

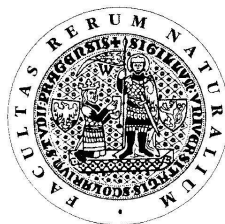
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



**Romana Velvarská**

**Separace a stanovení možných produktů enzymového štěpení  
4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosidu pomocí kapilární  
elektroforézy**

Separation and determination of possible products of enzymatic  
cleavage of 4-nitrophenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside using  
capillary electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Tomáš Křížek

Praha 2012

## **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 případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24.5.2012

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Tomáši Křížkovi za jeho cenné rady, připomínky, čas a hlavně trpělivost a ochotu, která mi byla věnována při řešení dané problematiky a následném vypracování této práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a projektu 710 Grantové agentury Univerzity Karlovy.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací podmínek metody, kterou lze využít k porovnání aktivity enzymu  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy při hydrolyze jejího přirozeného substrátu a tzv. chromogenního substrátu, který se často využívá při studiu enzymové kinetiky. Jako substrát pro štěpení byl zvolen 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid. Tento oligosacharid obsahuje vazbu, kterou enzym štěpí v přirozeném substrátu, a zároveň také vazbu, která se vyskytuje v substrátu chromogenním. Pro stanovení produktů, jež vznikají při enzymatické hydrolyze 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosidu byla využita kapilární zónová elektroforéza. Nejprve bylo nutno najít optimální složení základního elektrolytu, tedy jeho hodnotu pH a koncentraci. Optimálním základním elektrolytem byl roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mmol/l a hodnotě pH 10,25. Následně byla zjištěna opakovatelnost měření, kalibrační závislosti a linearita, limit detekce a limit kvantifikace. Opakovatelnost migračních časů se pohybovala do 0,6%, opakovatelnost plochy píků pak v rozmezí 2,5 až 6,3%. Limity detekce metody byly v rozmezí 0,005-0,120 mmol/l. Nakonec byla optimalizovaná metoda úspěšně použita ke sledování průběhu skutečného enzymového štěpení.

## Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, sacharidy, enzymová kinetika, beta-*N*-acetylhexosaminidasa

## Abstract

This work deals with the development and optimization of conditions of a method that can be used to compare the activity of the enzyme  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase in hydrolysis of a natural substrate and a chromogenic substrate, which is often used in the study of enzyme kinetics. As a substrate, 4-nitrophenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside was selected for cleavage. This oligosaccharide contains bond, which the enzyme cleaves in the natural substrate, and the bond that occurs in the chromogenic substrate. To determine the products arising from enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside, capillary zone electrophoresis was used. First, it was necessary to find the optimal composition of the electrolyte, its pH and concentration. The optimal background electrolyte was a solution of sodium tetraborate at a concentration of 25 mmol/l and a pH of 10.25.

Subsequently, repeatability, calibration curves and linearity, limit of detection and limit of quantification were investigated. Repeatability of migration times ranged up to 0.6%, the repeatability of peak areas between 2.5 and 6.3%. Limits of detection were ranging from 0.005 to 0.120 mmol/l. Finally, the optimized method was successfully used to monitor the actual enzyme cleavage.

## **Keywords**

Capillary electrophoresis, saccharides, enzyme kinetics, beta-*N*-acetylhexosaminidase

# Obsah

<b>1</b>	<b>Teoretický úvod</b>	<b>-9-</b>
	1.1 $\beta$ - <i>N</i> -acetylhexosaminidasa	-9-
	1.1.1 Struktura	-9-
	1.1.2 Aktivita	-10-
	1.2 4-nitrofenyl- <i>N,N'</i> -diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid	-11-
	1.3 Separační analytické metody	-13-
	1.4 Kapilární zónová elektroforéza	-13-
	1.4.1 Elektroforetická pohyblivost	-14-
	1.4.2 Elektroosmotický tok	-15-
	1.4.3 Základní instrumentace pro CZE	-16-
	1.5 Separace a stanovení sacharidů	-18-
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>-20-</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>-21-</b>
	3.1 Použité chemikálie a přístroje	-21-
	3.1.1 Chemikálie	-21-
	3.1.2 Příprava roztoků	-21-
	3.1.3 Přístrojové vybavení	-21-
	3.2 Optimální složení základního elektrolytu	-22-
	3.2.1 Závislost pohyblivostí jednotlivých sacharidů na pH	-22-
	3.2.2 Vliv koncentrace základního elektrolytu na separaci	-23-
	3.3 Opakovatelnost měření	-25-
	3.4 Kalibrační závislosti jednotlivých sacharidů	-25-
	3.5 Stanovení LOD a LOQ	-27-
	3.6 Enzymové štěpení	-27-
<b>4</b>	<b>Závěr</b>	<b>-29-</b>
<b>5</b>	<b>Použité zdroje</b>	<b>-30-</b>

## Použité zkratky

CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMF	dimethylformamid
EOF	elektroosmotický tok
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
HexB	hexosaminidasa <i>B</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
NP-Chitobiosa	4-nitrofenyl- <i>N,N'</i> -diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid
NP-GlcNAc	4-nitrofenyl- <i>N</i> -acetylglukosamin

## Použité symboly

$E$	intenzita elektrického pole
$F_E$	elektrická síla
$F_\eta$	třecí, frikční síla
$i$	hustota elektrického proudu
$L$	délka kapiláry
$m$	elektroforetická pohyblivost (mobilita)
$m_{eo}$	pohyblivost elektroosmotického toku
$Q$	elektrický náboj
$r$	hydratovaný poloměr iontu
$U$	napětí
$v$	rychlost pohybu částice
$v_{eo}$	rychlost elektroosmotického toku
$\zeta$	elektrokinetický potenciál
$\varepsilon$	dielektrická konstanta roztoku
$\kappa$	specifická vodivost prostředí
$\eta$	viskozita prostředí

## Seznam obrázků

- Obr. 1            Struktura 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosidu se znázorněným  
možným štěpením vazeb
- Obr. 2            Možné produkty enzymového štěpení NP-Chitobiosy
- Obr. 3            Zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu
- Obr. 4            Závislost pohyblivosti jednotlivých sacharidů na hodnotě pH
- Obr. 5            Elektroferogram separace sacharidů
- Obr. 6            Kalibrační závislost ploch píků na koncentraci jednotlivých sacharidů
- Obr. 7            Závislost koncentrace na reakčním čase vznikajících produktů  
při enzymovém štěpení NP-Chitobiosy  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou



# 1 Teoretický úvod

## 1.1 $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa

Ve všech živých organismech, ať prokaryotních či eukaryotních, probíhají chemické a biochemické reakce, které jsou katalyzovány vhodnými biomakromolekulami. K těmto účelům slouží specializované proteiny zvané enzymy. V dnešní době již bylo izolováno přes 3000 enzymů, které byly rozděleny do šesti hlavních skupin podle typu reakcí, které katalyzují. Jednou z těchto hlavních skupin jsou nejdéle známé enzymy zvané hydrolasy, jež katalyzují hydrolytické reakce (reakce, při nichž dochází ke štěpení chemické vazby molekulami vody) [1].

Jedním z těchto hydrolytických enzymů je  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa. Tento enzym je znám ve třech formách a to jako monomerní bakteriální, dimerní lidský a dimerní fungální. Fungální hexosaminidasa je velmi důležitá v životním cyklu hub, neboť katalyzuje procesy, při nichž se formují například septa či mikrotubuly. Jedná se o robustní enzym, jenž zůstává aktivní v oxidativním prostředí. Dále mezi jeho význačné vlastnosti patří i to, že je schopen hydrolyzovat chitobiosu stejně dobře jako vyšší chito-oligomery [2,3]. V následujícím experimentu byla použita k enzymatickému štěpení substrátu konkrétně  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum*.

### 1.1.1 Struktura

Základní strukturní uspořádání se skládá ze dvou katalytických podjednotek a dvou nekovalentně vázaných propeptidů. Nejprve se však váže jeden propeptid na jednu podjednotku, čímž ji chrání před destrukcí a teprve poté dochází k dimerizaci s další podjednotkou/propeptidem, neboť dimerizace je pomalejší proces [2]. Molekulová hmotnost jedné podjednotky činí 15 kDa. Přibližná molekulová hmotnost propeptidu je 65 kDa a v případě připojení dvou molekul, je molekulová hmotnost hexosaminidasy 160 kDa. Zmíněný propeptid funguje jako intracelulární regulátor regulující enzymatickou aktivitu, dimerizaci a také extracelulární sekreci [4]. Přestože je enzym v podstatě pH stabilní a má pH optimum, průběh dimerizace, jakožto reverzibilního procesu, je závislý na hodnotě pH. Do hodnoty pH 3,5 se vyskytuje hexosaminidasa jako dimerní, kolem hodnoty pH 2,5 je už známá pouze monomerní

forma, stále však s enzymatickou aktivitou. Po zvýšení pH dochází opět k dimerizaci [2].

### 1.1.2 Aktivita

Nezbytnou podmínkou aktivace je vazba O-glykosylovaných propeptidů na N-glykosylované katalytické podjednotky. Koncentraci propeptidu v endoplasmatickém retikulu si dokáže houba regulovat aktivně sama podle potřeby jednotlivých fází růstového cyklu. V exponenciální růstové fázi dochází k tvorbě hexosaminidasy jako vysoce aktivního enzymu, který obsahuje dvě molekuly propeptidu na jeden dimer. Při zkoumání obsahu volného propeptidu v endoplasmatickém retikulu a cytosolu se ukázalo, že koncentrace v endoplasmatickém retikulu je stále nízká z důvodu navázání propeptidu na podjednotky. Zatímco v cytosolu je koncentrace nepřímo úměrná obsahu hexosaminidasy vytvořené v endoplasmatickém retikulu. Ve stacionární fázi růstu, kdy se zpomaluje rychlost množení buněk, až dojde k ustanovení rovnováhy tj. počet buněk se přibližně nemění, byla zjištěna nejnižší koncentrace jak hexosaminidasy, tak volných molekul propeptidu v endoplasmatickém retikulu. Naopak v cytosolu byl zjištěn nejvyšší obsah volných propeptidů. Z toho lze usoudit, že houba reguluje množství volného mikrosomálního propeptidu v endoplasmatickém retikulu pomocí aktivního transportu do cytosolu.

Regulace enzymové aktivity u houbových hexosaminidas probíhá odlišně než u většiny enzymů, které jsou regulovány allostericky, což znamená, že potřebují regulátory, které způsobí konformační změnu, a tím pádem jejich aktivita je závislá na koncentraci těchto molekul. Naproti tomu u hexosaminidas dochází k sekreci dvou typů molekul a to jednoho plně aktivního, se dvěma propeptidy, a druhého s poloviční aktivitou, který má jeden propeptid. Studie zaměřené na kinetiku reakcí ukázaly, že nedochází k žádné kooperativě mezi oběma podjednotkami a propeptidy. Propeptidy I. třídy nebo také intramolekulární chaperony se nazývají ty propeptidy, jež jsou důležité pro správné složení polypeptidu a inhibují jeho aktivitu. Při aktivaci enzymu dojde k jejich uvolnění a znehodnocení. V plně aktivním enzymu se tedy nenacházejí. Dále jsou zde propeptidy II. třídy, které se neúčastní katalytických reakcí při skládání enzymů, ale jiných biologických procesů. U houbových hexosaminidas se ukázalo, že propeptidy (intermolekulární chaperony) udržují tyto enzymy v aktivním stavu

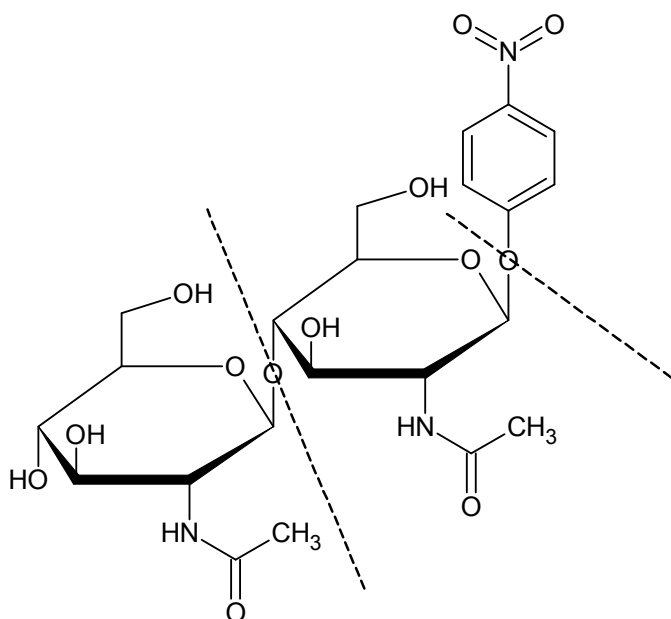
a zůstávají navázány na katalytické podjednotky. Neodštěpují se při aktivaci enzymu jako jiné propeptidy I. třídy. Pouze u lidské HexB se ukázalo, že propeptid zde inhibuje aktivitu enzymu, jelikož nedochází k jeho úplné degradaci při „dozrávání“ enzymu v lysozomu. Tento propeptid zůstává kovalentně vázán k podjednotkám prostřednictvím disulfidického můstku. U houbových hexosaminidas se neprokázaly zbytky cysteinu, tedy propeptidy jsou vázány na podjednotky nekovalentní vazbou, která je velmi stabilní [2].

Při studiích enzymové kinetiky hexosaminidas se velmi často využívá chromogenních substrátů, jejichž hydrolyzou vznikají látky, které absorbují v UV nebo VIS oblasti. Aktivita vůči těmto vazbám se může lišit oproti aktivitě vůči reálným vazbám. Tyto rozdíly lze sledovat například separačními analytickými metodami, jako je kapilární zónová elektroforéza.

## 1.2 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid

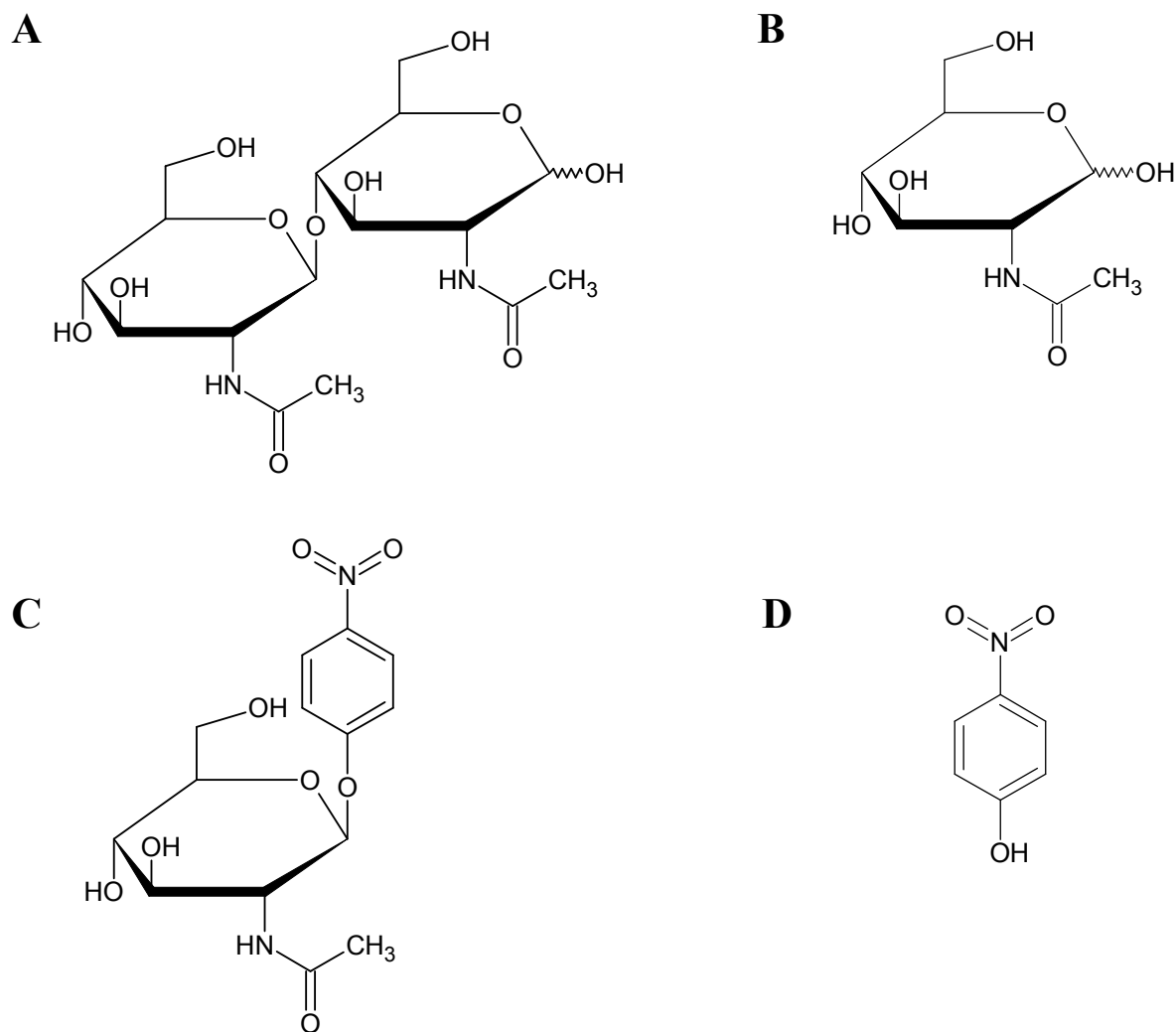
Jedním ze substrátů, jenž může být hydrolyzován  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou je 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid (NP-Chitobiosa). Rozpustnost v DMF činí 25 mg/ml, čímž lze získat světle nažloutlý roztok, avšak toto rozpouštědlo inhibuje aktivitu  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas. Rozpustný je i ve vodě, nicméně jeho koncentrace se pohybují kolem hodnoty 2 mmol/l, získaný roztok je čirý [5].

Ze základního strukturního vzorce na **obrázku 1** lze předpokládat možné produkty štěpení., které jsou znázorněny na **obrázku 2**.



**Obrázek 1** Struktura 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosidu se znázorněným možným štěpením vazeb.

Pokud dojde k hydrolýze jedné ze dvou O-glykosidických vazeb, očekávanými produkty štěpení budou jednak *N*-acetylglukosamin (GlcNAc) a jednak 4-nitrofenyl-*N*-acetylglukosamin (NP-GlcNAc). Dojde-li ke štěpení druhé O-glykosidické vazby, dalšími produkty mohou být *N,N'*-diacetylchitobiosa a 4-nitrofenol. Chitobiosa a NP-GlcNAc mohou být dále štěpeny enzymem na konečné produkty a tedy z původní molekuly substrátu vzniknout dvě molekuly GlcNAc a jedna molekula 4-nitrofenolu.



**Obrázek 2** Možné produkty enzymového štěpení NP-Chitobiosy. (A) Chitobiosa, (B) GlcNAc, (C) NP-GlcNAc, (D) 4-nitrofenol.

### 1.3 Separální analytické metody

V dnešní době se v analytické chemii využívají zejména tři druhy experimentálních metod, a to optické, elektroanalytické a separální. Vhodná metoda se zpravidla volí na základě vlastností analyzované látky a také s ohledem na cíl dané práce. Moderní doba vyžaduje stále nové objevy sloučenin a látek, které by mohly mít praktické využití jak v lékařství, tak v průmyslu a mnoha dalších oborech. Separální metody nám umožňují například odseparovat nežádoucí sloučeniny ze směsí, nebo naopak izolovat konkrétní produkty chemických reakcí či pouze oddělit jednotlivé složky pro další analýzu. V analytickém měřítku potom umožňují vysoce selektivní stanovení jednotlivých složek vzorku prostřednictvím jejich separace a následné detekce vhodnou detekční technikou.

Jednou z podskupin těchto metod jsou metody chromatografické, založené na separaci látek mezi dvěma fázemi, kde dochází k ustanovení různých typů rovnováh např. sorpční, rozpouštěcí nebo iontově výměnné. Mezi separální techniky dále patří tzv. elektromigrační metody, kdy dochází k separaci látek na základě jejich rozdílné elektroforetické migrace v elektrickém poli. Separální proces probíhá v tenkostěnné kapiláře, jejíž vnitřní průměr činí několik desítek mikrometrů, což zajišťuje velmi malou spotřebu vzorku a dalších činidel. Podle mechanismu separace a druhu media v tenkostěnné kapiláře lze rozdělit kapilární elektromigrační metody na šest základních technik a to kapilární zónovou a gelovou elektroforézu, micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii, elektrochromatografii v naplněných kapilárách, kapilární izoelektrické fokusování a kapilární izotachoforézu [5,6].

### 1.4 Kapilární zónová elektroforéza

S prvními studii elektroforetických technik přišel Mikkers [7,8] v roce 1979 a o dva roky později Lukacs s Jorgensonem [9] tyto metody blíže specifikovali. Teprve v posledních dvaceti letech však můžeme pozorovat náhlý zájem a rozvoj hlavně kapilární zónové elektroforézy (CZE), nejjednodušší elektroforetické metody. Zájem roste zejména v oblasti farmacie, kdy se začíná používat jako další kontrolní metoda čistoty léků spolu s HPLC. Také se ukázalo, že je tato technika vhodná pro separaci přírodních látek, které vykazují farmakologickou či biologickou aktivitu vhodnou

pro farmaceutický či kosmetický průmysl a mnoho dalších odvětví. Kapilární zónovou elektroforézou lze účinně separovat molekuly velké i malé [10].

Kapilární elektroforéza je vhodná metoda pro separaci látek s nábojem, který získaly disociací nebo protonizací [5]. Následně dochází k uspořádanému pohybu nabitých částic, v důsledku působení elektrického pole, ve kterém jsou urychlovány silou  $F_E$ . Tato síla je přímo úměrná jak náboji částice  $Q$ , tak intenzitě působícího elektrického pole  $E$ .

$$F_E = QE \quad (1)$$

Pohyb nabitých částic vlivem elektrického pole v kapiláře nazýváme elektroforetickou migrací. Částice s kladným nábojem se pohybují směrem ke katodě a částice se záporným nábojem směřují k anodě. Dalším transportním jevem je pak elektroosmotický tok kapaliny kapilárou.

Dále je nutno zmínit, že proti působící síle  $F_E$  působí opačně orientovaná třecí neboli frikční síla  $F_\eta$ , která se řídí Stokesovým zákonem, je tedy závislá na rozměrech částice (hydratovaném poloměru  $r$ ), viskozitě prostředí  $\eta$  a na rychlosti pohybu částice  $v$  a to přímo úměrně [6].

$$F_\eta = -6\pi\eta r v \quad (2)$$

#### 1.4.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost (mobilita)  $m$  patří mezi důležité veličiny transportních jevů, které se uplatňují při migraci iontů. Pohyblivost je definována jako podíl rychlosti nabitých částic  $v$  v kapalném prostředí a intenzity stejnosměrného elektrického pole  $E$ .

$$m = \frac{v}{E} \quad (\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}) \quad (3)$$

Intenzitu pole v kapiláře lze vyjádřit jako podíl napětí  $U$  vloženého mezi konce kapiláry a délky kapiláry  $L$ , což je zároveň rovno podílu hustoty elektrického proudu  $i$  a specifické vodivosti prostředí  $\kappa$ .

$$E = \frac{U}{L} = \frac{i}{\kappa} \quad (\text{Vm}^{-1}) \quad (4)$$

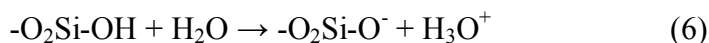
Pokud nastane tzv. ustálený stav, tedy rovnováha mezi působící elektrickou a frikční silou tj.  $F_E = -F_\eta$  (síla  $F_\eta$  má opačný směr než síla  $F_E$ ), lze odvodit vztah pro pohyblivost  $m$  ve tvaru:

$$m = \frac{Q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

V závislosti na podmínkách se hovoří o několika druzích pohyblivosti. Bude-li se jednat o ionty silného elektrolytu, označuje se jejich pohyblivost jako aktuální, neboť se vztahuje k dané iontové síle a teplotě. Bude-li roztok nekonečně zředěný, jedná se o limitní pohyblivost, jejíž hodnoty jsou tabelovány pro teplotu 25 °C jako konstanty daných iontů. Pro pohyblivost slabých elektrolytů platí jistá závislost na jejich disociaci, která se řídí hodnotou pH. Při specifické hodnotě pH, iontové síly a teploty vykazují ionty určitou efektivní pohyblivost. Závislosti efektivní pohyblivosti na pH se využívá při optimalizaci separace, kdy se hledá pH, při kterém jsou pohyblivosti jednotlivých iontů dostatečně rozdílné pro úplnou separaci [11].

#### 1.4.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmóza je druhým transportním jevem, který probíhá v kapilárách. Ačkoliv k samotné separaci jednotlivých složek nepřispívá, má vliv na výslednou migrační rychlost všech látek, tedy účinnost a dobu separace. Projevuje se jako důsledek působení stejnosměrného elektrického pole, jež se vytvoří vložením napětí na elektrody umístěné na koncích kapiláry. Na vnitřní stěně kapiláry se pak vytvoří tzv. elektrická dvojvrstva mezi pevnou fází kapiláry a kapalnou fází nosného elektrolytu. Tato dvojvrstva vzniká díky selektivní adsorpci jednoho druhu iontů nebo disociaci ionogenních skupin, jako jsou v případě křemenných kapilár silanolové skupiny ( $\equiv\text{Si-OH}$ ), jež vznikly hydrolyzou původních siloxanových skupin ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ). Takto vzniklé skupiny následně podléhají disociaci, čímž dostává vnitřní povrch kapiláry negativní náboj, jak je vidět v následující rovnici:



Vzniklé kationty, v tomto případě oxoniové, pak vytvářejí druhou část dvojvrstvy, označovanou též jako difuzní, která je pozitivně nabitá. Pohyb této vrstvy, který je způsoben vloženým napětím, se označuje jako elektroosmotický tok a je důsledkem migrace hydratovaných vodíkových iontů ke katodě [5].

Rychlost tohoto toku  $v_{eo}$  ( $\text{m s}^{-1}$ ) lze vyjádřit pomocí intenzity elektrického pole  $E$  a veličiny zvané elektroosmotická mobilita  $m_{eo}$  ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) podle vztahu:

$$v_{eo} = m_{eo} E \quad (7)$$

Pohyblivost  $m_{eo}$  závisí nepřímo úměrně na viskozitě roztoku  $\eta$  a přímo úměrně na elektrokinetickém potenciálu  $\zeta$ .  $\epsilon$  je dielektrická konstanta daného roztoku.

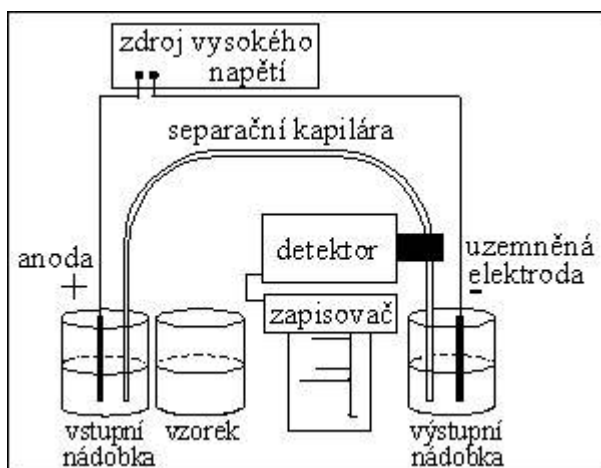
$$m_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (8)$$

Pohyblivost elektroosmotického toku může být vyšší než elektroforetická pohyblivost iontů, neboť elektrokinetický potenciál je závislý na hodnotě pH elektrolytu. V rozmezí pH 3-8 se elektroosmotický tok 4-5krát zvyšuje [11]. V případě, že elektroosmotická pohyblivost skutečně přesáhne pohyblivost některých aniontů, tyto ionty se potom ve výsledku pohybují směrem ke katodě, a je tedy možné je stanovit v jednom experimentu spolu s kationty.

### 1.4.3 Základní instrumentace pro CZE

Mezi základní části patří křemenná separační kapilára, vstupní a výstupní nádobka, zdroj vysokého napětí, elektrody, detektor a zapisovač. Zapojení a přesné uspořádání je znázorněno na **obrázku 3**.





**Obrázek 3** Zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu [12].

Vstupní a výstupní nádobka je naplněna separačním pufrem, pracuje se s napětím v rozmezí 10-30 kV, neboť při vyšších hodnotách je příliš vysoký proud (neměl by přesáhnout hodnotu 100  $\mu\text{A}$ ) a dochází pak k nadměrnému ohřevu vnitřního prostoru kapiláry, což může mít značně negativní vliv na separaci analytů. Používané kapiláry se vyrábí z taveného křemene a potahují se žluto-hnědou vrstvou polyimidu, který jim dodává pružnost. Bez této vrstvy jsou kapiláry velice křehké a snadno se lámou. Vnější průměr takto potažených kapilár činí 375  $\mu\text{m}$ , vnitřní průměr se u kapilár pro CZE pohybuje mezi 25-100  $\mu\text{m}$ . U kapilár s menším vnitřním průměrem je nižší rozsah difúze složek vzorku a lepší odvod tepla, jež vzniká průchodem elektrického proudu. Výsledkem je poté velmi malé rozmytí zón jednotlivých látek a zkrácení doby separace, jelikož lze použít vyšší napětí. Na druhé straně klesá s klesajícím průměrem kapiláry délka optické dráhy nejběžněji používaného absorpčního spektrometrického detektoru a s ní klesá i citlivost detekce [5,6]. Pro detekci analytu je řada možných detektorů, vhodná volba závisí především na vlastnostech detekované látky a způsobu provedení separace. Nejčastěji používanou detekcí je přímá spektrofotometrická UV detekce díky její jednoduchosti a reprodukovatelnosti. Lze však použít také nepřímou UV detekci, dále elektrochemickou detekci, vodivostní, fluorescenční detekci, hmotnostní spektrometr.

Způsoby dávkování vzorku jsou tři a to gravitační, tlakové a elektrokinetické, přičemž gravitační je nejjednodušší avšak nejméně přesné, proto se v praxi využívají spíše další dvě možnosti. Objemy vzorku při dávkování se pohybují v řádu desítek nL, spotřeba je tedy velmi malá, což je jedna z výhod CZE [5].

## 1.5 Separace a stanovení sacharidů

Sacharidy jsou v našem světě velmi významné látky, které jsou součástí jak rostlin, tak živých organismů. Slouží jako zdroj uhlíku, energie a tím pádem jsou nezbytné pro metabolismus [13]. Je známo přes 100 přírodních monosacharidů a dále různé deriváty jako amino-, acetamido-, fosfáto- aj., které mohou vytvářet řetězce a dále se kombinovat s lipidy či proteiny a tak zastávat určitou specifickou funkci v biomolekulách [14]. Pro stanovení sacharidů v různých vzorcích bylo navrženo mnoho analytických metod, avšak tyto postupy jsou časově náročné a příprava vzorků komplikovaná, neboť je nutno nejprve sacharidy derivatizovat, čímž se usnadní jejich detekce díky zavedení chromoforu nebo elektricky nabitých skupin do molekuly sacharidu [13]. Jednou z užívaných technik separace a stanovení sacharidů je kapilární zónová elektroforéza, jež není náročná na chemikálie či množství dávkovaného vzorku, avšak optimalizace této separační metody není zcela triviální.

Přestože bylo publikováno poměrně velké množství metod elektroforetické separace sacharidů, separace konkrétně chito-oligosacharidů se objevují velmi zřídka a separace zde studované směsi nebyla doposud popsána. Sacharidy jsou neutrální látky, které pokud chceme separovat pomocí CZE, je nutno ionizovat. Pro separaci jim lze udělit buď kladný, nebo v případě zde studovaných chito-oligomerů, záporný náboj a to volbou vhodného elektrolytu. Za použití kyselého pufru, kdy se pH pohybovalo kolem hodnot pH 3, sacharidy získaly kladný náboj na volné aminové skupině. V těchto studiích se ukázalo, že migrační časy a také pohyblivost se zvětšovaly s rostoucím řetězcem oligosacharidů, což poukazuje na závislost těchto jevů na molekulové hmotnosti. Tato vyvinutá metoda se ukázala jako účinná bez potřeby sacharidy derivatizovat [15,16]. Dále lze použít alkalický pufr o vysoké hodnotě pH, kdy dochází k disociaci hydroxylových skupin, nebo roztok tetraboritanu sodného, potom tedy sacharidy získají záporný náboj. Při použití roztoku tetraboritanu sodného dochází k vazbě mezi atomem boru a hydroxylovými skupinami daného sacharidu a tím pádem vznikne záporně nabitý komplex. Ukázalo se, že komplexace je nejvíce efektivní v rozmezí hodnot pH 8-10, dále také účinnost závisí na vzájemném postavení hydroxylových skupin a také na jejich počtu, a to tak, že čím víc hydroxylových skupin sacharid obsahuje, tím lépe se komplexace uskutečňuje. Dále tento děj ovlivňují případné substituenty a zda se jedná o cyklickou či acyklickou formu sacharidu [17].

Pokud je pH separačního pufru vyšší než čtyři, pohybuje se elektroosmotický tok směrem ke katodě, a tedy záporně nabitě komplexy putují k anodě proti elektroosmotickému toku, což má za následek to, že anionty s vyšší pohyblivostí mají delší migrační časy [6]. Roztok tetraboritanu sodného se používá účelně, jelikož generuje rychlý EOF, dále neabsorbuje ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra a tím pádem umožňuje citlivou UV detekci už při 190 nm, dále je jeho příprava snadná a reprodukovatelná. Mezi jeho nevýhody však patří velká elektrická vodivost, která způsobuje přehřívání kapiláry za použití vyššího separačního napětí [5].

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a optimalizovat podmínky pro metodu kapilární zónové elektroforézy, jež by byla využitelná pro stanovení možných produktů vzniklých hydrolyzou 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosidu enzymem  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou. Následná metoda měla být využita k reálnému sledování průběhu enzymové reakce.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

Dekahydrát tetraboritanu sodného (p.a), kyselina citrónová (p.a), *N,N'*-diacetylchitobiosa ( $\geq 96\%$ ), *N*-acetylglukosamin ( $\geq 99\%$ ), 4-nitrofenyl-*N*-acetylglukosamin ( $\geq 99\%$ ), 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid ( $\geq 99\%$ ) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4-nitrofenol (Lachema, Brno, Česká republika),  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* (prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc., Katedra biochemie, PřF UK)

#### 3.1.2 Příprava roztoků

Separční pufrы byly připraveny rozpuštěním potřebného množství tetraboritanu sodného ve vodě, aby měly koncentraci 15, 20 a 25 mmol/l. Hodnota pH byla následně upravena pomocí hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l. Citrátový pufr byl připraven rozpuštěním takového množství kyseliny citrónové, aby měl koncentraci 0,2 mol/l a hodnota pH byla upravena hydroxidem sodným na 4,5. Při enzymovém štěpení ve vialce byl ředěn čtyřikrát, tedy jeho koncentrace byla 0,05 mol/l. Zásobní roztoky analytů byly rovněž připraveny rozpuštěním ve vodě na potřebné koncentrace. Roztok 4-nitrofenyl-*N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosidu o koncentraci 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 5 mg v celkovém objemu 1,8 ml směsi destilované vody a etanolu (22 % obj.).

#### 3.1.3 Přístrojové vybavení

- Zařízení pro kapilární elektroforézu s DAD detektorem CE<sup>3D</sup>, Agilent Technologies (Waldbronn, Německo)

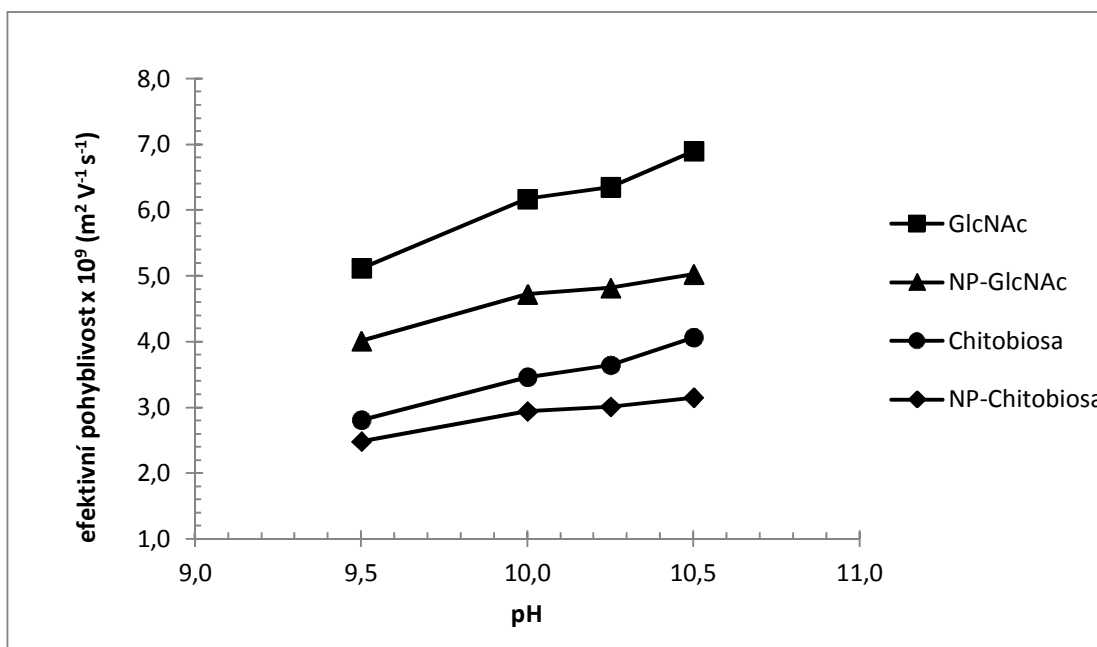
- Separační křemenná kapilára (vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ , vnější průměr 375  $\mu\text{m}$ , celková délka 65 cm, efektivní délka 56,5 cm; CACO-Sila Tubing and Optical Fibers, Slovenská republika)
- pH metr Orion model 370 (Cambridge, Velká Británie)
- skleněná pH elektroda Metrohm 6.0224.100 (Riverview, Florida, USA)

### 3.2 Optimální složení základního elektrolytu

Nejprve bylo nutno nalézt takové složení pufru, při kterém by docházelo k úplné separaci jednotlivých sacharidů. Používaným pufrům byl roztok tetraboritanu sodného, který vytváří se sacharidy již zmíněný komplex (viz. kapitola 1.3). Nejprve bylo nutno stanovit optimální hodnotu pH a následně upravit dle potřeby hodnotu koncentrace.

#### 3.2.1 Závislost pohyblivosti jednotlivých sacharidů na pH

Při zjišťování závislosti pohyblivosti sacharidů na hodnotě pH byl použit roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 20 mmol/l.



**Obrázek 4** Závislost pohyblivosti jednotlivých sacharidů na hodnotě pH. Separační kapilára 75  $\mu\text{m}$  x 65 cm / 56,5 cm; separační pufr, 20 mmol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ; elektrokinetické dávkování; 5kV/5s.

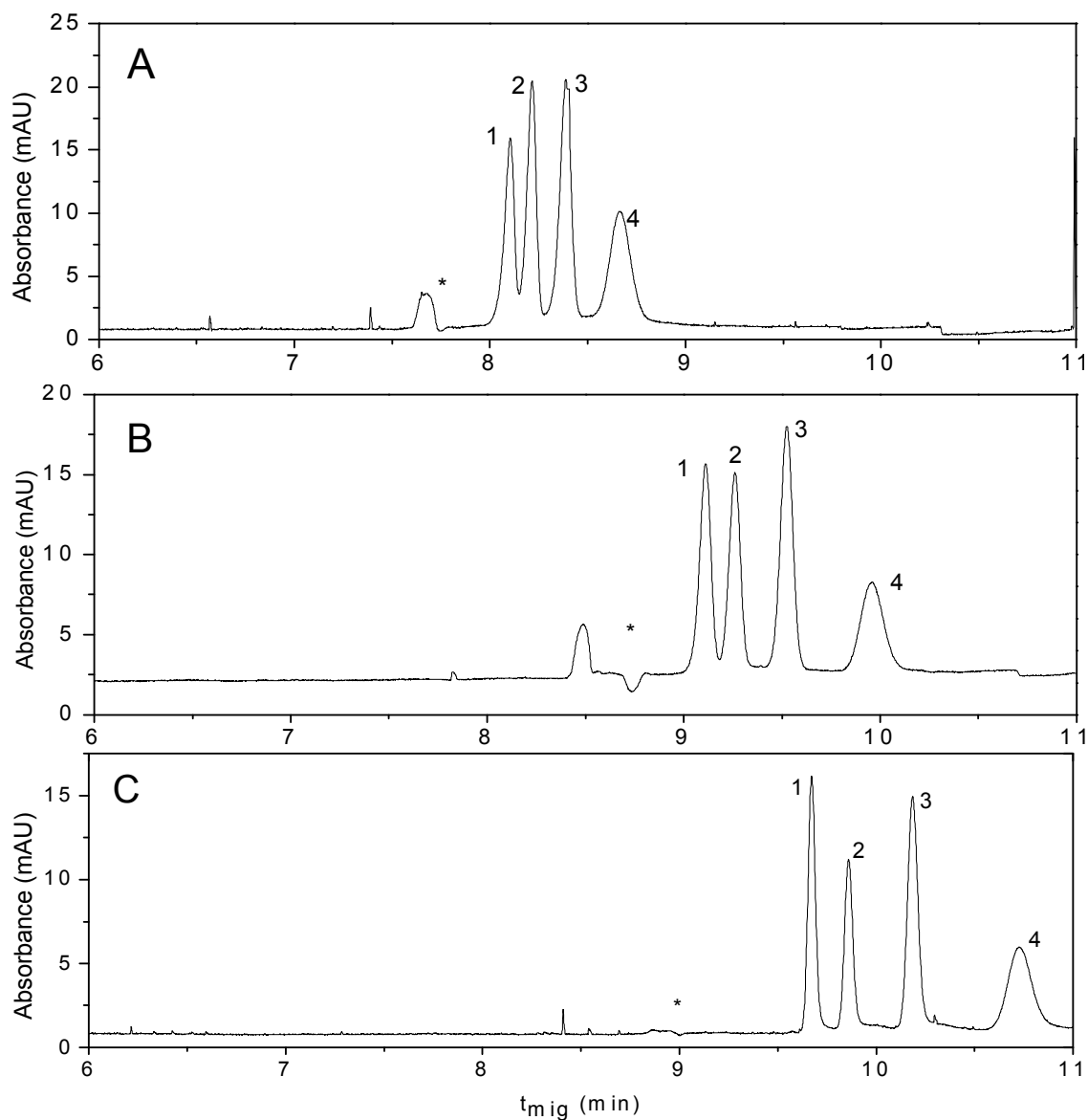
Jedním z možných produktů enzymového štěpení je 4-nitrofenol, který má tak vysokou hodnotu pohyblivosti, že při vyšším pH ho nebylo možno stanovit. To však nebylo překážkou splnění cíle práce, neboť z provedených experimentů vyplynulo, že 4-nitrofenol migruje ve výsledku k anodě a se stanovenými sacharidy tedy neinterferuje. Ze získaného grafu na **obrázku 4** je patrné, že nejvyšší hodnoty pohyblivosti při vysokém pH má GlcNAc a proto byly jeho migrační časy na elektroferogramech nejdelší (viz. kapitola 1.3). Dále lze pozorovat, že s rostoucí hodnotou pH separačního pufru, rostou efektivní pohyblivosti jednotlivých sacharidů. Vyšší nárůst pohyblivosti při vyšší hodnotě pH je hlavně u chitobiosy a GlcNAc oproti zbylým dvěma sacharidům. Tento jev je důsledkem zlepšující se komplexace sacharidů s tetraboritanem sodným, čímž roste jejich pohyblivost při zvyšujícím se pH a pravděpodobně také disociací hydroxylových skupin ve vysokém pH. Méně substituované sacharidy mají vyšší efektivní pohyblivost a z tohoto důvodu, lze na **obrázku 4** při vyšším pH pozorovat u zmíněných dvou sacharidů strmější nárůst efektivní pohyblivosti. Optimální hodnota pH byla stanovena na 10,25 na základě jednotlivých elektroforetických měření, kdy rozlišení mezi píky NP-Chitobiosy a chitobiosy bylo 1,70 a píky bylo možno považovat za oddělené. Při nižších hodnotách pH ještě nedocházelo k oddělení těchto dvou píků a naopak při vyšších hodnotách docházelo k přibližování píků chitobiosy a NP-GlcNAc. Rozlišení pro pH 10,5 bylo také vyhovující, avšak z důvodu vyšší vodivosti elektrolytu a tím pádem větší hodnoty procházejícího proudu bylo využito pH 10,25. V následující **tabulce 1** lze pozorovat jednotlivá rozlišení píků.

**Tabulka 1** Rozlišení píků jednotlivých sacharidů

Rozlišení mezi píky	pH			
	9,50	10,00	10,25	10,50
NP-Chitobiosa - Chitobiosa	0,62	1,30	1,70	2,42
Chitobiosa - NP-GlcNAc	2,36	2,63	2,74	1,76
NP-GlcNAc - GlcNAc	1,77	2,57	3,19	2,68

### 3.2.2 Vliv koncentrace základního elektrolytu na separaci

Po zjištění optimální hodnotě pH pufru pro koncentraci 20 mmol/l byl dále zjišťován vliv koncentrace při této konkrétní hodnotě pH. Následující **obrázek 5**, tři elektroferogramů, ukazuje výsledky separace při hodnotě pH 10,25 a různých koncentracích používaného pufru.



**Obrázek 5** Elektroferogram separace sacharidů. Separační kapilára 75  $\mu\text{m}$  x 65 cm / 56,5 cm; separační pufr pH 10,25; (A) 15 mmol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , (B) 20 mmol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , (C) 25 mmol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ; (1) NP-Chitobiosa, (2) Chitobiosa, (3) NP-GlcNAc, (4) GlcNAc, (\*) EOF; UV absorbance při 200 nm.



Na **obrázku 5 (A)** byl pro separaci použit jako separační pufr roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 15 mmol/l. Separace NP-Chitobiosy a chitobiosy na tomto elektroferogramu není zcela úplná. Na **obrázku 5 (B)** byl použit pufr o vyšší koncentraci, 20 mmol/l. Separace NP-Chitobiosy a chitobiosy se zlepšuje, píky jsou odděleny, nicméně za použití separačního pufru o vyšší koncentraci, docházelo k lepšímu odseparování a snazšímu stanovení. Poslední elektroferogram, **obrázek 5 (C)**, znázorňuje separaci s tetraboritanem sodným o koncentraci 25 mmol/l. Zde lze pozorovat zcela odseparovanou NP-Chitobiosu od chitobiosy, proto pro další měření byl využit jako separační pufr roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mmol/l a pH 10,25.

### 3.3 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření byla testována s koncentrací všech složek 1 mmol/l. Měření bylo prováděno celkem sedmkrát. Ze získaných dat, plocha píků a migrační časy, byla vypočtena směrodatná odchylka, aritmetický průměr a relativní směrodatná odchylka v procentech jako podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru. Data jsou zobrazena v **tabulce 2**.

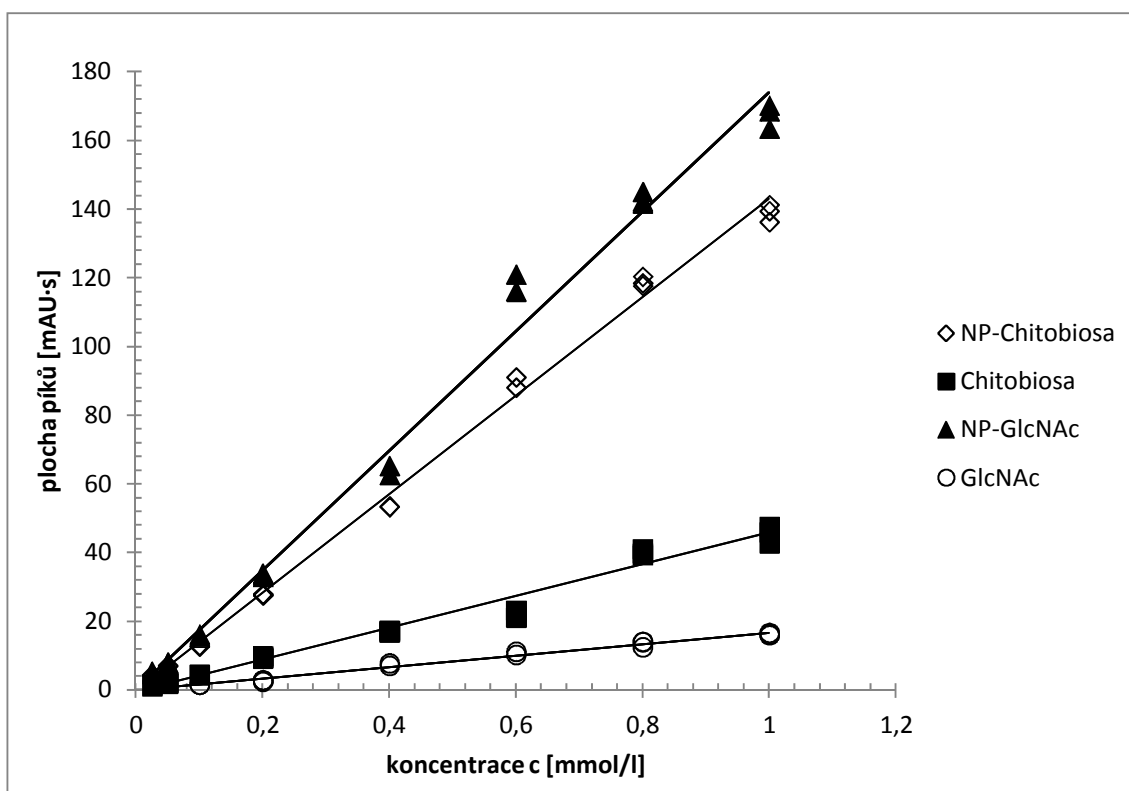
**Tabulka 2** Opakovatelnost naměřených ploch píků a migračních časů látek pro koncentraci 1 mmol/l (n=7)

<b>Relativní směrodatná odchylka [%]</b>	<b>NP-Chitobiosa</b>	<b>Chitobiosa</b>	<b>NP-GlcNAc</b>	<b>GlcNAc</b>
<b>Plocha</b>	2,56	6,23	2,41	2,98
<b>t<sub>mig</sub></b>	0,56	0,54	0,57	0,57

Ze získaných dat v **tabulce 2** je vidět, že relativní směrodatné odchylky migračních časů jednotlivých složek se pohybují kolem 0,6%. Měření v tomto směru poskytuje přesné výsledky. Směrodatné odchylky ploch píků jsou sice vyšší, nicméně se pořád pohybují v jednotkách %, což odpovídá běžně dosahovaným hodnotám, a lze tedy tvrdit, že výsledky jsou rovněž dostatečně přesné.

### 3.4 Kalibrační závislosti jednotlivých sacharidů

Po zjištění optimálních podmínek separace a stanovení sacharidů bylo možno naměřit kalibrační závislosti ploch píků jednotlivých sacharidů na jejich koncentraci. Koncentrace byly voleny v rozmezí 0,025–1 mmol/l (pro GlcNAc 0,1-1 mmol/l). Jako separační pufr byl použit roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mmol/l a hodnotě pH 10,25.



**Obrázek 6** Kalibrační závislost ploch píků na koncentraci jednotlivých sacharidů. Separací kapilára 75  $\mu\text{m}$  x 65 cm / 56,5 cm; separační pufr, 25 mmol/l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ; pH 10,25.

Jednotlivé parametry kalibračních závislostí jsou ukázány v **tabulce 3**. Závislosti ploch píků na koncentracích jsou dobře popsány lineární regresí, což lze určit z hodnot  $R^2$ , které se pohybují kolem jedné. Na základě T-testu byla velikost úseku u všech analytů shledána statisticky nevýznamnou, neboť hodnoty nepřesahovaly kritickou hodnotu 2,11 a poté byla ověřena linearita kalibračních závislostí. Vynesením dekadického logaritmu ploch píků v závislosti na dekadickém logaritmu koncentrací a následnou lineární regresí byla získána přímka, jejíž směrnice odpovídající koeficientu linearity se

pohybovala kolem hodnoty 1. Ve třech ze čtyř případů bylo zjištěno, že je závislost v celém studovaném rozsahu koncentrací lineární. Mírnou odchylku lze pozorovat pouze u GlcNAc.

**Tabulka 3** Parametry kalibračních závislostí (n=19)

	NP-Chitobiosa	Chitobiosa	NP-GlcNAc	GlcNAc
Směrnice [mAU·s·l·mol <sup>-1</sup> ]	143,3	46,4	174,0	16,8
Úsek [mAU·s]	0,4	0,5	0,0	0,1
T-test	0,30	0,56	0,00	0,29
R <sup>2</sup>	0,996	0,979	0,990	0,986
Koeficient linearity	0,99	1,01	1,00	1,08

### 3.5 Stanovení LOD a LOQ

Dalším cílem bylo stanovit limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ), přičemž se vycházelo ze získaných dat z kalibrační závislosti. Tyto dva údaje jsou závislé jednak na chybě měření, jež je udávána buď směrodatnou odchylkou nebo tzv. šumem, což je časová fluktuace měřeného signálu bez analytu, dále také na citlivosti metody. LOD je v podstatě taková koncentrace analytu, která způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu, LOQ je desetinásobkem [18]. LOD lze tedy vypočítat jako trojnásobek podílu výšky šumu a směrnice kalibrační přímky daného píku. LOQ je desetinásobek tohoto podílu [19]. V následující **tabulce 4** jsou vypočtené hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé sacharidy.

**Tabulka 4** Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé sacharidy.

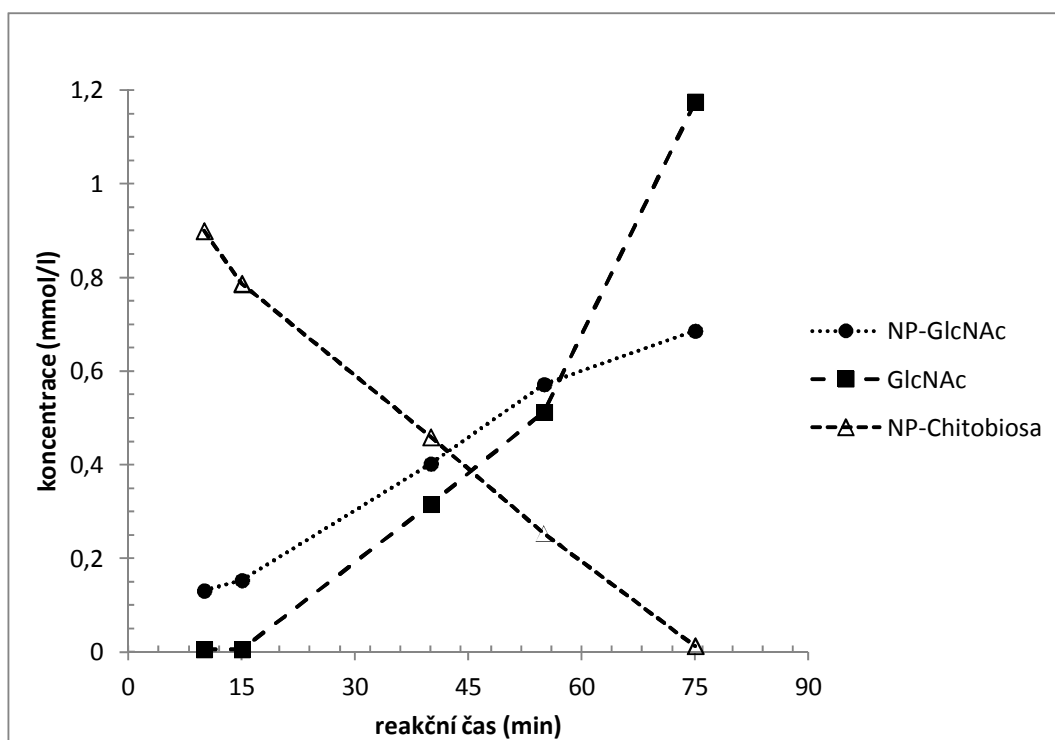
	NP-Chitobiosa	Chitobiosa	NP-GlcNAc	GlcNAc
LOD [mmol/l]	0,006	0,019	0,005	0,120
LOQ [mmol/l]	0,019	0,063	0,018	0,401

Nejnižší možné detekovatelné koncentrace se pohybují v rozmezí od 0,005–0,120 mmol/l, kdy lze tyto údaje ještě kvalitativně využít. Nižší hodnoty LOD u NP-Chitobiosy a NP-GlcNAc jsou způsobeny přítomností aromatického kruhu, který lépe absorbuje v UV-VIS oblasti. Hodnoty limitu kvantifikace udávají nejnížší stanovitelné koncentrace použitelné pro kalibraci s danou směrodatnou odchylkou,

ze získaných dat se tyto hodnoty zkoumaných sacharidů pohybují od 0,018–0,401 mmol/l.

### 3.6 Enzymové štěpení

Při působení enzymem  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou na sacharid NP-Chitobiosu se ukázalo, že dochází přednostně ke štěpení O-glykosidické vazby za vzniku GlcNAc a NP-GlcNAc. Po rozštěpení veškeré NP-Chitobiosy na zmíněné dva sacharidy, enzym dále štěpí O-glykosidickou vazbu v NP-GlcNAc a tím pádem ve směsi dále vzniká GlcNAc a 4-nitrofenol, který nelze stanovit z důvodu příliš rychlého pohybu proti EOF, to že vzniká je patrné z narůstající koncentrace GlcNAc po vyčerpání veškerého substrátu. Z toho je zřejmé, že enzym výrazně preferuje přirozený substrát před chromogenním. Na **obrázku 7** je znázorněno štěpení NP-Chitobiosy v průběhu 75 minut.



**Obrázek 7** Závislost koncentrace na reakčním čase vznikajících produktů při enzymovém štěpení NP-Chitobiosy  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou.

## 4 Závěr

Na základě experimentálních měření se ukázal jako ideální separační pufr pro separaci a stanovení chito-oligosacharidů roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mmol/l a hodnotě pH 10,25. Za těchto separačních podmínek byl pík chitobiosy zcela rozlišitelný jak od NP-Chitobiosy, tak od NP-GlcNAc. Relativní směrodatné odchylky migračních časů se pohybovaly kolem 0,6%. Směrodatné odchylky ploch píků dosahovaly mírně vyšších hodnot, řádově v jednotkách procent. Získané výsledky jsou tedy přesné. Kalibrační křivky jednotlivých sacharidů mají lineární průběh s mírnou odchylkou u GlcNAc. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 0,005–0,120 mmol/l a limity kvantifikace od 0,018–0,401 mmol/l. Tyto parametry naznačují, že metoda je dobře použitelná pro sledování enzymového štěpení NP-Chitobiosy, což bylo ověřeno. Nakonec byly stanoveny skutečné produkty enzymového štěpení NP-Chitobiosy enzymem  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou. Ukázalo se, že enzym přednostně štěpí O-glykosidickou vazbu mezi GlcNAc a NP-GlcNAc, po vyčerpání veškerého substrátu enzym následně štěpí NP-GlcNAc na 4-nitrofenol a GlcNAc, tedy z jedné molekuly NP-Chitobiosy nakonec vznikají 2 molekuly GlcNAc a 1 molekula 4-nitrofenolu. Přestože 4-nitrofenol nebyl stanoven pomocí CZE z důvodu příliš vysoké pohyblivosti, lze předpokládat jeho vznik na základě rostoucí koncentrace GlcNAc, která může být způsobena pouze štěpením NP-GlcNAc po vyčerpání veškerého substrátu.

## 5 Použité zdroje

- [1] Kolektiv autorů: *BIOCHEMIE - Základní kurz*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum; 2009
- [2] O. Plíhal, J. Sklenář, K. Hofbauerová, P. Novák, P. Man, P. Pompach, D. Kavan, H. Ryšlavá, L. Weignerová, A. Charvátová-Pišvejcová, V. Křen, K. Bezouška: *Large Propeptides of Fungal  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidases Are Novel Enzyme Regulators That Must Be Intracellularly Processed to Control Activity, Dimerization, and Secretion into the Extracellular Environment*. *Biochemistry* 46: 2719-2734; 2007
- [3] R. Ettrich, V. Kopecký Jr., K. Hofbauerová, V. Baumruk, P. Novák, P. Pompach, P. Man, O. Plíhal, M. Kutý, N. Kulik, J. Sklenář, H. Ryšlová, V. Křen, K. Bezouška: *Structure of the dimeric N-glycosylated form of fungal  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibration spectroscopy, and biochemical studies*. *BMC Structural Biology* 7:32; 2007
- [4] H. Ryšlavá, A. Kalendová, V. Doubnerová, P. Skočdopol, V. Kumar, Z. Kukačka, P. Pompach, O. Vaněk, K. Slámová, P. Bojarová, N. Kulik, R. Ettrich, V. Křen, K. Bezouška: *Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase*. *FEBS Journal* 278: 2469-2484; 2011
- [5] K. Štulík a kolektiv: *Analytické separační metody*. Nakladatelství Karolinum; 2005
- [6] F. Opekar, I. Jelínek, P. Rychlovský, Z. Plzák: *Základní analytická chemie*. Nakladatelství Karolinum; 2010
- [7] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M.: *High-performance zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography* 169: 11–20; 1979

- [8] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M.: *Concentration distributions in free zone electrophoresis*. Journal of Chromatography 169: 1-10; 1979
- [9] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D.: *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*. Analytical Chemistry 53: 1298–1302; 1981
- [10] H.R. Rabanes, A. M. Guidote Jr., J. P. Quirino: *Capillary electrophoresis of natural products: Highlights of the last five years (2006-2010)*. Electrophoresis 33: 180-195; 2012
- [11] V. Kašička: *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chemické listy 91: 320-329; 1997
- [12] web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html, převzato 29.4.2012, 11:59
- [13] S. Rovio, J. Yli-Kauhaluoma, H. Sirém: *Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection*. Electrophoresis 28: 3129-3135; 2007
- [14] Jiří Pazourek: *Moderní elektroforetické analytické metody*. [http://faf.vfu.cz/export/sites/faf/struktura-fakulty/sekce\\_ustavy/ustav\\_chemickyh\\_leciv/vyuka/analyticka-chemie/elforeza.pdf](http://faf.vfu.cz/export/sites/faf/struktura-fakulty/sekce_ustavy/ustav_chemickyh_leciv/vyuka/analyticka-chemie/elforeza.pdf); 2003
- [15] T. Hattori, N. Anraku, R. Kato: *Capillary electrophoresis of chitooligosaccharides in acid solution: Simple determination using a quaternary-ammonium-modified column and indirect photometric detection with Crystal Violet*. Journal of Chromatography B 878: 477-480; 2010
- [16] M. W. Wolff, H. G. Bazin, R. J. Lindhardt: *Analysis of fluorescently labeled oligosaccharides by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry*. Biotechnology Techniques 13: 797-801; 1999

- [17] Z. El Rassi: *High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*. Beckman Instruments, Inc.; 1996
- [18] M. Pohanka: *Základy statistiky laboratorních experimentů*. Vojenské zdravotnické listy, ročník 60 LXXIX, č. 2; 2010
- [19] [www.hplc.cz/Tip/lod\\_loq.htm](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm)