

7 Závěr

Výsledky dosažené v této dizertační práci prokazují, že kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie jsou vysoce účinné a vysoce citlivé metody pro separaci, kvalitativní i kvantitativní analýzu a pro fyzikálně-chemickou charakterizaci peptidových hormonů.

Na základě strategie pro racionální výběr podmínek pro CE analýzu a separaci strukturně podobných peptidů byly ionogenní peptidy analyzovány jako kationty v klasických a izoelektrických pufrech v kyselé oblasti pH (pH = 2-2,5) a jako anionty v amfoterním pufru ve slabě alkalické oblasti pH, pH = 8,1. Neionogenní peptidy byly analyzovány metodou micelární elektrokinetické chromatografie s micelární fází tvořenou anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným v alkalickém prostředí, pH 8,8. Tyto podmínky byly zvoleny s cílem minimalizovat adsorpci peptidů na vnitřním povrchu separačního prostoru, čehož bylo dosaženo potlačením disociace silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry v kyselé oblasti pH a elektrostatickým odpuzováním záporně nabitých peptidů od záporně nabitých disociovaných silanolových skupin na vnitřní stěně kapiláry v alkalické oblasti pH. Hodnota pH základního elektrolytu byla zvolena v oblasti pH, ve které analyzované peptidy vykazovaly největší rozdily ve spočtených hodnotách svých specifických nábojů, tj. efektivních nábojů vztažených na jednotku relativní molekulové hmotnosti. Účinnost separací peptidových hormonů v klasických pufrech a v izoelektrických pufrech byla ve většině případů srovnatelná, v případě hormonů uvolňujících gonadotropin dosahovala vyšších hodnot v izoelektrických pufrech.

Při CZE analýze lidského insulinu a jeho oktapeptidového fragmentu značených fluorescenční značkou NBD bylo ukázáno, že citlivost fluorescenční detekce s detektorem na bázi argonovým laserem indukované fluorescence (excitace/emise 488/520 nm) je desetkrát až třistakrát vyšší než citlivost UV-absorpčních detektorů v oblasti vlnových délek kolem 200 nm.

Kapilární zónová elektroforéza byla využita rovněž k fyzikálně-chemické charakterizaci analyzovaných peptidů. Byl vypracován postup pro určení teploty uvnitř kapiláry v průběhu CE analýzy, který umožnil přesné stanovení efektivních elektroforetických pohyblivostí peptidů při standardní teplotě 25°C.

Pomocí semiempirických modelů korelujících efektivní elektroforetickou pohyblivost peptidů s jejich efektivním nábojem, velikostí a prostorovým uspořádáním byly ověřeny vzájemné vztahy těchto parametrů peptidů v roztocích a pro homologické řady peptidových hormonů bylo potvrzeno jejich podobné elektroforetické chování. Na základě těchto studií byly navrženy pravděpodobné tvary peptidových molekul v jednotlivých elektrolytových systémech.