

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Alice Šimonová

Využití kapilární elektroforézy při analýze sacharidové složky glykopeptidů

Application of capillary electrophoresis in analysis of saccharide component of
glycopeptides

Diplomová práce

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

Praha 2020

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případně využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11.06.2020

Bc. Alice Šimonová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat hlavně svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a odborné vedení během experimentální části a při sepsování mé diplomové práce. Dále děkuji mé rodině, snoubenci a přátelům za psychickou podporu při studiu.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce byl vývoj metody pro stanovení osmi monosacharidů nejčastěji se vyskytujících v glykoproteinech pomocí kapilární elektroforézy. Konkrétně se jednalo o stanovení glukosy, galaktosy, manosy, *N*-acetylglukosaminu, *N*-acetylgalaktosaminu, fukosy, *N*-acetylneuraminové kyseliny a xylosy. Celková délka křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 10 μm byla 50,0 cm a efektivní délka 35,0 cm. Základním elektrolytem byla směs hydroxidu sodného o koncentraci 50 mmol/l, hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 22,5 mmol/l a cetyltrimethylamoniumbromidu o koncentraci 0,2 mmol/l. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 70 s, separace probíhala při napětí -30 kV a tlaku 270 kPa vkládaném na výstupní vialku a detekce analytů probíhala pomocí bezkontaktního vodivostního detektoru. Meze detekce se pohybovaly v rozmezí od 5 do 7 mg/l a meze stanovitelnosti od 16 do 22 mg/l. Opakovatelnost ploch píků a jejich migračních časů vztažených na vnitřní standard kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonové poskytla hodnoty relativních směrodatných odchylek menších než 4 %. Nakonec byly určeny vhodné podmínky pro hydrolyzu oligosacharidů na monosacharidy před jejich separací. Hydrolyza probíhala v 4M kyselině chlorovodíkové při 100 °C v blokové lázni, hydrolyza netrvala déle než 10 minut. Ověřením několika kalibračních bodů bylo zjištěno, že kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,4 mol/l ve vzorku dávkovaném do systému nemá vliv na separaci.

Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, monosacharidy, glykopeptidy

Abstract

The aim of this thesis was the development of the method for the determination of eight monosaccharides commonly found in glycoproteins by capillary electrophoresis. Namely, it was determination of glucose, galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine, fucose, *N*-acetylneuraminic acid and xylose. Total length of silica capillary with inner diameter of 10 μm was 50.0 cm and effective length was 35.0 cm. Background electrolyte was compound of sodium hydroxide of 50 mmol/l concentration, disodium phosphate of 22.5 mmol/l concentration and cetyltrimethylammoniumbromide of 0.2 mmol/l concentration. Samples were injected hydrodynamically with pressure of 5 kPa for 70 s, driving voltage was -30 kV and the pressure of 270 kPa was applied to the outlet vial during the separation; capacitively coupled contactless conductivity detector was used to detect the analytes. The limits of detection were between 5 and 7 mg/l and the limits of quantification were between 16 and 22 mg/l. Repeatability of peak areas and migration times related to 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid as an internal standard showed values of relative standard deviation lower than 4 %. Conditions for hydrolysis of oligosaccharides to monosaccharides were determined as 4M hydrochloric acid and 100 $^{\circ}\text{C}$, hydrolysis was no longer than 10 minutes. By re-measuring several calibrations points it was determined that 0,4M hydrochloric acid in sample injected to system does not affect separation.

Key words

Capillary electrophoresis, monosaccharides, glycopeptides

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
1 CÍL PRÁCE	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Sacharidy	12
2.1.1 Stanovení sacharidů	12
2.1.2 Stanovení sacharidů pomocí kapilární elektroforézy	13
2.2 Glykosylace	18
2.2.1 Příklady onemocnění spjatých s glykosylací	19
2.2.2 Bioléčiva	21
2.3 Elektroforetické přístupy v glykoproteomice	22
2.3.1 Analýza intaktního glykoproteinu	23
2.3.2 Analýza glykopeptidů	23
2.3.3 Analýza uvolněných glykanů	24
2.3.4 Analýza monosacharidů	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Použité chemikálie	26
3.2 Přístrojové vybavení	26
3.3 Experimentální podmínky	27

3.4 Výpočty	28
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
4.1 Optimalizace metody	30
4.2 Kalibrace	39
4.3 Opakovatelnost.....	40
4.4 Výtěžnost	43
4.5 Hydrolyza oligosacharidů	43
5 ZÁVĚR	46

Seznam zkratk a symbolů

BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
Fuc	fukosa
Gal	galaktosa
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
Glc	glukosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová kyselina
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPAEC-PAD	vysokoúčinná aniontově-výměnná chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
Man	manosa
Neu5Ac	<i>N</i> -acetylneuraminová kyselina
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v normálním módu (normal phase)

PMP	1-fenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-on
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzním módu (reverse phase)
UV	ultrafialový (ultraviolet)
Xyl	xylosa
A	plocha
A_{rel}	relativní plocha
c	koncentrace
h_s	výška šumu
I	iontová síla
k	směrnice kalibrační přímky
l_c	celková délka kapiláry
l_d	efektivní délka kapiláry
m_{ef}	efektivní mobilita
m_{EOF}	elektroosmotická mobilita
m_{poz}	pozorovaná mobilita
n	počet měření
q	úsek kalibrační přímky
R	výtěžnost
R^2	koeficient determinance
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka

t	T-test
t_{EOF}	migrační čas elektroosmotického toku
t_m	migrační čas
t_{rel}	relativní migrační čas
U	napětí
γ	vodivost

1 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vývoj metody pro separaci a stanovení monosacharidových jednotek glykoproteinů pomocí kapilární elektroforézy. V další části bude optimalizován postup hydrolyzy oligosacharidů před jejich separací.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou přítomné ve všech organizmech na Zemi a mají rozsáhlý biologický význam: jsou zdrojem energie pro živočichy i pro rostliny, tvoří základní stavební strukturu buněčných stěn a podílejí se na struktuře informačních molekul. Ovlivňují konformace, metabolismus a biologickou aktivitu glykolipidů a glykoproteinů, proto je zvýšený zájem o jejich analýzu, ať už se jedná o stanovení monosacharidů či oligosacharidů [1]. Z chemického hlediska jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony a ve své molekule obsahují nejméně tři alifaticky vázané atomy uhlíku. Podle počtu cukerných jednotek se dělí na monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a složené sacharidy. Jednotlivé monosacharidy jsou vzájemně pospojovány glykosidovými (poloacetalovými) vazbami [2]. Rostliny dokáží syntetizovat sacharidy fotosyntézou z oxidu uhličitého a vody, vznikající energii ukládají nejčastěji ve formě škrobu. Všechny ostatní organizmy jsou zcela závislé na příjmu sacharidů potravou, přičemž se vznikající energie (například oxidací glukosy) ukládá ve formě ATP a NADH do buněk [3].

2.1.1 Stanovení sacharidů

Mezi nejčastěji používané metody ke stanovení sacharidů patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapilární elektroforéza (CE) a plynová chromatografie (GC). Sacharidy jsou problematické analyty a každá z uvedených metod má pro jejich analýzu své výhody i nevýhody.

První z možností stanovení sacharidů je kapalinová chromatografie, pro HPLC v reverzním módu (RP-HPLC) jsou sacharidy příliš polární, v systému jsou zadržovány jen velmi slabě a jejich separace je tím pádem prakticky nemožná. Využitím normálního módu HPLC (NP-HPLC) jsou silně polární látky zadržovány příliš dlouho a mezi hlavní nevýhody se řadí škodlivost používaných rozpouštědel pro lidské zdraví i životní prostředí. V neposlední řadě je možné pro vysoce polární látky použít metodu hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC), kde má ovšem matrice vzorku značný vliv na separaci. Kromě problémů se separací je obtížná i detekce sacharidů, které většinou neobsahují chromofory, a proto je nelze citlivě

detekovat přímou UV detekcí [4]. Jako nejvhodnější metoda kapalinové chromatografie se jeví vysokoúčinná aniontově-výměnná chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD), ta má mnohem vyšší citlivost než výše zmíněné metody, například analýzou medu pomocí HPAEC-PAD bylo nalezeno 27 sacharidů [5] a pomocí GC pouze 16 [6].

Mezi další možnosti stanovení se řadí plynová chromatografie, která se nejčastěji používá v kombinaci s hmotnostním spektrometrem či s plamenově ionizačním detektorem. Nevýhodou stanovení sacharidů pomocí GC je ale fakt, že nejsou dosti těkavé a je tak nutné je před separací derivatizovat. Výběr stacionární fáze se řídí druhem derivátu. Metoda se tím stává pracnou a zdlouhavou, derivatizace navíc přináší zvýšené riziko kontaminace vzorku nebo ztráty analytů během procesu [7].

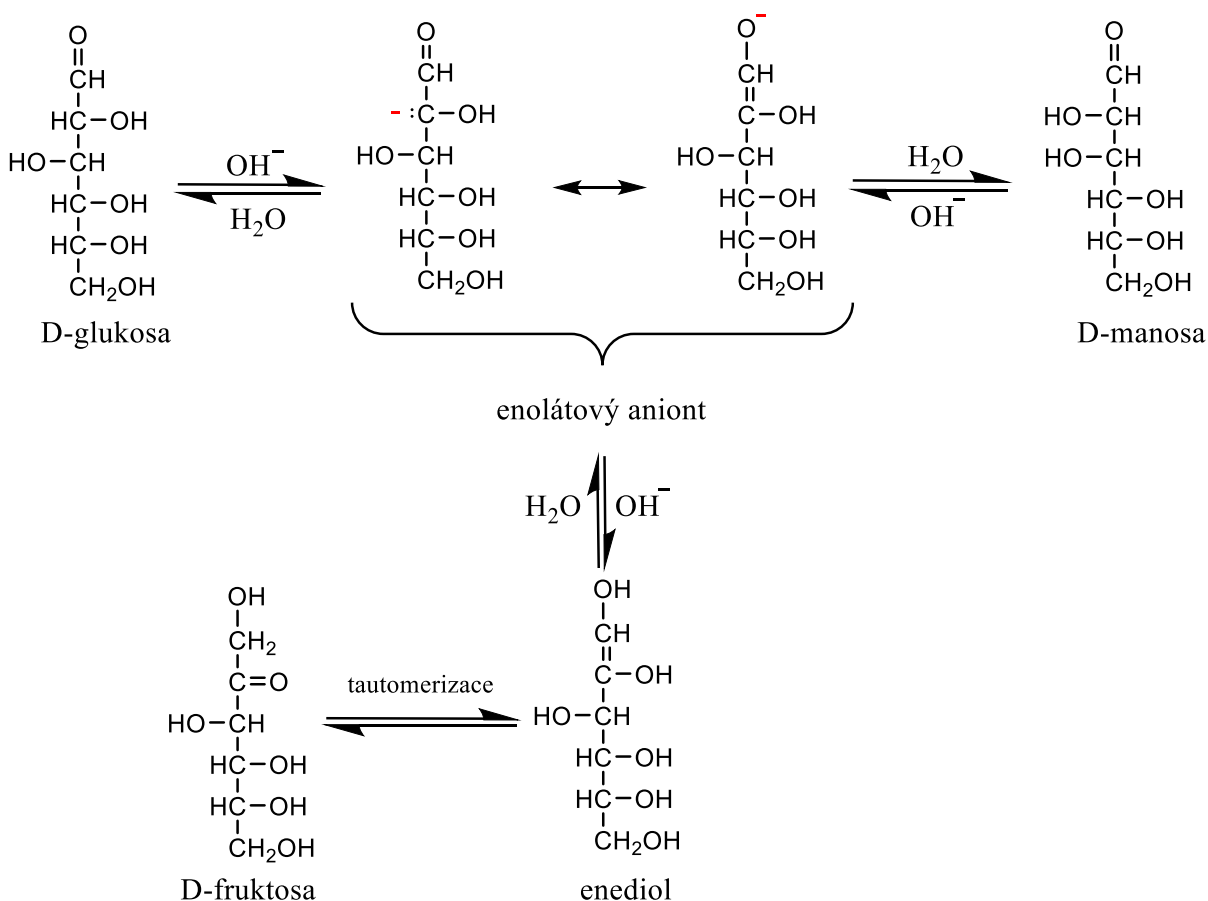
Poslední z možností je kapilární elektroforéza. Většina sacharidů je ovšem v kyselém a neutrálním prostředí nenabitá, a proto je pro jejich ionizaci potřeba pracovat v silně zásaditém prostředí. Jinou možností je derivatizace sacharidů či tvorba komplexů s borátem (detailněji popsáno v následující kapitole).

2.1.2 Stanovení sacharidů pomocí kapilární elektroforézy

V posledních několika letech lze z počtu publikovaných článků pozorovat zvýšený zájem o analýzu sacharidů pomocí CE, dané sacharidy mohou být stanovované jak derivatizované, tak i nederivatizované. Kapilární elektroforéza se pro stanovení sacharidů využívá zejména kvůli několika výhodám, mezi které patří malá spotřeba vzorku a rozpouštědel spjatá s šetrností k životnímu prostředí, použití několika různých druhů detekce, vysoká účinnost separace, a nakonec i krátká doba analýzy [8]. Nejčastějšími typy detekce jsou spektrometrická (absorbance či fluorescence), elektrochemická (potenciometrie, voltametrie či konduktometrie) a hmotnostní detekce [9].

UV detekce

Přímé UV detekce sacharidů se nevyužívá příliš často, protože sacharidy v UV oblasti absorbují jen velmi málo. Jednou z možností je použití vysoce zásaditého pufru, to způsobí kaskádu reakcí (ionizace, mutarotace, enolizace, isomerizace) (Obr. 1) při které vznikne aniont detekovatelný při 270 nm [10]. Jiná možnost je komplexace s borátovým pufrem a následná detekce sacharidů při 195 nm, při této vlnové délce ovšem absorbují všechny látky obsahující aminoskupinu, proto není tato detekce příliš selektivní [11].



Obr. 1 – Kaskáda reakcí dávající vzniknout aniontu detekovatelnému při 270 nm, vytvořeno v ChemDraw, převzato z [12] a upraveno

Nepřímá UV detekce sacharidů se používá, pokud dané analyty neabsorbují v UV oblasti vůbec, nebo jen velmi málo. Do základního elektrolytu (BGE) se přidává aditivum absorbující UV záření, které udržuje konstantní signál pozadí. Přidané aditivum musí mít stejný

náboj jako zkoumaný analyt, protože ten pak kvůli podmínce zachování elektroneutrálnosti vytěsňuje ionty aditiva ze své zóny. Když dosáhne zóna analytu detektoru, dojde k poklesu absorbance, což se projeví záporným píkem v elektroferogramu. Metoda je vhodná především pro neredukující sacharidy, které nelze derivatizovat. Vlnová délka detekce se vybírá na základě přidaného aditiva, kterým může být například kyselina 1,2,4-trikarboxybenzoová (214 nm), kyselina sorbová (254 nm) nebo *p*-nitrofenol (400 nm) [13-15].

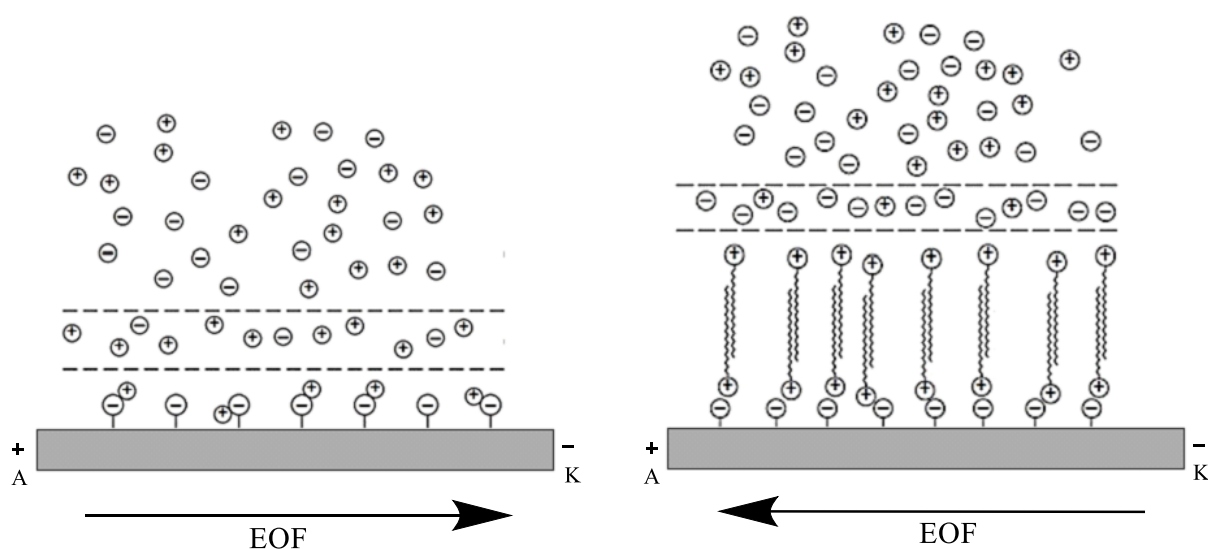
Elektrochemická detekce

Amperometrická detekce je vysoce citlivá metoda, avšak vkládané separační napětí může výrazně ovlivnit stanovení. V kombinaci s CE se používá amperometrická detekce při konstantním potenciálu, pulzní amperometrická detekce a detekce na enzymově modifikovaných elektrodách [16].

Konduktometrická detekce je závislá na náboji analytu a může být prováděna ve dvou módech, jako kontaktní a bezkontaktní vodivostní detekce. Použitím vysoce bazického BGE dojde k disociaci hydroxylových skupin sacharidů a tím ke vzniku záporného náboje, čímž je umožněn jejich pohyb v elektrickém poli. Zóny separovaných sacharidů mají vodivost nižší, než je vodivost BGE, a na elektroferogramu se projeví jako negativní píky [16]. S rostoucím pH BGE roste i vodivost roztoku, s vyšší vodivostí pak roste proud během separace a dochází k přehřívání roztoku uvnitř kapiláry. Ke snížení proudu se používají kapiláry s velmi malým vnitřním průměrem, protože při vodivostní detekci se tím na rozdíl od UV detekce výrazně nesnižuje její citlivost [17].

Bezkontaktní vodivostní detekce využili Tůma *a kol.* [18] při analýze mono- a disacharidů v nápojích, potravinách a v potravinových aditivech. Ke stanovení použili křemennou kapiláru o vnitřním průměru 5 μm , celkové délce 32,6 cm a efektivní délce 18,3 cm. Jako základní elektrolyt použili 75 mM hydroxid sodný a separační napětí bylo 15 kV. Daná metoda umožnila separovat 7 analytů v pořadí sacharosa, laktosa, galaktosa, glukosa, manosa, fruktosa a ribosa během 140 sekund.

Při použití bazického BGE jsou sacharidy záporně nabitě a migrují proti směru elektroosmotického toku (EOF), to může v některých případech neúměrně prodlužovat analýzu. Přídavkem kationtových tenzidů, mezi které patří například v této práci používaný cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), dojde k obrácení elektroosmotického toku (Obr. 2), analyty migrují v opačném pořadí stejným směrem jako elektroosmotický tok a tím se zkrátí celková doba analýzy, pro správnou separaci je však nutno obrátit polaritu vkládaného napětí. K analýze mono- a disacharidů v ovocných nápojích toho využili Carvalho *a kol.* [19] v kombinaci s bezkontaktní vodivostní detekcí. K separaci použili křemennou kapiláru o vnitřním průměru 20 μm , celkové délce 44 cm a efektivní délce 35,5 cm. BGE se skládal z 10mM hydroxidu sodného, 4,5mM hydrogenfosforečnanu sodného a 0,2mM CTAB, separační napětí bylo 25 kV. Daná metoda umožnila separovat 4 analyty v pořadí fruktosa, glukosa, galaktosa a sacharosa během 3,5 minut.

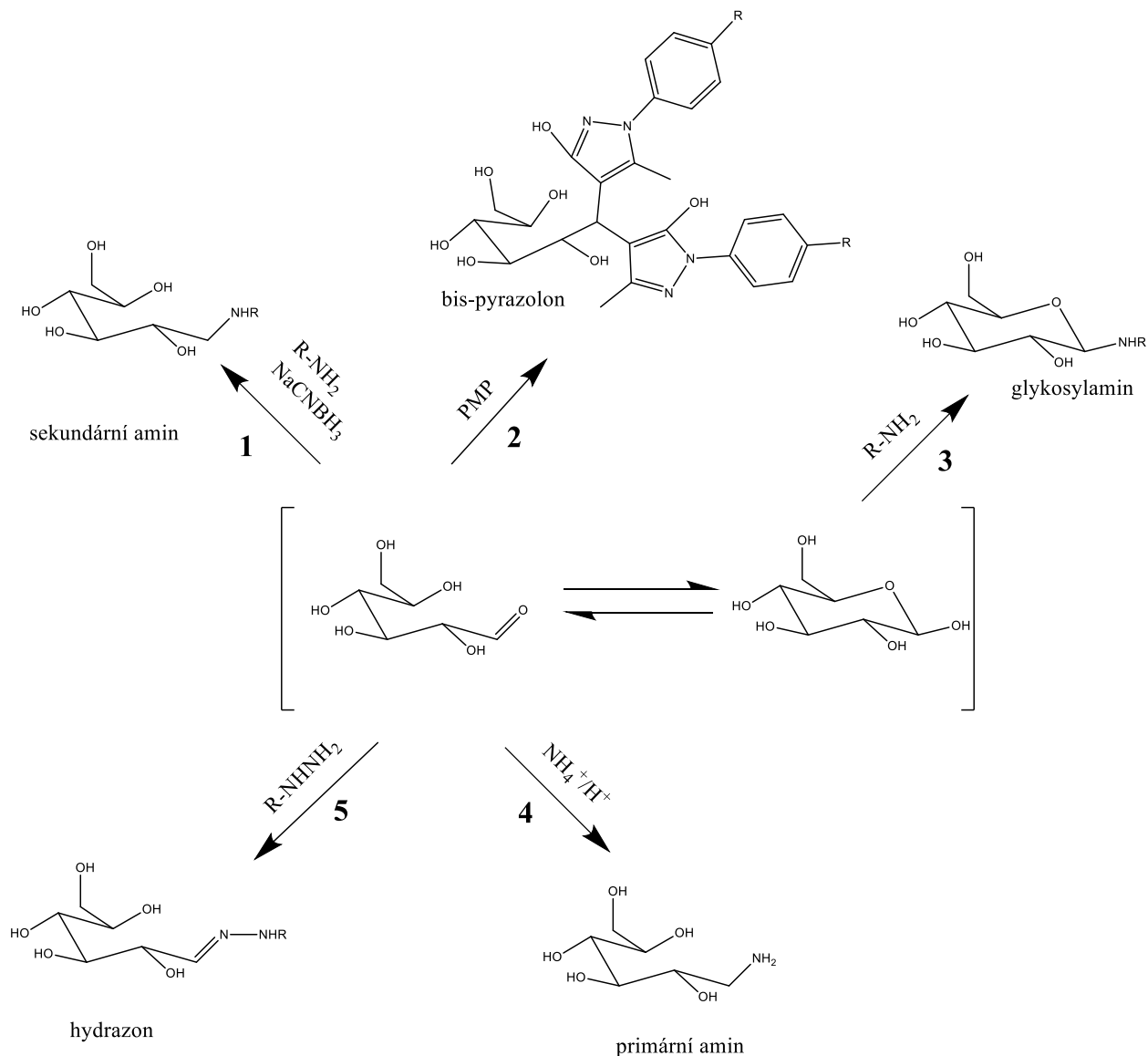


Obr. 2 – Směr elektroosmotického toku, (A) – bez přídavku kationtových tenzidů, (B) – s přídavkem kationtových tenzidů, převzato z [20] a upraveno

Derivatizace sacharidů

Zabudování fluoroforu či chromoforu do molekuly sacharidu zaručuje zvýšení citlivosti UV absorpční a fluorescenční detekce. Neutrální sacharidy se derivatizují činidly s nabitými funkčními skupinami, aby derivatizované analyty vykazovaly elektroforetickou migraci i

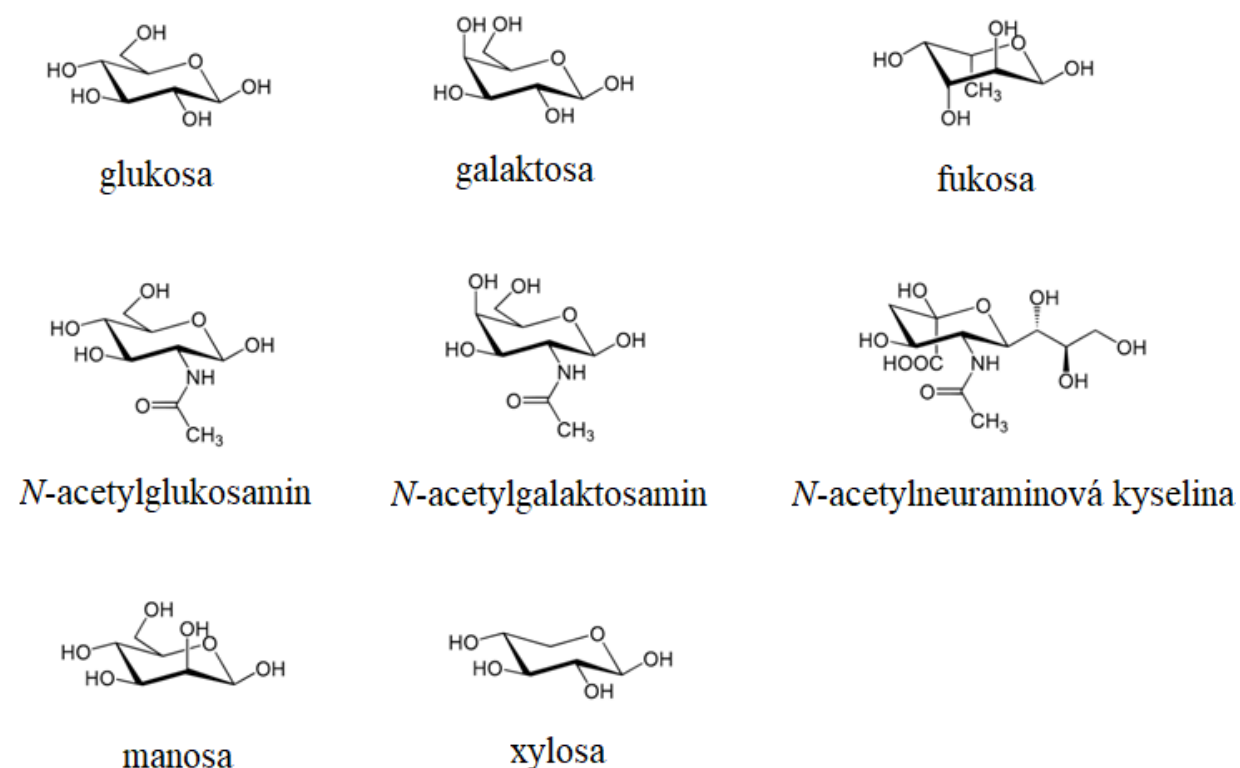
v neutrálním nebo kyselém prostředí. V některých případech může proto dojít nejen ke zlepšení citlivosti detekce, ale také selektivity, účinnosti a rozlišení. Existuje několik způsobů derivatizace sacharidů (Obr. 3), mezi které patří například reaktivní aminace či kondenzace redukujícího sacharidu a pyrazolonových látek [16].



Obr. 3 – Různé přístupy derivatizace sacharidů: 1 – reaktivní aminace, 2 – pyrazolonová derivatizace, 3 – aminace za vzniku glykosylaminu, 4 – derivatizace *N*-methylglykaminovými deriváty, 5 – vznik hydrazonu; PMP – 1-fenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-on, vytvořeno v ChemDraw, převzato z [16] a upraveno

2.2 Glykosylace

Glykosylace neboli navázání řetězce sacharidů na protein je jedna z nejběžnějších post-translačních modifikací proteinů probíhající na endoplasmatickém retikulu a v Golgiho aparátu. Podle typu vazby sacharidových jednotek na peptid se glykoproteiny dělí do dvou základních skupin. Pokud je sacharid vázán přes amidovou skupinu asparaginu, jedná se o tzv. *N*-glykosylaci. V druhém případě je sacharid vázán přes hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu a jedná se o tzv. *O*-glykosylaci [21]. Cukernou část glykoproteinů tvoří přímé nebo rozvětvené řetězce sacharidů. Nejčastěji se v nich vyskytují monosacharidy (Obr. 4) glukosa (Glc), galaktosa (Gal), manosa (Man), *N*-acetylglukosamin (GlcNAc), *N*-acetylgalaktosamin (GalNAc), fukosa (Fuc), *N*-acetylneuraminová kyselina = sialová kyselina (Neu5Ac) a xylosa (Xyl) [22]. Mezi sebou mohou být monosacharidy vázány glykosidovou vazbou a tvořit tak oligosacharidy až polysacharidy. Hydrolyzou se sacharidové jednotky z glykoproteinů opět uvolňují.



Obr. 4 – Monosacharidy nejčastěji se vyskytující v glykoproteinech; vytvořeno v ChemDraw

Glykoproteiny jsou důležité například pro mezibuněčnou komunikaci, iontový transport, imunitu a glykosylace také ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti proteinu, mezi které patří mimo jiné jeho stabilita, rozpustnost a konformace. Nesmírná heterogenita funkcí glykoproteinů je dána zejména díky rozmanitosti glykanových struktur, které mohou být na daném proteinu navázány [23]. Změny v glykosylaci mohou nastat v důsledku autoimunitního onemocnění, rakoviny nebo imunodeficience. Díky změnám v glykosylaci proteinů mohou být například maskovány či rozpoznávány rakovinové buňky [24], při rakovině lze pozorovat nadměrnou nebo nedostatečnou expresi přirozeně se vyskytujících sacharidů či se mohou objevit zcela nové struktury sacharidů, které se v dané buňce normálně nevyskytují. Tyto změny jsou způsobeny změnou exprese glykotransferas, což vede k modifikacím ve struktuře *N*- a *O*-vázaných sacharidů, přičemž některé změny pomáhají vývoji nádoru nebo zvyšují jeho závažnost [25].

Mezi nejčastější změny v glykosylaci patří nárůst velikosti a větvení *N*-vázaných sacharidů, které je zprostředkováno *N*-acetylglukosamintransferasou V. Zvýšené β -1,6-GlcNAc větvení vede k vytvoření dalších míst k připojení sialových kyselin, čímž se v kombinaci se zvýšenou produkcí sialyltransferas tvoří sacharidy s jejich větším počtem. Zvýšený obsah se vyskytuje jak v případě chronických zánětů, tak v případě rakovinného bujení [25].

2.2.1 Příklady onemocnění spjatých s glykosylací

Hepatoceleulární karcinom

V játrech dochází k syntéze většiny glykoproteinů krevní plazmy, onemocnění jater má za následek změnu v produkci specifických glykotransferas, čímž může dojít ke změnám v glykosylaci. Tato změna může být rakovinového i nerakovinového původu. V prvním případě se jedná o hepatocelulární karcinom v druhém případě jde převážně o strukturní změny v *N*-glykanech [26].

Hepatoceleulární karcinom je z hlediska rakoviny jater nejběžnější nádor, u mužů se vyskytuje přibližně dvakrát častěji než u žen. Ke karcinomu dochází častěji u pacientů s chronickým onemocněním jater, jako je například cirhóza. Mezi tři hlavní příčiny cirhózy patří chronická hepatitida, alkoholické poškození jater a dlouhodobá obstrukce žlučových cest. Jedinou

možností léčby je odstranění nádoru či transplantace jater. Pro diagnostiku se u pacientů s cirhózou využívají neinvazivní zobrazovací metody (ultrazvuk, počítačová tomografie, magnetická rezonance), u pacientů bez cirhózy je nutné provést biopsii a z histologického vyšetření lze sledovat nárůst hladiny glykosylované formy alfafetoproteinu, ten má 95% senzitivitu k hepatocelulárnímu karcinomu, jeho hladina se zvyšuje i v těhotenství [27].

Rakovina vaječníku

Nejčastějším typem zhoubného nádoru vaječníku je epitelální karcinom z buněk vystylajících povrch vaječníků. Diagnostika se provádí kombinací sonografie a sledování sérového karbohydrátového antigenu 125, který není zcela specifický. Jeho hladina se zvyšuje například v těhotenství či při jiných typech rakoviny. Během karcinomu vaječníku dochází k nárůstu větvení a obsahu sialových kyselin u sérových glykoproteinů. Změny v glykosylaci u pacientek s rakovinou vaječníku byly nalezeny například i u haptoglobinu, α 1-antitrypsinu či transferinu [25].

Rakovina prostaty

Karcinom prostaty je druhý nejčastější nádor u mužů, k rozvoji přispívá zejména obezita a dědičnost, nádor může způsobit i virové onemocnění (například lidský herpesvirus). Průběžným sledováním hladiny prostatického specifického antigenu u mužů nad 45 let lze diagnostikovat rané stádium rakoviny prostaty, antigen ovšem není zcela specifický pro rakovinu prostaty. Jeho hladina se zvyšuje například při zvětšené prostatě či po jízdě na kole, jedním z problémů je tedy nadbytečná diagnostika rakoviny. Analýza glykoproteinu benigního a maligního původu ukázala značné rozdíly v jejich glykosylaci, v séru pacienta s rakovinou byl nižší obsah fukosy a *N*-acetylneuraminové kyseliny [28], [29].

Dědičné poruchy glykosylace

Dědičné poruchy glykosylace se řadí mezi vzácná autozomálně recesivní onemocnění, která mohou být prakticky na všech úrovních glykosylace. Příznaky jsou velmi nespecifické, od neurologických poruch, přes poruchy srážlivosti krve, až po onemocnění trávicího traktu. Vyšetření sérového transferinu, respektive jeho isoform, pomocí isoelektrické fokusace

poskytuje informace o *N*-glykosylaci. Nedostatek záporných nábojů, které transferinu poskytují čtyři jednotky kyseliny *N*-acetylneuraminové, poukazuje na kratší či chybějící sacharidový řetězec, což má za následek celkovou hypoglykosylaci. Léčba některých typů těchto poruch je zprostředkovávána podáváním manosy či fukosy, kterých má pacient nedostatek. Vyšetření apolipoproteinu C-III pomocí isoelektrické fokusace poskytuje informaci o *O*-glykosylaci, tento glykoprotein může obsahovat až dvě molekuly kyseliny *N*-acetylneuraminové [30], [31].

2.2.2 Bioléčiva

Během posledních několika let se zvyšuje zájem o bioléčiva („biopharmaceuticals“) používaná v oblasti terapie i diagnostiky nejrůznějších onemocnění. Jedná se o léčiva biologického (rostlinného) původu získávaná převážně rekombinantní technikou, podstatnou část tvoří zejména monoklonální protilátky, nové typy vakcín a terapeutické proteiny. Pro kontrolu kvality bioléčiv i pro diagnostiku je naprosto zásadní správná glykosylace, k jejímu stanovení jsou potřeba analytické metody, které jsou popsány v následující kapitole [32].

Terapeutické monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou produkovány jediným klonem B-lymfocytů, na dané proteiny sloužící jako antigeny se vážou s přesně určenou specifitou. Monoklonální protilátky používané k terapii lze snadno rozpoznat podle typické koncovky -mab, té předchází slabika určující původ protilátky (například -o- pro myš), nakonec se přidávají ještě vsuvky dle místa zásahu a u látek používaných k terapii karcinomu se pomocí vsuvek upřesňuje místo zásahu. Monoklonální protilátky druhé generace jsou léčiva s cíleně změněným profilem glykosylace, tím dochází ke zvýšení účinnosti léčiva a ke snížení cytotoxicity při jejich aplikaci [32]. Mezi taková léčiva se řadí *mogamulizumab* používaný v Japonsku k terapii akutní T-leukémie u dospělých, či *obinutuzumab* k terapii ne-Hodgkinských lymfomů [33].

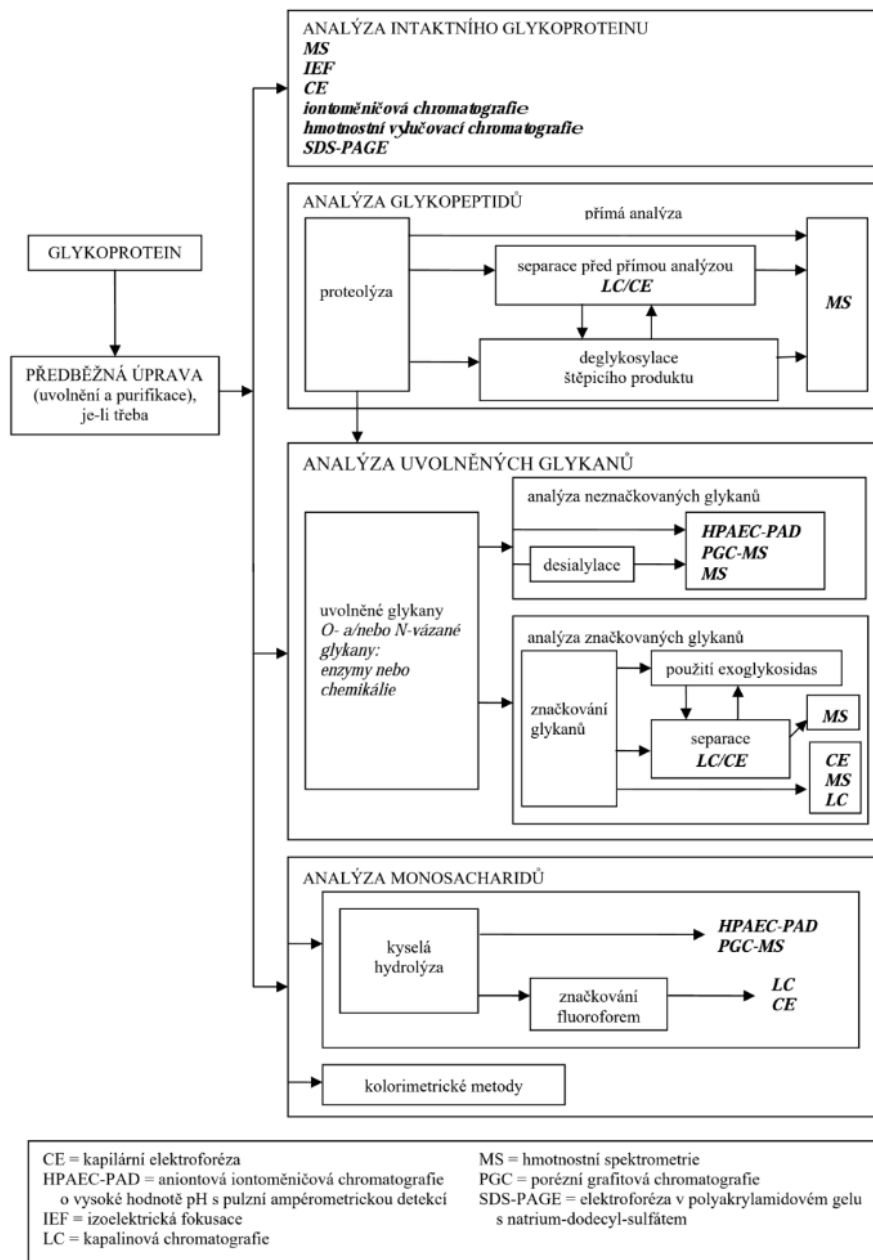
Terapeutické proteiny

Mezi terapeutické proteiny se řadí zejména peptidické hormony získané rekombinantní technologií, nejznámějším takovýmto proteinem je *lidský insulin*. Insulin je peptidický hormon

udržující správnou hladinu glukosy v těle. U pacientů s diabetem, u kterých nezabrala zejména dieta a antidiabetika, je zcela nezbytné pravidelné intravenosní podávání insulinu [32].

2.3 Elektroforetické přístupy v glykoproteomice

Glykosylaci můžeme hodnotit na čtyřech hlavních úrovních, z hlediska intaktního glykoproteinu, glykopeptidů, uvolněných glykanů a monosacharidů. Obr. 5 poskytuje přehledný postup analýz a použitých metod pro každou úroveň [34].



Obr. 5 – Přehled analýz v glykoproteomice, převzato z [34]

2.3.1 Analýza intaktního glykoproteinu

Intaktní glykoprotein, respektive jeho analýza, poskytuje zejména informace o struktuře a celkové glykosylaci daného glykoproteinu. Isoformy glykoproteinu mají stejnou polypeptidovou sekvenci, avšak struktura glykanových řetězců, jejich umístění a stupeň saturace na jednotlivých glykosylačních místech přispívá k jeho složitosti a heterogenitě. Mezi běžně používané metody identifikace intaktního glykoproteinu patří kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií, RP-HPLC, HILIC a v neposlední řadě i CE [35-37]

Mnoho glykoproteinů, zejména pak $\alpha 1$ -kyselý glykoprotein, má potenciál se stát nádorovými markery. Téměř polovinu z celkové relativní molekulové hmotnosti tvoří rozvětvené glykany, které mohou být vázány k hlavnímu řetězci na pěti různých místech *N*-glykosidickými vazbami. Běžná koncentrace glykoproteinu v krevní plazmě zdravého jedince se pohybuje okolo 0,5 mg/ml, jeho zvýšená koncentrace ukazuje mimo jiné na nádorové onemocnění [38]. Metodou CE ve spojení s hmotnostní spektrometrií bylo ve vzorcích krevního séra identifikováno více než 150 jeho isoform [39].

2.3.2 Analýza glykopeptidů

Analýza glykopeptidů poskytuje informace o stupni obsazení proteinu a o struktuře navázaných sacharidů. Získané informace o stavu glykosylace jsou důležité jak pro diagnózu a léčbu onemocnění, tak pro lepší porozumění jeho průběhu. Na druhou stranu jsou některé glykopeptidy (například lidský erythropoetin stimulující tvorbu červených krvinek) zneužívány ve vrcholovém sportu jako doping. V tomto případě je nutné zjistit, zda se jedná o endogenní formu, či zda glykoprotein vznikl rekombinantní expresí. V neposlední řadě lze analýzou glykopeptidů urychlit vývoj vakcín (například na HIV) [40]. Nejprve je nutné glykoprotein podrobit proteolytickému štěpení, poté se může provádět buď přímá analýza hmotnostním spektrometrem, rozdělení před analýzou (nejčastěji HPLC nebo CE) a následná analýza hmotnostním spektrometrem, nebo deglykosylace glykopeptidů poskytující peptidové mapy, z kterých lze identifikovat různá glykosylační místa [34].

2.3.3 Analýza uvolněných glykanů

Uvolněné glykany poskytují informace o daných typech glykanů v proteinu a lze z toho vyvodit i jeho stupeň sialylace. Tyto informace jsou praktické zejména při detekci biomarkerů a při výzkumu bioléciv. Štěpení může probíhat buď chemicky, nebo enzymaticky, postup se vždy volí na základě analyzovaného glykoproteinu. Analyzovat glykany lze přímo například pomocí HPAEC-PAD, nebo se musí nejprve derivatizovat, přičemž způsob derivatizace se volí na základě použité metody jejich stanovení [34], [41].

Chemické štěpení

N-glykany jsou z glykoproteinu často uvolňovány pomocí bezvodého hydrazinu, tato metoda má ovšem několik nevýhod, proto se v praxi moc nevyužívá. Mezi dané nevýhody patří například hydrolyza acetylovaných monosacharidů (GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac), nebo ztráta redukujícího konce GlcNAc vlivem vysoké teploty během reakce [41].

Enzymatické štěpení

Enzymatické uvolnění *N*-glykanů z glykoproteinů probíhá pomocí endoglykosidas, nejčastěji pomocí peptid-*N*-glykosidas (PNGasy), které štěpí mezi dvěma GlcNAc zbytky. Nejběžněji používaný enzym je PNGasa F, která štěpí za vzniku amoniaku, kyseliny asparagové a nereduktivního oligosacharidu [42].

Exoglykosidasy jsou enzymy štěpící sacharidy směrem k proteinu, toho se využívá pro určení pořadí jednotlivých monosacharidů. Pojmenovávají se dle příslušných monosacharidů, které hydrolyzují. Například β -galaktosidasa hydrolyzuje β -galaktosidické vazby v laktose za vzniku glukosy a galaktosy [42].

2.3.4 Analýza monosacharidů

Monosacharidy poskytují informaci o poměrném zastoupení jednotlivých monosacharidových jednotek v glykoproteinu. K jejich analýze je možné použít jednoduchou, nenákladnou a rychlou elektroforetickou metodu, kterou vyvíjím. Rozpadu polysacharidových jednotek v glykoproteinu na monosacharidy lze dosáhnout pomocí hydrolyzy, může se jednat

o enzymatickou a chemickou hydrolyzu. Chemická hydrolyza může být buď kyselá, či zásaditá. Kyselá hydrolyza je velmi účinná metoda oddělení monosacharidů z molekuly glykoproteinu. Gey a Unger [43] analyzovali monosacharidy ve vzorku fetuinu metodou HPAEC-PAD. Pro hydrolyzu vybrali 3 kyseliny, konkrétně se jednalo o kyselinu chlorovodíkovou (4M), trifluoroctovou (1M a 2M) a sírovou (0,5M). Rozpustili vzorek glykoproteinu ve směsi 0,5 ml vody a 0,5 ml roztoku kyseliny a zahřívali ho při 100 °C, poté vzorek zakoncentrovali na vakuové odparce a po rozpuštění analyzovali 7 monosacharidů pomocí HPEAC-PAD, mobilní fáze byl 19 mM hydroxid sodný.

Tran *a kol.* [44] hydrolyzovali *O*-glykosylovaný kaseinomakropeptid pomocí kyseliny chlorovodíkové. Pro hydrolyzu neutrálních monosacharidů zvolili rozpuštění vzorku o koncentraci 2 mg/ml v 1 ml 2M HCl, zahřívání 4 h při 100 °C, odpaření do sucha a rozpuštění ve vodě. Pro acetylované monosacharidy použili rozpuštění vzorku v 1 ml 4M HCl, zahřívání 4 h při 100 °C, odpaření do sucha, přidání 1,5 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 0,5 ml anhydridu kyseliny octové, směs nechali přes noc v lednici a opět rozpustili ve vodě. Pomocí HPAEC-PAD poté analyzovali 7 monosacharidů, mobilní fáze byl 460 mM hydroxid sodný.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Kyselina chlorovodíková, 36% (Lach:ner, Česká republika)

Hydroxid sodný, p.a. (Penta, Česká republika)

Hydroxid draselný, p.a. (Penta, Česká republika)

Hydroxid lithný monohydrát, > 99 % (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný, p.a. (Merck, Německo)

Deionizovaná voda připravená systémem Milli-Q (Millipore, USA)

Sacharidy: glukosa, $\geq 99,5$ %, galaktosa, ≥ 99 %, manosa ≥ 99 %, *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylgalaktosamin, 98 %, fukosa, ≥ 98 %, *N*-acetylneuraminová kyselina, ≥ 95 %, xylosa, ≥ 99 %, laktosa, $\geq 99,5$ %, sacharosa, $\geq 99,5$ % (Sigma-Aldrich, USA)

Hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB), > 97 % (Merck, Německo)

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová kyselina (HEPES), $\geq 99,5$ %, (Carl Roth, Německo)

3.2 Přístrojové vybavení

Kapilární elektroforéza model 7100 (Agilent Technologies, Německo) s bezkontaktním vodivostním detektorem

Křemenná kapilára: vnější průměr 375 μm , vnitřní průměr 20 a 10 μm (Polymicro Technologies, USA), pokud není uvedeno jinak – celková délka 50 cm/efektivní délka 35 cm

Ultrazvuková lázeň: Elmasonic S15 (Elma Schmidbauer, Německo)

Analytické váhy 262 SMA-FR (Precisa, Švýcarsko)

pH metr, 3540 pH/conductivity meter (Jenway, UK)

Bloková lázeň QBD2 (Grant Instruments, UK)

3.3 Experimentální podmínky

Teplota kazety s kapilárou: 25 °C

Příprava nové kapiláry: promytí 2 minuty 1M roztokem hydroxidu sodného tlakem 1 MPa a poté 2 minuty deionizovanou vodou tlakem 1 MPa

Příprava kapiláry před separací: promytí 120 s BGE do odpadní vialky tlakem 1 MPa a poté 90 s BGE do vialky s BGE tlakem 1 MPa

Optimalizované podmínky (viz kapitola 4.1): pokud není uvedeno jinak, filtrovaný BGE – 50mM hydroxid sodný + 22,5mM hydrogenfosforečnan sodný a 0,2mM CTAB, dávkování – hydrodynamické 10 kPa 70 s, tlak během analýzy -270 kPa

Filtr: nylonový filtr na stříkačku Agilent, velikost pórů 0,45 µm

Separční napětí: -30 kV (proud přibližně 4 µA)

Hydrolyza: Do polypropylenové mikrozkumaky bylo pipetováno 0,2 ml standardu disacharidu o koncentraci 10 mg/ml, k tomu byla přidána kyselina chlorovodíková o koncentraci 8 mol/l (její objem se lišil dle konečné koncentrace) a vše bylo doplněno deionizovanou vodou na celkový objem 1 ml. Takto připravené vzorky byly hydrolyzovány v blokové lázni při dané teplotě. Po pětiminutových intervalech bylo odebráno vždy 60 µl, přidáno 24 µl HEPES o koncentraci 5 mg/ml a doplněno deionizovanou vodou do 600 µl. Tento vzorek byl následně nadávkován a analyzován pomocí vyvinuté metody

3.4 Výpočty

Elektroosmotická mobilita m_{EOF} :

$$m_{EOF} = \frac{l_d \cdot l_c}{t_{EOF} \cdot U}$$

l_d – efektivní délka kapiláry, l_c – celková délka kapiláry, t_{EOF} – migrační čas elektroosmotického toku (marker EOF byla zóna vody ze vzorku projevující se významným poklesem vodivosti),
 U – vkládané napětí

Pozorovaná mobilita m_{poz} :

$$m_{poz} = \frac{l_d \cdot l_c}{t_m \cdot U}$$

l_d – efektivní délka kapiláry, l_c – celková délka kapiláry, t_m – migrační čas dané látky,
 U – vkládané napětí

Efektivní mobilita m_{ef} :

$$m_{ef} = m_{poz} - m_{EOF}$$

m_{poz} – pozorovaná mobilita dané látky, m_{EOF} – mobilita elektroosmotického toku

Směrodatná odchylka s :

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i – výsledek i -tého měření, \bar{x} – průměrná hodnota měření, n – počet měření

Relativní směrodatná odchylka s_r :

$$s_r = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} [\%]$$

s – směrodatná odchylka, \bar{x} – průměrná hodnota měření

Mez detekce a mez stanovitelnosti:

Mez detekce (*LOD*) vyjadřuje koncentraci analytu, kterou lze s jistotou detekovat, a určuje se jako koncentrace analytu poskytující signál odpovídající trojnásobku výšky šumu.

$$LOD = \frac{3 \cdot h_s}{k}$$

h_s – výška šumu, k – směrnice kalibrační přímky

Mez stanovitelnosti (*LOQ*) vyjadřuje nejmenší možnou koncentraci, kterou lze s jistou spolehlivostí za daných podmínek stanovit, a určuje se jako koncentrace analytu poskytující signál odpovídající desetinásobku výšky šumu.

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_s}{k}$$

h_s – výška šumu, k – směrnice kalibrační přímky

T-test t :

$$t = \frac{q}{s_q} \cdot \sqrt{n}$$

q – úsek kalibrační přímky, s_q – směrodatná odchylka úseku, n – počet hodnot

Výtěžnost R :

$$R = \frac{c_{stan}}{c_{skut}} \cdot 100 [\%]$$

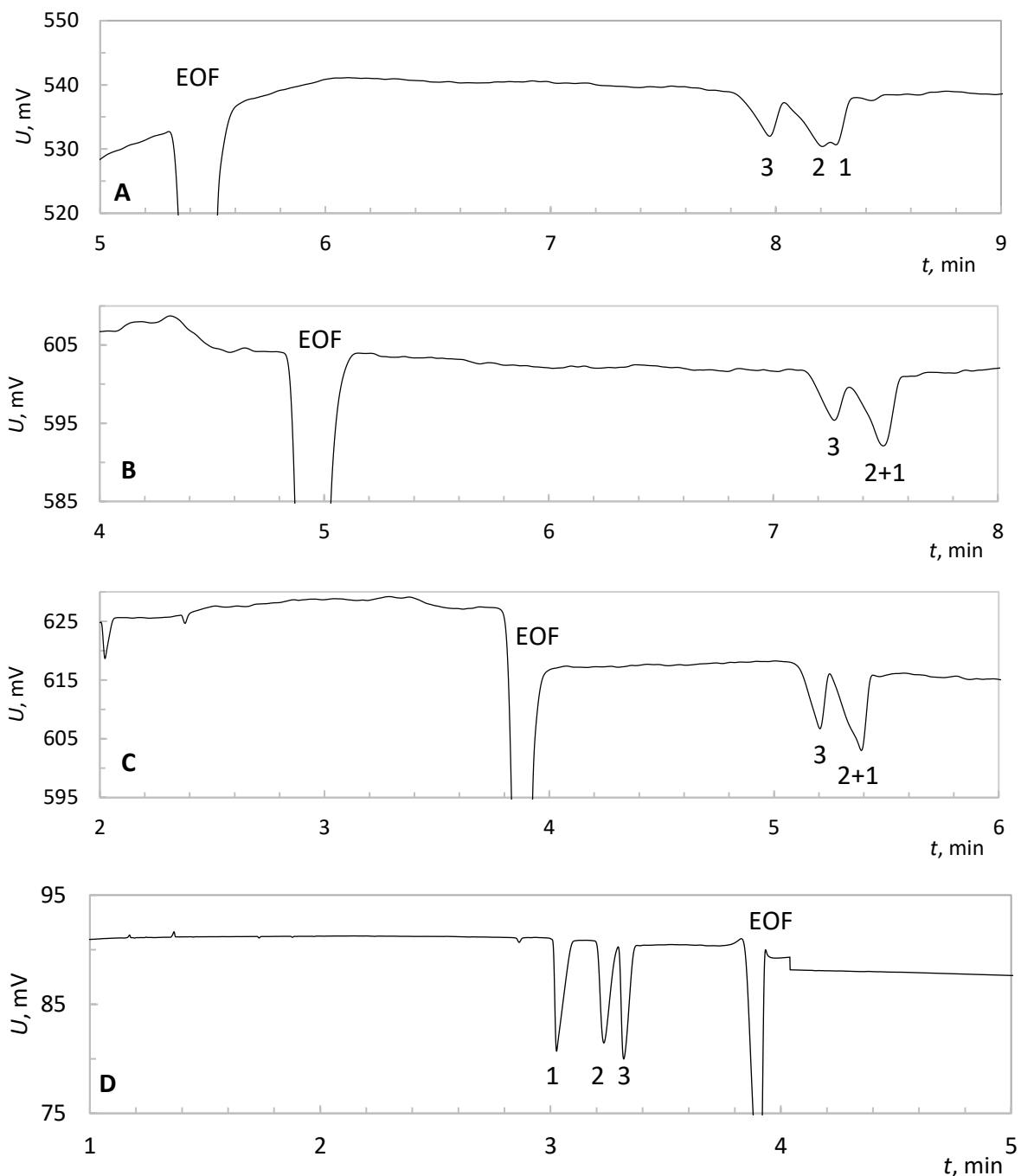
c_{stan} – stanovené hodnoty koncentrace spočítané z kalibrační závislosti, c_{skut} – skutečné hodnoty koncentrace

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace metody

Pro prvotní testování separace monosacharidů pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí jsem zvolila silně bazické základní elektrolyty. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.2, při pH vyšším, než je pK_a hydroxylových skupin sacharidů, dojde k jejich disociaci a molekula získává záporný náboj. Na základě předešlé rešerše jsem zvolila jako BGE roztoky hydroxidu lithného, sodného a draselného, a nakonec roztok obsahující hydroxid sodný, hydrogenfosforečnan sodný a CTAB.

K určení vhodného složení BGE pro separaci monosacharidů jsem zvolila standardy glukosy, galaktosy a *N*-acetylglukosaminu o koncentraci 0,2 mg/ml v kapiláře o vnitřním průměru 20 μm , celkové délce 50,0 cm a efektivní délce 35,0 cm. Pro separaci jsem použila roztoky 75 mM hydroxidu lithného, 75 mM hydroxidu sodného, 75 mM hydroxidu draselného a směsný roztok obsahující 10 mM hydroxid sodný, 4,5 mM hydrogenfosforečnan sodný a 0,2 mM CTAB.



Obr. 6 – Porovnání analýzy směsi standardů o koncentraci 0,2 mg/ml v různých BGE:
 (A) 75 mM LiOH, (B) 75 mM NaOH, (C) 75 mM KOH, (D) 10 mM NaOH + 4,5 mM H₂PO₄ +
 0,2 mM CTAB; vnitřní průměr kapiláry 20 μ m, celková délka 50,0 cm/délka k detektoru
 35,0 cm, dávkování 5 kPa 20 s, vkládané napětí (A), (B), (C) 15 kV, (D) -25 kV;
 (1) *N*-acetylglukosamin, (2) glukosa, (3) galaktosa

Z naměřených elektroferogramů (Obr. 6) jsem jako nejvhodnější BGE pro analýzu monosacharidů určila směsný roztok hydroxidu sodného, hydrogenfosforečnanu sodného a CTAB. Použitím tohoto základního elektrolytu došlo k úplnému rozdělení všech analytů na základní linii, píky byly nejužší a jejich tvar byl nejvíce podobný Gaussovskému píku. Výhodou použití CTAB je, že nedochází k přehřívání roztoku uvnitř kapiláry a je tak možné použít vyšší separační napětí. Dalším kladem je, že obrácením elektroosmotického toku dojde ke zkrácení celkové doby analýzy. Oproti základnímu roztoku nejčastěji používanému k analýze monosacharidů kapilární elektroforézou (NaOH) se zkrátil celkový čas analýzy méně než na polovinu.

Tabulka 1 – Hodnoty pro hydroxidy o koncentraci 75 mmol/l vypočtené pomocí programu PeakMaster s nalezenými hodnotami pKa; I – iontová síla, γ – vodivost, $c^{(0)}$ – koncentrace nedisociované formy, $c^{(+1)}$ – koncentrace disociované formy, m_{ef} – efektivní mobilita

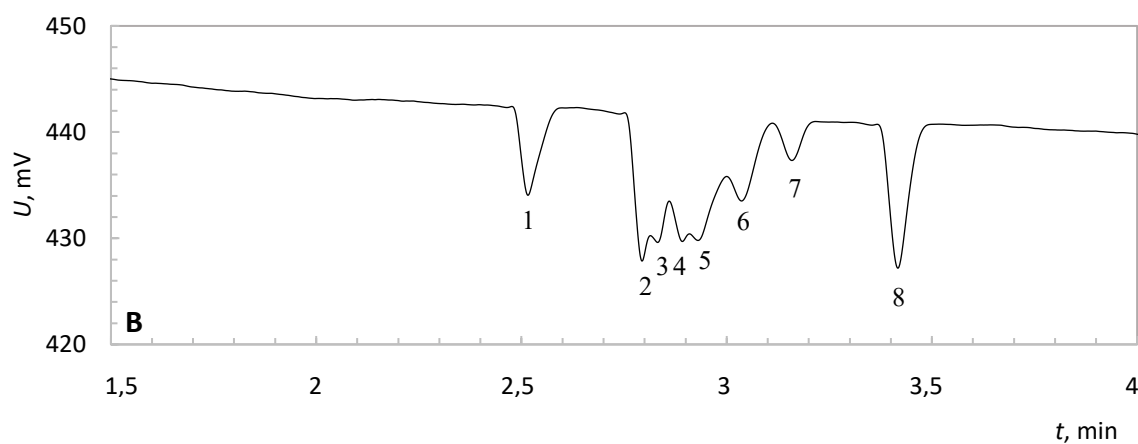
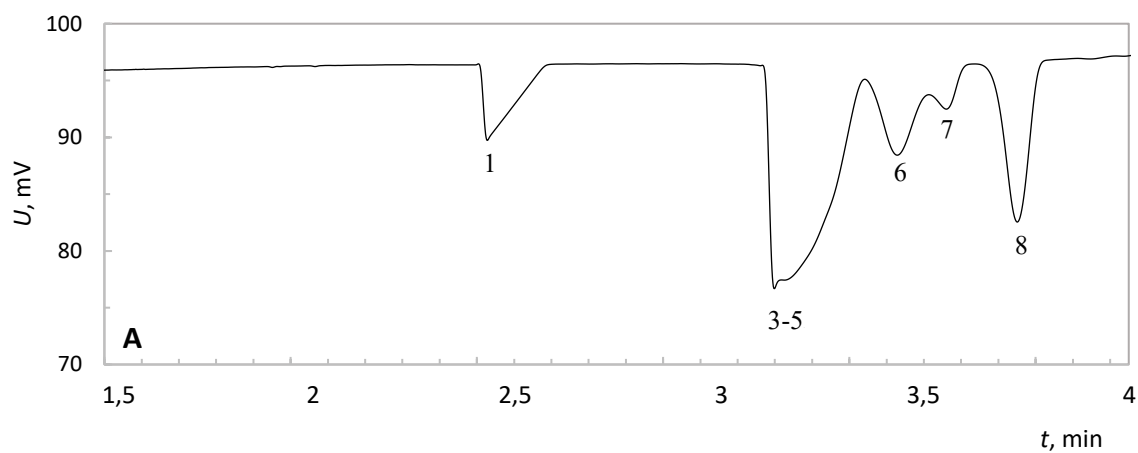
	pKa [45]	pH	I [mM]	γ [S/m]	$c^{(0)}$ [mM]	$c^{(+1)}$ [mM]	m_{ef} [$10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	
							glc	gal
LiOH	13,82	12,76	70,08	1,51	4,92	70,08	-18,75	-18,07
NaOH	14,56	12,78	74,01	1,67	0,99	74,01	-18,86	-18,20
KOH	15,10	12,78	74,71	1,85	0,29	74,71	-18,86	-18,22

Tabulka 2 - Vypočtené hodnoty mobilit standardů glcNAc, glc a gal v různých BGE a jejich relativní směrodatné odchylky; m_{poz} – pozorovaná mobilita, m_{ef} – efektivní mobilita, s_r – relativní směrodatná odchylka

	m_{poz} [$10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]				m_{ef} [$10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]					
	EOF	glcNAc	glc	gal	glcNAc	s_r [%]	glc	s_r [%]	gal	s_r [%]
75 mM LiOH	3,55	2,37	2,38	2,45	-1,20	0,13	-1,18	0,12	-1,11	0,15
75 mM NaOH	3,87	2,56	2,56	2,62	-1,31	0,77	-1,31	0,77	-1,25	0,77
75 mM KOH	4,99	3,60	3,60	3,72	-1,39	0,47	-1,39	0,47	-1,26	0,52
10 mM NaOH + 4,5 mM Na ₂ HPO ₄ + 0,2 mM CTAB	-2,94	-3,80	-3,56	-3,46	-0,87	0,52	-0,62	0,47	-0,53	0,53

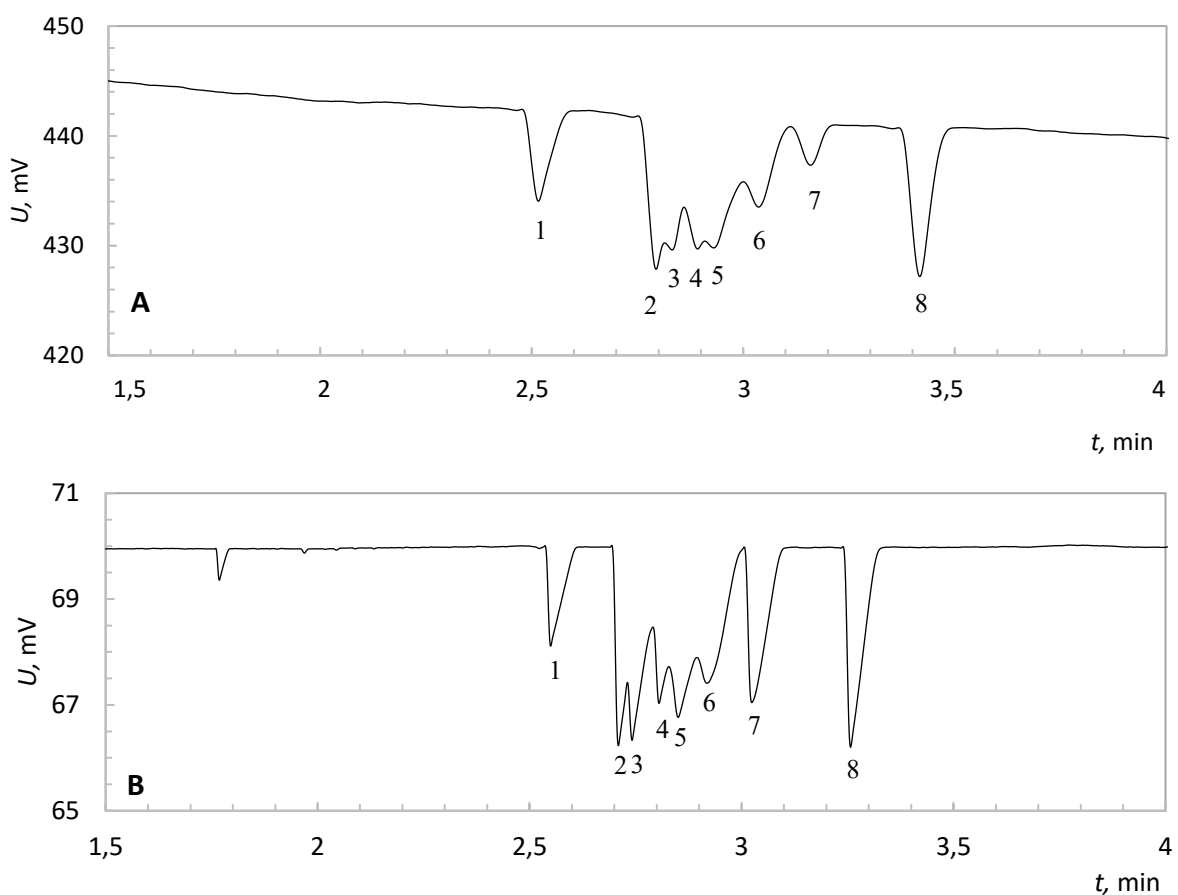
Hodnoty pKa jednotlivých hydroxidů v programu PeakMaster byly chybné, proto jsem pro výpočet daných parametrů použila hodnoty nalezené v literatuře. Z tabulky 1 a nalezených hodnot pK_a lze vidět, že zásaditost hydroxidů roste ve skupině periodické tabulky ($\text{LiOH} < \text{NaOH} < \text{KOH}$). Je známo, že hydratovaný poloměr kationtů ve skupině naopak klesá ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$). Hydroxid draselný je tedy v roztoku nejvíce disociován, z čehož plyne nejvyšší pH a iontová síla jeho roztoku. Díky nejmenšímu hydratovanému poloměru má draselný iont nejvyšší elektroforetickou mobilitu. To v kombinaci s nejvyšším stupněm disociace vede k nejvyšší vodivosti roztoku hydroxidu draselného. Tabulka 2 udává naměřené hodnoty pozorovaných mobilit a z nich vypočítané hodnoty efektivních mobilit analytů a EOF. S rostoucím pH roztoků roste i rychlost EOF od LiOH ke KOH. Stejně tak rostou (v absolutní hodnotě) i efektivní mobility sacharidů, které s rostoucím pH vykazují vyšší stupeň disociace a vyšší efektivní náboj. Nakonec lze z hodnot vypočítaných pomocí programu PeakMaster vidět, že efektivní mobilita glukosy je ve všech případech větší než galaktosy, to rovněž koresponduje s naměřenými hodnotami. Standardy migrovaly ve všech uvedených hydroxidech v pořadí galaktosa, glukosa a *N*-acetylglukosamin, přičemž píky glukosy a *N*-acetylglukosaminu byly částečně či zcela překryté, navíc byly píky široké a rozmyté, což snižuje selektivitu metody.

Následnou aplikací zvoleného BGE obsahujícího 10 mM hydroxid sodný, 4,5 mM hydrogenfosforečnan sodný a 0,2 mM CTAB na všech osm analyzovaných standardů došlo k překryvu většiny píků (Obr. 7A), proto jsem dále zvolila pětikrát vyšší koncentraci hydroxidu sodného (50 mM) a hydrogenfosforečnanu sodného (22,5 mM), tím jsem dosáhla stejné hodnoty pH, ale vyšší iontové síly BGE. S rostoucí iontovou silou se zlepšuje účinnost separace, píky se zužují a při stejné selektivitě lze dosáhnout lepšího rozlišení. K jistému zlepšení sice došlo, ale k rozdělení všech 8 standardů monosacharidů na základní linii ne (Obr. 7B).



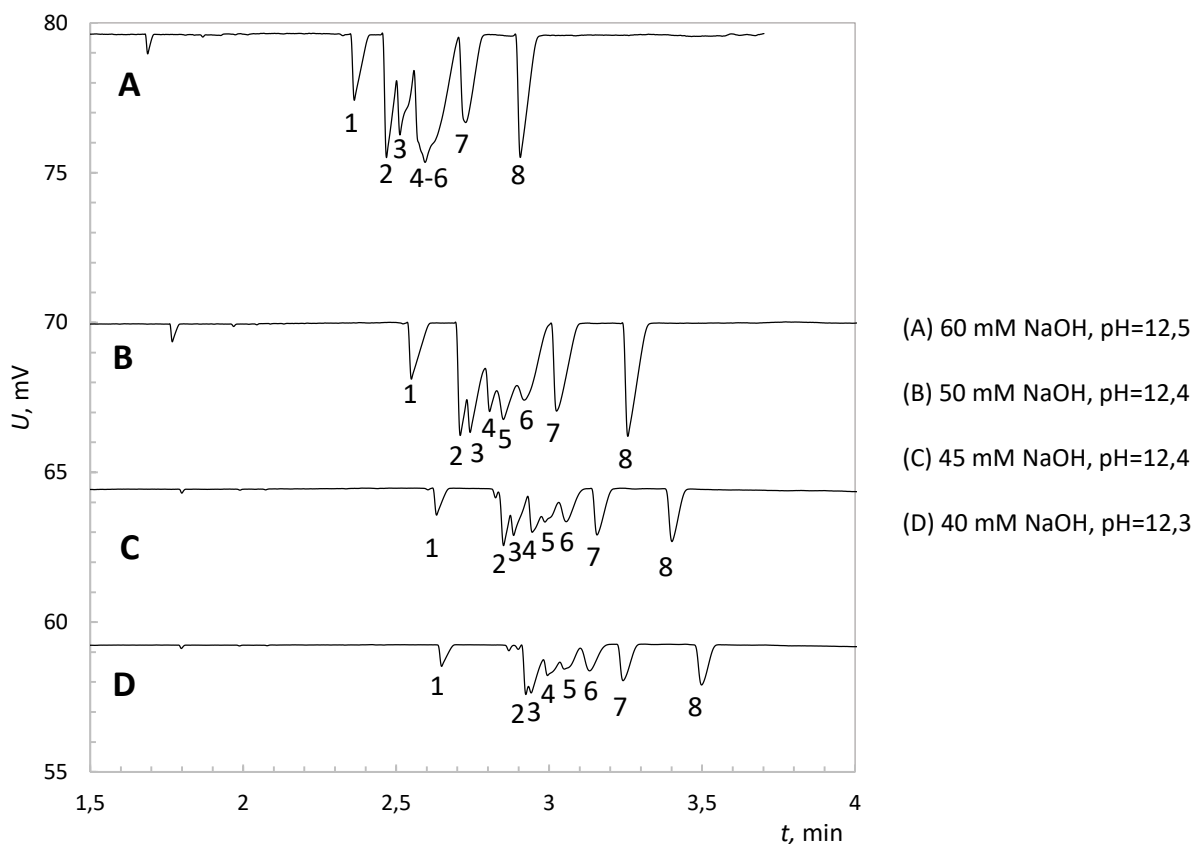
Obr. 7 – Aplikace zvoleného BGE na všechny standardy o koncentraci 0,2 mg/ml; (A) 10 mM NaOH, 4,5 mM Na₂HPO₄ a 0,2 mM CTAB, (B) 50 mM NaOH, 22,5 mM Na₂HPO₄ a 0,2 mM CTAB; průměr kapiláry 20 μm, celková délka 50,0 cm/délka k detektoru 35,0 cm, dávkování 5 kPa 20 s, vkládané napětí -30 kV; (1) Neu5Ac, (2) Xyl, (3) Man, (4) GlcNAc, (5) GalNAc, (6) Glc, (7) Gal, (8) Fuc

Čím déle migrují analyty uvnitř kapiláry, tím spíše se projeví i malé rozdíly v jejich mobilitě, a o to lepší je poté rozlišení. Prodloužení času migrace analytů lze uskutečnit prodloužením celkové délky kapiláry a tím délky k detektoru nebo vkládáním protisměrného tlaku. Použitím kapiláry o průměru 20 μm , celkové délce 80,0 cm a efektivní délce 65,0 cm došlo jen k mírnému zlepšení rozlišení, ale k výraznému prodloužení celkové doby analýzy (15 minut). Další možností pro zlepšení rozlišení je použití kapiláry s užším vnitřním průměrem. Kapilára o průměru 10 μm , celkové délce 50,0 cm a efektivní délce 35,0 cm poskytla lepší rozlišení a lepší poměr signál/šum než kapilára o průměru 20 μm o stejné délce (Obr. 8), proto jsem se rozhodla využívat užší kapiláru.



Obr. 8 – Porovnání separace všech standardů o koncentraci 0,2 mg/ml v 20 μm (A) a 10 μm (B) kapiláře; 50 mM NaOH, 22,5 mM Na₂HPO₄ a 0,2 mM CTAB; celková délka 50,0 cm/délka k detektoru 35,0 cm, dávkování 5 kPa 20 s, vkládané napětí -30 kV; (1) Neu5Ac, (2) Xyl, (3) Man, (4) GlcNAc, (5) GalNAc, (6) Glc, (7) Gal, (8) Fuc

Poté jsem zkoušela měnit koncentraci hydroxidu sodného a tím celkové pH BGE (Obr. 9). S narůstajícím pH základního elektrolytu rostla jeho vodivost, migrace všech analytů i EOF se zrychlovala a tím se zhoršilo celkové rozlišení. Naopak s klesajícím pH se migrace mírně zpomalovala, i přesto však nedocházelo k výrazně lepšímu rozlišení, vlivem menšího rozdílu vodivosti základního elektrolytu a zóny vzorku se ovšem snižovala citlivost. Z důvodu vyšší citlivosti jsem se tedy rozhodla ponechat původní BGE s koncentrací hydroxidu sodného 50 mmol/l.



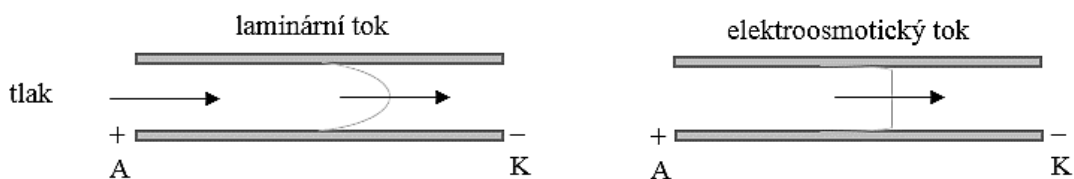
Obr. 9 – Vliv koncentrace NaOH v základním elektrolytu (22,5 mM Na₂HPO₄ + 0,2 mM CTAB); průměr kapiláry 10 μm, celková délka 50,0 cm/délka k detektoru 35,0 cm, dávkování 5 kPa 70 s, vkládané napětí -30 kV; (1) Neu5Ac, (2) Xyl, (3) Man, (4) GlcNAc, (5) GalNAc, (6) Glc, (7) Gal, (8) Fuc

Tabulka 3 – Hodnoty disociačních konstant pro jednotlivé monosacharidy

Analyt	pKa
<i>N</i> -acetylneuraminová kyselina	3,02 [46]
Xylosa	12,29 [1]
Manosa	12,08 [1]
<i>N</i> -acetylglukosamin	11,56 [46]
<i>N</i> -acetylgalaktosamin	11,60 [46]
Glukosa	12,28 [1]
Galaktosa	12,35 [1]
Fukosa	-

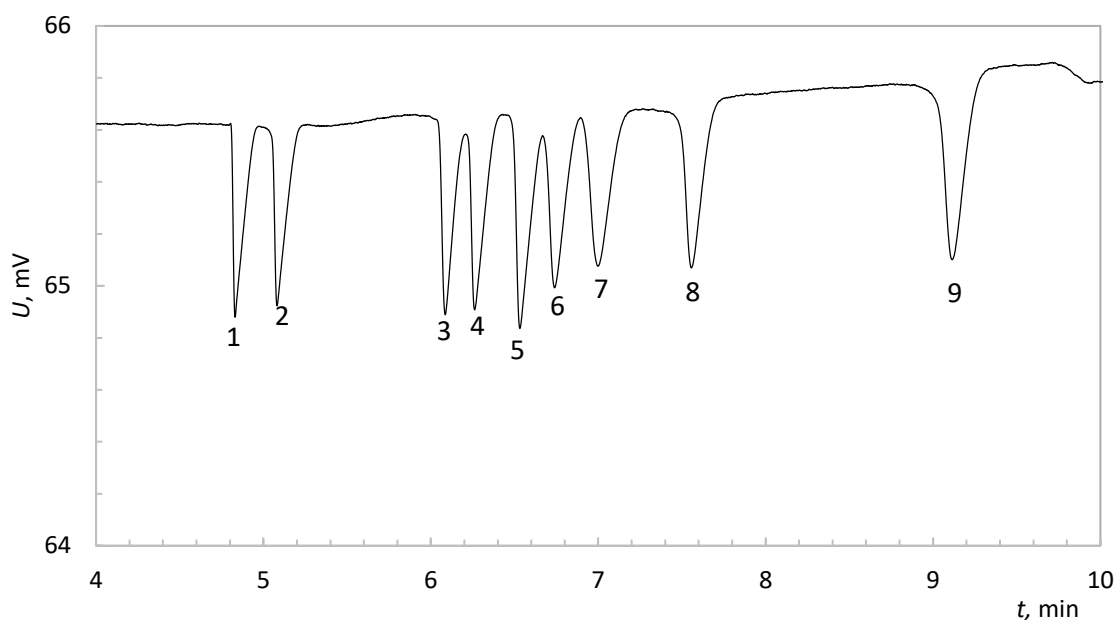
Pořadí analytů (Obr. 9) bylo ve všech případech *N*-acetylneuraminová kyselina, xylosa, manosa, *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylgalaktosamin, glukosa, galaktosa a fukosa. Z tabulky 3 lze u Man, Glc a Gal pozorovat trend pořadí migrace dle narůstající hodnoty pKa, prostorově jsou si tyto 3 monosacharidy nejvíce podobné, jejich pořadí tedy závisí převážně na velikosti náboje. Dále je zřejmé, že Neu5Ac migruje nejrychleji, protože je v takto silně bazickém elektrolytu vlivem své hodnoty pKa nejvíce nabitá. Xylosa migruje i přes větší hodnotu pKa rychleji, což je dáno její velikostí, jako jediná je totiž pentosa. Protože jsou *N*-acetylované hexosaminy více nabité, měly by migrovat rychleji než hexosy, připojením acetylu se však zvětšuje jejich velikost a tím pádem migrují pomaleji než manosa. Hodnotu pKa pro Fuc jsem nenalezla, její pořadí je ale pravděpodobně dáno tím, že oproti Man, Glc a Gal má jako jediná hexosa o jeden hydroxyl méně a je tedy i méně nabitá. Kombinace prostorového uspořádání a velikost náboje daná hodnotou pKa způsobuje velmi podobnou pohyblivost všech analyzovaných monosacharidů, proto dochází k nedostatečnému rozlišení.

Jak již bylo zmíněno, s rostoucím časem trvání migrace analytů v kapiláře lze dosáhnout lepšího rozlišení, čehož lze docílit vkládáním protisměrného tlaku. Na výstupní vialku lze po čas separace aplikovat přednastavený tlak 10 kPa, vkládáním tohoto tlaku však došlo jen k mírnému zlepšení, proto jsem se nakonec rozhodla na elektroforetický systém připojit externí tlakovou lahev s dusíkem a aplikovat tak mnohem větší tlak na výstupní vialku. Jako optimální jsem zvolila hodnotu 270 kPa, což umožnilo separovat píky téměř na základní linii (Obr. 11). Použitím nižšího tlaku se standardy nedělily a použitím většího tlaku docházelo k chvostování píků vlivem parabolického profilu toku v kapiláře, jak je naznačeno na Obr. 10.



Obr. 10 – Profily laminárního a elektroosmotického toku

Kombinace přídatku CTAB a vkládaného vysokého tlaku na daný systém měla za následek snížení opakovatelnosti migračních času standardů monosacharidů, proto jsem se rozhodla přidávat vnitřní standard 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonovou kyselinu (HEPES), viz kapitola 4.3 Opakovatelnost. Tento vnitřní standard jsem zvolila na základě podobných vlastností (zejména mobility, zjištěno v programu PeakMaster), jaké mají dané monosacharidy. Hlavní podmínkou však je, že vnitřní standard musí být dostatečně rozlišený od ostatních píků, což v tomto případě platí.



Obr. 11 – Elektroforegram 8 stanovovaných standardů, BGE 50 mM NaOH + 22,5 mM Na₂HPO₄ + 0,2 mM CTAB; průměr kapiláry 10 μm, celková délka, 50,0 cm/délka k detektoru 35,0 cm, dávkování 5 kPa 70 s, vkládané napětí -30 kV, tlak vkládaný na výstupní vialku 270 kPa; (1) HEPES, (2) Neu5Ac, (3) Xyl, (4) Man, (5) GlcNAc, (6) GalNAc, (7) Glc, (8) Gal, (9) Fuc

4.2 Kalibrace

Tabulku kalibračních parametrů (Tabulka 4) jsem sestrojila z dat získaných měření standardů vybraných monosacharidů o koncentracích 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,25 a 0,5 mg/ml. Všechna měření jsem prováděla ve třech opakováních a pro výpočet daných parametrů jsem použila medián těchto hodnot.

Tabulka 4 – Parametry kalibračních závislostí optimalizované metody pro všechny analyzované monosacharidy. Kalibrační rozsah 0,03-0,5 mg/ml, $n = 3$; k – směrnice, s_k – směrodatná odchylka směrnice, b – úsek, s_q – směrodatná odchylka úseku, R^2 – koeficient determinance, LOD – mez detekce, LOQ – mez stanovitelnosti

Analyt	k [mV·s·ml/mg]	s_k	q [mV·s]	s_q	R^2	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
<i>N</i> -acetylneuraminová k.	8,14	0,15	-0,20	0,03	0,9992	0,005	0,016
Xylosa	5,56	0,04	+0,01	0,01	0,9997	0,005	0,017
Manosa	5,87	0,05	+0,01	0,01	0,9997	0,005	0,018
<i>N</i> -acetylglukosamin	5,63	0,06	+0,05	0,01	0,9995	0,005	0,017
<i>N</i> -acetylgalaktosamin	6,48	0,07	-0,08	0,02	0,9995	0,006	0,021
Glukosa	6,24	0,08	+0,04	0,02	0,9993	0,007	0,022
Galaktosa	7,59	0,09	-0,04	0,02	0,9994	0,005	0,018
Fukosa	8,49	0,08	0,00	0,02	0,9995	0,005	0,018

Na základě T-testu na dvoustranném intervalu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsem určila, že velikost úseku je pro všechny naměřené analyty statisticky významná, protože dané hodnoty převyšují kritickou hodnotu 2,26. Všechny hodnoty R^2 byly vyšší než 0,999, vynesemím logaritmické závislosti relativní plochy na koncentraci jsem určila, že všechny hodnoty korelačního koeficientu určujícího linearitu byly větší než 0,95. Nejnižší detekovatelné koncentrace (LOD) optimalizované metody stanovení monosacharidů se pohybují v rozmezí od 5 do 7 mg/l a nejnižší stanovitelné koncentrace (LOQ) se pohybují od 16 do 22 mg/l.

4.3 Opakovatelnost

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů píků jsem provedla deset po sobě jdoucích měření všech 8 standardů o koncentraci 0,2 mg/ml s přídatkem vnitřního standardu HEPES o stejné koncentraci. Z tabulky 5 a 6 je zřejmé, že vztažením jak ploch, tak migračních časů na vnitřní standard dojde k podstatnému snížení relativních směrodatných odchylek. Relativní směrodatné odchylky ploch vztažených na vnitřní standard HEPES se pohybovaly od 0,8 do 3,5 % a relativní směrodatné odchylky migračních časů vztažené na vnitřní standard HEPES se pohybovaly od 0,2 do 1,4 %.

Tabulka 5 – Naměřené a vypočtené hodnoty opakovatelnosti ploch píků standardů Neu5Ac o koncentraci 0,15 mg/ml a Xyl, Man, GlcNAc, GalNAc, Glc, Gal, Fuc o koncentraci 0,2 mg/ml;

A – plocha píku, A_{rel} – relativní plocha píku vztažená na vnitřní standard HEPES,

s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka

A [mV·s]									
	HEPES	Neu5Ac	Xyl	Man	GlcNAc	GalNAc	Glc	Gal	Fuc
1	2,84	2,71	3,02	3,37	3,83	3,36	3,91	4,06	5,04
2	2,99	2,95	3,26	3,52	3,9	3,57	4,08	4,2	5,16
3	2,73	2,49	2,90	3,25	3,52	3,17	3,78	3,95	4,79
4	2,90	2,72	3,09	3,41	3,75	3,38	4,01	4,10	5,19
5	2,76	2,51	2,88	3,20	3,58	3,19	3,85	4,10	4,71
6	2,65	2,33	2,78	3,08	3,47	3,14	3,63	3,73	4,73
7	2,77	2,50	2,92	3,17	3,63	3,30	3,78	3,93	4,82
8	2,76	2,55	2,95	3,27	3,45	3,09	3,79	3,72	4,76
9	2,67	2,40	2,80	3,12	3,37	2,90	3,65	3,54	4,52
10	2,71	2,53	2,82	3,25	3,52	3,04	3,70	3,60	4,59
s	0,10	0,17	0,14	0,13	0,16	0,18	0,14	0,22	0,22
s_r [%]	3,58	6,63	4,77	3,95	4,58	5,70	3,67	5,62	4,47

A_{rel}									
	Neu5Ac	Xyl	Man	GlcNAc	GalNAc	Glc	Gal	Fuc	
1	0,95	1,06	1,19	1,35	1,18	1,38	1,43	1,77	
2	0,99	1,09	1,18	1,30	1,19	1,36	1,40	1,73	
3	0,91	1,06	1,19	1,29	1,16	1,38	1,45	1,75	
4	0,94	1,07	1,18	1,29	1,17	1,38	1,41	1,79	
5	0,91	1,04	1,16	1,30	1,16	1,39	1,49	1,71	
6	0,88	1,05	1,16	1,31	1,18	1,37	1,41	1,78	
7	0,90	1,05	1,14	1,31	1,19	1,36	1,42	1,74	
8	0,92	1,07	1,18	1,25	1,12	1,37	1,35	1,72	
9	0,90	1,05	1,17	1,26	1,09	1,37	1,32	1,69	
10	0,93	1,04	1,20	1,30	1,12	1,37	1,33	1,69	
s	0,03	0,01	0,02	0,03	0,03	0,01	0,05	0,03	
s_r [%]	3,18	1,33	1,33	1,98	2,98	0,72	3,53	1,99	

Tabulka 6 – Naměřené a vypočtené hodnoty opakovatelnosti migračních časů píků standardů Neu5Ac o koncentraci 0,15 mg/ml, Xyl, Man, GlcNAc, GalNAc, Glc, Gal, Fuc o koncentraci 0,2 mg/ml; t_m – migrační čas píku, t_{rel} – relativní čas píku vztažený na vnitřní standard HEPES, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka

	t_m [min]								
	HEPES	Neu5Ac	Xyl	Man	GlcNAc	GalNAc	Glc	Gal	Fuc
1	4,82	5,06	6,03	6,21	6,48	6,68	6,93	7,48	9,02
2	4,83	5,07	6,06	6,24	6,51	6,72	6,97	7,52	9,08
3	4,83	5,08	6,06	6,24	6,51	6,71	6,96	7,51	9,06
4	4,79	5,03	5,99	6,16	6,43	6,63	6,87	7,41	8,90
5	4,80	5,06	6,06	6,23	6,49	6,70	6,95	7,51	9,05
6	4,88	5,15	6,18	6,36	6,63	6,84	7,11	7,69	9,31
7	4,90	5,16	6,20	6,38	6,66	6,87	7,14	7,72	9,36
8	4,77	5,00	5,91	6,09	6,36	6,54	6,77	7,29	8,73
9	4,82	5,06	5,98	6,17	6,45	6,64	6,86	7,39	8,88
10	4,77	5,01	5,93	6,11	6,38	6,56	6,80	7,32	8,78
s	0,04	0,05	0,09	0,09	0,09	0,10	0,11	0,13	0,19
s_r [%]	0,83	0,99	1,49	1,44	1,43	1,52	1,64	1,79	2,16

	t_{rel}								
	Neu5Ac	Xyl	Man	GlcNAc	GalNAc	Glc	Gal	Fuc	
1	1,05	1,25	1,29	1,35	1,39	1,44	1,55	1,87	
2	1,05	1,25	1,29	1,35	1,39	1,44	1,56	1,88	
3	1,05	1,25	1,29	1,35	1,39	1,44	1,56	1,88	
4	1,05	1,25	1,29	1,34	1,38	1,43	1,55	1,86	
5	1,05	1,26	1,30	1,35	1,39	1,45	1,56	1,88	
6	1,05	1,27	1,30	1,36	1,40	1,46	1,58	1,91	
7	1,05	1,27	1,30	1,36	1,40	1,46	1,58	1,91	
8	1,05	1,24	1,28	1,33	1,37	1,42	1,53	1,83	
9	1,05	1,24	1,28	1,34	1,38	1,42	1,53	1,84	
10	1,05	1,24	1,28	1,34	1,38	1,42	1,53	1,84	
s	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	
s_r [%]	0,21	0,74	0,67	0,65	0,75	0,88	1,04	1,39	

4.4 Výtěžnost

Výtěžnost optimalizované metody byla otestována z měření standardů Neu5Ac o koncentraci 0,15 mg/ml a Xyl, Man, GlcNAc, GalNAc, Glc, Gal, Fuc o koncentraci 0,2 mg/ml. Výtěžnost byla spočítána jako procentuální poměr stanovených a skutečných hodnot koncentrací analyzovaných monosacharidů.

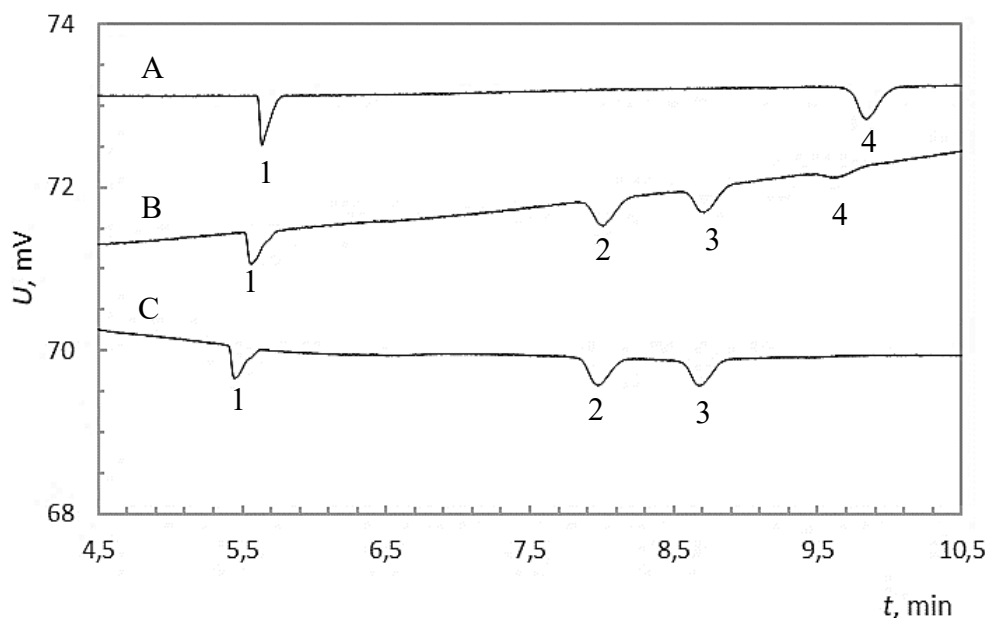
Tabulka 7 – Vypočtené hodnoty výtěžnosti z měření standardů; c_{skut} – reálně naměřené hodnoty koncentrace, c_{teor} – teoretické hodnoty koncentrace, R – výtěžnost

	Neu5Ac	Xyl	Man	GlcNAc	GalNAc	Glc	Gal	Fuc
c_{stan} [mg/ml]	0,14	0,19	0,20	0,19	0,19	0,21	0,19	0,20
c_{skut} [mg/ml]	0,15	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
R [%]	92	94	99	94	95	107	95	102

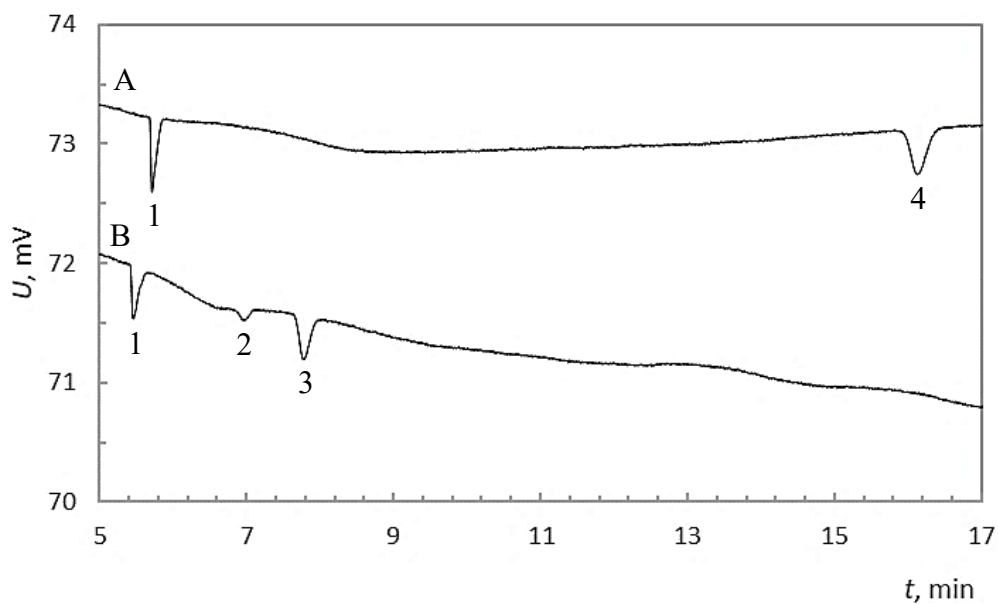
Výtěžnost (tabulka 7) se pohybovala od 92 do 107 %, což vypovídá o správnosti metody.

4.5 Hydrolýza oligosacharidů

Na standardech disacharidů laktosy a sacharosy jsem testovala vhodný způsob hydrolýzy oligosacharidů na jednotlivé monosacharidy. Na základě rešerše jsem pro kyselou hydrolýzu zvolila kyselinu chlorovodíkovou o koncentraci 4 mol/l, oba disacharidy jsem hydrolyzovala odděleně v polypropylenové mikrozkuhavce v blokové lázni při 50, 80 a 100 °C. Po pětiminutových intervalech jsem z každé zkuhavky odebírala 60 µl do vialky, přidala vnitřní standard HEPES a doplnila do celkového objemu 600 µl. Jako nejvhodnější teplotu jsem určila 100 °C (Obr. 12 a Obr. 13), k úplné hydrolýze laktosy došlo do 10 minut, v případě sacharosy dokonce do 5 minut. Použitím nižší teploty se pouze prodloužil čas hydrolýzy, navíc docházelo k deformaci píku HEPES. Následně jsem na standardu laktosy testovala vhodnou koncentraci kyseliny chlorovodíkové pro hydrolýzu, mimo 4M HCl jsem použila ještě 2M a 6M. Použitím 2M kyseliny došlo k prodloužení hydrolýzy z 10 minut na 20 minut a při použití 6M kyseliny docházelo jak k deformaci píku HEPES, tak k výraznému zhoršení základní linie, proto jsem jako optimální zvolila původní koncentraci 4 mol/l.



Obr. 12 - Průběh hydrolyzy 2 mg/ml laktosy v 4M kyselině chlorovodíkové, (A) – před začátkem hydrolyzy, (B) – po 5 minutách, (C) – po 10 minutách; průměr kapiláry 10 μm , celková délka 50,0 cm/délka k detektoru 35,0 cm, dávkování 5 kPa 70 s, vkládané napětí -30 kV; (1) HEPES, (2) Glc, (3) Gal, (4) laktosa



Obr. 13 – Průběh hydrolyzy 2 mg/ml sacharosy v 4M kyselině chlorovodíkové, (A) – před začátkem hydrolyzy, (B) – po 5 minutách; průměr kapiláry 10 μm , celková délka 50,0 cm/délka k detektoru 35,0 cm, dávkování 5 kPa 70 s, vkládané napětí -30 kV; (1) HEPES, (2) Glc, (3) fruktosa, (4) sacharosa

V rámci experimentu byl nakonec otestován vliv kyseliny chlorovodíkové v matrici vzorku. Přeměřením standardů glukosy a galaktosy o koncentracích 0,05; 0,1 a 0,2 mg/ml s přidavkem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,4 mol/l a následným dosazením získaných hodnot relativních ploch do kalibrační přímky jsem určila, že kyselina chlorovodíková ve vzorku o dané koncentraci nemá vliv na stanovení. Jak uvádí tabulka 8, míra odchýlení byla pro jednotlivé koncentrace maximálně 5 %.

Tabulka 8 – Vliv kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,4 mol/l na stanovení, c_{stan} – stanovená koncentrace, s_r – relativní směrodatná odchylka, c_{skut} – skutečná koncentrace, R – výtěžnost

	Glc _{0,2}	Gal _{0,2}	Glc _{0,1}	Gal _{0,1}	Glc _{0,05}	Gal _{0,05}
c_{stan} [mg/ml]	0,208	0,208	0,105	0,103	0,052	0,052
s_r [%]	4,29	4,29	3,52	2,71	2,86	2,86
c_{skut} [mg/ml]	0,20	0,20	0,10	0,10	0,05	0,05
R [%]	104	104	105	103	104	104

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byl vývoj metody pro separaci a stanovení sacharidových jednotek glykoproteinů, konkrétně glukosy, galaktosy, manosy, fukosy, *N*-acetylglukosaminu, *N*-acetylgalaktosaminu, *N*-acetylneuraminové kyseliny a xylosy. Během práce jsem optimalizovala složení základního elektrolytu na 50mM hydroxid sodný + 22,5 mM hydrogenfosforečnan sodný a 0,2 mM CTAB o celkovém pH = 12,4, způsob dávkování na hydrodynamické pomoci tlaku 10 kPa po dobu 70 s, vkládané napětí na -30 kV a vkládaný tlak 270 kPa po dobu celé analýzy na výstupní vialku. Následně jsem otestovala opakovatelnost měření takto optimalizované metody, relativní směrodatné odchylky ploch vztažených na vnitřní standard HEPES se pohybovaly od 0,8 do 3,5 % a relativní směrodatné odchylky migračních časů vztažené na vnitřní standard HEPES se pohybovaly od 0,2 do 1,4 %, což značí velmi dobrou opakovatelnost. Dále byla proměřena kalibrační závislost, přičemž všechny hodnoty R^2 byly vyšší než 0,999, z naměřené kalibrace byly dále stanoveny meze detekce pohybující se od 5 do 7 mg/l a meze stanovitelnosti pohybující se od 16 do 22 mg/l. Výtěžnost metody se pro jednotlivé monosacharidy pohybovala od 92 do 107 %, to vypovídá o celkové správnosti metody.

Nakonec jsem optimalizovala postup hydrolýzy oligosacharidů před jejich separací. Vhodnou koncentraci kyseliny chlorovodíkové pro hydrolýzu disacharidů laktosy a sacharosy jsem určila jako 4 mol/l, vhodnou teplotu hydrolýzy v blokové lázni pak na 100 °C. K úplné hydrolýze laktosy na glukosu a galaktosu došlo do 10 minut, k hydrolýze sacharosy na glukosu a fruktosu dokonce do 5 minut. Závěrem jsem přeměřením několika kalibračních bodů zjistila, že HCl o koncentraci 0,4 mol/l ve vzorku nemá vliv na separaci.

Seznam použité literatury

- [1] J. Žídková a J. Chmelík, „Kapilární elektroforéza sacharidů,“ *Chemické listy* 94, pp. 1093-1103, 2000.
- [2] M. Kodíček, O. Valentová a R. Hynek, BIOCHEMIE chemický pohled na biologický svět, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015.
- [3] R. Maughan, „Carbohydrate metabolism,“ *Surgery (Oxford)*, č. 21, pp. 6-10, 2009.
- [4] X. Yan, „HPLC for Carbohydrate Analysis,“ v *HPLC Principle, Practices and Procedures*, Nova Science, 2014.
- [5] V. Morales, N. Corzo a M. L. Sanz, „HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups,“ *Food Chemistry*, č. 107, pp. 922-928, 2008.
- [6] N. H. Low a P. Sporns, „Analysis and quantification of minor di and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography,“ *Journal of Food Science*, č. 53 (2), pp. 558-561, 1988.
- [7] A. G. W. Bradbury, „Gas chromatography of carbohydrates in food,“ v *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*, Boston, Springer, 1990, pp. 111-144.
- [8] L. Michalicová a Z. Glatz, „Nové směry ve studiu biomolekulárních interakcí pomocí kapilární elektroforézy,“ *Chemické listy*, č. 110, pp. 259-257, 2016.
- [9] S. Cortacero-Ramirez a kolektiv, „Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with,“ *Food chemistry*, p. 471–476, 2004.
- [10] S. Rovio, J. Yli-Kauhaluoma a H. Sirén, „Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection,“ *Electrophoresis*, č. 28, pp. 3129-3135, 2007.

- [11] S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann a H. M. Widmer, „Influence of Borate Complexation on the Electrophoretic,“ *Analytical chemistry*, č. 63, pp. 1541-1547, 1991.
- [12] I. Delidovich a R. Palkovits, „Catalytic Isomerization of Biomass-Derived Aldoses: A Review,“ *ChemSusChem*, č. 9(6), pp. 547-561, 2016.
- [13] J. Damn a G. Overkluft, „Indirect UV detection as a non-selective detection method in the qualitative and quantitative analysis of heparin fragments by high-performance capillary electrophoresis,“ *Journal of Chromatography A*, č. 678, pp. 151-165, 1994.
- [14] A. V. Jager, F. G. Tonin a M. F. M. Tavares, „Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis,“ *Journal of separation science*, č. 30, pp. 586-594, 2007.
- [15] J. Plocek a J. Chmelik, „Separation of disaccharides as their borate complexes by capillary electrophoresis with indirect detection in visible range,“ *Electrophoresis*, č. 18, pp. 1148-1152, 1997.
- [16] N. Volpi, *Capillary electrophoresis of carbohydrates: from monosaccharides to complex polysaccharides*, New York: Humana/Springer, 2011.
- [17] Z. El Rassi a Y. Mechref, „Recent advances in capillary electrophoresis of carbohydrates,“ *Electrophoresis*, č. 17, pp. 275-301, 1996.
- [18] P. Tůma, K. Málková, E. Samcová a K. Stulík, „Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection,“ *Analytica Chimica Acta*, č. 698, pp. 1-5, 2011.
- [19] A. Carvalho, J. da Silva a C. do Lago, „Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection,“ *Electrophoresis*, č. 24, p. 2138–2143, 2003.

- [20] <http://www.brainkart.com/>, „Capillary Electrophoresis Methods,“ [online] 31.05.2020.
- [21] A. Varki, *Essentials of glycobiology*, 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [22] K. R. Murray, *Harper's illustrated biochemistry*, 26th ed., New York: McGraw–Hill, 2003.
- [23] R. J. Solá a K. Griebenow, „Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals,“ *Journal of Pharmaceutical Sciences*, č. 98(4), pp. 1223-1245, 2009.
- [24] D. H. Dube a C. R. Bertozzi, „Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics,“ *Nature Reviews Drug Discovery*, č. 6, p. 477–488, 2005.
- [25] R. Šaldová, P. M. Rudd a J. Káš, „Změna glykosylace na sérových glykoproteinech u pacientek s rakovinou vaječníku pravděpodobně přispívá k patogenezi nemoci,“ *Chemické listy*, č. 103, pp. 386-393, 2009.
- [26] S. Bekesova, O. Kosti, K. B. Chandler, J. Wu, H. L. Madej, K. C. Brown, V. Simonyan a R. Goldman, „N-glycans in liver-secreted and immunoglobulin-derived protein fractions,“ *Journal of Proteomics*, č. 75(7), pp. 2216-2224, 2012.
- [27] J. Balogh, D. Victor, E. H. Asham, S. Gordon Burroughs, M. Boktour, A. Saharia, X. Li, R. M. Ghobrial a H. P. Monsour, „Hepatocellular carcinoma: a review,“ *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, č. 3, pp. 41-53, 2016.
- [28] P. Rawla, „Epidemiology of Prostate Cancer,“ *World journal of oncology*, č. 10(2), pp. 63-89, 2019.
- [29] R. Peracaula, G. Tabares, L. Royle, D. J. Harvey, R. A. Dwerk, P. M. Rudd a R. de Llorens, „Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumour origin,“ *Glycobiology*, č. 13, pp. 457-470, 2003.

- [30] S. Wopereis, S. Grünwald, E. Morava, J. M. Penzien, P. Briones, M. T. Garía-Silva, P. N. M. Demacker, K. M. L. C. Huijben a R. A. Wevers, „Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis,“ *Clinical chemistry*, č. 49(11), pp. 1839-1845, 2003.
- [31] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow a J. Novak, „Glycosylation in health and disease,“ *Nature Reviews Nephrology*, č. 15, pp. 346-366, 2019.
- [32] L. Beneš, „Bilogická terapeutika - bioléčiva,“ *Praktické lékárenství*, č. 4(6), pp. 292-297, 2008.
- [33] P. Klener, jr. a P. Klener, *Principy systémové protinádorové léčby*, Praha: Grada Publishing, a.s., 2013.
- [34] Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2017: 1.-4.díl*, Praha: Grada Publishing, 2017.
- [35] P. Kozlík, R. Goldman a M. Sanda, „Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC,“ *Electrophoresis*, č. 38(17), pp. 2193-2199, 2017.
- [36] P. Kozlík, R. Goldman a M. Sanda, „Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers,“ *Analytical and Bioanalytical chemistry*, č. 410, pp. 5001-5008, 2018.
- [37] J. Giorgetti, V. D'Atri, J. Canonge, A. Lechner, . D. Guillarme, . O. Colas, E. Wagner-Rousset, A. Beck, E. Leize-Wagner a Y.-N. François , „Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis - Mass spectrometry: assessment and method validation,“ *Talanta*, č. 178, pp. 530-537, 2018.

- [38] S. Ongay, P. J. Martín-Álvarez, C. Nesüß a M. de Frutos, „Statistical evaluation of CZE-UV and CZE-ESI-MS data of intact α -1-acid glycoprotein isoforms for their use as potential biomarkers in bladder cancer,“ *Electrophoresis*, č. 31, pp. 3314-3325, 2010.
- [39] S. Ongay a C. Nesüß, „Isoform differentiation of intact AGP from human serum by capillary electrophoresis-mass spectrometry,“ *Analytical and Bioanalytical chemistry*, č. 398(2), pp. 845-855, 2010.
- [40] H. Desaire, „Glycopeptide analysis, recent developments and applications,“ *Molecular & Cellular Proteomics*, č. 12(4), pp. 893-901, 2013.
- [41] J. P. Kamerling a G. J. Gerwig, „Strategies for the Structural Analysis of Carbohydrates,“ v *Comprehensive Glycoscience*, Utrecht, Elsevier, 2007, pp. 1-68.
- [42] A. Dell, S. Chalabi, P. G. Hitchen, J. Jang-Lee, V. Ledger, S. J. North, P. C. Pang, S. Parry, M. Sutton-Smith, B. Tissot, H. R. Morris, M. Panico a S. M. Haslam, „Mass Spectrometry of Glycoprotein Glycans: Glycomics and Glycoproteomics,“ v *Comprehensive Glycoscience*, Londýn, Elsevier, 2007, pp. 69-100.
- [43] M. H. Gey a K. K. Unger, „A strategy for chromatographic and structural analysis of monosaccharide species from glycoproteins,“ *Journal of Analytical chemistry*, č. 356, pp. 488-494, 1996.
- [44] N. Tran, Y. Daali, S. Cherkaoui, M. Taverna, J. Neeser a J. Veuthey, „Routine o-glycan characterization in nutritional supplements - a comparison of analytical methods for the monitoring of the bovine kappa-casein macropeptide glycosylation,“ *Journal of chromatography*, pp. 151-163, 2001.
- [45] W. M. Haynes, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 92. vydání, USA: CRC Press, 2011.
- [46] <https://www.drugbank.ca/> „DrugBank,“ [online] 30.05.2020.