

KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA SACHARIDŮ

JITKA ŽÍDKOVÁ a JOSEF CHMELÍK

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno, jittak@iach.cz, chmelik@iach.cz

Došlo dne 18.XI.1999

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, sacharidy

Obsah

1. Úvod
2. Elektrolyty pro kapilární elektroforézu sacharidů
 - 2.1. Elektroforéza v silně alkalickém elektrolytu
 - 2.2. Komplexy sacharidů s ionty
 - 2.2.1. Komplexy sacharidů s boráty
 - 2.2.2. Komplexy sacharidů s kovy
3. Kapilární kolona
4. Detekce sacharidů
 - 4.1. Detekce nederivatizovaných sacharidů
 - 4.1.1. Přímá detekce sacharidů v UV oblasti
 - 4.1.2. Nepřímá detekce
 - 4.1.3. Elektrochemická detekce
 - 4.2. Dynamicky značené sacharidy
5. Derivatizace sacharidů
 - 5.1. Reduktivní aminace
 - 5.2. Bazicky katalyzovaná kondenzace redukujícího sacharidu s PMP nebo PMPMP
 - 5.3. Derivatizace sacharidů s karboxylovou skupinou
6. Využití kapilární elektroforézy sacharidů v praxi
 - 6.1. Stanovení monosacharidů a disacharidů
 - 6.2. Stanovení oligosacharidů a polysacharidů
7. Příklady využití sacharidů jako aditiv v kapilární elektroforéze
8. Závěr

1. Úvod

Sacharidy tvoří většinu organických materiálů na Zemi. Hrají roli ve všech formách života, jako zásoba a zdroj energie a metabolické meziprodukty. Tvoří základy struktury buněčných stěn rostlin, hub a bakterií. Poslední studia ukazují, že hrají také důležitou roli v procesech buněčného rozpoznávání. Ovlivňují konformace, metabolismus i biologickou aktivitu molekul glykoproteinů a glykolipidů. Z těchto důvodů vzrůstá zájem o analýzy sacharidů, a to jak o relativně jednoduchá stanovení jednotlivých monosacharidů, tak o rozlišení mikroheterogenit oligosacharidů. Ty mohou například ovlivnit bezpečnost a účinnost terapeutických glykoproteinů jako je erytropoietin nebo tkáňový typ plazminogenového aktivátoru, nebo léků založených na sacharidické složce jako tetrasacharid sialyl Lewis^x. Ten zprostředkovává vazbu bílých krvinek

na specifické receptory v cévách a jejich následný pohyb z krevního řečiště ke tkáním, stejně jako beta-fectin, který je rozeznáván neutrofily a spouští imunitní odezvu proti nemocím působeným viry nebo kvasinkami¹.

Stanovení sacharidů je komplikováno jejich izomerií. Jen monosacharidů existuje více než 100, mohou zaujímat různé konformace a mohou být vázány třemi až čtyřmi různými způsoby k monosacharidům jiným. Navíc typ glykosidické vazby může být buď v α nebo β konfiguraci. Tři různé monosacharidy mohou tedy tvořit více než 1000 trisacharidů. Struktury oligo- a polysacharidů mohou být buď lineární, cyklické nebo větvené. Dále sacharidy obsahují substituenty jako pyruvátové, acetátové, fosfátové a sulfátové estery, methylethery, aminoskupiny a další.

Existence velkého množství různých typů sacharidů, které se od sebe často jen velmi málo liší, znesnadňuje identifikaci jednotlivých sacharidů ve směsích. Navíc jsou velmi polární a netěkavé, postrádají snadno ionizovatelné skupiny a většina z nich neabsorbuje v analyticky využitelné oblasti světelného spektra ani nefluoreskuje, což brání citlivé detekci¹.

Metod pro stanovení sacharidů bylo vyvinuto několik. Patří mezi ně NMR spektroskopie, hmotnostní spektrometrie, různé chromatografické a elektroforetické techniky. Jako vhodná separační technika může být použita kapalinová chromatografie a elektroforéza (kapilární, nebo v polyakrylamidovém gelu). Nejvhodnější z kapalinových chromatografií se jeví vysoce účinná ionexová chromatografie s pulsní amperometrickou detekcí (HPIC PAD). Pomocí této techniky jsou detegovány redukující i neredukující sacharidy bez chemické derivatizace a citlivost je nižší než 50 nM, navíc se sacharidy neinteraguje většina anorganických iontů a karboxylových kyselin². Pomocí této metody mohou být separovány látky lišící se jednou z vazeb³, jako maltosa, isomaltosa a cellobiosa, nebo maltooligosacharidy až do stupně polymerace 30.

Stejně tak kapilární elektroforéza je vhodná alternativa pro stanovení mono a oligosacharidů i fragmentů glykoproteinů. Díky její velké účinnosti můžeme v krátkém separačním čase dosáhnout vysokého rozlišení a reprodukovatelné mikrokvantifikace. Výhodná je nepatrná spotřeba vzorku – detekční limity se pohybují ve speciálních případech v oblasti piko až attomolů. Proti kapalinové chromatografii je výhodná také nižší cena zařízení. Kapilární elektroforéza má ale také nevýhody: nízkou kapacitu při preparacích, nebezpečí ucpání kapiláry, nízkou reprodukovatelnost analýzy při různých koncentracích solí ve vzorcích¹. Přehledné práce na toto téma napsali El Rassi a Mechref⁴, El Rassi⁵ a Oefner a Scherz¹.

Pro stanovení sacharidů pomocí kapilární elektroforézy je nutné zajistit, aby sacharidy byly nabitě a detegovatelné. Některé sacharidy náboj mají, jsou to: aldonové kyseliny, uronové kyseliny, sialové kyseliny, aminosacharidy a sacharidy složené ze sulfatovaných sacharidů, jako chondroitin, dermatan, keratan a heparin⁵. Neutrálním sacharidům je možné náboj udělit zvýšením pH do silně alkalické oblasti, kde dochází k jejich disociaci, vytvořením komplexů sacharidů s ionty, nebo derivatizací⁵.

Sacharidy je možné detegovat elektrochemicky pomocí

oxidace na povrchu kovových elektrod. U detekce v optické oblasti máme několik možností. Některé sacharidy absorbují v UV oblasti, pro neabsorbující použijeme nepřímou detekci (do roztoku přidáme látku, která absorbuje při určité vlnové délce, v zóně analytu je tato látka vytěsněna a na záznamu nalezneme negativní pík), nebo derivatizací připravíme deriváty sacharidů absorbující v ultrafialové/viditelné oblasti, nebo fluoreskující⁴.

2. Elektrolyty pro kapilární elektroforézu sacharidů

2.1. Elektroforéza v silně alkalickém elektrolytu (v přítomnosti elektroosmotického toku)

Pořadí migrace sacharidů je závislé na stupni ionizace. Sacharidy, které disociují nejméně, dosáhnou detektoru jako první, protože mají menší schopnost migrovat proti elektroosmotickému toku v nepokryté křemenné kapiláře. Rychlost elektroosmotického toku je o řád vyšší, než rychlost elektromigrace. Disociační konstanty sacharidů jsou v rozmezí 10^{-12} – 10^{-14} (viz tabulka I) (cit.⁵). Jako elektrolyty se používají roztoky hydroxidů⁶ sodných, draselných a lithných o pH vyšším než 12.

Redukující sacharidy jsou ionizovány lépe, což je způsobeno kyselým charakterem poloacetalové skupiny⁷. Z tabulky I můžeme odvodit, že s rostoucím počtem hydroxylových skupin roste acidita sacharidů. Přítomnost intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami a aniontem kyslíku může vést ke změnám kyselosti, vodíkové můstky například stabilizují vazbou vznikající iontový náboj. To vysvětluje nižší kyselost a vyšší mobilitu deoxy-D-ribosy v porovnání s D-ribosou, protože aniontový kyslík na C1 je schopný vazby s přilehlou hydroxylovou skupinou na C2 u D-ribosy, taková vazba nemůže existovat u deoxy-sloučenin⁵.

2.2. Komplexy sacharidů s ionty

Sacharidy tvoří komplexy s anionty i kationty. Z aniontů se nejčastěji používá komplexace boráty, možné je vytvořit i komplexy sacharidů s germananem⁹, cínčitánem¹⁰, arsenitanem¹¹, molybdenanem¹², wolframanem¹⁰ nebo vanadičnanem¹³. Z kationtů jsou nejčastěji používány vápenaté¹⁴, lanthanité¹⁵ a měďnaté¹⁶ kationty.

2.2.1. Komplexy sacharidů s boráty

Ve vodném prostředí se kyselina boritá chová jako Lewisova kyselina:



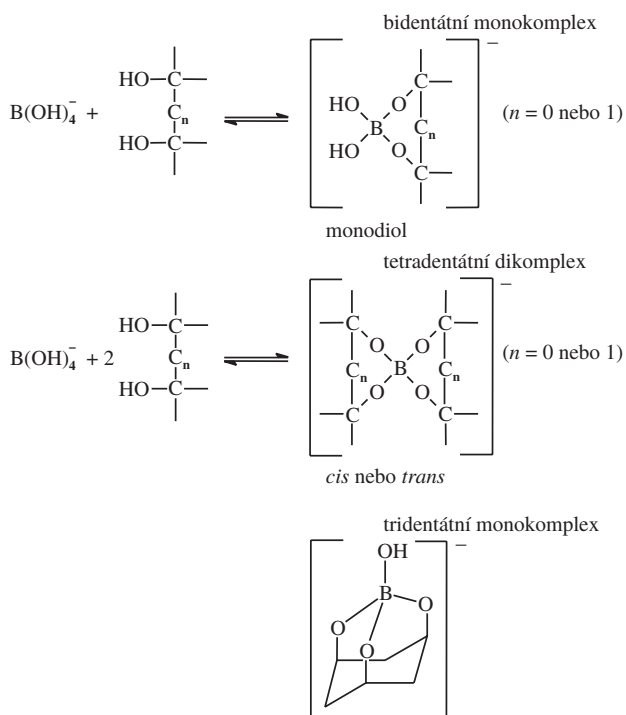
V alkalické oblasti je rovnováha této reakce silně posunuta doprava. Z tohoto důvodu reagují sacharidy s tetrahydroborátovým aniontem a tvoří následující komplexy¹⁷ (obr. 1).

Struktura sacharidů poskytuje možnost tvorby různých forem, jak je zřejmé ze schématu 1 na příkladu glukosy. Ve vodném roztoku se vyskytují jak lineární forma glukosy, tak cyklické formy s pětičlenným i šestičlenným cyklem⁵.

Tabulka I
Ionizační konstanty (hydroxylových skupin) sacharidů ve vodě⁸ při 25 °C

Sloučenina	p <i>K</i> _a	Sloučenina	p <i>K</i> _a
2-Deoxyglukosa	12,52	glycerol	14,40
2-Doxyribosa	12,67	laktosa	11,98
D-Arabinosa	12,43	maltosa	11,94
D-Fruktosa	12,03	D-glukosa	12,35
D-Galaktosa	12,35	D-lyxosa	12,11
D-Glucitol	13,57 ^a	D-manitol	13,50 ^a
D-Manosa	12,08	rafinosa	12,74 ^a
D-Ribosa	12,21	sacharosa	12,51
D-Xylosa	12,29		

^a Měřeno při 18 °C



Obr. 1. Tvorba borátových komplexů se sacharidy

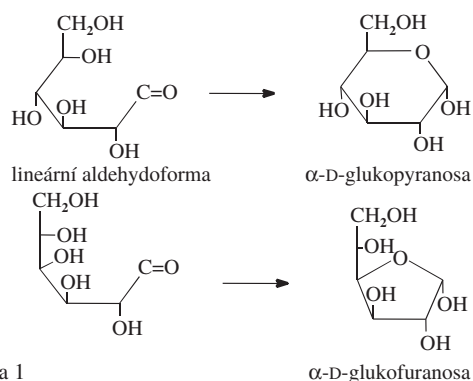


Schéma 1

Jednotlivé formy se liší svými vlastnostmi a to hlavně schopností komplexace. Je známo, že furanosové a lineární formy tvoří silnější borátové komplexy¹⁸. Ke tvorbě komplexů dochází, pokud hydroxylové skupiny sacharidů jsou vhodně situované, tj. pokud je vzdálenost kyslíků v molekule sacharidu stejná jako je vzdálenost kyslíků v molekule borátu. Proto jsou *threo*-1,2-dioly stabilnější než *erythro*-1,2-dioly, *syn*-1,3-dioly než *anti*-1,3-dioly, 1,2-dioly jsou stabilnější než 1,3-dioly¹⁷. Stabilita komplexů je zvyšována počtem hydroxylových skupin.

Komplexace je ovlivněna substituenty sacharidů, závisí na náboji a lokalizaci substituentů. V případě záporně nabitých substituentů poklesne komplexace z důvodu coulombické repulze¹⁹. Ve vodných roztocích vedle sebe koexistují mono a dikomplexy²⁰. Poměr jejich koncentrací je závislý na koncentraci borátů a polyolů, pozici hydroxylových skupin v polyolech a na přítomnosti substituentů. Za běžných podmínek, při kterých se elektroforéza provádí, převládají monokomplexy. Na elektroferogramu tvoří směs mono a dikomplexů jeden pík, protože tvorba dikomplexů z monokomplexů je dynamická⁵.

Tvorba borátových komplexů se sacharidy závisí na pH, a to pro různé sacharidy různě. Optimální pH je v oblasti 10–11 (cit.²¹). Pomocí tvorby komplexů můžeme separovat různé mono a disacharidy, ale také homologní oligoglukany, které se navzájem liší pouze typem interglykosidické vazby jako α -(1-3) vázané laminariny, α -(1-6)isomaltosa a β -(1-4)celooligosacharidy²². Komplexace boráty umožňuje také separace závislé na velikosti založené na rozdílech v poměru náboj/hmotnost. Náboj je stejný pro všechny oligoglukany, nezávislý na velikosti z důvodu ionizace jedné ze tří hydroxylových skupin borátu ($pK_a = 9,14$), elektroforetická mobilita klesá s rostoucí molekulovou velikostí²³.

Dále bylo zjištěno, že zvýšení teploty analýzy zlepší účinnost rozlišení a zkrátí dobu analýzy²⁴. Zvlášť výrazně je tento jev znát na separaci glukosy a xylosy v borátovém elektrolytu. Při teplotě 20 °C trvá analýza více než 40 minut a glukosa a xylosa koeluuji v jednom širokém píku, při teplotě 60 °C trvá analýza 20 minut a glukosa a xylosa jsou rozlišeny na základní linii. Hlavní důvod tohoto jevu je, že se zvýšenou teplotou se sacharidy vyskytují více v otevřených formách a ty se účastní komplexace lépe než formy cyklické²¹. (Při 60 °C je v roztoku 4× více cyklických forem než při 20 °C.)

K detekci se využívá skutečnosti, že borátové komplexy mají vyšší absorpční koeficient při 195 nm než samotné sacharidy²⁴.

2.2.2. Komplexy sacharidů s kovy

Nejstabilnější komplexy tvoří trojmocné kationty, komplexy s dvojmocnými kationty jsou slabší a nejméně silné komplexy vznikají s jednomocnými kationty⁷. Pro stabilitu komplexu je důležitý iontový poloměr kationtu. Nejlépe komplexují kationty s iontovým poloměrem 100–110 pm, například Ca^{2+} nebo La^{3+} .

Silná tvorba komplexů je u sacharidů s uspořádáním hydroxylových skupin axiální–ekvatoriální–axiální²⁵ a 1,3,5-tri-axiální u šestičetných kruhů. U pětičetných kruhů je to *cis,cis*-1,2,3-triolové seskupení v konformaci *twist*¹⁵.

Některé sloučeniny nemají a–e–a sekvenci ve stabilnější konformaci, ale mohou ji mít v konformaci méně stabilní (viz

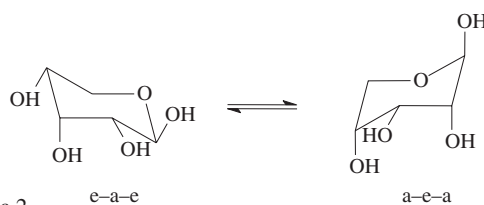


Schéma 2

schéma 2). Takové sacharidy s kovy tvoří také komplexy, které jsou však slabší¹⁵.

Tvorby komplexu se nejčastěji účastní 3 hydroxylové skupiny, komplexy vznikají i se čtyřmi nebo dvěma hydroxylovými skupinami¹⁵. Systémy s kationty jako komplexačními činidly poskytují jinou selektivitu, než elektrolyty borátové. Rozlišení je ale ve většině případů horší než v případě borátů⁵.

3. Kapilární kolona

Pro kapilární elektroforézu sacharidů se používá zpravidla nepokrytá křemenná kapilára. Vnitřní průměr kapiláry se pohybuje od 10 do 75 μ m, celková délka kapiláry bývá 25 až 80 cm, efektivní délka (délka po detekční okénko) 20 až 50 cm. Nejčastěji jsou používány kapiláry vyráběné firmou Polymicro Technology, Phoenix, USA, nebo Chromatographie Service, Langerwehe, SRN.

Elektroforéza sacharidů ve vodných roztocích (borátových nebo roztocích NaOH) se provádí v nepokryté kapiláře, protože většina povrchů podléhá hydrolytické degradaci při $pH > 8,5$. Sacharidy tvoří v alkalickém pH nebo s boráty anionty, které jsou odpuzovány od záporně nabitého povrchu kapiláry, takže nedochází k jejich adsorpci na kapilární stěnu. Pokud však provádíme stanovení v reálných vzorcích, dochází k adsorpci kationtových kontaminantů na povrch kapiláry, to může vést k nereprodukovatelnosti stanovení. Při stanovení glykokonjugátů jako glykoproteinů a glykopeptidů je povrch kapiláry nutné, tyto látky jsou totiž mnohonásobně nabitě a při vysokém poměru povrch/objem u kapiláry mají glykokonjugáty silnou schopnost navázat se na stěnu. Také při stanovení derivátů sacharidů jsou používány pokryté kapiláry. Lze s nimi dosáhnout větší účinnosti separací⁵.

První metoda pro pokrývání kapilár byla popsána Hjer-ténem²⁶, který modifikoval skleněné nebo křemenné trubičky nezesíťovaným polyakrylamidem. To vede k tvorbě monomolekulární vrstvy kovalentně připojené ke kapiláře siloxanovou vazbou. Toto pokrytí má slabou hydrolytickou stabilitu při vysokém pH.

Nebo byl polyakrylamidový povlak připojen ke stěně kapiláry Si–C vazbou²⁷. Takový povlak vykazuje větší stabilitu a reprodukovatelnost v rozsahu pH 2 až 10,5. Huang a spol.²⁸ imobilizovali polyakrylamid přes 7-oct-1-enyl-trimetoxy-silan místo používaného 3-methylakryloxypropyltrialkoxy-silanu. Tato vrstva ze zesíťovaného siloxanu je více stabilní. Nashabeh a El Rasi²⁹ pokryli kapiláry polyetherovým povlakem, ty vykazují vysokou separační účinnost pro různé biopolymery. Smith a El Rasi připravili povlak, který mění elektroosmotický tok z anodického na katodický v závislosti na pH použitého pufru³⁰. Povrch kapilár se skládá z nezreagovaných siloxanových skupin, vrstvy pozitivně nabitých kvartérních amonio-

vých funkcí a vrchní hydrofilní vrstvy polyetherového řetězce. Z důvodu přítomnosti pozitivně i negativně nabitých skupin (kvartérních amoniových a nezreagovaných silanolových skupin) se náboj povlaku může měnit z kladného na záporný se změnou pH.

V jiných laboratořích byly připraveny další povlaky: polyvinylpyrolidinový³¹, polyethylenglykolový³², maltosový³³, arylpentafluorový³⁴, polyethyleniminový³⁵, hydrofobně navázaná C18 s adsorbovaným neiontovým tenzidem³⁶, poly(methylglutamátový)³⁷, z polymerního epoxidu³⁸, s navázaným α -laktalbuminem (amfoterní protein)³⁹, polyvinylalkoholový⁴⁰ a celulosový⁴¹.

4. Detekce sacharidů

4.1. Detekce nederivatizovaných sacharidů

4.1.1. Přímá detekce sacharidů v UV oblasti

Jednoduché sacharidy jako je glukosa, fruktosa a sacharosa je možné detegovat přímo při 195 nm. Extinkční koeficient se zvýší, provedeme-li elektroforézu v borátovém pufru²⁴. Sacharidy obsahující *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylglukosamin a zbytky kyseliny sialové je možno detegovat při 200 nm (cit.⁴²) nebo 185 nm (cit.⁴³). Detekce při této vlnové délce není příliš selektivní, protože všechny látky obsahující aminoskupinu vykazují silnou absorpci ve vzdálené ultrafialové oblasti. Kyselé di- a oligosacharidy vzniklé z glykosaminoglykanů je možno detegovat⁴⁴ při 232 nm. Problémem je, že elektrolyt nemůže obsahovat aditiva absorbující v této oblasti spektra. Taková je ovšem většina běžných aditiv.

4.1.2. Nepřímá detekce

Nepřímá detekce je používána u látek postrádajících důležité fyzikální vlastnosti pro přímou detekci. Do elektrolytu přidáme aditivum, které udržuje konstantní signál pozadí v detektoru. Když dosáhne detektoru nedetegovatelný ion, dojde k poklesu koncentrace iontu detegovatelného v zóně analytu, dojde k poklesu signálu pozadí a vznikne negativní pík. Nepřímá detekce může být prováděna ve stejném zařízení jako detekce přímá. Výhodou nepřímé detekce je, že je univerzální a dá se aplikovat na různé typy sloučenin bez potřeby pre- nebo post-kolonové derivatizace a že její citlivost je značná. Sacharidy mohou být detegovány v pikomolových množstvích. Detekční limit pro glukosu⁴⁵ může být i 2 pmoly. Tato metoda je vhodná především pro neredukující sacharidy, které nemohou být derivatizovány⁴⁵.

Jako aditivum jsou vybírány jednou nabitě chromoforní (nebo fluoroforní) ionty s vysokou molární absorptivitou (nebo kvantovou účinností), které neinteragují se stěnou kapiláry ani s analyty a mají efektivní elektroforetickou mobilitu blízko analytům. Díky tomu, že aditiva nesou jeden náboj, mají dobré číslo přeměny (počet molekul chromoforu nahrazených jednou molekulou analytu). Díky přibližně stejné efektivní mobilitě aditiva a analytu nedochází k chvostování migrujícího solutu v zónách. Pro nepřímou detekci sacharidů byla použita tato aditiva: kyselina sorbová⁴⁶ (254 nm), kyselina 5-sulfosalicylová⁴⁴ (214 nm), kyselina 1,2,4-trikarboxy-

benzoová⁴⁴ (214 nm), *p*-nitrofenol⁴⁷ (400 nm) nebo fluorescenční aditiva: kumarin 343 (cit.⁴⁸) a fluorescein⁴⁹.

Důležitou podmínkou úspěšné analýzy je najít vhodnou koncentraci aditiva. Při vyšších koncentracích se snižuje odezva, protože na detekční fotodiodu dopadne méně světla. Při nižších koncentracích citlivost klesá z důvodu relativně vysoké koncentrace hydroxidových iontů, které nahrazují nabitě molekuly analytu v zónách. Citlivost detekce neutrálních sacharidů je limitována, protože při pH přibližně 12 není koncentrace hydroxidových iontů zanedbatelná vůči koncentraci detegovatelného iontu⁴⁵.

4.1.3. Elektrochemická detekce

Tato detekce je založena na elektrochemických změnách na povrchu elektrody. Výhodou metody je, že může být prováděna i ve velmi úzkých kapilárách, protože citlivost není závislá na šířce kapiláry⁴. Citlivost je vysoká, mez detekce je 50 femtomolů pro redukující i neredukující sacharidy⁵⁰. Rozlišujeme amperometrickou detekci při konstantním potenciálu⁵¹ a pulsní amperometrickou detekci⁵².

Nevýhodami je, že detekci je možné provádět pouze při pH vyšším než 12. Dále detekce vykazuje odezvu i pro látky jiné než sacharidy – pro aminokyseliny, peptidy, organické kyseliny, jednoduché alkoholy, nebo alifatické aminy⁵³.

4.2. Dynamicky značené sacharidy

Detekce cyklodextrinů se provádí jako detekce jejich inkluzních komplexů s 2-aminonaftalen-6-sulfonovou kyselinou pomocí laserem indukované fluorescence⁵⁴ (LIF). Když prochází detekčním okénkem komplexy, sledujeme zvýšenou fluorescenci. Detekce cyklodextrinů může být také prováděna pomocí tvorby komplexů s kyselinou benzoovou. Při vzniku komplexů dochází k posunu absorpce v ultrafialové oblasti a komplexy mohou být detegovány jako pokles absorbance v zónách komplexů⁵⁵. Podobným způsobem je využívána tvorba komplexů amylosy a amylopektinu s jodem. Modré komplexy jodu s amylosou nebo amylopektinem jsou detegovány při 560 nm (cit.⁵⁶).

5. Derivatizace sacharidů

Derivatizace se provádí pomocí vazby derivatizačního činidla na redukující skupiny sacharidů. Derivatizační činidlo má zaručit sacharidům citlivou detekci a zároveň náboj v širokém rozsahu pH, nebo hydrofobní charakter, využitelný v micelární elektrokinetické chromatografii. Další kriteria pro úspěšnou derivatizaci jsou: *i*) vysoký výtěžek, *ii*) tvorba jednoduchých produktů, *iii*) nedetegovatelné vedlejší produkty, *iv*) minimální spotřeba vzorku při derivatizaci a čištění, *v*) mírné podmínky, které nevedou ke štěpení sacharidických podjednotek během derivatizace⁴. Pro derivatizaci redukujících sacharidů jsou používány dva rozdílné způsoby, poskytující detekční limity v rozsahu femto a attomolů¹.

5.1. Reduktivní aminace

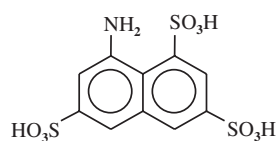
Tento způsob derivatizace je používán nejčastěji. Může být prováděn dvěma způsoby⁵⁷.

a) Derivatizace redukujících sacharidů činidlem s následnou reduktivní aminací.

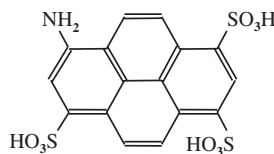
Nejprve reaguje redukující konec sacharidu s primární aminoskupinou sloučeniny chromoforu (fluoroforu) za vzniku

Schiffovy báze, která je následně redukována kyanoborhydridem sodným viz⁵⁸ schéma 3.

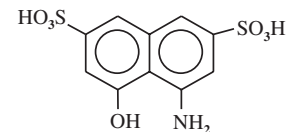
Vzniklé deriváty jsou stabilní v alkalickém i kyselém prostředí. Reakce je téměř kvantitativní a pro monosacharidy



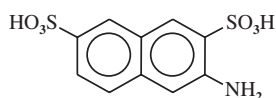
8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS)⁵⁹
 $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$
He-Cd laser 235 nm



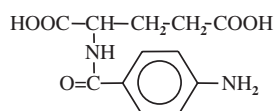
9-aminopyren-1,4,6-trisulfonová kyselina (APTS)⁶⁰
 $\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 521 \text{ nm}$
argonový iontový laser 488 nm



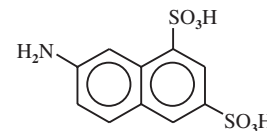
4-amino-5-hydroxynaftalen-2,7-disulfonová kyselina (AHNS)⁶¹
 $\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$
He-Cd laser 235 nm



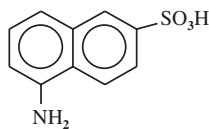
3-aminonaftalen-2,7-disulfonová kyselina (3-ANDA)⁶²
 $\lambda = 235 \text{ nm}$



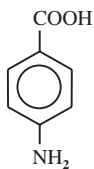
N-(4-aminobenzoyl)-*L*-glutamová kyselina (ABG)⁶³
 $\lambda_{max} = 291 \text{ nm}$



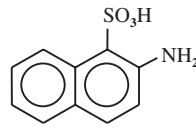
7-aminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina (ANDSA)⁶⁴
 $\lambda_{max} = 274 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 315 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$
xenon-rtuťová lampa



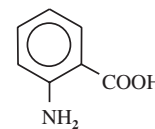
5-aminonaftalen-2-sulfonová kyselina (5-ANSA)⁶²
 $\lambda = 235 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$
He-Cd laser 235 nm



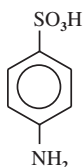
p-aminobenzoová kyselina⁶⁵
 $\lambda_{max} = 285 \text{ nm}$



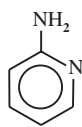
2-aminonaftalen-1-sulfonová kyselina (2-ANSA)⁶²
 $\lambda = 235 \text{ nm}$



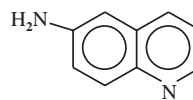
o-aminobenzoová kyselina⁶⁶
 $\lambda_{max} = 285 \text{ nm}$,
 $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$



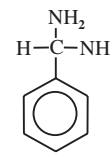
sulfanilová kyselina (SA)⁶⁴
 $\lambda_{max} = 247 \text{ nm}$



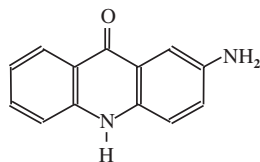
2-aminopiridinn (2-AP)⁶⁷
 $\lambda_{max} = 240 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 375 \text{ nm}$
He-Cd laser 325 nm



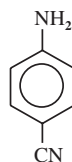
6-aminochinolin (6-AQ)⁶⁸
 $\lambda_{max} = 270 \text{ nm}$, $\lambda_{max} > 495 \text{ nm}$
He-Cd laser 325 nm



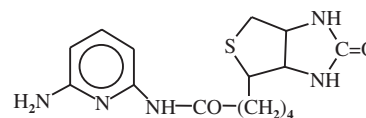
S-(−)-1-phenethylamin⁶⁹
 $\lambda = 200 \text{ nm}$



2-aminoakridon (2-AA)⁷⁰
 $\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$
argonový iontový laser 320 nm

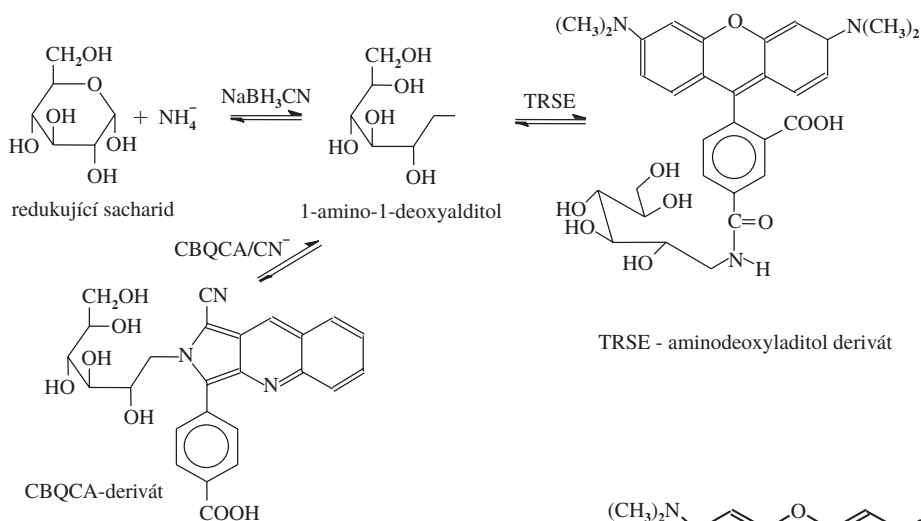
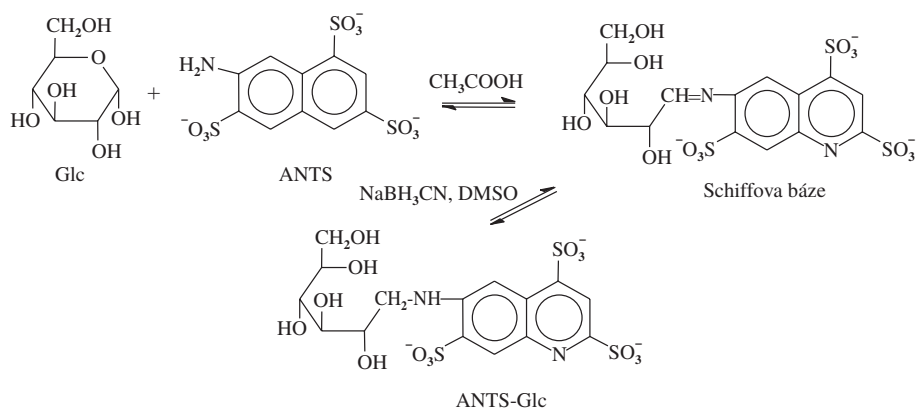


p-aminobenzonitril⁷¹
 $\lambda_{max} = 285 \text{ nm}$



2-amino-(amidobiotinyl)pyridin (BAP)⁷²
 $\lambda_{exc} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$
argonový iontový laser 320 nm

Obr. 2. Činidla používaná pro derivatizaci reduktivní aminací



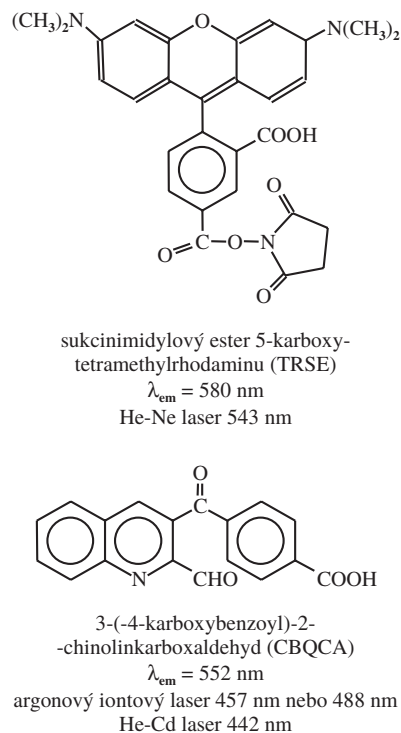
probíhá bez nežádoucích bočních reakcí jako je β -eliminace, epimerace nebo desialyzace. Činidla používaná pro tento způsob reduktivní aminace jsou uvedena na (obr. 2).

b) Derivatizace redukcujících sacharidů po reduktivní aminaci

Redukující sacharid je při této derivatizaci převeden pomocí amoniaku na 1-amino-1-deoxyderivát. Ten může reagovat se sukcinimidovým esterem 5-karboxy-tetramethylrhodaminu (TRSE) nebo s 3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolinkarboxaldehydem (CBQCA viz⁵⁸ schéma 4).

Detekční limit CBQCA-derivátu se uvádí řádově femto až attomoly⁷³. Činidlo CBQCA bylo původně vyvinuto pro citlivou detekci aminokyselin a peptidů. Nevýhoda tohoto činidla je přesně definovaný molární poměr sacharidu a činidla, při kterém je možné získat maximální výtěžek. Například molární výtěžek derivatizace galaktosaminu byl vyšší při molárním nadbytku CBQCA 1 až 2, při poměru 0,2 a 5 klesl výtěžek na 1/10. Další nevýhodou je derivatizace aminů přítomných ve vzorcích, které interferují v analýzách a desialyzace při podmínkách nutných pro reduktivní aminaci. Ale na rozdíl od předchozího způsobu derivatizace není nutné odstraňovat nadbytek činidla, protože nezreagované činidlo nefluoreskuje⁷³.

Podobně je tomu v případě TRSE. Činidlo také reaguje s nesacharidickými materiály. Detekční limit sacharidů je 60 molekul⁷⁴. Použitá činidla jsou na schématu 5.



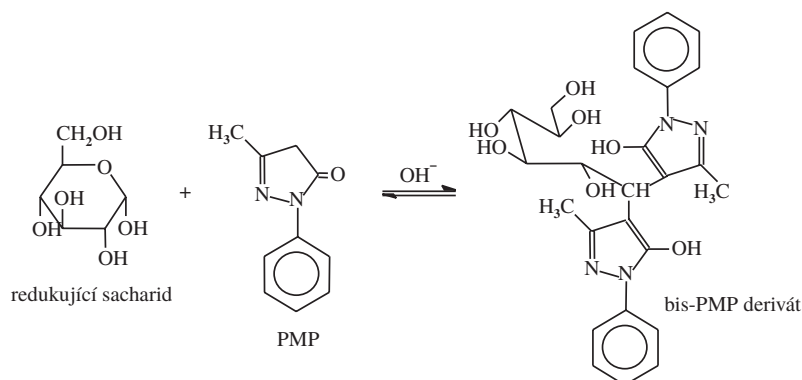


Schéma 6

5.2. Bazicky katalyzovaná kondenzace mezi karbonylovou skupinou redukujiícího sacharidu a 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem (PMP) nebo 1-(*p*-methoxy)fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem (PMPMP)

Průběh reakce je znázorněn⁵⁷ ve schématu 6.

Při reakci vznikají bis-PMP nebo bis-PMPMP deriváty. Činidlo PMPMP je více reaktivní a má o 50 % vyšší citlivost při UV detekci. Díky přítomnosti ketoskupin v pyrazolonovém kruhu je možné využít také elektrochemické detekce, ta dává lineární odezvu v rozsahu 0,5–200 pmolů. Kondenzace je prováděna při alkalických podmínkách pH ~8,3. To znamená, že nedochází k desialyzaci. Nevýhodou je, že pro derivatizaci je třeba velký nadbytek činidla, který může interferovat při analýze. Dále je zde problém při skladování bis-PMP a bis-PMPMP derivátů, které jsou v alkalickém prostředí labilní a mohou tvořit mono-PMP nebo mono-PMPMP deriváty⁷⁵. Činidla PMP a PMPMP jsou znázorněna ve schématu 7.

5.3. Derivatizace sacharidů s karboxylovou skupinou

Pro karboxylované sacharidy se používá derivatizace aminy v přítomnosti karbodiimidu⁷⁶. Reakce je znázorněna ve schématu 8.

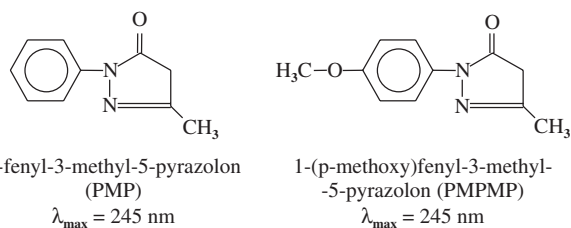


Schéma 7

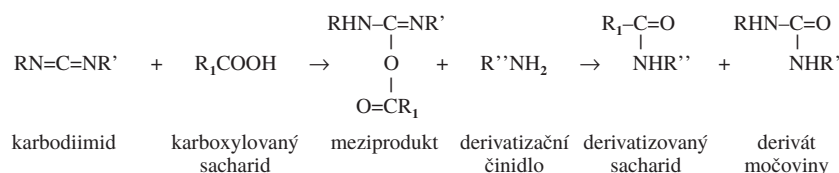


Schéma 8

6. Využití kapilární elektroforézy sacharidů v praxi

Jak bylo popsáno v úvodu, má kapilární elektroforéza sacharidů široké uplatnění v různých oborech: lékařství, farmácii, zemědělství, potravinářství atd. Naše laboratoř se specializuje zejména na stanovení sacharidů v potravinách, proto bude následující kapitola zaměřena na tuto problematiku.

6.1. Stanovení mono-, di- a trisacharidů

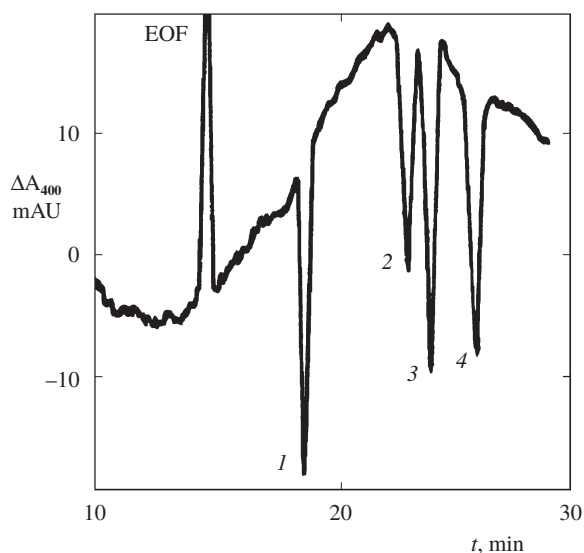
a) Nederivatizované mono-, di- a trisacharidy

Aby bylo sacharidům umožněno migrovat v elektrickém poli je třeba použít speciální elektrolyty. Detekce je prováděna elektrochemicky. Tento způsob byl úspěšně použit na stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy v běžných nápojích⁵⁰. Do elektrolytu byly přidány borátové ionty, které zlepšily díky tvorbě komplexů separace sacharidů s blízkými hodnotami pK_a . Tímto způsobem byly stanoveny sacharidy v jablečných šťávách, nebo monitorována aktivita enzymu glukosaoxidasa⁷⁷. Vedle toho byla použita k detekci sacharidů nepřímá detekce. Vzhledem k tomu, že je tato metoda detekce méně citlivá, je možné ji použít pouze pro analýzy koncentrovaných sacharidických roztoků. Například pro stanovení cukerného složení ovocných šťáv⁷⁸. Pro stanovení monosacharidů v ovocných šťávách je možné použít nepřímou detekci pomocí *p*-nitrofenolu jako aditiva⁷⁹ (obr. 3).

Nederivatizované di- a trisacharidy byly analyzovány v elektrolytech s vysokým pH^{50,80} (například trehalosa, sacharosa, laktulosa, celobiosa, rafinosa a stachyosa) za elektrochemické detekce⁵⁰, nebo byla při vysokém pH analyzována sacharosa a maltosa a detegována nepřímou detekcí⁸⁰. Pomocí borátové komplexace lze navzájem oddělit i nepatrné rozdíly v typu vazby mezi stejnými molekulami sacharidů, například glukosové dimery: maltosu, isomaltosu a celobiosu. Separace disacharidů provedli Plocek a Chmelík⁴⁷ (obr. 4).

b) Derivatizované mono-, di- a trisacharidy

Předkolonová derivatizace monosacharidů se provádí, po-



Obr. 3. Stanovení monosacharidů vyskytujících se v ovocných šťávách; kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 45 cm, efektivní délka 30 cm, elektrolyt: 6 mmol.l^{-1} *p*-nitrofenol, 40 mol.l^{-1} Na_2HPO_4 , pH 12,75, napětí 4 kV, vzorek: 2 mmol.l^{-1} (1) sacharosa, (2) maltosa, (3) glukosa, (4) fruktosa detekce byla prováděna při 400 nm

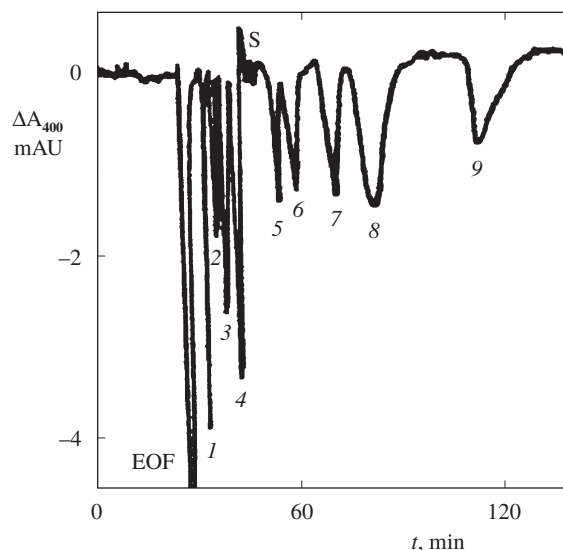
kud je třeba dosáhnout vyšší citlivost detekce analytů, udělit sacharidům náboj, nebo zlepšit slučitelnost sacharidů s určitým elektrolytovým systémem. Sacharidy jsou příliš hydrofilní, aby se mohly rozpustit v micelárních systémech, proto jsou označeny hydrofobními značkami a analyzovány micelární elektrokinetickou chromatografií, jako derivatizační činidlo se používá například 2-aminoakridon⁸¹. Tato sloučenina může být také použita pro enantiomerní separace, když jsou do elektrolytu přidány β -cyklohextriny⁸¹. Pro separace pomocí micelární elektrokinetické chromatografie byla dále použita tato činidla: 4-aminobenzonitril⁷¹, nebo 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon⁸². Fluorescenčně byly monosacharidy značeny pomocí 9-aminopyren-1,4,6-trisulfonové kyseliny^{60,83}. Enantiomerní separace D- a L-monosacharidů jsou prováděny po jejich derivatizaci 2-aminopiridinem, 5-aminonaftalen-2-sulfonovou kyselinou, nebo 4-amino-5-hydroxynaftalen-2,7-disulfonová kyselina v přítomnosti lineárních a cyklických dextrinů⁶¹, nebo S(-)-1-fenylethylaminu⁶⁹. Hydrolyzáty xylanů a hemi-celulos jsou analyzovány pomocí derivatizace *p*-aminobenzoovou kyselinou a rozděleny na základě rozdílné komplexace boráty⁶⁵.

Některé disacharidy včetně gentiobiosy, maltosy, laktosy, celobiosy a melibiosy byly značeny 9-aminopyren-1,4,6-trisulfonovou kyselinou⁸³ a separovány pomocí kapilární elektroforézy.

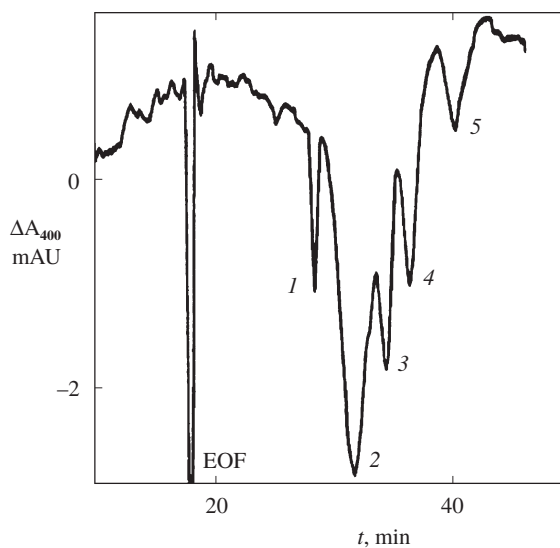
6.2. Stanovení oligosacharidů a polysacharidů

a) Nederivatizované oligosacharidy a polysacharidy

Separace vyšších oligosacharidů je možné provádět pomocí borátové komplexace maximálně do čtyř glukosových jednotek (obr. 5). Vyšší nederivatizované oligosacharidy nelze od sebe pomocí kapilární elektroforézy separovat.



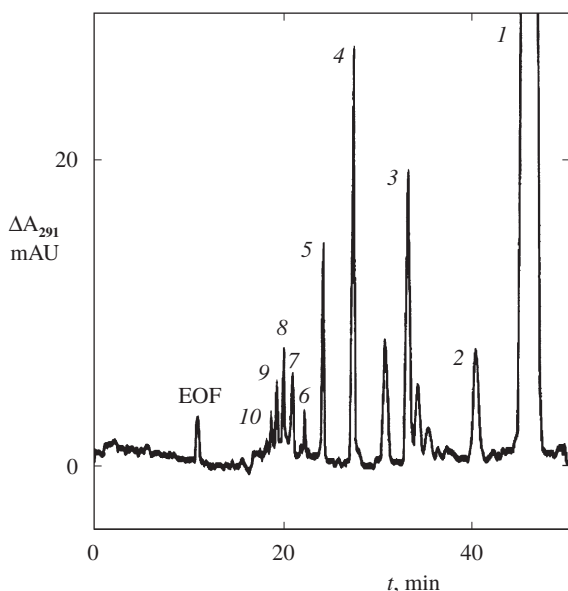
Obr. 4. Separace disacharidů jako komplexů s boráty (cit.⁴⁷); kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 75 μm vnitřní průměr, délka 70 cm, efektivní délka 50 cm, elektrolyt: 6 mmol.l^{-1} *p*-nitrofenol, 175 mmol.l^{-1} borát sodný, pH 10,00, napětí 6 kV, vzorek: (1) sacharosa (15 mmol.l^{-1}), (2) celobiosa (10 mmol.l^{-1}), (3) maltosa (15 mmol.l^{-1}), (4) laktosa (15 mmol.l^{-1}), (5) 4-*O*-galaktosyl-mannopyranosid (5 mmol.l^{-1}), (6) isomaltosa (10 mmol.l^{-1}), (7) fruktosa (10 mmol.l^{-1}), (8) melibiosa (25 mmol.l^{-1}), (3) glukosa (15 mmol.l^{-1}), (S) systémový pík, detekce byla prováděna při 400 nm



Obr. 5. Kapilární elektroforéza maltooligosacharidů jako komplexů s boráty; kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 45 cm, efektivní délka 30 cm, elektrolyt: 6 mmol.l^{-1} *p*-nitrofenol, 400 mmol.l^{-1} borát sodný, pH 10,00, napětí 4 kV, vzorek: (1) sacharosa 10 mmol.l^{-1} , (2) směs maltooligosacharidů o 5–9 jednotkách 20 mmol.l^{-1} , (3) maltotetraosa 10 mmol.l^{-1} , (4) maltotriosa 10 mmol.l^{-1} , (5) maltosa 10 mmol.l^{-1} , detekce byla prováděna při 400 nm

b) Derivatizované oligosacharidy a polysacharidy

Pomocí derivatizace a detekce v UV oblasti lze separovat oligosacharidy až do velikosti 30 homologních zbytků⁶³. Směs



Obr. 6. Separace maltooligosacharidů od 2 do 10 glukosových jednotek jako derivátů ABG; kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 45 cm, efektivní délka 30 cm, elektrolyt: 200 mmol.l^{-1} borát sodný, pH 10,00, napětí 4 kV; vzorek: ABG deriváty maltooligosacharidů s 2–9 jednotkami. (1) derivatizační činidlo, (2)–(9) deriváty maltooligosacharidů (čísla odpovídají počtu glukosových jednotek) (EOF) elektroosmóza. Detekce byla prováděna při 291 nm

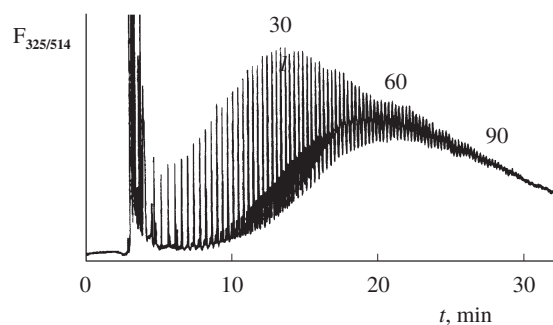
podobná jako na obr. 5 byla úspěšně separována po derivatizaci kyselinou *N*-(4-aminobenzoyl)-L-glutamovou (obr. 6).

Pro velice citlivá stanovení homologních oligosacharidů, například maltooligosacharidů je používána derivatizace fluoreskujícími činidly, nejčastěji 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonovou kyselinou^{59,84}. Za pomoci této derivatizace je možné separovat více než 90 oligomerů za méně než 30 minut⁸⁵. Deriváty činidla 3-aminonaftalen-2,7-disulfonové kyseliny mají stejné rozlišení, ale separovat lze maximálně 30 oligomerů. U derivátů maltooligosacharidů s 2-aminonaftalen-1-sulfonovou kyselinou a 5-aminonaftalen-2-sulfonovou kyselinou bylo rozlišeno pouze 20 oligomerů a byla zde menší účinnost. Doba migrace derivátů 2-aminonaftalen-1-sulfonové kyseliny je 4 krát nižší než derivátů 5-aminonaftalen-2-sulfonové kyseliny⁶².

Pořadí derivatizovaných oligosacharidů na obrázku 6 je opačné než na obrázku 7. V nepokryté kapiláře (obr. 6) je uplatněna elektroosmóza, která funguje jako pumpa a nese záporně nabitě deriváty ke katodě – nejprve deriváty s nejnižší elektroforetickou mobilitou. V pokryté kapiláře (obr. 7) je elektroosmóza eliminovaná a deriváty putují k anodě – nejprve deriváty s nejvyšší elektroforetickou mobilitou.

7. Příklady využití sacharidů jako aditiv v kapilární elektroforeze

Kromě stanovení různých sacharidů pomocí kapilární elektroforezy, lze sacharidy využít v této technice jako aditiv při stanovení jiných látek.



Obr. 7. Elektroforetická separace oligomerů dextransu derivatizovaných ANTS (cit.⁸⁵); kapilára: Polymicro Technologies, Phoenix, USA, 50 μm vnitřní průměr, délka 50 cm, efektivní délka 35 cm, modifikovaná na vnitřním povrchu lineárním polyakrylamidem²⁴, elektrolyt: 0,1 mol.l^{-1} Tris-borát, pH 8,5, napětí 20 kV, fluorimetrická detekce: $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$

Polysacharidy byly použity jako separační média, ve kterých se látky dělí na základě rozdílů velikostí. První práce na toto téma provedl Ogston a spol.⁸⁶ – použil roztoky kyseliny hyaluronové pro elektroforezu polystyrenových částic. Separace DNA byly také prováděny v roztocích hydroxypropylmethylcelulosy⁸⁷. Kapalné agarosové roztoky udržované při jejich želatinizující teplotě byly poprvé použity Bočkem a Chrambachem na separaci sulfatovaných polystyrenových standardů (do průměru částic 2 μm) a na cirkulární⁸⁸ a lineární DNA (cit.⁸⁹).

Sacharidy byly přidávány jako aditivum pro separace na základě velikostí. Elektroforetická migrace uniformě nabitých polysacharidů může být ovlivněna přidávkem opačně nabitěho moderátoru. Stefansson a spol.⁹⁰ použili aminodextran pro zlepšení separace hyaluronanů na základě jejich velikosti v gelové kapilární elektroforeze. Aminodextran interaguje s negativně nabitými hyaluronany iontově výměnným mechanismem. Síla interakcí mezi aminodextranem a hyaluronanem závisí na délce řetězce hyaluronové kyseliny.

Sacharidy byly aplikovány jako chirální selektory, například cyklodextriny pro jejich schopnost rozlišit enantiomery mechanismem inkusních komplexů^{91,92}. Dále byl použit heparin^{93,94} nebo chondroitin sulfát A, B a C^{95,96} jako chirální selektor pro enantiomerní rozdělení různých farmaceutických sloučenin.

Sacharidy byly použity jako povlaky kapilár pro kapilární elektroforezu. Metodu pro přípravu stabilních celulosových povlaků popsal Huang a spol.⁹⁷ Celulosové deriváty (například hydroxypropylcelulosa) jsou imobilizovány na povrch kapiláry. Takový povlak je hydrolyticky stabilní, vykazuje reprodukovatelnou separaci derivátů oligosacharidů a glykoforem proteinů v pufrch o vysokém pH.

Deriváty sacharidů se používají i na dynamické pokrytí kapilár. Hydroxypropylmethylcelulosa přidaná do katolytu, kterým je kapilára naplněna dříve než je nastříknut vzorek a spuštěn elektrický proud, tvoří dynamické pokrytí stěn kapiláry a snižuje interakce mezi proteiny a stěnou. Malá množství hydroxypropylmethylcelulosy přidaná do pufru umožní provádět dynamickou izoelektrickou fokusaci proteinů s vysokým rozlišením v nepokryté kapiláře za přítomnosti elektroosmotického toku⁹⁸.

8. Závěr

Kapilární elektroforézu lze použít pro stanovení různých sacharidů ve vzorcích farmaceutických, medicínských, potravinářských a dalších. Výhodou je především její jednoduchost a účinnost. Pomocí kapilární elektroforézy je možné separovat jinak těžko rozlišitelné izomery sacharidů, které se liší například jen v jedné vazbě.

Tato práce vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum EP 9410/99.

LITERATURA

- Oefner P., Scherz H.: *Adv. Electrophor.* 7, 155 (1994).
- Dionex LPN 032861, Ion Chromatography Cookbook*, str. II-34. Dionex, Sunnyvale 1987.
- Barsuhn K., Kotarski S. F.: *J. Chromatogr.* 546, 273 (1991).
- El Rassi Z., Mechref Y.: *Electrophoresis* 17, 275 (1996).
- El Rassi Z.: *Adv. Chromatogr.* 34, 177 (1994).
- Garner T. W., Yeung E. S.: *J. Chromatogr.* 515, 639 (1990).
- Frahn J. L., Mills J. A.: *Aust. J. Chem.* 12, 65 (1959).
- Redelman J. A. Jr.: *Adv. Chem. Ser.* 117, 51 (1971).
- Antikainen P. J.: *Acta Chem. Scand.* 13, 312 (1959).
- Weigel H.: *Adv. Carbohydr. Chem.* 18, 61 (1963).
- Roy G. L., Laferrriere A. L., Edwards J. O.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* 4, 106 (1957).
- Borune E. J., Hutson D. H., Weigel H.: *J. Chem. Soc.* 1960, 4252.
- Searle F., Weigel H.: *Carbohydr. Res.* 85, 515 (1980).
- Honda S., Yamamoto K., Suzuki S., Ueda M., Kakehi K.: *J. Chromatogr., A* 558, 327 (1991).
- Angyal S. J.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 47, 1 (1989).
- Bazzanella A., Bachmann K.: *J. Chromatogr., A* 799, 238 (1998).
- Van Duin V., Peters J. A., Kieboom A. P. G., Van Bekkum H.: *Tetrahedron* 41, 3411 (1985).
- Davis H. B., Mott C. J. B.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 76, 1991 (1980).
- Foster A. B.: *Chem. Ind.* 1952, 828.
- Makkee M., Kieboom A. P. G., Van Bekkum H.: *Tetrahedron* 41, 3411 (1985).
- Honda S., Iwase S., Makino A., Fujiwara S.: *Anal. Biochem.* 176, 72 (1989).
- Honda S., Suyuki S., Nose A., Yamamoto K., Kakehi K.: *Carbohydr. Res.* 215, 193 (1991).
- Landers J. P., Oda P. R., Schuchard M. D.: *Anal. Chem.* 64, 2846 (1992).
- Hofster-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer H. M.: *Anal. Chem.* 63, 1541 (1991).
- Angyal S. J., Davies K. P.: *Chem. Commun.* 1971, 500.
- Hjertén S.: *J. Chromatogr.* 347, 191 (1985).
- Cobb K. A., Dolník V., Novotný M.: *Anal. Chem.* 62, 2478 (1990).
- Huang M., Workink W. P., Lee M. L.: *J. Microbiol. Sep.* 4, 233 (1992).
- Nashabeh W., El Rassi Z.: *J. Chromatogr.* 632, 157 (1993).
- Smith J. T., El Rassi Z.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 573 (1992).
- Mc Cormick R. M.: *Anal. Chem.* 60, 2322 (1988).
- Wang T., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr.* 594, 325 (1992).
- Bruin G. J. M., Huisden R., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 480, 339 (1989).
- Swedberg S. A.: *Anal. Biochem.* 185, 51 (1990).
- Towns J. K., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 516, 69 (1990).
- Towns J. K., Regnier F. E.: *Anal. Chem.* 63, 1126 (1991).
- Bentrop D., Kohr J., Eugelhardt H.: *Chromatographia* 32, 171 (1991).
- Towns J. K., Bao J., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 599, 227 (1992).
- Maa F. Y., Hyver K. J., Swedberg S. A.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 14, 65 (1991).
- Gilges M., Husmann H., Kleemis M. H., Motsch S. R., Schomburg G.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 452 (1992).
- Smith J. T., El Rassi Z.: *Electrophoresis* 14, 396 (1993).
- Hughes D. E.: *J. Chromatogr., B* 657, 315 (1994).
- Kakehi K., Susami A., Taga A., Suzuki S., Honda S. J.: *J. Chromatogr., A* 608, 209 (1994).
- Damm J. B. L., Overklift G. T.: *J. Chromatogr., A* 678, 151 (1994).
- Ginsburg V., Robbins P.: *Biology of the Carbohydrates*. Wiley, New York 1981.
- Vorndran A. C., Oefner P. J., Scherz H., Bonn G. K.: *Chromatographia* 33, 163 (1992).
- Plocek J., Chmelík J.: *Electrophoresis* 18, 1148 (1997).
- Garne T. W., Yeung E. S.: *J. Chromatogr.* 515, 639 (1990).
- Richmond M. D., Yeung E. S.: *Anal. Biochem.* 210, 245 (1993).
- Colon L. A., Dadoo R., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 65, 476 (1993).
- Ye J., Baldwin R. P.: *J. Chromatogr., A* 687, 141 (1994).
- Lu W., Cassidy R. M.: *Anal. Chem.* 65, 2878 (1993).
- Weber P., Kornfelt T., Klausen N. K., Lunte S. M.: *Anal. Biochem.* 225, 135 (1995).
- Penn S. G., Chiu R. W., Monnig C. A.: *J. Chromatogr., A* 680, 233 (1994).
- Nardi A., Fanali S., Foret F.: *Electrophoresis* 11, 774 (1990).
- Brewster J. D., Fishman M. L.: *J. Chromatogr., A* 693, 382 (1995).
- Bardelmeijer H. A., Lingeman H., de Ruyter C., Underberg W. J. M.: *J. Chromatogr., A* 807, 3 (1998).
- Hase S.: *J. Chromatogr., A* 720, 173 (1996).
- Chiesa C., Horváth C.: *J. Chromatogr.* 645, 337 (1993).
- Evangelista R. A., Liu M., Chen F.: *Anal. Chem.* 67, 2239 (1995).
- Stefansson M., Novotny M. V.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11573 (1993).
- Chiesa C., O'Neill R. A.: *Electrophoresis* 15, 1132 (1994).
- Plocek J., Novotny M. V.: *J. Chromatogr., A* 757, 215 (1997).
- Mechref Y., El Rassi Z.: *Electrophoresis* 15, 627 (1994).
- Huber C., Grill E., Oefner P., Bobleter O.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 825 (1994).

66. Anumula K. R.: *Anal. Biochem.* 220, 275 (1994).
67. Honda S., Akao E., Suzuki S., Okuda M., Kakehi K., Nakamura J.: *Anal. Biochem.* 180, 351 (1989).
68. Nashabeh W., El Rassi Z.: *J. Chromatogr.* 600, 279 (1992).
69. Noe C. R., Freissmuth J.: *J. Chromatogr., A* 704, 503 (1995).
70. Jackson P.: *Anal. Biochem.* 216, 243 (1994).
71. Schwaigen H., Oefner P., Huber C., Grill E., Bonn G. K.: *Electrophoresis* 15, 941 (1994).
72. Rothenberg B. E., Hayers B. K., Toomre D., Manzi A. E., Varki A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11939 (1993).
73. Liu J., Shiota O., Wiesler D., Novotny M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2302 (1991).
74. Zaho J. Y., Diedrich P., Zhang Y., Hindsgaul O., Dovicki N. J.: *J. Chromatogr., B* 657, 307 (1994).
75. Honda S., Ueno T., Kakehi K.: *J. Chromatogr.* 608, 289 (1992).
76. Mechref Y., El Rassi Z.: *Anal. Chem.* 68, 1771 (1996).
77. Ye J., Baldwin R. P., *J. Chromatogr., A* 687, 141 (1994).
78. Klockow A., Paulus A., Figueiredo V., Amadò R., Widmer H. M., *J. Chromatogr., A* 680, 187 (1994).
79. Žídková J., Chmelík J.: *Nepublikované výsledky.*
80. Xu X., Kok W. T., Poppe H.: *J. Chromatogr., A* 716, 231 (1995).
81. Greenaway M., Okafo G. N., Camilleri P., Dhanak D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 14, 1691 (1994).
82. Chiesa C., Oefner P. J., Zieske L. R., O'Neill R. A.: *J. Cap. Electrophor.* 2, 175 (1995).
83. Chen F., Evangelista R. A., *Anal. Biochem.*: 230, 273 (1995).
84. Klockow A., Widmer H. M., Amadò R., Paulus A.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 350, 415 (1994).
85. Chmelík J., Chmelíková J., Novotný M. V.: *J. Chromatogr., A* 790, 96 (1997).
86. Ogston A. G., Preston B. N., Wells J. D.: *Proc. R. Soc. (London)*, A 333, 297 (1973).
87. Schwartz H. E., Ulfelder K., Sunzeri F. J., Bush M. P., Brownlee R. G.: *J. Chromatogr.* 559, 267 (1991).
88. Boček P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 13, 31 (1992).
89. Boček P., Chrambach A.: *Electrophoresis* 12, 1059 (1992).
90. Stefansson M., Sudor J., Hong M., Chmelíková J., Chmelík J., Novotný M. V.: *Anal. Chem.* 69, 3846 (1997).
91. Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* 635, 113 (1993).
92. Amini A., Sorman U. P., Lindgren B. H., Westerlund D.: *Electrophoresis* 19, 731 (1998).
93. Stalcup A. M., Agyei N. M.: *Anal. Chem.* 66, 3054 (1994).
94. Agyei N. M., Gahm K. H., Stalcup A. M.: *Anal. Chim. Acta* 307, 185 (1995).
95. Nishi H.: *J. Chromatogr., A* 735, 345 (1996).
96. Gotti R., Cavrini V., Andrisano V., Mascellani G.: *J. Chromatogr., A* 814, 205 (1998).
97. Huang M., Plocek J., Novotny M. V.: *Electrophoresis* 16, 396 (1995).
98. Thormann W., Caslavská J., Molteni S., Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 589, 321 (1992).

J. Žídková and J. Chmelík (*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*):
Electrophoresis of Carbohydrates

Capillary electrophoresis (CE) is well suitable for determination of saccharides in a variety of pharmaceutical, biomedical and food samples. It is able to distinguish subtle differences between carbohydrate molecules which are difficult to detect and/or resolve. Other advantages of CE are its simplicity and effectivity. The review deals with the principles and practical applications of determination of mono-, oligo- and polysaccharides.

Česká společnost chemická přijme

novou výkonnou redaktorku Chemických listů

Kvalifikační předpoklady: VŠ vzdělání chemického zaměření
Předpokládaný nástup: jaro 2001, několikaměsíční zaškolení
Bližší informace: prof. B. Kratochvíl, tel. 02/3113908, 0606/870366, e-mail: kratochb@vscht.cz
 Ing. C. Jirátová, tel. 02/21082370, e-mail: jiratova@csvts.cz
 Ing. M. Bláhová, tel. 02/22220184, e-mail: mblahova@csvts.cz