



# Využití kapilární elektroforézy při studiu enzymů

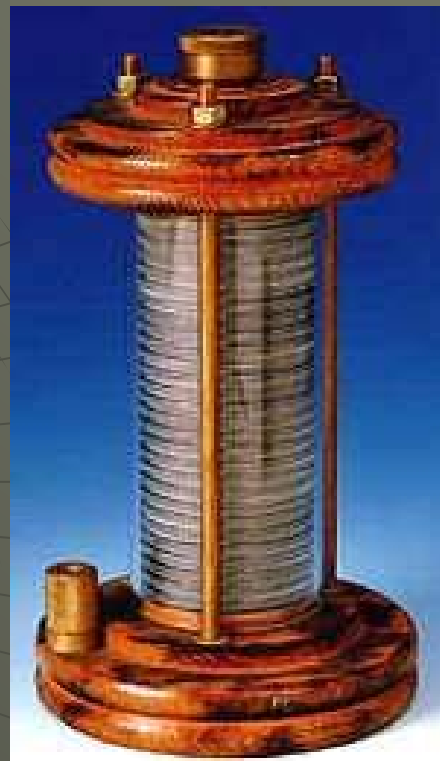
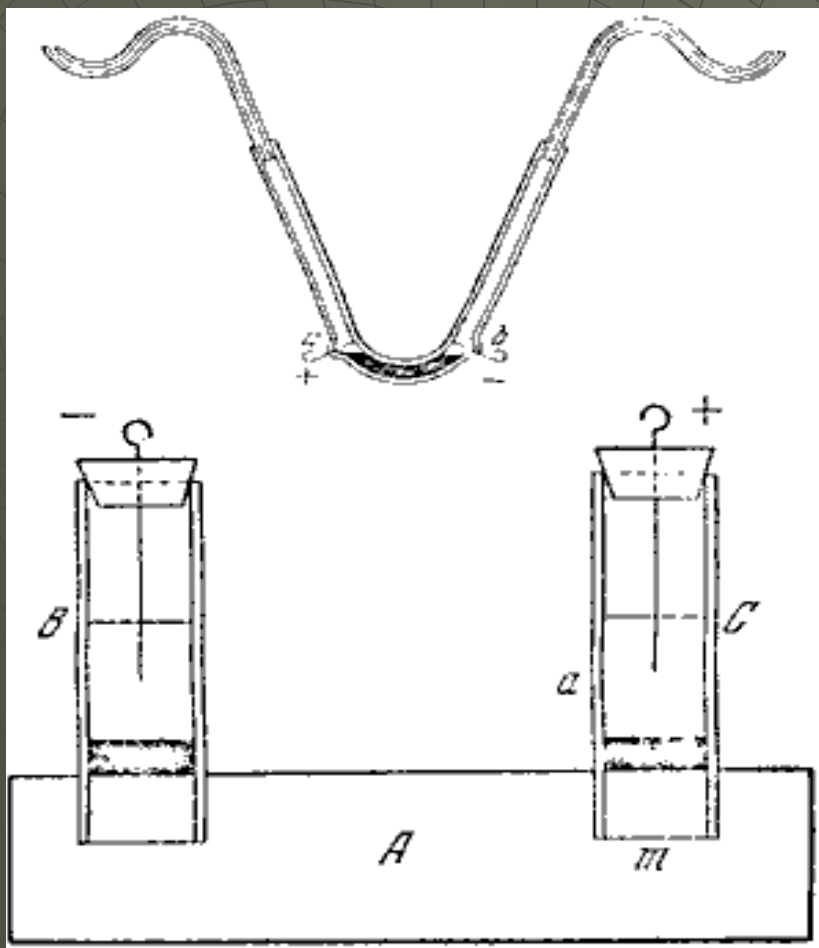
Zdeněk Glatz

Ústav biochemie př.f. MU

# Frederic Reuss

(1807)

## Katoforéza



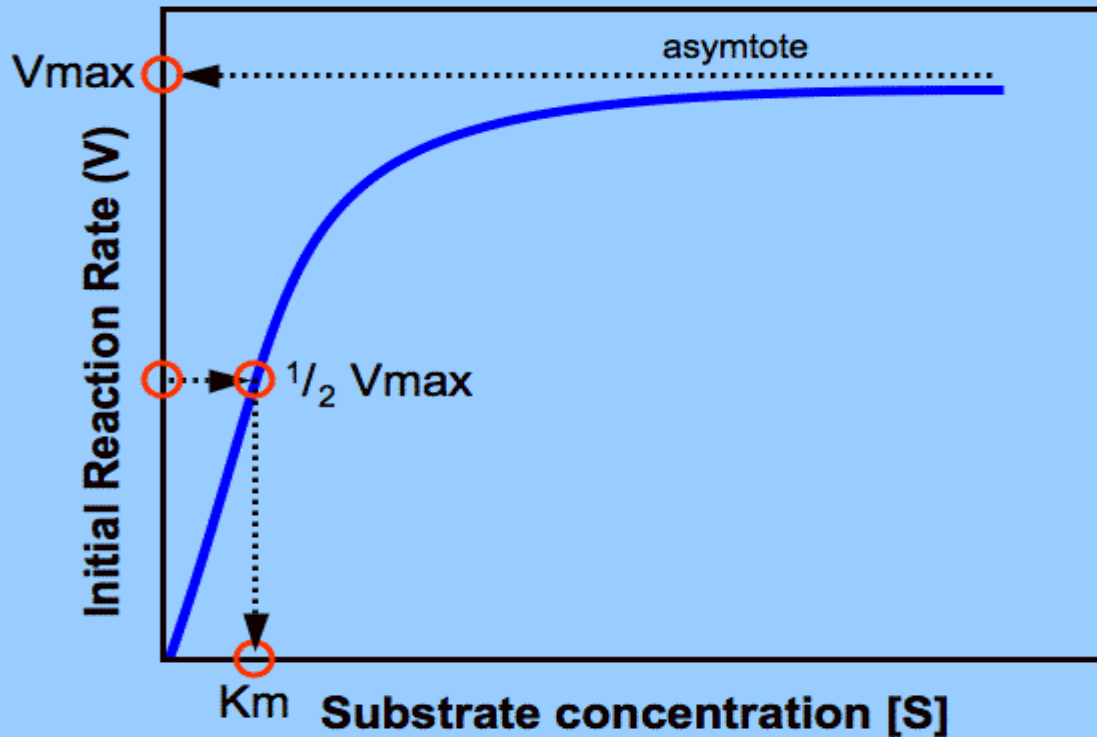
# Elektroforéza

(1909)

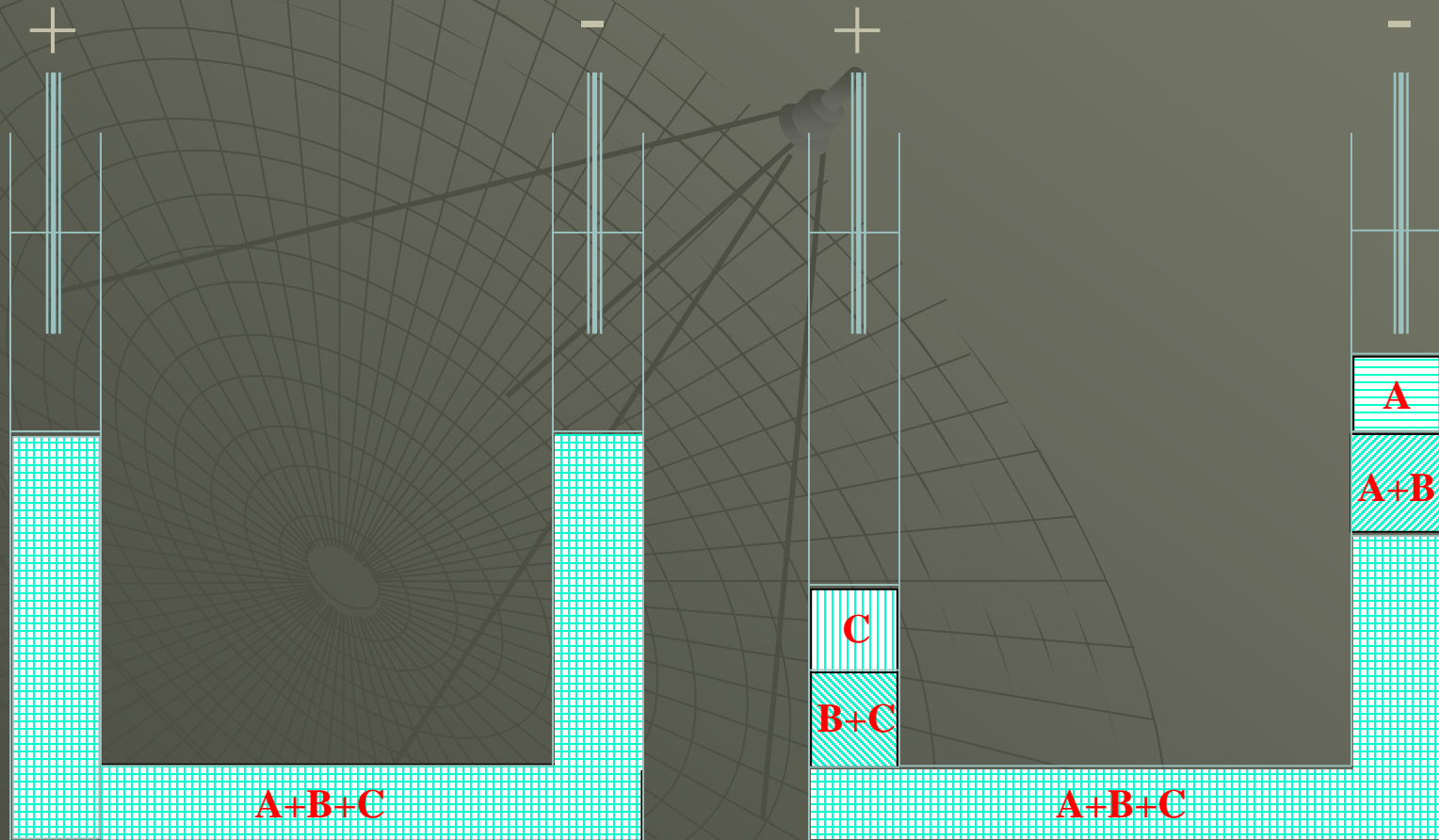
Leonor Michaelis

## Michaelis Menten Plot

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

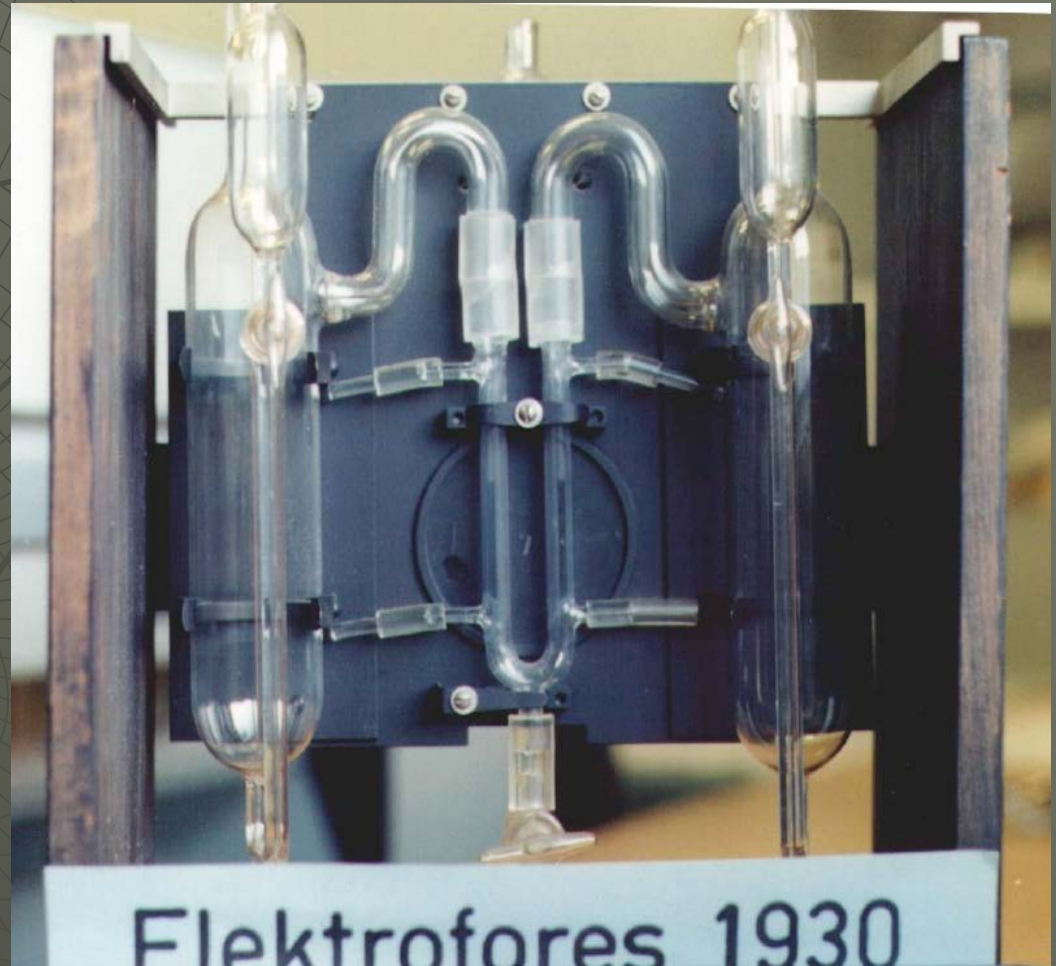


# Volná elektroforéza (1925)



# Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)



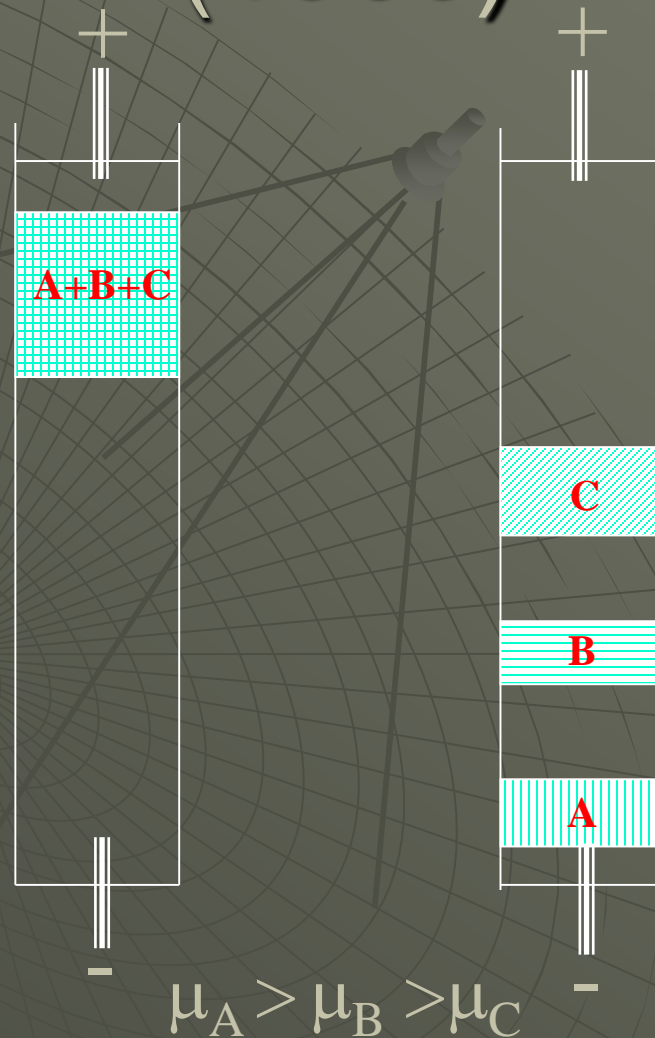
# Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)

Nobelova cena 1948



# Zónová elektroforéza (1939)

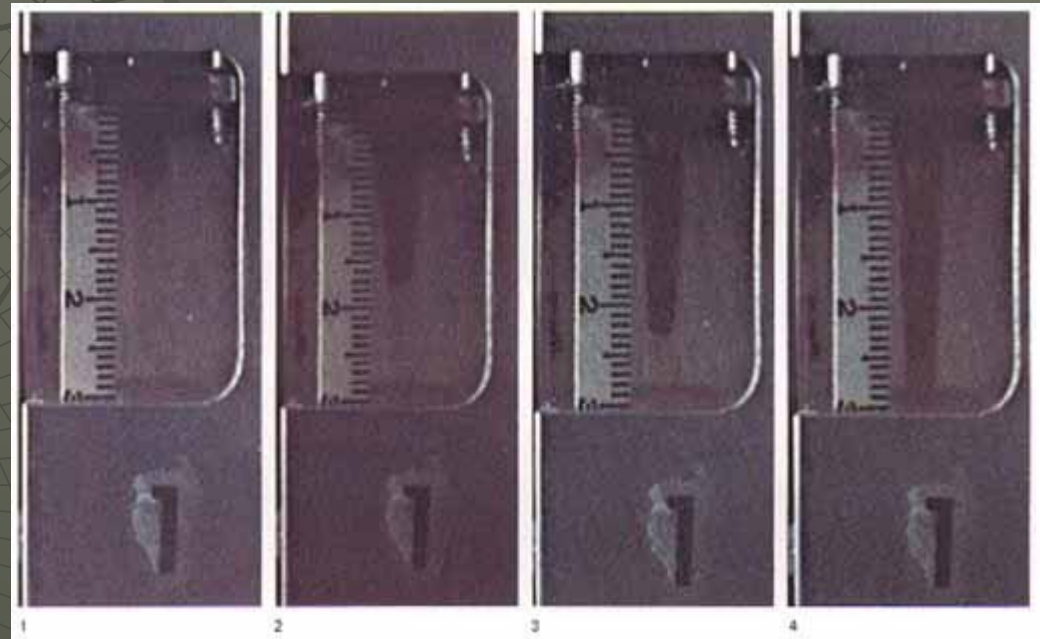
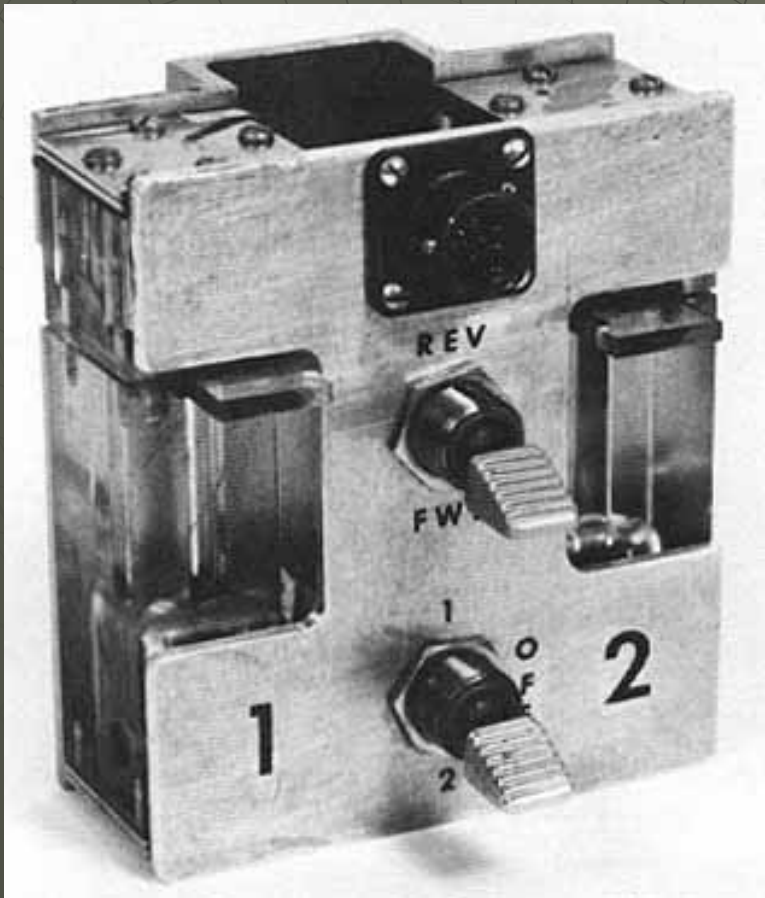


# Skylab





# Skylab



# Stabilizace

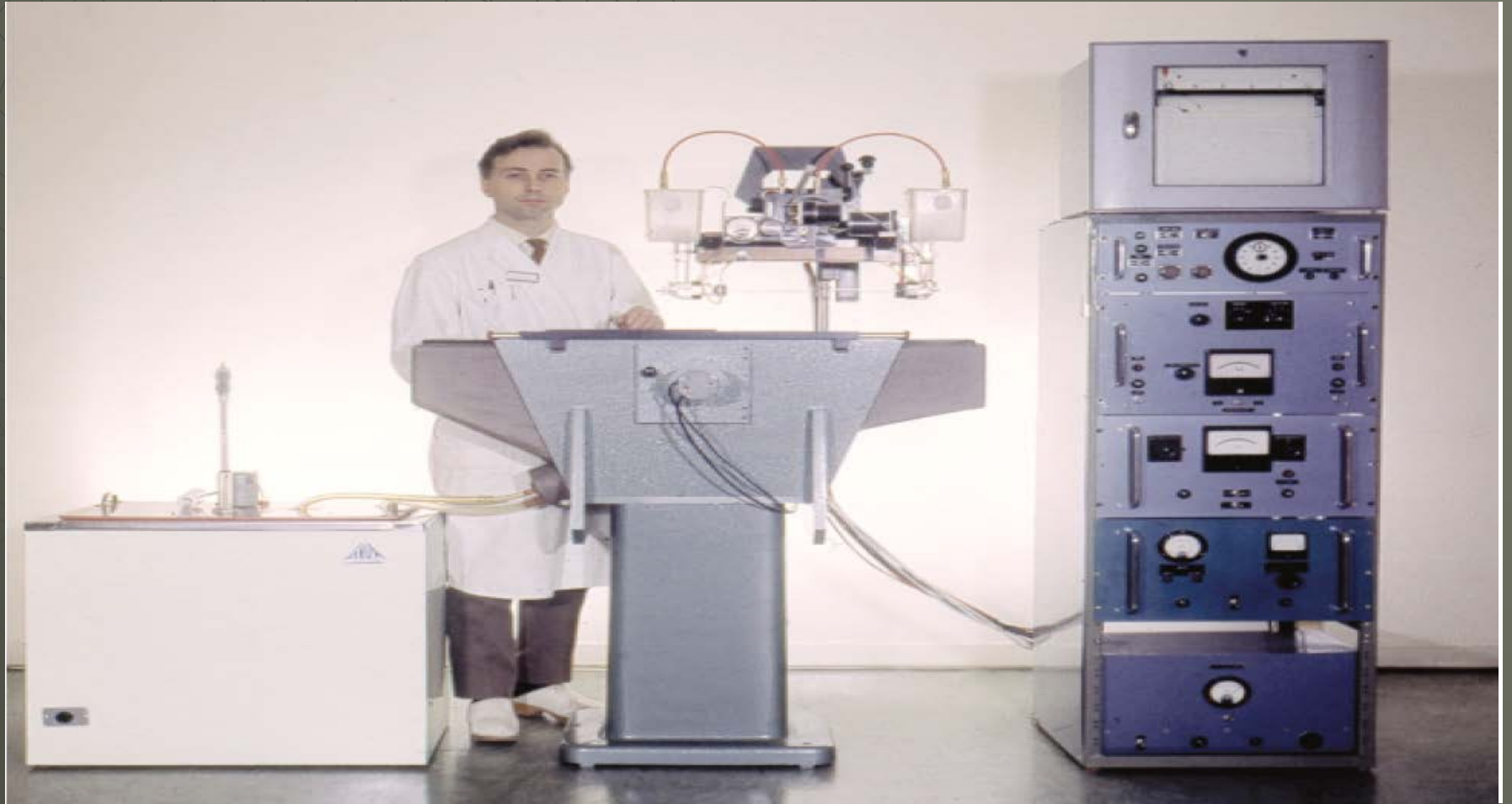
- ◆ Porézní media
- ◆ Kapilára

# Porézní media

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

# Kapilární elektroforéza

1967 - Hjerten  
3 mm kapilára



# Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová  
75  $\mu\text{m}$  kapilára

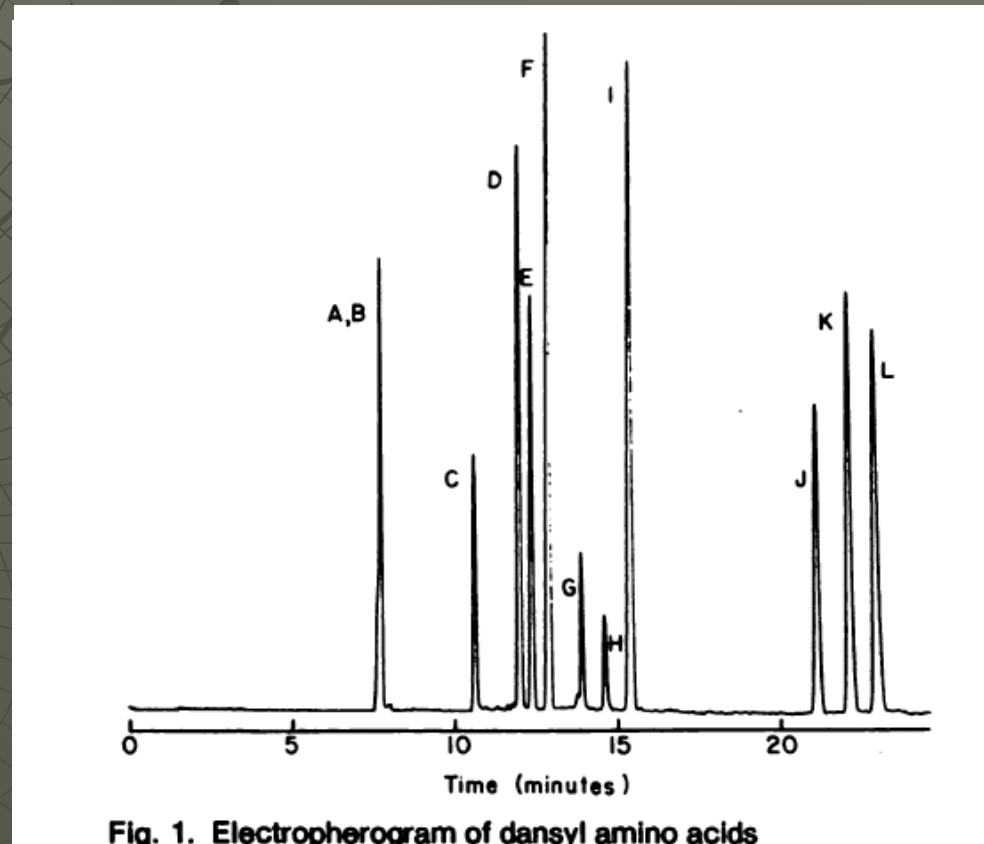


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

# Beckman 1987

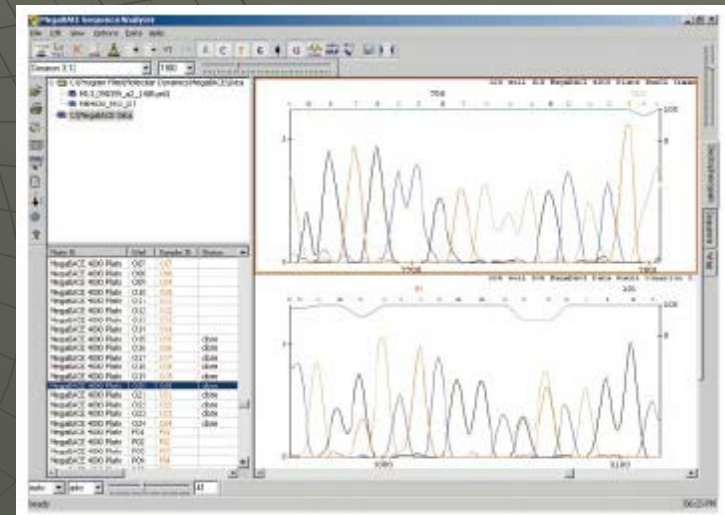
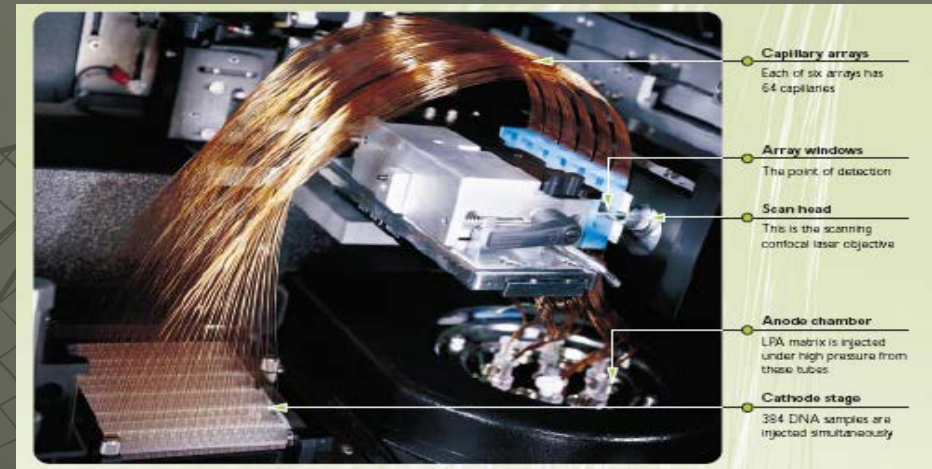


# 2003 - Projekt lidského genomu

## Paralelní sekvencování

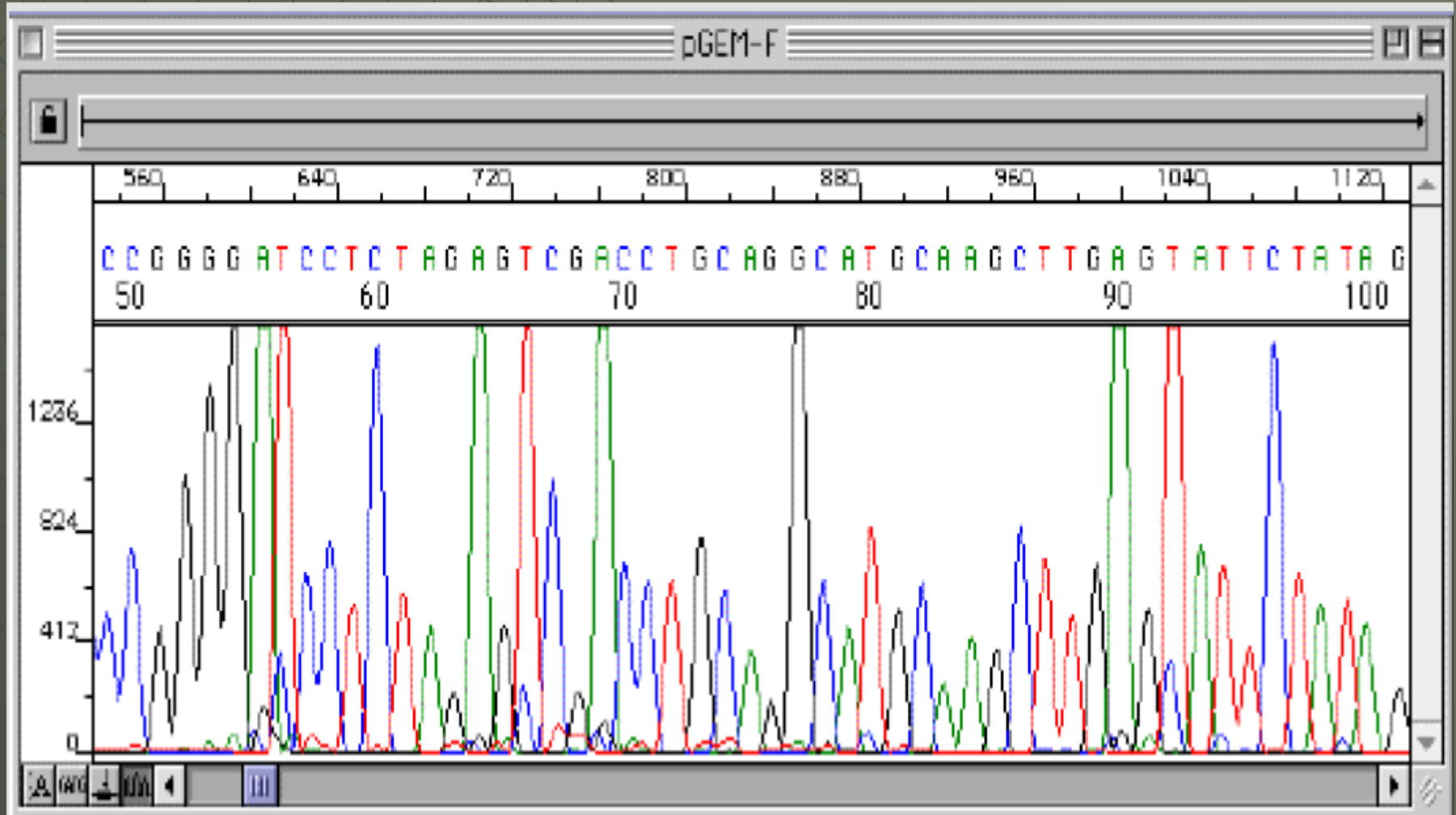


## Automatizace



# 2003 - Projekt lidského genomu

**1 DNA – 1 vzorek**





# 300 sekvenátorů





Proč enzymy ?

# Enzymy – molekulární stroje



# Enzymy – molekulární stroje



*Rychlostní konstanta :*

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

# Enzymy – molekulární stroje

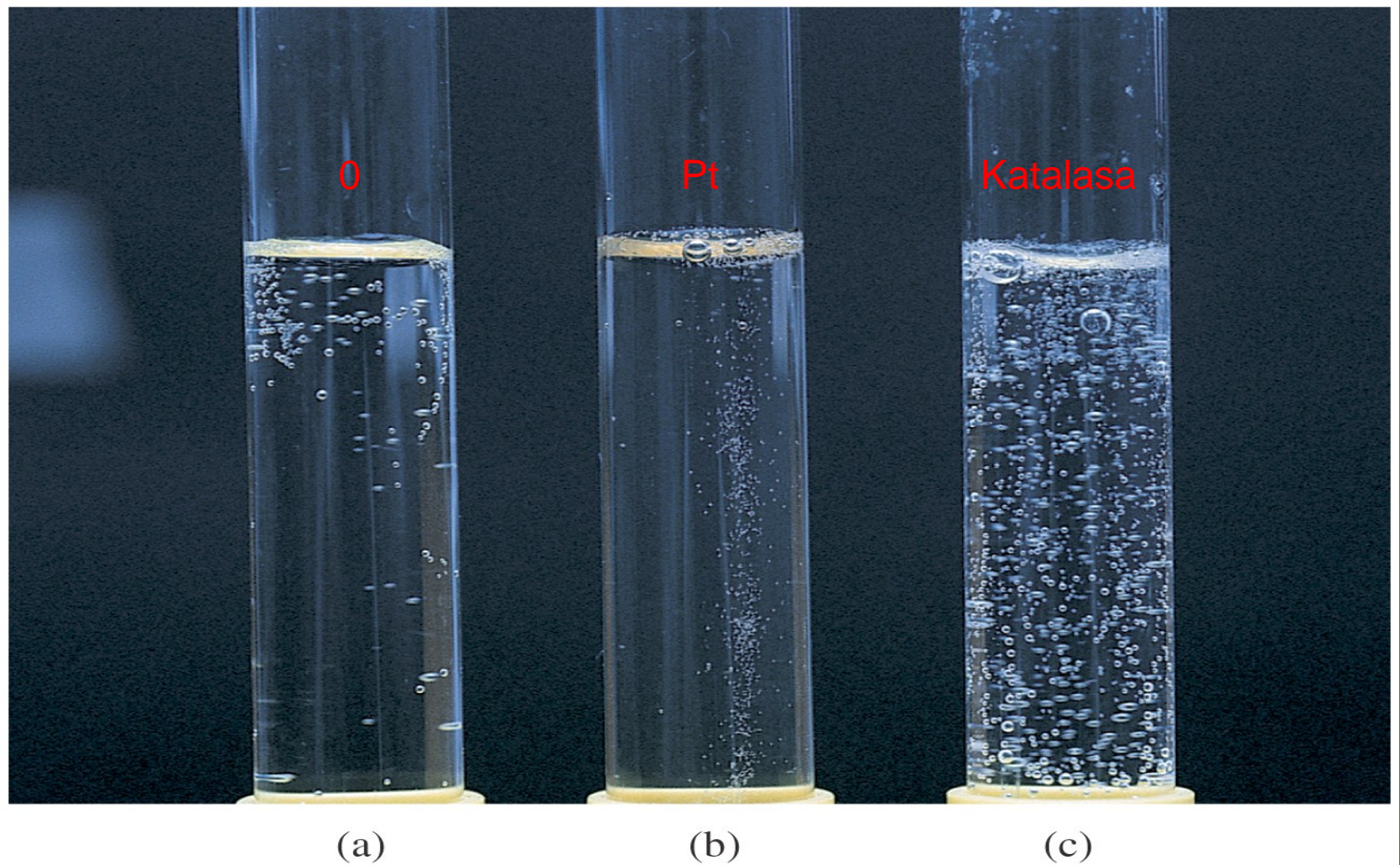


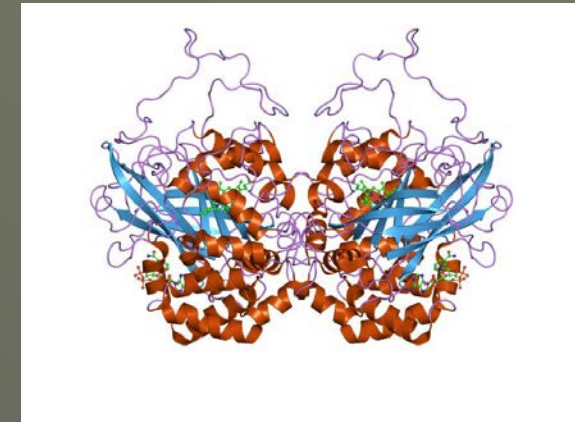
Figure 5-1 Concepts in Biochemistry, 3/e

# Enzymy – molekulární stroje

*Katalasa*



Číslo přeměny **40 000 000**



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

# Enzymy – stanovení koncentrace

*Escherichia coli*



3 000 bílkovin

*Homo sapiens*



25 000 bílkovin

Koncentrace ↔ Katalytická aktivita



Substrát



Produkt

# Stanovení aktivity enzymů

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

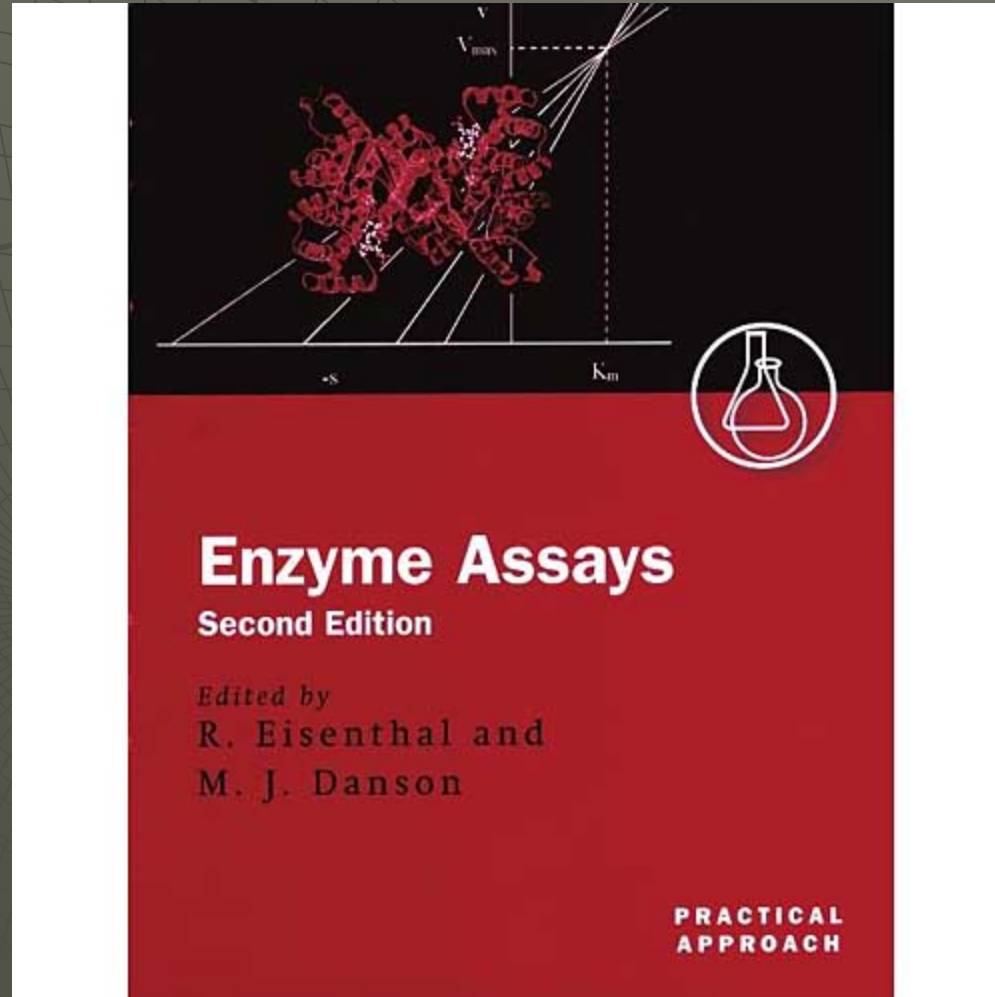


# Metody používané pro stanovení aktivity enzymů

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

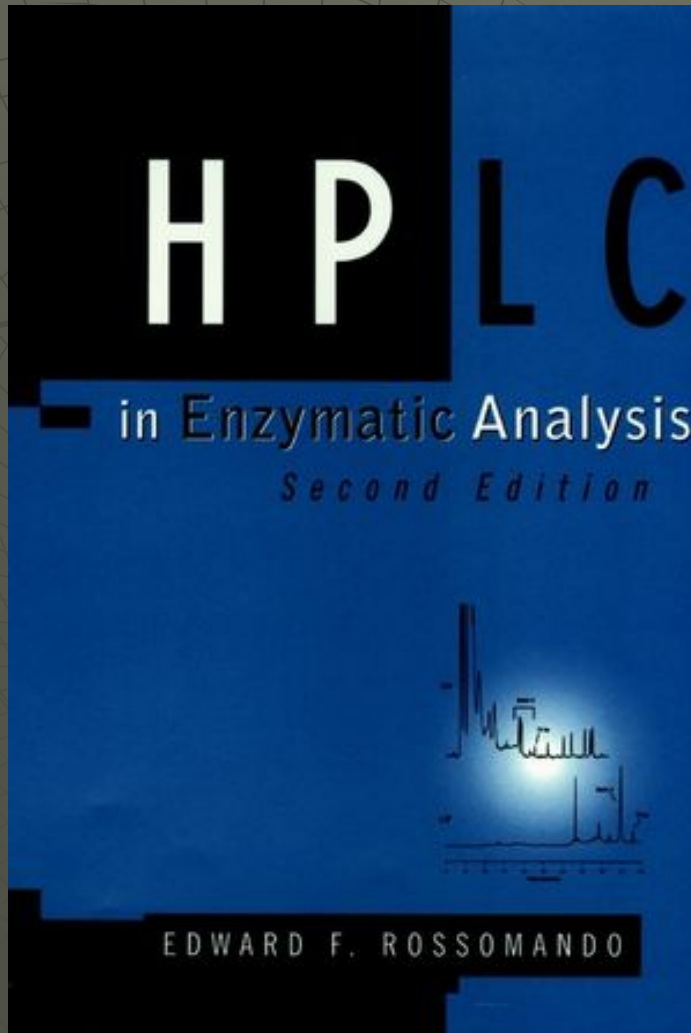
# Enzyme Assays

R. Eisingthal and M.J. Danson



# HPLC in Enzymatic Analysis

## E.F. Rossomando





Proč enzymy a CE ?

# Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**

nabité i neutrální látky

nízkomolekulární i vysokomolekulární látky

chirální i achirální látky

bakterie i viry

# Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace

CZE, MEKC,  
CIEF, CIP  
NACE, MEEKC,  
CGE, ChCE



CEC

# Výhody CE

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

# Výhody CE

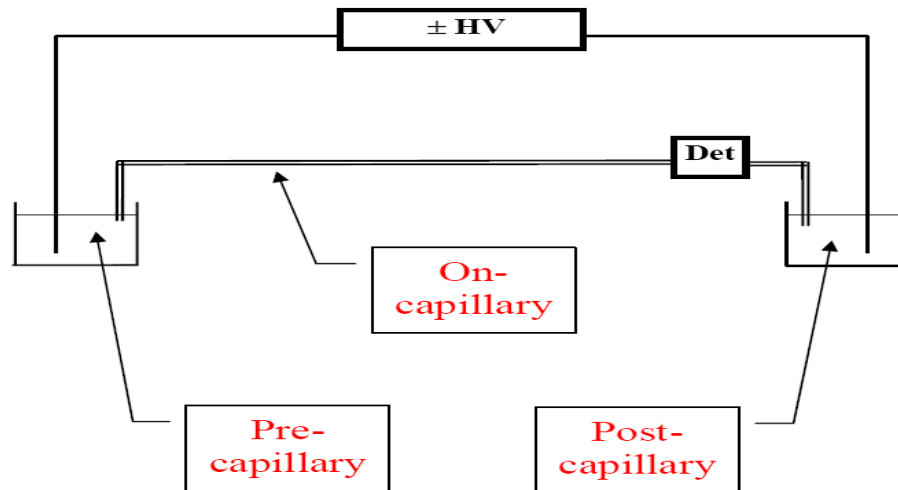
**Kapilára jako reakční prostor**



# Studium enzymových reakcí pomocí CE

- „Pre-capillary“
- „On-capillary“
- „Post-capillary“

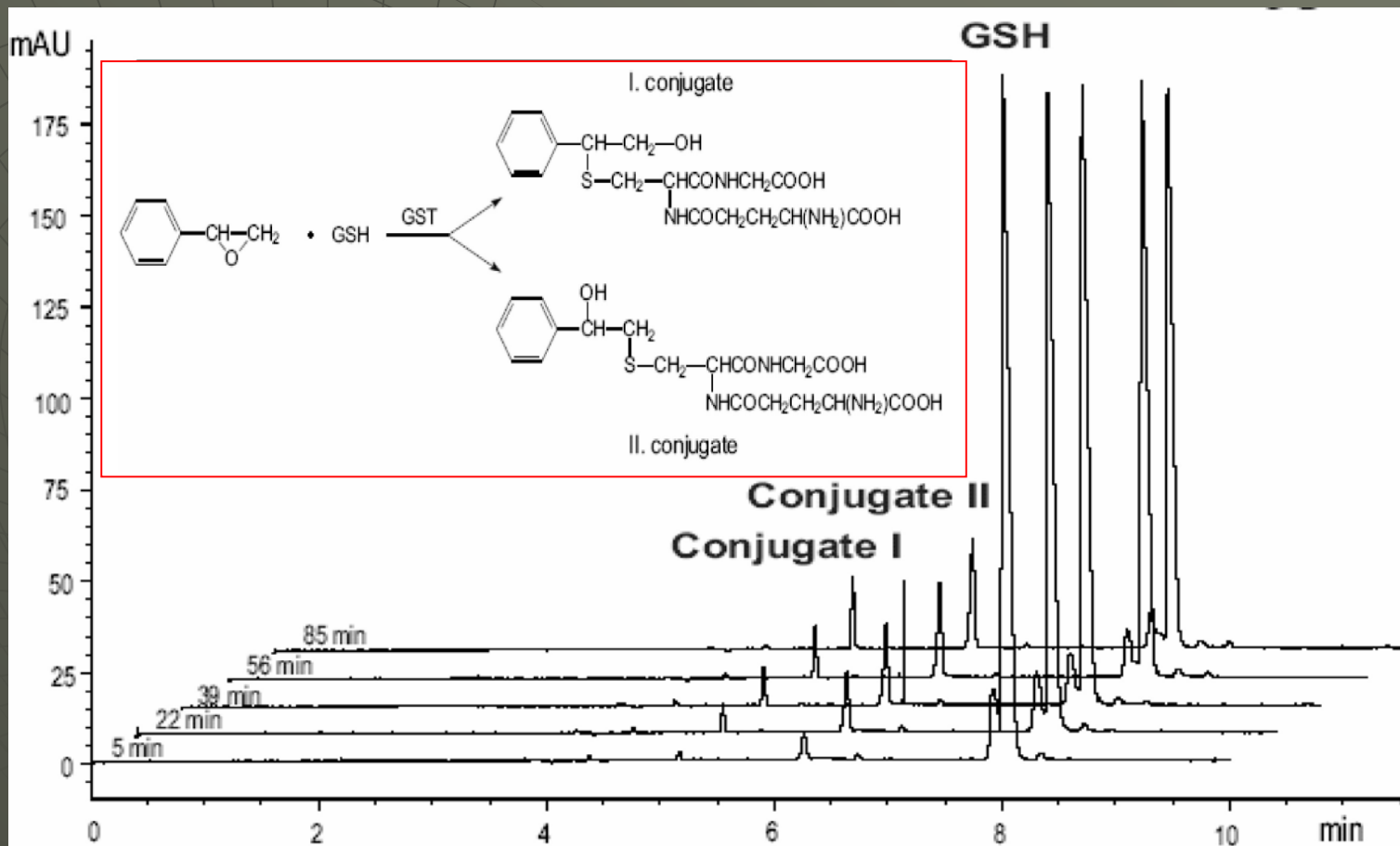
**HOMOGENNÍ**



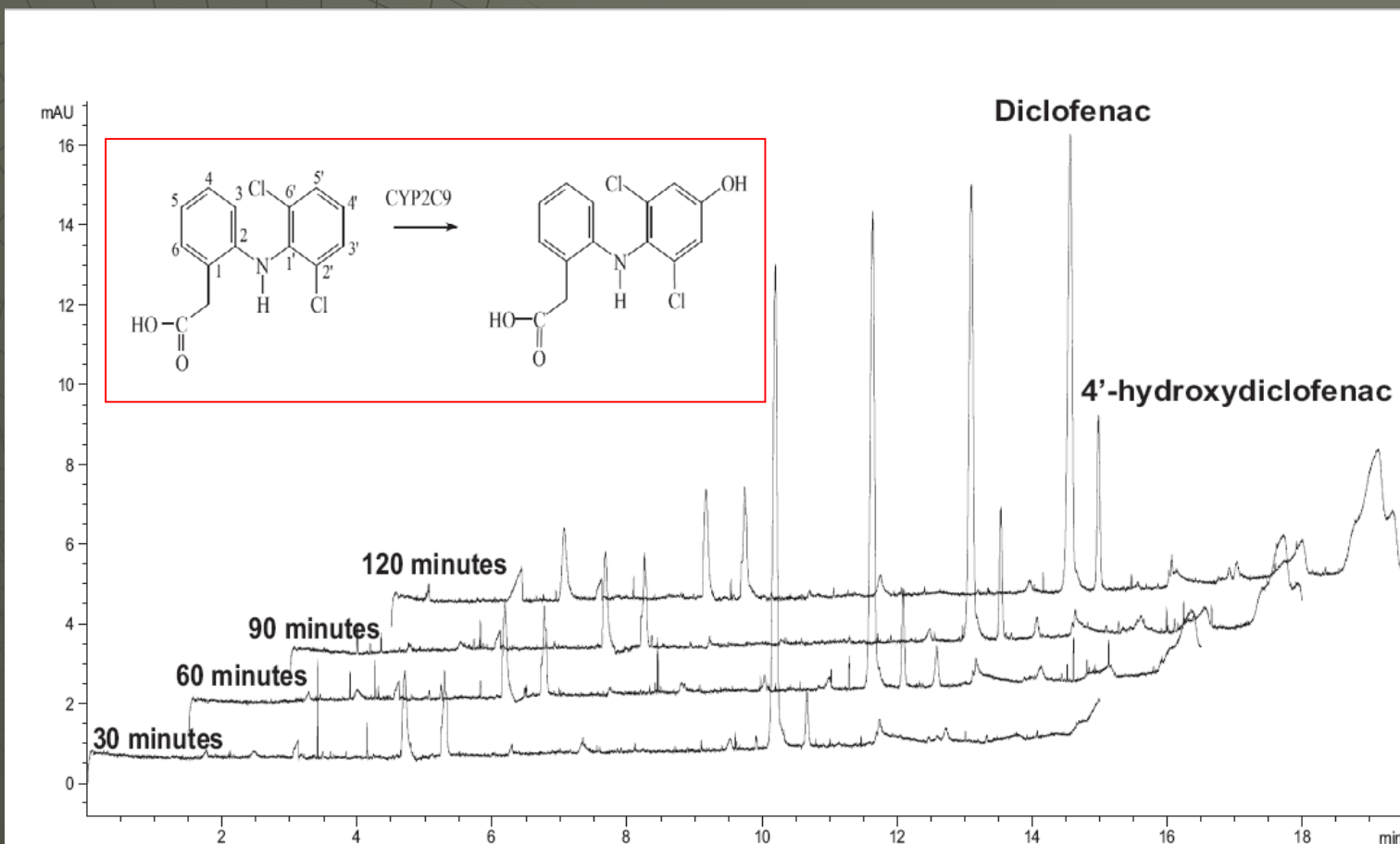
# Studium enzymových reakcí pomocí CE

- **„Pre-capillary“ provedení :**
  - kapilára je používána pouze pro separaci a detekci
  - nutná manipulace mezi enzymovou reakcí a separací

# Kinetické stanovení glutathion S-transferasa



# „End point“ stanovení cytochrom P450 2C9



# Studium enzymových reakcí pomocí CE

- **„On-capillary“ provedení :**
  - kapilára je navíc využita i jako reakční prostředí
  - stanovení je automatizováno – dávkování, smísení, inkubace, separace, detekce ⇒ CE

# Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza

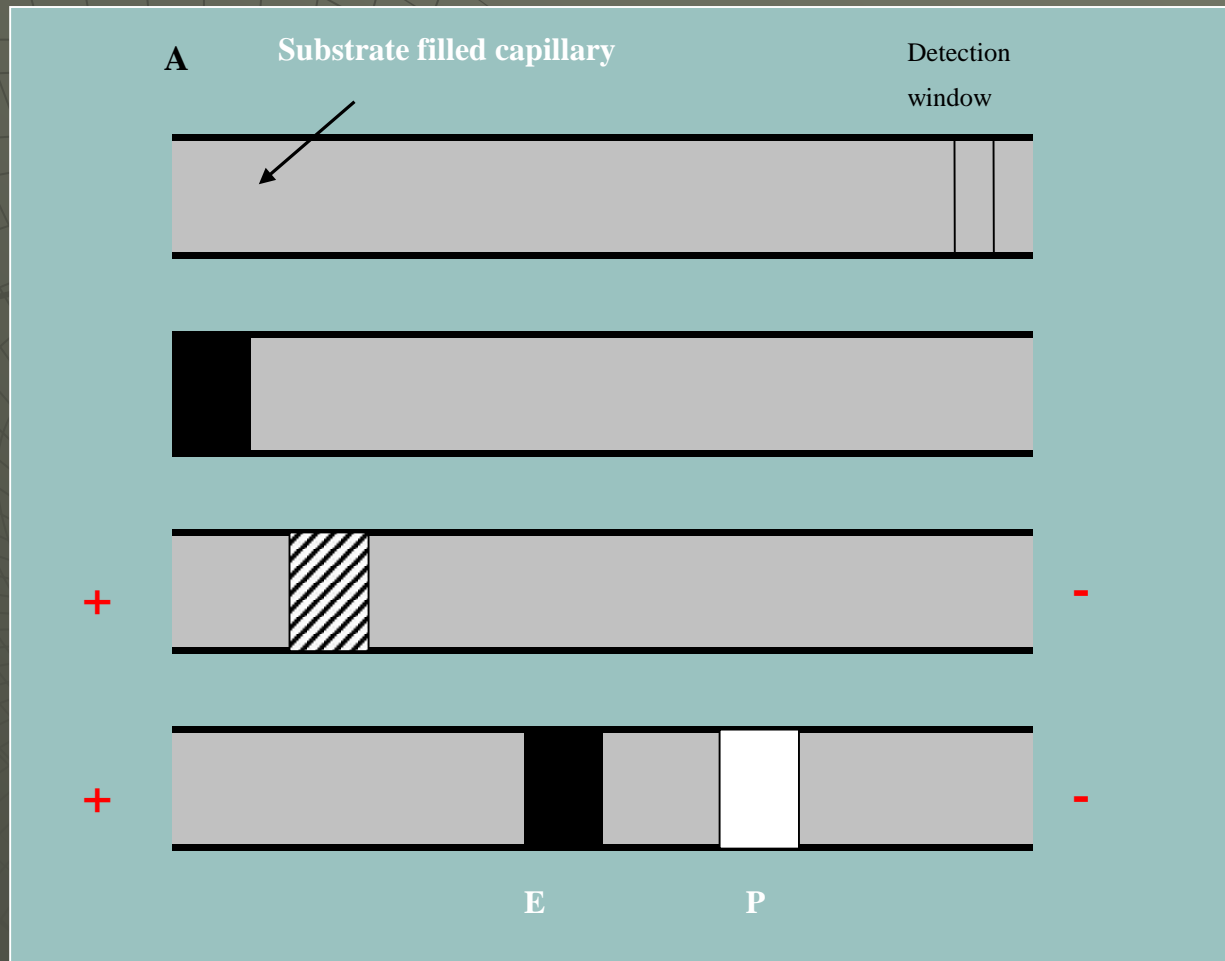
## Electrophoretically **M**ediated **M**icro**A**nalysis **EMMA**

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

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

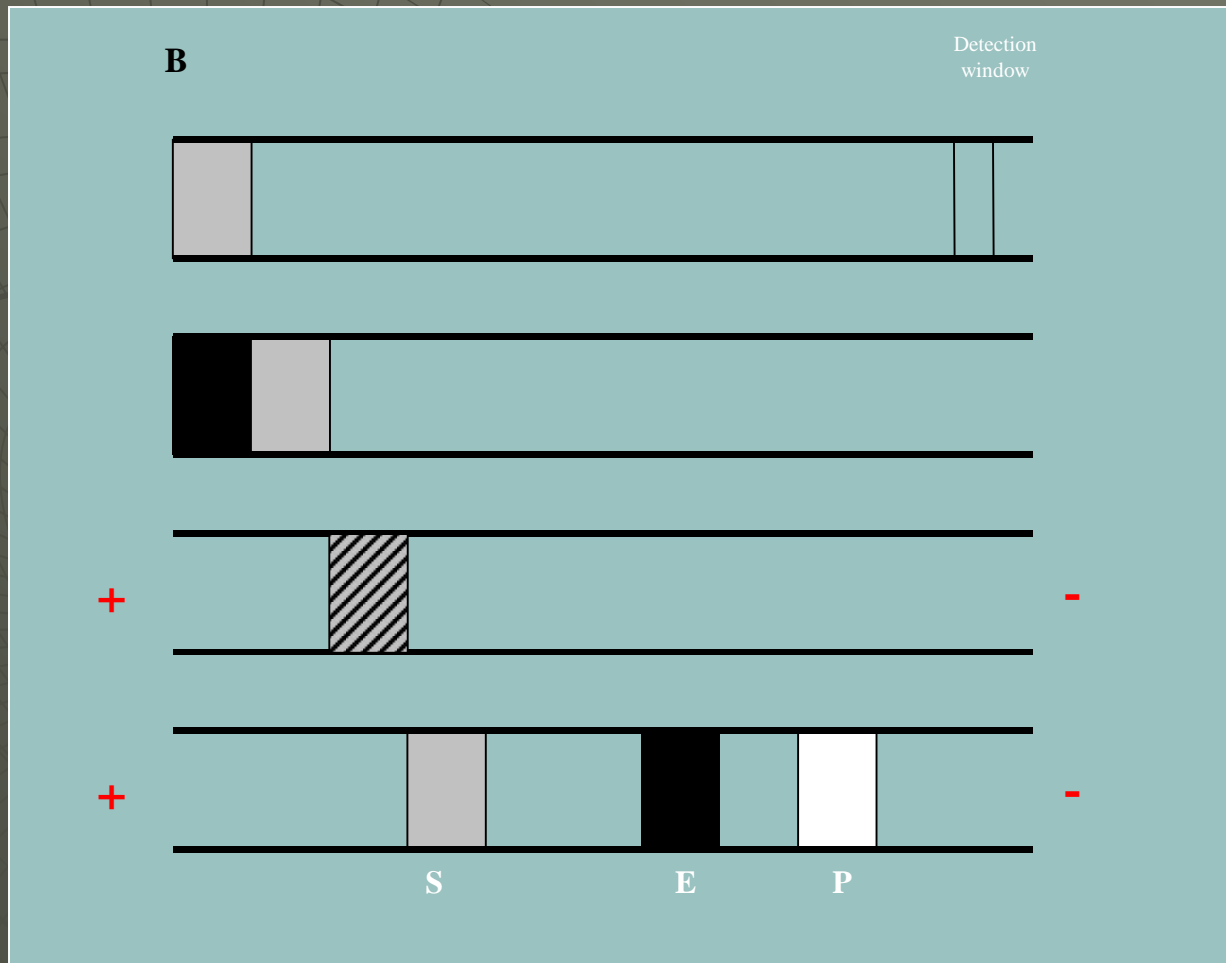


# EMMA - kontinuální mód





# EMMA – zonální mód



# EMMA – zonální mód

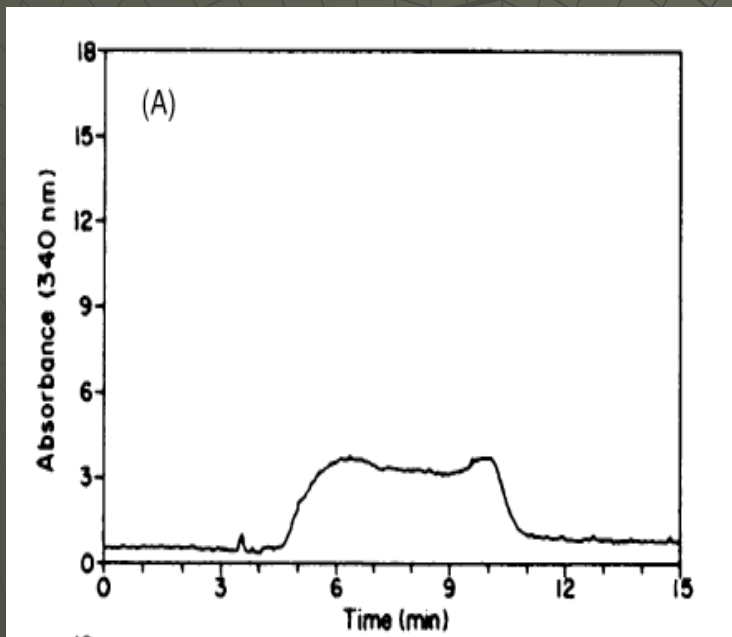
## Výhody :

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

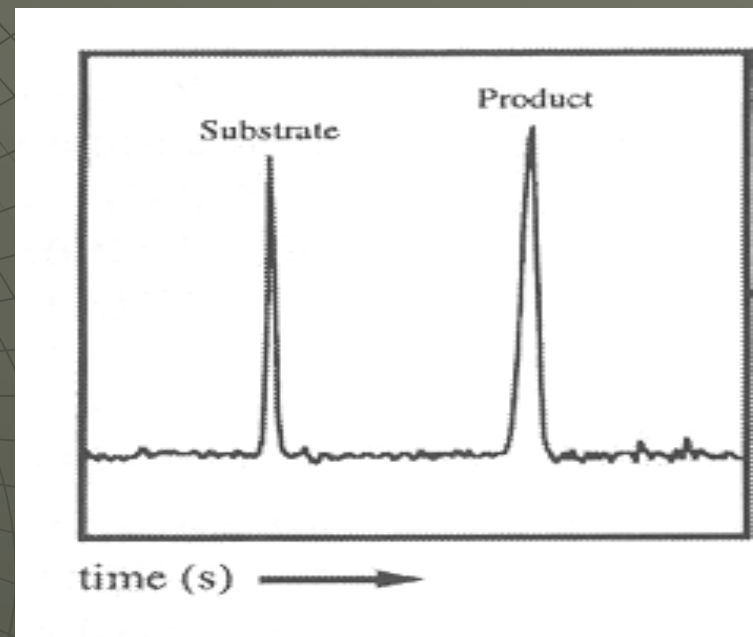
# EMMA – vyhodnocení



Kontinuální mód



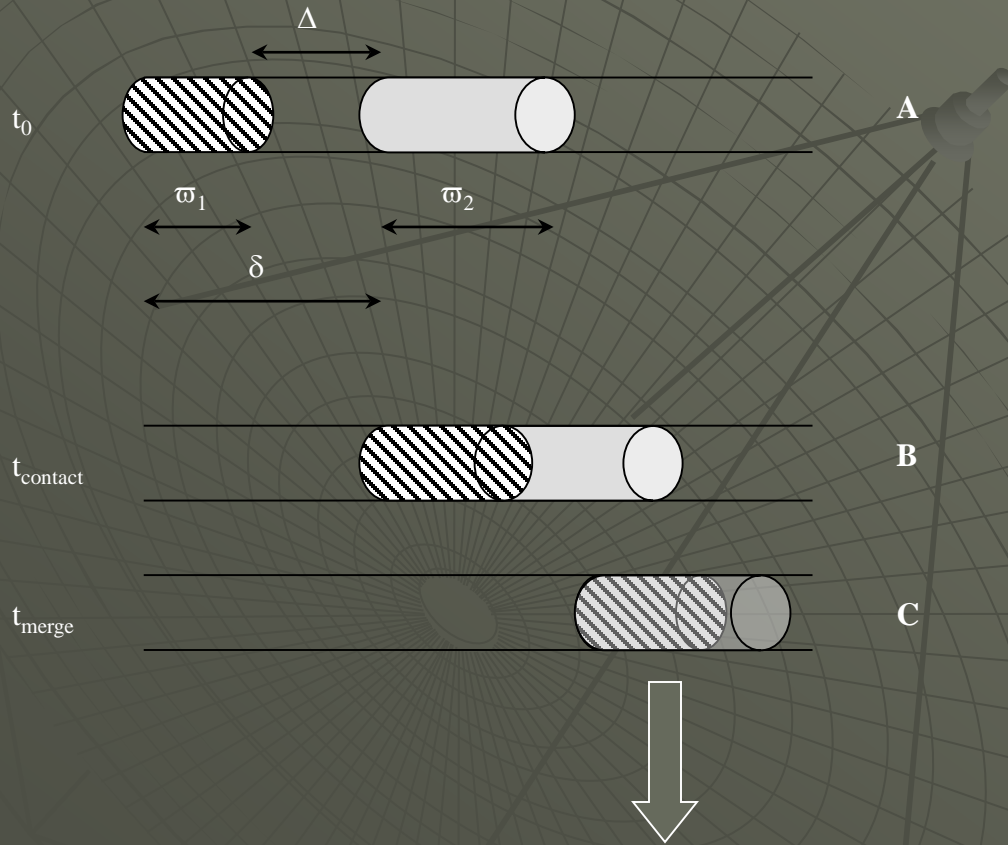
Zonální mód



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

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

# EMMA – zonální mód



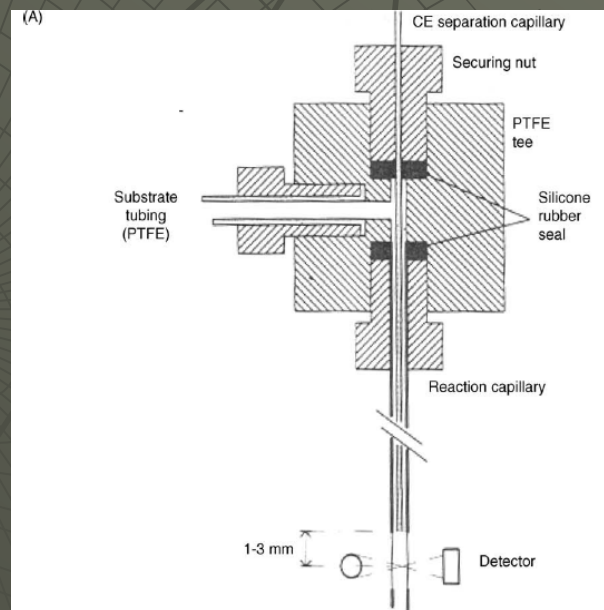
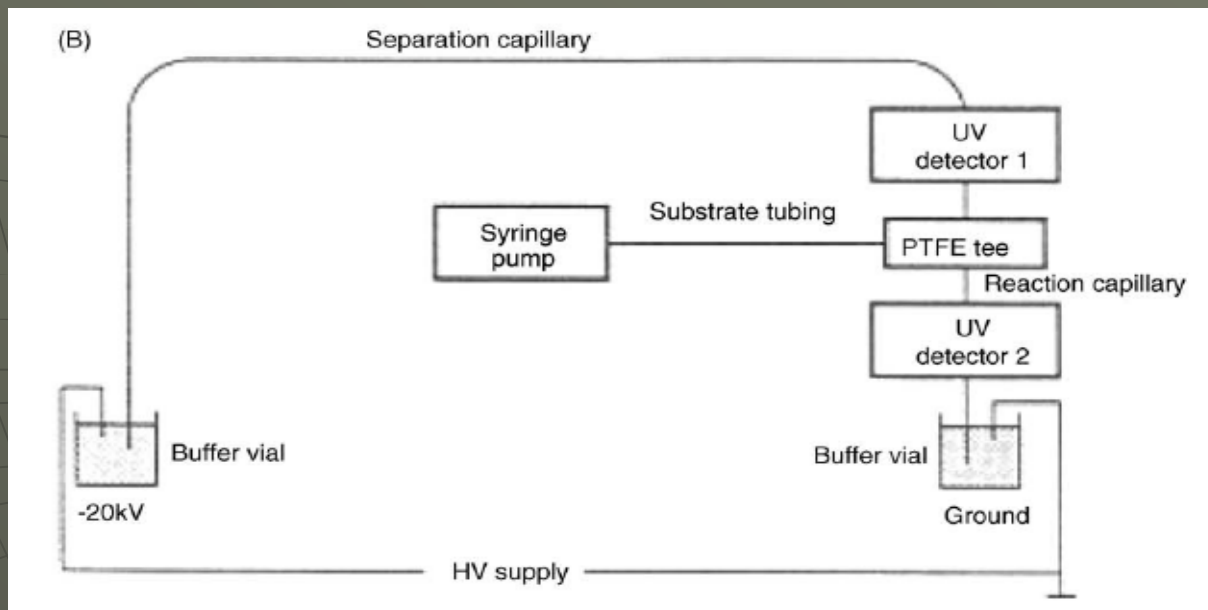
$$t_{\text{reaction}} = \frac{w_1 + w_2}{\Delta \mu_{EP} E}$$

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

vypnutí el. napětí: "zero potential amplification"

# Studium enzymových reakcí pomocí CE

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

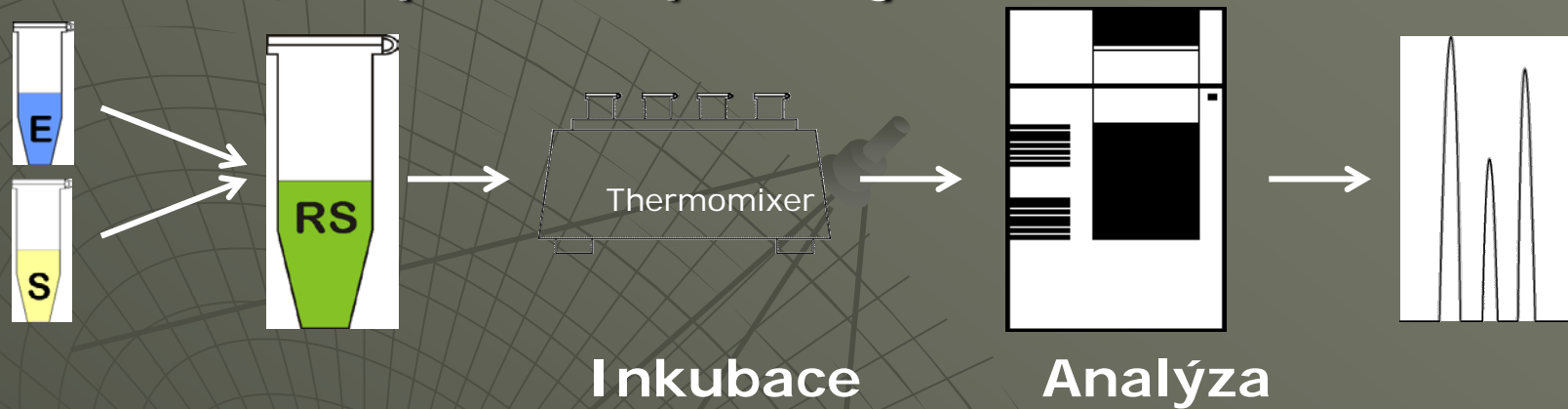


The background features a large, faint circular grid pattern. A small, dark, cylindrical object is positioned on a line that extends from the center of the grid towards the top right.

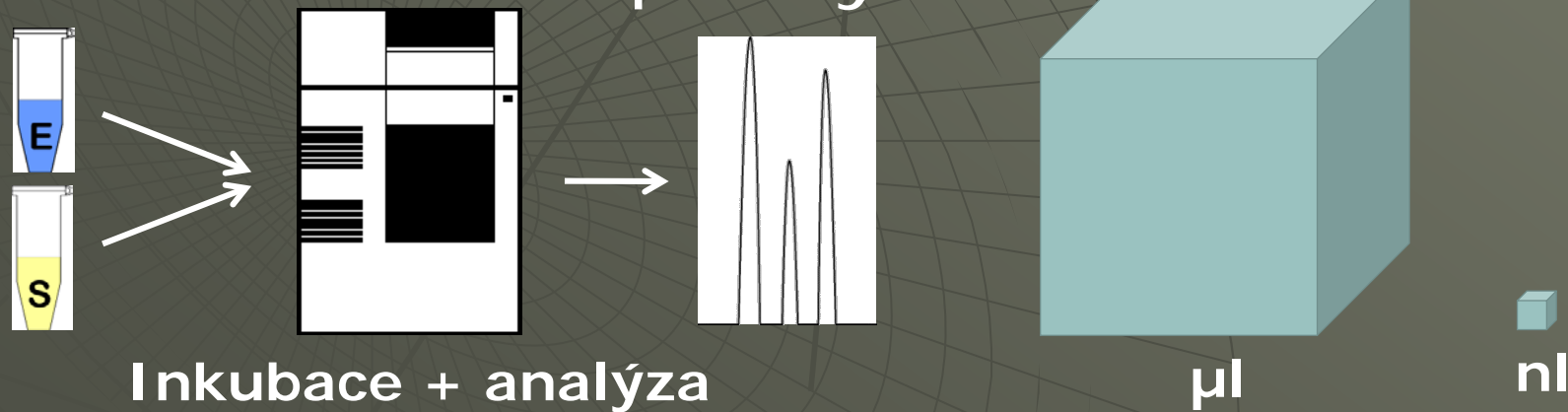
# Studium enzymů pomocí CE ?

(pre-capillary versus on-capillary)

# Off-line – pre-capillary



# On-line – on-capillary





# Rhodanasa (EC 2.8.1.1)



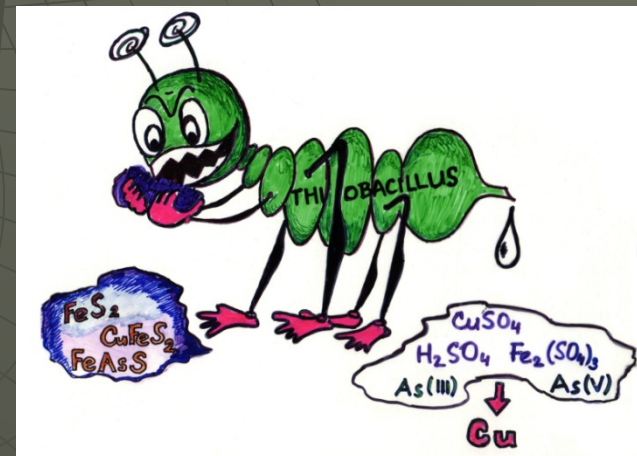
*Homo sapiens*

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

*Acidithiobacillus ferrooxidans*

Biohydrometalurgie

Životní prostředí



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

## Volba separačních podmínek



**0.1 mM TTAB - 15 mM borát pH 9.0**  
**blízká mobilita CN<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>**  
**vysoká koncentrace CN<sup>-</sup> v reakční směsi**



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

## Volba separačních podmínek



**100 mM  $\beta$ -alanin - HCl, pH 3.5**

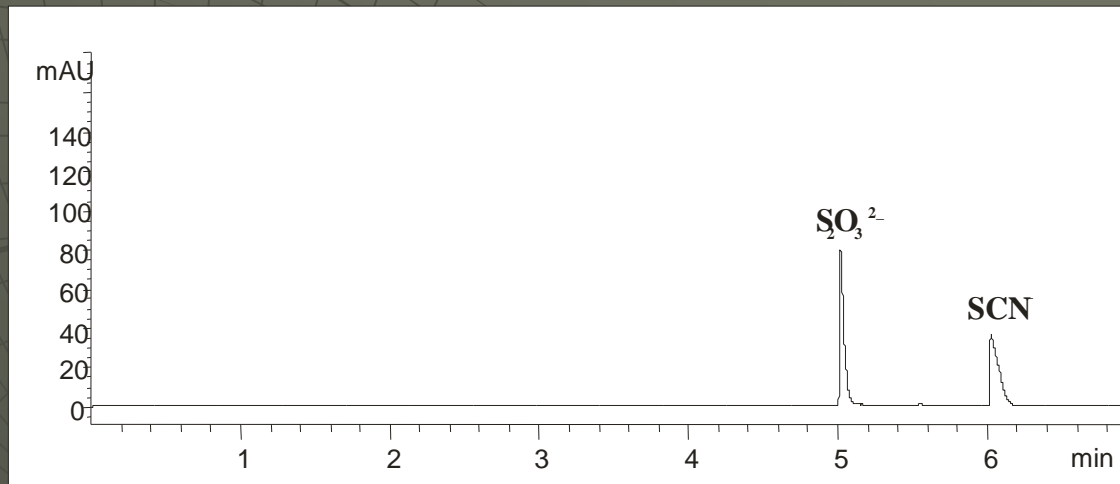
**nízký EOF**

**$\text{CN}^- = \text{HCN}$**



# rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

## Analýza standardů



**Kapilára:** křemenná, vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ ,  
celková délka 64.5 cm, efektivní  
délka 56 cm

**Dávkování :** 50 mbar/6s

**Separční napětí:** 18 kV (negativní polarita)

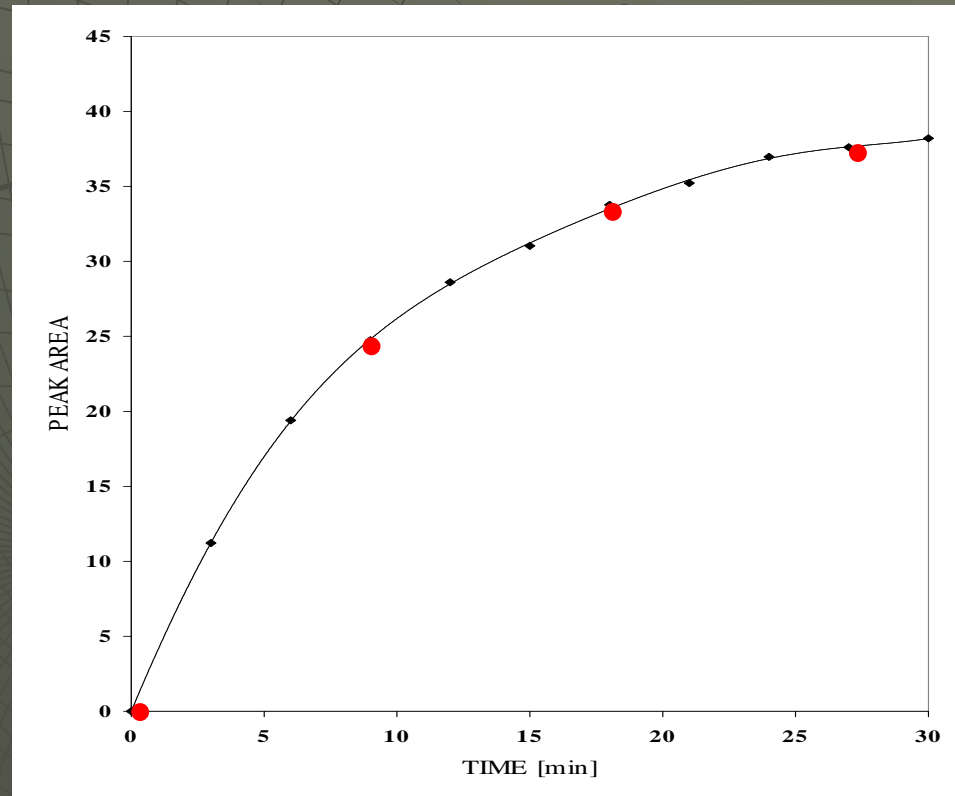
**Teplota kapiláry:**  $25 \pm 0,1$  °C

**Detekce:**  $\lambda = 200$  nm (šířka pásu 20 nm)

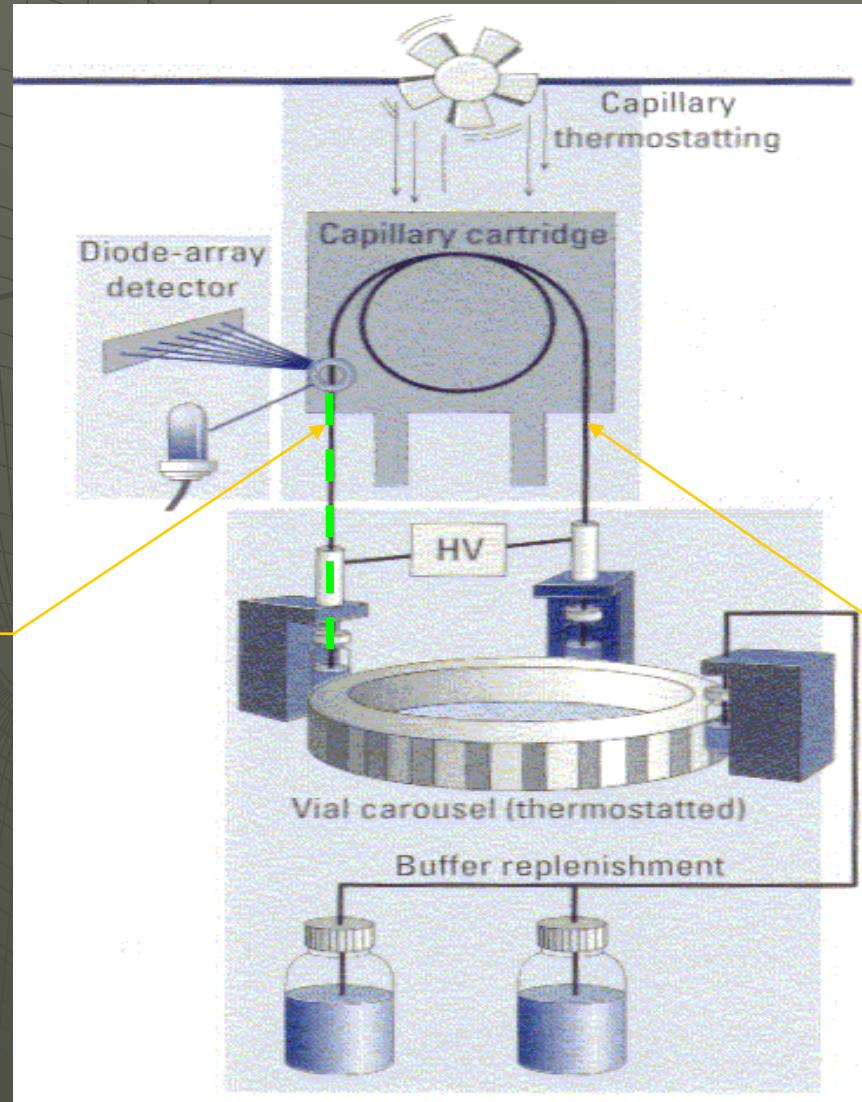
**Vzorek :** 1 mM  $S_2O_3^{2-}$ , 1 mM  $SCN^-$ , 25 mM  $CN^-$   
v 25 mM HEPES pufru (pH 8.5)

# rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

## Stanovení aktivity



# rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity Dávkování

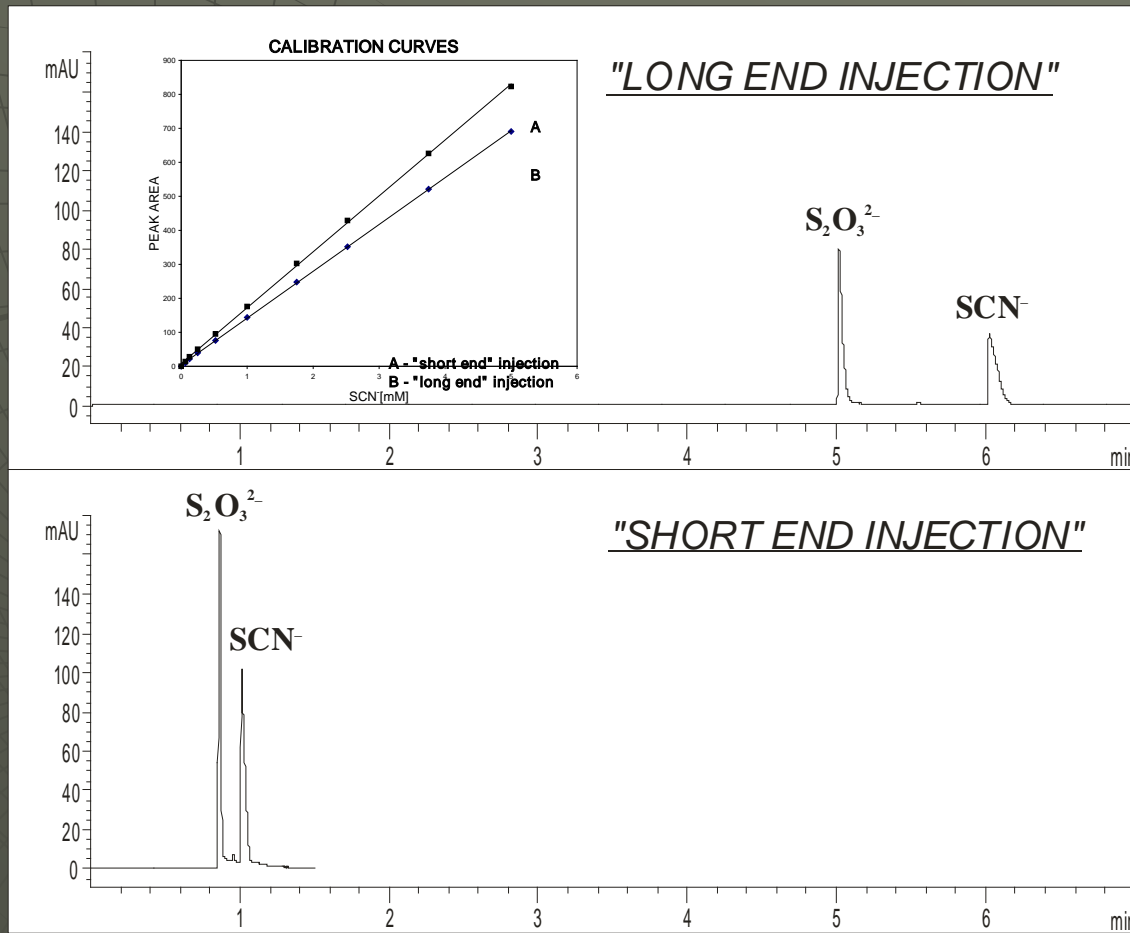


Short-end

Long-end

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

# „Short end“ versus „Long end injection“



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

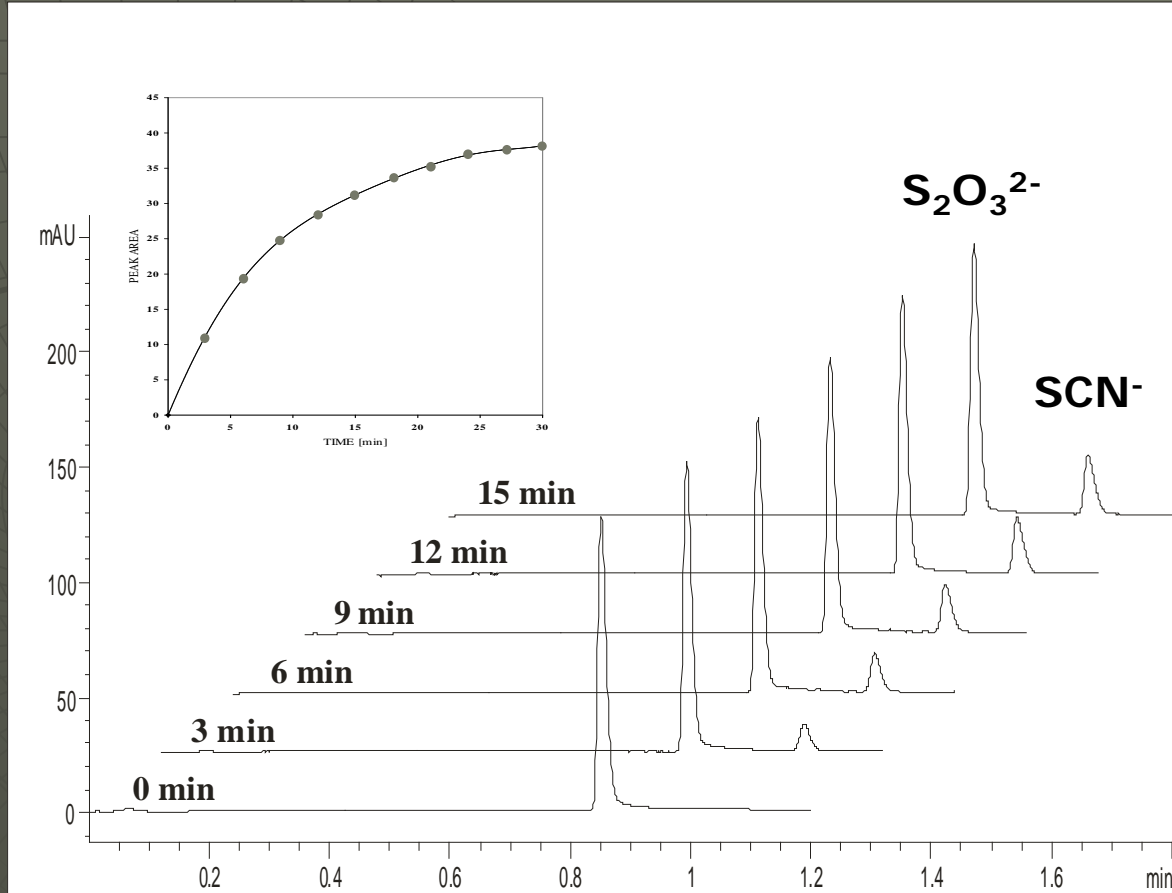
# „Short end“ versus „Long end injection“

	Short-end injection	Long-end injection
<b>Doba analýzy</b>	1.5 min	7 min
<b>Přesnost migračních časů (n=10)</b>	0.11 %	0.04 %
<b>Přesnost plochy píků (n=10)</b>	0.33 %	0.82 %
<b>Linearita</b>	50 - 5000 $\mu\text{M}$	50 - 5000 $\mu\text{M}$
<b>Korelační koeficient</b>	0.9993	0.9998
<b>Limit detekce</b>	2.5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$



# rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

## Stanovení aktivity



# rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Volba separačních parametrů

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

pH optimum rhodanasy: 8.5



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



# rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Volba separačních parametrů

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

pH optimum rhodanasy: 8.5

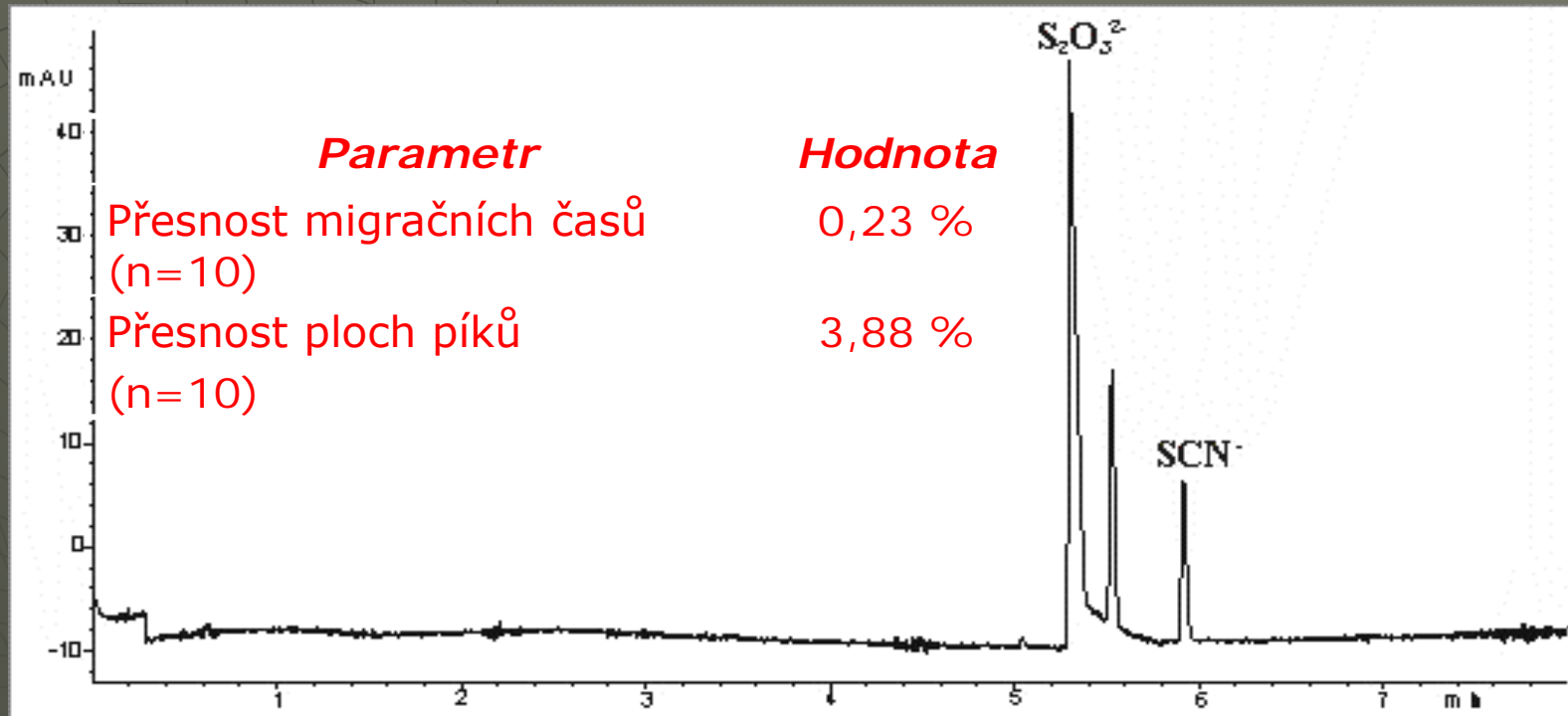


Kombinace metody EMMA s "partial filling technique"



# rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Dávkovací a separační parametry



25 mM HEPES  
(pH 8,5)

Substráty v 25 mM  
HEPES (pH 8,5)

Rhodanasa v 25 mM  
HEPES (pH 8,5)

25 mM HEPES  
(pH 8,5)



+

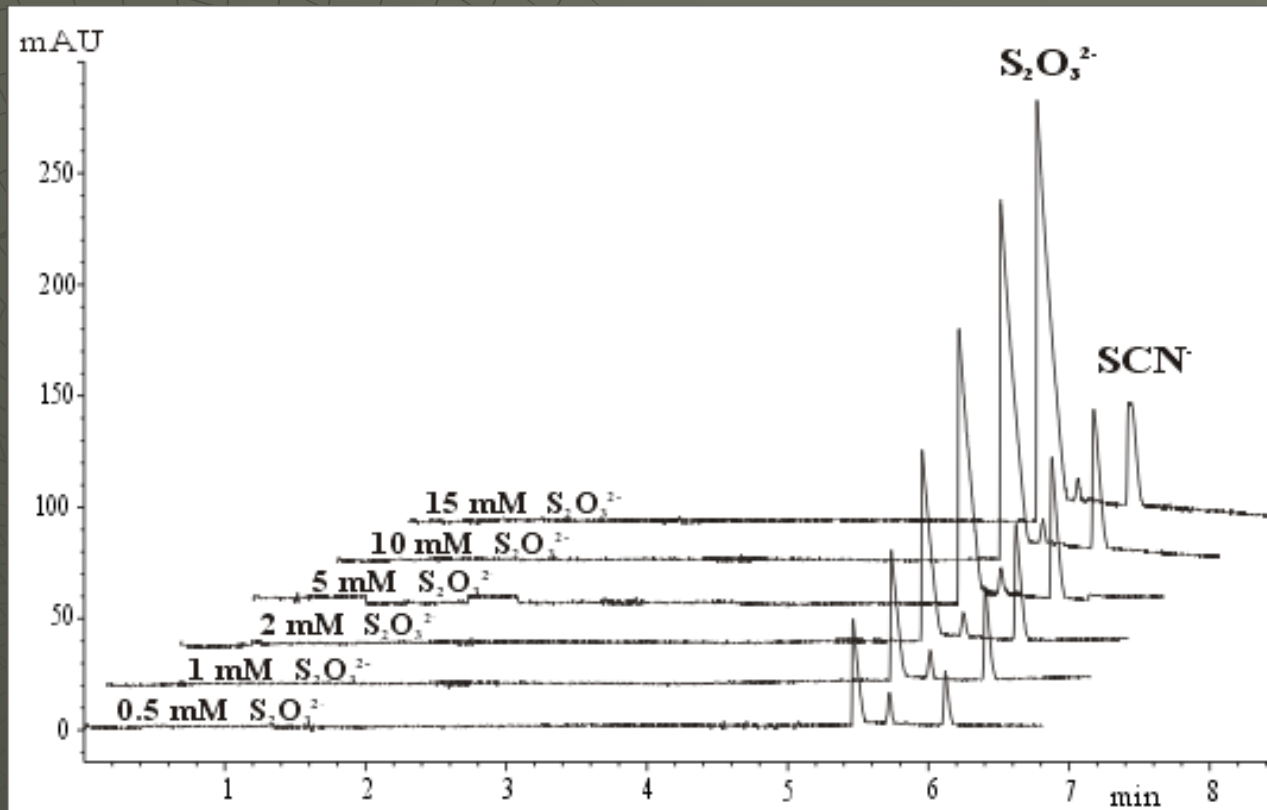
-  
nástřik  
vzorku

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

↑  
Detekce  
200 nm

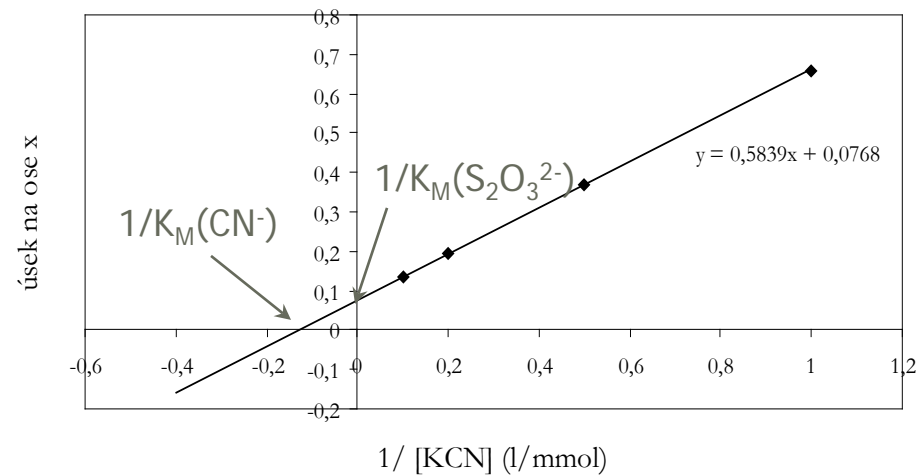
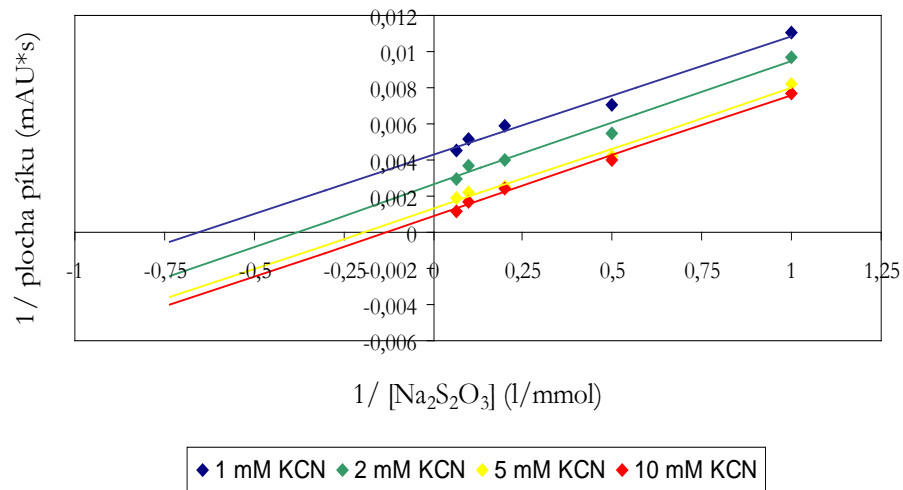
rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

# Stanovení Michaelisových konstant $K_m$



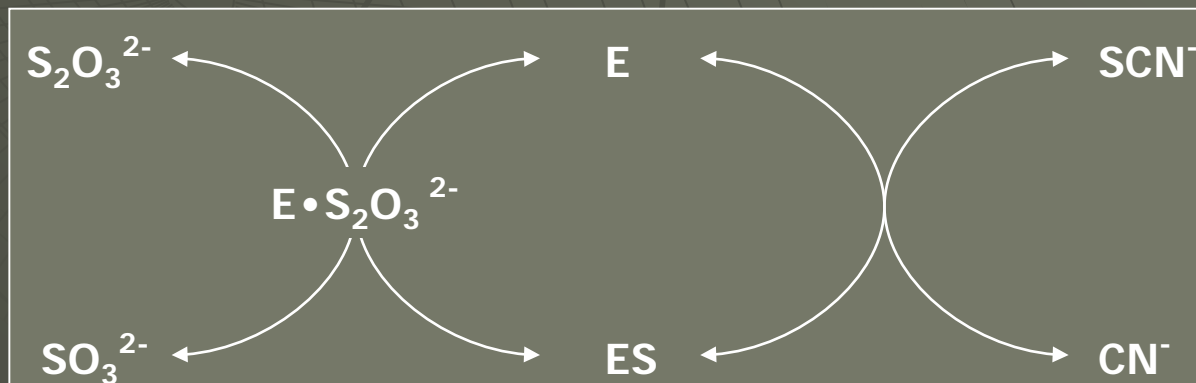
# rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Stanovení Michaelisových konstant $K_M$



$$K_M(\text{CN}^-) = 7.60 \text{ mM}$$

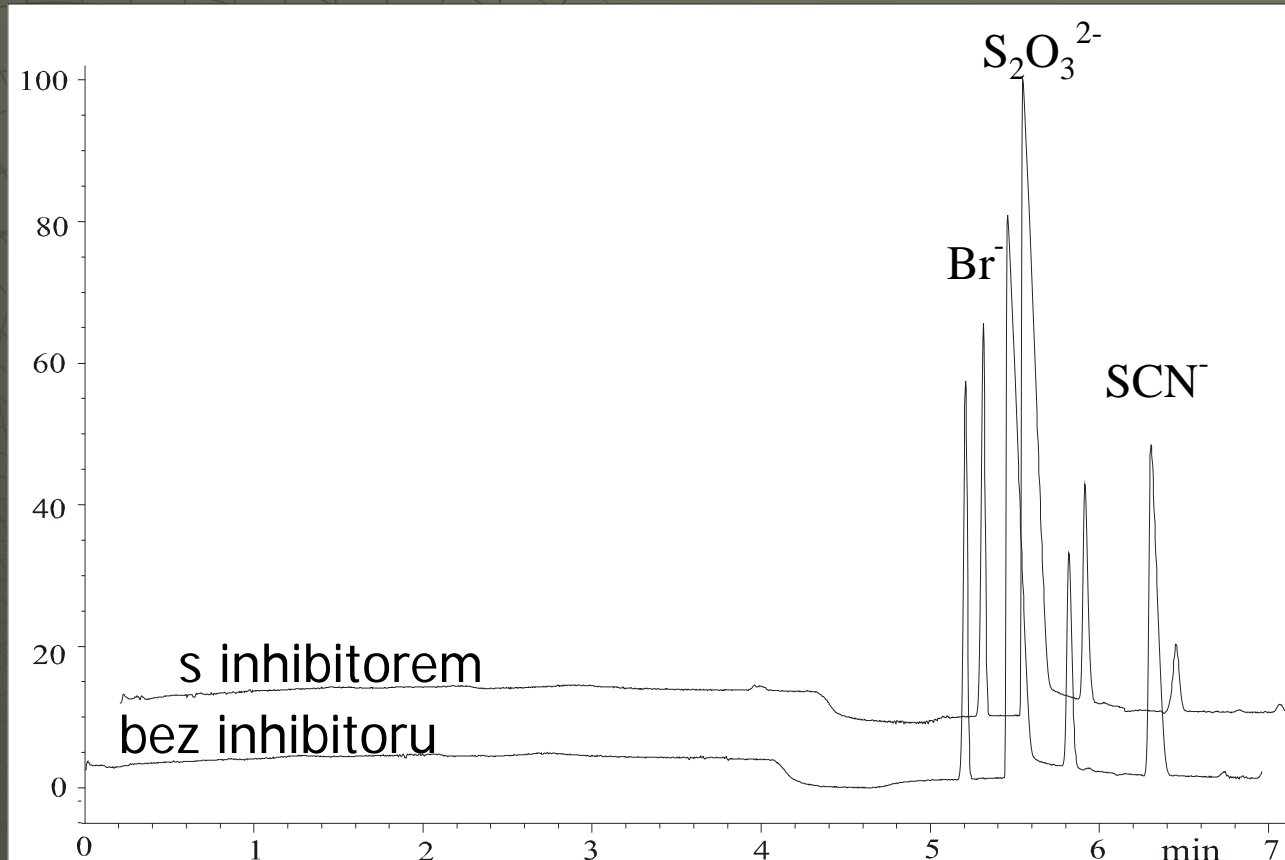
$$K_M(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = 13.02 \text{ mM}$$



rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

# Inhibice rhodanasy 2-oxoglutarátem

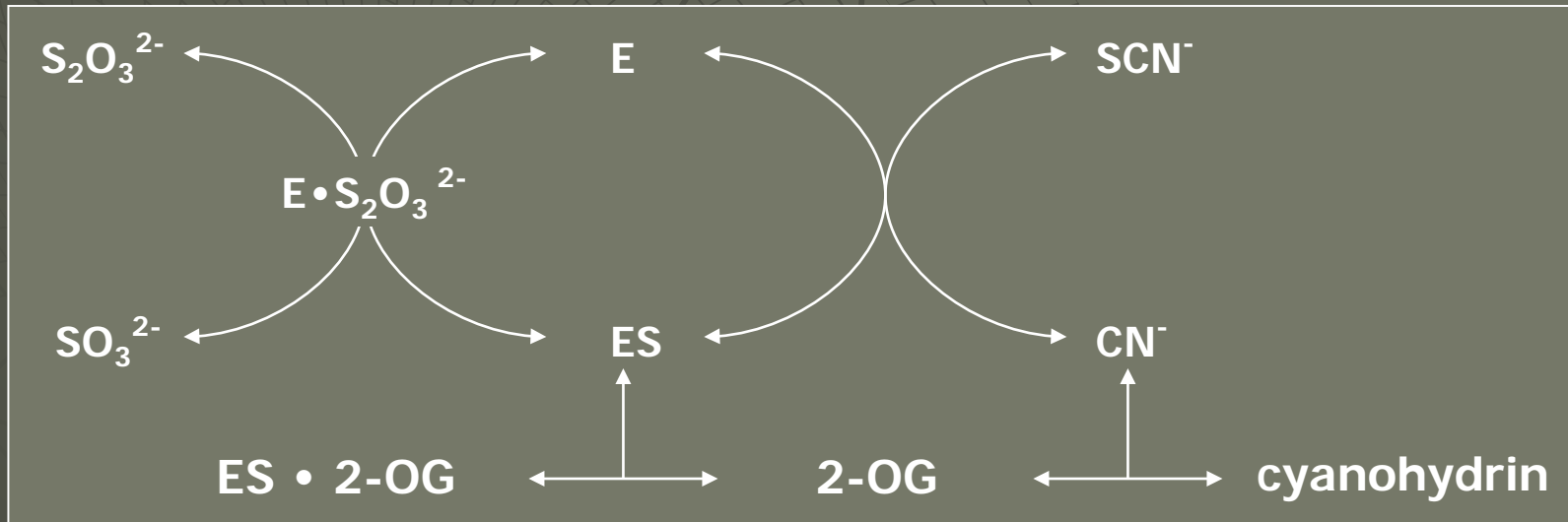
(inhibitor přidán do zóny substrátů)



# rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

## Diagnostika typu inhibice

	2-OG $K_i$ (mM)	inhibice
$S_2O_3^{2-}$	1.40	akompetitivní
$CN^-$	$3.62 \times 10^{-1}$	kompetitivní





# Haloalkandehalogenasa (EC 3.8.1.5)



- Odbourávání halogenovaných derivátů uhlovodíků
- Enantioselektivní organické syntézy

# haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

## Volba separačních podmínek



**100 mM  $\beta$ -alanin - HCl, pH 3.5**

**UV 200 nm**

**Separační napětí 18 kV (hegativní polarita)**



haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

## Volba separačních podmínek

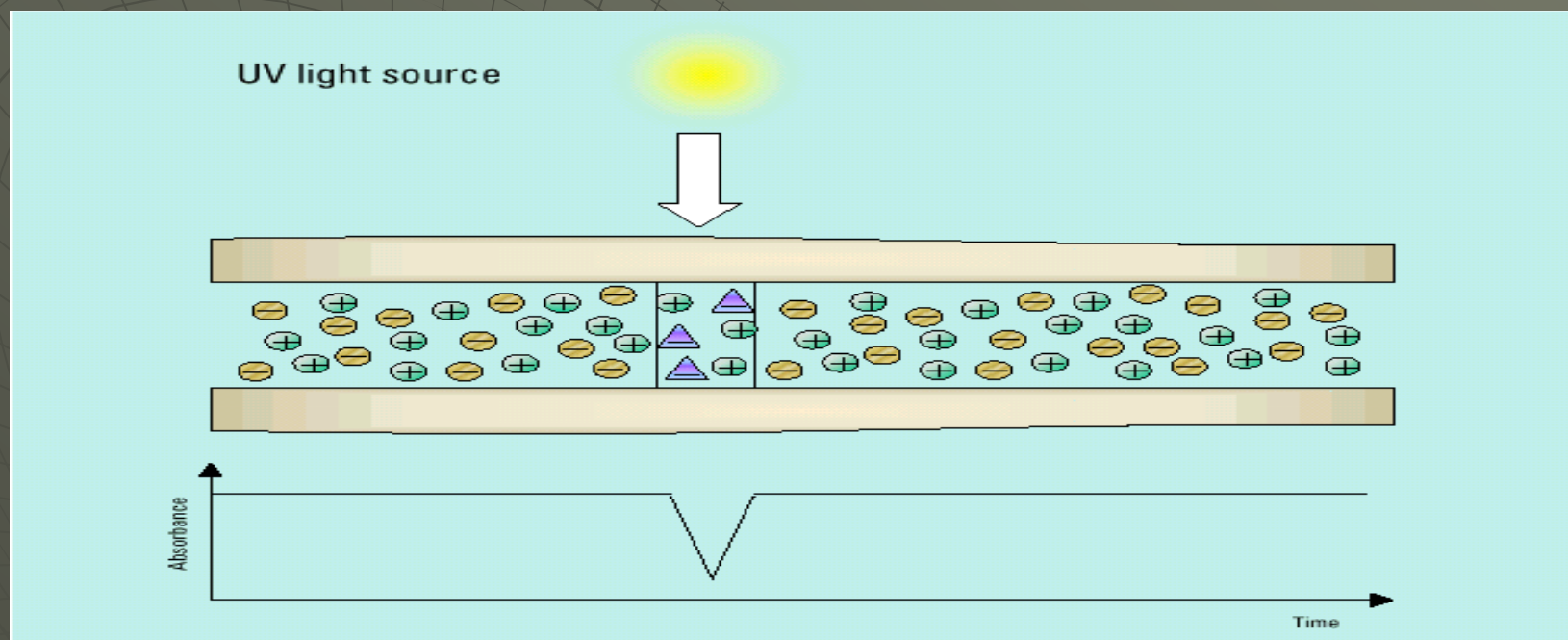


Nepřímá detekce



# haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

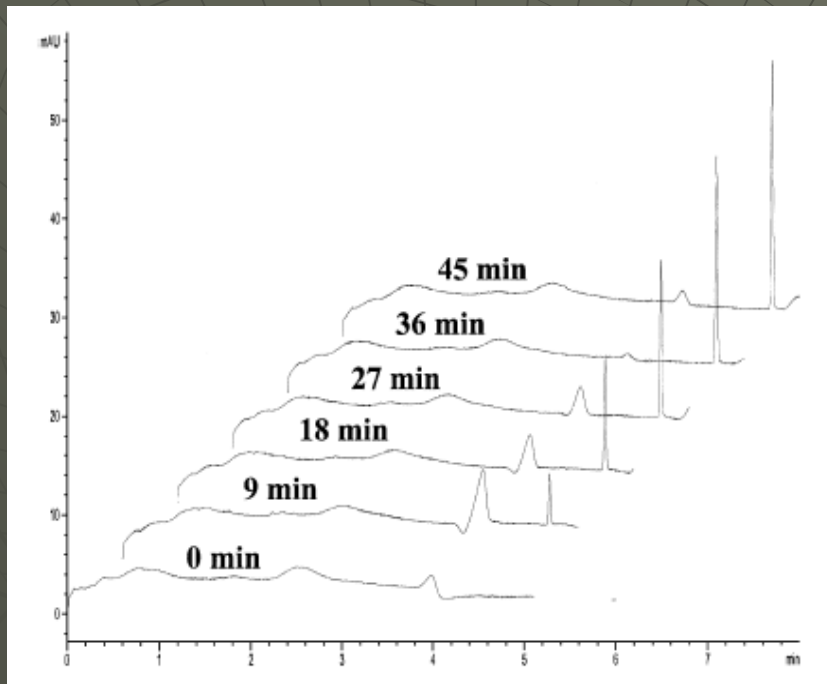
## Nepřímá detekce



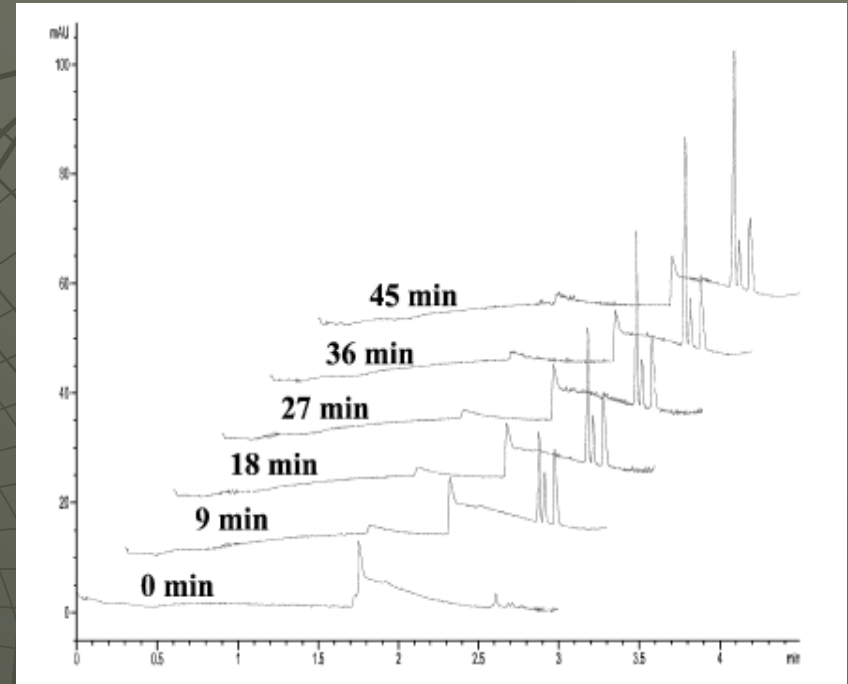
**5 mM chroman 0.5 mM TTAB pH 8.5**  
Nepřímá detekce – 315 nm / 375 nm  
Separační napětí 15 kV (negativní polarita)

# haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

## Stanovení aktivity substrát 1-brombutan



**Přímá detekce**



**Nepřímá detekce**

# haloalkandehalogenasa – EMMA

## Dávkovací a separační parametry Základní elektrolyt

**20 mM  $\beta$ -alanin - HCl, pH 3.5 - přímá detekce**  
separační napětí 29,9 kV (negativní polarita)

**nebo**

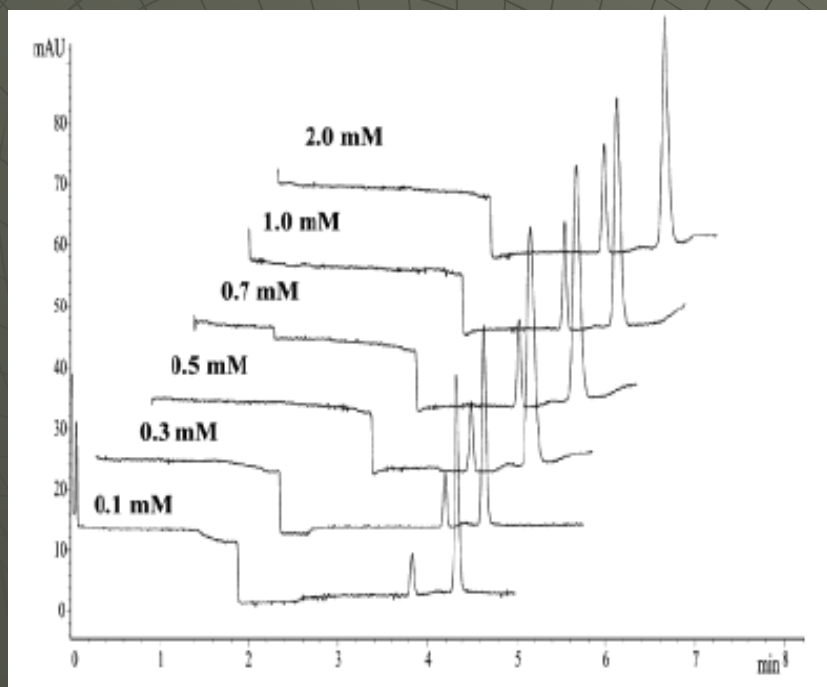
**10 mM chroman 0.1 mM CTAB pH 9.2 - nepřímá detekce**  
separační napětí 18 kV (negativní polarita)

## Dávkování

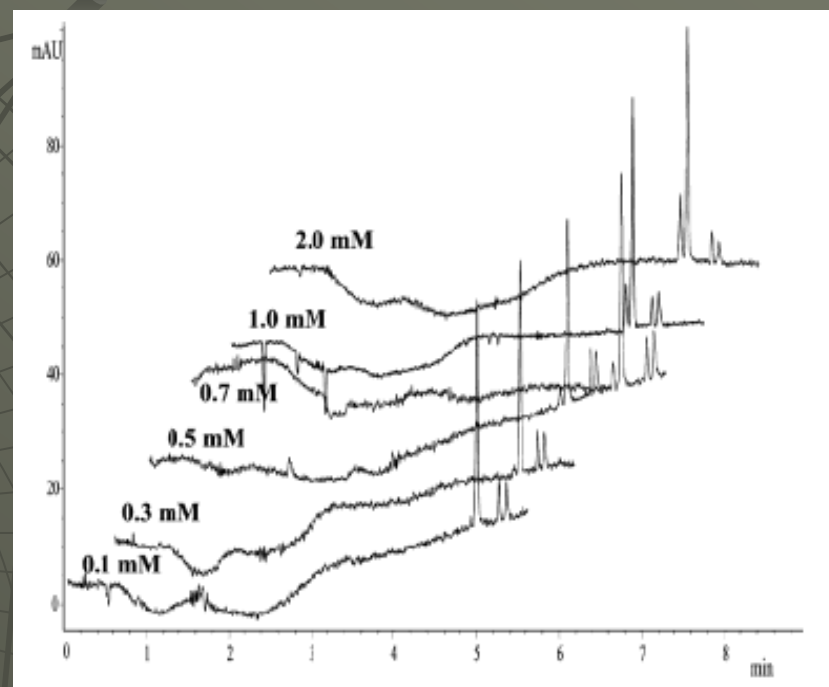
1. 20 mM glycinátový pufr (pH 8.6) : 50 mbar/4s
2. Enzym ve 20 mM glycinátovém pufru (pH 8.6) : 50 mbar/4s
3. Substrát ve 20 mM glycinátovém pufru pufru (pH 8.6) : 50 mbar/4s
4. 20 mM glycinátový pufr (pH 8.6) : 50 mbar/4s

# haloalkandehalogenasa – EMMA

## Stanovení Michaelisovy konstanty $K_m$ substrát 1-brombutan



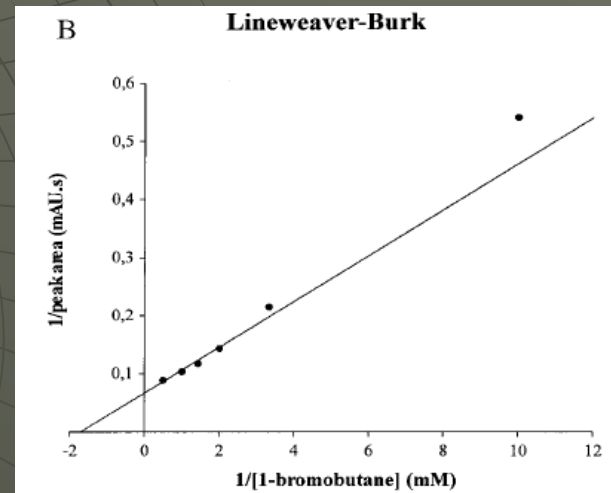
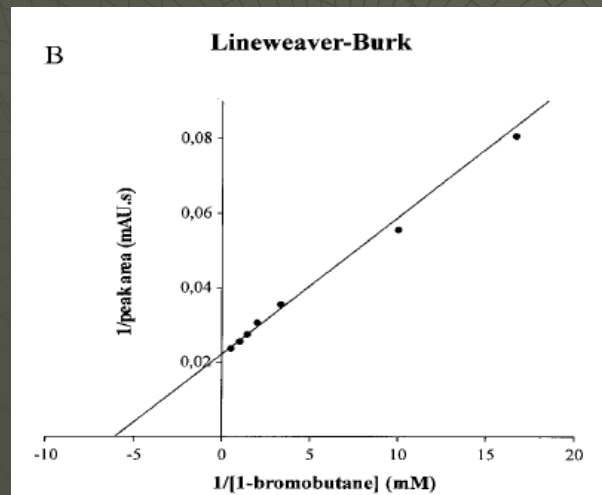
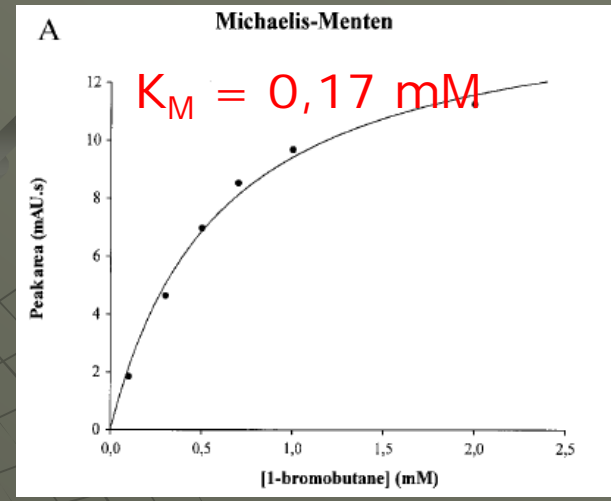
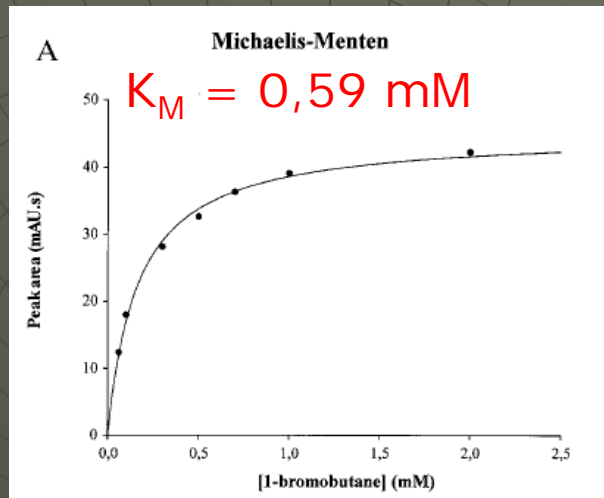
**Přímá detekce**



**Nepřímá detekce**

# haloalkandehalogenasa – EMMA

## Stanovení Michaelisovy konstanty $K_m$ substrát 1-brombutan



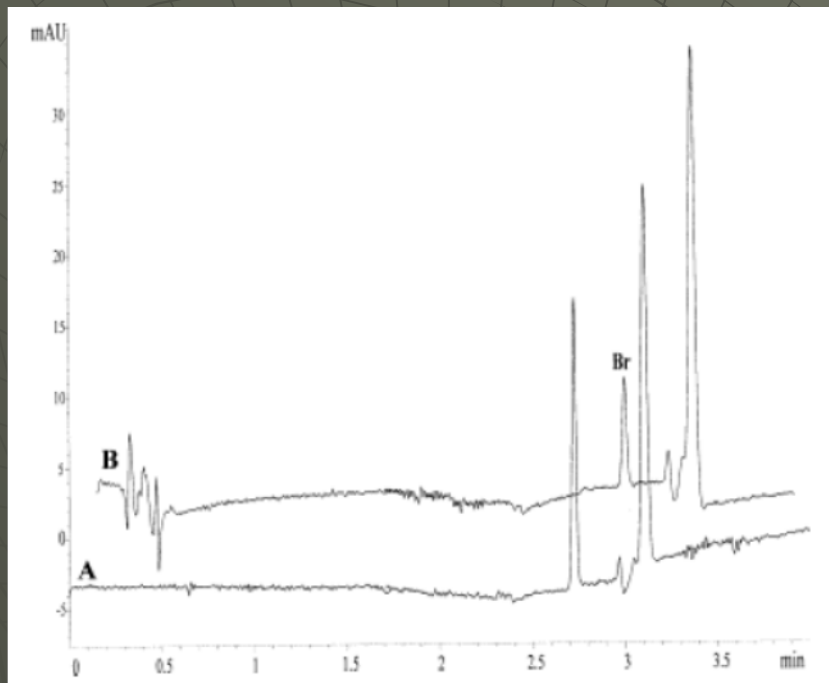
**Přímá detekce**

**Nepřímá detekce**

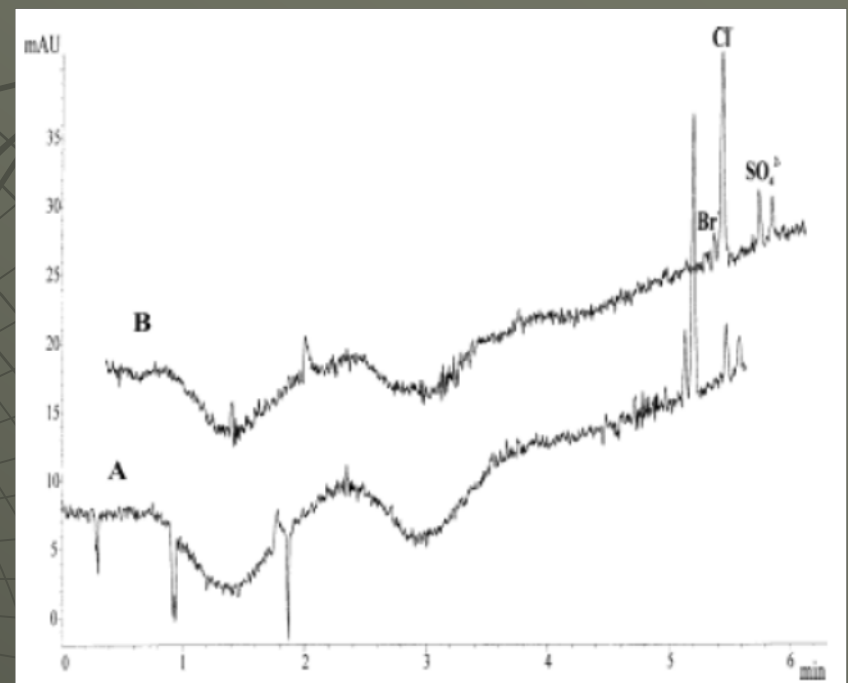


# haloalkandehalogenasa – EMMA

Stanovení inhibiční konstanty  $K_i$   
substrát 1-brombutan; inhibitor 1,2-dichloethan



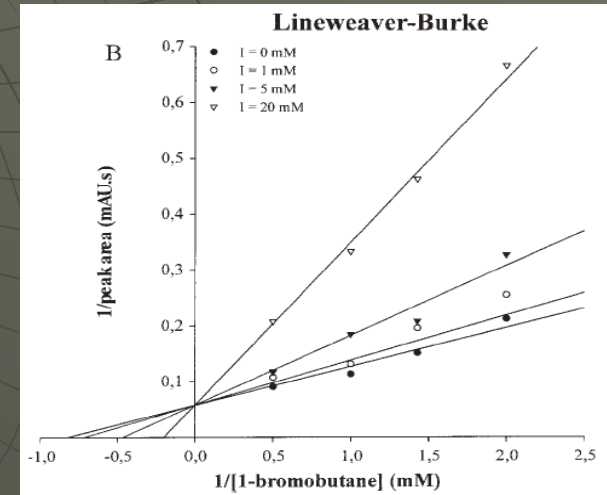
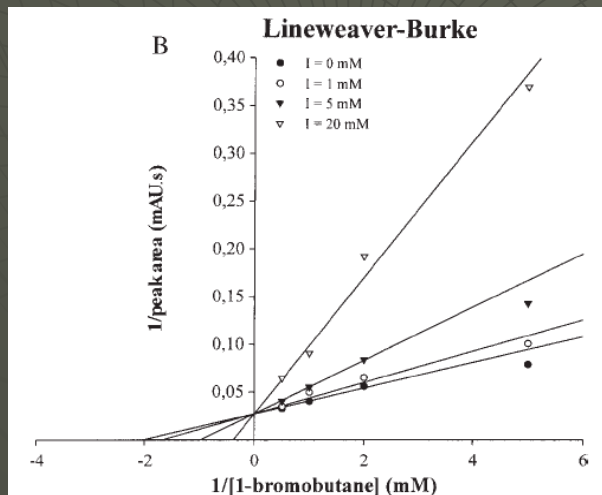
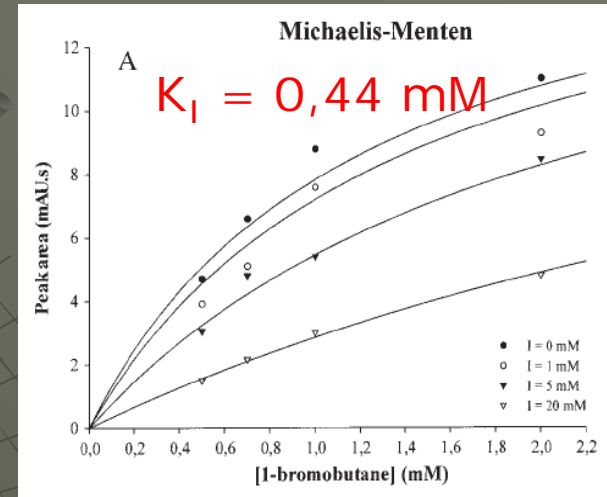
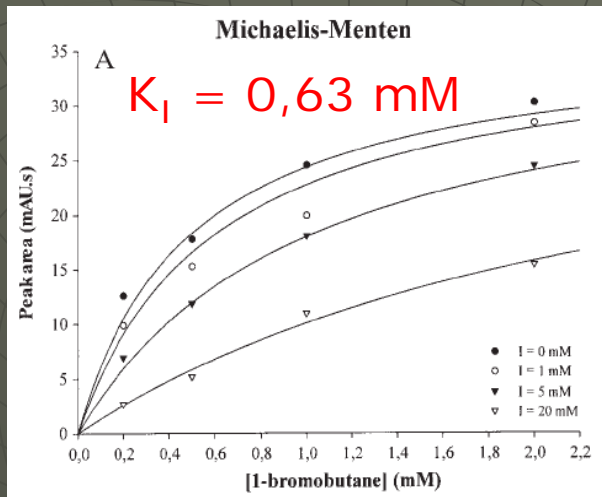
**Přímá detekce**



**Nepřímá detekce**

# haloalkandehalogenasa – EMMA

## Stanovení inhibiční konstanty $K_i$ substrát 1-brombutan; inhibitor 1,2-dichloethan



**Přímá detekce**

**Nepřímá detekce**

# „Pre-capillary“ enzymové stanovení stanovení aktivity

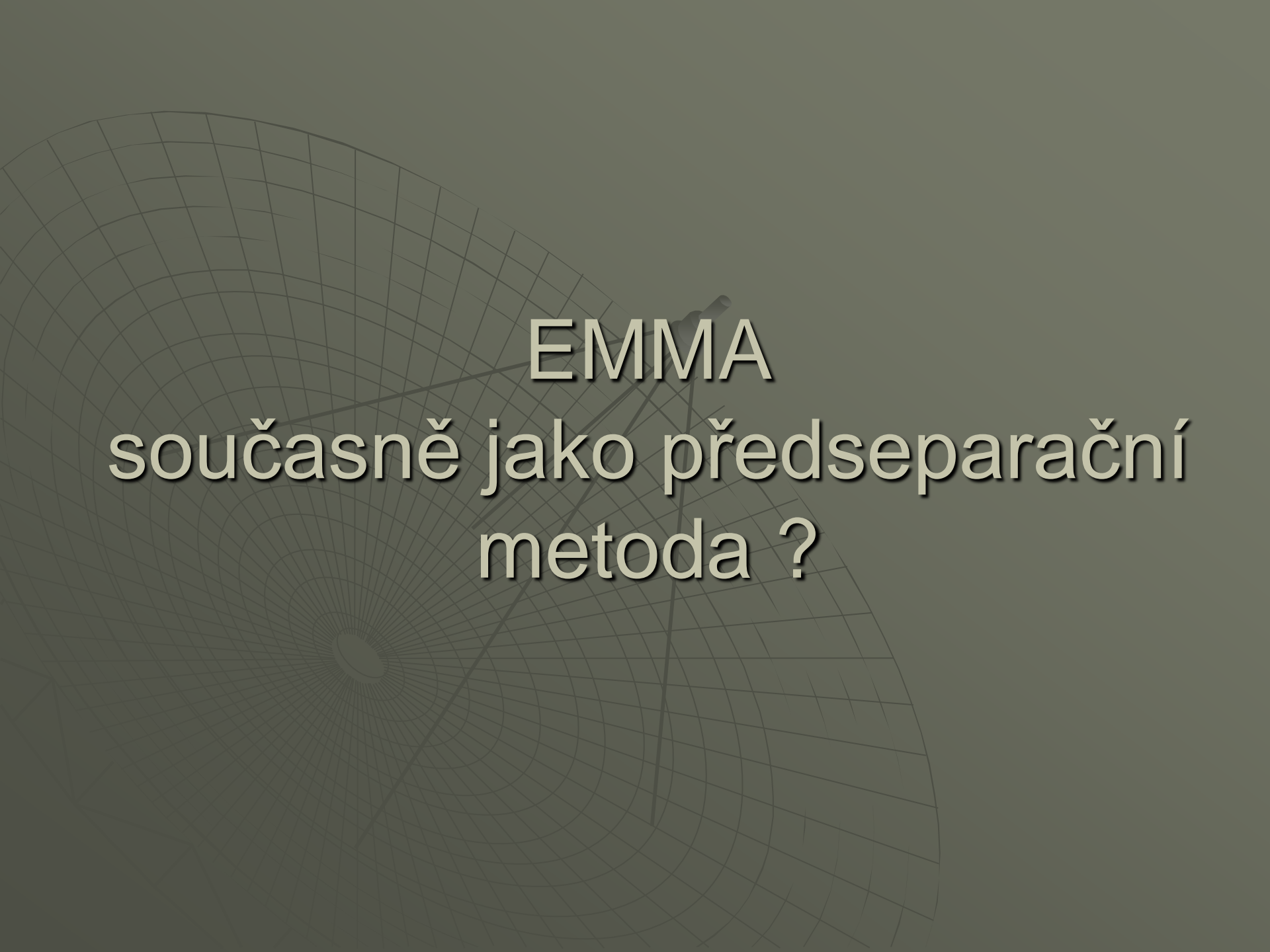
- ◆ Vysoká účinnost
- ◆ Vysoké rozlišení
- ◆ Rychlost analýzy

# „On-capillary“ enzymové stanovení studium kinetiky

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

Studium kinetiky dvousubstrátové enzymové reakce  
(60 experimentů)

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



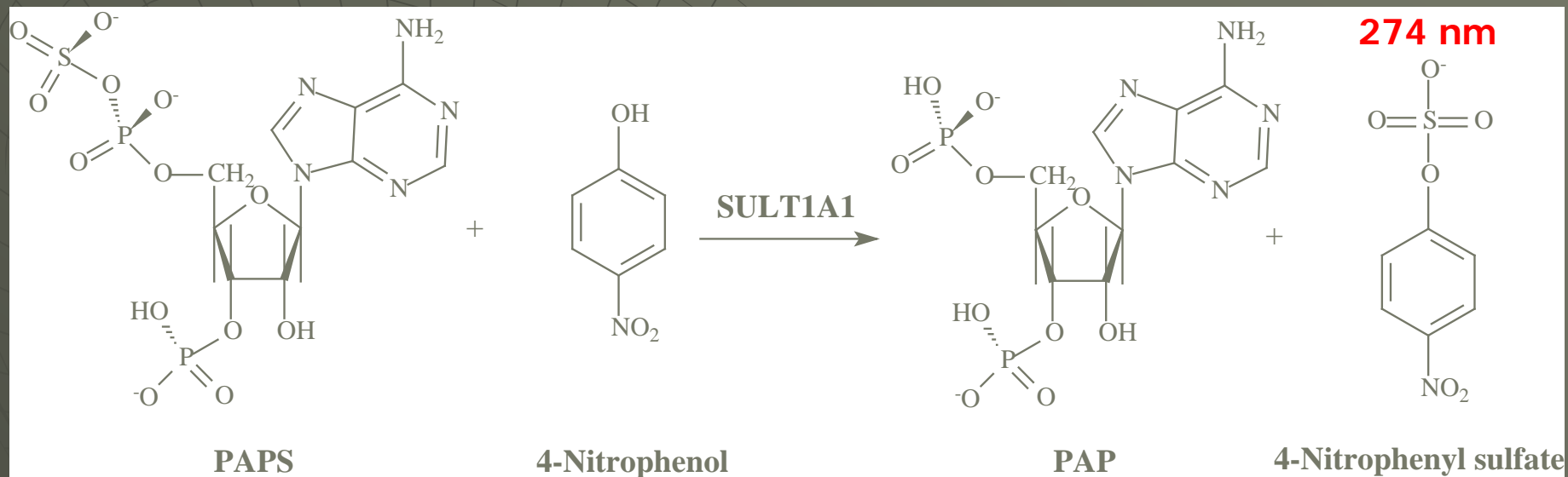
EMMA  
současně jako předseparační  
metoda ?

# Sulfotransferasa (EC 2.8.2.1)

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

# sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

## Reakce



Velmi nestabilní  
80 % (20 % PAP)

~1 mg 5400 Kč

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

# sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

## Předseparace PAP od PAPS – MEKC (cholát)

### Separační podmínky:

BGE: 150 mM HEPES, pH 6.5 +  
20 mM kyselina cholová

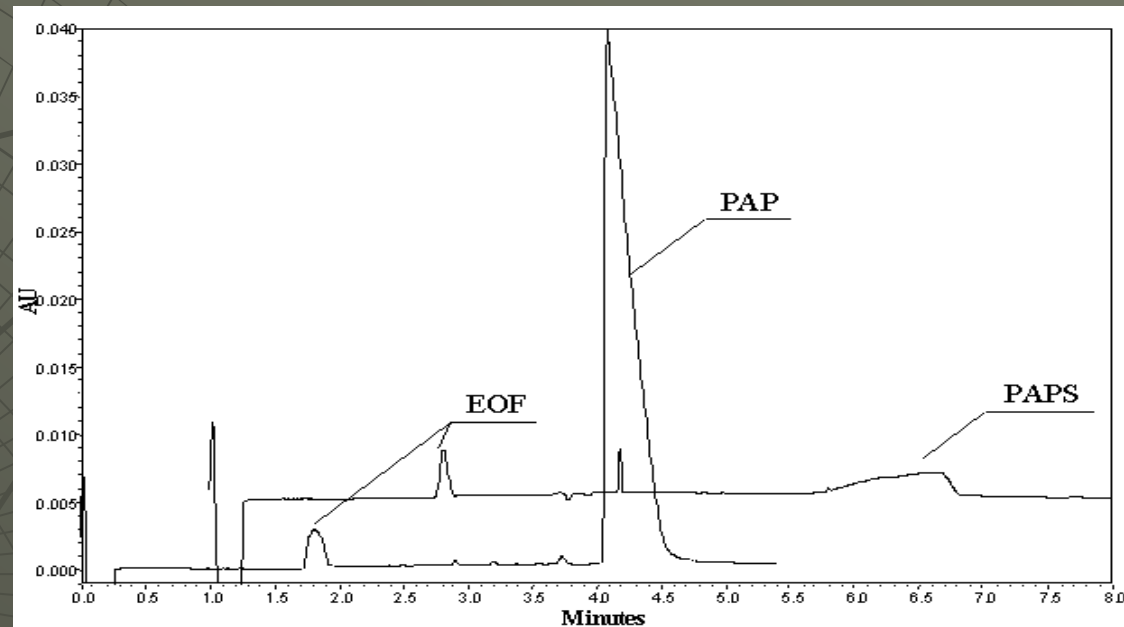
Kapilára:  $L_T=31.2$  cm ( $L_E = 21$ cm),  
75  $\mu$ m I.D.

Napětí: + 10 kV

Teplota kapiláry: 37 °C

Detekce: 260 nm

Dávkování: 0.3 psi/ 5 s 1mM PAP  
nebo 115 mM PAPS



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



# sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

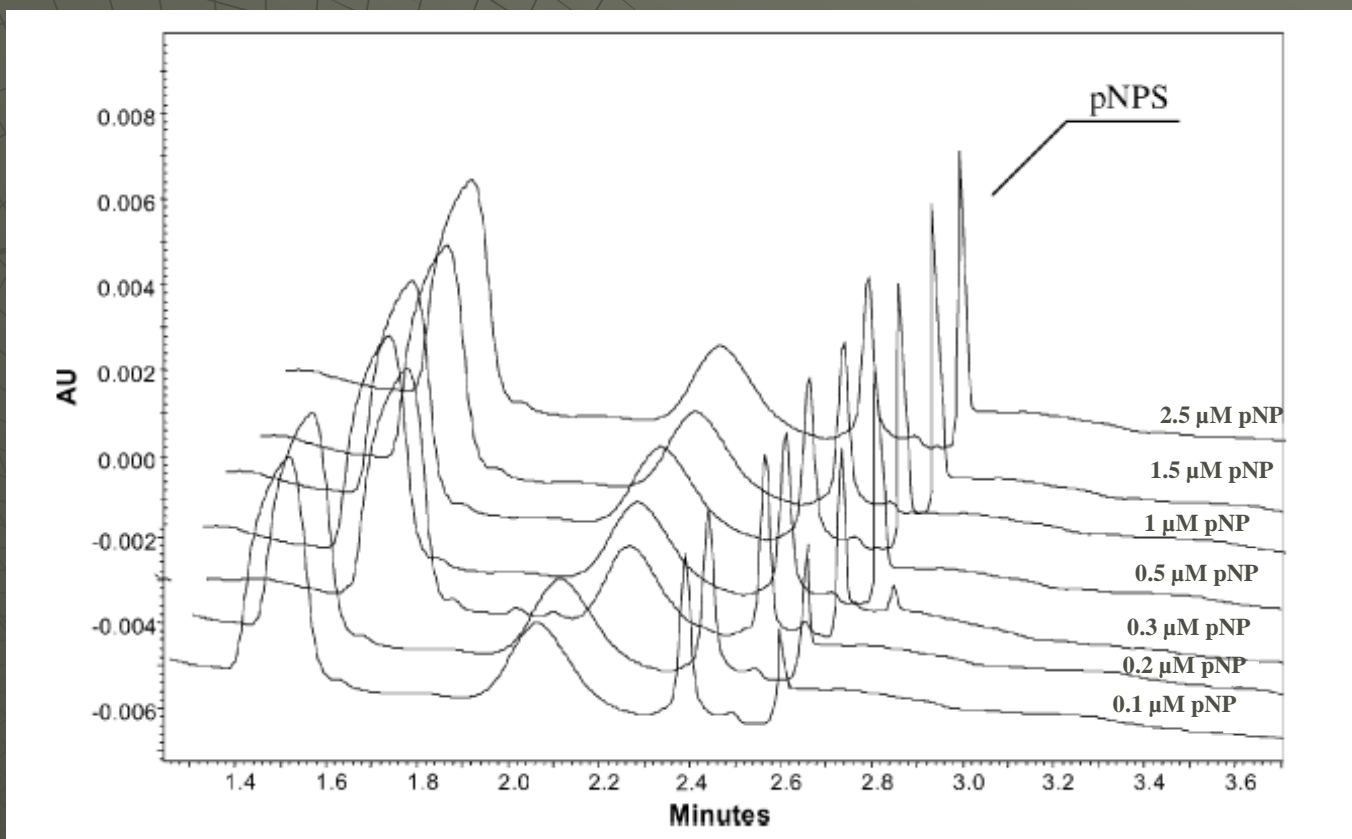
## Dávkování a inkubace

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

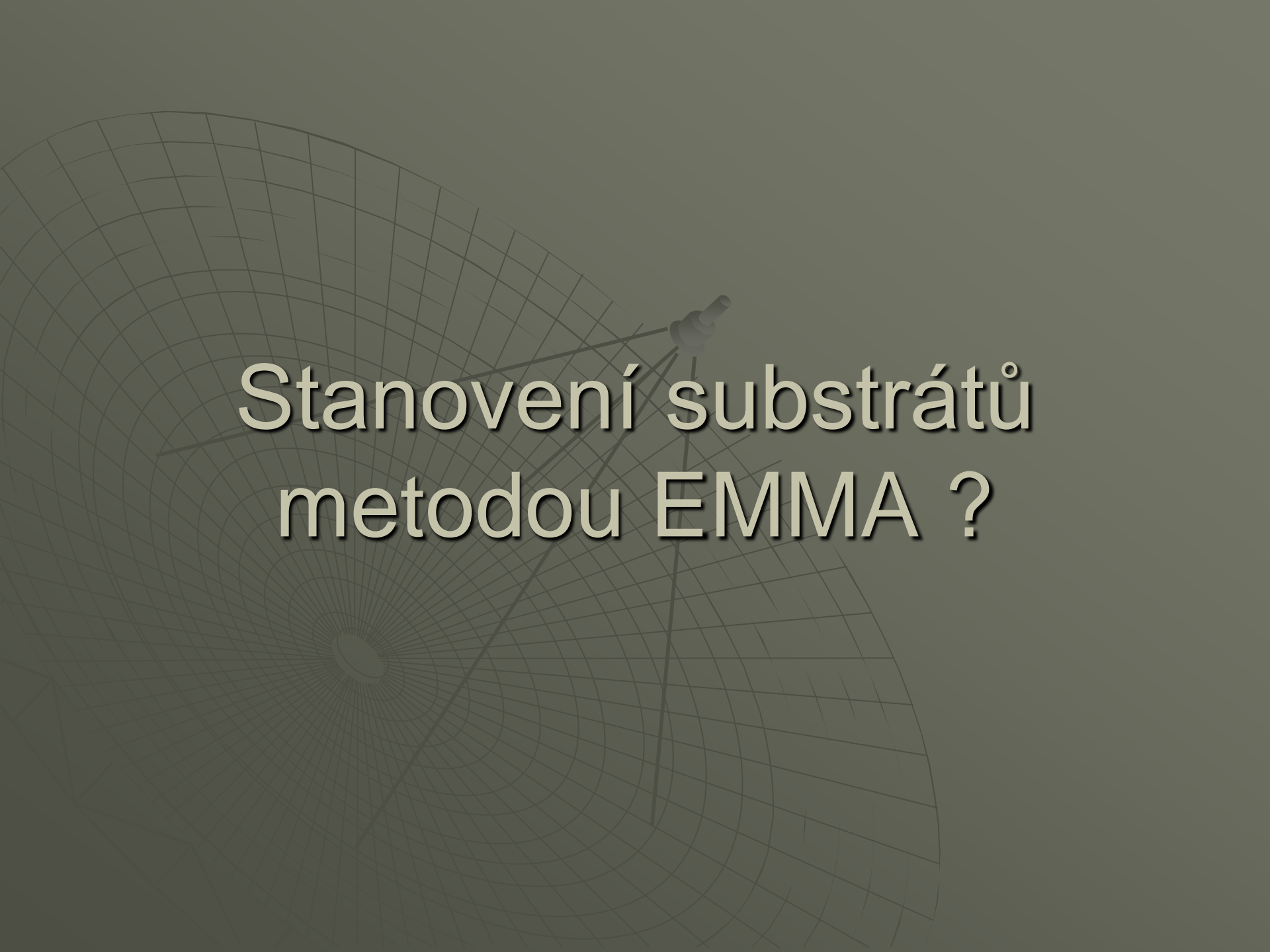


# sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

## Stanovení Michaelisovy konstanty pro 4-nitrofenol

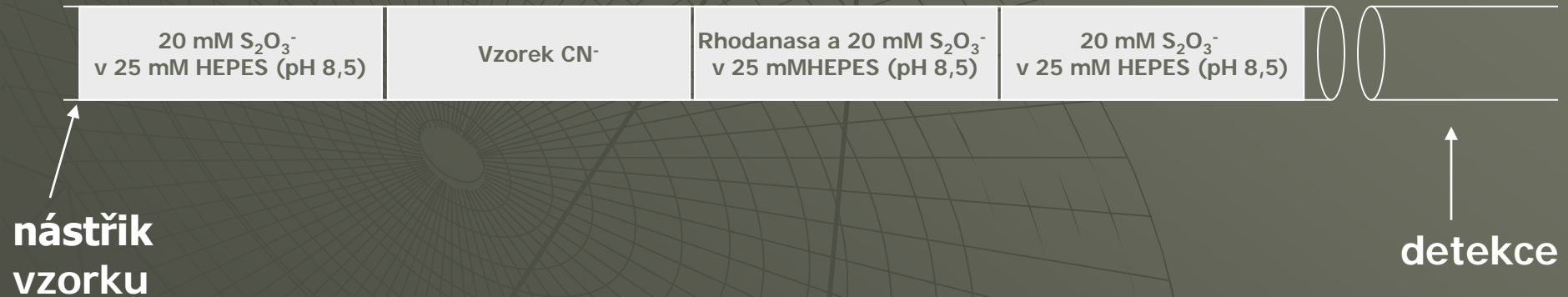


$$K_M = 0.8 \mu\text{M}$$



Stanovení substrátů  
metodou EMMA ?

# stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan



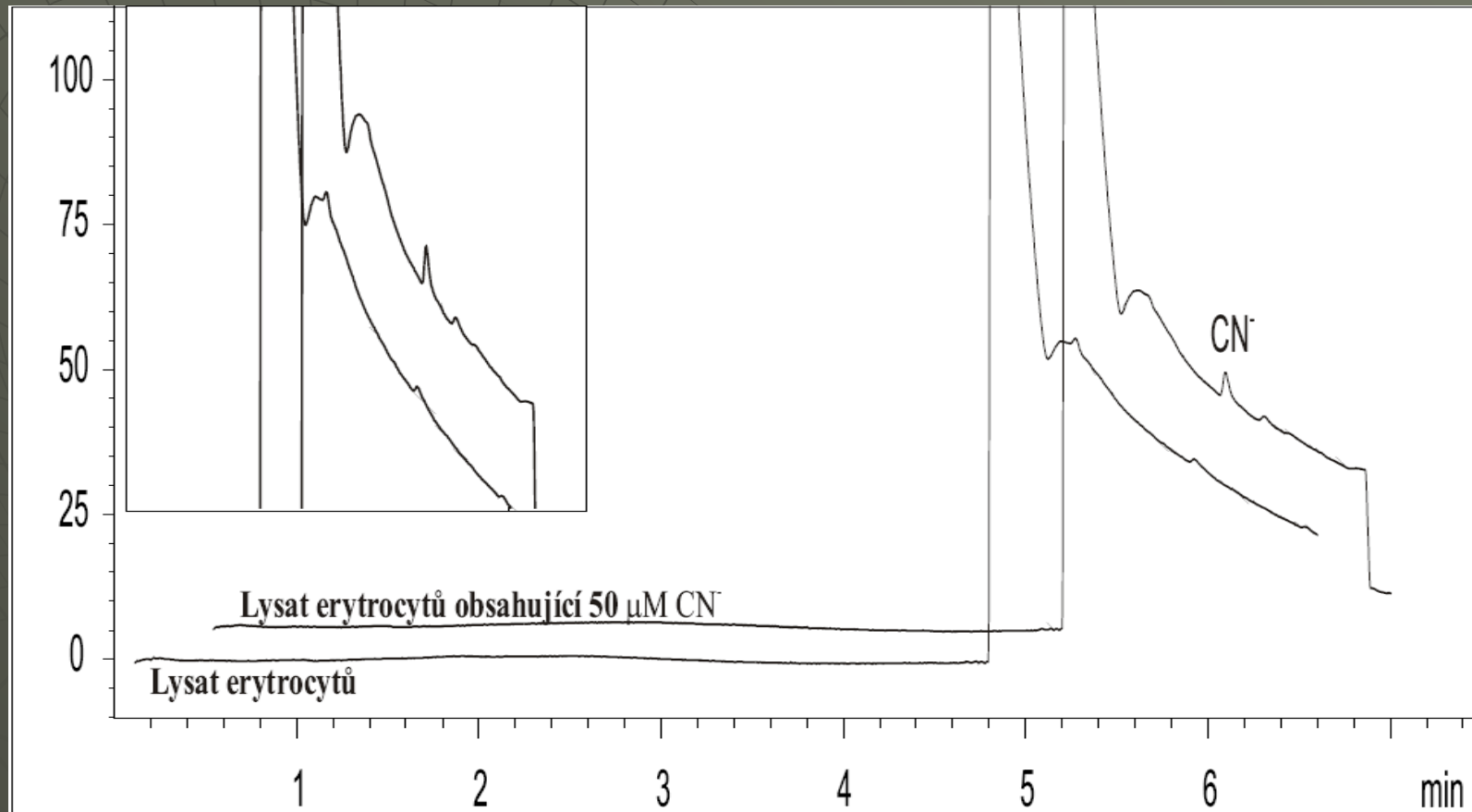
# stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan

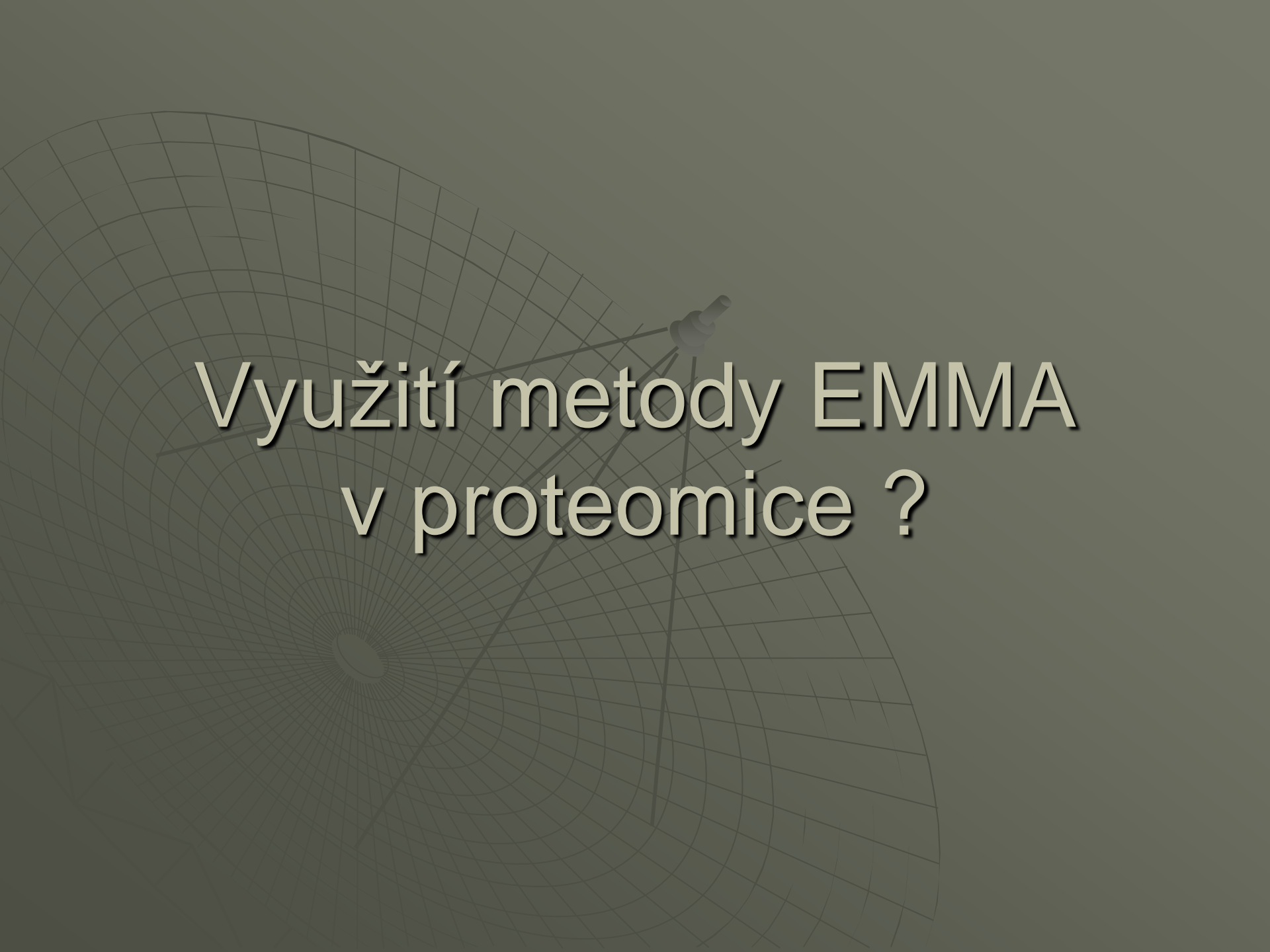
## Dávkování a inkubace

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

# stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan

## Vzorek lysatu erythrocytů (LOD 3 $\mu\text{M}$ )

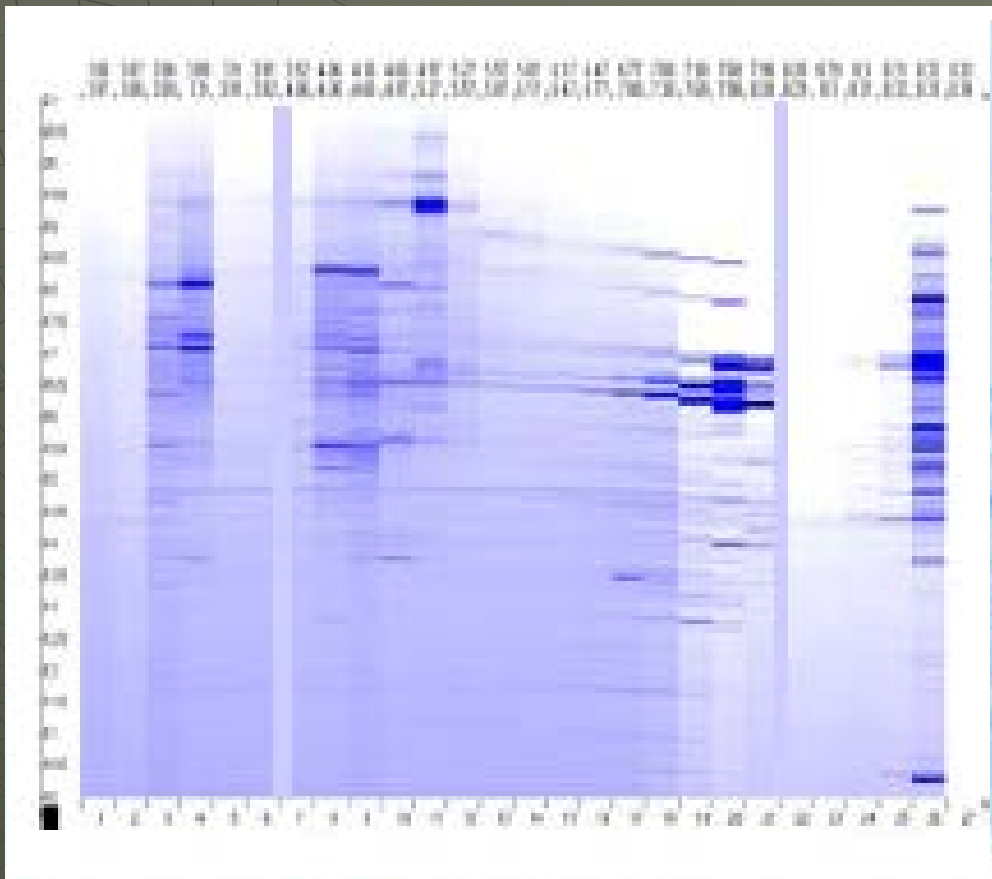


The background features a faint, light-colored grid pattern on a dark gray background. A circular grid, resembling a microscope lens or a circular grid, is centered on the left side. A small, dark, cylindrical object, possibly a microscope component, is positioned near the top center of the grid.

# Využití metody EMMA v proteomice ?

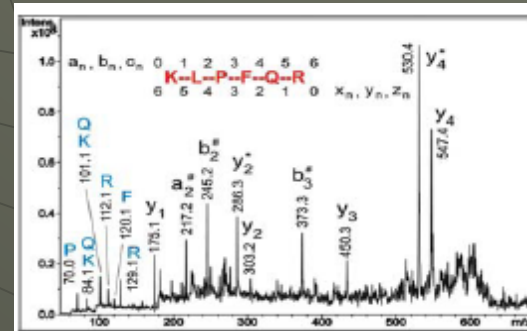
# 1D, 2D HPLC, CZE, HPLC-CE, CE-HPLC

Vzorek



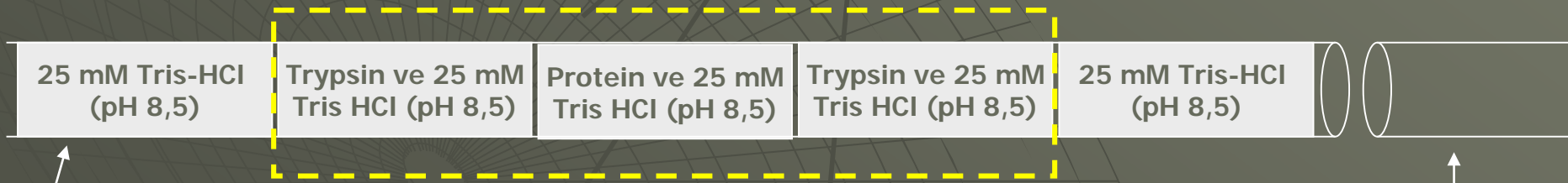
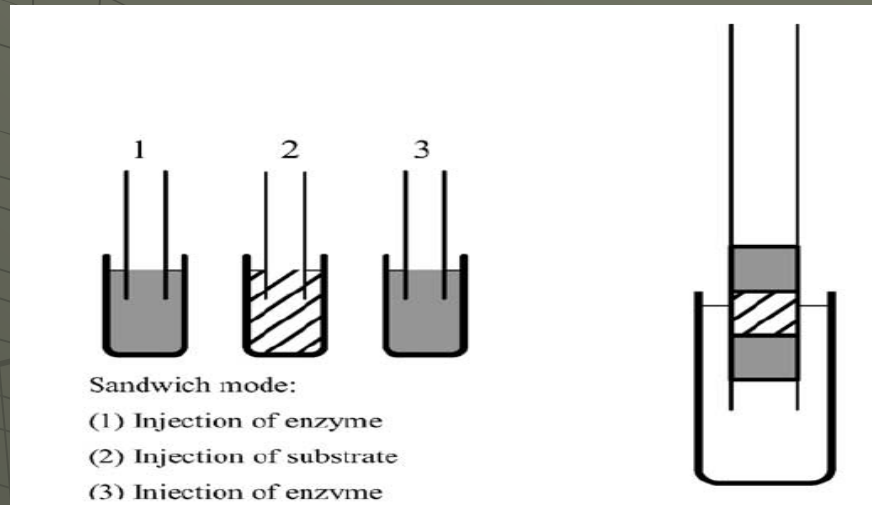
Tryptické štěpení

MS/MS





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



↑  
nástržik  
vzorku

**Základní elektrolyt**

0,1 M fosfátový pufr pH 2,5  
nebo

0,1 M mravenčanový pufr pH 2,5

**Separační napětí**

18 kV (negativní polarita)

↑  
Detekce  
200 nm

# integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE

Optimalizace

$\beta$ -kasein, cytochrom c

Teplota kapiláry

↓  
35 °C

Množství trypsinu

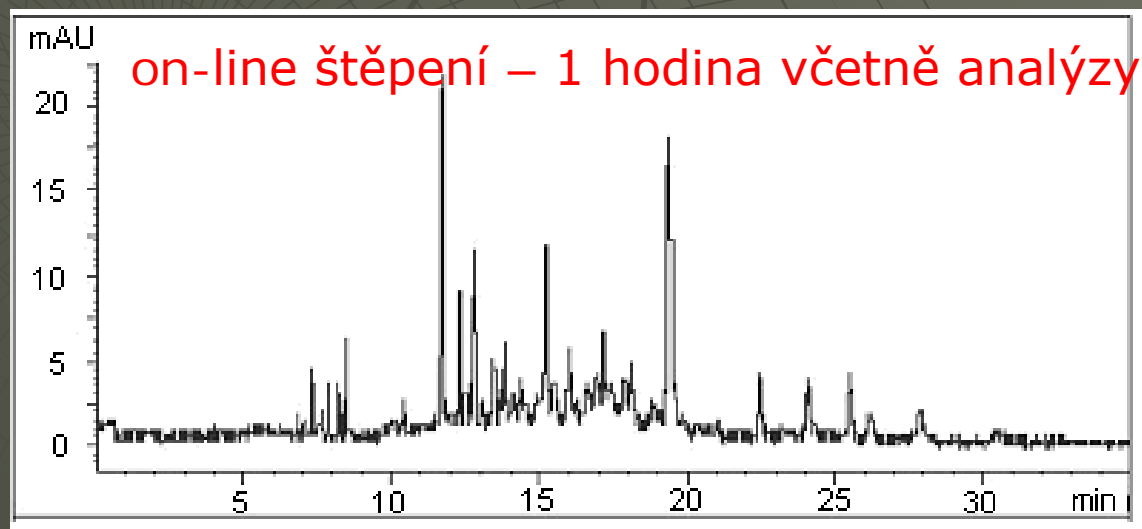
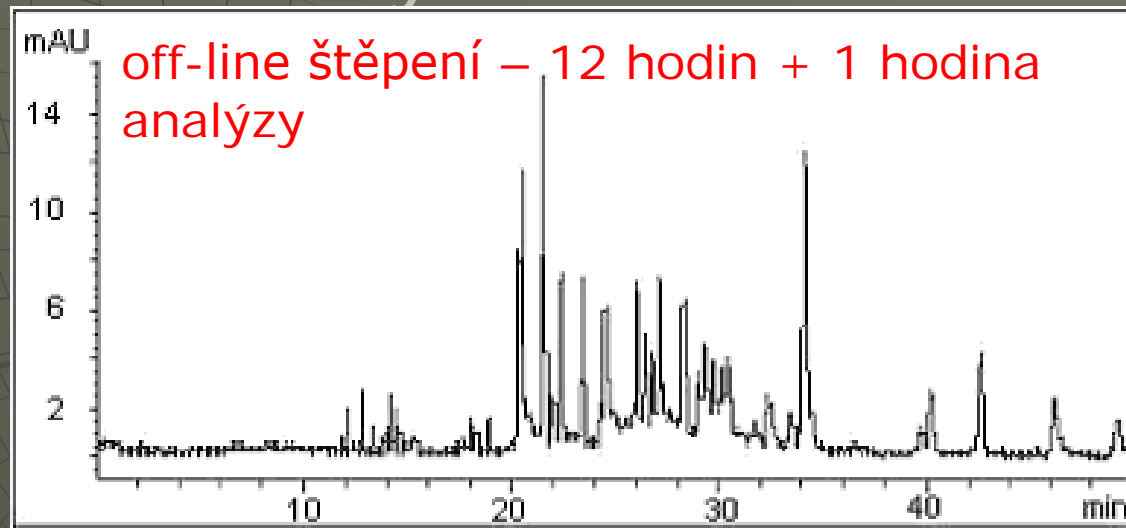
↓  
0,1 mg/ml

„Zero potential amplification“

↓  
0 s

# integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE

## cytochrom c



# EMMA – využití

## ➤ Enzymové systémy

- Aktivita enzymů
- Koncentrace substrátů a inhibitorů
- Kinetika enzymové reakce

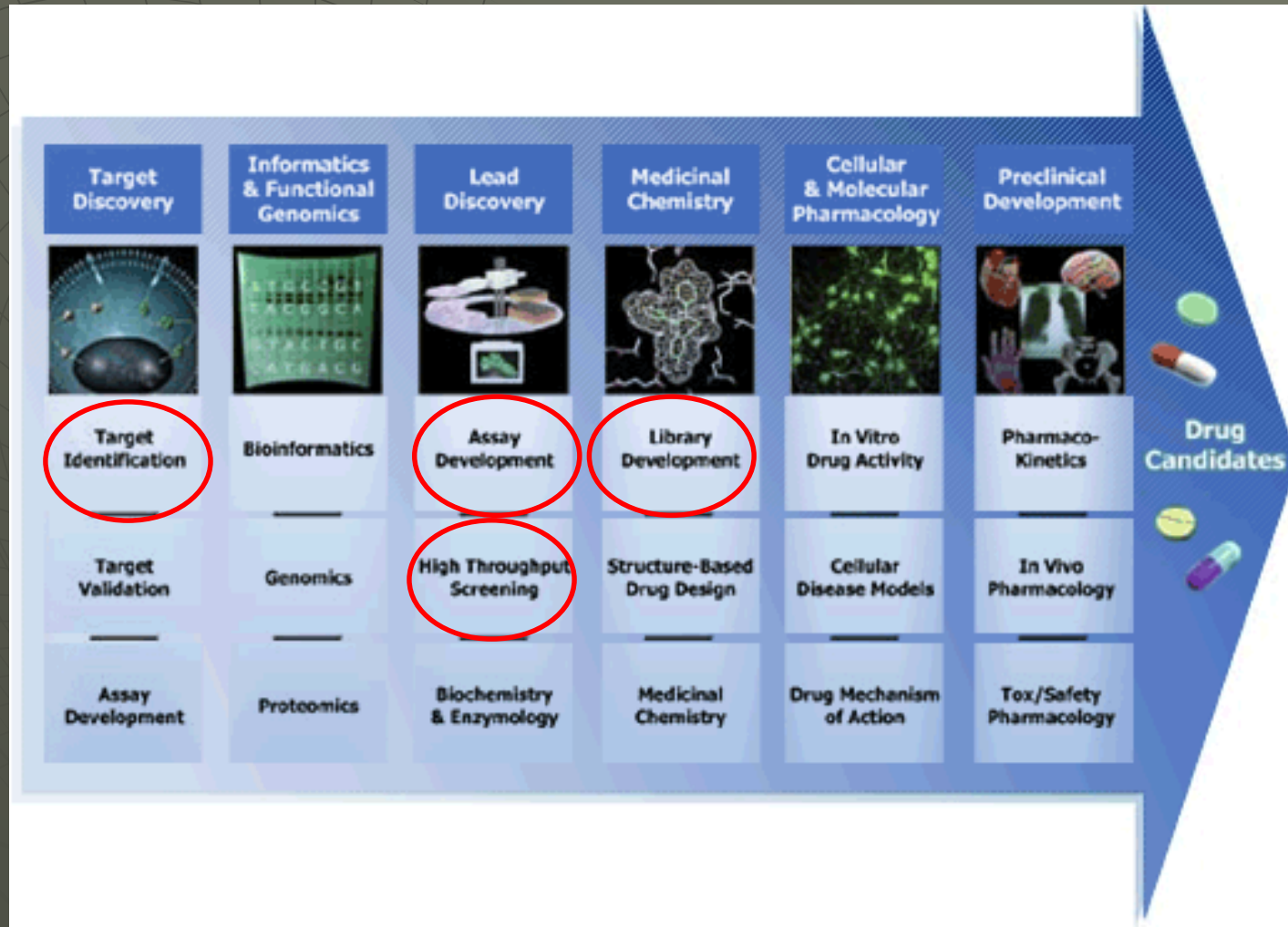
## ➤ Neenzymové systémy

- GSH, HCys, Cys, DTT
- Ca(II)
- Gentamycin a kanamycin
- Kreatin
- Cr(VI) a Co(II)

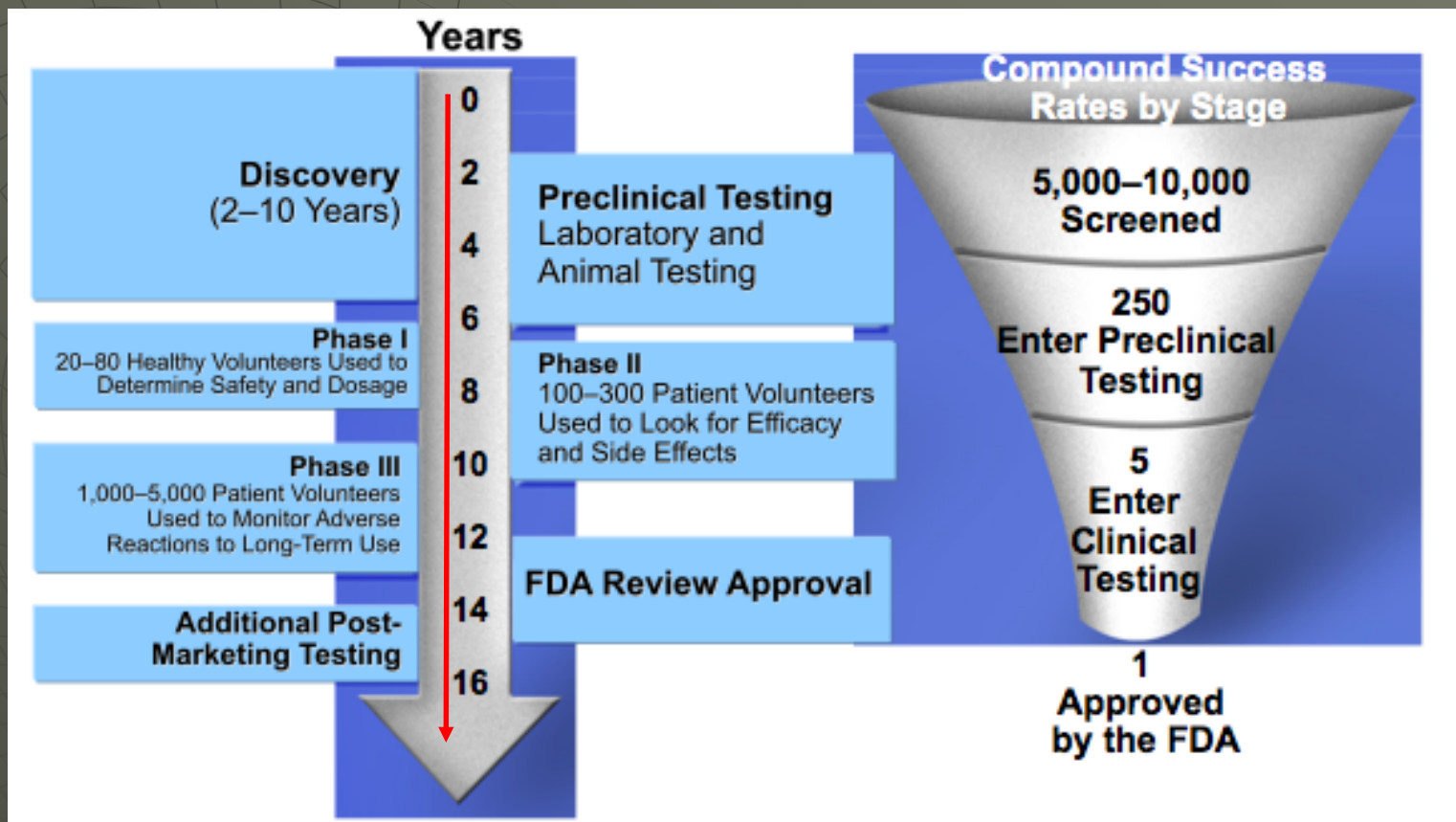
The background features a dark gray grid pattern that is circular and centered on the left side of the slide. Overlaid on this grid is a faint, light-colored illustration of a microscope, positioned diagonally from the upper right towards the center. The text is centered horizontally and vertically over the grid.

# Využití metody CE při vývoji nových léčiv

# Vývoj nového léčiva

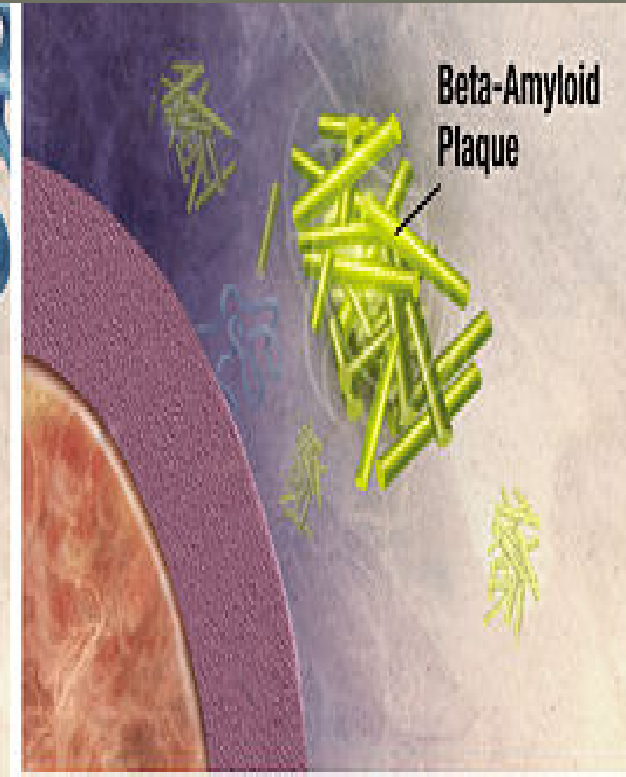
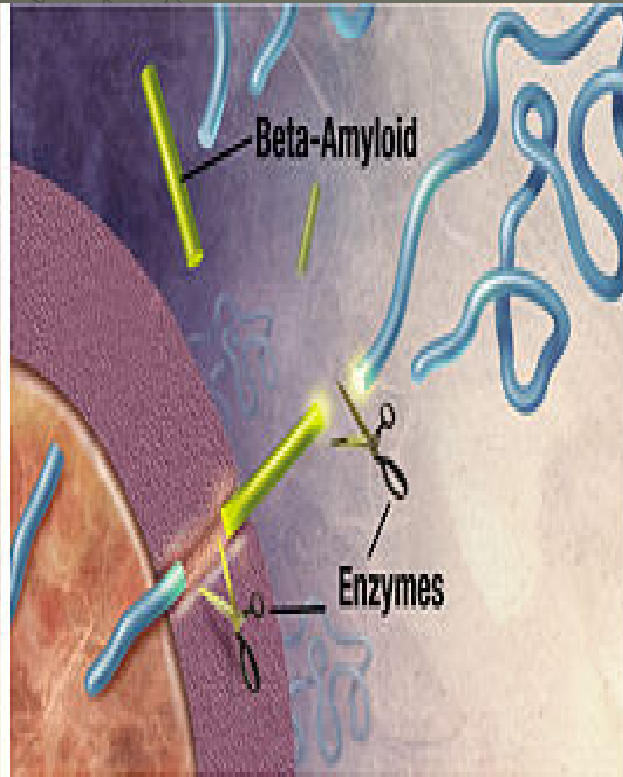
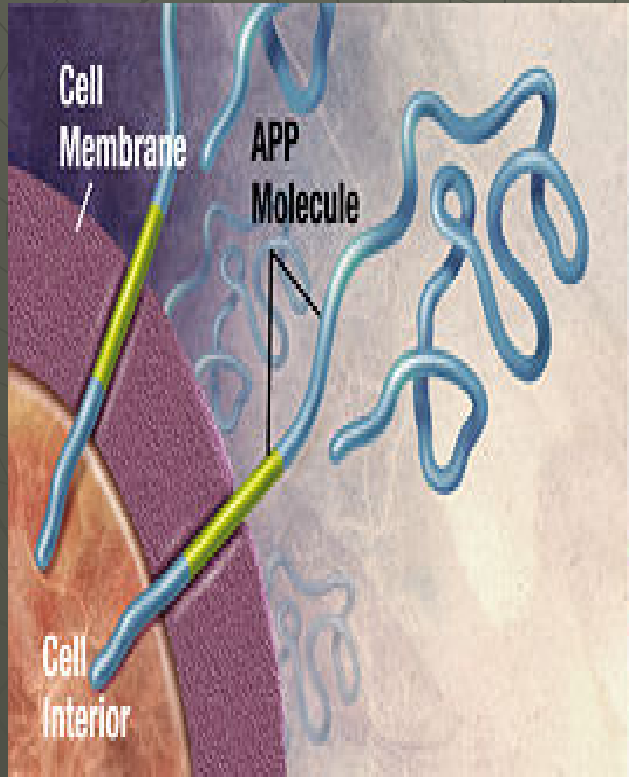


# Vývoj nového léčiva



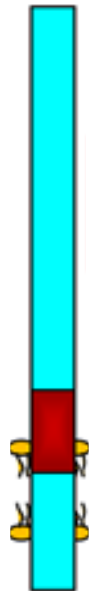
~ 500 mil \$

# Alzheimer





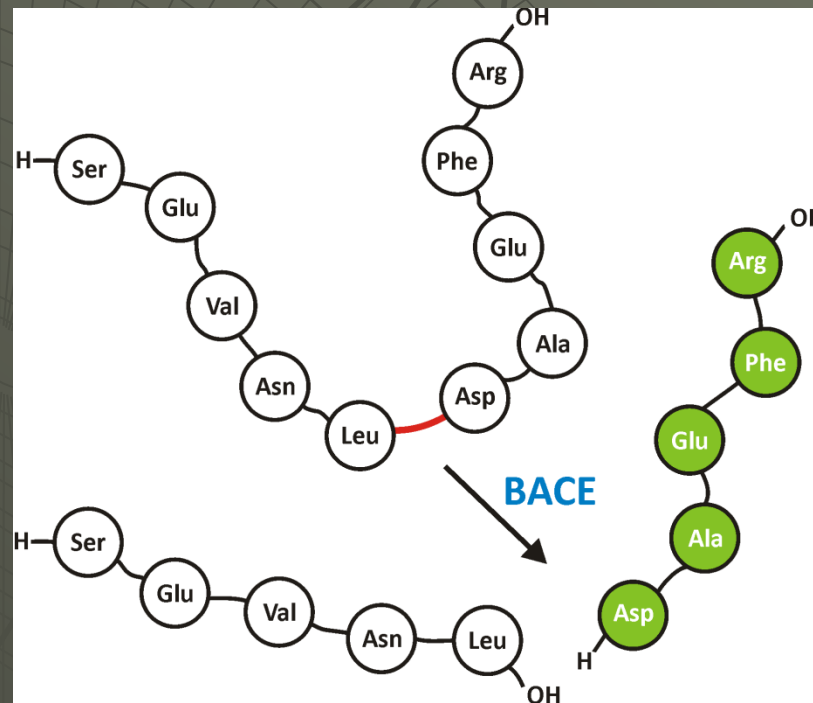
# Alzheimer



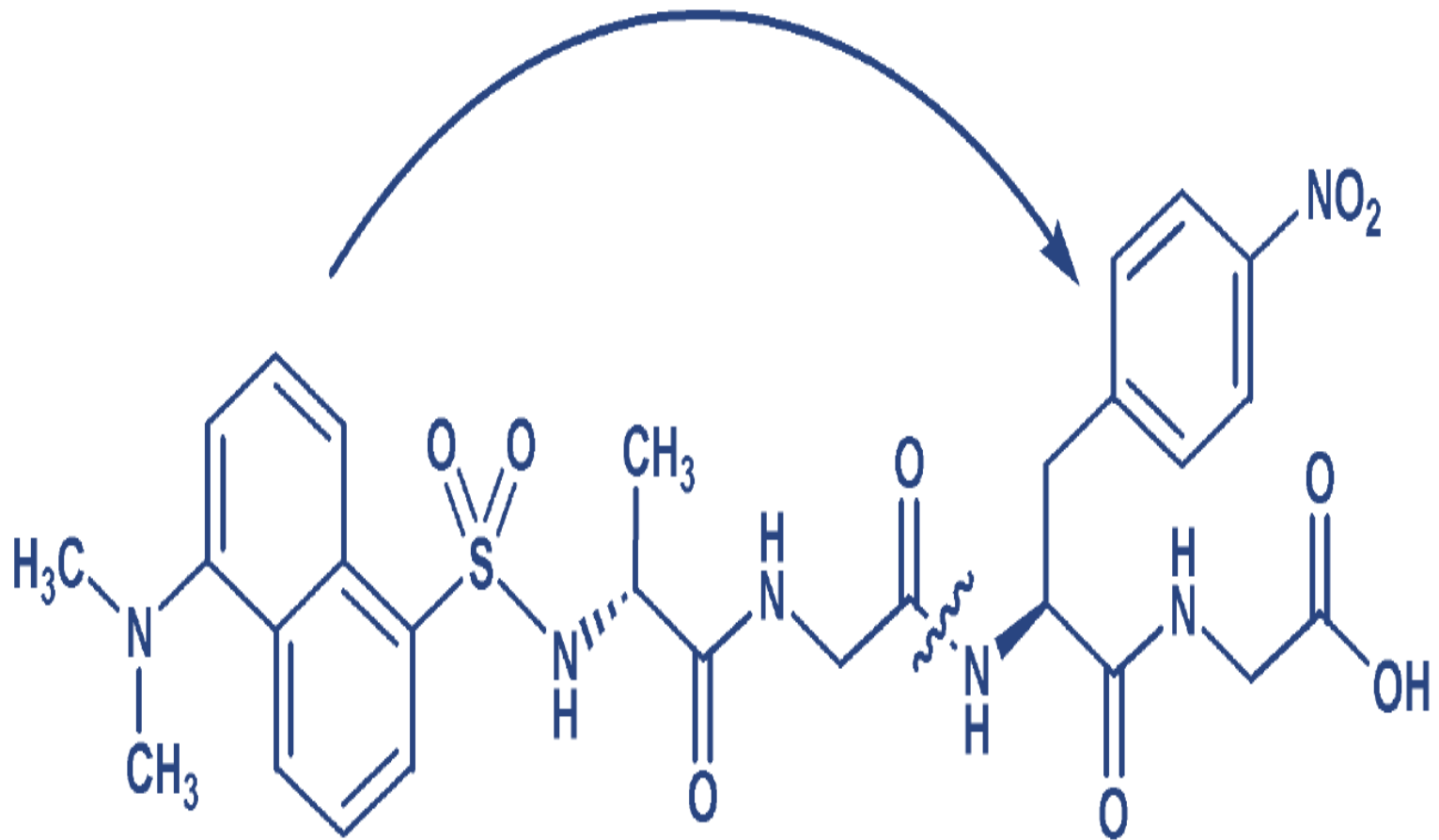
API

# $\beta$ -sekretasa FRET assay

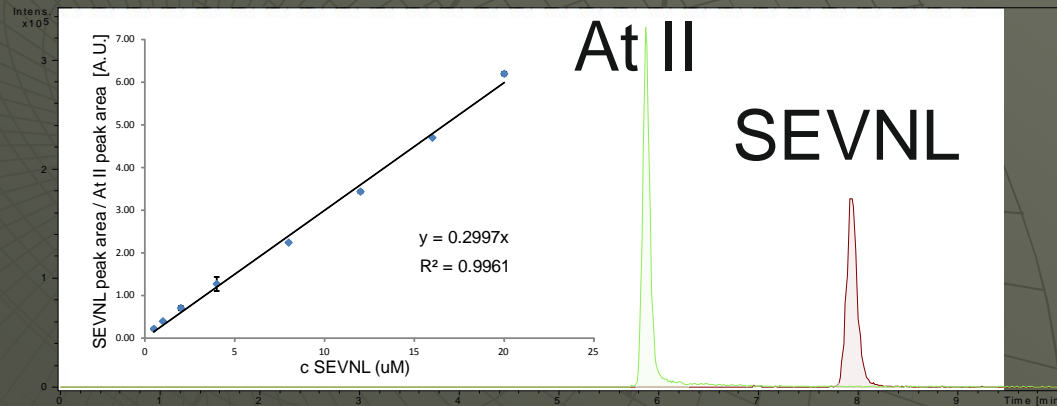
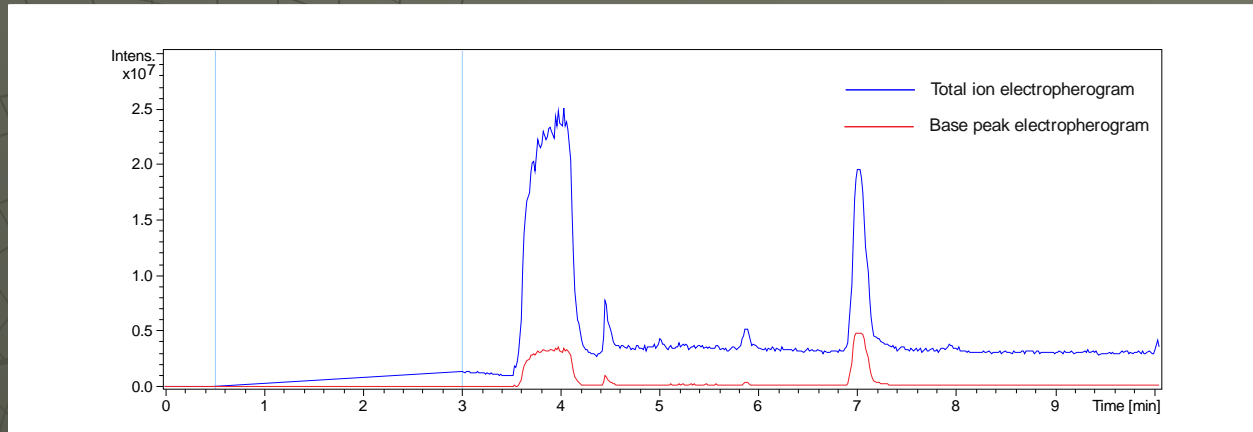
- ◆  $\beta$ -Secretase = aspartic-acid protease
- ◆ SEVNLDAEFR = model substrate



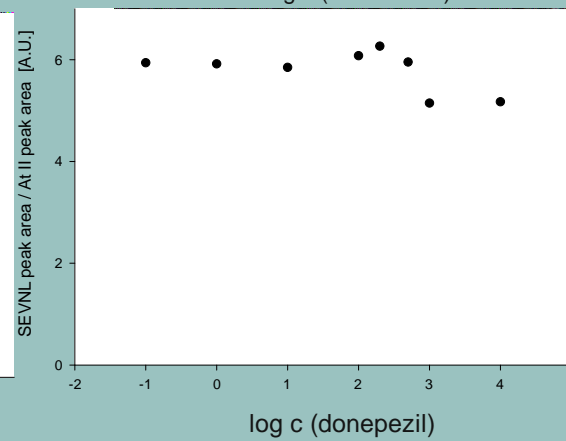
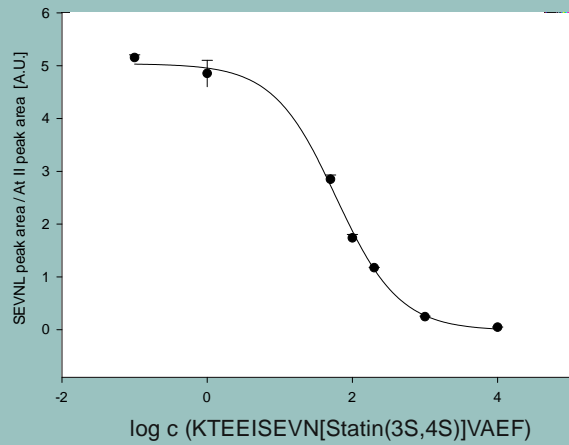
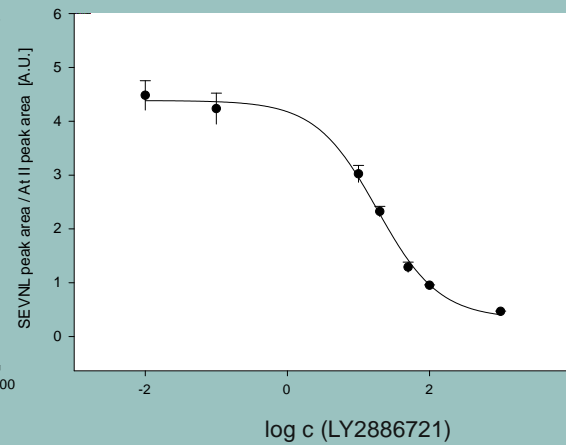
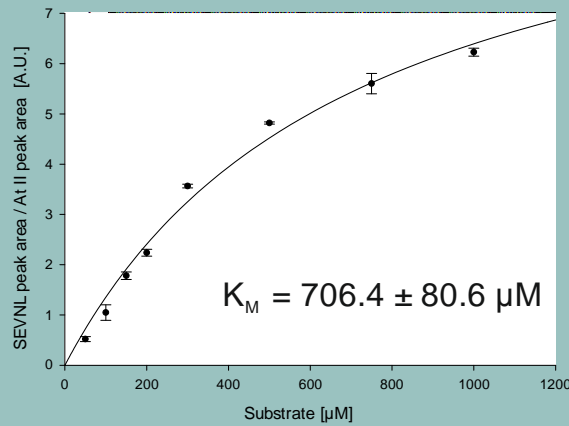
# $\beta$ -sekretasa FRET assay



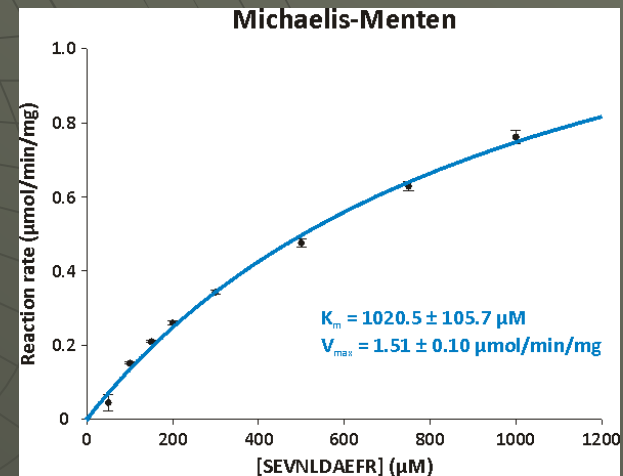
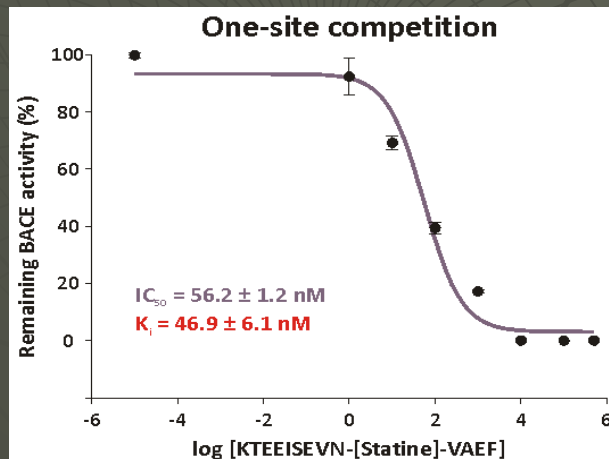
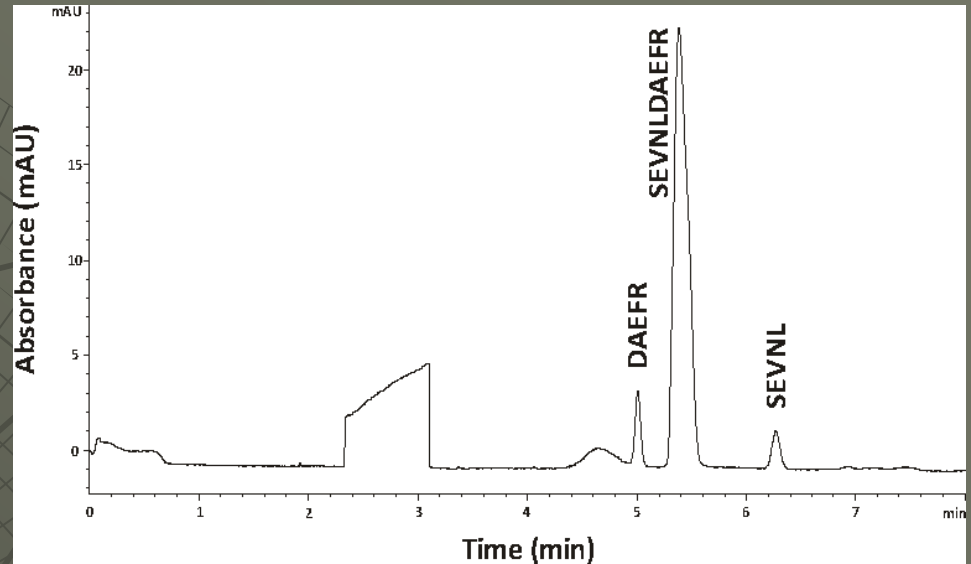
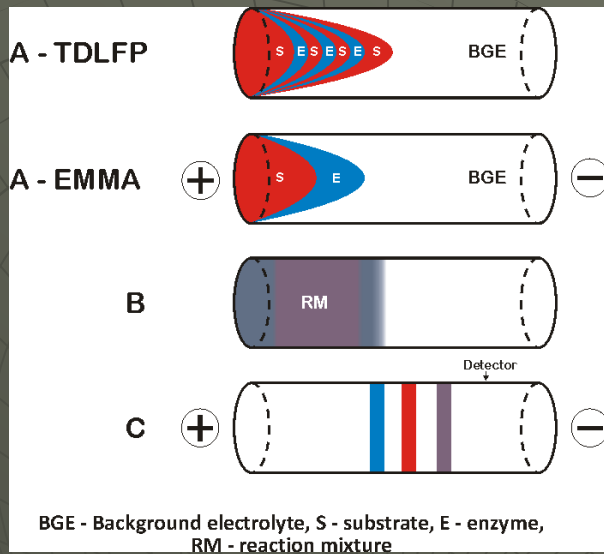
# off-line CE-MS metoda



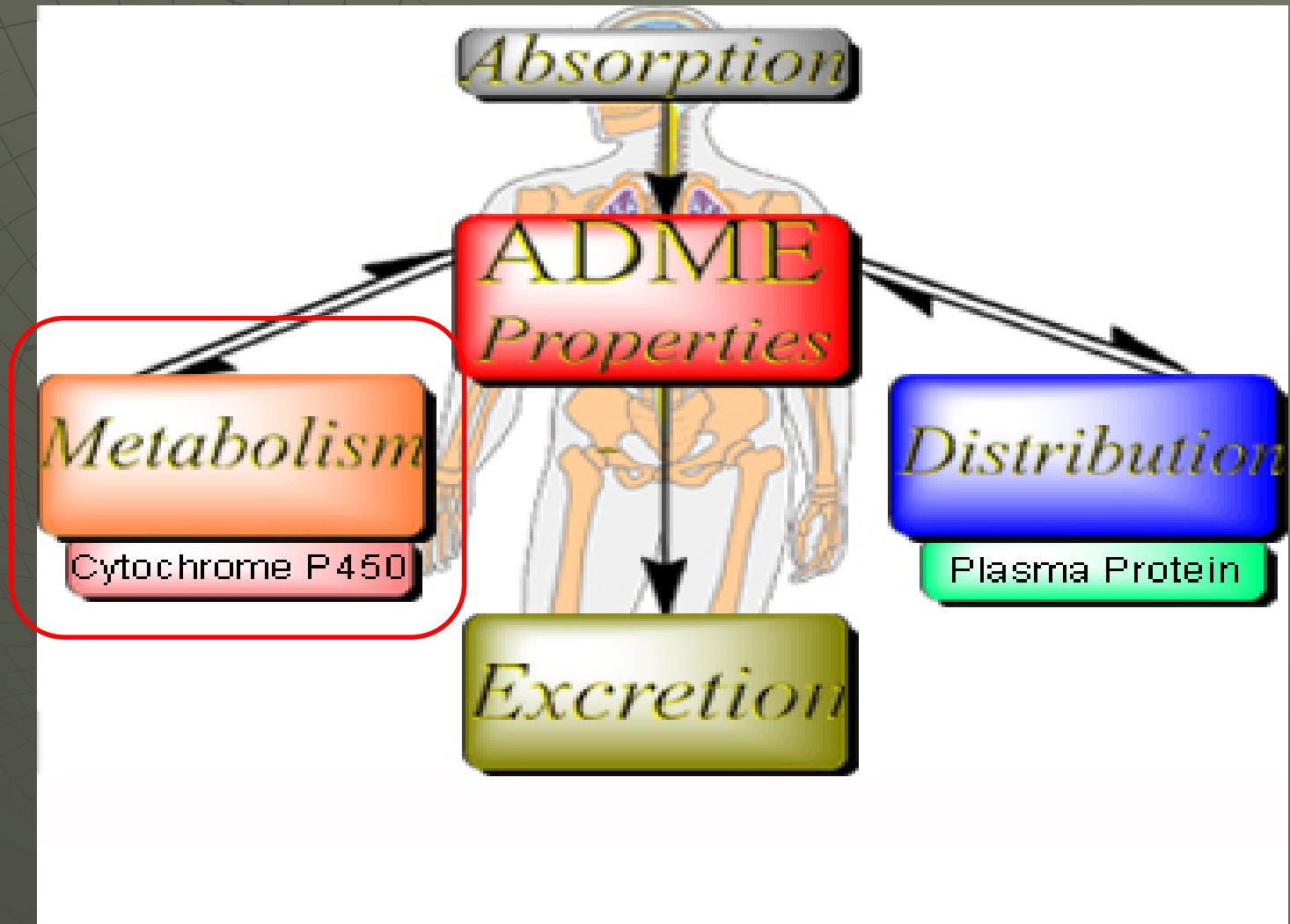
# Kinetická a inhibiční studie $\beta$ -sekretasy



# On-line CE-UV metody



# Vývoj nového léčiva - LADME



# Cytochromy P450 (CYP)



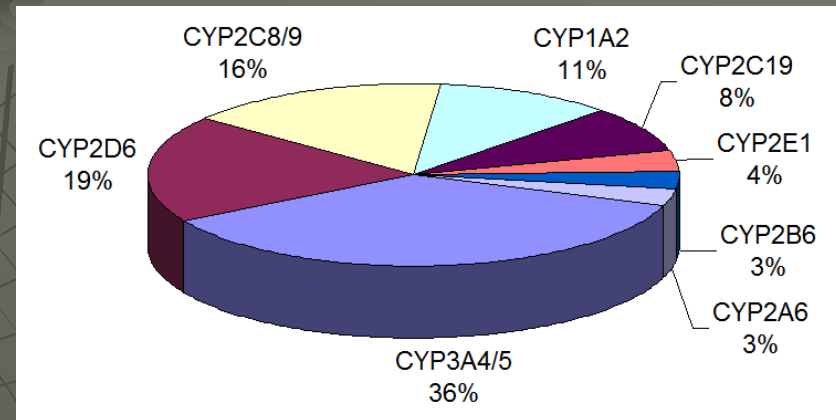
*Homo sapiens*

50 různých CYP izoforem

podíl na metabolismu 80 % známých léčiv

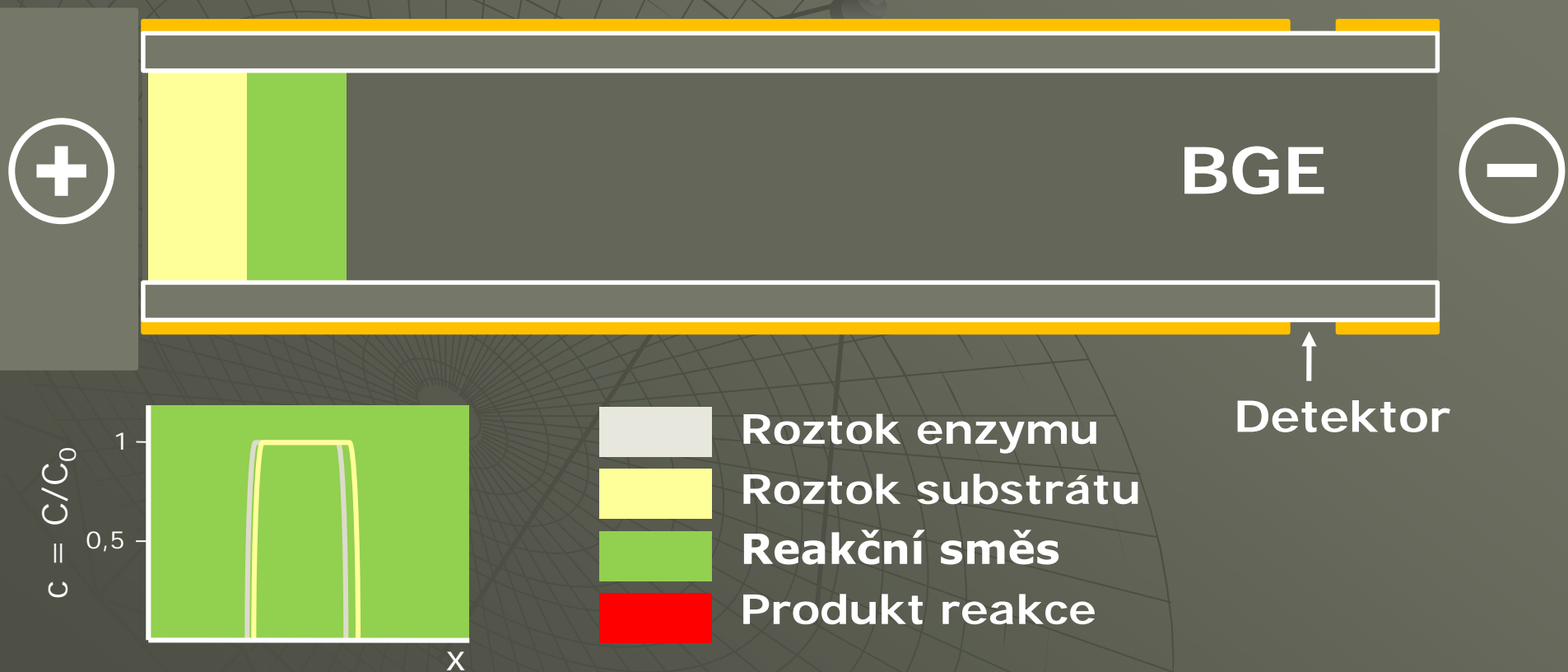


*Jaterní plátky, hepatocyty, mikrosomy, rekombinantní enzymy*

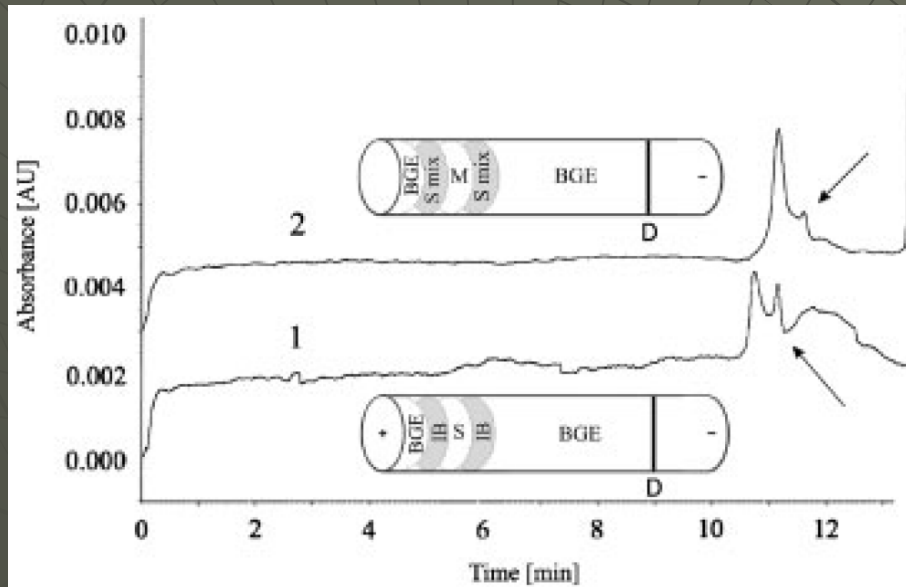




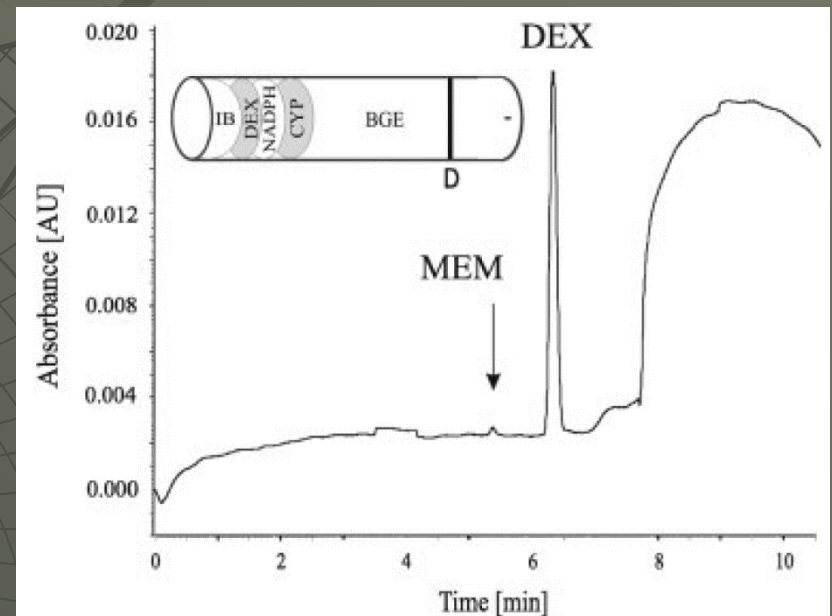
# EMMA – CYP3A4 + dextrometorfan



# EMMA – CYP3A4 + dextrometorfan



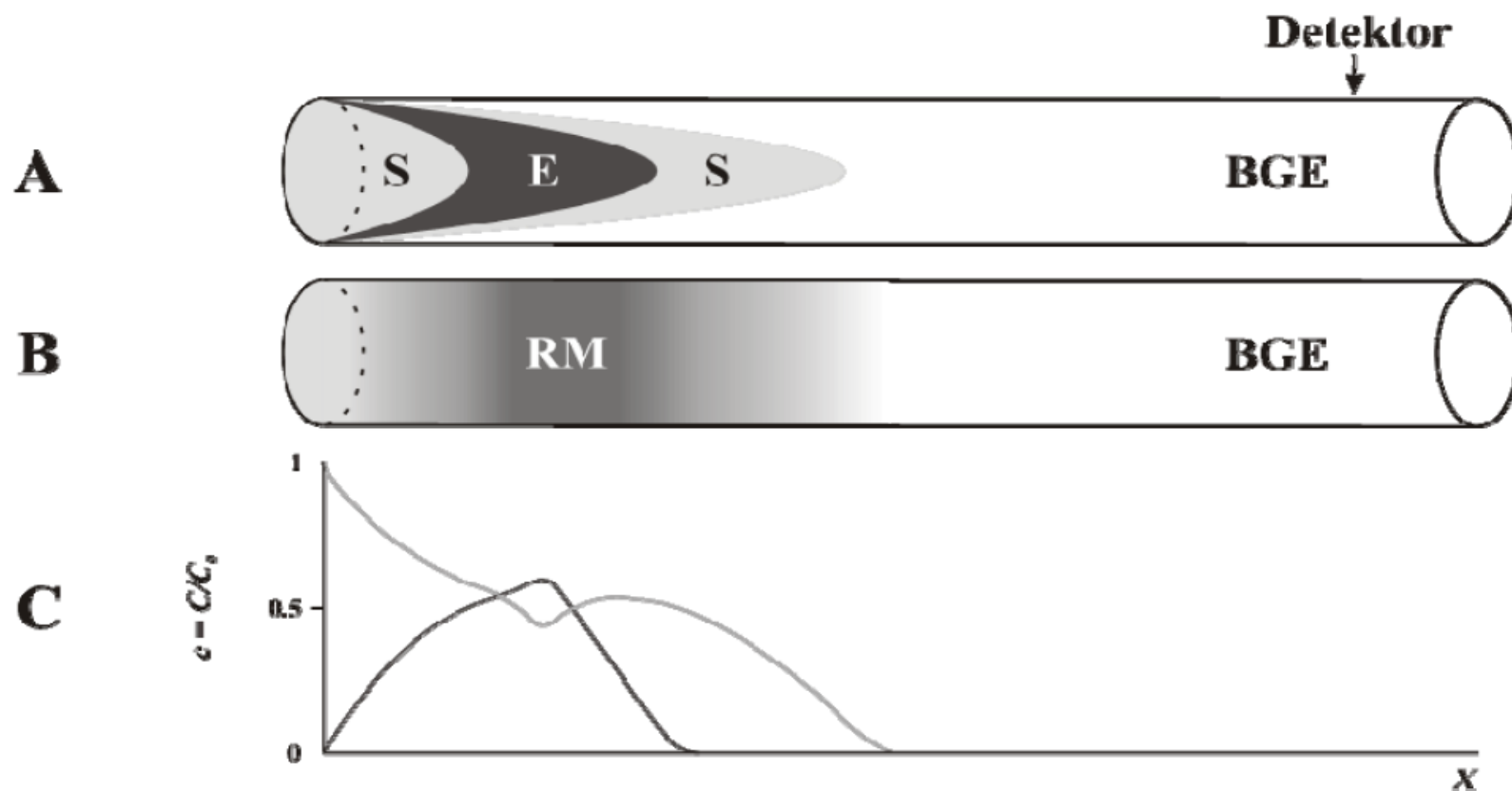
**HLM**



**CYP3A4**

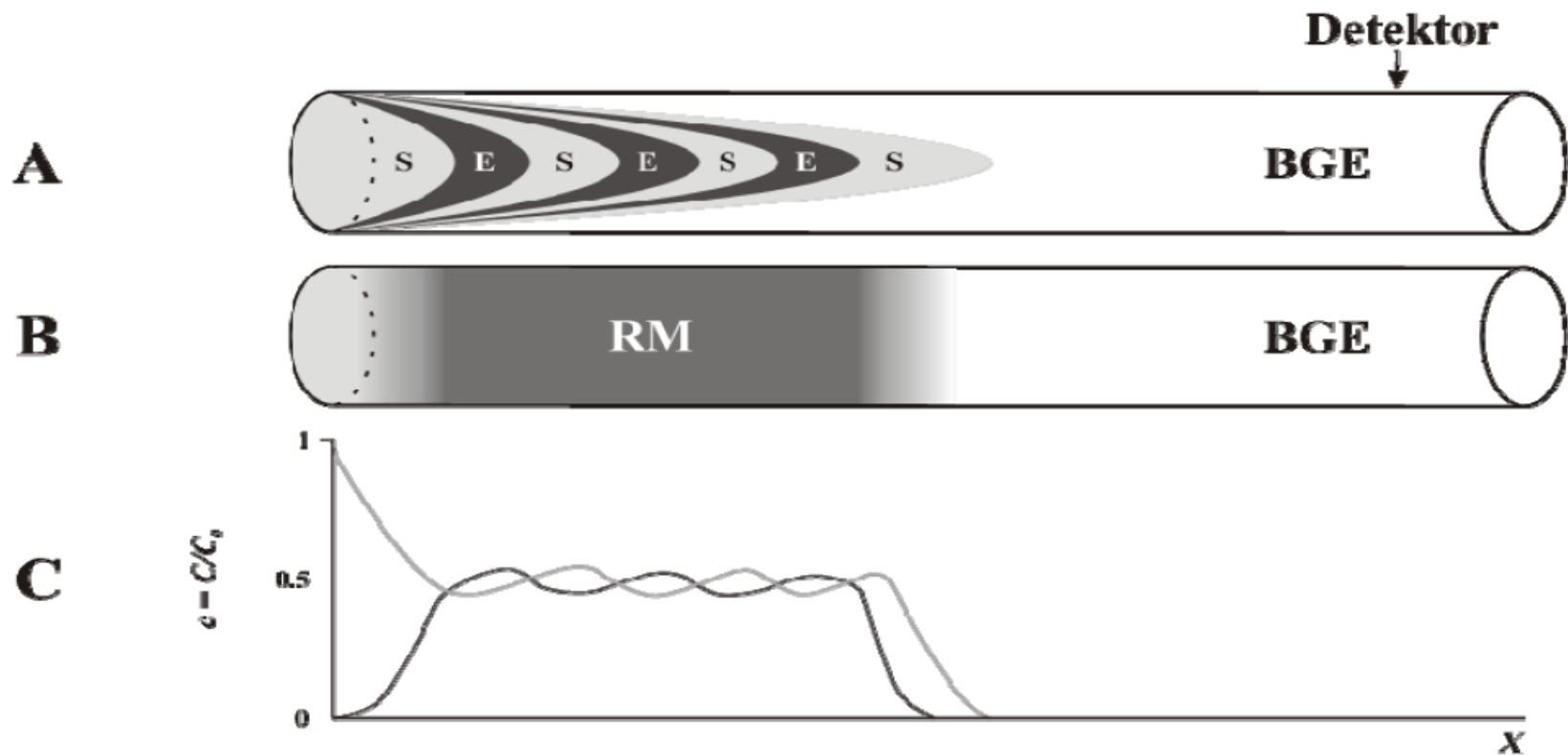
# Míchání difuzí

TDLFP = Transverse diffusion of laminar flow



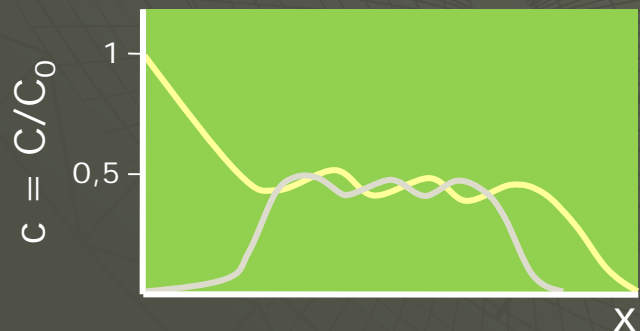
# Míchání difuzí


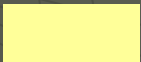
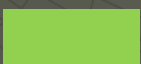
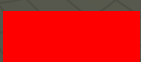
TDLFP = Transverse diffusion of laminar flow



R. Řemínek, M. Zeisbergerová, M. Langmajerová, Z. Glatz, Electrophoresis, 34 (2013) 2705.

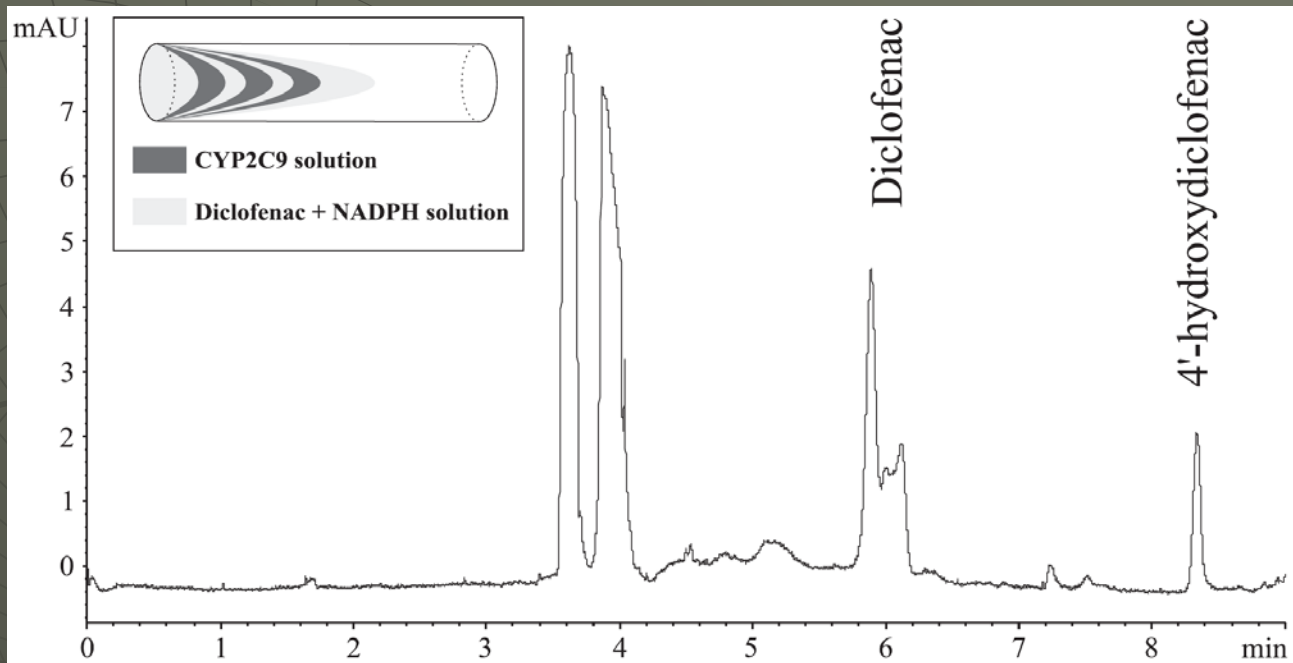
# Míchání difuzí – CYP2C9 + diclofenac



-  Roztok enzymu
-  Roztok substrátu
-  Reakční směs
-  Produkt reakce

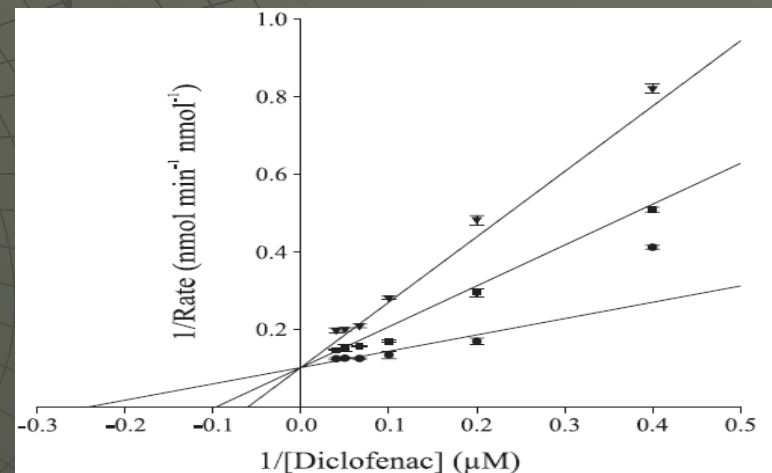
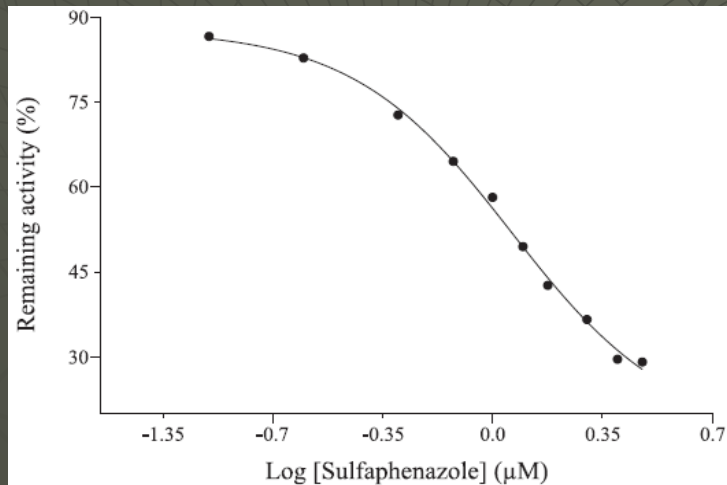
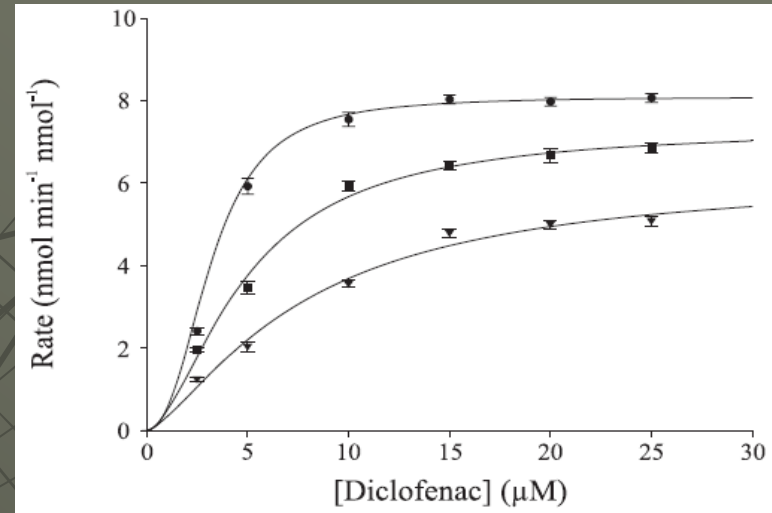
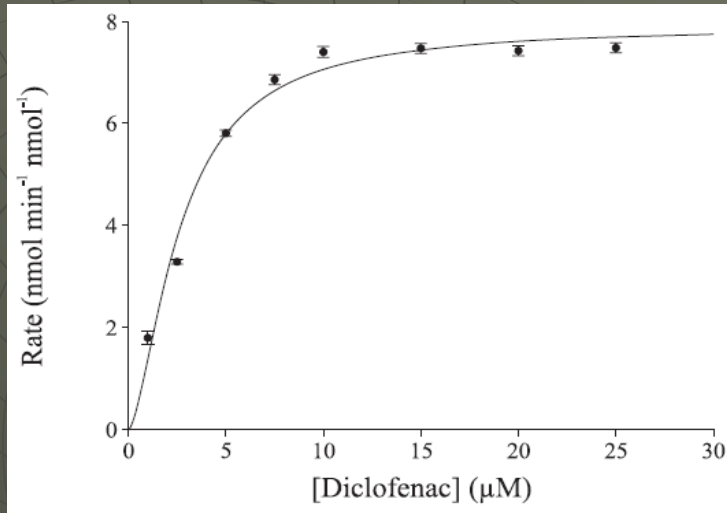
↑  
Detektor

# Míchání difuzí – CYP2C9 + diclofenac



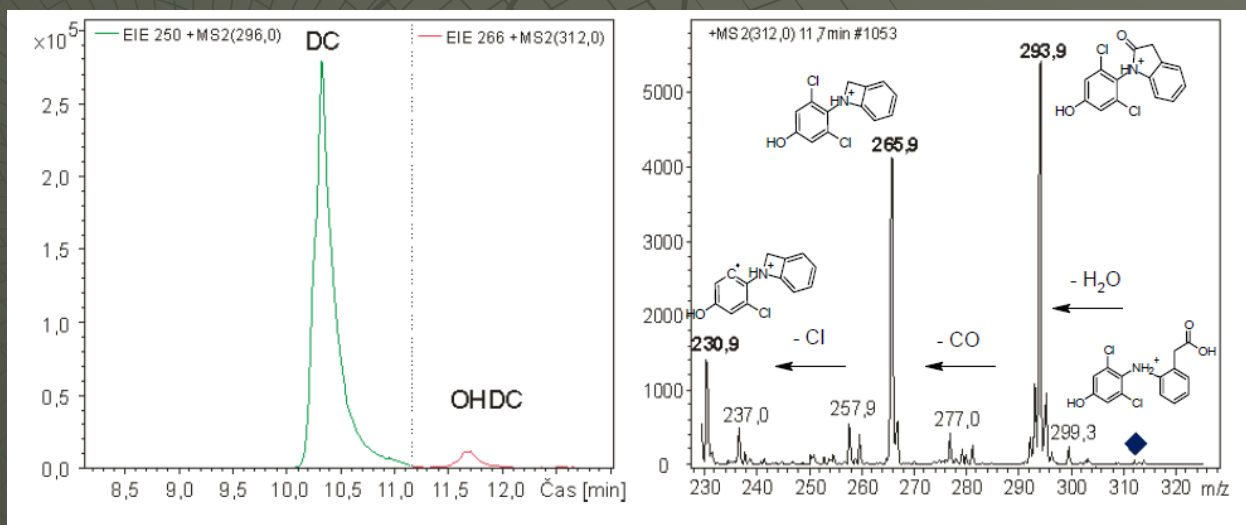
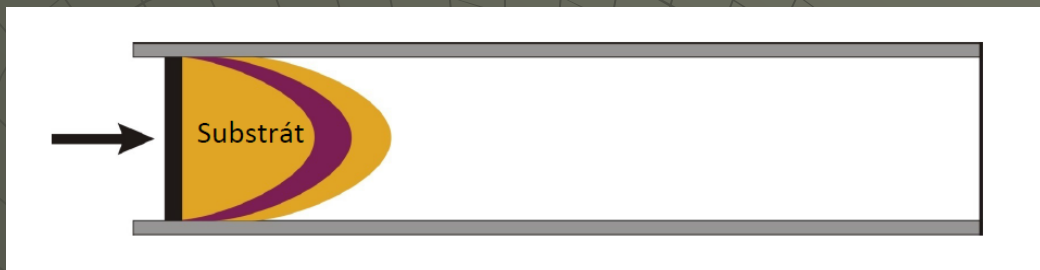
R. Řemínek, M. Zeisbergerová, M. Langmajerová, Z. Glatz, Electrophoresis, 34 (2013) 2705.

# Míchání difuzí – CYP2C9 + diclofenac



$K_m = 2,66 \pm 0,18 \mu\text{M}$ ;  $V_{max} = 7,91 \pm 0,22 \text{ nmol/min/nmol}$ ;  $n = 1,59 \pm 0,16$ ;  
 $IC_{50} = 0,94 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ;  $K_i = 0,39 \pm 0,07 \mu\text{M}$

# Kombinace TDLFP s MS detekcí

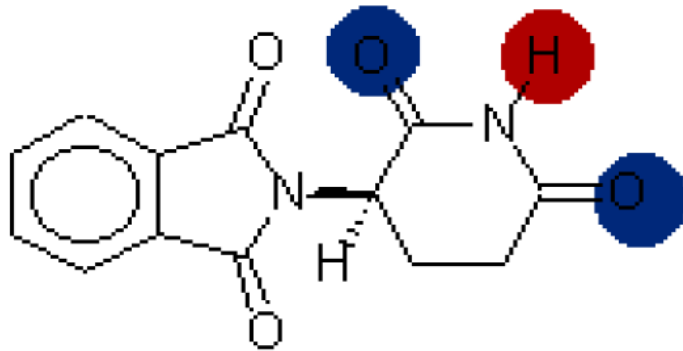




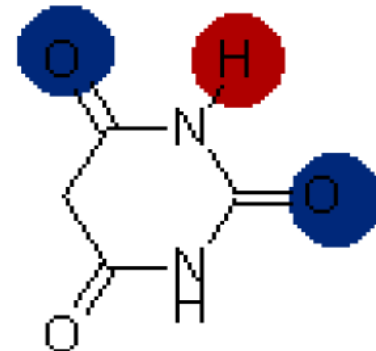


Chiralita – chirální separace ?  
pomocí CE

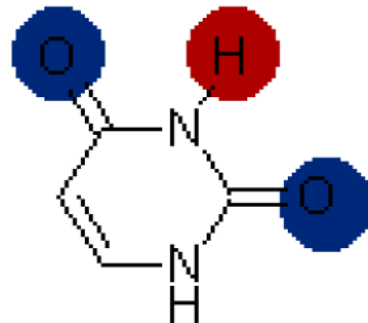
# Thalidomid



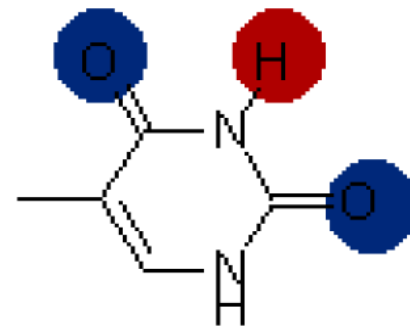
Thalidomid



Barbitursäure



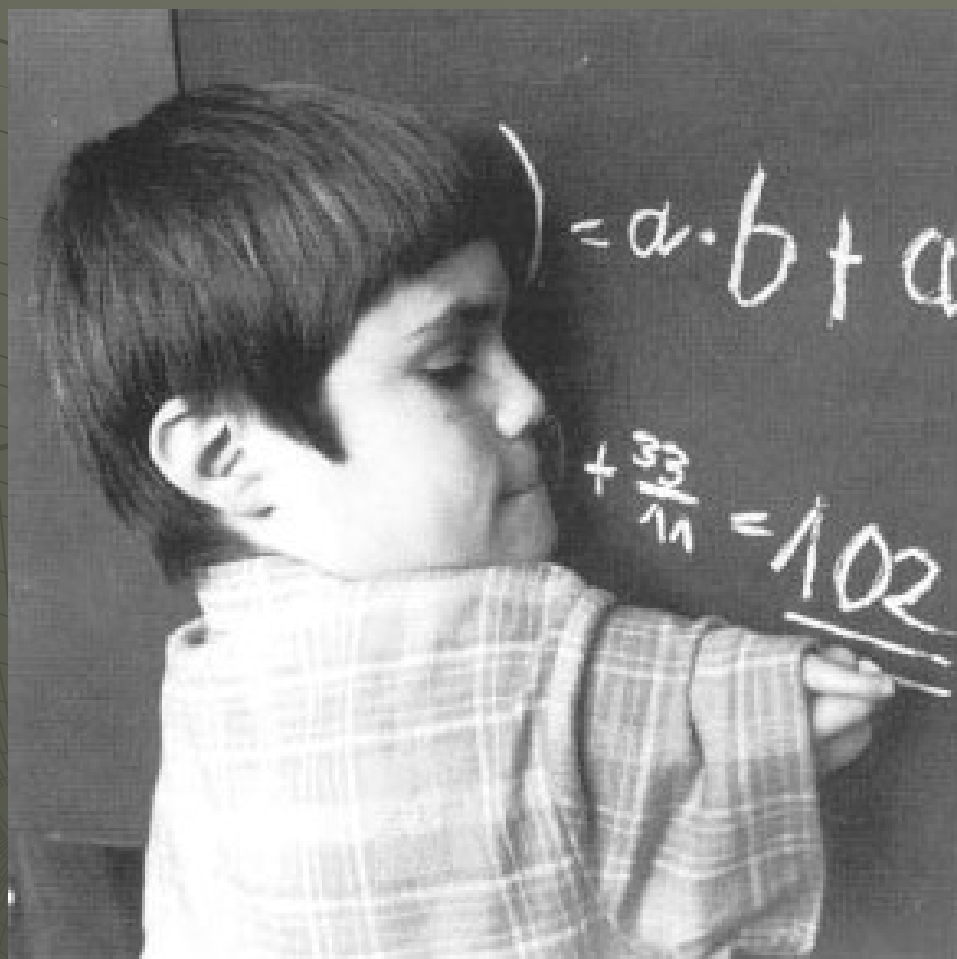
Uracil



Thymin

# Thalidomid

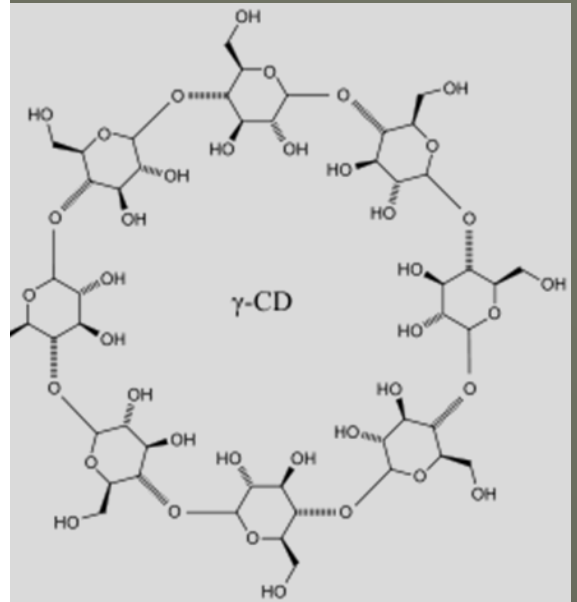
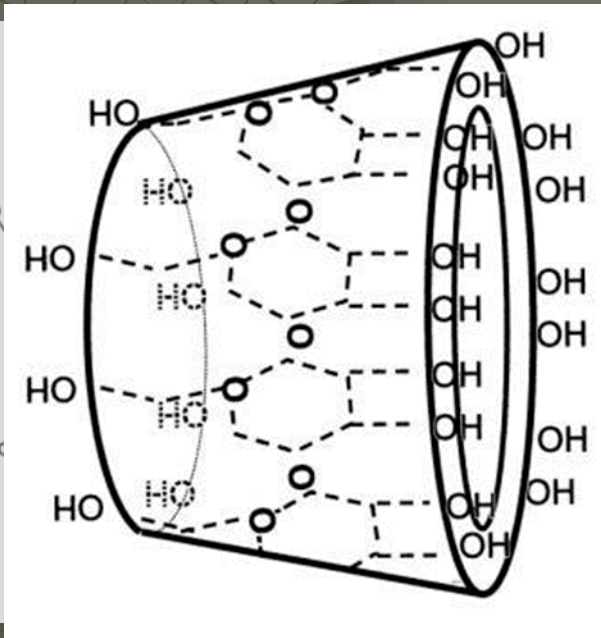
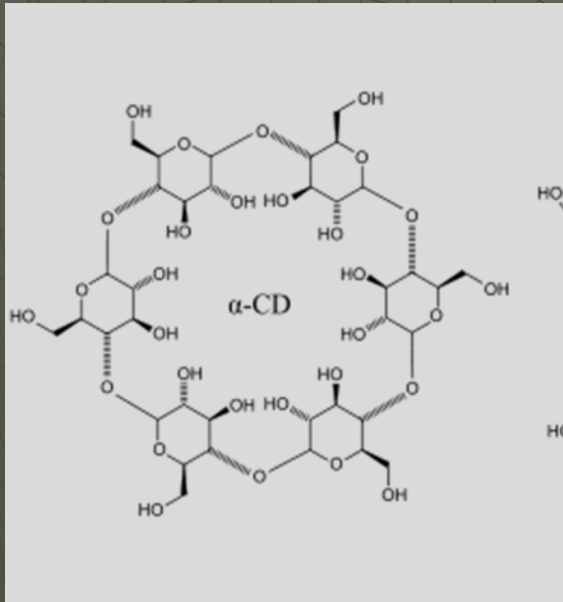




# Chirální separace

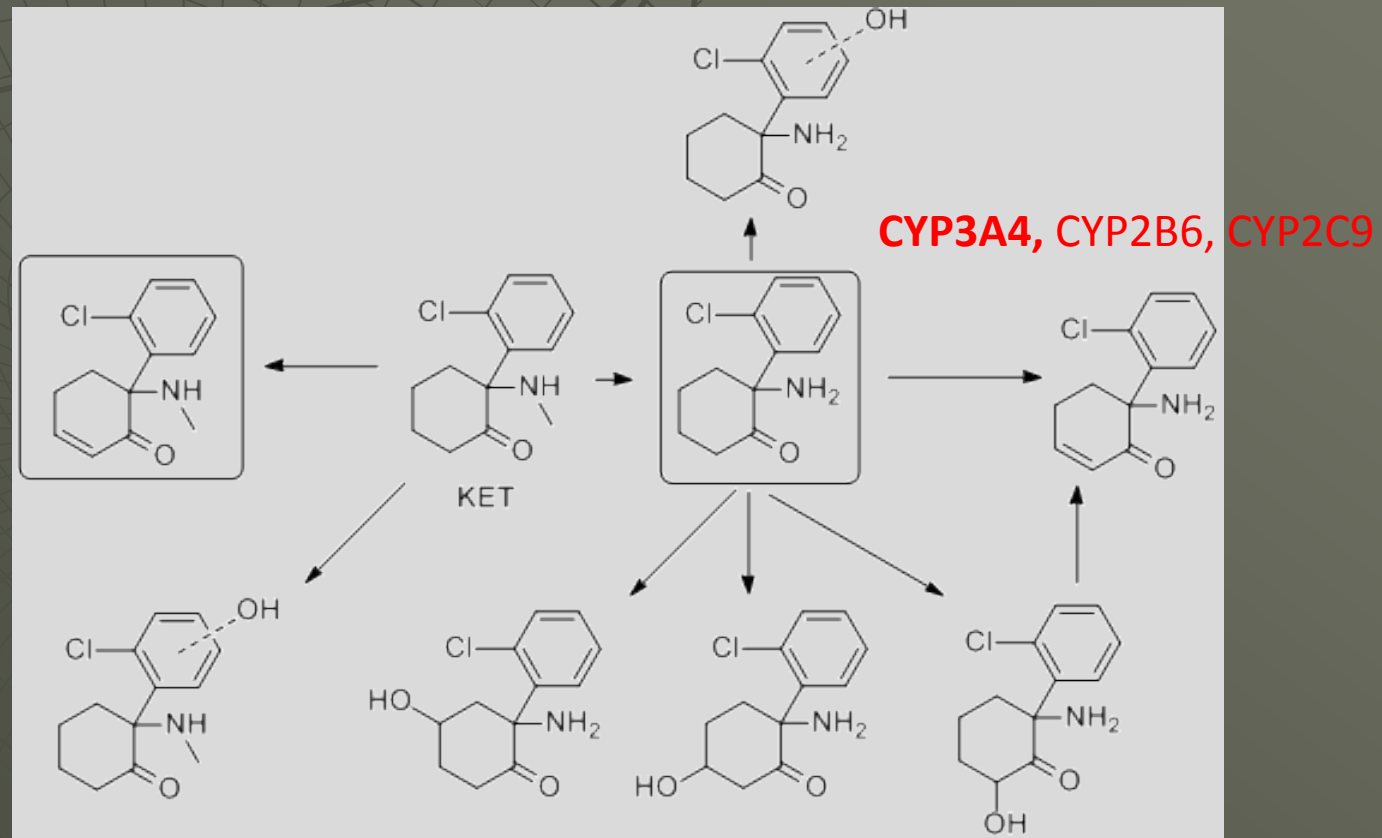


# Cyklodextriny

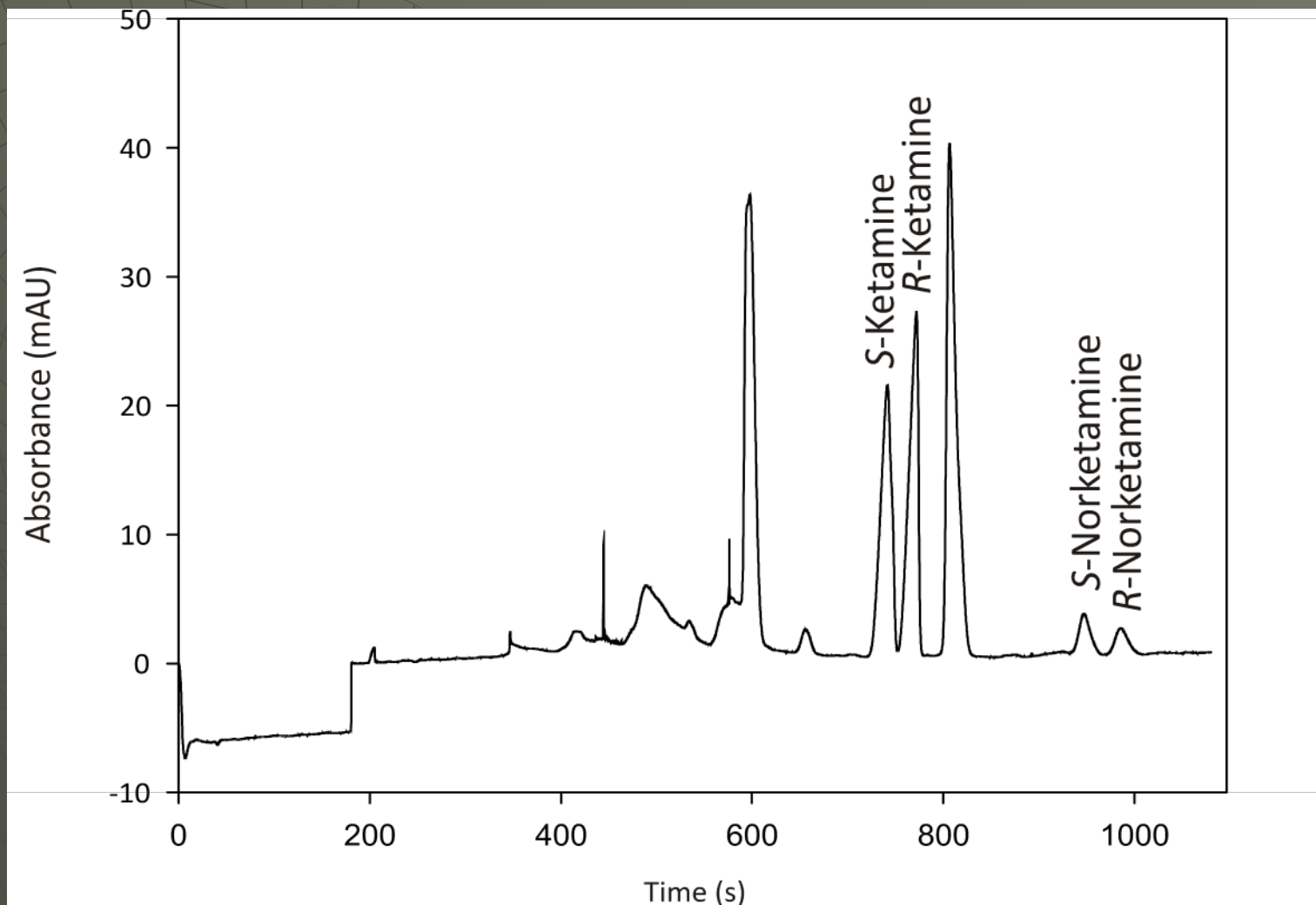


# Ketamin

anestetikum a analgetikum v humánní a veterinární medicíně



# TDLFP ketaminu

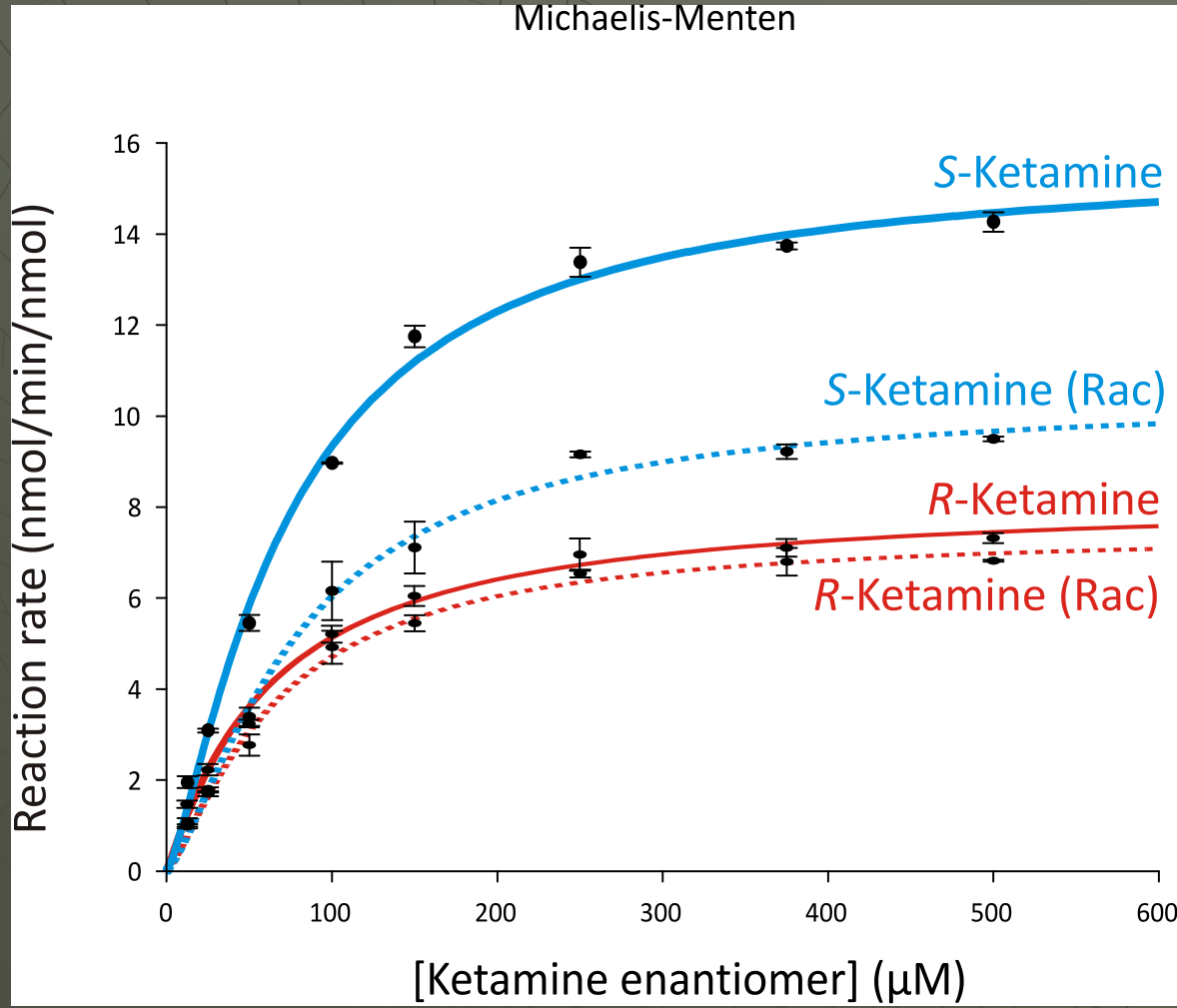


50 mM TRIS-fosfátový pufr (pH 2.5) obsahující  
3 % (w/v) vysoce sulfatovaný  $\gamma$ -cyclodextrin



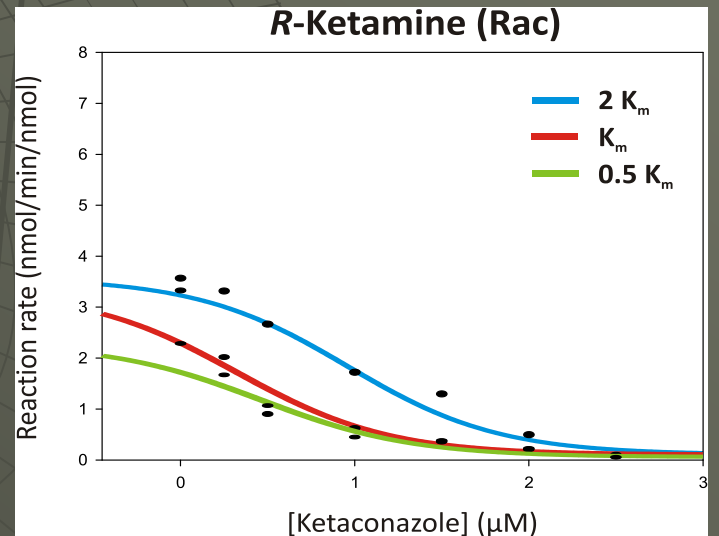
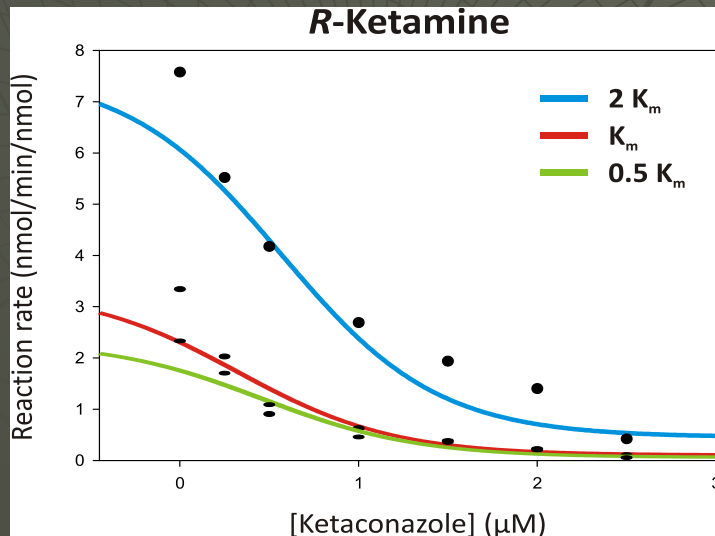
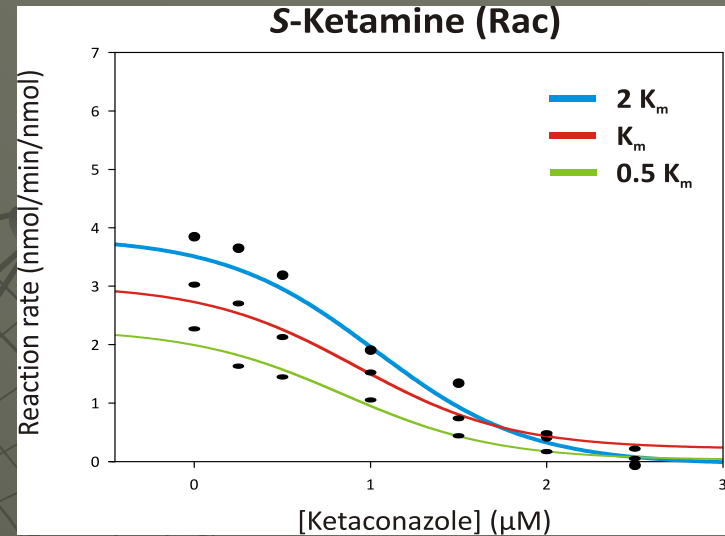
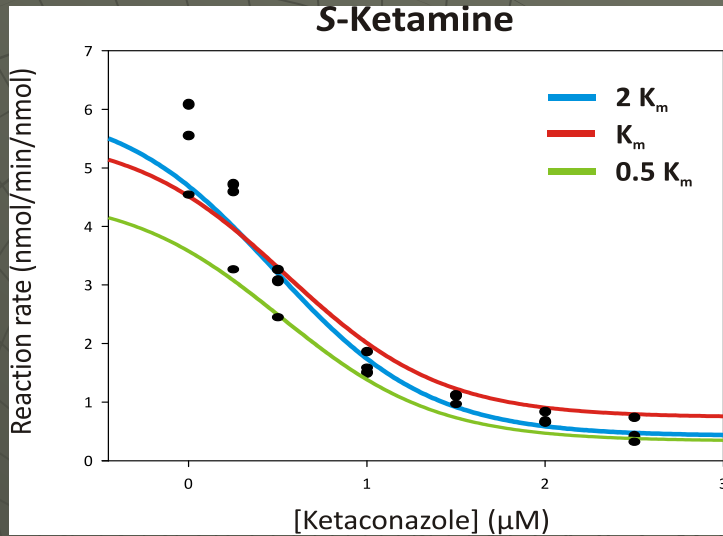
# Kinetická studie

Michaelis-Menten



$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nmol/min/nmol)
$74.22 \pm 5.75$	$15.66 \pm 0.52$
$79.54 \pm 8.49$	$10.13 \pm 0.48$
$62.91 \pm 8.02$	$8.18 \pm 0.40$
$66.45 \pm 6.62$	$7.47 \pm 0.31$

# Inhibiční studie



# Počítačové simulace

G Model  
CHROMA-357950; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

Journal of Chromatography A, xxx (2016) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



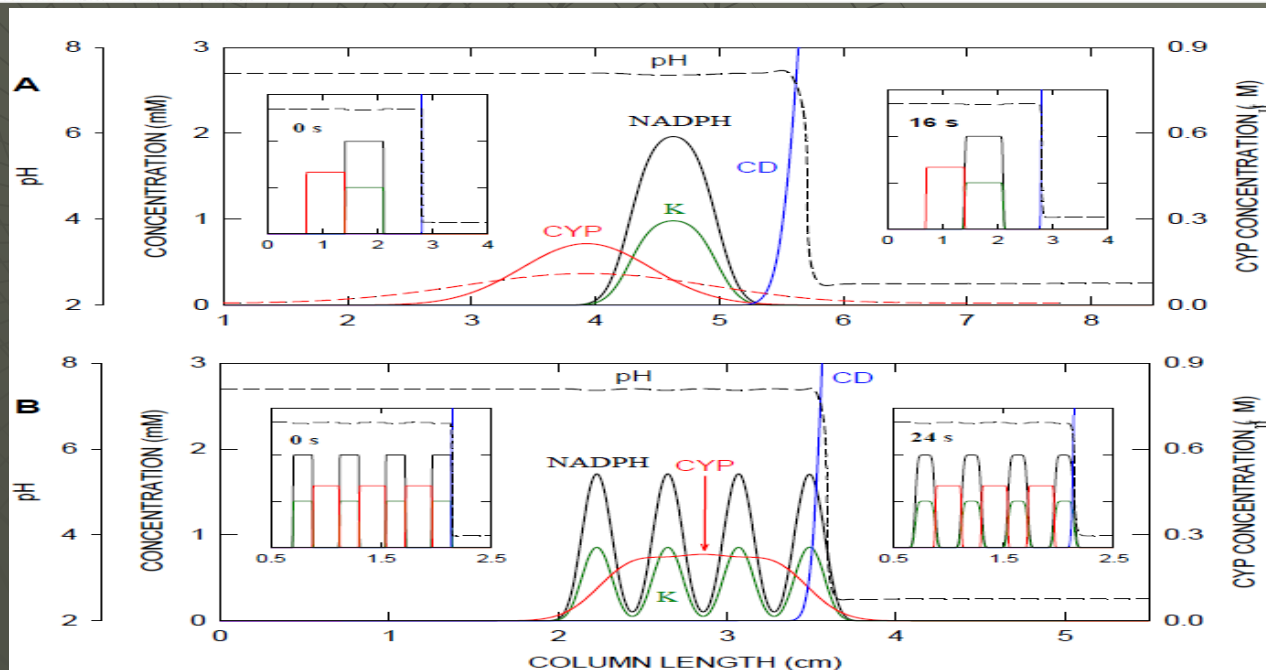
## Simulation and experimental study of enzyme and reactant mixing in capillary electrophoresis based on-line methods

Marta Pelcová<sup>a,b</sup>, Roman Řemínek<sup>a,b</sup>, Friederike A. Sandbaumhüter<sup>a</sup>,  
Richard A. Mosher<sup>c</sup>, Zdeněk Glatz<sup>b</sup>, Wolfgang Thormann<sup>a,+</sup>

<sup>a</sup> Clinical Pharmacology Laboratory, Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, Switzerland

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

<sup>c</sup> RAM Software Solutions, Tucson, AZ, USA



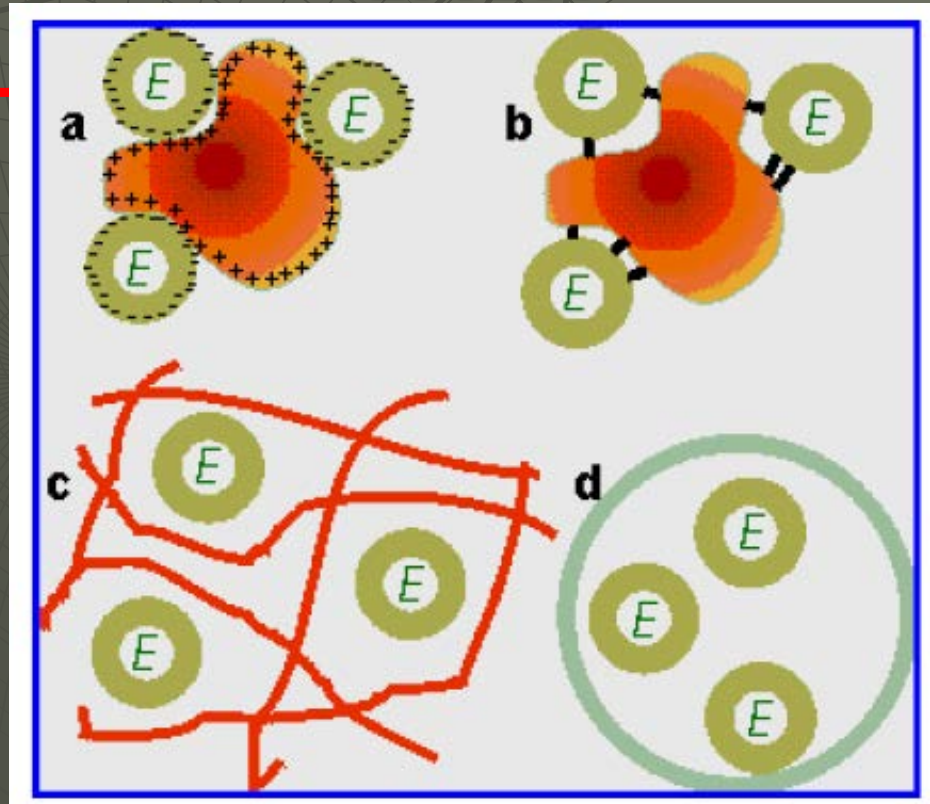
# EMMA versus TDLFP

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

# Studium enzymových reakcí pomocí CE

## Enzymový reaktor

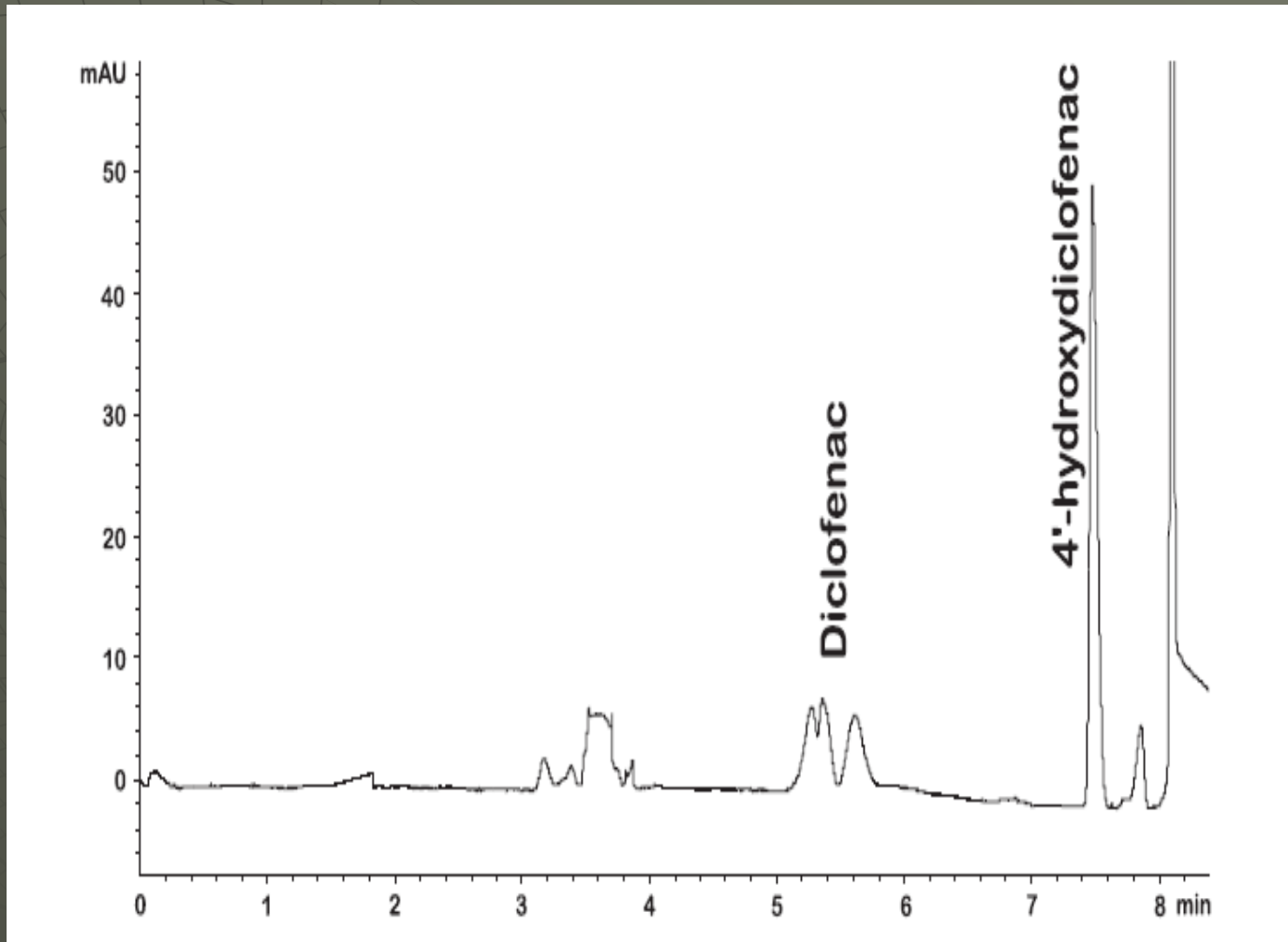
### IMER



# IMER

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


# CYP2CD IMER




Schejbal, J. et al. *J. Chromatogr.*, 1437 (2016) 234.

# Studium enzymových reakcí CE

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

 **ELSEVIER**

 **ScienceDirect**

Journal of Chromatography B, 841 (2006) 23–37

**JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B**

[www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

Review

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

Zdeněk Glatz\*

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic*

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

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

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

 **ELSEVIER**

**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**

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



Review

**Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays**

Yi Fan, Gerhard K.E. Scriba\*

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

Chromatographia (2015) 78:947–970  
DOI 10.1007/s10337-015-2912-0



REVIEW

## Advances in Capillary Electrophoresis-Based Enzyme Assays

Gerhard K. E. Scriba<sup>1</sup> · Fathalla Belal<sup>2</sup>



Chem. Listy 107, 914–920 (2013)

Referát

## **STUDIUM ENZYMOVÝCH REAKCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU V ON-LINE USPOŘÁDÁNÍ**

**ROMAN ŘEMÍNEK, MARTA ZEISBERGEROVÁ  
a ZDENĚK GLATZ**

# EMMA



ELSEVIER

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

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1032 (2004) 173–184

---

---

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

---

---

[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

Review

## Electrophoretically mediated microanalysis

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

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

<sup>b</sup> *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic*

# EMMA



ELSEVIER

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

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1032 (2004) 173–184

---

---

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

---

---

[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

Review

## Electrophoretically mediated microanalysis

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

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

<sup>b</sup> *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic*

#### **Record 1 of 4**

**Title:** Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis

**Author(s):** Van Dyck, S (Van Dyck, S); Kaale, E (Kaale, E); Novakova, S (Novakova, S); Glatz, Z (Glatz, Z); Hoogmartens, J (Hoogmartens, J); Van Schepdael, A (Van Schepdael, A)

**Source:** ELECTROPHORESIS **Volume:** 24 **Issue:** 22-23 **Pages:** 3868-3878 **DOI:** 10.1002/elps.200305636 **Published:** DEC 2003

---

#### **Record 2 of 4**

**Title:** Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis: An update

**Author(s):** Zhang, J (Zhang, J); Hoogmartens, J (Hoogmartens, J); Van Schepdael, A (Van Schepdael, A)

**Source:** ELECTROPHORESIS **Volume:** 27 **Issue:** 1 **Pages:** 35-43 **DOI:** 10.1002/elps.200500492 **Published:** JAN 2006

---

#### **Record 3 of 4**

**Title:** Advances in CE-mediated microanalysis: An update

**Author(s):** Zhang, J (Zhang, Jie); Hoogmartens, J (Hoogmartens, Jos); Van Schepdael, A (Van Schepdael, Ann)

**Source:** ELECTROPHORESIS **Volume:** 29 **Issue:** 1 **Pages:** 56-65 **DOI:** 10.1002/elps.200700475 **Published:** JAN 2008

---

#### **Record 4 of 4**

**Title:** Recent developments and applications of EMMA in enzymatic and derivatization reactions

**Author(s):** Zhang, J (Zhang, Jie); Hoogmartens, J (Hoogmartens, Jos); Van Schepdael, A (Van Schepdael, Ann)

**Source:** ELECTROPHORESIS **Volume:** 31 **Issue:** 1 **Special Issue:** SI **Pages:** 65-73 **DOI:** 10.1002/elps.200900373 **Published:** JAN 2010

# EMMA

744

*Electrophoresis* 2015, 36, 744–763

**Zdeněk Glatz**

Department of Biochemistry,  
Faculty of Science and CEITEC,  
Masaryk University, Brno, Czech  
Republic

Review

## **On-capillary derivatisation as an approach to enhancing sensitivity in capillary electrophoresis**

# TDLFP

742

J. Sep. Sci. 2009, 32, 742–756

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

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

Review

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

# IMER

706

J. Sep. Sci. 2009, 32, 706–718

**Jana Krenkova**  
**Frantisek Svec**

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

Review

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

3550

*Electrophoresis* 2004, 25, 3550–3563

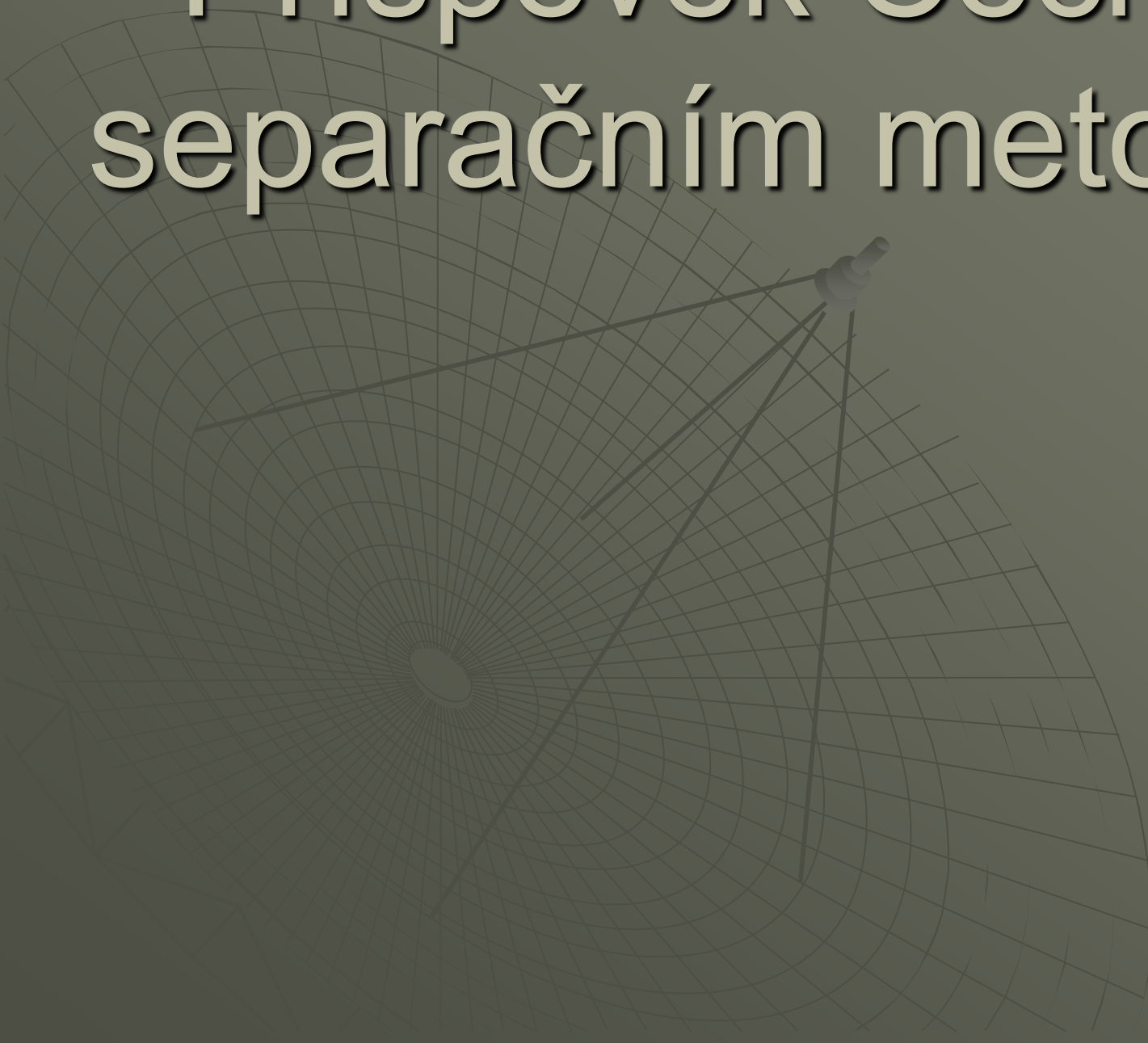
Review

Jana Krenková\*  
František Foret

Institute of Analytical Chemistry,  
Brno, Czech Republic

## **Immobilized microfluidic enzymatic reactors**

# Příspěvek Čechů k separačním metodám





# Příspěvek Čechů k separačním metodám





Vám děkuji za pozornost!