

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

**ÚJFAJTA CUKOR ELVÁLASZTÁSI ÉS MEGHATÁROZÁSI MÓDSZER
KIFEJLESZTÉSE KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZISRE**

DOI:10.18136/PE.2025.965

Készítette:

Farsang Róbert

Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. Guttman András, Dsc.

Professor emeritus

Dr. Járvas Gábor

Tudományos főmunkatárs

**Pannon Egyetem
Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet
Transzlációs Glikomika Kutatócsoport**



**Veszprém
2025**

**ÚJFAJTA CUKOR ELVÁLASZTÁSI ÉS MEGHATÁROZÁSI MÓDSZER
KIFEJLESZTÉSE KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZISRE**

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Kémiai tudományok tudományágban

Írta: Farsang Róbert

Témavezetők: Dr. Guttman András, Dr. Járvás Gábor

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Guttman András

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Járvás Gábor

Az értekezés bírálatra bocsátható.

.....
TDHT elnök

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján %-ot ért el.

A bíráló Bizottság tagjai:

elnök:

bírálok:

tagok:

Veszprém,

.....
Bíráló Bizottság elnök

A doktori (PhD) oklevél minősítése:

Veszprém,

.....
az EDHT elnöke

Kivonat

Újfajta cukor elválasztási és meghatározási módszer kifejlesztése kapilláris elektroforézisre

A kutatómunka célja egy fluoreszcensen jelölt glikánok elválasztására szolgáló, nagy felbontóképességű, on-line elektrokinetikus tisztítást megvalósító kapilláris elektroforézis (CE) alapú analitikai, és az ehhez kapcsolódó, Glükóz Egységen alapuló szerkezetmeghatározási módszer kifejlesztése.

Az „Irodalmi összefoglaló” a glikoproteinek diagnosztikai és gyógyszeripari szerepén keresztül ismerteti az aszparaginhoz kötött glikánok (N-glikánok) analitikájának fontosságát. Bemutatja az egyik legelterjedtebb glikán analitikában használt elválasztási módszer, a kapilláris elektroforézis elvi hátterét, alap technikáit, a különböző detektálási módokat, valamint az on-line prekoncentrációs technikák fajtáit. Kitér a glikánok fluoreszcens jelölésére és tisztítására, valamint bemutatja a glikánok CE-vel történő szerkezetmeghatározási módszereit. Az „Anyagok és eszközök” fejezet a kísérletekhez használt anyagokat és berendezéseket foglalja össze.

A Szerző kidolgoz egy on-line elektrokinetikus tisztítást megvalósító elválasztási rendszert, ami egy elektroosztatikus áramlás (EOF) vezérelt kapilláris zónaelektroforézis glikán analitikai módszer, amely háttéreltrollként 253 mM Tris bázis, 150 mM kapronsav, pH=8,1 puffert alkalmaz. Ez a nagyhatékonyságú módszer képes a mintatisztítási lépésen át nem esett, fluoreszcensen jelölt glikánok vizsgálatára. A Szerző az újfajta glikán elválasztási rendszerrel nagy térfogatú mintafelhalmozás (LVSS) alapú prekoncentrációs eljárást is létrehoz.

Emellett a Szerző megvizsgálja az iparban elterjedten használt, szilárd fázisú extrakción alapuló (szabad festéket eltávolító) mintatisztítási módszer hatékonyságát, ami - a Szerző által létrehozott rendszerrel ellentétben - a jelenleg iparban használt kapilláris gélelektroforézis esetén szükséges mintaelőkészítési lépés a fluoreszcensen jelölt glikánok vizsgálatánál. Azt a megállapítást teszi, hogy ez a tisztítási lépés többféle kiindulási minta esetén látszólag tendencia nélkül a különböző glikán struktúrák mennyiségi meghatározásánál kritikus hibát okoz.

A kidolgozott elválasztási módszerhez kapcsolódóan a Szerző kifejleszt egy belső standardokat és maltodextrin létrát használó, kis szórással, valamint nagy reprodukálhatósággal rendelkező Glükóz Egységet (GU) meghatározó algoritmust, amelynek alkalmazását egy konkrét példán keresztül mutatja be. A GU értékek robusztusságát 36 humán immunglobulin G1 glikán minta mérés 8 véletlenszerűen kiválasztott struktúráján vizsgálja (%RSD > 0,1%), illetve a reprodukálhatóságot háromféle kapilláris hosszon végzett mérések során kapott GU értékek összehasonlításán végzi, amely esetben szintén %RSD > 0,1% szórásértéket kap, ami rendkívül jónak mondható.

Abstract

Development of a novel sugar separation and determination method for capillary electrophoresis

The aim of this research is to develop a capillary electrophoresis (CE) based analytical method for the high resolution separation of fluorescently labelled glycans, with on-line electrokinetic cleanup, and develop a structure determination method based on the Glucose Unit approach.

The "Literature Summary" describes the importance of the analysis of asparagine-bound glycans (N-glycans) through the major role of glycoproteins in diagnostics and pharmaceuticals. It introduces the principles of capillary electrophoresis, one of the most widely used separation methods in glycan analysis, basic CE techniques, different detection methods, and types of on-line preconcentration techniques. It covers the fluorescent labelling and purification of glycans and describes methods for the structure determination of glycans by CE. The chapter "Materials and instruments" summarizes the materials, equipment and software used in the experiments.

The author develops a separation system for on-line electrokinetic purification using an electro-osmotic flow (EOF) driven capillary zone electrophoresis method with 253 mM Tris-base, 150 mM caproic acid, pH=8.1 buffer as background electrolyte. This high-efficiency method can detect fluorescently labelled glycans that have not undergone the purification sample preparation step. The author also implements a preconcentration procedure based on high-volume sample stacking (LVSS) with the novel glycan separation system.

In addition, the Author investigates the efficiency of the commonly used sample (excess dye removal) purification method based on solid phase extraction, which, in contrast to the Author's system, is a necessary sample preparation step for the analysis of fluorescently labelled glycans in the currently used capillary gel electrophoresis. It is concluded that this purification step causes critical error in the quantification of different glycan structures for several starting samples with apparently no trend.

In connection with the developed separation method, the author develops a Glucose Unit (GU) determination algorithm using internal standards and a maltodextrin ladder with low standard deviation and high reproducibility, then demonstrates its application by a work example. The robustness of the GU values is tested on 8 randomly selected structures of 36 human immunoglobulin G1 glycan sample measurements (%RSD > 0.1%) and the reproducibility is tested by comparing GU values obtained from triplicate measurements on three different capillary lengths, in which case also %RSD > 0.1% standard deviation is obtained, which is considered to be very good.

Auszug

Entwicklung einer neuartigen Zuckertrennungs- und -bestimmungsmethode für die Kapillarelektrophorese

Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Entwicklung einer auf Kapillarelektrophorese (CE) basierenden Analyseverfahren für die hochauflösende Trennung fluoreszenzmarkierter Glykane mit elektrokinetischer Online-Reinigung und einer damit verbundenen Strukturbestimmungsmethode auf der Grundlage der Glukoseeinheit.

Die „Literaturzusammenfassung“ beschreibt die Bedeutung der Analyse von Asparagin-gebundenen Glykanen (N-Glykanen) durch die große Rolle von Glykoproteinen in der Diagnostik und Pharmazie. Es werden die Grundsätze der Kapillarelektrophorese, einer der am häufigsten verwendeten Trennmethode in der Glykananalyse, grundlegende CE-Techniken, verschiedene Nachweismethoden und Arten von Online-Vorkonzentrationsverfahren vorgestellt. Es behandelt die Fluoreszenzmarkierung und Reinigung von Glykanen und beschreibt Methoden zur Strukturbestimmung von Glykanen durch CE. Das Kapitel „Materialien und Instrumente“ gibt einen Überblick über die in den Experimenten verwendeten Materialien, Geräte und Software.

Der Autor entwickelt ein Trennsystem für die elektrokinetische Online-Reinigung unter Verwendung einer durch elektroosmotischen Fluss (EOF) angetriebenen Kapillarezonenelektrophorese-Methode mit 253 mM Tris-Base, 150 mM Capronsäure, pH=8,1-Puffer als Hintergrund-Elektrolyt. Mit dieser hocheffizienten Methode können fluoreszenzmarkierte Glykane nachgewiesen werden, die den Schritt der Probenvorbereitung zur Reinigung nicht durchlaufen haben. Der Autor implementiert auch ein Vorkonzentrationsverfahren auf der Basis von High-Volume Sample Stacking (LVSS) mit dem neuartigen Glykan-Trennsystem.

Darüber hinaus untersucht der Autor die Effizienz der üblicherweise verwendeten Probenreinigungsmethode (Entfernung des freien Farbstoffs) auf der Grundlage der Festphasenextraktion, die im Gegensatz zum System des Autors ein notwendiger Probenvorbereitungsschritt für die Analyse von fluoreszenzmarkierten Glykanen in der derzeit verwendeten Kapillargel-Elektrophorese ist. Es wird geschlussfolgert, dass dieser Aufreinigungsschritt kritische Fehler bei der Quantifizierung verschiedener Glykanstrukturen für mehrere Ausgangsproben verursacht, wobei es offenbar keinen Trend gibt.

Im Zusammenhang mit der entwickelten Trennmethode entwickelt der Autor einen Algorithmus zur Bestimmung der Glukoseeinheit (GU) unter Verwendung interner Standards und einer Maltodextrinleiter mit geringer Standardabweichung und hoher Reproduzierbarkeit und demonstriert dessen Anwendung anhand eines Arbeitsbeispiels. Die Robustheit der GU-Werte wird an 8 zufällig ausgewählten Strukturen von 36 menschliches Immunglobulin G1- Glykanprobenmessungen getestet (%RSD > 0,1 %),

und die Reproduzierbarkeit wird durch den Vergleich von GU-Werten geprüft, die aus dreifachen Messungen an drei verschiedenen Kapillarlängen gewonnen wurden, wobei auch in diesem Fall eine Standardabweichung von %RSD > 0,1 % erzielt wird, was als sehr gut angesehen wird.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések listája	1
2	Bevezetés és célkitűzés	2
3	Irodalmi összefoglaló	3
3.1	A glikoproteinek biológiai jelentősége	3
3.2	Kapilláris elektroforézis alapjai	4
3.2.1	Detektálási módok	7
3.2.2	Elektroforetikus mobilitás	9
3.2.3	Elektroozmotikus áramlás	10
3.2.4	On-line prekoncentrációs technikák	11
3.3	Glikánok fluoreszcens jelölése.....	16
3.3.1	Szabad festék eltávolítása szilárd fázisú extrakcióval	17
3.4	Szénhidrát struktúra meghatározási módszerek	18
3.4.1	A migrációs idő kalibrálása maltodextrin létrával és belső standardokkal.....	18
3.4.2	Enzimatisz szekvenálással történő szénhidrát struktúrameghatározás	19
3.4.3	Glikán struktúrameghatározás CE-MS kapcsolással	20
4	Anyagok és Eszközök	21
4.1	Vegyszerek.....	21
4.2	Mintaelőkészítés	21
4.2.1	N-glikán felszabadítás	21
4.2.2	Fluoreszcens jelölés	21
4.2.3	Mintatisztítás	21
4.3	Kapilláris elektroforézis.....	22
5	Eredmények.....	23
5.1	CATRIS elválasztó puffer kifejlesztése.....	23
5.2	Prekoncentrációs módszer fejlesztése CATRIS elválasztási módszerre.....	29
5.3	A mágneses mikrogyöngyökkel végzett mintatisztítás hatékonyságának vizsgálata. 34	
5.4	Struktúra meghatározási módszer kidolgozása a CATRIS elválasztási módszerhez. 41	
5.4.1	Elvi háttér	41
5.4.2	A GU számítási algoritmus implementálása Excel táblázatban	46
5.4.3	A GU számítási módszer bemutatása egy példán keresztül	48
5.4.4	A GU számítási módszer robusztusságának vizsgálata	51
5.4.5	A GU számítási módszer reprodukálhatóságának vizsgálata	54
5.4.6	GU számítási módszer vizsgálata DP4 és DP15 belső standardok használatával . 56	
6	Összefoglalás.....	57
	Tézispontok	59

Theses	61
Publikációk.....	63
Az értekezés tématerületét érintő publikációk	64
Köszönetnyilvánítás	65
Hivatkozások.....	66

1 Rövidítések listája

APTS	8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav
BFS	Nem bevont falú kvarckapilláris (bare fused-silica)
BGE	Háttélektrolit (background electrolyte)
CATRIS	150 mM kapronsav, 253 mM Trisz(hidroxi-metil)-amino-metán, pH=8,1 puffer
CE	Kapilláris elektroforézis
CE-LIF	Kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással
CGE	Kapilláris gélelektroforézis (capillary gel electrophoresis)
DP1	Glükóz
DP10	Maltodekaóz
DP11	Maltounodekaóz
DP12	Maltododekaóz
DP13	Maltodekatrióz
DP14	Maltodekatetraóz
DP15	Maltodekapentaóz
DP2	Maltóz
DP3	Maltotrióz
DP4	Maltotetraóz
DP5	Maltopentaóz
DP6	Maltohexaóz
DP7	Maltoheptaóz
DP8	Maltoktaóz
DP9	Maltononaóz
DTT	Ditiotreitol
EOF	Elektroosmotikus áramlás (electroosmotic flow)
GU	Glükóz Egység (Glucose Unit)
hIgG1	Humán immunoglobulin G 1
HPLC	Nagynyomású folyadékkromatográfia
HR-NCHO	Nagy-felbontású N-glikán elválasztó gél (High-Resolution N-linked Carbohydrate separation buffer)
IST	Belső standard (internal standard)
LVSS	Nagy térfogatú mintafelhalmozás (Large volume sample stacking)
MD	Maltodextrin
MS	Tömegspektrométer
RFU	Relatív fluoreszcens egység (Relative fluorescence unit)
RSD	Relatív standard deviáció (relative standard deviation)
SMRS	Mintamátrix eltávolító lépés (Sample Matrix Removal Step)
THF	Tetrahidrofurán
Tris base	Trisz(hidroxi-metil)-amino-metán
NP-40	Nonidet P-40

2 Bevezetés és célkitűzés

A fehérjékhez kötött összetett cukrok (glikánok) minőségi és mennyiségi vizsgálata egyre nagyobb szerepet játszik egyes betegségek diagnosztizálásában, valamint fehérjealapú gyógyszerek minőségi állandóságának monitorozásában [1]. A cukorstruktúrák számos élettani folyamatban játszanak kulcsszerepet, részt vesznek például immunfolyamatokban, jelátvitelben, a fehérjék stabilitásának és oldatosságának kialakításában. Egyes betegségekben, többek között a rák és autoimmun betegségek esetén az egyes fehérjékhez kötött cukorstruktúrák mennyiségi aránya megváltozik, így azok biomarkerként használhatóak. Ahhoz, hogy a glikán struktúrák külön-külön vizsgálhatóak legyenek, legtöbbször valamilyen elválasztási módszert használnak, például nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiát, vagy kapilláris elektroforézist. Az utóbbi egy világszerte egyre gyakrabban alkalmazott módszer, viszonylag új technika a folyadék-kromatográfiához képest, vele ortogonális. A kapilláris elektroforézissel történő glikán analitika fejlesztésében még rengeteg potenciál van, emellett a glikánok betegségeknel betöltött szerepének kutatása még gyerekcipőben jár. A kapilláris gélelektroforézis alapú glikán analízis mintaelőkészítése tartalmaz egy lépést, amely során a szabad, el nem reagált fluoreszcens festéket eltávolítják. Ez meglehetősen erőforrásigényes feladat, így ennek kiküszöbölése jelentősen könnyítené a kapilláris elektroforézissel történő glikán analízis folyamatát.

Munkám során olyan kapilláris elektroforézis alapú glikán elválasztási rendszert terveztem kialakítani, amely az elektroosmotikus áramlás (EOF) jelenséget hasznosítja on-line tisztítás megvalósítására. Ez úgy érhető el, hogy az EOF az elválasztókapillárisban a kimeneti vég felé mozog, amihez képest a szabad festék és a festett cukrok relatív mozgása ellentétes irányú. Amíg a szabad festék abszolút értékben vett mozgékonyasága nagyobb, mint az EOF sebessége (így a hidrodinamikusan injektált festék távozik a kapillárisból annak bemeneti végén), addig ez a jelölt cukrok esetében kisebb, így azok a detektor felé mozognak, miközben elválnak az egymáshoz képest a nem egyforma mozgékonyaságuk miatt. Az ilyen elválasztási rendszer esetén nincs szükség a tisztítási lépésre.

Emellett a kialakított újfajta elválasztási rendszerrel terveztem tesztelni a mágneses mikrógyöngyökkel végzett mintatisztítási módszer hatékonyságát, illetve az elválasztási módszerhez szerkezetmeghatározást lehetővé tevő számítási algoritmust terveztem kifejleszteni, ami kellően nagy pontossággal és reprodukálhatósággal képes az elválasztott molekulák struktúráját meghatározni a kapilláris hosszától függetlenül.

3 Irodalmi összefoglaló

3.1 A glikoproteinek biológiai jelentősége

A glikoproteinek olyan biomolekulák, amelyek az élő szervezetek folyamataiban kulcsszerepet játszanak. Ezek egy fehérjevázból és hozzá kapcsolt szénhidrátláncokból, másnéven glikánokból épülnek fel. A glikoproteinek alapvető funkcióit elsősorban az aminosavak által kialakított doménekhez kötik, de a glikoziláció is rendkívül nagy hatással bír többek között a molekulák stabilitására, sejtfelszíni kommunikációra [2], receptor-kötődési mechanizmusra, vagy éppen immunfolyamatokra, valamint segítik a fehérjék megfelelő konformációjának kialakítását. Az egyes glikán struktúrák vizsgálata nagy jelentőséggel bír bizonyos betegségek diagnosztikájában [3], mivel egyértelműen azonosíthatók vele adott fiziológiai állapotok [4], ezért a glikánok biomarkerként való felhasználása egyre szélesebb körű szerepet kap.

A glikánok két leggyakoribb típusa az O- és az N-glikánok. Az N-glikánok a fehérjék Asn-X-Ser/Thr szekvenciájához kapcsolódnak, ahol X a prolin kivételével bármilyen aminosav lehet. Az N-glikánok endoglikozidázok segítségével lehasíthatók az aszparaginról. Az egyik leggyakrabban alkalmazott endoglikozidáz – az N-kötött glikánok eltávolításához – a peptid-N4-(N-acetil- β -glükózaminil)-aszparagin-amidáz F, vagy röviden PNGáz F enzim [5]. A humán sejtekben ezen oligoszacharidok leggyakoribb monomerjei az N-acetilglükózamin, a mannóz, a galaktóz, a fukóz és az N-acetilneuraminsav. Az Y-alakot képző, ún., core struktúrát a két darab N-acetilglükózamin, és az ahhoz kapcsolódó három mannóz alkotja, amelyekhez további monomerek kapcsolódnak. A kapcsolódó monomerek alapján a glikán lehet magas mannóz-tartalmú, hibrid és komplex típusú.

A glikozilációs folyamatok, a fehérjék érésekor, a ko- és posztranszlációs módosulások során mennek végbe a riboszómán (az N-glikoziláció esetén), az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-apparátusban. Nagyszámú enzimreakció és számos lépés során alakul ki a végleges szerkezet. Az aszparaginhoz kötött glikánok esetén első lépésként a tizennégy monomerből álló prekursor az ER-ben szintetizálódik és a dolicholhoz kötődik, majd a riboszómán a peptidszintézis során transzferáz enzimek segítségével a naszcens fehérje adott aszparaginjára kerül át. Nagy szerepet játszanak a fehérjék megfelelő konformációjának felvételében, majd a Golgi-apparátus ciszternáiban nyerik el a végleges szerkezetüket [6].

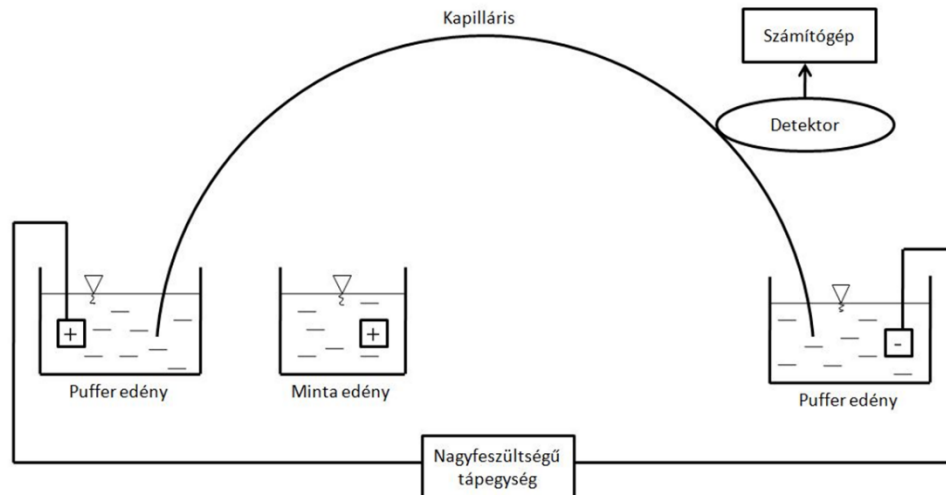
A glikoziláció összetétele a glikoprotein alapú gyógyszerek hatékonyságát rendkívüli mértékben befolyásolja [7, 8] így szükség van az aszparanginhoz (N-glikánok) vagy szerin/treoninhoz (O-glikánok) kovalensen kötött cukrok minél hatékonyabb vizsgálatára. A glikánok összetett és diverz szerkezete miatt, valamint a komplex biológiai rendszerek következtében a kvalitatív és kvantitatív vizsgálatok gyakran nehézségekkel járnak.

3.2 Kapilláris elektroforézis alapjai

A kapilláris elektroforézis (CE) az elmúlt évtizedek technológiai fejlődésének eredményeként az egyik legmodernebb és leghatékonyabb elválasztási technikává vált. A módszer a klasszikus elektroforézis eljárások továbbfejlesztéseként alakult ki, és napjainkra a folyadék- és gázkromatográfiás rendszerek versenyképes alternatívájává nőtte ki magát. A CE előnyei közé tartozik a rövid analízisidő, a kiemelkedően magas elválasztási hatékonyság, a minimális minta- és vegyszerigény, valamint a nagyfokú automatizálhatóság [9].

A CE működésének alapja az, hogy az elektromos tér hatására a különböző töltéssel rendelkező ionok eltérő sebességgel mozognak egy vezetőképes közegben, amit az ionok töltése és mérete (hidrodinamikai térfogata) határoz meg, így a kapilláris egy pontján rögzített detektorablakban az egyes komponensek külön-külön detektálhatóak. Bár az elektroforézis fizikai alapjai már a 19. század végén ismertek voltak, az első jelentős gyakorlati demonstrációra az 1930-as években került sor Tiselius Nobel-díjat érő munkássága révén, aki szérumfehérjéket választott szét egy U-alakú üvegcsőben. Az üvegcsőben történő elválasztások során jelentős hőtermelés lépett fel, ami negatívan befolyásolta a felbontást. A későbbi fejlesztések során különféle szilárd hordozókat (pl. papír, keményítő, agaróz, poliakrilamid-gél) alkalmaztak az elválasztásokhoz, azonban a Joule-hő hatására kialakuló hőmérsékleti és viszkozitási gradiensek konvekciós áramlásokat idéztek elő, amelyek a csúcshéledéshez vezettek. Az 1970-es években több kutatócsoport is dolgozott a hőhatás mérséklésén, ami elvezetett a kis átmérőjű (mikrométeres skálájú) üvegapillárisok használatához, amelyeket gázkromatográfiában már korábban alkalmaztak. A technika egyik jelentős áttörése Jorgenson és Lukács nevéhez fűződik, akik 75 μm belső átmérőjű kapillárisokat alkalmaztak, lehetővé téve akár 30 kV feszültség alkalmazását az elválasztás során, ugyanis a kapilláris nagy felület/térfogat aránynak köszönhető a Joule-hő leadása hatékonyan történhet meg [10, 11].

A CE berendezés általánosságban két elektródából (anód és katód), nagyfeszültségű tápegységből, elválasztó kapillárisból, puffer és mintaedényekből, detektorból és adatfeldolgozó egységből áll (1. ábra).



1. ábra: A CE sematikus rajza

A legáltalánosabb kapilláris elektroforézis módszer a **kapilláris zónaelektroforézis (CZE)**, amely alkalmas mind a kis, mind a nagyméretű méretű töltéssel rendelkező molekulák elválasztására. Az elválasztási mechanizmus a töltés/tömeg arány különbségén alapul. A CZE alapvető feltétele a pufferoldat homogenitása és az állandó térerősség a kapilláris teljes hosszában [12].

A **kapilláris gélelektroforézist (CGE)** elsősorban fehérjék, illetve nukleinsavak méret szerinti elválasztására vezették be. A kapillárist az elválasztás előtt egy szűrőmátrixot (pl. lineáris poliakrilamid, agaróz, dextrán, stb.) tartalmazó gélpufferrel töltik fel, amely annak szűrőhatása miatt képes nagy biomolekulák méret szerinti elválasztására. Ahhoz, hogy a fehérjéket méret szerint lehessen elválasztani, először denaturálják, majd egy felületaktív anyaggal (legtöbb esetben nátrium-dodecil szulfáttal (SDS)) fedik be, amitől a fehérjék felületi töltéssűrűsége egyforma lesz, így az elválasztás a molekulaméretük alapján valósul meg (CE-SDS-MW) [13].

A **micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC)** esetén a futtatópufferhez micellákat képző felületaktív anyagot (általában SDS) adnak a kritikus micellaképződési koncentrációnál nagyobb mennyiségben. A töltéssel nem rendelkező molekulák a polaritásuknak megfelelően bizonyos megoszlási hányados szerint oszlanak meg a vizes és a „micellás” fázisok között, és minél apolárisabb egy molekula, annál nagyobb arányban található meg a micellák belsejében. A töltéssel rendelkező micellák az elválasztófeszültség hatására migrálnak, és az eltérő polaritású molekulákat különböző sebességgel viszik magukkal, mivel az megváltoztatja a tömeg/töltés arányokat. Az elválasztás így a molekulák polaritása szerint valósul meg. Ezzel a módszerrel az egyéb elektroforetikus módszerrel nem vizsgálható, széles pH tartományban töltéssel nem rendelkező molekulák elválasztása is megvalósítható CE-vel [14].

A **kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF)** alapja, hogy az elektromos térben egy molekula addig vándorol, amíg töltéssel rendelkezik, és ha semlegessé válik, akkor nem vándorol tovább. Az cIEF-et pH-gradiensben végzik, ahol a pH az anódnál alacsony, a

katódnál pedig magas. Az EOF-et ennél a módszernél meg kell szüntetni, ugyanis az ellehetetlenítené a pH-gradiens kialakítását. A pH-gradienst egy sor zwitterionos vegyszerrel, úgynevezett hordozó amfolitokkal hozzák létre. Ha feszültséget kapcsolunk, az amfolitkeverék szétválk a kapillárisban. A pozitív töltésű amfolitok a katód felé vándorolnak, míg a negatív töltésűek az anód felé. A pH-érték ekkor az anódos szakaszon csökken, a katódos szakaszon pedig nő. Végül az amfolitok vándorlása megszűnik, amikor az egyes amfolitok elérik izoelektromos pontjukat, és már nem kapnak töltést. A kezdetben a nettó negatív töltéssel rendelkező analit az anód felé vándorol, ahol csökkenő pH-jú pufferrel találkozik. Végül a mintakomponens eléri azt a pH-értéket, ahol nettó töltése nulla lesz (az izoelektromos pontját (pI)), és a vándorlás leáll. Minél nagyobb az oldatban lévő amfolitok száma, annál simább a pH-gradiens. Az anódpuffer pH-értékének alacsonyabbnak kell lennie, mint a legsavasabb amfolit pI-értéke, hogy megakadályozza az analitba történő migrációt. Hasonlóképpen, a katódnak magasabb pH-val kell rendelkeznie, mint a legbázikusabb amfolitnak. A cIEF három alapvető lépése az injektálás, a fókuszálás és a mobilizálás. Az injektálás során az amfolitok és a fehérjék keverékéből álló mintával feltöltik a kapilláris teljes hosszát. A fókuszálás során puffertartályokat nátrium-hidroxiddal (katód) és foszforsavval (anód) töltik fel, majd közéjük 500-700 V/cm térerősséget kapcsolnak. A fókuszálás előrehaladtával az áramerősség 1 μ A alá csökken. A mobilizálás katódos vagy anódos irányban is elvégezhető. A katódmobilizáláshoz a katódtartályt nátrium-hidroxid oldattal töltik fel, míg anódos mobilizáció esetén a nátrium-hidroxidot az anódtartályba töltik. Amikor feszültséget kapcsolnak a rendszerre, a pH megváltozik a kapillárisban, mivel az anionok/kationok versenyeznek a hidroxidion/oxóniumion vándorlásával. A pH megváltozásával mind az amfolitok, mind a fehérjék mobilizálódnak a nátrium-hidroxidot tartalmazó puffertartály irányába. A mobilizáció előrehaladtával az áram emelkedik, ahogy a kisméretű ionok a kapillárisba vándorolnak. A detektálás a fehérjék esetében 280 nm-en történik, mivel az amfolitok erősen elnyelnek az alacsony UV-tartományban [15].

Az cIEF-hez hasonlóan az **kapilláris izotachoforézis (cITP)** is nulla elektroosztatikus áramlást, valamint heterogén pufferrendszer igényel. A kapillárist olyan vezető elektrolittal töltik fel, amelynek nagyobb a mozgékonyasága, mint a meghatározandó mintakomponensek bármelyikének. A végelektrolit az mintainjektálás felőli puffertartályban helyezkedik el, amely elektrolitnak az elektroforetikus mozgékonyasága alacsonyabb, mint bármelyik mintakomponensé. Az elválasztás a vezető és a befejező elektrolit közötti „résben” történik az analitok egyéni mozgékonyasága alapján. Az egyes komponensek között stabil zónahatárok alakulnak ki, ami rendkívül hatékony elválasztást eredményez [16].

A **kapilláris elektrokromatográfia (CEC)** egy hibrid technikának nevezhető, amely ötvözi egymásban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), valamint a CE tulajdonságait. A mozgófázist az EOF hajtja keresztül a kapillárison, míg az állófázis

(gyakran szilikagél) biztosítja az elválasztás alapját a két fázis közti megoszlás miatt. Az elválasztás kialakításában mind az elektroforetikus, mind a kromatográfias megoszlási hatások szerepet játszanak [17].

3.2.1 Detektálási módok

A CE-hez csatolt detektálási módokat négy nagy típusba sorolhatjuk: az abszorbancia, a fluoreszcencia, valamint az elektrokémiai detektálási módba, emellett lehetőség van a tömegspektrométerrel történő csatolásra is.

Az **abszorbancia detektálás** a leggyakrabban alkalmazott módszer a CE esetén, ugyanis sok szerves anyag 195-210 nm-es hullámhosszúságú elektromágneses sugárzást képes elnyelni. A direkt abszorbancia detektálás azon az elven alapul, hogy az elválasztott vegyületek különböző mértékben nyelik el az UV/látható tartományba eső fényt, és az elnyelés mértéke arányos a koncentrációjukkal a Lambert–Beer-törvény szerint [18]. Általánosságban elmondható, hogy azok a molekulák adnak jó jel-zaj arányt (jól detektálhatóak), amelyek tartalmaznak π -kötést. Lehetőség van a célmolekulákat az UV/látható fényt elnyelő derivatizálószerrel való jelölésre [19], ami egyrészt nagy érzékenységet biztosíthat a detektálásnál, másrészt egyes speciális reakciók miatt lehetőség van egy adott molekulát külön jelölni, növelve ezzel a specificitást.

Ezzel szemben az indirekt abszorbancia detektálás elve az, hogy a háttérektrólit olyan UV/látható fényt elnyelő iont tartalmaz, amely azonos töltésű, mint az analit, és amikor az analit molekulák áthaladnak a detektorablakon, kiszorítják a háttérionokat, megnövelve így az átjutott fény intenzitása, amit detektálni lehet. Ez egy sokkal általánosabban használható detektálási mód, azonban a kellő felbontáshoz a célmolekula és a „háttérmolekula” elektroforetikus mobilitásait minél jobban közelíteni kell egymáshoz, így a jó elválasztási módszer kifejlesztése nagy kihívást jelenthet.

A **lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektálás** a legérzékenyebb módszer, kapilláris elektroforézissel történő alkalmazása esetén a kimutatási határ 10^{-13} M alatt van [20]. A különböző vizsgálni kívánt molekuláknak nagyrészt nincs fluoreszcens tulajdonságuk, azonban lehetőség van ezek fluoreszcens festékekkel való jelölésére mind kovalens, mind nem-kovalens módon. A fluoreszcens detektálás érzékenysége amiatt kiemelkedő, hogy a gerjesztő fény más hullámhosszú, mint amit a molekula emittál. A detektor elé helyezett optikai szűrő csak az emittált fényt engedi át, így a gerjesztő fény hullámhosszát szinte teljesen ki lehet szűrni, emiatt rendkívül nagy jel-zaj arány érhető el.

Az abszorbancia detektáláshoz hasonlóan a LIF detektálás során is lehetőség van indirekt detektálásra, ebben az esetben a sokkal nagyobb érzékenység miatt elegendő kevesebb fluoreszkáló háttériont az elválasztópufferbe tenni, ami azonban a kis ionerősség miatt csúcshéledést okozva rontja a felbontást, így ez a módszer nem különösebben terjedt el [21].

Az **elektrokémiai detektálás** három fő típusú módszert foglal magába: a potenciometriát, a konduktometriát, valamint az amperometriát. Általánosságban a

potenciometria és a vezetőképesség detektorok jó érzékenységgel bírnak az ionok széles csoportjára egyidejűleg, az amperometriás detektálás ezzel szemben szelektív, és „ráhangolható” az adott analitra. Bár néhány esetben sikeresen alkalmazták, az elektrokémiai detektálás CE-vel történő megvalósítása rendkívül nehézkes és fáradságos lehet, mivel az érzékelő előkészítése bonyolult gyártási és kezelési eljárásokat foglalhat magában, és az elektródának a kapillárisban való pontos térbeli igazítására van szükség.

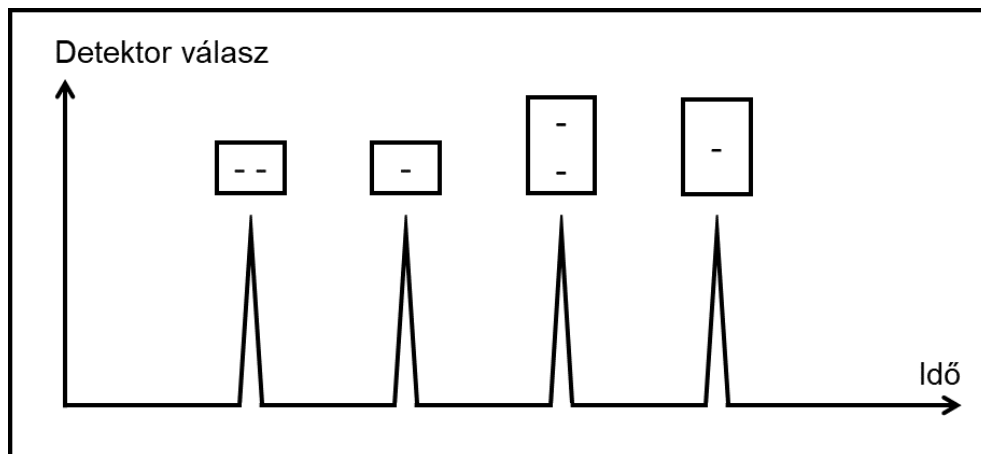
A potenciometria CE-ben történő első alkalmazása Haber és Simon csoportja valósította meg 1990-ben [22]. A jel akkor keletkezik, amikor az analit a detektor lipofil membrán részébe kerül. Az analit jelenléte megváltoztatja az érzékelő belső töltőoldata és a kapillárisban lévő oldat közötti potenciálkülönbséget. A potenciálkülönbség a Nernst-egyenlet által megadott ionaktivitás mérőszáma, és közvetlen kapcsolatban áll az ionkoncentrációval. A potenciometriás válasz általában elég gyors ahhoz, hogy megakadályozza a csúcs alakjának torzulását, és így kvantitatív információ nyerhető az analit koncentrációjáról. A potenciometriás mikroérezékelők hátrányai közé tartozik azonban a szenzor előkészítésének és kezelésének nehézkes kivitelezése (azaz a mikroelektróda ionszelektív membránfázisának előkészítése) és az igazításhoz szükséges bonyolult mikromanipulációk [22].

A CE-ben az UV/látható abszorbanciás és fluoreszcens tulajdonságokkal nem rendelkező ionok vizsgálatát gyakran vezetőképesség detektálással végzik. A vezetőképesség detektorok általában két, az elektrolitoldattal érintkező elektródából állnak, amelyekre elektromos potenciált kapcsolnak. Amikor az analit áthalad az elektróda résen, az elektródák közötti vezetőképesség az ionos célmolekulák koncentrációjával közvetlenül összefüggő mennyiséggel változik. A vezetőképesség-detektálás kimutatási határa értéke 10^{-6} és 10^{-7} M között mozog az elektrokinetikus injektálással bevitt minták esetében [23-26].

Az amperometriás CE detektálást először Wallingford és Ewing 1987-ben mutatta be a CE detektálási technikájaként a katekol és a katekolamin mennyiségi meghatározására [27-29]. Az amperometriás detektálás az elektródfelületen az alkalmazott egyenfeszültség hatására létrejövő, a vizsgált analitre vagy az analitról történő elektrontranszferen alapul. Az elektrontranszfer eredménye egy redoxireakció az elektródon, amely az analit koncentrációjával közvetlenül összefüggő áramot hoz létre. Az amperometriás technikák fő hátránya az analit köztes reakciótermékeinek erős adszorpciója az elektródfelületre (szénelektródok), ami később csökkenti az elektród aktivitását (elektronátvitel) és zavarja a detektálást. Ez a probléma csökkenthető az impulzusos amperometriás detektálás (PAD) alkalmazásával, amely folyamatos, háromlépcsős potenciálhullámformát használ (1. lépés: detektálás; 2. lépés: az elektródfelület anódos tisztítása; 3. lépés: reaktiválás) [30]. A PAD-ről először a szénhidrátok kimutatására szolgáló CE detektálási technikaként számoltak be. A végoszlopos elrendezésű aranyelektródák és a PAD alkalmazásával az inozitol esetében 0,28 fmol és a maltóz esetében 1,21 fmol közötti kimutatási határértéket értek el [31].

3.2.2 Elektroforetikus mobilitás

Az elektroforetikus elválasztás megvalósításához szükség van egy elektromosan vezető közegre és a rákapcsolt elektromos térre. CE esetén a vezető közeg szerepét a kapillárisba töltött pufferoldat látja el, míg az elektromos teret a két elektróda között alkalmazott feszültségkülönbség hozza létre. Ez az elektromos tér mozgatja a töltéssel rendelkező komponenseket a töltésüknek megfelelő irányba. Az elektroforetikus mobilitás (μ_{ef}) azt fejezi ki, hogy egy adott közegben az ionok milyen mértékben képesek mozogni az elektromos tér hatására, ami az ion töltésének és hidrodinamikai térfogatának arányától függ (1. egyenlet, 2. ábra). A kationok és anionok effektív mobilitása egy adott elektromos térben ellentétes irányú.

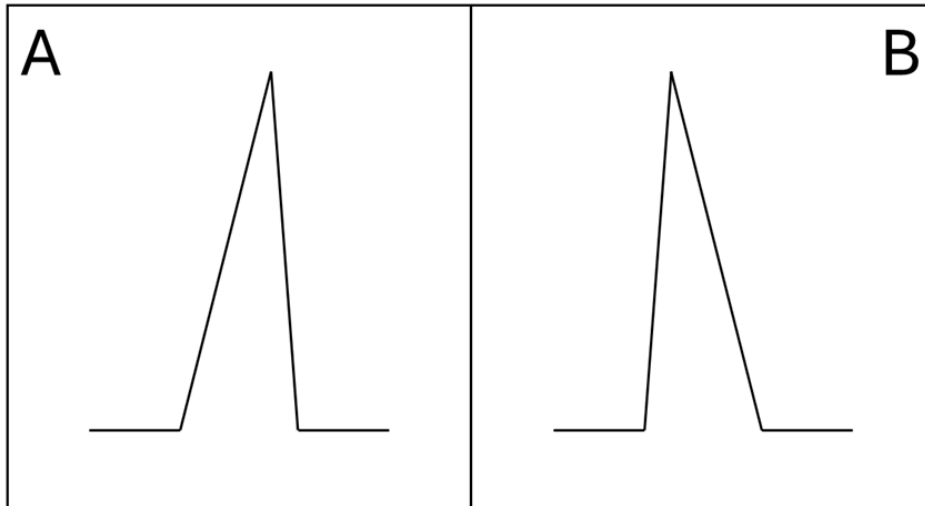


2. ábra: A különböző töltésű és hidrodinamikai térfogatú ionok elektromigrációjának alakulása egy kapilláris elektroforézis elválasztás során [32].

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r_i} \quad (1)$$

ahol q a részecske töltése, η a közeg dinamikus viszkozitása, r_i pedig a részecske hidrodinamikai sugara gömbalakot feltételezve.

A CE során a mintakomponensekről akkor gyűjthető a legtöbb információ, ha az azokhoz tartozó csúcsok az elektroferogramon alapvonal szinten elválnak egymástól. Az elválasztópuffer anyagi minősége alapvető szerepet játszik az elválasztás teljesítménye szempontjából. Az egyik ilyen minőségi szempont az, hogy a vizsgálni kívánt mintakomponensek elektroforetikus mobilitása minél közelebb kell eszenek a pufferrendszer a mintakomponensekkel azonos töltésű ionjainak elektroforetikus mobilitásával, csökkentve ezzel a csúcsszélesedést okozó elektroforetikus diszperziót. Ezt az elvet nevezi a szakirodalom „mobility matching”-nek. Ha az adott ko-ion elektroforetikus mobilitása nagyobb, mint az analité, akkor a csúcs bal oldalt szélesedik („fronting”), ellenkező esetben jobb oldalt szélesedik („tailing”) (3. ábra) [33].



3. ábra: „Mobility matching” fontosságának személtetése: A panel: „fronting”-os csúcs, B panel: „tailing”-es csúcs

3.2.3 Elektroozmotikus áramlás

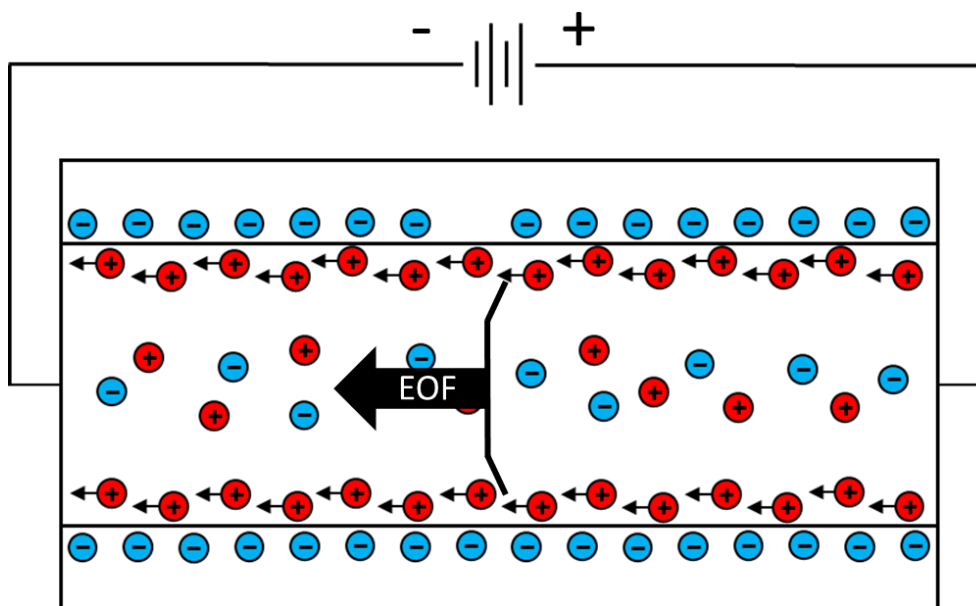
Az elektroozmotikus áramlás (EOF) a CE egyik alapvető jelensége. Az EOF akkor alakul ki, amikor egy vezetőképes oldattal töltött kapillárisra feszültséget kapcsolnak, és annak belső felületén rögzített töltések találhatók. A CE során alkalmazott kapillárisok többnyire szilícium-dioxidból készülnek, melyek belső felszínén szilanol (Si–OH) csoportok helyezkednek el. Ezek a csoportok magasabb pH-n deprotonálódnak, így negatív töltésűvé válnak. A kapilláris belső fala akkor fog számottevő negatív töltéssel rendelkezni, ha a használt elválasztópuffer pH-ja meghaladja a 4-es értéket, mivel a szilanol-csoportok disszociációja a pH=4–6 tartományon belül történik meg. A keletkező negatív felületi töltések elektrosztatikusan vonzzák az oldatban jelen lévő pozitív ionokat, amelyek az ún. elektromos kettősréteg kialakulásához vezetnek a kapilláris belső fala mentén [9].

Az EOF érzékenyen reagál a kapilláris belső falának kémiai és fizikai tulajdonságaira [34]. Az elválasztó közeg, vagyis a háttélektrolit összetételének és pH-jának megfelelő megválasztása alapvető fontosságú annak érdekében, hogy a pozitív töltésű ko-ionok kellő mértékben kölcsönhatásba lépjenek a negatív fallal. A kettősréteg sűrűsége fokozatosan csökken a kapilláris fala felől a kapilláris közepe felé haladva. Ennek belső, rögzített része a Stern-réteg, amely gyakorlatilag mozdulatlan, míg a külső, diffúzabb rész - a Helmholtz-sík - már képes elmozdulni az elektromos tér hatására. A kettősrétegben létrejövő potenciálkülönbséget zéta-potenciálnak nevezzük. Amikor elektromos tér éri a rendszert, a diffúz réteg pozitív ionjai elmozdulnak a katód irányába, és ezzel együtt elmozdítják a hozzájuk kapcsolódó oldószermolekulákat is. Ez az együttes mozgás hozza létre az EOF-et. Az így kialakuló folyadékáramlás karakterisztikája eltér a nyomás által (hidrodinamikusan) előidézett áramlástól: nem parabolikus, hanem közel egyenletes profilú, úgynevezett "dugóáramlás" jön létre. Ez azt jelenti, hogy az áramlási sebesség a

kapilláris teljes keresztmetszetében közel azonos, így nem alakul ki számottevő nyomásesés, és elkerülhető a csúcsok szélesedése az elválasztás során [9, 35].

Amennyiben az elválasztás nem kellően hatékony, többféle módszer is alkalmazható az elválasztás javítására. Az egyik lehetőség a kapilláris fizikai hosszának növelése, amely meghosszabbítja az elválasztási utat, így az egyes komponenseknek több idejük jut a szétválásra. Egy másik megközelítés a kapillárison belüli effektív elválasztási távolság növelése az EOF irányított alkalmazásával. Ha az EOF az injektálási oldal felé történik, az olyan hatást eredményez, mintha hosszabb kapillárist használnánk, anélkül, hogy ténylegesen megnövelnénk annak fizikai hosszát [9].

Az EOF sebessége számos tényezőtől függ, többek között az alkalmazott elektromos tér intenzitásától. Bár a nagyobb elektromos tér növeli az áramlás sebességét, ezzel egyidejűleg növeli az analitok effektív mobilitását, ami nem feltétlenül javítja a felbontását. Az EOF fokozásának hatékonyabb módja lehet a háttérpuffer koncentrációjának csökkentése (az elektromos kettősréteg vastagságának növelése révén), illetve pH értékének emelése (a szilanolcsoportok deprotonáltsági fokának növelése miatt). Az EOF jelenség sematikus rajza a 4. ábrán látható.



4. ábra: Az elektroosmotikus áramlás elvi rajza

3.2.4 On-line prekoncentrációs technikák

A CE módszerek hátránya az optikai detektálás során, hogy kis érzékenységgel és kimutathatósággal rendelkeznek, amely a kis mintamennyiségek és a rövid detektálási úthossz következtében tapasztalható. A detektálhatóság javítása érdekében ún. prekoncentrációs eljárásokat alkalmaznak, melyek lehetnek on-line és off-line technikák. Az off-line előtöményítési módszerek közé tartoznak azok az eljárások, ahol a koncentráció még a mintaelőkészítés során történik meg, például extrakcióval, bepárlással

stb. Ezzel szemben az on-line módszerek az elválasztás kezdő lépéseként valósulnak meg a kapillárison belül [36].

Az online módszerek – mint a mező-erősítéses mintafelhalmozás (field amplified sample stacking, FASS), nagy térfogatú mintafelhalmozás (large-volume sample stacking, LVSS) a tranziens izotachoforézis (tITP), a sweeping, a dinamikus pH csatolás és a folyadék-folyadék extrakció (LLE), stb. –, a minta és a pufferrendszer eltérő tulajdonságain alapulnak [37]. Ezek a tulajdonságok például a vezetőképesség, a koionok mobilitása, koncentrációja, a puffer rendszerek kémhatása. Gyakran alkalmazzák ezek valamilyen kombinációját, például FASS-sweeping [38], FASS-tITP [39], stb.

A leggyakrabban alkalmazott on-line módszerek az ún. „stacking” módszerek, mely során a mintadugó injektálása után, feszültség hatására, különböző elvek alapján, a vizsgálandó analitok egy keskeny szakaszon dúsulnak fel a háttélektrolit zónájának elején. A stacking elnevezést legjobban rétegzésként lehetne lefordítani. Ez arra a jelenségre utal, hogy az elválasztandó analitok keskeny zónában rétegződnek. Az elválasztás során tapasztalható csúcsok élesek, ami jobb felbontást eredményez. A prekoncentráció mechanizmusának elve alapján csoportosíthatók a stacking módszerek.

A koncentráció különbségből adódó prekoncentrációt Kolraush stackingnek is nevezik, mely lényege a mintadugó és a háttélektrolit eltérő vezetőképessége. A mintazóna alacsonyabb vezetőképessége miatt kialakuló nagyobb elektromos térerősség hatására gyorsan vándorolnak az analitok, majd belépve a háttélektrolit nagyobb vezetőképességű rétegébe (alacsonyabb térerősség) az analitok lelassulnak és a határreteg mentén koncentrálnak [40]. Ezen az elven alapulnak a FASS és az LVSS módszerek.

A mező-erősítéses mintafelhalmozás során a pufferoldat vezetőképessége jóval meghaladja a mintamátrix vezetőképességét, így a feszültségesítés nagyobb a mintamátrixban, mint a háttélektrolitban, így az analitok mobilitása a mintapufferben nagyobb lesz, mint a BGE-ben. Az injektálás után, ahol a mintadugó általában 1-5%-át teszi ki a kapillárisnak, a vezetőképességbeli különbség miatt, elektromos tér hatására, a puffer határán az analitok feldúsulnak, növelve a detektálhatóságot [41].

A FASS hátránya, hogy a korlátozott térfogatú mintadugó sokszor nem javítja kellőképpen az érzékenységet, valamint a mintamátrix rontja a felbontást. Az LVSS a FASS-hoz hasonló elven működik, ahol a lényegi különbség a nagy (akár a kapilláris hosszának fele) hosszúságú mintadugó hidrodinamikusan történő injektálása. Ennél a technikánál szerepet játszik az EOF, mégpedig oly módon, hogy az injektálási irányba áramló EOF a mintadugót kinyomja, míg az analitok a kis vezetőképességű mintadugóban gyorsan mozognak, majd a BGE és a mintadugó határán feldúsulnak a feszültségesítés következtében [42]. Ebben a megvalósításban az analitok abszolút effektív mobilitása nagyobb, mint az EOF effektív mobilitása. A nagy térfogatú mintahalmozás, alkalmazható a CZE és a MEKC módszerek használata során is [40, 43, 44].

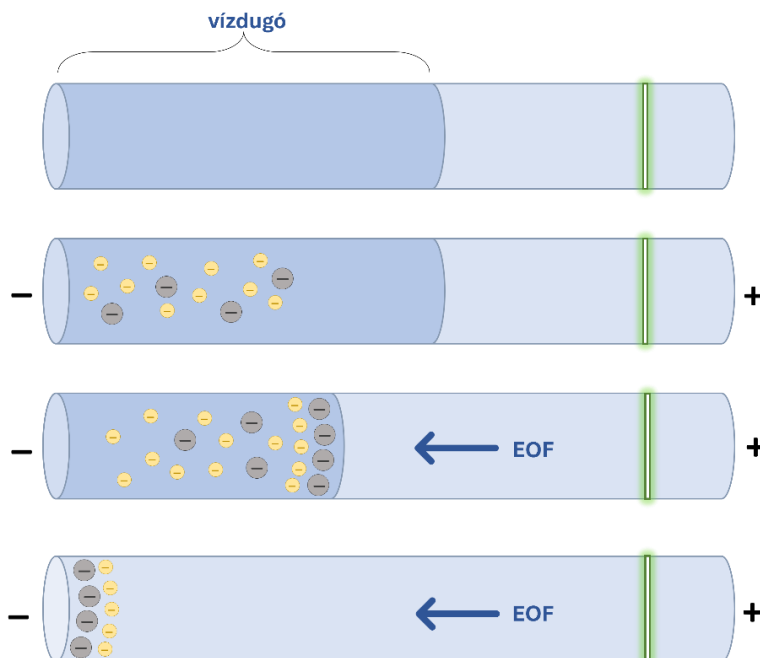
A mintamátrix eltávolítására kétféle mód áll rendelkezésre az LVSS során, mely végbe mehet polaritásváltással vagy anélkül. A polaritásváltásos LVSS során nagy

hidrodinamikusan történő mintamennyiség injektálása után megfordítják a polaritást. Ekkor az EOF irányvektora az injektálási oldal felé mutat, így a pozitív és semleges töltésű komponensek gyorsabban haladnak a bemeneti oldal felé az EOF következtében, miközben a negatív töltésű analitok a detektálási ablak fele mozdulnak el és egy koncentrációs zónában dúsulnak fel, de fokozatosan ők is a bemeneti oldal felé haladnak a határréteg mentén. Mielőtt ez a zóna elhagyná a kapillárist, a polaritás irányának megfordításával megfordul az EOF iránya is és megindul az anionok elválasztása a töltésüknek és hidrodinamikusan átmérőjüknek megfelelően. Ehhez szükség van arra, hogy az elválasztandó analitok ionos formában legyenek, ezen kívül az ionok effektív mobilitásának kisebbnek kell lennie az EOF mobilitásánál. Polaritás váltás nélkül úgy kivitelezhető a mintamátrix eltávolítása, hogy egy ponton az EOF sebessége megegyezik a halmozott analit zóna sebességével, ekkor a zóna migrálása a bemeneti oldal felé leáll és az elválasztás akkor kezdődik meg, amikor az elválasztó pufferbe kerül át a kapilláris bemeneti vége. A mintadugóban lévő EOF sebessége nagyobb, mint a BGE-ben, mivel a mintapuffer ellenállása nagyobb, így nagyobb feszültségesítés tapasztalható benne [42], [45].

A FASI (field amplified sample injection) során a minta injektálása elektrokinetikusán történik. Bár az LVSS növeli a mintadugó térfogatát, a kapilláris kis belső térfogata korlátozza a magas detektálási érzékenység kialakítását. A FASI lehetőséget teremt arra, hogy az analit koncentráció a kialakított mintadugóban csak az analitok migrációs sebességétől és az injektálás időtartamától függjön. A mátrix-FASI (M-FASI) lényege, hogy a mintamátrix kialakításához alacsony vezetőképességű közeget alkalmaznak az elektrokinetikus injektálás előtt, hogy a mintadugó ellenállását növeljék. Feszültség hatására a nagy ellenállása miatt a mintamátrix elektromos térerőssége sokkal nagyobb lesz, mint a háttélektrolité, így az analitok gyorsan vándorolnak a mintadugóban, a BGE határán pedig felhalmozódnak a hirtelen sebességcsökkenés következtében. A nagy érzékenység ellenére a M-FASI során nagy Joule-hő keletkezik, valamint korlátozott az injektálás ideje is [46].

A jobb hőelvezetés miatt alkalmazható a kisebb érzékenységű PAEKI (pressure assisted electrokinetik injection), mely során a nyomás egyidejű alkalmazásával végzik el az elektrokinetikus injektálást, mivel ekkor az EOF kiegyensúlyozásával a futtató puffer mozdulatlan marad a mintainjektálás során és kialakul egy ellenion réteg az BGE határán, amely megakadályozza az analit réteg diffúzióját, ezzel segítve a keskeny mintazóna kialakulását [47]. Gyakran az elektrokinetikus injektálást vízdugó hidrodinamikusan injektálása előzi meg, amely technikát HC-FASI-nak (head column-FASI) neveznek [46]. Az alacsony vezetőképességű zónát a kapilláris elején hozzák létre, ezzel nagy térerősségű zónát létrehozva, amelyet egy hosszú elektrokinetikus injektálás követ. Ezek a technikák kombinálhatók az EOF segítségével történő felesleges vízdugó kinyomásával. Miután az analitok a vízdugó elején keskeny zónába rendeződnek, a vízdugó mérete csökkenthető, vagy akár teljes egészében kinyomható, ha az analitok

átlépnek az elválasztó pufferbe még az elválasztás előtt. Ez a módszer FAEP néven terjedt el (field amplified sample injection – EOF pump), amelynek sematikus ábráját az 5. ábra mutatja be [46].



5. ábra: A FAEP prekoncentrációs technika sematikus ábrája

Az M-FASI és a HC-FASI kombinációjával hozták létre a C-FASI technikát. Ennek lényege, hogy alacsony vezetőképességű mintamatrixot alkalmazva alacsony vezetőképességű zóna (vízdugó) injektálását követi az elektrokinetikus mintainjektálás, így a két módszer erősíti egymás előnyeit. A létrehozott feszültség hatására nagyobb térerősség keletkezik már a mintatartó edényben is, ezért nagyobb mennyiségű analit, gyorsabban jut a kapillárisba, ahol szintén nagy sebességgel halmozódnak fel a vízdugó és a háttérelektrolit határfelületen [46].

Az on-line prekoncentrációk közé tartozik a tranziens izotachoforézis is, mely során nem csak egy háttérelektrolit van, hanem egy vezető és egy követő pufferoldat. A kapillárist teljes hosszában a vezető pufferrel töltik fel, majd a mintát hidrodinamikusan injektálják be. Az elválasztás során az injektálási kapillárisvég a követő pufferoldatba, míg a kapilláris másik vége a vezető pufferoldatba ér. A módszer lényege, hogy a vezető pufferben az analitokkal megegyező töltésű pufferkomponens effektív elektroforetikus mobilitása nagyobb, azonban a követő BGE-ben kisebb, mint a vizsgálandó analitok mobilitása. Elválasztás közben így az analit nem tudja megelőzni a vezető BGE megfelelő komponensét, míg a követő BGE említett komponense nem tudja megelőzni az analitokat. Az analitok egymástól elválva, keskeny zónában feldúsulnak, megvalósítva a prekoncentrációt [44].

A dinamikus pH csatolás esetén a mintakomponensek feldúsulása a pH-diszkontinuitás következtében valósul meg. A vizsgált analitok a mintamatrixban olyan

töltéssel rendelkeznek, mely következtében nagy effektív mobilitással bírnak, majd a háttélektrolitba átlépve a fajlagos töltésük kisebb lesz, így a mobilitásuk is csökken. Az elektroforetikus mobilitásuk csökkenésével a mintadugó és a BGE határán lelassulnak és létrejön az előtöményítés. Az analitok töltésére különböző pH értékeken a molekulák pKa értékéből lehet következtetni. Olyan háttélektrolitoknál, ahol a töltés széles pH tartományban állandó, ez a technika nem alkalmazható. Míg az alacsony pH-jú mintapuffer és a magas pH-jú háttélektrolit esetén nem jelentős az előkoncentráció, például peptidek esetében, addig a fordított pH-csatolással (magas pH-jú mintapuffer, alacsony pH-jú BGE) jó előkoncentráció érhető el [48, 49].

A pH-közvetített stacking során, azon belül is a sav-közvetített töményítés során a mintát elektrokinetikusán juttatják a kapillárisba, majd ezt követi egy rövid savas, a háttélektrolitnál alacsonyabb pH-jú dugó hidrodinamikai injektálása. A savból a nagy mozgékonyaságú hidrogén-ionok a minta zónába jutnak, ahol az ott jelen lévő hidrogén-ionokkal együtt a háttélektrolitból származó hidroxid-ionokkal titrálódnak és létrehoznak egy nagy ellenállású zónát. Az analitok keskeny sávba rendeződnek a titrált régió és a BGE határán. A bázis-közvetített stacking során az alacsonyabb pH-jú háttélektrolit után egy magasabb pH-jú BGE-t juttatnak a kapillárisba, ezután injektálják csak be a mintát. A magasabb pH-jú BGE a mintazóna előtt az analitok elektromos mobilitásának csökkentésére szolgál, mivel megváltoztatja azok töltési állapotát és dinamikus pH kapcsolást hoz létre [50, 51].

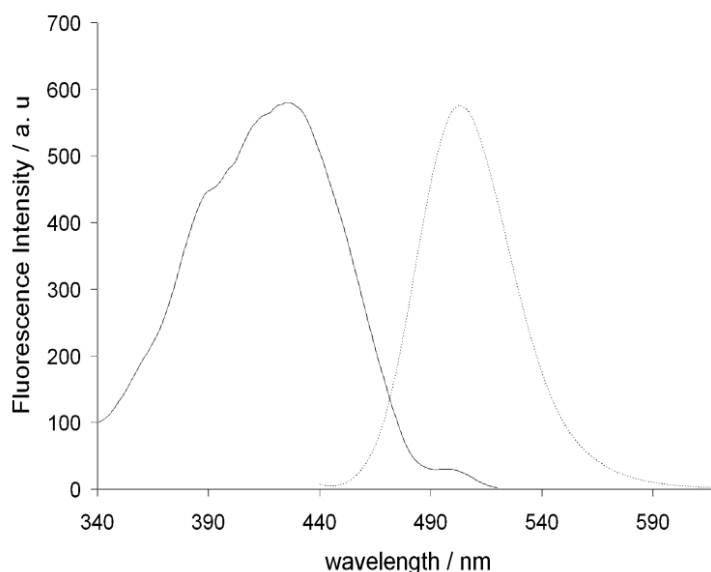
Egy kevésbé ismert technika, az egycsepp mikroextrakciós (single drop microextraction, SDME) módszer. Ebben az esetben az elválasztópufferrel töltött kapilláris bemeneti vége erősen hidrofób, például oktanol réteggel van bevonva. Kis nyomással létrehozható egy BGE-vel töltött oktanol csepp a kapilláris bemeneti végén, mely belemerül a mintamátrixba. Mivel a mintapuffer pH-ja úgy van beállítva, hogy az analitoknak nincs töltése, ezért az adott komponensekre jellemző megoszlási hányadosuknak megfelelően bediffundálnak a hidrofób cseppbe. A cseppből szintén az analitok megoszlásának köszönhetően tovább diffundálnak a BGE-be és itt már töltéssel rendelkeznek a háttélektrolit pH-jának megfelelően, ami megakadályozza a visszafelé irányuló diffúziót. A módszer hátránya, hogy a prekoncentráció igen hosszú időt vesz igénybe, azonban mivel a jelerősség jelentős növekedést mutat, ezért alacsony koncentrációjú mintamátrix esetén jól alkalmazható [52].

A sweeping egy MEKC-ben alkalmazható prekoncentrációs technika. Abban az esetben, amikor az analitok nem rendelkeznek töltéssel, az analitok detergens segítségével (pl. SDS) való micellaképzéssel elválaszthatók egymástól a polaritásuknak megfelelően, ezen az elven alapul a MEKC is. A részecskének elektroforetikus mobilitását a töltött detergens molekulák adják, mivel a micellák kívülről töltéssel rendelkeznek. Az analit a micella apoláros belsejébe diffundál. Az analitok eltérő megoszlási hányadossal rendelkeznek a vizes fázis és a „micellás fázis” között. Ennek következtében az egyes analitok nagyobb százalékban vannak jelen a micella belsejében,

mint a puffer vizes fázisában. Az elektromos erőter hatására pufferben lévő micellák a detektorablak felé viszik az analitokat. Az elválasztás az analitok hidrofóbításán alapul, mivel amelyik analit szívesebben tartózkodik a micella belsejében az kerül először detektálásra, a többi kevésbé hidrofób analit pedig ezután sorban. A prekoncentráció ebben az esetben úgy valósul meg a sweeping során, hogy a hidrodinamikus injektálás után a mintadugó elején lévő analitok kerülnek először a BGE-be, ahol jelen vannak a töltéssel rendelkező micellák. A micellák az elválasztás során töltésüknek megfelelően haladnak a detektor felé, az analitokat pedig a micellák szállítják. Az analitok a mintadugó elejétől kezdenek el vándorolni, a mintadugó végében lévő analitok pedig az után, hogy a micellák elérik a mintadugó végét ezért a teljes analit mennyiség feldúsul egy kis szakaszon. [53, 54].

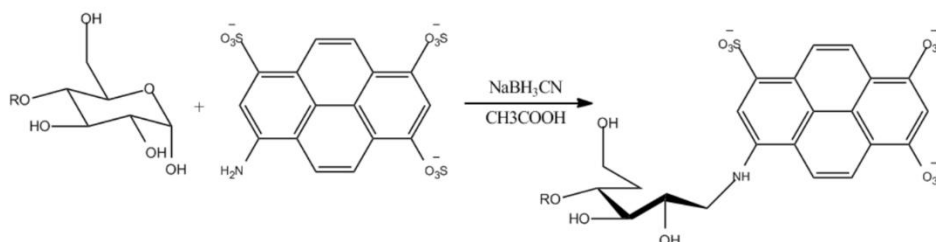
3.3 Glikánok fluoreszcens jelölése

A glikoproteinekről leemésztett glikán struktúrák kapilláris elektroforézissel történő vizsgálata derivatizálási lépést igényel, ugyanis ezek a struktúrák az elektromágneses sugárzás UV/látható tartományát számottevően nem nyelik el, így közvetlen detektálhatóságuk akadályba ütközik. Emellett elektromos töltéssel még széles pH-tartományban sem rendelkeznek (kivéve a szialsavat tartalmazó glikánokat), így elektroforetikus mobilitásuk nem biztosított megfelelő mértékben. A gyakorlatban legelterjedtebb derivatizálószer kapilláris elektroforézis módszerrel történő glikán analízis esetében a 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS), amely egy fluoreszcens molekula (gerjesztési hullámhossz: 425 nm; emissziós hullámhossz: 520 nm (6. ábra)), emellett 3 negatív töltéssel rendelkezik széles pH-tartományban, így mind a lézer indukált fluoreszcens detektálhatóságot, mind az elektromos térben történő mozgékonyaságot biztosítja [55].



6. ábra: Az APTS gerjesztési és emissziós spektruma [55]

Az APTS-sel történő jelölés egy kétlépéses redukív aminálási reakció, amely során a szénhidrátok redukáló végéhez köt be a fluoreszcens festék. Első lépésben savkatalizátor jelenlétében Schiff-bázis keletkezik, majd második lépésben redukció során stabil konjugátum jön létre (7. ábra). Redukálószerként gyakran nátrium-cioanoborohidridet használnak, azonban ennek környezetre való káros hatása miatt egyre gyakrabban 2-pikolin boránt alkalmaznak, amely kisebb környezetkárosító hatással bír. A savkatalizátorként leggyakrabban ecetsavat alkalmaznak annak ellenére, hogy erősebb savakkal (pl. citromsav, vagy malonsav) nagyobb reakciósebesség érhető el, ugyanis ezek az erősebb savak a glikántruktúrák esetlegesen jelen lévő szialsavakat nagyobb mértékben szakítja le, amely jelentős információvesztéssel járhat a glikánprofil kiértékelése során.



7. ábra: Az APTS-sel történő redukív aminálási reakció

3.3.1 Szabad festék eltávolítása szilárd fázisú extrakcióval

Az APTS-sel történő glikánjelölés esetén a nagy reakciósebesség biztosítása érdekében a deriválószerből nagy felesleget használnak, nagyságrendekkel többet, mint amennyit az ekvimoláris arány igényelne. Ezért a legtöbb esetben tisztítási lépésre van szükség a jelölt szénhidrátok CE-analízise előtt, mivel a nem reagált deriválószer nagy csúcsa átfedhet a minta néhány érdekes komponensével. A fluorofórral jelölt cukrok kapilláris elektroforézises analízisében általánosan használt tisztítási módszerek közé tartozik a hidrofil kölcsönhatáson alapuló mikrooszlopok [56] vagy karboxilbevonatú paramágneses gyöngyök [57] használata, mindkettő támogatja a teljes automatizálást folyadékkezelő robotok használatával.

A paramágneses mikrogyöngyökkel végzett szabad APTS eltávolításának elve azon a tényen alapul, hogy kellően apoláris (magas acetonitril-tartalmú) mintamátrixban az jelölt szénhidrátok erősebben kötnek ki a gyöngyök hidrofil falához, mint a szabad festékmolekulák. A szuszpenzióban lévő mikrogyöngyök mágneses tér segítségével a mintaedény falához vonzhatóak, így aztán azokról a folyadékot el lehet távolítani. A tisztítási folyamat általában több ciklust tartalmaz, amelyből egy ciklus a következőképpen néz ki: 1. apoláris oldószer helyezése a mikrogyöngy szuszpenziót tartalmazó mintamátrixba (ekkor a jelölt glikánok a gyöngyök falán vannak); 2. mágnes mellett a folyadék leszívása a gyöngyökről; 3. kis mennyiségű vízben a gyöngyök felszuszpenzálása (a jelölt glikánok oldatba kerülnek). A tisztítás során használt oldószerösszetétel — tipikusan magas acetonitril-tartalmú közeg — úgy van

optimalizálva, hogy a nagyobb hidrophil molekulák (mint a jelölt glikánok) visszamaradjanak, míg a kisebb szabad festék átmosódik. Így a méret, a töltésmegoszlás és a kölcsönhatási lehetőségek különbsége miatt a szabad APTS nem marad meg a gyöngyökön, míg a glikán-APTS konjugátum igen [57].

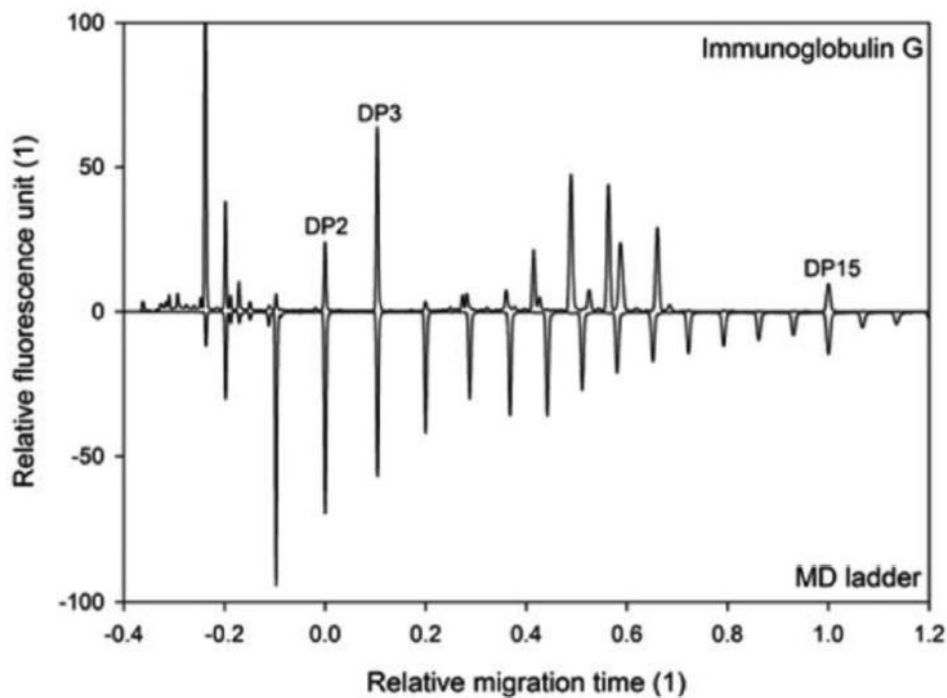
3.4 Szénhidrát struktúra meghatározási módszerek

Számos módszert fejlesztettek ki a mintákban lévő ismeretlen glikánok szerkezetének azonosítására. Többek között lehetőség van a migrációs időket normalizálni a maltodextrin létrához, exoglikozidáz enzimekkel történő szekvenálást végezni, valamint tömegspektrométerrel (MS) való kapcsolás révén nyerhető szerkezeti információ a glikánokról.

3.4.1 A migrációs idő kalibrálása maltodextrin létrával és belső standardokkal

Több szerkezetmeghatározási módszer egy úgynevezett migrációs időindexet alkalmaz a glikánok azonosítására, amelynél az analit migrációs ideje leginkább egy lineáris glükózpólimer homológ sorozat által létrehozott méretlétrához történő viszonyításként értelmezhető, hasonlóan a Kovats Indexhez [58]. Az elválasztás bizonyos tényezői változásokat okozhatnak a migrációs időben, azonban az ezekből fakadó eltérésekből eredő hibák kiküszöbölhetőek a maltodextrin létra, mint standard használatával. Az analit látszólagos mobilitása az elektroforetikus mobilitás és az EOF algebrai összegéből adódik. Noha a klasszikus, alacsony pH-s kapilláris gélelektroforézis módszereknél az EOF nagyrészt minimális, egy kis mértékben még mindig jelen van, és a kapilláris fal felületi tulajdonságainak változása miatt futtatásonként módosulhat. A biomolekulák a kapilláris belső falához való adszorpciója, a háttélektrolit ionerősségének ingadozása, illetve a pH-változások – például az anódos és katódos puffertartályban végbemenő elektrolízis következtében – mind hozzájárulhatnak ehhez a mérsékelt migrációs idő csúszáshoz. Az analit maltodextrin létrához való viszonyításával korrigálni lehet a migrációs idők változékonyságából eredő hibát.

A Glükóz Egység (GU) módszer használatával [59] számszerűsíthető a struktúra monoszacharidjainak száma és azok kapcsolódási módjának hatása a CE alapú elválasztásokban (hidrodinamikai térfogat), valamint becsülhetővé válik az ismeretlen glikánszerkezet. A GU módszer reprodukálhatóságát különféle paraméterek – például térerősség, effektív elválasztási hossz, hőmérséklet, kapilláris felületi bevonat vagy mintainjektálási technika – esetében is igazolták. A módszer figyelembe veszi továbbá a maltodextrin létra migrációs idejében tapasztalható változást, amely a maltooligoszacharidok spirális szerkezetének kialakulásával függ össze, és jellemzően a hétnél nagyobb polimerizációs fok fölött jelentkezik, megváltoztatva ezzel a migrációs tulajdonságokat [60]. Azonban – amint azt a 8. ábra is szemlélteti – a módszer egyszerűsíthető úgy, hogy mindössze három együtt injektált standardot alkalmaznak a migrációs idők pontos indexelésére. Ezáltal elkerülhetőek a létra és a minta ko-migrációja miatt fellépő csúcsátfedések [61].



8. ábra: A Glükózegység módszer maltodextrin létrához történő migrációs idő normalizálásnak bemutatása [61]

A GU értékek kiszámítása a 2. egyenlet szerint történik.

$$GU_x = G_N + \frac{t_x - t_N}{t_{N+1} - t_N} \quad (2)$$

ahol G_N a glükózegységek száma a szomszédos maltooligoszacharid létracsúcsban, t_x a célglikán, és a t_N és t_{N+1} az N és $N + 1$ glükóz egységet tartalmazó maltooligomer migrációs ideje. A maltodextrin létra és a GU értékek alkalmazását tovább fejlesztette a nagy áteresztőképességű elemzésekhez készült GUcal adatbázis, amely elérhető a www.gucal.hu weboldalon. A program automatikusan kiszámítja az elektroferogramban található csúcsok GU értékeit, miután betöltötték a standard maltooligoszacharid létra és a minta elektroferogramok ASCII fájljait [62].

3.4.2 Enzimatisz szekvenálással történő szénhidrát struktúrameghatározás

Az exoglikozidázok olyan enzimek, amelyek egy bizonyos monoszacharid egységet hasítanak le a glikánok nem redukáló végéről [63]. Ezek az enzimek specifikus oligoszacharid-monomerekre szelektívek. Az enzim további szelektivitással rendelkezhet, például a kötés orientációjára (alfa vagy béta), illetve a szén-szén kötés helyzetére (pl. α 2-3 vagy α 2-6 szialsav). Egy szénhidrát exoglikozidáz általi emésztése csak akkor lehetséges, ha az exoglikozidáz specificitása megfelel a terminális monomer jellemzőinek. Amint az 1. táblázatban összefoglaltam, a kereskedelemben számos exoglikozidáz áll rendelkezésre különböző specificitással.

1. táblázat: Példák a kereskedelmi forgalomban kapható exoglikozidáz enzimekre

monomer	enzimkötési szelektivitás
N-acetil-neuraminsav	n-acetil-neuraminidáz: α 2-3; α 2-3,6; α 2-3,6,8; α 2-3,6,8,9
galaktóz	galaktozidáz: β 1-3; β 1-4; β 1-3,4; β 1-3,6; β 1-4,6
N-acetil-glükózamin	n-acetil- glükózaminidáz: β 1-2,3,4,6
mannóz	mannozidáz: α 1-2; α 1-2,3; α 1-6; α 1-2,3,6
fukóz	fukozidáz: α 1-2, α 1-6, α 1-3,4, α 1-2,4,6, α 1-2,3,4,6

A szubsztrát terméké történő átalakulását a CE-vel úgy hasznosítják, hogy analizálják a mintát az enzimátikus emésztés előtt és után. A termék képződését a migrációs idő eltolódásaként figyelhetjük meg. A megfelelő exoglikozidázokkal történő emésztést követően lehetőség van az oligoszacharidok szekvenciájának és kötődésének feltárására. Ezek az elemzések off-line vagy online végezhetők a CE-vel.

3.4.3 Glikán struktúrameghatározás CE-MS kapcsolással

A CE elválasztáshoz kapcsolódó glikán struktúrameghatározás egy másik lehetséges módja a MS-sel történő csatolás. A módszer lényege, hogy a CE kiváló felbontású elválasztóképeségét ötvözi az MS nagy pontosságú szerkezetazonosító képességével, így lehetővé teszi egyes glikánstruktúrák pontos szerkezeti beazonosítását. Az azonos összetételű, de az elágazásukban eltérő glikánok beazonosításában egyrészt segítséget nyújt az, hogy a CE legtöbbször képes elválasztani ezeket az izomereket, másrészt a hozzá kapcsolt tandem MS részletes fragmentációs mintázatai pontos szerkezeti információt nyújthatnak az egyes szerkezetekről [64].

Mint a CE-nél általában, a CE-MS módszereknél is gyakran használnak derivatizálószerkezeteket a glikán analízis során. Az APTS ennél a csatolt módszernél is gyakran használt festék [65], ugyanis az elektroforetikus mobilitás biztosításán túl a negatív MS módban a glikánoknak negatív töltést biztosít, így azok MS-ban való detektálhatóságát jelentős mértékben növeli.

Lehetőség van jelölést nem igénylő glikán analízisre is CZE-MS rendszerrel, amellyel rendkívül nagy érzékenység érhető el, valamint a hagyományos módszereknél egy nagyságrenddel több struktúra azonosítható be [66]. A szerzők közlése szerint a módszer annyira érzékeny, hogy akár egyetlen sejtről nyert glikánprofil is vizsgálható vele, illetve a tandem MS technika miatt a szerkezeti izomerek egymástól megkülönböztethetőek lettek.

4 Anyagok és Eszközök

4.1 Vegyszerek

A humán immunglulin G1 (hIgG1), ribonukleáz B, fetuin, nátrium-cianoborohidrid (1 M THF-ben), aminopirénetriszulfonát (APTS) és a ditiotreitól (DTT) a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) származott. A hexánsav, Tris bázis, glicerin, jégecet, acetonitril, nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és tetrahidrofurán a VWR-től (Radnor, PA, USA) származott. A PNGáz F enzim a Pannon Egyetemen (Veszprém, Magyarország) készült [67]. Az Agencourt CleanSEQ paramágneses tisztítógyöngyök a Bio-Science Kft-től (Budapest, Magyarország) származnak. A maltooligoszacharidok M040-es létrája a Grain Processing Co. (Muscatine, IA) szíves ajándéka volt. A szénhidrát elválasztó gélpuffer (HR-NCHO) a Bio-Science Kft.-től (Budapest, Magyarország) származott.

4.2 Mintaelőkészítés

4.2.1 N-glikán felszabadítás

A glikoproteinekről (ribonukleáz B, fetuin, hIgG1), valamint a humán szérumban lévő glikoproteinjeiről a glikánstruktúrákat PNGáz F enzim segítségével szabadítottam fel a következő módon: 10 μL 1 mg/mL-es glioprotein oldathoz, illetve 10 μL 10-szeresen hígított humán szérumban lévő 2 μL denaturáló oldatot (0,375% NP-40, 12,75% glicerin és 0,625% SDS) adtam, majd 15 percig inkubáltam 70°C-on. Ezután 2 μL (50% glicerinben tárolt) 1,35 mg/mL (75 $\mu\text{Unit}/\mu\text{L}$) PNGáz F-et adtam a mintákhoz, majd 37°C-on temperáltam azokat 2 órán keresztül.

4.2.2 Fluoreszcens jelölés

A fluorofór jelöléshez 20 μL redukív aminációs reakcióelegyet (15% HPLC minőségű víz, 35% jégecet, 40% tetrahidrofurán és 10% 1 M nátrium-cianoborohidrid) adtam 10 μL 1 mg/mL maltooligoszacharid létrához, valamint a glikoproteinekről felszabadított glikán mintákhoz. A jelölési reakciót 1 μL 20 mM APTS hozzáadásával indítottam el, majd 60°C-on inkubáltam 1 órán át nyitott mintaedény fedéllel, mialatt a minta teljesen beszáradt [68]. A jelölési folyamat befejezése után a mintákat 80 μL HPLC minőségű vízben oldottam fel.

4.2.3 Mintatisztítás

A mintatisztítási lépést Biomek 3000 automata folyadékkezelő robot segítségével végeztem. Mintánként 200 μL Agencourt CleanSEQ paramágneses gyöngyről a tárolófolyadékot eltávolítottam, majd a mikrogyöngyökhöz 20 μL tisztítatlan, APTS jelölt mintát adtam, és felszuszpenzáltam. Három tisztítási ciklust végeztem, amelyből egy ciklus a következőképpen néz ki: 1) 170 μL acetonitrilt adtam a mintát tartalmazó mikrogyöngyszuszpenzióhoz, majd 120 másodpercig vártam. 2) A mintatartó tálcát egy mágneses tartóra helyeztem, majd 60 másodpercig hagytam a mikrogyöngyöket a

mágneshez vándorolni. 3) A mikrogyöngyökről eltávolítottam a folyadékot, majd 20 μL vízzel újra szuszpendáltam, amit 180 másodpercig történő rázatás követett. A harmadik ciklus végén a 20 μL víz helyett 80 μL vízzel eluáltam a gyöngyök felületéről a jelölt glikánokat, majd 240 másodperc rázatás után a mágnesek segítségével az eluált mintát egy új mintatároló edénybe helyeztem át. A mintánkénti 3 mosófolyadékot 37 °C-on egy éjszakán át bepároltam, majd 80 μL vízben visszaoldottam. A tisztítatlan mintákat az analízis előtt 4-szeresére hígítottam, hogy elérjem a tisztított mintákkal azonos koncentrációt.

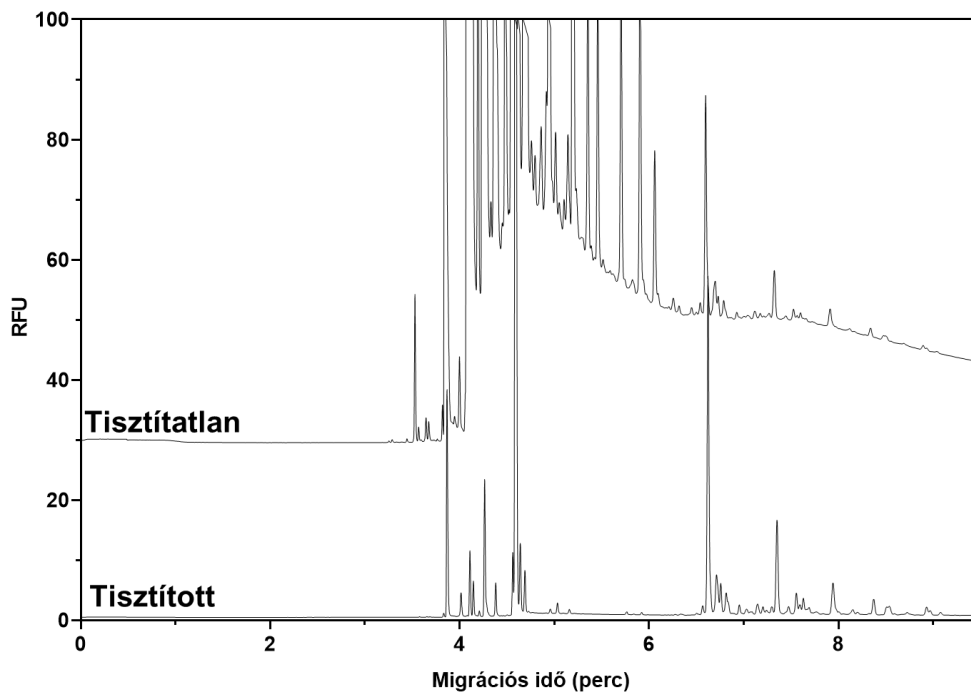
4.3 Kapilláris elektroforézis

Az APTS-sel jelölt minták kapilláris elektroforézis analízisét PA800 Plus berendezéssel (Beckman Coulter, Brea, CA) végeztem, amely szilárdtest lézer indukált fluoreszcens detektorral (gerjesztés 488 nm, emisszió 520 nm) volt felszerelve, és a 32 Karat szoftver (ver 10.1) vezérelte. A 30 μm és 50 μm belső átmérőjű, belső bevonat nélküli kvarckapillárisok (BFS) a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) cégtől származtak. A kapilláris és a mintatálca hőmérsékletét egyaránt 20 °C-ra állítottam be. Az APTS-jelölt minták elektroosmotikus áramlással támogatott CZE elválasztását 253 mM Tris-bázis és 150 mM kapronsav összetételű és 8,1 pH-jú (CATRIS-ként elnevezett) háttélektrolitban 30 cm effektív hosszúságú (40 cm teljes hosszúságú) BFS kapillárisban végeztem. Az alkalmazott feszültség 30 kV volt, az anód az injekciós oldalon, a katód pedig a detektálási oldalon (normál polaritás). A kapillárist a futtatások előtt 2 percig 0,5 N NaOH-oldattal kondicionáltam, majd a 2 percig háttélektrolittal töltöttem fel. A mintákat 5 másodpercig 1 psi nyomással injektáltam. A hagyományos, alacsony pH-értékű gélpufferrel végzett CGE-analízis egy 40 cm effektív hosszúságú (összesen 50 cm) 50 μm belső átmérőjű BFS-kapillárisban történt. Az alkalmazott elektromos potenciál 30 kV volt, a katód az injekciós oldalon, az anód pedig a detektálási oldalon (fordított polaritás). Ebben az esetben a mintákat 2 kV feszültséggel 2 másodpercig (fordított polaritással) injektáltam, amit 5 másodperces 5 psi-vel történő vízdugó injektálás előzött meg.

5 Eredmények

5.1 CATRIS elválasztó puffer kifejlesztése

A cukroknak általánosságban nincs töltésük, valamint az UV/látható frekvenciatartományában nem nyelnek el fényt, nincs fluoreszcens tulajdonságuk, így CE módszerrel közvetlenül nem vizsgálhatóak. Lehetséges azonban különféle töltött fluoreszcens festékekkel történő származékképzésük, amely által biztosított lesz a molekulák elektromigrációja és detektálhatósága. Az egyik leggyakoribb erre a célra használt festékekkel, az APTS-sel való redukív aminálási reakció gyorsabb lejátszódása érdekében a festéket nagy feleslegben adják a reakcióelegyhez. Az iparban jelenleg alkalmazott kapilláris gélelektroforézis módszerekkel történő vizsgálatukhoz a mintamátrixban feleslegben lévő festéket el kell távolítani, ugyanis a nagy mobilitású szabad APTS-ionok a vizsgálni kívánt struktúrák előtt érnek a detektorablakhoz, és nagy relatív koncentrációja és „tailing”-es karaktere miatt telíti a kapillárisoszlopot, elfedve így az analitokat (9. ábra).



9. ábra: Humán szérumban lévő APTS-sel jelölt N-glikánjainak CE elektroferogramja. Mérési paraméterek: 40 cm-es teljes hosszúságú (30 cm-es effektív hosszúságú), 30 μ m belső átmérőjű, BFS kapilláris; 2 psi – 5 másodperc vízdugó injektálás, -5 kV – 5 másodperc minta injektálás; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; -30 kV elválasztófeszültség. Alsó elektroferogram: mágneses gyöngyökkel történő tisztítással kezelt minta. Felső elektroferogram: tisztítás nélküli minta.

Az 9. ábrán a 6. perc utáni csúcsok a glikán struktúrák, míg a 3-5 perces sávban a szabad APTS csúcsok láthatóak. A felső, tisztítatlan mintához tartozó elektroferogramon jól látszik, hogy a szabad festék oly mértékben telíti a kapillárisoszlopot, hogy leszálló

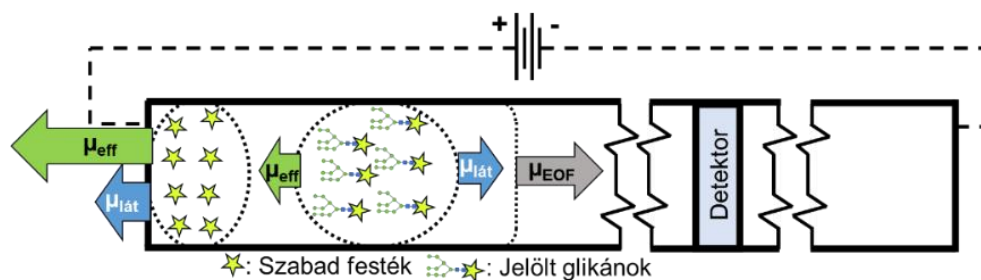
ága olyan mértékű alapvonal emelkedést okoz, amely elnyomja a vizsgálni kívánt glikánstruktúrákat is. A 9. ábra alsó elektroferogramján a mágneses gyöngyökkel történt tisztítással kezelt mintához tartozó mérés látható. Ebben az esetben ugyanúgy 3-5 perc közötti időtartományban láthatóak a szabad festék csúcsok, de sokkal kisebb intenzitással, mint a tisztítatlan minta esetén, és az alapvonal is visszaáll az eredeti értékre, így az a mérést nem zavarja. A tisztítási lépés többféleképpen történhet, de minden esetben munkaerő- és költségigényes lépésekről van szó, illetve egy későbbi fejezetben bemutatom, hogy csúcsarány változást is okozhat a glikánprofilban. Munkám során kifejlesztettem egy olyan kapilláris elektroforézis módszert APTS-jelölt glikánok analíziséhez, amely esetén ez a tisztítási lépés kihagyható. A hagyományos CE elválasztás során az analitok a hidrodinamikai átmérő/töltés arányukhoz képest növekvő sorrendben jutnak el a detektorablakig, ebből adódóan a szabad festék (amely 3 negatív töltéssel rendelkezik, viszont nem kötődik hozzá oligoszacharid) fog elsőként detektálásra kerülni.

A CE esetén több technika is kihasználja az EOF jelenséget [69]. Ilyenkor egy mintakomponens látszólagos mobilitását az EOF mobilitásának és a komponens effektív mobilitásának algebrai összegeként kapjuk meg:

$$\mu_{lát} = \mu_{EOF} + \mu_{eff} \quad (3)$$

ahol $\mu_{lát}$ a látszólagos (mért) mobilitás, μ_{EOF} az EOF mobilitása és μ_{eff} az effektív mobilitás.

Ha a mobilitásnak pozitív az előjele, akkor a mozgás a kapilláris bemeneti vége felől a kimeneti vége felé történik, ha negatív, akkor ellenkező irányba. Egy olyan rendszer esetén, ahol a μ_{EOF} pozitív, a rendszer polaritásából (a bemeneti a pozitív elektróda) adódóan az összes negatívan töltött részecskére a μ_{eff} negatív értékű lesz. Lehetséges viszont olyan rendszert létrehozni, ahol a μ_{EOF} abszolútértékben vett értéke nagyobb, mint a vizsgálni kívánt mintakomponensek μ_{eff} abszolútértékben vett értéke, ami által a vizsgálandó analitok $\mu_{lát}$ értéke pozitív lesz, vagyis eljutnak a detektorablakig, így vizsgálhatóak lesznek normál polaritású elválasztás esetén is. Ez azt is jelenti, hogy az EOF-et nem használó CGE-hez képest a glikáncsúcsok sorrendje (nagyreszt) fordított lesz, vagyis a hidrodinamikai átmérő/töltés arányukhoz képest csökkenő sorrendben migrálnak. Van egy „határmobilitás” (az EOF mobilitásának értéke), amelynél nagyobb abszolútértékkel rendelkező (egyébként negatív) mobilitással bíró molekulák az elválasztás közben nem jutnak be a kapillárisba, hanem legyőzve az EOF „sodrását” kijutnak a kapilláris bemeneti végén. A rendszert úgy állítottam be, hogy az EOF mobilitása a szabad APTS és a vizsgálni kívánt mintakomponensek abszolútértékben vett mobilitása közé essen, ezáltal egy online elektrokinetikus tisztítási lépést valósítottam meg (10. ábra) [70].



10. ábra: Az online elektrokinetikus tisztítást megvalósító kapilláris elektroforézis módszer sematikus ábrázolása. A nyilak hossza arányos az adott mobilitások nagyságával, így a μ_{eff} és a μ_{EOF} előjeles összege (jobb a pozitív irány) eredményezi a μ_{lat} nagyságát mind a szabad festék, mind a jelölt glikánok esetén. Az ábráról leolvasható, hogy míg a szabad festék elhagyja a kapilláris annak bemeneti végén ($\mu_{\text{lat, festék}} < 0$), addig a jelölt glikánok eljutnak a detektorablakig ($\mu_{\text{lat, glikán}} > 0$).

A megfelelő pufferrendszer kialakításához tehát az EOF és a mintakomponensek effektív mobilitásainak megfelelő arányának megtalálása a kulcs. Az EOF mobilitása több paraméter függvénye: a BGE vezetőképességével fordított arányosságban, míg a pH értékével egyenes arányosságban áll. Az analitok effektív mobilitására viszont csak a BGE vezetőképességének van hatása, azzal fordított arányosságban áll. Ahhoz, hogy a BGE egymás utáni futtatások alkalmával az EOF mobilitása viszonylag állandó érték maradjon, arra van szükség, hogy a puffer elektrolízisből adódó pH változása nagy (30 kV-os) kapocsfeszültség ellenére se változzon jelentősen. Minden puffernek a pK_a értékének megfelelő pH értéken a legnagyobb a pufferkapacitása, ennek megfelelően a munkám során a puffereket mindig ezekre az értékekre állítottam be. Egy adott pH-n a pufferrendszer koncentrációjának növelésével csökken a mintakomponensek effektív mobilitása, azonban az EOF mobilitása ennél is jobban csökken, ezért lehetséges kísérletileg megtalálni azt a pufferkoncentrációt a puffer pK_a -jának megfelelő pH-n, ahol teljesülnek a 4. egyenletben feltüntetett viszonyok.

$$|\mu_{\text{eff, glikán}}| < \mu_{\text{EOF}} < |\mu_{\text{eff, festék}}| \quad (4)$$

Többféle puffer (ammónia, 4-metil-morfolin, trietil-amin stb.) tesztelése után a Tris bázis alapú puffernél állapodtam meg, ugyanis a pH=8 körül tűntek optimálisnak a mobilitásarányok olyan áramerősség mellett, ami megszokott a kapilláris elektroforézis elválasztások közben (~30 μA). A Tris bázis rendkívül nagy (pH=7-9 pufferelési tartomány) pufferkapacitással rendelkezik, $pK_a=8,1$. Emellett ez egy aránylag nagy méretű, egy töltéssel rendelkező molekula, így magasabb koncentrációban sem növeli jelentős mértékben a BGE vezetőképességét, ami az elektroforézis közben az ennek megfelelően emelkedett áramerősség esetén jelentkező hőfejlődés kiküszöbölése, valamint a CE berendezés terhelésének moderálásának szempontjából előnyös.

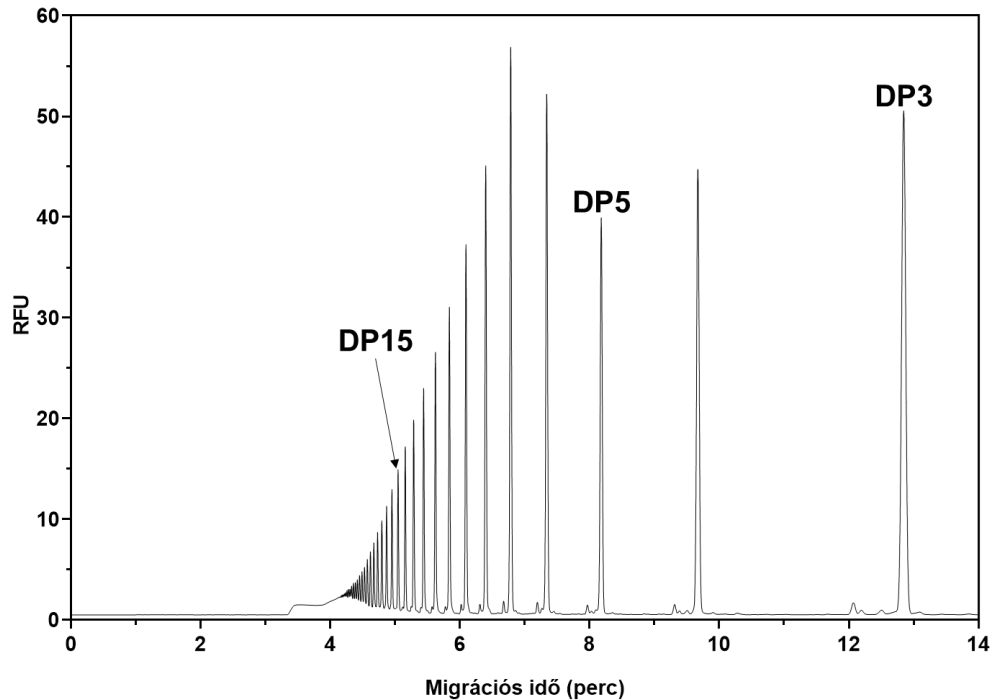
Az elválasztás minőségére nagy hatást gyakorol az, hogy milyen anyagi minőséggel bírnak a BGE azon komponensei, amelyek a mintakomponensekkel azonos töltéssel

rendelkezik, tehát amelyeknek velük egy irányú az effektív mobilitásuk. Ez a gyakorlatban a deprotonált savat jelenti, amivel a Tris bázis-t 8,1-es pH-ra állítjuk. Ennek a pufferkomponensnek a jelentősége abban áll, hogy ha nagy az effektív mobilitás különbség (bármelyik irányba) a BGE anion komponense és a mintakomponens között akkor az elektroforetikus diszperzió jelensége miatt csúcsalak változást (fronting vagy tailing) és ezáltal csúcshévedést tapasztalunk, ami az elválasztás hatékonyságát jelentősen rontja. A fejlesztés során tehát olyan, kellően erős savat kerestem, amely a mintakomponensek mobilitásával hozzávetőlegesen megegyező mobilitással rendelkezik, minimálisra csökkentve ezzel az elektroforetikus diszperziót. Nyílt láncú, telített monokarbonsav homológ sort teszteltem a hangyasavtól az oktánsavig, ezek közül a hexánsav, (közismert néven kapronsav) adta a legjobb felbontást a kívánt csúcstartományban. A hexánsav egy kellően erős sav ($pK_a=4,8$), azonban erősen apoláris, így tiszta vízben nagyon rosszul oldódik. Tris bázis oldatban viszont fel lehet oldani a kapronsavat, ugyanis a bázikus közegben a sav deprotonálódik, így már oldható a poláris oldószerben. A puffer elkészítésénél már csak egy független paramétert kellett változtatnom a kísérletek során, mégpedig a hexánsav koncentrációt, ugyanis a pH-t 8,1-es értéken rögzítettem, amitől nem független a Tris bázis koncentrációja. Azért a hexánsav koncentrációját vettem fix értéknek, mert az egy viszkozusabb folyadék, nehezebb pipetázni, így a pH-ra ezzel történő beállítása körülményes lenne. Ehelyett egy hígabb Tris bázis oldatba oldottam be a rögzített mennyiségű kapronsavat, majd 1 mol/dm³-es Tris bázis oldattal állítottam be a 8,1-es pH-t, ezután jelre töltve értem el a végkoncentrációt.

30 μ m belső átmérőjű, 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú BFS kapillárist használva állítottam be a koncentrációt. Azért a 30 μ m belső átmérőre esett a választásom, mert tapasztalatom szerint az EOF dugószerű áramlása jobban meg tud valósulni (a kisebb kapillárisjáratban létrejövő sugár irányú sebességgradiens miatt), növelve ezzel a felbontást. Emellett a kisebb keresztmetszet miatt a kialakuló áramerősség is kisebb, mint az 50 μ m-es belső átmérőjű kapilláris esetén a nagyobb ellenállás miatt, aminek köszönhetően magasabb pufferkoncentrációt is elvisel a CE berendezés 30 kV elválasztófeszültség mellett, így a jelentősen nagyobb vezetőképességű BGE hatására jobban meg tud valósulni a „stacking”, így a tisztítatlan, nagyobb vezetőképességű minták esetén is jó felbontás érhető el. A 40 cm-es hosszra azért esett a választásom, mert ettől lefelé (30 cm) és felfelé (50 – 90 cm) is el lehet térni attól függően, hogy rövidebb elválasztási idő, vagy esetleg nagyobb felbontás elérése a cél.

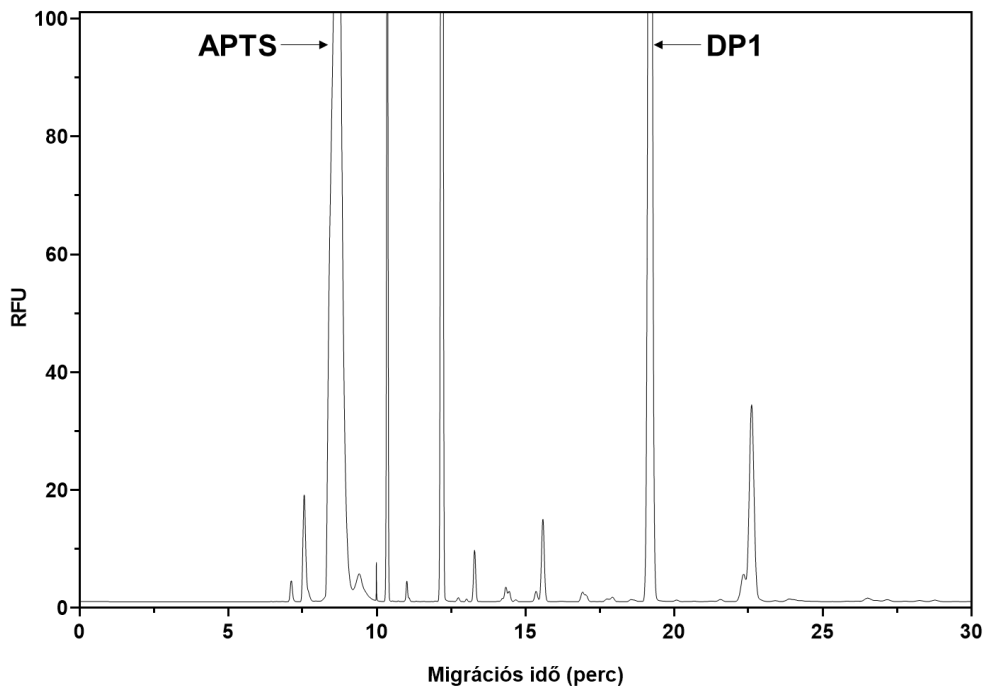
APTS jelölt maltodextrin létramintán teszteltem 50 mmol/dm³ és 200 mmol/dm³ közötti kapronsavkoncentrációjú háttélelektrolit oldatokat a 40 cm-es és 30 μ m belső átmérőjű BFS kapillárison 30 kV-os elválasztófeszültséggel, 20°C-os kapilláris hőmérséklettel, 1 psi 5 másodperc mintainjektálással. Ezek közül a 150 mmol/dm³ és 253 mmol/dm³ Tris bázis (pH=8,1) összetételű puffer bizonyult az optimálisnak az

analízisidő (DP3- ig kb. 13 perc) és a felbontás (alapvonalai elválasztás kb. DP16-ig) tekintetében (11. ábra).



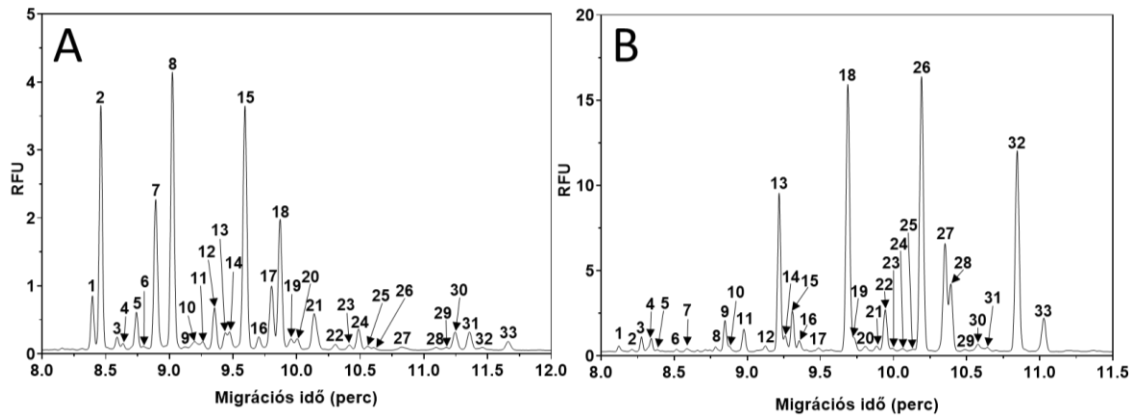
11. ábra: Tisztítatlan maltodextrin létra minta elektroferogramja; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV normál polaritású elválasztófeszültség.

Annak érdekében, hogy bebizonyítsam, hogy olyan elválasztási rendszert hoztam létre, aminél a szabad festék az elválasztás kezdetén a kapilláris bemeneti végén elhagyja a rendszert (10. ábra), megmértem a 11. ábrán látható elektroferogramhoz tartozó APTS-jelölt maltodextrin mintát, úgy, hogy minden elválasztási paraméter megegyezett, mint a 11. ábra mérési paraméterei, azzal az eltéréssel, hogy az elválasztófeszültség polaritását megfordítottam, tehát a negatív elektróda volt a bemeneti végén. Ez azt eredményezte, hogy az EOF a kapilláris bemeneti vége felé áramlott, ugyanakkor a szabad festék (valamint a DP1 is) az EOF-nél nagyobb abszolút értékű mobilitása miatt eljut a detektorablakig (12. ábra). Mivel ilyen polaritás mellett detektálható a szabad festék, ebből következik, hogy az ellenkező polaritás mellett nem jut el a detektorablakig, így normál polaritás mellett megvalósul az on-line elektrokinetikus tisztítás.



12. ábra: Tisztítatlan maltodextrin létra minta elektroferogramja; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség.

Ezután a CATRIS elválasztási hatékonyságát összehasonlítottam egy kereskedelmi forgalomban lévő (HR-NCHO) géllal, úgy állítva be a kapillárisok hosszát, hogy az analízisidő közel egyforma legyen. Jelen esetben mindkét kapilláris 50 cm teljes (40 cm effektív) hosszúságú volt. A gél esetében a BFS kapilláris 50 μm belső átmérőjű volt, ugyanis ennél az elválasztóközegnél a 30 μm belső átmérőjű kapilláris gyakran eltömődik, emiatt a gyakorlatban nem használják. Az analíziseket hIgG1 mintán végeztem, a CATRIS esetén felesleges festéktől tisztítatlan, míg a HR-NCHO esetén tisztított mintán (13. ábra).



13. ábra: A panel: tisztítatlan hIgG1 minta elektroferogramja; CATRIS BGE; 50 cm teljes (40 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV normál polaritású elválasztófeszültség. B panel: tisztított hIgG1 minta elektroferogramja; HR-NCHO BGE; 50 cm teljes (40 cm effektív) hosszúságú, 50 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; 5 psi 5 másodperc vízdugó-, 2 kV 2 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. A két ábrán látható azonos számú csúcsok nem feleltethetők meg egymásnak, a számozás csak a csúcsok számáról ad információt.

A két elektroferogramot megvizsgálva megállapítható, hogy az elválasztási teljesítmény a két módszer esetén nagyon hasonló, erről árulkodik, hogy ugyanannyi a csúcs darabszám. Fontos kiemelni, hogy míg a HR-NCHO esetén a mintát a vizsgálat előtt idő- és munkaiigényes tisztítási lépéssel kellett kezelni, addig a CATRIS esetében erre nem volt szükség. Megfigyelhető továbbá, hogy a struktúrák sorrendje a két módszernél közel ellentétes, ez az elválasztási mechanizmus különbözőségéből adódik. A gél esetén ugyanis nincs EOF, a mintakomponensek az időben az effektív mobilitásuk növekvő sorrendében válnak el. Ehhez képest a CATRIS puffer ellenirányú EOF-et hoz létre az elválasztás közben, amihez képest a mintakomponensek a bemeneti vég felé mozdulnak el, így az analitok időbeli elválasztása az effektív mobilitásuk csökkenő sorrendjében valósul meg. Az, hogy miért nem teljesen tükörképe a két elektroferogram egymásnak, azzal magyarázható, hogy míg a CATRIS esetén a mozgásvektorra számított hidrodinamikai keresztmetszet az elsődleges effektív mobilitást befolyásoló tényező, úgy a gél esetén (a struktúrák gél térhálós szerkezetén való átjutása révén) ez a tényező nagyobb mértékben a hidrodinamikai felület, valamint a térhálóval való különféle intermolekuláris kölcsönhatások összege.

5.2 Prekoncentrációs módszer fejlesztése CATRIS elválasztási módszerre

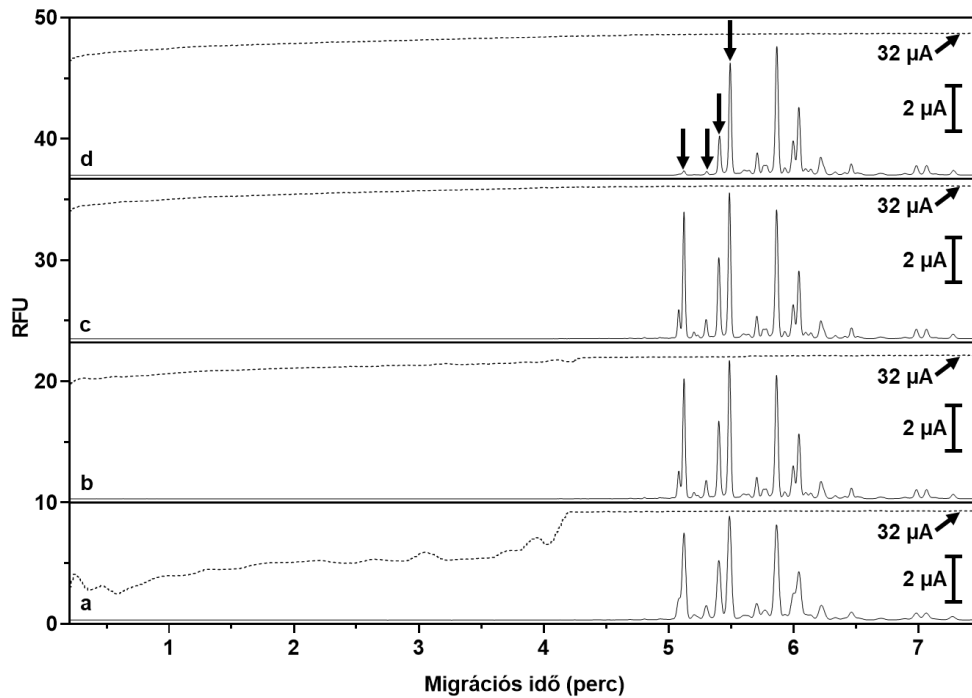
A kapilláris elektroforézis módszerek (például a HR-NCHO elválasztási módszer) gyakran alkalmazzák a „stacking”-nek nevezett prekoncentrációs eljárást, ami azon a fizikai jelenségen alapul, hogy ha a kapilláris egy szakasza egy kisebb, míg egy másik szakasza egy nagyobb vezetőképességű oldattal van töltve, majd erre ráadva a kapcsolófeszültséget, a rendszeren teljes hosszában egyforma nagyságú áram fog

keresztülfolyjni, de a feszültségesekek különbözőek lesznek. Ez azt is jelenti, hogy a két szakaszon ugyanakkora áram folyik át adott pillanatban, és mivel ezt az áramerősséget a kisebb vezetőképességű oldat esetén kevesebb ion hozza létre, mint a nagyobb vezetőképességű oldat esetén, így értelemszerűen az első oldatban nagyobb lesz a feszültségesek, és ennek megfelelően gyorsabban fognak mozogni az ionok, mint a második esetben. A HR-NCHO gélt alkalmazó elválasztási módszernél a tisztított minta elektrokinetikus (feszültséggel történő) injektálása előtt egy vízdugót injektálnak a kapilláris elejébe. A mintainjektálásnál a mintamátrix ezzel a nagyon alacsony vezetőképességű vízdugóval érintkezik, az injektáló feszültséget ráadva a rendszerre a mintakomponensek a vízdugón keresztül gyorsan mozognak, majd amint elérik a gél felületét, ott lelassulnak, így ott egy rövid szakaszon betöményednek (prekoncentráció). Ezáltal kis csúcshélesség, valamint nagy érzékenység érhető el.

A CATRIS módszer alapesetben (1 psi 5 másodperc mintainjektálás) is megvalósít „stacking”-et, ugyanis a puffer jelentősen nagyobb vezetőképességgel rendelkezik, mint a mintamátrix, így a mintadugóból az anionok (köztük az analitok) az elválasztófeszültség hatására gyorsan a mintadugó kapilláris bemeneti vége felőli határához migrálnak, majd lelassulnak, így feldúsulnak. Meg kell jegyezni, hogy amint az elválasztófeszültség a rendszerre kerül, a mintadugó az EOF megindulása miatt a kapilláris kimeneti vége felé megindul, emiatt az EOF-nél kisebb abszolútértékben vett mobilitású mintakomponensek nem jutnak ki a kapillárisból, ugyanis az EOF hatására a puffer beáramlik a kapilláris elején. Ennél a kis 1 psi 5 másodperces injektálásnál olyan rövid ez a mintadugó, hogy ez az EOF-et, valamint az elválasztást nem befolyásolja nagymértékben, így a 13. ábrán látható jó felbontást kaphatjuk.

Az LVSS technika a „stacking” egy változata oly módon, hogy a nyomással a kapilláris hosszának akár 10-20%-át feltöltik mintával, majd a „stacking” miatt a teljes mintadugóból az analitok egy kis sávba töményednek be, jelentősen növelve ezzel a detektálási érzékenységet. Az LVSS-t az irodalomban nagyrészt fordított polaritás és EOF létrehozása mellett valósítják meg, ami azért előnyös, mert a mintadugó a kapilláris eleje fele elhagyja a rendszert, így az az elválasztást nem zavarja. Eközben a mintakomponensek az EOF-nél nagyobb effektív mobilitással vándorolnak a kapilláris kimeneti vége felé, így azok detektálhatóak.

A CATRIS esetén is adja magát, hogy LVSS-t alkalmazzunk, azonban akár már 5 psi 5 másodpercre növelve az injektálást, a felbontás csökken, és hiába növekedett meg a csúcsmagasság, a nagy mintadugó végig haladása a kapillárisban elrontja az elválasztást (14. ábra „a” elektroferogram).



14. ábra: LVSS megvalósítása CATRIS elválasztási rendszeren különböző hosszúságú, fordított polaritású SMRS-sel. A „b”, „c” és „d” elektroferogramok az „a” elektroferogram migrációs idejére lettek normalizálva. Minta: tisztítatlan hIgG1 minta (ugyanaz minden esetben); CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 µm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; 5 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. „a” elektroferogram: nincs SMRS; „b” elektroferogram: 10 kV 20 másodperc SMRS; „c” elektroferogram: 10 kV 30 másodperc SMRS; „d” elektroferogram: 10 kV 40 másodperc SMRS. A szaggatott vonalak az adott elektroferogramhoz tartozó áramgörbét jelentik.

Ezt a problémát úgy oldottam meg, hogy a nagy térfogatú injektálás után, de az elválasztás előtt beiktattam egy fordított polaritású, mintamátrix eltávolítási lépést (sample matrix remove step, SMRS). Ezt 10 kV feszültséggel hoztam létre (úgy, hogy a kapilláris mindkét vége pufferben volt), keresve azt az időhosszt, aminél a mintamátrix már elhagyja a rendszert, a mintakomponensek pedig a kapilláris elejében még bent maradnak (15. ábra).

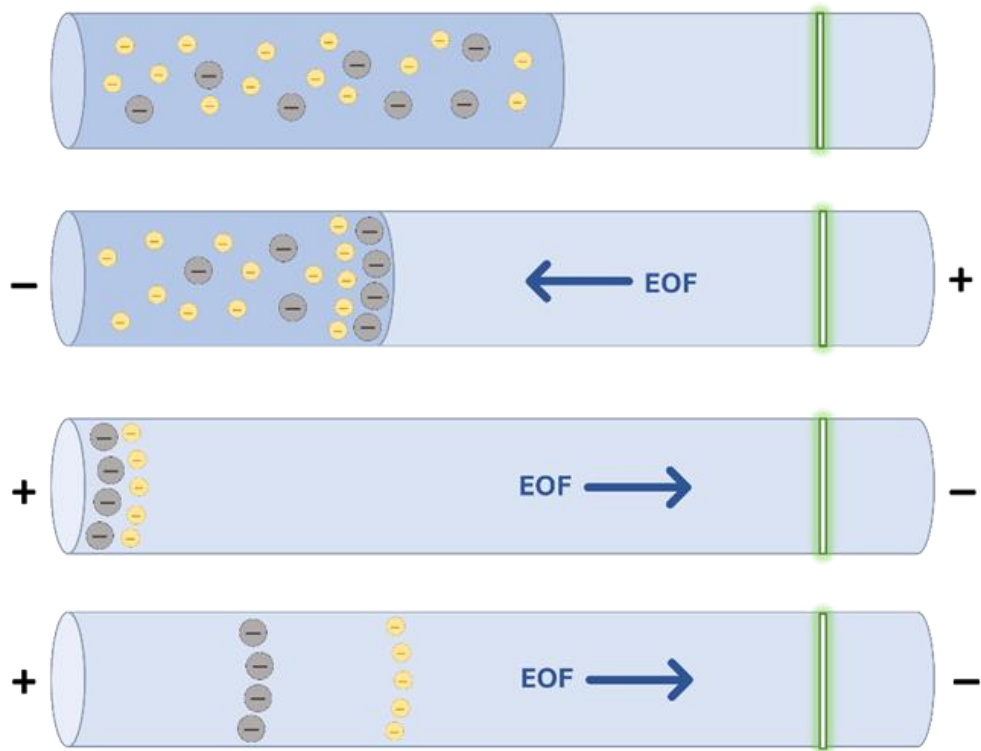
A 14. ábra „a” jelű elektroferogramján látható, hogy SMRS nélkül ekkora mintadugó nagyban rontja a felbontást. A szaggatott vonallal ábrázolt áramgörbén látszik, hogy kicsivel 4 perc után hagyja el a mintadugó a kapilláris annak kimeneti végén, innentől beáll egy közel konstans áramerősség, ezzel együtt egy konzisztens EOF sebesség is. A felbontás romlása saját meglátásom szerint amiatt következik be, hogy a nem konstans áramerősség nem konzisztens EOF-et jelent. Mivel az EOF-et a kapilláris belső felén kialakuló pozitív töltésű réteg mozgása okozza, ennek a sebességnek át kell terjednie a kapilláris közepén lévő folyadékrétegbe is. Egy beállt, konzisztens EOF-nél nincs jelentős mértékű sugárirányú gradiens, így a lamináris rétegek már nem csúsznak el egymáson,

így nem tapasztalható csúcshéledés. Azonban egy inkonzisztens EOF esetén a kapilláris fala mentén létrejött pozitívan töltött réteg mozgását a belsőbb rétegek folyamatosan „lekövetik” így egy folyton váltakozó sugár irányú sebességgradiens alakul ki. Abból kifolyólag, hogy a mintakomponensek a kapilláris teljes keresztmetszetében megtalálhatóak, az egymáson elcsúszó folyadék rétegek csúcsmagasság csökkenést, és ami még fontosabb, csúcshéledést hoznak létre.

A 14. ábra „b” jelű elektroferogramhoz tartozó mérésnél a 10 kV-on, 20 másodpercig tartó fordított polaritású SMSR-t alkalmaztam. A szaggatottal ábrázolt áramgörbén látszik, hogy a mintadugó mérete, ami az elválasztás közben keresztülment a kapillárison, jelentősen lecsökkent az „a” elektroferogramhoz képest. Ez azon látszik, hogy sokkal konzisztensebb az áram, mint az „a” mérés esetén, azonban kicsivel 4 perc után látszik a pont, ahol a mintadugó elhagyja a rendszert. A felbontás már elérte azt a szintet, mint ami a „hagyományos” 1 psi 5 másodperc injektálás esetén tapasztalható.

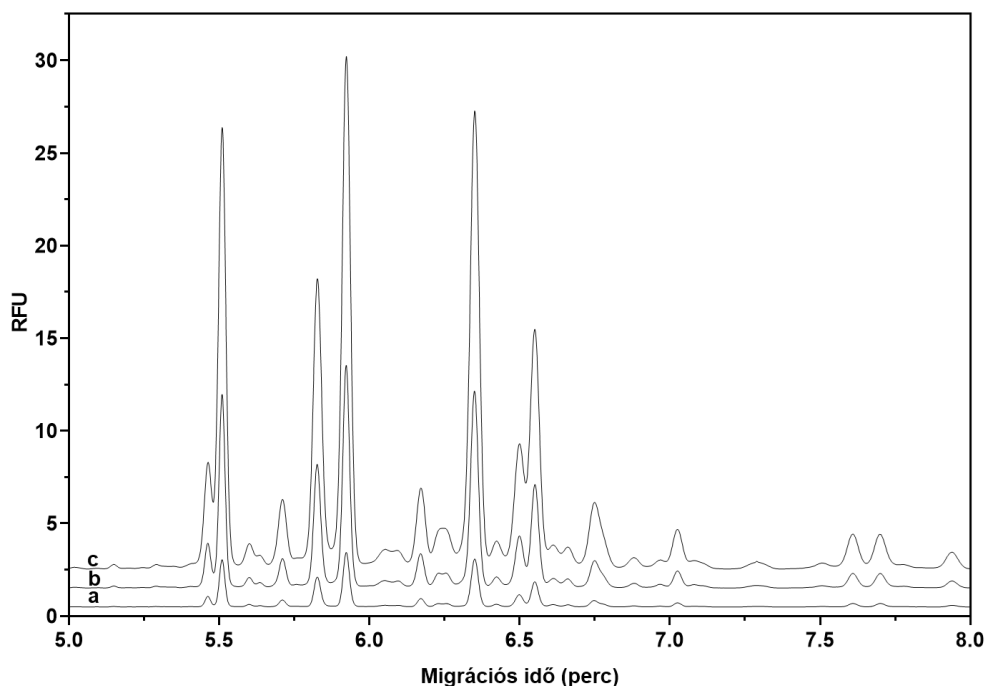
A 14. ábra „c” jelű mérésnél a 10 kV-on, 30 másodpercig tartó fordított polaritású SMSR-t alkalmaztam. Az ehhez tartozó, szaggatott vonallal ábrázolt áramgörbén már nem található törés, így elmondható, hogy az egész mintadugó elhagyta a rendszert. A felbontás gyakorlatilag megegyezik a „b” elektroferograméval.

A 14. ábra „d” jelű mérésnél a 10 kV-on, 40 másodpercig tartó fordított polaritású SMSR-t alkalmaztam. Az ehhez tartozó, szaggatott vonallal ábrázolt áramgörbén ugyancsak nem látszik törés, azonban itt már olyan hosszú volt az SMRS lépés, hogy az hIgG1 legkisebb abszolútértékben vett effektív mobilitással rendelkező struktúráit (nyíllal jelölve) már „utolérte” az EOF, és azoknak nagy részét a kapilláris bemeneti oldalán eltávolította a rendszerből. A felbontás ugyanakkor megegyezik a „b” és a „c” elektroferogram felbontásával. Következésképpen elmondható, hogy a felbontás akkor is eléri a maximális értékét, amikor olyan hosszúságú SMRS-t alkalmazunk, hogy még marad egy kis méretű mintadugó a rendszerben. A „b” és a „c” mérés egyaránt megfelel az elvárásoknak, úgymint a felbontás a maximális, illetve nem vesz el információ a struktúrák SMRS révén történő kilökésével. Az, hogy milyen hosszúságú SMRS-t kell alkalmazni, függ az adott minta vezetőképességétől, pH-jától, a kapilláris hosszától, valamint a beinjektált mintadugó hosszától, amit az adott rendszerre meg kell állapítani. Látszik azonban, hogy az SMRS hossza nagy határon belül változtatható az adott rendszerben a megfelelő eredmény elérése mellett, például a 14. ábrán látható rendszer esetén 67%-kal növelve az SMRS hosszát is még a kívánt eredményt kapjuk.



15. ábra: A polaritásváltásos LVSS on-line preconcentrációs módszer sematikus ábrája

A 16. ábrán egy összehasonlítást mutatok be ugyanazon hIgG1 mintára a standard 1 psi 5 másodperces (16. ábra „a” jelű mérés), valamint 5 psi 5 másodperces (16. ábra „b” jelű mérés) és 8 psi 8 másodperces (16. ábra „c” jelű mérés) LVSS + SMRS-t alkalmazó mérést. Erről megállapítható, hogy az LVSS-t SMRS-sel kiegészítve akár egy nagyságrendnyi jelintenzitás növekedés is elérhető az egyes struktúrák esetében a felbontás jelentős csökkenése nélkül.



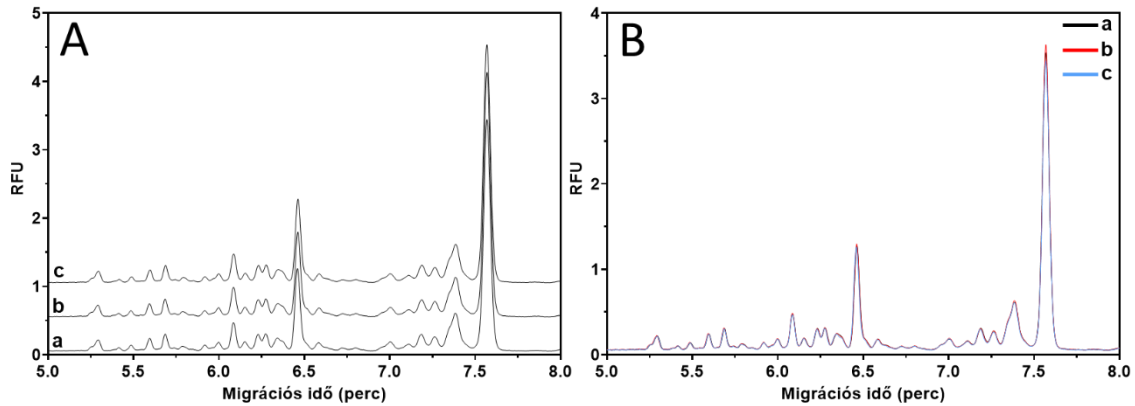
16. ábra: A preconcentrációs módszer hatékonyságának bemutatása CATRIS rendszerben. A „b” és „c” elektroferogramok az „a” elektroferogram migrációs idejére lettek normalizálva. Minta: tisztítatlan hIgG1 minta (ugyanaz minden esetben); CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. „a” elektroferogram: 1 psi 5 másodperc mintainjektálás, SMRS; „b” elektroferogram: 5 psi 5 másodperc mintainjektálás, 10 kV 30 másodperc SMRS; „c” elektroferogram: 8 psi 8 másodperc mintainjektálás, 10 kV 60 másodperc SMRS;

5.3 A mágneses mikrogyöngyökkel végzett mintatisztítás hatékonyságának vizsgálata

Az egyes glikánstruktúrák egymáshoz viszonyított mennyiségi aránya (mely információt a kapilláris elektroforézis esetében a migrációs idővel korrigált csúcs alatti terület hordoz) fontos biomarker egyes betegségek esetén, illetve a glikoprotein hatóanyagú gyógyszerek minőségi jellemzőjének egyik alapja. Az iparban jelenleg glikánok analízisére használt kapilláris elektroforézis módszerek mintaelőkészítési lépései között szerepel a nagy feleslegben adott, el nem reagált fluoreszcens festék mintamátrixból való eltávolítása valamilyen módon. Az egyik ilyen gyakran alkalmazott (például a Fast Glycan Labeling and Analysis Kit, melynek része a HR-NCHO gél is) tisztítási művelet Agencourt CleanSEQ paramágneses mikrogyöngyöket használ.

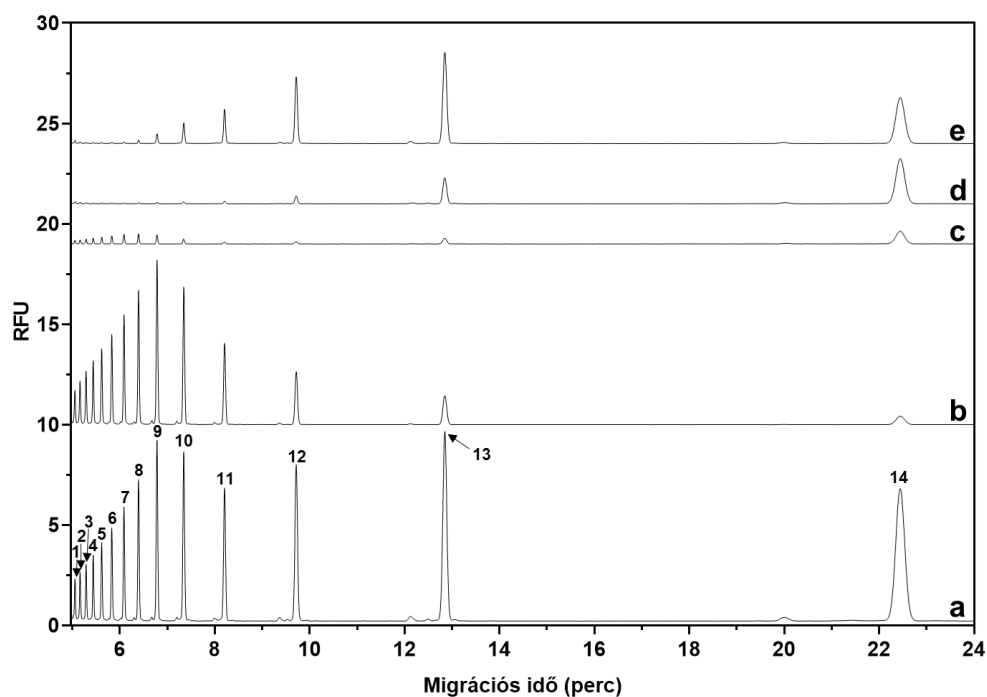
Mivel a CATRIS elválasztási módszer alkalmazható felesleges festéktől tisztítatlan mintákra is, így ennek segítségével lehetőségem volt megvizsgálni, hogy különböző mintákon hogyan viszonyulnak egymáshoz a tisztítatlan, a mágneses mikrogyöngyökkel tisztított, valamint a 3 mosási ciklus eluenseinek glikánprofiljai. A tisztítási lépéseket egy Biomek 3000 automata folyadékkezelő robot segítségével végeztem, melynek

kalibrációját, valamint programjának megírását is én végeztem. Először azt bizonyítottam, hogy a robot nagy reprodukálhatósággal képes véghez vinni a tisztítási folyamatot. Ehhez jelölt (és tisztítatlan) emberi szérum N-glikán mintát használtam, melyből 3 párhuzamos tisztítást, majd mérést végeztem (17. ábra). A humán szérumminta vizsgálatát a Helsinki Nyilatkozat iránymutatásai szerint végeztem, az etikai engedély száma 6152-2024, amelyet 2024 október 19-én hagytak jóvá.



17. ábra: Mágneses mikrogyöngyökkel végzett, párhuzamosan tisztított minták elektroferogramjai. Minta: humán szérum; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10 °C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV normál polaritású elválasztófeszültség. „A” panel: a párhuzamos elektroferogramok egymás felett ábrázolva. „B” panel: az elektroferogramok egymásra helyezve ábrázolva. Mindkét panel: „a” elektroferogram: #1 párhuzamos, „b” elektroferogram: #2 párhuzamos, „c” elektroferogram: #3 párhuzamos.

A 17. ábra alapján megállapítható, hogy az automata folyadékkezelő robot beállításai megfelelőek voltak, ugyanis a három párhuzamost egymásra helyezve szinte tökéletesen átfednek, így a tisztítási lépés reprodukálhatósága nagy. Ezután négyféle mintamatrixú és glikánprofilú (maltodextrin létra, hIgG1, ribonukleáz B és fetuin) tisztítatlan mintán a folyadékkezelő robot segítségével elvégeztem a tisztítást az eluenseket minden esetben külön gyűjtve. Ezt követően a tisztítatlan mintákat négyszeresére hígítottam, valamint az eluenseket beszárítottam, majd 80 μL HPLC tisztaságú vízben visszaoldottam, így a kapott koncentrációk egymással összehasonlíthatóak lettek. Így mind a négy mintatípusra 5-5 minta jött létre, melyeket külön-külön analizáltam a CATRIS módszerrel. Az elektroferogramokon ezután kiválasztottam a legfontosabb struktúrákat, melyek területszázalék változását megvizsgáltam a tisztított és a tisztítatlan minták esetén (18-21. ábrák).



18. ábra: A mágneses mikrogyöngyökkel végzett tisztítási lépés vizsgálata maltodextrin létra mintán. A „b”, „c”, „d” és „e” elektroferogramok az „a” elektroferogram migrációs idejére lettek normalizálva; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10°C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. „a” elektroferogram: tisztítatlan minta; „b” elektroferogram: tisztított minta, „c” elektroferogram: első mosó eluens; „d” elektroferogram: második mosó eluens; „e” elektroferogram: harmadik mosó eluens.

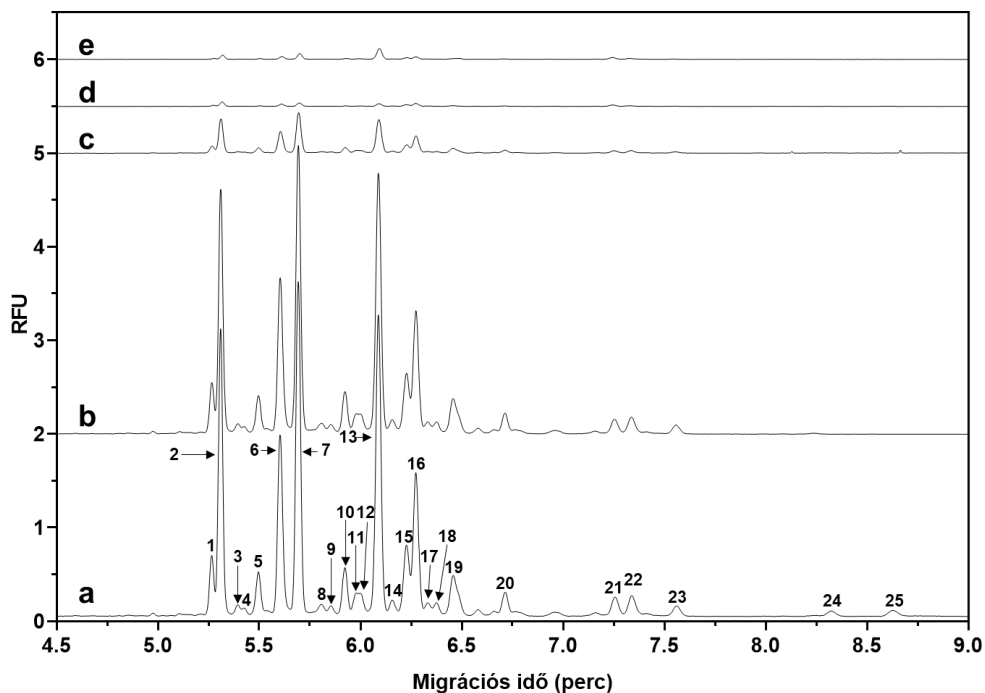
A 18. ábra számmal jelölt struktúráinak területszázalék változását az 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat: A maltodextrin létra glikánstruktúráinak területszázalék változása a tisztítási lépés során

Csúcs No.	Struktúra	Tisztítatlan (%Area)	Tisztított (%Area)	(%Area) változás
1	DP15	1,72	2,70	57,5%
2	DP14	1,93	3,40	75,9%
3	DP13	2,24	4,18	86,7%
4	DP12	2,62	5,00	91,0%
5	DP11	3,10	5,99	92,9%
6	DP10	3,76	7,25	92,7%
7	DP9	4,71	9,01	91,3%
8	DP8	6,03	11,35	88,1%
9	DP7	8,23	14,74	79,2%
10	DP6	8,34	13,24	58,8%
11	DP5	7,32	8,70	18,9%
12	DP4	10,39	6,80	-34,6%
13	DP3	17,22	5,05	-70,7%
14	DP2	22,39	2,61	-88,4%

A 18. ábra, illetve az 2. táblázat alapján megállapítható, hogy a tisztítási lépés során nagymértékben változik a maltodextrin létra glikánprofilja. Minél kisebb a polimerizációs foka a maltodextrin létra komponensnek, a tisztítás során annál jobban elveszik. Ez azzal magyarázható, hogy minden struktúra végén egy APTS molekula található, ami a molekulának egy poláris véget ad. Minél rövidebb az ehhez kapcsolódó cukorlánc, a molekula összességében annál polárisabb lesz, ami nem kedvez a tisztítás során a hidrofób kölcsönhatás kialakulásának, így ezek a struktúrák nagyobb arányban maradnak az eluensekben. Az is látszik, hogy míg az első eluensben (18. ábra „c” elektroferogram) az összes struktúra közel azonos arányban veszik el, addig a második és harmadik eluensben (18. ábra „d” és „e” elektroferogramok) inkább a rövidebb struktúrák vesznek el, mert ezekben az esetekben már jelentősen kisebb koncentrációban van jelen a szabad, nagyon poláris APTS.

A mágneses mikrogyöngyökkel végzett tisztítási lépés hIgG1 mintára kifejtett hatását a 19. ábra mutatja be.



19. ábra: A mágneses mikrogyöngyökkel végzett tisztítási lépés vizsgálata hIgG1 mintán. A „b”, „c”, „d” és „e” elektroferogramjai az „a” elektroferogram migrációs idejére lettek normalizálva; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10 °C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. „a” elektroferogram: tisztítatlan minta; „b” elektroferogram: tisztított minta; „c” elektroferogram: első mosó eluens; „d” elektroferogram: második mosó eluens; „e” elektroferogram: harmadik mosó eluens.

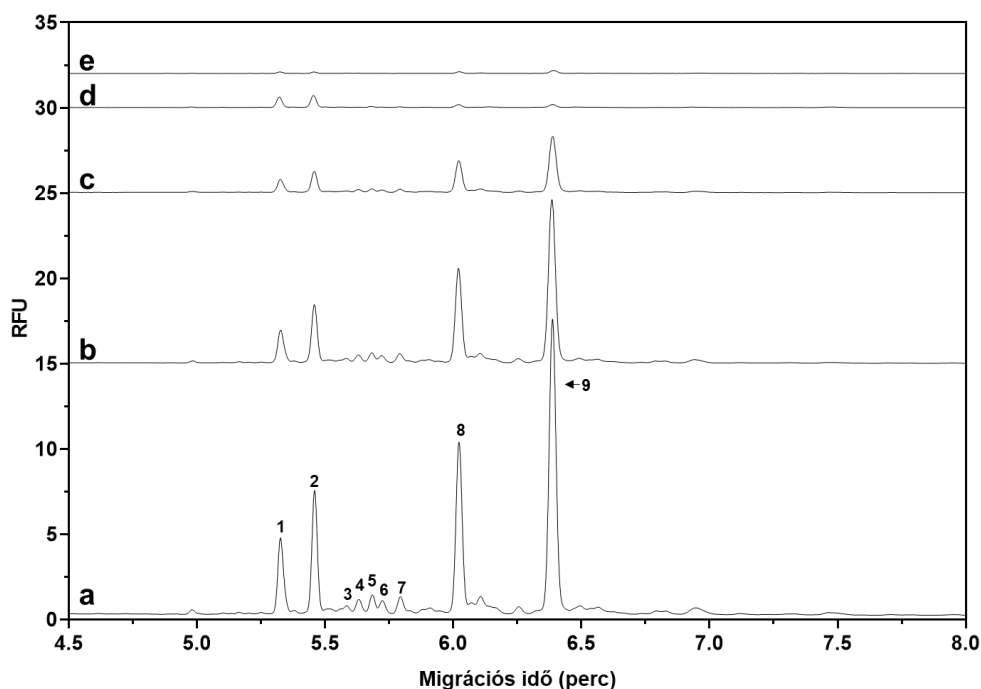
A számozott csúcsok területszázalékának változásait a hIgG1 minta esetében a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: A hIgG1 glikán struktúráinak területszázalék változása a tisztítási lépés során

Csúcs No.	Struktúra	Tisztítatlan (%Area)	Tisztított (%Area)	%Area változás	Csúcs No.	Struktúra	Tisztítatlan (%Area)	Tisztított (%Area)	%Area változás
1	FA2BG2	2,94	3,18	8,23%	14	A2B	1,23	1,30	5,21%
2	FA2G2	13,44	13,37	-0,53%	15	FA2BG2S1	4,92	4,88	-0,83%
3	FA2B(3)G1	0,81	0,84	3,35%	16	FA2G2S1	8,49	8,54	0,64%
4	A2G2	0,58	0,82	42,45%	17	A2BG2S1	0,99	1,03	4,42%
5	FA2(3)G1	2,48	2,50	0,63%	18	A2G2S1	0,98	0,92	-5,77%
6	FA2(6)G1	10,09	10,28	1,87%	19	FA2(3)G1S1	3,97	4,04	1,76%
7	A2B(3)G1	17,39	17,72	1,91%	20	FA2(6)G1S1	1,66	1,66	0,46%
8	A2B(6)G1	0,99	1,10	10,99%	21	FA2BG2S2	1,57	1,37	-12,72%
9	A2B(6)G1	0,76	0,76	0,00%	22	FA2G2S2	1,73	1,62	-6,41%
10	FA2B	2,76	2,83	2,46%	23	A2G2S2	0,93	0,87	-5,93%
11	A2(6)G1	1,29	1,41	9,57%	24	ismeretlen	0,57	0,00	-100,00%
12	A2(6)G1	1,30	1,25	-4,04%	25	ismeretlen	0,69	0,00	-100,00%
13	FA2	17,45	17,77	1,83%					

A hIgG1 minta esetén egyes struktúrák csúcsalatti területének aránya az összes csúcsterülethez képest jelentős mértékben változik. Nem lehet egyértelmű szabályszerűséget megállapítani, hogy mi alapján veszik el jobban egyik, vagy másik struktúra, de megfigyelhető, hogy a negatívan töltött sziálsavat tartalmazó struktúrák területszázaléka nagyobb arányban csökken a tisztítás során. Emellett a 24-gyel és 25-tel jelzett struktúrák a tisztítás során teljesen eltűnnek.

A tisztítási lépés a ribonukleáz B mintára kifejtett hatását a 20. ábra mutatja be.



20. ábra: A mágneses mikrogöngyökkel végzett tisztítási lépés vizsgálata ribonukleáz B mintán. A „b”, „c”, „d” és „e” elektroferogramjai az „a” elektroferogram migrációs idejére lettek normalizálva; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10 °C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. „a” elektroferogram: tisztítatlan minta; „b” elektroferogram: tisztított minta; „c” elektroferogram: első mosó eluens; „d” elektroferogram: második mosó eluens; „e” elektroferogram: harmadik mosó eluens.

A ribonukleáz B egyes struktúráinak tisztítás során végbemenő csúcsterület változásainak összegzése a 4. táblázatban láthatóak.

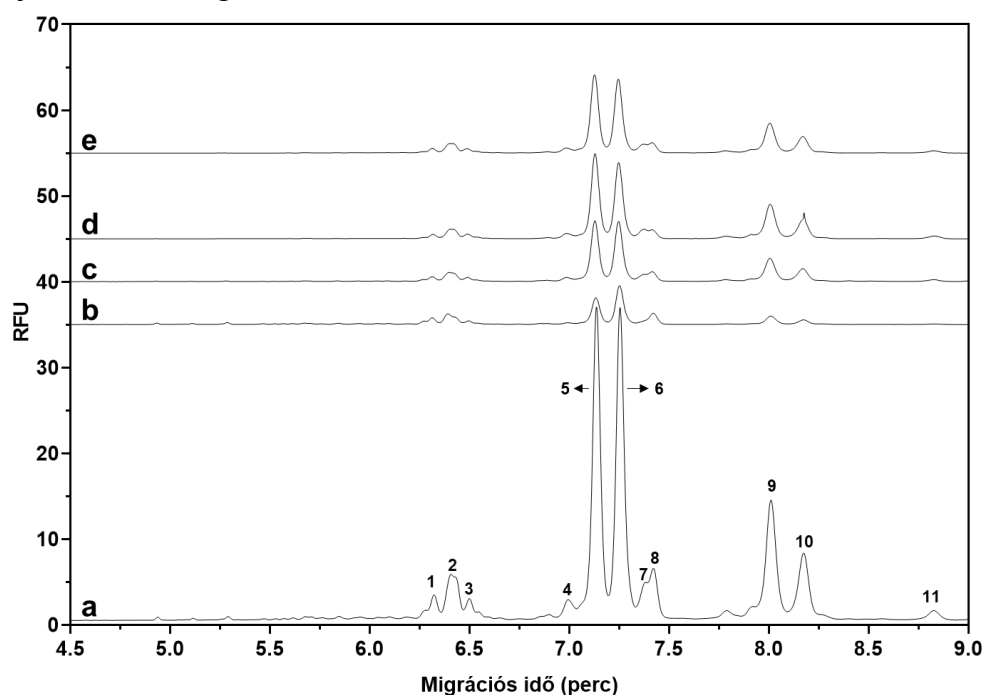
4. táblázat: A ribonukleáz B glikán struktúráinak területszázalékváltozása a tisztítási lépés során

Csúcs No.	Struktúra	Tisztítatlan (%Area)	Tisztított (%Area)	(%Area) változás
1	Man 9	9,86	8,24	-16,4%
2	Man 8c	14,25	12,92	-9,3%
3	Man 8b	1,10	1,02	-6,5%
4	Man 8a	1,99	1,98	-0,6%
5	Man 7c	2,35	2,29	-2,6%
6	Man 7b	1,78	1,77	-0,8%
7	Man 7a	2,39	2,28	-4,5%
8	Man 6	22,92	23,91	4,3%
9	Man 5	43,37	45,58	5,1%

A ribonukleáz B egy magasan mannozilált N-glikozilációjú fehérje, amely esetén a tisztítatlan és a tisztított elektroferogramok első pillantásra meglehetősen hasonlóknak tűntek (20. ábra, „a” és „b” elektroferogramok). Míg az első mosófolyadék („c” elektroferogram) a minta összes komponensének jelentős mennyiségét tartalmazta,

hasonló eloszlásban, mint a tisztítatlan minta, addig a második mosóoldat a nagyobb mannóz 8 és mannóz 9 komponensek irányába mutatott nagyon torz eltolódást (1. és 2. csúcs). Bár a harmadik mosófolyadék nem sok mintakomponenst tartalmazott, az első és a második mosófolyadék tartalma közötti különbség már elegendő volt a glikánprofil jelentős mértékű megváltoztatására, amint azt a 4. táblázatban szereplő csúcsértékek mutatják. Például a Man 9 szerkezetben a veszteség 16,4%-os volt, és a többi komponens esetében is különböző mértékű veszteségek voltak megfigyelhetők. Megállapítható tehát, hogy a tisztított profil nem a magas mannóz-tartalmú mintakomponensek eredeti mennyiségi eloszlását reprezentálta.

Az erősen szialilált fetuin N-glikánok szintén finom profilkülönbségeket mutattak, amelyeket nyilvánvalóan a tisztítási folyamat okozott, amint azt a 21. ábra mutatja az „a” és „b” jelű elektroferogramok összehasonlításával.



21. ábra: A mágneses mikrogyöngyökkel végzett tisztítási lépés vizsgálata fetuin mintán. A „b”, „c”, „d” és „e” elektroferogramjai az „a” elektroferogram migrációs idejére lettek normalizálva; CATRIS BGE; 40 cm teljes (30 cm effektív) hosszúságú, 30 μm belső átmérőjű BFS kapilláris; 20°C kapilláris, 10 °C mintatároló hőmérséklet; 1 psi 5 másodperc mintainjektálás; 30 kV fordított polaritású elválasztófeszültség. „a” elektroferogram: tisztítatlan minta; „b” elektroferogram: tisztított minta; „c” elektroferogram: első mosó eluens; „d” elektroferogram: második mosó eluens; „e” elektroferogram: harmadik mosó eluens.

A legszembetűnőbb, hogy a csúcsok területének aránya felcserélődött a két fő komponens, az A3G3S(3)2S(6)1 és az A3G3S(3)1S(6)2 között a tisztítási folyamat során. A mosófolyadékok elektroferogramjai (c-e) mind jelentős csúcs alatti terület százalék változást okozott a tisztított és a nem tisztított minta között (5. táblázat).

5. táblázat: A fetuin N-glikán struktúráinak területszázalék változása a tisztítási lépés során

Csúcs No.	Struktúra	Tisztítatlan (%Area)	Tisztított (%Area)	(%Area) változás
1	A3G3S(3)2 S(6)1	2.01	4.83	139.9%
2	A3G3S(3)1S(6)2	4.28	7.33	71.5%
3	A3G3S(6)3	1.97	2.59	31.7%
4	A3G3S(3)2 S(6)1	2.95	1.42	-51.8%
5	A3G3S(3)2S(6)1	28.63	22.96	-19.8%
6	A3G3S(3)1 S(6)2	29.87	33.37	11.7%
7	A3G3S(3)1 S(6)2	3.76	3.31	-12.0%
8	A3G3S(6)3	3.96	8.65	118.6%
9	A3G3S(3)2 S(6)2	13.90	8.97	-35.5%
10	A3G3S(3)1 S(6)3	7.90	4.76	-39.7%
11	A3G3S(3)2 S(6)3	0.78	0.23	-70.1%

Összességben elmondható, hogy kisebb oligoszacharidok felé irányuló mennyiségi profíleltolódás már a maltooligoszacharid létra analízisének is jól látható volt. Több, jól ismert glikoprotein (IgG, ribonukleáz B és fetuin) APTS-jelölt N-glikán profiljának elemzése során szintén nem várt minőségi és mennyiségi mintakomponens veszteségeket tártam fel a mosási lépések során. Szintén fontos megjegyezni, hogy a véletlenszerűen kiválasztott csúcsok százalékos területének átlagos standard eltérése három párhuzamos tisztítási lépéssel közel 4%RSD volt, ami viszonylag nagy reprodukálhatóságot jelent, ami az eredmények tükrében hamisan azt a látszatot keltheti, hogy a különböző minták esetén a nyert információ a valós képet mutatja [71].

5.4 Struktúra meghatározási módszer kidolgozása a CATRIS elválasztási módszerhez

5.4.1 Elvi háttér

A kromatográfiai módszerektől eltérően kapilláris elektroforézis esetén az adott struktúrák látszólagos migrációs idejei jelentős szórással rendelkezhetnek a vizsgálatok között akár egy adott elválasztási rendszeren belül is. Ez amiatt van, hogy az elektromigráció sebessége rendkívül érzékeny különböző paraméterekre (pl. kapilláris hossz, hőmérséklet, BGE pH és vezetőképesség, kapilláris belső falának állapota stb.), így a CE-vel történő glikánszerkezet meghatározása a struktúrák és különböző belső standardok migrációs idejeinek egymáshoz történő viszonyításával végezhető. Az irodalmi összefoglalóban bemutatott GU számítási módszer jól használható CGE analízis esetén, ugyanis a gélelektroforézis esetén az EOF nem játszik szerepet, így a látszólagos migrációs idők közvetlenül használhatóak a maltodextrin létracsúcsokhoz való „normáláshoz” akár már két belső standard felhasználásával is.

A CGE-vel (pl. HR-NCHO gél puffer) történő maltodextrin létra elválasztás esetén a létracsúcsok migrációs idejeinek arányai állandók egy adott rendszerben, ezt használják fel a GU érték meghatározásánál [61]. Ezen felül megfigyeltem, hogy ebben a rendszerben a DP8 - DP15 létracsúcsok polimerizációs fok értékei és migrációs idejei

közé $R^2 > 0,9999$ illeszkedéssel egyenes illeszthető az elválasztási paramétereiktől függetlenül.

A CATRIS módszer esetén a GU módszer nem alkalmazható, ugyanis a látszólagos mobilitás az effektív mobilitás és az EOF mobilitásának algebrai összegeként számítható ki, amelyet (a már korábban is feltüntetett) 5. egyenlet mutat be:

$$\mu_{lát} = \mu_{EOF} + \mu_{eff} \quad (5)$$

ahol $\mu_{lát}$ a látszólagos (mért) mobilitás, μ_{EOF} az EOF mobilitása és μ_{eff} az effektív mobilitás.

A mobilitás érték és a migrációs idő között fordított arányosság áll fent, és mivel csak a mobilitások egymáshoz viszonyított arányait elegendő a számoláshoz használni, így az egyszerűség kedvéért a mobilitást a migrációs érték reciprokaként adom meg a továbbiakban, nincs szükség a tényleges mobilitásértékek megadására (6. egyenlet).

$$\frac{1}{\mu_{lát}} \propto t_{lát} \quad (6)$$

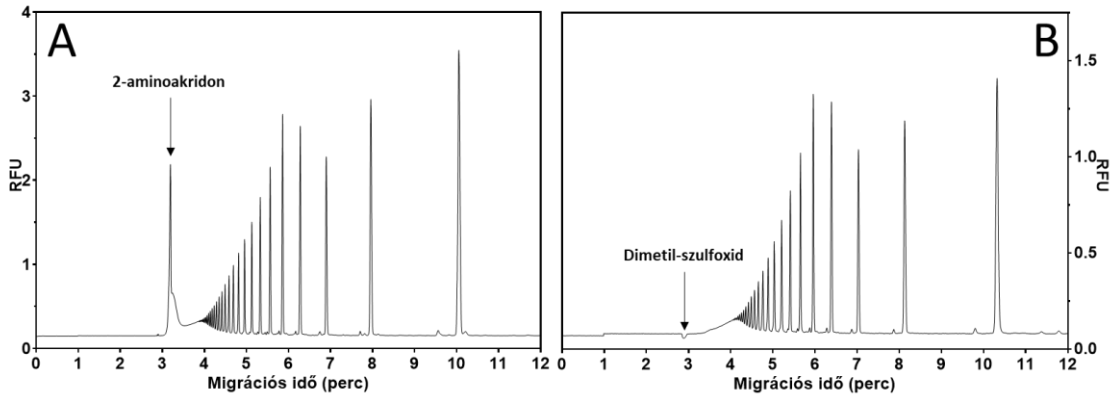
ahol a $\mu_{lát}$ a látszólagos mobilitás, a $t_{lát}$ pedig a látszólagos migrációs idő.

Az 5. és 6. egyenlet felhasználásával felírhatóak a mobilitásviszonyok a migrációs idők felhasználásával (7. egyenlet).

$$|t_{eff}| = - \left(\frac{1}{t_{lát}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right)^{-1} \quad (7)$$

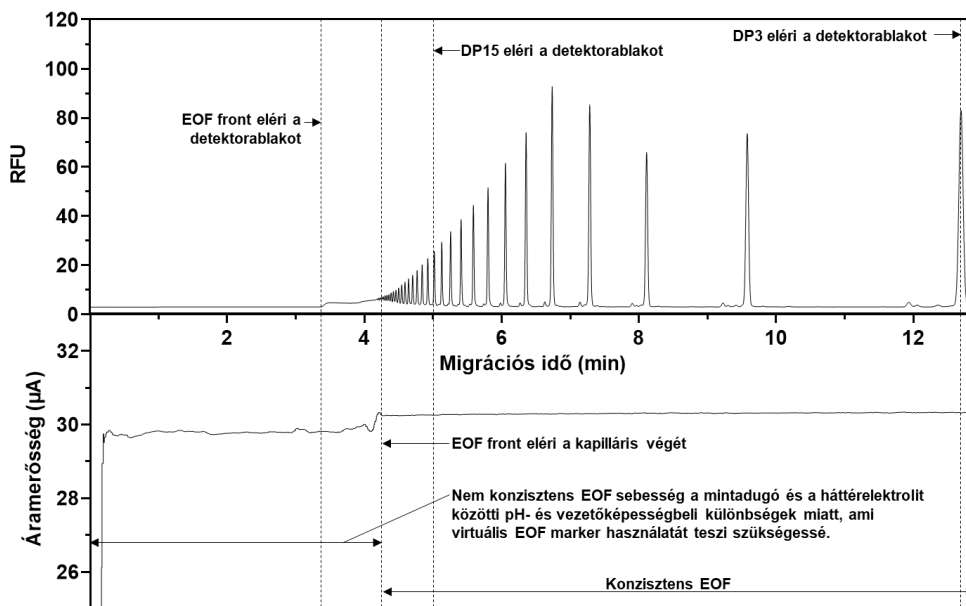
ahol a t_{eff} az effektív migrációs idő (ami az EOF-fel korrigált látszólagos migrációs idő); a $t_{lát}$ a látszólagos migrációs idő; a t_{EOF} az EOF migrációs ideje (az EOF front detektorablakig történő eljutásának ideje). Az abszolútérték használatára a jobb ábrázolhatóság miatt volt szükség.

A 7. egyenletet, valamint azt a megfigyelést felhasználva, hogy a CGE esetén a DP8-DP15 a polimerizációs fokok és migrációs idők közé lineáris illeszthető, feltételeztem, hogy ha a 7. egyenletből kiszámítom a CATRIS módszerrel mért maltodextrin létra $|t_{eff}^{DP8}|$ és $|t_{eff}^{DP15}|$ közötti értékeket, ezekre is illeszthető az előbb leírt módon egyenes. Ahhoz, hogy ezt megtegyem, meg kell határozni az EOF migrációs idejét, amit EOF markerekkel tehetünk meg. Ez olyan anyag lehet, amely (akár negatív, akár pozitív) jelet ad a detektorban, valamint nem rendelkezik töltéssel, így csak az EOF mozgatja a detektorablak felé. Ilyenek lehetnek pl. a 2-aminoakridon, amely töltéssel nem rendelkező fluoreszcens festék (22. ábra, „A” panel), valamint a dimetil-szulfoxid, amely szintén nem rendelkezik töltéssel, azonban a törésmutató megváltozása miatt negatív jelként detektálható (22. ábra, „B” panel).



22. ábra: Különböző EOF markerek CATRIS elválasztás esetén. A panel: 2-aminoakridon. B panel: dimetil-szulfoxid.

Az így kapott $|t_{eff}^{DP8}| - |t_{eff}^{DP15}|$ értékek közé azonban nem lehetett kellően nagy illeszkedésű egyenest illeszteni amiatt, mert amíg a mintadugó (amit az EOF a kapilláris kimeneti vége felé visz) nem hagyja el a kapillárist a kimeneti végen, addig a nem konzisztens vezetőképesség érték miatt az EOF sebessége nem konstans értékű. Ez azért probléma, mert a CATRIS rendszer esetén általában az EOF marker migrációs ideje kisebb, mint az az idő, amíg a mintadugó elhagyja a kapillárist (ami az áramgörbén megfigyelhető ugrásként jelenik meg). Ezt a jelenséget a 23. ábrán mutatom be.



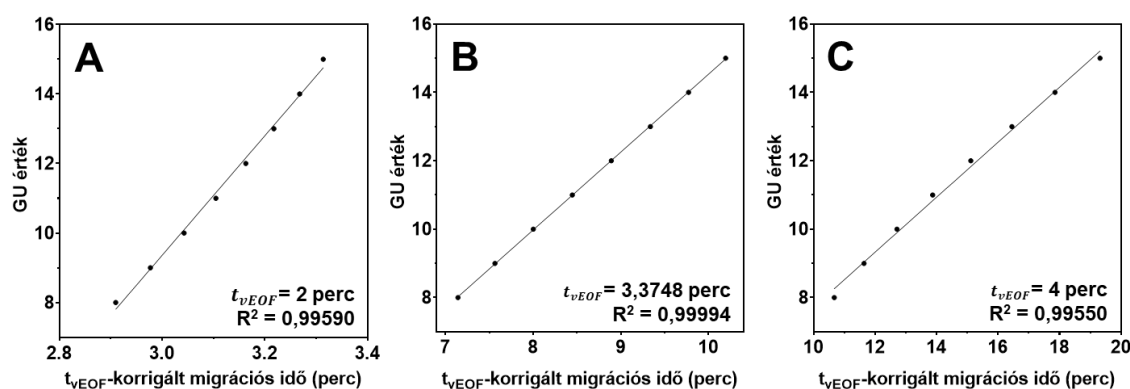
23. ábra: Az EOF marker használatának problémájának bemutatása CATRIS rendszer esetén. Az áramerősség görbén 4 perc után figyelhető meg a töréspont, amely a mintadugó kapillárist történő elhagyását jelzi.

A feltételezés, hogy a $|t_{eff}^{DP8}|$ és $|t_{eff}^{DP15}|$ közötti értékek közé a CATRIS rendszerben is illeszthető $R^2 > 0,9999$ illeszkedéssel egyenes, azt jelenti, hogy kell lennie olyan (virtuális) EOF értéknek, amely segítségével a 7. egyenlet felhasználásával olyan

$|t_{eff;v'}^{DP8}|$ és $|t_{eff;v'}^{DP15}|$ értékeket kapunk, amelyre teljesül az említett illeszkedés. (A tagokban a v' index azt jelöli, hogy az érték a 7. egyenlet szerint korrigálva van a t_{vEOF} értékkel.) A virtuális EOF marker migrációs idejének (t_{vEOF}) kiszámítását numerikus módszerrel végeztem, úgy, hogy a 8. egyenletbe (ami a 7. egyenlet átalakított formája) 0-tól $t_{lát}^{DP15}$ -ig milliszekundumos felbontással $t_{vEOF;MD}$ értékeket helyettesítettem, majd kapott 8 számpár ($|t_{eff;v'}^{DP(n)}|, n$); $n=8-15$ közé egyeneseket illesztve megkerestem a legnagyobb R^2 értéket adó t_{vEOF} értéket.

$$|t_{eff;v'}^{DP(n)}| = - \left(\frac{1}{t_{lát}^{DP(n)}} - \frac{1}{t_{vEOF;MD}} \right)^{-1} \quad (8)$$

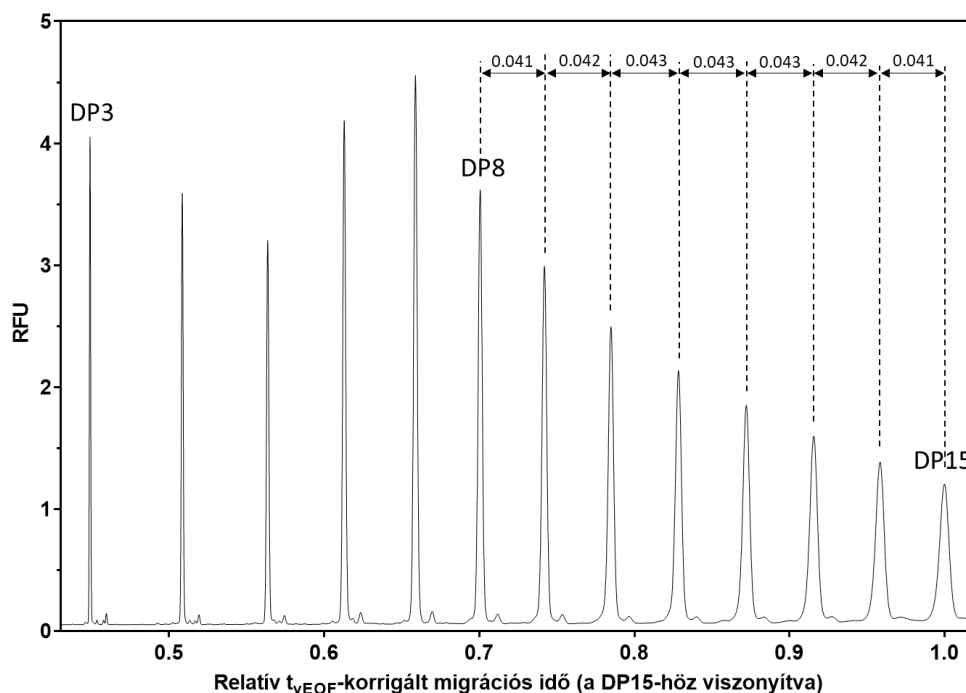
A 24. ábrán bemutatok egy példát, amelyen 3 behelyettesített értékre kapott illeszkedést mutatok be.



24. ábra: A t_{vEOF} -korrigált migrációs idők és a maltodextrin létra komponenseinek polimerizációs foka közötti illesztési példák különböző t_{vEOF} -értékekre. A panel: $t_{vEOF} = 2$ perc, $R^2 = 0,99590$. B panel: $t_{vEOF} = 3,3748$ perc, $R^2 = 0,99994$ (legjobb illeszkedés). C panel: $t_{vEOF} = 4$ perc, $R^2 = 0,99550$. A GU érték definíció szerint megegyezik a polimerizációs fokkal.

A 24. ábrán jól látszik, hogy van egyfajta tendencia a pontok egymáshoz viszonyított elhelyezkedésében. Kisebb behelyettesítési értékek esetén a pontok „konvexen” helyezkednek el („A” panel), majd a legjobb illeszkedést adó t_{vEOF} értéknél szinte tökéletesen egy vonalban („B” panel), majd ennél nagyobb behelyettesítési érték esetén „konkáv” alakban állnak a pontok („C” panel). Ebből vizuálisan is látszik, hogy mindig lehet találni egy maximális illeszkedést adó t_{vEOF} -értéket.

Ezzel a módszerrel, hasonlóan a HR-NCHO elválasztáshoz (ahol az effektív és a látszólagos mobilitások megegyeznek az EOF kiküszöbölése miatt), létre lehet hozni egy virtuális létrát, ahol a DP8-DP15 közötti tartományban az egymást követő létracsúcsok távolsága közel megegyezik. Egy CATRIS rendszerrel mért létra elektroferogramot lehet ábrázolni úgy, hogy annak minden x-tengely értékét behelyettesítjük a 8. egyenletbe, majd a kapott értékeket normáljuk a $|t_{eff;v'}^{DP(15)}|$ értékre, így nulla és egy közötti értékeket kapva. Ennek ábrázolását a 25. ábra mutatja be.



25. ábra: Egy CATRIS rendszerrel mért maltodextrin létra CE-LIF ábrázolása a 8. egyenlet szerint módosítva a DP15 csúcsra normálva.

A 25. ábrán láthatóak a DP8-D15 tartományban az egymást követő csúcsok közötti relatív t_{vEOFF} különbségek, amelyek szinte teljesen megegyeznek, ami vizualizálja a lineáris tartományt.

Abból kiindulva, hogy a HR-NCHO rendszerben a létracsúcsok migrációs idejeinek arányai állandóak, feltételezhető, hogy a 25. ábrán látható létracsúcsok relatív t_{vEOFF} -korrigált migrációs időarányai is állandóak lesznek egy adott rendszeren belül, amit felhasználtam az új GU számolási módszer kidolgozásánál.

Szembetűnő, hogy a 25. ábra DP3-DP8 közötti csúcsok nem lineárisan követik egymást, azonban $(|t_{eff;v'}^{DP(n)}|, n)$; $n=3-8$ pontokra másodfokú polinom illeszthető $R^2 > 0,9999$ értékkel. Az ok, ami miatt a DP8-nál nagyobb polimerizációs fokú maltodextrin struktúrák máshogy migrálnak, mint az annál kisebbek, az, hogy a nagyobb struktúrák helikális szerkezetet vesznek fel, ami miatt megváltozik a hidrodinamikai átmérőjük [60]. Ez megmutatkozik mind a HR-NCHO, mind a CATRIS módszer esetén is.

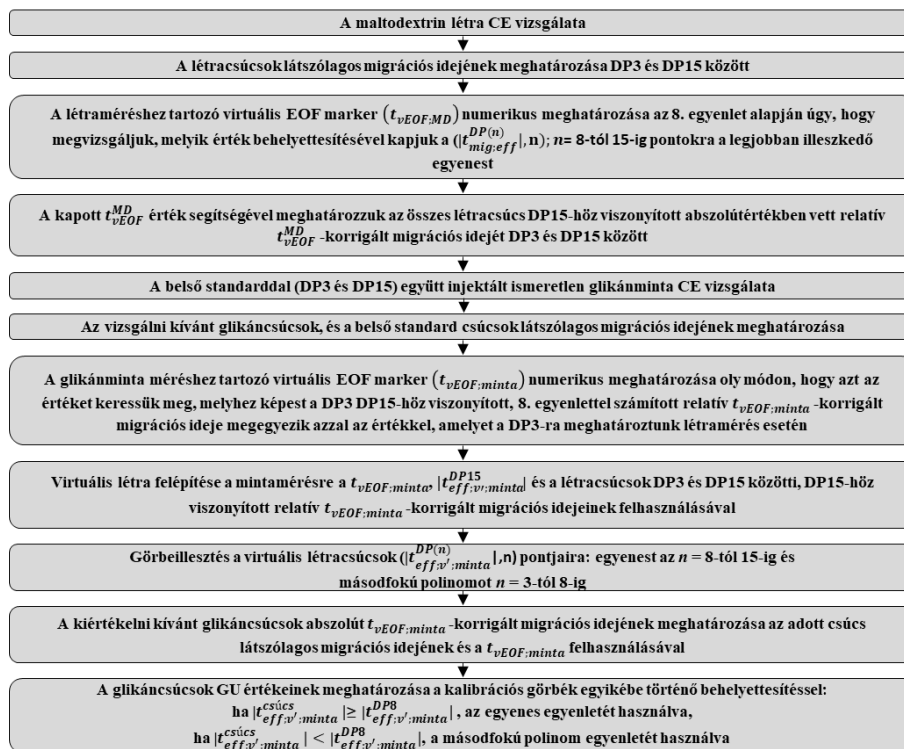
A valós glikánminta kiértékelése azon a megfigyelésen alapszik, hogy a létramérés során meghatározott $|t_{eff;v'}^{DP(n+1)}| / |t_{eff;v'}^{DP(n)}|$; $n=3-14$ arányok állandóak az adott mérési rendszerben. A mintamérésnek tartalmaznia kell belső standardként két maltodextrin létra struktúrát, a DP3-at, illetve a DP15-öt. A mintamérés során a $t_{vEOFF;mintá}$ értéket úgy lehet kiszámítani, hogy a belső standardok látszólagos migrációs idejeit behelyettesítjük a 9. egyenletbe, és numerikus kereséssel azt a $t_{vEOFF;mintá}$ értéket keressük meg, amelyre a $|t_{eff;v';mintá}^{DP15}| / |t_{eff;v';mintá}^{DP3}|$ megegyezik a létramérés kiértékelése során kapott

$\left| t_{eff;v';MD}^{DP15} \right| / \left| t_{eff;v';MD}^{DP3} \right|$ aránnyal. Az így meghatározott $t_{vEOF;minta}$ érték és a korábban meghatározott, állandónak vett $\left| t_{eff;v'}^{DP(n+1)} \right| / \left| t_{eff;v'}^{DP(n)} \right|$; $n=3-14$ arányok, valamint a belső standardok migrációs idejeinek felhasználásával a 9. egyenlet segítségével a mintamérésre egy virtuális létra állítható a DP3-DP15 tartományban. A virtuális létra $\left(\left| t_{eff;v';minta}^{DP(n)} \right|, n \right)$; $n=3-8$ közötti pontjaira másodfokú polinomot, illetve $n=8-15$ között egyenest illesztve megkapjuk a kalibrációs görbéket a GU érték meghatározásához. Egy ismeretlen mintacsúcs GU értékének meghatározása úgy történik, hogy a látszólagos migrációs idejét behelyettesítjük az 9. egyenletbe.

$$\left| t_{eff;v'}^{csúcs} \right| = - \left(\frac{1}{t_{lát}^{csúcs}} - \frac{1}{t_{vEOF;minta}} \right)^{-1} \quad (9)$$

A kapott $\left| t_{eff;v'}^{csúcs} \right|$ értéket ezután behelyettesítjük a kalibrációs görbék egyikébe:

az egyenes egyenletébe, ha $\left| t_{eff;v'}^{csúcs} \right| \geq \left| t_{eff;v';minta}^{DP8} \right|$, vagy a másodfokú polinomba, ha $\left| t_{eff;v'}^{csúcs} \right| < \left| t_{eff;v';minta}^{DP8} \right|$. A GU számítási algoritmus folyamatábráját a 26. ábra mutatja be [72].

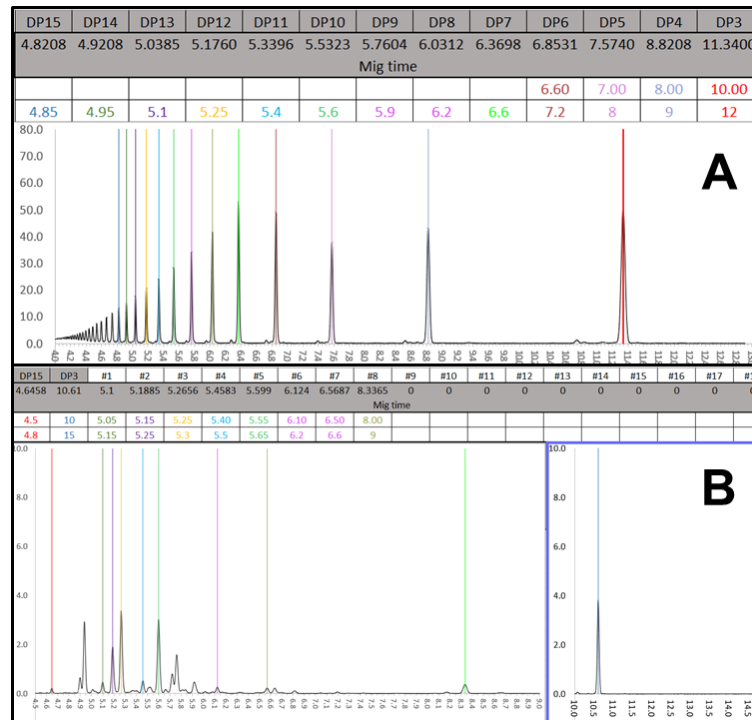


26. ábra: A GU számítási módszer folyamatábrája.

5.4.2 A GU számítási algoritmus implementálása Excel táblázatban

A GU számítási algoritmus automatizálását a Microsoft Excel programban végeztem. A csúcsok migrációs idejének meghatározására egy kvázi grafikus felületet hoztam létre, amelynél egy adott csúcs előtt és után kézzel meg lehet adni a keresési intervallumot,

amik között egy képlet megkeresi a maximum y-tengely értéket (az adott csúcs migrációs idejét), amelyet egy függőleges vonallal jelez is, segítve így a csúcsok kijelölését (27. ábra).



27. ábra: Az Excel táblázat létracsúcsok (A panel), valamint a (hIgG1) mintacsúcsok és belső standard csúcsok (B panel) migrációs idejét meghatározó grafikus felülete. A meghatározott migrációs idők függőleges vonallal vannak jelezve.

A grafikus felületekről származó migrációs időket alapul véve az Excel táblába implementált GU számítási algoritmus automatikusan kiszámítja a csúcsok GU értékeit (28. ábra).

DP	Mig time (min)	EOF front (min)	Max R ²	MD Best (min)	MD (min)	MD relative migration times	MD DPA/DP15 ratios	Best EOF calc	Best DP3/DP15 Sample (t-eff) ratios	Sample DP	Sample MD (min)	Sample Peak ID	Sample app mig time (min)	DP15	Slope	Cons.	a	b	c	Peak ID	Peak (t-eff)	Sample GU (DP15)	Sample GU (DP3-8)	Sample GU VALID
2	15	4.8208	0.98980136	0.0002	0.99947575	3.29880	10.35889474	1	0.447365471	-0.67087508	6	0.447359293	3.1929	15	10.20963234	DP15	4.4658			#1	8.539	11.200	11.637	11.200
3	14	4.9208	0.98980206	0.0004	DP3-8	9.52475844	0.58115943		-0.67083462	5.99955	14	9.782456615		14	2.26237	-8.11776	0.16409	0.02248	-0.51845	#2	8.301	10.643	10.976	10.663
4	13	5.0385	0.989803075	0.0006	0.999972909	9.4788456	0.915044209		-0.670803417	5.9999	13	9.34228392	#1	5.1						#3	8.111	10.213	10.460	10.213
5	12	5.176	0.98980345	0.0008		9.02787235	0.873490392		-0.670771373	5.99985	12	8.80759647	#2	5.1885						#4	7.693	8.267	8.566	8.267
6	11	5.3396	0.98980454	0.001		8.56972363	0.827281499		-0.670739129	5.9998	11	8.446239441	#3	5.2636						#5	7.430	8.691	8.767	8.691
7	10	5.5321	0.98980484	0.0012		8.118013019	0.783482384		-0.670707286	5.99975	10	7.999080138	#4	5.4283						#6	6.671	6.974	6.934	6.934
8	9	5.7604	0.98980553	0.0014		7.678426233	0.746487976		-0.670675444	5.9997	9	7.559959395	#5	5.5789						#7	6.213	5.938	5.925	5.925
9	8	6.0312	0.98980643	0.0016		7.217390005	0.698494618		-0.670643202	5.99965	8	7.13341517	#6	6.124						#8	5.175	3.590	3.992	3.992
10	7	6.3698	0.98980892	0.0018		6.80880922	0.654796994		-0.670611161	5.9996	7	6.70565826	#7	6.5687										
11	6	6.8031	0.98980882	0.002		6.32700269	0.615788366		-0.670579121	5.99955	6	6.225924671	#8	6.9345										
12	5	7.274	0.98980918	0.0022		5.84809817	0.564450316		-0.670547082	5.9995	5	5.70205308												
13	4	8.0208	0.989807701	0.0024		5.248549962	0.506477775		-0.670515043	5.99945	4	5.170951874												
14	3	11.34	0.989807771	0.0026		4.634211821	0.447385471		-0.670483005	5.9994	3	4.567373906												
15			0.98980824	0.0028					-0.670450967	5.99935														
16			0.98980871	0.003					-0.670418931	5.9993														
17			0.98980918	0.0032					-0.670386895	5.99925														
18			0.98980965	0.0034					-0.670354859	5.9992														
19			0.989810119	0.0036					-0.670322825	5.99915														
20			0.989810589	0.0038					-0.670290791	5.9991														
21			0.989811059	0.004					-0.670258758	5.99905														
22			0.989811529	0.0042					-0.670226725	5.999														
23			0.989811999	0.0044					-0.670194693	5.99895														
24			0.989812469	0.0046					-0.670162662	5.9989														
25			0.989812939	0.0048					-0.670130632	5.99885														
26			0.989813409	0.005					-0.670098602	5.9988														
27			0.989813879	0.0052					-0.670066573	5.99875														
28			0.989814349	0.0054					-0.670034544	5.9987														
29			0.989814819	0.0056					-0.670002517	5.99865														
30			0.989815289	0.0058					-0.66997049	5.9986														
31			0.989815759	0.006					-0.66993846	5.99855														

28. ábra: Az Excel táblázat GU számítási algoritmust végrehajtó felülete, amely teljesen automatizált, a migrációs időket a 27. ábrán látható felületekről exportálja (sárgával kiemelve), a csúcsok GU értékeit kékkel jelöltem.

5.4.3 A GU számítási módszer bemutatása egy példán keresztül

Első lépében meghatározzuk a maltodextrin létra elektroferogramján a DP15-DP3 létracsúcsok látszólagos migrációs idejeit (23. ábra felső elektroferogram, 6. táblázat).

6. táblázat: A maltodextrin létra komponenseinek látszólagos migrációs idejei

Létracsúcs	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
Migrációs idő (perc)	5,045	5,155	5,285	5,440	5,621	5,837	6,094	6,398	6,783	7,339	8,180	9,671	12,846

Ezután a DP15 és a DP8 közötti csúcsok látszólagos migrációs idejeit behelyettesítjük a 8. egyenletbe, majd a t_{vEOF} helyére 0-tól $t_{lát}^{DP(15)}$ -ig (5,045 perc) milliszekundumos felbontású behelyettesítéssel minden kapott 8 pontra illesztett egyenesek illeszkedései (R^2) közül megkeressük a legnagyobbat, és az ehhez tartozó $t_{vEOF;MD}$ értéket használjuk a további számítások során.

A 7. táblázatban illusztrálom a numerikus keresés három kiragadott pontját, melyek közül a középső $t_{vEOF;MD}$ érték adja a legjobb ($R^2=0,9999424$) illeszkedést, amit szürkével emeltem ki. A táblázatban a három pont további értékeket jelöl, amelyek nem lettek feltüntetve, mert a tényleges számuk több ezer lenne, amit nem lehet megjeleníteni hely hiányában.

7. táblázat: Példák a numerikus keresés során a 8. egyenlet alapján számított különböző $t_{vEOF;MD}$ legjobb illeszkedési értékeire.

$t_{vEOF;MD}$ (perc)	...	3,1378	...	3,37480	...	3,8320	...
Egyenes illeszkedés (R^2)	...	0,9996830	...	0,9999424	...	0,9980192	...

A meghatározott $t_{vEOF;MD}$ érték segítségével a DP15 és DP3 közötti létracsúcsokra ki lehet számítani azok $|t_{eff;v}^{DP(n)}|$ értékét a 8. egyenlet segítségével. A kapott értékeket a 8. táblázatban mutatom be.

8. táblázat: A maltodextrin létra komponenseinek számított $|t_{eff;v}^{DP(n)}|$ értékei a legjobb illeszkedést adó 3,3748 perces $t_{vEOF;MD}$ felhasználásával.

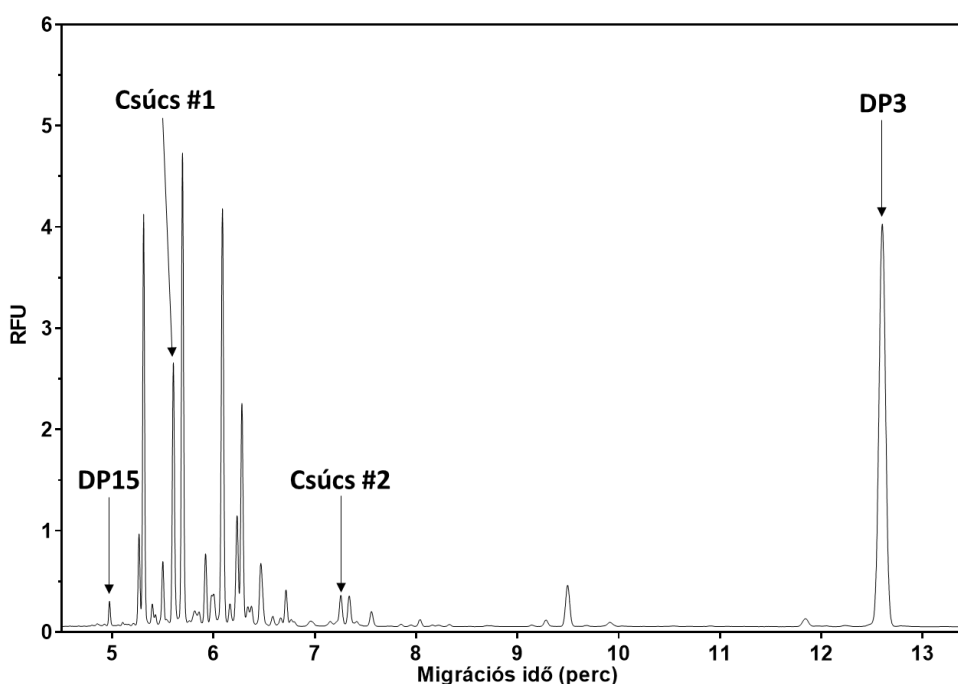
Létracsúcs (DP)	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
$ t_{eff;v}^{DP(n)} $ (perc)	10,195	9,772	9,336	8,891	8,446	8,001	7,564	7,142	6,716	6,248	5,745	5,184	4,577

A 8. táblázatban látható $|t_{eff;v}^{DP(n)}|$ értékeket a DP15-re normalizálva a 9. táblázatban látható értékeket kaptam (25. ábra).

9. táblázat: A létrakomponensek relatív $|t_{eff,v}^{DP(n)}|$ értékei a DP15-re normalizálva.

Létracsúcs (DP)	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
Relatív $ t_{eff,v}^{DP(n)} $	1,000	0,959	0,916	0,872	0,828	0,785	0,742	0,701	0,659	0,613	0,564	0,508	0,449

Ezután a vizsgálni kívánt elektroferogramról (ami jelen esetben egy DP15 és DP3 belső standard csúcsokat tartalmazó hIgG1 N-glikánprofil) meg kell határozni a vizsgálni kívánt csúcsok, és a belső standard csúcsok látszólagos migrációs idejét (29. ábra, 10. táblázat).



29. ábra: hIgG1 glikánprofil, feltüntetve a két kiválasztott kiértékelendő csúcs, valamint a belső standard csúcsok

10. táblázat: A két belső standard és a két véletlenszerűen kiválasztott csúcs látszólagos migrációs ideje a 29. ábrán.

Csúcs ID	DP15	Csúcs#1	Csúcs#2	DP3
Migrációs idő (min)	4,973	5,603	7,256	12,601

A maltodextrin létra és a hIgG1 minta mérése ugyanazon a rendszeren történt, emiatt a $|t_{eff,v}^{DP(3)}| / |t_{eff,v}^{DP(15)}|$ (9. táblázat, szürkén szedett érték, 0,449 perc) a két mérésben megegyezik, így a 9. egyenletet használva numerikus módszerrel meg lehet keresni azt a $t_{vEOF;minta}$ értéket, amelyre teljesül, hogy $|t_{eff,v';minta}^{DP(3)}| / |t_{eff,v';minta}^{DP(15)}| = |t_{eff,v';MD}^{DP(3)}| / |t_{eff,v';MD}^{DP(15)}|$. A

11. táblázatban néhány kiragadott példát mutatok be különböző behelyettesített $t_{vEOF;minta}$ értékek esetén kapott $|t_{eff;v';minta}^{DP(3)}| / |t_{eff;v';minta}^{DP(15)}|$ értékekre.

11. táblázat: Különböző $t_{vEOF;minta}$ értékekre kapott relatív $t_{vEOF;minta}$ -korrigált migrációs idők a DP3 esetén.

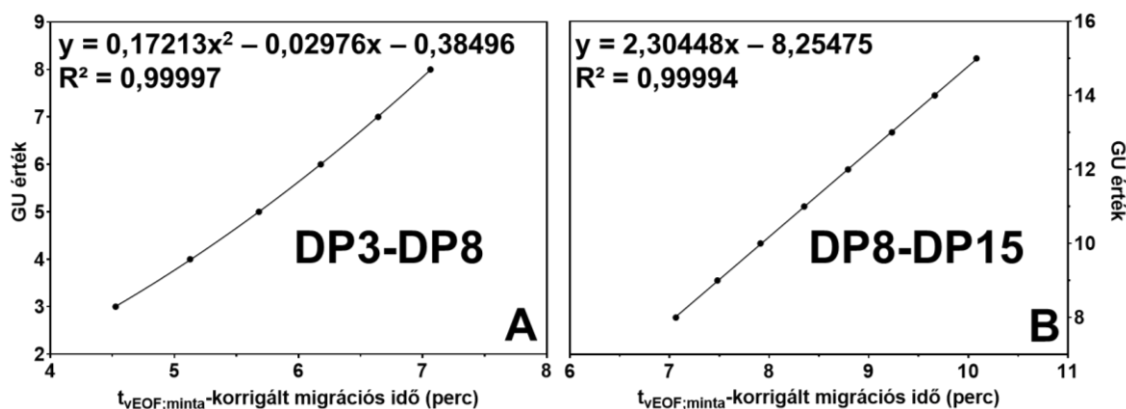
$t_{vEOF;minta}$	3,0931	3,3303	3,6835
$ t_{eff;v';minta}^{DP(3)} / t_{eff;v';minta}^{DP(15)} $	0,5010	0,4490	0,3664

Ezzel a lépéssel a $t_{vEOF;minta}$ értéket 3,3303 percben határoztam meg, amely a $|t_{eff;v';minta}^{DP(15)}|$ érték kiszámításához használható, ismét a 9. egyenlet alapján. Ezt és a DP3-DP15 közötti létracsúcsok (a 9. táblázatban felsorolt) relatív $|t_{eff;v';minta}^{DP(n)}|$ értékeit felhasználva a 12. táblázatban látható, mintamérésre vonatkozó virtuális létrát lehet létrehozni.

12. táblázat: A mintaméréshez tartozó virtuális létracsúcsok $t_{vEOF;minta}$ -korrigált migrációs idejei.

Létracsúcs (DP)	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
$ t_{eff;v';minta}^{DP(n)} $ (perc)	10,082	9,664	9,233	8,792	8,352	7,913	7,480	7,063	6,642	6,179	5,681	5,126	4,527

A GU számításhoz szükséges kalibrációs görbék létrehozásához a 12. táblázatban látható értékpárokat használtam fel: egyenest illeszttem a DP8-DP3 értékpárokra, illetve másodfokú polinom-ot a DP15-DP8 értékpárokra. A kapott kalibrációs görbéket a 30. ábra mutatja be.

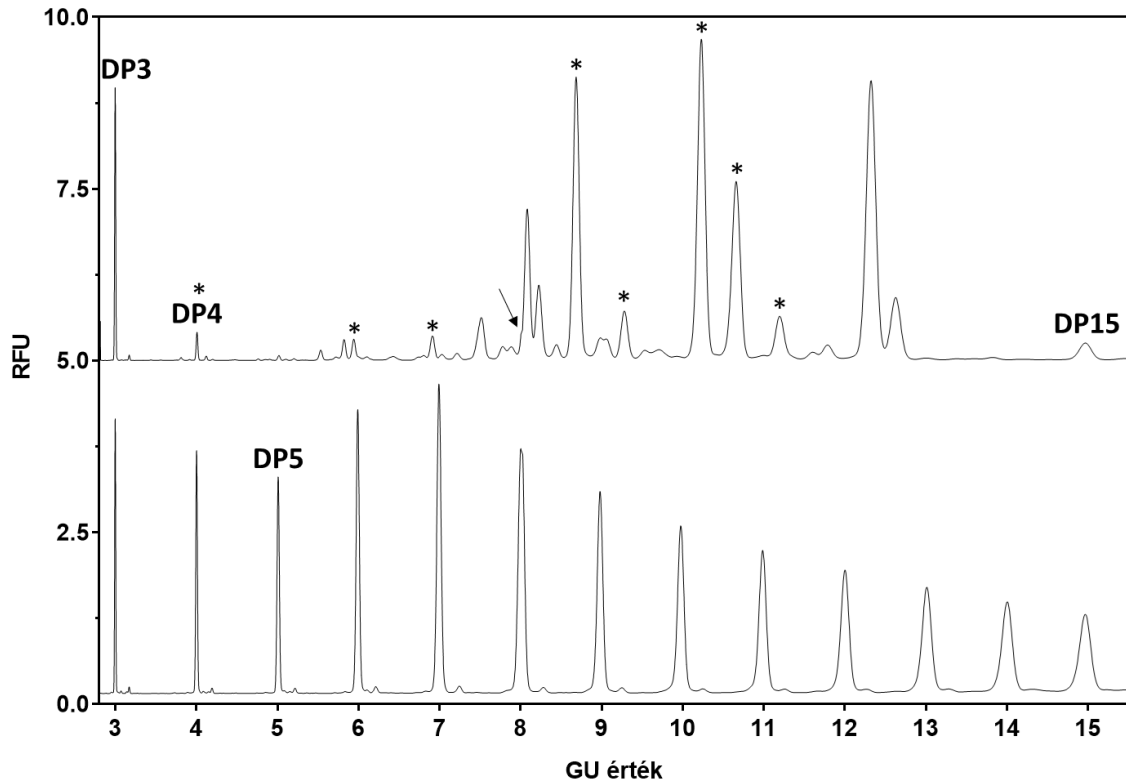


30. ábra: Kalibrációs görbék a GU számításhoz: A panel DP3-DP8. B panel: DP8-DP15.

Ahhoz, hogy megállapítsam, hogy egy ismeretlen mintacsúcs GU értékét melyik kalibrációs görbével tudom kiszámolni, meg kellett vizsgálnom, hogy az adott $|t_{eff;v'}^{csúcs}|$ hogyan viszonyul a $|t_{eff;v';minta}^{DP8}|$ (12. táblázat, szürkével szedett) értékhez. Abban az esetben, ha annál nagyobb, akkor a lineáris egyenletbe (pl. 29. ábra, csúcs#1), ha annál kisebb, akkor a másodfokú polinomba kell behelyettesíteni (pl. 29. ábra, csúcs#2). A GU

értékek a két struktúrára a következő lettek: $GU_{(\text{csúcs\#1})} = 10,665$, illetve $GU_{(\text{csúcs\#2})} = 5,953$.

A kalibrációs görbéket felhasználva lehetőség nyílik arra, hogy az elektroferogramokat GU érték szerint ábrázoljuk. Ez úgy lehetséges, hogy az elektroferogram minden pontját behelyettesítjük a fentebb leírt módon a megfelelő egyenletbe, majd ezt ábrázolva megkapjuk a GU szerinti ábrázolást (31. ábra).



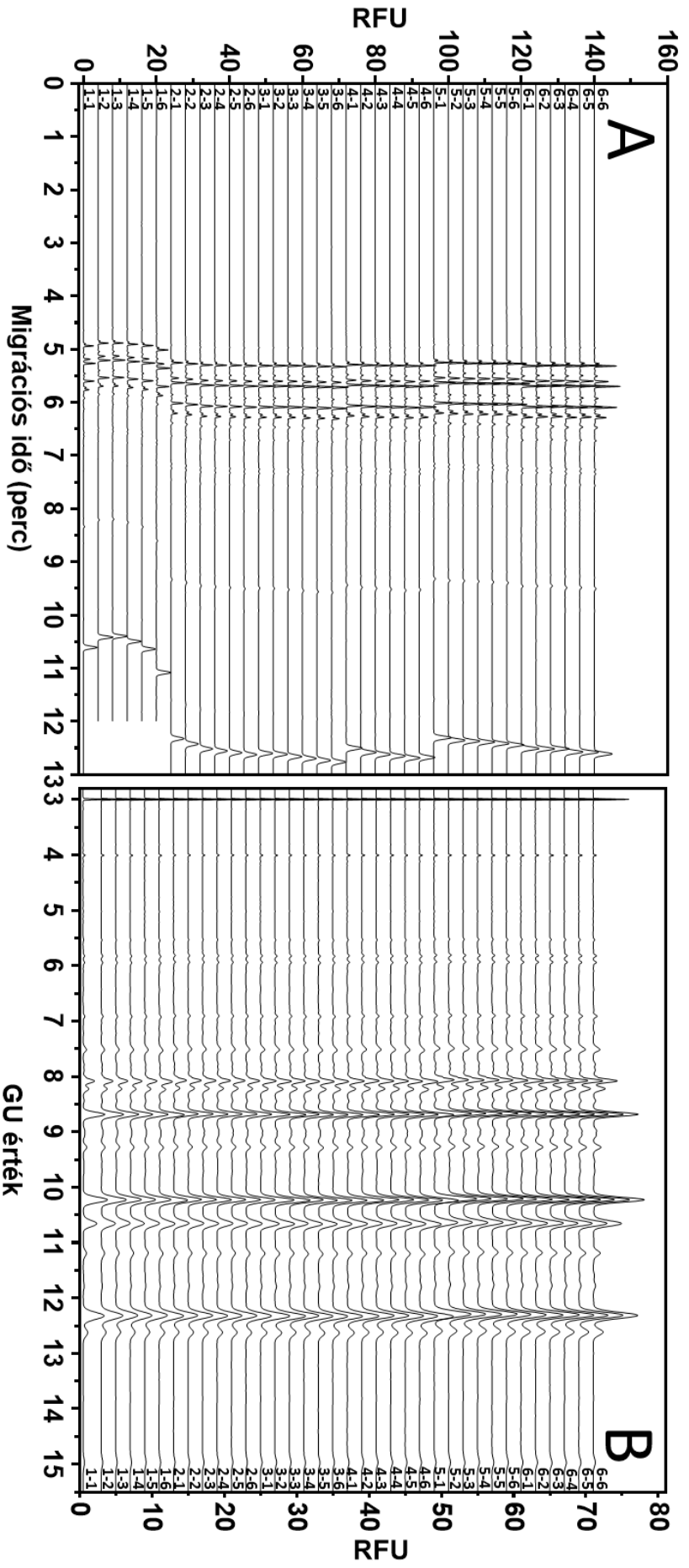
31. ábra: GU-értékre normalizált maltodextrin létrá (alsó elektroferogram) és hIgG1 N-glikán (felső elektroferogram) ábrázolása a GU számítási módszerrel. Az elektroferogram minden adatpontját beillesztettem a megfelelő egyenletbe, azaz lineárisba, ha az adatpont t_{vEOF} -korrigált migrációs ideje nagyobb volt, mint a DP8-é, és a másodfokú egyenletbe, ha kisebb. A létramérés kalibrációs görbéi nincsenek feltüntetve. A csillaggal jelölt struktúrákat a következő fejezetben használok robusztusság vizsgálatra, a nyíl a később leírt töréspontot mutatja be.

A 31. ábrán történő ábrázolásmód az elektroferogramok egymással történő könnyebb összehasonlíthatósága miatt hasznos, ugyanis a „nyers” elektroferogramok esetén egy adott struktúra látszólagos migrációs idejei mérések között (a korábban már említett tényezők miatt) nagyban eltérhetnek. A 31. ábrán a $GU=8$ értéknél látható, hogy a rendszer „függvényt vált”. Ez egy szinte alig észrevehető (nyíllal jelzett) törést jelent az elektroferogramban, amit a nem teljesen tökéletes görbe illeszkedésekből adódó hiba okoz. Ha nem lenne ilyen nagy mértékű a görbék illeszkedése, a töréspont sokkal jelentősebb lenne, és a GU számítási módszer hatékonysága is jelentősen csökkenne.

5.4.4 A GU számítási módszer robusztusságának vizsgálata

A számítási módszer robusztusságának vizsgálatát 40 centiméter teljes hosszúságú (30 centiméter effektív hosszúságú) kapillárisal végeztem. A méréseket 6 napon

keresztül végeztem, minden nap egy létramérést 6 hIgG1 mintamérés követett, így összesen 36 mérés GU értékeit hasonlítottam össze 8 kiválasztott struktúra esetén (7 db hIgG1 struktúra, illetve a DP4 struktúra, ami a DP3 belső standard szennyezőjeként megjelent csúcs). A 36 „nyers” elektroferogram („A” panel) és a hozzájuk tartozó elektroferogramok GU-ra normalizált ábrázolása („B” panel) a 32. ábrán láthatóak.



32. ábra. Hat napon keresztül napi hat belső standardokkal együtt injektált hlgG1 glikámminta elektroferogramjai. 30 cm effektív hosszúságú kapillaris segítségével (40 cm teljes hossz). Számozás: az elektroferogram első és második száma az adott napot, illetve az adott napon végzett mérés sorszámát jelöli. A panel: „nyers” elektroferogramok. B. panel: Az A panelen látható elektroferogramok a 31. ábrán leírtak szerinti ábrázolása.

A robusztusságvizsgálat legelső mérése előtt új kapillárist fűztem be, ami miatt a kapilláris fala eleinte nem volt teljesen kondicionált állapotban, ami a második napra már megvalósult. Emiatt az első napon (a gyorsabb EOF miatt) a migrációs idők jelentősen kisebbek, mint a későbbi napokon (32. ábra, „A” panel). Ennek ellenére a GU-normalizált ábrázoláson (32. ábra, „B” panel) az egyes csúcsok szinte tökéletesen egymás alatt helyezkednek el, ami mutatja a módszer kiemelkedő reprodukálhatóságát. A 8 kiválasztott glikán struktúrára számított GU értékek statisztikai adatait a 13. táblázatban mutatom be.

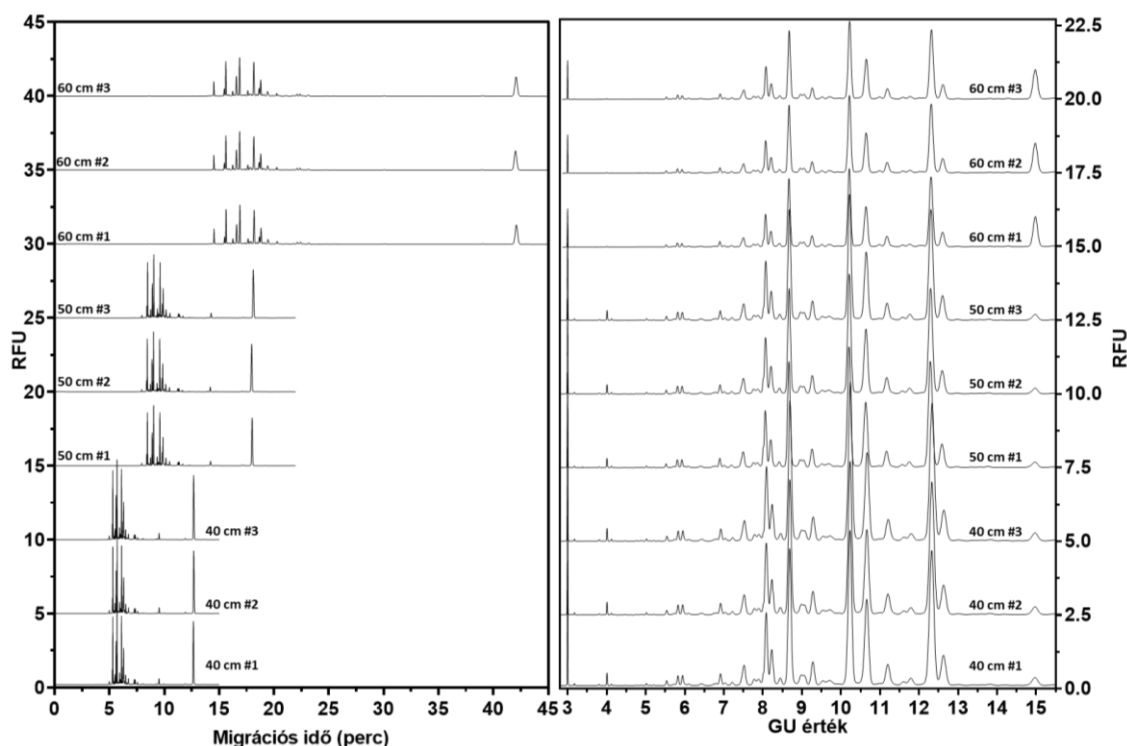
13. táblázat: Hét véletlenszerűen kiválasztott hIgG1 glikán struktúra és a DP4 (31. ábra csillaggal jelölt csúcsok) GU-értékeinek statisztikája a hat nap alatt végzett 36 mérés során.

Struktúra	Átlag (GU)	SD	%RSD
FA2(3)G1	11,196	0,012	0,103
FA2(6)G1	10,659	0,008	0,075
A2B(3)G1	10,229	0,008	0,076
FA2B	9,281	0,007	0,074
FA2	8,686	0,007	0,079
FA2(6)G1S1	6,931	0,007	0,098
FA2BG2S2	5,953	0,006	0,108
DP4	3,991	0,002	0,041

A 13. táblázatban látható statisztikai adatokból az látszik, hogy a GU értékek szórása rendkívül alacsony mindkét kalibrációs görbe esetén, így elmondható, hogy a módszer rendkívül robusztus a 32. ábra „A” panelén látható, nagy szórással rendelkező látszólagos migrációs idők ellenére is. A pontosságot a DP4 struktúra elméleti (GU=4,000), valamint a számított (GU=3,991) közötti mindössze 0,225%-os GU különbség mutatja.

5.4.5 A GU számítási módszer reprodukálhatóságának vizsgálata

A GU számítási módszer reprodukálhatóságát különböző hosszúságú (40; 50 és 60 cm teljes hosszúságú) kapillárisokon végeztem. Mindhárom hossz esetén egy létramérést három hIgG1 glikánminta mérése követte. (A 40 cm-es kapilláris esetén a mérések a 32. ábrán látható 6-1; 6-2 és 6-3 sorszámú elektroferogramok voltak.) A „nyers” elektroferogramok és a GU-normalizált ábrázolások a különböző hosszúságú kapillárisok esetén a 33. ábra mutatja be.



33. ábra: Hármás mérések különböző hosszúságú kapillárisok esetén belső standardokkal együtt injektált hIgG1 glikánmintára. A panel: „nyers” elektroferogramok. B panel: Az „A” panelen látható elektroferogramok a 31. ábrán leírtak szerinti ábrázolása.

A 31. ábrán látható csillaggal jelzett struktúrák összesítő GU érték statisztikája a különböző hosszúságú kapillárison mért hármás mérésekre a 14. táblázat mutatja be.

14. táblázat: A GU-értékek általános statisztikája 40 cm, 50 cm és 60 cm teljes hosszúságú kapilláris esetében, hármás mérésekre.

40 cm (n=3)				50 cm (n=3)				60 cm (n=3)			
Struktúra	Átlag	SD	%RSD	Struktúra	Átlag	SD	%RSD	Struktúra	Átlag	SD	%RSD
FA2(3)G1	11,188	0,003	0,029	FA2(3)G1	11,177	0,009	0,076	FA2(3)G1	11,185	0,007	0,058
FA2(6)G1	10,655	0,002	0,022	FA2(6)G1	10,643	0,008	0,071	FA2(6)G1	10,646	0,004	0,038
A2B(3)G1	10,225	0,003	0,026	A2B(3)G1	10,216	0,007	0,064	A2B(3)G1	10,218	0,003	0,030
FA2B	9,280	0,002	0,025	FA2B	9,267	0,004	0,044	FA2B	9,262	0,003	0,032
FA2	8,684	0,002	0,018	FA2	8,674	0,006	0,063	FA2	8,671	0,004	0,040
FA2(6)G1S1	6,928	0,001	0,014	FA2(6)G1S1	6,922	0,005	0,073	FA2(6)G1S1	6,919	0,004	0,058
FA2BG2S2	5,948	0,001	0,010	FA2BG2S2	5,942	0,005	0,076	FA2BG2S2	5,940	0,003	0,042
DP4	3,991	0,000	0,000	DP4	3,991	0,002	0,038	DP4	3,986	0,001	0,014

A 14. táblázatban látható átlagok szórásának átlagos szórása $\%RSD = 0,068$, ami mutatja, hogy számítási módszer az adott rendszertől függetlenül reprodukálható, és minden kapilláris hossz esetén külön-külön is kicsi a kapott GU értékek szórása.

5.4.6 GU számítási módszer vizsgálata DP4 és DP15 belső standardok használatával

Mivel az előző fejezetekben bemutatott elektroferogramokon megjelenik a DP4-es maltodextrin létra struktúra, így adta magát, hogy megvizsgáljam, milyen eredményt kapok, ha nem DP3 és DP15 a belső standard, hanem DP4 és DP15. Ebben az esetben a létramérés kiértékelése változatlan módon, DP3-DP15-ig történt, azonban a $t_{vEOF; minta}$ numerikus kereséséhez a $\frac{|t_{eff;v';minta}^{DP(4)}|}{|t_{eff;v';minta}^{DP(15)}|} = \frac{|t_{eff;v';MD}^{DP(4)}|}{|t_{eff;v';MD}^{DP(15)}|}$ teljesülését vettem alapul. A kalibrációs görbék illesztése, illetve a GU meghatározása az 5.4.1. fejezetben leírtak szerint történt. A számításhoz az előző fejezetben ismertetett 50 cm-es teljes hosszú kapillárison mért hármas mérést (és a hozzájuk tartozó létramérést) vettem alapul. A 7 db glikán struktúra (31. ábra csillaggal jelölt struktúrái a DP4 kivételével (ami jelen esetben az egyik belső standard csúcs) összesített GU statisztikáját, valamint viszonyításképpen ugyanezen mérésekhez tartozó, de DP3 és DP15 belső standardokat használó statisztikáját (14. táblázat középső oszlop) a 15. táblázat mutatja be.

15. táblázat: A GU-értékek általános statisztikája 50 cm hosszú kapilláris esetén, hármas mérésekkel, DP3 + DP15 (bal oldali panel) és DP4 + DP15 (jobb oldali panel) belső standardokat használó GU-számítással.

50 cm (n=3; DP3 + DP15)				50 cm (n=3; DP4 + DP15)			
Struktúra	Átlag	SD	%RSD	Struktúra	Átlag	SD	%RSD
FA2(3)G1	11,177	0,009	0,076	FA2(3)G1	11,172	0,007	0,065
FA2(6)G1	10,643	0,008	0,071	FA2(6)G1	10,639	0,006	0,058
A2B(3)G1	10,216	0,007	0,064	A2B(3)G1	10,211	0,005	0,052
FA2B	9,267	0,004	0,044	FA2B	9,262	0,003	0,030
FA2	8,674	0,006	0,063	FA2	8,668	0,004	0,047
FA2(6)G1S1	6,922	0,005	0,073	FA2(6)G1S1	6,915	0,003	0,043
FA2BG2S2	5,942	0,005	0,076	FA2BG2S2	5,936	0,003	0,044

A 15. táblázatban látható átlagok szórásának átlagos szórása 0,046 %RSD, ami mutatja, hogy a kétfajta, különböző belső standardokat használó számítás esetén a kapott GU értékek szinte megegyeznek. A DP4-et használó módszer előnye, hogy a mintaméréseket, amennyiben az összes érdekes csúcs látszólagos migrációs ideje kisebb, mint a DP4-é, elegendő a DP4-es csúcsetektálásig futtatni, ami ebben az adott esetben kb. 4,5 perccel rövidebb analízisidőt tesz lehetővé.

6 Összefoglalás

A fehérjékhez kötött N-glikán struktúrák minőségi és mennyiségi vizsgálata egyre nagyobb szerepet játszik különböző betegségek (pl. autoimmun, rák stb.) diagnosztikájában, valamint a fehérjealapú gyógyszerek gyártási hatékonyságának egy fontos indikátora. Ezeknek a nagy szerkezeti varianciát mutató molekuláknak az elválasztását gyakran kapilláris elektroforézissel (CE) végzik. Azonban a glikánok általánosságban nem rendelkeznek az elektroforézishez szükséges elektromos töltéssel, valamint abszorbancia alapon detektálható csoportokkal, így a CE-vel való vizsgálatukhoz gyakran töltött fluoreszcens festékekkel jelölik. A hagyományos kapilláris gélelektroforézissel történő vizsgálat előtt a nagy feleslegben adott, el nem reagált fluoreszcens festéket el kell távolítani a mintamátrixból, ugyanis az az analízist ezzel a módszerrel lehetetlenné teszi.

Munkám célja egy olyan újfajta, fluoreszcensen jelölt glikánok elválasztására szolgáló kapilláris elektroforézis módszer kidolgozása volt, amely esetén elhagyható a szabad festék eltávolítását célzó mintaelőkészítési lépés. Ehhez egy olyan pufferrendszert alakítottam ki, amely az elektroosztatikus áramlást használja az elválasztás során. A pufferkoncentrációt, a pH-t, és egyéb paramétereket úgy állítottam be, hogy a kapilláris kimeneti vége felé áramló EOF sebessége a jelölt glikánok és a szabad festék abszolútértékben vett (egyébként negatív előjelű) effektív mobilitásértékei közé essen, így a szabad festék az elválasztás kezdetén a kapilláris bemeneti részén elhagyja a rendszert, míg a jelölt glikánokat – azok pozitív irányú látszólagos mobilitásaik miatt – detektálni lehet. A kialakított pufferösszetétel 253 mM Tris bázis, 150 mM kapronsav, pH=8,1 lett. Ezzel megvalósítottam az on-line elektrokinetikus tisztítást, ami szükségtelessé teszi a szabad festék eltávolítását a mintaelőkészítési fázisban, amellyel sok erőforrás takarítható meg a vizsgálatok során. A kialakított rendszerrel ezenkívül megvalósítottam egy nagytérfogatú mintafelhalmozáson (LVSS) alapuló prekoncentrációs módszert, amivel egy nagyságrendnyi jelnövekedést értem el.

A létrehozott újfajta elválasztási módszert ezután felhasználtam arra, hogy vizsgáljam az iparban használt paramágneses mikrogyöngyökkel végzett mintatisztítási eljárás hatékonyságát. Megállapítottam, hogy különböző minták esetén (maltodextrin létra, humán immunoglobulin G, ribonukleáz b és fetuin glikánminták) a tisztítási lépés szignifikáns változást eredményezett egyes glikánstruktúrák mennyiségében, ami kritikus hibát okozhat a glikánprofil kiértékelése során, ugyanis a struktúrák mennyiségi arányaiból nyerhető információ torzul. Látszólag nincs tendencia arra, hogy melyik struktúrák mennyiségi aránya csökken az egyes minták esetében, így a mintatisztítás elhagyásának egy további előnye a valóságoshoz közelebb álló mennyiségi információk nyerése az N-glikán analízis során.

Az EOF vezérelt kapilláris elektroforézis módszerhez létrehoztam egy Glükóz Egységen (GU) alapú szerkezetmeghatározási módszert. Az algoritmus maltodextrin

létrát veszi alapul, valamint két belső standardot használ, amely két struktúra (maltotrióz (DP3) és maltodekapentaóz (DP15)) megtalálható a maltodextrin létrában is. A módszer azon alapszik, hogy az algoritmus numerikus módszerrel keres egy olyan „virtuális EOF” migrációs időt, amelyet (és egy, a disszertációban részletezett összefüggést) felhasználva a DP15-DP3 maltodextrin létracsúcsok „vEOF-korrigált” migrációs idejei közé illeszthető egyenesnek legjobb az illeszkedése. Azt állapítottam meg, hogy az így kapott „vEOF-korrigált” migrációs idők minden struktúrára egy adott elválasztási rendszerben állandók. Ezt felhasználva a mintamérés belső standarjainak migrációs idejeiből (egy újabb numerikus kereséssel) megkapható a mintamérésre vonatkozó „virtuális EOF” migrációs idő, amellyel a mintamérésre meg lehet alkotni a kalibrációs görbét, amelyeket aztán a GU számításra lehet felhasználni. A módszer robusztusságát 6 napon keresztül, napi 6 alkalommal mért humán immunglobulin G1 glikánminta 8 véletlenszerűen kiválasztott struktúrájának GU számításával végeztem, amely esetén a szórás %RSD < 0,1% volt. A módszer reprodukálhatóságát 3 különböző hosszúságú kapillárison végeztem ugyanezzel a mintával, hármas mérésekkel, amelyek esetében a 8 glikán struktúrára átlagosan szintén %RSD < 0,1% szórásértéket kaptam, amely rendkívül jónak mondható.

Tézispontok

1. Online elektrokinetikus tisztítást megvalósító kapilláris elektroforézis módszert dolgoztam ki APTS-jelölt glikánok nagy felbontású elválasztására, amely alkalmas olyan minták vizsgálatára, amelyek mintamátrixából előzőleg nem lett eltávolítva a nagy feleslegben adott fluoreszcens festék. Optimalizáltam az elválasztó háttér elektrolit összetételét és pH-ját, valamint az elválasztási paramétereket, majd bizonyítottam, hogy az iparban jelenleg használatos, tisztítási lépést kívánó kapilláris gélelektroforézis módszerhez összemérhető felbontást értem el a 253 mM Trisz-(hidroximetil)-aminometán - 150 mM kapronsav, pH=8,1 pufferrendszerrel felesleges festéktől meg nem tisztított minták esetén, emellett egy speciális, fókuszálással egybekötött nagy térfogatú mintafelhalmozással elődúsítást valósítottam meg, amellyel akár egy nagyságrendnyi jelintenzitás növekedés érhető el.

Farsang, R., Hogyor, K., Jarvas, G., & Guttman, A. (2023). Capillary zone electrophoresis of 8-aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonic acid labeled carbohydrates with online electrokinetic sample cleanup. *Analytical Chemistry*, 95(45), 16459-16464.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Method for purification free capillary electrophoresis of labeled carbohydrates; WO2025078849

2. A kifejlesztett kapilláris elektroforézis módszerrel igazoltam, hogy karboxilcsoportokat tartalmazó mágneses gyöngyökkel történő, az iparban alkalmazott mintatisztítási folyamat során bizonyos glikánstruktúrák mennyiségi aránya megváltozhat, ezáltal a minőségi információ torzulhat. A mintakomponensek arányát megvizsgáltam fetuin, humán immunglobulin G, ribonukleáz B, valamint maltodextrin létra tisztított, tisztítatlan, valamint a tisztítási lépés három eluensében, és bizonyítottam az csúcsarányváltozást.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Purification free N-glycan analysis by capillary zone electrophoresis: Hunt for the lost glycans. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238, 115812.

3. Újfajta megközelítéssel, numerikus módszert alkalmazó Glükóz Egység számítási módszert hoztam létre a kifejlesztett kapilláris elektroforézis technikára, ami a maltodextrin létra polimerizációs fokához viszonyítja az ismeretlen glikán struktúrák effektív migrációs idejét, ami alapján rendkívül nagy pontossággal és ismételhetőséggel, kapilláris hossz és minta vezetőképességtől függetlenül lehetséges azonosítani az analitokat. Hat napon keresztül napi hat humán immunoglobulin G1 N-glikánprofilal végzett vizsgálattal bizonyítottam az algoritmus ismételhetőségét, valamint 40 cm, 50 cm és 60 cm teljes hosszúságú

kapillárison történő 3-3 mérésel bizonyítottam a számítási módszer jó reprodukálhatóságát a kapillárisoszlop hosszától függetlenül.

Farsang, R., Farkas, A., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Glucose unit computation in capillary zone electrophoresis of carbohydrates using a numerical approximation based search for a virtual EOF marker. A tutorial. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 176, 117762.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Glucose unit determination based on a numeric virtual eof marker search method; WO2025141293A1

Theses

1. I have developed a capillary electrophoresis method for the high-resolution separation of APTS-labelled glycans by online electrokinetic purification, suitable for the analysis of samples from which the fluorescent dye has not been removed in large excess from the sample matrix. I have optimized the electrolyte composition and pH of the separation background and the separation parameters, and demonstrated comparable resolution to the capillary gel electrophoresis method currently used in industry, which requires a purification step, using 253 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane - 150 mM caproic acid, pH=8.1 buffer system for samples not cleaned from excess dye, and I have also achieved a special large volume sample stacking with focusing to achieve an increase in signal intensity of up to one order of magnitude.

Farsang, R., Hogyor, K., Jarvas, G., & Guttman, A. (2023). Capillary zone electrophoresis of 8-aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonic acid labeled carbohydrates with online electrokinetic sample cleanup. *Analytical Chemistry*, 95(45), 16459-16464.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Method for purification free capillary electrophoresis of labeled carbohydrates; WO2025078849

2. Using the developed capillary electrophoresis method, I have demonstrated that the sample purification process with magnetic beads containing carboxyl groups, as used in industry, can change the quantitative ratio of certain glycan structures, thus distorting the qualitative information. I examined the ratio of sample components in purified and unpurified fetuin, human immunoglobulin G, ribonuclease B, and maltodextrin ladder, as well as in three eluents of the purification step, and demonstrated peak ratio changes.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Purification free N-glycan analysis by capillary zone electrophoresis: Hunt for the lost glycans. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238, 115812.

3. Using a novel approach, a numerical method for calculating Glucose Units has been developed for the capillary electrophoresis technique, which relates the effective migration time of unknown glycan structures to the degree of polymerization of the maltodextrin ladder, allowing the identification of analytes with very high accuracy and repeatability, independent of capillary length and sample conductivity. I have demonstrated the repeatability of the algorithm by testing six human immunoglobulin G1 N-glycan profiles per day for six days and by 3-3 measurements on capillary lengths of 40 cm, 50 cm and 60 cm total lengths

to demonstrate the good reproducibility of the calculation method regardless of capillary column length.

Farsang, R., Farkas, A., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Glucose unit computation in capillary zone electrophoresis of carbohydrates using a numerical approximation based search for a virtual EOF marker. A tutorial. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 176, 117762.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Glucose unit determination based on a numeric virtual eof marker search method; WO2025141293A1

Publikációk

Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

Szabadalom

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Method for purification free capillary electrophoresis of labeled carbohydrates; WO2025078849

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Glucose Unit determination based on a numeric virtual EOF marker search method; WO2025141293A1

Tudományos cikkek

Farsang, R., Hogyor, K., Jarvas, G., & Guttman, A. (2023). Capillary zone electrophoresis of 8-aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonic acid labeled carbohydrates with online electrokinetic sample cleanup. *Analytical Chemistry*, 95(45), 16459-16464.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Purification free N-glycan analysis by capillary zone electrophoresis: Hunt for the lost glycans. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238, 115812.

Farsang, R., Farkas, A., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Glucose unit computation in capillary zone electrophoresis of carbohydrates using a numerical approximation based search for a virtual EOF marker. A tutorial. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 176, 117762.

Az értekezés tématerületét érintő publikációk

Szabadalom

Kovács, N., **Farsang, R.**, Szigeti, M., Jarvas, G., & Jankovics, H.; Tagged exoglycosidase enzymes and immobilized glycan sequencing approach; US20240417708A1

Tudományos cikkek

Farsang, R., Kovacs, Z., Jarvas, G., & Guttman, A. (2022). Ultrahigh-sensitivity capillary electrophoresis analysis of trace amounts of nitrate and nitrite in environmental water samples. *Separations*, 9(11), 333.

Kovacs, N., **Farsang, R.**, Szigeti, M., Vonderviszt, F., & Jankovics, H. (2022). Enhanced recombinant protein production of soluble, highly active and immobilizable PNGase F. *Molecular Biotechnology*, 64(8), 914-918.

Filep, C., Szigeti, M., **Farsang, R.**, Haberger, M., Reusch, D., & Guttman, A. (2021). Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities. *Analytica Chimica Acta*, 1166, 338492.

Szabo, M., Sarkozy, D., Szigeti, M., **Farsang, R.**, Kardos, Z., Kozma, A., ... & Guttman, A. (2022). Introduction of a capillary gel electrophoresis-based workflow for biotherapeutics characterization: size, charge, and N-glycosylation variant analysis of bamlanivimab, an anti-SARS-CoV-2 product. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 839374.

Farsang, R., Kovacs, N., Szigeti, M., Jankovics, H., Vonderviszt, F., & Guttman, A. (2022). Immobilized exoglycosidase matrix mediated solid phase glycan sequencing. *Analytica Chimica Acta*, 1215, 339906.

Sarkozy, D., **Farsang, R.**, Szigeti, M., Austin, S., Lock, S., & Guttman, A. (2023). Capillary electrophoresis analysis of industrial galactooligosaccharides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 233, 115434.

Torok, R., Auer, F., **Farsang, R.**, Jona, E., Jarvas, G., & Guttman, A. (2022). The effect of sample glucose content on PNGase F-mediated N-glycan release analyzed by capillary electrophoresis. *Molecules*, 27(23), 8192.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Guttman András professzornak**, valamint **Járvás Gábornak**, akik szakmai segítségükkel és folyamatos támogatásukkal lehetővé tették a disszertáció megszületését.

Köszönöm **Reider Baláznak** és **Szigeti Mártonnak**, hogy pályám elején irányba állítottak, és megszerettették velem a kutatói munkát.

Hálás vagyok **Auer Felícianak**, **Hogyor Kingának**, **Bokrossy-Csiba Máriának** és **Török Rebekának**, akik mindig segítettek, amikor szükségem volt rá.

Köszönöm feleségemnek, **Farsang-Brenner Andreának** a szeretetet, türelmet és a támogatást, amit irányomba tanúsított.

Köszönöm a testvéremnek, **Farsang Evelinnek**, hogy mutatta az utat, amit követhetek, illetve **Édesanyámnak** és **Édesapámnak**, akik mindig mellettem álltak.

Köszönöm a **Rörge** tagjainak, hogy segítettek levezetni a feszültséget.

Hivatkozások

- [1] A. Shrivastava, S. Joshi, A. Guttman, and A. S. Rathore, "N-Glycosylation of monoclonal antibody therapeutics: A comprehensive review on significance and characterization," *Anal Chim Acta*, vol. 1209, p. 339828, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339828>.
- [2] H.-J. Gabius, "The sugar code: Why glycans are so important," *Biosystems*, vol. 164, pp. 102–111, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.07.003>.
- [3] S. Shanker, L. Hu, S. Ramani, R. L. Atmar, M. K. Estes, and B. V Venkataram Prasad, "Structural features of glycan recognition among viral pathogens," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 44, pp. 211–218, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.05.007>.
- [4] M. J. Kailemia, D. Park, and C. B. Lebrilla, "Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer," *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, no. 2, pp. 395–410, 2017, doi: [10.1007/s00216-016-9880-6](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9880-6).
- [5] A. L. Tarentino, C. M. Gomez, and T. H. Jr. Plummer, "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F," *Biochemistry*, vol. 24, no. 17, pp. 4665–4671, Aug. 1985, doi: [10.1021/bi00338a028](https://doi.org/10.1021/bi00338a028).
- [6] G. Y. Wiederschain, "Essentials of glycobiology," 2009, *Springer Nature BV*.
- [7] X. Yu, M. J. E. Marshall, M. S. Cragg, and M. Crispin, "Improving Antibody-Based Cancer Therapeutics Through Glycan Engineering," *BioDrugs*, vol. 31, no. 3, pp. 151–166, 2017, doi: [10.1007/s40259-017-0223-8](https://doi.org/10.1007/s40259-017-0223-8).
- [8] J. Batra and A. S. Rathore, "Glycosylation of monoclonal antibody products: Current status and future prospects," *Biotechnol Prog*, vol. 32, no. 5, pp. 1091–1102, Sep. 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.2366>.
- [9] A. Shalhan, R. Guijt, and M. Breadmore, "Capillary Electrophoresis: Basic Principles," in *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*, J. A. Siegel, P. J. Saukko, and M. M. Houck, Eds., Waltham: Academic Press, 2013, pp. 549–559. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00241-5>.
- [10] M. Jimidar, "Chapter 17 Electromigration methods: origins, principles, and applications," in *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 47, S. Ahuja and N. Jespersen, Eds., Elsevier, 2006, pp. 575–623. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(06\)47017-3](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(06)47017-3).
- [11] J. W. Jorgenson and K. DeArman. Lukacs, "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries," *Anal Chem*, vol. 53, no. 8, pp. 1298–1302, Jul. 1981, doi: [10.1021/ac00231a037](https://doi.org/10.1021/ac00231a037).
- [12] B. Gaš and E. Kenndler, "System zones in capillary zone electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 23–24, pp. 3901–3912, Dec. 2004, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200406159>.
- [13] L. Hajba, S. Jeong, D. S. Chung, and A. Guttman, "Capillary Gel Electrophoresis of Proteins: Historical overview and recent advances," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 162, p. 117024, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117024>.

- [14] S. El Deeb, M. A. Iriban, and R. Gust, "MEKC as a powerful growing analytical technique," *Electrophoresis*, vol. 32, no. 1, pp. 166–183, Jan. 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.201000398>.
- [15] F. Kilár, "Recent applications of capillary isoelectric focusing," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 22–23, pp. 3908–3916, Dec. 2003, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200305650>.
- [16] Z. Malá and P. Gebauer, "Recent progress in analytical capillary isotachopheresis (2018 - March 2022)," *J Chromatogr A*, vol. 1677, p. 463337, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463337>.
- [17] K. D. Bartle and P. Myers, "Theory of capillary electrochromatography," *J Chromatogr A*, vol. 916, no. 1, pp. 3–23, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00709-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00709-9).
- [18] W. Mäntele and E. Deniz, "UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 173, pp. 965–968, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>.
- [19] A. Mainka and K. Bächmann, "UV detection of derivatized carbonyl compounds in rain samples in capillary electrophoresis using sample stacking and a Z-shaped flow cell," *J Chromatogr A*, vol. 767, no. 1, pp. 241–247, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00012-5).
- [20] A. T. Timperman, Karim. Khatib, and J. V Sweedler, "Wavelength-Resolved Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis," *Anal Chem*, vol. 67, no. 1, pp. 139–144, Jan. 1995, doi: [10.1021/ac00097a022](https://doi.org/10.1021/ac00097a022).
- [21] W. G. Kuhr and E. S. Yeung, "Indirect fluorescence detection of native amino acids in capillary zone electrophoresis," *Anal Chem*, vol. 60, no. 17, pp. 1832–1834, Sep. 1988, doi: [10.1021/ac00168a038](https://doi.org/10.1021/ac00168a038).
- [22] C. Haber, I. Silvestri, S. Rösli, and W. Simon, "Potentiometric Detector for Capillary Zone Electrophoresis: Kolumne," *Chimia (Aarau)*, vol. 45, no. 4, p. 117, doi: [10.2533/chimia.1991.117](https://doi.org/10.2533/chimia.1991.117).
- [23] Xiaohua. Huang, T. K. J. Pang, M. J. Gordon, and R. N. Zare, "On-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis," *Anal Chem*, vol. 59, no. 23, pp. 2747–2749, Dec. 1987, doi: [10.1021/ac00150a004](https://doi.org/10.1021/ac00150a004).
- [24] X. Huang, M. J. Gordon, and R. N. Zare, "Quantitation of Li⁺ in serum by capillary zone electrophoresis with an on-column conductivity detector," *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 425, pp. 385–390, 1988.
- [25] M. J. Gordon, X. Huang, S. L. Pentoney, and R. N. Zare, "Capillary Electrophoresis," *Science (1979)*, vol. 242, no. 4876, pp. 224–228, Oct. 1988, doi: [10.1126/science.242.4876.224](https://doi.org/10.1126/science.242.4876.224).
- [26] R. J. Reay, R. Dadoo, C. W. Stormont, R. N. Zare, and G. T. A. Kovacs, "Microfabricated electrochemical detector for capillary electrophoresis," in *Proceedings of the solid-state sensor and actuator workshop*, 1994, pp. 61–64.
- [27] R. A. Wallingford and A. G. Ewing, "Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection in 12.7. mu. m diameter columns," *Anal Chem*, vol. 60, no. 18, pp. 1972–1975, 1988.

- [28] R. A. Wallingford and A. G. Ewing, "Retention of ionic and non-ionic catechols in capillary zone electrophoresis with micellar solutions," *J Chromatogr A*, vol. 441, no. 2, pp. 299–309, 1988.
- [29] R. A. Wallingford and A. G. Ewing, "Amperometric detection of catechols in capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions," *Anal Chem*, vol. 60, no. 3, pp. 258–263, 1988.
- [30] A. G. Ewing, J. M. Mesáros, and P. F. Gavin, "Electrochemical detection in microcolumn separations," *Anal Chem*, vol. 66, no. 9, pp. 527A–537A, 1994.
- [31] T. J. O'Shea, S. M. Lunte, and W. R. LaCourse, "Detection of carbohydrates by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection," *Anal Chem*, vol. 65, no. 7, pp. 948–951, 1993.
- [32] K. D. Altria, "Fundamentals of capillary electrophoresis theory," in *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*, Springer, 1996, pp. 3–13.
- [33] Y. Y. Rawjee, R. L. Williams, and Gyula. Vigh, "Efficiency Optimization in Capillary Electrophoretic Chiral Separations Using Dynamic Mobility Matching," *Anal Chem*, vol. 66, no. 21, pp. 3777–3781, Nov. 1994, doi: 10.1021/ac00093a038.
- [34] M. Horká *et al.*, "Capillary electrophoresis in a fused-silica capillary with surface roughness gradient," *J Sep Sci*, vol. 39, no. 19, pp. 3827–3834, 2016.
- [35] A. Alizadeh, W. Hsu, M. Wang, and H. Daiguji, "Electroosmotic flow: From microfluidics to nanofluidics," *Electrophoresis*, vol. 42, no. 7–8, pp. 834–868, 2021.
- [36] Y. Chen, W. Lü, X. Chen, and M. Teng, "Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis," *Central European Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 3, pp. 611–638, 2012.
- [37] D. M. Osbourn, D. J. Weiss, and C. E. Lunte, "On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 21, no. 14, pp. 2768–2779, Aug. 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20000801\)21:14<2768::AID-ELPS2768>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20000801)21:14<2768::AID-ELPS2768>3.0.CO;2-P).
- [38] S. Dziomba, P. Kowalski, and T. Bączek, "Field-amplified sample stacking–sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis," *J Chromatogr A*, vol. 1267, pp. 224–230, 2012.
- [39] P. Li, W. Zhao, X. Wang, G. Shi, and T. Zhou, "Stacking and simultaneous determination of estrogens in water samples by CE with electrochemical detection," *J Sep Sci*, vol. 36, no. 2, pp. 334–340, Jan. 2013, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201200412>.
- [40] A. Šlampová, Z. Malá, and P. Gebauer, "Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2016–2018)," *Electrophoresis*, vol. 40, no. 1, pp. 40–54, 2019.
- [41] W. Alahmad, A. Sahragard, and P. Varanusupakul, "Online and offline preconcentration techniques on paper-based analytical devices for ultrasensitive chemical and biochemical analysis: A review," *Biosens Bioelectron*, vol. 194, p. 113574, 2021.
- [42] G. Islas, J. A. Rodriguez, I. Perez-Silva, J. M. Miranda, and I. S. Ibarra, "Solid-phase extraction and large-volume sample stacking-capillary electrophoresis for determination

- of tetracycline residues in milk,” *J Anal Methods Chem*, vol. 2018, no. 1, p. 5394527, 2018.
- [43] A. Šlampová, Z. Malá, P. Gebauer, and P. Boček, “Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2014–2016),” *Electrophoresis*, vol. 38, no. 1, pp. 20–32, 2017.
- [44] Z. K. Shihabi, “Stacking in capillary zone electrophoresis,” *J Chromatogr A*, vol. 902, no. 1, pp. 107–117, 2000.
- [45] M. Pieckowski, P. Kowalski, and T. Bączek, “Combination of large volume sample stacking with polarity switching and cyclodextrin electrokinetic chromatography (LVSS-PS-CDEKC) for the determination of selected preservatives in pharmaceuticals,” *Talanta*, vol. 211, p. 120673, 2020.
- [46] D.-S. Lian, S.-J. Zhao, J. Li, and B.-L. Li, “Progress in stacking techniques based on field amplification of capillary electrophoresis,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 406, no. 25, pp. 6129–6150, 2014, doi: 10.1007/s00216-014-8062-7.
- [47] T. He, Z. Xu, and J. Ren, “Pressure-assisted electrokinetic injection stacking for seven typical antibiotics in waters to achieve µg/L level analysis by capillary electrophoresis with UV detection,” *Microchemical Journal*, vol. 146, pp. 1295–1300, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.057>.
- [48] G. Zhu, L. Sun, and N. J. Dovichi, “Dynamic pH junction preconcentration in capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for proteomics analysis,” *Analyst*, vol. 141, no. 18, pp. 5216–5220, 2016.
- [49] J. Jaafar, Z. Irwan, R. Ahamad, S. Terabe, T. Ikegami, and N. Tanaka, “Online preconcentration of arsenic compounds by dynamic pH junction-capillary electrophoresis,” *J Sep Sci*, vol. 30, no. 3, pp. 391–398, 2007.
- [50] P. Meng, Y. Wang, and L. Meng, “pH-mediated stacking in capillary electrophoresis for analysis of opiates in saliva,” *Analytical Methods*, vol. 4, no. 11, pp. 3695–3700, 2012.
- [51] S. D. Arnett and C. E. Lunte, “Enhanced pH-mediated stacking of anions for CE incorporating a dynamic pH junction,” *Electrophoresis*, vol. 28, no. 20, pp. 3786–3793, 2007.
- [52] Z. A. AlOthman, M. Dawod, J. Kim, and D. S. Chung, “Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review,” *Anal Chim Acta*, vol. 739, pp. 14–24, 2012.
- [53] J. P. Quirino and S. Terabe, “Exceeding 5000-Fold Concentration of Dilute Analytes in Micellar Electrokinetic Chromatography,” *Science (1979)*, vol. 282, no. 5388, pp. 465–468, Oct. 1998, doi: 10.1126/science.282.5388.465.
- [54] A. T. Aranas, A. M. Guidote Jr, and J. P. Quirino, “Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 394, no. 1, pp. 175–185, 2009.
- [55] Z. Sharrett *et al.*, “Exploring the use of APTS as a fluorescent reporter dye for continuous glucose sensing,” *Org Biomol Chem*, vol. 7, no. 7, pp. 1461–1470, 2009.
- [56] L. R. Ruhaak *et al.*, “Optimized Workflow for Preparation of APTS-Labeled N-Glycans Allowing High-Throughput Analysis of Human Plasma Glycomes using 48-Channel

- Multiplexed CGE-LIF,” *J Proteome Res*, vol. 9, no. 12, pp. 6655–6664, Dec. 2010, doi: 10.1021/pr100802f.
- [57] C. Váradi, C. Lew, and A. Guttman, “Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies,” *Anal Chem*, vol. 86, no. 12, pp. 5682–5687, 2014.
- [58] E. Kováts, “Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone,” *Helv Chim Acta*, vol. 41, no. 7, pp. 1915–1932, Jan. 1958, doi: <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>.
- [59] A. Guttman and C. Starr, “Capillary and slab gel electrophoresis profiling of oligosaccharides,” *Electrophoresis*, vol. 16, no. 1, pp. 993–997, Jan. 1995, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.11501601165>.
- [60] S. Mittermayr and A. Guttman, “Influence of molecular configuration and conformation on the electromigration of oligosaccharides in narrow bore capillaries,” *Electrophoresis*, vol. 33, no. 6, pp. 1000–1007, 2012.
- [61] G. Jarvas, M. Szigeti, J. Chapman, and A. Guttman, “Triple-internal standard based glycan structural assignment method for capillary electrophoresis analysis of carbohydrates,” *Anal Chem*, vol. 88, no. 23, pp. 11364–11367, 2016.
- [62] G. Jarvas, M. Szigeti, M. P. Campbell, and A. Guttman, “Expanding the capillary electrophoresis-based glucose unit database of the GUcal app,” *Glycobiology*, vol. 30, no. 6, pp. 362–364, 2020.
- [63] M. Szigeti and A. Guttman, “Automated N-glycosylation sequencing of biopharmaceuticals by capillary electrophoresis,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 11663, 2017.
- [64] X. Zhong, Z. Chen, S. Snovida, Y. Liu, J. C. Rogers, and L. Li, “Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Quantitative Analysis of Glycans Labeled with Multiplex Carbonyl-Reactive Tandem Mass Tags,” *Anal Chem*, vol. 87, no. 13, pp. 6527–6534, Jul. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b01835.
- [65] C. M. Snyder, X. Zhou, J. A. Karty, B. R. Fonslow, M. V Novotny, and S. C. Jacobson, “Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct structural identification of serum N-glycans,” *J Chromatogr A*, vol. 1523, pp. 127–139, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.009>.
- [66] A.-L. Marie, S. Ray, and A. R. Ivanov, “Highly-sensitive label-free deep profiling of N-glycans released from biomedically-relevant samples,” *Nat Commun*, vol. 14, no. 1, p. 1618, 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37365-4.
- [67] N. Kovács, R. Farsang, M. Szigeti, F. Vonderviszt, and H. Jankovics, “Enhanced recombinant protein production of soluble, highly active and immobilizable PNGase F,” *Mol Biotechnol*, vol. 64, no. 8, pp. 914–918, 2022.
- [68] B. Reider, M. Szigeti, and A. Guttman, “Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination,” *Talanta*, vol. 185, pp. 365–369, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.101>.
- [69] Y. Li, R. Xiang, C. Horváth, and J. A. Wilkins, “Capillary electrochromatography of peptides on a neutral porous monolith with annular electroosmotic flow generation,”

Electrophoresis, vol. 25, no. 4–5, pp. 545–553, Feb. 2004, doi:
<https://doi.org/10.1002/elps.200305767>.

- [70] R. Farsang, K. Hogyor, G. Jarvas, and A. Guttman, “Capillary Zone Electrophoresis of 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic Acid Labeled Carbohydrates with Online Electrokinetic Sample Cleanup,” *Anal Chem*, vol. 95, no. 45, pp. 16459–16464, Nov. 2023, doi: 10.1021/acs.analchem.3c03714.
- [71] R. Farsang, G. Jarvas, and A. Guttman, “Purification free N-glycan analysis by capillary zone electrophoresis: Hunt for the lost glycans,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 238, p. 115812, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115812>.
- [72] R. Farsang, A. Farkas, G. Jarvas, and A. Guttman, “Glucose unit computation in capillary zone electrophoresis of carbohydrates using a numerical approximation based search for a virtual EOF marker. A tutorial,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 176, p. 117762, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117762>.