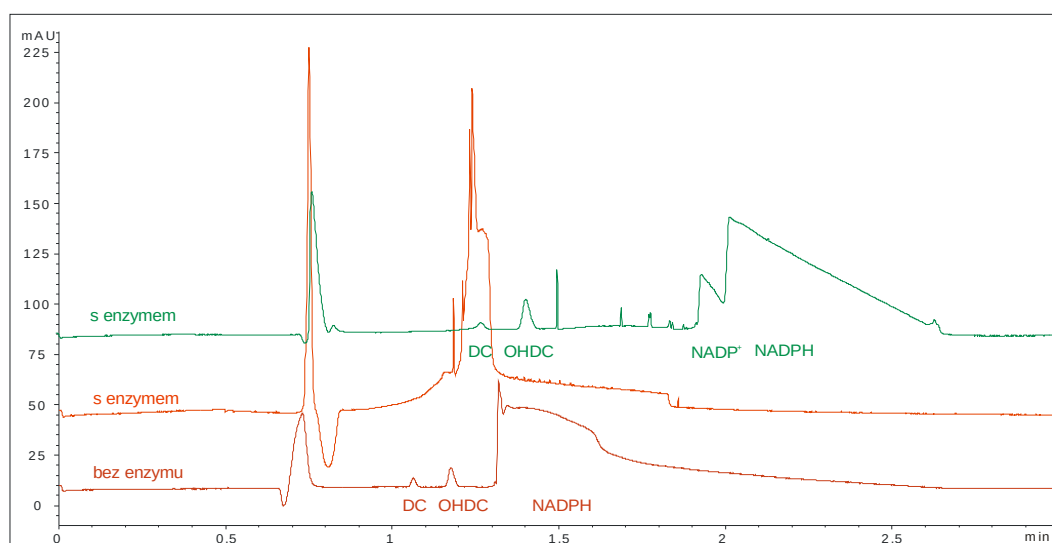
Obr. 19 Schéma dávkování pro uskutečnění inkubace v kapiláře.



Obr. 20 Inkubace (15 min) uskutečněná v různých prostředích, popis křivek přímo v elektroforeogramu.

ZVÝŠENÍ DÁVKOVÁNÍ VZORKU

Při inkubaci v kapiláře nevznikalo dostatečné množství produktu, a proto bylo jedním z řešení zvýšit dávkování inkubační směsi. Při stávajících podmínkách bylo možné dávkovat inkubační směs bez proteinu čtyřikrát delší dobu tedy 60 s, ale při přidání enzymu do vzorku došlo ke ztrátě separace, a proto bylo opět upraveno pH BGE. Snížením hodnoty pH na 7,90 došlo k separaci směsi.

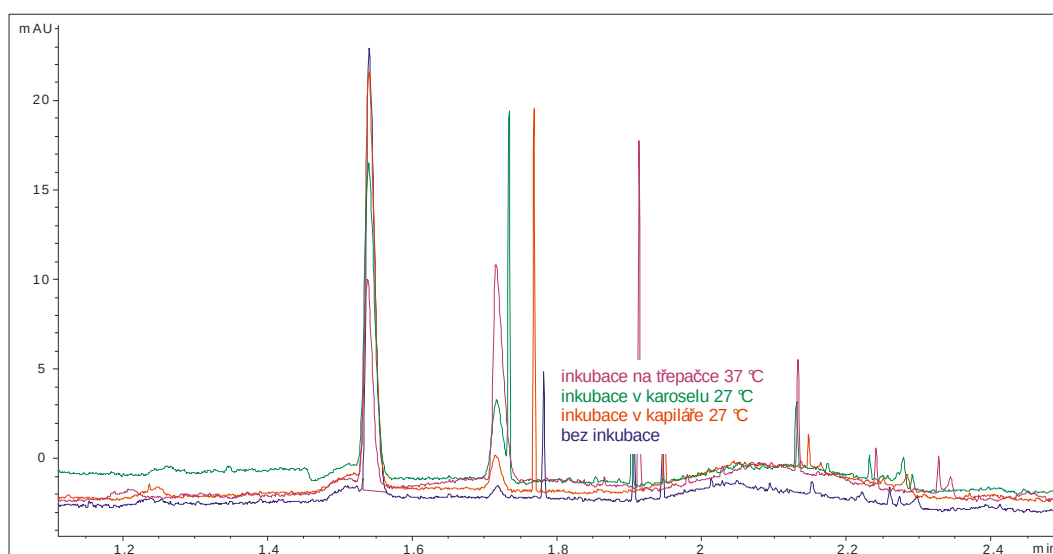


Obr. 21 Vliv zvýšení dávkování reakční směsi na separaci. Koncentrace DC a OHDC 10 μ M. Červené křivky znázorňují záznam separace s enzymem a bez enzymu při BGE o pH 8,10. Zelená křivka znázorňuje záznam separace s enzymem při BGE o pH 7,90

Při podmínkách umožňujících dávkování většího objemu reakční směsi byl opět proveden pokus pro ověření, že reakce může probíhat v kapiláře. Schéma dávkování je stejné jako při předchozím pokusu, separační podmínky se změnili jen v době dávkování inkubační směsi a pH BGE. Při těchto podmínkách byly naměřeny elektroforeogramy na Obr. 22.

Shrnutí podmínek separace:

Vzorek: 100 μ M DC, 52 nM CYP, 2 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Dávkování: tlakem 10 mbar: 10 s IB, 60 s vzorek, 10 s IB
On-line inkubace: 15 min
Teplota v kazetě: 37 °C
Teplota v karuselu: 27 °C
Kapilára: vnitřní průměr 50 μ m, L_{tot} 34 cm, L_{eff} 25,5 cm
Napětí: 30 kV
DAD: UV detekce v 25,5 cm, 200 nm
BGE: 50 mM TRIS-borát, pH 7,90



Obr. 22 Inkubace uskutečněná v různých prostředích, popis křivek přímo v elektroforeogramu.

Bylo ověřeno že reakce může probíhat v kapiláře. Na třepačce bylo dosaženo nejvyšších výtěžků, především díky vyšší teplotě. V karuselu byly nižší výtěžky, protože zde byla teplota pouze 27 °C. V kapiláře se dají nižší výsledky oproti výsledkům v karuselu přisoudit difuzi substrátu a NADPH i enzymu v podélném směru díky koncentračnímu gradientu. Tento proces může probíhat, když není roztok s inkubační směsí v uzavřené nádobce a v definovaném objemu.

Proto je vhodné pro metodu EMMA s využitím amplifikace při nulovém potenciálu dávkovat jednu ze zón delší. V případě, že je jedna ze zón delší je i větší pravděpodobnost, že se zóny protnou.

6.1.4 OPTIMALIZACE MÍCHÁNÍ METODOU EMMA

Pro měření s využitím metodologie EMMA byla vytvořena metoda při které bylo možné dávkovat velký objem vzorku a zároveň vzorek s vyšší koncentrací enzymu. Při trojnásobném zvýšení koncentrace enzymu (156 nM) bylo nutné pro zachování separace zvýšit i koncentraci BGE na 100 mM TRIS a 120 mM kyselinu boritou. Takto připravený roztok měl pH 8,40. Po zvýšení koncentrace pufru bylo sníženo separační napětí na 14 kV. Došlo ke zpomalení separace, ale zároveň ke snížení tvorby bublinek plynu, které narušovali separaci a vyhodnocení záznamu. Pro zajištění rozlišení bylo také nutné prodloužit separační délku kapiláry na 40 cm.

Optimalizace doby míchání reakční směsi vložení napětí vyžaduje znalost mobilit všech reaktantů v aplikovaném elektrickém poli. V případě, že je známa rychlost pohybu pouze jedno z reaktantů, nelze vypočítat optimální dobu aplikace napětí a tuto dobu lze zjistit pouze na základě experimentu, při kterém se měří plocha produktu vznikajícího při inkubační reakci míchané různou dobou aplikovaného napětí.

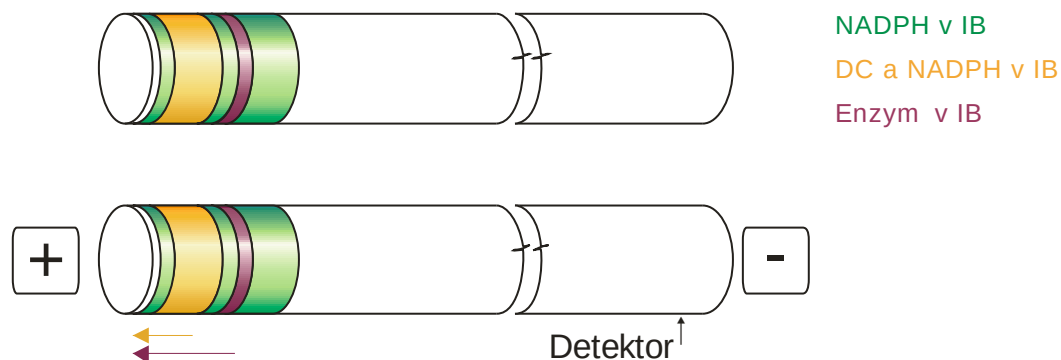
Vzhledem k tomu, že byla známa rychlost DC a jeho náboj, ale v elektroforetickém záznamu nebyl spolehlivě identifikován pík enzymu, optimalizace byla rozdělena na dva experimenty označené **A** a **B**. V uspořádání **A** se dávkovala nejprve zóna enzymu a poté zóna substrátu. Naopak v případě **B** se do kapiláry nejprve nadávkoval substrát a poté enzym. Pro zpřehlednění situace je výhodné zanedbat při popisování těchto systémů vliv EOF, který způsobuje výsledný pohyb všech uvažovaných látek ve směru k detektoru.

A) POŘADÍ 1. ENZYM, 2. SUBSTRÁT:

Pořadí dávkovaných zón při tomto měření je znázorněno na Obr. 23. Protože má DC záporný náboj dochází při aplikaci napětí k pohybu této látky směrem od detektoru v případě zanedbání vlivu EOF jak je zmíněno výše. Při předpokladu, že enzym má záporný výsledný náboj a mobilitu větší než mobilita substrátu dojde po aplikaci napětí také k pohybu enzymu ve směru od detektoru, ale větší rychlostí než se pohybuje DC. V určité chvíli dochází k protnutí zón. Směr pohybu DC a enzymu je znázorněn v Obr. 23 barevnými šipkami.

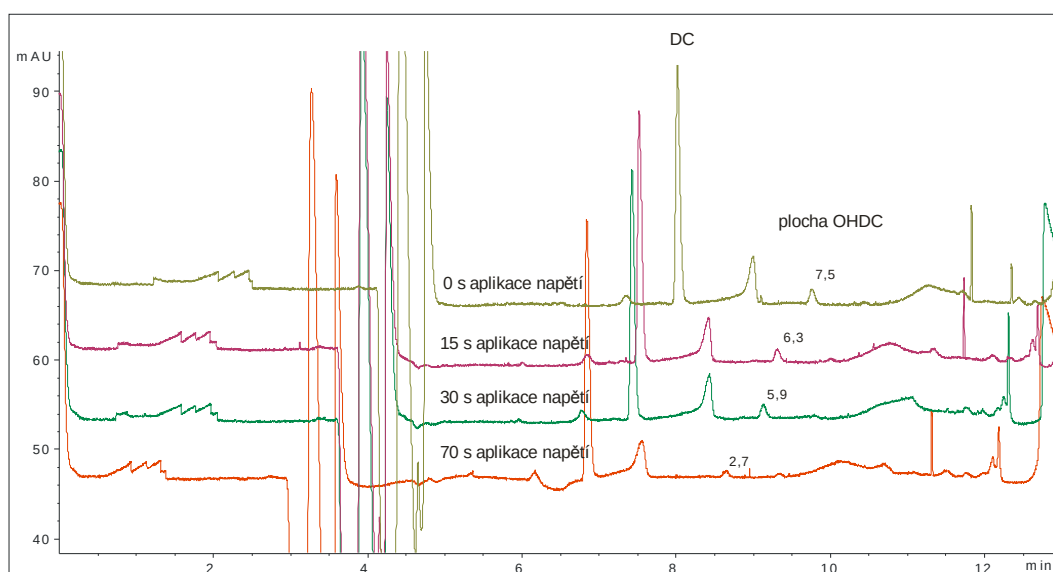
Podmínky separace:

Roztok substrátu zn. DC:	50 μ M DC, 1 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Roztok enzymu zn. E:	156 nM CYP v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Roztok inkubačního pufru zn. IB:	1 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
Dávkování:	tlakem 50 mbar: 13 s IB, 3 s E, 3 s IB, 15 s DC, 2 s IB, 2 s BGE
Aplikace napětí:	14 kV po různou dobu
On-line inkubace:	15 min
Teplota v kazetě/karuselu:	37/30 °C
Kapilára:	vnitřní průměr 50 μ m, L_{tot} 48,5 cm, L_{eff} 40,0 cm
Napětí:	lineární nárůst během 0,2 min na 14 kV
DAD:	UV detekce v 40,0 cm, 200 nm
BGE:	120 mM TRIS 100 mM kyselina boritá, pH 8,40

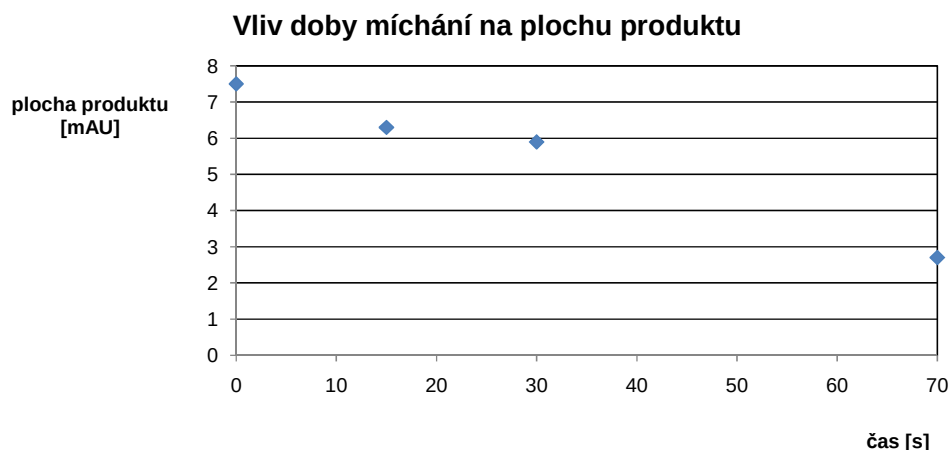


Obr. 23 Pořadí dávkování zón a směr pohybu látek bez uvažování EOF (žlutá šipka DC, fialová enzym).

Na Obr. 24 jsou elektroforeogramy pro měření s tímto systémem. Po aplikaci napětí 14 kV po dobu 0 až 70 s po nadávkování reaktantů, inkubaci při vypnutém napětí a následné separaci, docházelo ke snižování plochy produktu, což je zaznamenáno v grafu na Obr. 25. Tuto závislost lze vysvětlit tím, že předpoklad neodpovídal skutečnosti a po aplikaci napětí dochází naopak ke vzdalování DC a enzymu. Proto při analýze s inkubací nemíchanou vložením napětí vzniká nejvíce produktu. Zóny jsou v tomto případě nejbližší u sebe a uplatňuje se částečné míchání ve smyslu TDLFP viz kapitola 1.3.2.



Obr. 24 Optimalizace míchání při pořadí dávkování 1. enzym, 2. substrát. V popisku v elektroforeogramu je nad jednotlivými záznamy doba aplikace napětí a plocha produktu OHDC. Inkubace probíhala 15 minut.



Obr. 25 Graf závislosti plochy produktu OHDC na době míchání.

B) POŘADÍ SUBSTRÁT, ENZYM:

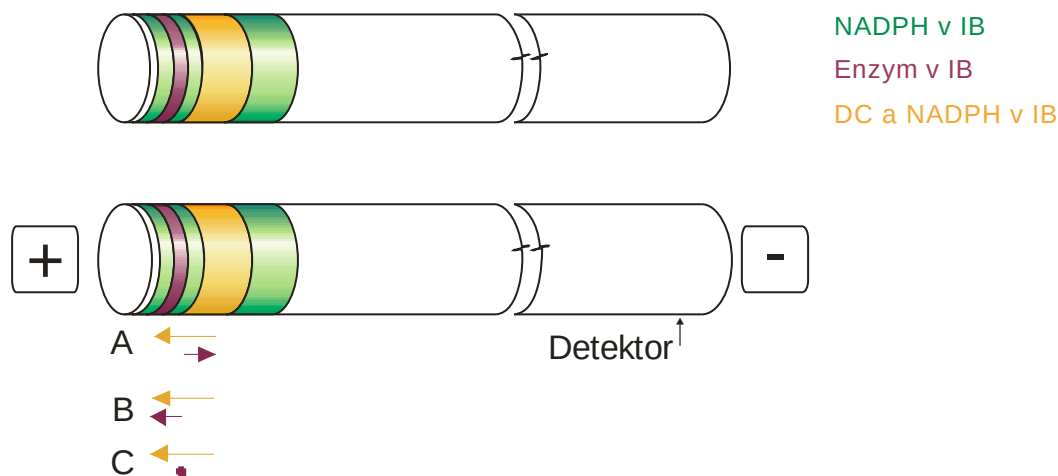
Druhý případ počítal s možností neutrálního nebo kladného výsledného náboje anebo také záporného výsledného náboje, při kterém byla očekávaná mobilita enzymu menší než mobilita substrátu. Pořadí dávkovaných zón při tomto měření je znázorněno na Obr. 26. Opět je pro přehlednost zanedbáván vliv EOF. Při předpokladu, že se enzym pohybuje ve směru k detektoru je směr pohybu znázorněn šipkami na nákresu A. Nákres B popisuje enzym pohybující se směrem k detektoru a v případě neutrálního enzymu popisují situaci šipky na nákresu C. V každém případě v při nějakém čase dojde k protnutí zón reaktantů.

Podmínky separace, které se liší od podmínek pokusu A):

Dávkování:

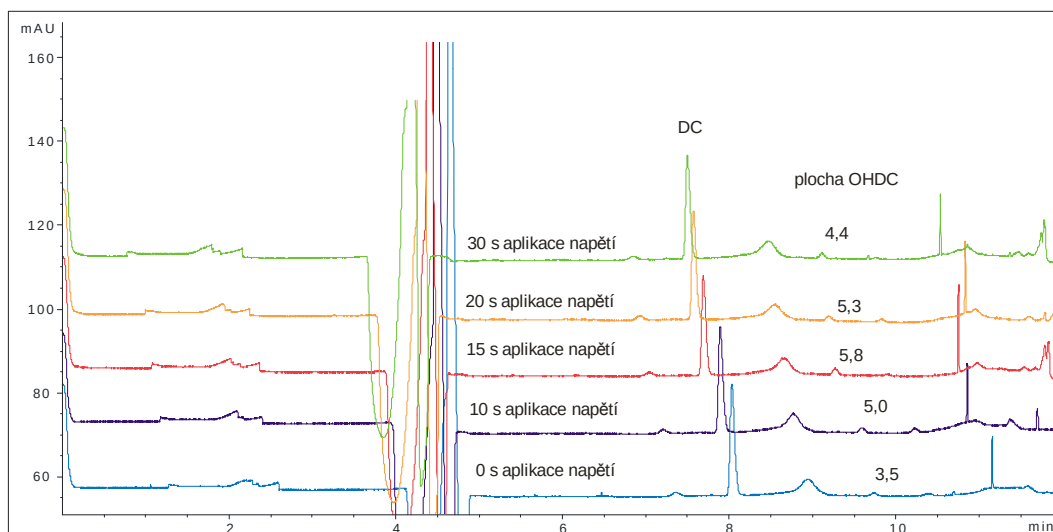
tlakem 50 mbar:

13 s IB, 15 s DC, 3 s IB, 3 s E, 2 s IB, 2 s BGE

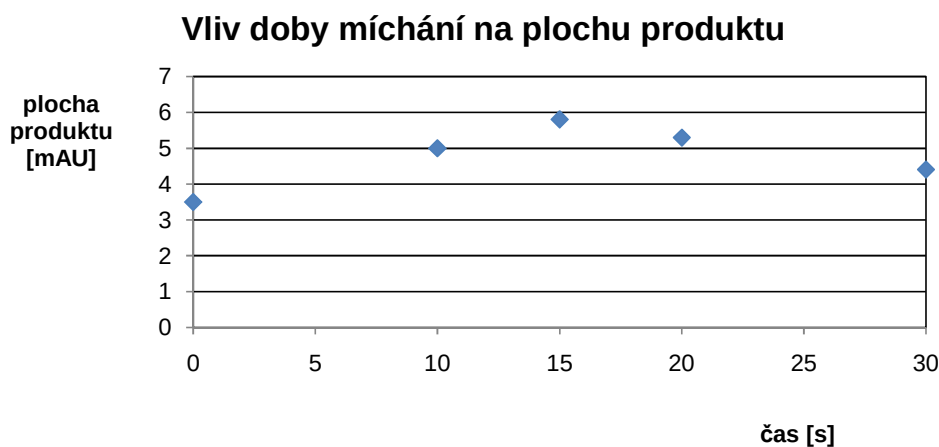


Obr. 26 Pořadí dávkování zón a směr pohybu látek bez uvažování EOF. Fialové a žluté šipky A, B, C popisují různé možnosti pohybu enzymu a DC.

Při měření s tímto uspořádáním byly naměřeny elektroforeogramy na Obr. 27, závislost plochy produktu na době míchání je znázorněna v grafu na Obr. 28. Nejvyšších ploch bylo dosaženo při aplikaci napětí po dobu 15 s.



Obr. 27 Optimalizace míchání při pořadí dávkování 1. substrát 2. enzym. V popisku v elektroforeogramu je nad jednotlivými záznamy doba aplikace napětí a plocha produktu OHDC. Inkubace probíhala 15 minut.

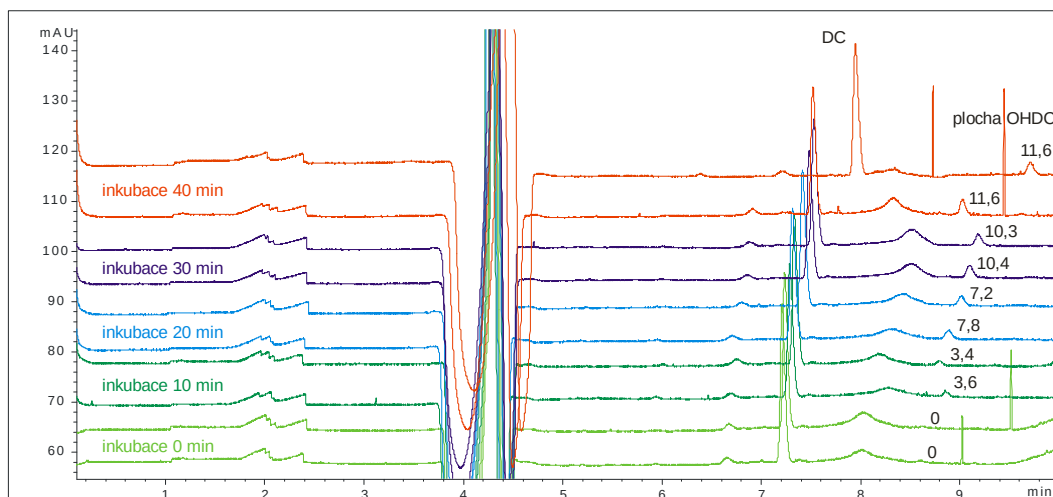


Obr. 28 Graf závislosti doby míchání na ploše produktu OHDC

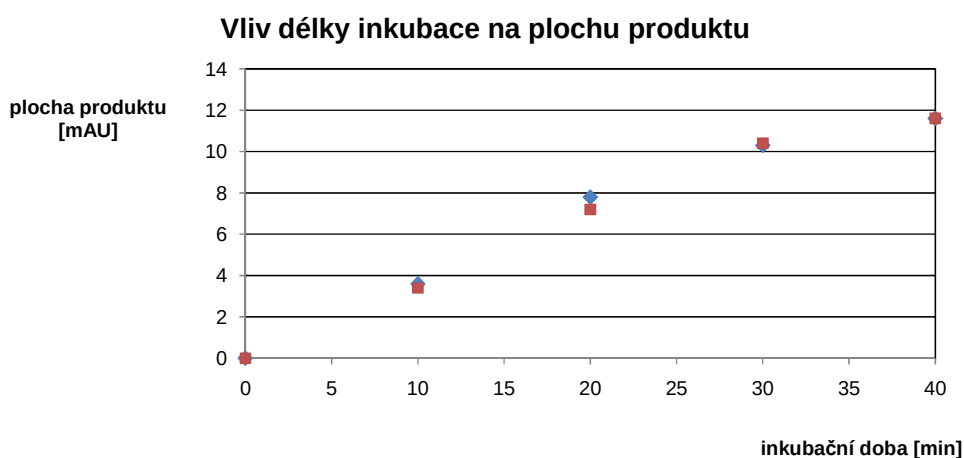
Při pokusu **A** bylo při prodlužování délky aplikace napětí před inkubací pozorován pokles plochy produktu. Při pokusu **B** bylo pozorováno zvýšení plochy produktu při aplikaci napětí 14 kV po dobu 15 s před inkubací. Pomocí vzorců na straně 15 lze vypočítat, že migrační čas enzymu při těchto podmínkách byl přibližně 4 min. Vzhledem k tomu, že se v čase 4 min objevoval systémový pík odpovídající EOF, měl enzym nulový výsledný náboj a pohyboval se s elektroosmotickým tokem. Reakce probíhala přibližně 3,8 cm od vstupního konce kapiláry. Nicméně množství vznikajícího produktu v pokusu **B** je nedostatečné.

6.1.5 PRODLOUŽENÍ DOBY INKUBACE

Jedním ze způsobů jak získat více produktu je prodloužení inkubační doby. Doba se prodlužovala po 10 minutách a záznamy jsou uvedeny na Obr. 29 a graf na Obr. 30. Při inkubaci trvající víc jak 30 minut již nevzniká významně více produktu a může se projevovat vliv difuze. Prodlužováním doby inkubace se také velmi prodlužuje celková doba analýzy. Při inkubaci probíhající 30 min trvá celá analýza téměř hodinu.



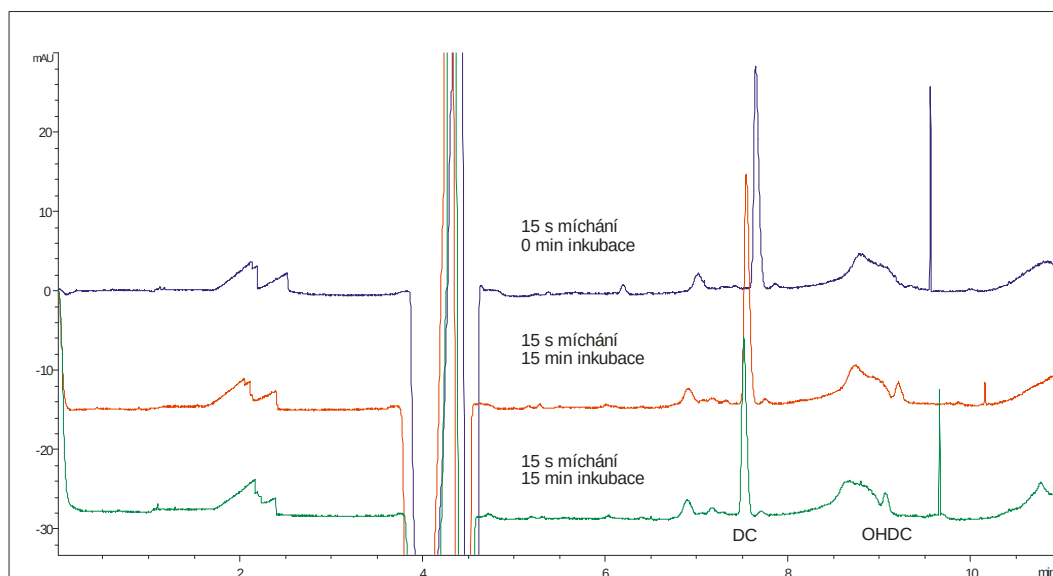
Obr. 29 Elektroforeogram inkubací s prodlužující se dobou inkubace



Obr. 30 Graf znázorňující vliv délky inkubace na plochu produktu enzymatické reakce – OHDC.

6.1.6 PRODLOUŽENÍ ZÓNY ENZYMU

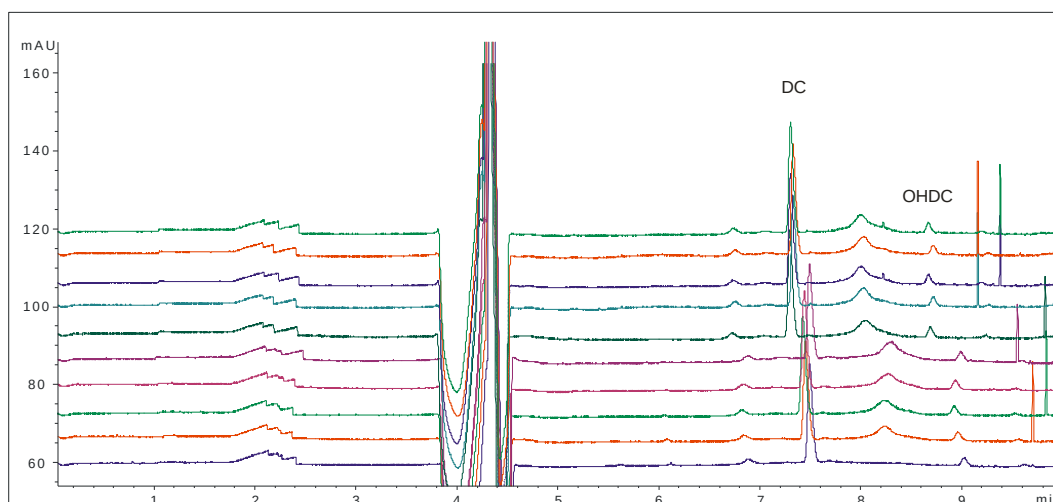
Prodloužení doby dávkování enzymu, byl druhý způsob, jak zvýšit množství vzniklého produktu. Jak je vidět na elektroforeogramu na Obr. 31, při daných podmínkách se neodseparoval OHDC na základní linii. Tento způsob zvýšení výtěžku byl neúspěšný.



Obr. 31 Elektroforeogramy při prodloužení zóny enzymu

6.1.7 OPAKOVATELNOST

Pro optimalizovanou metodu **B** byla proměřena opakovatelnost samotné separace. Substrát byl dávkován ve svém obvyklém pořadí a produkt enzymatické reakce byl přidán do zóny enzymu v koncentraci 10 μM . Dávkování zón je na schématu na Obr. 26 a podmínky dávkování jsou uvedeny na straně 39. Poté bylo na 15 s aplikováno napětí. Inkubace neprobíhala a směs byla proto ihned analyzována. Počet opakování byl 8. Elektroforeogramy jsou na Obr. 32. Vypočtené statistické parametry jsou v Tab. 4.



Obr. 32 Opakovatelnost metody B (1.substrát, 2. enzym)

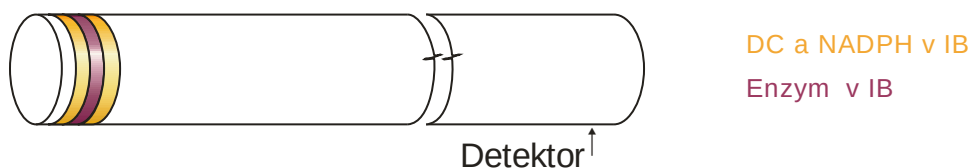
Tab. 4 Statistické parametry pro metodu EMMA

Parametr	Hodnota [%]
Diclofenak	
Opakovatelnost plochy píku	2,7
Opakovatelnost migračního času	1,1
Opakovatelnost výšky píku	6,0
4'-Hydroxydiclofenak	
Opakovatelnost plochy píku	4,0
Opakovatelnost migračního času	1,7
Opakovatelnost výšky píku	8,1

Bylo dosaženo relativně dobré opakovatelnosti, avšak při inkubačních reakcích nevznikalo dostatečné množství produktu.

6.1.8 METODA TDLFP

Vzhledem k nízkým výtěžkům metody EMMA byla k míchání reakční směsi použita i metoda TDLFP (Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles), která již v naší laboratoři byla úspěšně aplikována na tento systém [34]. Byla využita základní varianta tohoto systému, tedy dávkování 3 zón v pořadí substrát, enzym, substrát. Pořadí dávkovaných zón při tomto měření je znázorněno na Obr. 33.



Obr. 33 Pořadí dávkování zón při metodě využívající TDLFP.

On-line inkubace míchaná v kapiláře byla srovnána s inkubacemi probíhajícími v karuselu a na třepačce. Vzhledem k různým způsobům uskutečnění reakce byly využívány 4 postupy.

1) Off-line inkubace na třepačce:

Reakční směs byla připravena tak, aby výsledná koncentrace substrátu byla 50 μM a výsledná koncentrace NADPH byla 1 mM. Tato směs se nechala pre-inkubovat 5 minut na třepačce při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ a 450 rpm. Reakce byla odstartována přidáním enzymu na výslednou koncentraci 156 nM. Po uplynutí času inkubace byla reakční směs zastavena zmražením na -70 $^{\circ}\text{C}$. Při analýze byl vzorek rozmražen těsně před dávkováním a převeden do dávkovací vialky.

2) On-line inkubace v kapiláře s ručně míchanou směsí:

Reakční směs byla připravena tak, aby výsledná koncentrace substrátu byla 50 μM a výsledná koncentrace NADPH byla 1 mM. Reakce byla odstartována přidáním enzymu na požadovanou výslednou koncentraci těsně před dávkováním, směs byla převedena do dávkovací vialky, umístěna do karuselu a dávkována. Směs byla inkubována v přímo v kapiláře a po uplynutí inkubačního času byla analyzována.

3) Off-line inkubace v karuselu:

K tomuto účelu byla využita reakční směs připravená pro on-line inkubaci míchanou ručně. Po nadávkování směsi do kapiláry byla dávkovací vialka ponechána v karuselu a po uplynutí času inkubace byla reakční směs zastavena zmražením na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při analýze byl vzorek rozmražen těsně před dávkováním.

4) On-line inkubace míchaná v kapiláře:

Byly připraveny 2 roztoky. Roztok substrátu s $50\text{ }\mu\text{M}$ DC a 1 mM NADPH a roztok enzymu obsahující enzym v požadované koncentraci bez NADPH. Tyto roztoky byly uchovávány v chladicím boxu a do karuselu byly umístěny těsně před dávkováním.

V případě inkubace míchané i probíhající v kapiláře bylo dávkování následující:

Roztok substrátu zn. DC: $50\text{ }\mu\text{M}$ DC, 1 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50

Roztok enzymu zn. E: 156 nM CYP v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50

Dávkování: tlakem 50 mbar : 10 s DC, 3 s E, 10 s DC, 2 s BGE

Pro ostatní případy byla zóna enzymu nahrazena zónou s inkubační směsí:

Roztok substrátu zn. DC: $50\text{ }\mu\text{M}$ DC, 1 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50

Roztok inkubační směsi: $50\text{ }\mu\text{M}$ DC, 1 mM NADPH, 156 nM CYP v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50

Dávkování: tlakem 50 mbar : 10 s DC, 3 s inkubační směs, 10 s DC, 2 s BGE

Podmínky separace:

Inkubace: 15 min

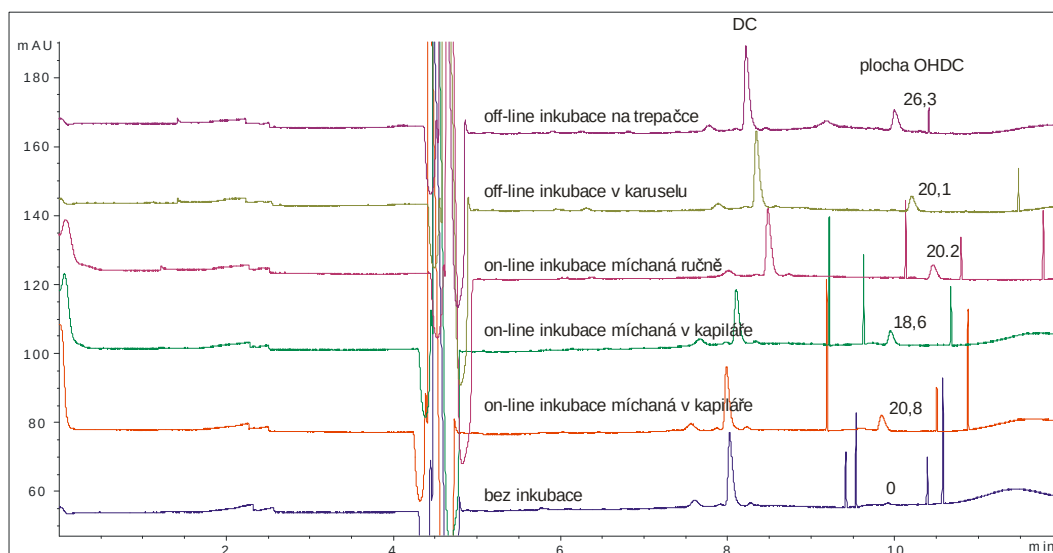
Teplota v kazetě/karuselu: $37/30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Kapilára: vnitřní průměr $50\text{ }\mu\text{m}$, L_{tot} $48,5\text{ cm}$, L_{eff} $40,0\text{ cm}$

Napětí: lineární nárůst během $0,2\text{ min}$ na 14 kV

BGE: 120 mM TRIS 100 mM kyselina boritá, pH 8,40

DAD: UV detekce v $40,0\text{ cm}$, 200 nm



Obr. 34 Elektroforeogramy získané při měření enzymových reakcí v různých prostředích. Nad křivkami je uveden postup inkubace a plocha produktu OHDC.

Při reakci probíhající na třepačce vznikalo více produktu než při inkubaci probíhající v karuselu. Vzhledem k tomu, že byla teplota při inkubaci na třepačce i v karuselu stejná, lze vyšší výsledky enzymatické reakce probíhající na třepačce vysvětlit homogenizací této směsi. Výsledky separací směsí probíhajících v karuselu, v kapiláře s ručním mícháním a v kapiláře s mícháním uplatňujícím příčnou difuzi jsou srovnatelné. Při využití tohoto způsobu míchání byly plochy produktu inkubační reakce vyšší než při metodě EMMA. Pro spojení CE-MS byl proto vybrán tento způsob míchání.

6.2 SPOJENÍ CE-MS

6.2.1 ANALÝZA STANDARDŮ DC A OHDC

Základní podmínky pro analýzu byly zvoleny na základě obecných informací z manuálů [32],[33].

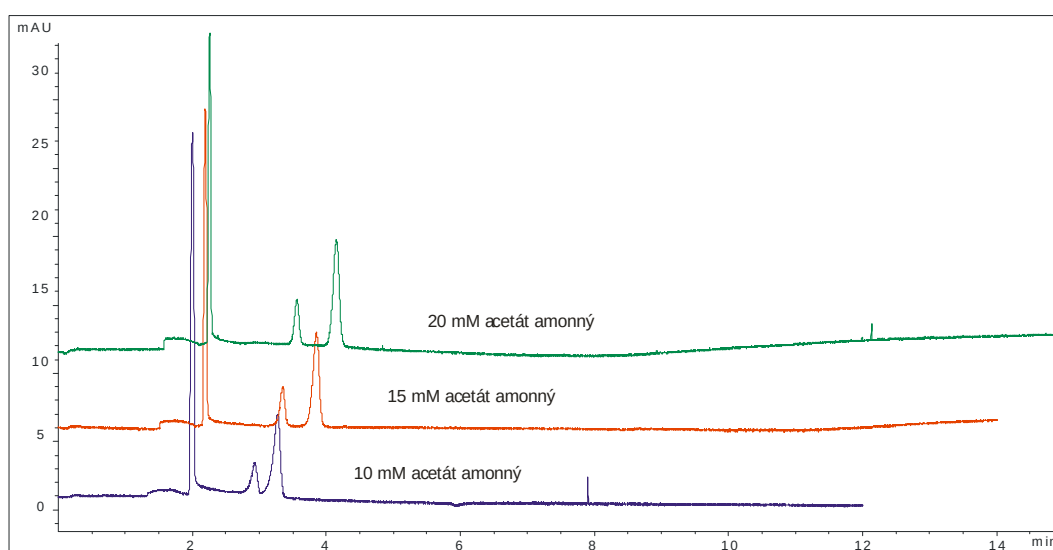
Elektroforéza:

Kapilára:	vnitřní průměr 50 μm , celková délka 90 cm
Napětí:	lineární nárůst během 0,3 min na 30 kV
Kazeta:	37°C
BGE:	10 mM acetát amonný, pH 8,50
Dávkování:	tlakem 30 mbar 10 s
DAD:	UV detekce v 25,5 cm, 200 nm

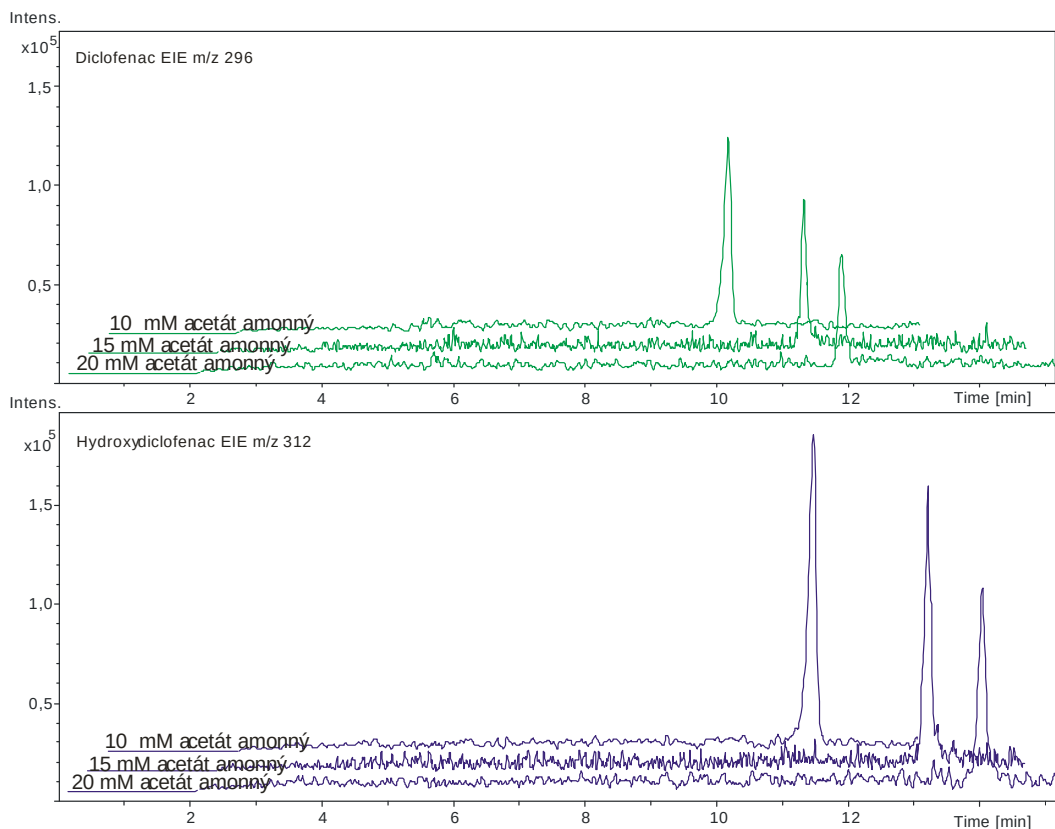
Hmotnostní spektrometr:

Přídavná kapalina:	5 mM acetát amonný v MeOH:Voda 1:1
Průtok přídavné kapaliny:	4 $\mu\text{l/min}$, splitter 1:100
Polarita:	pozitivní mód
Napětí:	- 4000 V
Tlak nebulizačního plynu:	10 psi
Průtok sušícího plynu:	10 l/min
Teplota:	200 °C
Rozsah m/z:	120 - 500
Smart Target Settings:	300 m/z

Tyto podmínky byly použity na separaci směsi standardů DC a OHDC o koncentraci 100 μM . Poté byla proměřena závislost na koncentraci BGE. Záznam z elektroforézy je na Obr. 35 a extrahovaný iontový elektroforeogram z MS na Obr. 36. Ze záznamu CE je vidět, že při vyšší koncentraci BGE dochází k zvýšení rozlišení separace. V záznamech z MS lze pozorovat stejnou závislost, ale lze také vidět i snížení intenzity signálu při vyšší koncentraci BGE. To je pravděpodobně způsobeno iontovou supresí při ionizaci. Pro další měření byla vybrána koncentrace BGE 15 mM acetát amonný.

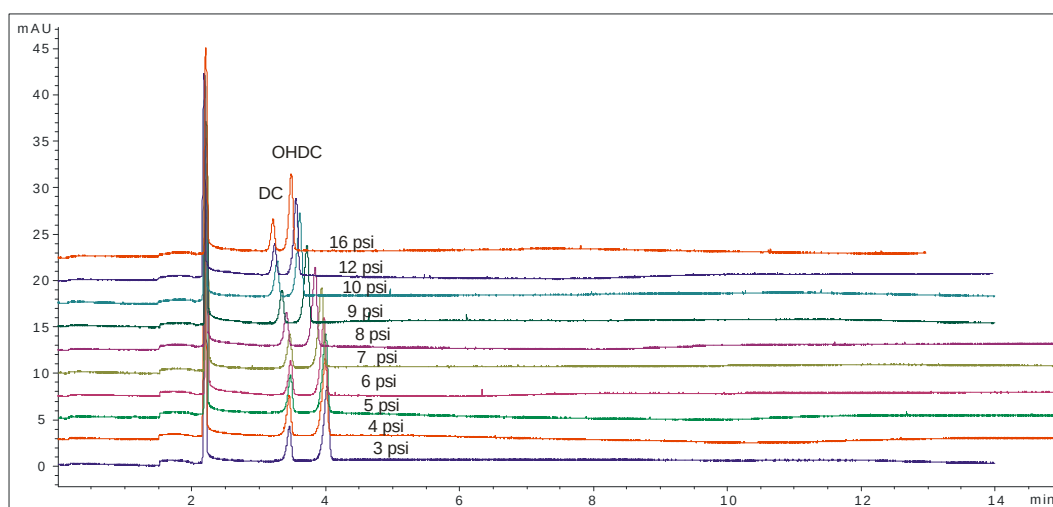


Obr. 35 Vliv koncentrace BGE na migrační čas a separaci standardů DC a OHDC při UV detekci v 25,5 cm při 200 nm. Koncentrace acetátu amonného je uvedena nad křivkou.

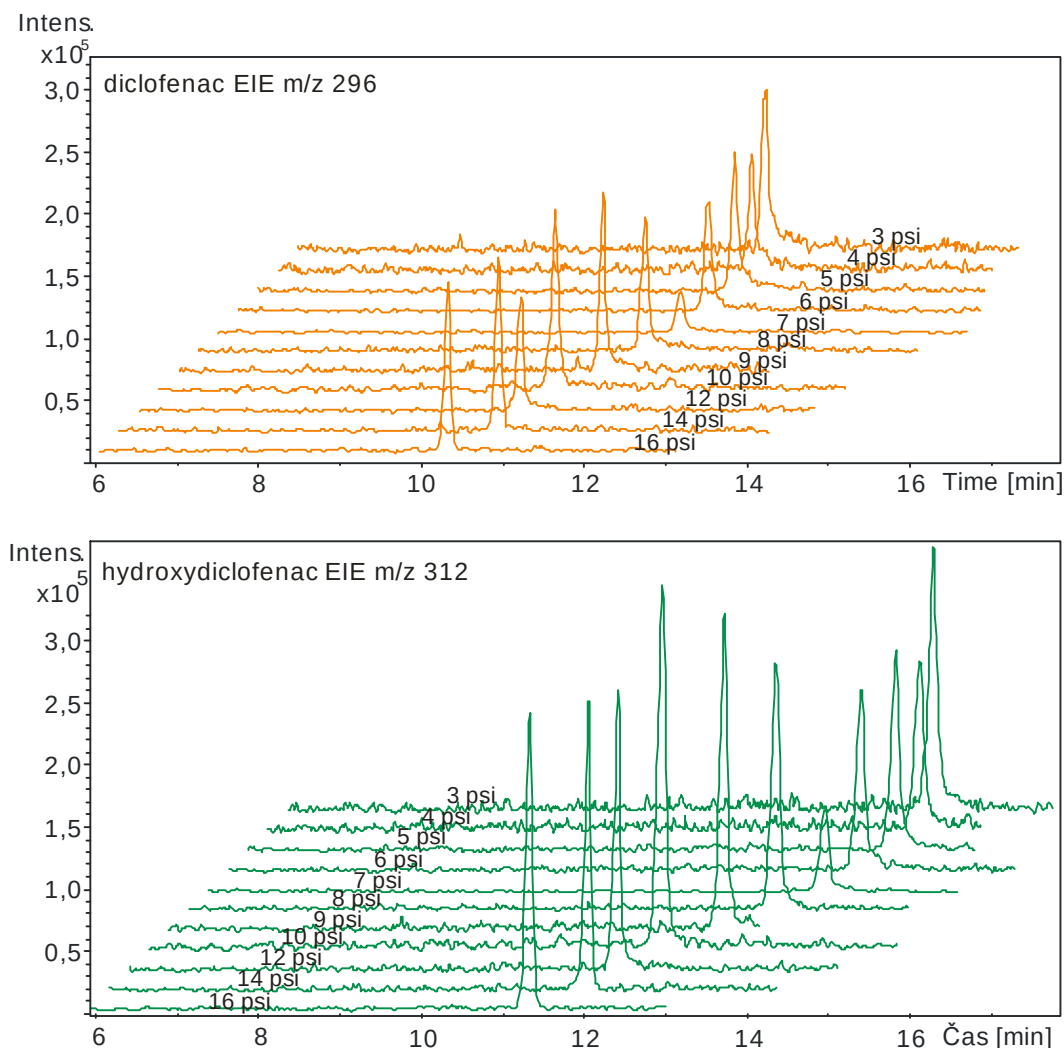


Obr. 36 Vliv koncentrace BGE na migrační čas a intenzitu signálu standardů DC a OHDC při MS detekci v 75 cm. Koncentrace acetátu amonného je uvedena nad záznamem.. Extrahované iontové elektroforeogramy při m/z 296 pro DC a 312 pro OHDC.

Dále byla proměřena závislost na tlaku nebulizačního plynu. Byly proměřeny hodnoty tlaku 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 12, 14, 16 psi (psi: pound-force per square inch; 1 psi = 68,948 mbar). Záznamy elektroforeogramů jsou na Obr. 37 a záznamy s extrahovanými iontovými elektroforeogramy z MS jsou na Obr. 38



Obr. 37 Vliv tlaku nebulizačního plynu na migrační časy standardů DC a OHDC při UV detekci. Hodnota tlaku nebulizačního plynu je uvedena nad křivkou záznamu



Obr. 38 Vliv tlaku nebulizačního plynu na migrační časy standardů DC a OHDC při MS detekci. Extrahované iontové elektroforeogramy pro m/z 296 a 312. Hodnota tlaku nebulizačního plynu je uvedena nad křivkou záznamu.

Ze závislosti migračního času na tlaku nebulizačního plynu lze odvodit, že při vyšším tlaku dochází k zrychlení separace a snížení rozlišení. Při stále stejném průtoku sušícího plynu (10 l/min) dochází při změně nebulizačního tlaku ke změnám intenzity signálu.

6.2.2 STUDIUM VLIVU SLOŽENÍ PŘÍDAVNÉ KAPALINY

Pro spojení CE-MS se využívá přídavná kapalina, která svým složením může významným způsobem ovlivnit ionizaci, protože představuje hlavní podíl ionizovaného roztoku. Její složení bylo optimalizováno při sledování ionizace DC. Roztok standardu byl nastříkovan injekční stříkačkou umístěnou v infuzní pumpě, kde byl nastaven průtok 4 µl/min (0,24 ml/hod). Byla vyzkoušena směs methanolu s vodou v poměru 1:1 v obou módech ionizace, a stejná směs s 0,5 % přídavku kyseliny octové (AcA) nebo amoniaku. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5

Parametry hmotnostní spektrometru:

Polarita:	pozitivní mód/negativní mód
Napětí:	-/+ 3500 V
Tlak nebulizačního plynu:	9 psi
Průtok sušícího plynu:	4 l/min
Teplota sušícího plynu:	210 °C
rozsah m/z:	200 - 325 m/z
Smart Target Settings:	296
Fragmentace SRM:	
Isolace:	296 m/z
Šířka:	4 m/z
CutOff:	80 m/z
Amplituda:	1,0 V

Tab. 5 Intenzity mateřského a dceřiných iontů DC při různém složení přídavné kapaliny

intenzita mateřského iontu				
složení	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
aditivum	-	-	0,5 % AcA	0,5 % NH ₃
ionizační mód	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
m/z [nM] koncentrace DC	296	294	296	294
100	1 10 ⁴	2,5 10 ⁴	-	2 10 ⁴
50	-	2,0 10 ⁴	-	6 10 ³
10	-	1,0 10 ³	-	2 10 ³
0	-	-	-	2 10 ³

měření ve scanu v rozsahu m/z 200 – 325

AcA - kys. octová, FoA - kys. mravenčí; symbol - značí, že ve spektru nebyl ion nalezen

intenzita dceřiných iontů								
složení	MeOH/H ₂ O		MeOH/H ₂ O		MeOH/H ₂ O		MeOH/H ₂ O	
aditivum	-		-		0,5 % AcA		0,5 % NH ₃	
ionizační mód	pozitivní		negativní		pozitivní		negativní	
m/z [nM] koncentrace DC	278	250	278	250	278	250	278	250
100	3,8 10 ³	3,6 10 ³	-	380	2,5 10 ⁴	2,6 10 ⁴	-	170
50	1,1 10 ³	1,1 10 ³	-	200	3,1 10 ³	1 10 ³	-	110
10	400	350	-	-	1,6 10 ³	2,1 10 ³	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-

fragmentace iontu 296 m/z při rozsahu 200 – 325 m/z

AcA - kys. octová, FoA - kys. mravenčí; symbol - značí, že ve spektru nebyl ion nalezen

Z výsledků vyplývá, že při použití směsi methanol/voda bez aditiv poskytuje negativní ionizace při měření ve scanu vyšší signál na rozdíl od pozitivní ionizace. Naproti tomu při MS² módu je intenzita vzniklých fragmentů při negativní ionizaci nižší.

Při použití kyseliny octové jako aditiva se ve scanu mateřský ion vůbec neobjevil, ale intenzita dceřiných iontů se zvýšila. Při MS měření s kyselinou octovou se objevuje velké množství jiných iontů, jde pravděpodobně o nečistoty ve vzorku. Přidání amoniaku nepřineslo zlepšení vůči základní směsi bez aditiva ani v MS ani v MS² módu.

Pro další optimalizace byl vybrán pozitivní mód a byly vyzkoušeny dvě kyseliny, octová (AcA) a mravenčí (FoA), v různých koncentracích. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6 Intenzity mateřského a dceřiných iontů DC při různém složení přídavné kapaliny.

intenzita mateřského iontu				
složení	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
aditivum	0,1 % AcA	1 % AcA	0,1 % FoA	0,2 % FoA
ionizační mód	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
m/z	296	296	296	296
[nM] koncentrace DC				
100	2,2 10 ⁵	-	2 10 ⁴	1,0 10 ⁴
50	-	-	1 10 ⁴	0,5 10 ³
10	-	-	-	-
0	-	-	-	-

měření ve scanu v rozsahu m/z 200 – 325

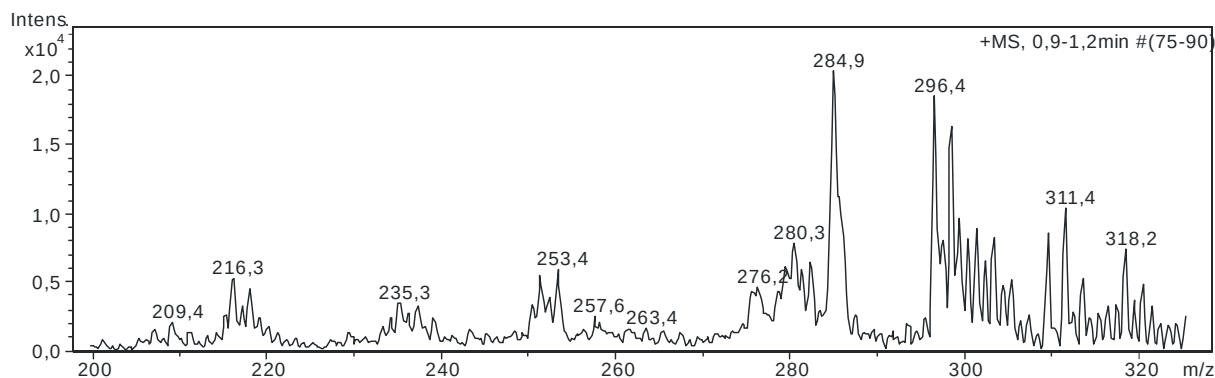
AcA - kys. octová, FoA - kys. mravenčí; symbol - značí, že ve spektru nebyl ion nalezen

intenzita dceřiných iontů								
složení	MeOH/H ₂ O		MeOH/H ₂ O		MeOH/H ₂ O		MeOH/H ₂ O	
aditivum	0,1 % AcA		1 % AcA		0,1 % FoA		0,2 % FoA	
ionizační mód	pozitivní		pozitivní		pozitivní		pozitivní	
m/z	278	250	278	250	278	250	278	250
[nM] koncentrace DC								
100	8 10 ³	7 10 ³	2,8 10 ³	2,4 10 ³	2,4 10 ⁴	2,8 10 ⁴	2,3 10 ⁴	1,8 10 ⁴
50	3,6 10 ³	3,2 10 ³	1,3 10 ³	1,0 10 ³	8,0 10 ³	1,2 10 ⁴	3,2 10 ⁴	6,0 10 ³
10	2,2 10 ³	2,0 10 ³	1,0 10 ³	200	3,4 10 ³	4 10 ³	1,7 10 ⁴	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-

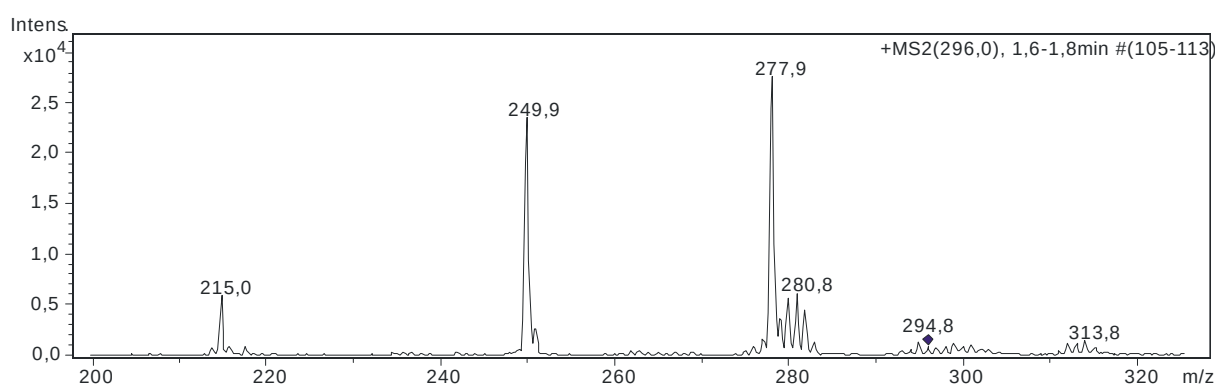
fragmentace iontu 296 m/z při rozsahu 200 – 325 m/z

AcA - kys. octová, FoA - kys. mravenčí; symbol - značí, že ve spektru nebyl ion nalezen

Při použití kyseliny octové docházelo ve scanu především k detekci jiných hodnot m/z. Nejlepších výsledků bylo dosaženo se směsí obsahující methanol a vodu v poměru 1:1 s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Spektrum scanu s těmito podmínkami je na Obr. 39. Byl identifikován molekulární kladně nabitý ion $[M + H]^+ = 296$ a $[M + Na]^+ = 318$. Ostatní ionty jsou pravděpodobně nečistoty. Hodnota 284 m/z se objevovala ve scanu i při použití nulové koncentrace DC. Jednoznačných výsledků bylo dosaženo při fragmentaci. Spektrum MS² je znázorněno na Obr. 40. Ve spektru jsou fragmenty s m/z 278, 250 a 215, což souhlasí s daty v literatuře [29]. Pro další práci byl téměř vždy volen citlivější a selektivnější MS² mód.



Obr. 39 ESI MS spektrum 100 nM DC ve směsi methanol:voda 1:1 s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí.



Obr. 40 ESI MS² spektrum 100 nM DC ve směsi methanol:voda 1:1 s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí.

6.2.3 PROMÝVÁNÍ KAPILÁRY PŘI ON-LINE INKUBACI

Stejně jako při metodě EMMA bylo nutné intenzivně promývat kapiláru, aby bylo zajištěno, že na vnitřním povrchu stěny kapiláry nebudou zůstávat nečistoty. Kyselina chlorovodíková byla nahrazena 0,2% kyselinou octovou a vzhledem k nepřítomnosti vialky na detekčním konci kapiláry byl vynechán krok s aplikací napětí. Promývání probíhalo při 37 °C a je popsáno v Tab. 7.

Tab. 7 Kroky při prvním promývání daného dne.

Pořadí	Příkaz	Roztok	Doba [min]
1	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
2	promytí - flush	0,2% kyselina octová	2
3	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
4	promytí - flush	1 M NaOH	2
5	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
6	promytí - flush	BGE	5

promytí – flush: promývání kapiláry pomocí tlaku přibližně 950 mbar

Promývání během dne před a po analýze při 37 °C je popsáno v Tab. 8:

Tab. 8 Kroky při promývání před a po analýze.

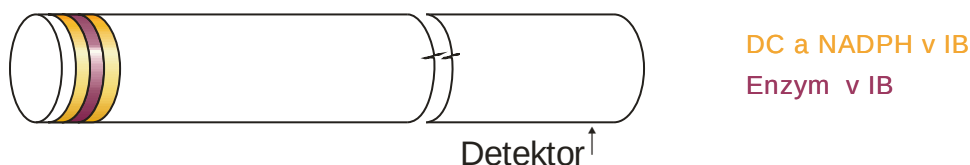
Pořadí	Příkaz	Roztok	Doba [min]
Před analýzou:			
1	promytí - flush	BGE	5
Po analýze:			
2	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
3	promytí - flush	0,2% kyselina octová	2
4	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5
5	promytí - flush	1 M NaOH	2
6	promytí - flush	deionizovaná voda	1,5

promytí – flush: promývání kapiláry pomocí tlaku přibližně 950 mbar

Na závěr dne byla kapilára promyta 10 min vodou při 50 °C.

6.2.4 SEPARACE REAKČNÍ SMĚSI

Pro on-line inkubaci probíhající v kapiláře s využitím CE-MS byla reakční směs míchána univerzálnější technikou TDLFP. Dávkovací schéma je znázorněno na Obr. 41.



Obr. 41 Schéma dávkování při On-line inkubaci při CE-MS

Při uskutečnění reakce v kapiláře bylo nejprve potřeba upravit podmínky, tak aby docházelo k separaci substrátu a produktu při dávkování celé inkubační směsi při využití acetátu amonného. Byla změněna koncentrace BGE na 30 mM o pH 9,20. Aplikované napětí bylo nastaveno na hodnotu 30 kV. Při spojení CE-MS je v softwaru automaticky přednastavena maximální hodnota proudu na 50 uA. Vzhledem k této limitaci bylo skutečné napětí při separaci korigováno softwarem a pohybovalo se okolo hodnoty 18 kV. Pro urychlení analýzy byl po 10 minutě na vstupní vialku aplikován tlak 50 mbar. Výsledné nastavení obou přístrojů:

Elektroforéza:

Roztok substrátu zn. DC: 100 μ M DC, 4 mM NADPH v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
 Roztok enzymu zn. E: 333 nM CYP v TRIS-HCl 50 mM pH 7,50
 Dávkování: 50 mbar: 2 s DC, 2 s E, 2 s DC; 15 mbar: 2 s BGE
 Inkubace: 10 min
 Teplota v kazetě/karuselu: 37/30 °C
 Kapilára: vnitřní průměr 75 μ m, celková délka 75 cm, broušená špička
 Napětí: lineární nárůst během 0,2 min na 30 kV, limit pro proud 50 μ A
 BGE: 30 mM acetát amonný, pH 9,20
 Přítlak: do 10,0 min 0 mbar, od 10,2 min 50 mbar
 DAD: UV detekce v 26 cm, 200 nm

Hmotnostní spektrometr:

Přídavná kapalina: MeOH:W 1:1 0,3 % kyselina mravenčí
Průtok přídavné kapaliny: 0,4 µl/min, splitter 1:100
Polarita: pozitivní mód
Průtok sušícího plynu: 4 l/min
Tlak nebulizačního plynu: 5 psi
Teplota sušícího plynu: 200 °C

SPS (Smart Target Settings) umožňuje optimální nastavení iontové pasti pro požadovanou hodnotu m/z, SRM (Single Reaction Monitoring) umožňuje fragmentaci vybrané hodnoty m/z. Při analýze s hmotnostním spektrometrem lze pro každý úsek analýzy nastavit různé podmínky:

První segment:

Trvání: 0,0 - 0,5 min
Napětí: 0 V
Scan: 290 - 320 m/z
Smart Target Settings: 300 m/z

Druhý segment:

Trvání: 0,5 - 8,2 min
Napětí: - 4000 V
Scan: 100 - 800 m/z
Smart Target Settings: 300 m/z

Třetí segment pro DC:

Trvání: 8,2 - 11,1 min
Napětí: - 4000 V
Scan: 230 - 325 m/z
Smart Target Settings: 296 m/z
SRM:
Isolace: 296 m/z
Šířka: 4 m/z
CuttOff: 80 m/z
Amplituda: 1,0 V

Čtvrtý segment pro OHDC:

Trvání: 11,1 - 13,0 min
Napětí: - 4000 V
Scan: 230 - 325 m/z
Smart Target Settings: 312 m/z
SRM:
Isolace: 312 m/z
Šířka: 4 m/z
CuttOff: 84 m/z
Amplituda: 1,0 V

6.2.5 ON-LINE ENZYMOVÁ REAKCE

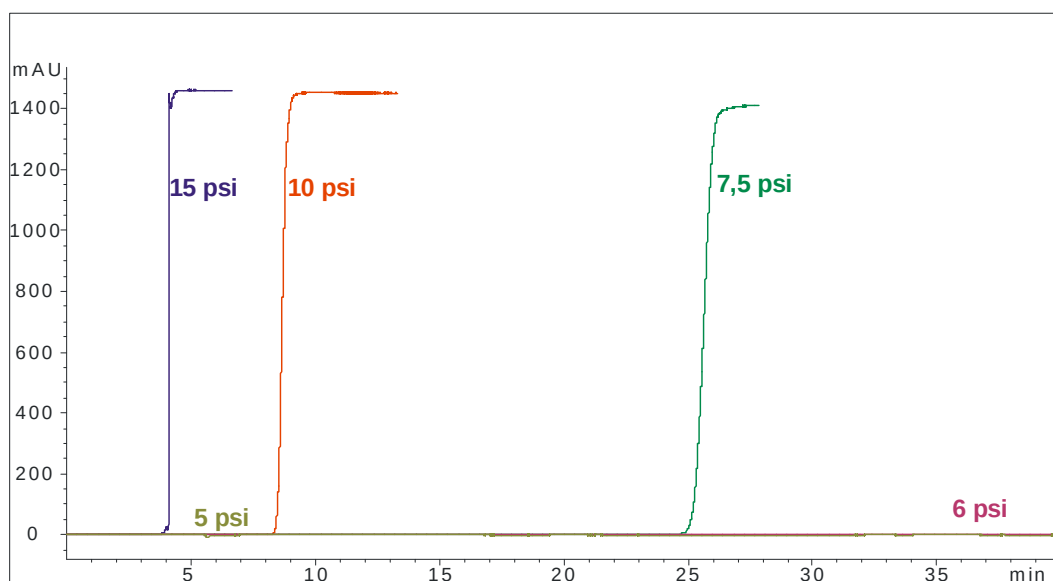
Toto nastavení se použilo pro spojení on-line inkubace se separací a následnou MS detekcí. Inkubace probíhala 10 min s vialkou BGE na vstupním konci kapiláry. Všechny ostatní podmínky zůstaly zachovány. Nicméně při těchto analýzách se neobjevil žádný signál hledaných látek ani v elektroforeogramu ani v hmotnostním záznamu. Vzhledem k tomu, že se neobjevil ani signál NADPH při 340 nm, zdálo se pravděpodobné, že inkubační směs po nadávkování nezůstává v kapiláře kvůli sifonovému efektu.

Nejprve byl vstupní konec kapiláry posunut co nejvýše, což problém při on-line inkubaci nevyřešilo. Poté byl upravován tlak nebulizačního plynu na výstupním konci kapiláry. Bylo ověřeno, že k pohybu kapaliny v kapiláře skutečně dochází a to při následujícím pokusu:

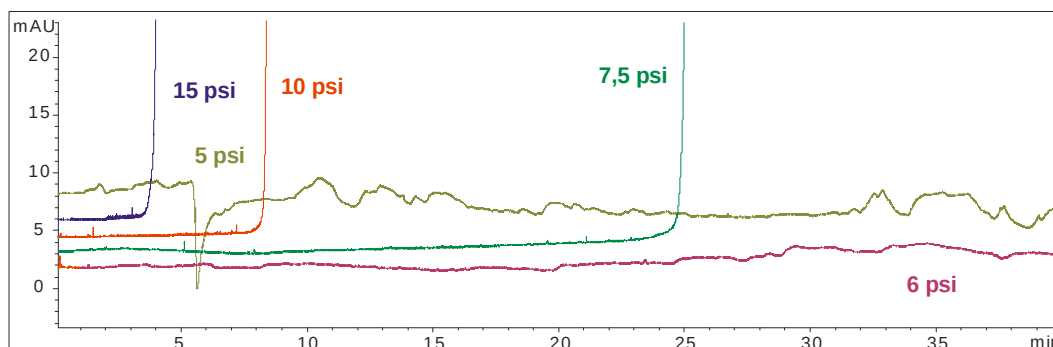
V nastavení iontové pasti byl měněn tlak nebulizačního plynu v prvním segmentu. Součástí analýzy bylo promytí kapiláry 4 min BGE tak jako před každou analýzou. Pak byla na vstupní konec umístěna vialka s roztokem substrátu a NADPH. Poté se ihned sepnul záznam bez aplikace napětí. Detekce probíhala pomocí DAD v 26 cm.

Výsledky těchto měření jsou vyobrazeny na Obr. 42. Při vysokých tlacích nebulizačního plynu docházelo k pohybu kapaliny směrem k hmotnostnímu spektrometru a nasávání vzorku do kapiláry. Při 15 psi se roztok se vzorkem dostal k detekčnímu okénku už za 4 minuty. Při snižování průtoku docházelo k postupnému prodloužení času potřebnému k posunu roztoku vzorku až k detekčnímu okénku. Při tlaku 7,5 psi se směs dostala k detekčnímu okénku při 25 minutě. Na druhou stranu při nižším tlaku nebulizačního plynu 6 psi je základní linie relativně stabilní a při 5 psi je základní linie nestabilní a dochází po 5 minutě k jejímu prudkému poklesu. Vzhledem k tomu, že při analýzách s nastavením 1. segmentu na 5 psi se neobjevil ani v elektroforeogramu ani v hmotnostním záznamu žádný signál hledaných látek, byla nastaven tlak nebulizačního plynu na 6 psi, ale ani při tomto nastavení nebyl detekován signál v CE nebo MS. Proto byl pro první segment zvolen tlak 7,5 psi.

Při tomto uspořádání nebyl problém s detekcí látek a reakční směs zůstávala v kapiláře.



Obr. 42 Vliv tlaku nebulizačního plynu na pohyb kapaliny v kapiláře. Bez přiblížení.



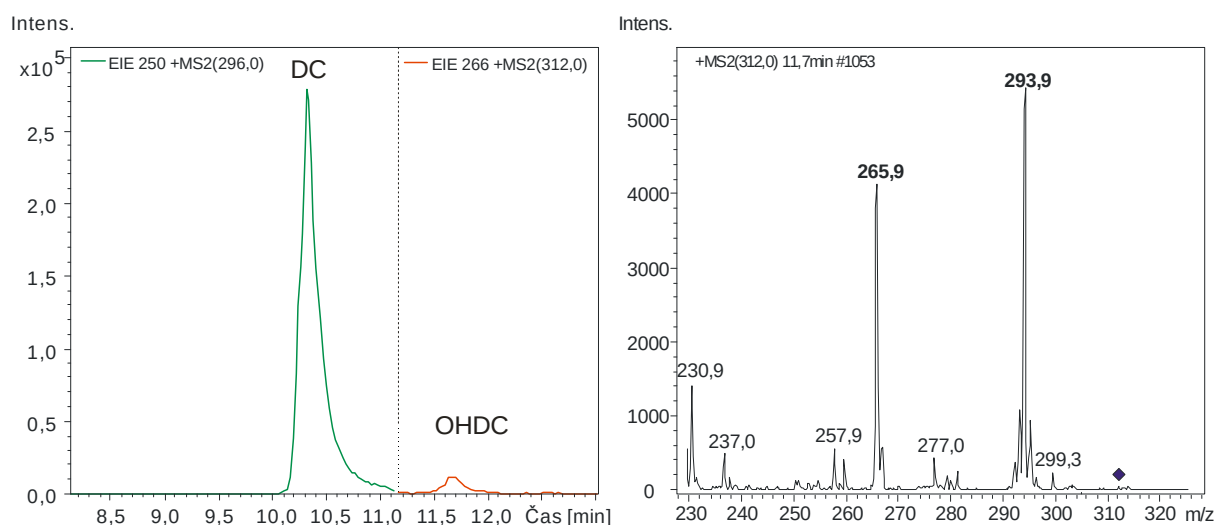
Obr. 43 Vliv tlaku nebulizačního plynu na pohyb kapaliny v kapiláře. S přiblížením.

Výsledné nastavení prvního segmentu iontové pasti pro detekci on-line generovaného produktu inkubace. Ostatní nastavení zůstalo zachováno.

První segment:

Trvání: 0,0 - 0,5 min
Napětí: 0 V
Tlak nebulizačního plynu: 7,5 psi
Scan: 290 - 320 m/z
Smart Target Settings: 300 m/z

Toto nastavení bylo úspěšné a byl detekován produkt inkubace. Extrahované iontové elektroforeogramy MS² analýzy jsou uvedeny na Obr. 44 vpravo. Hmotnostní spektrum produktu je uvedeno na Obr. 44 vlevo.



Obr. 44 **Vpravo:** Část extrahovaných iontových elektroforeogramů EIE při 250 m/z pro DC a při 266 pro OHDC z MS² spektra. **Vlevo:** CE-MS² spektrum mateřského iontu 312 v čase 11,7 min

6.2.6 OPAKOVATELNOST

Pro CE-MS metodu s on-line inkubací byla proměřena opakovatelnost $n=10$. Relativní směrodatná odchylka byla pro DC (SRM: 296→250) 34 % a pro OHDC (SRM: 312→266) 46 %. Kvůli nedostatečné opakovatelnosti nebyla metoda použita ke kvantifikaci látek.

6.3 DISKUZE

V této diplomové práci jsem se zabývala vytvořením metody EMMA pro studium hydroxylace diclofenaku prostřednictvím isoformy cytochromu P450 2C9. U této metody probíhá enzymová reakce přímo v kapiláře a po inkubační fázi dochází k ukončení reakce separací reaktantů pomocí elektrického pole. Nejprve byla ověřena možnost, že tento enzymový systém může reagovat v kapiláře a to metodou, která zahrnovala dávkování celé reakční směsi, její inkubaci a následnou separaci.

Jako první byla vyzkoušena možnost použít jeden pufr pro inkubaci i separaci. Při použití inkubačního pufru TRIS-HCl o pH 8,50 jako BGE sice docházelo k separaci, ale s malou účinností. Při použití acetátu amonného nebo TRIS-borátu jako BGE byla separace dostatečná. Poté byl zkoumán vliv difuze po nadávkování vzorku obsahujícího substrát a produkt a následném ponechání vzorku 10 min v kapiláře před zahájením separace. Pro omezení vlivu případných jevů způsobených komplexní maticí vzorku byl využit pouze vzorek standardů bez enzymu. Při použití acetátového pufru se více projevoval vliv difuze, docházelo ke zhoršení tvaru píků, a proto byl pro další experimenty zvolen TRIS-borátový pufr.

Při dávkování celé reakční směsi bylo využíváno dávkování co nejvyššího objemu, tak aby v kapiláře vzniklo co největší množství produktu. Separace této směsi byla optimalizována volbou koncentrace a pH BGE. Při ověřování, že reakce může probíhat v kapiláře se využívaly různé postupy pro zohlednění různých podmínek v kapiláře a ve vialce umístěné na třepačce. V kapiláře byl poté detekován produkt enzymatické reakce.

Po ověření, že reakce může probíhat v kapiláře bylo pokračováno s optimalizací metody EMMA. Při optimalizaci byl základní otázkou směr pohybu enzymu v elektrickém poli. K určení jeho směru byly provedeny dva experimenty s různým uspořádáním dávkovaných reaktantů (1. enzym, 2. substrát; 1. substrát, 2. enzym) využívající ke stanovení mobility enzymu jeho enzymové aktivity. Bylo zjištěno, že výsledný náboj enzymu při daných podmínkách byl nulový a v kapiláře se pohyboval pouze s EOF. Nicméně při míchání využívajících aplikaci napětí docházelo k neuspokojivým výtěžkům enzymové reakce, přičemž možné příčiny nízké produkce při využití tohoto přístupu míchání jsou:

- Mícháním elektrickým polem dochází k inaktivaci enzymu.
- Vzhledem k tomu, že nejde o jeden enzym ale o komplex enzymů vázaných na membráně (cytochrom P450, cytochrom P450 reduktasa), může po aplikaci napětí docházet k jejich separaci a tím znemožnění průběhu enzymové reakce.
- Složky enzymového komplexu interagují se stěnou kapiláry.

Kvůli nízkým výtěžkům při metodě EMMA byla k míchání použita i technika TDLFP. Při tomto způsobu mísení reaktantů vznikalo dostatečné množství produktu, a proto byl tento přístup využit pro metodu využívající MS detekci iontovou pastí.

Pro spojení CE-MS byl vybrán těkavý pufr acetát amonný. Na separaci standardů bylo ověřeno, že se snižující se koncentrací BGE dochází k rychlejší separaci s vyšší intenzitou signálu, nicméně pro separaci inkubační směsi bylo nutné použít vyšší koncentraci acetátu amonného. Při nižší koncentraci nedocházelo k separaci, což mohlo být způsobeno velkým

množství proteinu ve vzorku nebo velkým objemem dávkované zóny. Při CE-MS separaci je separační napětí limitováno maximální hodnotou procházejícího proudu 50 μA , která je definovaná v software. Při vyšší koncentraci acetátu amonného a tím i při nižším aplikovaném napětí docházelo k snížení velikosti EOF a výraznému prodloužení separace, a proto byl pro urychlení analýzy po 10 minutě aplikován tlak 50 mbar na vstupní vialku s BGE.

Při inkubačních reakcích se projevil vliv sifonového efektu, který byl způsoben obtížnou nastavitelností přesné vzájemné polohy výstupního konce kapiláry v elektrospreji a vstupního konce kapiláry v CE. Při počátečních podmínkách docházelo k pohybu kapaliny směrem od hmotnostního spektrometru. Po nadávkování zón substrátu a enzymu a inkubační fázi, tedy 10 minutovém prostoji bez aplikace napětí, nebyl po zahájení separace detekován signál sledovaných látek. Tento problém byl nejprve řešen kontinuální aplikací tlaku na vialku umístěnou na vstupní konec kapiláry během inkubační fáze. Při tomto způsobu docházelo již k detekci analytů, ale byl vyzkoušen i druhý působ, jak omezit sifonový efekt ohleduplnější k přístrojovému vybavení.

Sifonový efekt byl potlačen prostřednictvím změny tlaku nebulizačního plynu. Byla nalezena optimální hodnota tohoto tlaku a poté byla uskutečněna reakce využívající on-line probíhající enzymatickou reakci spojenou s MS detekcí. Byl úspěšně detekován produkt enzymové reakce, ale opakovatelnost stanovení neumožnila kvantifikaci vzniklého produktu. Možné důvody velké chyby při stanovení jsou:

- Celá analýza obsahuje velké množství dílčích kroků.
- Nevhodnost iontové pasti ke kvantifikaci.

ZÁVĚR

Při vývoji on-line inkubační metody pro studium modelové reakce cytochromu P450 isoformy 2C9 s diclofenakem byla v této diplomové práci využita metodologie EMMA v kombinaci s technikou částečného plnění a amplifikací při nulovém potenciálu. Částečné plnění umožnilo uskutečnit enzymatickou reakci a zároveň separaci v optimálních podmínkách. Pro enzymové systémy vyžadující delší dobu inkubace pro získání dostatečného množství produktu lze využít amplifikaci při nulovém potenciálu. Kromě metodologie EMMA byla v této práci pro mísení reaktantů využita i technika TDLFP a lepších výsledků dosaženo s touto technikou.

Po zavedení metody založené na TDLFP využívající UV detekci byl optimalizována i CE-MS metoda, využívající komerční interface pro ionizaci elektrosperem a iontovou past. Pro identifikaci sledovaných látek bylo využito specifických fragmentů. Byl detekován substrát i produkt, nicméně nedostatečné výsledky při opakovatelnosti neumožnili kvantifikaci vzniklého produktu.

SUMMARY

The EMMA methodology in combination with partial filling and zero-potential amplification was used in this diploma thesis. The reaction of cytochrome P450 2C9 isoform with diclofenac was chosen as a model system. Partial filling technique enables to carry out the enzymatic reaction and separation simultaneously in optimal conditions. Amplification at zero potential allows to obtain sufficient amount of product in case of enzyme systems require longer incubation time. In this work both EMMA methodology and the technique TDLFP were used for mixing of reactants; better results were achieved with TDLFP.

First was optimized method using UV detection, CE-MS method was introduced afterwards. MS detection was achieved using commercial available electrospray ionization interface and ion trap. Compound was identified by specific fragmentation patterns. Substrate and product was successfully detected, but insufficient repeatability of substrate and product area did not allow consequent quantification.

POUŽITÉ INFORMAČNÍ ZDROJE

- [1] *High Performance Capillary Electrophoresis: A primer*. Germany: Agilent Technologies, 2009. Publication Part Number: 5990-3777EN.
- [2] Evenhuis, C. J.; Musheev, M. U.; Krylov, S. N., Universal Method for Determining Electrolyte Temperatures in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* 2011, 83, 1808-1814.
- [3] Pei, L.; Xie, L. J.; Lin, Q.; Ling, X. M.; Guan, Z.; Yang, Z. J., Studies on the adenosine deaminase-catalyzed conversion of adenosine and nucleoside prodrugs by different capillary electrophoresis modes. *Analytical Biochemistry* 2011, 414, 131-137.
- [4] Bao, J. M.; Regnier, F. E., Ultramicro enzyme assay in a capillary electrophoretic system. *Journal of Chromatography* 1992, 608, 217-224.
- [5] Zugel, S. A.; Burke, B. J.; Regnier, F. E.; Lytle, F. E., Electrophoretically mediated microanalysis of leucine aminopeptidase using two-photon excited fluorescence detection on a microchip. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 5731-5735.
- [6] Patterson, D. H.; Harmon, B. J.; Regnier, F. E., Electrophoretically mediated microanalysis of calcium. *Journal of Chromatography A* 1994, 662, 389-395.
- [7] Ptolemy, A. S.; Britz-McKibbin, P., Sample preconcentration with chemical derivatization in capillary electrophoresis - Capillary as preconcentrator, microreactor and chiral selector for high-throughput metabolite screening. *Journal of Chromatography A* 2006, 1106, 7-18.
- [8] Kaale, E.; Van Goidsenhoven, E.; Van Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmartens, J., Electrophoretically mediated microanalysis of gentamicin with in-capillary derivatization and UV detection. *Electrophoresis* 2001, 22, 2746-2754.
- [9] Mason, P. E.; Schildt, D. C.; Strein, T. G., In-capillary determination of creatinine with electrophoretically mediated microanalysis: Characterization of the effects of reagent zone and buffer conditions. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 154-158.
- [10] Van Dyck, S.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J., Michaelis-Menten analysis of bovine plasma amine oxidase by capillary electrophoresis using electrophoretically mediated microanalysis in a partially filled capillary. *Electrophoresis* 2001, 22, 1436-1442.
- [11] Zeisbergerova, M.; Reminek, R.; Madr, A.; Glatz, Z.; Hoogmartens, J.; Van Schepdael, A., On-line drug metabolites generation and their subsequent target analysis by capillary zone electrophoresis with UV-absorption detection. *Electrophoresis* 2010, 31, 3256-3262.
- [12] Okhonin, V.; Liu, X.; Krylov, S. N., Transverse diffusion of laminar flow profiles to produce capillary nanoreactors. *Analytical Chemistry* 2005, 77, 5925-5929.
- [13] Krylova, S. M.; Okhonin, V.; Krylov, S. N., Transverse diffusion of laminar flow profiles - a generic method for mixing reactants in capillary microreactor. *Journal of Separation Science* 2009, 32, 742-756.
- [14] Yunusov, D.; So, M.; Shayan, S.; Okhonin, V.; Musheev, M. U.; Berezovski, M. V.; Krylov, S. N., Kinetic capillary electrophoresis-based affinity screening of aptamer clones. *Analytica Chimica Acta* 2009, 631, 102-107.
- [15] Berezovski, M. V.; Mak, T. W.; Krylov, S. N., Cell lysis inside the capillary facilitated by transverse diffusion of laminar flow profiles (TDLFP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387, 91-96.
- [16] Olivares, J. A.; Nguyen, N. T.; Yonker, C. R.; Smith, R. D., Online mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* 1987, 59, 1230-1232.
- [17] Moini, M., Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 4241-4246.
- [18] OptiMS Technology. BeckmanCoulter [online]. © 2000-2011 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/capillary-electrophoresis/optims-technology/index.htm>

- [19] Huhn, C.; Ramautar, R.; Wuhler, M.; Somsen, G. W., Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 396, 297-314.
- [20] Soga, T.; Ueno, Y.; Naraoka, H.; Matsuda, K.; Tomita, M.; Nishioka, T., Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Analytical Chemistry* 2002, 74, 6224-6229.
- [21] Kok, M. G. M.; de Jong, G. J.; Somsen, G. W., Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-mass spectrometry of anionic metabolites using a triethylamine-containing background electrolyte and sheath liquid. *Electrophoresis* 2011, 32, 3016-3024.
- [22] Huikko, K.; Kotiaho, T.; Kostianen, R., Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002, 16, 1562-1568.
- [23] van Wijk, A. M.; Muijselaar, P. G.; Stegman, K.; de Jong, G. J., Capillary electrophoresis-mass spectrometry for impurity profiling of basic pharmaceuticals using non-volatile background electrolytes. *Journal of Chromatography A* 2007, 1159, 175-184.
- [24] Guengerich, F. P., Cytochromes P450, Drugs, and Diseases. *Molecular Interventions* 2003, 3, 194-204.
- [25] Ansele, J. H.; Thakker, D. R., High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 93, 239-255.
- [26] *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*. 3rd ed.; Ortiz de Montellano, P. R., New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, ISBN 978-0306483240.
- [27] Tang, W.; Stearns, R. A.; Bandiera, S. M.; Zhang, Y.; Raab, C.; Braun, M. P.; Dean, D. C.; Pang, J. M.; Leung, K. H.; Doss, G. A.; Strauss, J. R.; Kwei, G. Y.; Rushmore, T. H.; Chiu, S. H. L.; Baillie, T. A., Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: Identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* 1999, 27, 365-372.
- [28] Bort, R.; Mace, K.; Boobis, A.; Gomez-Lechon, M. J.; Pfeifer, A.; Castell, J., Hepatic metabolism of diclofenac: Role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochemical Pharmacology* 1999, 58, 787-796.
- [29] Galmier, M. J.; Bouchon, B.; Madelmont, J. C.; Mercier, F.; Pilotaz, F.; Lartigue, C., Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 38, 790-796.
- [30] Phillips, I. R.; Shephard E. A. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, 1998, 107. ISBN 08-960-3519-0.
- [31] Mádr, A. Diplomová práce: Studium metabolismu léčiv cytochromy P450 pomocí kapilární elektroforézy. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2010. 59s.
- [32] *Installing the Agilent CE-ESI-MS Sprayer Kit*. Germany: Agilent Technologies, 2002. Publication Part Number: G1600-90117.
- [33] *CE/MS Analysis Optimization Guide*. Germany: Agilent Technologies, 2010. Publication Part Number: G7100-90001.
- [34] Řemínek, R.; Zeisbergerová, M.; Glatz, Z., A generic method for on-line screenings of drug metabolism mediated by cytochrome P450 2C9 isoform by means of capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, podáno do tisku: květen 2012.