

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



**Andrea Orgoníková**

**SLEDOVÁNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY MYROSINASY POMOCÍ KAPILÁRNÍ  
ELEKTROFORÉZY V OFF-LINE A ON-LINE USPOŘÁDÁNÍ**

Monitoring of myrosinase enzymatic activity by capillary electrophoresis in off-line and  
on-line setting

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 21. 5. 2020

Andrea Orgoníková

## **Abstrakt**

Glukosinoláty jsou sekundární produkty rostlin, které jsou hydrolyzovány enzymem myrosinase, za vzniku toxických produktů, jako jsou například isothiokyanatany. Tyto produkty degradace se podílejí na obraně rostliny proti vnějším patogenům.

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním enzymové aktivity myrosinasy pomocí kapilární elektroforézy. Jako substrát enzymové reakce byl zvolen 3-indolylmethylglukosinolát známý pod triviálním názvem glukobrassicin. V rámci experimentů byla vyzkoušena enzymová reakce jak v off-line, tak i on-line uspořádání kapilární elektroforézy. Jako základní elektrolyt byl použit roztok obsahující 9 mM tetraboritan sodný, 15 mM kyselinu fosforečnou a 10 mM hexadecyltrimethylammonium chlorid (pH = 7,02). Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem (5 kPa, 3 s). Na kapiláru bylo vkládané napětí -20 kV a roztok v kapiláře byl zároveň mobilizován tlakem 5 kPa. Optimalizovaná metoda byla vyhodnocena změřením kalibrační závislosti, meze detekce, meze stanovitelnosti, opakovatelnosti měření pro dávkování glukobrassicinu v off-line i on-line uspořádání a opakovatelnosti on-line enzymové reakce. Hodnota meze detekce byla stanovena na 0,011 mg ml<sup>-1</sup> a hodnota meze stanovitelnosti na 0,035 mg ml<sup>-1</sup>. V off-line i on-line uspořádání byly relativní směrodatné odchylky pro plochy píků menší než 4 % a pro migrační čas menší než 1,5 %. Pro enzymové reakce v on-line uspořádání byla relativní směrodatná odchylka pro plochu píku glukobrassicinu 0,76 % a pro migrační čas 0,54 %.

## **Klíčová slova**

Myrosinasa, glukobrassicin, kapilární elektroforéza, enzymová aktivita

## **Abstract**

Glucosinolates are secondary products of plants, that are hydrolysed by the enzyme myrosinase. Hydrolysis of glucosinolates leads to a production of toxic compounds, such as isothiocyanates. These degradation products are involved in the defense system of the plant against external pathogens.

This bachelor thesis deals with monitoring of myrosinase enzymatic activity by capillary electrophoresis. As a substrate, 3-indolylmethylglucosinolate known by trivial name glucobrassicin, was selected. The enzymatic reaction was tested in both off-line and on-line setting by capillary electrophoresis. As the background electrolyte a solution containing 9 mM sodium tetraborate, 15 mM phosphoric acid and 10 mM hexadecyltrimethylammonium chloride (pH = 7.02) was used. The sample was injected hydrodynamically by pressure (5 kPa, 3 s). A voltage of -20 kV was applied to the capillary and solution in the capillary was simultaneously mobilized by a pressure 5 kPa. The optimized method was evaluated by measuring calibration curve, limit of detection, limit of quantification, repeatability of injection of glucobrassicin in off-line and on-line setting and also repeatability of on-line enzymatic reaction. The limit of detection was 0.011 mg ml<sup>-1</sup> and the limit of quantification was 0.035 mg ml<sup>-1</sup>. In both off-line and on-line setting relative standard deviations were for peak areas less than 4 % and for migration time less than 1.5 %. The relative standard deviation for the enzyme reaction in the on-line setting was 0.76 % for the peak area and 0.54 % for the migration time.

## **Keywords**

Myrosinase, glucobrassicin, capillary electrophoresis, enzyme activity

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za ochotu, vstřícnost, cenné rady a odborné vedení, při vypracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině za veškerou podporu během studia.

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	8
1 Cíl práce .....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Glukosinoláty.....	10
2.1.1 Význam glukosinolátů.....	10
2.2 Myrosinasa.....	10
2.2.1 Stanovení aktivity myrosinasy .....	12
2.3 Kapilární elektroforéza .....	13
2.3.1 Enzymové reakce v kapilární elektroforéze .....	13
2.4 Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza .....	15
2.5 Metody založené na difúzi – TDLFP .....	16
2.6 Detekce u EMMA metody .....	17
2.7 Elektroinjekční analýza.....	17
3 Experimentální část.....	18
3.1 Použité chemikálie a instrumentace.....	18
3.1.1 Chemikálie.....	18
3.1.2 Instrumentace.....	18
3.2 Experimentální podmínky.....	18
3.3 Příprava roztoků.....	19
3.4 Off-line měření .....	19
3.5 On-line měření .....	20
4 Výsledky a diskuze.....	21
4.1 Optimalizace .....	21
4.1.1 Optimalizace složení základního elektrolytu.....	21
4.1.2 Optimalizace migračního času .....	22
4.1.3 Optimalizace promývání kapiláry .....	22
4.2 Kalibrační závislost.....	22
4.3 Enzymová reakce v off-line uspořádání .....	24
4.4 Enzymová reakce v on-line uspořádání .....	27
4.5 Opakovatelnost měření .....	29
4.5.1 Opakovatelnost dávkování glukobrassicinu .....	29
4.5.2 Opakovatelnost on-line enzymové reakce.....	30

5	Závěr.....	31
	Seznam literatury.....	32

## Seznam použitých zkratek a symbolů

GLS	glukosinoláty (glucosinolates)
ESP	protein, podílející se na tvorbě epithionitrilů (epithiospecifier protein)
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (micellar electrokinetic capillary chromatography)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
EMMA	elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (electrophoretically mediated microanalysis)
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADP <sup>+</sup>	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
TDLFP	metoda míchání reaktantů, založena na příčné difúzi (transverse diffusion of laminar flow profiles)
EIA	elektroinjekční analýza (electroinjection analysis)
CTAC	hexadecyltrimethylammonium chlorid
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromid
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
$c$	látková koncentrace
$R^2$	koeficient determinace
$A$	plocha píku
$t_m$	migrační čas
$t_r$	reakční čas
$A/t_m$	korigovaná plocha píku
$c_{rel}$	relativní koncentrace



## **1 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout metodu pro sledování enzymové aktivity myrosinasy s využitím kapilární elektroforézy. V první řadě bylo nutné optimalizovat složení základního elektrolytu a experimentální podmínky analýzy. V dalším kroku byla navržena metoda pro provedení enzymové reakce jak v off-line, tak i on-line uspořádání, a byla ověřena její použitelnost.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Glukosinoláty

Glukosinoláty (GLS) jsou sekundární produkty rostlin odvozené od aminokyselin, jejichž hlavní funkcí je ochrana rostliny proti škůdcům a patogenům. Jedná se o sirné glykosidy, které se vyskytují zejména u brukvovitých rostlin (*Brassicaceae*)<sup>1</sup>. Je identifikováno více než 100 různých GLS, které se liší svými substituenty v postranním řetězci<sup>2</sup>. Glukosinoláty jsou rozděleny do tří skupin (alifatické, aromatické a GLS s indolovou skupinou) na základě struktury různých prekurzorů aminokyselin<sup>1</sup>. Mezi tyto aminokyseliny patří alanin, leucin, isoleucin, valin, tyrosin, fenylalanin, tryptofan a methionin<sup>2</sup>. Glukosinoláty jsou enzymaticky hydrolyzovány za vzniku síranových iontů, D-glukosy a specifických produktů, jako jsou například isothiokyanáty<sup>1</sup>.

#### 2.1.1 Význam glukosinolátů

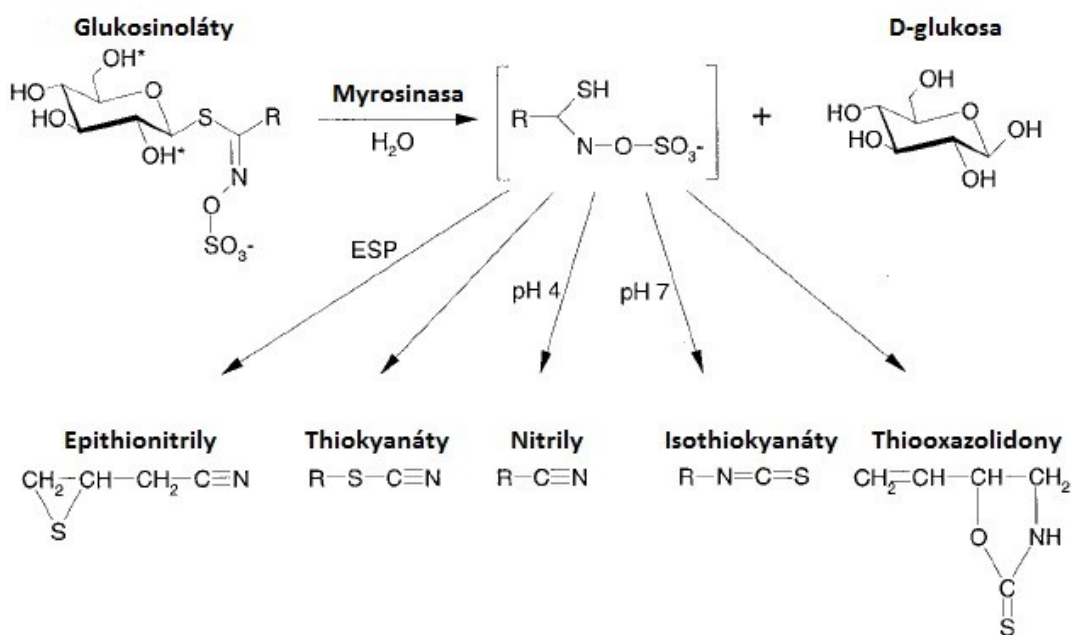
Glukosinoláty jsou předmětem zájmu hlavně díky jejich výskytu v zelenině. Charakteristická chuť zeleniny je způsobena právě isothiokyanáty, které vznikají z GLS jejich hydrolýzou. Pro svou hořkost jsou naopak známé GLS s indolovou skupinou. Glukosinoláty jsou také studovány díky jejich schopnosti působit proti rakovině. Sulforafan, isothiokyanát nacházející se v brokolici, působí proti růstu nádoru blokadou jeho buněčného cyklu a podporou apoptózy<sup>3</sup>.

### 2.2 Myrosinasa

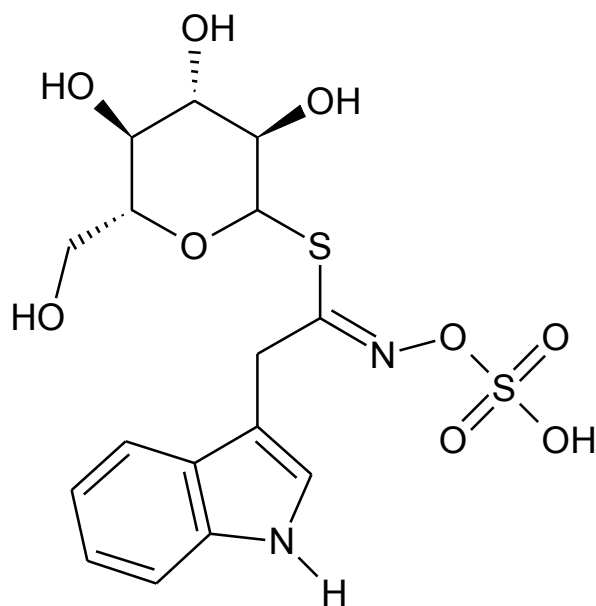
Hydrolýza glukosinolátů je katalyzována enzymem thioglukosidasou, který je znám také pod triviálním názvem myrosinasa (EC 3.2.3.1). Všechny rostliny obsahující glukosinoláty obsahují také enzym myrosinasu<sup>2</sup>. Myrosinasa a glukosinoláty se vyskytují v rostlinách odděleně. K hydrolýze GLS dochází tedy až při mechanickém poškození pletiva, při vzájemném kontaktu enzymu s GLS<sup>4</sup>. Aktivita myrosinasy závisí na druhu rostlin a rostlinném orgánu. Nejvyšší enzymová aktivita se obvykle nachází v semenech<sup>2</sup>. Optimální pH pro aktivitu myrosinasy je v rozmezí 6,5 – 7,0 v závislosti na původu enzymu<sup>5</sup>. Aktivita myrosinasy je ovlivňována kyselinou askorbovou, která je spolu s glukosinoláty přítomna ve vakuolách. Kyselina askorbová se specificky váže na myrosinasu, čímž způsobuje její konformační změnu, která vede ke zvýšené reakční rychlosti<sup>6,7</sup>.

V roce 1970 MacGibbon a Allison dokázali pomocí gelové elektroforézy existenci více forem myrosinasy. Jednotlivé izoenzymy myrosinasy se liší svými chemickými i fyzikálními vlastnostmi. Všechny izolované izoenzymy jsou glykoproteiny, jejichž molekulová hmotnost je 125 – 150 kDa<sup>7</sup>.

Rozklad GLS pomocí myrosinasy vede ke vzniku nestabilního meziprojektu, který může po uvolnění síranového aniontu vést ke vzniku isothiokyanátů, thiokyanátů, nitrilů a epithionitrilů<sup>7</sup> (Obr. 1). Jaký produkt vznikne, závisí na velkém množství faktorů, jako je pH, typ substrátu a teplota. Při neutrálním pH dochází ke vzniku isothiokyanátů, zatímco při kyselějším pH dochází ke vzniku nitrilů<sup>8</sup>. K hydrolyze GLS za vzniku thiokyanátů dochází pouze u tří glukosinolátů: allyl-, benzyl- a 4-(methylthio)butylglukosinolátu<sup>7</sup>. K tvorbě epithionitrilů degradací GLS dochází pouze u alkenylglukosinolátů za přítomnosti specifického proteinu ESP (epithiospecifní protein)<sup>7</sup>. Hydrolyza GLS s indolovou skupinou, mezi něž patří také glukobrassicin (3-indolylmethylglukosinolát) na obrázku 2, je odlišná od ostatních typů GLS. Vznikající isothiokyanáty jsou při neutrálním pH nestabilní a přeměňují se na stabilnější produkty, jako jsou například indol-3-karbinol nebo indol-3-acetonitril<sup>3,7</sup>. Produkty hydrolyzy GLS, zejména isothiokyanáty, jsou toxické. Jejich přítomnost u člověka může vést k inhibici zachytu jódu ve štítné žláze<sup>7</sup>. V současnosti se studie zabývají i jejich pozitivními dopady, zejména protinádorovými a antibakteriálními účinky<sup>8</sup>.



Obr. 1 Schéma konečných produktů degradace glukosinolátů<sup>2</sup>



Obr. 2 Schéma molekuly glukobrassicinu<sup>9</sup>

### 2.2.1 Stanovení aktivity myrosinasy

K měření enzymové aktivity můžeme využít dva postupy: u prvního z nich měříme pokles koncentrace substrátu za určitou dobu, zatímco u druhého měříme zvýšení koncentrace produktu<sup>10</sup>. Ke stanovení aktivity myrosinasy se využívá řada přístupů. Mezi nejčastější metody patří spektrofotometrie, při které se měří rychlost hydrolýzy GLS sledováním poklesu absorbance při určité vlnové délce<sup>11</sup>. Mezi další způsoby stanovení patří pH-stat metoda<sup>11</sup>, která je založená na titraci  $H^+$  iontů uvolněných během enzymové reakce. Sledování množství glukosy, uvolněné během hydrolýzy GLS, patří k dalším, často využívaným metodám<sup>11</sup>. Vzniklá glukosa je enzymaticky oxidována na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku, který je dalšími reakcemi převeden na barevný produkt, jenž může být fotometricky detekován<sup>11</sup>. K analýze enzymové aktivity jsou však nejlepší ty metody, které sledují pokles koncentrace substrátu a zároveň zvýšení koncentrace produktů. Mezi takové metody můžeme zařadit například micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii (MEKC), která byla v odborných studiích využita k provedení off-line enzymové analýzy a k detekci glukosinolátu (sinigrin) a produktu jeho hydrolýzy allylisothiokyanátu<sup>8</sup>. U MEKC metody dochází k rozdělení analytů mezi mobilní vodnou fází a micelární pseudostacionární fází. K tvorbě micelární pseudofáze se často využívá dodecylsírán sodný (SDS) popřípadě hexadecyltrimethylammonium bromid<sup>12</sup>.

## 2.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi analytické metody, které jsou založeny na separaci iontů na základě jejich různé elektroforetické pohyblivosti v prostředí roztoku základního elektrolytu (BGE). Separace iontů probíhá v křemenné kapiláře naplněné BGE, jejíž průměr je obvykle 50 – 100  $\mu\text{m}$  a délka 30 – 80 cm. Na začátku separace je vzorek nadávkován na konec kapiláry, následně jsou oba konce kapiláry ponořeny do roztoku základního elektrolytu. Vlivem elektrického pole jednotlivé složky vzorku migrují svými elektroforetickými rychlostmi k detektoru, kde jsou detekovány<sup>13</sup>. Pohyb kationtů a aniontů v kapiláře je ovlivněn elektroosmotickým tokem (EOF). Elektroosmotický tok vzniká v důsledku disociace silanolových skupin křemenné kapiláry, díky čemuž se uvolňují protony do roztoku. Záporný náboj stěny kapiláry přitahuje kationty z roztoku. Tyto kationty u povrchu po vložení napětí migrují směrem ke katodě a strhávají s sebou díky viskozitě celý roztok uvnitř kapiláry. Rychlost EOF je často větší než rychlosti elektroforetické migrace iontů, což způsobuje celkový pohyb kationtů ale i aniontů směrem ke katodě<sup>13</sup>.

Kapilární elektroforéza je metoda, která se hodí pro analýzu systému glukosinoláty - myrosinasa díky rychlému provedení separace a velmi nízké spotřebě reaktantů<sup>14</sup>.

### 2.3.1 Enzymové reakce v kapilární elektroforéze

Enzymy patří mezi biologické katalyzátory, jejichž funkcí je katalýza biochemických reakcí. K tomu, aby enzymy v organismu správně fungovaly, je nutná regulace jejich aktivity. Jakákoliv změna v aktivitě enzymů může způsobit zásadní problémy v organismu. Proto také studium enzymové aktivity dnes patří k velmi často zkoumaným problémům a je kladen důraz na objev nových enzymů, stejně tak jako je snaha o zlepšení stability a specificity již existujících enzymů<sup>12,15,16</sup>. Mechanismus účinku řady léků je rovněž založen na inhibici aktivity určitého enzymu. Hledání inhibitorů enzymů a testování jejich inhibičního efektu jsou proto významnými prvky při vývoji nových léků. Pro studium enzymových reakcí se používá absorpční, popřípadě fluorescenční spektrometrie. Nevýhodou těchto metod je to, že se mohou použít pouze, pokud se spektrometrické vlastnosti substrátu a enzymu liší, což často v praxi není splněno. Z toho důvodu bylo nutné ke studiu enzymových reakcí nalézt jinou vhodnější metodu<sup>12</sup>.

Kapilární elektroforéza se v současnosti stala velmi využívanou metodou pro studium enzymových reakcí a stanovení enzymové aktivity, díky vysoké účinnosti separace, malému rozměru kapilár, které se používají pro reakci a separaci a krátkému času analýzy<sup>17,18</sup>. Enzymová analýza se v kapilární elektroforéze může rozdělit do tří hlavních skupin. Pre-kapilární enzymová analýza (off-line metoda), poprvé představena v roce 1991, je metoda, při které je enzymová reakce provedena mimo separační kapiláru - ve zkumavce, či mikrozukmavce. Během off-line uspořádání dochází tedy ke smíchání substrátu a enzymu ve vhodné nádobce. Poté se ponechá reakční směs stát k proběhnutí reakce. Po uplynutí určité doby, potřebné k proběhnutí reakce, se směs nadávkuje do kapiláry, kde dochází k separaci substrátu a produktů enzymové reakce<sup>19</sup>. Hydrodynamické dávkování vzorku pomocí tlaku u této metody převládá. K urychlení analýzy se používá dávkování na krátký konec kapiláry. Separace tedy probíhá s obrácenou polaritou na úseku od konce kapiláry k detektoru<sup>20</sup>. Mezi výhody off-line uspořádání patří rovnoměrné složení reakční směsi v celém objemu nádoby a tedy platí, že reakční rychlost je všude stejná. Mezi nevýhody naopak můžeme zařadit vyšší spotřebu enzymu i substrátu při tvorbě reakční směsi<sup>15</sup>. Druhou metodou je on-line kapilární enzymová analýza, při níž jsou substrát i enzym samostatně vpraveny do kapiláry, kde dochází k promíchání a enzymové reakci. Tato metoda se obvykle označuje jako elektroforetický zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA)<sup>14</sup>. V současnosti se EMMA využívá pro stanovení aktivity enzymových reakcí, Michaelisových konstant a hledání inhibitorů. K jejím hlavním výhodám patří to, že celý proces od nadávkování reaktantů přes enzymovou reakci, separaci až po detekci probíhá v jedné kapiláře, čímž dochází ke snížení rizika vzniku chyb<sup>12,21</sup>.

Poslední skupinu představuje post-kapilární enzymová analýza poprvé představena v roce 1994 Emmerem a Roeraadem. Post-kapilární uspořádání lze například využít pro stanovení aktivity izoenzymů<sup>15</sup>. V tomto uspořádání se využívá systém pro kapilární elektroforézu, který je spojen s mikroreaktorem pro provedení enzymové reakce. Na začátku analýzy jsou jednotlivé enzymy separovány a následně dochází k měření jejich aktivity. Součástí systému jsou dva detektory. První detektor je UV detektor, který detekuje separaci enzymů, zatímco druhý detektor se nachází za mikroreaktorem k detekci produktů enzymové reakce. Emmer a Roeraad se ve své studii zabývali separací enzymů glukosy-6-fosfát dehydrogenasy a 6-fosfoglukonát dehydrogenasy a následnou reakcí glukosy-6-fosfát dehydrogenasy s glukosou-6-fosfátem za vzniku NADPH<sup>22</sup>. Tato metoda

však nenalezla širší uplatnění díky nekompatibilitě komerčních CE přístrojů s postkapilárním reaktorem<sup>20</sup>.

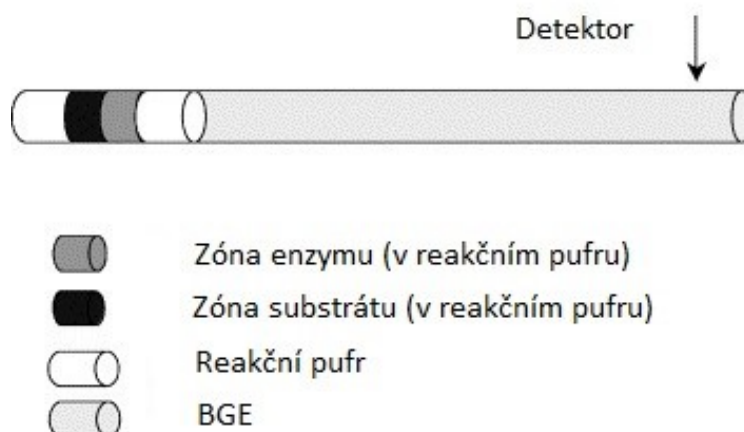
Studium enzymových reakcí pomocí kapilární elektroforézy můžeme dále rozdělit na základě způsobu reakce na heterogenní a homogenní uspořádání. Během heterogenního uspořádání je jeden z reaktantů, nejčastěji enzym, imobilizován na nosiči, popřípadě stěně kapiláry. K reakci tedy dochází mezi imobilizovaným enzymem a substrátem nacházejícím se v BGE. Během homogenního uspořádání je substrát i enzym ve formě roztoku. K homogennímu uspořádání patří výše zmíněné off-line i on-line metody<sup>15,20</sup>.

## 2.4 Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza

První studii, která se zabývala on-line uspořádáním, publikovali Bao a Regnier v roce 1992. V této studii byla stanovována aktivita enzymu glukosa-6-fosfát dehydrogenasy. Tento enzym katalyzuje oxidaci glukosy-6-fosfát na 6-fosfoglukonát, při které dochází k přeměně oxidované formy  $\text{NADP}^+$  na NADPH. O rok později byla tato metoda pojmenována jako elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA)<sup>21,23</sup>. Při provedení enzymových reakcí hraje důležitou roli smíchání reaktantů, doba reakce směsi a detekce produktů. EMMA spojuje tyto operace v jednu univerzální metodu<sup>21</sup>.

U EMMA se k promíchání reaktantů využívají dva módy. První mód je tzv. zonální mód (plug-plug mode), který k promíchání reaktantů využívá jejich různé elektroforetické pohyblivosti. V tomto módu jsou substrát i enzym dávkovány do kapiláry naplněné BGE jako samostatné zóny. Po aplikaci napětí dochází k tomu, že se jednotlivé zóny promísí díky různým elektroforetickým pohyblivostem reaktantů. Jakmile jsou zóny substrátu a enzymu promíchány, dochází k vypnutí napětí a proběhnutí enzymové reakce. Opětovnou aplikací napětí se enzymová reakce ukončí a nezreagovaný substrát, enzym a produkt enzymové reakce jsou separovány. K použití tohoto módu je ovšem nutné znát elektroforetické pohyblivosti substrátu i enzymu, k výpočtu času a napětí, které potřebujeme k promíchání zón<sup>14,15,21</sup>.

K proběhnutí enzymové reakce je důležité udržovat optimální podmínky. U EMMA metody často dochází k inhibici enzymové reakce základním elektrolytem. K tomuto jevu dochází zejména tehdy, pokud základní elektrolyt obsahuje povrchově aktivní látku, jako je například SDS. Z toho důvodu je nutné oddělit zónu BGE od zóny enzymu a substrátu. Tento problém byl vyřešen technikou částečného plnění kapiláry (Obr. 3). Zóny enzymu a substrátu jsou od BGE odděleny zónami reakčního pufru, které poskytují, na rozdíl od BGE, vhodné prostředí pro proběhnutí enzymové reakce<sup>12,21</sup>.



Obr. 3 Schéma částečného plnění kapiláry<sup>21</sup>

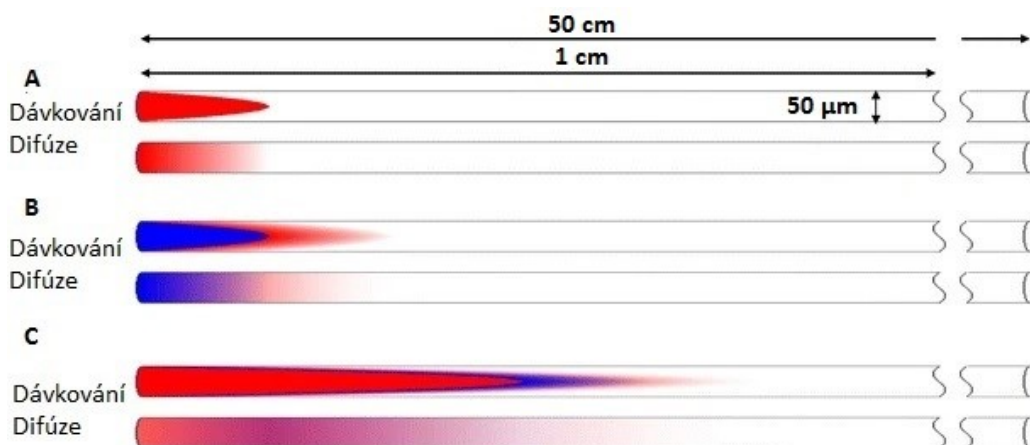
Druhý mód, který se používá k promíchání enzymu a substrátu v kapiláře, je tzv. kontinuální mód (long contact mode). V tomto módu je kapilára na začátku naplněna jedním z reaktantů (nejčastěji substrátem). Po nadávkování enzymu dochází k elektroforetickému promíchání enzymu a substrátu a vzniku produktu<sup>15,21</sup>.

## 2.5 Metody založené na difúzi – TDLFP

K dalším způsobům promíchání reaktantů patří metody založené na podélné, nebo příčné difúzi. U první zmíněné metody jsou do kapiláry dávkovány zóny substrátu a enzymu, které do sebe vzájemně difundují, čímž dochází k proběhnutí enzymové reakce. Poté se aplikuje separační napětí k oddělení reaktantů a produktů reakce. K nevýhodám této metody patří, že nadávkované zóny reaktantů v kapiláře mohou mít délku i několik mm. Na takto dlouhé dráze může podélná difúze trvat i několik hodin<sup>15,24</sup>.

Metoda založená na příčné difúzi se označuje jako TDLFP (transverse diffusion of laminar flow profiles). Zóny reaktantů jsou hydrodynamicky nadávkovány do kapiláry, díky čemuž získají charakteristický parabolický tvar (Obr. 4). K získání požadovaného parabolického profilu je nutné, aby tlak dávkování byl dostatečně vysoký a doba dávkování dostatečně krátká. Z důvodu velmi malého průměru kapiláry (50  $\mu\text{m}$ ) je rychlost podélné difúze zanedbatelná vůči rychlosti příčné difúze. Díky příčné difúzi nadávkovaných reaktantů směrem ke stěnám kapiláry dochází k promísení reaktantů a získání homogenní koncentrace reaktantů v tomto směru<sup>15,24,25</sup>. Metoda TDLFP se dobře osvědčila při mísení tří a více reaktantů v kapiláře a při mísení reaktantů se stejnými elektroforetickými pohyblivostmi<sup>24,25</sup>.





Obr. 4 Schéma metody TDLFP<sup>26</sup>

## 2.6 Detekce u EMMA metody

Využití detektorů u EMMA metody se liší v závislosti na citlivosti detekce, kterou potřebujeme dosáhnout. Mezi často využívané detektory patří spektrofotometrický UV-VIS detektor. Limit detekce UV-VIS detektoru při použití nl objemu vzorku je  $10^{-16}$  mol. Velmi citlivá je také laserem indukovaná fluorescence, jejíž limit detekce je  $10^{-21}$  mol. K dalším využívaným detekčním technikám patří například chemiluminiscence. Z důvodu vyšší finanční náročnosti chemiluminiscence a laserem indukované fluorescence patří UV-VIS detektor k nejčastěji používaným detektorům EMMA metody<sup>21</sup>.

## 2.7 Elektroinjekční analýza

Elektroinjekční analýza (EIA) představuje alternativní metodu k metodě EMMA. U obou metod dochází k smísení substrátu i enzymu v kapiláře vlivem separačního napětí, díky různým elektroforetickým pohyblivostem reaktantů. Elektroinjekční analýza se však liší dávkováním reaktantů, které probíhá elektrokineticky z opačných konců kapiláry. Metoda EMMA potřebuje pro smísení reaktantů určitou minimální délku kapiláry, která může být u EIA daleko kratší, což patří k hlavním výhodám EIA. K dalším výhodám patří menší riziko znečištění substrátu a enzymu, díky dávkování z opačných konců kapiláry<sup>21,27</sup>.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie a instrumentace

#### 3.1.1 Chemikálie

- Thioglukosidasa ze semene *Sinapis alba*  $\geq 100$  jednotek/g (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Glukobrassicin sodná sůl 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hexadecyltrimethylammonium chlorid 25% ve vodě (CTAC), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina O-fosforečná 85% p. a. (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Tetraboritan disodný dekahydrát p. a. (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Hydroxid sodný p. a. (Penta, Praha, Česká republika)

#### 3.1.2 Instrumentace

- Analytické váhy Nimbus, NBL 254i (BioIng, Ivančice, Česká republika)
- Křemenná kapilára, pokrytá vrstvou polyimidu o délce 50,0 cm, efektivní délka 41,5 cm s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)
- Kapilární elektroforéza CE<sup>3D</sup> (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- pH metr 3540 pH & Conductivity Meter (Jenway, Staffordshire, UK)
- Systém na přípravu deionizované vody Milli-Q (Millipore, Bedford, USA)

### 3.2 Experimentální podmínky

Na začátku každého dne měření byla kapilára promyta 5 minut 1 M roztokem hydroxidu sodného a 5 minut deionizovanou vodou. Před každým měřením byla kapilára promyta 3 minuty 1 M roztokem hydroxidu sodného do odpadní vialky, 1 minutu základním elektrolytem do odpadní vialky a 1 minutu základním elektrolytem do vialky se základním elektrolytem. Vialky se základním elektrolytem byly po každém

pátém měření vyměněny, aby se předešlo ovlivnění výsledků elektrolýzou základního elektrolytu. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky, tlakem 5 kPa po dobu 3 s. Na kapiláru bylo vkládáno napětí o velikosti -20 kV, proud byl přibližně -30  $\mu\text{A}$  a roztok v kapiláře byl zároveň mobilizován tlakem 5 kPa aplikovaným na vstupním konci kapiláry. Kazeta s kapilárou byla termostatována na teplotu 25 °C a elektroferogram byl zaznamenáván při vlnové délce 225 nm.

### 3.3 Příprava roztoků

Složení základního elektrolytu bylo převzato ze studie, v níž se autoři zabývali separací glukosinolátů pomocí MEKC<sup>28</sup>, a upraveno pro potřeby této práce. Základní elektrolyt byl připraven smísením odpovídajícího množství tetraboritanu sodného, CTAC a kyseliny fosforečné v deionizované vodě tak, aby výsledný zásobní roztok BGE obsahoval 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselinu fosforečnou a 20 mM CTAC (pH = 7,02, upraveno 10 M hydroxidem sodným). Tento zásobní roztok BGE byl před měřením zředěn 1:1 (v/v) deionizovanou vodou.

Jako reakční pufr byl použit fosfátový pufr, který byl připraven smísením dihydrogenfosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě v takovém množství, aby koncentrace výsledného fosfátového pufru byla 10 mmol l<sup>-1</sup> (pH fosfátového pufru = 7,04, upraveno 10 M hydroxidem sodným).

Roztok enzymu byl připraven smísením enzymu s fosfátovým pufrem tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 mg ml<sup>-1</sup>.

### 3.4 Off-line měření

Při měření enzymové reakce v off-line uspořádání byl do vialky napipetován roztok glukobrassicinu, fosfátový pufr a roztok enzymu. Reakční směs byla poté ponechána k proběhnutí enzymové reakce. Po uplynutí určité doby byl vzorek z vialky hydrodynamicky nadávkován (5 kPa, 3 s) do kapiláry a mobilizován tlakem 5 kPa. Na kapiláru bylo zároveň vloženo napětí o velikosti -20 kV. Před každou analýzou byla kapilára promyta tak, jak je uvedeno v kapitole 3.2.

### 3.5 On-line měření

Na začátku on-line měření bylo do kapiláry hydrodynamicky dávkováno (5 kPa, 3 s) 5 zón. První byla zóna fosfátového pufru, za kterou následovala zóna roztoku enzymu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , glukobrassicinu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , enzymu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  a nakonec byla dávkována opět zóna fosfátového pufru. Po každém nadávkování glukobrassicinu, nebo enzymu byl vstupní konec kapiláry ponořen do vialky s vodou (byla připravena jedna vialka s vodou pro substrát a druhá pro enzym), aby se zabránilo znečištění vzorků. Před spuštěním separace byla nastavena čekací doba, která umožňovala proběhnutí enzymové reakce v kapiláře. V případě měření pouze glukobrassicinu bez enzymu, byly zóny enzymu nahrazeny zónami fosfátového pufru.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Optimalizace

#### 4.1.1 Optimalizace složení základního elektrolytu

Jak již bylo zmíněno dříve, složení BGE bylo převzato ze studie Michaelseena a spol.<sup>28</sup>. V této studii základní elektrolyt obsahoval 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselinu fosforečnou a 50 mM CTAB, pH bylo upraveno na 7,0. CTAB bylo použito kvůli interakci kladně nabitých micel CTAB se záporně nabitými glukosinoláty, která zvyšovala jejich rozlišení<sup>28</sup>. V mém případě bylo místo CTAB použito CTAC a jeho koncentrace byla snížena, neboť jsem se nezabývala separací jednotlivých glukosinolátů. Použitím základního elektrolytu, který obsahuje kationtovou povrchově aktivní látku jako například CTAC, dochází k obrácení EOF. Roztok v kapiláře je v důsledku obráceného EOF unášen směrem k anodě. Záporně nabitě glukosinoláty tedy migrují směrem od detektoru k vstupnímu konci kapiláry. Použitím obrácené polarity napětí dochází k migraci glukosinolátů směrem k detektoru. Proti směru migrace GLS však migrují kladně nabitě micely CTAC, které interakcemi výslednou migraci GLS zpomalují. Jako BGE byl nejdříve použit roztok obsahující 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselinu fosforečnou a 40 mM CTAC, pH = 7,0. Při použití BGE o tomto složení však během analýzy docházelo k náhlému poklesu proudu, což neumožňovalo dokončení analýzy. Nestabilní podmínky, jako je pokles proudu při analýze, mohou být způsobeny zlomenou, popřípadě neprůchodnou kapilárou nebo vytvořením bublinky plynu v kapiláře. K nestabilitě systému může přispívat například sorpce enzymu na stěnu kapiláry. Z toho důvodu bylo vyzkoušeno promytí kapiláry před každou analýzou 1 M kyselinou chlorovodíkovou. Toto promytí však nevyřešilo nestabilitu proudu. Byl tedy připraven nový zásobní roztok BGE, jež obsahoval 18 mM tetraboritan sodný, 30 mM kyselinu fosforečnou a 20 mM CTAC, čímž se snížila vodivost a tím i hodnota proudu. Při vysokých hodnotách procházejícího proudu se vyvíjí více tepla a může docházet k přehřívání roztoku v kapiláře. To může vést ke vzniku plynových bublin nebo při práci s proteiny a enzymy, k jejich denaturaci. Ve vialce byl tento BGE před každým měřením ještě zředěn 1:1 deionizovanou vodou. Při použití tohoto BGE došlo ke snížení hodnoty proudu a jeho stabilizaci po celou dobu analýzy. Jeho hodnota se pohybovala kolem -30  $\mu\text{A}$ . Původní hodnota proudu byla přibližně -50  $\mu\text{A}$ .

#### 4.1.2 Optimalizace migračního času

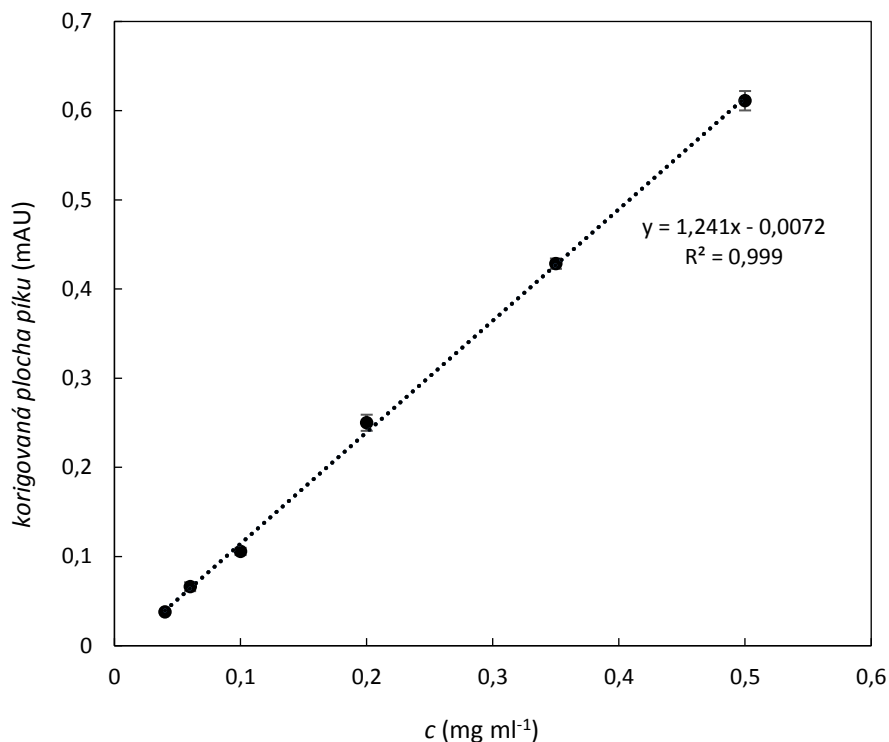
Při hydrodynamickém dávkování roztoku glukobrassicinu (5 kPa, 3 s) jak v off-line, tak i on-line uspořádání, se migrační čas glukobrassicinu pohyboval okolo 8 minut. Při hydrodynamickém dávkování roztoku glukobrassicinu spolu s roztokem enzymu (5 kPa, 3 s) docházelo k dalšímu prodlužování migračního času glukobrassicinu. Spolu s dlouhým promýváním kapiláry před každým měřením byla doba analýzy velmi dlouhá a bylo nutné najít metodu, při které dojde ke zkrácení migračního času glukobrassicinu. Tento problém byl vyřešen mobilizací roztoku v kapiláře tlakem 5 kPa zároveň s aplikací napětí. Použitím tlaku se migrační čas glukobrassicinu zkrátil z 8 na 4 minuty, tedy přibližně na polovinu. Došlo také k další stabilizaci a zvýšení spolehlivosti elektroforetického systému.

#### 4.1.3 Optimalizace promývání kapiláry

Na počátku byla kapilára promývána před každým měřením 1 minutu BGE do vialky s odpadem a 1 minutu BGE do vialky s BGE. Při použití tohoto promývání však docházelo k velkým výkyvům migračního času glukobrassicinu. Dále bylo vyzkoušeno promývání 5 minut 1 M kyselinou chlorovodíkovou a 5 minut deionizovanou vodou, popřípadě 2 minuty 1 M hydroxidem sodným a 1 minutu deionizovanou vodou. Nejvhodnější variantou se ukázalo být promývání 3 minuty 1 M hydroxidem sodným, 1 minutu BGE do odpadní vialky a 1 minutu BGE do vialky s BGE.

### 4.2 Kalibrační závislost

Kalibrační závislost byla získána změřením standardních vzorků glukobrassicinu o koncentracích 0,04; 0,06; 0,1; 0,2; 0,35 a 0,5 mg ml<sup>-1</sup>, které byly získány naředěním zásobního roztoku fosfátovým pufrem. Závislost byla změřena v off-line uspořádání. Měření pro každou koncentraci bylo provedeno třikrát. Do grafu byla plocha píku vynesena jako medián korigované plochy píku (plocha píku dělená migračním časem), Obr. 5. Získané parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce 1.



Obr. 5 Kalibrační závislost korigované plochy píku na koncentraci glukobrassicinu. Hydrodynamické dávkování (5 kPa, 3 s), roztok mobilizován tlakem 5 kPa, separační napětí -20 kV (proud přibližně -30  $\mu$ A), BGE 9 mM tetraboritan sodný, 15 mM kyselina fosforečná a 10 mM CTAC, pH = 7,02, UV detekce 225 nm.

Tab. 1 Parametry kalibrační závislosti

$k$	$b$	$R^2$	LOD	LOQ
[mAU ml mg <sup>-1</sup> ]	[mAU]		[mg ml <sup>-1</sup> ]	[mg ml <sup>-1</sup> ]
1,241	-0,0072	0,999	0,011	0,035

Hodnota koeficientu determinace kalibrační závislosti  $R^2$  byla 0,999, z čehož vyplývá, že 99,9 % variability hodnot proměnné  $y$  bylo vysvětleno touto závislostí.

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány pomocí následujících rovnic:

$$LOD = \frac{3 s_{y,x}}{k} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 s_{y,x}}{k} \quad (2)$$

kde  $k$  je směrnice kalibrační závislosti,  $s_{y,x}$  směrodatná odchylka rozptylu bodů kolem regresní přímky, která byla vypočítána pomocí funkce STEYX programu MS Excel.

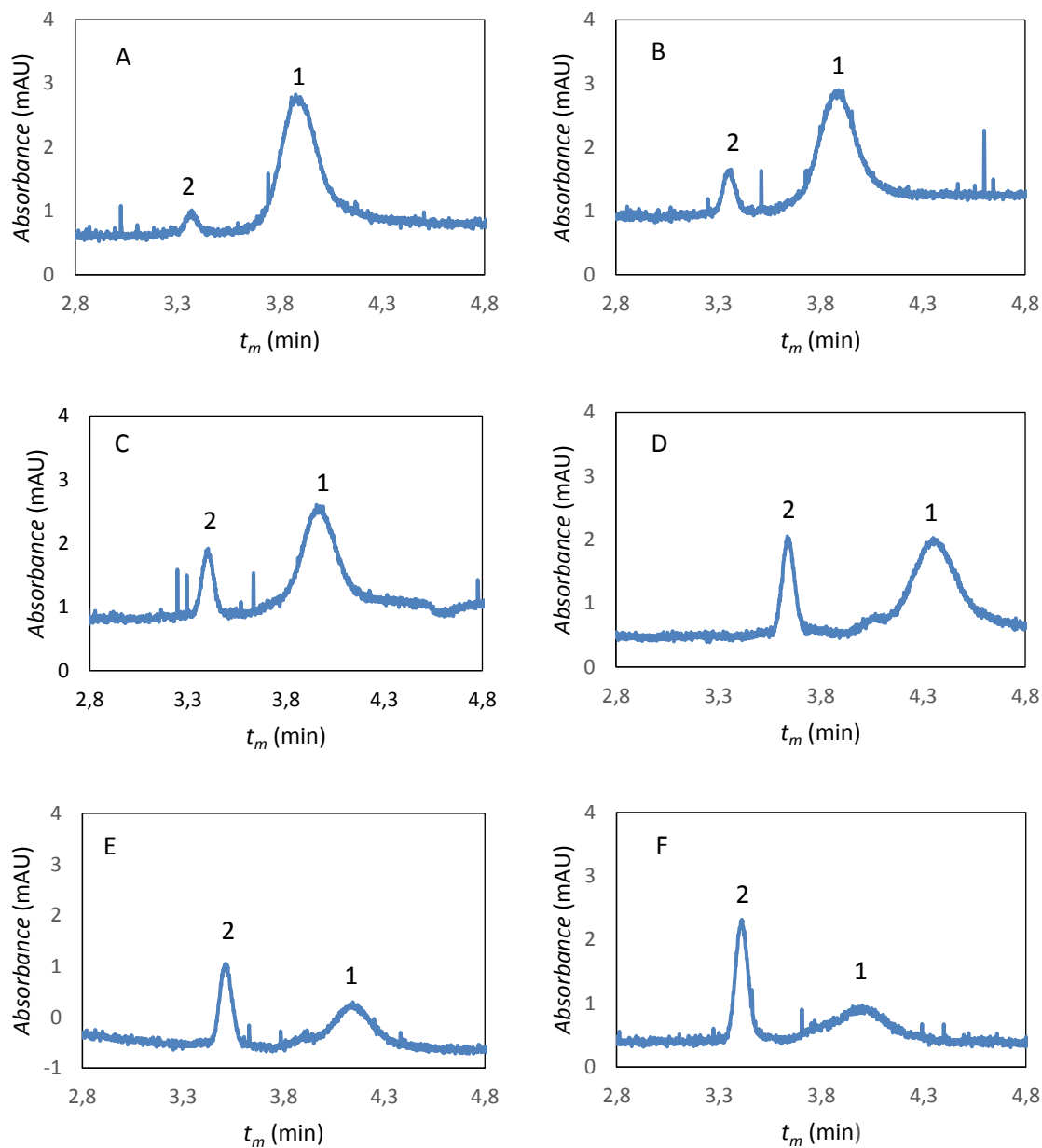
Vypočítaná mez detekce byla  $0,011 \text{ mg ml}^{-1}$  glukobrassicinu v roztoku a mez stanovitelnosti  $0,035 \text{ mg ml}^{-1}$  glukobrassicinu v roztoku. Lineární dynamický rozsah metody byl  $0,035 \text{ mg ml}^{-1} - 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ .

### 4.3 Enzymová reakce v off-line uspořádání

Enzymová reakce v off-line uspořádání byla provedena mimo separační kapiláru ve vialce. Do vialky byl napipetován roztok glukobrassicinu, enzymu a reakční fosfátový pufr o koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\text{pH} = 7,04$ ) o celkovém objemu roztoku ve vialce  $100 \mu\text{l}$ . Koncentrace glukobrassicinu a enzymu ve vialce byla  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Koncentrace enzymu i substrátu byly zvoleny tak, aby bylo možné pozorovat postupné zmenšování píku glukobrassicinu. Enzymová reakce byla ukončena vložení separačního napětí, avšak pouze v nanolitrovém objemu reakční směsi, který byl nadávkován do kapiláry. Ve vialce enzymová reakce nadále probíhala, což umožnilo využít tuto reakční směs pro další sledování průběhu enzymové reakce.

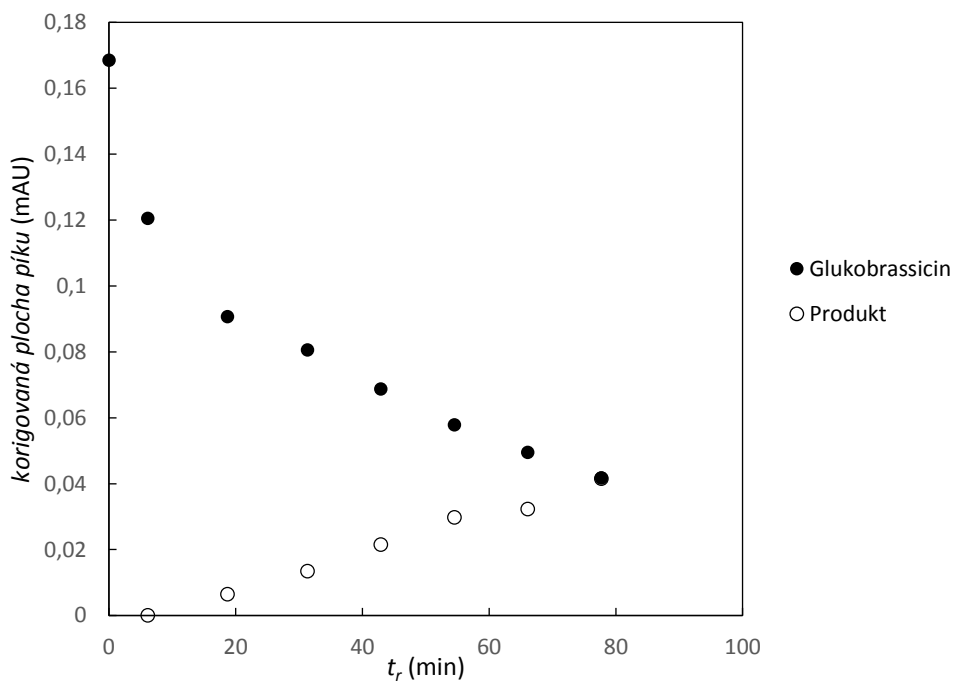
Při porovnání elektroferogramů, získaných z off-line enzymové reakce na obrázku 6, lze pozorovat zmenšování plochy píku glukobrassicinu (1) s časem enzymové reakce a zároveň zvětšování plochy píku neznámého produktu (2) s časem enzymové reakce. Tento produkt vykazuje silnou UV absorbanci a lze tedy očekávat, že obsahuje indolovou skupinu glukobrassicinu. Migrační čas tohoto produktu je kratší než migrační čas glukobrassicinu, z čehož vyplývá, že je záporně nabitý a má menší velikost nebo slaběji interaguje s micelami. Mohlo by se tedy jednat o nestabilní meziprodukt degradace glukobrassicinu, vzniklý odštěpením glukosy. Dále je z elektroferogramů na obrázku 6 (A – F) patrné, že dochází k mírnému posunu migračního času jak glukobrassicinu, tak i produktu enzymové reakce.





Obr. 6 Elektroferogramy enzymové reakce v off-line uspořádání. Hydrodynamické dávkování (5 kPa, 3 s), roztok mobilizován tlakem 5 kPa, separační napětí -20 kV (proud přibližně -30  $\mu$ A), BGE 9 mM tetraboritan sodný, 15 mM kyselina fosforečná a 10 mM CTAC, pH = 7,02, UV detekce 225 nm; čas reakce (A) 18,7 min, (B) 31,3 min, (C) 42,9 min, (D) 54,5 min, (E) 66,1 min, (F) 77,7 min.

Na obrázku 7 lze vidět zmenšování plochy píku glukobrassicinu a zároveň nárůst plochy píku produktu s rostoucím časem enzymové reakce. Dále je z obrázku 7 patrné, že na začátku reakce klesá plocha píku glukobrassicinu strměji a s rostoucím časem enzymové reakce dochází naopak k pozvolnějšímu poklesu.



Obr. 7 Graf závislosti korigované plochy píku glukobrassicinu a produktu na čase enzymové reakce pro off-line uspořádání. Koncentrace enzymu a substrátu  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Hydrodynamické dávkování ( $5 \text{ kPa}$ ,  $3 \text{ s}$ ), roztok mobilizován tlakem  $5 \text{ kPa}$ , separační napětí  $-20 \text{ kV}$  (proud přibližně  $-30 \text{ }\mu\text{A}$ ), BGE  $9 \text{ mM}$  tetraboritan sodný,  $15 \text{ mM}$  kyselina fosforečná a  $10 \text{ mM}$  CTAC,  $\text{pH} = 7,02$ , UV detekce  $225 \text{ nm}$ .

Pomocí korigovaných ploch píku glukobrassicinu, jenž byly získány z elektroferogramů při off-line enzymové analýze, byla vypočítána relativní koncentrace glukobrassicinu pro daný reakční čas (Tab. 2).

*Tab. 2 Vypočítaná relativní koncentrace glukobrassicinu z korigovaných ploch píku, získaných během off-line enzymové reakce.*

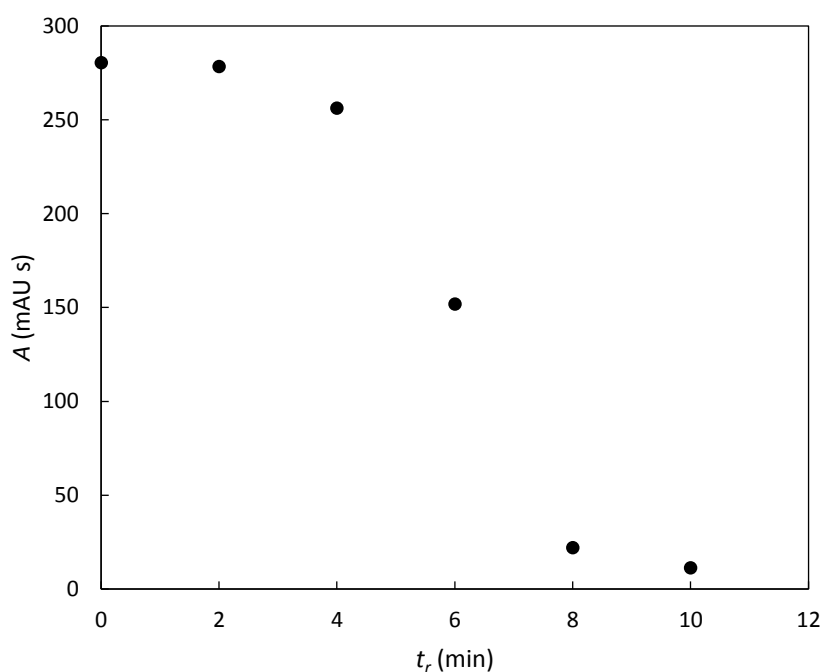
Reakční čas	Korigovaná plocha píku	Relativní koncentrace
$t_r$ [min]	$A/t_m$ [mAU]	$c_{rel}$ [%]
0	0,168	100,0
6,1	0,120	71,4
18,7	0,091	54,2
31,3	0,081	48,2
42,9	0,069	41,1
54,5	0,058	34,5
66,1	0,049	29,2
77,7	0,042	25,0

#### 4.4 Enzymová reakce v on-line uspořádání

V prvním kroku tohoto experimentu bylo nutné optimalizovat počet a pořadí zón, jež se dávkovaly do kapiláry. Jak již bylo uvedeno výše, enzymová reakce může být inhibována základním elektrolytem, který obsahuje povrchově aktivní látku, jako je například CTAC. K průkazu inhibice enzymové reakce základním elektrolytem bylo tudíž do vialky napipetováno 5  $\mu$ l roztoku glukobrassicinu, 50  $\mu$ l roztoku enzymu, 22  $\mu$ l fosfátového pufru a 23  $\mu$ l základního elektrolytu. Koncentrace glukobrassicinu ve vialce byla 0,05 mg ml<sup>-1</sup> a koncentrace enzymu 0,5 mg ml<sup>-1</sup>. Po provedení off-line analýzy bylo pozorováno, že s rostoucím časem enzymové reakce nedochází ke změně velikosti plochy píku glukobrassicinu, čímž byla prokázána inhibice enzymové reakce základním elektrolytem. Při srovnávacím experimentu bylo ověřeno, že za těchto podmínek bez přídavku základního elektrolytu reakce probíhá. Z tohoto důvodu bylo nutné při on-line analýze oddělit zóny enzymu a substrátu od zón BGE. Metoda TDLFP předpokládá nejvyšší účinnost ve smísení reaktantů v případě, pokud jsou do kapiláry nadávkovány zóny v pořadí enzym – substrát – enzym. Do kapiláry bylo tedy hydrodynamicky dávkováno 5 zón. První dávkována zóna byla zóna fosfátového pufru o koncentraci

10 mmol l<sup>-1</sup> a pH 7,04 k oddělení zóny BGE od reakční směsi. Jako další následovala zóna roztoku enzymu o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup>, substrátu o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup>, enzymu o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup>, vše v prostředí fosfátového pufru, pH 7,04, a jako poslední opět zóna fosfátového pufru. Poté byla nastavena čekací doba, během které došlo k difúzi mezi zónami enzymu a substrátu a tím i k proběhnutí reakce.

Na obrázku 8 je patrný pomalý začátek enzymové reakce, kdy s rostoucím reakčním časem, nedochází k výraznému poklesu plochy píku glukobrassicinu. To může být způsobeno například délkou zón reakční směsi v kapiláře. K strmějšímu poklesu plochy píku dochází až tehdy, pokud se reakční směs před aplikací separačního napětí ponechala v kapiláře déle než 2 minuty.



Obr. 8 Graf závislosti plochy píku glukobrassicinu na čase enzymové reakce pro on-line uspořádání. Koncentrace substrátu a enzymu 1 mg ml<sup>-1</sup>. Zóny dávkovány v pořadí fosfátový pufr, enzym, substrát, enzym a fosfátový pufr. Hydrodynamické dávkování (5 kPa, 3 s), roztok mobilizován tlakem 5 kPa, separační napětí -20 kV (proud přibližně -30  $\mu$ A), BGE 9 mM tetraboritan sodný, 15 mM kyselina fosforečná a 10 mM CTAC, pH = 7,02.

## 4.5 Opakovatelnost měření

### 4.5.1 Opakovatelnost dávkování glukobrassicinu

Opakovatelnost měření pro plochu píku a migrační čas byla vyhodnocena pro dávkování glukobrassicinu jak v off-line, tak i on-line uspořádání ze sedmi opakování měření téhož vzorku. V off-line uspořádání byla použita koncentrace glukobrassicinu  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . V on-line uspořádání bylo do kapiláry dávkováno 5 zón (zóny enzymu byly nahrazeny zónami fosfátového pufru). První dvě zóny byly zóny fosfátového pufru o koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  a pH 7,04, následovala zóna glukobrassicinu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  a nakonec opět dvě zóny fosfátového pufru. Pro měření opakovatelnosti byl použit základní elektrolyt o složení  $10 \text{ mM CTAC}$ ,  $15 \text{ mM}$  kyselina fosforečná a  $9 \text{ mM}$  tetraboritan sodný, pH 7,02. Z tabulky 3 je patrné, že relativní směrodatné odchylky (RSD) plochy píku byly v obou případech menší než 4 %, RSD migračního času pak menší než 1,5 %, což ukazuje na dobrou opakovatelnost měření. Z tabulky 3 je rovněž patrné, že plocha píku glukobrassicinu pro on-line uspořádání je přibližně desetkrát větší než pro off-line uspořádání. To odpovídá tomu, že během on-line uspořádání byla použita desetkrát větší koncentrace glukobrassicinu. Dále je zřejmé, že hodnoty relativní směrodatné odchylky plochy píku i migračního času jsou výrazně menší pro on-line uspořádání. To souvisí pravděpodobně s celkově větší velikostí píků, u kterých je přesnější integrace a tedy i určení plochy a polohy vrcholu píku.

Tab. 3 Naměřená opakovatelnost plochy píku a migračního času glukobrassicinu pro off-line i on-line uspořádání. Počet měření  $n = 7$ .

	Off-line	On-line	Off-line	On-line
	$A$ [mAU s]	$A$ [mAU s]	$t_m$ [min]	$t_m$ [min]
1	24,0	253,7	3,629	3,593
2	23,0	253,3	3,669	3,571
3	24,2	269,3	3,785	3,600
4	23,2	262,5	3,727	3,531
5	23,7	259,9	3,682	3,514
6	21,4	260,5	3,666	3,525
7	24,1	259,6	3,706	3,538
Medián	23,7	259,9	3,682	3,538
SD	0,91	5,04	0,047	0,032
<b>RSD [%]</b>	<b>3,83</b>	<b>1,94</b>	<b>1,27</b>	<b>0,90</b>

#### 4.5.2 Opakovatelnost on-line enzymové reakce

Pro změření opakovatelnosti on-line enzymové reakce bylo do kapiláry dávkováno hydrodynamicky (5 kPa, 3 s) 5 zón tak, jak je uvedeno v kapitole 3.5. Koncentrace dávkovaného fosfátového pufru o pH 7,04 byla 10 mmol l<sup>-1</sup>, koncentrace glukobrassicinu 1 mg ml<sup>-1</sup> a koncentrace enzymu 1 mg ml<sup>-1</sup>. Čas enzymové reakce glukobrassicinu s myrosinaseou byl nastaven na 6 minut. RSD pro plochu píku glukobrassicinu byla 0,76 % a pro migrační čas 0,54 % (Tab. 4). Z těchto hodnot je zřejmé, že vyvinutá metoda má velmi dobrou opakovatelnost i při zahrnutí enzymové reakce.

Tab. 4 Naměřená opakovatelnost plochy píku a migračního času glukobrassicinu po proběhnutí enzymové reakce. Počet měření  $n = 5$ .

	On-line	
	$A$ [mAU s]	$t_m$ [min]
1	241,0	3,420
2	243,0	3,424
3	237,8	3,449
4	241,1	3,465
5	238,9	3,462
Medián	241	3,449
SD	1,82	0,019
<b>RSD [%]</b>	<b>0,76</b>	<b>0,54</b>

## 5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla vyvinuta a optimalizována metoda k uskutečnění enzymové reakce glukobrassicinu s myrosinase pomocí off-line i on-line uspořádání kapilární elektroforézy. Během experimentů bylo vyzkoušeno různé složení základního elektrolytu. Jako základní elektrolyt byl nakonec zvolen 9 mM tetraboritan sodný, 15 mM kyselina fosforečná a 10 mM CTAC, pH 7,02. Jak pro off-line, tak i pro on-line uspořádání se ukázalo jako optimální hydrodynamické dávkování tlakem 5 kPa po dobu 3 s. Dále byl zkrácen migrační čas glukobrassicinu, a tím i celková doba analýzy mobilizací roztoku v kapiláře tlakem 5 kPa. Optimalizovaná metoda má dobu separace pouze 5 minut.

Díky off-line uspořádání byla zjištěna inhibice enzymové reakce základním elektrolytem, a zóny reakční směsi během on-line analýzy byly proto od zón základního elektrolytu odděleny zónami fosfátového pufru.

Nakonec byla změřena opakovatelnost jak pro dávkování a detekci glukobrassicinu v off-line i on-line uspořádání, tak pro enzymovou reakci v on-line uspořádání. Ze získaných relativních směrodatných odchylek plochy píku a migračních časů při dávkování glukobrassicinu bylo zjištěno, že lepší opakovatelnost vykazuje dávkování glukobrassicinu v on-line uspořádání. V obou případech však byly relativní směrodatné odchylky plochy píku menší než 4 %, v případě migračního času menší než 1,5 %. Relativní směrodatná odchylka během enzymové reakce v on-line uspořádání byla pro plochu píku 0,76 % a pro migrační čas 0,54 %. Hodnoty těchto RSD naznačují velmi dobrou opakovatelnost pro enzymové reakce v on-line uspořádání.

## Seznam literatury

- (1) Ishida, M.; Hara, M.; Fukino, N.; Kakizaki, T.; Morimitsu, Y. Glucosinolate Metabolism, Functionality and Breeding for the Improvement of Brassicaceae Vegetables. *Breed. Sci.* **2014**, *64* (1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>.
- (2) Rask, L.; Andréasson, E.; Ekbom, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B.; Meijer, J. Myrosinase: Gene Family Evolution and Herbivore Defence in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* **2000**, *42* (1), 93–114. <https://doi.org/10.1023/A:1006380021658>.
- (3) Halkier, B. A.; Gershenzon, J. BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF GLUCOSINOLATES. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57* (1), 303–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>.
- (4) Winde, I.; Wittstock, U. Insect Herbivore Counteradaptations to the Plant Glucosinolate–Myrosinase System. *Phytochemistry* **2011**, *72* (13), 1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.016>.
- (5) Ludikhuyze, L.; Rodrigo, L.; Hendrickx, M. The Activity of Myrosinase from Broccoli (Brassica Oleracea L. Cv. Italica): Influence of Intrinsic and Extrinsic Factors. *J. Food Prot.* **2000**, *63* (3), 400–403. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.3.400>.
- (6) Botti, M. G.; Taylor, M. G.; Botting, N. P. Studies on the Mechanism of Myrosinase: INVESTIGATION OF THE EFFECT OF GLYCOSYL ACCEPTORS ON ENZYME ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (35), 20530–20535. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20530>.
- (7) Bones, A. M.; Rossiter, J. T. The Myrosinase-Glucosinolate System, Its Organisation and Biochemistry. *Physiol. Plant.* **1996**, *97* (1), 194–208. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x>.
- (8) Gonda, S.; Kiss-Szikszai, A.; Szűcs, Z.; Nguyen, N. M.; Vasas, G. Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC): Simultaneous Determination of Glucosinolates and AITC by CE-MEKC. *Phytochem. Anal.* **2016**, *27* (3–4), 191–198. <https://doi.org/10.1002/pca.2615>.
- (9) W. Watson, G.; M. Beaver, L.; E. Williams, D.; H. Dashwood, R.; Ho, E. Phytochemicals from Cruciferous Vegetables, Epigenetics, and Prostate Cancer Prevention. *AAPS J.* **2013**, *15* (4), 951–961. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9504-4>.
- (10) Gomes, A. R.; Rocha-Santos, T. A. P. Enzyme Assays. In *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*; Elsevier, 2018; p B9780124095472142000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14331-8>.
- (11) Piekarska, A.; Kusznierevicz, B.; Meller, M.; Dziedziul, K.; Namieśnik, J.; Bartoszek, A. Myrosinase Activity in Different Plant Samples; Optimisation of



- Measurement Conditions for Spectrophotometric and PH-Stat Methods. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *50*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.048>.
- (12) Křížek, T.; Kubíčková, A. Microscale Separation Methods for Enzyme Kinetics Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (8), 2185–2195. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5744-x>.
- (13) Kašička, V. Teoretické Základy a Separační Principy Kapilárních Elektromigračních Metod. *Chem. Listy* **1997**, 320–329.
- (14) Křížek, T.; Doubnerová, V.; Ryšlavá, H.; Coufal, P.; Bosáková, Z. Offline and Online Capillary Electrophoresis Enzyme Assays of  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (8), 2425–2434. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6607-1>.
- (15) Řemínek, R.; Zeisbergerová; Glatz, Z. Studium Enzymových Reakcí Kapilární Elektroforézou v Online Uspořádání. *Chem. Listy* **2013**, *107*, 914–920.
- (16) Gattu, S.; Crihfield, C. L.; Lu, G.; Bwanali, L.; Veltri, L. M.; Holland, L. A. Advances in Enzyme Substrate Analysis with Capillary Electrophoresis. *Methods* **2018**, *146*, 93–106.
- (17) Martín-Biosca, Y.; Asensi-Bernardi, L.; Villanueva-Camañas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernández, M. J. Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors by CE after Enzymatic Reaction at Capillary Inlet. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (10), 1748–1756. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800701>.
- (18) Scriba, G. K. E.; Abromeit, H.; Hense, M.; Fan, Y. Capillary Electrophoretic Enzyme Assays. In *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*; Volpi, N., Maccari, F., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 984, pp 285–308. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-296-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-296-4_21).
- (19) Fan, Y.; Scriba, G. K. E. Advances In-Capillary Electrophoretic Enzyme Assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53* (5), 1076–1090. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.04.005>.
- (20) Glatz, Z. Determination of Enzymatic Activity by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **2006**, *841* (1–2), 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.02.051>.
- (21) Nováková, S.; Van Dyck, S.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J.; Glatz, Z. Electrophoretically Mediated Microanalysis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032* (1–2), 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.025>.
- (22) Emmer, Å.; Roeraade, J. Capillary Electrophoresis, Combined with an on-Line Micro Post-Column Enzyme Assay. *J. Chromatogr. A* **1994**, *662* (2), 375–381.
- (23) Bao, J.; Regnier, F. E. Ultramicro Enzyme Assays in a Capillary Electrophoretic System. *J. Chromatogr. A* **1992**, *608* (1–2), 217–224. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87127-T](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87127-T).

- (24) Okhonin, V.; Wong, E.; Krylov, S. N. Mathematical Model for Mixing Reactants in a Capillary Microreactor by Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (19), 7482–7486. <https://doi.org/10.1021/ac8013127>.
- (25) Krylova, S. M.; Okhonin, V.; Krylov, S. N. Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles - a Generic Method for Mixing Reactants in Capillary Microreactor. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (5–6), 742–756. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800671>.
- (26) Berezovski, M. V.; Mak, T. W.; Krylov, S. N. Cell Lysis inside the Capillary Facilitated by Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles (TDLFP). *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *387* (1), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0866-7>.
- (27) Andreev, V. P.; Kamenev, A. G.; Popov, N. S. Electroinjection Analysis. The Introduction of a New Variant of Flow-Injection Analysis and Comparison with Electrophoretically-Mediated Microanalysis. *Talanta* **1996**, *43* (6), 909–914. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(95\)01784-4](https://doi.org/10.1016/0039-9140(95)01784-4).
- (28) Michaelsen, S.; Møller, P.; Sørensen, H. Factors Influencing the Separation and Quantitation of Intact Glucosinolates and Desulphoglucosinolates by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1992**, *608* (1–2), 363–374. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87144-W](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87144-W).