

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**VYUŽITÍ MODERNÍCH INSTRUMENTÁLNÍCH
TECHNIK V DIAGNOSTICKÉ ANALÝZE**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: Ing. Lenka Portychová
Studijní obor: Analytická chemie
Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2021

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Ing. Lenka Portychová

Úvodem bych chtěla poděkovat zejména Dr. Ing. Zoře Nývltové a doc. RNDr. Davidovi Jirovskému, Ph.D. za jejich cenné rady, odborné vedení, ochotu a vstřícnost. Dále Mgr. Karolíně Štochlové za pomoc s experimenty.

Děkuji též Výzkumnému ústavu organických syntéz a.s. i Univerzitě Regensburg za poskytnutí zázemí, přístrojů a materiálu pro můj výzkum. V neposlední řadě děkuji mým rodičům, mému partnerovi i mé dceři za všestrannou podporu a motivaci. Zvláštní poděkování patří mému dědečkovi, který se o mou vědeckou a výzkumnou činnost vždy velmi zajímal.

SOUHRN

Předložená disertační práce je zaměřena na vývoj a popis analytických metod stanovení vybraných biomarkerů v klinické diagnostice s využitím elektrochemie jako významného prvku moderních instrumentálních technik. Biomarkery jsou látky, jejich přítomnost může indikovat různé typy závažných onemocnění a stavů, či expozici škodlivým chemickým látkám. Pozornost byla v této práci věnována především stanovení metanefrinů, markerů tumoru feochromocytomu, a dále indoxyl sulfátu, významnému markeru řady zdravotních komplikací, od selhávání ledvin přes střevní dysbiózu až po poruchy centrální nervové soustavy. Část práce je též věnována vývoji originálního instrumentu sloužícího k metabolomickému výzkumu.

Spojení kapalinové chromatografie s elektrochemickým i spektrofotometrickým detektorem a propojení elektrochemie s hmotnostním spektrometrem byly využity s cílem analyzovat s vysokou citlivostí, přesností i správností vybrané sloučeniny ve složitých biologických matricích, jako je moč, krevní plazma či krevní sérum. Vyvinuté metody a postupy mohou sloužit v klinické praxi k rutinní diagnostice, případně se mohou stát základem pro simulaci metabolomických procesů probíhajících v lidském organismu a ke studiu oxidačního stresu i různých defektů DNA.

SUMMARY

The presented thesis is focused on the development and description of analytical methods for the determination of selected biomarkers in clinical diagnostics using electrochemistry as an important element of modern instrumental techniques. Biomarkers are substances whose presence usually indicates various types of serious diseases and conditions, or exposure to harmful chemicals. In this work, attention was paid mainly to the determination of metanephrines, markers of the tumor pheochromocytoma, and indoxyl sulfate, an important marker of several health complications, from renal failure through intestinal dysbiosis to central nervous system disorders. Part of the work is also devoted to the development of an original instrument used for metabolomics research.

Combinations of liquid chromatography with electrochemical and spectrophotometric detector as well as connection of electrochemistry with mass spectrometry were used to analyze selected compounds in complex biological matrices such as urine, blood plasma or blood serum. The developed methods and procedures are highly sensitive, accurate and precise. It is possible to use them in both clinical practice for routine diagnosis, or in clinical research for studying of human metabolomics processes, oxidative stress and DNA defects.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1	Plazmatické metanefriny	11
3.1.1	Definice a metabolismus metanefrinů.....	11
3.1.2	Stanovení metanefrinů	12
3.1.2.1	Úprava krevní plazmy a izolace metanefrinů	12
3.1.2.2	Stanovení pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí.....	13
3.2	Indoxyl sulfát.....	15
3.2.1	Definice a metabolismus indoxyl sulfátu	15
3.2.2	Vylučování látek a funkce ledvin	16
3.2.3	Metabolismus látek v tlustém střevě.....	18
3.2.4	Stanovení indoxyl sulfátu	19
3.2.4.1	Izolace z biologické matrice	19
3.2.4.2	Analýza pomocí HPLC/ED-DAD metody.....	20
3.3	Nestabilní meziprodukty elektrochemických reakcí	21
3.3.1	Elektrochemie	21
3.3.2	Chování analytů na povrchu elektrod	21
3.3.3	Cyklická voltametrie	22
3.3.4	Hmotnostní spektrometrie ve spojení s elektrochemií	23
3.3.5	Typy EC/MS technik a jejich využití.....	24
4	PLAZMATICKÉ METANEFRINY	26
4.1	Experimentální část.....	26
4.1.1	Použité chemikálie	26
4.1.2	Použitý materiál	26
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	27
4.1.4	Příprava roztoků.....	28
4.1.5	Příprava sorbentů a popis plnění kolonek pro extrakci	29
4.1.6	Popis extrakce tuhou fází	30
4.1.7	Chromatografická analýza.....	31
4.2	Výsledky a diskuze.....	32
4.2.1	Optimalizace postupu izolace metanefrinů	32
4.2.2	Optimalizace metody stanovení metanefrinů.....	39
4.2.3	Validace metody stanovení metanefrinů.....	39

4.2.4	Porovnávání analýz vzorků krevní plazmy	42
5	INDOXYL SULFÁT.....	45
5.1	Experimentální část.....	45
5.1.1	Použité chemikálie	45
5.1.2	Použitý materiál	45
5.1.3	Přístrojové vybavení.....	45
5.1.4	Příprava roztoků.....	46
5.1.5	Popis předúpravy biologické matrice	47
5.1.6	Chromatografická analýza.....	47
5.2	Výsledky a diskuze.....	48
5.2.1	Optimalizace postupu předúpravy biologické matrice	48
5.2.2	Optimalizace metod stanovení indoxyl sulfátu.....	49
5.2.3	Validace metod stanovení indoxyl sulfátu.....	51
6	PROPOJENÍ ELEKTROCHEMIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	55
6.1	Experimentální část.....	55
6.1.1	Použité chemikálie	55
6.1.2	Použitý materiál	55
6.1.3	Přístrojové vybavení.....	56
6.1.4	Příprava roztoků.....	57
6.1.5	Předúprava kapilár	57
6.1.6	Předúprava tištěných elektrod	57
6.1.7	Základní podmínky testování kapilár a průtokových cel.....	57
6.1.8	Podmínky EC/MS analýz.....	58
6.1.9	Nastavení hmotnostního spektrometru	59
6.2	Výsledky a diskuze.....	60
6.2.1	Optimalizace elektrochemické průtokové cely	60
6.2.2	Optimalizace spojení elektrochemické průtokové cely a MS	61
6.2.3	Aplikační možnosti EC/MS sestavy	64
7	ZÁVĚR.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68
	Seznam ilustrací.....	70
	Seznam tabulek	70
	LITERATURA.....	71

1 ÚVOD

Předložená práce se zaměřuje zejména na vývoj a validaci nových, dostatečně citlivých a selektivních analytických metod pro sledování různých typů biomarkerů, které mohou sloužit jako indikátory různých typů onemocnění. V jednotlivých kapitolách jsou popsány možnosti využití propojení moderních analytických technik v klinické diagnostice včetně konkrétních experimentů. K prezentovaným analýzám bylo využito spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s elektrochemickým detektorem (ED) a detektorem diodového pole (DAD) a propojení elektrochemie (EC) s hmotnostním spektrometrem (MS). Cílem bylo analyzovat velmi nízké koncentrace organických sloučenin ve složitých biologických matricích s dostatečnou přesností i správností.

Ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové (FNHK) a Všeobecnou fakultní nemocnicí v Praze (VFN) bylo sledováno několik vybraných biomarkerů, sarkosin (marker rakoviny prostaty), 2-oxoglutarát (marker karcinomu tlustého střeva), kyselina vanilmandlová a homovanilová (markery vysokého krevního tlaku, přítomnosti neuroblastomu, popř. markery přítomnosti feochromocytomu), alantoin (marker metabolického syndromu), 1-hydroxypyren (marker expozice polycyklickými aromatickými uhlovodíky) a další. Pro tuto disertační práci byly vybrány dva typy biomarkerů, kterým byla v rámci naší spolupráce s FNHK a VFN věnována největší pozornost, plazmatické metanefriny (PMN) a indoxyl sulfát (IS).

Zvýšená hladina metanefrinů (metabolitů katecholaminů) v lidském organismu je specifickým markerem feochromocytomu, nádoru dřeně nadledvin. Touto problematikou jsem se začala zabývat již v rámci své diplomové práce [1], v níž jsou diskutované počáteční pokusy vývoje HPLC/ED metody stanovení látek typu katecholaminů. V předložené disertační práci popisují optimalizaci metody stanovení PMN, včetně předúpravy biologické matrice (krevní plazmy), následnou validaci metody a vytvoření soupravy pro stanovení volných PMN k diagnóze feochromocytomu.

Indoxyl sulfát se řadí mezi uremické toxiny. Je-li v lidském organismu přítomen ve vyšší koncentraci, způsobuje řadu zdravotních komplikací. Vyšší množství tohoto toxinu detekované v moči nebo krvi je obvykle způsobeno selháváním funkce ledvin či střevní dysbiózou. Může však značit i jiné komplikace, rakovinu střev nevyjímaje. Kromě toho, že IS zhoršuje zdravotní stav pacientů s nefunkčními ledvinami, souvisí tento toxin např. i s kardiovaskulárními chorobami a příhodami, poruchou kostního metabolismu a poruchami

centrálního nervového systému. IS byl analyzován jak v moči, tak v krevním séru. Součástí práce je optimalizace předúpravy vzorků i následné stanovení pomocí ED.

ED bývá velmi často využívána k detekci analytů v klinické medicíně pro jejich elektrochemickou aktivitu a taktéž díky senzitivě, selektivě i možnostem miniaturizace této techniky. Mimo to EC umožňuje *in vitro* simulace některých metabolických přeměn probíhajících v lidském organismu. Díky propojení EC s MS je možné predikovat stabilitu a toxicitu xenobiotik (léčiv, polutantů životního prostředí a dalších uměle vytvořených sloučenin). V rámci této disertační práce je popsán vývoj EC/MS sestavy sloužící k detekci velmi nestabilních meziproductů redoxních reakcí, využitelných též pro klinickou diagnostiku.

Výsledky prezentované v předložené práci demonstrují nové možnosti rychlého, přesného a správného stanovení vybraných biomarkerů s využitím elektrochemie jako významného prvku moderních instrumentálních technik.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce se zaměřuje zejména na včasnou diagnostiku biomarkerů s využitím elektrochemie, hmotnostní spektrometrie a vybraných speciálních technik. Konkrétně jsou v práci zahrnuta tato témata:

1) *Analýza metanefrinů v krevní plazmě*

- vývoj a validace metody pro izolaci a stanovení plazmatických metanefrinů, specifických markerů feochromocytomu, s využitím kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí
- vývoj kitu pro diagnostiku feochromocytomu, nádoru dřeně nadledvin

2) *Sledování toxického indoxyl sulfátu v moči a krevním séru*

- vývoj metod pro stanovení indoxyl sulfátu v moči a séru (např. pro diagnostiku střevní dysbiózy či pro stanovení míry intoxikace organismu osob s dysfunkcí ledvin) s využitím kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickým detektorem a detektorem diodového pole
- výzkum v oblasti zmírnění intoxikace organismu indoxyl sulfátem u pacientů podstupujících chronickou substituční léčbu

3) *Detekce rychle se rozkládajících meziproduktů*

- vývoj metody pro detekci nestabilních meziproduktů s využitím přímého propojení elektrochemie a hmotnostní spektrometrie
- možnosti využití vyvinuté techniky pro diagnostické účely

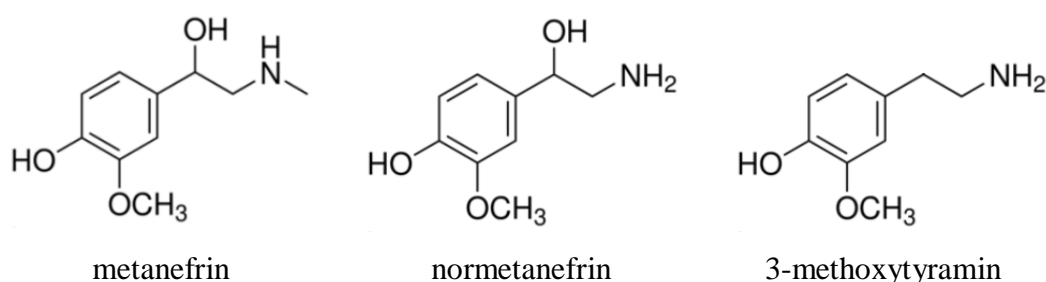
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Plazmatické metanefriny

Plazmatické metanefriny jsou ve zdravém lidském těle zastoupeny ve velmi malém množství, v řádech pmol l^{-1} . Navýšení jejich koncentrace je obvykle způsobeno buď stimulem prostředí (zejména psychickým či fyzickým vypětím) nebo neuroendokrinními tumory dřeně nadledvin, feochromocytomem a paragangliomem. Prevalence těchto nádorových onemocnění v České republice (ČR) se v posledních letech pohybuje na úrovni 0,05–0,1 %. Při včasné zahájení léčby je smrtnost nižší než 2 %. Většinou je však tento typ tumoru odhalen až při pitvě. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]

3.1.1 Definice a metabolismus metanefrinů

Metanefriny (viz **Obrázek 1**) jsou produkty katecholaminů, adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu, které jsou v lidském těle metabolizovány z aminokyseliny fenylalaninu. Z adrenalinu vzniká metanefrin (MN), z noradrenalinu normetanefrin (NMN) a z dopaminu 3-methoxytyramin (3-MT). Fyziologická hodnota metanefrinu se pro člověka pohybuje v rozmezí 60 až 310 pmol l^{-1} (někteří autoři [9] uvádějí až 500 pmol l^{-1}) plazmy. Pro normetanefrin je toto rozmezí 100 až 610 pmol l^{-1} (až 900 pmol l^{-1} [9]) plazmy a pro 3-methoxytyramin 6 až 90 pmol l^{-1} plazmy. [2, 10, 11, 12, 13, 14, 15]



Obrázek 1 Vzorec metanefrinu, normetanefrinu a 3-methoxytyraminu [11]

Vyšší koncentrace metanefrinů v lidském organismu mohou být způsobeny stresem, fyzickou námahou, zraněním, emocionální rozrušením, hypoglykemií, [16, 17] ale též konzumací některých potravin (zejména banánů, ale i ořechů, čokolády, mléka a mléčných

výrobků, dýňových a sezamových semínek, masa, ryb a dalších potravin) či léků (paracetamolu, antihypertenziv, tricyklických antidepresiv, β -blokátorů, antiparkinsonik a jiných). [9, 18, 19]

Kontinuálně extrémně zvýšená hladina metanefrinů je ve většině případů způsobena nádorovým onemocněním dřeně nadledvin, nejčastěji feochromocytomem. Tento typ tumoru má totiž schopnost metanefriny syntetizovat a průběžně je uvolňovat do organismu. Hlavním symptomem onemocnění u postižených osob je arteriální hypertenze, kterou však trpí čtvrtina obyvatelstva ČR, tudíž je přítomnost tohoto nádoru v těle často velmi obtížně odhalitelná. Není-li feochromocytom léčen, dochází k vážnému poškození srdce a ledvin. [4, 5, 7, 9, 20, 21, 22].

3.1.2 Stanovení metanefrinů

Metanefriny jsou obvykle detekovány v krevní plazmě, příp. ve 24hodinovém sběru moči. K jejich izolaci z matrice je v současnosti využívána téměř výhradně extrakce tuhou fází (SPE), která je pro analyty dostatečně selektivní a schopná účinně odstranit většinu nežádoucích látek obsažených v matrici. [2, 23, 24] Stanovení metanefrinů je prováděno nejčastěji pomocí elektrochemických senzorů, LC/ED, LC/MS, příp. imunochemickými metodami. [22, 25, 26, 27, 28, 29, 30]

3.1.2.1 Úprava krevní plazmy a izolace metanefrinů

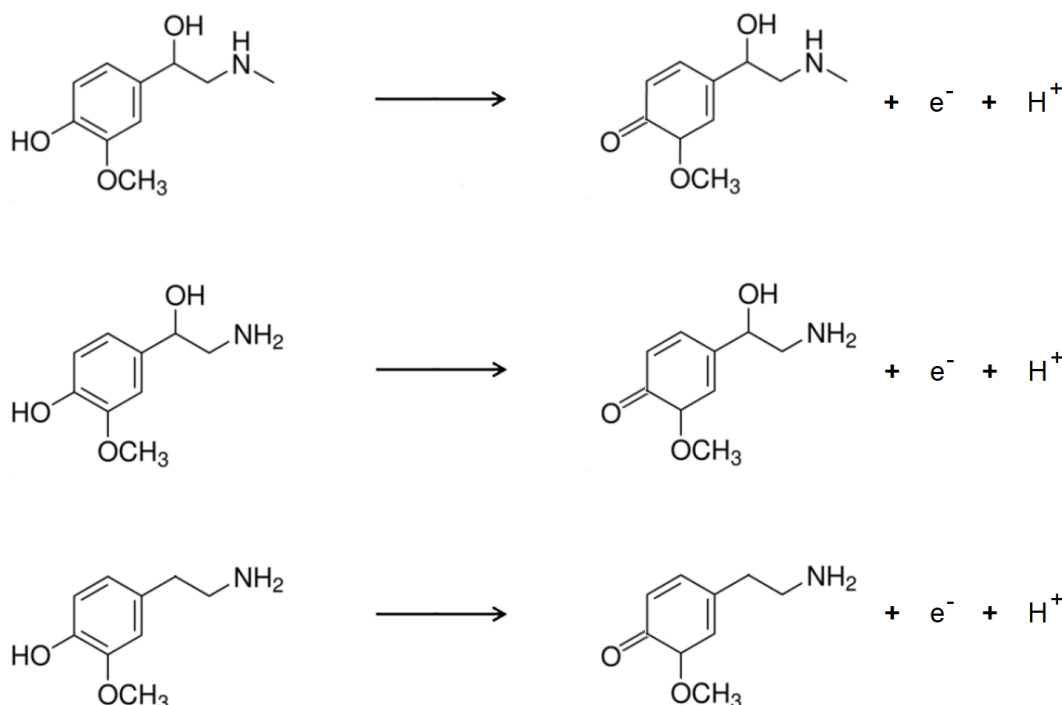
Odběr krve pro stanovení PMN je prováděn postupem, který eliminuje falešně pozitivní výsledky. Snahou je minimalizovat u pacienta psychickou i fyzickou zátěž, aby nedošlo k uvolnění katecholaminů a jejich metabolitů do krve. Pacientovi, který byl předem poučen, jakých léků, potravin a nápojů (a v jak velkém předstihu) se vyvarovat, je zavedena do žíly kanyla a odběr je proveden v poloze vleže po několikaminutovém klidu. Z odebrané krve je centrifugací oddělena plazma, která musí být buď do šesti hodin analyzována nebo zamražena při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. [31, 32, 33, 34, 35, 36]

Krevní plazma je tvořena převážně vodou, dále obsahuje bílkoviny, glukózu, lipidy, cholesterol, močovinu, hormony a širokou škálu dalších sloučenin. [37] Pro eliminaci těchto látek a pro účinnou izolaci metanefrinů je využívána SPE, nejčastěji s iontově výměnnými sorbenty nebo se sorbenty na bázi molekulárně vtištěného polymeru (MIP). Tento polymer je schopen specificky extrahovat analyt díky paměti tvaru a funkčních skupin templátové molekuly. [2, 23, 38, 39]

3.1.2.2 Stanovení pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí

Z hlediska mechanismu separace chromatografického systému existují dva základní typy kapalinové chromatografie, na normálních fázích (NP-LC) a na obrácených fázích (RP-LC). Speciálním případem RP-LC je chromatografie iontových párů (IPC), jejíž principem je přidavek iontově párových činidel (IPČ), např. alkylsulfonátů, do mobilní fáze (MF). Tyto sloučeniny podporují tvorbu iontových párů s nabitými analyty a zlepšují tak jejich separaci. Tato technika bývá s výhodami využívána k separaci katecholaminů či metanefrinů. [40]

ED je citlivá, vysoce selektivní s širokým lineárním dynamickým rozsahem a rychlou odpovědí. Důležité je však zvolit optimální složení a pH MF kapalinové chromatografie. Tato detekční technika využívá schopnosti látek obsahujících elektroaktivní funkční skupiny se oxidovat nebo redukovat na polarizovatelných elektrodách, na které je vkládáno vhodné napětí (podrobněji viz kapitola 3.3.1). ED jsou využívány zejména pro klinickou diagnostiku, analýzu biologických matric a farmaceutický průmysl. [41, 42] Např. pro stanovení katecholaminů a jejich metabolitů jsou ED zdaleka nejvyužívanějšími detektory vůbec, následované spektrálními. [26, 27, 41, 42] Při elektrochemické oxidaci metanefrinů dochází k odštěpení protonu H^+ z fenolické hydroxyskupiny – viz **Obrázek 2**. [42, 43]



Obrázek 2 Znázornění procesu oxidace metanefrinu, normetanefrinu a 3-methoxytyraminu

Elektrochemické detektory je obecně možné rozdělit na amperometrické a coulometrické, přičemž prvně jmenované zaznamenávají proud, druhé měří náboj.

Cely coulometrického detektoru obsahují tři typy elektrod, pracovní, srovnávací (referentní) a pomocnou. Posledně jmenovaná odvádí proud, díky čemuž si srovnávací elektroda (u ED je to hydrogen-palladiová) udržuje konstantní a známý potenciál. Ve dvouelektrodovém zapojení (tj. bez pomocné elektrody) se potenciál srovnávací elektrody mění s procházejícím proudem. Pracovní coulometrické elektrody jsou prakticky bezúdržbové, jsou vyrobeny z porézního grafitu a poskytují tak obrovskou plochu povrchu pro redoxní reakce. Dochází na nich ke konverzi elektrochemicky aktivních sloučenin blížící se ke 100 %. Mezi coulometrické detektory patří Coulochem (typy I-III), CoulArray a ECD-3000RS. [41, 42]

Coulochem je velmi citlivý a sofistikovaný elektrochemický detektor, který se skládá z analytické cely obsahující dvě elektrody, na nichž probíhá oxidace nebo redukce sledovaného analytu. Před touto celou může být navíc ještě zapojena cela kondicionační, která elektrochemicky eliminuje interferující látky a chrání tak celu analytickou. Tento detektor je vhodný pro stanovení stopových koncentrací analytů i ve složitějších vzorcích. [42, 44]

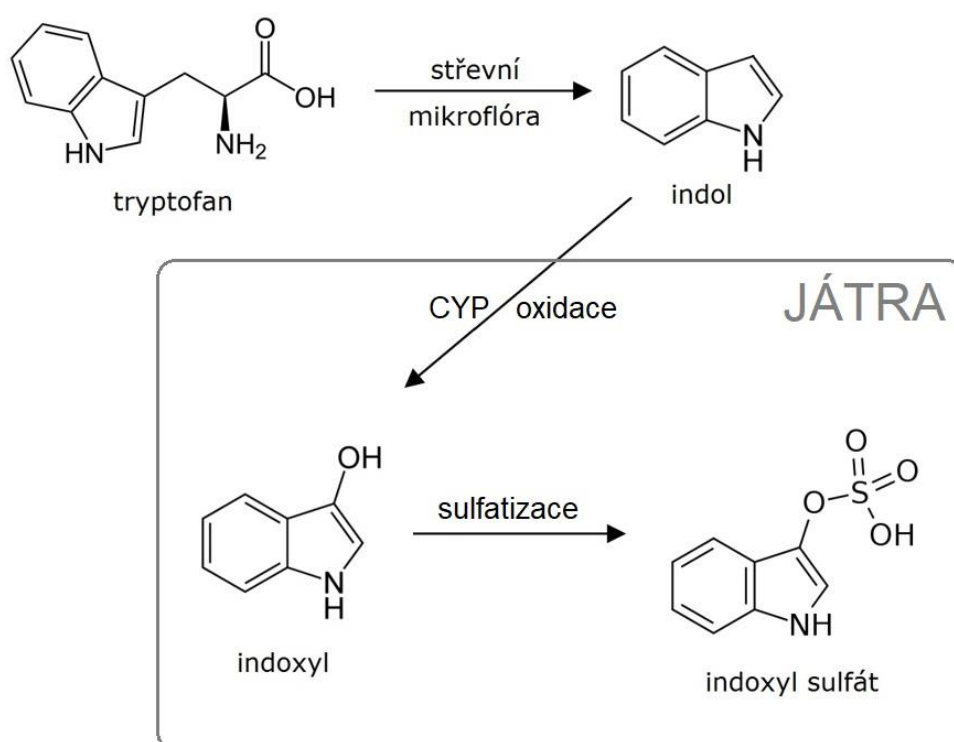
CoulArray detektor, na rozdíl od předchozího typu, má výhodu sériového zapojení čtyř až šestnácti průtočných cel, na něž jsou obvykle vkládány rozdílné potenciály a každá poskytuje samostatný signál. Detektor je kompatibilní i s gradientovou elucí a může být využíván pro stanovení analytů ve velmi komplexních maticích. [42, 45]

ED typu UltiMate ECD-3000RS je novější než oba typy zmíněné výše. Tento detektor je schopen selektivně detekovat velmi nízká, až femtogramová množství analytů ve velmi malých objemech vzorku (pouhých 5 μ l roztoku vzorku je dostatečujících k analýze). Je navíc možné s ním pracovat jak v coulometrickém módu (v modulu potenciostatu mohou být nezávisle na sobě zapojeny až čtyři různé elektrochemické cely) tak amperometrickém módu (včetně využití borem dopované diamantové elektrody). Detektor je možné používat i s gradientovou elucí a díky své konstrukci je navíc kompatibilní i s ultravysokoučinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC). [46]

3.2 Indoxyl sulfát

3.2.1 Definice a metabolismus indoxyl sulfátu

IS je toxickým metabolitem tryptofanu. Tuto aminokyselinu přijímanou v potravě nedokáže lidský organismus dostatečně vstřebat v tenkém střevě a je tedy rozložena až mikroflórou ve střevě tlustém. Mikrobiální tryptofanázou je metabolizována na indol a následně v játrech po hydroxylaci za přítomnosti cytochromu p450 (CYP) přeměněna na indoxyl. Posledním krokem procesu metabolismu v játrech je sulfatizace pomocí sulfotransferázy na indoxyl sulfát – celé schéma viz **Obrázek 3**. [47, 48, 49, 50]



Obrázek 3 Proces metabolismu tryptofanu přijatého ve stravě na indoxyl sulfát

Ve zdravě fungujícím lidském organismu je tento toxin vylučován ledvinami a odváděn z těla močí, mechanismem tubulární sekrece. V moči zdravých osob lze detekovat nízké hladiny IS – obvykle do $120 \mu\text{mol l}^{-1}$ (nejvýše $188 \mu\text{mol l}^{-1}$). Vyšší hladiny této látky v moči jsou obvykle způsobeny střevní dysbiózou, mohou však značit i jiné komplikace, rakovinu střev nevyjímaje. Vyšší množství IS v krvi většinou souvisí se selháváním ledvin. Tento toxin je již několik let studován právě v souvislosti s chronickým onemocněním ledvin (CKD) definovaným jako poškození struktury či funkce ledvin přetrvávající alespoň tři měsíce

a mající důsledky pro zdravotní stav pacienta. Onemocnění je obecně klasifikováno dle příčiny vzniku, hodnoty glomerulární filtrace a stanovení albuminurie. [51]

Pacienti s nefunkčními ledvinami (a dle provedených studií i dárči ledvin [52]) vždy vykazují zvýšené hodnoty tohoto toxinu (až 80krát vyšší oproti fyziologické koncentraci). Klasickou dialýzou (hemodialýzou či peritoneální dialýzou) je prakticky neodstranitelný kvůli jeho silné vaznosti k proteinům, zejména albuminu. Z důvodu vaznosti IS na proteiny má velký vliv na množství této sloučeniny v krvi skladba stravy. [48, 49, 53, 54] Pacienti s CKD mohou pomocí nízkoproteinové diety snížit hladinu IS v krvi až o 37 %. Fyziologická úroveň IS v krvi se většinou pohybuje v rozmezí 2–10 $\mu\text{mol l}^{-1}$. [55]

Mnohé studie poukazují na to, že vyšší koncentrace IS v krvi (cca $>20 \mu\text{mol l}^{-1}$) mají mimo střevní dysbiózu a CKD souvislost i s kardiovaskulárními nemocemi a srdečními příhodami, malabsorpčním syndromem (porucha trávení a vstřebávání základních živin), intolerancí glukózy, metabolickým syndromem, inzulinovou rezistencí, renální fibrotizací (zmnožení vazivové tkáně), reakcí štetu proti hostiteli po transplantaci krevetvorných kmenových buněk, poruchou kostního metabolismu, ale i s poruchami centrálního nervového systému, např. Parkinsonovou chorobou. IS navíc vyvolává oxidační stres a snižuje množství glutathionu, což je látka detoxifikující xenobiotika (látky cizí lidskému organismu). [48, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]

Je tedy nezbytné u rizikových osob pravidelně sledovat hladinu IS a snažit se o její snížení (optimálně alespoň na cca $190 \mu\text{mol l}^{-1}$ moči a/nebo $19 \mu\text{mol l}^{-1}$ krevního séra). [55, 58]

V literatuře byly popsány zejména tyto možnosti eliminace IS:

- snížení metabolismu tryptofanu ve střevech (nízkoproteinovou dietou či konzumací doplňků stravy/léčiv vyvazujících indol ze střev);
- optimalizace dialýzy.

Podrobněji jsou jednotlivé strategie diskutovány v následujících dvou kapitolách.

3.2.2 Vylučování látek a funkce ledvin

Ledviny jsou párový orgán umístěný v lidském těle v oblasti beder. Jejich funkcí je zejména exkrece ve vodě rozpustných látek, kterých se tělo potřebuje zbavit, přičemž dochází k vytvoření moči (skladba moči viz 3.2.4.1) a jejímu vyloučení. Kromě odstranění přebytečných látek, nežádoucích metabolitů a toxických sloučenin tak tento orgán reguluje i objem vody v těle. Dalšími funkcemi ledvin je např. udržování homeostázy, regulace acidobazické rovnováhy, udržování složení krevní plazmy či regulace krevního tlaku. Mimo to

se podílejí na řízení metabolismu vápníku v kostech, jelikož přeměňují vitamín D na kalcitriol, který podporuje vstřebávání vápníku a fosfátů ve střevě. [63]

Při selhávání ledvin se odpadní produkty se hromadí v krvi a mohou být příčinou otravy organismu. Nedostatečná funkce ledvin může být zjištěna na základě vyšetření glomerulární filtrace z dvacetičtyřhodinového sběru moči, či analýzou koncentrace vybraných toxických metabolitů, např. IS, v jednorázově odebrané biologické matrici.

V případě selhání funkce ledvin je nezbytné odstraňovat přebytečné látky a zplodiny metabolismu jiným způsobem, nejčastěji dialýzou. Tato separační technika využívá difúze nízkomolekulárních látek membránou, která je nepropustná pro velké molekuly. Separace probíhá směrem z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku o koncentraci nižší. [64]

Nejčastěji používanými jsou hemodialýza, hemodiafiltrace a peritoneální dialýza, přičemž každá je vhodná pro jinou skupinu nemocných. Při peritoneální dialýze má pacient natrvalo zavedenou hadičku do dutiny břišní a sám si do ní několikrát denně napouští speciální čistící roztok, na který se v průběhu jeho působení v těle navážou nežádoucí látky a který je po několika hodinách pacientem opět vypuštěn. Výhodou této metody je její provedení přímo pacientem v domácím prostředí, rizikem však možnost vzniku infekce dutiny břišní.

Při hemodialýze pacient pravidelně dochází do hemodialyzačního střediska, kde je mu během několika hodin krev očištěna od toxických a nadbytečných látek pomocí hemodialyzačního přístroje. Ten je před každou dialýzou přes hadičku napojen do speciální spojky mezi tepnou a žílou, která byla pacientovi v minulosti chirurgicky vytvořena na předloktí. Variantou hemodialýzy je hemodiafiltrace, která k očištění krve používá propustné filtry a následná ztráta tekutin je doplněna náhradním roztokem. Díky tomuto postupu je účinnost očištění krve od nežádoucích látek vyšší. [65]

Uremické toxiny, které se váží na proteiny, však nemohou přejít přes polopropustnou dialyzační membránu. Kromě IS sem řadíme *p*-kresol, glyoxal, homocystein, leptin a další. Dochází tak ke hromadění těchto toxinů v organismu a k následnému snížení kvality a délky života pacientů. Z tohoto důvodu je nutné vylepšit dialyzační možnosti, přičemž dle provedených studií není dostačující pouze navýšit dobu trvání dialýzy či změnit průtokovou rychlost dialyzátu. [54, 66] Vaznost IS k albuminu je řízena elektrostaticky a van der Waalsovými silami. Disociační konstanta tedy závisí na iontové síle, zředění a hodnotě pH roztoku. K úpravě pH dialyzátu je obvykle využíván octan sodný. Poslední dobou je však čím dál častěji testován citrát sodný. Kromě toho, že je tato sloučenina schopna dobře redukovat sraženiny na dialyzační membráně, zvyšuje iontovou sílu dialyzátu. Citrátové anionty se navíc váží na albumin, čímž může dojít ke snížení podílu IS vázaného na tuto bílkovinu a tedy

k lepšímu odstranění toxinu z lidského organismu. Tato úprava dialýzy však často není pro pacienty dostačující, jsou tedy nadále testovány i jiné možnosti odstraňování toxinů z těla. [54, 67]

3.2.3 Metabolismus látek v tlustém střevě

Pro lepší pochopení vlivu vybraných typů doplňků stravy/léčiv na vstřebávání toxických metabolitů ve střevech je v této kapitole popsáno fungování tlustého střeva a metabolismus látek v něm.

Tlusté střevo navazuje v těle na střevo tenké a je poslední částí trávicí trubice. Skládá se ze slepého střeva, tračnicku a konečníku. Mimo vstřebávání zbylých vitamínů a minerálů probíhá v tlustém střevě zejména vstřebávání vody a tedy zahušťování chymu (natrávené potravy se žaludečními šťávami). Ten je následně zformován ve stolici (díky střevní mikroflóře) a vyloučen. [63]

Střevní mikrobiom je komplexní ekosystém obsahující 10krát více buněk než je buněk v lidském organismu a 100krát více genů než je obsaženo v celém lidském genomu. Někteří vědci se domnívají, že střevo funguje v lidském těle jako jakýsi „druhý mozek“, který ovlivňuje v organismu mnohem více procesů než je aktuálně zmapováno. [68, 69] Funkcí střevní mikroflóry je zejména bránit průniku nežádoucích organismů a látek, stimulovat imunitní střevní systém, inhibovat patogenní mikroflóru a v neposlední řadě produkovat vitaminy. Choroby, užívání léků i nezdravý životní styl mohou mít na složení mikrobiomu ve střevě výrazně negativní vliv. Prospěšné mikroorganismy jsou potlačeny a dochází ke kolonizaci střeva patogeny (kampylobakter, salmonely, yersinie a jiné), potenciálními patogeny (klostridia, zejména toxický *Clostridium difficile*, kandidy a další) či gramnegativními bakteriemi (koliformní bakterie, enterobakterie, pseudomonády a jiné). [68]

O tom, jak důležitá je rovnováha střevní mikroflóry, svědčí kromě velké spotřeby probiotik a prebiotik též výzkum v oblasti transplantace mikrobiomu střeva, kdy je pacientovi do slepého střeva aplikována upravená stolice dárce. Tento zákrok je určen pacientům, kteří z nějakého důvodu přišli o výraznou část střevních mikroorganismů či pacientům s nevhodným složením střevní mikroflóry mající výrazně negativní vliv na zdraví pacienta. V takovém případě je proveden proplach střev a následná transplantace fekální hmoty. [70, 71]

Je-li snahou odstranit jen vybrané toxiny ze střeva, je optimálním řešením podat pacientovi lék, příp. doplněk stravy, který na sebe toxiny, resp. jejich prekurzory, ve střevě naváže, ale ostatní látky ani mikroflóru ze střeva neodstraní. V posledních letech je většina

výzkumu v této oblasti zacílena na AST-120, lék obsahující porézní uhlíkové částice distribuovaný pod obchodním názvem Kremezin. Některé studie ukazují, že tento lék účinně vyvazuje indol ze střev, nicméně jednoznačně pozitivní a dostačující efekt Kremezinu dosud nebyl uspokojivě prokázán. [48, 72]

3.2.4 Stanovení indoxyl sulfátu

IS je obvykle analyzován v moči, případně v krevním séru či plazmě. Po předúpravě biologické matrice (viz následující kapitola 3.2.4.1) je možné tento analyt stanovit pomocí chromatografie (tenkovrstvé či kapalinové) se spektrofotometrickou nebo elektrochemickou detekcí či odpařovacím detektorem rozptylu světla (ELSD). Hojně využívány jsou též LC/MS metody. [47]

3.2.4.1 Izolace z biologické matrice

Moč je nažloutlá tekutina slabě kyselého pH tvořená v ledvinách. Skládá se z vody (cca 95 %), organických látek (především močovina, kyselina močová a kreatinin) a anorganických látek (např. chlorid sodný, fosfáty, vápenaté ionty). Fyziologická koncentrace IS je nejvýše 120 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Výhodou stanovení látek v moči je jednoduchost této biologické matrice. Navíc samotný odběr moči může být výhodný pro pacienty, u kterých je z různých důvodů odběr krve obtížný. Nevýhodou představují problémy spojené s obtížně standardizovatelným sběrem moči. V praxi je nejvíce využíván dvacetičtyřhodinový sběr moči, případně jednorázový vzorek ranní moči, u něhož je však vhodné výslednou koncentraci sledované látky vztáhnout na množství přítomného kreatininu, které souvisí se zředěním vzorku. Kreatinin je nejčastěji stanovován spektrofotometricky při 500 nm po Jaffého reakci, tedy reakci v zásaditém prostředí s kyselinou pikrovou. [73]

Sbíraná moč by měla být uchovávána při 4 až 8 °C a co nejdříve analyzována. Několikahodinovým stáním, obzvláště pak za laboratorní teploty, se moč znehodnocuje (rozmnožením bakteriální mikroflóry, rozkladem přítomných látek atp.). Není-li možné vzorky sebrané moči ihned měřit, je optimální je zamrazit minimálně při -20 °C, vydrží tak stabilní po několik měsíců. [7, 74, 75]

Stanovení IS v *krvním séru* je prováděno především u pacientů, kteří již vlivem selhání ledvin neprodukují moč. Nevýhodou je obtížnější odběr a zpracování matrice. Ve zdravém lidském organismu je IS obvykle obsažen nejvýše v koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ séra. [49, 76]

Krevní sérum vzniká po vysrážení odebrané plné krve a následném odstranění krevní sraženiny, trombu. Zbývající nažloutlá tekutina, sérum, je svým složením podobná krevní plazmě, ale neobsahuje ani buněčné elementy (červené krvinky, krevní destičky) ani koagulační faktory (fibrinogen).

Pro získání séra je krev obvykle odebírána do zkumavek obsahujících separační gel (případně jiný typ separátoru). Po několika minutách se odebraná krev vysráží a následně je obsah zkumavek centrifugován. Separační gel se během centrifugace posune do prostoru mezi krevní sraženinou a sérum, čímž tyto dvě složky zcela oddělí. Sérum je buď do několika hodin (optimálně do šesti) analyzováno nebo zamraženo při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Před analýzou je vhodné vzorky deproteinovat a uvolnit veškerý navázaný indoxyl sulfát tak, aby bylo možné co nejpřesněji stanovit hladinu IS. Využívá se centrifugace séra bez přidaných činidel či s přidavkem organických rozpouštědel (zejména acetonitrilu) nebo kyselin. [77, 78, 79, 80, 81]

3.2.4.2 Analýza pomocí HPLC/ED-DAD metody

Elektrochemická detekce ve spojení s HPLC je popsána v kapitole 3.1.2.2. Předmětem této kapitoly je pouze stručný popis sestavy HPLC/ED-DAD, která byla využita k detekci IS v moči.

Eluát z kolony vstupuje do ED, ve kterém jsou redoxně aktivní látky oxidovány či redukovány, ostatní analyty nezměněny, a následně eluát pokračuje do DAD. Spojení dvou detektorů může být s výhodami využitelné pro získání detailnější informace o analytech, nebo, jako při stanovení IS a kreatininu, k simultánní detekci elektroaktivních a elektroneutrálních látek. [42, 46]

DAD patří mezi detektory spektrální, konkrétně spektrofotometrické. Tyto detektory, na rozdíl od ED, využívají fyzikálních vlastností látek, konkrétně schopnosti látek absorbovat ultrafialové nebo viditelné záření (cca 200–800 nm). Následkem absorpce atomy a molekuly vzorku přejdou do energeticky vyššího, excitovaného stavu. Velikost absorpce, absorbance, je přímo úměrná koncentraci stanovované látky. DAD snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. [82, 83, 84]

3.3 Nestabilní meziprodukty elektrochemických reakcí

3.3.1 Elektrochemie

Elektrochemie zkoumá procesy probíhající na rozhraní elektrod a roztoku. Základem jsou chemické změny elektroaktivních molekul způsobené přenosy elektronů. Tento proces zároveň vede ke vzniku elektrického proudu, čehož lze využít např. při elektrochemické detekci a kvantifikaci analytů obsahujících elektroaktivní funkční skupiny.

Obvyklými sestavami jsou dvouelektrodové či tříelektrodové uspořádání. Tříelektrodové obsahuje kromě pracovní a referenční elektrody navíc elektrodu pomocnou. Tento systém je výhodnější, protože je efektivně odváděn proud z pracovní elektrody. Mezi pracovní a srovnávací elektrodou je tak možné přesně změřit hodnotu napětí či mezi ně vložit konstantní potenciál a měřit hodnotu proudu.

U dvouelektrodového uspořádání dochází při změně hodnoty vloženého napětí pouze ke změně potenciálu pracovní elektrody. Kvůli odporu roztoku dochází k úbytku napětí z takové sestavy a měření hodnot napětí bývají nepřesná. U některých miniaturizovaných systémů však jiné než dvouelektrodové uspořádání není z prostorového hlediska možné. [85]

Miniaturizace je přesto obecně jednou z velkých výhod EC. Jednou z možností je např. využití ekonomických tištěných elektrod (PE). Ty jsou tvořeny speciální pastou, která je nanášena ve vrstvách o tloušťce několika desítek mikrometrů tzv. tlustovrstvou technologií. [42, 86]

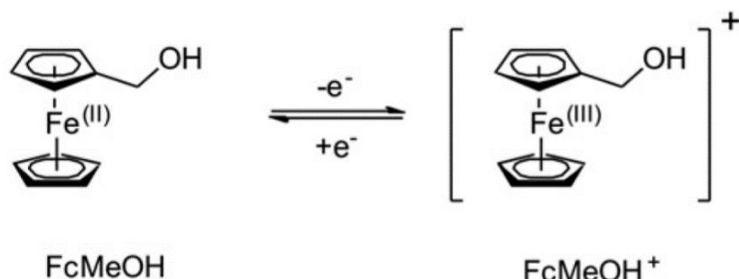
3.3.2 Chování analytů na povrchu elektrod

Pracovní elektrody jsou vyrobeny nejčastěji z uhlíku, zlata nebo rtuti, elektrochemicky stabilních materiálů s širokým potenciálovým rozsahem. Elektroaktivní analyty se na elektrodách oxidují či redukují, díky čemuž dochází ke vzniku elektrického proudu. Prochází-li elektrodou proud, může její potenciál nabývat hodnoty jiné, než je její rovnovážná hodnota, a dochází tak k tzv. polarizaci elektrody.

V průběhu redoxního děje dochází ke zvýšení/snížení oxidačního čísla molekul obsahujících elektroaktivní skupiny. Oxidace látek souvisí s odevzdáváním elektronů, redukce s přijímáním. Oba děje probíhají v systému vždy současně. Mezi elektrodami tak během tohoto děje dochází ke vzniku Faradaického proudu.

Mezi elektrochemicky oxidovatelné skupiny patří např. alkoholy, fenoly, aminy a organokovy, zejména ferrocen, který je často používán jako modelová sloučenina (viz **Obrázek**

4, na němž je znázorněn redoxní pár ferrocenmethanolu, FcMeOH). Mezi redukovatelné skupiny patří aldehydy, ketony, sulfoxidy, disulfidy, thiokyanáty, nitrily, organokovy, nitrolátky, aromatické karboxylové kyseliny a další. [42, 87]

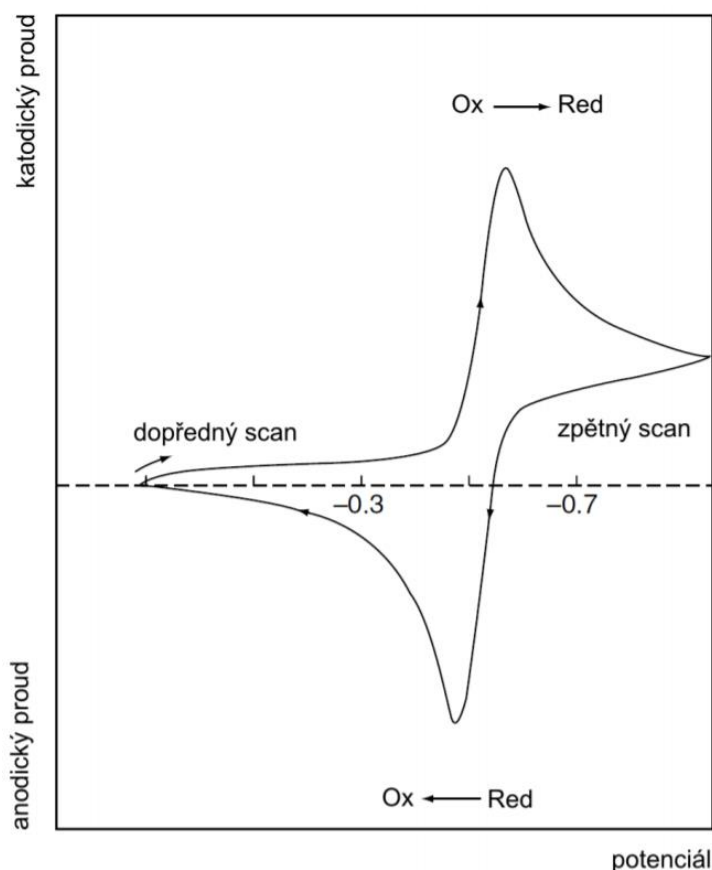


Obrázek 4 Redoxní pár ferrocenmethanolu (FcMeOH/FcMeOH⁺)

3.3.3 Cyklická voltametrie

Principem voltametrie je vložit na pracovní elektrodu potenciál, který se lineárně mění s časem v závislosti na rychlosti a následně je sledována proudová odezva v závislosti na daném potenciálu. U cyklické voltametrie dochází ke změně potenciálu mezi pracovní a srovnávací elektrodou, přičemž potenciál je lineárně zvyšován od počátečního ke zlomovému potenciálu (tzv. dopředný scan). Následně je potenciál lineárně snižován ke konečnému potenciálu (jedná se o tzv. zpětný scan), který je většinou shodný s počátečním potenciálem. Dopředný a zpětný scan tvoří jeden cyklus. Výsledkem měření je tzv. cyklický voltamogram, který zobrazuje závislost anodického a katodického proudu na hodnotě potenciálu – viz **Obrázek 5**.

Cyklická voltametrie je jednou z nejčastěji používaných metod pro základní charakterizaci elektrochemických reakcí, případně k získávání dalších informací. Tato metoda charakterizuje elektrochemickou aktivitu, redoxní potenciály i reverzibilitu redoxních procesů. [88]



Obrázek 5 Znárodnění cyklického voltamogramu [89]

3.3.4 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s elektrochemií

Elektrody mohou být v různých svých podobách spojeny s různými detekčními technikami fungujícími na jiném než elektrochemickém principu. S výhodami se využívá spojení se spektrofotometrickými detektory, nukleární magnetickou rezonancí či hmotnostní spektrometrií. Propojení EC s MS nabízí rychlou, spolehlivou a detailní informaci o metabolitech, které jsou elektrochemicky generovány a pomocí MS identifikovány v jednom EC/MS systému. [42, 90, 91, 92, 93]

Principem MS je vstupující látky nejprve ionizovat v iontovém zdroji a vzniklé ionty následně separovat v hmotnostním analyzátoru na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Ionizace vyžaduje dodání potřebného množství energie. Existuje více typů iontových zdrojů a několik z nich bylo testováno pro spojení MS s EC. V začátcích používání této techniky byl testován dnes již zastaralý termosprej (TSP), později chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a v menší míře i některé další zdroje. V současnosti je využívána výhradně ionizace elektrosprejem za atmosférického tlaku (ESI). Tato ionizační technika je kompatibilní s EC, protože je vysoce citlivá a spolehlivá i při nízkých průtocích, které jsou vhodné

pro vysokou účinnost elektrochemických reakcí. Z elektrochemického pohledu navíc ESI představuje celou složenou ze dvou elektrod, sprejovací kapiláry a MS. Je však nutné, aby byla EC účinně separovaná od vysokého napětí ESI a aby používané elektrolyty byly kompatibilní s ESI–MS. Elektrosprejování je vyvoláno vložením vysokého napětí mezi kapiláru a vstup do vakuované části hmotnostního spektrometru. Roztok je tak při výstupu z kapiláry rozprašován působením elektrického pole. Vzniklé kapičky nesou na svém povrchu velké množství nábojů, ale před vstupem do vakua MS z nich zůstávají už jen jednotlivé ionty vlivem odpařování rozpouštědla a Coulombických explozí. [94, 95, 96]

Spojení EC s MS může být velmi užitečným nástrojem pro simulaci a studium metabolismu xenobiotik, látek uměle vytvořených člověkem. Většina z nich je lipofilního charakteru, tedy obtížně vyloučitelná lidským organismem. Díky EC/MS je možné predikovat toxické látky vznikající v lidském těle z xenobiotik pomocí simulace „jednoelektronových oxidací“ oxidační fáze I metabolismu, která je v těle katalyzovaná pomocí CYP. [97] Tento instrument tak může nahradit testování na zvířatech i využívání jaterních mikrosomů. Výsledky jsou navíc dosažitelné ve velmi krátkém čase. [98, 99, 100]

3.3.5 Typy EC/MS technik a jejich využití

První EC/MS systém byl sestaven už v roce 1971 Bruckensteinem a Gaddem [101] a byl využit ke studiu těkavých metabolitů generujících se na porézní elektrodě, která byla součástí sestavy. Za poslední čtyři desetiletí byla publikována široká škála různých experimentálních uspořádání využívající amperometrické cely v uspořádání „thin-layer“ nebo „wall-jet“, coulometrické cely v uspořádání „flow-through“ i borem dopované diamantové elektrody (BDD). Často jsou využívány jednorázové elektrody s konstantní výkonností a možností rychlé a snadné výměny. Cely mohou být spojené s MS, popř. s HPLC/MS či CE/MS pomocí kapiláry z taveného oxidu křemičitého. Nejčastěji jsou tyto sestavy v současnosti využívány pro simulace lidského metabolismu vybraných sloučenin. [93, 96]

EC/MS uspořádání

Přímá detekce meziproductů a rychle se rozkládajících, nestabilních metabolitů je možná díky *on-line* spojení EC s MS pomocí krátké kapiláry a nastavení vhodných podmínek. Tato technika může sloužit ke studiu přeměn jednotlivých sloučenin i k identifikaci míst v molekule, kde dochází k oxidaci/redukci. Nejlepší volbou je přitom HRMS (MS s vysokým rozlišením hmoty). [102, 103, 104]

První spojení EC/ESI–MS s ohledem na konstrukci cely a spojovacího zařízení vzhledem k vysokému napětí elektrospreje uvedl v 90. letech Van Berkel a jeho kolegové. [105] Ukázali, že přímé spojení EC a MS dovoluje elektrochemickou ionizaci neutrálních sloučenin, studium elektrodových reakcí i posílení signálu díky zakoncentrování iontů. Následoval nárůst počtu publikací popisujících EC/MS techniky, nejčastěji pro studium metabolismu a průběhu redoxních reakcí. [97]

Nicméně nevýhodou přímého spojení EC/MS je chybějící separační krok, tato technika tak není vhodná pro komplexní vzorky. [106]

EC/MS uspořádání zahrnující separaci pomocí kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza (CE) separuje látky na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli, tj. dle rozdílných elektroforetických mobilit.

Kromě několika *off-line* uspořádání, při kterých jsou analyty obsažené ve vzorku podrobeny redoxním reakcím a získaný roztok je následně analyzován pomocí CE/MS sestavy, která není propojena s EC, je výzkum zaměřen hlavně na *on-line* sestavy. [107]

Matysik [108] popsal v roce 2003 elektrochemicky asistovanou injektáž (EAI) spojenou s CE/MS, kterou v následujících deseti letech s kolegy zdokonalil a plně zautomatizoval. K pokusům bylo využito několik typů tiskových elektrod. [109, 110, 111] Následně tým vedený Matysikem vyvinul a optimalizoval *on-line* sestavu EC/CE/MS obsahující miniaturizovanou celu se zlatou PE [112] a uhlíkovou PE. [113, 114]

EC/MS uspořádání zahrnující separaci pomocí kapalinové chromatografie

Off-line uspořádání EC a LC/MS je využíváno okrajově. Je vhodné pro generování stabilních metabolitů a zejména pro analyty, které je vhodné nechat reagovat po delší dobu, resp. pro takové, u kterých má význam studovat dobu trvání elektrochemické konverze. [114, 115, 116]

On-line sestavy jsou používány výrazně častěji, jelikož je s nimi možné zachytit i nestabilní meziprodukty elektrochemických reakcí. Navíc není třeba řešit zachytávání produktů EC a jejich přenos do LC/MS. Kapalinový chromatograf může být *on-line* zapojen před EC či za EC. V prvním případě jsou látky obsažené ve složité matici nejprve separovány a následně jsou elektroaktivní sloučeniny oxidovány/redukovány. Ve druhém případě dochází k separaci produktů elektrochemické reakce. [117, 118, 119, 120]

4 PLAZMATICKÉ METANEFRINY

4.1 Experimentální část

4.1.1 Použité chemikálie

- 1-oktansulfonát sodný, monohydrát, 99 % p.a. (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- acetonitril, 99,9 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- diethylamin, 98 % (Sigma-Aldrich)
- dihydrogenfosforečnan draselný 99 % p.a. (Lachema, a.s., Neratovice, Česká republika)
- hydroxid amonný, 25 % p.a. (Fluka)
- hydroxid sodný p.a. (PENTA, Chrudim, Česká republika)
- kyselina citronová, monohydrát, p.a. (Lachema, a.s.)
- kyselina ethylendiamintetraoctová, 99 % p.a. (Acros Organics, Geel, Belgie)
- kyselina chlorovodíková, 35 % p.a. (Lachema, a.s.)
- kyselina monochloroctová, 99 % (Sigma-Aldrich)
- kyselina octová, 99 % p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- methanol, 99,9 % p.a. (Labscan, Gliwice, Polsko)
- standard 3-methoxytyramin hydrochlorid 99 % p.a. (Sigma-Aldrich)
- standard metanefrin hydrochlorid 98 % (Sigma-Aldrich)
- standard normetanefrin hydrochlorid 98 % (Sigma-Aldrich)
- vnitřní standard 4-hydroxy-3-methoxybenzylamoniumchlorid 98 % (Sigma-Aldrich)

4.1.2 Použitý materiál

Filtry:

- 47 mm Nylon Membrane Filter 0,22 μm (Membrane Solutions, North Bend, USA)
- 25 mm Filter Nylon 0,2 μm (Thermo Fisher Scientific)

SPE kolonky:

- Bond Elut AccuCAT (200 mg, 3 ml, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Discovery DSC-MCAX (100 mg, 1 ml, Supelco, Bellefonte, USA)
- Discovery DSC-SAX (500 mg, 3 ml, Supelco)

- Discovery DSC-SCX (500 mg, 3 ml, Supelco)
- Discovery DSC-WCX (500 mg, 3 ml, Supelco)
- Oasis MAX (60 mg, 3 ml, Waters Corporation, Milford, USA)
- Oasis WAX (60 mg, 3 ml, Waters Corporation)
- Oasis WCX (60 mg, 3 ml, Waters Corporation)
- SCX (200 mg, 3 ml, Merck, Darmstadt, Německo)
- SOLA CX (10 mg, 1 ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- strata ABW (200 mg, 3 ml, Phenomenex, Torrance, USA)
- strata SAX (100 mg, 1 ml, Phenomenex)
- strata SCX (100 mg, 1 ml, Phenomenex)
- Strio-D (30 mg, 1 ml, StrioChem Technologies, Inc., Rancho Santa Margarita, USA)
- Strio-E (30 mg, 1 ml, StrioChem Technologies, Inc.)
- AFFINIMIP® SPE Metanephrines - 3mL, 100mg sorbent (AFFINISEP, Val-de-Reuil, Francie)
- prázdné kolonky: 3mL Empty Fritted SPE Tubes (Supelco)

SPE sorbenty:

- Bio-Rex 70, 100-200 mesh (Bio-Rad, Praha, ČR)
- Discovery DSC-SAX (Supelco)
- Discovery DSC-SCX (Supelco)
- Dowex 1X8, 50-100 mesh (Sigma-Aldrich)
- Dowex 50WX8, 100-200 mesh (Sigma-Aldrich)

Další vybavení:

- fritky Polyethylene Frits 3mL (Supelco)
- nástroj pro stlačení sorbentu v kolonce 3mL (Supelco)

4.1.3 Příkladové vybavení

Chlazená centrifuga:

- Sigma 3-16 KL (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Německo)

Extrakce tuhou fází:

- zařízení Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, USA)

Odpařování vzorků:

- aparatura sestavená z dusíkové tlakové lahve, zařízení pro redukci a kontrolu tlaku plynu na tlakové lahvi, systému pro čištění dusíku od případných nečistot pomocí aktivního uhlí a termobloku Multi-Blok Heater (Lab-Line Instruments, Bombaj, Indie)

pH metr:

- WTW 526/538 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo) s elektrodou BlueLine 28 pH (pH 0...14/-5...+80 °C/Gel, SCHOTT AG, Mainz, Německo); kalibrační roztoky pufrů o pH 7,00±0,01 a 4,01±0,01 (Hamilton Duracal Buffer, Bonaduz, Švýcarsko)

Systém pro úpravu vody:

- IWA 20iol (WATEK s.r.o., Ledec n. Sázavou, ČR)

Ultrazvuková lázeň:

- Sonorex Super RK 510 (Bandelin Electronic, Berlín, Německo)

Váhy:

- mikrováhy XP2U (Mettler – Toledo, Columbus, USA) s citlivostí 0,1 µg
- analytické váhy 870-61 (Mettler – Toledo) s citlivostí 0,1 mg

HPLC/ED:

- kapalinový chromatograf UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher Scientific)
- elektrochemický detektor Coulochem III obsahující analytickou celu Model 5011A a kondičionální celu Model 5021 (ESA, Inc., Chelmsford, USA)
- elektrochemický detektor ECD-3000RS s coulometrickým senzorem 6011RS obsahujícím porézní grafitovou pracovní elektrodu a hydrogen-palladiovou referenční elektrodu (Thermo Fisher Scientific)

4.1.4 Příprava roztoků

Roztoky standardů:

- Normetanefrin, metanefrin a 3-methoxytyramin:

Zásobní roztoky všech tří standardů byly připraveny jejich přesným odvážením pomocí mikrovah, 1 mg do odměrné baňky o objemu 10 ml, a rozpuštěny v 0,2 mol l⁻¹ kyselině octové. Roztoky standardů byly uchovávány při teplotě 4 °C.

Kalibrační roztoky byly dle potřeby rozsahu koncentrací připravovány ze zásobních roztoků jejich postupným ředěním 0,2 mol l⁻¹ kyselinou octovou.

- Vnitřní standard (I.S.):

Zásobní roztok I.S. byl připraven přesným odvážením pomocí mikrovah 1 mg hydrochloridu 4-hydroxy-3-methoxybenzylaminu (HBMA) do odměrné baňky o objemu 5 ml a rozpuštěn v 0,2 mol l⁻¹ kyselině octové. Roztok standardu byl uchováván při teplotě 4 °C. Dle potřeby byl dále ředěn 0,2 mol l⁻¹ kyselinou octovou.

Roztoky pro SPE připravované vždy bezprostředně před provedením extrakce:

- Fosfátový pufr o pH 7: Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 29,1 ml 0,1 mol l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného a 50 ml 0,1 mol l⁻¹ roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného.
- 3% roztok hydroxidu amonného: Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 6 ml ultračisté vody, 6 ml 25% roztoku hydroxidu amonného a 36 ml methanolu.

Mobilní fáze:

Mobilní fáze byla připravena smísením připravených roztoků A a B (1:1). Ke 2000 ml směsi bylo přidáno 85 ml acetonitrilu. Roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr (0,22 μm) a odvdzdušen v ultrazvukové lázni po dobu dvaceti minut.

- *Roztok A:* Do odměrné baňky o objemu 1000 ml bylo naváženo 10 g kyseliny monochloroctové, 3,1 g hydroxidu sodného, 1,1 g kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a 0,3 g monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného. Vše bylo rozpuštěno v cca 900 ml ultračisté vody a pH roztoku bylo upraveno pomocí nasyceného roztoku kyseliny monochloroctové na hodnotu pH 3,1. Baňka byla doplněna po rysku ultračistou vodou.
- *Roztok B:* Do odměrné banky o objemu 1000 ml bylo naváženo 0,5 g hydroxidu sodného, 0,02 g EDTA, 23 g monohydrátu kyseliny citrónové a odměřeno 0,9 ml diethylaminu. Vše bylo rozpuštěno v cca 900 ml ultračisté vody a pH roztoku bylo upraveno pomocí nasyceného roztoku hydroxidu sodného na hodnotu pH 2,55. Baňka byla doplněna po rysku ultračistou vodou.

4.1.5 Příprava sorbentů a popis plnění kolonek pro extrakci

Sorbenty Dowex byly zakoupeny v sykové podobě a převedeny do cyklů v naší laboratoři

následujícím postupem:

Dowex 50WX8 – převedení do H^+ cyklu:

- promytí 3x 2 ml 3mol l^{-1} HCl,
- proplach demineralizovanou vodou do neutrální reakce – cca 2 ml,
- 3x 2 ml 3mol l^{-1} NaOH,
- proplach demineralizovanou vodou do neutrální reakce – cca 2 ml,
- 3x 2 ml 3mol l^{-1} kyseliny octové,
- proplach demineralizovanou vodou na pH cca 7,3 - 7,5 – cca 2 ml

Dowex 1X8 – převedení do OH^- cyklu:

- promytí 3x 2 ml 3mol l^{-1} NaOH,
- proplach demineralizovanou vodou do neutrální reakce – cca 2 ml,
- 3x 2 ml 3mol l^{-1} HCl,
- proplach demineralizovanou vodou do neutrální reakce – cca 2 ml,
- 3x 2 ml 3mol l^{-1} NaOH,
- proplach demineralizovanou vodou do neutrální reakce – cca 2 ml.

Mezi jednotlivými kroky vždy cca 20 min prodleva.

Ostatní sorbenty nebyly nijak upravovány. Plnění sorbentů bylo prováděno pomocí soupravy od firmy Supelco – viz **Obrázek 6**, na kterém je zobrazena jedna prázdná kolonka „3mL Empty Fritted SPE Tubes“ obsahující fritku, dále balení fritek, nástroj pro stlačení sorbentu v SPE kolonce, sorbenty Discovery DSC-SCX (silný katex) a Discovery DSC-SAX (silný anex) a tři ručně plněné kolonky těmito sorbenty (v levé dolní části obrázku).

Katex s anexem se smísí v daném poměru a vytvořená homogenní směs se nasype do kolonky (díky přítomné fritce nepropadne skrz). Poté se do kolonky vloží další fritka, která je nástrojem k tomu určeným (viz **Obrázek 6**) posunuta až k sorbentu. Ten je díky přítomnosti této fritky zároveň silou stlačen.

4.1.6 Popis extrakce tuhou fází

Sorbent SPE kolonky byl kondiciován 2 x 2,5 ml 3% roztoku hydroxidu amonného, 2 ml fosfátového pufru o pH 7 a 2 ml ultračisté vody. Vše za vakua -15 mm Hg. Na mokrý sorbent byl aplikován 1 ml vzorku krevní plazmy (případně obohaceného standardy). Kolonka byla následně promyta 2 ml fosfátového pufru o pH 7, 2 ml ultračisté vody a 2 ml methanolu. Sorbent byl po promytí methanolem sušen za vakua -20 mm Hg po dobu cca dvou minut. Na závěr byla provedena eluce 2 ml 3% roztoku hydroxidu amonného a sorbent byl dvě minuty

sušen. Eluát byl následně odpařen při teplotě cca 60 °C v proudu dusíku do sucha. Před analýzou byl odparek rekonstituován 220 μ l.



Obrázek 6 Souprava od firmy Supelco pro přípravu ručně plněných kolonek

4.1.7 Chromatografická analýza

Podmínky analýzy vzorků pomocí LC/Coulochem III po SPE byly nastaveny následovně:

- průtok: 0,7 ml min⁻¹
- předkolona: UHPLC C18 4,6 mm ID Column (Phenomenex)
- kolona: Kinetex XB-C18 100 × 4,6 mm × 5 μ m (Phenomenex)
- teplota na koloně: 28 °C
- dávkované množství: 150 μ l
- potenciály vkládané na celý detektor: E1: +100 mV
E2: -350 mV
Kondicionační cela: +400 mV

Podmínky analýzy vzorků pomocí LC/ECD-3000RS po SPE byly nastaveny následovně:

- průtok: 0,5 ml min⁻¹
- *předkolona, kolona i teplota na koloně totožné s nastavením LC/Coulochem III*
- dávkované množství: 100 µl
- potenciály vkládané na celý detektoru: E1: +400 mV
E2: -300 mV

4.2 Výsledky a diskuze

4.2.1 Optimalizace postupu izolace metanefrinů

Před analytickým stanovením metanefrinů v plazmě je snaha odstranit co nejvíce interferujících látek přítomných v matrici. K tomuto účelu byla zvolena extrakce tuhou fází, jejíž postup byl dlouhodobě a pečlivě optimalizován. Byly testovány různé typy SPE kolonek, různá rozpouštědla užívaná během SPE i způsob jejich aplikace. V rámci mé diplomové práce [1] byla nejvhodnější SPE kolonkou zvolena Bond Elut AccuCAT. Postup SPE aplikovaný ve zmíněné práci, při němž bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti metanefrinů, byl následující:

Sorbent SPE kolonky byl kondicionován 2 x 2,5 ml 1,3% roztoku hydroxidu amonného, 2 ml fosfátového pufru o pH 7 a 2 ml ultračisté vody. Vše za vakua -15 mm Hg. Na mokrý sorbent byl aplikován 0,5 ml vzorku krevní plazmy (případně obohaceného standardy). Kolonka byla následně promyta 2 ml fosfátového pufru o pH 7, 2 ml ultračisté vody a 2 ml methanolu. Sorbent byl po promytí methanolem sušen za vakua -20 mm Hg po dobu cca dvou minut. Na závěr byla provedena eluce 1 ml 1,3% roztoku hydroxidu amonného a sorbent byl dvě minuty sušen. Eluát byl následně odpařen při teplotě cca 60 °C v proudu dusíku do sucha. Před analýzou byl odparek rekonstituován 220 µl.

V rámci předložené disertační práce byly testovány různé typy SPE kolonek a různé druhy SPE sorbentů, resp. jejich optimální plnění do zvolených kolonek typu „3mL Empty Fritted SPE Tubes“ s cílem zvýšit citlivost metody. Bylo provedeno srovnání výtěžností metanefrinů testovaných komerčních kolonek i všech směsí sorbentů nadávkovaných do kolonek. **Tabulka 1** shrnuje porovnání všech testovaných komerčních kolonek a vybraných směsí – v množství a poměrech, při nichž vykazovaly nejvyšší výtěžnost. Všechny byly testovány v šesti opakováních totožným postupem extrakce a analyzovány pomocí LC/Coulochem III. Krevní plazma byla získávána výhradně z VFN.

Tabulka 1 Výtěžnosti metanefrinů získané použitím různých typů SPE kolonek

U všech typů vyjmenovaných kolonek aplikován (vždy v šesti opakováních) totožný postup extrakce tuhou fází (SPE) i analytického stanovení normetanefrinu (NMN), metanefrinu (MN) a 3-methoxytyraminu (3-MT) (*kurzíva označuje ručně plněné kolonky*, vždy je uvedeno celkové množství sorbentu a poměr obou typů sorbentů).

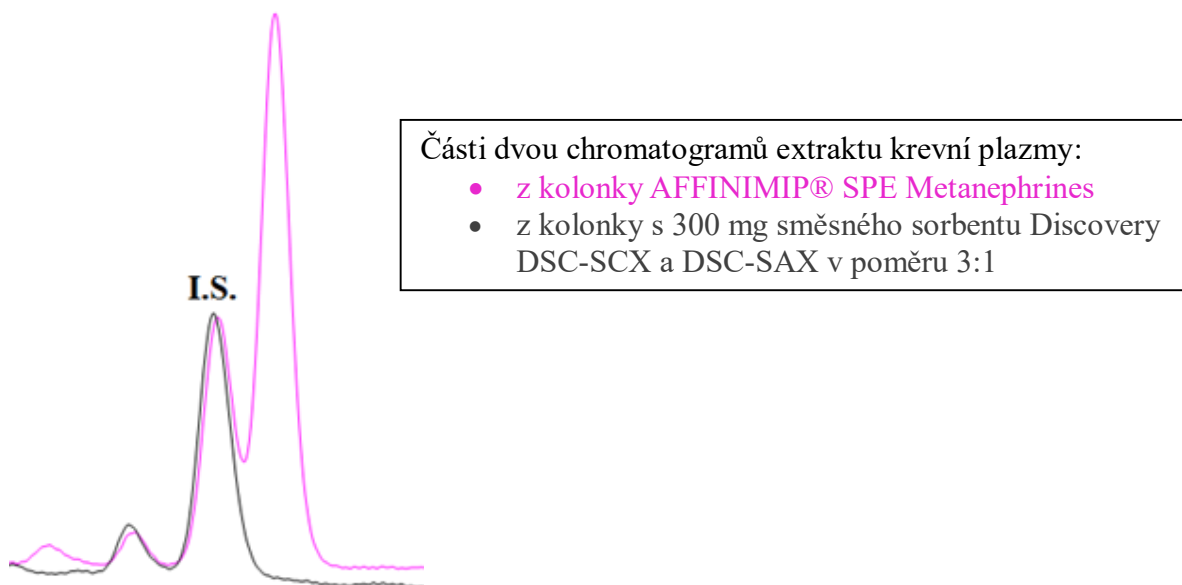
Typ SPE kolonky/ Směs sorbentu v SPE kolonce	Výtěžnost (%)		
	NMN	MN	3-MT
Bond Elut AccuCAT	85	96	77
Discovery DSC-MCAX	66	84	81
Discovery DSC-SAX	6	9	2
Discovery DSC-SCX	71	84	73
Discovery DSC-WCX	8	48	20
Merck SCX	42	37	54
Oasis MAX	< LOD	< LOD	< LOD
Oasis WAX	35	41	22
Oasis WCX	40	42	25
SOLA CX	< LOD	< LOD	< LOD
Strata ABW	80	88	79
Strata SAX	< LOD	< LOD	< LOD
Strata SCX	72	80	43
Strio D	20	21	12
Strio E	< LOD	< LOD	< LOD
300 mg Discovery DSC -SCX + -SAX (3:1)	93	101	84
400 mg Bio-Rex + Discovery DSC-SAX (3:1)	53	60	40
600 mg Bio-Rex + Discovery DSC-SAX (2:1)	57	69	38
600 mg Bio-Rex + DowexIX8 (2:1)	57	64	40
500 mg SCX + DowexIX8 (3:2)	65	73	51
500 mg Dowex50WX8 + DowexIX8 (2:1)	16	19	19
400 mg Dowex50WX8 + Discovery DSC-SAX (3:1)	31	39	33
AFFINIMIP® SPE Metanephries*	94	99	85

*Postup extrakce tuhou fází (SPE) dle doporučení výrobce:

Sorbent byl kondicionován 1 ml fosfátového pufru o pH 7 a 2 ml ultračisté vody. Na mokrý sorbent bylo aplikováno 1,5 ml roztoku vzorku krevní plazmy (pětkrát zředěný vzorek pomocí ultračisté vody). Kolonka byla následně promyta 1 ml ultračisté vody a 0,5 ml 40% methanolu. Sorbent byl sušen po dobu deseti sekund. Poté byla kolonka promyta 0,5 ml methanolu a následně byla provedena eluce 1 ml 5% kyseliny octové v methanolu. Eluát byl odpařen při teplotě cca 60 °C v proudě dusíku do sucha. Před analýzou byl odparek rekonstituován 220 µl. (Při aplikaci našeho postupu SPE byla výtěžnost pouze cca 25 %.)

Nejvyšších výtěžností bylo dosaženo při použití komerčních kolonek AFFINIMIP® SPE Metanephries a kolonek naplněných 300 mg směsného sorbentu Discovery DSC-SCX a Discovery DSC-SAX v poměru 3:1. Analyzované extrakty plazmy z MIP kolonek však

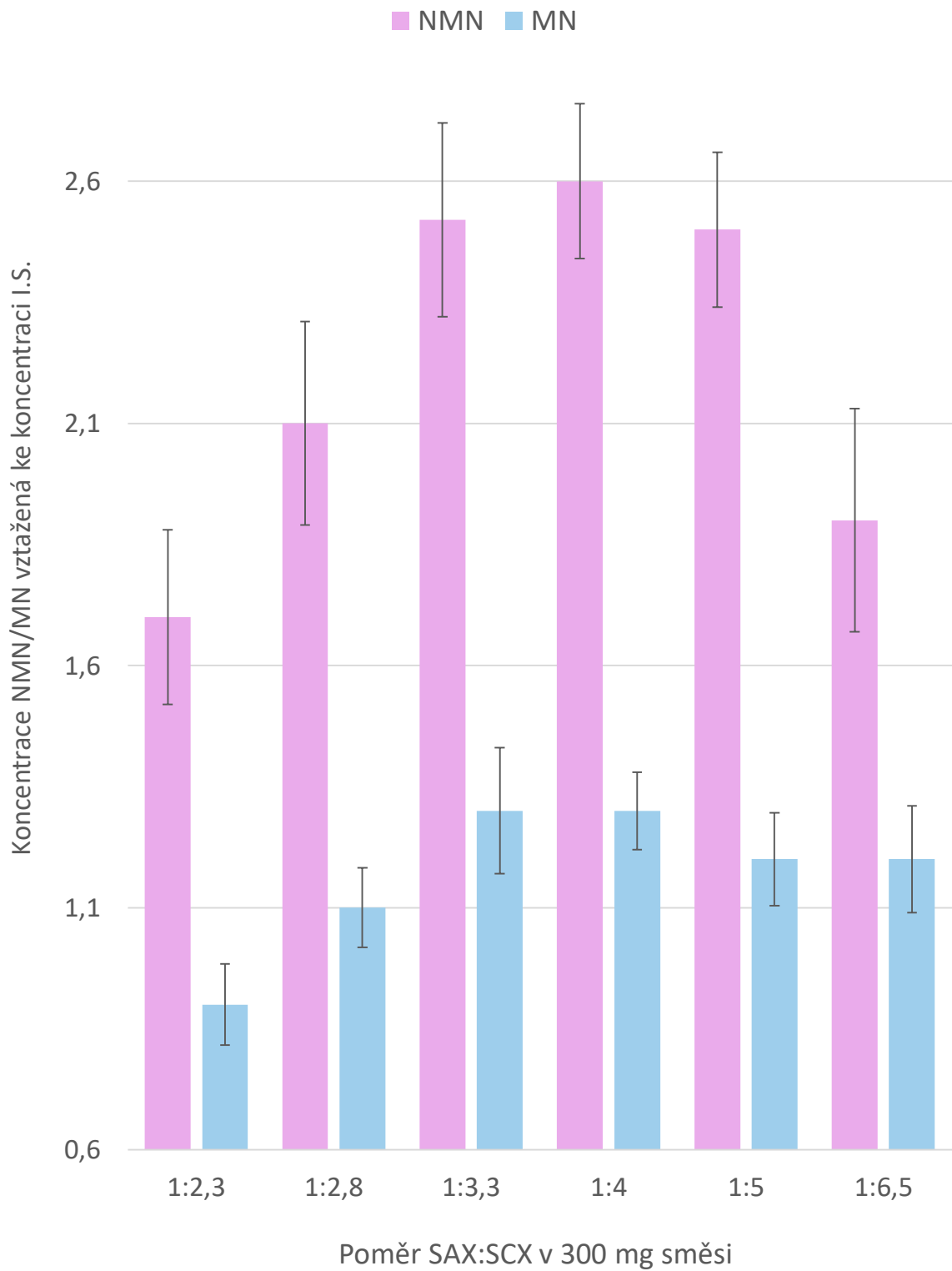
obsahovaly interferující látku, která se za podmínek metody eluovala velmi blízko vnitřního standardu – viz **Obrázek 7**. Nebylo tak možné správně a přesně plochu I.S. odečíst.



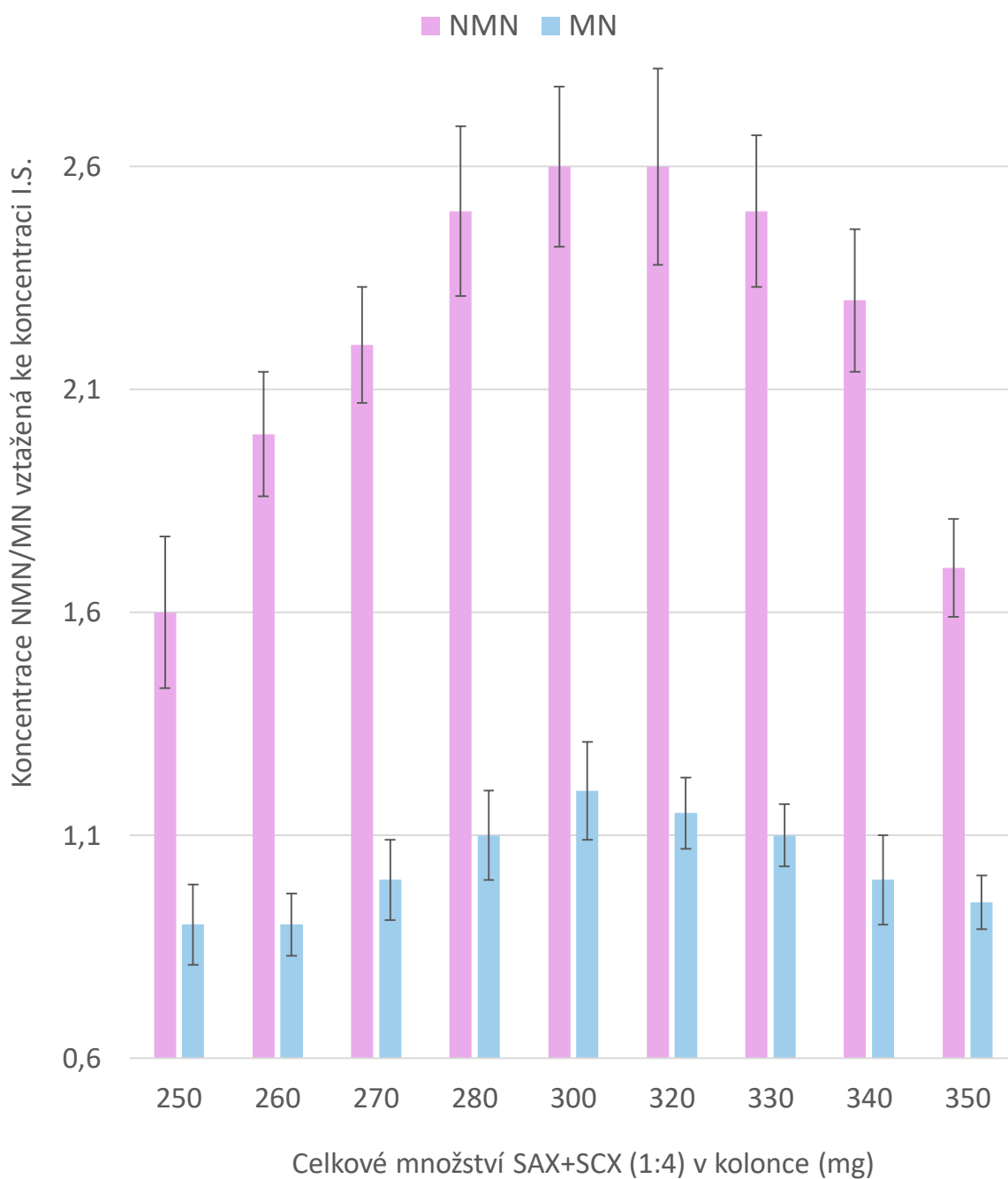
Obrázek 7 Porovnání eluce vnitřního standardu po různých typech SPE

V dalším kroku jsme se tedy podrobněji zaměřili na optimalizaci směsi sorbentů Discovery DSC-SCX a Discovery DSC-SAX. Ke všem pokusům byla využita směsná krevní plazma obohacená NMN, MN a I.S. na výsledné koncentraci všech tří látek cca 5 nmol l⁻¹. V průběhu analýz byly testovány různé postupy plnění kolonek, např. katex a anex v kolonce oddělené fritkou vs. homogenní směs katexu a anexu v kolonce. Ve druhém případě, s homogenní směsí, bylo dosaženo jednoznačně lepších výsledků.

Následně byl testován rozsah optimálního množství SAX, resp. SCX, pro šest zvolených poměrů v třisetmiligramové směsi ve třech opakováních – viz **Obrázek 8**. Výsledky jsou vyjádřeny jako poměry ploch ST(NMN či MN)/I.S. Z grafu je vidět, že nejvyšších výtěžností NMN i MN bylo dosaženo při poměru 1:4 (SAX:SCX). Tento poměr byl dále využíván ke stanovení optimálního množství směsi v kolonce – viz **Obrázek 9**.



Obrázek 8 Graf znázorňující závislost různých poměrů sorbentů na výtěžnosti metanefrinů (každý poměr sorbentů byl připraven 3krát, chybové úsečky zobrazují rozptyl hodnot)



Obrázek 9 Graf znázorňující závislost množství sorbentu na výtěžnosti metanefrinů (každé testované množství bylo připraveno 3krát, chybové úsečky zobrazují rozptyl hodnot)

Dle zjištěných výtěžností je optimálním množstvím směsi sorbentů Discovery DSC-SCX a Discovery DSC-SAX 300–320 mg. Z ekonomických důvodů jsme tedy zůstali u původně zvolených 300 mg.

Samotný postup provedení extrakce se od postupu publikovaného v diplomové práci [1] liší v několika parametrech. Jednou z provedených změn byla optimalizace složení elučního činidla. Dvouapůlnásobné navýšení koncentrace hydroxidu vedlo ke snížení přítomnosti interferujících látek v získaném extraktu. Dále pak bylo testováno dvojnásobné navýšení objemu dávkovaného vzorku (z 0,5 ml na 1 ml). Zvolené složení sorbentu v SPE kolonce vykazovalo dostačující kapacitu pro navýšený objem. Při zachovaném postupu zakoncentrování následujícím po extrakci (odpaření eluátu dosucha a následná rekonstituce 220 μ l mobilní fáze) tak došlo ke zvýšení citlivosti metody stanovení. Další změnou v SPE postupu bylo zavedení filtračního kroku bezprostředně před elucí, které vedlo k eliminaci některých interferencí z matrice. Nylonový filtr o průměru 25 mm a velikosti částic 0,2 μ m byl před aplikací elučního rozpouštědla nasazen mezi kolonku a otvor do extraktoru – viz **Obrázek 10**. Kvůli přítomnosti filtru však bylo nutné dvojnásobně navýšit objem elučního činidla.



Obrázek 10 Fotografie nylonového filtru umístěného pod SPE kolonkou

Pro doplnění je ještě třeba zmínit, že byla testována stabilita odparků získaných po SPE. Pokud jsou uchovávány při teplotě cca 6 °C, jsou stabilní 1–2 dny. Po 1 týdnu koncentrace metanefrinů v odparku klesne zhruba na polovinu. Jakmile však odparek rekonstitujeme mobilní fází, je stabilní pouze několik hodin (nejvýše deset).

V rámci snahy ještě více eliminovat přítomnost interferujících látek ve vzorku, zlepšit detekci analytů a současně šetřit analytickou kolonu byla testována centrifugace krevní plazmy, která byla zařazena v rámci předúpravy vzorků plazmy před SPE.

Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že optimální je odstředit plazmu při 4 °C a relativní odstředivé síle (RCF) cca 1000–2000 g po dobu 5 až 15 min. Pro účinné odstranění proteinů je navíc doporučováno přidat ke vzorku krevní plazmy deproteinační činidlo, např. silnou kyselinu (chloristou, trifluoroctovou, trichloroctovou, mravenčí, chlorovodíkovou, metafosforečnou), organické rozpouštědlo (methanol, ethanol, propanol, acetonitril), sůl vícemocného iontu (síran zinečnatý nebo měďnatý) atp. [36, 121]

V různých kombinacích byla testována RCF v rozsahu 1000–4000 g bez přidaného činidla, s přidavkem organických rozpouštědel (acetonitrilu, ethanolu, methanolu) či s vybranými kyselinami o koncentraci 4 mol l⁻¹ (HCOOH, HCl, HClO₄, HPO₃, TFA). Následovala SPE a analýza pomocí HPLC/ED. U všech postupů deproteinace plazmy s využitím odstředování byla problémem ztráta výtěžnosti způsobená nejspíše zachycením většího či menšího množství přítomných metanefrinů ve sraženině. Nejvyšších výtěžností NMN a MN bylo dosaženo s přidavkem 4 mol l⁻¹ HCOOH (v poměru 1:10, kyselina : plazma), při RCF 2000 g, 4 °C a době odstředování 15 min. Nicméně následující extrakce na SPE kolonkách byla problematická. Odstředěná plazma velmi špatně procházela sorbentem. Doba pro předúpravu vzorku se tedy výrazně navýšila a výsledné výtěžnosti metanefrinů naopak snížily (cca o 10 %). A ani odstředění bez následné SPE neposkytovalo žádoucí výsledky. Od centrifugace vzorků plazmy před SPE bylo tedy upuštěno.

Optimalizovaný postup předúpravy vzorků krevní plazmy určených ke stanovení volných metanefrinu byl využit k výrobě „FEO-kitu“. Tato „Souprava pro stanovení volných metanefrinů v plazmě metodou LC/ECD“ obsahuje téměř veškerý potřebný materiál (SPE kolonky, roztoky pro SPE, kalibrační roztoky metanefrinu, roztok I.S., filtry pro SPE, mobilní fáze a manuál v češtině) pro 100 analýz.

Notifikací popsaného zdravotnického prostředku zaslanou na Ústav v oblasti zdravotnických prostředků (ústav v rámci Státního ústavu pro kontrolu léčiv) včetně veškeré potřebné dokumentace (zejména Prohlášení o shodě) bylo výrobku přiděleno označení CE. Pro „FEO-kit“ byl navíc na Úřadu průmyslového vlastnictví (ÚPV) zapsán Užitený vzor číslo 27 302 s názvem „Souprava pro předúpravu vzorků krevní plazmy určených ke stanovení volných metanefrinů“.

4.2.2 Optimalizace metody stanovení metanefrinů

Vývoj metody stanovení započal již v mé diplomové práci [1] a v rámci předložené disertační práce byly provedeny navazující rozsáhlé optimalizační postupy.

Kvůli změně chromatografické kolony bylo upraveno (sníženo) množství organické složky v mobilní fázi tak, aby sledované analyty byly optimálně separovány od ostatních složek ve vzorku. Díky změně kolony bylo dosaženo užších elučních křivek a současně tak i lepší separace od ostatních složek obsažených v krevní plazmě. Výraznou výhodou však bylo zejména nepoměrně rychlejší ustalování této kolony pro analýzu.

Dále došlo k úpravě hodnot napětí vkládaných na elektrody detektoru. Optimalizace těchto hodnot byla vždy provedena na základě vyhodnocení voltamometrické křivky proměřené za podmínek metody na daném detektoru.

Výchozí podmínky pro Coulochem III byly:

- +400 mV na kondicionační cele,
- +100 mV na 1. měrné elektrodě,
- -400 mV na 2. měrné elektrodě.

Finální podmínky v rámci validované metody s využitím Coulochemu III byly:

- +400 mV na kondicionační cele,
- +100 mV na 1. měrné elektrodě,
- -350 mV na 2. měrné elektrodě.

A při přechodu na novější detektor, ECD-3000RS, byly hodnoty vloženého napětí zvoleny následovně:

- +400 mV na 1. měrné elektrodě,
- -300 mV na 2. měrné elektrodě.

4.2.3 Validace metody stanovení metanefrinů

Optimalizovaná metoda stanovení volných metanefrinů (normetanefrinu a metanefrinu) v plazmě (pomocí LC/Coulochem III) byla v roce 2014 validována a publikována v rámci diplomové práce Ing. Salfické. [122] O dva roky později byla validována metoda stanovení volných metanefrinů (NMN, MN i 3-MT) v plazmě s využitím UHPLC a zcela nového elektrochemického detektoru ECD-3000RS. Tato validace je v předložené práci popsána v následujících odstavcích. Shrnutí výsledků jednotlivých testovaných parametrů nabízí **Tabulka 2.**

Tabulka 2 Souhrn výsledků validace metody stanovení volného normetanefrinu (NMN), metanefrinu (MN) a 3-methoxytyraminu (3-MT) v krevní plazmě

Validační parametr	Výsledek		
	NMN	MN	3-MT
Přesnost	RSD 9,4 %	RSD 11,5 %	RSD 14,6 %
Správnost	Výtěžnost 114 % ^b , RSD 6,2 %	Výtěžnost 107 % ^b , RSD 6,1 %	-
	Výtěžnost 112 % ^c , RSD 7,0 %	Výtěžnost 111 % ^c , RSD 7,5 %	Výtěžnost 105 % ^c , RSD 8,9 %
Linearita^a	R ² = 0,9934	R ² = 0,9960	R ² = 0,9976
LOD	28 ^d pmol l ⁻¹	21 ^d pmol l ⁻¹	36 ^d pmol l ⁻¹
LOQ	93 ^e pmol l ⁻¹	71 ^e pmol l ⁻¹	120 ^e pmol l ⁻¹
Robustnost	ano	ano	ano

^a osm kalibračních roztoků NMN, MN i 3-MT, analyzovaný rozsah cca 0,25–200 nmol l⁻¹ (tzn. 0,05–40 nmol l⁻¹ plazmy)

^b fyziologický level (NMN: cca 550 pmol l⁻¹, MN: cca 300 pmol l⁻¹)

^c patologický level (NMN: cca 38 nmol l⁻¹, MN: cca 8 nmol l⁻¹, 3-MT: cca 9 nmol l⁻¹)

^d tzn. LOD ve vzorcích plazmy (před zakoncentrováním) je 13 pmol l⁻¹ pro NMN, 11 pmol l⁻¹ pro MN a 16 pmol l⁻¹ pro 3-MT

^e tzn. LOQ ve vzorcích plazmy (před zakoncentrováním) je 19 pmol l⁻¹ pro NMN, 15 pmol l⁻¹ pro MN a 25 pmol l⁻¹ pro 3-MT

RSD = relativní směrodatná odchylka

LOD = mez detekce

LOQ = mez stanovitelnosti

Přesnost metody byla hodnocena na základě velikosti relativní směrodatné odchylky (RSD) vícenásobně provedeného totožného postupu SPE téhož vzorku obohacené lidské krevní plazmy (koncentrační hladina metanefrinů cca 4,5 nmol l⁻¹). Ke každému vzorku byl před SPE též přidán I.S. HMBA na úrovni 4,5 nmol l⁻¹. Výsledky byly pro výpočet RSD vyjádřeny jako poměry ploch ST(NMN, MN či 3-MT)/I.S. Pro NMN a MN je RSD zhruba na úrovni deseti procent, pro 3-MT bezmála 15 %, takové hodnoty bývají u biologických vzorků běžné.

Pro vyhodnocení linearity několika koncentračních úrovní metanefrinů bylo zvoleno rozmezí, které pokrývalo naprostou většinu všech testovaných vzorků krevní plazmy (na fyziologické i patologické úrovni metanefrinů), tj. 0,05–40 nmol l⁻¹ plazmy. Celkem bylo v tomto rozmezí analyzováno osm koncentračních hladin. Jednotlivé vzorky byly připraveny obohacením totožných vzorků lidské krevní plazmy o kalibrační roztoky připravené postupným naředěním zásobního roztoku NMN, MN a 3-MT. Linearita byla hodnocena na základě korelačních koeficientů. Pro NMN byla zjištěna hodnota 0,9934, pro MN 0,9960 a pro 3-MT 0,9976. V porovnání s validací metody pro NMN a MN provedené na LC/Coulochem III [122] bylo dosaženo výrazně lepších výsledků. Na Coulochemu nebylo s popsanou metodou možné dosáhnout linearity v takto širokém rozmezí, kalibrační křivka měla spíše kvadratický charakter. Proto byla linearita posuzována zvlášť pro nízké (0,3–5 nmol l⁻¹ plazmy) a zvlášť

pro vysoké koncentrace metanefrinů (7,5–15 nmol l⁻¹ plazmy), přičemž korelační koeficienty byly pro NMN 0,9877, resp. 0,9961, a pro MN 0,9894, resp. 0,9813.

Správnost metody byla hodnocena na základě procentické hodnoty výtěžnosti (společně s RSD) analýz vzorků s předem stanovenou koncentrací sledovaných analytů. Byly měřeny komerční vzorky lyofilizované plazmy s fyziologickou i patologickou úrovní metanefrinů od firmy Chromsystems – „Endocrine Plasma Controls (lyoph.)“. Fyziologické úrovně jsou stanoveny na 546 pmol l⁻¹ pro NMN, 304 pmol l⁻¹ pro MN a patologické na 38,2 nmol l⁻¹ pro NMN, 7,6 nmol l⁻¹ pro MN, resp. 9,0 nmol l⁻¹ pro 3-MT. Výsledné výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí 105–114 % (RSD 6–9 %).

Dalšími testovanými parametry byly meze detekce a stanovitelnosti (LOD a LOQ). K analýze bylo připraveno 5 koncentračních hladin v analyzovaném rozmezí 50–300 pmol l⁻¹. Jednotlivé vzorky byly připraveny obohacením totožných vzorků lidské krevní plazmy o kalibrační roztoky MN, NMN a 3-MT. LOD i LOQ byly následně vyhodnoceny z výsledků měření statistickým programem QCexpert. I zde bylo dosaženo výrazně lepších výsledků než při validaci s Coulochemem. Výsledné hodnoty se pohybují pouze v řádech desítek pmol l⁻¹.

Pro stanovení robustnosti bylo provedeno SPE jednoho vzorku obohacené lidské krevní plazmy, analyzovaná koncentrace metanefrinů i I.S. byla cca 4 nmol l⁻¹. Robustnost metody byla ověřována změnou injektážního objemu, změnou rychlosti průtoku mobilní fáze, změnou teploty na koloně a změnou potenciálu analytické cely.

Standardní podmínky byly:

- dávkované množství: 150 µl,
- průtok: 0,50 ml min⁻¹,
- teplota na koloně: 28 °C,
- detekční potenciál: -350 mV.

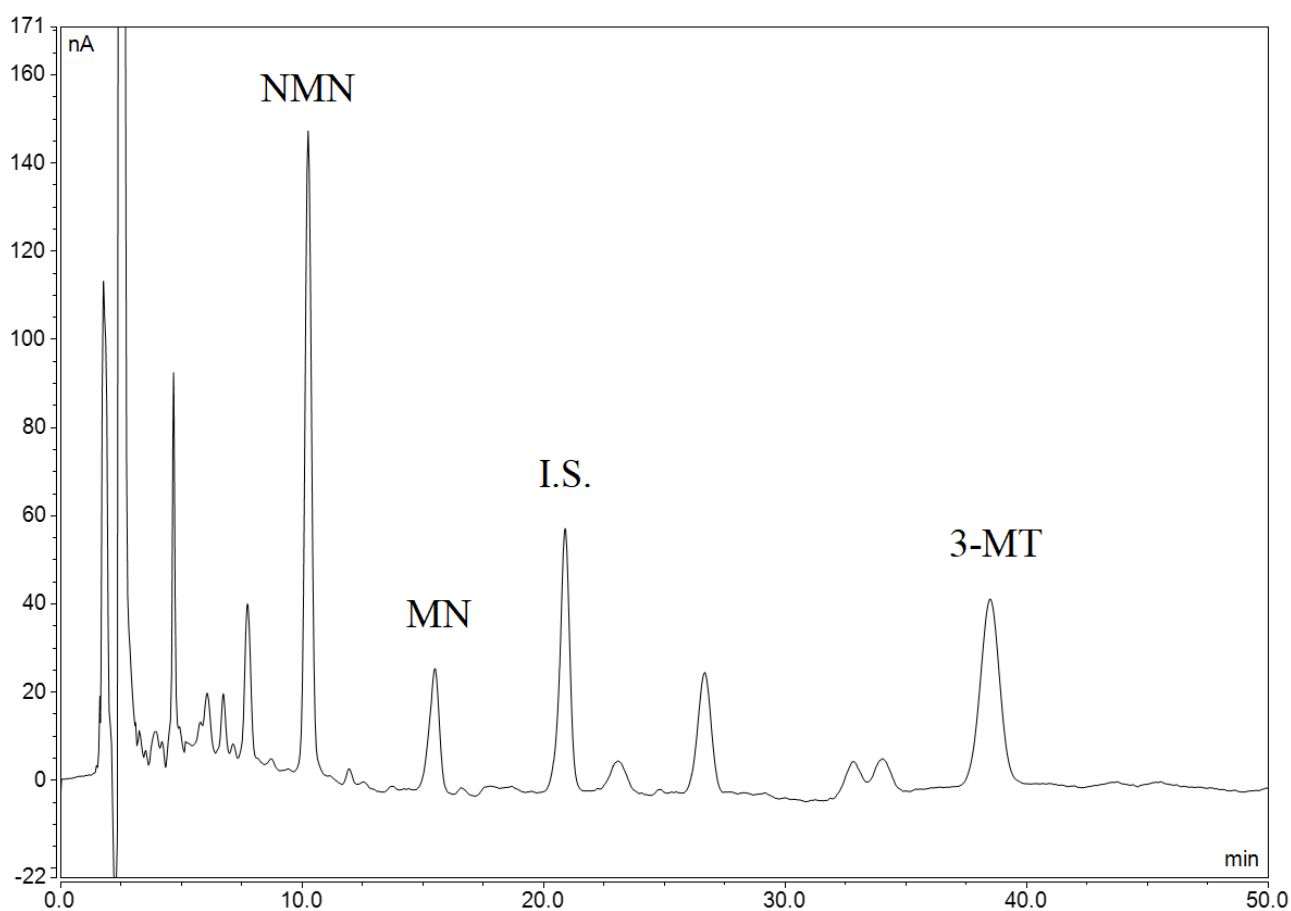
Tyto podmínky byly upraveny následovně:

- dávkované množství: 140 µl,
- průtok: 0,55 ml min⁻¹,
- teplota na koloně: 30 °C,
- detekční potenciál: -375 mV.

Všechny tyto parametry byly proměřeny v osmi kombinacích a výsledky vyhodnoceny statistickým počítačovým softwarem EffiValidation 3.0. Dle Dongova algoritmu byly všechny hypotézy přijaty, metoda je tedy vůči testovanému robustní.

Metoda byla certifikována Českým institutem pro akreditaci (ČIA).

Ve srovnání s detektorem Coulochem III bylo dosaženo zejména nižších mezí detekce (cca 14krát). Dále bylo dosaženo linearity ve výrazně širším rozsahu koncentrací (navíc s lepší hodnotou korelačního koeficientu). **Obrázek 11** znázorňuje záznam analýzy vzorku pacienta s využitím LC/ECD-3000RS.



Obrázek 11 Chromatografický záznam analýzy metanefrinů v krevní plazmě

- stanovení normetanefrinu (NMN), metanefrinu (MN), vnitřního standardu (I.S.) a 3-methoxytyraminu (3-MT) validovanou metodou využívající LC/ECD-3000RS (parametry metody viz kapitola 4.1.7)

4.2.4 Porovnávání analýz vzorků krevní plazmy

Validovanou metodou bylo na našem pracovišti ve Výzkumném ústavu organických syntéz (VUOS) analyzováno několik vzorků lidské krevní plazmy získaných z 3. interní kliniky

1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a VFN. Pro vyhodnocování koncentrací metanefrinů v těchto vzorcích v naší laboratoři byla využívána lineární kalibrace metanefrinů v plazmě. Při přípravě kalibračních bodů tedy bylo postupováno stejně jako při přípravě vzorků. Získané výsledky byly porovnány s výsledky dosaženými na analytickém pracovišti VFN, kde mají zavedenou vlastní metodu na stanovení MN a NMN, viz **Tabulka 3**.

Tabulka 3 Srovnání výsledků stanovení volného normetanefrinu (NMN), metanefrinu (MN) ve vzorcích krevní plazmy vybraných pacientů

Vzorek č.	VUOS*		VFN**	
	NMN pmol l ⁻¹	MN pmol l ⁻¹	NMN pmol l ⁻¹	MN pmol l ⁻¹
101	295	1848	251	1609
102	5519	3305	5454	3503
103	13831	472	13934	426
104	1022	228	1023	208
105	978	294	918	269
106	9481	964	9415	995
107	4552	2980	4377	3020

*Analyzováno na našem pracovišti ve Výzkumném ústavu organických syntéz.

**Analyzováno v laboratoři endokrinologie a metabolismu 3. interní kliniky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (jimi vyvinutou a rutinně používanou metodou).

Dále byly změřeny komerční vzorky lyofilizované plazmy, „Endocrine Plasma Controls (lyoph.)“, v naší laboratoři naší metodou, ve VFN jejich i naší metodou a v laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK jejich metodou, viz **Tabulka 4**.

Každý vzorek byl vždy změřen 10krát a všechny uvedené výsledné hodnoty jsou tedy průměrem získaných hodnot. Pro všechny analýzy bylo využito spojení LC/ED. Z porovnání v tabulce je vidět, že výsledky získané s využitím námi vyvinuté metody jsou správnější. Navíc v žádné z laboratoří analyticky nestanovují 3-MT, který indikuje metastázy tumoru feochromocytomu.

Tabulka 4 Porovnání výsledků analýz vzorků komerčně dostupné lyofilizované plazmy s předem stanovenou koncentrací metanefrinů mezi jednotlivými pracovišti

		<i>Výrobce</i>	VUOS*	FNHK**	VFN***	
					VFN metoda	VUOS metoda
pmol l⁻¹						
Fyziologická hladina	NMN	546±109	579±38	737±59	486±49	584±43
	MN	304±61	325±30	239±46	213±25	279±30
Patologická hladina	NMN	38220±7644	38312±3783	42327±4381	31730±3458	39383±3878
	MN	7605±1521	8071±774	7091±782	6655±670	7685±746

*Analyzováno na našem pracovišti ve Výzkumném ústavu organických syntéz.

**Analyzováno v laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK (jimi vyvinutou a rutinně používanou metodou).

***Analyzováno v laboratoři endokrinologie a metabolismu 3. interní kliniky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (jimi vyvinutou a rutinně používanou metodou a pro srovnání též námi vyvinutou validovanou metodou).

5 INDOXYL SULFÁT

5.1 Experimentální část

5.1.1 Použité chemikálie

- 1-oktansulfonát sodný, monohdrát, 99 % p.a. (Sigma-Aldrich)
- dihydrogenfosforečnan sodný, monohdrát, 99 % p.a. (Sigma-Aldrich)
- hydroxid sodný, 98 % p.a. (Lach-Ner)
- kyselina ethylendiamintetraoctová, 99 % p.a. (Sigma-Aldrich)
- kyselina chloristá, 70% (Sigma-Aldrich)
- kyselina octová, 99 % p.a. (Lach-Ner)
- kyselina pikrová, ≥ 98 % (Sigma-Aldrich)
- methanol, $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich)
- standard indoxyl sulfát, draselná sůl, ≥ 98 % (Sigma-Aldrich)
- standard kreatinin, ≥ 98 % (Sigma-Aldrich)

5.1.2 Použitý materiál

Filtry:

- 25 mm Filter Nylon 0,2 μm (Thermo Fisher Scientific)

5.1.3 Přístrojové vybavení

Chlazená centrifuga:

- Sigma 3-16 KL (Sigma Laborzentrifugen)

pH metr:

- WTW 526/538 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten) s nasazenou chloridovou elektrodou SCHOTT (pH 0...14/-5...+80 °C/Gel, SCHOTT AG); kalibrační roztoky pufrů o pH 7,00 \pm 0,01 a 4,01 \pm 0,01 (Hamilton Duracal Buffer)

Systém pro úpravu vody:

- IWA 20io1 (WATEK s.r.o.)

Ultrazvuková lázeň:

- Sonorex Super RK 510 (Bandelin Electronic)

Váhy:

- analytické váhy 870-61 s citlivostí 0,1 mg (Mettler – Toledo)

HPLC/ED-DAD:

- kapalinový chromatograf UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher Scientific)
- elektrochemický detektor ECD-3000RS s celou 6011RS (Thermo Fisher Scientific)
- detektor diodového pole DAD-3000RS (Thermo Fisher Scientific)

5.1.4 Příprava roztoků

Roztoky standardů:

- *Indoxyl sulfát a kreatinin k analýzám vzorků moči:*

Zásobní roztoky obou standardů byly připraveny jejich přesným odvážením pomocí analytických vah, zvlášť 1000 mg kreatininu do odměrné baňky o objemu 50 ml a zvlášť 50 mg IS do odměrné baňky stejného objemu. Následně byly oba rozpuštěny v 0,2 mol l⁻¹ kyselině octové a dále uchovávány při teplotě 4 °C. Kalibrační roztoky byly dle potřeby připravovány ze zásobních roztoků jejich postupným ředěním 0,2 mol l⁻¹ kyselinou octovou. Kalibrační řada IS byla vždy vytvořena fortifikací směsné moči kalibračními roztoky tohoto standardu.

- *Indoxyl sulfát k analýzám vzorků krevního séra:*

Zásobní roztok standardu IS byl připraven jeho přesným odvážením pomocí analytických vah, 50 mg do odměrné baňky o objemu 50 ml, a rozpuštěn v ultračisté vodě. Získaný roztok byl uchováván při teplotě 4 °C. Kalibrační roztoky byly dle potřeby připravovány ze zásobního roztoku jeho postupným ředěním ultračistou vodou. Kalibrační řada IS byla vždy vytvořena fortifikací směsného séra kalibračními roztoky IS.

Mobilní fáze:

Mobilní fáze k analýze vzorků moči byly následující:

- *MF A:* Fosfátový pufr obsahující 7 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,30 g IPČ monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,05 g EDTA v 1000 ml vodného roztoku. Hodnota pH pufru byla upravena na 7,3 pomocí 1 mol l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného.
- *MF B:* Methanol

Mobilní fáze k analýze vzorků krevního séra byly následující:

- MF A: Fosfátový pufr obsahující 3,5 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,15 g IPČ a 0,03 g EDTA v 1000 ml vodného roztoku.
- MF B: Methanol

5.1.5 Popis předúpravy biologické matrice

Úprava vzorků moči k analýze:

2 ml lidské moči (bez přídavku či s přídavkem IS) přefiltrované přes nylonový filtr (o průměru 25 mm a velikosti částic 0,2 μm) byly smíseny s 1 ml 1 mol l^{-1} roztoku hydroxidu sodného a následně s 1 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové. Po proběhnutí Jaffého reakce (cca deset minut) byl získaný červeně zbarvený roztok analyzován metodou HPLC/ED-DAD.

Úprava vzorků krevního séra k analýze:

350 μl séra bylo přidáno 350 μl ultračisté vody a 700 μl 7% kyseliny chloristé. Po pěti minutách byly vzorky umístěny do centrifugy chlazené na 4 $^{\circ}\text{C}$ a s RCF nastavenou na hodnotu 10 000 g na 10 minut. Získaný roztok oddělený od bílkovinné sraženiny byl analyzován metodou HPLC/ED.

5.1.6 Chromatografická analýza

Podmínky pro analýzu vzorků moči, kreatininu a IS byly následující (HPLC/ED-DAD):

- mobilní fáze: 95 % MF A a 5 % MF B
- průtok: 0,4 ml min^{-1}
- kolona: Zorbax SB-C18 250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm (Agilent)
- teplota na koloně: 20 $^{\circ}\text{C}$
- dávkované množství: 1 μl
- nastavení detektoru: DAD: vlnová délka 500 nm
ED: na grafitovou pracovní elektrodu bylo vloženo napětí +400 mV (vůči palladiové referenční elektrodě)

Podmínky pro analýzu vzorků krevního séra a IS byly následující (HPLC/ED):

- mobilní fáze: 85 % MF A a 15 % MF B
- průtok: 0,3 ml min^{-1}
- předkolona: UHPLC C18 4,6 mm ID Column (Phenomenex)
- kolona: Kinetex XB-C18 100 mm \times 4,6 mm \times 5 μm (Phenomenex)

- teplota na koloně: 20 °C
- dávkované množství: 10 µl
- nastavení detektoru: ED: na grafitovou pracovní elektrodu bylo vloženo napětí +400 mV (vůči palladiové referenční elektrodě)

5.2 Výsledky a diskuze

5.2.1 Optimalizace postupu předúpravy biologické matrice

Stanovení IS v *moči* bylo cíleno na jednorázové vzorky této matrice (získané od dobrovolníků z VUOS či z FNHK), nikoli na dvacetičtyřhodinový sběr, jak bývá zvykem. Bylo tedy žádoucí vztahovat změřenou koncentraci IS na množství kreatininu ve vyšetřovaném vzorku moči. Množství kreatininu v této biologické matrici je pro každého člověka specifické v závislosti na jeho zdravotním stavu, fyzické kondici a množství svalové hmoty. Změny koncentrace kreatininu tak odráží zejména rozdílný příjem tekutin během dne, aktuální zředěnost moči a tedy i míru zakoncentrování sloučenin přítomných ve vzorku. [75]

Na základě našich měření je možné stanovit množství kreatininu v moči jednoduše pomocí parametrů rovnice přímky změřené kalibrační řady standardu kreatininu v ultračisté vodě. Před analýzou je nutno kalibrační roztoky i testované vzorky podrobit Jaffého reakci [73], při níž kreatinin zreaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Získané červeně zbarvené roztoky (díky přítomnosti kreatinin-pikrátu) jsou analyzovány pomocí HPLC/DAD.

Otázkou však bylo, jak v těchto roztocích změřit současně i množství IS. Spektrofotometricky by to bylo problematické z důvodu možných nežádoucích interferencí použitých činidel (k IS se přidává např. Obermayerovo činidlo či *p*-dimethylaminobenzaldehyd [123]). Byla tedy zvolena elektrochemická detekce, pomocí které lze IS jednoduše stanovit jak v neupravených vzorcích moči, tak i ve vzorcích po Jaffého reakci. Podrobněji viz následující kapitola 5.2.2.

Vzorky *krevního séra* byly získávány z FNHK, kde vybrané vzorky krve odebírali do zkumavek obsahujících separační gel a po třiceti minutách je odstředili při 2000 g (po dobu 10 min). Separační gel se během centrifugace posune do prostoru mezi povrch krevní sraženiny a sérum, kde vytvoří stabilní bariéru, která separuje sérum od vysráženého fibrinu a krevních buněk. Alikvoty séra byly uchovávány při -75 ° C.

Během optimalizace izolace IS z krevního séra bylo vycházeno z testování různých podmínek nastavení odstředění krevní plazmy pro stanovení PMN (viz kapitola 4.2.1). K analýzám PMN se centrifugace neosvědčila z toho důvodu, že docházelo k významným ztrátám výtěžnosti těchto látek. Nabízelo se tedy zkusit, jaké budou výsledky v případě IS. Ze vzorků krevního séra je žádoucí před analýzou odstranit bílkoviny pro zvýšení selektivity i citlivosti a zároveň uvolnit IS z vazby na albumin. Na základě literatury [78, 79, 80] bylo testováno odstředění séra bez přidaných činidel i s přísávkou kyseliny chloristé, kyseliny mravenčí a acetonitrilu v různých poměrech s RCF v rozmezí 4 000–10 000 g.

Optimálním postupem, pomocí něhož byl s vysokou výtěžností získán IS a zároveň eliminovány ostatní složky vzorku, byl vyhodnocen přísávek ultračisté vody ke vzorku séra (v poměru 1:1) a následný přísávek 7% kyseliny chloristé ke směsi (v poměru 1:1). Po pěti minutách byly upravené vzorky vloženy do centrifugy nastavené na deset minut a 10 000 g (viz kapitola 5.1.5).

5.2.2 Optimalizace metod stanovení indoxyl sulfátu

Optimalizace HPLC/ED-DAD metody stanovení IS v moči

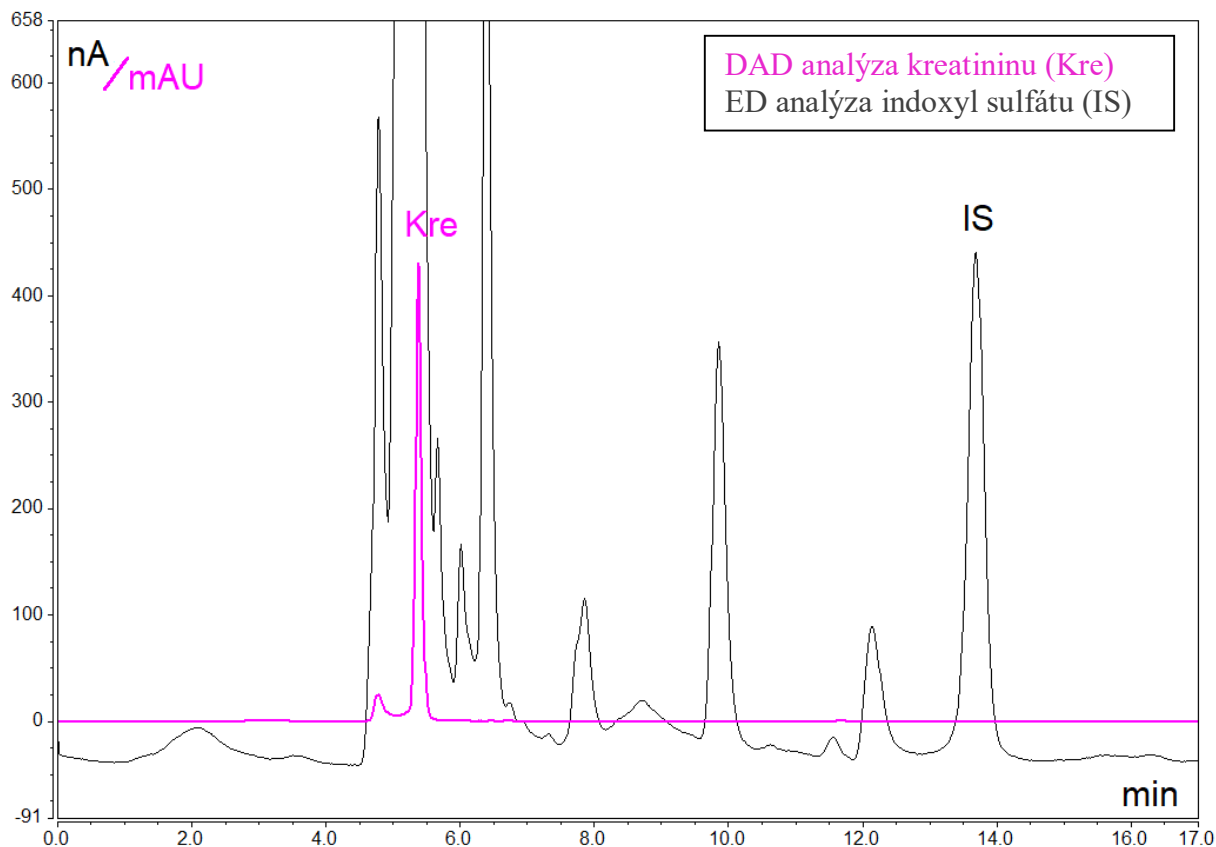
Pro stanovení kreatininu a IS v moči byla nejprve testována kolona používaná ke stanovení PMN (Kinetex XB-C18 100 × 4,6 mm × 5 μm), nicméně počáteční měření ukázala, že by bylo vhodnější ji vyměnit za delší kolonu typu C18. Byla tedy zvolena Zorbax SB-C18 250 mm × 4,6 mm × 5 μm a ta se pro analýzy vzorků moči osvědčila.

V počátcích optimalizace metody byl jako mobilní fáze využit běžně používaný fosfátový pufr obsahující navíc EDTA pro žádoucí odstranění stop těžkých kovů a zvýšení citlivosti elektrochemické detekce. Hodnota pH pufru byla postupně zvyšována až na 7,3, při níž byla odezva IS optimální. Do MF bylo přidáno též IPČ pro zvýšení selektivity (jako při stanovení PMN) a organická složka (konkrétně methanol), jejichž koncentrace byly optimalizovány pro dosažení separace eluční křivky IS od ostatních složek vzorku. Zvyšováním koncentrace IPČ dochází k prodlužování retenčních časů sledovaných analytů. Vyšší množství methanolu naopak vede k výraznému snížení retenčních časů. Z ekonomického i ekologického hlediska je vhodné obou sloučenin přidávat do MF co nejméně. Veškeré složky MF byly pozměňovány též s ohledem na eluci kreatininu. Dle výsledků obsáhlé sady analýz obsahoval jeden litr finální MF 300 mg IPČ a 5 % methanolu.

Po separaci složek vzorku následovala elektrochemická detekce. Hodnota vloženého napětí na pracovní elektrodu byla optimalizována (na +400 mV) na základě vyhodnocení

voltamometrické křivky IS proměřené v rozmezí -300 až $+600$ mV. Následně byl vzorek podroben spektrofotometrické detekci. Proměřením celého viditelného spektra pomocí DAD byla ke stanovení kreatininu, resp. kreatinin-pikrátu, zvolena vlnová délka 500 nm.

Obrázek 12 znázorňuje simultánní analýzu vzorku moči a eluční křivky IS a kreatininu.



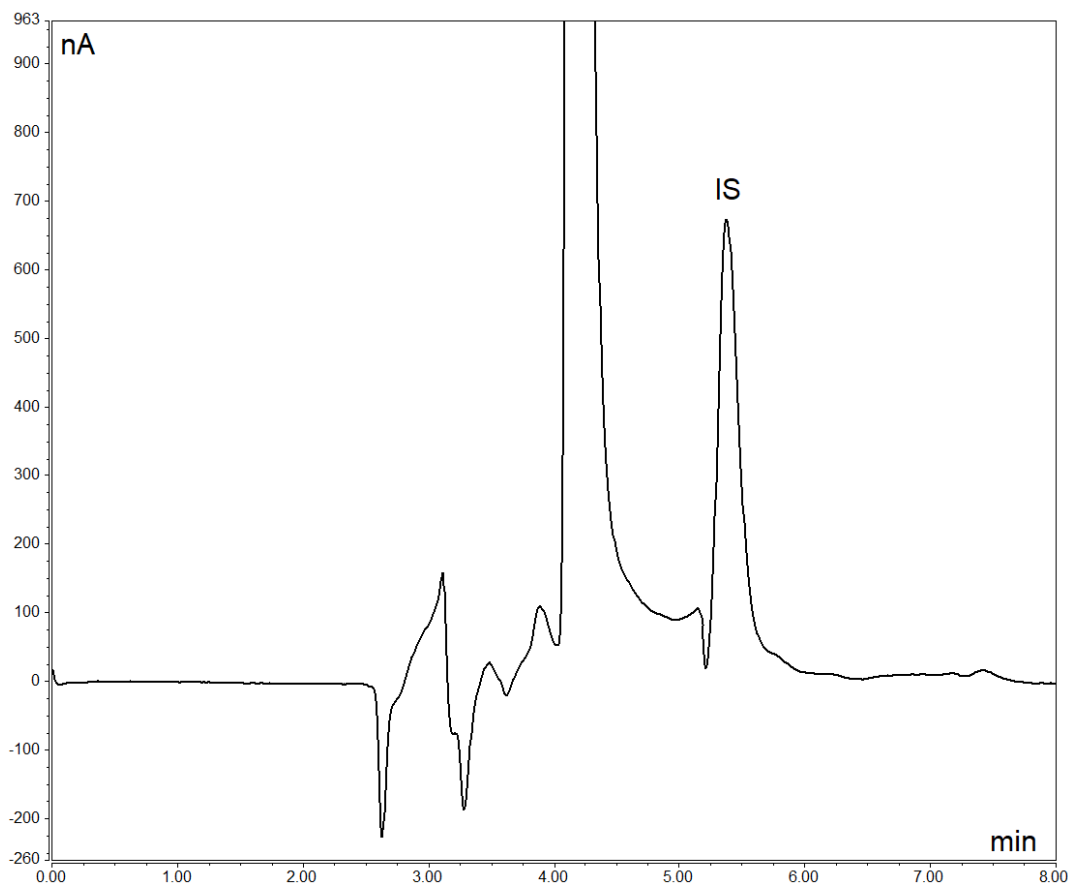
Obrázek 12 Chromatografický záznam analýzy indoxyl sulfátu a kreatininu v moči
- stanovení validovanou metodou využívající LC/ED–DAD (parametry metody viz kapitola 5.1.6)

Optimalizace HPLC/ED metody stanovení IS v krevním séru

Pro stanovení IS v séru se dlouhá kolona Zorbax SB-C18 250 mm \times 4,6 mm \times 5 μ m neosvědčila. První měření ukázala, že bude vhodnější použít kolonu kratší, k analýzám tak byla využívána kolona Kinetex XB-C18 100 \times 4,6 mm \times 5 μ m a MF bylo nutné znovu optimalizovat. Hodnotu pH fosfátového pufru nebylo třeba upravovat, čímž došlo k úspoře času. Množství IPČ bylo sníženo na 150 mg a množství methanolu naopak zvýšeno na 15 %. Průtok MF byl snížen z 0,4 ml min^{-1} na 0,3 ml min^{-1} , aby byla separace IS optimální.

Následovala elektrochemická detekce vzorku. Dle opětovného proměření voltamometrické křivky IS bylo ověřeno, že vložené napětí může zůstat na hodnotě $+400$ mV.

Obrázek 13 znázorňuje analýzu vzorku krevního séra a eluční křivku IS.



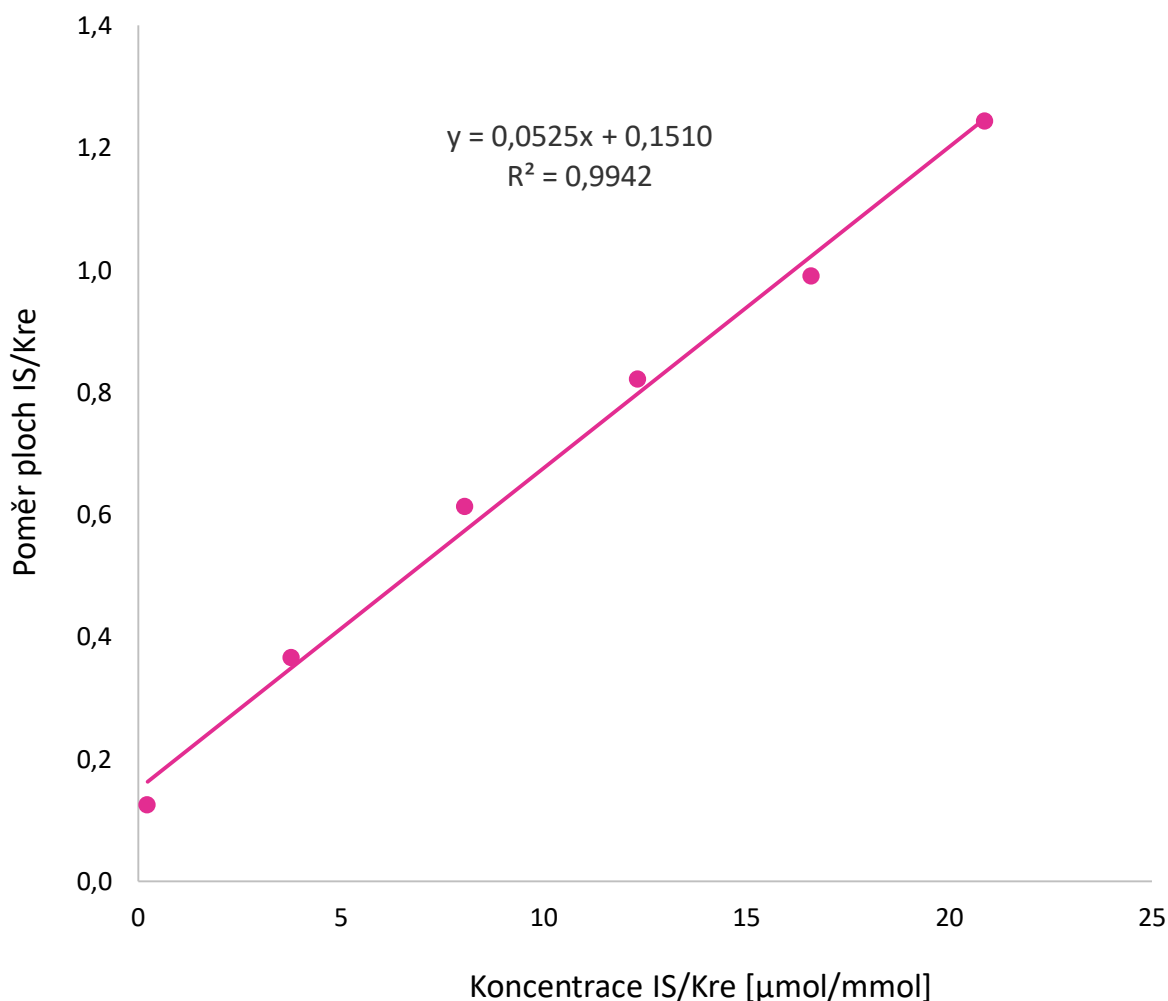
Obrázek 13 Chromatografický záznam analýzy indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru

- stanovení validovanou metodou využívající LC/ED (parametry metody viz kapitola 5.1.6)

5.2.3 Validace metod stanovení indoxyl sulfátu

Vyvinuté metody určené k detekci IS v moči i krevním séru byly validovány. Přesnost a správnost obou metod byly stanoveny pro nižší i vyšší úrovně IS sledované v biologických matricích. A všechny výsledky v průběhu validace metody stanovení IS v moči byly vztahovány k množství přítomného kreatininu. Výsledné koncentrace v moči tedy byly uváděny v jednotkách $\mu\text{mol mmol}^{-1}$. Pro názornější představu je zde přiložena získaná lineární přímka kalibrační řady IS v moči (**Obrázek 14**). Jednotlivé kalibrační body IS byly připraveny obohacením směsné moči na koncentrace v rozmezí 4–333 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a každý výsledek byl vztažen ke koncentraci kreatininu (16 mmol l^{-1}) přítomného ve zvolené směsné moči. Současně je pro porovnání přiložena i křivka kalibrační řady IS (6–416 $\mu\text{mol l}^{-1}$) v séru (**Obrázek 15**). Tato křivka neměla lineární, nýbrž kvadratický charakter.

Shrnutí veškerých výsledků jednotlivých testovaných parametrů validace je uvedeno přehledně v tabulkách – výsledky v moči nabízí **Tabulka 5** a výsledky v séru **Tabulka 6**.



Obrázek 14 Lineární přímka kalibrační řady indoxyl sulfátu (IS) v moči

Tabulka 5 Souhrn výsledků validace metody stanovení indoxyl sulfátu (IS) v moči

Validační parametr	Výsledek	
	Fyziologická hladina	Patologická hladina
Přesnost	RSD 8,0 % ^b	RSD 4,6 % ^c
Správnost	Výtěžnost 101 %, RSD 8,8 % ^b	Výtěžnost 100 %, RSD 11,6 % ^c
Linearita^a	$R^2 = 0,9942$	
LOD	56 nmol l ⁻¹	
LOQ	84 nmol l ⁻¹	
Robustnost	ano	

^a šest kalibračních roztoků, analyzovaný rozsah IS cca 4–333 μmol l⁻¹ moči

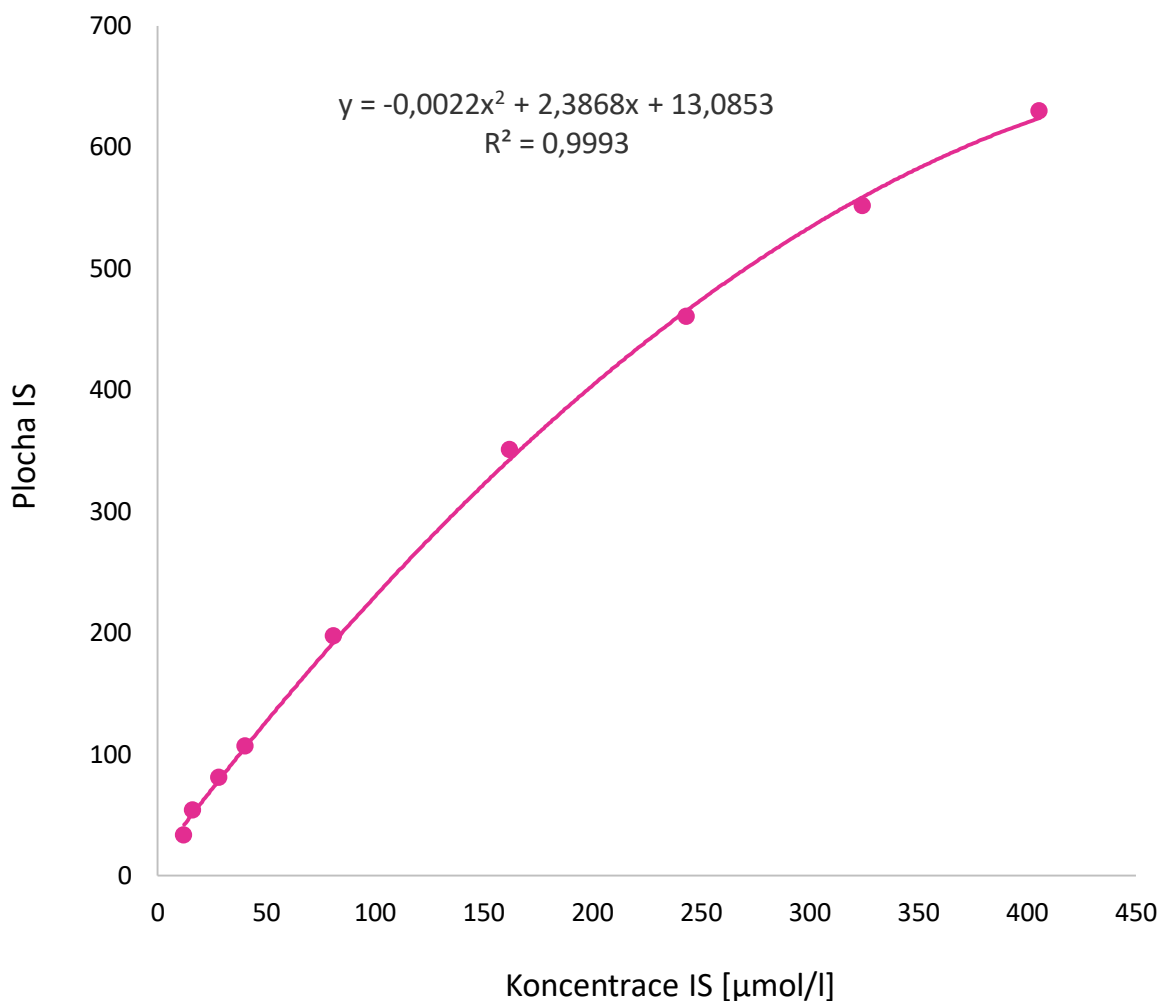
^b fyziologická hladina byla testována na úrovni cca 60 μmol l⁻¹ moči

^c patologická hladina byla testována na úrovni cca 200 μmol l⁻¹ moči

RSD = relativní směrodatná odchylka

LOD = mez detekce

LOQ = mez stanovitelnosti



Obrázek 15 Kvadratická přímka kalibrační řady indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru

Tabulka 6 Souhrn výsledků validace metody stanovení indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru

Validační parametr	Výsledek	
	Nižší koncentrace IS	Vyšší koncentrace IS
Přesnost	RSD 1,8 % ^b	RSD 0,7 % ^c
Správnost	Výtěžnost 96 %, RSD 2,6 % ^b	Výtěžnost 97 %, RSD 1,4 % ^c
Linearita^a	$R^2 = 0,9993$	
LOD	1,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$	
LOQ	2,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$	
Robustnost	ano	

^a devět kalibračních roztoků, analyzovaný rozsah IS cca 6–416 $\mu\text{mol l}^{-1}$ séra

^b koncentrace IS na úrovni cca 40 $\mu\text{mol l}^{-1}$ moči

^c koncentrace IS na úrovni cca 250 $\mu\text{mol l}^{-1}$ moči

RSD = relativní směrodatná odchylka

LOD = mez detekce

LOQ = mez stanovitelnosti

K parametrům (LOD a LOQ) je ještě vhodné doplnit postup jejich získání. Obdobně jako při validaci PMN se vyšlo z kalibrační řady IS a výsledky měření byly následně vyhodnoceny statistickým programem QCexpert. V rámci validace metody stanovení IS v moči byly analyzované roztoky v rozmezí 10–50 nmol l⁻¹ a u validace metody v krevním séru byly v rozmezí 2–10 μmol l⁻¹.

Pro stanovení robustnosti byl využit obohacený vzorek moči nebo séra. Robustnost byla u obou metod ověřována změnami vybraných parametrů o 10 %.

Standardní podmínky byly:

- dávkované množství: 1,0 μl (pro moč) a 10 μl (pro sérum),
- průtok: 0,40 ml min⁻¹ (pro moč) a 0,30 ml min⁻¹ (pro sérum),
- teplota na koloně: 20 °C,
- detekční potenciál: +400 mV.

Tyto podmínky byly upraveny následovně:

- dávkované množství: 0,9 μl (pro moč) a 9 μl (pro sérum),
- průtok: 0,36 ml min⁻¹ (pro moč) a 0,27 ml min⁻¹ (pro sérum),
- teplota na koloně: 22 °C,
- detekční potenciál: +440 mV.

Všechny tyto parametry byly proměřeny v osmi kombinacích a výsledky vyhodnoceny statistickým počítačovým softwarem EffiValidation 3.0. Dle Dongova algoritmu byly všechny hypotézy přijaty, metoda je tedy vůči testovanému robustní.

Obě metody byly po validaci certifikovány ČIA.

6 PROPOJENÍ ELEKTROCHEMIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

6.1 Experimentální část

6.1.1 Použité chemikálie

- acetonitril 99,9 % (Sigma-Aldrich)
- ferrocenemethanol 99 % (ABCR, Karlsruhe, Německo)
- hydroxid sodný ≥ 98 % (Sigma-Aldrich)
- isopropanol 99,8 % p.a. (Roth, Karlsruhe, Německo)
- kyselina mravenčí 98-100 % (Merck)
- kyselina octová 99 % (Sigma-Aldrich)
- octan amonný p.a. (Merck)

6.1.2 Použitý materiál

Filtry:

- 33 mm PES (polyethersulfon) Membrane Filter 0,22 μm (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko)

Jednorázové tenkovrstvé elektrody:

- tištěná uhlíková elektroda (screen-printed carbon electrode) DRP-110 obsahující grafitovou pracovní elektrodu o průměru 4 mm, grafitovou pomocnou elektrodu a argentchloridovou (Ag | AgCl) pseudoreferentní elektrodu (DropSens, Llanera, Španělsko)
- zlatá elektroda ED-SE1-Au složená ze zlaté pracovní elektrody o průměru 1 mm, zlaté pomocné elektrody a zlaté pseudoreferentní elektrody (Micrux Technologies, Oviedo, Španělsko)

Kapiláry z tavného křemene, vnější průměr (o.d.) 360 μm :

- vnitřní průměr (i.d.) 150 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)
- i.d. 100 μm (Polymicro Technologies)
- i.d. 75 μm (Polymicro Technologies)

- i.d. 50 μm (Polymicro Technologies)
- i.d. 25 μm (Polymicro Technologies)
- i.d. 15 μm (Polymicro Technologies)

Další materiál:

- PEEK (polyether ether keton) kapiláry
- PEEK návleky/trubičky na kapiláry
- brusné papíry (zrnitost 30 μm a 9 μm)

6.1.3 Přístrojové vybavení

Injektážní pumpa:

- A-99 (Razel Scientific Instruments, Saint Albans, USA) obsahující skleněnou stříkačku o objemu 1 ml (ILS, Stützerbach, Německo) a propojenou s celami PEEK kapilárou

Potenciostat:

- μ Autolab III se softwarem NOVA 2.0 (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Nizozemí)

Průtokové cely „wall-jet“:

- komerční polymethylmetakrylátová cely ED-FLOW-CELL s průtokovou komůrkou o průměru 2 mm (Micrux Technologies)
- komerční polymethylmetakrylátová cely FLWCL s průtokovou komůrkou o průměru 7 mm (DropSens)
- cely vyrobená z materiálu PEEK – konstrukčně inspirovaná celou ED-FLOW-CELL (dílna Univerzity Regensburg, Německo)

Systém pro úpravu vody:

- Milli-Q Advantage A10 system (Merck Millipore, Darmstadt, Německo)

Ultrazvuková lázeň:

- Sonorex Super RK 510 (Bandelin Electronic, Berlín, Německo)

MS sestava:

- TOF-MS se softwarem MicrOTOF Control 2.3 (micrOTOF, Bruker Daltonics, Bremen,

Německo) vybavený koaxiálním ESI interface (Agilent Technologies) s mikroskopickou kamerou (DigiMicro 1.3, dnt, Dietzenbach, Germany) určenou k monitorování kvality ESI sprejování

6.1.4 Příprava roztoků

Pracovní roztoky ferrocenmethanolu:

Vodný roztok FcMeOH byl připraven jeho rozpouštěním v 50mmol l⁻¹ vodném roztoku octanu amonného při 45 °C po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni a následným filtrováním přes membránový filtr (33 mm, PES, 0,22 μm). Z připraveného 1mmol l⁻¹ roztoku byly dle potřeby připravovány 250μmol l⁻¹, 50μmol l⁻¹, 25μmol l⁻¹ a 10μmol l⁻¹ roztoky.

Organický roztok FcMeOH byl připraven jeho rozpouštěním v acetonitrilovém roztoku 10mmol l⁻¹ octanu amonného a 1mol l⁻¹ kyseliny octové. Ze získaného 1mmol l⁻¹ roztoku byl připraven 50μmol l⁻¹ roztok FcMeOH.

Veškeré roztoky byly uchovávány při teplotě 4 °C.

Nosná kapalina vzorků do MS:

- směs ultračisté vody (49,9 %), isopropanolu (49,9 %) a kyseliny mravenčí (0,2 %)

6.1.5 Předúprava kapilár

Křemenné kapiláry byly vždy zkráceny keramickým nožem na požadovanou délku (15–35 cm). Následně bylo na obou koncích kapiláry opatrně odstraněno několik milimetrů polyimidové vrstvy a konce byly opatrně zbroušeny do rovna (popř. do úhlu 15°) pomocí brusného papíru. Poté byla kapilára promyta ultračistou vodou.

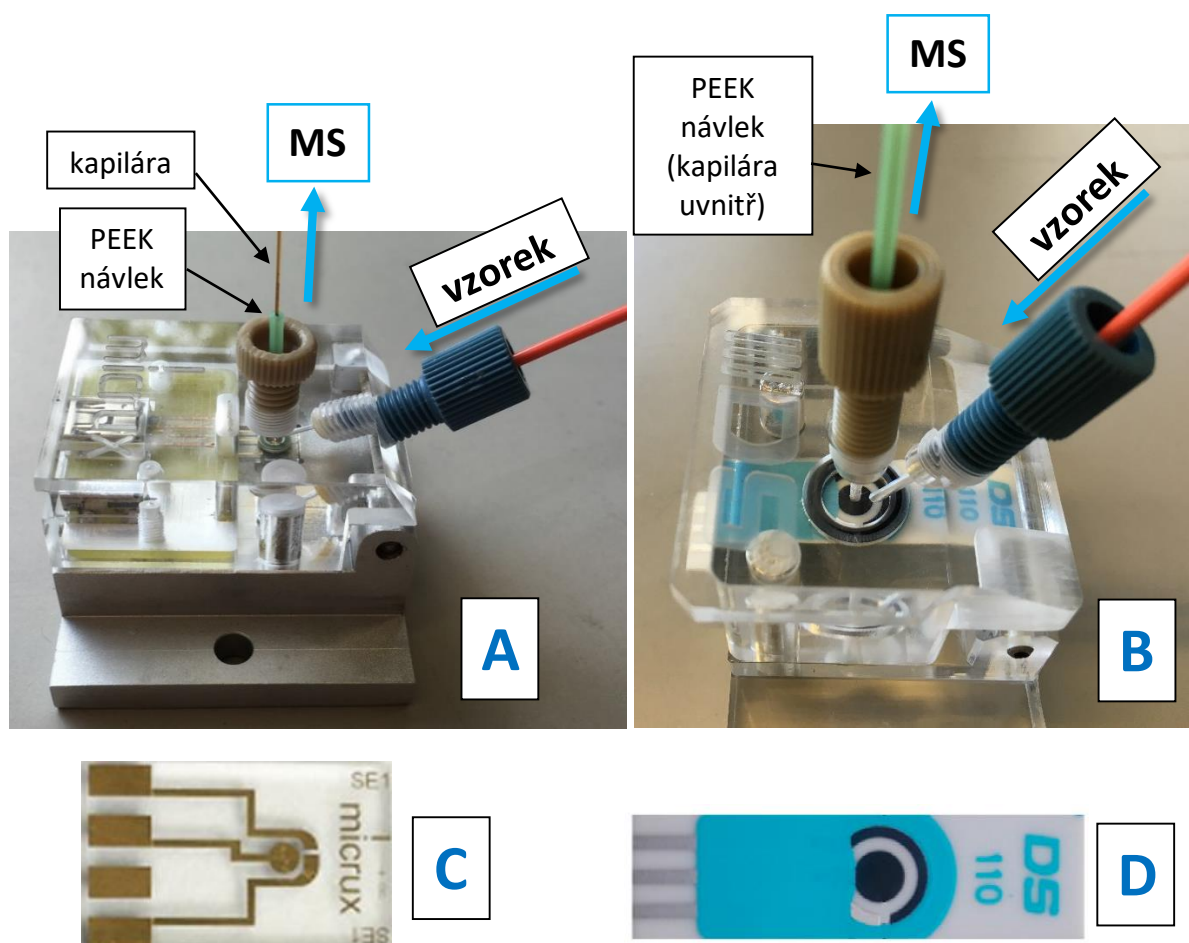
6.1.6 Předúprava tištěných elektrod

Tištěná elektroda je vložena do adaptéru napojeného na potenciostat. Následně se na elektrodu dávkuje kapka používaného pufru a po dobu jedné minuty je aplikováno napětí 1,3 V.

6.1.7 Základní podmínky testování kapilár a průtokových cel

Průtoková cela obsahující zvolenou jednorázovou elektrodu je PEEK kapilárou propojena s dávkovačem vzorku – injektážní pumpou (s nastavitelnou rychlostí průtoku),

do níž je vložena skleněná stříkačka se zvoleným roztokem vzorku. Po elektrochemické přeměně vzorku na elektrodě je roztok odváděn z cely zvolenou kapilárou zasunutou v ochranném tenkém PEEK návleku, prozatím pouze do kádinky (v následujících pokusech bude kapilára ústít do MS – názorné sestavy cel viz **Obrázek 16**). Tato kapilára je před zahájením analýz po dobu 10 min kondiciována pomocí 0,1 mol l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného, následně 5 min promývána ultračistou vodou a na závěr 30–40 min používaným puřrem.



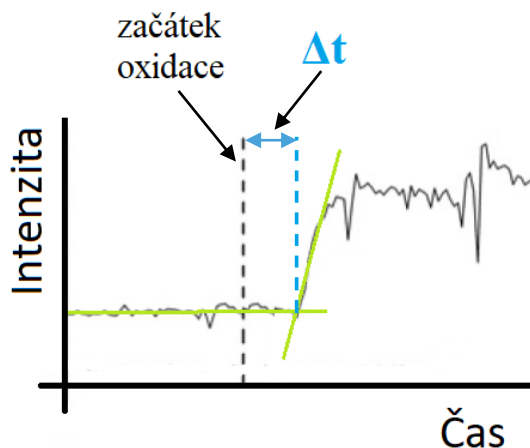
Obrázek 16 Používané sestavy komerčních průtokových cel a elektrod

(**A**: průtoková cela ED-FLOW-CELL Micrux; **B**: průtoková cela FLWCL DropSens; **C**: elektroda ED-SE1-Au; **D**: elektroda DRP-110)

6.1.8 Podmínky EC/MS analýz

Roztok FcMeOH byl přiváděn na elektrodu v cele a následně odváděn do MS – viz sestava popsaná v kapitole 6.1.7). Cella byla připojena k potenciostatu, pomocí něhož bylo možné volit hodnotu napětí na elektrodě. Signál analyzované sloučeniny byl vždy nejprve po dobu 180 sekund nahráván bez elektrochemické oxidace a následně bylo vloženo napětí

+400 mV po dobu dalších 180 sekund. Pro zvolení optimální EC/MS sestavy byla sledována doba přenosu vzorku od elektrody do MS (způsob odečtu viz **Obrázek 17**) a míra oxidace FcMeOH (v závislosti na sledované intenzitě).



Obrázek 17 Znárodnění sledované doby přenosu vzorku z cely do MS – Δt

6.1.9 Nastavení hmotnostního spektrometru

Veškeré MS analýzy byly prováděny v pozitivním módu ionizace se zaměřením na m/z 216,06. Optimalizované nastavení bylo následující:

- rozsah: 50–400 m/z
- parametry ESI:
 - napětí na kapiláře –4 000 V
 - tlak nebulizačního plynu: 1,8 bar
 - průtok sušícího plynu: 5,0 l min^{-1}
 - teplota sušícího plynu: 210 °C
- parametry optiky hmotnostního analyzátoru:
 - napětí na výstupu kapiláry: 75 V
 - skimmer 1: 25,3 V
 - hexapole 1: 23,0 V
 - hexapole RF: 65,0 V
 - skimmer 2: 23,0 V
 - lens 1 transfer: 49,0 μs
 - lens 1 pre pulse storage: 5,0 μs

6.2 Výsledky a diskuze

6.2.1 Optimalizace elektrochemické průtokové cely

Cílem bylo sestavit takový EC/MS systém (potažmo EC/CE/MS systém), který bude schopen ve velmi krátkém čase generovat a určit produkty elektrochemických reakcí ve vodných i organických roztocích vzorků. Z toho důvodu byla vedle optimalizace průtokové cely a elektrod neméně důležitá též optimalizace použité kapiláry vedoucí vzorek od elektrody do MS vstupu (její úprava, délka, i.d., umístění atp.). K veškerým pokusům byl zvolen ferrocenmethanol, který bývá běžně využíván jako modelová sloučenina pro elektrochemický výzkum.

První pokusy byly prováděny s jednorázovými uhlíkovými PE a kompatibilní celou FLWCL DropSens. Kompletní sestava je popsána v kapitole 6.1.7. Cílem pokusů s touto celou bylo optimalizovat:

- velikost průtoku vzorku
- rozměry kapiláry
- pozici kapiláry

Nejprve byly připraveny kapiláry s i.d. 150, 100 a 75 μm . Bylo testováno těsnění sestavy a možnost nastavení nejvyššího možného průtoku ($48 \mu\text{l min}^{-1}$) na injektážní pumpě, aniž by se někde v sestavě projevilo nežádoucí podtékání roztoku vzorku. Také byly porovnávány oba možné typy dávkování vzorku – původní zapojení (viz **Obrázek 16**) a opačné zapojení (tj. shora přívod vzorku přímo na celu a odvod vzorku šikmo vzhůru). A byly otestovány dvě různé pozice cely – dnem dolů a dnem vzhůru.

Po otestování cely na těsnost, sestavení a zapojení byla zvolena konfigurace znázorněná a popsána v kapitole 6.1.7. Nadále bylo snižováno i.d. kapiláry s cílem eliminovat možné nežádoucí reakce v jejím vnitřním prostoru. Nejvíce pokusů bylo provedeno s optimálním i.d. 50 μm . V počátcích testování těchto kapilár se už při velmi nízkých průtocích ($5 \mu\text{l min}^{-1}$) objevily problémy s netěsněním sestavy a podtekáním na různých místech. Celá sestava musela být před pokusy dokonale vysušena, dále bylo potřeba přidat jedno drobné těsnění do místa vstupu PEEK kapiláry do cely (konkrétně do „fittingu“) a nakonec i vyměnit těsnění umístěné kolem seskupení všech tří elektrod – z původního tenčího průhledného na silnější černé (viz **Obrázek 16** a černý kroužek nacházející se v sestavě vpravo nahoře). Po této optimalizaci bylo opět možné dostat se na průtok $48 \mu\text{l min}^{-1}$.

Závěrečnými pokusy už bylo pouze odzkoušeno, že při minimálních průtocích (cca $4 \mu\text{l min}^{-1}$) lze použít i kapiláru s i.d. $25 \mu\text{m}$, a poté započala optimalizace s jednorázovými zlatými tenkovrstvými elektrodami a kompatibilní celou ED-FLOW-CELL Micrux.

Výhodou druhé testované sestavy (Micrux) byla její lepší těsnost při použití kapilár s nižším vnitřním průměrem, i s i.d. $25 \mu\text{m}$ bylo možné se dostat až na průtok $8 \mu\text{l min}^{-1}$. Navíc předpokladem bylo, že by na cele mohly díky menšímu vyhrazenému prostoru probíhat elektrochemické přeměny rychleji.

Obě testovné cely jsou ovšem díky materiálu, z něhož jsou vyrobeny, vhodné výhradně pro vodné roztoky vzorků. V dílně Univerzity Regensburg tedy byla pro účely dalších pokusů vyrobena cela, jejíž předlohou byla perspektivnější konstrukce cely od firmy Micrux, z materiálu odolného k organickým rozpouštědlům – PEEK polymeru, doplněná silikonovým těsnícím kroužkem na elektrodě. Výsledkem byla chemicky odolnější cela.

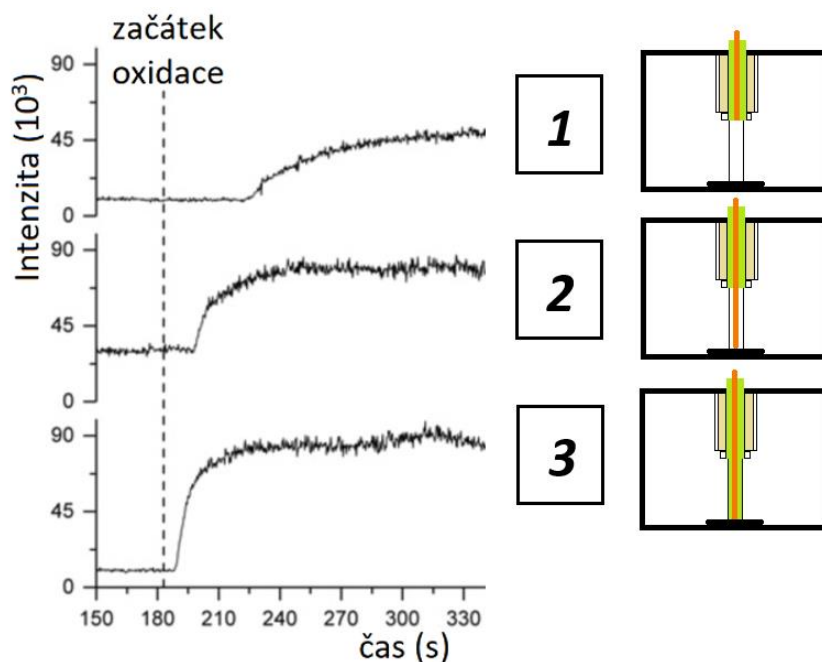
Další pokusy s celami byly prováděny už ve spojení s MS.

6.2.2 Optimalizace spojení elektrochemické průtokové cely a MS

Pomocí cyklické voltametrie bylo stanoveno optimální nastavení potenciálu oxidace vodného i organického roztoku FcMeOH (dvojmocné železo je oxidováno na trojmocné) na hodnotu $+400 \text{ mV}$.

První testování a optimalizace EC/MS sestavy byly prováděny s celou DropSens, 21 cm dlouhou kapilárou (i.d. $50 \mu\text{m}$) a s $25 \mu\text{mol l}^{-1}$ roztokem FcMeOH v 50 mmol l^{-1} pufru octanu amonného. Nejprve bylo žádoucí ověřit nejvhodnější umístění konce kapiláry v ochranném PEEK návleku vedoucího k elektrodě. V rámci cely bylo možné, aby kapilára s návlekiem končily v místě konce „fittingu“, popř. aby kapilára (resp. kapilára s návlekiem) končily až na dně cely – viz **Obrázek 18**. Posledně zmíněná konfigurace (kapilára s PEEK návlekiem jsou zasunuty až k elektrodě) poskytovala dle očekávání nejlépe reprodukovatelné záznamy a díky redukci mrtvého času a objemu těž nejnižší Δt (viz **Obrázek 17**) a nejvyšší intenzitu oxidované formy ferrocenmethanolu.

Jelikož byl vývoj sestavy částečně inspirován výzkumem kolegů F. M. Matysika a P. Palatzkého, kteří v rámci EAI využívali kapiláry zbroušené na úhel $10\text{--}15^\circ$ (na konci ústícím k elektrodě), byly v průběhu optimalizace porovnány kapiláry zbroušené do rovna s kapilárami zbroušenými na úhel 15° . V průběhu testovacích analýz však nebyl zaznamenán žádný rozdíl, nadále byly tedy kapiláry broušeny do rovna.

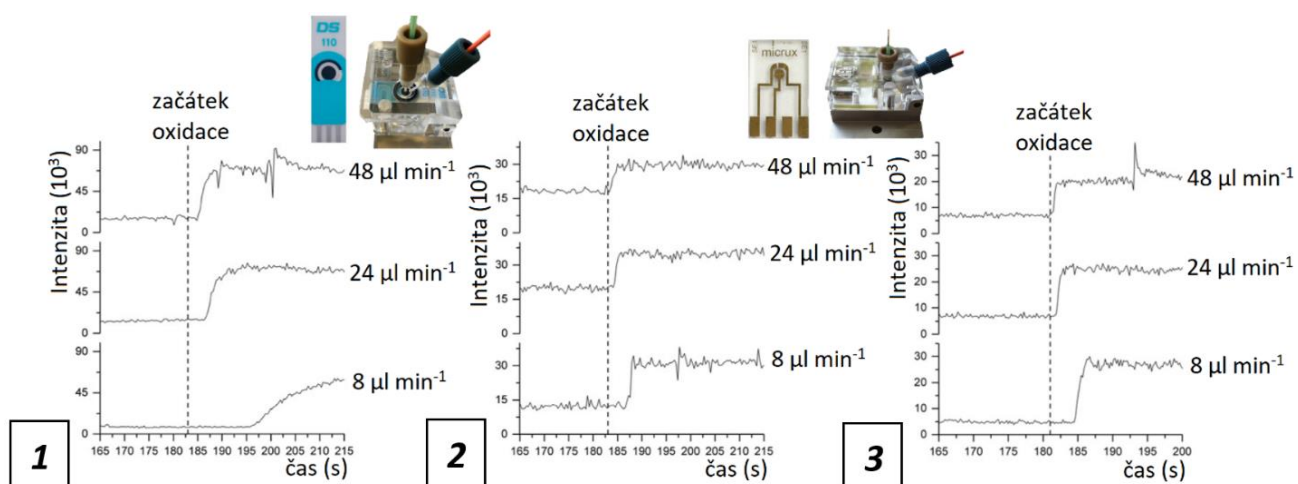


Obrázek 18 Ukázky záznamů EC/MS analýz FcMeOH s různým umístěním kapiláry

(1: kapilára s ochranným PEEK návlekm končí na konci „fittingu“ zašroubovaného v celi;
 2: kapilára je zasunuta až k uhlíkové tištěné elektrodě, tj. na dno cely, PEEK návlek končí na konci „fittingu“; 3: kapilára i s PEEK návlekm jsou zasunuty až k elektrodě)

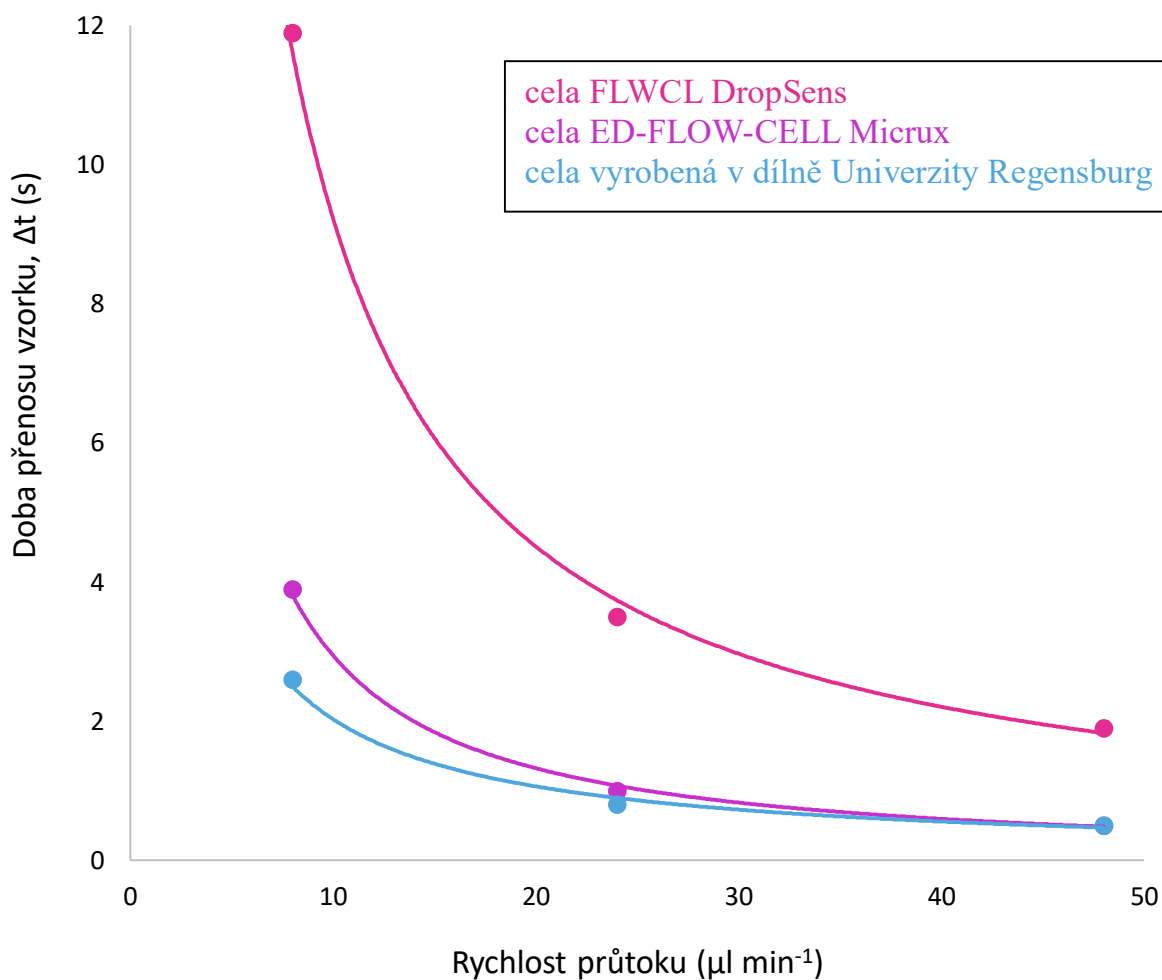
Provedená optimalizace EC/MS sestavy byla využita u všech tří typů testovaných průtokových cel. S kapilárou o i.d. 50 μm bylo následně provedeno porovnání záznamů analýz vodného a organického vzorku pro různé cely a různě vysoké průtoky (**Obrázek 19**). Pro cely DropSens a Micrux byl vzorkem 25 $\mu\text{mol l}^{-1}$ vodný roztok FcMeOH v 50 mmol l^{-1} pufru octanu amonného a pro celi vyrobenou v dílně Univerzity Regensburg byl vzorkem 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ organický roztok FcMeOH v acetonitrilovém roztoku obsahujícím 10 mmol l^{-1} octan amonný a 1 mol l^{-1} kyselinu octovou. Stejná měření jsou znázorněna též graficky – viz **Obrázek 20**.

U všech cel bylo dosaženo Δt v řádu pouhých několika sekund. Vyšší průtoky vedou, dle očekávání, k nižší Δt . Responzní charakteristiky jsou lepší u cel typu Micrux díky výrazně menšímu objemu cely. Současně je však zřejmé, že při nižších průtocích je dosaženo vyšší účinnosti elektrochemické přeměny, pravděpodobně díky déletrvajícimu kontaktu vzorku s povrchem elektrody.



Obrázek 19 Ukázky záznamů EC/MS analýz FcMeOH s různými celami a průtoky

(1: cela FLWCL DropSens; 2: cela ED-FLOW-CELL Micrux; 3: cela vyrobená v dílně Univerzity)



Obrázek 20 Grafické zpracování závislosti rychlosti průtoku na odezvě signálu

Následovalo porovnání všech tří cel s kapilárou o i.d. 25 μm . **Tabulka 7** ukazuje, za jak krátkou dobu (u obou cel typu Micrux) lze detekovat oxidovanou formu FcMeOH. Na rychlý přenos vzorku do MS má pravděpodobně vliv nízký mrtvý objem kapilár s i.d. 25 μm . Nevýhodou malého i.d. však může být větší náchylnost k přicpání kapiláry a také nemožnost práce s vyššími průtoky (nad 10 $\mu\text{l min}^{-1}$). Z tabulky je patrné, že tento typ kapiláry není vhodný pro celu DropSens (průtok 8 $\mu\text{l min}^{-1}$ ani nebylo možné vyzkoušet kvůli podtékání vzorku na různých místech sestavy).

Tabulka 7 Porovnání různých průtokových cel s kapilárou i.d. 25 μm

Průtok ($\mu\text{l min}^{-1}$)	Doba přenosu vzorku z cely do hmotnostního spektrometru (s)		
	Cela DropSens ^a typ FLWCL	Cela Micrux ^a typ ED-FLOW-CELL	Vyrobená cela ^b (Univerzita Regensburg)
4	15,1 \pm 2,0*	3,5 \pm 0,2*	2,4 \pm 0,3*
8	–	2,2 \pm 0,2*	1,3 \pm 0,2*

^a Vzorek: 25 $\mu\text{mol l}^{-1}$ vodný roztok ferrocenmethanolu v 50 mmol l^{-1} pufru octanu amonného

^b Vzorek: 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ organický roztok ferrocenmethanolu v acetonitrilovém roztoku 10 mmol l^{-1} octanu amonného a 1 mol l^{-1} kyseliny octové

* Provedeno pět měření za stejných podmínek

6.2.3 Aplikační možnosti EC/MS sestavy

Vyvinutá sestava je vhodná pro studium elektrochemických reakcí v jednoduchých vodných i organických roztocích. Její hlavní předností je možnost velmi rychlé a přímé detekce produktů redoxních reakcí a to i velmi nestabilních a rychle se rozkládajících metabolitů, protože vznikající sloučeniny je možné detekovat už do 2,5 sekundy. Navíc použití jednorázových elektrod je větší zárukou spolehlivých výsledků než je tomu v případě konvenčních elektrod používaných dlouhodobě, u nichž hrozí jejich zanesení a výrazné zhoršení výsledků.

Na základě popsaných měření jednoduchých elektrochemických modelů je zřejmé, že po úpravě je možné sestavu využít i ke složitějšímu metabolomickému výzkumu. Byly započaty pokusy se zlatou tenkovrstvou elektrodou Micrux a kapilárou s i.d. 25 μm inspirované uspořádáním EAI/CE/MS (využívající pouze uhlíkovou PE DropSens) s automatickou injektážní jednotkou. [111] V dílně Univerzity Regensburg byla vyrobena injektážní cela pro elektrodu a zásobník s elektrolytem. První měření ukázala, že dostačujícím množstvím vzorku k analýze je pouhých 10 μl , tedy 5krát méně než u EAI/CE/MS sestavy.

Zautomatizováním a optimalizací EC/CE/MS uspořádání lze predikovat mnoho metabolických procesů probíhajících v lidském organismu a následně tyto procesy zkoumat. Vyvinutá sestava je aktuálně používána (s uhlíkovými i zlatými pracovními elektrodami) ke studiu oxidace nukleových bazí, poškození DNA a vlivu oxidačního stresu na člověka. [112, 113, 114] Výhledově by mohla být využívána nejen k objasnění metabolických procesů, ale také v dopingových kontrolních laboratořích k odhalování nových prostředků zneužívaných profesionálními sportovci či farmaceutickými společnostmi k vývoji nových léčiv.

7 ZÁVĚR

Předložená práce cílí na nové možnosti využití analytických metod a moderní instrumentace. Je rozdělena do tří hlavních částí a nabízí čtenáři tři různé úhly pohledu na využití elektrochemie v klinické diagnostice a metabolomice.

První část se zabývá volnými metanefriny v krevní plazmě a diagnostikou feochromocytomu, navazují v ní na svou diplomovou práci. Je zde popsán pokrok v oblasti přesného a správného stanovení plazmatických metanefrinů, konkrétně metanefrinu, normetanefrinu a 3-methoxytyraminu, pomocí elektrochemického detektoru ECD-3000RS, optimalizace a následná validace metody i porovnávání výsledků našich měření s ostatními pracovišti. Náš výzkum v oblasti diagnostiky feochromocytomu byl zakončen sestavením kompletního kitu pro stanovení volných plazmatických metanefrinů s požadovanou přesností, správností i citlivostí a pod číslem 27 302 byl pro tento kit zapsán Užitiný vzor na ÚPV.

V rámci druhé části byl popsán další významný biomarker, indoxyl sulfát. Tato sloučenina je dlouhodobě sledována v rámci CKD, ale v posledních letech se hlouběji zkoumají též souvislosti mezi IS a střevní dysbiózou, malabsorpčním syndromem, intolerancí glukózy, metabolickým syndromem, inzulinovou rezistencí, kardiovaskulárními nemocemi, srdečními příhodami, poruchou centrálního nervového systému, renální fibrotizací, reakcí štetu proti hostiteli po transplantaci krvetvorných kmenových buněk, oxidačním stresem, poruchou kostního metabolismu a dalšími zdravotními komplikacemi. IS je toxin, jehož hladinu v lidském organismu je potřeba sledovat, zejména pak u vybraných rizikových skupin pacientů. V předložené práci je popsán vývoj a validace metod stanovení IS v moči i krvi, konkrétně krevním séru. K analýzám bylo využito propojení elektrochemického detektoru se spektrofotometrickým.

Třetí část je věnována elektrochemii samotné a její moderní roli v klinické diagnostice. Je zde popsán začátek vývoje propojení EC/MS sloužícímu ke generování a velmi rychlému stanovení široké škály sloučenin, z něhož byla později vytvořena unikátní EC/CE/MS sestava. Aplikačním potenciálem sestavy je zejména metabolomický výzkum *in vitro* s minimální spotřebou vzorku (v jednotkách μl) i analytických chemikálií. Instrument může být s výhodami používán k detekci velmi nestabilních meziproductů redoxních procesů, ke studiu oxidačního stresu a různých typů poškození DNA, k odhalování dosud neznámých xenobiotik či k výzkumu nových léčiv.

Ačkoli se diskutované elektrochemické přístupy liší v mnoha ohledech (např. ve velikosti elektrod a zároveň i ve velikosti povrchu účastnícího se elektrochemických reakcí,

v míře účinnosti redoxní přeměny, v instrumentaci, možnostech i limitech), předložená disertační práce poukazuje na vysoký aplikační potenciál elektrochemie v moderní diagnostice.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Δt	doba přenosu vzorku z elektrochemické cely do MS (transfer time)
3-MT	3-methoxytyramin
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric-pressure chemical ionization)
BDD	borem dopovaná diamantová elektroda
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CKD	chronické onemocnění ledvin (chronic kidney disease)
CYP	cytochrom p450
ČIA	Český institut pro akreditaci
DAD	detektor diodového pole (diode array detection)
EAI	elektrochemicky asistovaná injektáž (electrochemically assisted injection)
EC	elektrochemie (electrochemistry)
ED	elektrochemický detektor (electrochemical detector)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla (evaporative light scattering detector)
ESI	ionizace elektrosprejem za atmosférického tlaku (electrospray ionization)
FcMeOH	ferrocenmethanol
FNHK	Fakultní nemocnice v Hradci Králové
HMBA	4-hydroxy-3-methoxybenzylamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením hmoty (high resolution mass spectrometry)
IPC	iontově párová chromatografie (ion pair chromatography)
IPČ	iontově párové činidlo
i.d.	vniřní průměr
I.S.	vnitřní standard
IS	indoxyl sulfát
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)

MF	mobilní fáze
MIP	molekulárně vtištěný polymer (molecularly imprinted polymer)
MN	metanefrin
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
m/z	poměr hmotnosti a náboje (mass-to-charge ratio)
NMN	normetanefrin
NP-LC	kapalinová chromatografie na normálních fázích (normal-phase LC)
o.d.	vnější průměr
PE	tištěná elektroda (printed electrode)
PEEK	polyether ether keton
PES	polyethersulfon
RCF	relativní odstředivá síla (relative centrifugal force)
RP-LC	kapalinová chromatografie na obrácených fázích (reversed-phase LC)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SAX	silný anex (strong anion exchange)
SCX	silný katex (strong cation exchange)
SPCE	tištěná uhlíková elektroda (screen-printed carbon electrode)
SPE	extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
TSP	ionizace termosprejem
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
ÚPV	Úřad průmyslového vlastnictví
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze (3. interní klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy)
VUOS	Výzkumný ústav organických syntéz

Seznam ilustrací

Obrázek 1	Vzorec metanefrinu, normetanefrinu a 3-methoxytyraminu [11]	11
Obrázek 2	Znázornění procesu oxidace metanefrinu, normetanefrinu a 3-methoxytyraminu	13
Obrázek 3	Proces metabolismu tryptofanu přijatého ve stravě na indoxyl sulfát.....	15
Obrázek 4	Redoxní pár ferrocenmethanolu (FcMeOH/FcMeOH ⁺)	22
Obrázek 5	Znázornění cyklického voltamogramu [89].....	23
Obrázek 6	Souprava od firmy Supelco pro přípravu ručně plněných kolonek	31
Obrázek 7	Porovnání eluce vnitřního standardu po různých typech SPE	34
Obrázek 8	Graf znázorňující závislost různých poměrů sorbentů na výtěžnosti metanefrinů	35
Obrázek 9	Graf znázorňující závislost množství sorbentu na výtěžnosti metanefrinů	36
Obrázek 10	Fotografie nylonového filtru umístěného pod SPE kolonkou.....	37
Obrázek 11	Chromatografický záznam analýzy metanefrinů v krevní plazmě	42
Obrázek 12	Chromatografický záznam analýzy indoxyl sulfátu a kreatininu v moči	50
Obrázek 13	Chromatografický záznam analýzy indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru	51
Obrázek 14	Lineární přímka kalibrační řady indoxyl sulfátu (IS) v moči	52
Obrázek 15	Kvadratická přímka kalibrační řady indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru	53
Obrázek 16	Používané sestavy komerčních průtokových cel a elektrod	58
Obrázek 17	Znázornění sledované doby přenosu vzorku z cely do MS – Δt	59
Obrázek 18	Ukázky záznamů EC/MS analýz FcMeOH s různým umístěním kapiláry	62
Obrázek 19	Ukázky záznamů EC/MS analýz FcMeOH s různými celami a průtoky	63
Obrázek 20	Grafické zpracování závislosti rychlosti průtoku na odezvě signálu	63

Seznam tabulek

Tabulka 1	Výtěžnosti metanefrinů získané použitím různých typů SPE kolonek	33
Tabulka 2	Souhrn výsledků validace metody stanovení volného normetanefrinu (NMN), metanefrinu (MN) a 3-methoxytyraminu (3-MT) v krevní plazmě	40
Tabulka 3	Srovnání výsledků stanovení volného normetanefrinu (NMN), metanefrinu (MN) ve vzorcích krevní plazmy vybraných pacientů	43
Tabulka 4	Porovnání výsledků analýz vzorků komerčně dostupné lyofilizované plazmy s předem stanovenou koncentrací metanefrinů mezi jednotlivými pracovišti.....	44
Tabulka 5	Souhrn výsledků validace metody stanovení indoxyl sulfátu (IS) v moči.....	52
Tabulka 6	Souhrn výsledků validace metody stanovení indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru	53
Tabulka 7	Porovnání různých průtokových cel s kapilárou i.d. 25 μ m	64

LITERATURA

- [1] L. Portyčová, Optimalizace metody pro stanovení látek typu katecholaminů (Diplomová práce), Pardubice: Univerzita Pardubice, 2013.
- [2] M. A. Raggi, C. Sabbioni, G. Casamenti, G. Gerra, N. Calonghi a L. Masotti, *J. Chromatogr. B* 730, p. 201, 1999.
- [3] I. Machová, A. Brázdová, M. Fusek a J. Zídková, *Chem. listy* 106, p. 16, 2012.
- [4] M. Kršek, Endokrinologie, Praha: Galén, 2011.
- [5] T. Zelinka, *Interní Med.* 1, p. 30, 2007.
- [6] R. Cifkova, Z. Skodova, J. Frohlich, V. Lanska, J. Bruthans, M. Jozifova, V. Adamkova, M. Galovcova, P. Wohlfahrt a A. Krajcoviechova, *J. Hypertens.* 28, p. e138, 2010.
- [7] D. Stejskal, B. Lačňák, J. Václavík a R. Zuber, *Klin. Biochem. Metab.* 13(34), p. 201, 2005.
- [8] J. Šmalcová, O. Šmíd, J. Rulíšek, M. Balík, J. Dušková a J. Bělohlávek, *Cor et Vasa Case Reports* 3, p. 51, 2018.
- [9] D. F. Keren, *Warde Medical Laboratory* 15(2), p. 1, 2004.
- [10] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. S. LaMantia, J. O. McNamara a L. E. White, *Neuroscience*. 4. vyd., Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2007.
- [11] „Sigma-Aldrich,“ Merck, [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/>. [Přístup získán 12. 8. 2019].
- [12] T. D. Sotnikova, J. M. Beaulieu a S. Espinoza, *PLoS One* 5(10), p. 3452, 2010.
- [13] K. Pacák, Feochromocytom, Praha: Galén, 2008.
- [14] G. Eisenhofer, J. W. M. Lenders, H. Timmers, M. Mannelli, S. K. Grebe, L. C. Hofbauer, S. R. Bornstein, O. Tiebel, K. Adams, G. Bratslavsky, W. M. Linehan a K. Pacák, *Clin. Chem.* 57(3), p. 411, 2011.
- [15] G. Eisenhofer, J. W. M. Lenders, D. S. Goldstein, M. Mannelli, G. Csako, M. M. Walther, F. M. Brouwers a K. Pacák, *Clin. Chem.* 51(4), p. 735, 2005.

- [16] A. Barbeau a L. Wilkoff, *J. Canad. M. A. J.* 80, p. 717, 1959.
- [17] F. Blandini, G. V. Melzi d'Eril, G. Sances, C. Lucarelli, C. Herborg a E. Martignoni, *Chromatographia* 36, p. 164, 1993.
- [18] R. Rähkä, „Pediatrics 75,“ p. 136, 1985.
- [19] W. H. A. De Jong, G. Eisenhofer, W. J. Post, F. A. J. Muskiet, E. G. E. de Vries a I. P. Kema, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94(8), p. 2841, 2009.
- [20] J. j. Widimský, T. Zelinka, O. Petrák, B. Štrauch, J. Rosa, L. Šafařík, A. Vránková a R. Holaj, *Časopis lékařů českých* 148, p. 365, 2009.
- [21] H. Neumann, W. Young Jr. a C. Eng, *N. Engl. J. Med.* 381, p. 552, 2019.
- [22] E. Sbardella a A. Grossman, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, p. 101346, 2019.
- [23] X. He, J. Gabler, C. Yuan, S. Wang, Y. Shi a M. Kozak, *J. Chromatogr. B.* 879, p. 2355, 2011.
- [24] W. H. A. De Jong, W. J. Post, M. N. Kerstens, E. G. E. de Vries a I. P. Kema, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(6), p. 2851, 2010.
- [25] A. Vránková, T. Škramlíková, J. j. Widimský, J. Škrha a Z. Jůzová, *Chem. Listy.* 104, p. 784, 2010.
- [26] G. Sun, S. Wang, J. Zhou, J. Pan, Y. Tong, Q. Mei a H. Zhai, *Microchemical Journal* 152, p. 104438, 2020.
- [27] S. Yu, Y. Yin, Q. Li, J. Yu, W. Liu, D. Wang, Q. Cheng, S. Xie, X. Cheng a L. Qiu, *J. Chromatogr. B* 1129, p. 121805, 2019.
- [28] T. Dwight, E. Kim, T. Novos a R. Clifton-Bligh, *Horm. Metab. Res.* 51, p. 443, 2019.
- [29] C. Dethlefsen, L. Hansen, C. Lillelund, C. Andersen, J. Gehl, J. Christensen, B. Pedersen a P. Hojman, *Cancer Res* 77(18), p. 4894, 2017.
- [30] E. Pussard, A. Chaouch a T. Said, *Clin. Chem. Lab. Med.* 52(3), p. 437, 2013.
- [31] J. Babjuk, F. Perlík a Z. Šídlo, *Bioanalytika léků*, Praha: Avicenum, 1990.
- [32] „Test ID: PMET,“ Mayo Clinic Laboratories, [Online]. Available: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/81609>. [Přístup získán 2. 5. 2019].

- [33] A. Markvartová, *Poučení pro pacienty vyšetřované z důvodu diagnostikování či vyloučení feochromocytomu*, Praha: 3. interní klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice, 2017.
- [34] I. Vermousek, *Poučení pro pacienty vyšetřované z důvodu diagnostikování či vyloučení feochromocytomu*, Brno: Imunoanalytická a mikrobiologická laboratoř, RNDr. Z. Čecháček s.r.o. , 2015.
- [35] M. Vašatová, *Poučení pro pacienty vyšetřované z důvodu diagnostikování či vyloučení feochromocytomu*, Hradec Králové: Ústav klinické biochemie a diagnostiky lékařské fakulty Univerzity Karlovy ve FN HK, 2019.
- [36] M. Pecka, *Praktická hematologie - Laboratorní metody*, Český Těšín: Infiniti art s.r.o., 2010.
- [37] S. Trojan, *Lékařská fyziologie*, Praha: Grada, 2003.
- [38] T. Nema, E. C. Y. Chan a P. C. Ho, *Talanta* 82, p. 488, 2010.
- [39] M. Bouri, M. J. Lerma-García, R. Salghi, M. Zougagh a A. Ríos, *Talanta* 99, p. 897, 2012.
- [40] L. R. Snyder, J. J. Kirkland a J. L. Glajch, *Practical HPLC method development*, 2. vyd., New York: John Wiley and Sons., Inc., 1997.
- [41] B. E. Erickson, *Anal. Chem.* 72(9), p. 353 A, 2000.
- [42] R. J. Flanagan, D. Perrett a R. Whelpton, *Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons*, Londýn: Royal Society of Chemistry, 2005.
- [43] Z. Shi, X. Zhang, Q. Zhen, M. Zuo, G. Tian, Y. He a M. Ding, *Sci. Rep.* 7, p. 8041, 2017.
- [44] ESA, *Coulochem III, Reference Manual*, USA: ESA, Inc., 2004.
- [45] V. Keříková, L. Grynová a P. Jandera, *Chem. Listy* 98, p. 343, 2004.
- [46] Thermo, *Electrochemical Detector ECD-3000RS, Operating Instructions*, Germering: Thermo Fisher Scientific, 2012.
- [47] H. Filik a D. Kilcan, *J. Anal. Chem.* 69, p. 255, 2014.
- [48] T. Niwa, *Nagoya J. Med. Sci.* 72, p. 1, 2010.
- [49] B. Matouš, *Základy lékařské chemie a biochemie*, Praha: Galén, 2010.

- [50] E. Banoglu, G. Jha a R. King, *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.* 26, p. 235, 2001.
- [51] J. Bureš, *Vnitřní lékařství*. 2., přepracované a rozšířené vydání, sv. 2, Praha: Galén, 2014.
- [52] M. Rossi, K. Campbell, D. Johnson, T. Stanton, H. B.A., H. C.M., G. Dimeski, B. McWhinney, J. Ungerer, O. Kaiser a N. Isbel, *Transplantation* 97, p. 548, 2014.
- [53] S. C. Leong a T. L. Sirich, *Toxins* 8, p. 358, 2016.
- [54] R. Hyšpler, A. Tichá, R. Šafránek, P. Moučka, Z. Nývltová, K. Štochlová, S. Dusilová-Sulková a Z. Zadák, *Dis. Markers* 2018, p. 1, 2018.
- [55] S. Marzocco, F. Dal Piaz, L. Di Micco, S. Torraca, M. L. Sirico, D. Tartaglia, G. Autore a B. Di Iorio, *Blood Purif.* 35, p. 196, 2013.
- [56] D. Yoshikawa, H. Ishii, S. Suzuki, K. Takeshita, S. Kumagai, M. Hayashi, T. Niwa, H. Izawa a T. Murohara, *Circ. J.* 78, p. 2477, 2014.
- [57] L. S. Zhang a S. S. Davies, *Genome Med.* 8, p. 46, 2016.
- [58] E. Cassani, M. Barichella, R. Canello, F. Cavanna, L. Iorio, E. Cereda, C. Bolliri, P. Z. Maria, F. Bianchi, B. Cestaro a G. Pezzoli, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21, p. 389, 2015.
- [59] R. Poesen, B. Meijers a P. Evenepoe, *Sem. Dialysis* 26, p. 323, 2013.
- [60] Y. C. Hou, C. L. Lu a K. C. Lu, *Nephrology* 23, p. 88, 2018.
- [61] K. Akiyama, T. Kimura a K. Shiizaki, *Int. J. Endocrinol.* 2018, p. 6, 2018.
- [62] M. Nataatmadja, Y. Cho, K. Campbell a D. Johnson, „Chapter 8,“ v *Chronic Kidney Disease – from Pathophysiology to Clinical Improvements*, IntechOpen, 2018, p. 181.
- [63] S. Standring, *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 41. vydání, Londýn : Elsevier, 2016.
- [64] J. Káš, M. Kodíček a O. Valentová, *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd., Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006.
- [65] „IKEM, Klinika nefrologie,“ [Online]. Available: <https://www.ikem.cz/cs/transplantcentrum/klinika-nefrologie/pro-pacienty/informace-pro-dialyzovane-pacienty/a-1414/>. [Přístup získán 26. 10. 2019].
- [66] D. H. Krieter, A. Hackl, A. Rodriguez, L. Chenine, H. L. Moragues, H. D. Lemke, C. Wanner a B. Canaud, *Nephrol. Dial. Trans.* 25, p. 212, 2010.

- [67] G. Grundström, A. Christensson, M. Alquist, L. G. Nilsson a M. Segelmark, *BMC Nephrol* 14, p. 216, 2013.
- [68] J. Lata a J. Juránková, *Interní Med.* 13, p. 63, 2011.
- [69] J. Ochoa-Repáraz a L. H. Kasper, *Curr. Obes. Rep.* 5, p. 51, 2016.
- [70] A. Khoruts a M. J. Sadowsky, *Mucosal Immunol.* 4, p. 4, 2011.
- [71] M. J. Sadowsky, A. Khoruts, A. R. Weingarden a M. J. Hamilton, „Compositions and methods for transplantation of colon microbiota“. USA Patent US9968638B2, 2018.
- [72] M. Asai, S. Kumakura a M. Kikuchi, *Ren. Fail.* 41, p. 47, 2019.
- [73] M. Jaffe, *Z. Physiol. Chem.* 10, p. 391, 1886.
- [74] D. F. Putnam, *Composition and Concentrative Properties of Human Urine*, Washington, D. C.: NASA, 1971.
- [75] M. Niesser, B. Koletzko a W. Peissner, *Ann. Nutr. Metab.* 61, p. 314, 2012.
- [76] J. Mourek, *Fyziologie, Učebnice pro studenty zdravotnických oborů*, 2. vyd., Praha: Grada, 2012.
- [77] V. Panichi, M. T. Rocchetti, A. Scatena, A. Rosati, M. Migliori, F. Pizzarelli a L. Gesualdo, *J. Nephrol.* 30, p. 583, 2017.
- [78] J. A. J. G. van den Brand, H. A. M. Mutsaers, A. D. van Zuilen, P. J. Blankestijn, P. H. van den Broek, F. G. M. Russel, R. Masereeuw a J. F. M. Wetzels, *PLoS ONE* 11, p. e0168117, 2016.
- [79] P. C. Fan, J. C. H. Chang, C. N. Lin, C. C. Lee, Y. T. Chen, P. H. Chu, G. Kou, Y. Lu, C. W. Yang a Y. C. Chen, *J. Formos. Med. Assoc.* 118, p. 1099, 2019.
- [80] C. Shu, X. Chen, T. Xia, F. Zhang, S. Gao a W. Chen, *Biomed. Chromatogr.* 30, p. 1782, 2016.
- [81] J. Holle, U. Querfeld, M. Kirchner, A. Anninos, J. Okun, D. Thurn-Valsassina, A. Bayazit, A. Niemirska, N. Canpolat, I. K. Bulut a kol., *Ped. Nephrol.* 34, p. 2571, 2019.
- [82] J. Zýka, *Analytická příručka. Díl 1.*, Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988.
- [83] J. Váňa, *Analyzátory plynů a kapalin*, Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984.

- [84] V. Milata a P. Seglía, *Spektrálne metódy v chémii*, Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2004.
- [85] R. T. Perera a J. K. Rosenstein, *Sci. Rep.* 8, p. 1965, 2018.
- [86] J. Hubálek a M. Adámek, *Mikrosenzory a mikromechanické systémy*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012.
- [87] T. Herl a F. M. Matysik, *ChemElectroChem* 7, p. 2498, 2020.
- [88] J. Barek, F. Opekar a K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Praha: Karolinum, 2005.
- [89] H. Burešová, *Cyklická voltametrie jako detekční technika ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (Diplomová práce)*, Praha: Univerzita Karlova, 2014.
- [90] M. Voicescu, D. Rother, F. Bardischewsky, C. Friedrich a P. Hellwig, *Biochemistry* 50, p. 17, 2011.
- [91] H. Simon, D. Melles, S. Jacquilleot, P. Sanderson, R. Zazzeroni a U. Karst, *Anal. Chem.* 84, p. 8777, 2012.
- [92] P. Gamache, D. Meyer, M. Granger a I. Acworth, „Online electrochemical-LC-MS techniques for profiling and characterizing metabolites and degradants,“ v *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics (Ramanathan, R.)*, John Wiley & Son.
- [93] W. Lohmann a U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 394, p. 1341, 2009.
- [94] K. Lemr a L. Borovcová, *Chem. Listy* 114, p. 169, 2020.
- [95] K. Lemr a L. Borovcová, *Chem. Listy* 114, p. 96, 2020.
- [96] P. Nowak, M. Wozniakiewicz a P. Koscielniak, „Trends Anal. Chem. 59,“ p. 42, 2014.
- [97] L. Portychová a K. Schug, *Anal. Chim. Acta* 993, p. 1, 2017.
- [98] P. Anzenbacher a E. Anzenbacherová, „Drug-metabolizing enzymes e an overview,“ v *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics (Anzenbacher, P.; Zanger, U.M.)*, Weinheim, Wiley-VCH, 3, p. 2012.
- [99] H. Faber, M. Vogel a U. Karst, *Anal. Chim. Acta* 834, p. 9, 2014.
- [100] U. Zanger, „Introduction to drug metabolism,“ v *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics (Anzenbacher, P.; Zanger, U.M.)*, Weinheim, Wiley-VCH, 2012, p. 287.
- [101] S. Bruckenstein a R. Gadde, *J. Am. Chem. Soc.* 93, p. 793, 1971.

- [102] U. Jurva, *Electrochemistry On-line with Mass Spectrometry: Instrumental Methods for in Vitro Generation and Detection of Drug Metabolites (Disertační práce)*, Groningen: University of Groningen, 2004.
- [103] U. Jurva, H. Vikström, L. Weidolf a A. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, p. 800, 2003.
- [104] P. Palatzky, *Electrochemically Assisted Injection for Capillary Electrophoresis Time-of-flight Mass Spectrometry: Novel Instrumental and Methodical Developments (Disertační práce)*, Regensburg: University of Regensburg, 2013.
- [105] F. Zhou a G. van Berkel, *Anal. Chem.* 67, p. 3643, 1995.
- [106] T. Herl a F. M. Matysik, *TM - Tech. Mess.* 84, p. 672, 2017.
- [107] M. Cindric a F. M. Matysik, „Hyphenation of electrochemistry with mass spectrometry for bioanalytical studies,“ v *Advances in Chemical Bioanalysis (Matysik, F., M.)*, Heidelberg, Springer, 2014, p. 237.
- [108] F. M. Matysik, *Electrochem. Commun.* 5, p. 1021, 2003.
- [109] R. Scholz a F. M. Matysik, *Analyst* 136, p. 1562, 2011.
- [110] R. Scholz, P. Palatzky a F. M. Matysik, *Anal. Bioanal. Chem.* 406, p. 687, 2014.
- [111] P. Palatzky, A. Zöpfl, T. Hirsch a F. M. Matysik, *Electroanalysis* 25, p. 117, 2013.
- [112] T. Herl, N. Heigl a F. M. Matysik, *Monatsh. Chem.* 149, p. 1685, 2018.
- [113] T. Herl, L. Taraba, D. Böhm a F. M. Matysik, *Electrochem. Comm.* 99, p. 41, 2019.
- [114] T. Herl a F. M. Matysik, *Anal. Chem.* 92, p. 6374, 2020.
- [115] L. Guido, D. Carvalho, J. Táborský, J. Skopalová, H. Saldanha a P. Bednář, *Chromatographia* 78, p. 1233, 2015.
- [116] S. Torres, R. Brown, T. Zelesky, G. Scrivens, R. Szucs, J. Hawkins a M. Taylor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131, p. 71, 2016.
- [117] S. Jahn a U. Karst, *J. Chromatogr. A* 1259, p. 16, 2012.
- [118] L. Switzar, S. Nicolardi, J. W. Rutten, S. A. J. Lesnik Oberstein, A. Aartsma-Rus a Y. E. M. van der Burgt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, p. 50, 2016.
- [119] P. Zhao, Y. Guo, H. D. Dewald a H. Chen, *Int. J. Mass Spectrom.* 443, p. 41, 2019.

- [120] H. Mizuno, Y. Kobayashi, J. Z. Min, T. Toyooka a K. Todoroki, *Med. Mass Spec.* 4, p. 58, 2020.
- [121] L. Nováková a M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha: Europrint, 2013.
- [122] M. Salfická, *Validace metody pro stanovení volných metanefrinů v plazmě (Diplomová práce)*, Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014.
- [123] I. Davidsohn a J. B. Henry, *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, p. 76., Philadelphia: W. B. Saunders, 1963.

O některých výsledcích jsem referovala na těchto mezinárodních konferencích:**Postery:****Nanoporous Graphite in Electrochemical Sensors and its Usage for Determination of Metanephrines**

Konference NANOCON 2014, Brno, Česká republika

Plasma Free Metanephrines in Diagnostics

Konference CECE 2014, Brno, Česká republika

Plasma Free Metanephrines as Diagnostic Markers of Pheochromocytoma

Symposium klinické biochemie FONS 2014, Pardubice, Česká republika

Plasma Free Metanephrines as Diagnostic Markers of Pheochromocytoma

Konference INDC 2014, Praha, Česká republika

Přednášky:**Detekce uremického toxinu a jeho využití v diagnostice**

L. Portychová, K. Štochlová, R. Hyšpler, Z. Zadák, Z. Nývltová

Konference Vitatox 2019, Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

Determination of Urinary Indican and Creatinine Using an UHPLC/ECD-DAD Method

L. Portychová, Z. Nývltová, K. Štochlová, D. Jirovský

Konference CECE 2016, Brno, Česká republika

Volné plazmatické metanefriny jako diagnostické markery feochromocytomu

L. Portychová, Z. Nývltová, A. Horna

Konference Moderní elektrochemické metody 2014, Jetřichovice u Děčína, Česká republika

Curriculum vitae

Titul, jméno a příjmení: Ing. Lenka Portychová

Bydliště: Štefánikova 337, 500 11 Hradec Králové

E-mail: l.port@seznam.cz

Vzdělání

- 2014-doposud **Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc**
(obor *Analytická chemie*), doktorské kombinované studium (Ph.D.),
disertační práce s názvem „Využití moderních instrumentálních technik
v diagnostické analýze“
- 2008-2013 **Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice**
(obor *Hodnocení a analýza potravin*), titul Ing., diplomová práce s názvem
„Optimalizace metody pro stanovení látek typu katecholaminů“

Pracovní zkušenosti

- 2021-doposud Od 01/2021 zaměstnána ve firmě **Apigenex s.r.o.**, Rybitví (*analytický chemik – purifikační specialista: preparativní chromatografie, LC/MS, LC/DAD*)
- 2015-2020 5,5 roku zaměstnána ve **Výzkumném ústavu organických syntéz a.s.**,
Rybitví (*výzkumný pracovník: LC/MS (zejména HRMS), GC/MS, LC/DAD, LC/ED*),
aktivní účast na výzkumných projektech a konferencích, školení nových zaměstnanců)
- 2013-2015 Dva roky zaměstnána ve firmě **RADANAL s.r.o. – Institut Nutrice a Diagnostiky**,
Pardubice (*výzkumný pracovník: LC/ED, LC/MS, částečný servis přístrojů v jiných firmách, aktivní účast na konferencích a školeních*)

Odborné vědecké zaměření

Analytická chemie, separační techniky – zejména spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, s elektrochemickými detekčními systémy a s dalšími typy detektorů (DAD, ELSD, Corona,...) a využití těchto metod při analýze a detekci sloučenin v komplexních maticích.

Odborná praxe a stáže

- 2016 Tříměsíční pracovní stáž - **Universität Regensburg**, Řezno, Německo
(*výzkumný pracovník – elektrochemie, MS*), Certifikát o absolvování stáže

Projektová činnost

- TJ04000245 – *Studium chování fosfonátů s cílem snížení ztrát v rostlinných produktech* (trvání projektu: 05/2020-04/2022)
- TITSMZP833 – *Vliv přípravků na ochranu rostlin na necílové druhy živočichů a regulace používání rizikových přípravků v zemědělství* (trvání projektu: 02/2020-07/2022)
- TJ02000134 – *Odstraňování polárních polyfluorovaných sloučenin z kontaminovaných materiálů* (trvání projektu: 04/2019-03/2021)
- TH02030223 – *Inovace integrované ochrany peckovin ve vztahu ke způsobu skladování a obsahu reziduí pesticidů* (trvání projektu: 01/2017-12/2020)
- CZ.01.1.02/0.0/0.0/15_019/0004711 – *Vývoj gastroretentivní formy selenu a jodu v nápoji a tabletě, úprava elektrolytové rovnováhy* (trvání projektu: 02/2017-07/2019)
- QJ1510354 – *Tvorba a selekce odrůd jabloní s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek a prodlouženou skladovatelností plodů* (trvání projektu: 04/2015-12/2018)
- TH01030787 – *Zavedení vhodných postupů snižujících negativní vlivy na hmyzí opylovače a další užitečné organismy do technologie produkce ovoce a vypracování postupů zvyšujících efektivitu opylení* (trvání projektu: 01/2015-12/2018)
- TA04010762 – *Zlepšení kvality bezlepkového pečiva novými zdroji proteinů* (trvání projektu: 07/2014-12/2017)
- TA04010954 – *Nové analytické metody pro efektivní stanovení biologických markerů* (trvání projektu: 07/2014-06/2017)
- 4.1 IN04/1739 – *Inovace izolace standardů bioaktivních látek z přírodních zdrojů* (trvání projektu: 01/2014-05/2015)
- FT-TI4/331 – *Vývoj kitu pro stanovení plazmatických metanefrinů* (trvání projektu: 01/2012-12/2014)
- TA01010737 – *Vývoj technologického zpracování ve světě nově zaváděných vysoce nutričně hodnotných luštěnin pro využití k přípravě běžných potravin i dietních a výživových výrobků* (trvání projektu: 01/2011-12/2014)

Seznam prvoautorských publikací v impaktovaných časopisech

Portyčhová L., Schug K. A. *Instrumentation and Applications of Electrochemistry Coupled to Mass Spectrometry for Studying Xenobiotic Metabolism: A Review*. Analytica Chimica Acta 2017, **993**, p. 1-21 (doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.050).

Portyčhová L., Štochllová K., Hyšpler R., Nývltová Z. *Elektrochemické stanovení toxického indoxyl sulfátu v biologické matrici*. Chemické Listy 2020, **114** (10), str. 674-679.

Prezentace na odborných setkáních

2019 Konference Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie (Přednáška s názvem *Vliv podmínek skladování na obsah reziduí v ovoci*), Hotel Dlouhé Stráně, Loučná nad Desnou

- 2019 Konference Vitatox (Přednáška s názvem *Detekce uremického toxinu a jeho využití v diagnostice*), Penzion Za Vodou, Dvůr Králové nad Labem
- 2016 Konference CECE (Přednáška s názvem *Determination of Urinary Indican and Creatinine Using an UHPLC/ECD-DAD Method*), Hotel Continental, Brno
- 2015 Mezinárodní konference o separační chemii a analýze toxických látek (Přednáška s názvem *LC/EC/MS-jako nový nástroj pro predikci toxických látek*), Institut ochrany obyvatelstva, Lázně Bohdaneč
- 2015 Dvoudenní seminář společnosti RADANAL s.r.o. ve spolupráci s německou firmou RECIPE Chemicals + Instruments GmbH (Přednáška s názvem *FEO-kit – stanovení plazmatických metanefrinů*), Hotel DAP, Praha; AVANTI Hotel, Brno
- 2014 Konference Moderní elektrochemické metody (Přednáška s názvem *Volné plazmatické metanefriny jako diagnostické markery feochromocytomu*), Hotel Bellevue, Jetřichovice u Děčína

Postery na odborných setkáních

- 2014 Konference NANOCON (Prezentace posteru s názvem *Nanoporous Graphite in Electrochemical Sensors and its Usage for Determination of Metanephrines*), Hotel Voroněž I, Brno
- 2014 Konference CECE (Prezentace posteru *Plasma Free Metanephrines in Diagnostics*), Hotel Continental, Brno
- 2014 Symposium klinické biochemie FONS (Prezentace posteru s názvem *Plasma Free Metanephrines as Diagnostic Markers of Pheochromocytoma*), Univerzita Pardubice, Pardubice
- 2014 Konference INTERNATIONAL NUTRITION & DIAGNOSTICS CONFERENCE (Prezentace posteru s názvem *Plasma Free Metanephrines as Diagnostic Markers of Pheochromocytoma* – oceněn jako 3. nejlepší ze 167 posterů), Hotel DAP, Praha
- 2014 Konference INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEPARATION SCIENCES (Prezentace posteru s názvem *Quantification of Quinolizidine Alkaloids in Lupin Seeds by UHPLC/MS/MS*), Hotel DAP, Praha
- 2014 Česká lipidomická konference (Prezentace posteru *Analysis of Antioxidants in Lupin Oil*), ÚOCHB AV ČR, Praha
- 2014 Konference Epilepsy, Brain and Mind (Prezentace posteru *Methods for Determination of Antiepileptic Drugs*), Hotel International, Brno
- 2014 Konference Chiranal (Prezentace posteru *Nutritional Benefits of Lupin Seeds*), Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc

PŘÍLOHY

Prvoautorské publikace v impaktovaných časopisech:

- Portyčová L., Štochllová K., Hyšpler R., Nývltová Z. *Elektrochemické stanovení toxického indoxyl sulfátu v biologické matrici*. Chemické Listy 2020, **114** (10), 674.
- Portyčová L., Schug K. A. *Instrumentation and Applications of Electrochemistry Coupled to Mass Spectrometry for Studying Xenobiotic Metabolism: A Review*. Analytica Chimica Acta 2017, **993**, 1.

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ TOXICKÉHO INDOXYL SULFÁTU V BIOLOGICKÉ MATRICI

LENKA PORTYCHOVÁ^{a,b}, KAROLÍNA ŠTOCHLOVÁ^a, RADOMÍR HYŠPLER^c
a ZORA NÝVLTOVÁ^a

^a Výzkumný ústav organických syntéz, a.s., č.p. 296, 533 54 Rybitví, ^b Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, ^c Centrum pro výzkum a vývoj Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové
lenka.portychova@vuos.com

Došlo 13.1.20, přijato 28.4.20.

Klíčová slova: indoxyl sulfát, HPLC, elektrochemická detekce, uremický toxin, moč, krevní sérum

Úvod

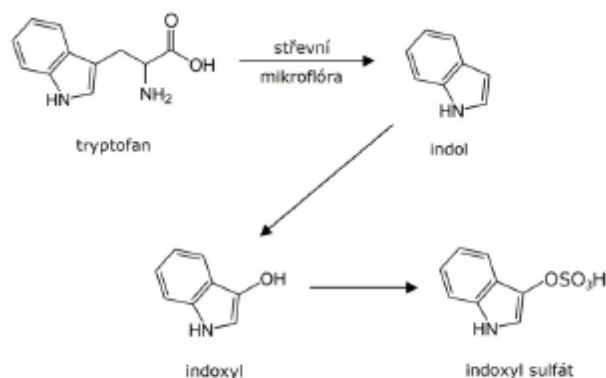
Sloučenina indoxyl sulfát (IS) je metabolitem tryptofanu, aminokyseliny nepostradatelné pro lidský organismus. Metabolismus tryptofanu v těle probíhá dvěma hlavními cestami. Jednou cestou vzniká meziprodukt kynurenin, který je dále metabolizován např. na aminokyselinu alanin, vitamin nikotinamid nebo na vybrané neurotransmitery – kyselinu kynureovou, kynuramin, chinolinát a další. Druhou cestou vzniká velmi důležitý neurotransmitter serotonin. Tryptofan přijatý stravou se ve střevě nedokáže dostatečně vstřebat, a je tudíž rozkládán střevními bakteriemi na indol, z něhož po hydroxylaci a sulfatizaci v játrech vzniká uremický toxin IS (obr. 1). Tato toxická látka je ve zdravém fungujícím organismu vychytávána ledvinami a odváděna z těla močí – mechanismem tubulární sekrece^{1–3}.

Ve vzorcích moči nebo krve, resp. krevního séra, zdravých osob lze detekovat nízké hladiny IS – v moči většinou nejvýše 30 mg l⁻¹, v séru je tato hodnota pětikrát až šestkrát nižší. Vyšší hladiny této látky jsou obvykle způsobeny střevní dysbiózou, mohou však značit i jiné komplikace, nádory tlustého střeva s poruchou pasáže nevymáje. Vyšší množství IS v krvi většinou souvisí se selháváním ledvin. Tento toxin je již několik let studován právě v souvislosti s chronickým onemocněním ledvin. IS podněcuje renální fibrotizaci, zmnožení vazivové tkáně. Pacienti s nefunkčními ledvinami vždy vykazují zvýšené hodnoty tohoto toxinu, 10–80krát vyšší oproti běžné koncentraci, jelikož klasickou dialýzou (hemodialýzou či peritoneální dialýzou) je obtížně odstranitelný kvůli jeho silné vaznosti k proteinům, zejména albuminu. Z důvodu vaznosti na bílkoviny lze množství IS v krvi částečně ovlivnit složením přijímané potravy. I osoby s plně funkčními led-

vinami vykazují vyšší hodnoty IS v krvi, obsahuje-li jejich strava více proteinů^{1–8}.

Mnohé studie poukazují na to, že vyšší koncentrace IS v krvi mají mimo střevní dysbiózu a chronické onemocnění ledvin souvislost i s kardiovaskulárními nemocemi a srdečními příhodami, malabsorpčním syndromem (porucha trávení a vstřebávání základních živin), intolerancí glukosy, reakcí štetu proti hostiteli po transplantaci krevetvorných kmenových buněk, poruchou kostního metabolismu, ale i s poruchami centrálního nervového systému, např. Parkinsonovou chorobou. IS navíc vyvolává oxidační stres a snižuje množství glutathionu, látky detoxifikující xenobiotika^{9–14}. Je tedy nezbytné, zejména u rizikových pacientů, monitorovat množství IS v organismu.

Orientační stanovení IS v moči je běžně prováděno pomocí Obermeyerova testu, který cílí na odhalení střevní dysbiózy a toxémie. Analytická stanovení jsou optimálně prováděna rovněž ve vzorcích moči kvůli snadnosti odběru této biologické matrice. U pacientů, kteří už moč kvůli onemocnění ledvin neprodukují, je nutné k analýze IS odebrat krev. Po separaci látek obsažených v biologické matrici, obvykle pomocí HPLC, je dle literatury^{1,15–17} IS možné stanovit s využitím spektrofotometrického detektoru, elektrochemického detektoru (ED), odpařovacího detektoru rozptylu světla (ELSD) či pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Mez detekce (LOD) IS se u spektrofotometrických detektorů a ELSD pohybuje na úrovni jednotek, případně desetin mg l⁻¹, u ED na úrovni desetin až setin mg l⁻¹ a u MS ještě cca o řád níže. Na našem pracovišti jsme zvolili ED z důvodu jeho vysoké selektivity, dostačující citlivosti a současně nižších ekonomických nákladů v porovnání s MS. Použitou pracovní elektrodou ED byl porézní grafit. Elektrody s různými modifikacemi uhlíku (skelný uhlík, grafen, porézní grafit) jsou výrazně upřednostňovány pro stanovení IS i ostatními autory^{15,16,18,19}.



Obr. 1. Metabolismus tryptofanu v trávicím traktu

Experimentální část

Přístrojové vybavení

V rámci popsaných experimentů byly využity analytické váhy XS205DU (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA), ultrazvuková lázeň Sonorex Super RK 510 (Bandelin Electronic, Berlin, Německo), systém na úpravu vody IWA 20iol (WATEK, Ledec nad Sázavou, ČR), pH metr WTW 538 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo) s elektrodou BlueLine 28 pH (Schott, Mainz, Německo) a chlazená centrifuga Sigma 3-16 KL (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Německo).

K separaci a následné detekci byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC) UltiMate 3000 Series s elektrochemickým detektorem (ED) ECD-3000RS s coulometrickým senzorem 6011RS (porézní grafitová pracovní elektroda; palladiová referenční elektroda) a detektorem diodového pole (DAD) DAD-3000RS (celá HPLC/ED-DAD sestava od Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Používané chemikálie a standardy

Pro potřeby optimalizace a validace metod stanovení IS byla používána draselná sůl indoxyl sulfátu (čistota $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a kreatinin (amid *N*-methylguanidinoctové kyseliny, čistota $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich). K přípravě vzorků a roztoků pro chromatografické analýzy byl využíván methanol (čistota $\geq 99,9\%$; Sigma-Aldrich), EDTA (čistota 99 % p.a.; Sigma-Aldrich), dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (čistota 99 % p.a.; Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (čistota 98 % p.a.; Lach-Ner, Neratovice, ČR), kyselina octová (čistota 99 % p.a.; Lach-Ner), monohydrát 1-oktansulfonátu sodného (čistota 99 % p.a.; Sigma-Aldrich), kyselina pikrová (čistota $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich) a kyselina chloristá (čistota 70 %; Sigma-Aldrich).

Stanovení indoxyl sulfátu v moči

Příprava roztoků

Kalibrační řada IS byla připravena fortifikací směsné moči kalibračními roztoky IS připravenými v $0,2\text{ mol l}^{-1}$ kyselině octové v koncentračním rozmezí 1–85 mg l^{-1} . Konečné výsledky stanovení IS ve vzorcích moči byly vztahovány na množství přítomného kreatininu. To bylo vypočteno pomocí kalibrační řady kreatininu v ultračisté vodě.

Mobilní fáze (MF) používaná pro chromatografické stanovení byla složena z methanolu (MF B) a fosfátového pufru (MF A) obsahujícího 7 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,30 g iontové párového činidla monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,05 g EDTA v 1000 ml vodného roztoku. Hodnota pH pufru byla upravena na 7,3 pomocí 1 mol l^{-1} roztoku hydroxidu sodného.

Příprava vzorku moči k analýze (Jaffého reakce)

Pro vlastní analytické stanovení byly odebrány 2 ml přefiltrované lidské moči (bez přídavku či s přídavkem IS), smíseny s 1 ml 1 mol l^{-1} roztoku hydroxidu sodného a následně s 1 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové. Po proběhnutí Jaffého reakce (cca 10 min) byl získaný červeně zbarvený roztok kreatinin-pikrátu obsahující též IS analyzován metodou HPLC/ED-DAD.

Analytické podmínky stanovení

Separace látek obsažených ve vzorcích moči byla prováděna na chromatografické koloně Zorbax SB-C18 250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm (Agilent, Santa Clara, CA, USA), skrz kterou protékala MF ve složení 95 % MF A a 5 % MF B rychlostí 0,4 ml min^{-1} . V rámci spektrofotometrické detekce byla sledována vlnová délka 500 nm (pro stanovení kreatininu). Pro detekci IS bylo na porézní grafitovou pracovní elektrodu vloženo konstantní napětí +400 mV (vůči palladiové referenční elektrodě).

Stanovení indoxyl sulfátu v krevním séru

Příprava roztoků

Kalibrační řada IS byla připravena fortifikací směsného séra kalibračními roztoky IS připravenými v ultračisté vodě v koncentračním rozmezí 10–110 mg l^{-1} .

MF používaná pro chromatografické stanovení byla složena z methanolu (MF B) a fosfátového pufru (MF A) obsahujícího 3,5 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,15 g monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,03 g EDTA v 1000 ml vodného roztoku.

Příprava vzorku krevního séra k analýze

K 350 μl séra bylo přidáno 350 μl ultračisté vody a 700 μl 7% kyseliny chloristé. Po pěti minutách byly vzorky na dalších deset minut umístěny do centrifugy chlazené na 4 °C s relativní centrifugační silou nastavenou na 10 000 *g*. Získaný roztok oddělený od bílkovinné sraženiny byl analyzován metodou HPLC/ED.

Analytické podmínky stanovení

Separace látek obsažených ve vzorcích krevního séra byla prováděna na chromatografické koloně Kinetex XB-C18 100 mm \times 4,6 mm \times 5 μm s předkolonou HPLC C18 4,6 mm ID Column (obě Phenomenex, Torrance, CA, USA), skrz kterou protékala MF ve složení 85 % MF A a 15 % MF B rychlostí 0,3 ml min^{-1} . Na coulometrickou celu elektrochemického detektoru bylo vloženo napětí +400 mV (vůči palladiové referenční elektrodě).

Výsledky a diskuse

Stanovení indoxyl sulfátu v moči

Zpracování vzorků

K analýze moči je obecně často používán její dvacetitýhodinový sběr. Je-li sledovaná látka stanovována

v jednorázově odebraném vzorku moči, je vhodné výslednou koncentraci této látky vztáhnout na množství přítomného kreatininu z důvodu různé zředěnosti moči. Množství kreatininu v této biologické matrici je pro každého člověka specifické v závislosti na jeho zdravotním stavu, fyzické kondici a množství svalové hmoty. U jednotlivce tak změny v koncentraci kreatininu odráží zejména rozdílný příjem tekutin během dne, a tedy rozdílné zakonzentrování sloučenin přítomných ve vzorku moči.

Na základě našich poznatků je na rozdíl od IS možné stanovit množství kreatininu v moči jednoduše pomocí parametrů rovnice přímky změřené kalibrační řady standardu kreatininu v ultračisté vodě. Před analýzou byly tyto kalibrační roztoky i testované vzorky moči podrobeny snadno proveditelné a rychlé Jaffého reakci²⁰, kdy kreatinin reaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Vzniklý červeně zbarvený kreatinin-pikrát byl detekován spektrofotometricky.

Naproti tomu spektrofotometrické stanovení IS by bylo problematické z důvodu nutnosti přidavku vybraných činidel (Obermayerovo činidlo, thymol, *p*-dimethylaminobenzaldehyd a další)²¹, což by pravděpodobně ovlivnilo stanovení kreatinin-pikrátu. Proto byla použita elektrochemická detekce, pomocí které lze IS stanovovat přímo v neupravených vzorcích moči i ve vzorcích po Jaffého reakci.

Optimalizace HPLC/ED-DAD metody

V počátcích vývoje byla testována kolona Kinetex XB-C18 100 mm × 4,6 mm × 5 μm, která se nám již dříve osvědčila pro separaci složek v biologické matrici. První měření však ukázala, že by bylo vhodnější vyměnit ji za delší kolonu C18. Byla zvolena Zorbax SB-C18 s rozměry 250 mm × 4,6 mm × 5 μm.

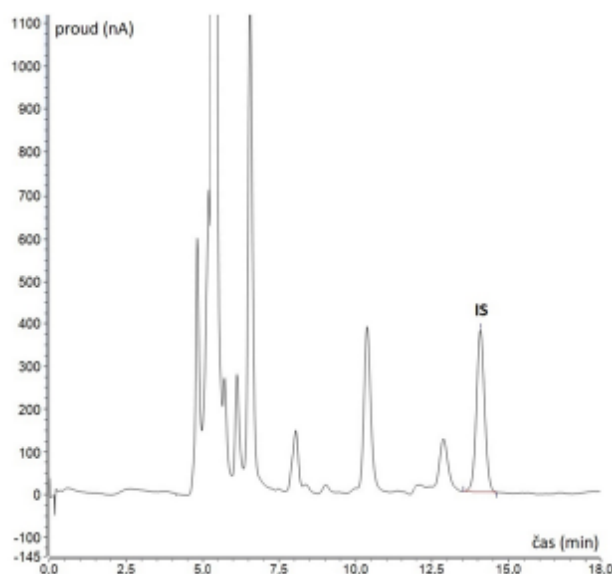
Dalším důležitým krokem bylo pro tuto kolonu a celý systém zvolit optimální složení MF. Pro ED je vhodné použít pufované prostředí. Pro první pokusy byl zvolen běžně používaný fosfátový pufr složený z vodného roztoku monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, který se osvědčil. Hodnota pH pufru byla upravena na optimálních 7,3 pomocí hydroxidu sodného. Tato hodnota pH byla zvolena s ohledem na optimální odezvu a separaci IS. Při elektrochemické detekci je vhodné do MF přidat EDTA pro odstranění stop těžkých kovů a zvýšení citlivosti detekce. Další složkou MF je iontově párové činidlo. Díky podpoření tvorby iontových párů s nabitými analyty byla při separaci IS výrazně zvýšena selektivita. Poslední složkou je organická fáze, methanol. Množství methanolu a iontově párového činidla bylo společně s rychlostí průtoku MF kolonou sledováno a byl vyhodnocován vliv těchto změn na separaci IS.

Výhodou použitého HPLC/ED-DAD systému je možnost spektrofotometrické i elektrochemické detekce sloučenin v jediné analýze vzorku moči. Pro detekci kreatininu, resp. kreatinin-pikrátu, ve vzorcích byla zvolena spektrofotometrie a optimální vlnovou délkou byla zvolena hodnota 500 nm na základě proměření celého spektra pomocí DAD. IS byl ve vzorcích detekován pomocí ED a optimální hodnota vloženého napětí na coulometrickou

celu byla stanovena voltametrií s lineárním nárůstem potenciálu na základě vyhodnocení voltametrické křivky IS (závislost proudu vyvolaného elektrochemickou přeměnou IS na elektrodě na potenciálu této elektrody) v rozmezí –300 až +600 mV na hodnotu +400 mV. Ukázka chromatogramu je uvedena na obr. 2. Je znázorněna eluční křivka IS, ostatní píky pocházejí pravděpodobně z matrice moči, nicméně nebyly blíže identifikovány.

Validace metody

Po dokončení optimalizace byla provedena validace metody stanovení IS v moči, přičemž každý výsledek byl vztážen k množství přítomného kreatininu. Opakovatelnost měření, opakovatelnost analytické metody i její správnost byly určovány pro fyziologickou i patologickou hladinu IS. Opakovatelnost měření je pro obě hladiny 4,9 %. Opakovatelnost metody je 8,0 % pro fyziologickou hladinu a 4,6 % pro patologickou. Správnost metody byla vyhodnocena na základě výtěžnosti ze vzorků připravených pro určení opakovatelnosti metody. Pro fyziologické koncentrace vycházela výtěžnost 101,5 %, pro patologické 99,7 %. Korelační koeficient linearity v analyzovaném koncentračním rozmezí 1–85 mg l⁻¹ je 0,9942 (rovnice vyjadřující vztah mezi poměrem ploch IS a kreatininu a poměrem koncentrací IS a kreatininu: $A = 0,024 c \text{ (mg g}^{-1}\text{)} + 0,151$). Hodnota LOD pro stanovení IS v moči je 0,014



Obr. 2. Chromatografický záznam stanovení indoxyl sulfátu (IS) v moči; kolona Zorbax SB-C18 250 mm × 4,6 mm × 5 μm (Agilent); mobilní fázi A (95 %) byl fosfátový pufr o pH 7,3 (obsahující v 1000 ml 7 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,30 g monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,05 g EDTA), mobilní fázi B (5 %) byl methanol; průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹; přístroj HPLC UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher Scientific) s detektorem diodového pole DAD-3000RS a elektrochemickým detektorem ECD-3000RS obsahujícím celu 6011RS s vloženým napětím +400 mV (porézni grafitová pracovní elektroda; palladiová referenční elektroda)

mg l^{-1} a hodnota meze stanovitelnosti (*LOQ*) je $0,021 \text{ mg l}^{-1}$. Obě tyto hodnoty byly vypočteny z kalibrační přímky pomocí statistického programu QC Expert. Robustnost metody byla testována vůči čtyřem faktorům. Konkrétně vůči změně objemu dávkovaného množství vzorku, změně rychlosti průtoku MF, změně teploty na chromatografické koloně a změně detekčního potenciálu. Byla prokázána vysoká robustnost prezentované metody vůči všem testovaným faktorům. Popsaná validovaná metoda byla následně v našem výzkumném ústavu akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČIA) pod názvem Stanovení močového indikamu a kreatininu pomocí UHPLC/ECD-DAD.

Analýza reálných vzorků

Vyvinutou metodou byly analyzovány vzorky ranní moči 19 zdravých dobrovolníků a byl sledován vztah mezi množstvím přijatých bílkovin ve stravě a hladinou IS v moči. Osoby s vyšším příjmem proteinů vylučovaly větší množství tohoto toxinu než osoby s nízkoproteinovou stravou.

Pro určení hladiny IS u pacientů s poškozenými ledvinami, kteří už nevylučují žádnou moč či minimální množství, bylo nutné vyvinout a validovat metodu stanovení IS v krvi, konkrétně krevním séru, které jsme měli k dispozici od pacientů docházejících na dialýzu do Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK).

Stanovení indoxyl sulfátu v krevním séru

Zpracování vzorků

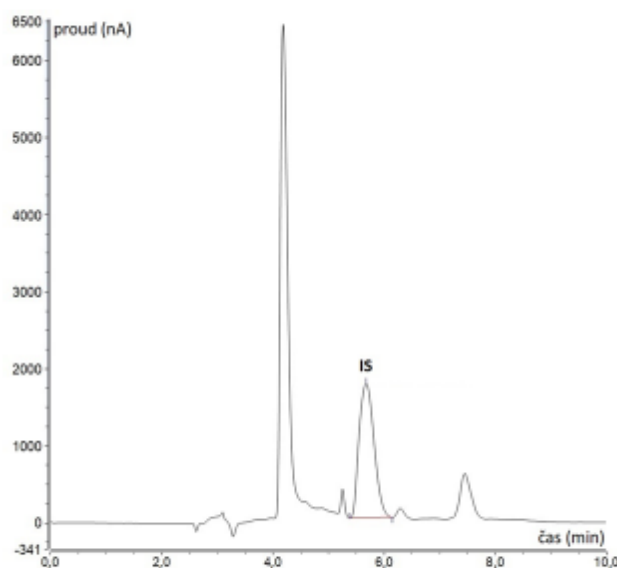
Ze vzorků krve, krevní plazmy či krevního séra je žádoucí před analýzou odstranit bílkoviny pro zvýšení selektivity i citlivosti a zároveň uvolnit IS z vazby na albumin. K tomuto účelu jsme zvolili roztok kyseliny chloristé a následnou centrifugaci.

Optimalizace HPLC/ED metody

Ke stanovení IS v krevním séru byla zvolena kolona Kinetex XB-C18 $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$. Při volbě vhodného složení MF jsme vycházeli z MF použité pro stanovení IS v moči, kterou jsme optimalizovali. Hodnotu pH pufru bylo vhodnější neupravovat a ponechat na 4,2. Koncentrace methanolu byla navýšena, množství iontové párového činidla naopak sníženo – viz kapitola Experimentální část. Ukázka chromatogramu je uvedena na obr. 3. Je znázorněna eluční křivka IS, ostatní píky pocházejí pravděpodobně z matrice séra, nicméně nebyly bližší identifikovány.

Validace metody

Po dokončení optimalizace byla provedena validace metody stanovení IS v krevním séru. Opakovatelnost měření je 2,4 % pro fyziologickou hladinu IS a 0,7 % pro patologickou. Opakovatelnost analytické metody je 1,8 % na fyziologické hladině, 0,7 % na patologické. Správnost metody byla vyhodnocena na základě výtěžnosti. Pro fyziologické koncentrace je 96,3 %, pro patologické 97,1 %. Průběh křivky kalibrační řady v séru v koncentračním rozmezí $1\text{--}110 \text{ mg l}^{-1}$ nebyl lineární, nýbrž kvadratický



Obr. 3. Chromatografický záznam stanovení indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru; kolona Kinetex XB-C18 $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ s předkolonou HPLC C18 $4,6 \text{ mm ID}$ Column (Phenomenex); mobilní fázi A (85 %) byl fosfátový pufr o pH 4,2 (obsahující v 1000 ml 3,5 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,15 g monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,03 g EDTA), mobilní fázi B (15 %) byl methanol; průtok mobilní fáze $0,3 \text{ ml min}^{-1}$; přístroj HPLC UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher Scientific) s elektrochemickým detektorem ECD-3000RS obsahujícím celou 6011RS s vloženým napětím +400 mV (porézní grafitová pracovní elektroda; palladiová referenční elektroda)

(rovnice $A_{IS} (\text{nA min}) = -0,034 (c (\text{mg l}^{-1}))^2 + 9,498 c (\text{mg l}^{-1}) + 13,085$). Korelační koeficient v analyzovaném koncentračním rozmezí je 0,9993. *LOD* pro stanovení IS v séru je $0,37 \text{ mg l}^{-1}$, *LOQ* je $0,56 \text{ mg l}^{-1}$ dle výpočtů programu QC Expert. Byla prokázána též vysoká robustnost metody stejným postupem jako pro metodu stanovení IS v moči. Popsaná validovaná metoda byla následně v našem výzkumném ústavu akreditována ČIA pod názvem Stanovení indikamu pomocí UHPLC/ECD-DAD.

Analýza reálných vzorků

Popsanou HPLC/ED metodou byly analyzovány směsné vzorky séra zdravých osob a vzorky séra dvanácti pacientů FN HK odebrané před dialýzou a následně po ní. Ve vzorcích zdravých osob bylo stanoveno množství IS $2,38 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$. Koncentrace ve vzorcích od pacientů jsou uvedeny v tab. I. Dialyzovaní pacienti mají natrvalo zavedený tepennožilní zkrat či katetr, díky čemuž není odebrání jejich krve problematické. Odběr před dialýzou je pacientům prováděn standardně, aby mohla být tato léčebná metoda dle vybraných faktorů v krvi správně nastavena. Po dialýze byla krev odebrána znovu z důvodu vyhodnocení účinnosti zvoleného nastavení léčebné metody. Ve většině případů nedošlo ke snížení koncentrace toxinu IS ani na polovinu, v některých zůstala koncentrace stejná či

Tabulka I

Koncentrace indoxyl sulfátu v krevním séru stanovená u vybraných pacientů před a po dialýze pomocí vyvinuté metody na přístroji HPLC/ED

Pacient č.	Před dialýzou [mg l ⁻¹]	Po dialýze [mg l ⁻¹]	Pacient č.	Před dialýzou [mg l ⁻¹]	Po dialýze [mg l ⁻¹]
1	58,9±0,5	45,7±0,4	7	42,2±0,2	36,6±0,2
	53,4±0,4	29,2±0,1		33,2±0,2	58,2±0,3
	37,5±0,4	38,2±0,4		28,1±0,1	26,1±0,3
	53,2±0,3	34,1±0,5		57,6±0,7	23,0±0,1
2	43,9±0,5	29,4±0,2	8	28,1±0,4	10,3±0,1
	36,0±0,3	37,2±0,3		33,3±0,5	33,6±0,3
	42,3±0,4	38,1±0,3		35,4±0,4	27,4±0,1
	46,2±0,6	17,9±0,1		49,1±0,2	26,5±0,1
3	82,9±0,7	44,7±0,6	9	35,5±0,5	61,7±0,4
	61,7±0,5	55,2±0,4		26,4±0,5	30,4±0,2
	69,2±0,9	49,4±0,7		25,0±0,3	23,4±0,3
	79,9±0,7	42,2±0,6		30,3±0,1	20,6±0,4
4	34,6±0,2	24,1±0,3	10	95,0±0,7	22,8±0,5
	29,4±0,1	25,5±0,2		91,3±1,1	99,4±1,4
	26,9±0,3	21,8±0,1		87,4±1,0	75,1±0,9
	45,7±0,5	24,4±0,2		90,4±0,6	57,2±0,3
5	48,9±0,3	13,7±0,3	11	55,8±0,7	11,6±0,1
	47,7±0,3	50,5±0,4		40,1±0,6	32,9±0,4
	43,1±0,2	30,1±0,1		34,0±0,3	24,8±0,5
	59,3±0,5	37,9±0,3		44,4±0,3	19,7±0,1
6	52,8±0,4	50,5±0,4	12	34,9±0,6	32,2±0,2
	49,9±0,2	55,1±0,3		33,4±0,2	33,6±0,1
	44,9±0,4	41,9±0,2		36,2±0,3	29,9±0,4
	57,6±0,3	35,3±0,1		34,1±0,3	24,5±0,3

byla dokonce ještě vyšší po dialýze než před ní z důvodu zvýšení koncentrace bílkovin ve vzorku oddialyzováním nadbytečné vody z těla pacientů.

Závěr

V rámci předložené studie byly validovány a následně akreditovány metody stanovení indoxyl sulfátu v moči a krevním séru. Moč je před analýzou upravena rychlou Jaffého reakcí, ze séra jsou odstraněny bílkoviny jednoduchým postupem precipitace. Pomocí validovaných metod lze v obou biologických matricích stanovit hladinu IS v relativně krátkém čase s dostačující přesností i správností, a sledovat tak změny koncentrace tohoto toxinu v lidském organismu. Díky tomu je možné nadále hledat způsoby, jak z těla účinně odstranit tento nebezpečný toxin, který způsobuje vážné zdravotní komplikace a zhoršuje zdravotní stav pacientů.

LITERATURA

- Filik H., Kilcan D.: *J. Anal. Chem.* 69, 255 (2014).
- Niwa T.: *Nagoya J. Med. Sci.* 72, 1 (2010).
- Matouš B.: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén, Praha 2010.
- Leong S. C., Sirich T. L.: *Toxins* 8, 358 (2016).
- Hyšpler R., Tichá A., Šafránek R., Moučka P., Nývltová Z., Štochllová K., Dusilová-Sulková S., Zadák Z.: *Dis. Markers* 2018, 3985861.
- Marzocco S., Dal Piaz F., Di Micco L., Torraca S., Sirico M. L., Tartaglia D., Autore G., Di Iorio B.: *Blood Purif.* 35, 196 (2013).
- Niwa T., v knize: *Uremic Toxins* (Niwa T., ed.), kap. 4, str. 53. J. Wiley, Hoboken 2012.
- Makrlíková A., Berek J., Vyskočil V., Navrátil T.: *Chem. Listy* 112, 605 (2018).
- Yoshikawa D., Ishii H., Suzuki S., Takeshita K., Kumagai S., Hayashi M., Niwa T., Izawa H., Murohara T.: *Circ. J.* 78, 2477 (2014).

10. Zhang L. S., Davies S. S.: *Genome Med.* 8, 46 (2016).
11. Cassani E. a 10 spoluautorů: *Parkinsonism Relat. Disord.* 21, 389 (2015).
12. Poesen R., Meijers B., Evenepoel P.: *Sem. Dialysis* 26, 323 (2013).
13. Hou Y. C., Lu C. L., Lu K. C.: *Nephrology* 23, 88 (2018).
14. Akiyama K., Kimura T., Shiizaki K.: *Int. J. Endocrinol.* 2018, 6.
15. Vaarmann A., Kask A., Mäeorg U.: *J. Chromatogr. B* 769, 145 (2002).
16. Filik H., Avan A. A., Aydar S.: *Curr. Pharm. Anal.* 12, 36 (2016).
17. Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 113, 703 (2019).
18. Xu H., Wang D., Zhang W., Zhu W., Yamamoto K., Jin L.: *Anal. Chim. Acta* 577, 207 (2006).
19. Bergerová M., Libánský M., Dejmková H.: *Curr. Anal. Chem.* 14, 530 (2018).
20. Jaffe M.: *Z. Physiol. Chem.* 10, 391 (1886).
21. Davidsohn I., Henry J. B.: *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, str. 76. W. B. Saunders, Philadelphia 1963.

L. Portychová^{a,b}, K. Štochlová^a, R. Hyšpler^c, and Z. Nývltová^a (^a *Research Institute of Organic Synthesis, Rybitví*, ^b *Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*, ^c *Department of Research and Development of University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove*): **Electrochemical Determination of Toxic Indoxyl Sulfate in Biological Matrix**

The study is focused on optimization and validation of methods for determination of toxic indoxyl sulfate in human urine and blood serum. Samples were analyzed using HPLC/ED-DAD system after the biological matrix had been pretreated. Validated methods were successfully tested on samples from healthy people as well as from dialyzed patients. The aim was to monitor both indoxyl sulfate levels and impact of various methods for elimination of this toxin from patients with renal disease.

Keywords: indoxyl sulfate, HPLC, electrochemical detection, uremic toxin, urine, blood serum



Review

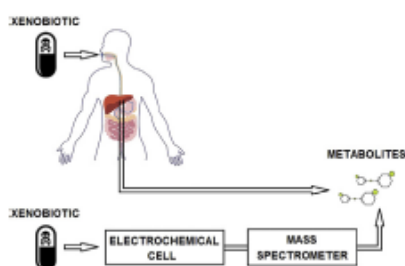
Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: A review

Lenka Portyachová^{a, b}, Kevin A. Schug^{c, *}^a Research Institute for Organic Synthesis, Inc., 533 54 Rybitví, Czech Republic^b Department of Analytical Chemistry, Palacký University, 771 46 Olomouc, Czech Republic^c Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Texas at Arlington, Arlington, TX 76019, USA

HIGHLIGHTS

- Xenobiotic metabolism can be simulated using electrochemistry coupled to mass spectrometry.
- On-line systems provide increased throughput and information on short-lived species.
- Liquid phase separations can be incorporated to analyze complex systems.
- Recent developments include miniaturized systems and advanced materials.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2017

Received in revised form

21 August 2017

Accepted 26 August 2017

Available online 13 September 2017

Keywords:

Cytochrome P450

Metabolite

Pharmaceutical

Simulation

Electrospray ionization

Hyphenated techniques

ABSTRACT

The knowledge of metabolic pathways and biotransformation of xenobiotics, artificial substances foreign to the entire biological system, is crucial for elucidation of degradation routes of potentially toxic substances. Nowadays, there are many methods to simulate xenobiotic metabolism in the human body *in vitro*. In this review, the metabolism of various substances in the human body is described, followed by a summary of methods used for prediction of metabolic pathways and biotransformation. Above all, focus is placed on the coupling of electrochemistry to mass spectrometry, which is still a relatively new technique. This promising tool can mimic both oxidative phase I and conjugative phase II metabolism. Different experimental arrangements, with or without a separation step, and various applications of this technique are illustrated and critically reviewed.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: ADME, absorption, distribution, metabolism, and excretion; APCI, atmospheric pressure chemical ionization; BDD, boron-doped diamond; CD, corona discharge; CE, capillary electrophoresis; CYP, Cytochrome P450; DBDI, dielectric barrier discharge ionization; DESI, desorption electrospray ionization; EAI, electrochemically-assisted injection; EC, electrochemistry; ElChemS, international workshop on electrochemistry/ mass spectrometry; ESI, electrospray ionization; FAPA, flowing atmospheric pressure afterglow; FTICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; GST, glutathione S-transferase; HDX, hydrogen/deuterium exchange; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; HR, high resolution; ICP, inductively coupled plasma; IT, ion trap; LC, liquid chromatography; LIT, linear ion trap; LS, liquid sample; MP, mobile phase; MS, mass spectrometry; NACE, nonaqueous capillary electrophoresis; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NMR, nuclear magnetic resonance; PESI, probe electrospray ionization; Q, quadrupole; Qq, tandem quadrupole; QqQ, triple quadrupole; ROS, reactive oxygen species; TCC, triclocarban; TOF, time-of-flight; TSP, thermospray; UHPLC, ultra high-performance liquid chromatography; UV, ultraviolet.

* Corresponding author. 700 Planetarium PL, Box 19065, Arlington, TX 76019-0065, USA.

E-mail address: kschug@uta.edu (K.A. Schug).<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.050>

0003-2670/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Xenobiotic metabolism	3
2.1. Xenobiotics	3
2.2. Metabolism in the human body	3
2.3. Cytochrome P450	3
2.4. Simulations of xenobiotic metabolism	3
3. Instrumentation and hardware	7
3.1. Electrochemistry/mass spectrometry	8
3.2. Electrochemistry/mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis	8
3.3. Electrochemistry/mass spectrometry coupled to liquid chromatography	9
3.4. Miniaturized systems	10
4. Applications	10
4.1. Applications of electrochemistry/mass spectrometry	11
4.2. Applications of electrochemistry/mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis	12
4.3. Applications of electrochemistry/mass spectrometry coupled to liquid chromatography	13
4.4. Applications of miniaturized systems	15
5. Summary and outlook	17
Acknowledgements	18
References	18

1. Introduction

Electrochemistry (EC) is a very broad field with many applications, especially in biological and biomedical areas. EC is often used as a means of detection for liquid chromatography (LC) and in biosensors. Compounds are oxidized or reduced on the surface of a working electrode with an applied voltage. Hence, it is possible to selectively detect and determine electroactive compounds. Such selectivity can be a big advantage in many cases, especially in cases of complex mixtures [1,2]. Moreover, electrochemical cells can be coupled with other detection techniques, such as diode array detection, fluorescence spectroscopy, or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [3–7]. Interfacing of EC with mass spectrometry (MS) (EC/MS) is still a relatively new development [8–13].

During the last three to four decades, the range of methods and applications of electrochemistry coupled on-line or off-line to mass spectrometric methods, first using thermospray (TSP)–MS and since the 1990s, especially electrospray ionization (ESI)–MS, has dramatically increased. In retrospect, TSP–MS generally featured high flow rates, which is not as amenable for coupling EC/MS. Analytes pass through the electrochemical cell very fast and therefore the conversion efficiency can be very low. On the other hand, ESI–MS provides high sensitivity and reliability at low flow rates. Moreover, this ionization method is quite compatible with EC, because the essence of this technique is a set of reactions related to charge transfer. Consequently, when combined, both the mobile phase (MP) for ESI–MS and the MP for EC should contain volatile buffers [10,13–16].

However, there are also some problems in EC/ESI–MS coupling. The electrochemical system must be suitably decoupled from the very high voltage (usually up to 6 kV) used in ESI. Combinations of currents in EC and currents in ESI can be a problem because of side reactions. In addition, higher concentrations of electrolytes used as MP in EC (usually up to 0.1 mol L⁻¹) can cause fouling of the atmospheric ionization interface. Higher electrolyte concentrations in the MP can also suppress ionization efficiency for ESI–MS. Moreover, every ESI device itself is an electrochemical cell and analytes can be oxidized/reduced in the capillary [14,15,17].

Nonetheless, there has been a steady increase over the last

decade in the number of publications that describe EC/MS applications. By now, this technique has successfully been used in many different research areas, including drug metabolism studies [9,11,12,18,19], prediction of stability, toxicity and environmental persistence of compounds [2,3,10,11,13–15,19–21], determination of unstable metabolites [19,22] and last but not least, peptide, protein and nucleotides research [2,4,5,9,10,12–14,21]. For the latter, such studies include investigations on disulfide bond reduction [23,24], peptide and protein cleavage [25–30], electrochemical tagging [31–35], metalloproteins [29,36], hydrogen/deuterium exchange (HDX) [8,37], endogenous or exogenous reactive oxygen species (ROS), and oxidative stress [12,13,38,39]. The most recent contributions (since 2014) to EC/MS are summarized in Table 1.

EC/MS coupling can provide rapid, reliable, and detailed information on possible metabolites, which are generated and identified in the same system. A direct determination of intermediates and short-lived, unstable metabolites is possible, if EC is connected to MS using a short capillary and suitable conditions are established in the system. This technique is also useful for determining the sensitivity of a substrate towards oxidation, as well as for identifying oxidatively labile sites in a molecule – regions where oxidations are likely to take place [9,11,13,19,21,38,40–42].

EC coupled to MS features simple, versatile, and efficient instrumentation. Simulations are relatively easy to conduct. Experiments can be tuned in terms of electrode material, cell design, applied potential, and solvent conditions. Moreover, automation of the whole EC/MS system is possible. There are no test animals and biohazard risks are largely minimized [9,10,12,13,19,21,22,40–42].

Some additional challenges still remain to be addressed. First, data evaluation can be laborious and time consuming. Second, reactions initiated via direct hydrogen atom abstraction (*O*-dealkylation, aliphatic hydroxylation) cannot be simulated because of too high oxidation potential. Third, the stereochemistry induced by different enzymes cannot be obtained without modifications of the electrode surfaces. These systematic challenges add to those process challenges mentioned previously with regard to the physical coupling of EC to MS [10,19,39,40].

In this review, we focus on xenobiotic metabolism, and the possibility of using EC/MS as a complementary technique to

biological studies to glean useful information about such processes. First, we present the background of relevant metabolism processes arising from xenobiotics and the actions of the Cytochrome P450 (CYP) enzymes. Next, we describe different experimental arrangements and fields where this technique can be used. We show possibilities of xenobiotic metabolism prediction and a comparison of experiments with EC/MS vs. other means of simulation (usage of hepatocytes or microsomes, chemical simulation with metalloporphyrins, use of laboratory animals, etc.). Examples of applications from the literature are presented. Finally, we discuss future prospects of the EC/MS coupling.

2. Xenobiotic metabolism

Xenobiotic metabolism is a biochemical modification of (lipophilic) substances through enzymatic pathways into easily excreted (hydrophilic) metabolites. It is an important process for the detoxification of the human body from artificial poisonous compounds, namely xenobiotics [43,44].

2.1. Xenobiotics

Xenobiotics (from the Greek *xenos* "stranger" and *bios* "life") are artificial substances foreign to a biological system. These compounds are primarily products of human activity (environmental pollutants, drugs, food additives, etc.). They can be introduced into living organisms in many different ways – inhalation, transdermal, or orally, among others. The fate of compounds in the human body is known as ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion). Most xenobiotics have lipophilic character, hence it is difficult to excrete them from the body. More lipophilic substances are accumulated in cell membranes and in fat tissue. A conversion of lipophilic substances to hydrophilic products is necessary for detoxification of organisms. However, the metabolism of xenobiotics can also lead to the formation of toxic metabolites [10,12,43–46].

2.2. Metabolism in the human body

The metabolism of xenobiotics is divided into three phases. In phase I, foreign compounds are transformed in the liver into more polar metabolites containing hydrophilic functional groups (hydroxyl, amino, carboxylic, etc.). This is caused by oxidation reactions (alternatively dehydrogenations, hydrolysis, or reductions) catalyzed by enzymes, especially by CYP (see Fig. 1 and section 2.3) [9,10,12,13,19,40,43–45,47]. The modified compounds may be excreted directly by kidneys or bile, but more often they undergo a phase II metabolism step. In a few cases, the reactive intermediates can bind to cellular macromolecules (such as proteins and DNA) and cause toxicity, immune response, and diseases. A large number of foreign compounds are destroyed by oxidation. For example, ethanol is converted to acetic acid, which is relatively benign, whereas methanol is converted to formic acid, which is toxic [10,44,46,48].

In phase II, conjugation reactions (glucuronidation, sulfation, glutathione conjugation, methylation, acetylation, and condensation) are catalyzed by transferase enzymes, such as glutathione *S*-transferase (GST). The metabolites from the previous phase react with hydrophilic conjugation agents (endogenous compounds), such as glutathione, glucuronic acid, or sulfate, and increased polarity adducts are created. These products are more easily eliminated from the body in phase III [9,10,12,13,19,40,43–45]. The problem is, if the conjugation agents are depleted, reactive metabolites may readily bind to cellular macromolecules, where they can cause severe damage, including tissue necrosis, cellular

apoptosis, and chemical carcinogenesis [12,45,46].

Polar compounds may be further processed in phase III and consequently they are excreted, mainly in urine or bile. Nonbiodegradable xenobiotics are accumulated in the fat tissue and can seriously harm the health of a human [19,40,43,46].

2.3. Cytochrome P450

CYP represents a large family of heme containing proteins (incorporating also a coordinate cysteine), which typically catalyze phase I reactions, including a variety of oxidations (mainly hydroxylations, epoxidations, heteroatom oxidations/dealkylations, dehalogenations, and alcohol oxidations). This group of enzymes was named in 1962 by Sato and Omura [49], based on the attribute that CYP contains a chromophore, which absorbs light at 450 nm [19,45,47].

Nowadays, more than 500 forms of these monooxygenases have been found. They are localized in many tissues of the human body, but especially in the liver, intestines, lungs, and kidneys. They are also present in the brain, heart, or in nasal mucosa. Subcellular localization of these enzymes is primarily in microsomes [19,45,47].

2.4. Simulations of xenobiotic metabolism

The knowledge of the metabolic pathways and the biotransformation of xenobiotics are crucial for elucidation of degradation routes of new active compounds and potentially toxic substances, as well as for determination of the stability of environmental pollutants. Nowadays, there are many methods to simulate xenobiotic metabolism *in vitro*. Hence, at least initially, one can avoid, for example, an administration of radioactively-labeled compounds to laboratory animals (*in vivo* testing) [9,12,41].

In vitro models for xenobiotic metabolism should precisely simulate processes in the human liver where the biotransformation of xenobiotics takes place. Therefore, the well-established methods are generally based on CYP enzymes originating from the liver. Commonly used models are primary hepatocytes, liver homogenates with hepatic enzymes, and especially, liver microsomes. They are created from the endoplasmic reticulum of cells and the activity of CYP is high in these organelles. Thus, *in vitro* studies are often based on the incubation of xenobiotics (mostly drugs) with human or rat liver microsomes, followed by isolating and detecting the metabolic products. These applications have been well characterized and documented [9,10,12,13,40,41,50–53].

Another possibility for simulating metabolism is the use of *in silico* expert systems. These systems are based on computational modelling of metabolic reactions. Thus, they can be useful for predicting how chemicals might behave in living systems. Commercially available systems include TIMES, META, and METEOR. However, most *in silico* expert systems are based on animal databases. Hence, there may be significant differences when results are extrapolated to humans [54–56].

Chemical simulations of xenobiotic metabolism are possible using appropriate metalloporphyrins as surrogates of the heme-containing active center of CYP. Porphyrins are important macrocyclic tetra pyrroles in biology. The parent structure of all porphyrins consists of four pyrrole units linked by four methine bridges. Two of the four-ring nitrogens carry protons and there are eight positions at which substitution can occur with side groups. Metalloporphyrins are formed by a combination of a porphyrin and a metal ion, e.g., Fe³⁺, Cu²⁺, Ag⁺, or Mn²⁺. They are found in the oxygen carrying proteins such as hemoglobin and in a variety of vital enzymes, especially those involved in biological oxidation and reduction. Since the active center in CYP contains iron as the metal ion, it is obvious that iron complexes are the most commonly used

Table 1

The most recent contributions to the coupling of electrochemistry/mass spectrometry.

Type of EC/MS system	General scope of the study	Type of Analyte	Notable performance metrics	Reference
EC inherently present in ESI-MS	Characterization of the reducing potencies of natural antioxidants	Natural antioxidants (e.g., α -tocopherol, retinol, melatonin, and gallic acid)	Solid-phase extraction was used for pretreatment of complex samples. Flow injection (or LC) coupled to QqTOF-MS (in positive mode) was used for experiments. Used electrodes were made of conductive diamond, glassy carbon, or platinum.	[157]
EC/MS	Electrochemical reaction efficiency of potassium ferrocyanide; dopamine and hydroquinone oxidation	Potassium ferrocyanide, dopamine, and hydroquinone	A battery-operated flow-through thin-layer electrochemical cell was coupled to ESI-FTICR-MS (in positive mode).	[174]
EC/MS	The identification of drug metabolites generated electrochemically in order to study simulated metabolic pathways	Psychostimulants and their metabolites	Used electrodes were made of glassy carbon or BDD. The ionization of all compounds was achieved with a helium-based FAPA source. QIT-MS was used for the detection.	[175]
EC/MS	Structural analysis of recombinant monoclonal antibodies	An intact monoclonal antibody	An electrochemical cell was coupled directly to ESI source and FTICR-MS equipped with a 15 T magnet.	[176]
EC/MS	Identification of fleeting electrochemical reaction intermediates	Transient diimine intermediates resulting from electrochemical oxidations of uric acid and xanthine	A spray of analyte microdroplets was directed to a "waterwheel" working electrode set-up composed of a round rotating platinum working electrode partially immersed in an aqueous electrolyte solution. Microdroplets were consequently directed into the Orbitrap mass analyzer.	[121]
EC/MS	Benzimidazole ring formation from a quinoneimide species	Acebutolol	A coulometric cell was used for oxidation reactions. UHPLC/ESI-QTOF-MS (in positive mode) was used to identify oxidation products in the presence and absence of glutathione. Chemical structure elucidations of the products were performed by HRMS and NMR.	[138]
EC/MS	Investigation of several electrochemical reactions with biological relevance in the aqueous phase, such as nitrosothiol reduction, carbohydrate oxidation, and carbamazepine oxidation	Nitrosothiols, saccharides, and carbamazepine	A gold disc working electrode was used for nitrosothiol reduction and saccharide oxidation. A glassy carbon working electrode was used for carbamazepine oxidation. Redox products flowed out of the cell via a fused silica connection capillary directly into a DESI-MS.	[177]
EC/MS	Analysis of large and heavily disulfide-bonded proteins	A therapeutic IgG1-antibody and nerve growth factor- β	Electrochemical reduction of samples was integrated into an on-line HDX-MS workflow. Used electrochemical cell was equipped with a titanium electrode. Products were separated by UHPLC and subjected to QTOF-MS.	[178]
EC/MS	Study of the oxidation behavior of sulfur-containing amino acids and glutathione	Cysteine, <i>N</i> -acetylcysteine, methionine, and glutathione	Direct combination of reagentless electrochemical oxidation and MS in the presence and absence of cisplatin.	[78]
EC/MS	Oxidation of <i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	On-line EC/LSESI-MS (in positive mode) system with an electrochemical thin-layer flow-through cell was used.	[120]
EC/MS	Simulation of the oxidative metabolism of methimazole	The antithyroid drug methimazole	A coulometric flow-through cell equipped with a porous graphite working electrode was coupled on-line to ESI-MS.	[164]
EC/MS	Utilization of an EC/PESI-MS set-up	β -lactoglobulin A, ubiquitin, and cytochrome C	A 700–800 V voltage was applied across the cell to drive the separation of a mixture of β -lactoglobulin A, ubiquitin, and cytochrome C. After separation, PESI-QqLIT-MS was used.	[166]
EC/MS	Probing protein 3D structures and protein–substrate interactions using EC-assisted isotope labeling cross-linking MS	Peptide SJGKV-NH ₂ , somatostatin-14, α -lactalbumin, and calmodulin-mastoparan complexes	A thin-layer electrochemical flow cell containing a diamond working electrode was coupled to LSESI-QTOF-MS.	[167]
EC/MS	Generating metal ion adducts of organic compounds - electrochemical activation of the pesticide cyproconazole in a soil solution matrix via formation of its adducts with Ag and Cu cations	The pesticide cyproconazole	The electrochemical device consisted of two static parts and one rotatable part. Used working electrodes were made of silver, copper or gold wire. The device was on-line connected to ESI-IT-MS.	[179]
EC/MS	Identifying electrochemical reaction intermediates	Triphenylamine, uric acid, glutathione disulfide, <i>N,N'</i> -dimethoxydiphenylamine, and di- <i>p</i> -tolylamine	A flat surface with porous carbon tape was used as the working electrode. One set-up had the conducting carbon tape in the form of a grooved inclined plane, the other one was in the form of a flat plane that had the conducting carbon tape as its front surface. DESI-MS was used.	[180]
EC/MS	Electrochemical reactions at liquid/liquid interface, mechanism study of oxygen reduction at water/oil interface	Oxygen at water/oil interface (and a tetraphenylporphyrin as the catalyst of reactions)	An Y-shaped dual-channel microchip as an electrochemical cell and an ionization device to couple with MS to monitor oxygen reduction reactions at liquid/liquid interfaces. Reaction products were directed from the outlet of the Y-shaped channel into ESI-LIT-MS.	[181]
EC/(LC)/MS	Simulation of the reductive metabolism of biologically important nitro aromatic molecules	3-trifluoromethyl-4-nitrophenol, niclosamide, and nitlamide	A flow-through electrochemical cell was directly connected to HRMS. Binding of the nitroso metabolite to glutathione was demonstrated using LC/ESI-HRMS.	[182]
EC/(LC)/MS	Screening of short-lived and potentially toxic drug metabolites	Chlorpromazine, clozapine, and amodiaquine	A microfluidic electrochemical chip was coupled on-line to ESI-MS or LC/ESI-MS. The chip was equipped with a working platinum electrode.	[90]
EC/(LC)/MS	Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products	The antimuscarinic drug fesoterodine	Samples underwent a cyclic voltammetry at a stationary and rotating disc glassy carbon electrodes or time dependent linear sweep voltammetry. UHPLC/ESI-QTOF-	[183]

Table 1 (continued)

Type of EC/MS system	General scope of the study	Type of Analyte	Notable performance metrics	Reference
EC/(LC)/MS	<i>In-vitro</i> determination of selected chemotherapeutics and their electrochemical products in comparison to <i>in-vivo</i> approach	Antibiotics (e.g., amoxicillin, cefotaxime, and moxifloxacin)	MS set-up was used for analyses. The mechanism of the electrochemical oxidation has been confirmed by on-line EC/MS with porous glassy carbon electrode. Electrochemical oxidation of samples (phase I metabolism) and addition of glutathione for follow-up reactions (phase II conjugation) were performed using working electrode made from glassy carbon, BDD, gold, or platinum. For direct EC/MS analysis, ESI-QqQ-MS set-up was used.	[165]
EC off-line combined with LC/MS	Study of oxidation mechanisms of xanthohumol	Xanthohumol	Electrochemically assisted oxidation was off-line combined with UHPLC/ESI-QTOF-HRMS and ion mobility MS.	[184]
EC/LC/MS	Prediction of transformation products in water appearing after ozonation	Diclofenac and metoprolol	A BDD working electrode used for oxidation was on-line coupled to ESI-TOF-MS (in positive mode for metoprolol and in negative mode for diclofenac)	[20]
EC/LC/MS	Simulation of the reductive metabolism of a pesticide in fish	3-trifluoromethyl-4-nitrophenol	Carbon microfiber electrodes were used for reduction. Samples after pretreatment were transferred to autosampler vials and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until LC/ESI-HRMS analysis.	[139]
EC/LC/MS	Synthesis of pharmaceutical oxidation products	Fesoterodine fumarate	The electrochemical synthesis was performed in a cell containing a working electrode made from tubular reticulated glassy carbon. Analytical HPLC and preparative HPLC were used. Compounds were detected by a single quadrupole MS or UV detector.	[171]
EC/LC/MS	Electrochemical generation of selegiline metabolites	The drug selegiline	Two types of working electrodes were applied, glassy carbon and BDD. A flow electrochemical cell was coupled on-line to reversed phase LC linked to BDD-MS.	[185]
EC/LC/MS	Comparison of TiO_2 photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction, and direct electrochemistry for simulation of phase I metabolism reactions of drugs	Buspirone, promazine, testosterone, and 7-ethoxycoumarin	A working electrode of porous graphite was used for redox reactions. UHPLC/ESI-QqQ-MS was used for on-line monitoring of products during EC potential ramps. Further analyses of products were performed with UHPLC/ESI-QTOF-MS.	[62]
EC/LC/MS	Electrochemical protein cleavage	Proteins bovine insulin and chicken egg white lysozyme	A microfluidic electrochemical cell with an integrated BDD working electrode was used in front of LC-MS/MS.	[163]
EC/LC/MS	Electrochemical oxidation of 5-hydroxymethyl tolterodine and identification of its oxidation products	5-hydroxymethyl tolterodine, the active metabolite of antimuscarinic drugs	Cyclic and differential pulse voltammetry at glassy carbon electrode and controlled potential electrolysis at platinum gauze electrode were performed. Electrolyzed solutions were analyzed using UHPLC/ESI-QTOF-MS.	[186]
EC/LC/MS	Peptide and protein modification, separation and identification (e.g., reduction of disulfide bonds, identification of obtained free thiol groups, and direct tagging of electrochemically generated free cysteines)	Glutathione, glutathione dimer, oxytocin, insulin, and benzoquinone	On-line dual (oxidative and reductive) electrochemistry coupled to LC and ESI-HRMS was presented. Two liquid streams were combined, with one containing a disulfide, which was reduced to the respective thiol in an electrochemical cell based on a titanium working electrode. The other stream contained phenol, which was electrochemically activated to benzoquinone on a BDD working electrode.	[141]
EC/LC/MS	Investigation of the oxidative transformation of roxarsone	The animal feed additive roxarsone (3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid)	The cell consisted of a BDD working electrode was coupled to HILIC and ESI-ICP-HRMS (in negative mode).	[142]
EC/LC/MS	Electrochemical oxidation of chicoric acid and identification of oxidation products	Chicoric acid	Sample underwent an electrochemical oxidation (in the presence of glutathione) using cyclic voltammetry and chronoamperometry at a glassy carbon electrode. Products were separated by UHPLC and identified by MS.	[187]
EC/LC/MS	Simulation of biotransformation reactions of chlorpyrifos	The organophosphate insecticide chlorpyrifos	Oxidative products were produced by a BDD electrode, separated by HPLC and on-line detected by ESI-MS. Furthermore, LC-MS/MS and FTICR-HRMS were used for investigation.	[188]
EC/LC/UV/MS	Investigation of the oxidative stability of active pharmaceutical substances	(2S,3S)-2-(diphenylmethyl)-N-[2-methoxy-5-(propan-2-yl)benzyl]-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amine	The electrochemical oxidation was performed using a cell consisting of a planar working electrode from glassy carbon. The cell was connected to HPLC system, which was coupled to a diode array detector and subsequently to MS. An automated electrochemical platform, two LC pumps, and a dual-loop injection method were used.	[189]
EC/LC/MS and EC/CE/MS	Simulation of the metabolic fate of drugs	Alkaloid harmine, a naturally occurring monoaminoxidase inhibitor	An electrochemical cell (containing a BDD working electrode) was directly connected to ESI-TOF-MS (in positive mode). As a separation technique, LC or NACE were used.	[170]
EC/LC/MS and EAI/CE/MS	Characterization of the oxidative behavior of cyclic nucleotides	Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate, adenosine3',5'-cyclic monophosphate, and cytidine-3',5'-cyclic monophosphate	BDD and screen-printed carbon electrodes were used. Generated products were analyzed by LC coupled to ESI-HRMS. As an alternative, EAI/CE/MS set-up was used for product generation and identification.	[169]
LC/EC/MS	Structural analyses of proteins/peptides that contain disulfide bonds	Protein/peptide mixture sample		[101]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Type of EC/MS system	General scope of the study	Type of Analyte	Notable performance metrics	Reference
LC/EC/MS	In-depth characterization of protein disulfide bonds	Ribonuclease B, β -lactoglobulin	Samples were separated using UHPLC and subsequently were reduced in an electrochemical flow cell. Products were analyzed by DESI-MS.	[140]
EAI/CE/MS	Simulation of the oxidative attack of guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine	The nucleoside guanosine and the oxidation product 8-oxo-7,8-dihydroguanosine	LC system was hyphenated to an electrochemical cell with a titanium-based working electrode, which was coupled to ESI-FTICR-MS A fully automated laboratory-made EAI cell with an integrated buffer reservoir and a compartment holding screen-printed electrodes was used for the injection, CE was used for the separation, and ESI-TOF-MS for detection.	[38]

BDD = Boron-doped diamond.
 CE = Capillary electrophoresis.
 DBDI = Dielectric barrier discharge ionization.
 DESI = Desorption electrospray ionization.
 EAI = Electrochemically assisted injection.
 EC = Electrochemistry.
 ESI = Electrospray ionization.
 FAPA = Flowing atmospheric pressure afterglow.
 FTICR = Fourier transform ion cyclotron resonance.
 HDX = Hydrogen/deuterium Exchange.
 HILIC = Hydrophilic interaction liquid chromatography.
 HPLC = High-performance liquid chromatography.
 HR = High resolution.
 ICP = Inductively coupled plasma.
 IT = Ion trap.
 LC = Liquid chromatography.
 LIT = Linear ion trap.
 LS = Liquid sample.
 MS = Mass spectrometry.
 NACE = Nonaqueous capillary electrophoresis.
 NMR = Nuclear magnetic resonance.
 PESI = Probe electrospray ionization.
 Q = Quadrupole.
 Qq = Tandem quadrupole.
 QqQ = Triple quadrupole.
 TOF = Time-of-flight.
 UHPLC = Ultra high-performance liquid chromatography.
 UV = Ultraviolet.

structures. Metalloporphyrins are able to catalyze a broad range of CYP-mediated reactions, including epoxidation, aliphatic and aromatic hydroxylation, or oxidation of heteroatoms [50,57–59].

Another biomimetic model system for studying of xenobiotic metabolism is the Fenton reaction. Fenton's reagent is a mixture of hydrogen peroxide and a ferrous salt. This reagent is able to oxidize various organic substrates via highly electrophilic hydroxyl radicals generated by the Fenton reaction. Hydroxyl radicals are produced when one electron of Fe^{2+} is transferred to hydrogen peroxide, which results in the oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} and oxygen atoms are reduced to hydroxyl ions. The use of a Fenton system in on-line setups seems to be promising in situations, such as high throughput screening of drug candidates. However, further studies are still needed to develop this technology [60–63].

It is also possible to use light-harvesting mechanisms in combination with CYP enzymes for simulations of xenobiotic metabolism. Light-driven oxidation has predominantly featured bacterial CYP enzymes, from sources such as *Bacillus megaterium* or *Mycobacterium tuberculosis*. CYP enzymes in these systems are exposed to visible light irradiation, which helps drive the catalytic cycle [64–67].

If an electrode is used as an electron-supply source, it is called an electrochemically-driven enzymatic system. CYP molecules are immobilized (using, for example, surfactant films, polyion layer-by-layer films, or nanoscale lipid bilayers) on the electrode, and thus they can act as biosensors for the detection of xenobiotic metabolism. This system also enables one to monitor the electroactivity of enzymes. It is possible to couple such a system to other analytical

techniques, such as LC/MS, to obtain a more complete picture of the system. However, application of this system is not free from difficulties. The slow diffusion of a substrate to the electrode surface can be limiting, and structural changes of enzymes during immobilization can occur [64,68,69].

None of these briefly described models can fully mimic xenobiotic metabolism *in vivo*. Model systems cannot provide a complete quantitative survey of the situation in a natural redox system. However, some of them seem to be promising, especially on-line methods. By using on-line methods, it is possible to screen ADME rapidly and directly detect short-lived species [12,19,22,70].

Lately, there has been a steady expansion in different EC/MS applications. By now, this technique has been used in many areas (in both industry and academia), often coupled with separation techniques, such as LC or capillary electrophoresis (CE) [70,71]. The main research area has been simulation of the oxidative phase I metabolism (catalyzed by CYP). Within these simulations, "one-electron oxidation" (e.g., *N*-dealkylation, dehydrogenation, alcohol-oxidation, *S*-oxidation, and *P*-oxidation) can be mimicked. A good correlation between EC/MS and the application of human or rat liver microsomes, the most commonly used *in vitro* models for simulations of xenobiotic metabolism, has been observed in many cases [1,2,9–11,13–16,18,21,22,24,25,27,37,38,40–42,61,72–90].

Not only phase I, but also phase II metabolism can be simulated. Several articles [1,2,9,13,14,38,75,90] describe EC/MS techniques for study of the conjugative phase II process. Such experimental designs incorporate transferase enzymes, which are added to the system by a syringe pump in continuous flow, or they can be

immobilized on magnetic microparticles.

EC coupled to MS has been also used, for example, in drug development for elucidation of new chemical entities metabolism [1,9,15,22,84,91], in doping control laboratories for clarification of the biotransformation pathway of potential performance-enhancing therapeutics [10], and in forensic toxicology for fast generation of metabolites relevant to illicit drugs [9,13].

In the next sections, different experimental arrangements used in EC/MS are described and particular applications of these arrangements are delineated.

3. Instrumentation and hardware

EC/MS can be a very useful instrumental tool to simulate and study xenobiotic metabolism. A vast array of different experimental arrangements has been published in the last 35 years. The first EC/MS set-up was established already in 1971 by Bruckenstein and Gadde [73]. Volatile intermediates and products were studied using an on-line coupling of a porous platinum electrode and the gas-inlet system of a mass spectrometer. Since the 1980s, also off-line electrochemical batch reactors have been used for EC/MS studies. This technique was first described by Shono et al. [72] in 1980 (published in 1981). A home-made cell was used for experiments. However, an electrochemical flow-through cell coupled on-line to a mass spectrometer, with or without a separation technique, is currently the most commonly used means for simulations of metabolism reactions. The main configurations used in experiments with EC/MS are depicted in Fig. 2. In the following sections, each will be described in more detail.

Studies using EC coupled to MS have been performed with amperometric thin-layer or wall-jet electrochemical cells. However, the most commonly used are boron-doped diamond (BDD) working electrodes and coulometric flow-through cells, usually constructed from porous glassy carbon working electrodes and maintenance-free solid-state reference electrodes. Coulometric cells measure the change of generated potential, unlike amperometric cells, which measure the generated current resulting from redox reactions. Nowadays, EC implemented in microchips and microfluidic devices seems to be a very promising [9,64,92,93].

Porous flow-through cells have a very high active surface area (estimated to be in the cm^2 range) and exhibit almost quantitative electrochemical conversion, which is only affected by the flow rate ($\sim 10\text{--}500 \mu\text{L min}^{-1}$) to a minor extent. The distribution of flow is minimal in coulometric cells. Porous flow-through cells are practically maintenance free. Nonetheless, they can be clogged by small particles and it is not possible to clean the electrode material manually. Therefore, a suitable filter must be placed in front of each electrochemical cell in system [94,95].

Amperometric cells have a solid smooth planar working electrode surface where the electrochemical conversion takes place.

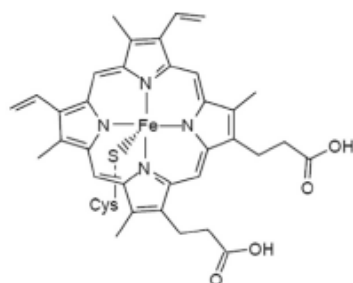


Fig. 1. Structure of the active site of Cytochrome P450.

The cleaning of electrodes is simple. The cell volume is low and the response time is very short. Moreover, these cells have a lower noise level and therefore higher sensitivity in comparison to coulometric flow-through cells. Nonetheless, these cell types exhibit only partially electrochemical conversion. Lower flow rates have to be used to achieve higher conversion rates in the thin-layer cell ($\sim 10 \mu\text{L min}^{-1}$). One of the main drawbacks of amperometric cells is electrode passivation. The working electrode can be easily deactivated as a result of accumulation of reaction products and contaminants. This deactivation depends on the nature of the electrode and adjusted conditions (e.g., applied potential and pH). It leads very often to lower reproducibility. Up to now, amperometric cells have been mainly used in off-line batch experiments. However, thin-layer cells offer the implementation of different working electrode materials, which might be useful for the investigation of further applications. A very promising material for the amperometric electrodes is BDD. It has larger electrochemical potential window in aqueous solutions than glassy carbon. In addition, BDD is chemical inert and stable even in aggressive environments [95–97].

The design of different cell types is shown in Fig. 3. Each cell is equipped with three electrodes, specifically a working electrode, a reference electrode, and a counter electrode. The oxidation potential is set between the working and counter electrodes. The coulometric tubular cell has a large working electrode surface area which is surrounded by the eluent flow. The arrangement of the amperometric thin-layer cell enables the eluent flow to be in the same level as the working electrode surface. On the contrary, the working electrode of the amperometric wall-jet cell is positioned opposite to the eluent flow. Therefore, these cells are more sensitive and self-cleaning compared to thin-layer cells. The porous flow-through cell has a very large working electrode surface area and the eluent flow goes through this porous cell. Hence, the electrochemical conversion efficiency is very high, as mentioned before [95–98].

MS is an analytical technique that ionizes chemical species and sorts the ions based on their mass-to-charge ratio. The apparatus consists of ion source, mass analyzer, and detector. The ion source ionizes the components of an analyzed sample. Ions are subsequently transported to the mass analyzer and separated before detection. Various ionization methods have been used in EC/MS couplings. TSP transfers ions from the liquid phase to the gas phase in a heated capillary. This method enables rapid acquisition of information and is not limited by chemical or ion noise. Nonetheless, this ionization method is characterized as having low sensitivity. This drawback can be suppressed, for example, if nebulization is adjusted to generate smaller droplets and/or less volatile ions are vaporized at lower rates.

Other ionization methods used in EC/MS set-ups are atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and desorption electrospray ionization (DESI). In APCI, primary ions are produced in the gas phase through the application of a corona discharge to a nebulized heated solvent spray at atmospheric pressure. This method is useful especially for analysis of less polar compounds with lower molecular mass, but it is not usable for ionization of biomolecules. DESI is a combination of ESI and desorption ionization techniques. The coupling of EC and DESI is quite simple. Both parts can be connected with a very short piece of capillary, hence the post-column dead volume is very small. Moreover, there is no problem with potentials, because the voltage used for spray ionization is much higher than the potential applied to the electrochemical cell. DESI can be successfully used for ionization of large proteins and protein complexes [8,10,99–101].

As mentioned before, the EC/MS coupling has been demonstrated to the greatest extent in combination with electrospray

ionization–mass spectrometry, because this ionization method is well compatible with EC, unlike, for example, hard ionization methods [13–16]. ESI–MS provides high sensitivity and reliability at the low flow rates required for high electrochemical reaction efficiency [74]. It is suitable for the generation of ions from highly polar compounds and biomolecules. From the electrochemical point of view, the ESI source represents a controlled-current high resistance cell consisting of two electrodes, the capillary emitter and mass spectrometer (the cell is often grounded after the inlet to the high vacuum mass spectrometer). As an alternative configuration, many CE/ESI-MS set-ups place the high voltage in the MS and ground the spray needle, rather than vice versa, to avoid the interaction between the ESI voltage and the CE voltage. The two electrodes are connected by the power supply and by a series of resistors consisting of the electrochemical contact to the solution, the solution resistance, the resistance at the solution–air interface and in the gas-phase, and the charge neutralization at the counter electrode [21,102]. A schematic view of an electrospray ionization source is shown in Fig. 4.

3.1. Electrochemistry/mass spectrometry

Direct coupling of EC with MS, e.g., using a capillary (see Fig. 2A), allows for potential-dependent abundance determination of reactive oxidation products or intermediates. Chemical information about the species formed during electrochemical reactions is gained in real time. For this purpose, high resolution (HR) MS is the best choice [19,40,104].

In the 1980s and 1990s, on-line EC/MS systems with TSP-MS have been used. Hambitzer and Heitbaum constructed a three-electrode cell connected to TSP-MS; the electrolyte was conducted from the working electrode into the heated capillary of TSP. Their first research in this area was published in 1986 [99], and additional studies followed in the 1990s [105,106]. Other studies in the simulation of xenobiotic metabolism using EC/TSP-MS have been performed by Getek et al. [75] and Volk et al. [76,107].

Since the 1990s, TSP has been slowly replaced by ESI. Van Berkel et al. presented many different arrangements of on-line coupling of EC and ESI–MS [108–112]. They also illustrated how the electrospray source can be characterized as a controlled-current electrolytic cell [102,113]. In 2004, Van Berkel and Asano [14] described EC/ESI–MS coupling with a three-electrode controlled potential electrochemical flow cell. However, a correct set-up of the on-line system is very important to avoid some difficulties, such as the coupling of currents between the electrochemical cell and the electrospray needle, or adsorption of analytes on the electrode surface. This adsorption is caused not only by properties of the investigated compounds and solvent composition, but also by the electrode material and the applied potential. Negatively charged species adsorb on the electrode surface at positive potentials, while positively charged species adsorb at negative potentials. It is possible to release adsorbed ionic compounds, if the electrode polarity is changed [19,112,114,115]. Moreover, the ESI high voltage and backward current must be considered in EC/ESI–MS coupling. One or more ground points can be inserted or the same potential can be applied at both the electrochemical cell and electrospray needle to avoid problems with the presence of interfering currents. Experimental conditions should be chosen so that mass spectrometric detection of electrochemical reactions generated during the ionization process are limited [108,116–119].

Since the 1990s, not only ESI has been used in EC/MS instruments, but also various ambient ionization methods have been implemented, as well [77,101,120,121]. In general, ambient ionization methods are characterized by the separation of the sample and

the ionization energy. Such arrangements can provide greater flexibility for in situ monitoring of surfaces and other media [122]. DESI, mentioned previously, is one of the most popular ambient ionization techniques, which has been developed. Brown et al. [121] reported a new ambient ionization method for the mass spectrometric detection of fleeting reaction intermediates in electrochemical reactions utilizing a “waterwheel” working electrode setup. It was composed of a round rotating platinum working electrode that is partially immersed in an aqueous electrolyte solution. As the working electrode was rotated, a 1 mm thick layer of liquid film developed on the electrode surface, forming the “waterwheel”. Above it, a custom spray probe directed a spray of analyte microdroplets to the surface of the working electrode.

However, the main disadvantage of such an EC/MS system is that it is missing a separation step. While it may be possible to better detect short-lived intermediates, this arrangement is suitable only for simple systems, where the separation of compounds is not needed. If separation is demanded, then coupling to CE or LC can be a viable alternative.

3.2. Electrochemistry/mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis

CE separates ions according to their electrophoretic mobilities. Aqueous buffer solutions without organic solvents are utilized. Hence, separation conditions for this technique can be made to closely mimic those in a physiologically-relevant environment [123,124]. Realization of a suitable CE/MS interface, which provided optimal performance of both components, was an issue for a long time. In 1988, Smith et al. [125] introduced the sheath-flow interface. Such an arrangement usually involves a commercially available coaxial sheath-liquid ESI sprayer. The sheath liquid is an electrolytic bridge, which enables the grounding of the electrophoretic current via the stainless-steel tubing. In addition, the sheath liquid provides an optimal flow of used solvent, which is an important condition for stable spray characteristics. The ESI sprayer is usually also grounded in the electrospray circuit. In this way, interference between the two high-voltage circuits (CE and ESI) is avoided [72,124].

The coupling of EC/MS to CE can be a challenging task. Analytes separated by CE have to carry charge to enable a separation based on differences in electrophoretic mobilities. Alternatively, the separation of neutral species requires the use of additives (e.g., surfactants) that can carry them through the separation column. However, ESI–MS has limited compatibility with surfactant-containing solutions. Another concept to consider is the electrochemical conversion of redox active species prior to CE separation, where the compatibility of background electrolytes with ESI–MS is less of an issue [71,126,127].

Besides a few off-line approaches, the main focus of research has been on advancing the on-line concept. In 2003, Matysik first described electrochemically-assisted injection (EAI)/CE/MS coupling [79]. An exemplary arrangement of this technique can be described as follows. The capillary inlet was close to an electrode in an electrochemical cell. Only a drop of sample solution (50 μ L) is needed for experiments with this device. After the injection step, the capillary inlet was placed in a vial containing the separation buffer and the separation voltage was applied [102,127–130]. A schematic of the EAI device and the CE/ESI–MS set-up is shown in Fig. 5.

In 2013, Matysik et al. [127] developed a fully automated EAI injection device. Three different carbon-based screen-printed electrodes, including unmodified carbon, carbon-nanofiber, and reduced graphene-oxide formats, were used. The results illustrated

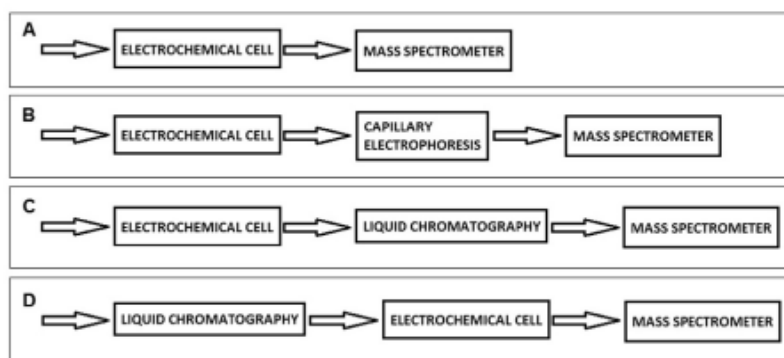


Fig. 2. Schematic configurations for combining electrochemistry, mass spectrometry, and separation techniques. Adapted from Ref. [13].

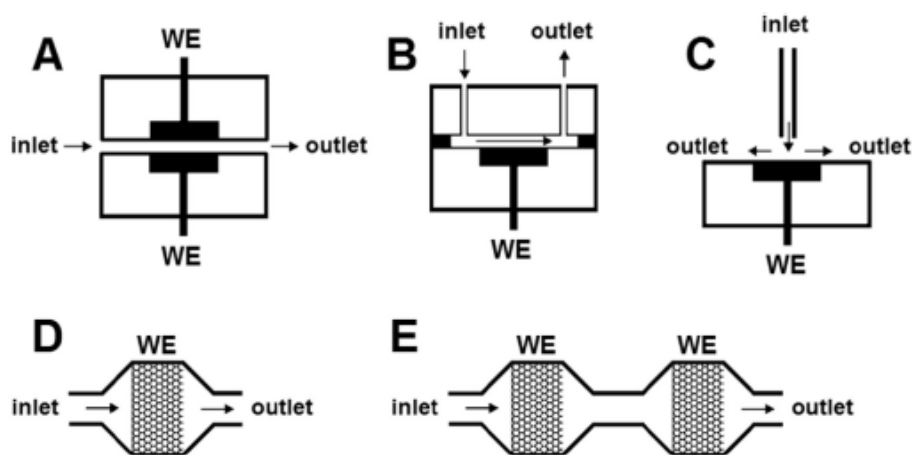


Fig. 3. Design of electrochemical cells: (A) tubular; (B) thin-layer; (C) wall-jet; (D) flow-through; and (E) dual working flow-through. Adapted from Ref. [97].

the potential of EAI/CE/MS in screening of electrode materials with various electrocatalytic properties.

3.3. Electrochemistry/mass spectrometry coupled to liquid chromatography

LC, especially HPLC, has been used as the separation technique in many EC/MS applications due to its simplicity of coupling with MS. The off-line coupling is applicable for the targeted generation and conjugation of stable metabolites that are supposed to be incubated or left to react over a given time period. However, the on-line arrangement is used much more often, because it enables a direct detection of intermediates and metabolites without a long-time delay. In Fig. 6, general EC/ESI–MS arrangements, with and without separation steps, are shown. For the on-line EC/LC/ESI–MS coupling, an additional integrated switching valve is necessary for independent adjustment of EC and LC conditions [12].

The first example of the on-line coupling of EC/LC/MS was reported by Volk et al., in 1989 [107]. Products of electrooxidation reactions in a porous working electrode flow cell were separated using LC and subsequently analyzed by TSP-MS. In the 1990s, the same group used this EC/LC/TSP-MS set-up for further research activities [80,131]. Iwahashi et al. [132,133] used a similar arrangement for the investigation of electrochemical reactions. However, they exchanged the thermospray interface for ESI. After oxidation reactions, products were separated and determined by

ESI–MS. In 2001, Karst et al. [134] published the hyphenation of HPLC, electrochemical conversion, and MS using ESI and APCI interfaces. Many other studies using EC/LC/MS have been published since the beginning of the 21st century [9,81–83,91,135–140]. In 2009, Karst and Lohmann [9] illustrated an on-line electrochemistry/enzyme reactor/LC/MS system for simulation of xenobiotic metabolism. GST was used as a catalyst for reactions. Their EC/GST/LC/MS arrangement is shown in Fig. 7.

In 2011, Doležal et al. [42] published on-line HPLC/EC/ESI–MS set-ups, as depicted in Fig. 2C and D, for detection and characterization oxidation products. In the same year, Karst et al. [85] illustrated EC/LC/ESI–MS apparatus containing a simple amperometric thin-layer cell equipped with a BDD working electrode. Baumann, Karst et al. [83] published their EC/LC/ESI-ion trap MSⁿ arrangement (Fig. 8) to identify metabolites of a radiotracer, and to determine metabolites in body fluids and cell extracts from *in vivo* studies with both nonradioactive and radioactively-labeled isatin. The major radioactive metabolite occurring *in vivo* was successfully identified using this approach.

Lately, the coupling of EC, LC, and MS has been further investigated. New applications have been tested and new approaches have been tried. Cai et al. [101] described advantages of ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) connected to EC/DESI–MS. Using UHPLC, they achieved faster separation and higher sensitivity, in comparison to conventional HPLC. Moreover, the dead volume was minimized, because the electrochemical cell was

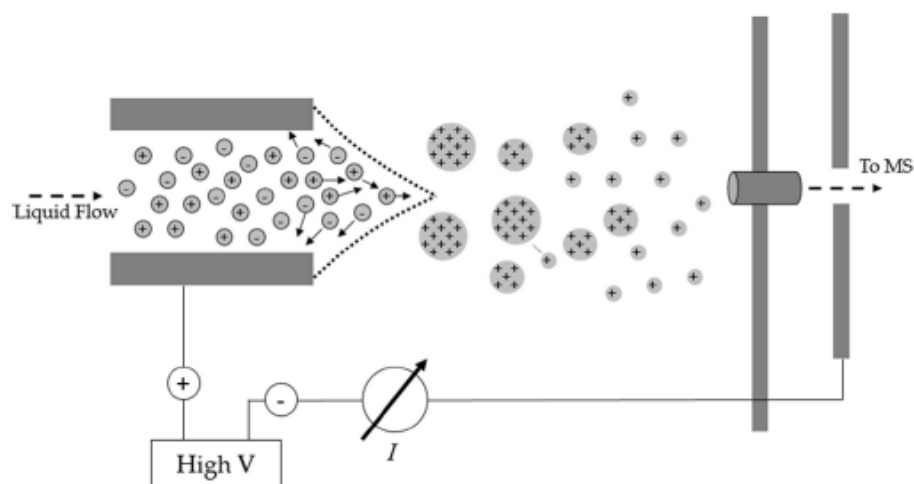


Fig. 4. Schematic view of an electrospray ionization source in the positive ionization mode connected to a mass spectrometer (MS). Adapted from Ref. [103].

connected easily to DESI-MS with a short piece of capillary. In 2017, Karst et al. [141] presented a new hyphenated technique, featuring on-line dual electrochemistry/LC/ESI-MS. Reduction and oxidation are combined, thus two working electrodes were used (titanium and BDD). The same research group [142] described EC coupled to hydrophilic interaction LC (HILIC) and ESI-MS. This arrangement enabled both estimation of metabolite polarity and identification of isomeric products.

3.4. Miniaturized systems

The use of electrochemistry can be inherent to the ESI-MS source ("in-source" arrangements, microspray emitters, etc.) or EC can be implemented into microchips and microfluidic devices which can then be coupled to the ESI-MS interface.

If an electrochemical system is integrated into the ESI-MS, it is possible to gain control over reactions at the ESI emitter electrode and thus monitor redox reactions more effectively. Several research articles about this topic were published in the past 15 years [14,15,115,117,143–157]. Van Berkel et al. [14] tested the inherent electrochemistry at the emitter electrode in ESI-MS, controlled by a three-electrode electrochemical cell into the controlled-current electrospray emitter circuit. Two different basic cell designs were investigated, specifically planar flow-by working electrode and porous flow-through working electrode designs. The developed three-electrode controlled-potential electrochemical cell incorporated into ESI-MS and using a porous flow-through working electrode was further studied also by Kertesz et al. [143]. Van Berkel and Kertesz [118] demonstrated the utilization of the electrochemistry inherent to electrospray using the porous flow-through electrode at the upstream ground contact or at both the upstream ground contact and the high-voltage emitter contact in ESI-MS. In 2006, they [15] also presented advantages of controlled-current electrochemistry-ESI with a two-electrode emitter cell. They concluded that a simple and inexpensive battery and resistor circuit used with a two-electrode emitter cell provided the same basic electrochemical capabilities as a three-electrode emitter cell controlled by a sophisticated floated potentiostat. In 2008, Mautjana et al. [145,146] presented experiments using the ESI-MS instrument with a cone-shaped capillary inlet. Two years later, Lloyd and Hess [154] described corona discharge initiated electrochemical electrospray ionization (see Fig. 9). This selective

technique induces the "in-source" fragmentation of a range of molecules that complex transition metals. In 2014, Plattner et al. [157] presented a controlled-current EC/ESI-MS assay. A flow-injection system was combined with MS.

In comparison, completely independent EC cell units have other significant advantages, such as enormous reduction of sample volumes and analysis time, possibility to manufacture portable low-cost units with low electricity consumption, and finer regulation of electrochemical reactions of interest. This type of EC can be favorably coupled on-line to ESI-MS [12,88,158–163]. Liljegren et al. [160] described one type of the on-chip combination of EC and ESI-MS. An array of gold microcoil electrodes was incorporated into a polydimethylsiloxane microflow channel equipped with an ESI emitter. The transfer times were only 0.6 and 1.2 s for flow rates of 1.0 and 0.5 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectively.

In 2009, Odijk et al. [162] designed a microfluidic microreactor chip for electrochemical conversion of analytes, containing a platinum working electrode, a palladium reference electrode, and counter electrodes. Using this chip, cyclic voltammograms were measured in volumes of 9.6 nL. Using the EC/LC/MS combination and a flow rate of 1 $\mu\text{L min}^{-1}$, an on-line conversion of 97% was obtained. One year later, this research group [88] presented an integrated three-electrode electrochemical cell on-chip with high analyte conversion rates. The electrochemical cell contained a platinum working electrode, counter electrodes, and an iridium oxide pseudo-reference electrode. In 2012, Odijk et al. [89] reported a novel design of a miniaturized three-electrode electrochemical cell (see Fig. 10). The internal volume was 175 nL. A working electrode and a counter electrode were placed in two separate channels to isolate generated reaction products. In 2016, Van den Brink et al. [163] described a microfluidic electrochemical cell with an integrated BDD working electrode coupled to MS. The internal volume of the cell was only 160 nL.

4. Applications

Different types of EC/MS coupling have been used in a wide variety of different applications. The main research area has been simulation of xenobiotics metabolism. The other prominent use has been in protein research. Publications describe peptide and protein cleavage due to electrochemical oxidation, which is also useful for protein surface mapping. Other articles illustrate advantages of EC/

MS coupling for disulfide bond reduction, hydrogen/deuterium exchange, and electrochemical tagging of redox sensitive peptides and proteins [6,7,145,163]. This can be useful in the search for new biomarkers. Moreover, labeling changes properties of peptides and proteins, which is useful for improving sample preparation, HPLC separations, MS detection, and quantitation [11,32–35,38,39]. Several research articles describe applications related to simulations of the attack of DNA or RNA by endogenous or exogenous ROS, and simulation of various DNA lesions, either resulting from attack of ROS or from adduct formation between endogenous biomolecules and xenobiotics [9,19,22,27,37,38].

4.1. Applications of electrochemistry/mass spectrometry

On-line EC/MS is suitable for optimization of the electrochemical conditions and it can provide a very rapid answer as to which potential should be used for optimum yield of the desired product. The simplicity and speed of this system make it a useful tool in xenobiotic metabolism research [19,40,104]. In the first research article using EC/MS, volatile intermediates and products of the reduction of NO_2^- in 0.1 M perchloric acid were studied [73]. Since the 1980s, EC/MS coupling has been further investigated and new applications have been tested. Shono et al. [72] simulated *N*-dealkylation of four neuropharmacologically active drugs, namely lisuride, diazepam, methysergide, and imipramine. Getek et al. [75] studied acetaminophen and simulated both phase I (oxidation catalyzed by CYP) and phase II metabolism of this compound. The phase II was mimicked by the conjugation of added glutathione (or cysteine) with the oxidation products of acetaminophen.

Further studies in the simulation of xenobiotic metabolism using EC/MS has been performed by Volk et al. [76] and particularly, by Jurva and Bruins. One EC/MS system [74] featured a working electrode from porous graphite for electrochemical conversion of analytes, such as lidocaine, 7-ethoxycoumarin, and an enantiomer of the dopamine agonist, 2-(*N*-propyl-*N*-2thienylethylamino)-5-hydroxytetralin. These compounds were injected with an injection loop and passed through an electrochemical cell connected to a potentiostat. Oxidation products were then easily detected by ESI–MS.

Van Berkel et al. [108,110] used EC/ESI–MS for a variety of applications: ionization of neutral analytes for detection by ESI–MS; study of (short-lived) products of electrochemical reactions; determination of metals (using coupling anodic stripping voltammetry); and investigation of soluble products from the anodic polymerization of aniline in H_2O and $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1 v/v) with ammonium acetate. It has also been demonstrated that an

electrochemical cell with electrodes under potential control can be used for sample preconcentration and cleanup for both organic [111,112] and inorganic [109] compounds. In 2003, Jurva et al. [40] presented a comparison between EC/MS and CYP-catalyzed oxidation reactions. CYP-catalyzed reactions initiated by *one electron oxidation*, such as *N*-dealkylation, *S*-oxidation, *P*-oxidation, alcohol oxidation, and dehydrogenation, could be successfully mimicked by the EC/MS system. On the contrary, it was not possible to simulate reactions initiated via direct hydrogen atom abstraction, such as *O*-dealkylation and hydroxylation of unsubstituted aromatic rings. The oxidation potential of these reactions is usually too high to be electrochemically oxidized. Van Berkel and Asano [14] also described the controlled oxidation of reserpine using a EC/ESI–MS coupling. The indole alkaloid, reserpine, is often used to test the specifications of ESI–MS.

Besides ESI–MS, ambient ionization methods, such as liquid-sample DESI and flowing atmospheric pressure afterglow (FAPA), have been used to couple between EC and MS [77,101,120,121]. Special applications could be realized using these interfaces, such as studies of disulfide bond-containing proteins and peptides and their differentiation from those without disulfide bonds, investigation of electrochemical reactions on electrode surfaces, and some others. In 2015, Brown et al. [121] illustrated a new ambient ionization method utilizing a “waterwheel” working electrode setup for MS detection of fleeting reaction intermediates in electrochemical reactions. This technique provided the ability to monitor electrochemical reactions on the time scale of milliseconds, which can be then used to elucidate mechanisms of many redox reactions. Data that showed the formation of a diimine intermediate of the electrochemical oxidation of uric acid that has a lifetime in solution of 23 ms was presented, as well as data that provided evidence for the formation of a similar diimine species from the electrooxidation of xanthine, which had not been previously observed.

Nowadays, EC/MS coupling is still used for simulations of metabolic pathways, mostly those catalyzed by CYP; there are several recent examples [78,164–168]. Chipiso and Simoyi [164] observed oxidation of methimazole. They concluded that some of the generated species were similar to metabolites within the framework of both *in vitro* and *in vivo* studies. Zabel and Weber [78] studied the oxidation behavior of sulfur-containing amino acids, cysteine, *N*-acetylcysteine, methionine, and glutathione by EC/MS. Mechanistic oxidation routes were successfully confirmed. Moreover, new reactions were monitored. On the basis of results, cisplatin has a highly significant impact on the redox reactivity of sulfur species. Szultka-Mlynska and Buszewski [165] used EC/MS coupling for simulations of metabolism and for the determination

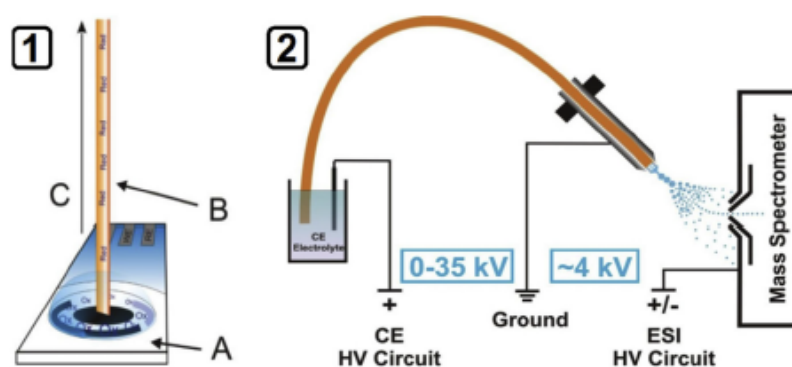


Fig. 5. (1) Schematic view on electrochemically-assisted injection: (A) Screen-printed electrode, (B) capillary, (C) injection for CE/MS; (2) Capillary electrophoresis (CE)/electrospray ionization–mass spectrometry (ESI–MS) is carried out using a grounded spray needle arrangement. Reprinted with permission from Ref. [104].

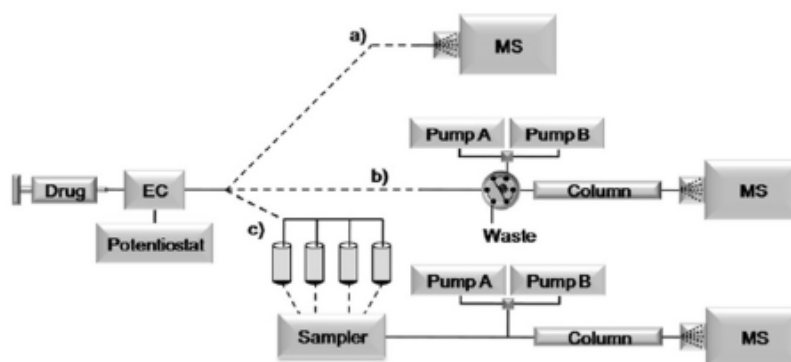


Fig. 6. Generalized EC/MS instrumental arrangements: (a) direct on-line electrochemistry (EC)/electrospray ionization–mass spectrometry (ESI–MS) coupling; (b) on-line EC/liquid chromatography (LC)/ESI–MS; and (c) off-line EC/LC/ESI–MS hyphenation (pre-column options). Reprinted with permission from Ref. [12].

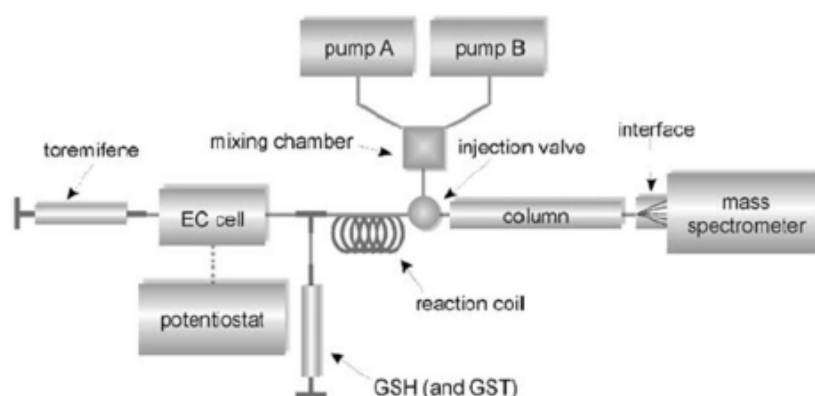


Fig. 7. Schematic of an electrochemistry (EC)/Glutathione S-transferase (GST)/liquid chromatography (LC)/mass spectrometry (MS) system for the simulation of the oxidative phase I and the conjugative phase II metabolism of toremifene. Reprinted with permission from Ref. [9].

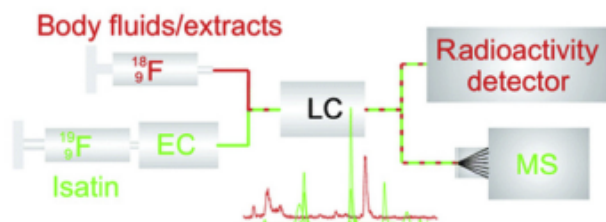


Fig. 8. The developed electrochemistry (EC)/liquid chromatography (LC)/electrospray ionization–mass spectrometry (ESI–MS) set-up to determine metabolites in body fluids and cell extracts with the nonradioactive (^{19}F) and radioactive isatin (^{18}F). Reprinted with permission from Ref. [83].

of electrochemical products of selected chemotherapeutics, specifically antibiotic drugs, such as amoxicillin, cefotaxime, fluconazole, linezolid, metronidazole, and moxifloxacin. The experiments consisted of electrochemical oxidation and subsequent addition of glutathione for follow-up reactions (phase II metabolism). Oxidation reactions, dehydrogenation, and *N*-demethylation were observed. The results correlated well with those from *in vivo* experiments. Thus, it is possible to use the EC/MS technique for the prediction of biological metabolism of therapeutic drug monitoring, as well as for pharmacokinetic studies.

4.2. Applications of electrochemistry/mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis

CE is suitable especially for analysis of biological compounds, because the separation conditions for this technique can be maintained close to those in a physiological environment, as previously mentioned. EC/CE/MS, especially the EAI/CE/MS coupling, can be a useful technique for investigation of numerous complex processes. EAI was first described in 2003 [71,79,123,124].

Since 2003, Matysik et al. have used the EAI/CE/MS arrangement to study the electrochemical oxidation of various ferrocene derivatives [127,129,130]. In 2013, the same group [128] developed a fully automated EAI injection device. The arrangement was used for mechanistic and quantitative studies of the reduction of 4-nitrotoluene. In the next year, Scholz et al. [38] presented the first bioanalytical application of EAI/CE/MS. They simulated the oxidative metabolism of guanosine. A comparison of metabolites formed under alkaline, neutral, and acidic conditions was presented. In 2016, they [169] published the EAI/CE/MS set-up for the simulation of the oxidative metabolism of cyclic nucleotides.

Karst et al. [170] investigated the metabolic degradation of drugs using EC coupled to nonaqueous CE (NACE)/ESI–MS and HPLC/ESI–MS. Both separation techniques were compared in their study. The NACE/ESI–MS coupling was used for the first time in this research area, and this technique can provide additional

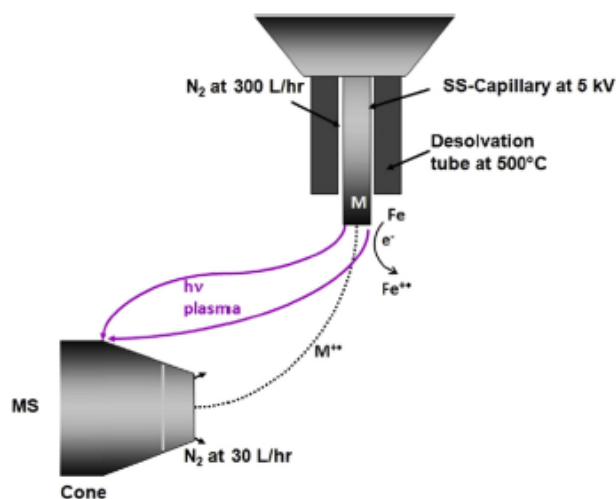


Fig. 9. An experimental set-up of corona discharge (CD) induced electrochemical ionization. The plasma ion path is directed away from the analyte ion path to the ground plate behind the orifice. CD removed an electron from Fe at the sharp edge of the SS capillary resulting in radical Fe^{\bullet} . Analytes (M) with ionization potential lower than Fe/Fe^{\bullet} were ionized by electrochemical oxidation and fragmented. During this process, Fe^{\bullet} was regenerated. The surface interaction is critical for the formation of the radical ions and for their subsequent fragmentation. Reprinted with permission from Ref. [154].

information about possible metabolites. A naturally occurring monoaminoxidase inhibitor, harmine, was investigated in that study. When the CYP-catalyzed oxidative metabolism of harmine was simulated, the combination of HPLC and NACE enabled the detection of 37 products in total (six of them were detected only by the NACE/ESI-MS set-up). Importantly, the different reaction conditions involved for the two separation techniques affected the fate of metabolites.

4.3. Applications of electrochemistry/mass spectrometry coupled to liquid chromatography

In the 1980s and 1990s, Volk et al. [107,131] used electrochemistry on-line coupled to HPLC/TSP tandem mass spectrometry to provide insight into the solution-phase decomposition reactions of electrochemically generated oxidation products. They successfully separated and identified oxidation products of a series of purines. The same system was further used by the same group [80] to compare the enzymatic and the electrochemical oxidation pathways of uric acid. Both enzymatic and electrochemical reactions

yielded the same intermediates and products. High conversion efficiencies in the electrochemical process were advantageous for elucidation of their structures using MS. Iwahashi et al. [132,133] used a similar arrangement for the investigation of electrochemical reactions of a tryptophan metabolite and 3-hydroxyanthranilic acid. HPLC/EC/MS analyses of 3-hydroxyanthranilic acid were performed to identify the respective peak compounds. Representative mass spectra observed in this work are shown in Fig. 11. Iwahashi et al. exchanged the TSP interface for ESI. After oxidation reactions, the products were separated and determined by ESI-MS. This technique is very useful in organic chemistry for both small and large molecules. The utilization for macromolecules is possible because ESI is a soft process where fragmentation is negligible during ionization. Unlike TSP, ESI-MS can produce abundant multiply protonated ions. Additionally, the coupling of HPLC with TSP-MS is not as straightforward as the coupling with ESI-MS. An electrolyte (typically ammonium acetate) must be added to the solvent if TSP is used. Nowadays, ESI is routinely used for most of applications.

In 2001, Karst et al. [134] published the hyphenation of HPLC, electrochemical conversion, and MS. Ferrocenecarboxylic acid esters were synthesized, separated by reversed-phase HPLC, and coulometrically oxidized prior to single quadrupole MS analysis using ESI and APCI interfaces. In 2007, Karst and Lohmann [82] illustrated a direct detection of reactive metabolites of model compounds using an on-line coupling of EC/LC/MS. Amodiaquine, amsacrine, and mitoxantrone, which are all known for readily binding to cellular macromolecules after metabolism by CYP, were the model compounds. EC/LC/MS results were compared to those from rat liver microsome incubations and the methods were shown to be highly complementary. For example, *N*-dealkylation and *N*-oxidation of amodiaquine were successfully simulated by electrochemical oxidation reactions, as well as the formation of an aldehyde. Two years later, that group [9] simulated oxidative phase I catalyzed by CYP and conjugative phase II metabolism of tor-emifene. An enzymatically catalyzed phase II reaction was successfully implemented into the on-line system, in addition to an electrochemical phase I simulation. GST was added as a catalyst for the reactions. The use of transferases is crucial for simulation of phase II metabolism.

In 2010, Baumann et al. [84] used an EC/LC/ESI-MS system to predict the oxidative metabolism and discover new metabolites of triclorcarban (TCC). Results were confirmed by *in vitro* studies with human and rat liver microsomes. Reactive quinone imines formed from hydroxylated metabolites of TCC were discovered. The reactivities of the new species were demonstrated by their covalent binding to glutathione and macromolecules, using β -lactoglobulin A as a model protein. The research article explained the *in vivo* protein binding of, to date, unidentified TCC metabolites. However,

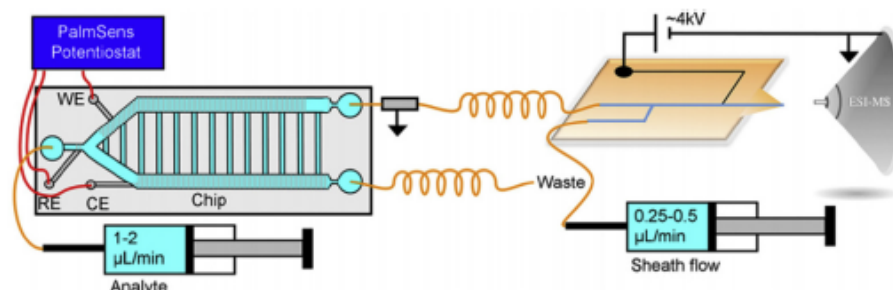


Fig. 10. Schematic overview of a set-up with an electrochemical chip. A syringe pump introduces analyte into the chip, electrode potentials are controlled by a potentiostat, the electrochemical chip is connected to a microchip electrospray ionization. Reprinted with permission from Ref. [89].

neither microsomal studies nor the data obtained by the EC/LC/MS simulation could completely depict all of the *in vivo* processes.

Doležal et al. [42] detected and characterized R-roscovitine oxidation products using on-line HPLC/EC/ESI–MS. R-roscovitine underwent *N*-dealkylation, hydroxylation of the aromatic side-chain, dihydroxylation, methoxylation, and dimer formation. Structures of six major products were elucidated using MS and compared to previously identified R-roscovitine *in vitro/in vivo* metabolites. Most of them evinced similarity due to the same reaction type. In a similar vein, Karst et al. [85] reported an investigation of the biotransformation pathway of the drug verapamil using EC/LC/ESI–MS. The oxidative metabolism catalyzed by CYP was successfully mimicked and results were compared with those from *in vitro* studies, specifically from incubations with rat and human liver microsomes. The data obtained by the purely instrumental technique correlated well with those from microsome experiments.

In 2011, Baumann, Karst et al. [83] published their EC/LC/ESI–MS arrangement to identify metabolites of a radiotracer and to determine metabolites in body fluids and cell extracts from *in vivo* studies. The major radioactive metabolite occurring *in vivo* was successfully identified using this approach. Nouri-Nigjeh et al. [86,87] used EC/LC/MS to mimic the oxidation of lidocaine. *N*-dealkylation and 4-hydroxylation products were generated. The *N*-oxidation product was obtained by electrochemical oxidation at constant potential in the presence of hydrogen peroxide. Square-wave potential pulses may also be applicable to modulate the selectivity of electrochemical reactions with other drug compounds in order to generate oxidation products with greater selectivity and higher yield based on the optimization of cycle times and potentials. This collection represents some important work, which has considerably widened the scope of using direct electrochemistry-based oxidation reactions for the imitation of *in vivo* oxidative drug metabolism.

In 2015, Bussy and colleagues published two research reports using EC/LC/MS. First, was a study to simulate the oxidation of acebutolol [138]. Two supporting electrolytes, ammonium acetate and lithium acetate, were tested in the experiment. Oxidation products in the presence and absence of glutathione were identified and a correlation between the supporting electrolyte nature and oxidation product formation was established. Acebutolol was oxidized to quinoneimide species and to additional species only with ammonium acetate (not with lithium acetate) as the supporting electrolyte. However, side reactions occurred. The quinoneimide species was converted to a benzimidazole ring product in the presence of ammonia. In the second work [139], a nitro reduction metabolite as a standard for a LC/MS-based quantitative assay was generated using an electrochemical cell. This approach was further used to quantify reductive metabolites of the pesticide 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol reductive metabolism in several fish species. 3-trifluoromethyl-4-aminophenol was the main metabolite. They concluded that the level of reductive metabolism of the pesticide could be related with sensitivities to this compound. Moreover, secondary reactive metabolites associated with toxicological effects were observed. According to results of this research, further investigation of 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol metabolism and possibilities for its bioactivation are still needed.

In 2016, Switzar et al. [140] characterized protein disulfide bonds using an on-line LC/EC/ESI–MS platform. Retention times were used for identifying both intra- and interpeptide disulfide bonds. Peptides were characterized in two different proteins, β -lactoglobulin and ribonuclease B. In 2017, Karst et al. [141] presented on-line dual electrochemistry/LC/ESI–MS, where reduction and oxidation were combined. Low molecular mass disulfides and peptides were investigated. Protein disulfides were reduced and

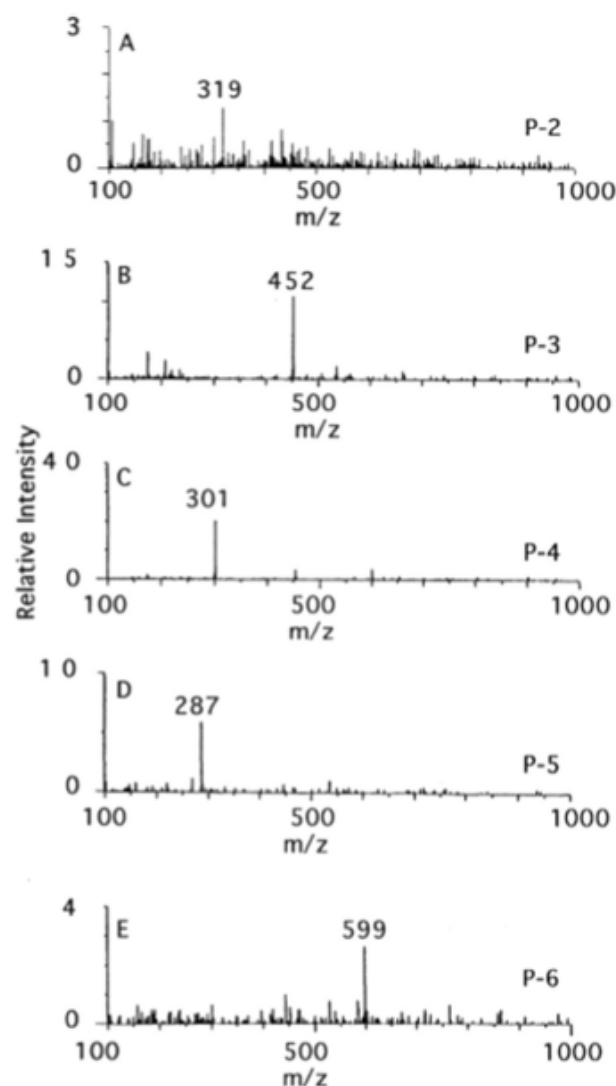


Fig. 11. Mass spectra of respective peak compounds (peaks 2, 3, 4, 5 and 6) of 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA). Reprinted with permission from Ref. [133] (Copyright, Elsevier, 1999).

phenols were oxidized during their experiments. Moreover, the developed method was tested for insulin. It was confirmed that it is suitable also for larger biomolecules containing disulfide bonds. Nonetheless, further optimization, especially related to efficiency of the electrochemical reactions, was needed. The same research group [142] described EC coupled to HILIC/ESI–MS. The animal feed additive roxarsone was oxidized, both phase I and phase II metabolism were simulated, and potential transformation products were identified. Separation by HILIC enabled both estimation of metabolite polarity and identification of isomeric products. Various potentially toxic metabolites, not only with arsenic but also without arsenic, were observed. Moreover, EC/MS was used for reactivity estimation towards free cysteines in biomolecules and two potential reactive intermediates of roxarsone were revealed.

4.4. Applications of miniaturized systems

As mentioned before (Chapter 3.4), EC can be inherent to the ESI–MS source (as in “in-source” arrangements, microspray emitters, etc.) or EC can be implemented into microchips and microfluidic devices which can then be coupled to the ESI–MS interface. The “in-source” EC systems are particularly well suited for the detection of extremely short-lived species and various applications have been tested. Van Berkel et al. [14,118] oxidized 3,4-dihydroxybenzoic acid and reserpine to present advantages of controlled-current electrochemistry–ESI with a two-electrode emitter cell. This cell system provided not only oxidation reactions (of reserpine) in positive ion mode (or reduction in negative ion), but also reduction of analytes (methylene blue) in positive ion mode and oxidation (of 3,4-dihydroxybenzoic acid) in negative ion mode by simply altering the potential of the working electrode.

Two years later, Mautjana et al. [145] presented HDX experiments with dopamine and cysteine using the ESI–MS instrument with a cone-shaped capillary inlet. This configuration allowed efficient collection of radially segregated ions generated in ESI and therefore the sensitivity of measurements using the cone-shaped

capillary inlet was very high. Oxidation pathways observed in the instrument were relevant to biological reactivity of dopamine (see Fig. 12) and cysteine. High flow rates applicable for this configuration can be useful for direct coupling of electrospray and microcolumn separations. The same group [146] used the same instrumentation (electrospray with a cone-shaped capillary inlet) for uric acid oxidation and thus, for enhancing the sensitivity of uric acid detection. Negatively charged urate ions were oxidized during positive ion mode to neutral radicals, which formed the uric acid dimer. This dimer and the unoxidized acid were detected.

The interactions by metal ions with biological species is also an important topic of study. Prudent et al. [151] investigated the interaction of copper ions with peptides using electrospray microemitters. One contained a platinum electrode using a copper electrolyte solution with a peptide sample, the other one was with a sacrificial copper anode in a water/methanol solution containing only a peptide. They demonstrated that a sacrificial metal electrode coupled to microchip–ESI–MS can be used for the study of metal complexation. In related work, Lloyd and Hess [154] described corona discharge-initiated electrochemical electrospray ionization as a suitable technique for a range of molecules that complex transition metals. Unlike electron capture dissociation or electron transfer dissociation, where ions are generated by the addition of an electron (reduction), corona discharge-initiated electrochemical

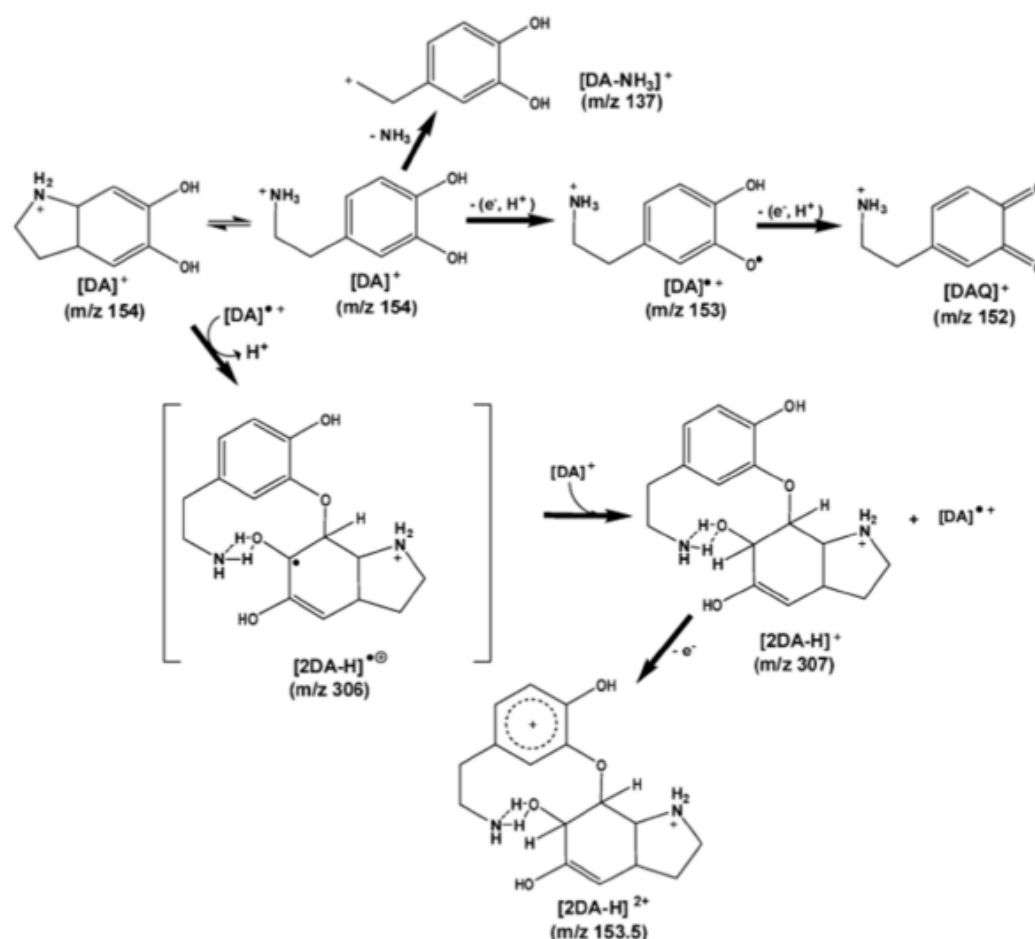


Fig. 12. Dopamine oxidation in positive ion mode of electrospray ionization-mass spectrometry. Reprinted with permission from Ref. [145] (Copyright, Wiley, 2008).

electrospray ionization creates an electron deficient species. Hence, fragmentations observed in this study were unique. Rare dissociation pathways were present in radical oxidation reactions using Cu-complexes. Due to the metal complexation, it is possible to fragment nucleosides, glycopeptides, and phosphopeptides into diagnostically useful ions.

In 2014, Plattner et al. [157] compared controlled-potential and controlled-current ESI-MS. In the controlled-potential arrangement, only redox-active systems can be studied. Oxidation products, however, show redox activities themselves. Determination of reducing potencies is more relevant for characterization of such compounds. This aspect can be analyzed by the controlled-current ESI-MS set-up. Plattner et al. presented the controlled-current ESI-MS assay as a tool for the characterization of the reducing potencies of natural antioxidants (e.g., α -tocopherol, resveratrol, retinol, melatonin, and gallic acid). A comparison of the reducing potencies in wine samples is shown in Fig. 13. Directly, electrochemical properties of electrospray was used for reduction of tested substances. A flow-injection system was combined with MS in most of cases. LC was used to process complex samples and solid-phase extraction was used for pretreatment of the complex samples. Unwanted redox reactions in ESI-MS could be suppressed by redox buffers (e.g., glutathione), which are oxidized in the ESI emitter.

EC cell units implemented into a microchip or a microfluidic device have other significant advantages. For example, a wider range of electrochemical reactions may be studied on microchips. Liljegren et al. [160] used the on-chip combination of EC and ESI-MS for the investigation of oxidation products of dopamine. They demonstrated that this experimental arrangement can be very useful for fundamental electrochemical investigations, as well as for applications based on the use of electrochemically controlled sample pretreatment, preconcentration, and ionization steps prior to MS.

In 2009, Odijk et al. [162] designed a microfluidic microreactor chip for electrochemical conversion of analytes. Using this chip, cyclic voltammograms were measured in volumes of 9.6 nL (the internal volume of the main channel) and the electrochemical metabolism pathway of amodiaquine was studied. As a primary advantage, the consumption of sample and chemicals was minimal in these experiments. Results were similar to those obtained with conventional cell systems. The chip is very suitable for conversion of small and fast reacting ions. Nonetheless, accuracy was not sufficient due to small variations in the flow velocity. On-line and on-chip cyclic voltammograms recorded at different flow rates are illustrated in Fig. 14. An added contribution of convection to the measured current was observed with increasing flow rates. One year later, this research group [88] presented an integrated three-

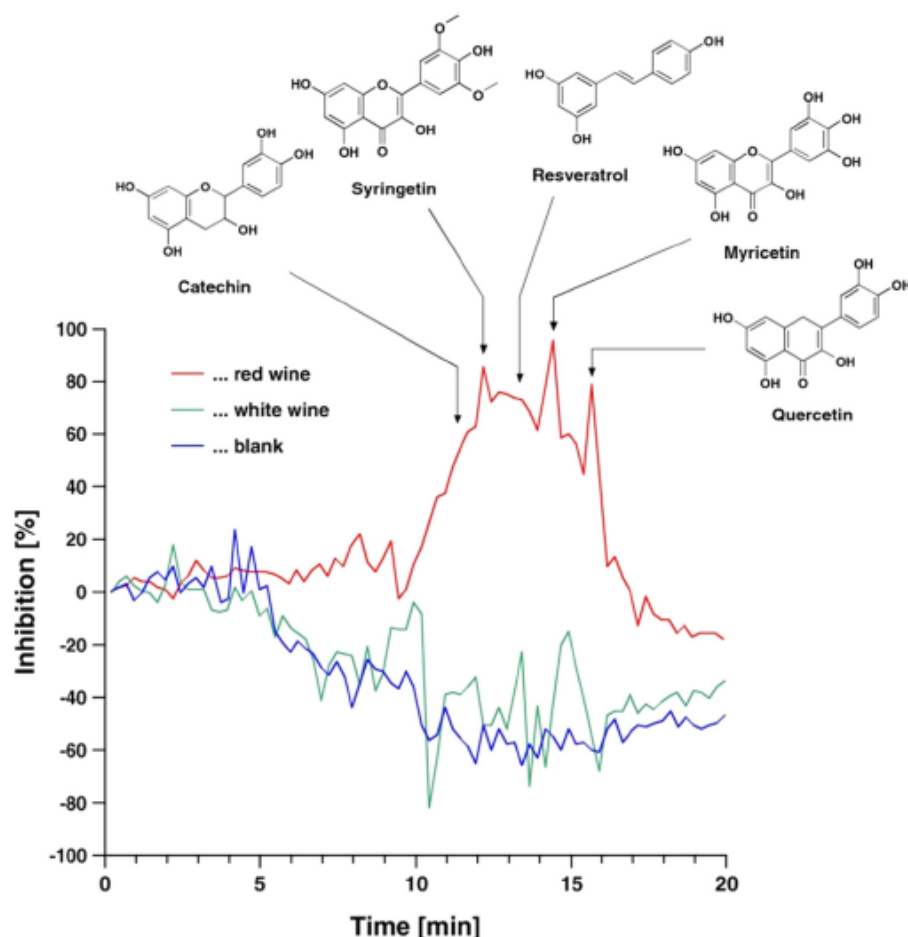


Fig. 13. Comparison of the reducing potencies of chromatographic fractions using controlled-current electrochemistry inherently present in electrospray ionization-mass spectrometry and with amodiaquine as indicator molecule. Reprinted with permission from Ref. [157] (Copyright, Springer, 2014).

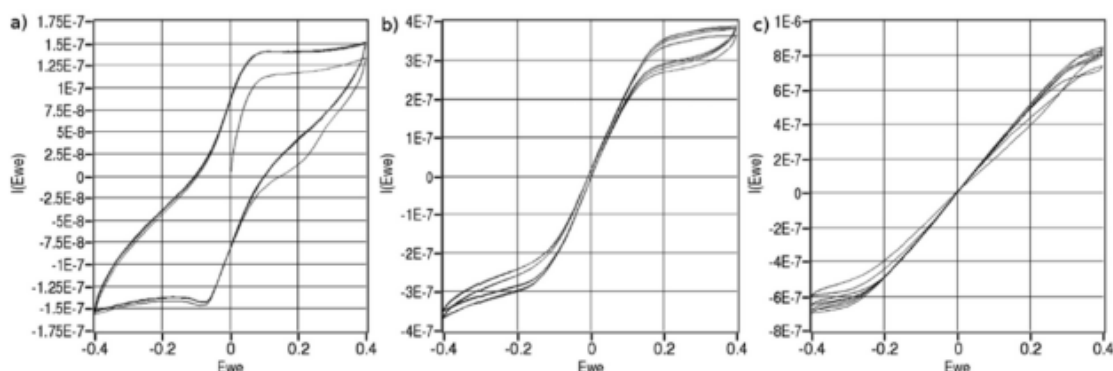


Fig. 14. Cyclic voltammograms recorded in a solution containing 2.5 mM ferrocyanide, 2.5 mM ferricyanide, 0.1 M KNO_3 and 2 mM phosphate buffer using a chip with a working electrode area of 2.4 mm^2 . Scan rate was 20 mV s^{-1} . a) No-flow, b) 0.1 mL min^{-1} , and c) 0.25 mL min^{-1} . Reprinted with permission from Ref. [162] (Copyright, Royal Society of Chemistry, 2009).

electrode electrochemical cell on-chip for purposes of drug metabolism studies. They mimicked the oxidative drug metabolism reactions catalyzed by CYP enzymes that normally occur in the human body. With the chip, different reaction products of both rat liver cell microsome and human liver cell microsome incubations were observed. In 2012, Odijk et al. [89] described an electrochemical chip coupled to ESI–MS for simulation of drug metabolism, specifically that of mitoxantrone. At an oxidation potential of 700 mV, all known oxidative metabolites were observed. Using this chip, conversion rates were close to 100%, while the maximum flow rate was set at $8 \mu\text{L min}^{-1}$. Higher flow velocity caused leakages because of too higher pressure in the developed microfluidic system.

In 2015, Van den Brink et al. [90] illustrated novel screening methods using an electrochemical chip coupled on-line to MS or LC/MS, to generate phase I and phase II drug metabolites and to demonstrate protein modification by reactive metabolites. The short transit time (approximately 4.5 s) between electrochemical oxidation and MS detection allowed for detection of a short-lived radical metabolite of chlorpromazine, which was too unstable to be detected using previously established test routines. In addition, a fast way to screen candidate drugs was established by recording real-time mass voltammograms. These could be used to identify drug metabolites that formed upon oxidation, by applying a linear potential sweep in conjunction with simultaneous detection of oxidation products. Furthermore, detoxification of electrochemically generated reactive metabolites of paracetamol was mimicked by their adduct formation with the antioxidant glutathione. Finally, the potential toxicity of reactive metabolites could be investigated by the modification of proteins, which was demonstrated by modification of carbonic anhydrase I with electrochemically generated reactive metabolites of paracetamol. With this series of experiments, the potential of this electrochemical chip as a complementary tool for a variety of drug metabolism studies in the early stages of drug discovery was demonstrated. One year later, they [163] described a microfluidic electrochemical cell, which exhibited reduced adsorption of peptides and proteins. Efficient electrochemical peptide bond cleavage of proteins bovine insulin and chicken egg white lysozyme was observed in this microfluidic cell coupled to MS.

5. Summary and outlook

EC/MS coupling represents a fast, versatile, automatable, efficient, reliable, and “green” approach. Instrumental arrangements

discussed in this review are useful for rapid optimization of electrochemical conditions [22,40,104], quantification of metabolites [2,13,22,25,40], almost real-time monitoring of even potentially unstable products [89,99], small scale synthesis of standards [2,13,16,20,22,171], and sample preconcentration and cleanup [109,111,112,160]. Generally, EC/MS has been usually used for characterization of short-lived intermediates emerged during xenobiotic metabolism, which is simulated by EC, or to make ions of compounds with low polarity for signal enhancement in MS. This coupling has been demonstrated to the greatest degree as EC/ESI–MS. In most of cases, an electrochemical cell, mainly coulometric flow-through cell, is coupled to ESI–MS. Several publications have illustrated integration of an electrochemical system into ESI–MS, some others independent EC cell units implemented into a microchip or a microfluidic device. Nonetheless, these arrangements are suitable only for simple systems, where the separation of compounds is not needed. If separation is demanded, then coupling of EC/MS through the use of CE or LC is more desirable. Coupling of EC/MS with chromatographic techniques is the most complex arrangement. It can be used for complex analytical problems in which high selectivity is needed. It is also well suited for quantitative analysis. EC/LC/MS is a promising tool for the identification of both reactive and stable metabolites in drug development and research [82,172].

The number of various applications of EC/MS is still increasing. In March 2017, already the 4th international workshop on EC/MS (EChMS), related mainly to metabolite generation and identification, environmental fate of xenobiotics, simulation of advanced oxidation processes, preparative scale EC/MS, and peptide and protein adducts, took place in Münster, Germany. The previous workshops were held in 2011, 2013, and 2015 [173].

As still new pharmaceuticals are produced, new compounds are used as doping in sport, and new substances are discovered, reliable metabolism simulation of all these xenobiotics is needed. Improving of EC/MS set-ups could be useful for the pharmaceutical industry, for doping control laboratories, but also for research groups looking for new substances. Using EC/MS coupling, a targeted synthesis of reference standards is possible. Another promising field might be the elucidation of antioxidant pathways. In the future, improvements in miniaturized arrangements could be beneficial to speed experiments and to decrease the amounts of used chemicals and standards. Some special miniaturized devices could be utilized for fieldwork. A further evaluation of alternative cell designs could be likewise an important topic.

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] R.J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, *Electrochemical Detection in HPLC: analysis of Drugs and Poisons*, Royal Society of Chemistry, London, 2005.
- [2] B.E. Erickson, Product Review: electrochemical detectors for liquid chromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 353A–357A.
- [3] L. Liu, Z. Suo, J. Zheng, Simultaneous determination of four compounds in Sanjing Shuanghuanglian Oral Liquid by high performance liquid chromatography-diode array detection-electrochemical detection, *Chin. J. Chromatogr.* 24 (2006) 247–250.
- [4] A. Sánchez-Ortega, M.C. Sampedro, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 70–76.
- [5] M. Dias, P. Hudhomme, E. Levillain, L. Perrin, Y. Sahin, F.X. Sauvage, C. Wartelle, Electrochemistry coupled to fluorescence spectroscopy: a new versatile approach, *Electrochem. Comm.* 6 (2004) 325–330.
- [6] M. Voicescu, D. Rother, F. Bardischewsky, C.G. Friedrich, P. Hellwig, A combined fluorescence spectroscopic and electrochemical approach for the study of thioredoxins, *Biochemistry* 50 (2011) 17–24.
- [7] H. Simon, D. Melles, S. Jacquilleot, P. Sanderson, R. Zazzeroni, U. Karst, Combination of electrochemistry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for metabolism studies, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8777–8782.
- [8] P.H. Gamache, D.F. Meyer, M.C. Granger, I.N. Acworth, Online electrochemical-IC-MS techniques for profiling and characterizing metabolites and degradants, in: R. Ramanathan (Ed.), *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009, pp. 275–293.
- [9] W. Lohmann, U. Karst, Electrochemistry meets enzymes: instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of tor-emifene, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1341–1348.
- [10] H. Faber, M. Vogel, U. Karst, Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies—a review, *Anal. Chim. Acta* 834 (2014) 9–21.
- [11] T. Hoffmann, D. Hofmann, E. Klumpp, S. Küppers, Electrochemistry-mass spectrometry for mechanistic studies and simulation of oxidation processes in the environment, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 1859–1868.
- [12] S. Jahn, U. Karst, Electrochemistry coupled to (liquid chromatography) mass spectrometry—current state and future perspectives, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 16–49.
- [13] H.P. Permentier, A.P. Bruins, R. Bischoff, Electrochemistry-mass spectrometry in drug metabolism and protein research, *Mini Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 46–56.
- [14] G.J. Van Berkel, K.G. Asano, M.C. Granger, Controlling analyte electrochemistry in an electrospray ion source with a three-electrode emitter cell, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1493–1499.
- [15] V. Kertesz, G.J. Van Berkel, Expanded use of a battery-powered two-electrode emitter cell for electrospray mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 953–961.
- [16] C. Zettersten, R. Lomoth, L. Hammarström, P.J.R. Sjöberg, L. Nyholm, The influence of the thin-layer flow cell design on the mass spectra when coupling electrochemistry to electrospray ionisation mass spectrometry, *J. Electroanal. Chem.* 590 (2006) 90–99.
- [17] S. Liu, W.J. Griffiths, J. Sjoevall, On-column electrochemical reactions accompanying the electrospray process, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1022–1030.
- [18] A. Baumann, W. Lohmann, B. Schubert, H. Oberacher, U. Karst, Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to *in vivo* and *in vitro* methods, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3192–3198.
- [19] U. Jurva, *Electrochemistry On-line with Mass Spectrometry: Instrumental Methods for *in Vitro* Generation and Detection of Drug Metabolites*, Dissertation, University of Groningen, 2004.
- [20] H. Faber, H. Lutze, P.L. Lareo, L. Frensemeier, M. Vogel, T.C. Schmidt, U. Karst, Liquid chromatography/mass spectrometry to study oxidative degradation of environmentally relevant pharmaceuticals by electrochemistry and ozonation, *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 152–159.
- [21] H. Oberacher, F. Pittler, R. Erb, S. Plattner, Mass spectrometric methods for monitoring redox processes in electrochemical cells, *Mass Spectrom. Rev.* 34 (2015) 64–92.
- [22] J. Roeser, *Electrochemical Oxidation and Cleavage Peptides in Bioanalysis. Mechanistic Aspects & Method Development*, Dissertation, University of Groningen, 2013.
- [23] A. Kraj, H.J. Brouwer, N. Reinhoud, J.P. Chervet, A novel electrochemical method for efficient reduction of disulfide bonds in peptides and proteins prior to MS detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9311–9320.
- [24] S. Nicolardi, M. Giera, P. Kooijman, A. Kraj, J.P. Chervet, A.M. Deelder, Y.E.M. Van der Burgt, On-line electrochemical reduction of disulfide bonds: improved FTICR-CID and -ETD coverage of oxytocin and hepcidin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 1980–1987.
- [25] J. Roeser, N.F.A. Alting, H.P. Permentier, A.P. Bruins, R. Bischoff, Boron-doped diamond electrodes for the electrochemical oxidation and cleavage of peptides, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6626–6632.
- [26] J. Roeser, H.P. Permentier, A.P. Bruins, R. Bischoff, Electrochemical oxidation and cleavage of tyrosine- and tryptophan-containing tripeptides, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7556–7565.
- [27] H.P. Permentier, U. Jurva, B. Barroso, A.P. Bruins, Electrochemical oxidation and cleavage of peptides analyzed with on-line mass spectrometric detection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1585–1592.
- [28] D.J. Walton, C.J. Campbell, P.G. Richards, J. Heptinstall, Electrooxidative nitration of phenols at copper electrodes, *Electrochim. Acta* 42 (1997) 3499–3507.
- [29] G. Kendall, H.J. Cooper, J. Heptinstall, P.J. Derrick, D.J. Walton, L.R. Peterson, Specific electrochemical nitration of horse heart Myoglobin, *Arch. Biochem. Biophys.* 392 (2001) 169–179.
- [30] H.P. Permentier, A.P. Bruins, Electrochemical oxidation and cleavage of proteins with on-line mass spectrometric detection: development of an instrumental alternative to enzymatic protein digestion, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1707–1716.
- [31] C. Roussel, L. Dayon, N. Lion, T.C. Rohner, J. Jossierand, J.S. Rossier, H. Jensen, H.H. Girault, Generation of mass tags by the inherent electrochemistry of electrospray for protein mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1767–1779.
- [32] T.C. Rohner, J.S. Rossier, H.H. Girault, On-line electrochemical tagging of cysteines in proteins during nanospray, *Electrochem. Comm.* 4 (2002) 695–700.
- [33] C. Roussel, L. Dayon, H. Jensen, H.H. Girault, On-line cysteine modification for protein analysis: new probes for electrochemical tagging nanospray mass spectrometry, *J. Electroanal. Chem.* 570 (2004) 187–199.
- [34] L. Dayon, C. Roussel, M. Prudent, N. Lion, H.H. Girault, On-line counting of cysteine residues in peptides during electrospray ionization by electro-generated tags and their application to protein identification, *Electrophoresis* 26 (2005) 238–247.
- [35] L. Dayon, C. Roussel, H.H. Girault, Probing cysteine reactivity in proteins by mass spectrometric EC-tagging, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 793–800.
- [36] K.A. Johnson, B.A. Shira, J.L. Anderson, I.J. Amster, Chemical and on-line electrochemical reduction of metalloproteins with high-resolution electrospray ionization mass spectrometry detection, *Anal. Chem.* 73 (2001) 803–808.
- [37] S. Myslinska, R. Salbo, M. Ploug, T.J.D. Jørgensen, Electrochemical reduction of disulfide-containing proteins for hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2013) 340–345.
- [38] R. Scholz, P. Palatzky, F.M. Matysik, Simulation of oxidative stress of guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine by electrochemically assisted injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 687–694.
- [39] P.H. Gamache, D.F. Meyer, M.C. Granger, I.N. Acworth, Metabolomic applications of electrochemistry/Mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1717–1726.
- [40] U. Jurva, H.V. Vikström, L. Weidolf, A.P. Bruins, Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 800–810.
- [41] S. Jahn, S. Beuck, I. Möller, M. Thevis, U. Karst, Using electrochemistry for metabolite simulation and synthesis in preventive doping research: application to the Rycal S107 and the PPAR δ -agonist GW1516, *Anal. Methods* 5 (2013) 1214–1224.
- [42] M. Karady, O. Novák, A. Horna, M. Strnad, K. Doležal, High performance liquid chromatography-electrochemistry-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/EC/ESI-MS) for detection and characterization of roscovitine oxidation products, *Electroanalysis* 23 (2011) 2898–2905.
- [43] U.M. Zanger, Introduction to drug metabolism, in: P. Anzenbacher, U.M. Zanger (Eds.), *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 287–289.
- [44] Z. Knežlik, J. Káš, T. Ruml, Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chem. Listy* 94 (2000) 913–918.
- [45] P. Anzenbacher, E. Anzenbacherová, Drug-metabolizing enzymes – an overview, in: P. Anzenbacher, U.M. Zanger (Eds.), *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 3–7.
- [46] M. Stiborova, Environmental pollutants, in: P. Anzenbacher, U.M. Zanger (Eds.), *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 639–641.
- [47] F.P. Guengerich, Cytochromes P450, in: P. Anzenbacher, U.M. Zanger (Eds.), *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 27–28, 47.
- [48] J. Brent, K. McMartin, S. Philipps, C. Aaron, K. Kulig, Fomepizole for the treatment of methanol poisoning, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 424–429.
- [49] T. Omura, R. Sato, A new cytochrome in liver microsomes, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1375–1376.
- [50] W. Lohmann, U. Karst, Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 79–96.
- [51] E.F.A. Brandon, C.D. Raap, I. Meijerman, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicol Appl. Pharmacol.* 189 (2003) 233–246.
- [52] O. Pelkonen, M. Turpeinen, J. Uusitalo, A. Rautio, H. Raunio, Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of *in vitro* investigations, *Basic*

- Clin. Pharmacol. Toxicol. 96 (2005) 167–175.
- [53] N. Plant, Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism, *Drug Discov. Today* 9 (2004) 328–336.
- [54] S.A. Kulkarni, J. Zhu, S. Blechinger, *In silico* techniques for the study and prediction of xenobiotic metabolism: a review, *Xenobiotica* 25 (2005) 955–973.
- [55] V.K. Gombar, J.J. Alberts, K.C. Cassidy, B.E. Mattioni, M.A. Mohutsky, *In silico* metabolism studies in drug discovery: prediction of metabolic stability, *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* 2 (2006) 177–188.
- [56] J. Kirchmair, M.J. Williamson, J.D. Tyzack, L. Tan, P.J. Bond, A. Bender, R.C. Glen, Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms, *J. Chem. Inf. Model* 52 (2012) 617–648.
- [57] J. Bernadou, B. Meunier, Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs, *Adv. Synth. Catal.* 346 (2004) 171–184.
- [58] M.C. Feiters, A.E. Rowan, R.J.M. Nolte, From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics, *Chem. Soc. Rev.* 29 (2000) 375–384.
- [59] D. Mansuy, A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis, *CR Chim.* 10 (2007) 392–413.
- [60] H.J.H. Fenton, Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc.* 65 (1894) 899–910.
- [61] T. Johansson, L. Weidolf, U. Jurva, Mimicry of phase I drug metabolism—novel methods for metabolite characterization and synthesis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2323–2331.
- [62] M. Ruokolainen, T. Gul, H. Permentier, T. Sikanen, R. Kostianen, T. Kotiaho, Comparison of TiO₂ photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction and direct electrochemistry for simulation of phase I metabolism reactions of drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 83 (2016) 36–44.
- [63] S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski, The Fenton reagents, *Free Radic. Biol. Med.* 15 (1993) 435–445.
- [64] P. Nowak, M. Wozniakiewicz, P. Koscielniak, Simulation of drug metabolism, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 42–49.
- [65] M. Kato, D. Nguyen, M. Gonzalez, A. Cortez, S.E. Mullen, L.E. Cheruzel, Region- and stereoselective hydroxylation of 10-undecenoic acid with a light-driven P450 BM3 biocatalyst yielding a valuable synthon for natural product synthesis, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 5687–5691.
- [66] N.H. Tran, D. Nguyen, S. Dwaraknath, S. Mahadevan, G. Chavez, A. Nguyen, T. Dao, S. Mullen, T.A. Nguyen, L.E. Cheruzel, An efficient light-driven P450 BM3 biocatalyst, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 14484–14487.
- [67] K. Jensen, P.E. Jensen, B.L. Moller, Light-driven cytochrome p450 hydroxylations, *ACS Chem. Biol.* 6 (2011) 533–539.
- [68] E. Schneider, D.S. Clark, Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 39 (2013) 1–13.
- [69] S. Krishnan, J.B. Schenkman, J.F. Rusling, Bioelectronic delivery of electrons to cytochrome P450 enzymes, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 8371–8380.
- [70] W. Lohmann, R. Dötzer, G. Gütter, S.M. Van Leeuwen, U. Karst, On-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry for the simulation of pesticide metabolism, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 138–145.
- [71] M. Cindric, F.M. Matysik, Coupling electrochemistry to capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 70 (2015) 122–127.
- [72] T. Shono, T. Toda, N. Oshino, Preparation of *N*-dealkylated drug metabolites by electrochemical simulation of biotransformation, *Drug Metab. Dispos.* 9 (1981) 481–482.
- [73] S. Bruckenstein, R.R. Gadde, Use of a porous electrode for *in situ* mass spectrometric determination of volatile electrode reaction products, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 793–794.
- [74] U. Jurva, H.V. Wikström, A.P. Bruins, *In vitro* mimicry of metabolic oxidation reactions by electrochemistry/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 529–533.
- [75] T.A. Getek, T.A. McRae, J.A. Hinson, Utility of solution electrochemistry mass spectrometry for investigation the formation and detection of biologically important conjugates of acetaminophen, *J. Chromatogr. A* 474 (1989) 245–256.
- [76] K.J. Volk, R.A. Yost, A. Brajter-Toth, Electrochemistry on line with mass spectrometry. Insight into biological redox reactions, *Anal. Chem.* 64 (1992) 21A–33A.
- [77] P. Liu, Q. Zheng, H.D. Dewald, R. Zhou, H. Chen, The study of electrochemistry with ambient mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 70 (2015) 20–30.
- [78] R. Zabel, G. Weber, Comparative study of the oxidation behavior of sulfur-containing amino acids and glutathione by electrochemistry-mass spectrometry in the presence and absence of cisplatin, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 1237–1247.
- [79] F.M. Matysik, Electrochemically assisted injection – a new approach for hyphenation of electrochemistry with capillary-based separation systems, *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 1021–1024.
- [80] K.J. Volk, R.A. Yost, A. Brajter-Toth, On-line mass spectrometric investigation of the peroxidase-catalysed oxidation of uric acid, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (1990) 205–215.
- [81] S.M. Van Leeuwen, B. Blankert, J.M. Kauffmann, U. Karst, Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 742–750.
- [82] W. Lohmann, U. Karst, Generation and identification of reactive metabolites by electrochemistry and immobilized enzymes coupled on-line to liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6831–6839.
- [83] A. Baumann, A. Faust, M.P. Law, M.T. Kuhlmann, K. Kopka, M. Schäfers, U. Karst, Metabolite identification of a radiotracer by electrochemistry coupled to liquid chromatography with mass spectrometric and radioactivity detection, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5415–5421.
- [84] A. Baumann, W. Lohmann, T. Rose, K.C. Ahn, B.D. Hammock, U. Karst, N.H. Schebb, Electrochemistry-mass spectrometry unveils the formation of reactive triclofocarban metabolites, *Drug Metab. Dispos.* 38 (2010) 2130–2138.
- [85] S. Jahn, A. Baumann, J. Roscher, K. Hense, R. Zazzaroni, U. Karst, Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry—A comparative study with liver cell microsomes, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9210–9220.
- [86] E. Nouri-Nigjeh, H.P. Permentier, R. Bischoff, A.P. Bruins, Electrochemical oxidation by square-wave potential pulses in the imitation of oxidative drug metabolism, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5519–5525.
- [87] E. Nouri-Nigjeh, A.P. Bruins, R. Bischoff, H.P. Permentier, Electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide on a platinum electrode in the imitation of oxidative drug metabolism of lidocaine, *Analyst* 137 (2012) 4698–4702.
- [88] M. Odiijk, A. Baumann, W. Olthuis, A. van den Berg, U. Karst, Electrochemistry-on-chip for on-line conversions in drug metabolism studies, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1521–1527.
- [89] M. Odiijk, W. Olthuis, A. van den Berg, L. Qiao, H. Girault, Improved conversion rates in drug screening applications using miniaturized electrochemical cells with frit channels, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9176–9183.
- [90] F.T.G. Van den Brink, L. Blüter, M. Odiijk, W. Olthuis, U. Karst, A. van den Berg, Mass spectrometric detection of short-lived drug metabolites generated in an electrochemical microfluidic chip, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1527–1535.
- [91] U. Jurva, H.V. Wikström, A.P. Bruins, Electrochemically assisted Fenton reaction: reaction of hydroxyl radicals with xenobiotics followed by on-line analysis with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1934–1940.
- [92] S.A. Özkan, LC with electrochemical detection. Recent application to pharmaceuticals and biological fluids, *Chromatographia* 66 (2007) 3–13.
- [93] C.F. Bökman, C. Zettersten, P.J.R. Sjöberg, L. Nyholm, A setup for the coupling of a thin-layer electrochemical flow cell to electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2017–2024.
- [94] T. Gul, R. Bischoff, H.P. Permentier, Electrosynthesis methods and approaches for the preparative production of metabolites from parent drugs, *Trends Anal. Chem.* 70 (2015) 58–66.
- [95] M.C. Santamaría, M.M. Barambio, A.S. Arribas, HPLC techniques with electrochemical detection, in: A. Escarpa, M.C. González, M.Á. López (Eds.), *Agricultural and Food Electroanalysis*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2015, pp. 77–81.
- [96] W. Lohmann, A. Baumann, U. Karst, Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: tools, technologies, and trends, *LCGC Eur.* 13 (2010) 6–12.
- [97] Antec, Design of electrochemical cells, Accessible from: <https://www.myantec.com/>, accessed April 2016.
- [98] J.S. Fritz, D.T. Gjerde, Ion Chromatography, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2009, p. 96.
- [99] G. Hambitzer, J. Heitbaum, Electrochemical themospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1067–1070.
- [100] A.L. Yergey, C.G. Edmonds, I.A.S. Lewis, M.L. Vestal, *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Techniques and Applications*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [101] Y. Cai, Q. Zheng, Y. Liu, R. Helmy, J.A. Loo, H. Chen, Integration of electrochemistry with ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* 21 (2015) 341–351.
- [102] G.J. Van Berkel, F. Zhou, Characterization of an electrospray ion source as a controlled-current electrolytic cell, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2916–2923.
- [103] K.A. Schug, Solution phase enantioselective recognition and discrimination by electrospray ionization – mass spectrometry: state-of-the-art, methods, and an eye towards increased throughput measurements, *Comb. Chem. High. Throughput Screen* 10 (2007) 301–316.
- [104] P. Palatzky, *Electrochemically Assisted Injection for Capillary Electrophoresis Time-of-flight Mass Spectrometry: Novel Instrumental and Methodical Developments*, Dissertation, University of Regensburg, 2013.
- [105] G. Hambitzer, J. Heitbaum, I. Stassen, Electrochemical themospray mass spectrometry: anodic oxidations of *N,N*-dialkylanilines, *J. Electroanal. Chem.* 447 (1998) 117–124.
- [106] G. Hambitzer, J. Heitbaum, I. Stassen, Electrochemical themospray mass spectrometry instrumentation for coupling electrochemistry to mass spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 838–842.
- [107] K.J. Volk, R.A. Yost, A. Brajter-Toth, Characterization of solution-phase and gas-phase reactions in on-line electrochemistry—themospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 474 (1989) 231–243.
- [108] F. Zhou, G.J. Van Berkel, Electrochemistry combined on-line with electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3643–3649.
- [109] J.R. Pretry, G.J. Van Berkel, Electrochemical sample pretreatment coupled on-line with electrospray mass spectrometry for enhanced elemental analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 1644–1652.
- [110] H. Deng, G.J. Van Berkel, Electrochemical polymerization of aniline investigated using on-line electrochemistry/electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4284–4293.

- [111] H. Deng, G.J. Van Berkel, Thin-layer electrochemical flow cell coupled on-line with electrospray-mass spectrometry for the study of biological redox reactions, *Electroanalysis* 11 (1999) 857–865.
- [112] J.R. Pretty, H. Deng, D.E. Goeringer, G.J. Van Berkel, Electrochemically modulated preconcentration and matrix elimination for organic analytes coupled on-line with electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2066–2074.
- [113] G.J. Van Berkel, F. Zhou, Electrospray as a controlled-current electrolytic cell: electrochemical ionization of neutral analytes for detection by electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3958–3964.
- [114] J.F. Mora, G.J. Van Berkel, C.G. Enke, R.B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J.B. Fenn, Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 939–952.
- [115] H. Girault, B. Liu, L. Qiao, H. Bi, M. Prudent, N. Lion, M. Abonnenc, Electrochemical reactions and ionization processes, *Eur. J. Mass Spectrom.* 16 (2010) 341–349.
- [116] S. Liu, W.J. Griffiths, J. Sjoval, On-column electrochemical reactions accompanying the electrospray process, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1022–1030.
- [117] R.A. Ochran, L. Koerner, Effects of ground loop currents on signal intensities in electrospray mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1748–1754.
- [118] G.J. Van Berkel, V. Kertesz, Expanded electrochemical capabilities of the electrospray ion source using porous flow-through electrodes as the upstream ground and emitter high-voltage contact, *Anal. Chem.* 77 (2005) 8041–8049.
- [119] C. Zettersten, On-line Electrochemistry Electrospray Ionisation Mass Spectrometry, Dissertation, University of Uppsala, 2009.
- [120] W.D. Looi, B. Brown, L. Chamand, A. Brajter-Toth, Merits of online electrochemistry liquid sample desorption electrospray ionization mass spectrometry (EC/LS DESI MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2227–2238.
- [121] T.A. Brown, H. Chen, R.N. Zare, Identification of fleeting electrochemical reaction intermediates using desorption electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 7274–7277.
- [122] H. Chen, G. Gamez, R. Zenobi, What can we learn from ambient ionization techniques? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1947–1963.
- [123] R.D. Smith, D.R. Goodlet, J.H. Wahl, Capillary electrophoresis – mass spectrometry, in: J.P. Landers (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 185–206.
- [124] M. Cindric, F.M. Matysik, Hyphenation of electrochemistry with mass spectrometry for bioanalytical studies, in: F.M. Matysik (Ed.), *Advances in Chemical Bioanalysis*, Springer, Heidelberg, 2014, pp. 237–260.
- [125] R.D. Smith, C.J. Barinaga, H.R. Udseth, Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948–1952.
- [126] J. Mark, R. Scholz, F.M. Matysik, Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 45–64.
- [127] R. Scholz, F.M. Matysik, A novel approach for the separation of neutral analytes by means of electrochemically assisted injection coupled to capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Analyst* 136 (2011) 1562–1565.
- [128] P. Palatzky, A. Zöpfl, T. Hirsch, F.M. Matysik, Electrochemically assisted injection in combination with capillary electrophoresis-mass spectrometry (EAI-CE-MS)—Mechanistic and quantitative studies of the reduction of 4-nitrotoleune at various carbon-based screen-printed electrodes, *Electroanalysis* 25 (2013) 117–122.
- [129] P. Palatzky, F.M. Matysik, Development and characterization of a novel semiautomated arrangement for electrochemically assisted injection in combination with capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry, *Electrophoresis* 33 (2012) 2689–2694.
- [130] P. Palatzky, F.M. Matysik, Development of capillary-based SECM probes for the characterization of cell arrangements for electrochemically assisted injection, *Electroanalysis* 23 (2011) 50–54.
- [131] K.J. Volk, R.A. Yost, A. Brajter-Toth, On-line mass spectrometric insights into electrochemical reactions: oxidation of thiopurines, *J. Electrochem. Soc.* 137 (1990) 1764–1771.
- [132] H. Iwahashi, T. Ishii, Detection of the oxidative products of 3-hydroxykynurenine using high-performance liquid chromatography–electrochemical detection–ultraviolet absorption detection–electron spin resonance spectrometry and high-performance liquid chromatography–electrochemical detection–ultraviolet absorption detection–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 23–31.
- [133] H. Iwahashi, 3-Hydroxyanthranilic acid-derived compounds formed through electrochemical oxidation, *J. Chromatogr. B* 736 (1999) 237–245.
- [134] G. Diehl, A. Liesener, U. Karst, Liquid chromatography with post-column electrochemical treatment and mass spectrometric detection of non-polar compounds, *Analyst* 126 (2001) 288–290.
- [135] K. Tahara, E. Makii, S. Iijima, Y. Abe, M. Mochizuki, On-line liquid chromatography and circular dichroism detection of stereo-isomers of α -tocopherol derivatives generated by an electrochemical reaction, *Anal. Sci.* 24 (2008) 935–938.
- [136] W. Lohmann, H. Hayen, U. Karst, Covalent protein modification by reactive drug metabolites using online electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9714–9719.
- [137] D. Falck, J.S.B. de Vlieger, M. Giera, M. Honing, H. Irth, W.M.A. Niessen, J. Kool, On-line electrochemistry–bioaffinity screening with parallel HR-LC-MS for the generation and characterization of modified p38 α kinase inhibitors, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 367–375.
- [138] U. Bussy, U. Jurva, R. Boisseau, M. Andresen-Bergström, V. Silvestre, N. Galland, D. Jacquemin, M. Boujita, Unexpected benzimidazole ring formation from a quinoneimide species in the presence of ammonium acetate as supporting electrolyte used in the coupling of electrochemistry with mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 456–460.
- [139] U. Bussy, Y.W. Chung-Davidson, K. Li, W. Li, A quantitative assay for reductive metabolism of a pesticide in fish using electrochemistry coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 4450–4457.
- [140] L. Switzar, S. Nicolardi, J.W. Rutten, S.A.J. Lesnik Oberstein, A. Aartsma-Rus, Y.E.M. van der Burgt, In-depth characterization of protein disulfide bonds by online liquid chromatography–electrochemistry–mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 50–58.
- [141] L. Bütter, L.M. Frensemeier, M. Vogel, U. Karst, Dual reductive/oxidative electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry: towards peptide and protein modification, separation and identification, *J. Chromatogr. A* 1479 (2017) 153–160.
- [142] L.M. Frensemeier, L. Bütter, M. Vogel, U. Karst, Investigation of the oxidative transformation of roxarsone by electrochemistry coupled to hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 153–161.
- [143] V. Kertesz, G.J. Van Berkel, M.C. Granger, Study and application of a controlled-potential Electrochemistry–Electrospray emitter for electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4366–4373.
- [144] E. Peintler-Krivan, G.J. Van Berkel, V. Kertesz, Minimizing analyte electrolysis in electrospray ionization mass spectrometry using a redox buffer coated emitter electrode, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1327–1334.
- [145] N.A. Mautjana, J. Estes, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth, Antioxidant pathways and one-electron oxidation of dopamine and cysteine in electrospray and on-line electrochemistry electrospray ionization mass spectrometry, *Electroanalysis* 20 (2008) 1959–1967.
- [146] N.A. Mautjana, J. Estes, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth, One-electron oxidation and sensitivity of uric acid in on-line electrochemistry and in electrospray ionization mass spectrometry, *Electroanalysis* 20 (2008) 2501–2508.
- [147] N.A. Mautjana, D.W. Looi, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth, Sensitivity of positive ion mode electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) in the analysis of purine bases in ESI MS and on-line electrochemistry ESI MS (EC/ESI MS), *Electrochim. Acta* 55 (2009) 52–58.
- [148] N.A. Mautjana, D.W. Looi, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth, Sensitivity of positive ion mode electrospray ionization mass spectrometry in the analysis of thiol metabolites, *Electroanalysis* 22 (2010) 79–89.
- [149] D.W. Looi, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth, Electrochemistry–electrospray ionization FT ICR mass spectrometry (EC ESI MS) of guanine–tyrosine and guanine–glutathione crosslinks formed on-line, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 2633–2640.
- [150] M. Prudent, C. Roussel, H.H. Girault, Electrochemical generation of Cu (I) complexes in aqueous solutions studied by on-line mass spectrometry, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2067–2074.
- [151] M. Prudent, H.H. Girault, On-line electrogeneration of copper–peptide complexes in microspray mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 560–568.
- [152] M. Prudent, J.S. Rossier, N. Lion, H.H. Girault, Microfabricated dual sprayer for on-line mass tagging of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2531–2538.
- [153] M. Prudent, H.H. Girault, The role of copper in cysteine oxidation: study of intra- and inter-molecular reactions in mass spectrometry, *Metalomics* 1 (2009) 157–165.
- [154] J. Lloyd, S. Hess, Peptide fragmentation by corona discharge induced electrochemical ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (2010) 2051–2061.
- [155] G. Van Berkel, V. Kertesz, Using the electrochemistry of the electrospray ion source, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5510–5520.
- [156] M. Abonnenc, L. Qiao, B. Liu, H.H. Girault, Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 3 (2010) 231–254.
- [157] S. Plattner, R. Erb, J.P. Chervet, H. Oberacher, Studying the reducing potencies of antioxidants with the electrochemistry inherently present in electrospray ionization-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 213–224.
- [158] F.T.G. Van den Brink, W. Olthuis, A. van den Berg, M. Odijk, Miniaturization of electrochemical cells for mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 70 (2015) 40–49.
- [159] L. Nyholm, Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications, *Analyst* 130 (2005) 599–605.
- [160] G. Liljegren, A. Dahlin, C. Zettersten, J. Bergquist, L. Nyholm, On-line coupling of a microelectrode array equipped poly(dimethylsiloxane) microchip with an integrated graphite electrospray emitter for electrospray ionisation mass spectrometry, *Lab. Chip* 5 (2005) 1008–1016.
- [161] G. Liljegren, N. Forsgard, C. Zettersten, J. Pettersson, M. Svedberg, M. Herranen, L. Nyholm, On-line electrochemically controlled solid-phase extraction interfaced to electrospray and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analyst* 130 (2005) 1358–1368.
- [162] M. Odijk, A. Baumann, W. Lohmann, F.T.G. van den Brink, W. Olthuis, U. Karst, A. van den Berg, A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies, *Lab. Chip* 9 (2009) 1687–1693.

- [163] F.T.G. van den Brink, T. Zhang, L. Ma, J. Bomer, M. Odiijk, W. Olthuis, H.P. Permentier, R. Bischoff, A. van den Berg, Electrochemical protein cleavage in a microfluidic cell with integrated boron doped diamond electrodes, *Anal. Chem.* 88 (2016) 9190–9198.
- [164] K. Chipiso, R.H. Simoyi, Electrochemistry-coupled to mass spectrometry in simulation of metabolic oxidation of methimazole: identification and characterization of metabolites, *J. Electroanal. Chem.* 761 (2016) 131–140.
- [165] M. Szultka-Mlynska, B. Buszewski, Electrochemistry-mass spectrometry for *in-vitro* determination of selected chemotherapeutics and their electrochemical products in comparison to *in-vivo* approach, *Talanta* 160 (2016) 694–703.
- [166] Y. Cai, P. Liu, M.A. Held, H.D. Dewald, H. Chen, Coupling electrochemistry with probe electrospray ionization mass spectrometry, *ChemPhysChem* 17 (2016) 1104–1108.
- [167] Q. Zheng, H. Zhang, S. Wu, H. Chen, Probing protein 3D structures and conformational changes using electrochemistry-assisted isotope labeling cross-linking mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 864–875.
- [168] T.A. Brown, Dissertation, Coupling Electrochemistry and Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry to Observe Transient Electrochemical Intermediates, Stanford University, 2016.
- [169] M. Gndric, M. Vojis, F.M. Matysik, Characterization of the oxidative behavior of cyclic nucleotides using electrochemistry–mass spectrometry, *Electroanalysis* 27 (2015) 234–241.
- [170] J. Roscher, H. Faber, M. Stoffels, O. Hachmüller, J. Happe, U. Karst, Nonaqueous capillary electrophoresis as separation technique to support metabolism studies by means of electrochemistry and mass spectrometry, *Electrophoresis* 35 (2014) 2386–2391.
- [171] S. Torres, R. Brown, R. Szucs, J.M. Hawkins, G. Scrivens, A. Pettman, D. Kraus, M.R. Taylor, Rapid synthesis of pharmaceutical oxidation products using electrochemistry: a systematic study of N-Dealkylation reactions of fesoterodine using a commercially available synthesis cell, *Org. Process Res. Dev.* 19 (2015) 1596–1603.
- [172] G. Diehl, U. Karst, On-line electrochemistry–MS and related techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 390–398.
- [173] Research Group of Prof. Dr. Uwe Karst: ElCheMS, 5th International Workshop on Electrochemistry/Mass Spectrometry, Sponsored by Antec Sci., 2017. Accessible from: <https://www.uni-muenster.de/Chemie.ac/karst/elchems.html> (accessed April 2017).
- [174] D.W. Looi, I. Iftikhar, A. Brajter-Toth, Electrochemical attributes of electrochemistry in tandem with electrospray mass spectrometry, *Electroanalysis* 26 (2014) 319–327.
- [175] M. Smoluch, P. Mielczarek, E. Reszke, G.M. Hieftje, J. Silberring, Determination of psychostimulants and their metabolites by electrochemistry linked on-line to flowing atmospheric pressure afterglow mass spectrometry, *Analyst* 139 (2014) 4350–4355.
- [176] S. Nicolardi, A.M. Deelder, M. Palmblad, Y.E. van der Burgt, Structural analysis of an intact monoclonal antibody by online electrochemical reduction of disulfide bonds and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5376–5382.
- [177] M. Lu, Y. Liu, R. Helmy, G.E. Martin, H.D. Dewald, H. Chen, Online investigation of aqueous-phase electrochemical reactions by desorption electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 1676–1685.
- [178] E. Trajberg, R.U. Jakobsen, S. Myslign, S. Christensen, T.J. Jørgensen, K.D. Rand, Conformational analysis of large and highly disulfide-stabilized proteins by integrating online electrochemical reduction into an optimized H/D exchange mass spectrometry workflow, *Anal. Chem.* 87 (2015) 8880–8888.
- [179] J. Janklová, Dytrová, M. Jankl, T. Navrátil, J. Cvačka, O. Pačes, An electrochemical device generating metal ion adducts of organic compounds for electrospray mass spectrometry, *Electrochim. Acta* 211 (2016) 787–793.
- [180] H. Cheng, X. Yan, R.N. Zare, Two new devices for identifying electrochemical reaction intermediates with desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3191–3198.
- [181] S.J. Liu, Z.W. Yu, L. Qiao, B.H. Liu, Electrochemistry-mass spectrometry for mechanism study of oxygen reduction at water/oil interface, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–8.
- [182] U. Bussy, Y.W. Chung-Davidson, K. Li, W. Li, Phase I and phase II reductive metabolism simulation of nitro aromatic xenobiotics with electrochemistry coupled with high resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7253–7260.
- [183] P. Kučerová, J. Skopalová, L. Kučera, J. Hrbáč, K. Lemr, Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochim. Acta* 159 (2015) 131–139.
- [184] L.F. Guido, D.O. Carvalho, J. Táborský, J. Skopalová, H.M. Saldanha, P. Bednář, Study of electrochemical oxidation of xanthohumol by ultra-performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry and ion mobility mass spectrometry, *Chromatographia* 78 (2015) 1233–1243.
- [185] P. Mielczarek, M. Smoluch, J.H. Kotlinska, K. Labuz, T. Gotszalk, M. Babij, P. Suder, J. Silberring, Electrochemical generation of selegiline metabolites coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1389 (2015) 96–103.
- [186] P. Kučerová, J. Skopalová, L. Kučera, J. Táborský, H. Švecová, K. Lemr, P. Cankar, P. Barták, Electrochemical oxidation of 5-hydroxymethyl tolterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochim. Acta* 215 (2016) 617–625.
- [187] E.F. Newair, R. Abdel-Hamid, P.A. Klmartin, Mechanism of chiroic acid electrochemical oxidation and identification of oxidation products by liquid chromatography and mass spectrometry, *Electroanalysis* 29 (2017) 850–860.
- [188] T.F. Mekonnen, U. Panne, M. Koch, Electrochemistry coupled online to liquid chromatography-mass spectrometry for fast simulation of biotransformation reactions of the insecticide chlorpyrifos, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3359–3368.
- [189] S. Torres, R. Brown, T. Zelesky, G. Scrivens, R. Szucs, J.M. Hawkins, M.R. Taylor, Electrochemical oxidation coupled with liquid chromatography and mass spectrometry to study the oxidative stability of active pharmaceutical ingredients in solution: a comparison of off-line and on-line approaches, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131 (2016) 71–79.



Lenka Portychová received her M.S. from the Department of Analytical Chemistry at the University of Pardubice in 2013. She has been employed in research companies for 5 years. Since 2014, she is a Ph.D. student in the Department of Analytical Chemistry at Palacký University in Olomouc, Czech Republic. Her research has been focused on modern instrumental techniques, diagnostic analysis, and biomarkers.



Kevin A. Schug is Professor and Shimadzu Distinguished Professor of Analytical Chemistry in the Department of Chemistry and Biochemistry at The University of Texas at Arlington in Arlington, Texas USA. He earned his Bachelor's degree in Chemistry from the College of William and Mary in 1998 and his Ph.D. Degree in Chemistry from Virginia Tech in 2002 under the direction of Prof. Harold McNair. He performed post-doctoral research with Prof. Wolfgang Lindner at the University of Vienna in Austria and joined U.T. Arlington in 2005. He and his group use a variety of sample preparation, chromatography, mass spectrometry, and spectroscopy techniques to solve problems in the analysis of complex systems.