

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Stanovení vybraných inhibitorů tyrosin kináz pomocí

CE-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michaela Kotková
Studijní program:	N1407 – Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 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.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady a připomínky nejen při vypracování literární rešerše, ale i při práci v laboratoři a vyhodnocení výsledků. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Danielu Baronovi, Ph.D. za pomoc při hledání vhodných knižních zdrojů a Katedře analytické chemie za umožnění vypracování této práce. Poděkovat bych chtěla také své rodině a příteli za podporu při studiu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Autor:	Bc. Michaela Kotková
Název práce:	Stanovení vybraných inhibitorů tyrosin kináz pomocí CE-MS
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2020

Abstrakt:

Teoretická část diplomové práce se zabývá popisem kapilární elektroforézy a jejího spojení s hmotnostní spektrometrií. Zmíněny jsou také vybrané inhibitory tyrosin kinázy, jenž se v praxi používají pro léčbu chronické myeloidní leukémie, při níž odchází ke vzniku fúzního proteinu BCR-ABL. Úkolem inhibitorů tyrosin kináz je blokování nekontrolovatelného růstu buněk. Cílem experimentální části bylo vyvinout metodu na separaci vybraných inhibitorů tyrosin kináz pomocí spojení CE-MS a optimalizace klíčových parametrů, jako je složení elektrolytu, podmínky separace a podmínky hmotnostní spektrometrie. Součástí experimentální části je i kalibrace. Výsledkem práce je metoda pro separaci s optimálními podmínkami. Na základě porovnání mezí detekce (LOD) a mezí stanovitelnosti (LOQ) jednotlivých analytů s koncentrací těchto látek v biologickém materiálu bylo vyhodnoceno, že daná metoda je vhodná pro analýzu vybraných inhibitorů v biologických vzorcích.

Klíčová slova:	Kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, inhibitory tyrosin kinázy, bosutinib, dasatinib, canertinib, erlotinib
Počet stran:	55
Jazyk:	Čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author:	Bc. Michaela Kotková
Title:	Determination of some tyrosine kinase inhibitors by CE-MS
Type of thesis:	Master's
Department:	Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of submission:	2020

Abstract:

The theoretical part of this thesis is focused on the description of capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry. Some of the tyrosine kinase inhibitors are also mentioned. These inhibitors are used for the treatment of chronic myeloid leukemia where the fusion protein BCR-ABL is created. The purpose of tyrosine kinase inhibitors is to slowdown the uncontrollable growth of cells. The aim of experimental part of this thesis is to develop a method for separation of selected tyrosine kinase inhibitors by CE-MS including optimization of key parameters like the composition of background electrolyte, and conditions of separation and mass spectrometry. The experimental part includes also calibration. The work resulted in a method for separation of selected TKIs by CE-MS under optimal conditions. Based on the comparison of LOQ values with common levels of the TKIs in biological fluids, the method is suitable for the analysis of the TKIs in medicinal samples.

Keywords:	Capillary electrophoresis, mass spectrometry, tyrosine kinases inhibitors, bosutinib, dasatinib, canertinib, erlotinib
Number of pages:	55
Language:	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Kapilární elektroforéza	10
2.1.1	Historie a použití	10
2.1.2	Princip elektroforetické separace	10
2.1.2.1	Elektroosmotický tok = EOF	11
2.1.2.2	Elektroforetická migrace	13
2.1.3	Schéma kapilární elektroforézy	14
2.1.4	Kapilární zónová elektroforéza = CZE	14
2.1.4.1	Ztráta účinnosti v CZE	16
2.1.5	Instrumentace	17
2.1.5.1	Zdroj vysokého napětí	17
2.1.5.2	Dávkování vzorku	17
2.1.5.3	Kapilára	19
2.1.5.4	Detekce	20
2.2	Spojení CE-MS	21
2.2.1	Princip CE-MS	21
2.2.2	Komplikace spojení CE-MS	22
2.2.2.1	Průtoková rychlost	22
2.2.2.2	Vlastnosti pufry	23
2.2.3	Elektrosprejová ionizace (elektrosprej)	23
2.2.4	Hmotnostní analyzátor	25
2.2.4.1	Kvadrupólový analyzátor	26
2.2.4.2	Trojité kvadrupól	27

2.2.4.3	Druhy iontových chromatogramů	28
2.3	Proteinové tyrosin kinázy	28
2.3.1	Inhibitory tyrosin kináz (TKI)	29
2.3.2	chronická myeloidní leukémie (CML)	30
2.3.3	Erlotinib	31
2.3.4	Dasatinib	32
2.3.5	Bosutinib	33
2.3.6	Canertinib	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1	Přístrojové vybavení	35
3.2	Chemikálie a pomůcky	35
3.3	Příprava standardu	35
3.4	Příprava základního elektrolytu (ZE)	36
3.4.1	Kyselina mravenčí	36
3.4.2	Kyselina octová	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Optimalizace CE	37
4.1.1	Dávkování	38
4.1.2	Složení a pH základního elektrolytu	39
4.2	Optimalizace MS	40
4.2.1	Sprejovací napětí	41
4.2.2	Teplota zmlžovacího plynu	43
4.2.3	Průtok zmlžovacího plynu	44
4.2.4	Tlak zmlžovacího plynu	45
4.3	Parametry metody	46
4.3.1	Opakovatelnost	47

4.3.2 Kalibrace.....	47
Závěr	50
Seznam zkratek.....	51
Literatura.....	52

1 ÚVOD

Kapilární elektroforéza se řadí mezi metody elektromigrační a k jejímu rozvoji došlo především ve druhé polovině 20. století. Principem kapilární elektroforézy je migrace iontů ve vodivém prostředí vlivem elektrického pole a má poměrně široký rozsah analyzovatelných látek – od malých anorganických či organických iontů až po biomakromolekuly, jako jsou proteiny či DNA. Jedním z módů je kapilární zónová elektroforéza (CZE), kterou lze použít pro analýzu iontových látek, ale nelze jí bohužel stanovit látky neutrální, tedy bez náboje. Mezi výhody kapilární elektroforézy patří především malá spotřeba vzorku, rychlost analýz a vysoká účinnost separace. Pozitivem je i široká škála detektorů, které lze pro analýzu využít, v závislosti na vlastnostech analyzované látky.

V praxi se velmi často využívá spojení separačních metod s hmotnostní spektrometrií. V případě spojení CE-MS se jedná o metodu poskytující účinnou separaci látek a dostatečnou strukturní analýzu, kterou umožňuje hmotnostní detektor. Jako iontový zdroj je často zvolen elektrosprej, který stejně jako CE pracuje s kapalinou a jejich napojení není konstrukčně náročné. Kromě ESI lze ale také použít fotoionizaci za atmosférického tlaku, MALDI, či chemickou ionizaci za atmosférického tlaku. Hmotnostních analyzátorů je celá řada, při našich experimentech byl ale využit trojitý kvadrupól (QqQ). Ten umožňuje využití několika pracovních skenů, př. TIC („total ion current“), kde dochází ke sběru všech iontů. K citlivějším se řadí SRM nebo SIM, kde dochází k monitoringu pouze vybraných iontů.

Spojení CE-MS je vhodná metoda pro analýzu biologického materiálu, př. krevních vzorků. V nich je možné analyzovat biologicky aktivní látky, v našem případě inhibitory tyrosin kinázy (ITK). Jedná se o látky, které se v současnosti používají pro léčbu chronické myeloidní leukémie (CML), která je charakteristická vznikem fúzního gen BCR-ABL, který vzniká křížením chromozomu 9 a 22. Účelem inhibitorů tyrosin kináz (př. dasatinib či erlotinib) je zastavit či omezit katalytickou aktivitu proteinových kináz, čímž by měly být schopny zablokovat nekontrolovatelný růst buněk.

Cílem práce je tedy vyvinout metodu pro stanovení vybraných inhibitorů tyrosin kináz pomocí CE-MS.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

2.1.1 HISTORIE A POUŽITÍ

Termín elektroforéza byl vytvořen roku 1909 Michaelisem a za průkopnický experiment je považován Tisseliův experiment z roku 1937, ve kterém byla poprvé ukázána separace sérových proteinů – albuminy a α , β , γ -globuliny, čímž poukázal na možnost elektroforetické analýzy pro biologicky aktivní molekuly [1, p. 27]. Postupem času došlo k rozvoji elektromigračních metod a jednou z nich je i kapilární elektroforéza (CE), se kterou se poprvé setkáváme v roce 1967, kdy Hjertén publikoval elektroforézu v rotující kapiláře s názvem „volná zónová elektroforéza“. Roku 1989 bylo na trh uvedeno první zařízení pro kapilární zónovou elektroforézou od firmy Beckman. [2, p. 16]

CE lze použít pro stanovení anorganických i organických látek, jejichž molekuly jsou schopny nést kladný náboj v důsledku protonizace nebo disociace (sodné, draselné ionty, aminy, aminokyseliny a jiné), či záporný náboj v důsledku disociace (př. chloridy, sírany, fenoly, sacharidy a další). Vyniká zejména díky malé spotřebě vzorku a činidel nutných pro separaci látek, velké účinnosti separace, velké rychlosti analýzy a krátké době optimalizace separačních podmínek. Oproti tomu nevýhodou je menší reprodukovatelnost a nižší citlivost oproti jiným metodám. [3, p. 181]

2.1.2 PRINCIP ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE

Elektroforéza je pohyb elektricky nabitých částic či molekul ve vodivém prostředí vlivem elektrického pole. Rychlost migrace iontů závisí na jejich poměru náboje ku velikosti iontu [4, p. 3]. Ionty různých látek se budou tedy pohybovat různou rychlostí, čímž bude docházet k jejich separaci. Pozitivně nabité kationty budou migrovat směrem k negativně nabitě elektrodě, katodě, a negativně nabitě anionty směrem ke kladně nabitě elektrodě, anodě. [5, p. 1]

Metoda kapilární elektroforézy využívá dvou transportních jevů – elektroforetické migrace a elektroosmotického toku.

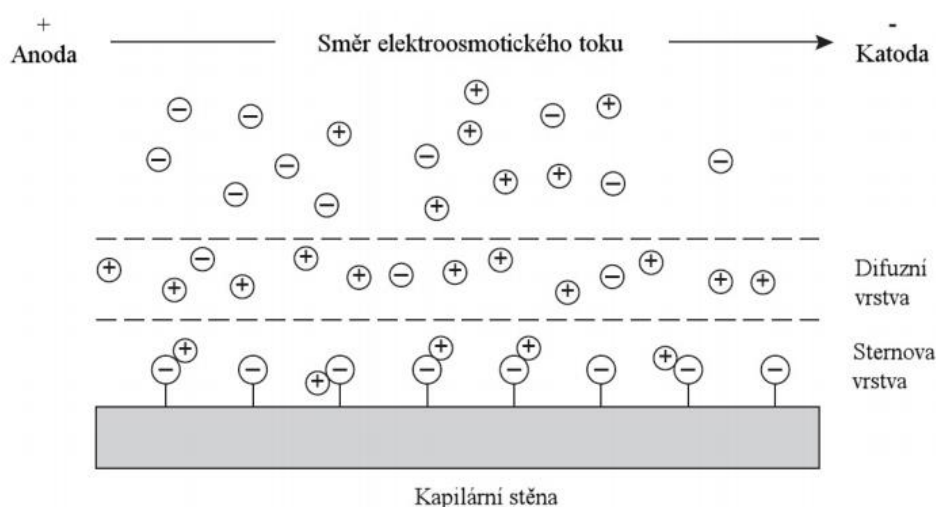
2.1.2.1 Elektroosmotický tok = EOF

Jak již plyne z názvu, klíčovou složkou kapilární elektroforézy je kapilára. Používají se různé materiály, mezi nejběžnější však patří kapiláry křemenné. Ty mají na vnitřní stěně kapiláry silanolové Si-OH skupiny, které jsou při hodnotách pH > 4 v disociované formě Si-O⁻. Takto disociované negativně nabitě skupiny k sobě přitahují kladně nabitě ionty z roztoku pufru a vzniká útvar nazývaný elektrická dvojvrstva. Ta je tvořena Helmholtzovou kompaktní vrstvou, jejíž kladně nabitě ionty jsou pevně vázány na záporně nabitý povrch kapiláry, a vrstvou difúzní, která je od povrchu kapiláry více vzdálená a uplatňují se v ní difúzní jevy. Ionty v difúzní vrstvě nejsou tak pevně vázány k povrchu kapiláry a vytváří tím mobilní vrstvu. [5, p. 21]

Po aplikaci elektrického pole na kapiláru dojde k migraci pozitivně nabitých iontů v mobilní vrstvě směrem k záporně nabitě katodě. Vzhledem k tomu, že ionty se nenacházejí v roztoku samostatně, ale jsou solvatovány, dojde k tomu, že spolu s ionty je ke katodě unášen celý objem roztoku. Tento efekt se nazývá elektroosmotický tok, dále jen EOF (obr.1.). [6, p. 5]

Směr EOF je určen polaritou nábojů ve dvojvrstvě a rychlost toku (1) je přímo úměrná hodnotě zeta-potenciálu ζ [V], intenzitě vloženého elektrického pole E [V/m], relativní permitivitě roztoku ϵ a nepřímo úměrná viskozitě roztoku η [Pa.s]. [2, p. 18], [3, p. 41]

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (1)$$

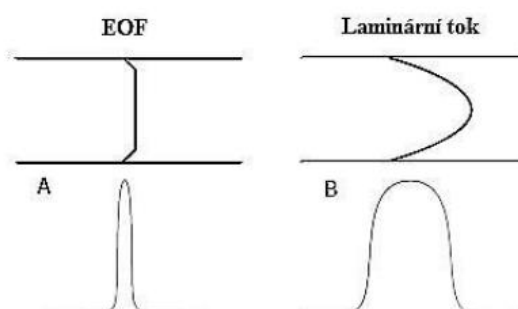


Obr. 1. Schéma elektroosmotického toku [7, p. 9]

Směr a intenzita EOF tedy výrazně ovlivňuje průběh separace a migraci iontů. Platí, že rychlost EOF se přičítá k migrační rychlosti částic, které migrují stejným směrem a odečítá se od těch, které migrují směrem opačným. Látky neutrální, tedy bez náboje, budou mít migrační rychlost shodnout s rychlostí EOFu. Jde tedy o důležitý parametr, který lze kontrolovat, a s jeho pomocí modifikovat podmínky separace [8, p. 283]. EOF může být upraven změnou složení roztoku nebo modifikací povrchu kapiláry, čímž může dojít ke změně jeho rychlosti, směru, nebo jej lze téměř zcela odstranit při hodnotách $\text{pH} < 2,5$. [3, p. 42]

Rychlost EOFu lze ovlivnit dvěma způsoby. První možností je vliv pH a platí, že rychlost EOF je funkcí pH [8, p. 283]. Čím vyšší je pH roztoku uvnitř kapiláry (tedy pH tlumivého roztoku či elektrolytu), tím větší negativní náboj je rozprostřen po vnitřní stěně kapiláry a tím výraznější a rychlejší EOF pozorujeme. Nejedná se ovšem o lineární závislost, jelikož množství negativního náboje na vnitřní straně kapiláry je limitováno počtem Si-OH skupin, které lze disociovat a u vysokých hodnot pH (př. 9-10) už nedochází k výrazným rychlostním rozdílům, protože nedochází k disociaci dalších Si-OH skupin. Druhým způsobem, jak ovlivnit rychlost, je koncentrace tlumivého roztoku. S rostoucí koncentrací roztoku se snižuje zeta-potenciál ζ elektrické dvojvrstvy, který způsobí nižší elektroosmotickou pohyblivost, a tedy i pomalejší EOF. Při použití roztoků s nižší koncentrací tedy pozorujeme rychlejší EOF. [3, p. 185]

Značnou výhodou, kterou EOF poskytuje je to, že rychlostní profil kapaliny v kapiláře je plochý a způsobuje tedy menší rozmytí zón analytu v porovnání s chromatografickými metodami (obr.2.), což vede ke zvýšené separační účinnosti [5, p. 46]. Umožňuje také separaci aniontů a kationtů v rámci jedné analýzy. Bez EOFu by byli vyžadovány dvě analýzy – jedna s nastavenou polaritou napětí pro analýzu kationtů, druhá s přepnutou polaritou pro analýzu aniontů.



Obr.2. Srovnání rychlostních profilů elektroosmotického a chromatografického toku [9, p. 7]

2.1.2.2 Elektroforetická migrace

Elektroforetická migrace je pohyb iontů v elektrickém poli vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě. Ionty v elektrolytu migrují určitou elektroforetickou rychlostí v_{EP} v jednotkách $m \cdot s^{-1}$, danou vztahem (1)

$$v_{EP} = \mu_{EP} \cdot E \quad (2)$$

kde μ_{EP} je elektroforetická pohyblivost a E je intenzita elektrického pole. Elektroforetická pohyblivost je dána vztahem (2)

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

s jednotkou $m^2 / V \cdot s$, kde q – náboj iontu, η – viskozita elektrolytu (tlumícího roztoku), r – efektivní (hydrodynamický) průměr iontu. [5, p. 39]

Z rovnice (2) lze vyčíst, že malé a více nabitě molekuly se budou kapilárou pohybovat nejrychleji a velké molekuly s nízkým nábojem budou pomalejší. Neutrální molekuly budou mít elektroforetickou pohyblivost nulovou, protože jejich náboj je nula. Zřejmé je také to, že vzrůst viskozity elektrolytu způsobí snížení elektroforetické pohyblivosti.

Stejně jako u EOFu i na elektroforetickou migraci má vliv pH roztoku a značně ovlivňuje náboj ionizovatelné látky. Mobilita aniontových látek roste se zvyšujícím se pH, protože v tom případě existují dominantně negativně nabitě a s klesajícím pH je část z nich neutralizována, čímž se jejich mobilita se snižuje.

Elektroforetická mobilita spolu s elektroosmotickým tlakem mají vliv na rychlost analytů v kapiláře. Získaná (měřená) elektroforetická rychlost v_{OBS} je dána vztahem

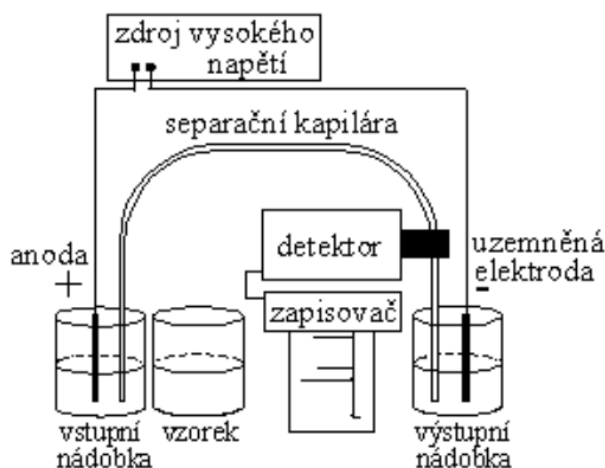
$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (4)$$

kde v_{EOF} je elektroosmotický tok v jednotkách m / s . [10, p. 62]. Stejný vzorec platí i pro získanou (měřenou) mobilitu [5, p. 40]

$$\mu_{OBS} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad (5)$$

2.1.3 SCHÉMA KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Uspořádání kapilární elektroforézy je poměrně jednoduché. Mezi základní komponenty patří vstupní nádobka, separační kapilára, výstupní nádobka, nádobka se vzorkem, detektor, vysokonapěťové napájení a zařízení pro zpracování dat, nejčastěji počítač (obr. 3.). Jednotlivé části budou podrobněji popsány v kapitole 2.1.5.



Obr.3. Schematické znázornění kapilární elektroforézy [3, p. 186]

Jako klasický model v kapilární elektroforéze je chápán takový, kde je za detektorem umístěna katoda a EOF je veden ze zdroje směrem k detektoru. V takovém případě anionty migrují proti směru EOFu a jejich elektroforetická rychlost i pohyblivost je nižší než získaná rychlost či pohyblivost. U kationtů, které migrují ve směru EOFu je situace opačná a získané hodnoty jsou vyšší.

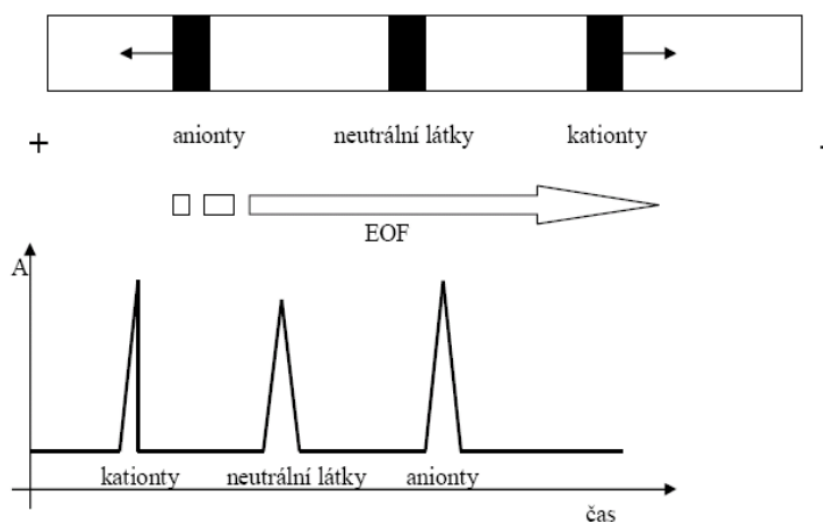
2.1.4 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA = CZE

Kapilární zónová elektroforéza je široce používaný mód pro separaci aniontů a kationtů, ale bohužel není schopna separovat látky neutrální. Schematické uspořádání vychází z kap. 2.1.3, kde nádobky a kapilára jsou naplněny pufrům o konstantním složení, čímž se odlišuje od jiných módů jako je např. izotachoforéza = ITP, kde se používá kombinace 2 elektrolytů – koncového (TE) a vedoucího (LE), mezi nimiž je separovaný vzorek. [5, p. 54]

Elektroforéza je realizována naplněním vstupní nádobky, výstupní nádobky a kapiláry elektrolytem, většinou vodným roztokem pufru o vhodném pH pro daný typ

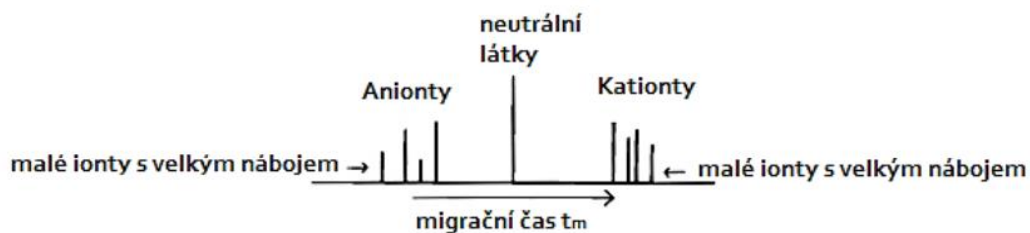
separace. Nejprve je kapilára zavedena do nádoby se vzorkem a vzorek je nadávkován do vstupního konce kapiláry ve formě krátké zóny. Poté se kapilára zavede do vstupní nádoby, druhý konec je ve výstupní nádobce a mezi nimi je generováno elektrické pole vložení napětí na elektrody ponořené v roztoku. To iniciuje migraci roztoku skrze kapiláru směrem k detektoru, kde jsou zaznamenány průchozí analyty a následně zpracovány počítačem. V průběhu migrace dochází k separaci analytů v homogenním pufru na základě jejich elektroforetických mobilit a vytvářejí se zóny. [11, p. 293]

V případě klasického modelu je pořadí analytů uvedeno na Obr. 4.



Obr. 4. Pořadí separace a detekce analyzovaných látek s odlišným iontovým charakterem a ukázka elektroforegramu [12, p. 7]

kde je vidět, že jako první detektorem projdou látky kladně nabitě, poté neutrální, a nakonec látky záporně nabitě. V případě, že v analyzovaném vzorku bude více druhů kationtů, budou rozděleny do zón podle své elektroforetické mobility a rychlosti, stejně jako anionty. V případě kationtů budou první detekovány látky malé a hodně nabitě, poté ionty větší a méně nabitě. U aniontů bude pořadí opačné (obr. 5.). Ty totiž migrují směrem k anodě, tedy proti EOFu a pro jejich detekci je nutné, aby byla rychlost EOFu větší, než elektroforetická rychlost aniontů. V opačném případě by totiž nebyly unášeny elektroosmotickým tlakem k detektoru [6, p. 6]. Neutrální látky budou všechny v jedné zóně a nebudou dále separovány, kvůli jejich nenabitému charakteru, jak bylo zmíněno dříve (separací neutrálních látek metodou kapilární elektroforézy se zabývá micelární elektrokinetická chromatografie = MEKC).



Obr. 5. Pořadí separovaných analytů s ohledem na velikost a náboj iontu [9, p. 7]

Záznam z kapilární elektroforézy je označován jako elektroforegram (obr. 4.). Na ose x je migrační čas – doba, za jakou analyzované látky dorazí ze vstupu kapiláry k detektoru. Nulová hodnota času je nastavena při sepnutí elektrického pole. [5, p. 10]. Na ose y je odezva detektoru, v tomto případě UV-VIS detektoru a jde tedy o absorpční.

CZE je využívána pro separaci malých anorganických iontů nebo rozměrných biomolekul. V případě, že daná látka není rozpustná ve vodě, lze použít i nevodné pufrů. [5, p. 55]

2.1.4.1 Ztráta účinnosti v CZE

V případě, že během separace dojde k poklesu účinnosti, dochází v elektroforegramu ke vzniku rozmytých či chvostujících píků. To může mít hned několik příčin – zahřívání kapiláry, geometrie kolony, absorpční procesy, difúze a další. [8, p. 281]

Zejména difúze má značný podíl na deformaci píků a zón. Lze ji omezit tím tak, že analyty tráví v kapiláře co nejmenší dobu, tedy zkrácení doby analýzy. To lze docílit zkrácením kapiláry nebo zvýšením napětí. Efekty zahřívání lze eliminovat nejčastěji chlazením kapiláry, či úpravou geometrických parametrů jako je třeba prodloužení a zúžení kapiláry, čímž dojde ke zvětšení povrchu a rozptýlení vznikajícího tepla. Poslední zmíněnou komplikací jsou absorpční a interakční procesy, kdy v případě že stěna kapiláry je záporně nabitá, může docházet k interakcím se stanovovanými kationty a tím k rozmývání zóny. Tomu lze zabránit přidáním aditiv, například solí, jejichž kationty vykompenzují záporný náboj. [11, p. 294]

2.1.5 INSTRUMENTACE

Schematické uspořádání (obr.3.) bylo zobrazeno v kapitole 2.1.3. V této kapitole se podrobněji zaměříme na jednotlivé složky kapilární elektroforézy a jejich provedení. Kromě základních komponent uvedených dříve se v praxi vyskytují systémy s termostatovanými kapilárami pro kontrolu teploty nebo kolektory frakcí.

2.1.5.1 Zdroj vysokého napětí

Úkolem vysokonapěťového zdroje je zajistit přítomnost elektrického pole skrze kapiláru a umožnit změnu polarity systému. Lze použít několik pracovních režimů – konstantní napětí, konstantní proud nebo konstantní režim napájení, přičemž nejčastěji používaný je režim konstantního napětí (5 – 30 kV), protože změny v napětí mohou způsobit změny v migračních časech [5, p. 13], [6, p. 15].

2.1.5.2 Dávkování vzorku

Vzorky pro kapilární elektroforézu bývají připraveny ve vialkách s objemy několika mikrolitrů až mililitrů. Dávkované množství se pohybuje v jednotkách nanolitrů [13, p. 24], přičemž malé spotřeby vzorku jsou velkou výhodou kapilární elektroforézy.

Rozlišujeme tři základní způsoby dávkování – hydrodynamický, elektrokinetický a gravitační. [14, p. 288]

Hydrodynamické dávkování (obr.6) spočívá v působení tlaku na hladinu v nádobce se vzorkem, kam je zavedena vstupní část kapiláry. Zvýšení tlaku na hladinu roztoku způsobí načerpání definovaného objemu do kapiláry. Dávkovaný objem (6) lze vypočítat podle vzorce

$$V_{inj} = \frac{\Delta P r^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (6)$$

kde ΔP – rozdíl tlaků na koncích kapiláry [mbar], r – poloměr kapiláry [μm], t – doba působení tlaku [s], η – viskozita roztoku vzorku [Pa.s], L – celková délka kapiláry [m]. Z rovnice je patrné, že nadávkovaný objem vzorku závisí na rozsahu a době působení tlaku na vzorek. Hydrodynamické dávkování se používá ve většině případů z toho důvodu, že vzorek nadávkovaný do kapiláry má stejné složení jako vzorek v nádobce. To neplatí u

dávkování elektrokinetického, které se používá především u kapilár plněných polyakrylamidovým gelem, kde nefunguje reprodukovatelně hydrodynamické dávkování. [3, p. 186], [5, p. 101]

Elektrokinetické dávkování (obr.6) je uskutečněno díky napětí, které je vloženo na elektrody. Anoda je po dobu dávkování umístěna v nádobce se vzorkem, po nadávkování se vloží zpět do vstupní nádoby. Vložené napětí způsobí migraci iontů do kapiláry vlivem elektroosmózy a elektroforetické mobility. Nadávkovaný objem (7) lze vypočítat podle vzorce

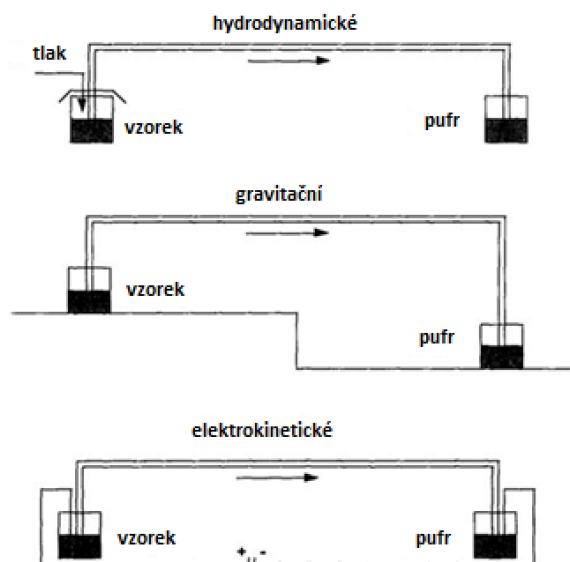
$$V_{inj} = V\pi c t r^2 (\mu_{EP} + \mu_{EOF}) / L \quad (7)$$

kde V – napětí [V], c – koncentrace vzorku [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$], t – doba působení napětí [s], r – poloměr kapiláry [μm], μ_{EP} – elektroforetická mobilita μ_{EOF} – elektroosmotická mobilita. Z rovnice vidíme, že množství nadávkovaného vzorku závisí na elektroforetických mobilitách iontů ve vzorku. V případě klasického uspořádání (migrace kationtů k detektoru) budou tedy zvýhodněny kationty a anionty budou znevýhodněny. Pokud by byly kationty s různými náboji, dojde k tomu, že v kapiláře budou převažovat kationty více nabitě, poté jednou nabitě a nejméně bude aniontů. Neutrální látky budou unášeny elektroosmotickým tlakem. Pro reprodukovatelné měření je tedy nutné provádět nástřik vždy z nové nádoby, protože v té původní se mění poměr zastoupení iontů [3, p. 186], [5]

Gravitační dávkování (obr. 6.) spočívá ve mechanickém zvednutí kapiláry, jejíž vstupní část je ponořen do nádoby se vzorkem a výstupní část je ponořena do nádoby s pufrem. Zvednutím kapiláry dojde k nasátí vzorku do kapiláry, běžně se užívá zvednutí o 5 cm po dobu 10 s. Nadávkovaný objem (8) lze vypočítat podle vzorce

$$V_{inj} = \frac{\rho g \Delta H d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (8)$$

kde ΔH – výškový rozdíl [cm], g – gravitační konstanta, ρ – hustota roztoku [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$], d – průměr kapiláry [cm], t – čas dávkování [s], η – viskozita roztoku [Pa.s], L – celková délka kapiláry [m]. Množství dávkovaného vzorku lze ovlivnit výškovým rozdílem a dobou zvednutí kapiláry. [6, p. 11]



Obr. 6. Možnosti dávkování v CE (Altria, 1996, p. 10, upraveno)

2.1.5.3 Kapilára

V kapilární elektroforéze se používá nejčastěji křemenná kapilára s délkou 25 – 100 cm a vnitřním průměrem 25 – 100 μm . Kapiláry s malým vnitřním průměrem, tedy co nejužší, mají tu výhodu, že snižují postranní difúzi (příčnou) a zajišťují minimální teplotní rozdíly mezi středem kapiláry a její stěnou [15, p. 23]. Kapiláry jsou pokryty ochrannou vrstvou polyimidu, který je silným UV absorbentem (Altria, 1996, p. 15 - 16).

V případě, že je použita CE v kombinaci s UV/VIS detekcí, je nutné upravit detekční okénko pro průchod světelného paprsku. To lze provést jednoduchou úpravou polyamidové vrstvy – buď část povlaku opatrně seškrábat nebo spálit pomocí žhaveného vlákna. [5, p. 13]

Aplikované napětí způsobuje zahřívání kapiláry, protože dochází k uvolnění tzv. Jouleova tepla, které je vedeno stěnou kapiláry do okolního prostředí [3, p. 185]. To je přímo úměrné vkládanému napětí (9), podle vztahu

$$Q = V \cdot I \cdot t \quad (9)$$

kde V – vkládané napětí [V], I – proud [A], t – čas [s] a Q – uvolněné teplo [J] [2, p. 21]. Takto uvolněné teplo může ovlivnit viskozitu roztoku v kapiláře a ovlivnit tím EOF i elektroforetickou migraci iontů, což může způsobit mírné rozmytí zóny. Z toho důvodu bývají kapiláry ochlazovány a uvolněné teplo rozptýleno. [5, p. 13]

2.1.5.4 Detekce

Poslední významnou součástí instrumentace pro CE je detektor. V kap. 2.1.5.2. bylo zmíněno, že při kapilární elektroforéze se pracuje s velmi nízkými objemy, v řádu nanolitřů. To znamená, že stanovované látky se často nachází v minimálních koncentracích a je tedy nutné zajistit dostatečně citlivou detekci. Kromě nízkých koncentrací se v CE uplatňuje i široké rozmezí typů chemických látek, které lze takto stanovit – od malých anorganických látek až po proteiny a DNA molekuly. Velmi často jsou analyzovány látky nacházející se ve složité matrici, například krevní vzorky, moč, tkáně a jiné. V takovém případě je nutné při určování selektivity detekce zhodnotit možné interference z matrice. Pro efektivní a účinnou detekci v CE je nutno zohlednit vlastnosti analytu, matrici vzorku a jeho složení a požadované limity detekce. (Khaledi, 1998, p. 304, 305)

Mezi široce používané detekční metody (tab.1.) v CE patří UV/VIS absorbance (přímá a nepřímá), fluorescence (přímá a nepřímá), hmotnostní spektrometrie, vodivostní měření, případně amperometrický či refraktometrický detektor. Ze zmíněných detektorů je nejvíce používaný UV/VIS detektor, který bude rozebrán níže podrobněji.

Tab. 1. Vybrané detekční metody s jejich limity detekce [2, p. 23]

Detekční metoda	Limit detekce LOD (mol)
UV/VIS	$10^{-13} - 10^{-12}$
Fluorescence	$5 \cdot 10^{-17}$
MS	$1 \cdot 10^{-17}$
Vodivostní	$1 \cdot 10^{-16}$
Amperometrický	$1 \cdot 10^{-19}$

UV/VIS absorpční detektor je kompatibilní s řadou módů CE a jednou z nich je i CZE [10, p. 308]. Je založen na absorpci ultrafialového nebo viditelného záření. Aby mohla daná látka absorbovat, musí ve své struktuře obsahovat chromofor – část molekuly schopná absorpce. V případě, že chromofor neobsahuje, je možné provést derivatizaci a do struktury vnést chromofor a nebo provést nepřímé měření, kdy kapilárou prochází absorbující roztok a v místě zóny analytu dojde k úbytku absorbance [10, p. 310]. Přepočet absorbance na koncentraci analytu je dán Lambert-Beerovým zákonem (10)

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (10)$$

kde A – absorbance [nm], ϵ – molární dekadický absorpční koeficient [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$], l – délka absorbující vrstvy [cm] a c – koncentrace analytu. Absorpce závisí na vlnové délce použitého záření, pH roztoku, složení pufru v kapiláře a na přítomnosti chromoforu [5, p. 116]. Analyty s hodnotami ϵ 10^4 – 10^5 jsou považovány za silné absorbenty a analyty s hodnotami $\leq 10^3$ za slabé absorbenty [10, p. 310].

Základní CE absorpční detektor je složen ze zdroje světla, fokusační optiky, selektoru vlnové délky a fotodetektoru, například diode array detektor (DAD), který umožňuje měřit několik vlnových délek současně. [10, p. 311]

2.2 SPOJENÍ CE-MS

Ve spojení s CE se používá řada detekčních technik a jednou z nich je spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), která poskytuje nejlepší kombinaci citlivosti, separace a strukturní informace (Jianyi and Henion, 1995, p. 669). CE poskytuje vysoce účinnou separaci analytů přítomných v nízkých koncentracích a MS poskytuje vysokou úroveň strukturní informace. Toto spojení je vhodné zejména pro složité a komplexní směsi vzorků, jako jsou biologické vzorky, kde se analyty nachází v malých množstvích [17, p. 115]. Citlivost analýz lze zvýšit zapojením off-line prekoncentračních technik, kterých je celá řada, například SPE nebo L-L extrakce [17, p. 116].

MS je považován za univerzální detektor a je schopen zaznamenat veškeré látky s molekulovou hmotností M_r v rozsahu hmotností spektrometru. V případě molekul s hodnotami M_r nad limit spektrometru lze využít vícenabitě ionty, které mohou vznikat za použití ESI. Tím se hodnota m/z sníží do detekovatelného limitu a lze zaznamenat i např. proteiny. Pro analýzu lze použít několik režimů – sledování vybraného iontu (EIC), sledování vybrané reakce (SRM), a nebo sledovat skupinu iontů, kdy přepínáme mezi hodnotami m/z . V případě EIC a SRM módu se jedná o velmi selektivní detektor, kdy je zvolena hodnota m/z konkrétního iontu. [5, p. 130]

2.2.1 PRINCIP CE-MS

Jedná se o on-line spojení, ve kterém je křemenná kapilára z CE přímo zavedena do iontového zdroje, což bývá nejčastěji elektrosprej (ESI). Výhodou ESI je, že velmi dobře ionizuje polární a nabitě látky, ideálně termolabilní, pro jejichž separaci se často používá CE

[18, p. 107]. Kapalina proudící z CE je smísená se stínící kapalinou a rozprášena v ESI. Vzniklý sprej je odpařen a nabitě částice analytu jsou směřovány do MS detektoru [15, p. 48]. V hmotnostním spektrometru je vzorek rozložen na nabitě fragmenty, které jsou analyzovány. Výsledek analýzy je hmotnostní spektrum, ve kterém je závislost poměru hmotnosti ku náboji (m/z) na intenzitě daného iontu [5, p. 130]

Separace probíhá v křemenné kapiláře a v kapalně fázi, zatímco detekce iontů probíhá v plynné fázi a v prostředí vakua.

Spojení CE/ESI-MS lze provést dvojím způsobem. V prvním případě je do sprejovací špičky zaváděna stínící kapalina, ve druhém tato kapalina chybí, tzv. „sheathless“. Spojení bez stínící kapaliny je vhodné zejména pro nanoelektrosprej (nanoESI), kdy se využívá nízkých průtoků v kapiláře. Může být realizováno pokovením zkoseného konce kapiláry. [19] Řešení s kapalinou je popsáno dále, vzhledem k tomu, že bylo použito při vývoji metody v experimentální části.

2.2.2 KOMPLIKACE SPOJENÍ CE-MS

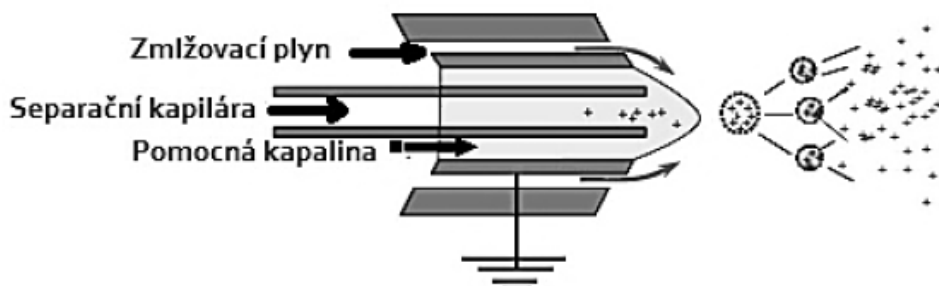
2.2.2.1 Průtoková rychlost

V CE probíhá separace za přítomnosti relativně malých průtokových rychlostí a pohybuje se v řádech nL/min. Pro vznik stabilního elektrospreje je nutný průtok v řádu $\mu\text{L}/\text{min}$ [20, p. 575]. Z toho důvodu se používá tzv. *stínící kapalina* („sheath liquid“) dodávaná z externího zdroje, která dorovná chybějící obsah kapaliny a zvýší průtokovou rychlost pro ESI. Stínící kapalinou je nejčastěji vodný roztok těkavé soli a vhodného organického rozpouštědla a její průtoky se pohybují v rozmezí 5 – 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Další výhodou, kterou poskytuje stínící kapalina, je možnost použití koncentrovanějších roztoků pufrů v CE, které budou touto kapalinou před ionizací zředěny. Platí totiž, že příliš koncentrované roztoky, tj. s velkou iontovou silou, nejsou efektivně ionizovány [5, p. 131]. V neposlední řadě stínící kapalina zajišťuje propojení elektrických obvodů v CE a v MS. Na konci Sprejovací špičky ESI dochází ke kontaktu eluentu z CE a sprejovacím prostorem, čímž se elektrický obvod spojí a stabilizuje průběh sprejování [20, p. 576].

Pro podpoření tvorby spreje a zvýšení jeho stability se do prostoru ESI přivádí inertní zmlžovací plyn, například dusík, pod vhodným tlakem [3, p. 243].

Stínící kapalina a zmlžovací plyn proudí z vnější strany kapiláry pro CE (obr. 7.). Typické složení stínící kapaliny je vodná směs methanolu, acetonitrilu, nebo isopropanolu s dalšími aditivy jako je octová kyselina, šťavelová kyselina pro tvorbu kationtů, nebo amoniak pro tvorbu kationtů. [18, p. 112]



Obr. 7. Sprejovací ESI špička [9, p. 12]

2.2.2.2 Vlastnosti pufru

Další komplikací je samotný pufr používaný v CE. Pro spojení CE-MS je nutné používat pufrы vyhovující oběma systémům. Mezi nevhodné patří pufrы netěkavé, ty mohou vést ke kontaminaci systému a iontového zdroje [15, p. 48] a jedná se většinou o soli alkalických kovů, jako je fosfát sodný. Přítomnost těchto alkalických kovů vede navíc ke vzniku aduktů analytů s těmito ionty. Tohle rozdělení analytu do několika různých signálů s různou hodnotou m/z snižuje citlivost detekce. Z toho důvodu je řada vyvinutých systémů pro CE nekompatibilní s MS.

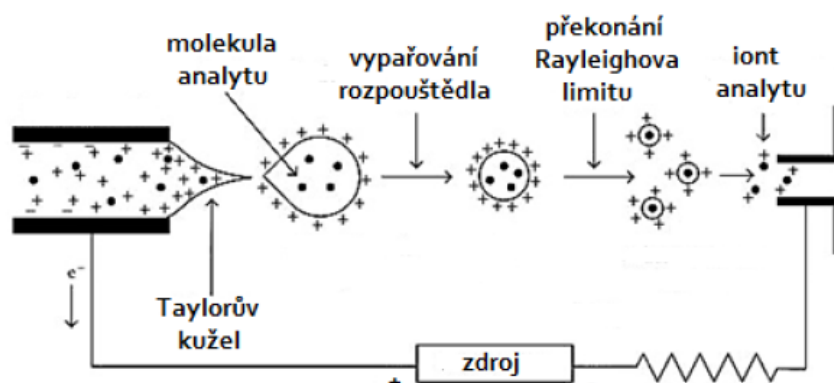
Bylo také prokázáno, že pufrы s vysokou iontovou silou či koncentrací snižují intenzitu signálu. [10, p. 415]

2.2.3 ELEKTROSPREJOVÁ IONIZACE (ELEKTROSPREJ)

Elektrosprej (ESI) je považován za měkkou ionizační techniku. [19] Díky tomu dochází v průběhu ionizace k menší fragmentaci a dostáváme dostatečnou informaci o molekulovém iontu analytu. Značnou výhodou ESI je to, že je schopen vytvářet vícenabité ionty. To umožňuje analyzovat látky, jejichž rozsah molekulové hmotnosti by jinak hmotnostní analyzátor nebyl schopen zaznamenat. Využívá se zejména při studiu proteinů. Postupem času byl kromě velkých molekul využíván i k ionizaci malých polárních látek. [21, pp. 1–2]

Ionizace probíhá tak, že na špičce ESI je vloženo napětí a vzniká silné elektrické pole při atmosférickém tlaku, které působí na kapalinu procházející kapalinou uvnitř špičky [22, p. 883]. Součástí špičky je i stínící kapalina stabilizující sprejování, jak bylo uvedeno v kap. 2.2.2.1. Vkládané napětí se většinou pohybuje v rozmezí 3 – 6 kV a jeho hodnota je ovlivněna rozpouštědlem a jeho povrchovým napětím [23, p. 43]. Čím větší bude povrchové napětí rozpouštědla, tím vyšší napětí je potřeba použít.

Vytvořené elektrické pole způsobí hromadění náboje na povrchu kapaliny na konci sprejovací špičky – při použití kladného napětí se hromadí kladný náboj a jde tedy o pozitivní mód, v případě záporné hodnoty napětí se akumulují záporné ionty a mluvíme o módu negativním. Na začátku má kapalina na konci kapiláry tvar kulatý. S nárůstem napětí a hromadění náboje na povrchu kapaliny se její tvar mění a prodlužuje se vlivem odpuzivých Coulombických sil mezi náboji [22, p. 884]. Jakmile tato síla překoná povrchové napětí kapaliny, dochází ke vzniku tzv. *Taylorova kužele*, z jehož hrotu dochází k uvolňování jednotlivých kapek (obr. 8.).



Obr. 8. Postup sprejování pomocí ESI za vzniku Taylorova kužele [9, p. 13]

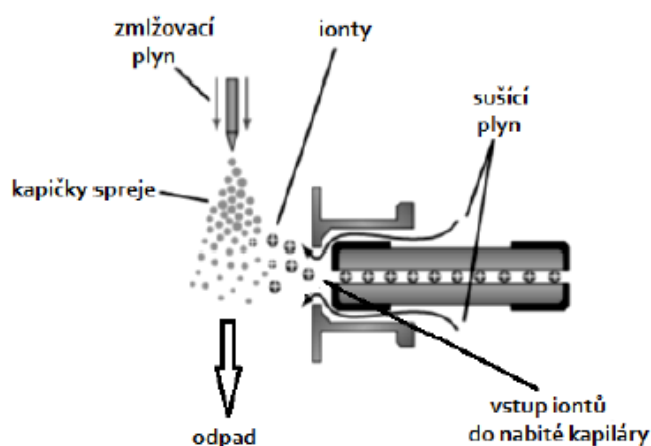
Vlivem vyhřátého pomocného plynu, který proudí do prostoru ESI dochází k odpařování rozpouštědla z kapky. Ta se tímto zmenšuje a opět dochází k akumulaci náboje na povrchu kapaliny a opakuje se proces, ke kterému dochází na konci sprejovací špičky. Taylorův kužel na kapce vzniká při dosažení Rayleighova limitu (11), který je dán rovnicí

$$q^2 = 8\pi^2 \varepsilon_0 \gamma D^3 \quad (11)$$

kde ε_0 – relativní permitivita vakua, D – průměr kapky, q – náboj kapky, γ – povrchové napětí rozpouštědla. Z jednoho Taylorova kužele se uvolní až 20 menších kapiček [23, p. 45]. Ty jsou opět odpařovány a zmenšovány.

V případě ionizace malých polárních molekul dochází k tomu, že při dosažení Rayleighova limitu se z povrchu kapky uvolní jednou nabitě ionty. Pokud jsou analyzovány velké molekuly, například proteiny, dochází k postupnému odpařování a hromadění náboje na povrchu, čímž vznikají vícenabitě ionty [23, p. 45].

Přestože v průběhu ionizace dochází k odpařování složek roztoku, můžou se zde vyskytovat látky netěkavé. V takovém případě by došlo ke kontaminaci a znečištění vstupu do hmotnostního analyzátoru, a proto se v praxi uplatňuje ortogonální uspořádání (obr. 9.).



Obr. 9. Ortogonální uspořádání ESI [9, p. 14]

2.2.4 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR

Poté, co jsou analyty převedeny na ionty v plynné fázi, je nutné je od sebe oddělit podle jejich hmotnosti. Fyzikální vlastnost, kterou měříme hmotnostním analyzátozem, je poměr hmotnosti ku náboji (m/z). V případě vícenabitých iontů tedy nezískáme molární hmotnost dané látky, ale pouze zdánlivé hodnoty m/z odpovídající pouze částečné hmotnosti.

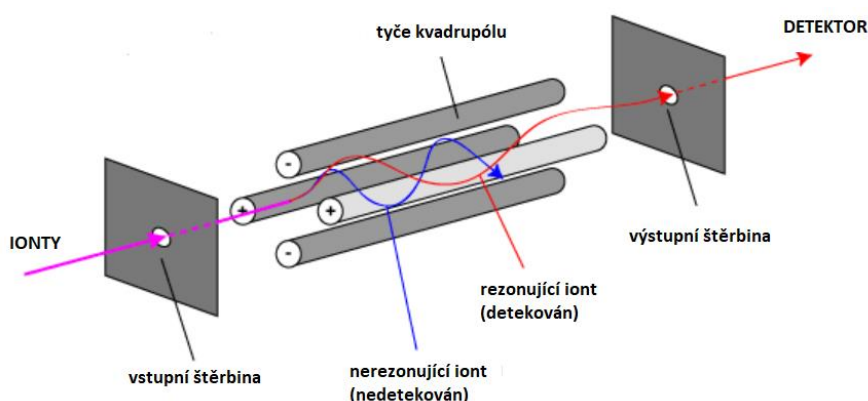
Existuje celá řada hmotnostních analyzátorů a principy, na jejichž základě dochází k separaci iontů, se můžou lišit (tab. 2.). Každý z těchto analyzátorů využívá statické nebo dynamické elektrické a magnetické pole buďto samostatně, nebo v různých kombinacích. [23, p. 85]

Tab. 2. Vybrané hmotnostní analyzátoři a jejich princip separace [23, p. 86]

Typ analyzátoři	Značka analyzátoři	Princip separace
Kvadrupól	Q	m/z (stabilita trajektorie)
Iontová past	IT	m/z (rezonanční frekvence)
Analyzátoři doby letu	TOF	Pohyblivost (doba letu)
Elektrický sektor	E / ESA	Kinetická energie

2.2.4.1 Kvadrupólový analyzátoři

Kvadrupólový analyzátoři (obr. 10.) patří mezi analyzátoři s rozlišením kolem 2 000, zatímco u TOFu to může být až 20 000. Rozlišení (R) je schopnost poskytnout dva signály pro ionty s malou diferencí hodnot m/z. [23, p. 89]. Je velmi využíván zejména díky nízké ceně a snadné automatizaci.



Obr. 10. Znáznornění kvadrupólového analyzátoři (Argoti, 2008, p. 36, upraveno)

Kvadrupól je složen ze 4 paralelně uspořádaných tyčí s hyperbolickým průřezem. Dvě protilehlé tyče jsou propojeny tak, že jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného kladného napětí, další dvě jsou připojeny k zápornému zdroji. Kromě stejnosměrného napětí (U) je na tyče vkládáno také vysokofrekvenční napětí (V). Kombinace těchto dvou zdrojů vytváří dvou dimensionální elektrické pole, které určuje trajektorii iontů a jejich detekci [24, p. 35]. Jestliže do analyzátoři vstoupí kladně nabitý ion, bude se pohybovat mezi záporně nabitými tyčemi po hyperbolické linii.

Potenciál na tyčích kvadrupólu je dán vztahem (12)

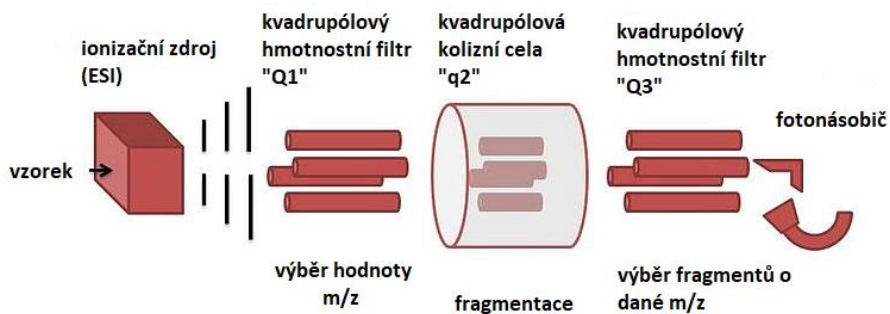
$$\Phi_0 = U - V \cos \omega t \quad (12)$$

kde ω – úhlová rychlost, V – amplituda střídavého (vysokofrekvenčního) napětí, U – stejnosměrné napětí, t – čas [23, p. 91]. Poměr U a V je udržován konstantní stejně jako ω a pro selekci iontů se mění jednotlivé hodnoty napětí. Ionty jsou v analyzátoru tedy ovlivňovány oscilujícím elektrickým polem, které je dáno hodnotami U a V . Zvolené ionty cestují po stabilní trajektorii směrem k detektoru, ostatní jsou vybity na tyčích. Po vstupu do analyzátoru jsou ionty urychleny do prostoru mezi tyčemi, který se nachází ve směru osy z a v ose x a y se nachází tyče kvadrupólu.

Fyzikální proměnné, kteří řídí trajektorii iontů jsou založeny na diferenciální rovnici druhého řádu, zvaná Mathieuova rovnice. [24, p. 35] Řešením této rovnice jsou dva parametry a_u a q_u , které určují, jaké hodnoty U , V a ω musí být nastaveny, aby iont o zvolené hodnotě m/z prošel tyčemi do detektoru. [23, pp. 92–93]

2.2.4.2 Trojitý kvadrupól

Mezi často používaný typ tandemového MS spektrometru je trojitý kvadrupól, značená QqQ (obr. 11), kde jsou zapojeny tři kvadrupólové analyzátoři v sérii. Části



Obr. 11. Znárodnění trojitého kvadrupólu (QqQ) (Yost, 1979, p. 1251, upraveno)

značené Q1 a Q3 mají roli hmotnostního analyzátoru, zatímco q2 vystupuje jako kolizní cela, ve které dochází k fragmentaci iontů pomocí kolizí indukované disociace (CID).

Ionty putující do kolizní cely jsou vybírány v prvním kvadrupólu. Kolizní cela je naplněna kolizním plynem a propouští všechny ionty. Pracuje pouze s vysokofrekvenčním napětím, vkládané na tyče. Při srážce analytu s inertním plynem (He , N_2) dojde k předání energie, která se mění z kinetické na vnitřní a dochází k fragmentaci původního iontu [23, p. 99]. V případě použití reaktivního plynu může docházet k iontově-molekulovým reakcím

[26, p. 2162]. Ve třetím kvadrupólu jsou analyzovány fragmenty a produkty z kolizní cely a propouštěny na detektor.

Kromě tří kvadrupólu se v systému nachází iontová optika, například čočky, oktapóly a hexapóly pro směřování dráhy iontů směrem do hmotnostního analyzátoru. [24, p. 38]

2.2.4.3 Druhy iontových chromatogramů

Iontový chromatogram je záznam reprezentující výskyt a intenzitu iontu v daném retenčním čase a existuje několik druhů těchto chromatogramů

Chromatogram celkového iontového proudu – TICC („total ion current chromatogram“), kdy se jedná o souhrn všech iontů v daném spektru díky tomu, že Q1 a Q2 propouští veškeré ionty v určitém rozsahu m/z o Q3, kde jsou skenovány a zaznamenány. [27, p. 24]

MRM / SRM chromatogram („multiple reaction monitoring“, „selected reaction monitoring“) kde dochází k monitoringu jedné reakce rodičovského iontu se známou hodnotou m/z za vzniku produktového iontu také se známou m/z . Jedná se o režim využívaný ke kvantifikaci pomocí MS.

Chromatogram extrahovaných iontů – EIC („extracted ion chromatogram“), což je chromatogram jednoho vybraného iontu s danou hodnotou m/z . Takový záznam umožňuje zobrazení retenčního času jednoho konkrétního iontu, tedy jeho lokalizaci a stejně tak zobrazení nečistot či dalších látek. [28]

2.3 PROTEINOVÉ TYROSIN KINÁZY

Proteinové tyrosin kinázy (PTK) katalyzují přenos fosfátu z ATP na tyrosinové zbytky na proteinovém substrátu. Fosforylace tyrosinových zbytků moduluje enzymatickou aktivitu a vytváří vazebné místo pro signalizační molekuly. Touto cestou dochází k tomu, že extracelulární signální molekuly jsou schopny ovlivňovat funkci a procesy cílových buněk. Mezi procesy ovlivňované kinázami patří například mitóza, která je závislá na interakci extracelulárních růstových faktorů s příslušnými receptory v membráně. Dalším procesem je například cyklus dělení buněk, kdy jednotlivé fáze dělení jsou regulovány právě kinázami. [29]. Dále mají PTK významnou roli v regulaci diferenciaci, růstu buněk, apoptóze, podílí se na tvaru buňky či adhezi. Vzhledem k jejich stěžejní roli k organismu není divu, že jsou

zapojeny do množství lidských onemocnění a poruch, jako je ateroskleróza, nemoci ledvin, neurologické poruchy, leukémie a nádorové onemocnění. [30]. Z toho důvodu musí být jejich katalytická aktivita striktně regulována.

Analýzou lidské genomové sekvence bylo odhaleno přibližně 518 lidských PTK a alespoň 90 z nich bylo identifikováno. Jsou děleny do dvou skupin – receptorové tyrosin kinázy (RTK) a nereceptorové (NRTK) a seskupeny do rodin. Nejprozkoumanější rodinou tyrosin kináz je rodina označována jako EGFR. [31, p. 2]

Příčinou řady nemocí je špatná funkce PTK, většinou se jedná o zvýšenou aktivitu někdo proteinů. Přes 80% onkogenů, které způsobují vznik rakoviny v lidském organismu, je kódováno právě PTK. Kromě rakovinných onemocnění se podílí také na méně závažných nemocích jako je lupénka či pulmonální fibróza. Jsou případy, ve kterých je možné jeden konkrétní PTK, resp. jeho zvýšenou aktivitu, přiřadit určitému onemocnění. Například chronická fáze chronické myeloidní leukémie (CML), kde jedním z příčin vzniku leukémie je fúzní protein BCR-ABL, což je produkt Filadelfského chromozomu. [32]

Při hledání nízkomolekulárních terapeutických látek působících proti rakovině bylo cíleno na PTK hned z několika důvodů:

Zaprvé, v každé buňce se nachází zhruba 200 – 300 proteinových kináz, jsou tedy velmi rozšířené a bude snadnější je v buňce zacílit. Zadruhé lze předpokládat, že proteinové kinázy se budou nacházet v blízkosti onkogenů či tumorů. Třetím důvodem je rozložení většího množství ATP vazebných míst napříč tyrosin kinázami, což umožňuje tvorbu farmokoforových modelů a design léčiv. [33]

Veškeré proteinové kinázy využívají jako substrát ATP. Z toho důvodu je v rámci struktury proteinových kináz silně zastoupena primární aminokyselinová sekvence, která je schopna vázat ATP. [29]

2.3.1 INHIBITORY TYROSIN KINÁZ (TKI)

Nadměrná exprese specifických proteinových kináz je tedy spojena s určitým typem rakoviny u lidí. Z těchto znalostí lze tedy vyvodit, že látky, které budou schopny zastavit či omezit tuto katalytickou aktivitu proteinových kináz, by měl být schopny zablokovat nekontrolovatelný růst buněk, ke kterému u rakovin dochází. Inhibitory kináz jsou tedy

novým potenciálním léčivem nejen v oblasti rakoviny, ale jsou používány i pro léčbu cukrovky či Alzheimerovy choroby. [29]

Pro vývoj inhibitorů PTK bylo důležité objasnit jejich strukturu a ukázalo se, že RTK jsou multi-doménové proteiny. Jednou z domén je doména katalytická, která obsahuje ATP vazebná místa. Vývoj léčiv urychlilo zejména porozumění molekulárním interakcím různých částí vazebných míst ATP. Přestože ve struktuře tyrosin kináz se vyskytuje více ATP vazebných míst, díky drobným rozdílům v uspořádání domén bylo možné vyvinout vysoce selektivní inhibitory.

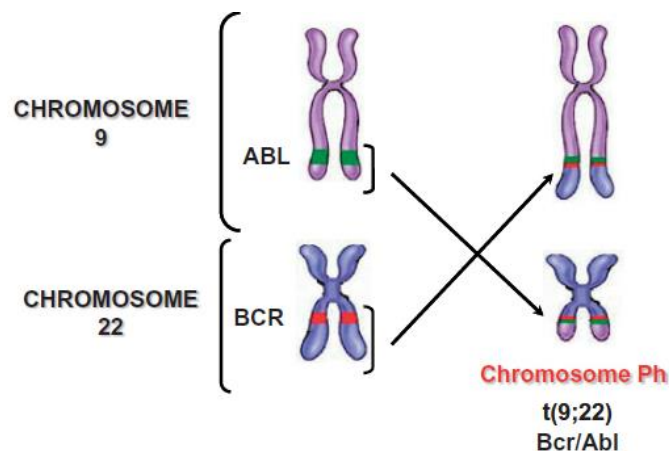
Většina malých molekul v klinickém vývoji léčiv se váže v blízkosti ATP vazebných míst cílových kináz a napodobují vazbu ATP. Jedná se tedy o kompetitivní inhibitory vazebných míst substrátu v katalytické doméně, čímž konkurují endogennímu ATP o vazbu a blokují aktivitu těchto kináz. V případě, že nedojde k přenosu ATP na kinázu, nedojde k její aktivaci a přenosům signálů. Byli vyvinuty i takové malé molekuly, které jsou schopny cílit na několik tyrosin kináz a mají tedy potenciál zablokovat více vazebných míst, čímž dochází k zvýšenému protinádorovému efektu. V roce 1980 byli popsány první přírodní TKI a od té doby byli značně rozvíjeni. [30]

2.3.2 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE (CML)

Přestože postupem času došlo k pokroku v diagnostice a léčbě rakoviny, stále je velmi častým zdrojem úmrtí. Dodnes se mezi dostupné léčebné procesy řadila operace, chemoterapie, radioterapie a endokrinní terapie. Ty byli schopny zajistit přežití u pacientů s některými typy nádorů, bohužel však stále odcházelo ke vzniku rezistence na léky a s léčbou byla často spojena i toxicita. Z toho důvodů je stále nutné vyvíjet novější metody léčby rakoviny, které by zajistili pacientům léčbu bez vážnějších vedlejších následků. [30] a jedním z nových slibných cílů pro léčbu rakoviny jsou TKI.

CML je myeloproliferativní porucha způsobena mutací, jež postihuje hematopoetické kmenové buňky, které mají na starosti péči o krvetvorné buňky. CML byla popsána již v roce 1845. V roce 1960 Dr. Nowell a Hungerford, pracující ve Filadelfii, popsali chromozomální abnormalitu, vyskytující se u pacientů s CML. Tento chromozom byl pojmenován jako Filadelfský chromozom (Ph). V roce 1972 Rowley popsal, že tento chromozom vzniká vzájemnou translokací mezi chromozomy 9 a 22 a fúzí mezi ABL genem

tyrosin kinázy na chromozomu 9 a BCR genu na chromozomu 22 (obr. 12). Výsledkem je fúzní gen BCR-ABL, který se od původní tyrosin kinázy strukturně liší a není ovlivněn regulačními mechanismy. Dochází poté k jeho nekontrolovatelnému dělení, jelikož je stále aktivní. Fúzní protein BCR-ABL zprostředkovává a udržuje vývoj CML pomocí signálních interakcí s dalšími buňkami, které vedou k buněčné adhezi, spuštění mitózy či inhibují apoptózu poškozených buněk. Tyhle procesy vedou k transformaci hematopoetických kmenových buněk. Signalizační procesy vedené BCR-ABL proteinem jsou často spojeny s narušením opravných procesů DNA, což vede k dalším chromozomálním změnám a mutacím. [34]



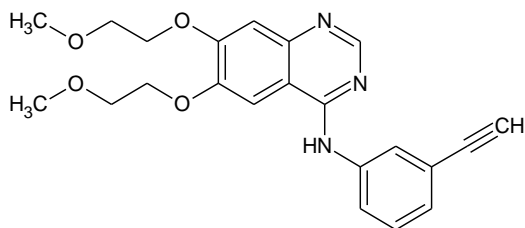
Obr. 12. Vznik fúzního BCR-ABL proteinu [31, p. 8]

Prvním TKI, který byl použit pro léčbu CML, je Imatinib. V případě pokročilého onemocnění však docházelo k velmi rychlému nástupu resistance vůči tomuto léčivu. Resistance může vzniknout na základě několika mechanismů, například přílišné zmnožení BCR-ABL proteinu či nízká biologická dostupnost Imatinibu [35, p. 469]. Pro překonání této odolnosti byli vyvíjeny nová léčiva na bázi TKI, jako je dasatinib či bosutinib (SKI-606). V dnešní době jsou léčiva na bázi TKI prvotní volnou pro léčbu CML. [34]

2.3.3 ERLOTINIB

Jedná se o silný a selektivní inhibitor rodiny EGFR tyrosin kináz s hodnotou IC_{50} 20 nM. Studie *in vitro* s lidskými buněčnými liniemi tlustého střeva postiženého rakovinou ukázali, že erlotinib zpomaluje postup buněčného cyklu a spouští u poškozených buněk

apoptózu. Ke zvýšení protinádorové aktivity došlo ve spojení s chemoterapií či radioterapií. [30]

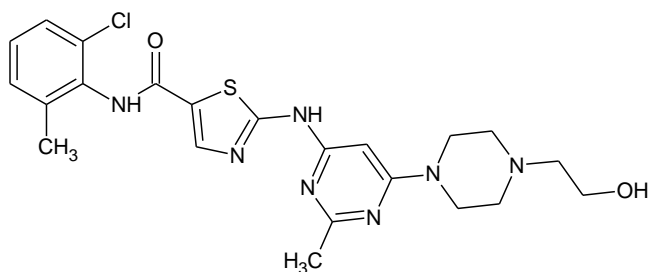


Obr. 13. Chemická struktura erlotinibu [36, p. 1490]

Pro stanovení erlotinibu (obr. 13.) a jeho metabolitů byla popsána řada metod jako je HPLC-UV/VIS, HPLC-QqQ, LC-MS/MS a jiné. Vhodnou alternativou namísto LC-MS metod je CZE a byla vyvinuta rychlá, snadná a citlivá metoda pro stanovení erlotinibu a jeho metabolitů v lidské moči pomocí CE s UV detekcí. [36]

2.3.4 DASATINIB

Jedná se o subnanomolární inhibitor bránící interakci BCR-ABL proteinu s ATP tím, že soutěží o vazebné místo na tyrosin kináze v BCR-ABL buňce. To vede k inhibici proteinu, resp. jeho schopnosti fosforylace a tedy aktivace, a protože tak buňka přichází o zdroj fosfátu, dojde k zastavení jejího růstu či dokonce apoptóze. Léčivo je schopno inhibovat hned několik tyrosin kináz, kdy kromě samotného BCR-ABL proteinu působí také na jeho zmutované verze a další rodiny TKI, například SCR, a je 100 až 300krát účinnější než Imatinib. [35, p. 469]



Obr. 14. Chemická struktura dasatinibu, komerčně značen Sprycel (Gonzalez et al., 2017, p. 401)

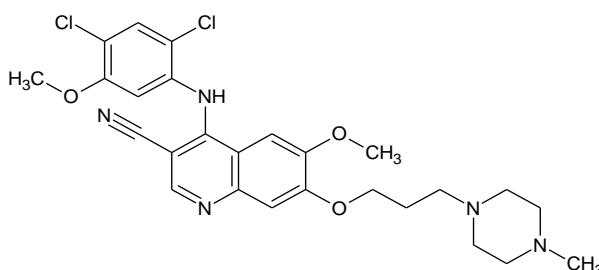
Dasatinib (obr. 14.) je považován za významné protinádorové léčivo a je tedy nutné mít vhodné analytické metody pro jeho stanovení v komplexní matrici, jako jsou tablety či

biologické vzorky. Mezi vhodné metody patří UHPLC a CZE. CZE je rychlá, účinná a široce využívaná separační technika pro analýzu farmaceutických vzorků. Hlavní výhodou CZE je malé množství vzorku potřebného pro analýzu, vysoká separační účinnost a krátký čas analýzy. [37, p. 401]

2.3.5 BOSUTINIB

Bosutinib (obr. 15.) je podobně jako dasatinib duální léčivo, je tedy schopnost opět inhibovat jak BCR-ABL protein, tak i SCR rodinu PTK, a je aktivní již v rozsahu nanomolárních koncentrací.

Prvotní analytickou metodou byla HPLC spojená se složitou L-L extrakcí a delšími časy analýzy. V dnešní době je běžně užívanou analytickou metodou pro kvantifikaci léčiv z biologických matric je UPLC-MS/MS. Její výhodou je především citlivost, specifita a rychlost. [38, p. 9188]

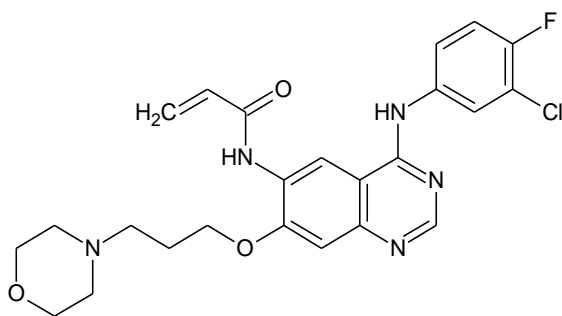


Obr. 15. Chemická struktura bosutinibu [38, p. 9184]

2.3.6 CANERTINIB

Canertinib (obr. 16.) je nejméně prozkoumané léčivo z uvedených TKI a jeho inhibiční aktivita není přesně specifikována. Je ovšem známo, že jeho působením dochází k blokaci a inhibici enzymatické aktivity BMX, což je kináza vázaná v kostní dřeni, a fosforylaci Stat3, což je transkripční faktor aktivován právě díky fosforylaci tyrosinového zbytku BMX, a podílí se na tvorbě specializovaných buněk tvořících kostní tkáň. [39, p. 97]

Bylo zjištěno, že aktivace Stat3 hraje rozhodující roli v průběhu metastáze, včetně proliferace a přežití buněk, jejich invaze a migrace a podílí se tedy na rozšiřování nádorových onemocnění v organismu. [40]



Obr. 16. Chemická struktura canertinibu [41]

Při zpracování rešerše byli objeveny publikace na stanovení canertinibu pomocí metod LC-MS/MS, LC-NMR-MS a CZE.

Při zpracování rešerše nebyla u žádného z uvedených léčiv nalezena publikace zabývající se jejich stanovením metodou CE-MS. U všech byly ale nalezeny metody pro stanovení pomocí CE, které jsou uvedeny u jednotlivých látek. Všechny čtyři byli společně s dalšími stanovovány pomocí CZE [42], kdy se podařilo validovat metodu a veškeré analyty stanovit v jedné analýze.

Vzhledem k tomu, že při stanovení analytů pomocí CE dochází k detekci iontů, je zřejmé, že se stanovované látky účastní disociační rovnováhy. Proto je významnou hodnotou disociační konstanta. J ednotlivé konstanty vybraných inhibitorů jsou uvedeny v Tab. 3 ve tvaru pKa.

Tab. 3. Disociační konstanty vybraných inhibitorů tyrosin kináz [43]

Analyt	pKa
Bosutinib	8,43
Dasatinib	7,22
Erlotinib	4,62
Canertinib	6,87

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Měření bylo prováděno na přístroji kapilární elektroforézy Agilent 7100 s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s trojitým kvadrupólovým analyzátozem a ionizací pomocí elektrospreje. Pomocná sprejovací kapalina byla přiváděna izokratickou LC pumpou Agilent 1260 a před vstupem do spojení CE-ESI-MS (interface) dělena děličem toku v poměru 1:100. Průtok sprejovací kapaliny byl nastaven na 1 ml/min.

Pro ovládání přístroje a sběr signálu byl použit software MassHunter, verze B.06.00.

Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára firmy Molex s vnitřním průměrem 50 μm a celkovou délkou 90 cm. Každý den byla kapilára kondicionována promytím 0,1 M NaOH (10 min) a deionizovanou vodou (10 min). Mezi každým měřením byla kapilára promývána deionizovanou vodou (2 min) a základním elektrolytem (3 min).

K přípravě vzorků a roztoků byla použita třepačka VORTEX IKA MS 3 Basic od firmy Merci, Centrifuga Eppendorf MiniSpin od firmy Merci, a pH metr laboratorní WTW inoLab pH 7110 od firmy Merci

3.2 CHEMIKÁLIE A POMŮCKY

Veškeré použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v čistotě p.a., vyjma methanolu a vody, které byly v čistotě LC-MS.

Chemikálie: deionizovaná voda, kyselina mravenčí, kyseliny octová, methanol pro LC-MS, H₂O pro LC-MS, hydroxid sodný (standardní roztok o koncentraci 0,1001 mol/l od firmy Sigma-Aldrich), standardy inhibitorů tyrosin kinázy (TKI) – bosutinib, dasatinib, erlotinib, canertinib

3.3 PŘÍPRAVA STANDARDU

Standardy stanovovaných látek byly připraveny v koncentraci 10^{-4} (mol/l). Jednotlivé standardy byly připraveny navážením příslušného množství TKI a rozpuštěním v MeOH pro LC-MS. Následně byla připravena směs všech 4 TKI v poměru 1:1:1:1. Pro důkladné rozpuštění byl použit ultrazvuk a vortex.

Připravené roztoky standardů byly uchovávány v lednici.

3.4 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU (ZE)

Pro přípravu základního elektrolytu bylo nutné zvolit těkavá rozpouštědla, aby nedocházelo ke kontaminaci iontového zdroje. Mezi zvolená rozpouštědla patří kyselina mravenčí a octová, bez aditiv a solí, kterými by opět mohlo dojít k zanesení systému MS.

3.4.1 KYSELINA MRAVENČÍ

Základní elektrolyt byl připraven o koncentracích 200, 100, 50 a 10 mM. Příprava byla provedena odpipetováním příslušného množství dané kyseliny do 250 ml odměrné baňky, doplněna po rysku vodou pro LC-MS a promíchána.

3.4.2 KYSELINA OCTOVÁ

Základní elektrolyt byl připraven o koncentracích 100, 50 a 10 mM. Příprava byla uskutečněna odpipetováním příslušného množství dané kyseliny do 250 ml odměrné baňky a doplněna po rysku vodou pro LC-MS a promíchána.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při práci v laboratoři bylo cílem vyvinout metodu na separaci vybraných inhibitorů tyrosin kinázy, konkrétně bosutinibu, dasatinibu, erlotinibu a dasatinibu, pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem, jakožto detektorem. Molární hmotnosti těchto látek jsou uvedeny v Tab. 4.

Mezi optimalizované parametry patří složení elektrolytu, podmínky separace a podmínky detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Po optimalizaci systému následovala kalibrace.

Tab. 4. Názvy analytů s jejich molární hmotností a protonovanou molekulou

Analyt	Molární hmotnost M_r [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	$[\text{M}+\text{H}]^+$
Bosutinib	530,4	531,4
Dasatinib	488,0	489,0
Erlotinib	393,4	394,3
Canertinib	485,9	486,9

Vzhledem k tomu, že metoda by v budoucnu měla být použita pro stanovení analytů v biologickém materiálu, kde se nachází ve velmi nízkých koncentracích, je nutné vyvinout metodu dostatečně citlivou. Z toho důvodu je hodnocena na prvním místě plocha píku spolu s výškou a teprve poté je brán do úvahy čas analýzy.

4.1 OPTIMALIZACE CE

V rámci CE byly optimalizovány dva hlavní parametry. Jedná se o složení základního elektrolytu a jeho pH.

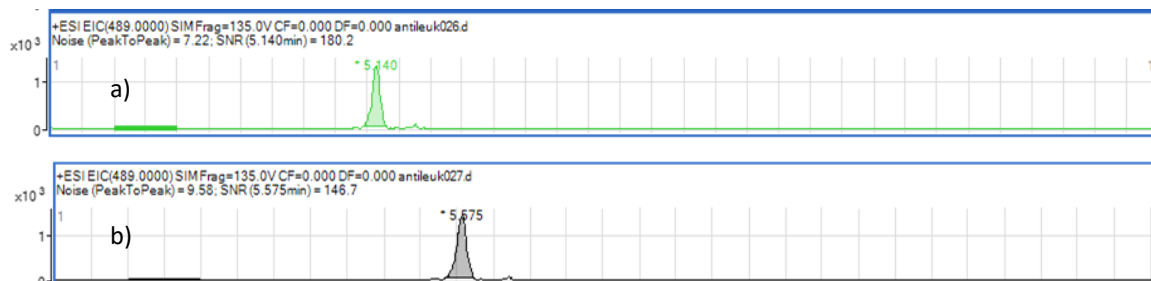
Při práci se samotnou elektroforézou by se optimalizovalo i napětí vkládané na elektrody, ovšem spojení s MS tuhle možnost limituje na maximální procházející elektrický proud 50 μA . V analýzách bylo použito napětí 20 kV, které zaručilo dostatečnou rychlost separace s procházejícími elektrickými proudy do 50 μA .

4.1.1 DÁVKOVÁNÍ

Dávkování vzorku bylo prováděno hydrodynamicky za tlaku 100 mbar. Během optimalizace byl zkoušen vliv doby dávkování vzorku a pufru na výsledek, resp. rychlost analýzy (první byl dávkován vzorek a pak elektrolyt). S rostoucím časem dávkování vzorku byl jasně viditelný nárůst ploch a výšek píků, zatímco zvyšující se doba dávkování pufru způsobila zkrácení času analýzy a migračních časů (tab. 5.). Ke změně času analýzy došlo díky tomu, že nadávkovaný pufr posunul zónu analytů dále do kapiláry (obr.17) a ta dříve doputovala k detektoru.

Tab. 5. Plochy a výšky píků dasatinibu při různém dávkování v prostředí 10 mM CH₃COOH

Dávkování vzorku [s]	Dávkování pufru [s]	Plocha píku	Výška píku	Migrační čas [min]
10	200	4 951,93	769,19	2,654
30	100	11 239,42	1,301,27	5,14
30	50	13 343,29	1 405,16	5,575



Obr. 17. Elektroforegramy analýz při a) 100 s dávkování pufru a za b) 50 s dávkování pufru s migračními časy uvedenými nad píkem

Bez dávkování pufru za vzorkem byla doba analýzy desítky minut.

Časy dávkování (jak vzorku, tak elektrolytu) byly optimalizovány. Doba dávkování vzorku byla nastavena na 10 s, protože nedocházelo k problémům se stabilitou procházejícího elektrického proudu (analýzy byly více opakovatelné). Doba dávkování elektrolytu byla zvolena na 120 s, protože poskytovala dostatečně rychlé analýzy (dostatečné posunutí zóny analytů v kapiláře), ale zároveň došlo k separaci všech studovaných analytů pomocí kapilární elektroforézy.

4.1.2 SLOŽENÍ A pH ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU

U složení elektrolytu je nutné vzít do úvahy těkavost složek a zvolit činidla a rozpouštědla netěkavá, aby nedošlo ke kontaminaci MS systému při sprejování. Všechny analyty, jak již bylo zmíněno, migrují v kyselém prostředí jako kationty. Z toho důvodu bylo studováno použití kyseliny octové a mravenčí jako základního elektrolytu, bez dalších aditiv.

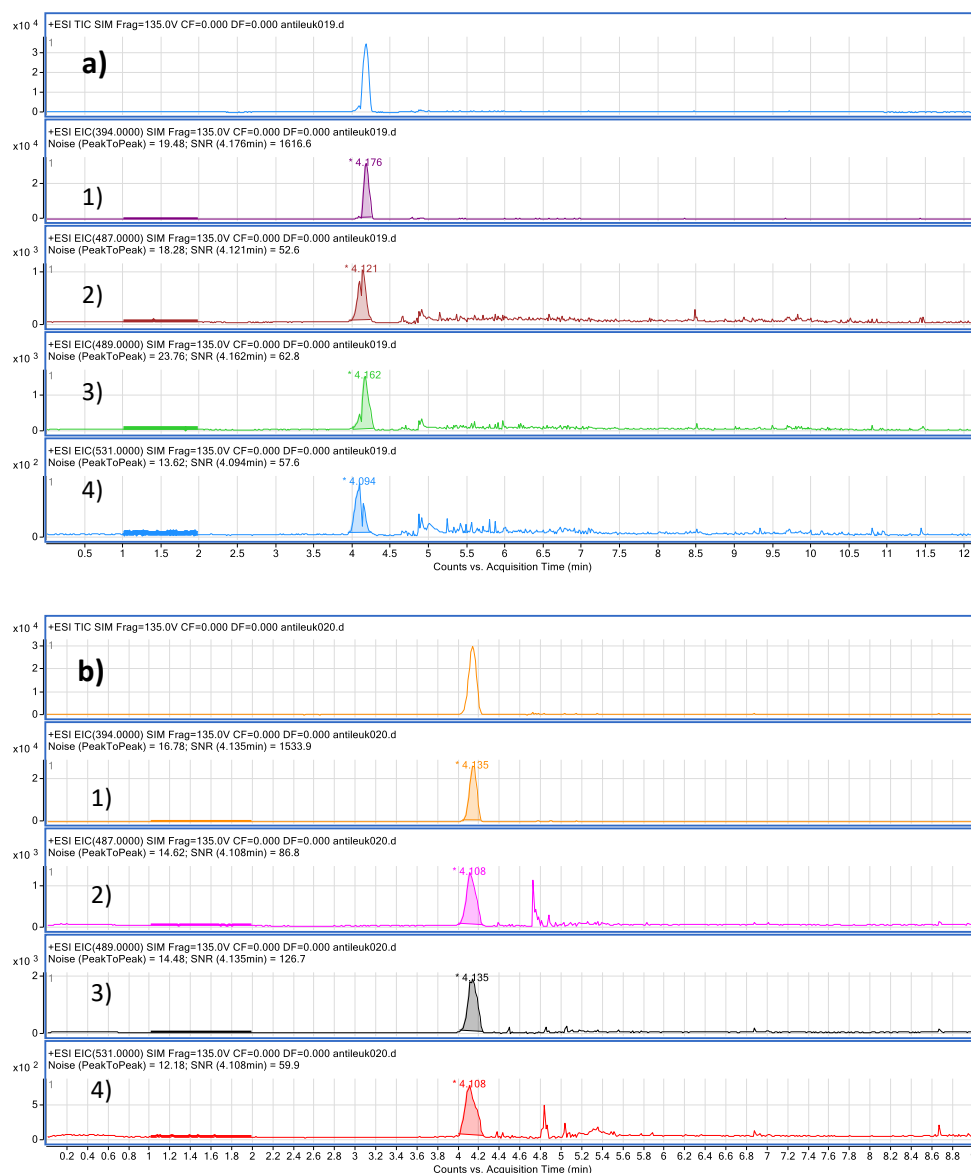
Jako první se optimalizovalo pH základního elektrolytu. pH má na separaci v CE značný vliv proto, že ovlivňuje EOF a náboj látek, což ovlivňuje jejich elektroforetickou mobilitu.

Pro určení optimálního pH byla provedena série měření s oběma kyselinami o různých koncentracích a tím i pH (tab. 6). Hodnoty pH byly vypočteny pomocí programu Peakmaster 5.3. [44]

Tab. 6. Hodnoty pH připravených základních elektrolytů

Základní elektrolyt	Koncentrace [mmol.l ⁻¹]	pH
Kyselina mravenčí	200	2,232
	100	2,386
	50	2,540
	10	2,906
Kyselina octová	100	2,881
	50	3,033
	10	3,387

Optimální prostředí (elektrolyt i pH) bylo zvoleno na základě rychlosti analýzy a účinnosti separace (obr. 18). Na zobrazených elektroforegramech lze vidět, že v prostředí 50 mM HCOOH byly získány ostřejší píky, nedocházelo tedy uvnitř kapiláry k rozmývání zón a také byl pozorován menší šum, než v prostředí 100 mM HCOOH (obr. 18a). Z těchto důvodů byla jako základní elektrolyt zvolena 50 mM HCOOH (obr. 18b), se kterou se pracovalo dále.



Obř. 18. Elektroforegramy analýz s a) 100 mM a b) 50 mM CHCOOH; 1) erlotinib, 2) canertinib, 3) dasatinib, 4) bosutinib

4.2 OPTIMALIZACE MS

V rámci hmotnostního spektrometru byly optimalizovány zejména podmínky týkající se iontového zdroje. Jako iontový zdroj byl použit ESI a mezi optimalizované parametry patří sprejovací napětí, teplota, tlak a průtok zmlžovacího plynu. Jako zmlžující plyn byl použit dusík N₂. Veškerá měření byla provedena třikrát.

Složení stínící kapaliny bylo zvoleno na základě předchozích experimentů a jedná se o směs MeOH a H₂O pro LC-MS v poměru 1:1. Její průtok byl nastaven na lineární pumpě

na 1 ml / min, tok byl pak dělen děličem 1:100 tak, aby průtok pomocné kapaliny v elektrospreji byl 10 µl/min.

Jako detektor byl použit trojitý kvadrupól a v průběhu optimalizace byli používány dva režimy. Prvním byl TIC, kdy byly sbírány všechny ionty (následující obrázky obsahují buď záznam při TIC režimu nebo extrahované záznamy při daném m/z charakteristickém pro analyty, případně obojí), a při kalibraci byl použit SRM režim.

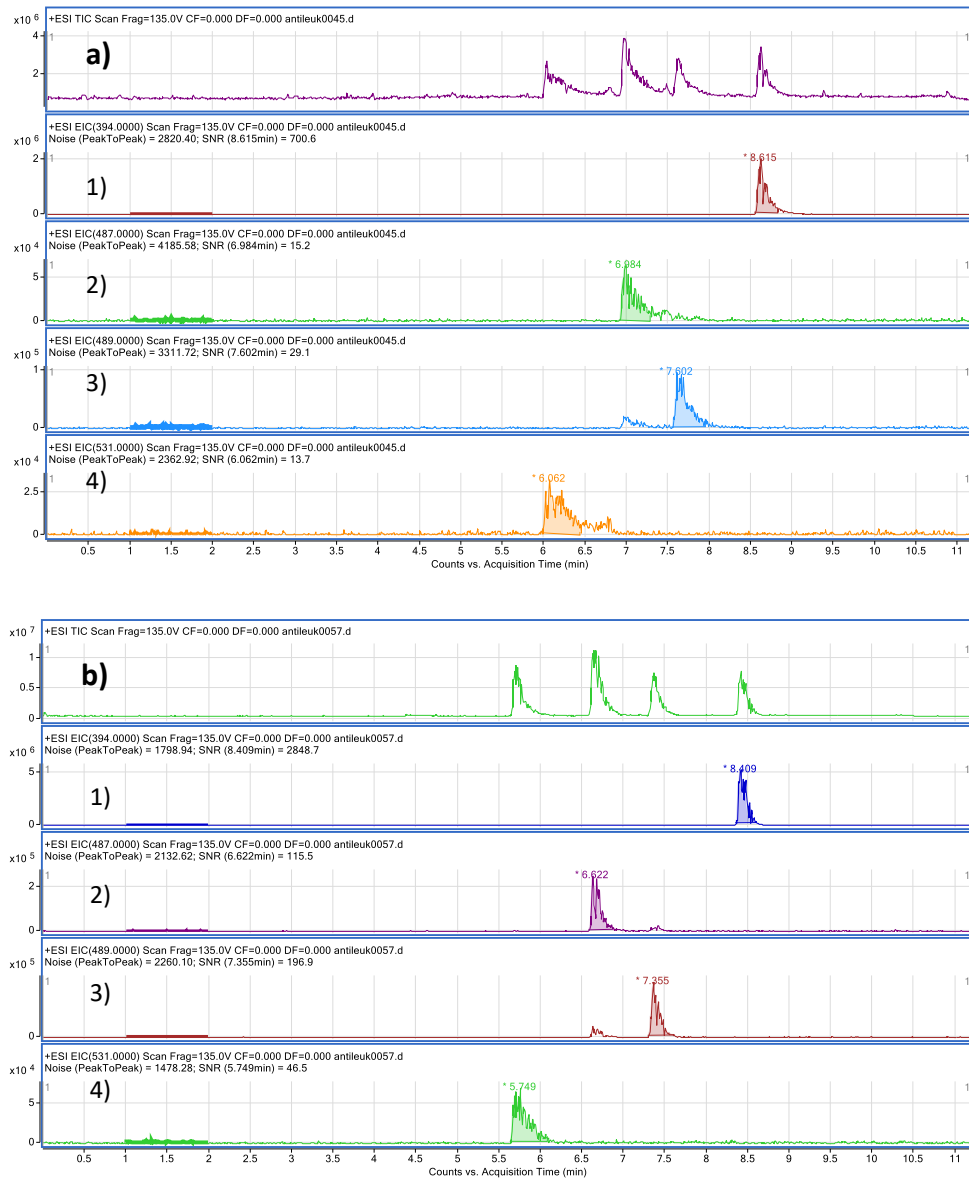
4.2.1 SPREJOVACÍ NAPĚTÍ

Na špičku ESI bývá vkládáno napětí v rozmezí 3 – 5 kV. V této práci bylo aplikováno napětí v rozmezí 3 – 4,5 kV s nárůstem o 0,5 kV. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 8 spolu s integrovanými hodnotami analytů, které byly srovnány a podle nichž bylo zvoleno optimální sprejovací napětí.

Tab. 8. Plochy, výšky píků a migrační časy vybraných TKI při různém napětí

Analyt	Sprejovací napětí [kV]	Plocha píku	Výška píku	Migrační čas [min]
Bosutinib	4,5	403 727,66	32 406,33	6,062
	4	820 557,70	143 801,80	5,518
	3,5	252,424,06	21 990,55	6,062
	3	120 589,39	9 975,78	5,856
Dasatinib	4,5	874 668,75	96 407,85	7,602
	4	2 841 665,13	620 242,44	6,96
	3,5	519 693,55	64 104,81	7,775
	3	305 995,39	38 411,61	7,388
Erlotinib	4,5	11 319 050,39	1 976 032	8,615
	4	31 868 896,69	5 982 903,17	7,849
	3,5	6 696 642,94	1 197 270,31	8,928
	3	4 385 134,21	819 309,73	8,409
Canertinib	4,5	585 531,89	63 673,55	6,984
	4	1 75 0757,23	248 684,67	6,284
	3,5	318481,33	37462,7	7,05
	3	195 229,05	29 435,51	6,745

Z Tab. 8 je jasně vidět, že hodnoty ploch a výšek píků s rostoucím napětím stoupají a dochází tedy k účinnější ionizaci analytů. U napětí 4,5 kV (obr. 19a) dochází ovšem ke značenému poklesu, protože dochází k narušení Taylorova kužele a napětí je pro systém příliš vysoké. Jako optimální napětí bylo tedy zvoleno napětí 4 kV (obr. 19b), při kterém byly získány nejvyšší hodnoty a také je vidět pokles retenčních časů, snížení doby analýzy a menší šum základní linie.



Obr. 19. Elektroforegramy analýz při napětí a) 4,5 kV a b) 4 kV; 1) erlotinib, 2) canertinib, 3) dasatinib, 4) bosutinib

4.2.2 TEPLOTA ZMLŽOVACÍHO PLYNU

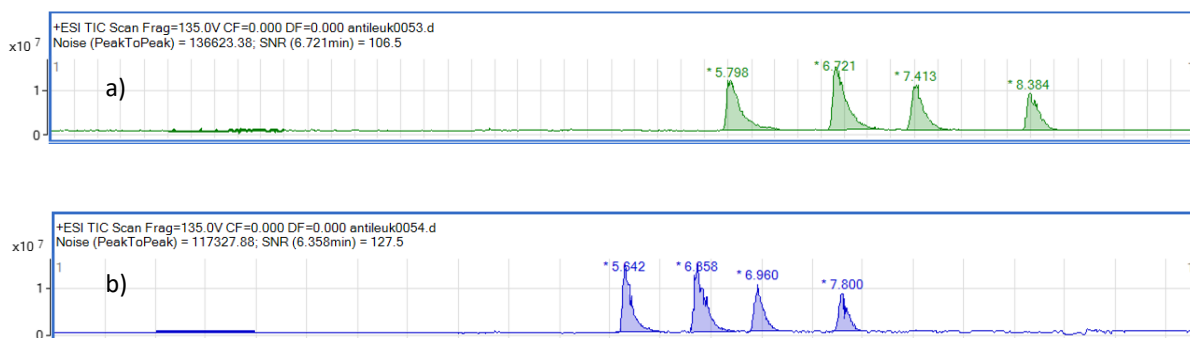
Teplota zmlžovacího plynu byla nastavena na hodnoty 250, 300 a 350 °C. Dochází při ní k odpařování rozpouštědla a tvorbě iontů. Cílem bylo dohledat teplotu, při níž bude odpařování a vznik iontů co nejefektivnější.

V Tab. 9. je zobrazena ukázka analytů při různých teplotních hodnotách.

Tab. 9. Plochy, výšky píků a migrační časy vybraných TKI při různé teplotě zmlžovacího plynu

Analyt	Teplota [°C]	Plocha píku	Výška píku	Migrační čas [s]
Bosutinib	200	670 889	68 709,44	5,749
	250	939 620,04	137 196,82	5,634
	300	1 094 465,75	177 149,25	6,861
Dasatinib	200	2 339 901,39	445 073,38	7,355
	250	3 711 820,20	613 571,24	6,943
	300	3 359 263,25	666 678,94	8,277
Erlotinib	200	29 743 891,25	5 124 718,69	8,409
	250	35 661 546,80	6 304 667,69	7,791
	300	31 976 784,31	7 264 164,29	9,076
Canertinib	200	1 782 194,04	359 095,41	6,441
	250	1 892 134,57	300 479,17	6,35
	300	2571928,	474 272,01	7,6

Z Tab. 9 je vidět, že s rostoucí teplotou zmlžovacího plynu dochází k nárůstu ploch a výšek píků, ovšem u teploty 250 a 300°C jsou hodnoty podobné. Rozdíly lze pozorovat v migračních časech, které jsou za použití teploty 300°C vyšší. O výsledné teplotě plynu bylo rozhodnuto na základě elektroforegramů všech analytů (obr. 20.), na kterých lze vidět, že při teplotě 300°C dochází k lepší separaci jednotlivých látek a proto byla zvolena tato teplota jako optimální.



Obr. 20. Elektroforegramy analýz za teploty a) 300°C a b) 250°C

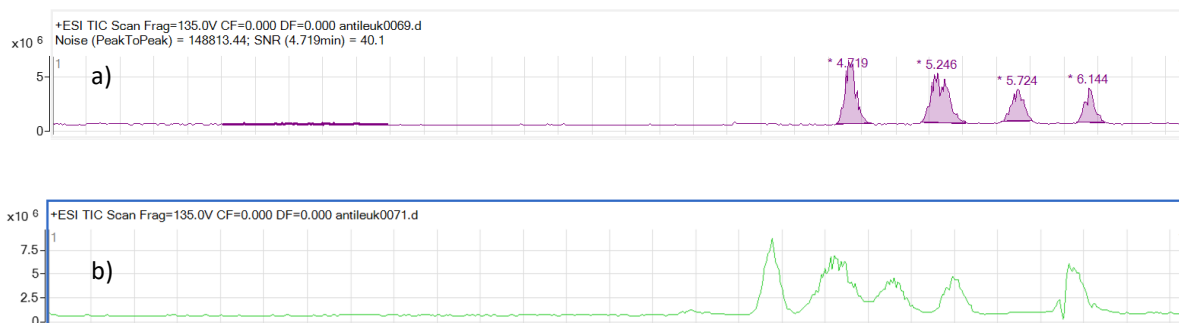
4.2.3 PRŮTOK ZMLŽOVACÍHO PLYNU

Průtok zmlžovacího plynu byl optimalizován při hodnotách 7, 10 a 13 l/min. V Tab. 10 jsou vypsány integrované hodnoty analytů při různých průtocích zmlžovacího plynu. U předchozích dvou parametrů je z Tab. 8 a 9. vidět, že retenční čas analytů se výrazně nemění, ovšem vlivem rozdílného průtoku plynu dochází k jeho posunu a zkrácení analýzy. Kromě citlivé metody je cílem vyvinout metodu dostatečně rychlou a jedná se tedy o významný parametr.

Tab. 10. Plochy, výšky píků a migrační časy vybraných TKI při různém průtoku zmlžovacího plynu

Analyt	Průtok [l/min]	Plocha píku	Výška píku	Retenční čas [s]
Bosutinib	7	657 127,75	123 882,33	3,352
	10	360 947,65	74 064,23	4,069
	13	199 420,03	53 060,65	4,744
Dasatinib	7	1 504 604,05	238 332,79	3,92
	10	939 734,12	177 497,19	4,653
	13	564 200,95	153 452,90	5,724
Erlotinib	7	16 104 468,45	2 791 110,31	4,192
	10	9 511 893,27	1 196 119,77	5,288
	13	9 898 208,99	2 734 452,74	6,144
Canertinib	7	1 201 801,29	160 310,74	3,673
	10	795 226,45	176 260,94	4,406
	13	461 765,64	112 332,82	5,23

Z Tab. 10 je jasně vidět, že intenzita ploch a výšek píků s rostoucím průtokem klesají, zatímco retenční čas roste. Cílem je vyvinout metodu co nejrychlejší, optimální by tedy z tohoto hlediska byl průtok 7 l/min, kde jsou i hodnoty ploch a píků nejvyšší.



Obr. 21. Elektroforegramy analýz za průtoku a) 13 l/min b) 7 l/min

Pro volbu optimálního průtoku byly brány do úvahy elektroforegramy analýz (obr. 21.), kde je vidět, že separace látek je v případě průtoku 7 l/min (obr. 21b) nedostatečná. Za použití průtoku 10 l/min tomu byli podobně, proto byla hodnota 13 l/min (obr. 21a) vyhodnocena jako optimální pro průtok.

4.2.4 TLAK ZMLŽOVACÍHO PLYNU

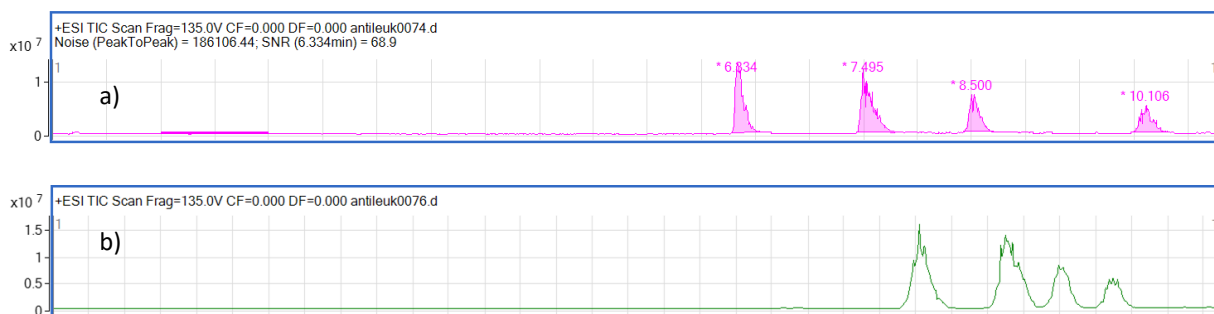
Posledním parametrem optimalizovaným v rámci MS je tlak zmlžovacího plynu. Ten byl testován v rozmezí 10 – 20 psi, konkrétně se jedná o hodnoty 10, 15 a 20 psi. Opět v Tab. 11 je ukázka integrovaných hodnot analytů při různých tlacích.

Tab. 11. Plochy, výšky píků a migrační časy vybraných TKI při různém tlaku zmlžovacího plynu

Analyt	Tlak [psi]	Plocha píku	Výška píku	Retenční čas [s]
Bosutinib	10	293 102,84	63 747,08	6,325
	15	199 420,03	53 060,65	4,744
	20	273 371,94	47 885,27	4,826
Dasatinib	10	1 377 791,49	355 352,55	8,5
	15	564 200,95	153 452,90	5,724

Erlotinib	20	856 540,64	175 183,15	5,609
	10	24 391 419,34	3 841 864,72	10,106
	15	9 898 208,99	2 734 452,74	6,144
Canertinib	20	21 903 051,21	4 248 688,96	5,897
	10	788 569,78	123 998,85	7,577
	15	461 765,64	112 332,82	5,23
	20	873 728,56	171 175,13	5,296

Z Tab. 11 je vidět, že nejvyšších hodnot bylo dosaženo za použití 10 a 20 psi. Při použití tlaku 10 psi došlo k nárůstu retenčního času až o 2 minuty, z toho důvodu byl jako optimální tlak zvolen 20 psi, kde jsou analýzy kratší, přestože jsou za jeho podmínek nižší hodnoty ploch a píků.



Obr. 22. Elektroforegramy analýz za tlaku a) 10 psi b) 20 psi

Na elektroforegramech (obr. 22.) je vidět, že za použití tlaku 20 psi (obr. 22b) je separace analytů horší, než při použití tlaku 10 psi (obr. 22a), ale píky jsou od sebe zřetelně odděleny.

S ohledem na nižší retenční čas a dostatečnou separaci byl zvolen jako optimální tlak 20 psi.

4.3 PARAMETRY METODY

Zatímco při optimalizaci byl použit TIC režim, pro kalibrační měření byl zvolen jako vhodnější režim SRM. Konkrétní SRM přechody byly zvoleny na základě měření hmotnostních spekter a studia fragmentace analytů. Pro kvantifikaci byly vybrány

nejintenzivnější přechody, které jsou shrnuty v Tab. 12 (výběr přechodů byl potvrzen i rešerší dostupné literatury) i s příslušným fragmentačním napětím.

Tab. 12. SRM přechody pro kvantifikaci analytů

Analyt	Přechod (m/z)	Fragmentační napětí
Bosutinib	530,0 --> 141,0	10 eV
Dasatinib	488,0 --> 401,0	20 eV
Erlotinib	394,0 --> 336,0	20 eV
Canertinib	486,0 --> 128,0	15 eV

4.3.1 OPAKOVATELNOST

Pro optimalizaci byla používána směs vybraných TKI o koncentraci 10^{-6} mol/l. Z této koncentrační hladiny byly stanoveny opakovatelnosti. V Tab. 13. jsou pro jednotlivé analyty uvedeny příslušné RSD hodnoty v %.

Tab. 13. Relativní směrodatné odchylky migračních časů a ploch píků vybraných TKI

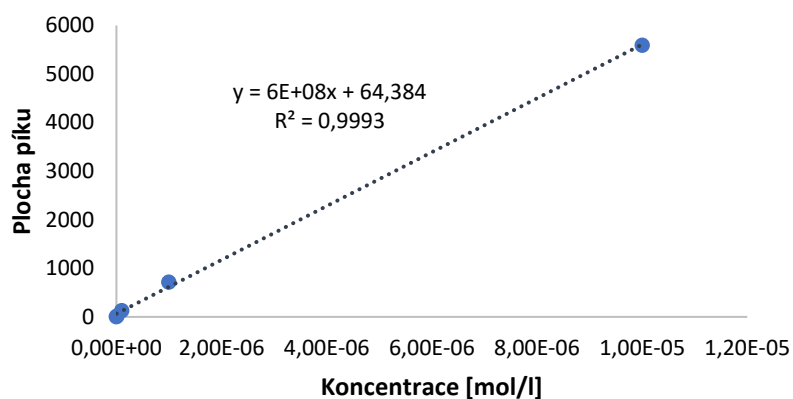
Analyt	Migrační čas [min]	RSD migračního času [%]	RSD plochy píku [%]
Bosutinib	4,78	0,77	2,5
Dasatinib	5,74	0,22	1,5
Erlotinib	6,20	0,47	3,8
Canertinib	5,29	1,09	6,4

Průměrné hodnoty byly vypočteny ze 3 měření za optimálních podmínek.

4.3.2 KALIBRACE

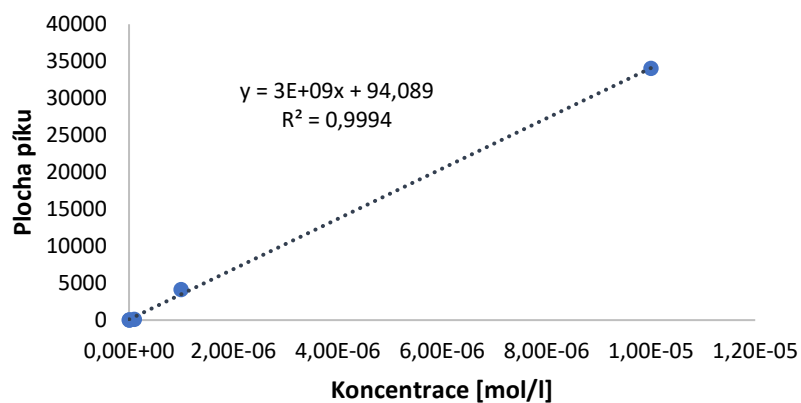
Pro každý z analytů byla sestavena kalibrační křivka (obr. 23. – 26.) jako závislost plochy píků na koncentraci směsi standardů.

Kalibrační závislost erlotinibu



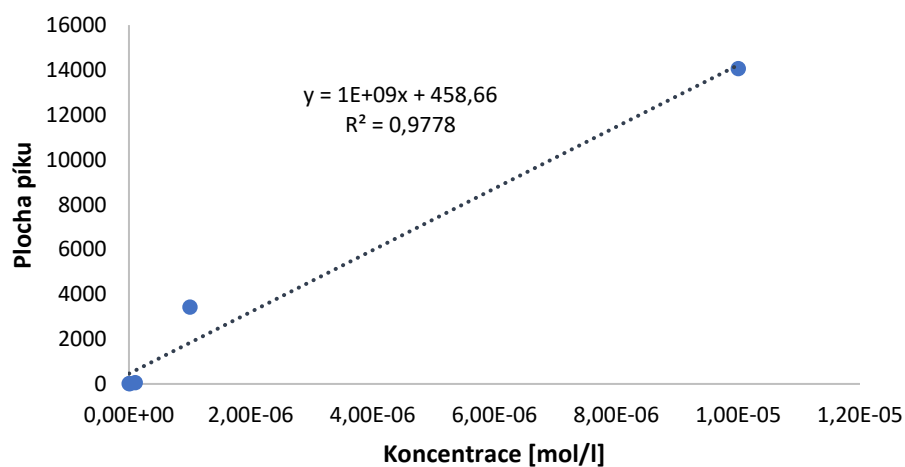
Obr. 23. Kalibrační křivka erlotinibu

Kalibrační závislost bosutinibu



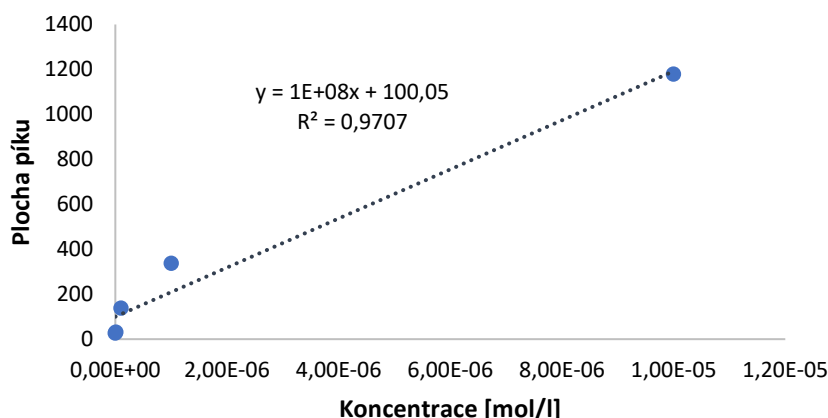
Obr. 24. Kalibrační křivka bosutinibu

Kalibrační závislost dasatinibu



Obr. 25. Kalibrační křivka dasatinibu

Kalibrační závislost canertinibu



Obr. 26. Kalibrační křivka canertinibu

Z obrázků je vidět, že kalibrační závislosti jsou lineární s koeficientem determinace od 0,9707 do 0,9994.

Na základě poměru signálu a šumu byly odhadnuty meze detekce (3 S/N) a meze stanovitelnosti (10 S/N) vybraných TKI. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 14. Mez detekce a stanovitelnosti vybraných TKI

Analyt	Mez detekce [mol/l]	Mez stanovitelnosti [mol/l]
Dasatinib	$8,6 \cdot 10^{-9}$	$2,9 \cdot 10^{-8}$
Bosutinib	$9,3 \cdot 10^{-8}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$
Erlotinib	$1,3 \cdot 10^{-8}$	$4,3 \cdot 10^{-8}$
Canertinib	$4,1 \cdot 10^{-9}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$

Mez detekce i stanovitelnosti jsou nižší, než jsou běžné klinické koncentrace, ve kterých se TKI vyskytují v tělních tekutinách. Metoda je tedy použitelná pro stanovení vybraných TKI v biologických vzorcích, např. v krvi. Navíc použití hmotnostního spektrometru jako detektoru umožňuje specifickou detekci TKI. Pro potvrzení přítomnosti TKI v krvi by bylo ještě nutné vybrat konfirmační SMR přechod pro každou TKI (jeden přechod pro kvantifikaci a jeden až dva další SRM přechody pro konfirmaci/identifikaci TKI).

ZÁVĚR

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro stanovení vybraných inhibitorů tyrosin kinázy pomocí CE-MS. Výhodou CE-MS je kombinace citlivosti, separace a strukturní informace. Je tedy vhodná pro analýzu biologického materiálu, např. krve.

Mezi vybrané inhibitory, které byly stanovovány, patří bosutinib, dasatinib, erlotinib a canertinib. Jsou to látky používané pro léčbu CML a vyskytují se ve velmi nízkých koncentracích.

Hlavní složkou vývoje metody byla optimalizace základních parametrů CE-MS. Jedná se o složení základního elektrolytu a jeho pH, sprejovací napětí a vlastnosti zmlžovacího plynu (tlak, teplota a průtok). Optimální hodnoty parametrů byli voleny na základě integrovaných hodnot a elektroforegramů.

Vyvinutá metoda má následující podmínky: nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a celkovou délkou 90 cm, základní elektrolyt 50 mM HCOOH, dávkování vzorku 100mbar/10s, dávkování pufru 100mbar/120s, separační napětí 20kV, sprejovací napětí 4kV, tlak zmlžovacího plynu (N_2) 20 psi, teplota 300°C a průtok 13 l/min, nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a celkovou délkou 90 cm. Průtok pomocné kapaliny byl nastaven na 1ml/min.

Po optimalizaci metody byly určeny její parametry. Byla tedy provedena kalibrace a určena opakovatelnost metody. Koeficienty determinace u kalibrace nabývají hodnot od 0,9707 do 0,9994. Na základě poměrů signálu a šumu byly LOQ a LOD, které jsou nižší než jsou klinické koncentrace vybraných inhibitorů a metoda je tedy použitelná pro jejich stanovení v biologických vzorcích.

SEZNAM ZKRATEK

CE – kapilární elektroforéza

CE-MS - kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií

CID – kolizí indukovaná disociace

CML – chronická myeloidní leukémie

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DAD – detektor s diodovým polem („diode array detector“)

EOF – elektroosmotický tok

ESI – elektrosprej

HPLC – vysoce účinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

L-L extrakce – extrakce kapalina-kapalina

LOD – mez stanovitelnosti

LOQ – mez detekce

MEKC – micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

SRM – multiple reaction monitoring – sken více fragmentačních přechodů

NRTK – nereceptorové tyrosin kinázy

PTK – protein tyrosin kinázy

QqQ – trojitý kvadrupól

RTK – receptorové tyrosin kinázy

SPE – extrakce pevnou fází

SRM – single reaction monitoring – sken jednoho fragmentačního přechodu

TKI – inhibitory tyrosin kináz

TOF – analyzátor doby letu

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné záření

ZE – základní elektrolyt

LITERATURA

- [1] J. P. Landers, *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*, Third. Taylor and Francis Group, 2008.
- [2] Z. Táborská, “Analýza designer drugs kapilární elektroforézou a hmotnostní spektrometrií,” Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.
- [3] Karel Štulík a kol., *Analytické separační metody*, First. Praha: Karolinum, 2004.
- [4] R. Ramautar, “CHAPTER 1: Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Metabolomics - From Metabolite Analysis to Metabolic Profiling,” *New Dev. NMR*, vol. 2018-Janua, no. 6, pp. 1–20, 2018, doi: 10.1039/9781788012737-00001.
- [5] Dale R. Baker, *Capillary electrophoresis*, First. New York: Wiley-Interscience, 1995.
- [6] K. D. Altria, *Capillary electrophoresis guidebook*. New Jersey: Humana Press Inc., 1996.
- [7] Aleš Mádr, “Využití kapilární elektroforézy při studiu metabolismu léčiv,” Masarykova Univerzita, 2008.
- [8] C. A. Monnig and R. T. Kennedy, “Capillary Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 12, pp. 280–314, 1994, doi: 10.1021/ac00084a013.
- [9] Ludmila Lněničková, “Chirální separace vybraných metabolitů pomocí CE-MS - diagnostika metabolických poruch,” Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.
- [10] M. G. Khaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis*, First. Wiley-Interscience, 1998.
- [11] A. G. Ewing, R. A. Wallingford, and T. M. Olefirowicz, “Capillary Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 61, no. 4, 1989, doi: 10.1021/ac00179a002.
- [12] Luboš Vančura, “Využití kapilární zónové elektroforézy pro stanovení nečistot v léčivech,” Univerzita Karlova v Praze, 2006.
- [13] M. A. Jenkins and M. D. Guerin, “Capillary electrophoresis as a clinical tool,” *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 682, no. 1, pp. 23–34, 1996, doi: 10.1016/0378-4347(95)00552-8.
- [14] S. C. Beale, “Capillary Electrophoresis,” *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 12, pp.

- 279–300, 1998, doi: 10.1021/a19800141.
- [15] J. R. Petersen, A. A. Mohammad, and H. Whatley, “Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis,” *Clin. Forensic Appl. Capill. Electrophor.*, pp. 21–58, 2003, doi: 10.1385/1-59259-120-5:21.
- [16] C. Jianyi and J. Henion, “Capillary electrophoresis-mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 703, pp. 667–692, 1995.
- [17] A. Týčová, V. Ledvina, and K. Klepárník, “Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications,” *Electrophoresis*, vol. 38, no. 1, pp. 115–134, 2017, doi: 10.1002/elps.201600366.
- [18] Agilent Technologies, “High Performance capillary elektrohoresis,” 5990–3777EN, 2014.
- [19] K. Lemr and L. Borovcová, “IONIZACE ELEKTROSPREJEM Karel Lemr a Lucie Borovcová,” *Chem. List.*, vol. 114, no. 2, p. 10, 2020.
- [20] R. D. Smith, J. H. Wahl, D. R. Goodlett, and S. A. Hofstadler, “Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 13, 1993, doi: 10.1021/ac00061a717.
- [21] S. Banerjee and S. Mazumdar, “Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte,” *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2012, no. January, pp. 1–40, 2012, doi: 10.1155/2012/282574.
- [22] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R. Udseth, “New Developments in Biochemical Mass Spectrometry: Electrospray Ionization,” *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 9, pp. 882–899, 1990, doi: 10.1021/ac00208a002.
- [23] H. de Edmond and S. Vincent, *Mass spectrometry - Principles and Applications*, Third. John Wiley and Sond Ltd, 2007.
- [24] D. Argoti, “Liquid chromatography-mass spectrometry for detection and characterization of DNA biomarkers and reactive metabolites,” *Chem. Biol.*, no. June, 2008.
- [25] R. A. Yost, “Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation,” *Anal. Chem.*, vol. 51, no. 12, 1979, doi: 10.1021/ac50048a002.
- [26] J. V. Johnson, R. A. Yost, P. E. Kelley, and D. C. Bradford, “Tandem-in-Space and Tandem-in-Time Mass Spectrometry: Triple Quadrupoles and

- Quadrupole Ion Traps,” *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 20, pp. 2162–2172, 1990, doi: 10.1021/ac00219a003.
- [27] M. Švidrnoch, “Spojení elektrokinetické chromatografie s hmotnostní spektrometrií v toxikologické a klinické analýze,” Univerzita Palackého v Olomouci, 2016.
- [28] M. Volný, “KVANTITATIVNÍ ANALÝZA S VYUŽITÍM HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE,” *Chem. List.*, vol. 114, no. 2, p. 8, 2020.
- [29] D. S. Lawrence and J. Niu, “Protein kinase inhibitors: The tyrosine-specific protein kinases,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 77, no. 2, pp. 81–114, 1998, doi: 10.1016/S0163-7258(97)00052-1.
- [30] S. Madhusudan and T. S. Ganesan, “Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy,” *Clin. Biochem.*, vol. 37, no. 7, pp. 618–635, 2004, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.05.006.
- [31] E. Gocek, A. N. Moulas, and G. P. Studzinski, “Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells,” *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 51, no. 3, pp. 125–137, 2014, doi: 10.3109/10408363.2013.874403.
- [32] A. Levitzki, “Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 82, no. 2–3, pp. 231–239, 1999, doi: 10.1016/S0163-7258(98)00066-7.
- [33] P. Traxler *et al.*, “Tyrosine kinase inhibitors: From rational design to clinical trials,” *Med. Res. Rev.*, vol. 21, no. 6, pp. 499–512, 2001, doi: 10.1002/med.1022.
- [34] X. An, A. K. Tiwari, Y. Sun, P. R. Ding, C. R. Ashby, and Z. S. Chen, “BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review,” *Leuk. Res.*, vol. 34, no. 10, pp. 1255–1268, 2010, doi: 10.1016/j.leukres.2010.04.016.
- [35] S. Redaelli *et al.*, “Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resisnat BCR/ABL mutants,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 3, pp. 469–471, 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.20.7183.
- [36] J. Rodríguez, G. Castañeda, L. Muñoz, D. Navarro, and J. C. Villa, “Simultaneous determination of erlotinib and metabolites in human urine using capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 35, no. 10, pp. 1489–1495, 2014, doi: 10.1002/elps.201300573.

- [37] A. G. Gonzalez, L. Taraba, J. Hraníček, P. Kozlík, and P. Coufal, "Determination of dasatinib in the tablet dosage form by ultra high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis, and sequential injection analysis," *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 2, pp. 400–406, 2017, doi: 10.1002/jssc.201600950.
- [38] L. Wang *et al.*, "Determination of bosutinib in mice plasma and tissue by UPLC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic and tissue distribution study," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 21, pp. 9184–9189, 2015, doi: 10.1039/c5ay01529d.
- [39] V. Von Manstein and B. Groner, "Tumor cell resistance against targeted therapeutics: the density of cultured glioma tumor cells enhances Stat3 activity and offers protection against the tyrosine kinase inhibitor canertinib," *Medchemcomm*, vol. 8, no. 1, pp. 96–102, 2017, doi: 10.1039/c6md00463f.
- [40] M. Z. Kamran, P. Patil, and R. P. Gude, "Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/421821.
- [41] W. A. Denny and G. W. Rewcastle, "Inhibitors of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway," *Cancer Drug Des. Discov.*, pp. 449–478, 2014.
- [42] J. Horská, P. Ginterová, J. Ševčík, and J. Petr, "CZE Separation of New Drugs for Treatment of Leukemia," *Chromatographia*, vol. 77, no. 21–22, pp. 1477–1482, 2014, doi: 10.1007/s10337-014-2730-9.
- [43] "Drug Bank." [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca>.
- [44] "<https://echmet.natur.cuni.cz/>."