

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Tereza Hlavsová

ANALÝZA A CHARAKTERIZACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH
PEPTIDŮ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

Analysis and characterization of antimicrobial peptides by
capillary electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

RNDr. Václav Kašička, CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a AV0Z40550506.

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

V Praze dne

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli-specialistovi, RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., a školiteli-garantovi, Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D., za možnost pracovat v Laboratoři elektromigračních metod Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., a za odborné vedení při vypracování této práce, poskytnutí konzultací a za cenné rady a konstruktivní připomínky k textu.

Poděkování patří celému kolektivu Laboratoře elektromigračních metod za poskytnutí dobrého pracovního zázemí.

Mé poděkování patří také mé rodině za podporu během studia.

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) s UV-fotometrickou detekcí při vlnové délce 206 nm byla využita pro stanovení stupně chemické čistoty, meze detekce a meze stanovitelnosti antimikrobiálního kationického peptidu halictinu a jeho 25 analogů. Halictin a jeho analogy byly charakterizovány efektivními elektroforetickými pohyblivostmi korigovanými na 25 °C v několika kyselých základních elektrolytech. Separace směsí strukturně blízkých analog halictinu byly provedeny metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Nejvyšších hodnot separační účinnosti, až $2,36 \cdot 10^5$ teoretických pater na metr délky kapiláry, bylo dosaženo metodou CZE v základním elektrolytu obsahujícím 30 mM kyselinu fosforečnou, 25 mM Tris a přídavek kationického tenzidu 0,4 mM didodecyldimethylamoniumbromidu (DDAB), pH 2,85. Nejvyšší hodnoty rozlišení CZE separací peptidů byly nalezeny v základním elektrolytu složeném z 30 mM kyseliny fosforečné, 25 mM Tris s přídavkem 0,4 mM DDAB a 0,1 % (m/v) hydroxyethylcelulosity, pH 2,84.

Předmětová slova: separační metody, kapilární elektromigrační metody, antimikrobiální peptidy

Klíčová slova: kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, analogy halictinu

Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) with UV-photometric detection at 206 nm was used for the determination of degree of chemical purity, limit of detection and limit of quantitation of antimicrobial cationic peptide halictine and its 25 analogs. Halictine and its analogs were characterized by their effective electrophoretic mobilities corrected to reference temperature 25 °C in several acidic background electrolytes. Separations of mixtures of structurally related analogs of halictine were performed by capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). The highest values of separation efficiency, up to $2.36 \cdot 10^5$ theoretical plates per meter, were achieved by CZE in the background electrolyte containing 30 mM phosphoric acid, 25 mM Tris and additive of cationic surfactant 0.4 mM didodecyldimethylammonium bromide (DDAB), pH 2.85. The highest values of resolution of CZE separations of peptides were found in background electrolyte composed of 30 mM phosphoric acid, 25 mM Tris, 0.4 mM DDAB and 0.1 % (m/v) hydroxyethylcellulose, pH 2,84.

Subject words: separation methods, capillary electromigration methods, antimicrobial peptides

Key words: capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, analogs of halictine

Seznam použitých zkratk

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
AcOH	kyselina octová
BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CEKC	kapilární elektrokinetická chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DDAB	didodecyldimethylamoniumbromid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTAC	dodecyltrimethylamoniumchlorid
ECD	elektrochemická detekce
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
HAL	halictin
HEC	hydroxyethylcelulosa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDAA	kyselina iminodioctová
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MHEC	methylhydroxyethylcelulosa
MHPC	methylhydroxypropylcelulosa

MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Phe	fenylalanin
SDS	dodecylsulfát sodný
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TP	teoretické patro
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialový

Seznam symbolů

A_c	korigovaná plocha píku
A_{206}	absorbance při 206 nm
c	molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
c_{eff}	efektivní molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
D	difúzní koeficient ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
E	intenzita elektrického pole ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$)
F_e	elektrická síla (N)
F_f	frikční síla (N)
H	výškový ekvivalent teoretického patra
I	elektrický proud (A)
k	směrnice přímky
L	délka kapiláry (m)
L_{eff}	efektivní délka kapiláry (m)
L_{tot}	celková délka kapiláry (m)
m	elektroforetická pohyblivost ($\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
m_{eff}	efektivní elektroforetická pohyblivost ($\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
$m_{eff,25}$	efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C ($\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
m_{eof}	elektroosmotická pohyblivost ($\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Δm	rozdíl pohyblivostí
\bar{m}	průměrná pohyblivost ($\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	šum (V)
N	počet teoretických pater
\bar{N}	průměrný počet teoretických pater
P	rozptýlený elektrický výkon ($\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$)
P_{CA}	stupeň čistoty (%)
pI	izoelektrický bod
q	počet elementárních nábojů
Q	náboj (C)
Q_J	Jouleovo teplo

r	poloměr iontu (m)
R	korelační koeficient
R_{BGE}	elektrický odpor základního elektrolytu při daném příkonu (Ω)
$R_{BGE,0}$	elektrický odpor základního elektrolytu při nízkém příkonu (Ω)
R_D	napěťová odezva detektoru (V)
R_S	rozlišení
S	plocha průřezu kapiláry (m^2)
S_D	citlivost detektoru ($V \cdot mol^{-1} \cdot dm^3$)
t	čas (s)
t_{eof}	migrační čas markeru elektroosmotického toku (s)
t_{mig}	migrační čas analytu (s)
T	teplota ($^{\circ}C$)
ΔT	přírůstek teploty ($^{\circ}C$)
U	separační napětí (V)
w	šířka píku
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky píku
η	viskozita prostředí ($N \cdot m^{-2} \cdot s$)
κ	měrná vodivost ($\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$)
σ^2	rozptyl
v	migrační rychlost látky v elektrickém poli ($m \cdot s^{-1}$)

Obsah

1. Úvod	12
2. Výzkumné cíle	14
3. Teoretická část	15
3.1. Elektroforetická pohyblivost	15
3.2. Elektroosmotický tok	16
3.3. Disperzní vlivy.....	17
3.3.1. Jouleovo teplo.....	17
3.3.2. Elektromigrační disperze	19
3.3.3. Difúze	19
3.3.4. Adsorpce na stěnu kapiláry	20
3.4. Separační účinnost	20
3.5. Rozlišení	21
3.6. Kapilární elektromigrační metody	22
3.6.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	22
3.6.2. Kapilární izotachoforéza (CITP).....	24
3.6.3. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).....	24
3.6.4. Kapilární afinitní elektroforéza (ACE).....	25
3.6.5. Kapilární gelová elektroforéza (CGE).....	25
3.6.6. Kapilární elektrokinetická chromatografie (EKC)	26
3.6.7. Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	27
4. Analýza peptidů kapilární elektroforézou	28
5. Antimikrobiální peptidy	30
6. Experimentální část	32
6.1. Chemikálie	32
6.2. Úprava vzorků.....	32
6.3. Přístrojové vybavení	34
7. Výsledky a diskuze	35

7.1.	Analýza a charakterizace analog halictinu	35
7.1.1.	Složení základních elektrolytů	35
7.1.2.	Stanovení stupně čistoty a separační účinnosti	38
7.1.3.	Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti	46
7.1.4.	Korekce efektivních elektroforetických pohyblivostí na referenční teplotu 25 °C.....	49
7.1.5.	Stanovení efektivní elektroforetické pohyblivosti	50
7.1.6.	Odhad modelu struktury peptidu.....	54
7.2.	Separace analog halictinu.....	56
8.	Závěr	60
9.	Použitá literatura	61

1. Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je moderní vysokoúčinnou separační technikou, ve které je separace založena na rozdílných rychlostech pohybu iontů v kapalném prostředí v elektrickém poli.

Kapilární elektromigrační metody jsou pro svou vysokou separační účinnost, která dosahuje stovek tisíc až milionů teoretických pater, a citlivost, jež je na úrovni femtomol – zeptomol (10^{-15} – 10^{-21} mol) analytu v nano- až pikolitrových objemech analyzovaných vzorků, považovány za nejúčinnější, nejcitlivější a také perspektivní analytické separační metody. Stále více se stávají uznávaným protějškem resp. doplňkem dosud nejrozšířenějších separačních metod, různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [1].

Již v 19. století byly prováděny první experimenty ve skleněných U-trubicích, které daly vznik elektromigračním separačním metodám. Vznik elektroforézy jako analytické separační techniky je datován do roku 1937, kdy švédský chemik Tiselius zjistil, že směsi proteinů umístěné v trubici s pufrem působením elektrického pole migrují na základě jejich různých nábojů a velikostí různými rychlostmi a na tomto principu je lze od sebe oddělit. V roce 1948 získal Tiselius Nobelovu cenu za svou práci v separačních metodách [2,3].

Od roku 1960 byly v elektromigračních technikách používány trubice s vnitřním průměrem 2-5 mm. Švédský biochemik Hjertén zkoumal zónovou elektroforézu a používal rotující trubice s vnitřním průměrem 1-3 mm [2,4]. Trubice byly postupně nahrazeny kapilárami, u kterých docházelo také ke snižování vnitřního průměru. První elektromigrační metodou v kapilárním formátu byla izotachoforéza, která byla nejčastěji prováděna v teflonových kapilárách o průměru 0,3-0,5 mm [5]. Skleněnou resp. křemennou kapiláru s vnitřním průměrem 75 μm použili pro separaci různých iontů (aminokyselin, peptidů, aminů) zónovou elektroforézou Jorgenson a Lukacsová. Svou prací demonstrovali vysoké rozlišení a vysokou účinnost separace, která byla v porovnání s rozšířenou kapalinovou chromatografií do té doby nevídaná [6,7].

V dalších letech začaly být v kapilárním formátu realizovány i další významné separační principy jako je izoelektrická fokusace [8], afinitní elektroforéza [9], elektrokinetická chromatografie [10,11] a elektrochromatografie [12,13].

Možnosti aplikací elektromigračních metod jsou v současné době velmi rozsáhlé. Využití je jak pro analýzy malých iontů a molekul jako jsou anorganické [14,15] a organické ionty [16,17], aminokyseliny [18–21], tak pro analýzu středně velkých a velkých makromolekul, jako jsou nukleosidy [22–24], nukleotidy [22,25,26], fragmenty nukleových kyselin [27], peptidy [28,29], proteiny [30,31] a polysacharidy [32]. Nejúspěšnější aplikací kapilární elektroforézy jak po stránce vědecké, tak i komerční je sekvenování kyseliny deoxyribonuklové, DNA [27,33–35], včetně sekvenace lidského genomu [36]. Kapilární elektroforéza se dále využívá v aplikacích proteomického [37], peptidomického [38] a metabolického výzkumu [39,40] a také pro analýzy mikroorganismů [41–43] a jednotlivých organel buňky [44,45].

2. Výzkumné cíle

- 1) Stanovit stupeň čistoty mez detekce a mez stanovitelnosti antimikrobiálního peptidu halictinu a jeho analogů metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) s UV-fotometrickou detekcí v několika kyselých základních elektrolytech.
- 2) Charakterizovat jednotlivé analogy antimikrobiálního peptidu halictinu jejich efektivní elektroforetickou pohyblivostí korigovanou na referenční teplotu 25 °C metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) v několika kyselých základních elektrolytech.
- 3) Testovat semiempirické modely závislosti efektivní pohyblivosti peptidů na poměru jejich náboje a relativní molekulové hmotnosti a případně z nich odhadnout sekundární strukturu analyzovaných peptidů v roztoku.
- 4) Najít vhodné podmínky pro separaci směsí analog antimikrobiálního peptidu halictinu kapilární zónovou elektroforézou (CZE) a micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC) a stanovit separační účinnosti a rozlišení těchto separací.

3. Teoretická část

3.1. Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost (mobilita), m , je ústřední veličinou všech elektroforetických metod. Elektroforetická pohyblivost je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

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

kde v je rychlost pohybu v elektrickém poli o intenzitě E . Intenzita pole v kapiláře je dána podílem připojeného napětí U a celkové délky kapiláry L_{tot} :

$$E = \frac{U}{L_{tot}} \quad (\text{V} \cdot \text{m}^{-1}) \quad (2)$$

Elektroforetická migrace nabitých analytů probíhá v médiu, které je nazýváno základní elektrolyt (BGE). Vlastnosti BGE, jako jsou pH, iontová síla a typ přítomných iontů, jsou důležité pro migraci a separaci analyzovaných látek. V elektrickém poli o konstantní intenzitě, E , ionty podléhají elektrostatické síle, F_e , která je úměrná intenzitě elektrického pole, E , a náboji, Q , jednotlivých iontů:

$$F_e = Q \cdot E \quad (3)$$

Elektrostatická síla, F_e , zajišťuje pohyb iontů směrem k opačně nabitě elektrodě. Tento pohyb iontů je bržděn opačně působící frikční silou, F_f , která je vyjádřena podle Stokesova zákona:

$$F_f = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (4)$$

kde je η viskozita kapaliny, r je poloměr částice nebo iontu a v je migrační rychlost.

V ustáleném stavu se velikosti obou opačně orientovaných sil rovnají:

$$F_e = -F_f \quad (5)$$

Z této rovnosti lze pro elektroforetickou pohyblivost, m , odvodit:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (6)$$

Z rovnice (6) vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku [1,46].

3.2. Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) neboli elektroosmóza je velmi důležitý proces v kapilární zónové elektroforéze. Jedná se o elektrokinetický jev, při kterém působením vnějšího elektrického pole na prostorový náboj elektrické dvojvrstvy v kapalině dochází k pohybu této kapaliny [47].

Elektrická dvojvrstva vzniká na vnitřním povrchu kapiláry, kde se stýká kapalným roztok s pevnou stěnou kapiláry. Stěny separačních kapilár obsahují množství ionizovatelných skupin (např. silanolových skupin v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár) a/nebo adsorbované ionty z roztoku, které vytvářejí s ionty opačného znaménka v roztoku stabilní elektrickou dvojvrstvu (tzv. Sternova vrstva). Ve stejnosměrném elektrickém poli se difúzní část dvojvrstvy (Guyova-Chapmanova vrstva) podél stěn začne pohybovat k příslušné elektrodě a prostřednictvím vnitřního tření v kapalině se pohybuje veškerý roztok přítomný v kapiláře. EOF unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy. Difúzní vrstvě přísluší elektrický potenciálový rozdíl, který se nazývá elektrokinetický potenciál

nebo také zeta potenciál. Elektrokinetický potenciál je určen zejména povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry.

Elektroosmotický tok v křemenných kapilárách je silně závislý na pH nosného elektrolytu při elektromigračních separacích, protože disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilár je závislá na pH roztoku, kterým je kapilára naplněna. Mezi pH 3-8 elektroosmotický tok několikanásobně stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i v případě rychlých malých iontů, např. chloridů.

Elektroosmózu lze ovlivnit složením nosného elektrolytu, zejména pH, iontovou silou, přísádky povrchově aktivních látek (tenzidů), které pokryjí vnitřní povrch kapiláry a změni rychlost toku a také vnějším příčným elektrickým polem [48].

Významnou vlastností EOF ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku. Příspěvek EOF je tedy k celkové disperzi zón analytů při jejich elektromigrační separaci zanedbatelný [1,47,48].

3.3. Disperzní vlivy

Elektroforéza je doprovázena několika jevy, které vychází z principu metody a/nebo z použité instrumentace. V kapilární elektroforéze patří mezi nejdůležitější doprovázející jevy Jouleovo teplo, difúze, elektromigrační disperze, nerovnoměrný EOF a adsorpce na stěnu kapiláry. Disperzní efekty těchto jevů snižují rozlišovací schopnost metody, jejich minimalizace je tedy velmi důležitá. Působením disperzních jevů během elektromigrace dochází k rozšiřování zón analytů a k ovlivnění citlivosti a účinnosti separace [49,50].

3.3.1. Jouleovo teplo

Teplo, které vzniká ve vodiči, jímž prochází elektrický proud, I , a na jehož koncích je napětí, U , se nazývá Jouleovo teplo, Q_J .

$$Q_J = U \cdot I \quad (7)$$

Disipovaný elektrický výkon vztažený na jednotku objemu kapiláry, P ($\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$), při průchodu elektrického proudu, I , separační kapilárou o průřezu, S (m^2), naplněné elektrolytem o měrné vodivosti, κ ($\Omega^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$), je tedy možné vypočítat ze vztahu:

$$P = \frac{E \cdot I}{S} = \frac{I^2}{\kappa \cdot S^2} \quad (8)$$

kde E je intenzita elektrického pole ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$).

Nadbytečný ohřev má za následek ovlivňování efektivních pohyblivostí migrujících látek a také může vést k poškození termolabilních separovaných látek, např. denuraci proteinů. Jouleovým ohřevem se zvyšuje střední teplota uvnitř kapiláry. Teplo vzniká v celém objemu sloupce elektrolytu, ale je odváděno pouze na okrajích, kde se elektrolyt stýká s chlazenými stěnami kapiláry. Vnitřní část elektrolytu v kapiláře je tedy teplejší než okrajové části. Teplotní rozdíl může být i větší než 10 K. Teplotní gradient způsobuje rozdílnou rychlost migrace iontů v blízkosti stěn a ve středu kapiláry a nehomogenitu i dalších fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou pH, hustota, viskozita, atd.

Elektrický ohřev je při snaze o zrychlení analýzy hlavním limitujícím faktorem pro používání vysokých elektrických napětí, a tím i proudů, a tedy i elektrických výkonů. Dvojnásobné zrychlení analýzy vyžaduje dvojnásobné napětí, ale tepelný výkon se tím zvýší čtyřikrát.

Teplotní efekty mohou být minimalizovány optimalizací elektrolytových systémů či konstrukcí aparatury, což v praxi znamená použití pufrů s nízkou iontovou silou a elektrickou vodivostí. Konstrukční metoda snížení efektů Jouleova ohřevu spočívá ve zlepšení odvodu tepla z kapiláry zvýšením plochy povrchu, který je chlazen [3,49].

3.3.2. Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze je efekt, který způsobuje nesymetrické rozšiřování zón analytů, tedy deformaci jejich zón. Intenzita elektrického pole se v jednotlivých zónách separovaných látek liší od intenzity elektrického pole v základním elektrolytu a zmíněná intenzita elektrického pole pak ovlivňuje pohyblivost jednotlivých zón analytů [49].

Pro silné elektrolyty platí, že pokud je pohyblivost analytů nižší než pohyblivost iontů základního elektrolytu, vedoucí rozhraní zóny látky je ostré a koncové rozhraní podléhá rozmývání. Jsou-li pohyblivosti stejné, nedochází k deformaci zóny a má tvar gaussovského píku. Jestliže je pohyblivost analytů vyšší než pohyblivost iontů BGE, pak přední rozhraní zóny analytu podléhá rozmývání a koncové rozhraní je ostré.

Vliv elektromigrační disperze lze snížit nízkou koncentrací dávkovaného analytu. Tím ale současně vzrůstají nároky na citlivost detekce. Vliv elektromigrační disperze lze zanedbat při koncentracích separovaných látek o dva až tři řády nižší, než je koncentrace BGE [3,49,50].

3.3.3. Difúze

Difúze je jev, kdy dochází k rozmývání zón analyzovaných látek v důsledku koncentračního spádu. Při elektroforetické analýze nadávkovaný vzorek do separační kapiláry reprezentuje zónu analyzovaných látek, na jejímž rozhraní je velmi ostrý skok koncentrací těchto látek. Vlivem difúze je tento ostrý skok plynule rozmýván. Za zjednodušujícího předpokladu, že dávkovaný vzorek tvoří v čase $t = 0$ pravoúhlý tenký obdélníkový schod koncentrací analyzovaných látek, pak po určitém čase t jsou výsledkem difúze koncentrační profily tzv. gaussovského tvaru. Lze je charakterizovat rozptylem σ^2 nebo standardní odchylkou σ danou vztahem:

$$\sigma = \sqrt{2Dt} \quad (9)$$

kde t je čas a D značí difúzní koeficient [49,50].

3.3.4. Adsorpce na stěnu kapiláry

Interakcí iontů separovaných látek se stěnou separační kapiláry dochází ke změnám migračního chování separovaných zón. Adsorpce je způsobena iontovými interakcemi mezi ionizovanými skupinami na povrchu křemenných kapilár a opačně nabitými ionty z roztoku elektrolytu. V blízkosti stěn separační kapiláry dochází k hromadění iontů separovaných látek a kapilára se vůči těmto iontům chová jako iontoměnič, což vede ke zvýšené sorpci, zvláště u makromolekul. Adsorpce způsobuje rozmývání separovaných zón, které se projevuje „chvostováním“ zadního rozhraní. Fixace sorbované látky na stěnu kapiláry může být tak silná, že už ji nelze z kapiláry vymýt.

Adsorpci je možné ovlivnit použitím základního elektrolytu o takovém pH, že stěny kapiláry i ionty separovaných látek nesou náboj stejného znaménka a navzájem se tedy odpuzují. Nejčastějším způsobem omezení adsorpce je však deaktivace stěn kapiláry. Stěny separačních kapilár mohou být pokryty jak hydrofobními polymery, tak i hydrofilními polymery typu alkylcelulosa nebo polyakrylamid. Tímto způsobem je zároveň snížen elektroosmotický tok během separace [49,50].

3.4. Separační účinnost

Separační účinnost je v CE charakterizována počtem teoretických pater, N :

$$N = \frac{L_{eff}^2}{\sigma^2} \quad (10)$$

kde L_{eff} je efektivní délka kapiláry (migrační dráha) a σ^2 je celkový rozptyl koncentračního profilu zóny.

Počet teoretických pater pro symetrické píky gaussovského profilu lze vypočítat z elektroferogramu podle následujících vztahů:

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (11)$$

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t}{w} \right)^2 \quad (12)$$

kde t je migrační čas, w je šířka píku při základně a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

Separační účinnost může být také charakterizována výškovým ekvivalentem teoretického patra, H , pro který platí:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (13)$$

Pro výškový ekvivalent teoretického patra, H , a počet teoretických pater, N , platí vztah:

$$N = \frac{L}{H} \quad (14)$$

Počet teoretických pater či výškový ekvivalent teoretického patra charakterizuje rozšíření zóny píku při průchodu daného analytu kapilárou. Vyšší počet pater odpovídá užším píkům a lepší separační účinnosti [3,46,50].

3.5. Rozlišení

Rozlišení, R_S , kvantitativně popisuje vzájemnou separaci dvou analytů. Obecně je rozlišení definováno vztahem:

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (15)$$

kde t je migrační čas a w je šířka píku při základně. Rozlišení může být úplné nebo částečné. Dvě zóny analyzované směsi jsou od sebe plně separované, je-li jejich rozlišení $R_S \geq 1,5$.

Vztah mezi rozlišením a počtem teoretických pater (separační účinností) je dán ve tvaru:

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot \bar{N}^{\frac{1}{2}} \cdot \left(\frac{\Delta m}{\bar{m}} \right) \quad (16)$$

kde Δm je rozdíl mobilit sledovaných analytů, \bar{m} je jejich průměrná pohyblivost a \bar{N} je průměrný počet teoretických pater [3,49].

3.6. Kapilární elektromigrační metody

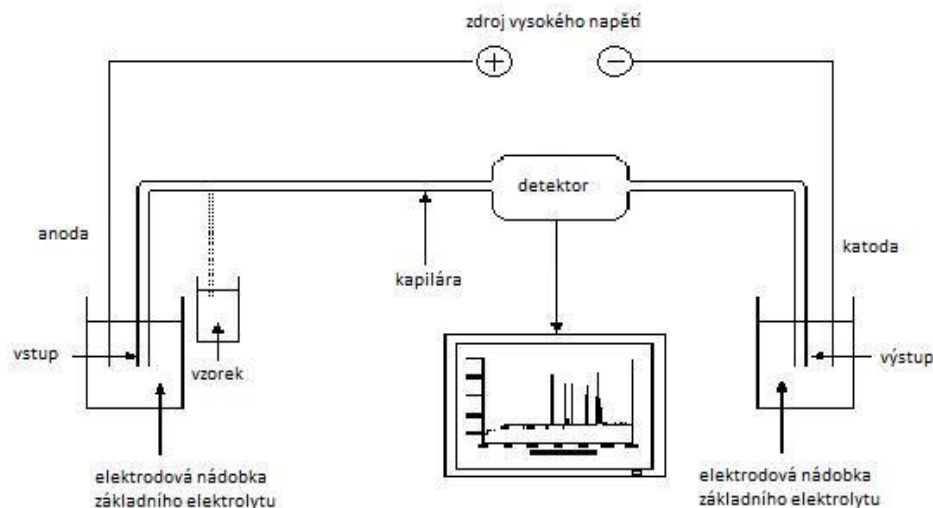
Kapilární elektromigrační metody jsou pro svou vysokou separační účinnost a citlivost řazeny mezi nejúčinnější a nejcitlivější separační analytické metody. Kapilární elektromigrační metody zahrnují sedm základních módů, které se od sebe liší typem média přítomného v separační kapiláře a vlastním mechanismem separace. Mezi základní elektromigrační metody patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), kapilární afinitní elektroforéza (ACE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC) [29].

3.6.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je principiálně nejjednodušší elektromigrační metodou, při které se jednotlivé složky vzorku, lišící se svými elektroforetickými pohyblivostmi, oddělují v homogenním prostředí základního elektrolytu (background elektrolyte - BGE).

Základní elektrolyt vede prakticky veškerý elektrický proud, který prochází kapilárou a jeho složení je konstantní v celé kapiláře a nemění se s časem.

Instrumentální uspořádání pro kapilární elektroforézu je schematicky znázorněno na **obrázku 1**.



Obrázek 1: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu.

Po nadávkování vzorku do kapiláry se na kapiláru vloží elektrické napětí. Jednotlivé složky vzorku se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru. Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem. V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě. Jeho rychlost je v neutrálních a alkalických základních elektrolytech relativně vysoká, takže výsledná rychlost kationtů a aniontů má stejný směr (katodický), což umožňuje analyzovat kationty a anionty současně v průběhu jednoho experimentu.

Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce záření nejčastěji používaného UV-fotometrického detektoru, tzv. elektroforegramu, získáváme kvalitativní a kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku. Kvalita analytu je dána migračním časem jeho píku a kvantita analytu je přímo úměrná výšce a ploše jeho píku [1,49].

3.6.2. Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza je elektroforéza, ve které je vzorek po nadávkování separován v diskontinuálním elektrolytovém systému, jež se skládá z vedoucího a koncového elektrolytu. Separovat lze buď kationty, nebo anionty. Součástí vedoucího elektrolytu je vedoucí ion, což je ion s největší efektivní pohyblivostí, a naopak koncový elektrolyt obsahuje ion s nejmenší efektivní pohyblivostí, koncový ion. Mobility iontů vzorku by se tedy měly pohybovat mezi mobilitami vedoucího a koncového iontu. Protiion vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrací kapacitu při daném pH separace, protiion koncového elektrolytu je do značné míry libovolný. Připojením stejnosměrného elektrického pole k takto definovanému systému dochází k pohybu směsné zóny iontů vzorku k příslušným elektrodám a dochází k separaci. Po určitém čase dojde k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé složky vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedních zónách s velmi ostrými rozhraními. Jestliže se ion vlivem difúze dostane do zóny méně pohyblivých iontů, kde na něj působí větší intenzita elektrického pole, je zvýšením hnací síly vrácen zpět do své zóny. Opačným vlivem působí pokles gradientu elektrického potenciálu a tím i hnací síly, když se ion dostane do zóny pohyblivějších iontů [1,3,51].

3.6.3. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Izoelektrická fokusace dělí amfoterní látky na základě jejich rozdílných izoelektrických bodů pI, tj. pH, při kterém má molekula efektivní náboj nulový a v elektrickém poli se nepohybuje.

Amfolyty jsou molekuly, které obsahují kyselou i bazickou část a mohou tedy existovat ve formě kladně nebo záporně nabitých a nebo elektroneutrálních částic. Typickými amfolyty jsou např. aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. Separace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na komplexní směsi amfolytů v kapiláře, které jsou schopny pufrat požadovaný rozsah pH. Dělené látky migrují roztokem, dokud nedoputují do části separačního prostředí, kde se z nich stanou neutrální látky, tj. kde je pH roztoku rovno jejich pI. Tento ustálený stav se nazývá fokusace.

Po dosažení ustáleného stavu je třeba fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány. Mobilizace se uskutečňuje buď hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u konců kapiláry, nebo elektroelucí, která se vyvolá změnou složení elektrodového roztoku u anody nebo katody. K přirozené mobilizaci zón dochází v přítomnosti elektroosmotického toku v křemenných kapilárách s neupraveným vnitřním povrchem [1,3].

3.6.4. Kapilární afinitní elektroforéza (ACE)

Kapilární afinitní elektroforéza je metoda, která charakterizuje vlastnosti biologických makromolekul, jako jsou např. proteiny a nukleové kyseliny, a analyzuje jejich specifické interakce s odpovídajícími afinitními ligandy. Afinitní interakce jsou způsobeny elektrostatickými vazbami, vodíkovými můstky, hydrofobním efektem a van der Waalsovými interakcemi. Principem ACE je změna elektroforetických pohyblivostí v závislosti na afinitních interakcích mezi ligandem a analytem. Se zvyšující se koncentrací ligandu elektroforetická rychlost postupně klesá.

ACE se často používá v oblasti separace chirálních látek a především se využívá ke stanovení vazebných (asociačních) konstant komplexů biomolekul s různými ligandy [9,52,53].

3.6.5. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Kapilární gelová elektroforéza je vhodná pro separaci biologických makromolekul (proteinů, fragmentů nukleových kyselin) s mnohem větší separační účinností, než je tomu u klasické plošné gelové elektroforézy nebo HPLC. Tyto látky mají rozdílnou relativní molekulovou hmotnost a velmi blízký či identický specifický náboj (tj. náboj vztažený na jednotku relativní molekulové hmotnosti), a proto je třeba, aby jejich elektromigrační separace probíhala v prostředích se síťovým efektem. Síťový efekt vykazují např. kovalentně prokřížované polyakrylamidové gely a agarosové gely. Na základě nekovalentních interakcí vytvářejí síťový efekt roztoky lineárních polymerů (lineární

polyakrylamid, deriváty celulosy, dextran, polyoxyetylen, aj.), které se nazývají fyzikální gely. Analyty se rozdělují na základě pohyblivosti nabitých částic v prostředí molekulárního síta a jsou oddělovány podle vzrůstající relativní molekulové hmotnosti [1,54].

3.6.6. Kapilární elektrokinetická chromatografie (EKC)

Kapilární elektrokinetická chromatografie je kombinovaná separační technika využívající jevy elektrokinetické, elektroforézu a elektroosmózu, i chromatografické, tj. distribuci analyzovaných látek mezi dvě fáze a relativní pohyb těchto fází proti sobě.

V EKC je separace založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi pseudofází a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu, ve které je pseudofáze rovnoměrně rozptýlena. Relativní pohyb těchto fází vůči sobě je vyvolán elektroosmotickým tokem dvoufázového systému jako celku a elektroforetickým pohybem pseudostacionární fáze v opačném směru. Tento dvoufázový systém se pohybuje v kapiláře určitou rychlostí v_{eo} a nabitá micelární pseudofáze se pohybuje v opačném směru elektroforetickým pohybem o velikosti v_{ep} . Protože je absolutní hodnota rychlosti v_{eo} vyšší než elektroforetická rychlost v_{ep} , je výsledný směr pohybu obou fází stejný, ale jejich rychlosti jsou různé. Vodnou fází nosného elektrolytu lze považovat za mobilní fázi a micelární fázi za fázi pseudostacionární.

MEKC využívá jako pseudostacionární fázi povrchově aktivní látky v koncentraci vyšší než je tzv. kritická micelární koncentrace (CMC). Povrchově aktivní látka v koncentraci nižší než CMC se chová jako normální elektrolyt. Po překročení kritické micelární koncentrace, která je specifickou charakteristikou každého detergentu (tenzidu), dochází k tvorbě agregátů – micel. Ve vodném prostředí základního elektrolytu se orientují hydrofobní skupiny povrchově aktivních látek dovnitř micely a hydrofilní skupiny jsou orientovány vně do vodného prostředí. Povrchově aktivní látka může být kationická (didodecyldimethylamoniumbromid, DDAB, dodecyltrimethylamoniumchlorid, DTAC, cetyltrimethylamoniumbromid, CTAB), anionická (dodecylsulfát sodný, SDS) nebo neionogenní (oktylglukosid).

Anionický detergent migruje směrem k anodě, tedy proti EOF. EOF je ale v neutrálním nebo bazickém pH většinou rychlejší než migrační rychlost micel a výsledný pohyb analytů je tedy ve směru EOF, tj. ke katodě. Kationický tensid způsobí potažení stěny kapiláry pozitivně nabitými molekulami, které obrátí směr EOF k anodě, a proto je třeba obrátit polaritu elektrod v uspořádání CE [1,3,46].

3.6.7. Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektrochromatografie je technika analogická kapilární HPLC. Separační prostor je tvořen plněnou nebo otevřenou kapilární kolonou, jejíž sorbent nebo na stěnu imobilizovaný ligand je stacionární fází. Pohyb mobilní fáze však není realizován tlakově vyvolaným hydrodynamickým tokem jako u HPLC, ale elektroosmotickým tokem vyvolaným stejnosměrným elektrickým polem připojeným k oběma koncům kolony, které jsou ponořené do roztoku mobilní fáze v elektrodových nádobkách. Molekuly dělených látek jsou unášeny mobilní fází k detektoru a zároveň zpoždovány interakcí se stacionární fází.

Kapilární elektrochromatografie se vyznačuje výhodami jako je vyšší separační účinnost, relativní jednoduchost instrumentace a vyšší selektivita. Oproti HPLC má navíc ještě výhodu, že elektroosmotický tok mobilní fáze má pravoúhlý rychlostní profil, což umožňuje dosahovat při separacích několikanásobně vyšších separačních účinností a dále díky absenci zpětného tlaku kolony můžeme používat menší částice sorbentu [1,47,55].

4. Analýza peptidů kapilární elektroforézou

Peptidy reprezentují rozsáhlou a rozmanitou skupinu biologicky aktivních sloučenin. Hrají klíčovou roli v kontrole a regulaci v mnoha zásadně důležitých procesech ve všech živých organismech. Peptidy působí jako hormony, neurotransmitery, koenzymy, enzymové substráty a inhibitory, receptorové ligandy, toxiny a antibiotika. Také spousta léčiv je odvozena od peptidů nebo peptidových struktur. Proto význam peptidů v poslední době vzrůstá.

Přírodní peptidy jsou složené z přibližně 20 aminokyselin spojených peptidovou vazbou a v rámci jednoho nebo více řetězců mohou být propojené disulfidovými můstky. V syntetických preparátech peptidů (analoga, deriváty, fragmenty) se vyskytují také nekódované aminokyselinové zbytky a různé typy propojení v rámci jednoho nebo více řetězců. V závislosti na počtu a sekvenci aminokyselinových zbytků se molekuly peptidů liší v jejich náboji, velikosti (relativní molekulové hmotnosti, M_r), konformaci, hydrofobicitě a specifických vazebných schopnostech. Tyto vlastnosti umožňují jejich separaci kapilární zónovou elektroforézou na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti.

Analýzy peptidů se kromě metod kapilární elektroforézy provádí metodami HPLC nebo také chromatografií na tenké vrstvě (TLC), i když tato metoda je již málo využívána. Výhody CE oproti těmto metodám jsou např. vysoká účinnost separace, malá spotřeba činidla, poměrně rychlá analýza a jednoduchá instrumentace.

Univerzální a nejčastěji používanou detekcí pro sledování peptidových separací pomocí CE je UV-absorpční detekce v oblasti, ve které peptidová vazba absorbuje krátkovlnné UV záření, většinou v rozsahu vlnových délek 200 až 220 nm. Citlivost UV-absorpčního detektoru lze zvýšit použitím speciálních typů detekčních cel, např. cely ve tvaru písmene Z, U nebo ve tvaru bubliny.

Laserem indukovaná fluorescenční detekce (LIF) je nejcitlivější detekční schéma v CE i v ostatních mikroanalytických systémech. Nevýhodou LIF detekce je, že většinou musí být peptidy derivatizovány fluorescenčními značkami. Nativní fluorescence, tedy fluorescence bez nutnosti derivatizace, může být využita pouze pro detekci peptidů obsahujících aromatické aminokyseliny (Trp, Tyr, Phe). Oproti UV-absorpční detekci nevyžadující derivatizaci má LIF detekce o dva až tři řády vyšší citlivost.

Dalším vysoce účinným detekčním módem pro CE je hmotnostní spektrometrie (MS). Nejběžnější ionizační techniky jsou elektrosprej (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), které charakterizují elektroforeticky separované peptidy jejich relativní molekulovou hmotností a dále podávají důležité informace o sekvenci a struktuře aminokyselin v řetězci a o jejich posttranslačních modifikacích.

Mezi méně používané techniky pro detekci peptidů v CE patří elektrochemická detekce (ECD), kontaktní a bezkontaktní vodivostní detekce a NMR [29,56,57].

5. Antimikrobiální peptidy

Přes velké úspěchy antibiotik v léčbě závažných onemocnění má jejich užití i negativní dopad. Kvůli adaptabilitě mikrobiálního a především bakteriálního genomu reagovaly bakteriální kmeny tvorbou různých mutantů, kteří se stali rezistentní na dostupná antibiotika. Nevhodné a zbytečně časté používání antibiotik urychlilo rozvoj mikrobiální rezistence. V současné době představuje výroba antibiotik jedno z největších odvětví farmaceutického průmyslu. Hledají se ale zároveň látky s odlišným mechanismem účinku a jedněmi ze slibných kandidátů jsou antimikrobiální peptidy.

Antimikrobiální peptidy jsou důležitou součástí vrozeného obranného systému většiny organismů proti napadajícím patogenům. První antimikrobiální peptid, cecropin, byl izolován roku 1980 z hemolymfy kukly amerického martináče *Hyalophora cecropia*. Od této doby byly izolovány antimikrobiální peptidy z širokého okruhu živočichů, obratlovců i bezobratlých, z rostlin a také z hub a bakterií.

Antimikrobiálních peptidů existuje několik druhů – kationické, anionické, aromatické dipeptidy a fragmenty proteinů vážící kyslík. Nejpočetnější skupinou jsou kationické peptidy, které zároveň vykazují mnohonásobně vyšší aktivitu než ostatní druhy. Zatím jich bylo charakterizováno přes 700 a více než polovina byla izolována z hmyzu. Kationické antimikrobiální peptidy jsou obvykle složeny z 10 až 50 aminokyselin, převážně z bazických (lysin, arginin) a hydrofobních aminokyselin, díky nimž se celkový náboj těchto peptidů pohybuje v rozmezí od +2 do +10 elektromigračních nábojů.

To, že antimikrobiální peptidy působí na bakteriální buňky a nejsou toxické pro buňky hostitele, je způsobeno rozdíly ve struktuře, složení a transmembránovém potenciálu mezi membránou bakteriální a eukaryotní buňky. Buněčné membrány bakterií jsou složeny převážně z fosfolipidů (fosfatidylglycerol, fosfatidylserin, kardiolipin), jejichž fosfátové skupiny membránové dvouvrstvy jsou záporně nabitě. Tady dochází k interakcím s kladně nabitým antimikrobiálním peptidem. Naproti tomu živočišná fosfolipidová dvouvrstva má neutrální náboj. Obsahuje hlavně obojetné ionty fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a molekuly cholesterolu. Antimikrobiální peptidy narušují bakteriální membránu tvorbou pórů a tím dochází k úniku životně důležitého obsahu bakteriální buňky. Některé peptidy pronikají dále do nitra bakterií, kde narušují jejich metabolismus nebo poškozují cytoplazmatické komponenty.

Spektrum působení antimikrobiálních peptidů je velice široké a zahrnuje i řadu mikroorganismů rezistentních proti dostupným antibiotikům. Navrhované aplikace těchto peptidů zahrnují léčbu i prevenci bakteriálních, kvasinkových a virových infekcí. Bylo prokázáno i působení na rakovinné buňky. Využití je dále zaměřeno proti patogenům cystické fibrózy, kožních nádorů, žaludečních vředů a dalších [58–62].

Na trh se zatím dostalo jen pár antimikrobiálních peptidů bakteriálního původu, jelikož klinické testy, kterými peptidy prochází, jsou příliš dlouhé [58].

Antimikrobiální peptid pojmenovaný halictin byl izolován z jedových váček eusociálních včel *Halictus sexcinctus* a jeho syntetická analoga byla připravena změnou počtu a sekvence aminokyselin [63].

6. Experimentální část

6.1. Chemikálie

- tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) – p.a., Serva (Heidelberg, Německo)
- dimethylsulfoxid (DMSO), kyselina fosforečná (H_3PO_4), kyselina octová (AcOH), hydroxid sodný (NaOH) a chlorid draselný (KCl) – p.a., Lachema (Brno, ČR)
- kyselina iminodioctová (IDAA) – p.a., Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- didodecyldimethylamoniumbromid (DDAB) – p.a., Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) – čistý, Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- dodecyltrimethylamoniumchlorid (DTAC) – čistý, Serva (Heidelberg, Německo)
- dodecylsulfát sodný (SDS) – puriss, Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- hydroxyethylcelulosa (HEC), methylhydroxyethylcelulosa (MHEC), methylhydroxypropylcelulosa (MHPC) – čistý, Serva (Heidelberg, Německo)

6.2. Úprava vzorků

Analyzované antimikrobiální peptidy byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi v ÚOCHB AV ČR [63]. Byly purifikovány metodou RP-HPLC na koloně Vydac C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Grace Vydac, Hesperia, CA, USA) a aktivní frakce byly dále analyzovány hmotnostní spektrometrií. Všechny vzorky byly pro CE analýzu rozpuštěny v deionizované vodě. Koncentrace vzniklých roztoků se pohybovaly v rozmezí 0,64-1,45 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Seznam analyzovaných peptidů je uveden v **tabulce 1**.

Tabulka 1: Přehled sekvencí aminokyselin, relativních molekulových hmotností (M_r), počtu elementárních nábojů (q) a poměru q/M_r analyzovaných peptidů.

Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84
HAL-1/22	<i>GMWSKILGHLIR</i> -NH ₂	1408,8	4	2,84
HAL-1/24	MWSKILGHLIR-NH ₂	1351,8	4	2,96
HAL-1/25	WSKILGHLIR-NH ₂	1220,8	4	3,28
HAL-1/27	GMWSKILGHL-NH ₂	1139,6	3	2,63
HAL-1/4	GMWSKILGHLKR-NH ₂	1423,8	5	3,51
HAL-1/9	GMWSKILGKLIR-NH ₂	1399,9	4	2,86
HAL-1/18	GMWSKILKHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38
HAL-1/5	GMW K ILGHLIR-NH ₂	1449,9	5	3,45
HAL-1/12	G KWSKILGHLIR-NH ₂	1405,9	5	3,56
HAL-1/17	K MWSKILGHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38
HAL-1/20	G KWSKILGKLIR-NH ₂	1396,9	5	3,58
HAL-1/19	G KW K ILGHLIR-NH ₂	1446,9	6	4,15
HAL-1/21	G KW K ILGKLIR-NH ₂	1438,0	6	4,17
HAL-1/2	GMWSKILG P LIR-NH ₂	1368,8	3	2,19
HAL-1/1	GMWSKIL P H L IR-NH ₂	1448,8	4	2,76
HAL-1/3	GMWSKIP G H L IR-NH ₂	1392,8	4	2,87
HAL-1/11	GMW P KILGHLIR-NH ₂	1418,8	4	2,82
HAL-1/28	GMWSKIM e L G H L IR-NH ₂	1422,8	4	2,81
HAL-1/7	GMWSKI L GHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84
HAL-1/8	GMWSK L GHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84
HAL-1/29	GMWS K ILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84
HAL-1/15	GMWSK L L G H L L R -NH ₂	1408,8	4	2,84
HAL-1/13	KMWSK K L G H L IR-NH ₂	1494,9	6	4,01
HAL-1/14	GMWSK K L K H L IR-NH ₂	1494,9	6	4,01
HAL-1/16	GMWSKMe L G H Me L IR-NH ₂	1436,8	4	2,78

Tučné zvýraznění aminokyselinového zbytku v sekvenci peptidu značí záměnu oproti aminokyselině původního řetězce, zvýraznění kurzívou značí D-konformaci aminokyseliny a zvýraznění tučně i kurzívou značí náhradu aminokyseliny v D-konformaci oproti aminokyselině v původním řetězci.

6.3. Přístrojové vybavení

Všechna měření byla provedena na CE analyzátoru domácí výroby ÚOCHB AV ČR [64]. Tento přístroj byl obsluhován manuálně. Sběr a zpracování dat byly provedeny chromatografickou stanicí Clarity (DataApex, Praha, ČR). Separace analytů probíhala v křemenné kapiláře s vnějším polyimidovým povlakem dodané firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA) o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm , celkové délky 40 cm a efektivní délky (od počátku k detektoru) 29 cm. Dávkování vzorků bylo hydrodynamické. Kapilára v tomto přístroji nebyla chlazena, a proto byly hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí korigovány na referenční teplotu 25 °C. Teplota okolního prostředí se při měření pohybovala v rozmezí 22-26,5 °C. Analyty byly detekovány pomocí UV-absorpčního fotometrického detektoru při vlnové délce 206 nm, zdrojem záření byla bezelektroková vysokofrekvenčně buzená jódová výbojka (LKB-Pharmacia, Uppsala, Švédsko), a detektorem záření byla UV-senzitivní křemíková fotodioda s vestavěným předzesilovačem (Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching, Německo).

Mimo dobu měření byla kapilára uložena v 0,5 M kyselině octové. Při každém uvedení přístroje do provozu byla kapilára promývána 1 M nebo 0,1 M hydroxidem sodným, deionizovanou vodou a základním elektrolytem. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývána základním elektrolytem. Vzorky byly dávkovány tlakem 5-15 mbar po dobu 5-15 s. Separální napětí bylo v rozmezí od -18 kV do +18 kV. Jako marker elektroosmotického toku byl použit 0,5 mg/ml dimethylsulfoxid (DMSO).

7. Výsledky a diskuze

7.1. Analýza a charakterizace analog halictinu

7.1.1. Složení základních elektrolytů

Základní elektrolyty (BGE) jsou pro kapilární zónovou elektroforézu velmi důležité, protože jejich složení ovlivňuje migrační chování analytů. Vhodný BGE musí zajistit správné elektroforetické chování všech rozpuštěných látek v roztoku, dostatečnou stabilitu systému a vyhovující separaci analytů.

Nejdůležitějším parametrem základního elektrolytu v CE pro separaci slabých elektrolytů a amfolytů je pH, protože efektivní pohyblivost těchto analytů je na pH silně závislá. Peptidy, jež jsou složené z aminokyselin, jsou amfolyty. Tyto látky amfolytické povahy mají ve své molekule jak kyselou funkční skupinu, tak zásaditou funkční skupinu a mohou nést kladný, záporný nebo nulový náboj podle pH okolního prostředí. Pro CE analýzy peptidů jsou dvě vhodné oblasti pH. V kyselé oblasti (pH 2,0-4,0) je úplně resp. částečně potlačena disociace karboxylové skupiny, aminoskupiny jsou protonované a analyty migrují jako kationty. Naproti tomu v zásadité oblasti (pH 8,0-10,0) jsou karboxylové skupiny plně disociované a aminoskupiny jsou protonované jen částečně nebo vůbec, takže analyty migrují jako anionty. Dalšími důležitými parametry základního elektrolytu v CE je jeho separační selektivita a účinnost pro dané analyty.

Bylo testováno několik druhů základních elektrolytů v kyselém i alkalickém pH: klasické pufrů (Tris/fosfát), slabé kyseliny (kyselina octová), izoelektrický BGE (kyselina iminodioctová) s přidavkem kationického tensidu (DDAB) pro metodu CZE a s přidavkem anionického (SDS) a kationických (CTAB, DTAC) tensidů pro metodu MEKC.

Složení, pH a elektroosmotická pohyblivost použitých BGE a separační napětí a proudy v těchto BGE, které byly použity pro stanovení stupně čistoty a separační účinnosti analog halictinu, jsou uvedeny v **tabulce 2**. BGE, které byly testovány pro separaci směsí analytů, jsou uvedeny v **tabulce 3**.

Tabulka 2: Přehled základních elektrolytů (BGE) použitých pro stanovení stupně čistoty a separační účinnosti CE analýz antimikrobiálních peptidů.

Označení	Složení základního elektrolytu	pH	$m_{eof} \cdot 10^9$ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	U (kV)	I (μA)
BGE VIII	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,05 mM DDAB	2,81	68,27	12	13,0
BGE I	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,1 mM DDAB	2,82	65,74	12	14,3
BGE VII	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,2 mM DDAB	2,89	71,96	12	12,5
BGE IX	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB	2,85	73,87	12	12,7
BGE X	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,8 mM DDAB	2,82	75,67	12	12,9
BGE XI	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 1,6 mM DDAB	2,86	77,39	12	13,0
BGE III	50 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,1 mM DDAB	2,32	64,19	12	27,1
BGE IV	0,5 M kyselina octová	2,54	/	12	7,5
BGE V	0,5 M kyselina octová; 0,1 mM DDAB	2,52	96,68	12	7,2
BGE VI	0,5 M kyselina octová; 60 mM SDS	2,92	/	12	25,6
BGE II	200 mM kyselina iminodioctová; 0,1 mM DDAB	2,28	/	12	33,5

Tabulka 3: Přehled základních elektrolytů (BGE) použitých pro separaci směsí antimikrobiálních peptidů.

Označení	Složení základního elektrolytu	pH	$m_{eof} \cdot 10^9$ ($m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)	U (kV)	I (μA)
BGE VII	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,2 mM DDAB	2,89	71,96	12	12,5
BGE IX a	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB	2,85	73,87	12	12,7
BGE IX b	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB	2,85	71,60	15	15,6
BGE IX c	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB	2,85	76,72	18	19,7
BGE X	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,8 mM DDAB	2,82	75,67	12	12,9
BGE XV	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 3,2 mM DDAB	2,84	/	12	13,0
BGE XVI	5 mM kyselina fosforečná; 20 mM TRIS; 50 mM SDS	8,64	55,36	12	19,5
BGE XIV	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,2 mM CTAB	2,81	35,80	12	12,5
BGE XII	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,5 mM CTAB	2,76	20,14	12	12,9
BGE XIII	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 2 mM CTAB	2,77	26,90	12	13,6
BGE XVII a	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 2 mM DTAC	2,81	/	12	13,6
BGE XVII b	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 2 mM DTAC	2,81	/	9	10,3
BGE XVII c	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 2 mM DTAC	2,81	/	15	19,4
BGE XVII d	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 2 mM DTAC	2,81	/	18	23,9
BGE XIX	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB; 0,1% HEC	2,84	59,87	12	13,2
BGE XX	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB; 0,1% MHEC	2,85	52,02	12	12,6
BGE XVIII	30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,4 mM DDAB; 0,1% MHPC	2,84	65,20	12	12,1

7.1.2. Stanovení stupně čistoty a separační účinnosti

Čistotu peptidů a obsah jednotlivých složek v jejich preparátech lze stanovit různými postupy, které jsou závislé na dostupnosti standardu peptidu. Pokud je standard dostupný, množství peptidu lze v analyzovaném vzorku určit absolutně pomocí metody kalibrační křivky nebo metodou vnitřního standardu.

Analoga halictinu jsou prvně syntetizované a analyzované látky, tudíž odpovídající standardy nebyly dostupné. Stupně čistoty byly proto stanoveny na základě vyhodnocení relativní korigované plochy píku P_{CA} , podle následujícího vztahu:

$$P_{CA(i)} = \frac{A_{c(i)}}{\sum_{i=1}^n A_{c(i)}} \cdot 100 \quad (17)$$

kde $A_{c(i)}$ je korigovaná plocha píku i -té složky daného vzorku peptidu a n je počet složek tohoto vzorku. Korigovaná plocha je plocha píku dělená jeho migračním časem.

Stupeň čistoty stanovený tímto způsobem je pouze přibližný, protože molární absorpční koeficienty jednotlivých složek vzorku se mohou lišit. Syntetické peptidy obsahují strukturně podobné příměsi a lze předpokládat i podobné hodnoty jejich molárních absorpčních koeficientů a tedy i relativně dobrý odhad stupně čistoty. Stupně čistoty všech analyzovaných peptidů ve vybraných elektrolytech jsou uvedeny v **tabulce 4**.

Společně se stupněm čistoty byla stanovena také separační účinnost pro všechny peptidy (viz **kapitola 3.4**) v jednotlivých elektrolytech. Hodnoty separační účinnosti vyjádřené počtem teoretických pater na metr délky kapiláry, N , pro všechny peptidy ve vybraných základních elektrolytech jsou uvedeny v **tabulce 5**. Analýza a určení stupně čistoty a separační účinnosti byly provedeny metodou CZE v elektrolytech BGE I-V a VII-XI a metodou MEKC v BGE VI.

V základních elektrolytech BGE II, IV a VI se neobjevovaly žádné píky peptidů, což bylo zřejmě způsobeno jejich vysokým kladným nábojem a jejich adsorpcí na částečně záporně nabitě stěny křemenné kapiláry. V BGE XI se píky peptidů objevovaly, ale v elektroforegramu v základní linii se vyskytovaly systémové píky a nepravidelnosti, které byly pravděpodobně způsobeny vysokou koncentrací přídavku detergentu DDAB.

Příklady analýz vybraných analog halictinu pro stanovení stupně čistoty jsou znázorněny na **obrázku 2**. Pro srovnání jsou ukázány záznamy analýz peptidů HAL-1/3, HAL-1/17 a HAL-1/25 ve vybraných elektrolytových systémech BGE I (30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,1 mM DDAB, pH 2,82), BGE III (50 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,1 mM DDAB, pH 2,32) a BGE V (0,5 M kyselina octová; 0,1 mM DDAB, pH 2,52). Na **obrázku 2A** a **2B** je ukázána analýza peptidu HAL-1/25, který byl vyhodnocen vysokým stupněm čistoty (~100 %) v obou vybraných elektrolytech. Peptid HAL-1/3 byl v základním elektrolytu BGE I vyhodnocen vysokým stupněm čistoty ~99,9 %, ale v BGE V bylo pro tento peptid zjištěno pět neidentifikovaných příměsí a jeho stupeň čistoty byl ~96,07 % (viz **obrázek 2C** a **2D**). Peptid HAL-1/17 byl vyhodnocen nejnižším stupněm čistoty a to ve všech použitých základních elektrolytech. V základním elektrolytu BGE I i BGE V byly v tomto preparátu zjištěny dvě neidentifikované příměsi a jeho stupeň čistoty dosáhl pouze ~83,43 % v BGE V a ~84,09 % v BGE I (viz **obrázky 2E** a **2F**).

Z výsledků analýz je zřejmé, že se mohou vyskytovat rozdíly ve stanoveném stupni čistoty v závislosti na složení základního elektrolytu a pro spolehlivé určení stupně čistoty je proto nezbytné provést analýzu daného vzorku ve více základních elektrolytech.

Nejvyšší separační účinnosti CE analýz pro jednotlivé peptidy byly dosaženy v základním elektrolytu BGE IX, přičemž nejvyšší separační účinnosti bylo dosaženo pro peptid HAL-1/7 a to 236 000 teoretických pater na jeden metr (TP/m). Naopak nejnižší separační účinnosti vykazoval v průměru základní elektrolyt BGE V a pro některé peptidy také BGE III. Nejnižší hodnota separační účinnosti náležela peptidu HAL-1/24 v základním elektrolytu BGE III a dosahovala pouze 1900 TP/m. V základním elektrolytu BGE I byly pro jednotlivé peptidy dosaženy nižší i vyšší hodnoty separačních účinností v rozsahu od 21 000 TP/m do 178 000 TP/m. Ve sloupcovém grafu na **obrázku 3** lze vidět největší rozdíly separačních účinností v základních elektrolytech BGE I, BGE III, BGE V a BGE IX pro vybrané peptidy HAL-1/7, HAL-1/8, HAL-1/24 a HAL-1/25. Na **obrázku 4** jsou ukázány elektroforegramy peptidu HAL-1/7 v BGE IX (**obrázek 4A**) s nejvyšší naměřenou účinností a peptidu HAL-1/24 v BGE III s nejnižší účinností (**obrázek 4B**), na kterých lze vidět výrazný rozdíl v šířce píků těchto peptidů a tudíž i v dosažených separačních účinnostech.

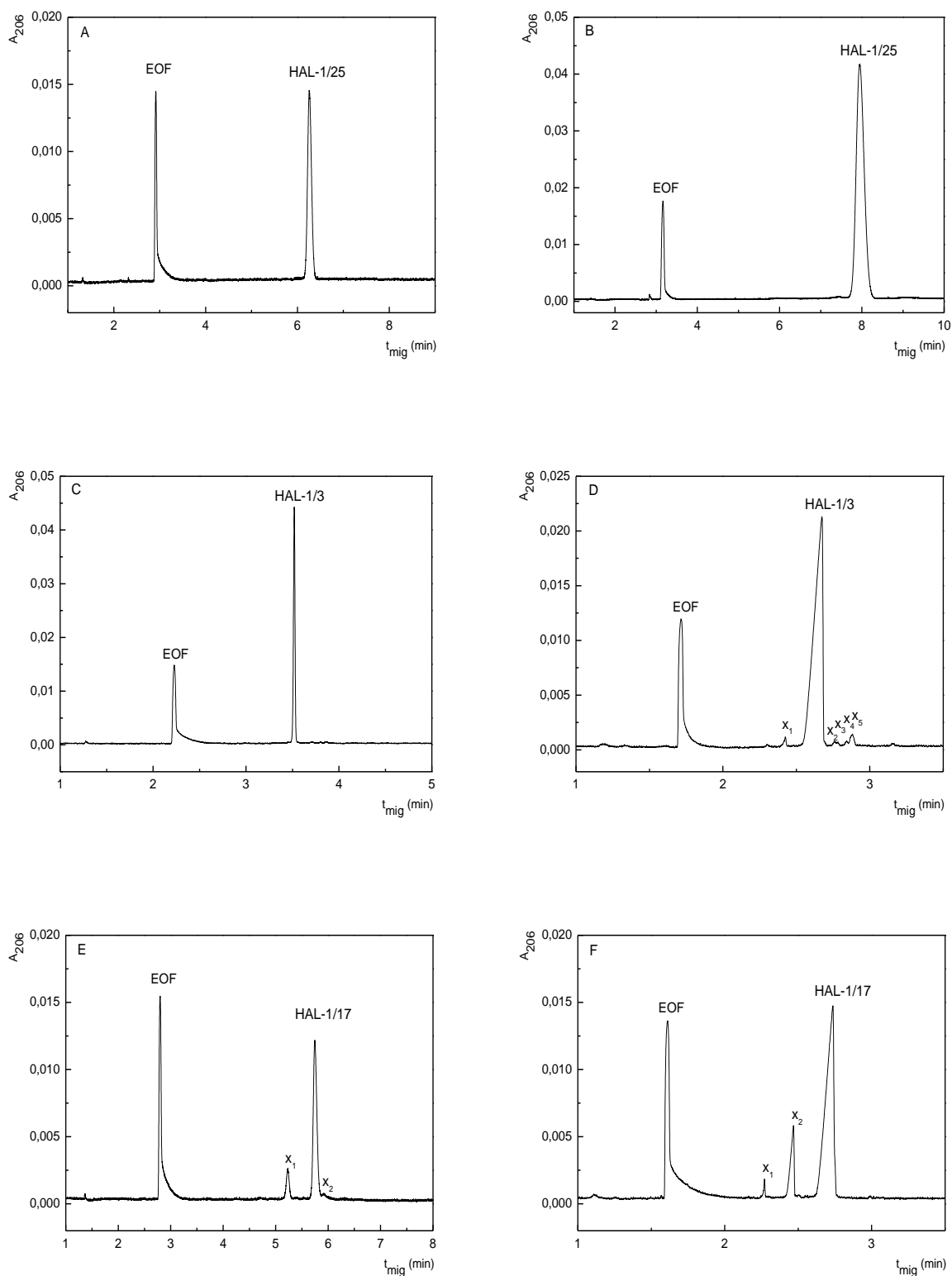
Tabulka 4: Stupeň čistoty, P_{CA} , jednotlivých antimikrobiálních peptidů v různých základních elektrolytech (BGE); složení BGE je uvedeno v tab. 2.

Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$	$(P_{CA} \pm SD) \%$				
					BGE VIII	BGE I	BGE III	BGE V	BGE IX
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	100,00 ± 0,00	97,06 ± 0,46	/	/	96,19 ± 0,23
HAL-1/22	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	99,91 ± 0,09	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	96,24 ± 0,11	95,36 ± 0,60
HAL-1/24	MWSKILGHLIR-NH ₂	1351,8	4	2,96	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	97,88 ± 0,50	96,78 ± 0,35
HAL-1/25	WSKILGHLIR-NH ₂	1220,8	4	3,28	97,67 ± 0,82	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	99,18 ± 0,07	95,91 ± 0,16
HAL-1/27	GMWSKILGHL-NH ₂	1139,6	3	2,63	96,63 ± 0,86	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	97,40 ± 0,04	95,44 ± 0,07
HAL-1/4	GMWSKILGHLKR-NH ₂	1423,8	5	3,51	98,21 ± 0,12	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	96,95 ± 0,19	95,93 ± 0,01
HAL-1/9	GMWSKILGKLIR-NH ₂	1399,9	4	2,86	97,01 ± 0,12	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	96,32 ± 0,22	95,40 ± 0,15
HAL-1/18	GMWSKILKHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38	93,41 ± 0,80	100,00 ± 0,00	99,15 ± 0,33	95,40 ± 0,27	93,29 ± 0,35
HAL-1/5	GMWKKILGHLIR-NH ₂	1449,9	5	3,45	98,03 ± 0,51	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	98,32 ± 0,06	98,01 ± 0,34
HAL-1/12	GKWSKILGHLIR-NH ₂	1405,9	5	3,56	95,55 ± 0,97	100,00 ± 0,00	98,05 ± 0,74	97,69 ± 0,12	94,33 ± 0,89
HAL-1/17	KMWSKILGHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38	79,56 ± 0,00	84,09 ± 0,13	81,64 ± 0,52	83,43 ± 0,06	79,03 ± 0,75
HAL-1/20	GKWSKILGKLIR-NH ₂	1396,9	5	3,58	94,73 ± 0,20	99,22 ± 0,09	98,25 ± 0,02	95,79 ± 0,20	94,22 ± 0,46
HAL-1/19	GKWKKILGHLIR-NH ₂	1446,9	6	4,15	94,15 ± 0,31	99,07 ± 0,09	97,82 ± 0,03	93,63 ± 0,87	96,89 ± 1,35

Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$	$(P_{CA} \pm SD) \%$				
					BGE VIII	BGE I	BGE III	BGE V	BGE IX
HAL-1/21	GKW K KILG K LIR-NH ₂	1438,0	6	4,17	90,22 ± 1,20	97,32 ± 0,28	95,29 ± 0,47	91,96 ± 0,09	96,71 ± 0,80
HAL-1/2	GMWSKILG P LIR-NH ₂	1368,8	3	2,19	93,08 ± 0,14	98,52 ± 0,14	98,19 ± 0,06	92,46 ± 0,04	98,39 ± 0,25
HAL-1/1	GMWSKIL P H L IR-NH ₂	1448,8	4	2,76	100,00 ± 0,00	98,54 ± 0,11	97,15 ± 0,91	96,36 ± 0,26	100,00 ± 0,00
HAL-1/3	GMWSKIP G H L IR-NH ₂	1392,8	4	2,87	98,13 ± 0,45	99,90 ± 0,00	94,64 ± 0,77	96,07 ± 0,11	100,00 ± 0,00
HAL-1/11	GMWP K ILG H LIR-NH ₂	1418,8	4	2,82	96,38 ± 0,12	98,02 ± 0,38	99,27 ± 0,52	93,86 ± 0,16	97,47 ± 0,24
HAL-1/28	GMWSKIM e L G H L IR-NH ₂	1422,8	4	2,81	93,28 ± 0,12	95,12 ± 0,31	96,54 ± 0,28	92,92 ± 0,31	96,18 ± 0,16
HAL-1/7	GMWSKIL G H L IR-NH ₂	1408,8	4	2,84	97,48 ± 0,16	99,38 ± 0,00	97,74 ± 0,12	96,94 ± 0,11	98,39 ± 0,14
HAL-1/8	GMWSK L G H LIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	91,11 ± 0,49	95,89 ± 1,24	100,00 ± 0,00	91,08 ± 0,37	96,17 ± 0,50
HAL-1/29	GMWS K ILG H LIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	95,18 ± 0,49	96,80 ± 0,42	97,73 ± 1,46	96,17 ± 0,48	97,66 ± 0,56
HAL-1/15	GMWSK L L G H L LIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	97,76 ± 0,01	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	97,08 ± 0,20	99,11 ± 0,09
HAL-1/13	KMWSK K L G H L IR-NH ₂	1494,9	6	4,01	91,12 ± 0,36	96,59 ± 0,77	94,92 ± 0,77	92,31 ± 0,45	98,67 ± 0,11
HAL-1/14	GMWSK K L K H L IR-NH ₂	1494,9	6	4,01	91,95 ± 0,68	96,36 ± 1,30	96,60 ± 0,53	92,31 ± 0,66	99,65 ± 0,35
HAL-1/16	GMWSKMe L G H Me L IR-NH ₂	1436,8	4	2,78	92,15 ± 0,51	93,92 ± 0,03	92,84 ± 0,14	88,99 ± 0,32	94,63 ± 0,75

Tučné zvýraznění aminokyselinového zbytku v sekvenci peptidu značí záměnu oproti aminokyselině původního řetězce, zvýraznění kurzívou značí D-konformaci aminokyseliny a zvýraznění tučně i kurzívou značí náhradu aminokyseliny v D-konformaci oproti aminokyselině v původním řetězci

M_r – relativní molekulová hmotnost, q – počet elementárních nábojů peptidu



Obrázek 2: Analýzy analog halictinu, peptidů HAL-1/3, HAL-1/17 a HAL-1/25 metodou CZE v BGE I, BGE III a BGE V.

(A) HAL-1/25 ($P_{CA} \sim 100\%$) v BGE I; (B) HAL-1/25 ($P_{CA} \sim 100\%$) v BGE III; (C) HAL-1/3 ($P_{CA} \sim 99,90\%$) v BGE I; (D) HAL-1/3 ($P_{CA} \sim 96,07\%$) v BGE V; (E) HAL-1/17 ($P_{CA} \sim 84,09\%$) v BGE I; (F) HAL-1/17 ($P_{CA} \sim 83,43\%$) v BGE V;

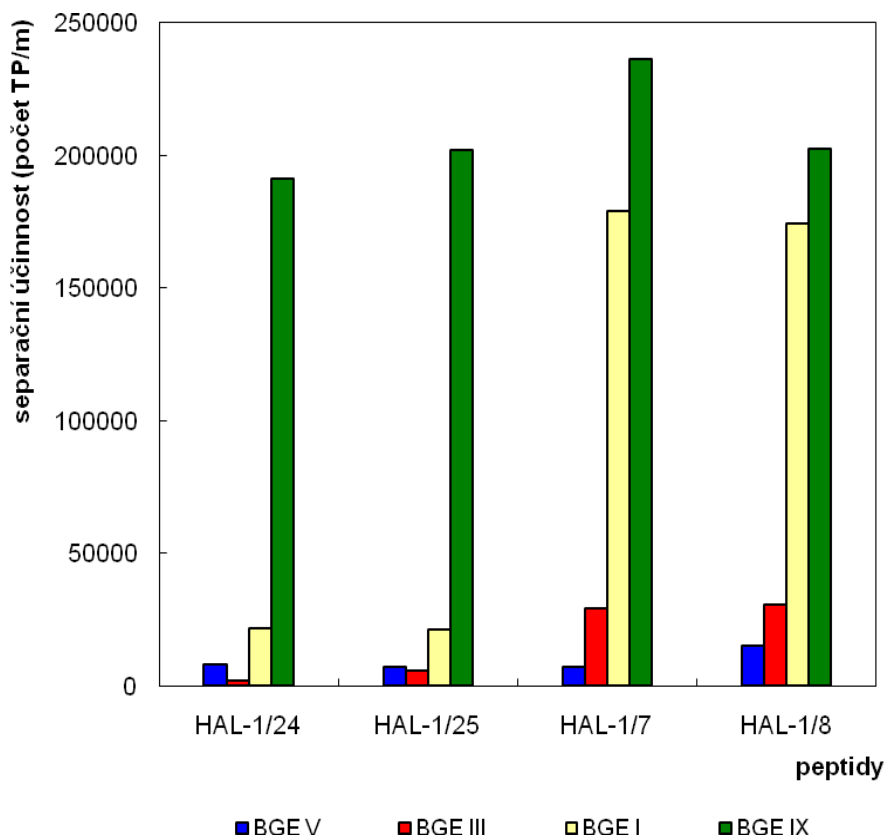
x – neidentifikované příměsi; A_{206} – absorbance při vlnové délce 206 nm; dávkování 5 mbar, 5 s; Složení BGE viz tab. 2; analyty viz tab. 1; experimentální podmínky viz kap. 6.3 a tab. 2.

Tabulka 5: Separační účinnost CE analýz pro jednotlivé peptidy v různých základních elektrolytech (BGE); složení BGE je uvedeno v tab. 2.

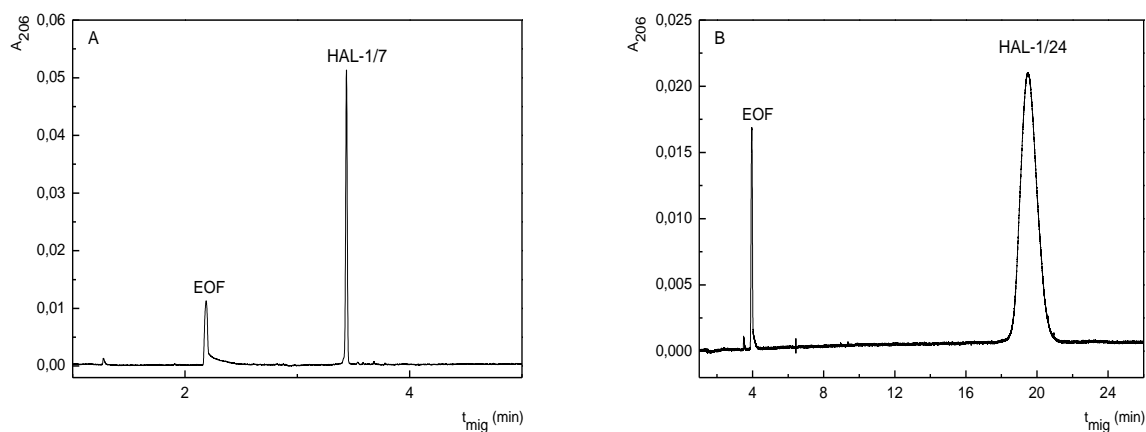
Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$	Separační účinnost (počet TP/m)				
					BGE VIII	BGE I	BGE III	BGE V	BGE IX
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	18800	175200	/	/	152500
HAL-1/22	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	18600	23500	3200	10300	155600
HAL-1/24	MWSKILGHLIR-NH ₂	1351,8	4	2,96	19600	21600	1900	8100	191400
HAL-1/25	WSKILGHLIR-NH ₂	1220,8	4	3,28	22000	21400	5800	7400	202000
HAL-1/27	GMWSKILGHL-NH ₂	1139,6	3	2,63	33100	28900	6900	6500	121800
HAL-1/4	GMWSKILGHLKR-NH ₂	1423,8	5	3,51	39900	22400	8500	7300	103500
HAL-1/9	GMWSKILGKLIR-NH ₂	1399,9	4	2,86	124800	32900	18000	10500	192100
HAL-1/18	GMWSKILKHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38	94500	30700	24100	9300	131300
HAL-1/5	GMWKKILGHLIR-NH ₂	1449,9	5	3,45	63900	34200	19900	5100	91600
HAL-1/12	GKWSKILGHLIR-NH ₂	1405,9	5	3,56	94800	44700	31700	7000	119400
HAL-1/17	KMWSKILGHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38	135400	30800	55800	9400	151800
HAL-1/20	GKWSKILGKLIR-NH ₂	1396,9	5	3,58	95400	41800	34800	7600	132600
HAL-1/19	GKWKKILGHLIR-NH ₂	1446,9	6	4,15	61800	39800	17800	6000	86600

Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$	Separační účinnost (počet TP/m)				
					BGE VIII	BGE I	BGE III	BGE V	BGE IX
HAL-1/21	G KW KILG KL LIR-NH ₂	1438,0	6	4,17	61500	35800	19800	6900	94900
HAL-1/2	GMWSKILG PL LIR-NH ₂	1368,8	3	2,19	81000	85900	40200	13900	97500
HAL-1/1	GMWSKIL PH LIR-NH ₂	1448,8	4	2,76	22700	109800	72800	7600	153000
HAL-1/3	GMWSKIP GH LIR-NH ₂	1392,8	4	2,87	77800	150200	111100	8300	159000
HAL-1/11	GMW PK ILGHLIR-NH ₂	1418,8	4	2,82	110000	125000	20500	8300	135200
HAL-1/28	GMWSK IMeL GHLIR-NH ₂	1422,8	4	2,81	142800	175500	27000	9400	164100
HAL-1/7	GMWSK IL GHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	165800	178800	29100	7100	236000
HAL-1/8	GMWSK L GHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	137100	174200	30600	15100	202300
HAL-1/29	GMWS K ILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	160100	150200	29800	8200	169200
HAL-1/15	GMWSK LL GHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	185900	151000	29200	9000	146900
HAL-1/13	KMWSK KL GHLIR-NH ₂	1494,9	6	4,01	72900	68200	23300	7800	98000
HAL-1/14	GMWSK KL KHLIR-NH ₂	1494,9	6	4,01	73700	69400	22100	7000	99100
HAL-1/16	GMWSK MeL G HMe LIR-NH ₂	1436,8	4	2,78	73400	68900	23600	8900	86500

Tučné zvýraznění aminokyselinového zbytku v sekvenci peptidu značí záměnu oproti aminokyselině původního řetězce, zvýraznění kurzívou značí D-konformaci aminokyseliny a zvýraznění tučně i kurzívou značí náhradu aminokyseliny v D-konformaci oproti aminokyselině v původním řetězci
 M_r – relativní molekulová hmotnost, q – počet elementárních nábojů peptidu



Obrázek 3: Největší rozdíly separačních účinností v základních elektrolytech BGE I, BGE III, BGE V a BGE IX pro vybrané peptidy HAL-1/7, HAL-1/8, HAL-1/24 a HAL-1/25.



Obrázek 4: Analýza analog halictinu metodou CZE v BGE IX a BGE III

(A) HAL-1/7 ($N=236\ 000$ TP/m) v BGE IX; (B) HAL-1/24 ($N=1900$ TP/m) v BGE III

A_{206} – absorbance při vlnové délce 206 nm; dávkování vzorku 5 mbar, 5 s; Složení BGE viz tab. 2; analyty viz tab. 1; experimentální podmínky viz kap. 6.3 a tab. 3.

7.1.3. Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Citlivost CZE analýzy je závislá hlavně na typu použitého detektoru. Měřené látky byly detekovány UV-absorpčním fotometrickým detektorem při vlnové délce 206 nm. Šum, n , odezva detektoru, R_D , poměr signál/šum, R_D/n , citlivost, S_D , mez detekce, LOD , a mez stanovitelnosti, LOQ , jsou parametry detektoru, které byly určeny pro všechny analyzované peptidy metodou CZE v BGE IX. Koncentrace analytů byly přepočteny na efektivní koncentrace, c_{eff} , podle hodnot stupňů čistoty určených v kapitole 7.1.2 a bylo s nimi počítáno při určování parametrů detektoru.

Citlivost detektoru, S_D , lze vyjádřit vztahem:

$$S_D = \frac{R_D}{c} \quad (22)$$

kde R_D je napěťová odezva detektoru (V) a c je koncentrace analytu ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Limit detekce, LOD , a limit stanovitelnosti, LOQ , jsou dány vztahy:

$$LOD = 3 \frac{n}{S_D} \quad (23)$$

$$LOQ = 10 \frac{n}{S_D} \quad (24)$$

kde n značí šum (V) a S_D je citlivost detektoru ($\text{V} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$).

V **tabulce 6 a 7** je z porovnání jednotlivých parametrů u základních elektrolytů BGE V a BGE IX vidět, že největší citlivosti detektoru, S_D , bylo dosaženo u většiny peptidů v BGE IX (30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS, 0,1 mM DDAB), protože tento elektrolyt neabsorbuje záření v UV oblasti. V základním elektrolytu BGE V (0,5 M kyselina octová; 0,1 mM DDAB), který částečně záření v UV oblasti absorbuje, byly citlivosti detektoru u většiny peptidů nižší.

Z porovnání hodnot meze detekce a meze stanovitelnosti u analog halictinu v BGE V a IX je zřejmé, že v základním elektrolytu BGE IX, neabsorbujícím v UV oblasti záření, byly hodnoty LOD a LOQ všech peptidů nižší než v absorbujícím elektrolytu BGE V.

Tabulka 6: Charakteristiky UV-fotometrického detektoru při vlnové délce 206 nm stanovené při analýze analog halictinu metodou CZE v BGE V.

Analyt	c (mmol·dm ⁻³)	c_{eff} (mmol·dm ⁻³)	R_D (mV)	R_D/n (-)	S_D (V·mol ⁻¹ ·dm ³)	LOD (μmol·dm ⁻³)	LOQ (μmol·dm ⁻³)
HAL-1	0,64	0,61	/	/	/	/	/
HAL-1/22	0,85	0,81	204,99	204,99	250,07	12,0	40,0
HAL-1/24	1,00	0,97	223,96	223,96	229,10	13,1	43,6
HAL-1/25	1,02	0,98	232,86	232,86	229,28	13,1	43,6
HAL-1/27	1,14	1,09	258,69	258,69	232,82	12,9	43,0
HAL-1/4	0,91	0,88	210,05	210,05	237,28	12,6	42,1
HAL-1/9	0,75	0,72	184,48	184,48	255,35	11,7	39,2
HAL-1/18	0,78	0,72	179,68	179,68	242,37	12,4	41,3
HAL-1/5	1,45	1,42	287,79	287,79	202,09	14,8	49,5
HAL-1/12	0,96	0,91	204,48	204,48	217,98	13,8	45,9
HAL-1/17	0,81	0,64	173,89	173,89	257,05	11,7	38,9
HAL-1/20	0,89	0,84	195,73	195,73	228,34	13,1	43,8
HAL-1/19	0,86	0,84	173,78	173,78	214,82	14,0	46,5
HAL-1/21	0,80	0,77	154,89	154,89	210,61	14,2	48,5
HAL-1/2	0,84	0,83	250,50	250,50	322,48	9,30	31,0
HAL-1/1	0,93	0,93	234,71	234,71	261,39	11,5	38,3
HAL-1/3	0,90	0,90	234,35	234,35	271,81	11,0	36,8
HAL-1/11	0,78	0,76	223,69	223,69	307,39	9,80	32,5
HAL-1/28	0,98	0,95	241,97	241,97	264,65	11,3	37,8
HAL-1/7	0,96	0,94	281,75	281,75	303,31	9,94	33,0
HAL-1/8	0,82	0,78	165,84	165,84	223,06	13,4	44,8
HAL-1/29	0,82	0,80	254,69	254,69	324,42	9,20	30,8
HAL-1/15	0,96	0,95	243,76	243,76	262,02	11,4	38,2
HAL-1/13	0,74	0,73	166,21	166,21	244,71	12,3	40,9
HAL-1/14	0,90	0,90	173,33	173,33	207,94	14,4	48,1
HAL-1/16	0,80	0,76	218,14	218,14	306,25	9,81	32,7

n - šum ~ 1 mV, c_{eff} - efektivní koncentrace, R_D - odezva detektoru, S_D - citlivost detektoru, LOD - mez detekce, LOQ - mez stanovitelnosti

Tabulka 7: Charakteristiky UV-fotometrického detektoru při vlnové délce 206 nm stanovené při analýze analog halictinu metodou CZE v BGE IX.

Analyt	c (mmol·dm ⁻³)	c_{eff} (mmol·dm ⁻³)	R_D (mV)	R_D/n (-)	S_D (V·mol ⁻¹ ·dm ³)	LOD (μmol·dm ⁻³)	LOQ (μmol·dm ⁻³)
HAL-1	0,64	0,61	221,70	221,70	347,03	8,60	28,8
HAL-1/22	0,85	0,81	340,99	340,99	400,32	7,49	25,0
HAL-1/24	1,00	0,97	543,92	543,92	544,65	5,51	18,4
HAL-1/25	1,02	0,98	483,75	483,75	472,45	6,35	21,2
HAL-1/27	1,14	1,09	504,20	504,20	441,99	6,79	22,6
HAL-1/4	0,91	0,88	407,32	407,32	446,11	6,72	22,4
HAL-1/9	0,75	0,72	333,38	333,38	444,47	6,75	22,5
HAL-1/18	0,78	0,72	367,57	367,57	473,01	6,34	21,1
HAL-1/5	1,45	1,42	541,79	541,79	374,07	8,02	26,7
HAL-1/12	0,96	0,91	388,94	388,94	405,05	7,41	24,7
HAL-1/17	0,81	0,64	350,89	350,89	432,73	6,93	23,1
HAL-1/20	0,89	0,84	343,33	343,33	383,68	7,82	26,1
HAL-1/19	0,86	0,84	277,30	277,30	320,98	9,35	31,2
HAL-1/21	0,80	0,77	253,60	253,60	317,11	9,46	31,5
HAL-1/2	0,84	0,83	302,11	302,11	359,59	8,34	27,8
HAL-1/1	0,93	0,93	420,66	420,66	451,45	6,65	22,2
HAL-1/3	0,90	0,90	410,99	410,99	457,94	6,55	21,8
HAL-1/11	0,78	0,76	303,09	303,09	390,92	7,67	25,6
HAL-1/28	0,98	0,95	515,27	515,27	523,67	5,73	19,1
HAL-1/7	0,96	0,94	574,42	574,42	599,44	5,00	16,7
HAL-1/8	0,82	0,78	190,21	190,21	233,01	12,87	42,9
HAL-1/29	0,82	0,80	494,71	494,71	606,04	4,95	16,5
HAL-1/15	0,96	0,95	440,22	440,22	459,39	6,53	21,8
HAL-1/13	0,74	0,73	274,89	274,89	373,57	8,03	26,8
HAL-1/14	0,90	0,90	280,59	280,59	310,70	9,66	32,2
HAL-1/16	0,80	0,76	240,74	240,74	300,77	9,97	33,2

n - šum ~ 1 mV, c_{eff} - efektivní koncentrace, R_D - odezva detektoru, S_D – citlivost detektoru, LOD – mez detekce, LOQ – mez stanovitelnosti

7.1.4. Korekce efektivních elektroforetických pohyblivostí na referenční teplotu 25 °C

Přístroj domácí výroby ÚOCHB AV ČR, na kterém byla provedena všechna měření, není vybaven aktivním chlazením kapiláry, což znamená, že všechna měření byla prováděna při aktuální laboratorní teplotě. Během doby měření byla okolní teplota v rozmezí 22-26,5 °C. Z tohoto důvodu a kvůli tvorbě Jouleova tepla v kapiláře bylo potřeba stanovené elektroforetické pohyblivosti analytů přepočítat na referenční teplotu 25 °C pro jejich vzájemné porovnávání.

Pomocí 20 mM vodného roztoku chloridu draselného o známé elektrické vodivosti byl proměřen elektrický proud při širokém rozsahu vloženého napětí 1–22 kV, jinak při stejných experimentálních podmínkách jako při ostatních CE měřeních, pouze s výjimkou toho, že kapilára byla naplněna roztokem KCl. Odpor tohoto elektrolytu, R_{BGE} , byl vypočítán z poměru vloženého elektrického napětí k naměřenému elektrickému proudu. V rozsahu od 20 do 30 °C se odpor tohoto elektrolytu snižuje přibližně o 2 % na stupeň Celsia.

Přírůstek teploty, ΔT , tj. rozdíl teploty uvnitř kapiláry a okolní teploty, byl vypočítán ze změn elektrického odporu, R_{BGE} , při určitém příkonu vkládaném na kapiláru podle vztahu:

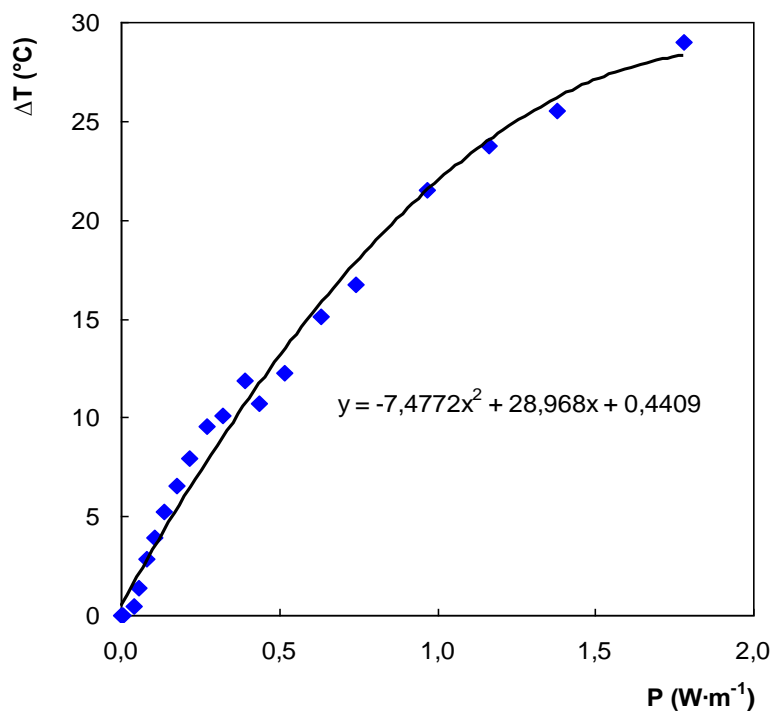
$$\Delta T = \frac{R_{BGE,0} - R_{BGE}}{0,02R_{BGE,0}} \quad (18)$$

kde $R_{BGE,0}$ je odpor při nízkém příkonu, kdy je ohřev roztoku zanedbatelný a R_{BGE} je odpor při daném příkonu.

Na **obrázku 5** je graficky znázorněna závislost přírůstku teploty, ΔT , na elektrickém příkonu, P , vloženém na kapiláru. Z rovnice této závislosti je po dosazení hodnot příkonu vypočítán přírůstek teploty a tato hodnota je využita pro výpočet efektivních elektroforetických pohyblivostí $m_{eff,25}$, jež jsou vztaženy k referenční teplotě s nárůstem efektivní pohyblivosti o 2 % na 1 °C podle následujícího vztahu:

$$m_{eff,25} = m_{eff,T_i} [1 - 0,020(T_0 + \Delta T - 25)] \quad (19)$$

kde $m_{eff,25}$ je efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C, m_{eff,T_i} je efektivní elektroforetická pohyblivost při aktuální teplotě během analýzy, T_0 je okolní teplota během měření [53].



Obrázek 5: Graf závislosti nárůstu teploty, ΔT , roztoku BGE uvnitř kapiláry oproti okolí na elektrickém příkonu, P , vztaženém na jednotku délky kapiláry.

7.1.5. Stanovení efektivní elektroforetické pohyblivosti

Efektivní elektroforetická pohyblivost všech analyzovaných analog halictinu, m_{eff} , byla určena z měření jejich migračního času a z migračního času neutrálního EOF markeru v jednotlivých základních elektrolytech BGE. Ve všech experimentech byl jako EOF

marker použit DMSO a efektivní elektroforetická pohyblivost byla vypočtena podle vztahu:

$$m_{eff,i} = \left(\frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \cdot \frac{L_{eff} \cdot L_{tot}}{U} \quad (20)$$

kde $t_{mig,i}$ je migrační čas daného analytu, t_{eof} je migrační čas markeru elektroosmotického toku, L_{eff} je efektivní délka kapiláry (k detektoru), L_{tot} je celková délka kapiláry a U je vložené napětí. Pro případné analýzy těchto látek na přístrojích jiného typu je velmi důležitá korekce vypočítaných hodnot m_{eff} na efektivní pohyblivosti při 25 °C (viz kapitola 7.1.3).

Elektroforetické pohyblivosti analog halictinu a elektroosmotický tok byly měřeny v různých základních elektrolytech, jejichž složení je uvedeno v **tabulce 2**. V **tabulce 8** jsou uvedeny efektivní elektroforetické pohyblivosti jednotlivých peptidů při 25 °C v jednotlivých elektrolytech BGE.

Nejvyšší hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí analog halictinu byly zjištěny u analýz v BGE V (0,5 M kyselina octová; 0,1 mM DDAB, pH 2,52). Naopak nejnižší hodnoty efektivních pohyblivostí byly nalezeny při analýzách v BGE III (50 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS; 0,1 mM DDAB, pH 2,32). V základních elektrolytech BGE I, BGE VIII a BGE IX o složení 30 mM kyselina fosforečná; 25 mM TRIS, ve kterých se měnila koncentrace DDAB v rozsahu 0,05-0,4 mM, byl rozdíl v hodnotách efektivních pohyblivostí téměř zanedbatelný.

Porovnáním efektivních pohyblivostí podle náboje analytů nebo podle poměru náboje a relativní molekulové hmotnosti analytů bylo zjištěno, že nejvyšší efektivní pohyblivosti mají peptidy, které obsahují v sekvenci více bazických aminokyselin (lysinů) a mají nejvyšší hodnotu poměru počtu elementárních nábojů a relativní molekulové hmotnosti.

Tabulka 8: Efektivní elektroforetické pohyblivosti analog halictinu korigované na referenční teplotu 25 °C, $m_{eff,25}$.

Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$	$(m_{eff, 25} \pm SD) \cdot 10^9 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$				
					BGE VIII	BGE I	BGE III	BGE V	BGE IX
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	21,36 ± 0,15	21,07 ± 0,10	/	/	21,49 ± 0,08
HAL-1/22	GMWSKILGHLIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	21,56 ± 0,03	21,98 ± 0,02	19,62 ± 0,23	30,13 ± 0,22	21,22 ± 0,01
HAL-1/24	MWSKILGHLIR-NH ₂	1351,8	4	2,96	21,68 ± 0,10	22,06 ± 0,02	20,54 ± 0,16	31,09 ± 0,33	21,60 ± 0,01
HAL-1/25	WSKILGHLIR-NH ₂	1220,8	4	3,28	22,76 ± 0,04	22,73 ± 0,11	19,46 ± 0,31	32,26 ± 0,20	22,08 ± 0,03
HAL-1/27	GMWSKILGHL-NH ₂	1139,6	3	2,63	18,89 ± 0,03	19,05 ± 0,01	16,56 ± 1,10	26,35 ± 0,09	18,82 ± 0,17
HAL-1/4	GMWSKILGHLKR-NH ₂	1423,8	5	3,51	24,13 ± 0,01	24,62 ± 0,03	20,06 ± 0,15	35,90 ± 0,49	24,09 ± 0,19
HAL-1/9	GMWSKILGKLIR-NH ₂	1399,9	4	2,86	21,26 ± 0,15	21,11 ± 0,26	17,36 ± 0,12	29,73 ± 0,60	21,24 ± 0,05
HAL-1/18	GMWSKILKHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38	23,67 ± 0,43	23,52 ± 0,13	18,97 ± 0,12	35,53 ± 0,11	23,52 ± 0,20
HAL-1/5	GMWKKILGHLIR-NH ₂	1449,9	5	3,45	23,76 ± 0,03	23,72 ± 0,24	18,69 ± 0,25	36,89 ± 0,16	23,65 ± 0,16
HAL-1/12	GKWSKILGHLIR-NH ₂	1405,9	5	3,56	24,42 ± 0,27	23,89 ± 0,25	18,97 ± ,021	36,73 ± 0,38	23,89 ± 0,01
HAL-1/17	KMWSKILGHLIR-NH ₂	1479,9	5	3,38	23,54 ± 0,20	23,96 ± 0,20	18,48 ± 0,06	35,73 ± 0,29	23,70 ± 0,24
HAL-1/20	GKWSKILGKLIR-NH ₂	1396,9	5	3,58	24,31 ± 0,24	24,47 ± 0,02	19,30 ± 0,02	36,26 ± 0,25	24,25 ± 0,01
HAL-1/19	GKWKKILGHLIR-NH ₂	1446,9	6	4,15	26,19 ± 0,28	26,63 ± 0,13	21,00 ± 0,06	40,89 ± 0,48	26,92 ± 0,26

Peptid	Sekvence	M_r	q	$(q/M_r) \cdot 10^3$	$(m_{eff, 25} \pm SD) \cdot 10^9 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$				
					BGE VIII	BGE I	BGE III	BGE V	BGE IX
HAL-1/21	G KW KILG K LIR-NH ₂	1438,0	6	4,17	26,53 ± 0,20	26,25 ± 0,04	21,06 ± 0,04	40,76 ± 0,20	26,06 ± 0,13
HAL-1/2	GMWSKILG P LIR-NH ₂	1368,8	3	2,19	16,79 ± 0,03	16,82 ± 0,07	13,54 ± 0,07	23,42 ± 0,24	17,41 ± 0,17
HAL-1/1	GMWSKIL P H L IR-NH ₂	1448,8	4	2,76	20,33 ± 0,09	20,46 ± 0,04	16,45 ± 0,10	29,71 ± 0,21	20,42 ± 0,04
HAL-1/3	GMWSKIP G H L IR-NH ₂	1392,8	4	2,87	20,94 ± 0,06	21,04 ± 0,10	16,94 ± 0,15	30,80 ± 0,13	21,01 ± 0,09
HAL-1/11	GMW P KILG H LIR-NH ₂	1418,8	4	2,82	20,83 ± 0,14	20,46 ± 0,13	17,52 ± 0,44	30,61 ± 0,39	20,59 ± 0,03
HAL-1/28	GMWSKIM e L G H L IR-NH ₂	1422,8	4	2,81	21,42 ± 0,06	21,10 ± 0,15	17,71 ± 0,06	30,68 ± 0,26	21,20 ± 0,13
HAL-1/7	GMWSKIL G H L IR-NH ₂	1408,8	4	2,84	21,76 ± 0,05	21,19 ± 0,10	17,77 ± 0,10	31,47 ± 0,08	21,10 ± 0,31
HAL-1/8	GMWSKIL G H L IR-NH ₂	1408,8	4	2,84	21,09 ± 0,12	20,92 ± 0,08	17,40 ± 0,02	29,82 ± 0,17	20,52 ± 0,42
HAL-1/29	GMWS K ILG H LIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	21,40 ± 0,12	21,49 ± 0,24	17,37 ± 0,16	30,46 ± 0,18	20,50 ± 0,03
HAL-1/15	GMWSK L L G H L LIR-NH ₂	1408,8	4	2,84	20,90 ± 0,04	21,32 ± 0,01	17,21 ± 0,05	30,26 ± 0,12	20,38 ± 0,05
HAL -1/13	KMWSK K L G H L IR-NH ₂	1494,9	6	4,01	25,75 ± 0,05	26,14 ± 0,02	20,94 ± 0,16	39,08 ± 0,18	25,49 ± 0,05
HAL-1/14	GMWSK K L K H L IR-NH ₂	1494,9	6	4,01	25,39 ± 0,27	25,75 ± 0,01	20,90 ± 0,03	39,86 ± 0,16	25,72 ± 0,02
HAL-1/16	GMWSKMe L G H Me L IR-NH ₂	1436,8	4	2,78	20,42 ± 0,03	20,96 ± 0,07	17,14 ± 0,07	28,97 ± 0,34	20,76 ± 0,31

Tučné zvýraznění aminokyselinového zbytku v sekvenci peptidu značí záměnu oproti aminokyselině původního řetězce, zvýraznění kurzívou značí D-konformaci aminokyseliny a zvýraznění tučně i kurzívou značí náhradu aminokyseliny v D-konformaci oproti aminokyselině v původním řetězci

M_r – relativní molekulová hmotnost, q – počet elementárních nábojů peptidu

7.1.6. Odhad modelu struktury peptidu

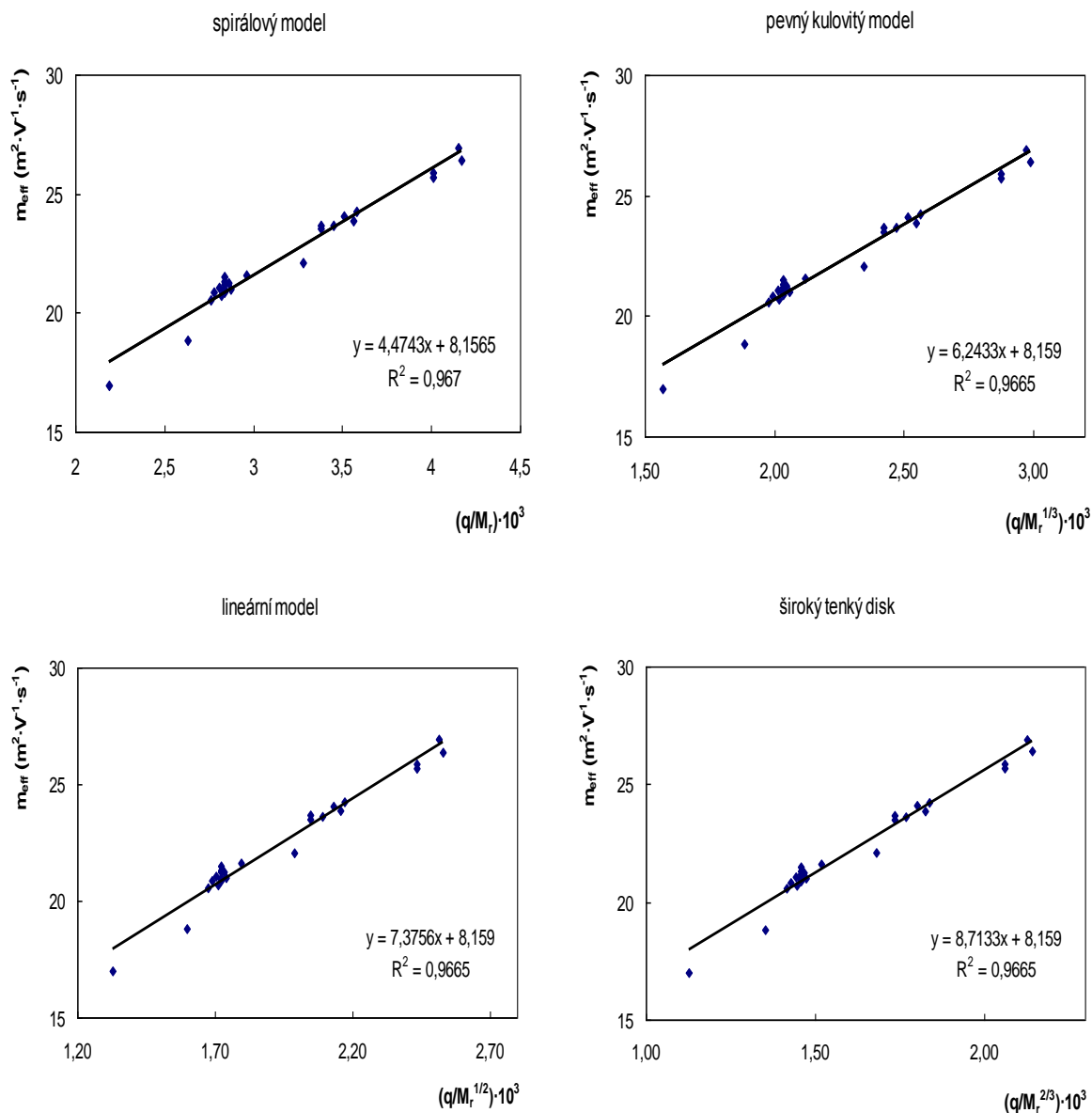
Existuje několik modelů pro odhad sekundární struktury peptidů, které jsou odvozeny ze vztahu mezi efektivní elektroforetickou pohyblivostí, m_{eff} , a poměrem náboje peptidu, q , k relativní molekulové hmotnosti, M_r , která je umocněná exponentem, f , (viz vztah 21). Exponent, f , je číslo, které odpovídá konkrétní struktuře peptidu (viz **tabulka 9**) [65,66].

$$m_{eff} = \frac{q}{M_r^f} \quad (21)$$

Tabulka 9: Modely struktury pro konkrétní exponenty relativní molekulové hmotnosti M_r^f .

M_r^f	model struktury
M_r^1	spirálový model
$M_r^{1/3}$	pevný kulovitý model
$M_r^{1/2}$	lineární model
$M_r^{2/3}$	široký tenký disk

Byly testovány čtyři modely korelace (viz **tabulka 9**) mezi efektivní elektroforetickou pohyblivostí peptidů a jejich náboji a relativními molekulovými hmotnostmi v základním elektrolytu BGE IX (30 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB, pH 2,85), BGE V (0,5 M kyselina octová, 0,1 mM DDAB, pH 2,52) a BGE III (50 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris, 0,1 mM DDAB, pH 2,32), ale struktura peptidů nemohla být jednoznačně určena, neboť korelační koeficienty všech těchto modelů byly velmi blízké, viz **obrázek 6**, kde jsou graficky znázorněny závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti na poměru náboje k relativní molekulové hmotnosti peptidů v BGE IX a viz **tabulka 10**, ve které jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů, R , a směrnic, k , pro elektrolyty BGE III, BGE V a BGE IX.



Obrázek 6: Grafické závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti na poměru náboje k relativní molekulové hmotnosti peptidů v BGE IX (30 mM H_3PO_4 , 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB, pH 2,85).

Tabulka 10: Korelační koeficienty a směrnice závislosti na M_r^f pro BGE III, V a IX.

BGE	M_r^1		$M_r^{1/3}$		$M_r^{1/2}$		$M_r^{2/3}$	
	k	R	k	R	k	R	k	R
BGE III	2,9933	0,7494	4,1764	0,7488	4,9338	0,7488	5,8286	0,7488
BGE V	8,5273	0,9636	11,866	0,9632	14,057	0,9632	16,606	0,9632
BGE IX	4,4743	0,9670	6,2433	0,9665	7,3756	0,9665	8,7133	0,9665

7.2. Separace analog halictinu

Základní elektrolyty BGE používané pro separaci analog halictinu byly vybrány na základě hodnot efektivních elektroforetických pohyblivostí při 25 °C získaných z předchozích analýz jednotlivých peptidů. Separace směsí analytů byly provedeny v režimu CZE a MEKC. Rozdělení analytů do směsí 1 – 5 bylo provedeno na základě naměřených hodnot efektivních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých analytů a podle strukturní podobnosti či podle nábojových rozdílů. Složení směsí je uvedeno v **tabulce 11**. Směs 1 byla tvořena peptidy s rozdíly v délce řetězce a náboji, směs 2 obsahovala peptidy s nábojovými rozdíly. Ve směsi 3 byly peptidy, v jejichž sekvenci byla jedna aminokyselina zaměněna za lysin, ve směsi 4 byla v sekvenci peptidů zaměněna aminokyselina methionin a další 1-2 aminokyseliny za lysin a směs 5 obsahovala peptidy, ve kterých byla jedna aminokyselina zaměněna za prolin.

Tabulka 11: Složení směsí 1 – 5 z jednotlivých peptidů.

	Směsi				
	1	2	3	4	5
Peptidy	HAL-1 GMWSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1 GMWSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1 GMWSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1 GMWSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1 GMWSKILGHLIR- NH ₂
	HAL-1/24 MWSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1/12 G K WSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1/4 GMWSKILGHL K R- NH ₂	HAL-1/12 G K WSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1/1 GMWSKIL P HLIR- NH ₂
	HAL-1/25 WSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1/19 G KW K ILGHLIR- NH ₂	HAL-1/9 GMWSKILG K LIR- NH ₂	HAL-1/19 G KW K ILGHLIR- NH ₂	HAL-1/2 GMWSKILG P LIR- NH ₂
	HAL-1/27 GMWSKILGHL- NH ₂	HAL-1/27 GMWSKILGHL- NH ₂	HAL-1/12 G K WSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1/20 G K WSKILG K LIR- NH ₂	HAL-1/3 GMWSKI P GHLIR- NH ₂
			HAL-1/17 K MWSKILGHLIR- NH ₂	HAL-1/21 G KW K ILG K LIR- NH ₂	HAL-1/11 GMW P KILGHLIR- NH ₂
			HAL-1/18 GMWSKIL K HLIR- NH ₂		

Tučné zvýraznění aminokyselinového zbytku v sekvenci peptidu značí záměnu oproti aminokyselině původního řetězce

Separace analog halictinu byla provedena v klasickém trisfosfátovém elektrolytu s přísady kationického tenzidu DDAB různé koncentrace pro metodu CZE a s přísady anionického SDS a kationických CTAB, DTAC různé koncentrace pro metodu MEKC. Přehled a složení použitých základních elektrolytů pro separaci směsí peptidů je v **tabulce 3**. Po porovnání základních elektrolytů bylo zjištěno, že nejlepší podmínky pro separaci směsí 1 – 5 se objevily v BGE IX (30 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB, pH 2,85) při separačním napětí 12 kV. Byly provedeny další analýzy směsí peptidů v tomto elektrolytu při separačním napětí 15 a 18 kV, ale v obou případech se jednalo o horší rozdělení peptidů. K základnímu elektrolytu BGE IX byly přidány tři druhy celulosy (0,1 % HEC, MHEC, MHPC). V elektrolytech s přísady 0,1 % MHEC a MHPC bylo rozdělení peptidů zhoršené a v případě přísady MHPC se navíc v záznamu vyskytovala spousta systémových píků a nepravidelností v základní linii.

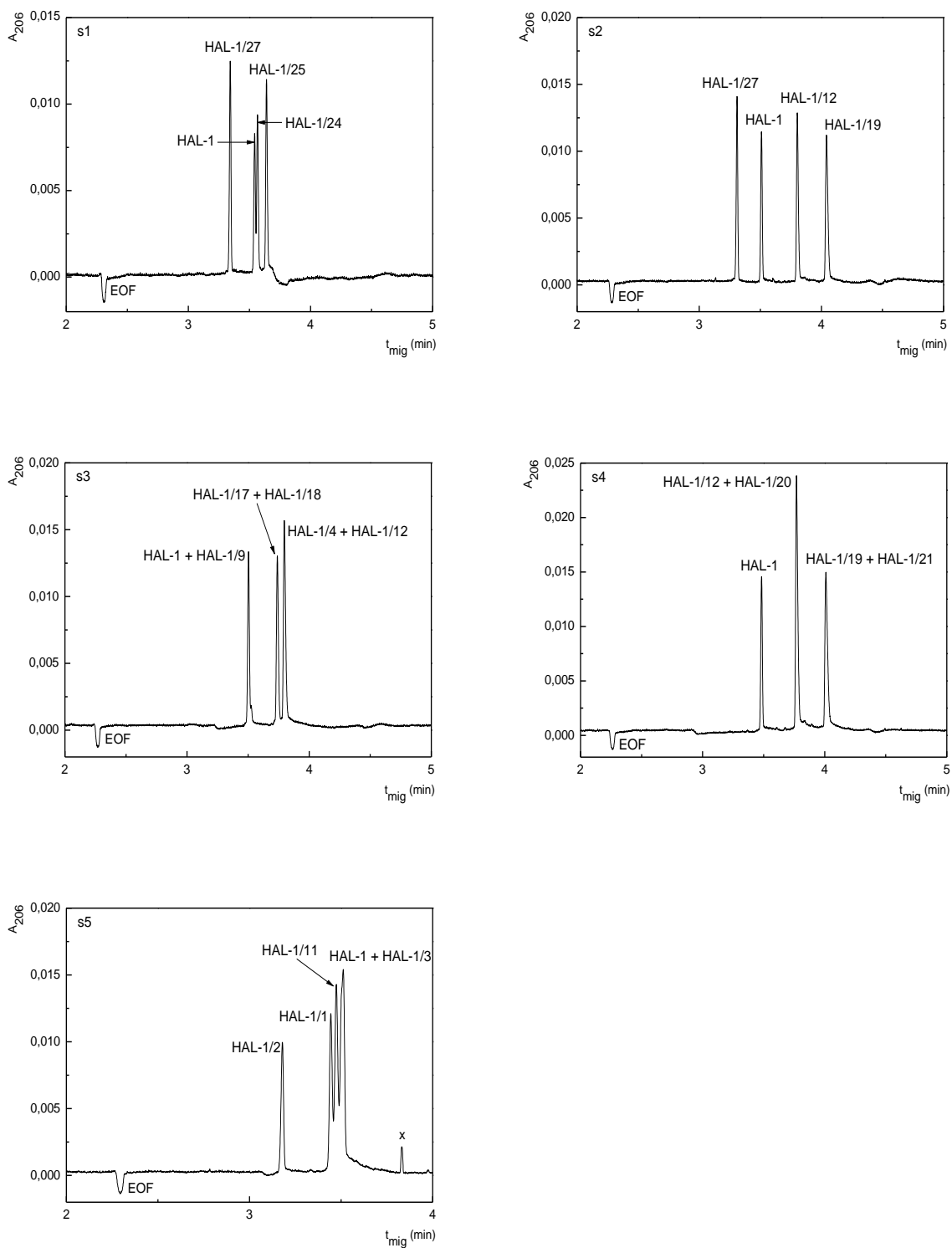
Nejlepší rozlišení separace bylo nalezeno v 30 mM kyselině fosforečné, 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB s přísadou 0,1 % HEC (pH 2,84). Docházelo nejen ke zlepšení rozlišení, ale také k prodloužení času analýzy. Nevýhodou tohoto elektrolytu byl výskyt nepravidelností a systémových píků v základní linii v elektroforegramu. Nejvyšší hodnoty separační účinnosti až $2,45 \cdot 10^5$ teoretických pater na metr však poskytovala 30 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB (pH 2,85). Srovnání rozlišení separace a separační účinnosti pro tyto dva elektrolyty je v **tabulce 12**.

Na **obrázku 7** je znázorněna separace analog halictinu v základním elektrolytu 30 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB (pH 2,85), kde ve směsi 1 a 2 došlo k úplné separaci všech látek (**obrázek 7s1 a 7s2**). Směs 3 je nejhůře rozdělená (**obrázek 7s3**), každý pík je zastoupen dvěma peptidy, které se překrývají (HAL-1 + HAL-1/9, HAL-1/17 + HAL-1/18 a HAL-1/4 + HAL-1/12). Ve směsi 4 se překrývají peptidy HAL-1/12 + HAL-1/20 a HAL-1/19 + HAL-1/21 a pouze jeden peptid se samostatně oddělil (**obrázek 7s4**). Ve směsi 5 se překrývají peptidy HAL-1 + HAL-1/3 a zbylé tři jsou oddělené (**obrázek 7s5**). Překrývání peptidů je pravděpodobně způsobeno stejným nábojem a tedy i podobnými efektivními elektroforetickými pohyblivostmi peptidů.

Tabulka 12: CZE separace směsí 1 – 5 v BGE IX a XIX.

Směs	Peptid	BGE IX: 30 mM H ₃ PO ₄ ; 25 mM Tris; 0,4 mM DDAB			BGE XIX: 30 mM H ₃ PO ₄ ; 25 mM Tris; 0,4 mM DDAB; 0,1 % HEC		
		$m_{eff} \cdot 10^{-9}$ (m ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹)	<i>N</i> (TP/m)	<i>R_S</i>	$m_{eff} \cdot 10^{-9}$ (m ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹)	<i>N</i> (TP/m)	<i>R_S</i>
směs 1	HAL-1/27	21,52	155100		21,29	175500	
	HAL-1	24,25	174200	5,90	24,02	173600	8,32
	HAL-1/24	24,54	176500	0,69	24,36	164000	1,07
	HAL-1/25	25,46	264700	2,36	25,3	160200	2,94
směs 2	HAL-1/27	21,77	218900		21,29	172700	
	HAL-1	24,55	171000	6,44	24,04	184400	8,04
	HAL-1/12	28,09	200700	8,65	27,61	153500	11,05
	HAL-1/19	30,6	166600	6,54	30,11	147800	8,09
směs 3	HAL-1 + HAL-1/9	25,08	245200		24,13	174500	
	HAL-1/17 + HAL-1/18	27,99	194100	7,62	27,04	148400	8,50
	HAL-1/4 + HAL-1/12	28,63	146900	1,54	27,69	134900	1,88
směs 4	HAL-1	25,01	168400		24,11	184800	
	HAL-1/12 + HAL-1/20	28,51	144900	7,81	27,68	149100	10,48
	HAL-1/19 + HAL-1/21	31,08	125500	5,66	30,2	133500	7,51
směs 5	HAL-1/2	19,56	140400		19,16	150800	
	HAL-1/1	23,44	120900	7,17	23,24	112000	9,19
	HAL-1/11	23,84	123000	0,76	23,64	99900	0,86
	HAL-1 + HAL-1/3	24,37	76100	0,89	24,07	89300	0,89

m_{eff} – efektivní elektroforetická pohyblivost (m²·V⁻¹·s⁻¹), *N* – separační účinnost (TP/m),
R_S - rozlišení separace



Obrázek 7: Separace směsí 1 – 5 analog halictinu metodou CZE v BGE IX (30 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris, 0,4 mM DDAB, pH 2,85)

A_{206} – absorbance při vlnové délce 206 nm; x – systémový pík; dávkování 5 mbar, 5 s; Složení BGE viz tab. 2; analyty viz tab. 1; experimentální podmínky viz kap. 6.3.

8. Závěr

V rámci této diplomové práce byly získány výsledky, které dokazují, že kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) jsou vhodnými metodami pro kvalitativní a kvantitativní analýzu, fyzikálně-chemickou charakterizaci a separaci peptidů, konkrétně nově syntetizovaného antimikrobiálního kationického peptidu halictinu a jeho analog.

Metodou kapilární zónové elektroforézy byla provedena analýza antimikrobiálního peptidu halictinu a jeho 25 analogů v několika kyselých základních elektrolytech. Byl stanoven stupeň čistoty těchto peptidů pomocí relativních korigovaných ploch píků a byla určena separační účinnost vyjádřená počtem teoretických pater na metr délky kapiláry. Dále byly pro analyzované peptidy určeny základní charakteristiky UV-fotometrického detektoru při vlnové délce 206 nm, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Kapilární zónovou elektroforézou byla provedena také charakterizace analog halictinu jejich efektivními elektroforetickými pohyblivostmi v několika kyselých základních elektrolytech. Změřené efektivní elektroforetické pohyblivosti byly korigovány na referenční teplotu 25 °C. Byly testovány semiempirické modely závislosti efektivní pohyblivosti analyzovaných peptidů na poměru jejich náboje a relativní molekulové hmotnosti.

Byla provedena separace směsí strukturně podobných analog halictinu metodami CZE a MEKC. Separace byly provedeny v klasických trisfosfátových základních elektrolytech s přídavkem kationických tenzidů (didodecyldimethylamoniumbromid, cetyltrimethylamoniumbromid, dodecyltrimethylamoniumchlorid), anionického tenzidu (dodecylsulfát sodný) a derivátů celulosy (hydroxyethylcelulosa, methylhydroxyethylcelulosa, methylhydroxypropylcelulosa). Nejvhodnější podmínky pro separaci směsí analog antimikrobiálního peptidu halictinu poskytoval základní elektrolyt 30 mM kyselina fosforečná, 25 mM Tris s přídavkem kationického tenzidu 0,4 mM DDAB (pH 2,85), ve kterém hodnoty separační účinnosti dosahovaly až $2,36 \cdot 10^5$ teoretických pater na metr délky kapiláry. Nejvyšší hodnoty rozlišení CZE separací peptidů byly nalezeny v základním elektrolytu složeném z 30 mM kyseliny fosforečné, 25 mM Tris s přídavkem 0,4 mM DDAB a 0,1 % (m/v) hydroxyethylcelulosy, pH 2,84.

9. Použitá literatura

- [1] Kašička, V.: Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické Listy* **91**:5, 320-329 (1997).
- [2] Vesterberg, O.: History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography* **480**: 3-19 (1989).
- [3] Heiger, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Waldbronn, Hewlett-Packard Company 1992
- [4] Hjertén, S.: Free Zone Electrophoresis. *Chromatographic Reviews* **9**:2, 122-219 (1967)
- [5] Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.: Isotachophoresis. Electrophoretic analysis in capillaries. *Journal of Chromatography* **53**: 315-328 (1970).
- [6] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry* **53**:8, 1298-1302 (1981).
- [7] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Capillary zone electrophoresis. *Science* **222**:4621, 266-272 (1983).
- [8] Hjerten, S.; Zhu, M.-D.: Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. *Journal of Chromatography* **346**: 265-270 (1985).
- [9] Takeo, K.: Advances in affinity electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **698**:1-2, 89-105 (1995).
- [10] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open- tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**:1, 111-113 (1984).
- [11] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic chromatography with micellar solution and open- tubular capillary. *Analytical Chemistry* **57**:4, 834-841 (1985).
- [12] Wan, Q. H.: Capillary electrochromatography: effect of electrolyte concentration on electroosmotic flow and column efficiency. *Journal of Chromatography A* **782**:2, 181-189 (1997).
- [13] Bartle, K. D.; Myers, P.: Theory of capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **916**:1-2, 3-23 (2001).
- [14] Pacáková, V.; Coufal, P.; Štulík, K.; Gaš, B.: The importance of capillary electrophoresis, capillary electrochromatography, and ion chromatography in separations of inorganic ions. *Electrophoresis* **24**:12-13, 1883-1891 (2003).

- [15] Wan, Q. J.; Kuban, P.; Tanyanyiwa, J.; Rainelli, A.; Hauser, P. C.: Determination of major inorganic ions in blood serum and urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytica Chimica Acta* **525**:1, 11-16 (2004).
- [16] Oehrle, S. A.: Determination of inorganic and organic ions in nickel- plating baths by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **739**:1-2, 413-419 (1996).
- [17] Tanyanyiwa, J.; Abad-Villar, E. M.; Hauser, P. C.: Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis. *Electrophoresis* **25**:6, 903-908 (2004).
- [18] Coufal, P.; Zuska, J.; van de Goor, T.; Smith, V.; Gaš, B.: Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **24**:4, 671-677 (2003).
- [19] Poinot, V.; Gavard, P.; Feurer, B.; Couderc, F.: Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis* **31**:1, 105-121 (2010).
- [20] Bergman, T.; Agerberth, B.; Jornvall, H.: Direct Analysis of Peptides and Amino Acids from Capillary Electrophoresis. *FEBS Letters* **283**:1, 100-103 (1991).
- [21] Klampfl, C. W.: Determination of organic acids by CE and CEC methods. *Electrophoresis* **28**:19, 3362-3378 (2007).
- [22] Liu, C. C.; Huang, J. S.; Tyrrell, D. L. J.; Dovichi, N. J.: Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry of nucleosides and nucleotides: Application to phosphorylation studies of anti-human immunodeficiency virus nucleosides in a human hepatoma cell line. *Electrophoresis* **26**:7-8, 1424-1431 (2005).
- [23] Helboe, T.; Hansen, S. H.: Separation of nucleosides using capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **836**:2, 315-324 (1999).
- [24] Šolínová, V.; Kašička, V.; Sázelová, P.; Holý, A.: Chiral analysis of anti-acquired immunodeficiency syndrome drug, 9-(R)-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (tenofovir), and related antiviral acyclic nucleoside phosphonates by CE using beta-CD as chiral selector. *Electrophoresis* **30**:12, 2245-2254 (2009).
- [25] Willems, A. V.; Deforce, D. L.; Van Peteghem, C. H.; Van Bocxlaer, J. F.: Analysis of nucleic acid constituents by on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* **26**:7-8, 1221-1253 (2005).
- [26] Šolínová, V.; Kašička, V.; Koval, D.; Česnek, M.; Holý, A.: Determination of acid-base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **27**:5-6, 1006-1019 (2006).
- [27] Hert, D. G.; Fredlake, C. P.; Barron, A. E.: Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* **29**:23, 4618-4626 (2008).

- [28] Kašička, V.: Recent developments in CE and CEC of peptides. *Electrophoresis* **29**:1, 179-206 (2008).
- [29] Kašička, V.: Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). *Electrophoresis* **31**:1, 122-146 (2010).
- [30] Dolník, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis* **29**:1, 143-156 (2008).
- [31] El Rassi, Z.: Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009. *Electrophoresis* **31**:1, 174-191 (2010).
- [32] Volpi, N.; Maccari, F.; Linhardt, R. J.: Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides. *Electrophoresis* **29**:15, 3095-3106 (2008).
- [33] Righetti, P. G.; Gelfi, C.; D'Acunto, M. R.: Recent progress in DNA analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23**:10, 1361-1374 (2002).
- [34] Forster, R. E.; Hert, D. G.; Chiesl, T. N.; Fredlake, C. P.; Barron, A. E.: DNA migration mechanism analyses for applications in capillary and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* **30**:12, 2014-2024 (2009).
- [35] Klepárník, K.; Boček, P.: Elektroforéza - úspěšná analytická metoda. *Vesmír* **89**:11, (2010).
- [36] Godde, R.; Akkad, D. A.; Arning, L.; Dekomien, G.; Herchenbach, J.; Kunstmann, E.; Meins, M.; Wieczorek, S.; Epplen, J. T.; Hoffjlan, S.: Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* **27**:5-6, 939-946 (2006).
- [37] Fonslow, B. R.; Yates, J. R.: Capillary electrophoresis applied to proteomic analysis. *Journal of Separation Science* **32**:8, 1175-1188 (2009).
- [38] Herrero, M.; Ibanez, E.; Cifuentes, A.: Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics. *Electrophoresis* **29**:10, 2148-2160 (2008).
- [39] Garcia-Perez, I.; Vallejo, M.; Garcia, A.; Legido-Quigley, C.; Barbas, C.: Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1204**:2, 130-139 (2008).
- [40] Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* **30**:1, 276-291 (2009).
- [41] Torimura, M.; Ito, S.; Kano, K.; Ikeda, T.; Esaka, Y.; Ueda, T.: Surface characterization and on-line activity measurements of microorganisms by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **721**:1, 31-37 (1999).
- [42] Rodriguez, M. A.; Armstrong, D. W.: Separation and analysis of colloidal/nanoparticles including microorganisms by capillary electrophoresis: a fundamental

review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **800**:1-2, 7-25 (2004).

- [43] Petr, J.; Ryparová, O.; Ranc, V.; Hinnerova, P.; Znaleziona, J.; Kowalska, M.; Knob, R.; Maier, V.; Frébort, I.; Lemr, K.; Ševčík, J.: Assessment of CE for the identification of microorganisms. *Electrophoresis* **30**:3, 444-449 (2009).
- [44] Whiting, C. E.; Arriaga, E. A.: CE-LIF analysis of mitochondria using uncoated and dynamically coated capillaries. *Electrophoresis* **27**:22, 4523-4531 (2006).
- [45] Chen, Y.; Xiong, G.; Arriaga, E. A.: CE analysis of the acidic organelles of a single cell. *Electrophoresis* **28**:14, 2406-2415 (2007).
- [46] Composite authors: *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. New York, John Wiley&Sons Inc. 1998.
- [47] Kvasničková, L.; Glatz, Z.; Kahle, V.: Capillary electrochromatography. *Chemické Listy* **97**:2, 86-92 (2003).
- [48] Gaš, B.: Kapilární elektroforéza. *Vesmír* **80**:7, (2001).
- [49] Boček, P.: Analytical capillary electrophoresis. *In Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*; Churacek, J., Ed.; Academia: Praha, 1993; pp. 97-141.
- [50] Foret, F.; Křivánková, L.; Boček, P.: *Capillary Zone Electrophoresis*. Weinheim, Verlag Chemie 1993.
- [51] Křivánková, L.; Pantůčková, P.; Boček, P.: Isotachopheresis in zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **838**:1-2, 55-70 (1999).
- [52] Pacáková, V.; Štulík, K.; Hubená, S.; Tichá, M.: Affinity capillary electrophoresis. *Chemické listy* **94**:2, 97-104 (2000).
- [53] Ehala, S.; Dybal, J.; Makrlík, E.; Kašička, V.: Application of capillary affinity electrophoresis and density functional theory to the investigation of valinomycin-lithium complex. *Journal of Chromatography A* **1216**:17, 3660-3665 (2009).
- [54] Rill, R. L.; Liu, Y. J.; Vanwinkle, D. H.; Locke, B. R.: Pluronic copolymer liquid crystals: unique, replaceable media for capillary gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **817**:1-2, 287-295 (1998).
- [55] Altria, K. D.: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **856**:1-2, 443-463 (1999).
- [56] Kašička, V.: Capillary electrophoresis of peptides. *Electrophoresis* **20**:15-16, 3084-3105 (1999).
- [57] Kašička, V.: Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **27**:1, 142-175 (2006).

- [58] Neubauerová, T.; Macková, M.; Macek, T.; Koutek, B.: Antimicrobial Cationic Peptides. *Chemické Listy* **103**:6, 460-468 (2009).
- [59] Čerovský, V.: Antimikrobiální peptidy - terapeutika budoucnosti? *Vesmír* **90**:2, (2011).
- [60] Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C.: Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**:6, 536-547 (2004).
- [61] Toke, O.: Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* **80**:6, 717-735 (2005).
- [62] Ciencialová, A.; Neubauerová, T.; Šanda, M.; Šindelka, R.; Cvačka, J.; Voburka, Z.; Budešínský, M.; Kašička, V.; Sázelová, P.; Šolínová, V.; Macková, M.; Koutek, B.; Jiráček, J.: Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *Journal of Peptide Science* **14**:6, 670-682 (2008).
- [63] Monincová, L.; Budešínský, M.; Slaninová, J.; Hovorka, O.; Cvačka, J.; Voburka, Z.; Fučík, V.; Borovičková, L.; Bednářová, L.; Straka, J.; Čerovský, V.: Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (Hymenoptera: Halictidae) and their analogs. *Amino Acids* **39**:3, 763-775 (2010).
- [64] Kašička, V.; Prusík, Z.; Sázelová, P.; Brynda, E.; Stejskal, J.: Capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow controlled by external radial electric field. *Electrophoresis* **20**:12, 2484-2492 (1999).
- [65] Grossman, P. D.; Colburn, J. C.: *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. San Diego, Academic Press, Inc. 1992
- [66] Šolínová, V.; Kašička, V.; Koval, D.; Hlaváček, J.: Separation and investigation of structure-mobility relationships of insect oostatic peptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **25**:14, 2299-2308 (2004).

