

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



# DIZERTAČNÍ PRÁCE

ANALÝZA, SEPARACE A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ  
CHARAKTERIZACE PEPTIDOVÝCH HORMONŮ  
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU



Veronika ŠOLÍNOVÁ

PRAHA 2006

Tato dizertační práce byla vypracována na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a v laboratoři elektromigračních metod v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v letech 2002 – 2006.

Prohlašuji, že jsem pod vedením školitele doc. RNDr. Ivana Jelínka, CSc., a školitele konzultanta RNDr. Václava Kašičky, CSc., pracovala samostatně, veškerou použitou literaturu jsem citovala a že celá práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 1. prosince 2006

  
Veronika Šolínová

## Obsah

Předmluva a poděkování.....	9
Seznam zkratk.....	11
Seznam symbolů.....	13
Seznam původních prací.....	15
1 Kapilární elektromigrační metody.....	16
1.1 Úvod .....	16
1.2 Migrace iontů v elektrickém poli.....	17
1.3 Disperzní jevy.....	18
1.4 Separační účinnost a rozlišení.....	20
2 Kapilární elektroforéza peptidů.....	22
2.1 Úvod.....	22
2.2 Kvalitativní a kvantitativní analýza.....	22
2.2.1 Stanovení stupně čistoty.....	23
2.3 Detekce.....	24
2.3.1 Základní kritéria pro funkci detektoru.....	24
2.3.2 UV-absorpční detekce.....	25
2.3.3 Laserem indukovaná fluorescenční detekce.....	25
2.3.4 Elektrochemická detekce.....	26
2.3.5 Hmotnostní spektrometrická detekce.....	26
2.4 Separace strukturně podobných peptidů.....	26
2.4.1 Výběr optimálních separačních podmínek.....	26
2.4.2 Složení a pH základního elektrolytu.....	27
2.4.3 Další faktory ovlivňující výběr základního elektrolytu.....	27
2.5 Fyzikálně-chemická charakterizace peptidů.....	28
2.5.1 Efektivní a specifický náboj.....	28
2.5.2 Efektivní elektroforetická pohyblivost.....	30
2.5.3 Termodynamické acidobazické disociační konstanty.....	31
2.6 Vztahy mezi efektivní elektroforetickou pohyblivostí peptidů a jejich nábojem, velikostí a prostorovým uspořádáním.....	33
2.6.1 Semiempirické modely.....	33
2.6.2 Predikce sekundární struktury peptidů.....	35

3	Peptidové hormony.....	36
3.1	Neurohypofyzární hormony .....	36
3.2	Insulin.....	37
3.3	Enkefaliny a dalarginy.....	38
3.4	Hmyzí oostatické peptidy.....	39
3.5	Hormony uvolňující gonadotropiny .....	40
4	Výzkumné cíle.....	43
5	Experimentální část.....	45
5.1	Chemikálie.....	45
5.2	Úprava vzorku.....	45
5.3	Přístrojové vybavení.....	46
6	Výsledky a diskuse.....	48
6.1	Analýza a separace peptidových hormonů.....	48
6.1.1	Strategie volby experimentálních podmínek.....	48
6.1.2	Složení základních elektrolytů.....	54
6.1.3	Volba kapiláry.....	55
6.1.4	Citlivost detekce.....	55
6.1.4.1	UV-absorpční detekce.....	55
6.1.4.2	Porovnání citlivosti UV-absorpční detekce a laserem indukované fluorescenční detekce.....	57
6.1.5	Kvalitativní a kvantitativní analýza.....	58
6.1.6	Separace strukturně podobných peptidů.....	61
6.2	Fyzikálně-chemická charakterizace peptidů .....	67
6.2.1	Výpočet efektivního a specifického náboje.....	67
6.2.2	Stanovení efektivní elektroforetické pohyblivosti při standardní teplotě.....	68
6.2.3	Testování semiempirických modelů korelujících pohyblivost peptidů a jejich náboj, velikost a prostorové uspořádání.....	70
6.2.4	Predikce pravděpodobné struktury peptidů v roztoku.....	74
7	Závěr.....	76
8	Literatura.....	78
9	Seznam publikací.....	87
10	Dodatek.....	90

Příloha: Publikace I-VI

## **Předmluva a poděkování**

Dizertační práce je založena na třech původních publikacích v mezinárodních časopisech s impakt faktorem, jedné práci přijaté do tisku a čtyřech kratších článcích publikovaných ve sbornících konferencí.

Na tomto místě bych chtěla srdečně poděkovat svým školitelům, doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc., a RNDr. Václavu Kašičkovi, CSc., za skvělé odborné vedení, cenné připomínky k mé práci a všestrannou pomoc během celého mého studia. Stejný dík patří i mým kolegům z laboratoře elektromigračních metod na ÚOCHB AV ČR, RNDr. Petře Sázelové, CSc., Mgr. Zdeňkovi Prusíkovi, CSc., Mgr. Dušanovi Kovalovi, Ph.D., a paní Věře Liškové, kteří vytvořili přátelskou atmosféru, ve které byla radost pracovat.

Ráda bych též poděkovala RNDr. Tomislavu Barthovi, DrSc., RNDr. Janu Hlaváčkovi, CSc., RNDr. Lence Žákové, Ph.D., a Mgr. Alici Ciencialové za poskytnutí biologicky aktivních peptidů.

Také bych ráda poděkovala Dr. Salvatore Fanalimu za možnost pobýt několik týdnů v jeho laboratoři v Ústavu chemických metodologií v Římě a poznat práci v zahraniční laboratoři.

Dále děkuji své rodině, především svému manželovi Petrovi, za podporu a pochopení během celého studia. Dík také patří všem mým přátelům, kteří mi fandili.

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AU	absorbanční jednotka
BGE	základní (nosný) elektrolyt
CAE	kapilární afinitní elektroforéza
CD	cirkulární dichroismus
CE-MS	spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií
CE	kapilární elektroforéza, kapilární elektromigrační metody
CEC	kapilární elektrochromatografie
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMEKC	kapilární micelární elektrokinetická chromatografie
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DLR	dalargin
ENK	enkefalin
EOF	elektroosmotický tok
ESI	elektrosprejová ionizace
GnRH	hormon uvolňující gonadotropiny
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CHAPS	3-[(3-choloamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IČ	infračervený
i.d.	vnitřní průměr
IDAA	kyselina iminodioctová
IEC	iontově výměnná chromatografie
IOPs	hmyzí oostatické peptidy
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LHRH	hormon uvolňující luteinizační hormon
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie

NBD	4-chloro-7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol
NHPs	neurohypofyzární peptidy
NMR	jaderná magnetická rezonance
o.d.	vnější průměr
PEG	polyethylenglykol
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází
SDS	dodecylsulfát sodný
SEC	molekulová vylučovací chromatografie
TEAP	tetraethylammonium chloristan
TMOF	trypsinový modulační oostatický faktor
tricin	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialový
UV-Vis	ultrafialový-viditelný

## Seznam symbolů

$\gamma$	aktivitní koeficient
$\epsilon_0$	permitivita prostředí [ $\text{Fm}^{-1}$ ]
$\epsilon_r$	relativní permitivita prostředí [ $\text{Fm}^{-1}$ ]
$\eta$	dynamická viskozita [ $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ]
$\zeta$	elektrokinetický potenciál, zeta potenciál [V]
$\kappa$	specifická elektrická vodivost [ $\text{Sm}^{-1}$ ]
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\mu$	elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{ep}$	efektivní elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
$\bar{\mu}_{ep}$	průměrná efektivní elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{eo}$	elektroosmotická pohyblivost iontu [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{lim}$	limitní iontová pohyblivost [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
$\theta$	odporová konstanta nádoby
$\sigma_{l,i}$	směrodatná odchylka v prostorové doméně [m]
$\sigma_{t,i}$	směrodatná odchylka v časové doméně [s]
$\sigma_{d,i}^2$	střední kvadratická vzdálenost [ $\text{m}^2$ ]
$a_i$	aktivita
$a$	průměr hydratovaného iontu [m]
$A$	plocha píku [AU.s nebo V.s nebo RFU.s]
$A_c$	korigovaná plocha píku [AU nebo V nebo RFU]
$c$	koncentrace látky [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$c_i$	látková (molární) koncentrace iontu $i$ [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$D_i$	difúzní koeficient [ $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ]
$D_{lim}$	limitní difúzní koeficient [ $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ]
$e$	elementární náboj ( $1,602177\cdot 10^{-19}$ C)
$E$	intenzita elektrického pole [ $\text{Vm}^{-1}$ ]
$F$	Faradayova konstanta (96485,34 $\text{Cmol}^{-1}$ )
$I$	iontová síla roztoku [ $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ]
$I_{el}$	elektrický proud [A]



$h$	výška píku [AU nebo V nebo RFU]
$K_a$	termodynamická acidobazická disociační konstanta (konstanta acidity)
$K_a^{mix}$	smíšená acidobazická disociační konstanta
$l_c$	celková délka kapiláry [m]
$l_d$	efektivní délka kapiláry [m]
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$n$	šum detektoru [V nebo AU nebo RFU]
$N_i$	počet teoretických pater látky $i$
$N_{dif,i}$	počet teoretických pater pouze za působení podélné difúze
$P_h$	relativní výška píku
$P_A$	relativní plocha píku
$P_{CA}$	relativní korigovaná plocha píku
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus acidobazické disociační konstanty (konstanty acidity)
$q$	efektivní náboj [e]
$q_s$	specifický náboj [e]
$R$	molární plynová konstanta ( $8,31451 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ )
$R$	odezva detektoru [V nebo AU nebo RFU]
$R_i$	vnitřní poloměr kapiláry [m]
$R_{ij}$	rozlišení píků $i$ a $j$
$r_i$	poloměr iontu $i$ [m]
$r$	korelační koeficient
$S$	citlivost [ $\text{V}\cdot\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$ nebo $\text{AU}\cdot\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$ nebo $\text{RFU}\cdot\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$ ]
$t$	teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$T$	termodynamická teplota [K]
$U$	elektrické napětí [V]
$w_{t,i}$	šířka píku $i$ při základně v časové doméně [s]
$t_{eo}$	migrační čas elektroneutrální látky [s]
$t_m$	migrační čas [s]
$v_{eo}$	rychlost elektroosmotického toku [ $\text{ms}^{-1}$ ]
$x$	molární zlomek
$z$	nábojové číslo iontu

## Seznam původních prací

Základem této dizertační práce jsou následující publikace, které jsou dále označovány římskými číslicemi (I-IV):

- I. **Analysis of Synthetic Derivatives of Peptide Hormones by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography with Ultraviolet-Absorption and Laser-Induced Fluorescence Detection.**  
Šolínová V., Kašička V., Koval D., Barth T., Cencialová A., Žáková L., *J. Chromatogr. B* 2004, 808, 75-82.
- II. **Analysis and Separation of Enkephalin and Dalargin Analogues and Fragments by Capillary Zone Electrophoresis.**  
Šolínová V., Kašička V., Barth T., Hauzerová L., Fanali S., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 9-18.
- III. **Separation and Investigation of the Structure-Mobility Relationships of Insect Oostatic Peptides by Capillary Zone Electrophoresis.**  
Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., *Electrophoresis* 2004, 25, 2299-2308.
- IV. **Separation and Investigation of the Structure-Mobility Relationships of Gonadotropin-Releasing Hormones by Capillary Zone Electrophoresis in Conventional and Isoelectric Acidic Background Electrolytes.**  
Šolínová V., Kašička V., Sázelová P., Barth T., Mikšík I., *J. Chromatogr. A*, v tisku

# 1 Kapilární elektromigrační metody

## 1.1 Úvod

Kapilární elektromigrační metody jsou analytické separační metody, které dělí látky a částice působením elektrického pole v kapiláře malého průměru naplněné kapalným roztokem základního elektrolytu. Kapilární elektroforéza (CE), přesněji označovaná jako kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), kapilární micelární elektrokinetická chromatografie (CMEKC) či kapilární afinitní elektroforéza (CAE) jsou rychlé (s typickou dobou analýzy několik minut), vysoce účinné ( $10^5$ - $10^6$  teoretických pater na metr) a vysoce citlivé separační metody s malou spotřebou analytů (pikomoly až attomoly) v nano až pikolitrových objemech vzorku. Mají široké uplatnění při analýzách a separacích širokého spektra látek, od malých organických a anorganických iontů přes středně velké a vysokomolekulární látky až po buňky a mikroorganismy.

Vývoj elektroforetických metod v kapilárním měřítku začal v druhé polovině minulého století [1-5]. Novým impulsem pro rozvoj CE metod se na počátku 80. let staly práce Jorgensona a Lukacsově [6, 7]. V současné době jsou CE metody stále více uznávaným protějškem, respektive doplňkem dosud nejrozšířenějších separačních metod – různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Základní experimentální sestava pro CE metody se skládá ze separační kapiláry, jejíž konce jsou ponořeny do elektrodových nádobek, ze zdroje vysokého napětí a z detektoru. Nejběžněji se používá křemenná kapilára o vnitřním průměru 25-75  $\mu\text{m}$  a celkové délce 20-100 cm vně pokrytá polyimidem. Kapilára a nádobky jsou naplněny základním elektrolytem. V nádobkách jsou umístěny platinové elektrody (katoda a anoda), mezi které se vkládá konstantní separační napětí (obvykle do 30 kV) ze zdroje vysokého napětí. Separované zóny analytů jsou detekovány on-column, end-column nebo off-column detektorem. Mezi nejběžnější typy detekce patří UV-Vis absorpční, fluorimetrická, vodivostní, elektrochemická či hmotnostně spektrometrická.

Kapilární zónová elektroforéza je nejčastěji používaná elektromigrační metoda, která umožňuje dělit ionogenní látky podle rozdílných elektroforetických pohyblivostí v homogenním prostředí základního elektrolytu. Oproti tomu elektroneutrální látky můžeme dělit pomocí kapilární micelární elektrokinetické chromatografie. Tato nejmladší elektromigrační technika [8, 9] využívá jevy elektrokinetické (elektroforézu a

elektroosmózu) i principy chromatografické, tj. distribuci analyzovaných látek mezi pseudofází tvořenou micelami ionogenního detergentu a vodnou fází základního elektrolytu a relativní pohyb těchto fází vůči sobě.

## 1.2 Migrace iontů v elektrickém poli

Pohyb iontu v kapalném prostředí působením elektrického pole se nazývá elektroforetická migrace. Ion se pohybuje v homogenním elektrickém poli konstantní elektroforetickou rychlostí,  $v_i$ , pro kterou platí vztah:

$$v_i = \mu_i \cdot E = \frac{|z_i|e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \cdot E \quad (1.1)$$

kde  $\mu_i$  [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] je elektroforetická pohyblivost iontu  $i$  definovaná jako rychlost jeho pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě,  $z_i$  je nábojové číslo iontu  $i$ ,  $e$  je elementární náboj,  $E$  [ $\text{Vm}^{-1}$ ] je intenzita elektrického pole,  $\eta$  [Pa.s] je viskozita roztoku základního elektrolytu,  $r_i$  [m] je poloměr iontu  $i$ . Ze vztahu (1.1) vyplývá, že elektroforetická pohyblivost iontu  $i$  je přímo úměrná velikosti jeho náboje a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě prostředí.

V reálných roztocích je pohyblivost iontu ovlivněna rovněž jeho elektrostatickými interakcemi s ostatními ionty, a proto je pohyblivost také funkcí iontové síly roztoku. Iontová síla,  $I$ , je definovaná:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (1.2)$$

kde  $c_i$  [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] je molární koncentrace  $i$ -tého iontu a  $z_i$  je nábojové číslo iontu  $i$ . Pohyblivost iontu v roztoku při dané iontové síle se nazývá aktuální iontová pohyblivost. Obecně aktuální pohyblivost vzrůstá s klesající iontovou silou roztoku a při nekonečném zředění, tedy nulové iontové síle, dosahuje hodnoty, která je definována jako limitní iontová pohyblivost. Tato fyzikální veličina závisí na rozpouštědle a teplotě, pro běžné malé anorganické a organické ionty je tabelována. Efektivní elektroforetická pohyblivost slabého elektrolytu (látky)  $j$ ,  $\mu_{epj}$  [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ], je definována jako pohyblivost této látky jako celku, tedy suma skládající se z příspěvků pohyblivostí jednotlivých iontových forem látky vážených molárním zlomkem těchto iontových forem v elektrolytu (látce)  $j$ :

$$\mu_{ep,j} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \mu_i \text{sign}(z_i)}{c_j} \quad (1.3)$$

kde  $c_j$  [mol.dm<sup>-3</sup>] je analytická koncentrace látky  $j$ ,  $c_i$  je koncentrace  $i$ -té iontové formy látky  $j$  a  $\mu_i$  [m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>] je aktuální pohyblivost  $i$ -té iontové formy. Koncentrace jednotlivých iontových forem slabého elektrolytu, a tudíž i jeho efektivní pohyblivost, je silně závislá na pH prostředí, ve kterém se elektrolyt nachází.

Další velmi důležitý pohyb v kapiláře je elektroosmotický tok (EOF), který vzniká působením elektrického pole na volný povrchový náboj na vnitřní stěně kapiláry [10]. Rychlost EOF,  $v_{eo}$ , se řídí von Smoluchovského rovnicí:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (1.4)$$

kde  $\mu_{eo}$  [m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>] je elektroosmotická pohyblivost definovaná jako rychlost EOF,  $v_{eo}$ , v elektrickém poli o jednotkové intenzitě,  $E$  [Vm<sup>-1</sup>],  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita prostředí,  $\varepsilon_0$  [Fm<sup>-1</sup>] je permitivita vakua,  $\eta$  [Pa.s] je viskozita prostředí,  $\zeta$  [V] je elektrokinetický (zeta) potenciál. EOF má rovinný rychlostní profil. Je závislý na pH a iontové síle základního elektrolytu a jeho rychlost roste s intenzitou elektrického pole v kapiláře.

### 1.3 Disperzní jevy

Problematika disperzních jevů v kapilární elektroforéze je velmi významná, neboť ovlivňuje zejména citlivost a účinnost separace [11]. Disperze je způsobena několika faktory jako jsou podélná difúze, radiální i podélný teplotní spád v kapiláře (Jouleovo teplo), elektromigrační disperze, adsorpce na stěnu kapiláry, nerovnoměrný EOF a rozšíření zón v důsledku dávkování a detekce [12-15].

Podélná difúze je definovaná jako tok hmoty vyvolaný koncentračním gradientem, v jehož důsledku látky s vyšší koncentrací putují do míst s nižší koncentrací. V CZE nelze podélnou difúzi eliminovat. S prodlužujícím se časem dochází k většímu rozšíření zóny analytu. V praxi lze difúzi omezit zkrácením doby analýzy, např. vyšším separačním napětím nebo rychlejším elektroosmotickým tokem. Disperze zóny může být vyjádřena pomocí Einsteinovy rovnice pro difúzi v kapalinách

$$\sigma_{d,i}^2 = 2D_i t_{m,i} \quad (1.5)$$

kde  $\sigma_{d,i}^2$  [m<sup>2</sup>] je střední kvadratická vzdálenost, tedy difúzní příspěvek disperze,  $D_i$  [m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>] je difúzní koeficient a  $t_{m,i}$  [s] je migrační čas  $i$ -tého analytu.

V roztocích o nekonečném zředění lze vztáhnout limitní elektroforetickou pohyblivost,  $\mu_{lim,i}$ , k limitnímu difúznímu koeficientu,  $D_{lim,i}$ , pomocí Nernstova-Einsteinova vztahu

$$D_{lim,i} = \frac{\mu_{lim,i}RT}{z_iF} \quad (1.6)$$

kde  $F$  je Faradayova konstanta,  $R$  molární plynová konstanta a  $T$  [K] je termodynamická teplota.

Jouleovo teplo vzniká uvnitř celé kapiláry při průchodu elektrického proudu základním elektrolytem. Důsledkem jeho nerovnoměrného odvodu ze separačního prostoru je parabolický teplotní profil uvnitř kapiláry a příčný a podélný teplotní gradient [16, 17]. Tento jev způsobuje změny ve viskozitě a pohyblivosti, a tím dochází k disperzi zóny analytu. Vliv Jouleova tepla lze potlačit volbou základního elektrolytu o nízké elektrické vodivosti a vhodnou konstrukcí aparatury [18].

Elektromigrační disperze způsobuje deformaci migrující zóny analytu v důsledku nelineární podstaty elektromigračních dějů. Dochází k deformaci Gaussova tvaru píku na trojúhelníkový. Vzniká v případech, kdy je dávkovaný analyt o takové koncentraci, že ovlivňuje vodivost nebo pH základního elektrolytu a tedy celkovou elektrickou vodivost v místě zóny analytu. Tvar píku iontů silných elektrolytů je ovlivněn pohyblivostí koiontů (iontů základního elektrolytu, které se pohybují stejným směrem a mají stejný typ náboje jako ion analytu). Pokud ion vzorku má vyšší pohyblivost než koiont základního elektrolytu, tak jeho pík bude rozmytý vpředu. Když bude pohyblivost iontu analytu nižší než pohyblivost koiontu základního elektrolytu, tak pík bude chvostovat, tedy bude rozmytý vzadu. V případě, že pohyblivosti iontu analytu i koiontu základního elektrolytu budou stejné, nebude docházet k deformaci [19, 20]. Pro slabé elektrolyty je situace složitější, protože jejich efektivní elektroforetická pohyblivost je ovlivněna také pH [12]. Proto je vhodné pro predikci možné elektromigrační disperze použít navržené počítačové simulační programy [21, 22].

Adsorpce na stěnu je další negativní jev v CZE. Vzniká interakcemi mezi analytem a stěnou kapiláry. Může docházet k reverzibilní adsorpci, která vede k deformaci tvaru píku a ke zpomalování rychlosti průchodu analytu kapilárou nebo k ireverzibilní adsorpci, kdy dochází ke ztrátě vzorku [10]. Je to jeden z hlavních problémů při analýze vysokomolekulárních látek [23, 24]. Omezit vliv adsorpce lze

pokrytím stěn kapiláry vhodným, nejčastěji polymerním materiálem, chemickým navázáním nebo fyzikální adsorpcí [25-27].

Nerovnoměrný elektroosmotický tok způsobuje rozšíření elektroforetických zón. Je způsoben rozdílnou hodnotou elektrokinetického potenciálu,  $\zeta$ , podél kapiláry a tedy rozdílně rychlým elektroosmotickým tokem. Nejčastěji vzniká v důsledku podélných rozdílů v teplotě roztoku uvnitř kapiláry v důsledku nedokonalého chlazení celé kapiláry [16, 17], případně porušením pokrytí nebo adsorpcí nabitých částic na povrchu kapiláry [28, 29].

Rozšíření zóny nastává při hydrodynamickém dávkování, kdy je roztok analytu dávkován pomocí rozdílu tlaků na koncích kapiláry. Dochází k deformaci pravouhlé zóny analytu, která je způsobená hydrodynamickým tokem během dávkování. Téměř pravouhlého dávkování zóny vzorku lze dosáhnout pomocí elektrokinetického dávkování, kdy je vstupní konec kapiláry ponořen do roztoku a ionty se dostávají po připojení stejnosměrného napětí na vstupní konec kapiláry vlastní elektromigrací a elektroosmózou. Zóna analytu může být také deformovaná neostrým či poškozeným koncem kapiláry [30], přítomností dodatečného hydrodynamického toku v kapiláře v důsledku rozdílných výšek hladin roztoků v elektrodových nádobkách [31] nebo při použití CE-MS rozhraní [32].

#### 1.4 Separační účinnost a rozlišení

Účinnost separace v CZE je určena analogicky jako v chromatografii, je tedy charakterizovaná počtem teoretických pater,  $N_i$ , a určuje, jak moc se zóny separovaných látek rozmývají.

$$N_i = \frac{l_d^2}{\sigma_{l,i}^2} = \frac{t_{m,i}}{\sigma_{t,i}^2} \quad (1.7)$$

kde  $l_d$  [m] je efektivní délka kapiláry,  $t_{m,i}$  [s] je migrační čas analyzované látky  $i$  a  $\sigma_{l,i}$  [m] a  $\sigma_{t,i}$  [s] jsou směrodatné odchylky koncentračního gaussovského profilu v prostorové a časové doméně. V CZE počet teoretických pater dosahuje hodnot  $10^5$ - $10^6$ . Do počtu teoretických pater se promítají všechny rozmývací jevy uvedené v kapitolách 1.2 a 1.3.

Pro zjednodušení, uvažujeme-li z disperzních jevů pouze podélnou difúzi a elektroosmotický tok je nulový, lze počet teoretických pater,  $N_{dif,i}$ , vyjádřit na základě Einsteinovy-Smoluchowského rovnice:

$$N_{dif,i} = \frac{\mu_{ep,i} U l_d}{2 D_i l_c} \quad (1.8)$$

kde  $\mu_{ep,i}$  [ $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] je efektivní elektroforetická pohyblivost analytu,  $U$  [V] je separační napětí,  $l_c$  [m] je celková délka kapiláry, a  $D_i$  [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ] je difúzní koeficient. Tato rovnice je omezeně použitelná; jak vyplývá z rovnice (1.6), platí pouze pro roztoky v nekonečném zředění. Pro látky s nevysokým nábojovým číslem a nízkou iontovou silou základního elektrolytu lze pro teplotu 25°C získat přibližný výraz

$$N_{dif,i} \approx 20 z_i U \frac{l_d}{l_c} \quad (1.9)$$

kde  $z_i$  je nábojové číslo analyzovaného iontu  $i$ . Z rovnice vyplývá, že vyšší účinnosti lze dosáhnout vyšším napětím, kdy se zkrácením doby analýzy omezí vliv difúze.

Veličina, která vyjadřuje separaci dvou analytů  $i$  a  $j$ , se nazývá rozlišení,  $R_{ij}$ . Charakterizuje relativní míru separace dvou píků. Je definována:

$$R_{ij} = \frac{2(t_{m,j} - t_{m,i})}{(w_{t,i} + w_{t,j})} \quad (1.10)$$

kde  $t_{m,i}$  a  $t_{m,j}$  [s] jsou migrační časy a  $w_{t,i}$  a  $w_{t,j}$  [s] jsou šířky píků při základně. Dva píky jsou úplně rozdělené, pokud je rozlišení větší než 1,5.

V kapilární elektroforéze se pro rozlišení uvádí vztah

$$R_{ij} = \frac{1}{4} \frac{\Delta \mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep}} \sqrt{\bar{N}} \quad (1.11)$$

kde  $\Delta \mu_{ep} = \mu_{ep,i} - \mu_{ep,j}$  je rozdíl pohyblivostí analytů  $i$  a  $j$ ,  $\bar{\mu}_{ep}$  [ $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] a  $\bar{N}$  jsou aritmetické průměry pohyblivostí a účinností píků analytů  $i$  a  $j$ .



## 2 Kapilární elektroforéza peptidů

### 2.1 Úvod

Peptidy představují početnou skupinu mimořádně významných a široce rozšířených biologicky aktivních látek: působí jako hormony, neurotransmitery, imunomodulátory, koenzymy nebo inhibitory enzymů, léčiva, toxiny a antibiotika a podílí se tak na řízení a regulaci mnoha životně důležitých procesů ve všech živých organismech. Přírodní peptidy jsou tvořeny ze 20 základních aminokyselin spojených peptidovými vazbami a někdy též disulfidovými můstky. Syntetické preparáty peptidů mohou obsahovat kromě kódovaných navíc ještě nekódované aminokyseliny a další typy vazeb. Výsledkem je velký počet aminokyselinových sekvencí v řetězcích peptidových molekul, které se liší svou velikostí (relativní molekulovou hmotností), elektrickým nábojem a prostorovým uspořádáním, tedy vlastnostmi, které způsobují jejich rozdílné elektroforetické pohyblivosti a umožňují jejich dělení kapilárními elektromigračními metodami.

V současné době význam separace peptidů vzrůstá především v oblasti proteomiky a peptidomiky, které představují hlavní směry při studiu biologických procesů a při vývoji nových léčiv. Separace, analýza, izolace a charakterizace peptidů patří mezi nejvýznamnější aplikační oblasti vysokoúčinných kapilárních elektromigračních separačních technik. Jejich využití v chemii peptidů bylo postupně shrnuto v přehledných článcích [33-35].

### 2.2 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Peptidy a jejich analogy a fragmenty jsou izolovány z přírodních materiálů nebo jsou syntetizovány z jednotlivých aminokyselin nebo jejich bloků. V některých případech jsou připraveny semisynteticky, tzn. syntetický peptid je navázán na izolovaný nativní peptid nebo na jeho fragment. Takto připravené peptidy bývají často využívány v biochemii jako substráty a inhibitory enzymů při zjišťování mechanismu jejich katalytických účinků, k modelovým studiím interakcí antigenů s protilátkami, hormonů s receptory, peptidů a proteinů s nukleovými kyselinami a k mapování antigenních epitopů proteinů. Široké uplatnění nacházejí také ve farmaceutickém průmyslu, medicíně a veterinární praxi. V takových případech je velmi důležitá kontrola úspěšnosti izolace nebo syntézy, případně jednotlivých kroků celého procesu, neboť

získané produkty mohou obsahovat různé příměsi, jako jsou vedlejší produkty peptidové syntézy, které mají nežádoucí negativní účinky.

CZE analýza se běžně používá ke stanovení stupně čistoty [36, 37], stanovení nízkomolekulárních iontových příměsí [38, 39], k analýze peptidů o nízké koncentraci v komplexních biomatricích jako jsou biologické tekutiny, buněčné lysáty a tkáňové extrakty s využitím hmotnostní spektrometrie (MS) a laserem indukované fluorescenční (LIF) detekce [40, 41], ke sledování chemických a enzymatických reakcí a fyzikálních změn pomocí hmotnostní spektrometrie s indukcí laserem za přítomnosti matrice ve spojení s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF-MS) [42, 43], k charakterizaci peptidů a proteinů sekvencí aminokyselin v polypeptidovém řetězci [44] a při peptidovém mapování, tj. při identifikaci proteinů prostřednictvím separace jejich peptidových fragmentů [45].

### 2.2.1 Stanovení stupně čistoty

Čistota peptidů a obsah jednotlivých složek ve vzorku mohou být stanoveny různými postupy. V případě, že standard peptidu je dostupný, můžeme množství peptidu v analyzovaném vzorku určit absolutně pomocí metody kalibrační křivky nebo metodou vnitřního standardu, tzn. porovnáním migračních časů, výšky a/nebo plochy píku standardu peptidu a peptidu v daném vzorku. Pokud standard peptidu není dostupný, tzn. když je peptid prvně syntetizován (izolován) a analyzován, pak stupeň čistoty  $i$ -té složky peptidového preparátu může být kvantifikován na základě vyhodnocení: i. relativní výšky píku,  $P_h(i)$  (2.1), ii. relativní plochy píku,  $P_A(i)$  (2.2), a iii. relativní korigované plochy píku  $P_{CA}(i)$  (2.3):

$$P_h(i) = h(i) / \sum h(i) \quad i = 1 \dots n \quad (2.1)$$

$$P_A(i) = A(i) / \sum A(i) \quad i = 1 \dots n \quad (2.2)$$

$$P_{CA}(i) = A_c(i) / \sum A_c(i) \quad i = 1 \dots n \quad (2.3)$$

kde  $h(i)$  je výška píku  $i$ -té složky peptidového preparátu,  $A(i)$  je plocha píku  $i$ -té složky peptidového preparátu a  $A_c(i)$  je korigovaná plocha píku  $i$ -té složky peptidového preparátu,  $n$  je počet složek vzorku peptidového preparátu. Korigovaná plocha píku je plocha píku vztažená k migrační rychlosti daného analytu a tj. je rovna ploše píku dělené migračním časem daného píku.

Takto stanovený stupeň čistoty je pouze přibližný, neboť molární absorpční koeficienty jednotlivých složek peptidového preparátu se mohou lišit. Nejčastěji

syntetické peptidy obsahují jako příměsi strukturně podobné látky výsledného produktu, které mají podobné molární absorpční koeficienty. Stanovení na základě relativní výšky píku (2.1) je vhodné použít v případech, kdy píky mají podobný tvar a šířku. Stanovení na základě relativní plochy píku (2.2) se užívá při vyhodnocování píku, jejichž rozdílná šířka není způsobena různou migrační rychlostí, ale elektromigrační disperzí nebo adsorpcí na stěnu kapiláry. Nejpřesnější stanovení stupně čistoty je pomocí relativní korigované plochy píku.

Parametrem kvalitativní analýzy peptidu je elektroforetická pohyblivost, která je pro daný peptid charakteristická za definovaných experimentálních podmínek.

## 2.3 Detekce

### 2.3.1 Základní kritéria pro funkci detektoru

Mezi nejběžněji uváděné charakteristiky detektoru řadíme: citlivost, šum, mez detekce, mez stanovitelnosti, spolehlivost (opakovatelnost), charakter závislosti signálu na koncentraci (lineární dynamický rozsah) a selektivitu.

Citlivost,  $S$ , je definovaná jako poměr změny signálu detektoru a změny koncentrace nebo hmotnosti analytu. Citlivost je dána směrnicí kalibrační křivky v daném bodě. Optimální detektor má být co nejcitlivější v souladu s dalšími uvedenými kritérii.

Šum,  $n$ , je část měřené veličiny, která neobsahuje informaci o analytu. V ideálním detektoru by měl být šum nulový. Ve skutečných detektorech se měřená veličina skládá ze signálu (tj. odezvy na sledovanou látku) a dalších složek, které tvoří pozadí (základní linie). Nežádoucí efekty obsažené v pozadí jsou způsobeny nečistotami v BGE, klidovými proudy zesilovače, síťovým nebo harmonickým kmitočtem, nevhodnou konstrukcí analyzátoru, driftem, poruchami v síťovém napětí, bublinkami v kapalině a jinými rušivými faktory. Většinu nežádoucích složek pozadí lze snáze či obtížněji potlačit, kompenzovat nebo odstranit. Je žádoucí, aby šum byl co nejnižší a poměr signálu k šumu co nejvyšší.

Mez detekce,  $LOD$ , je definovaná jako koncentrace (hmotnost) nebo látkové množství sledované látky, které lze kvalitativně postřehnout. Je určována statisticky, nejčastěji jako trojnásobek odhadu směrodatné odchylky šumu. Mez detekce se zmenšuje se vzrůstajícím poměrem signálu k šumu. Musíme vždy specifikovat metodu,

kteřou jsme mez detekce vypočítali, neboť hodnoty vypočítané různými metodami se liší. Mez stanovitelnosti, *LOQ*, je definována jako nejnižší koncentrace (hmotnost), kteřou lze stanovit.

Odezva detektoru, *R*, se vyjadřuje rovnicí  $R = S \cdot c^x$ , pak dynamický rozsah je interval koncentrace, ve kterém  $x \neq 0$ , tj. interval, ve kterém změna koncentrace analytu způsobuje změnu signálu.

### 2.3.2 UV-absorpční detekce

Nejčastěji používanou detekcí peptidů v CE je UV-absorpční detekce v rozsahu vlnových délek 200-220 nm, tj. v oblasti, ve které absorbuje peptidová vazba. Čím delší je peptidový řetězec a větší počet peptidových vazeb, tím intenzivnější je odezva signálu při stejné molární koncentraci [46]. Aby nedocházelo ke snižování signálu analytu, je vhodné používat jako základní elektrolyty takové, které v daném vlnovém rozsahu minimálně absorbují [47]. Tato podmínka je obtížně splnitelná pro BGE při detekování peptidů v oblasti 185-200 nm. Absorpce záření peptidovou vazbou je v dané oblasti vysoká, avšak absorpce BGE také, výjimkou jsou fosfátový a borátový pufr. Citlivost lze též ovlivnit konstrukcí detekční cely, byly navrženy cely ve tvaru Z, U [48], „sleeve“ [49] nebo bubliny [50], nebo s využitím prekoncentrace vzorku [51].

Peptidy obsahující v řetězci aromatické aminokyselinové zbytky mohou být detekovány při specifické vlnové délce 275-280 nm. Nejvyšší molární absorpční koeficient má tryptofan a tyrosin, slabší intenzitu vykazuje fenylalanin [52]. Intenzita signálu je velmi ovlivněna pH základního elektrolytu.

### 2.3.3 Laserem indukovaná fluorescenční detekce

Laserem indukovaná fluorescenční (LIF) detekce je nejcitlivější detekcí v CE, její citlivost je o dva až tři řády vyšší oproti UV-absorpční detekci. Nevýhodou této detekce je nutnost pre-, on-, nebo postcolumn derivatizace peptidů fluorescenčními značkami [53]. Navíc peptidy často obsahují více derivatizačních center v molekule, a tak proto výsledkem může být až několik produktů derivatizační reakce jedné analyzované látky. Mezi nejčastěji používaná derivatizační činidla reagující s aminoskupinou patří naftalen-2,3-dikarboxyaldehyd (NDA), furoylchinolin-3-karboxyaldehyd (FQ), fluorescein isothiokyanát (FITC) a (4-karboxybenzoyl)chinolin-2-karboxyaldehyd (CBQCA) [54]. Jen peptidy s aromatickými aminokyselinami s excitační vlnovou délkou 240-280 nm mohou být detekovány bez derivatizace.

Nezbytnou podmínkou pro excitaci peptidů je UV-laserový systém [55, 56], nebo multifotonová excitace např. v blízké infračervené oblasti [57].

### **2.3.4 Elektrochemická detekce**

Mezi elektrochemickou detekci patří amperometrická [58], voltametrická [59] a vodivostní [60, 61]. Elektrochemická detekce není příliš častá v kapilární elektroforéze peptidů. Vysoce citlivá a selektivní amperometrická a voltametrická detekce se používá pro peptidy obsahující oxidovatelné a redukovatelné funkční skupiny, tedy pro peptidy obsahující aminokyseliny jako tyrosin, cystein nebo tryptofan [62-64]. Univerzální bezkontaktní vodivostní detekcí lze detekovat všechny peptidy bez omezujících požadavků na jejich strukturu [65, 66].

### **2.3.5 Hmotnostní spektrometrická detekce**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je univerzální, citlivá i selektivní detekční technika pro CE [67]. Význam použití on- a off-line MS detekce v posledních letech s rozvojem v oblasti proteomiky, peptidomiky a peptidového mapování podstatně vzrostl [67-69]. Velmi významnou roli hraje MS při analýze a určování struktury peptidů a proteinů v komplexních směsích [70, 71]. Nejběžněji používaným iontovým zdrojem při spojení CZE-MS je elektrosprej (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), které umožňují nejen rychlou charakterizaci elektroforeticky separovaných peptidů jejich relativními molekulovými hmotnostmi [72], ale též poskytují důležité informace o struktuře a sekvenci aminokyselin v řetězci, o post-translačních modifikacích, peptidových mapách bílkovin [73] a o nekovalentních interakcích peptidů.

## **2.4 Separace strukturně podobných peptidů**

### **2.4.1 Výběr optimálních separačních podmínek**

Strategie pro racionální výběr podmínek pro CE separaci peptidů sleduje obecná pravidla pro výběr vhodných CE separačních podmínek [10, 74-77] a bere v úvahu specifické vlastnosti peptidů:

i. amfoterní charakter: efektivní náboj a efektivní pohyblivost peptidů jsou silně závislé na pH, peptidy mohou být separovány jako kationty nebo anionty metodou CZE, CITP nebo jako neutrální látky pomocí CMEKC,

- ii. počet, rozložení a sekvence aminokyselin v řetězci a konformace peptidu, které ovlivňují rozpustnost a pohyblivost; ze struktury peptidu také vyplývá jeho ionogenní či neionogenní charakter, tedy i výběr vhodné separační metody (CZE nebo CMEKC),
- iii. biologickou aktivitu, specifické vazebné interakce, chemickou a teplotní stabilitu,
- iv. tendenci větších peptidů adsorbovat se na vnitřní stěny separační kapiláry.

#### 2.4.2 Složení a pH základního elektrolytu

Z amfoterního charakteru peptidů vyplývá, že pro volbu CE separačních podmínek je důležité znát závislost efektivního a specifického náboje a/nebo efektivní elektroforetické pohyblivosti peptidů na pH, nebo alespoň jejich izoelektrické body ( $pI$ ).

pH základního elektrolytu by mělo být nejméně 1-2 jednotky vzdálené od  $pI$ , protože elektroforetická pohyblivost a rozpustnost peptidu při pH blízkém  $pI$  je nízká. Také je důležité, aby pH základního elektrolytu bylo v rozsahu, kde specifický náboj je větší než  $1 \cdot 10^{-4}$  e [47]. S přihlédnutím k tomu, že efektivní pohyblivost je přímo úměrná efektivnímu náboji a nepřímo úměrná relativní molekulové hmotnosti, a že rozdíly mezi pohyblivostí jednotlivých peptidů jsou maximální v oblasti největších rozdílů specifických nábojů jednotlivých peptidů, volíme jako optimální pH základního elektrolytu právě pH v oblasti maximálních rozdílů specifických nábojů.

Podle vhodně zvoleného pH vybíráme optimální složení základního elektrolytu (BGE). Jedna z významných vlastností BGE je pufrací kapacita při daném pH, pro optimální složení BGE splňuje  $pK_a$  pufrující složky podmínku  $pH_{BGE} = pK_a \pm 0,5$ . Typická iontová síla hlavní složky pufru se pohybuje v koncentračním rozsahu 10-200 mM. Těmto podmínkám vyhovuje několik pufrů. Výhodné je použití amfoterních, tzv. Goodových pufrů, dostupných v rozsahu pH 5,5-11, a kyselých izoelektrických pufrů dostupných v rozsahu pH 1,8-3,2, neboť navíc splňují podmínku relativně nízké elektrické vodivosti při dostatečné pufrací kapacitě [78, 79]. Mezi klasické pufrы pro kyselou oblast patří fosfátový a acetátový a pro zásadité pH borátový či fosfátový pufr.

#### 2.4.3 Další faktory ovlivňující výběr základního elektrolytu

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím výběr základního elektrolytu je rozpustnost látky. Analyzovaný peptid by měl mít minimální rozpustnost přibližně 1-0,1 mmol/l. Na rozpustnost peptidu má zásadní vliv pH, iontová síla a složení pufru, ale též různá aditiva. Pro zlepšení rozpustnosti bývá přidávána např. močovina a její deriváty

[80], neionogenní, zwitterionické, kationické a anionické detergenty [81] nebo cyklodextriny [82]. Tato činidla musí být přidávána opatrně, protože mohou měnit EOF, tvořit komplexy a nebo měnit mechanismus separace.

CZE separace peptidů jsou někdy prováděny v pufrech s přidavkem organického rozpouštědla jako acetonitrilu [83], methanolu [84], propanolu či jiných alkoholů. Organické rozpouštědlo může nejen ovlivnit rozpustnost, ale také změnit selektivitu a tím zlepšit nebo zhoršit rozlišení analytů [85].

Dále je nutné brát ohledy na chemickou a tepelnou stabilitu a biologickou aktivitu peptidů, aby nedocházelo k jejich nevratným změnám, jako např. denuraci, kterým je třeba zabránit pokud jsou dále použity k biologickému testování. Biologická aktivita peptidu je vždy vázaná na určitou konformaci polypeptidové molekuly, která je stabilní jen za určitých podmínek (pH, rozpouštědlo, složení pufru). Chemická stabilita některých funkčních skupin v peptidovém řetězci musí být také zohledněna. Peptidy obsahující labilní skupiny, např. amidovou, disulfidovou či sulfhydrylovou, nemohou být analyzovány při vysokém pH, neboť by u nich mohlo docházet k nežádoucím hydrolytickým nebo transsulfidovým reakcím.

## 2.5 Fyzikálně-chemická charakterizace peptidů

### 2.5.1 Efektivní a specifický náboj

Peptidy jsou amfoterní elektrolyty obsahující různé typy ionogenních skupin jako například aminoskupinu na N-konci peptidového řetězce nebo na bočním řetězci lysinu nebo karboxylovou skupinu na C-konci peptidu či na bočních řetězcích kyseliny asparagové a glutamové. Pro vybrané peptidy jsou tabelovány jejich acidobazické disociační konstanty [86], pro ostatní peptidy bereme průměrné hodnoty acidobazických disociačních konstant jednotlivých ionogenních skupin aminokyselin [47] viz **tabulka 1**.

Efektivní náboj peptidů je roven sumě nábojů (včetně znaménka) všech ionogenních skupin přítomných v polypeptidovém řetězci. Nejčastěji používaný vztah pro výpočet efektivního náboje je odvozen od Henderson-Hasselbalchovy rovnice [87]. Efektivní náboj je funkcí pH roztoku základního elektrolytu a  $pK_a$  hodnot ionogenních skupin aminokyselinových zbytků obsažených v peptidu [87]:

$$q = \sum_{i=1}^m \frac{1}{1+10^{pH-pK_a(i)}} - \sum_{j=1}^p \frac{1}{1+10^{pK_a(j)-pH}} \quad (2.4)$$

kde  $m$  a  $p$  jsou integrální počty kationických a anionických skupin,  $pK_a(i)$  a  $pK_a(j)$  jsou záporné dekadické logaritmy acidobazických disociačních konstant  $i$ -tých a  $j$ -tých ionogenních skupin analytu. Z toho vyplývá, že pokud známe aminokyselinovou sekvenci peptidu, můžeme z disociačních konstant jednotlivých ionogenních skupin peptidu určit, která skupina bude disociována a jaký bude její příspěvek k efektivnímu náboji při daném pH.

**Tabulka 1** Přibližný rozsah acidobazických disociačních konstant,  $pK_a$ , ionogenních skupin aminokyselinových zbytků v peptidovém řetězci.

Ionogenní skupina	Aminokyselinový zbytek	$pK_a$
-SO <sub>3</sub> H	kyselina cysteová	1,3
$\alpha$ -karboxylová	C-konec peptidového řetězce	1,8-3,5
$\beta$ - karboxylová	kyselina asparagová	3,5-4,5
-S-CH <sub>2</sub> -COOH	S-karboxymethylcystein	3,4-4,0
$\gamma$ - karboxylová	kyselina glutamová	4,0-4,5
imidazolová	histidin	5,6-6,9
$\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	N-konec peptidového řetězce	7,5-8,6
-SH	cystein	9,0-10,5
$\epsilon$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	lysin	9,0-10,8
$\delta$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	ornitin	9,6-10,2
fenolová	tyrosin	9,8-11,0
guanidiniová	arginin	10,0-12,5

Pro výpočet efektivního a specifického náboje (efektivní náboj dělený relativní molekulovou hmotností) při daném pH byl navržen počítačový program, který je založen na matematickém modelu acidobazických rovnováh pro obecný amfolyt [88]. Ze závislosti náboje na pH základního elektrolytu je možné získat důležité informace, jako např. oblast minimálního a maximálního náboje a hodnotu pH, v jehož okolí se náboj blíží nule, či je roven nule, tzv. izoelektrický bod ( $pI$ ) peptidu. V programu nejsou zohledněny vlivy sousedních aminokyselinových zbytků a sterické uspořádání v polypeptidovém řetězci, které mohou hrát důležitou roli v reálném prostředí. Podobný



přístup s přihlédnutím k vlivu prostředí na jednotlivé ionogenní skupiny byl publikován později [89]. Závislost efektivního náboje nebo efektivní pohyblivosti peptidu na pH lze určit též jinými metodami, jako např. acidobazickou titrační křivkou [90] nebo elektroforetickou titrační křivkou [91], případně pro malé oligopeptidy v rozmezí pH 4-10 kapilární izotachoforézou [92]. Izoelektrický bod peptidů lze též stanovit kapilární nebo gelovou izoelektrickou fokusací [74, 93] nebo CZE [94].

### 2.5.2 Efektivní elektroforetická pohyblivost

Efektivní elektroforetická pohyblivost peptidu je komplexní funkcí

- i. vlastností samotného peptidu (přítomné ionogenní skupiny, velikost, tvar),
- ii. vlastností základního elektrolytu, ve kterém se peptid nachází (složení, pH, iontová síla, viskozita a teplota),
- iii. interakcí peptidu se složkami média (solvatace, disociace, tvorba komplexu).

Z toho vyplývá, že pohyblivost musí být vždy vztahována k přesně definovaným podmínkám, jako je složení, pH a teplota základního elektrolytu.

Efektivní elektroforetickou pohyblivost peptidu v základním elektrolytu,  $\mu_{ep}$ , lze získat z experimentálně určeného migračního času peptidu,  $t_m$  [s], a migračního času elektroneutrální látky – markeru EOF,  $t_{eo}$  [s], podle vztahu:

$$\mu_{ep} = \frac{l_c l_d}{U} \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad (2.5)$$

kde  $l_c$  [m] je celková délka kapiláry,  $l_d$  [m] je efektivní délka kapiláry,  $U$  [V] je vložené separační napětí.

Při analýzách v silně kyselých základních elektrolytech s velmi pomalým elektroosmotickým tokem způsobeným potlačenou disociací silanolových skupin na stěnách křemenné kapiláry byla efektivní elektroforetická pohyblivost stanovena pomocí tlakem urychleného měření elektroosmotického toku [95]. Vzorek byl dávkován společně se zónou A neutrálního elektroosmotického markeru do kapiláry naplněné základním elektrolytem. Poté bylo vloženo separační napětí, analyty byly separovány a neutrální marker zóny A se pohyboval elektroosmotickou rychlostí. Analýza byla přerušena, separační napětí vypnuto v přesně daném čase,  $t_u$ , poté co zóna peptidu prošla detektorem. Následně byla nadávkována druhá zóna B stejného neutrálního markeru, kapilára byla vrácena do nádobky se základním elektrolytem, a na nádobku byl vložen dávkovací tlak. Obě zóny markeru, A i B, byly registrovány detektorem

v daných časech,  $t_A$  a  $t_B$ . Potom elektroforetická pohyblivost byla stanovena podle vztahu:

$$\mu_{ep} = \frac{l_c l_d}{U} \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_u} + \frac{t_A}{t_u t_B} \right) \quad (2.6)$$

kde  $l_c$  [m] je celková délka kapiláry,  $l_d$  [m] je efektivní délka kapiláry,  $t_m$  [s] je migrační čas peptidu,  $U$  [V] je vložené separační napětí.

### 2.5.3 Termodynamické acidobazické disociační konstanty

Stanovení termodynamické acidobazické disociační konstanty (konstanty acidity) ( $pK_a$ ) pomocí CZE je založeno na měření závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti ionogenní látky na pH v sérii základních elektrolytů o konstantní iontové síle. Jednosytná slabá kyselina HA podléhá disociaci podle rovnice:



Pro zjednodušení zápisu nebyla uvažována tvorba hydroxoniového kationtu ve vodném prostředí či obecně lyoniového iontu.

Poté termodynamická kyselá disociační konstanta,  $K_a$ , pro kyselinu HA je definovaná:

$$K_a = \frac{a_{H^+} a_{A^-}}{a_{HA}} = \frac{a_{H^+} c_{A^-} \gamma_{A^-}}{c_{HA} \gamma_{HA}} \quad (2.8)$$

$a_i$  jsou aktivity jednotlivých částic,  $c_i$  jejich molární koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ] a  $\gamma_i$  jejich aktivitní koeficient. Aktivitní koeficient neutrální formy,  $\gamma_{HA}$ , je roven jedné.

Aktivitní koeficienty pro zředěné elektrolyty při standardní teplotě 25°C lze vypočítat z klasické Debye-Hückelovy rovnice:

$$-\log \gamma_i = \frac{0.5085 z_i^2 \sqrt{I}}{1 + 0.3281 a \sqrt{I}} \quad (2.9)$$

kde  $I$  [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ] je iontová síla (výpočet viz rovnice 1.2),  $z_i$  je náboj iontu  $i$ ,  $a$  [m] je průměr hydratovaného iontu. Přesná hodnota průměru iontu nebývá známa, pro malé ionty se používá hodnota 0,5 nm.

Z praktického hlediska je vhodné zavést tzv. smíšenou disociační konstantu  $K_a^{mix}$  [96]:

$$K_a^{mix} = \frac{a_{H^+} c_{A^-}}{c_{HA}} \quad (2.10)$$

Ve výše uvedené rovnici vystupuje aktivita vodíkových kationů,  $a_{H^+}$ , která je přímo získána z měření pH základního elektrolytu ( $pH = -\log a_{H^+}$ ), a poměr koncentrací disociované a nedisociované formy kyseliny HA, který lze získat z elektroforetického měření.

Efektivní elektroforetická pohyblivost slabého elektrolytu  $j$ ,  $\mu_{ep,j}$ , je dána součtem iontových pohyblivostí,  $\mu_i$ , všech iontových forem elektrolytu  $j$  vážených jejich molárním zlomkem  $x_i$ :

$$\mu_{ep,j} = \sum_i \mu_i x_i \quad (2.11)$$

$$x_i = \frac{c_i}{\sum_i c_i} \quad (2.12)$$

kde  $c_i$  je molární koncentrace  $i$ -té iontové formy elektrolytu  $j$ .

Efektivní elektroforetickou pohyblivost slabé jednosytné kyseliny,  $\mu_{ep,HA}$ , lze vyjádřit vztahem:

$$\mu_{ep,HA} = \left[ \frac{1}{1 + 10^{(pK_a^{mix} - pH)}} \right] \mu_{A^-} \quad (2.13)$$

Aktuální iontová pohyblivost,  $\mu_{A^-}$ , a smíšená disociační konstanta závisí na iontové síle a teplotě základního elektrolytu. V případě, že analýza je provedena při konstantní iontové síle a teplotě, tedy konstantních parametrech, efektivní elektroforetická pohyblivost,  $\mu_{ep,HA}$ , je pouze funkcí pH a parametru  $K_a^{mix}$ . Smíšené disociační konstanty se získají pomocí regresní analýzy linearizovaných forem nebo nelinearizovaných modelů závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí na pH získané z CZE analýz látky v základních elektrolytech o různém pH. Smíšená disociační konstanta se přepočte na termodynamickou disociační konstantu pomocí vztahů (2.8) a (2.10).

Metoda CZE byla použita jako alternativní metoda pro stanovení  $pK_a$  k tradiční potenciometrii pro široké spektrum látek jako aminokyseliny [96], peptidy [97-99], a imidazolové deriváty [100].

## 2.6 Vztahy mezi efektivní elektroforetickou pohyblivostí peptidů a jejich nábojem, velikostí a prostorovým uspořádáním

### 2.6.1 Semiempirické modely

Modely jsou založeny na Stokesově rovnici, která popisuje pohyb kulovité částice v kapalině, a na působení síly elektrického pole na nabitou částici. Semiempirické modely korelují efektivní elektroforetickou pohyblivost peptidů,  $\mu_{ep}$ , s jejich efektivním nábojem,  $q$ , a velikostí jejich molekuly vyjádřenou pomocí relativní molekulové hmotnosti,  $M_r$ , nebo počtem aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci,  $n$ . Tyto modely rovněž popisují elektroforetické chování různých prostorových uspořádání molekul a mohou tak být využity při predikci sekundární nebo terciární struktury peptidů a proteinů v roztoku.

Prvně kvantitativně popsal tento vztah Offord [101] pro sérii oligo- a polypeptidů dělených papírovou elektroforézou:

$$\mu_{ep} = \frac{k_1 \cdot q}{M_r^{2/3}} \quad (2.14)$$

kde  $k$  je konstanta proporcionality. Tento vztah byl později použit v pracích dalších autorů, Issaq et al. [102], Rickard et al. [103] a Basak a Ladisch [104], Tessier et al. [105] a Jalali-Heravi [106] pro peptidy separované ve volném roztoku pomocí CZE.

Následující vztah byl odvozen pro rigidní sféricky tvarované molekuly v pufrch s nízkou iontovou silou [107]:

$$\mu_{ep} = \frac{k_1 \cdot q}{M_r^{1/3}} \quad (2.15)$$

Další semiempirický model byl navržen pro syntetické polymery s cylindrickým nebo tyčovitým tvarem molekul [108]:

$$\mu_{ep} = \frac{k_1 \cdot q}{M_r^{1/2}} \quad (2.16)$$

Cross [109] obměnil Offordův výraz tím, že jej převedl do logaritmické formy:

$$\log\left(\frac{\mu_{ep}}{q}\right) = k \cdot \log M_r \quad (2.17)$$

kde  $k$  je exponentem  $M_r$  v nelogaritmickém vztahu a může být určen jako směrnice této závislosti. Svou studii souboru peptidů upřesnil dalším zkoumáním konformačních stavů rozšířením o stanovení hydratačního obalu molekuly [110, 111].

Podobný výraz jako pro polymery navrhl Kim [112] pro svou sérii peptidů vzniklých enzymovým štěpením proteinů:

$$\mu_{ep} = \frac{k_1 \cdot q}{M_r^{0,56}} \quad (2.18)$$

Kombinací dvou modelů pro velké (2.14) a malé (2.15) molekuly získal Compton [113] další vztah:

$$\mu_{ep} = \frac{k_1 \cdot q}{k_2 \cdot M_r^{1/3} + k_3 \cdot M_r^{2/3}} \quad (2.19)$$

kde první člen ve jmenovateli,  $M_r^{1/3}$ , popisuje chování menších molekul, a druhý člen,  $M_r^{2/3}$ , chování větších molekul v pufru s nízkou iontovou silou.

V dosud uvedených příkladech modelů byla použita jako parametr velikosti molekuly relativní molekulová hmotnost. Jinou možností vyjádření molekulové velikosti je počet zbytků aminokyselin v peptidovém řetězci,  $n$ . Tento přístup byl prvně použit Grossmanem et al. [114]:

$$\mu_{ep} = \frac{k_2 \cdot \ln(q+1)}{n^{0,43}} \quad (2.20)$$

Cifuentes a Poppe [89] představili prvně modifikaci Grossmanova klasického lineárního modelu, kde v logaritmické závislosti pohyblivosti na náboji bylo též vyjádřeno snížení vlivu náboje silně nabitého peptidu:

$$\mu_{ep} = \frac{k_2 \cdot \log(1+k_1q)}{M_r^{0,411}} \quad (2.21)$$

Tento model byl také použit k charakterizaci fragmentů z enzymové hydrolyzy proteinu hovězího cytochromu c pomocí CE-MS [115]. Téměř stejná rovnice jenom s malým rozdílem v hodnotě exponentu  $M_r$ , 0,435 místo 0,411, byla navržena Adamsonem [116].

Sanz-Nebotová [117] kombinovala vztah (2.21) s  $q$  zohledňujícím snížení vlivu náboje silně nabitého peptidu a vztahy pro klasický semiempirický model (2.14), (2.15) a (2.16), porovнала jejich výsledky a vyhodnotila jako nejvhodnější korelační model vztah:

$$\mu_{ep} = \frac{k_2 \cdot \ln(k_1q+1)}{M_r^k} \quad (2.22)$$

kde  $k = 1/3$  pro malé molekuly,  $k = 1/2$  pro středně velké polymery,  $k = 2/3$  pro velké molekuly.

## 2.6.2 Predikce sekundární struktury peptidů

Vztahy korelující efektivní elektroforetickou pohyblivost peptidů s jejich efektivním nábojem a velikostí a tvarem jejich molekul lze použít pro určení pravděpodobné sekundární či terciární struktury peptidů a proteinů ve volném roztoku. Struktura molekuly je odvozena ze vztahu mezi elektroforetickou pohyblivostí a exponentem relativní molekulové hmotnosti, případně exponentem počtu aminokyselinových zbytků v peptidovém řetězci, jak je uvedeno v **tabulce 2** [107].

**Tabulka 2** Vztah mezi absolutní hodnotou koeficientu,  $k$ , ve vztahu (2.17) a tvarem molekuly.

Tvar molekuly	Proporční vztah
kulovitý	$k \sim 1/3$
náhodné klubko – neuspořádaný řetězec	$k \sim 0,5-0,6$
tyčovitý	$k \sim 0,8$
zploštělý disk	$k \sim 2/3$
Free-draining spirála	$k \sim 1,0$

Pro určení molekulové konformace je velmi důležité najít správnou korelační rovnici, ve které je elektroforetická pohyblivost vztažena k velikosti molekul. Také musíme brát v úvahu délku peptidového řetězce, neboť krátké peptidy se chovají v roztoku jako jednoduché organické ionty. Molekuly peptidů s delšími řetězci tvoří více uspořádané sekundární struktury, které jsou silně závislé na prostředí, ve kterém se nacházejí [118].  $\alpha$ -helikální nebo  $\beta$ -listové konformace se za běžných podmínek používaných pro CZE analýzy vyskytují častěji než náhodná klubka. Ve velkém rozsahu molekulových hmotností polypeptidy mohou tvořit odlišně organizované struktury [119]. Struktura je závislá na rozpouštědle, iontové síle a pH základního elektrolytu [120, 121]. Struktura syntetických peptidů byla studována CE s MS detekcí [122]. Znalost peptidové struktury pomáhá i při určování tvarů proteinových molekul v roztoku [123] a při peptidovém mapování proteinů [124].

### 3 Peptidové hormony

Biologicky aktivní peptidy reprezentují širokou skupinu syntetických nebo v přírodě se vyskytujících biomolekul, mezi nimiž jednu z nejpočetnějších a nejdůležitějších tříd tvoří hormony a peptidy, které hormony uvolňují.

#### 3.1 Neurohypofyzární hormony

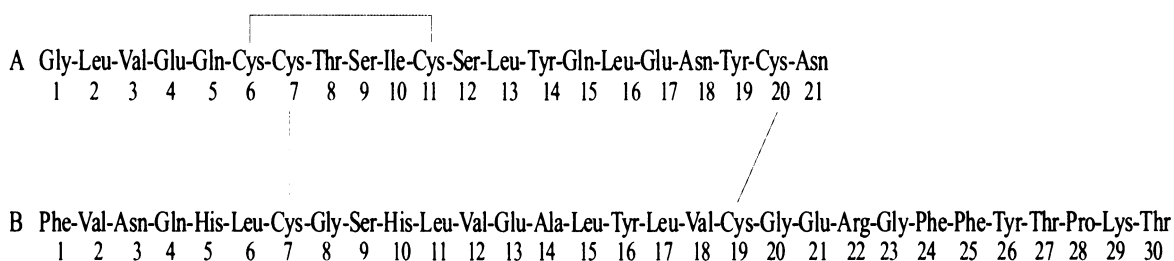
Mezi nejvýznamnější neurohypofyzární hormony patří vasopressin a oxytocin [125]. Oxytocin způsobuje stahy dělohy a vypuzování mléka při kojení. Vasopressin a jeho analogy jsou antidiuretické hormony [126], stimulují vylučování vody z ledvin a také zvyšují krevní tlak, aby umožnily lepší prokrvení ledvin [127]. Analogy antidiuretických hormonů byly různě modifikovány pro farmaceutický průmysl a vykazaly až 30krát větší účinnost antidiuretické aktivity a výrazný vzrůst účinku na krevní tlak. Pomocí studia 3D-struktury vasopressinu bylo dokázáno, že mezi dvěma kruhy Tyr a Phe jsou vytvořeny intramolekulární hydrofobní vazby. Díky této interakci tvoří molekula oxytocinu přibližně čtverec a vasopressinu lopatku. Tvar molekuly má zásadní význam pro vazbu daného hormonu k příslušnému receptoru na povrchu buňky a ovlivňuje také jeho elektroforetickou pohyblivost.

Strukturně podobné analogy vasopressinu a jiných biopeptidů byly separovány metodou CZE v kyselém základním elektrolytu 150 mM kyselině fosforečné, pH 1,8, a metodou RP-HPLC a iontově výměnnou chromatografií (IEC) [128, 129]. Oxytocin, vasopressin a další neurohypofyzární peptidové hormony byly analyzovány pomocí CMEKC ve čtyřech různých micelárních systémech – kationickém, anionickém, zwitterionickém a neutrálním [130]. Ke kontrole čistoty syntetických biologicky aktivních peptidů jako angiotensinu, oxytocinu, bradykininu či hormonu uvolňujícího gonadotropiny (GnRH) byla vyvinuta on-line prekoncentrační CE spojením kapiláry naplněné chromatografickým sorbentem s C18 reverzní fází a separační vnitřně nepokryté křemenné kapiláry při pH 3,5 [131]. Srovnání a výhody použití metody CEC na kolonách C8, C18 a C18/SCX oproti HPLC a CZE v kyselém prostředí acetonitrilu a tetraethylammonium chloristanu (ACN-TEAP), pH 3,0, bylo demonstrováno na oxytocinu, desmopressinu a karbetocinu [132]. Vliv složení BGE a předúpravy vzorku na účinnost separace v lidské plazmě byla testována na skupině čtyř peptidů včetně vasopressinu v tris-fosfátovém pufru, pH 2,0 [133]. Metoda imunoanalytického testování založeného na kompetitivní reakci volného vasopressinu a vasopressinu

vázaného v komplexu s fluorescein-isothiokyanátem (FITC) v mozkomíšní tekutině byla vyvinuta na modelové směsi [134].

### 3.2 Insulin

Insulin je peptidový hormon produkovaný pankreatem, reguluje metabolismus sacharidů, proteinů a mastných kyselin [125]. Molekula insulinu se skládá ze dvou polypeptidových řetězců, A a B, obsahujících 21 a 30 aminokyselinových zbytků viz. **obrázek 1**. Dva řetězce insulinu jsou vázány dvěma disulfidickými vazbami a třetí disulfidická vazba je na řetězci A. Relativní molekulová hmotnost je 5808, izoelektrický bod, *pI*, je 5,4-5,5.



**Obrázek 1** Sekvence aminokyselin lidského insulinu

CZE se často využívá k analýze lidského insulinu a jeho derivátů. Stabilní deriváty insulinu s anhydridem kyseliny exo-3,6-epoxy-1,2,3,6-tetrahydroftalové (ETPA) byly stanoveny pomocí CE a iontově výměnné HPLC [135]. CZE s UV detekcí byla použita při analýze insulinu v CHES-acetátovém elektrolytu v přítomnosti acetonitrilu (ACN), pH 7-8, [136] a následně porovnána s HPLC analýzou ve fosfátovém pufru s přídavkem ACN jako mobilní fázi. Metoda CE byla použita k validaci HPLC analýzy insulinu pro kvalitativní kontrolu pro farmaceutické účely [137]. Lidský insulin, proinsulin a mezofomy byly zároveň kvantitativně určeny pomocí CE v kyselině N-[tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonové, diethylentriaminu a methanolu po jejich předchozí purifikaci chromatografickými metodami [138]. Pro imunoanalytické stanovení insulinu pomocí CZE se nejčastěji používá fluorescenční detekce, kde se insulin předem musí fluorescenčními značkami derivatizovat nebo lze též využít nativní fluorescence (excitace při 275 nm, emise při 305 nm) [139]. Insulin s navázanou



fluorescenční značkou NN 382 byl analyzován v 50 mM fosfátu a 25 mM sulfátu draselném, pH 7,0, s multifotonovou LIF detekcí v blízké infračervené oblasti [140].

### 3.3 Enkefaliny a dalarginy

Enkefaliny (ENKs), [Leu<sup>5</sup>]enkefalin ([Leu<sup>5</sup>]ENK), pentapeptid H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH, a [Met<sup>5</sup>]enkefalin ([Met<sup>5</sup>]ENK), pentapeptid H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH, a dalargin (DLR), hexapeptid H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH, jsou biologicky aktivní peptidy, působící jako ligandy pro opiatové receptory v mozku [126]. Enkefaliny jsou fragmenty přírodního opioidního hormonu dynorfinu A (17 aminokyselin) a dynorfinu B (13 aminokyselin). Enkefaliny a dynorfiny jsou produkovány ze dvou velkých prekurzorových proteinů, preproenkefalinu a preprodynorfinu [126]. Mají významnou roli při vzniku stresu, zmírnění bolesti a jsou zapojeny do teplotní regulace a dýchání. Tyto peptidy a jejich analogy jsou také aplikovány při léčbě některých mentálních chorob jako chronická schizofrenie nebo senilní demence Alzheimerova typu.

Enkefaliny a dalargin byly často analyzovány kapilární elektroforézou, většinou byla kontrolována čistota syntetických preparátů, ale CE byla též použita pro stanovení těchto peptidů v biologických tekutinách jako sérum, plazma nebo mozkomíšní mok. Racionální přístup při výběru a optimalizaci důležitých experimentálních parametrů jako složení a pH základního elektrolytu, průměr kapiláry či sběr frakcí v analytické a preparativní CZE opioidních peptidů včetně dynorfinových a enkefalinových analogů v kombinaci s off-line hmotnostním spektrometrem byla shrnuta v práci autorů Lee a Desiderio [141]. [Leu<sup>5</sup>]ENK, [Met<sup>5</sup>]ENK a [desTyr<sup>1</sup>,Leu<sup>5</sup>]ENK byly analyzovány s vysokou citlivostí (s detekčním limitem 3-11 attomolů) metodou CZE s hmotnostním spektrometrem ESI-TOF-MS v citrátovém a fosfátovém BGE [142]. Analogy ENKs a DLR a dalších peptidů jako desmopressin a vasopressin byly separovány CZE v silně kyselém BGE, 150 mM kyselině fosforečné, pH 1,8 [128]. Stejně analogy byly též analyzovány a děleny CMEKC s micelární pseudofází tvořenou anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS) v alkalických BGEs (20 mM tetraborát, pH 9,2, a 20 mM fosfát, pH 8,8) nebo s kationickým detergentem cetyltrimethylammonium bromidem (CTAB) v kyselém BGE (50 mM fosfát, pH 4,1) [128, 129, 143]. Chirální separace dalarginových analogů s D- a L-izomery Phe na čtvrté pozici v peptidovém řetězci byly prováděny v 50 mM fosfátovém pufru, pH 2,5

s 10 mM  $\beta$ -cyklodextrinem [128]. [D-Tle<sup>2,5</sup>]DLR byl analyzován CZE v 0,5 M kyselině octové, pH 2,5, a poté přečištěn preparativně pomocí průtokové zónové elektroforézy [144]. Šest analogů a fragmentů enkefalinů bylo rozděleno a stanoveno v biologických matricích pomocí multidimenzionálního separačního systému tvořeného on-line spojením molekulově vylučovací chromatografie (SEC), koncentrační kolony s reverzní fází C18 a CZE [145, 146] s následnou hmotnostní spektrometrickou detekcí ESI-MS-MS-MS [147]. Dynorfinové peptidové analogy byly separovány CMEKC s anionickým, SDS, kationickým, CTAB, a zwitterionickým, CHAPS, surfaktantem [148]. Peptidy odvozené od enkefalinů byly derivatizovány fluorescein izothiokyanátem a následně děleny CMEKC v borátovém BGE s SDS a detekovány fluorescenčním detektorem [149]. [D-Pen<sup>2,5</sup>]ENK (D-Pen je D-penicilamin neboli D-3-merkaptovalin) a [D-Ser<sup>2</sup>,Thr<sup>6</sup>]DLR byly analyzovány v krysím séru pomocí CZE ve fosfátovém (pH 2,4) a borátovém (pH 8,3) pufru [150, 151]. Enkefaliny a jejich fragmenty byly elektrochemicky detekovány jako komplexy mědi (oxidace mědi na dvojmocnou) vznikající v kapiláře po CZE separaci [64]. Analogy enkefalinů byly separovány v tris-fosfátovém a Na-fosfátovém BGE, pH 2,5, v kapiláře modifikované nekovalentně vázanou dvojvrstvou opačně nabitých polymerů [152]. [Leu<sup>5</sup>]ENK, [Met<sup>5</sup>]ENK a jiné peptidové hormony byly separovány ve třech BGEs o pH 2,61; 2,85 a 10,0, a jejich  $pK_a$  byly stanoveny v široké pH oblasti 2-12 [153], a následně analyzovány hmotnostním spektrometrem ESI-MS v 50 mM kyselině octové a 50 mM kyselině mravenčí, pH 2,85 [154]. Úspěšná separace deseti peptidů – enkefalinů a jejich fragmentů a derivátů byla provedena ve fosfátovém pufru, pH 3,11, s UV detekcí [155]. [Leu<sup>5</sup>]ENK, [Met<sup>5</sup>]ENK a [D-Ala<sup>2</sup>]ENK byly též děleny pomocí CE v nevodném prostředí s elektrochemickou detekcí v nepokrytých křemenných a polyethylenglykolem (PEG) pokrytých kapilárách [156]. Fluorescenční detekce byla využita při vývoji imunoanalytického stanovení založeného na kompetitivní reakci volného [Met<sup>5</sup>]ENK a [Met<sup>5</sup>]ENK vázaného v komplexu s fluoresceinem [157].

### 3.4 Hmyzí oostatické peptidy

Hmyzí oostatické peptidy (insect oostatic peptides, IOPs) se řadí do skupiny antigonadotropních hmyzích hormonů vyskytujících se v různých živočišných druzích jako například mouše masařce *Neobellieria bullata* nebo komárovi *Aedes aegypti*. Tyto peptidy bývají též někdy nazývány trypsinové modulační oostatické faktory (TMOF).

Jelikož ovlivňují reprodukční procesy hmyzu, jsou považovány za možný nový typ biologicky odbourávatelných insekticidů. TMOF vyskytující se u komára *Aedes aegypti* (*Aed*-TMOF) je přírodní dekapeptid, který má sekvenci H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-OH. Byl prvně popsán Borovským [158] jako inhibitor biosyntézy trypsinových enzymů ve středním střevě komára, kde zabraňuje degradaci přijaté krve a tím nepřímo zastavuje růst oocytů [159]. Borovský také navrhl pravděpodobnou sekundární strukturu dekapektidu jako levotočivou  $\alpha$ -helikální strukturu [159]. Později analogy se zkracujícím se C-koncem řetězce, s cyklickou strukturou a prolinem nahrazeným dehydroprolinem či tyrosinem nahrazeným homotyrosinem byly syntetizovány na pevné fázi [160-162] a charakterizovány NMR a cirkulárním dichroismem [162, 163]. Biologická aktivita a mechanismus působení analogů byly studovány na mouchách masařkách *Neobellieria bullata* a myších. Zatímco u masařek byl v závislosti na struktuře pozorován 20-80% pokles reprodukčního procesu [164, 165], u myši žádný efekt na reprodukci zjištěn nebyl [166].

### 3.5 Hormony uvolňující gonadotropiny

Hormon uvolňující gonadotropiny (GnRH), dříve nazývaný hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH), je fyziologicky významným dekapeptidem (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>), který je syntetizován v neurosekrečních buňkách v hypotalamu a reguluje reprodukční funkce a podporuje druhotné pohlavní znaky. Agonisté GnRH jsou používány k léčení rakoviny prsu a prostaty.

Syntetické GnRH a jejich analogy a fragmenty jsou používány v CE jako modelové analyty nebo ve směsích společně s dalšími peptidy při vývoji metod pro reálné vzorky, při testování nové CE instrumentace [154, 167, 168] nebo při hledání optimálních experimentálních podmínek pro separaci [153, 169] nebo analýzu biopeptidů [131]. Úspěšná kombinace CE-MS bez zmlžujícího plynu byla demonstrována na gonadorelinu (syntetický lidský GnRH) [167]. On-line prekoncentrační CE-MS systém umožnil při imunoanalytickém stanovení vysokou citlivost, dobrou opakovatelnost a snadnou automatizaci. Jiný on-line prekoncentrační CE systém byl optimalizován pro kontrolu čistoty syntetických biologicky aktivních peptidů včetně GnRH ve fosfátovém BGE, pH 3,5 [131]. Membránový prekoncentrační CE-MS/MS systém byl navržen pro sekvenování biologicky aktivních peptidů na úrovni sub-100 femtomolů [170]. Devět modelových peptidů bylo analyzováno v 2 mM

acetátu amonném a 1% v/v kyselině octové. Úspěšná CE a CEC separace směsi peptidů a proteinů byla provedena v křemenných kapilárách modifikovaných kladně nabitým alkylaminosilylovým monomerem s UV a MS detekcí [171]. Rychlá separace pěti peptidů včetně GnRH byla získána v 5 mM kyselině octové s 50% v/v ACN. Spojení CE a nano-ESI rozhraní, kde elektrické porézní spojení a vstřikovací špička byly integrovány na vlastní křemennou kapiláru, bylo otestováno na separaci směsi devíti peptidů a proteinů včetně GnRH v 1 M kyselině octové, pH 2,4 [172]. Různé typy off-line a on-line spojení CZE-ESI-TOF-MS s pozlaceným rozhraním byly zkonstruovány a použity při separaci a analýze standardní směsi pěti peptidů a proteinů v 5 % v/v kyselině octové [173]. GnRH a jeho čtyři analogy, [D-Ala<sup>6</sup>]GnRH, [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH, [D-Phe<sup>2</sup>,D-Ala<sup>6</sup>]GnRH a [Gly-OH<sup>10</sup>]GnRH, byly analyzovány v kapiláře pokryté 3-(aminopropyl)trimethylsilanem v 0,01 M kyselině octové, pH 3,5, jako modelové směsi při testování vhodnosti CE-ESI-MS pro další identifikaci toxinů v hadím jedu [174]. CE využívající plem zesílené dávkování vzorku byla použita při stanovení vedlejších produktů po syntéze buserelinu, [Des-Gly<sup>10</sup>,D-Ser(tBu)<sup>6</sup>,Pro-NHEt<sup>9</sup>]GnRH, [175], jako optimální experimentální podmínky byly nalezeny kyselé BGEs s pH menším než 3,5. Úspěšné off-line spojení CE a MALDI-MS bylo předvedeno na analýze čtyř standardních peptidů, proteinů a reálného vzorku slz v 50 mM acetátu amonném, pH 7,4 [176]. Na základě známých nebo dříve stanovených charakteristik (acidobazické disociační konstanty ionogenních skupin) byly stanoveny vhodné separační podmínky pro CE analýzu sedmi terapeutických peptidů včetně buserelinu a triptolerinu, [D-Trp<sup>6</sup>]LHRH, [153]. Optimalizace podmínek byla prováděna v širokém rozmezí pH 2-12, nejlepší separace byla dosažena v BGE složeném z 50 mM kyseliny octové a 50 mM kyseliny mravenčí, pH 2,85 bylo upraveno pomocí amoniaku. Stejná sada peptidů byla též separována a charakterizována v organovodném elektrolytu, 2-propanol, kyselina octová a kyselina mravenčí, pomocí CE-ESI-MS s komerčním [154] a v laboratoři vyvinutým rozhraním pro stínící roztok [168]. Dále bylo provedeno srovnání predikovaných a experimentálně získaných hodnot rozlišení, elektroforetické pohyblivosti a retenčních faktorů v CE a HPLC [169]. Úplné separace GnRH a jeho pěti analogů bylo dosaženo pomocí RP-HPLC v mobilní směsi složené z ACN a fosfátového pufru, pH 2,5, CZE ve fosfátovém a borátovém pufru a CMEKC s přidáním CTAB, CHAPS a Triton X-100 do BGEs použitých v CZE [177]. Užití alternativní bezkontaktní vodivostní detekční techniky k UV-absorpční detekci bylo demonstrováno na analýze směsi devíti peptidů ve fosfátovém pufru, pH 2,5 [65], kde mez detekce se

pohybovala na úrovni  $\mu\text{M}$  a rozlišení dosahovalo vysokých hodnot. Nativní GnRH se používá ke studiu biologických regulačních procesů jako je kinetika a mechanismus účinku hormonů v těle [175, 178-180]. Rychlá CE metoda byla vyvinuta a validována pro měření stability lidského a lososího GnRH a jejich analogů v přítomnosti střevních enzymů [178], analýza byla prováděna v kyselině octové, pH 4,0. Stanovení syntetického GnRH v plazmě bylo prezentováno pomocí on-kapilárního prekoncentračního CE systému [180], k potlačení adsorpce na stěny kapiláry a pro zvýšení citlivosti a selektivity MS detekce byla kapilára pokrytá 3-aminopropyl-triethoxysilanem. Dalším příkladem použití CE je stanovení proteinů během studie vlivu GnRH v lidské ovariální tekutině a séru při in-vitro oplodnění [179].

## 4 Výzkumné cíle

Cílem dizertační práce bylo vyvinout nové metody pro analýzu, separaci a fyzikálně-chemickou charakterizaci vybraných peptidových hormonů a jejich analogů a fragmentů kapilárními elektromigračními technikami, zónovou elektroforézou a micelární elektrokinetickou chromatografií. Při analýze a separaci strukturně podobných peptidů byla výzkumná činnost zaměřena na vývoj vhodných experimentálních podmínek, tedy na volbu vhodného módu v závislosti na ionogenním či neionogenním charakteru peptidu, na výběr optimálního složení a pH základních elektrolytů, na úpravu vzorku a na volbu vhodného způsobu detekce. Při fyzikálně-chemické charakterizaci peptidů bylo záměrem spočítat jejich efektivní a specifické náboje, co nejpřesněji stanovit jejich efektivní elektroforetické pohyblivosti při standardní teplotě a pomocí semiempirických modelů studovat korelace mezi pohyblivostí, nábojem a velikostí peptidů a určit nejpravděpodobnější tvar jejich molekul v roztoku.

V oblasti CE analýzy a separace peptidů dílčími cíli bylo:

- Zvolit optimální separační podmínky na základě strategie pro racionální výběr podmínek pro ionogenní a neionogenní peptidy (I, II, III, IV).
- Nalézt vhodné složení základních elektrolytů pro analýzu a separaci v kyselém prostředí o  $\text{pH} < 2,5$  a ve slabě alkalickém prostředí ( $\text{pH} \sim 8$ ), s cílem minimalizovat adsorpci peptidů na stěnu kapiláry (I, II, III, IV).
- Porovnat mez detekce a citlivost UV-absorpčního detektoru s polem diod v komerčním CE analyzátoru P/ACE MDQ (Beckman Coulter) s mezí detekce a citlivostí fluorescenčního detektoru (argon ion LIF detektor, excitace/emise 488/520 nm) v tomtéž zařízení a s mezí detekce a citlivostí UV-absorpčního detektoru v laboratorním CE analyzátoru vlastní konstrukce (I, II).
- Kvalitativně a kvantitativně stanovit čistotu syntetických a semisyntetických preparátů peptidových hormonů a jejich analogů a fragmentů (I, II, III, IV).
- Porovnat CZE separaci strukturně podobných peptidových hormonů v klasických a izoelektrických pufrech jako základních elektrolytech (II, III, IV).

V oblasti fyzikálně-chemické charakterizace peptidů dílčími cíli bylo:

- Spočítat efektivní a specifický náboj peptidů na základě průměrných hodnot acidobazických disociačních konstant ionogenních skupin přítomných v jejich řetězcích (**I, II, III, IV**).
- Určit experimentálně efektivní elektroforetické pohyblivosti peptidů při standardní teplotě 25°C (**III, IV**).
- Ověřit pomocí semiempirických modelů vztahy mezi pohyblivostí peptidů a jejich nábojem, velikostí a prostorovou strukturou a určit pravděpodobný tvar jejich molekul v roztoku (**II, III, IV**).

## 5 Experimentální část

### 5.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p. a. Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) byl dodán firmou Serva (Heidelberg, Německo), kyselina fosforečná, kyselina octová a dimethylsulfoxid (DMSO) byly získány z Lachemy (Brno, ČR), kyselina iminodioctová (IDAA) byla dodána od Bachemu (Bubendorf, Švýcarsko), isoforon (3,5,-trimethyl-2-cyklohexen-1-on) a dodecylsulfát sodný (SDS) byly od Fluky (Buchs, Švýcarsko) a tricín ([tris(hydroxyl-methyl)-methyl]-glycin) byl získán od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

### 5.2 Úprava vzorku

Analogy oxytocinu, vasopressinu, oktapeptidu B23-B30 z C-konce B-řetězce lidského insulinu (HI), enkefalinů, dalarginu, lineárních hmyzích oostatických peptidů a hormonů uvolňujících gonadotropin byly syntetizovány na pevné fázi [181] v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB). Struktura dalarginu byla obměněna substitucí leucinu v pozici 5 za D-terciární leucin [182], glykosidací [183] nebo jodizací tyrosinu v pozici 1, derivatizací na karboxylové skupině C-konci argininu a kombinací těchto modifikací. Cyklické hmyzí oostatické peptidy byly cyklovány z lineárních řetězců, boční řetězce byly chráněny [162]. Syntetické peptidy byly čištěny preparativní HPLC nebo molekulovou vylučovací chromatografií (SEC) a charakterizovány pomocí aminokyselinové analýzy, hmotnostní spektrometrie a analytické HPLC.

Lidský insulin a jeho B23-B30 oktapeptid byl pro fluorescenční detekci značen pomocí derivatizačního činidla, 4-chloro-7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazolu (NBD). NBD reagoval s volnou  $\epsilon$ -amino skupinou Lys B29 v oktapeptidu HI, přičemž jeho  $\alpha$ -amino skupina Lys byla chráněna Fmoc chránicí skupinou [184]. Fluorescenčně značené molekuly HI byly připraveny semisynteticky trypsinem katalyzovanou syntézou peptidové vazby mezi C-koncem Arg B22 desoktapeptidu HI a N-koncem NBD-značeného oktapeptidu B23-30 HI [185].

Rozpustnost peptidů je dána jejich aminokyselinovým složením a sekvencí. Při CE analýze se peptidy nejčastěji rozpouštějí v deionizované vodě nebo v základním elektrolytu. Rozpustnost peptidu ve vodě je výhodná z hlediska možnosti použít stejný vzorek v různých elektrolytových systémech a dosáhnout lepšího zkoncentrování



rozpuštěného vzorku. Na druhou stranu použití základního elektrolytu jako rozpouštědla vzorku zaručí konstantní separační podmínky, pohyb v BGE během celého pokusu, což je důležité při měření fyzikálně chemických vlastností. Protože nejdříve bylo důležité nalézt vhodné experimentální podmínky, většina peptidových hormonů byla rozpuštěna v deionizované vodě, ve vodě nerozpustné peptidy byly rozpuštěny v základním elektrolytu. Analyzované peptidy byly rozpuštěny v koncentračním rozsahu 0,01-1,5 mg.ml<sup>-1</sup> pro UV-detekci a 10-1000krát nižší pro LIF detekci.

### 5.3 Přístrojové vybavení

Měření byla prováděna ve dvou přístrojích, v laboratorním CE-analyzátoru sestrojeném v ÚOCHB AV ČR (ÚOCHB-CE) [186] a v komerčním zařízení P/ACE MDQ System (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA).

CE analyzátor sestrojený v ÚOCHB byl obsluhován manuálně, sběr a zpracování dat bylo prováděno chromatografickou stanicí Clarity (DataApex, Praha, ČR). Křemenné kapiláry z vnějšku pokryté polyimidem s vnitřním průměrem 50 µm a vnějším průměrem 200 µm, které měly celkovou délku 30 cm a efektivní 19 cm, byly vyrobeny v Ústavu skelných a keramických materiálů, resp. v Ústavu radiotechniky a elektroniky AV ČR (ÚRE, Praha, ČR). Jednotlivé experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě 22-24°C bez aktivního chlazení kapiláry. Dávkování vzorku bylo hydrodynamické. Látky byly detekovány UV detektorem s pevnou vlnovou délkou 206 nm, zdrojem záření byla bezelektrodová vysokofrekvenčně buzená jódová výbojka (LKB-Pharmacia, Uppsala, Švédsko), a UV-senzitivní křemíková fotodioda s vestaveným předzesilovačem (Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching, Německo).

Komerční CE analyzátor byl plně automatický přístroj, jeho řízení, sběr a zpracování dat byly prováděny softwarem P/ACE System MDQ, verze Karat (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Křemenné kapiláry z vnějšku pokryté polyimidem byly dodané firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA), měly vnitřní průměr 50 µm nebo 75 µm a vnější průměr 375 µm, celkovou délku 39-40 cm a efektivní délku (k detektoru) 29-30 cm, přesné rozměry jsou udány u jednotlivých měření. Kapilára byla chlazená kapalinou nastavenou na standardní teplotu 25°C. Dávkování vzorku bylo hydrodynamické. Látky byly detekovány UV-detektorem s diodovým polem (PDA) s vlnovým rozsahem 190-600 nm a nebo fluorescenčním detektorem s argonovým

laserem indukovanou fluorescencí (LIF) s excitační vlnovou délkou 488 nm a emisní vlnovou délkou 520 nm.

Nová kapilára byla postupně promývána, nejprve vodou, poté 1 M hydroxidem sodným, opět vodou a nakonec základním elektrolytem. Každý krok trval 10 minut. Následně byly vnitřní stěny kapiláry a elektroosmotický tok stabilizovány vloženým vysokým napětím po dobu 20 minut. Mezi jednotlivými měřeními se stejnými podmínkami byla kapilára promývána základním elektrolytem 2 minuty. Při každé změně základního elektrolytu byla kapilára promývána 0,1 M NaOH 5 minut a poté byl stabilizační krok opakován jako pro novou kapiláru. Separační napětí bylo v rozsahu 10-25 kV. Vzorky byly dávkovány tlakem 5-15 mbar po dobu 5-15 s. Základní elektrolyty byly filtrovány přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr (Millipore, Bedford, MA, USA).

## 6 Výsledky a diskuse

### 6.1 Analýza a separace peptidových hormonů

Ke kvalitativní a kvantitativní CE analýze a následné separaci strukturně podobných peptidů a k jejich fyzikálně-chemické charakterizaci bylo vybráno pět různě velkých skupin peptidových hormonů. První skupinu tvoří osm neurohypofyzárních peptidů (NHPs), jako oxytocinu (OT), vasopressinu (VP) a hmyzího diuretického hormonu (IDH) a jejich derivátů (**tabulka 3**), druhá skupina obsahuje pankreatický hormon lidský insulin (HI) (**obrázek 1**, kapitola 3.2) a jeho fragment B23-30. Třetí 12-členná skupina obsahuje enkefaliny (ENKs) a dalargin (DLR) a jejich fragmenty a deriváty (**tabulka 4**), čtvrtá, nejpočetnější, je skupina 20 hmyzích oostatických peptidových hormonů (IOPs) (**tabulka 5**) a pátou 12-člennou skupinu tvoří hormony uvolňující gonadotropin (GnRHs) a jejich analogy a fragmenty (**tabulka 6**).

#### 6.1.1 Strategie volby experimentálních podmínek

Strategie pro racionální volbu podmínek pro CE separaci peptidů, která bere v úvahu specifické vlastnosti peptidů, byla použita při výběru experimentálních podmínek pro jejich analýzu. Charakteristické vlastnosti peptidů vyplývají z jejich aminokyselinového složení a sekvence, které určují jejich elektrický náboj, velikost, tvar, hydrofobicitu a specifické vazebné schopnosti. Ze struktury též vyplývá ionogenní či neionogenní charakter látky, který hraje důležitou roli při volbě separačního módu metody. Pokud jsou peptidy nabitě alespoň v určité oblasti pH, můžeme zvolit metodu CZE, pokud ne, volíme metodu CMEKC.

Analyzované peptidy (**tabulky 3-6**) obsahují 2 až 10 aminokyselinových zbytků, jejich relativní molekulová hmotnost je v rozmezí od 238,2 do 1262,5. Výjimku tvoří lidský insulin, který má ve dvou řetězcích 51 aminokyselinových zbytků, relativní molekulovou hmotnost 5808 a izoelektrický bod 5,4-5,5. Ze struktury peptidů vyplývá, že většina peptidů obsahuje nejméně jednu ionogenní skupinu, nejčastěji volný N-konec ( $\alpha\text{-NH}_3^+$  skupina) nebo C-konec ( $\alpha\text{-COOH}$  skupina) peptidového řetězce. Oxytocin, vasopressin a všechny jejich deriváty, DLR-NHEt, a většina GnRHs a jejich fragmentů a analogů mají amidované karboxylové skupiny na C-koncích peptidových řetězců, deriváty OT, VP a IDH mají na N-konci kyselinu merkaptopropionovou, všechny GnRHs kromě třech mají v pozici 1 kyselinu pyroglutamovou (pGlu) a PacDLR má N-konec derivatizovaný fenylacetátem. Kromě IDH a jeho derivátů, dvou fragmentů

**Tabulka 3** Zkratky, sekvence a relativní molekulové hmotnosti,  $M_r$ , neurohypofyzárních hormonů a derivatizovaného B23-30 fragmentu lidského insulinu

Peptid	Zkratka	Sekvence v třípísmenném kódu	$M_r$
Oxytocin	OT	H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH <sub>2</sub>	1007,2
Deamino-oxytocin	dOT	Mpa-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH <sub>2</sub>	992,2
Arg <sup>8</sup> -vasopressin	AVP	H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	1084,2
(Deamino- D-Arg <sup>8</sup> )-vasopressin	dDAVP	Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	1069,3
Hmýzí diuretický hormon	IDH	H-Cys-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	975,4
(Deamino- D-Arg <sup>8</sup> )-IDH	dDA-IDH	Mpa-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro- D-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	960,4
(D-Arg <sup>8</sup> )-IDH	DA-IDH	H-Cys-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-D-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	975,4
(Deamino- Arg <sup>8</sup> )-vasopressin	dAVP	Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH <sub>2</sub>	1069,3
NBD-derivát B23-B30-lidského insulin. fragmentu	NBD-B23-30-HI	H-Gly-Phe-Phe-Thr-Pro-Lys-(NBD)-Thr-OH	1175,7

*NBD = 4-chloro-7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol, Mpa – kyselina merkaptopionová*

*Tabulka 4 Zkratky, sekvence a relativní molekulové hmotnosti,  $M_r$ , enkefalinů, dalarginu a jejich fragmentů a analogů*

Peptid	Zkratka	Sekvence v třípísmenném kódu	$M_r$
[Leu <sup>5</sup> ]enkefalin	[Leu <sup>5</sup> ]ENK	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	555,8
[Met <sup>5</sup> ]enkefalin	[Met <sup>5</sup> ]ENK	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	573,8
ENK dipeptidový fragment	YG	H-Tyr-Gly-OH	238,3
ENK tripeptidový fragment	YGG	H-Tyr-Gly-Gly-OH	295,4
Dalargin	DLR	H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH	726,1
DLR dipeptidový fragment	YA	H-Tyr-Ala-OH	252,3
DLR tripeptidový fragment	YAG	H-Tyr-D-Ala-Gly-OH	309,4
[D-Tle <sup>5</sup> ]dalargin	[D-Tle <sup>5</sup> ]DLR	H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Tle-Arg-OH	726,1
Dalargin ethylamid	DLR-NH <sub>2</sub>	H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-NH-Et	749,0
[Tyr(1 <sub>2</sub> )]dalargin	I <sub>2</sub> DLR	H-(3,5-di-I)-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH	960,8
[D-Ser <sup>2</sup> , Thr <sup>6</sup> ]dalargin	[D-Ser <sup>2</sup> Thr <sup>6</sup> ]DLR	H-Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr-OH	689,9
N-fenylacetyl-dalargin	PacDLR	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -Ac-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH	859,1

**Tabulka 5** Zkratky, sekvence a relativní molekulové hmotnosti,  $M_r$ , hmyzích oostatických peptidů

Zkratka	Sekvence v třípísmenném kódu	$M_r$
YDPAP <sub>6</sub>	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-OH	1044,1
YDPAP <sub>5</sub>	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Pro-OH	950,0
YDPAP <sub>4</sub>	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-OH	852,9
YDPAP <sub>3</sub>	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-OH	755,8
YDPAP <sub>2</sub>	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-OH	658,7
YDPAP	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-OH	561,6
YDPA	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-OH	464,5
YDP	H-Tyr-Asp-Pro-OH	393,4
YD	H-Tyr-Asp-OH	296,3
c(YDPAP) <sub>2</sub>	Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro └──────────────────────────────────┘	1087,2
c(YDPAP)	Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro └──────────┘	543,6
c(YDPA)	Tyr-Asp-Pro-Ala └────────┘	446,5
YDPAP <sub>5</sub> ΔP	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Pro-Δ-Pro-OH	1044,5
YDPAΔP	H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Δ-Pro-OH	559,6
YDΔPA	H-Tyr-Asp-Δ-Pro-Ala-OH	462,5
YDΔP	H-Tyr-Asp-Δ-Pro-OH	391,4
DPAP	H-Asp-Pro-Ala-Pro-OH	399,0
DPA	H-Asp-Pro-Ala-OH	301,3
DΔPA	H-Asp-Δ-Pro-Ala-OH	299,3
HtyDPA	H-Hty-Asp-Pro-Ala-OH	476,6

*Hty* – homotyrosin, *Δ-Pro* – dehydroprolin

**Tabulka 6** Zkratky, sekvence a relativní molekulové hmotnosti,  $M_r$ , GnRHs a jejich fragmentů a analogů

Peptid	Zkratka	Sekvence v třípísmenném kódu	$M_r$
Lidský GnRH	hGnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	1181,5
[ $\beta$ Ala <sup>6</sup> -ProNHEt <sup>10</sup> ]hGnRH	$\beta$ ANHEt-hGnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- $\beta$ -Ala-Leu-Arg-Pro-Pro-NHEt	1262,5
[Des-Pro-Gly-NH <sub>2</sub> ]hGnRH	dPGNH <sub>2</sub> -hGnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-OH	1028,3
[Des-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub> ]hGnRH	dAPGNH <sub>2</sub> -hGnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OH	872,1
Fragment hGnRH 1-4	pGluHWS	pGlu-His-Trp-Ser-OH	538,6
Fragment hGnRH 4-10	SYGLRPPG-NH <sub>2</sub>	H-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	766,0
Fragment hGnRH 7-10	LRPG-NH <sub>2</sub>	H-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	440,6
Lososí GnRH	sGnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	1211,5
[Des-Gly-NH <sub>2</sub> ]sGnRH	dGNH <sub>2</sub> -sGnRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-OH	1155,4
[Des-pGlu <sup>1</sup> -D-Om <sup>6</sup> ]sGnRH	dPyrDOm-sGnRH	H-His-Trp-Ser-Tyr-D-Om-Trp-Leu-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	1058,3
Kuřecí GnRH I	cGnRH I	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Gln-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	1180,4
[Des-Gly-NH <sub>2</sub> ]cGnRH II	dGNH <sub>2</sub> -cGnRH II	pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-OH	1179,4

*pGlu* – kyselina pyroglutamová

hGnRH obsahují GnRHs fenolovou skupinu tyrosinu. OT, VP, DLR, lidské GnRHs a jejich deriváty a fragmenty mají ve svých řetězcích guanidinylovou skupinu argininu, GnRHs kromě dvou fragmentů mají imidazolovou skupinu histidinu a analog fragmentu lososího GnRHs obsahuje  $\delta$ -aminoskupinu ornitinu. Všechny neurohypofyzární hormony obsahují disulfidové můstky tvořené mezi cysteiny nebo mezi cysteinem a kyselinou merkaptopropionovou. NBD značený lidský insulin obsahuje 15 volných ionogenních skupin, guanidinylovou skupinu argininu, čtyři fenolové skupiny tyrosinu, dvě imidazolové skupiny histidinu, čtyři  $\gamma$ -karboxylové skupiny kyseliny glutamové a dvě volné aminoskupiny na N-koncích a dvě volné karboxylové skupiny na C-koncích. Pomocí průměrných hodnot acidobazických disociačních konstant jednotlivých ionogenních skupin byla spočtena závislost efektivního a specifického náboje na pH a určeny optimální oblasti pH pro analýzu a separaci, tj. oblasti pH, kde jsou tyto peptidy nabitě a rozdíl v jejich specifických nábojích je maximální.

Všechny peptidové hormony kromě deamino-oxytocinu a cyklických oostatických peptidů bylo možné separovat v kyselých základních elektrolytech, NHPs bylo možné analyzovat jako kationty při pH < 8, ENKs a DLR při pH < 4, IOPs při pH < 3,5, GnRHs při pH < 5 a GnRHs s amidovaným C-koncem až do pH 10. Přesné měření pohyblivosti v silně kyselých pufrch při pH nižším než 2 je složité, neboť vzrůstá iontová síla a prudce roste vodivost BGE a dochází k nárůstu teploty roztoku v kapiláře. Všechny výše uvedené peptidy kromě deamino-oxytocinu a cyklických oostatických peptidů bylo možné analyzovat jako kationty v pH rozmezí 2-3,5. Vhodné podmínky pro analýzu všech hormonů jako aniontů v zásaditém prostředí nebylo možné najít. NHPs jsou v alkalické oblasti nenabitě nebo záporně nabitě až při pH vyšším než 11. Chemická labilita disulfidového můstku ovšem vylučuje použití silně alkalické oblasti pH. GnRHs s volným C-koncem lze analyzovat jako anionty již při pH > 7, ale GnRHs s blokováním C-koncem až při pH > 12, což není výhodné z důvodu vysoké koncentrace hydroxidových aniontů. Dochází k podobným nežádoucím efektům jako při vysoké koncentraci vodíkových iontů. Insulin a jeho derivát B23-30-HI, které jsou značené pomocí NBD, lze analyzovat pouze v oblasti s pH nižším než 8,5, protože NBD dosahuje svého excitačního a emisního maxima právě v oblasti pH 3-8,5. Enkefaliny, dalarginy a IOPs bylo možné bezproblémově analyzovat jako anionty v alkalické oblasti při pH 8,1.



### 6.1.2 Složení základních elektrolytů

Základní elektrolyt byl vybírán tak, aby splňoval několik kritérií. Bylo nezbytné, aby zaručoval požadované pH v zóně putujícího analyzovaného peptidu, tedy musel mít dostatečnou pufrací kapacitu. To znamenalo, že pH základního elektrolytu bylo co nejméně vzdálené od konstanty acidity ( $pK_a$ ) pufrující složky a vodivost základního elektrolytu byla co nejnižší. Proto jsme většinou volili uni-univalentní základní elektrolyt, složený z jednoho kationtu a jednoho aniontu, aby se omezily rušivé vlivy nadbytečných systémových zón. Dále pohyblivost složek BGE byla zvolena tak, aby docházelo k co nejmenší elektromigrační disperzi zón analytu a aby nedocházelo k interakcím analyzovaného iontu se složkami BGE nebo s látkami dodatečně přidanými do BGE ovlivňujícími EOF. V úvahu byla též brána použitá detekční technika.

*Tabulka 7 Složení a pH základních elektrolytů.*

Zkratka	Složení	pH
BGE I	2 M kyselina octová	2,18
BGE II	0,1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,05 M tris	2,25
BGE III	0,1 M kyselina iminodioctová	2,30
BGE IV	0,2 M kyselina iminodioctová	2,32
BGE V	0,05 M kyselina iminodioctová	2,40
BGE VI	0,5 M kyselina octová	2,50
BGE VII	0,04 M tris; 0,04 M tricín	8,10
BGE VIII	0,005 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,02 M tris; 0,05 M SDS	8,80

Na základě strategie pro racionální volbu experimentálních podmínek byly pro CE analýzu a separaci peptidů vybrány základní elektrolyty v kyselé oblasti, pH 2,18-2,50, a slabě alkalický pufr, pH 8,1, pro metodu CZE a alkalický pufr, pH 8,8, pro metodu CMEKC. Jejich přesné složení a pH společně s jejich zkratkou jsou uvedeny v **tabulce 7**. Pro kyselou oblast byly použity základní elektrolyty složené ze středně silných či slabých kyselin jako jsou kyselina trihydrogenfosforečná, ( $pK_{a1} = 2,15$ ;  $pK_{a2} = 7,21$ ;  $pK_{a3} = 12,32$ ) nebo kyselina octová ( $pK_a = 4,76$ ) a izoelektrický pufr, kyselina iminodioctová ( $pK_a = 2,23$ ), který navíc splňuje podmínku relativně nízké elektrické vodivosti při dostatečné pufrací kapacitě. Pro alkalickou oblast byl vybrán amfoterní, tzv. Goodův pufr, tricín ( $pK_a = 8,15$ ) v kombinaci s bází trisem ( $pK_a = 8,3$ ), a

již zmiňovaný fosfátový pufr. Jako konstituent micelární pseudofáze byl použit aniontový detergent dodecylsulfát sodný (SDS). Všechny uvedené elektrolyty byly použity pro UV-absorpční detekci. Pro fluorescenční detekci byla zvolena kyselina octová, pH 2,50.

### 6.1.3 Volba kapiláry

Pro výběr vhodné separační kapiláry byla důležitá dvě hlediska, geometrické parametry a vnitřní povrch kapiláry. Délku kapiláry jsme volili tak, aby v rozumně krátké době bylo možné úplné rozdělení analyzovaných látek. Rozměr vnitřního průměru kapiláry byl důležitý při kontrole teploty základního elektrolytu a citlivosti optických detekcí.

Vzhledem k vybrané oblasti pH a složení základních elektrolytů, peptidové hormony byly v kyselém prostředí kladně nabitě a postupně se zvyšujícím pH přecházely do neutrální až záporně nabitě formy kromě výše zmíněných výjimek. Bylo možné použít vnitřně nepokryté křemenné kapiláry s polyimidem na vnější straně s vnitřním průměrem 50 nebo 75  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 375  $\mu\text{m}$ , které měly celkovou délku 39-40 cm a efektivní délku 29-30 cm nebo kapiláry o rozměrech 50  $\mu\text{m}$  i.d. a 200  $\mu\text{m}$  o.d., s celkovou délkou 30 cm a efektivní délkou 19 cm. Při analýze peptidových hormonů jako kationtů v nepokrytých křemenných kapilárách v kyselých základních elektrolytech bylo využito snížení EOF a adsorpce díky potlačení disociace silanolových skupin. Rychlý katodický EOF se poté uplatnil při analýze všech peptidových hormonů, které se vyskytly v aniontové formě při alkalickém pH 8-9.

### 6.1.4 Citlivost detekce

#### 6.1.4.1 UV-absorpční detekce

Nejběžněji používaná detekce peptidů v CE je UV-absorpční detekce v oblasti 200-220 nm, tj. v oblasti absorpce UV-záření peptidovou vazbou.

Porovnáním dvou UV-absorpčních detektorů v přístrojích se zabývá kapitola v publikaci I. Srovnání citlivosti detektorů bylo demonstrováno na CZE analýze dvou neurohypofyzárních nonapeptidů, oxytocinu a Arg<sup>8</sup>-vasopressinu v kyselém tris-fosfátovém pufru, pH 2,25, BGE II. První absorpční detektor se skládal z vysokofrekvenčně buzené jódové výbojky s emisní vlnovou délkou 206 nm jako zdroje světla a UV-senzitivní křemíkové fotodiody s vestaveným předzesilovačem

(ÚOCHB detektor) a byl zabudován do CE-analyzátoru vyvinutého v ÚOCHB. Druhý detektor, detektor s polem fotodiod s vlnovým rozsahem 190-600 nm a s deuteriovou lampou (PDA detektor), byl pro srovnání také nastaven na konstantní vlnovou délku 206 nm. Tento detektor byl součástí komerčního přístroje Beckman P/ACE MDQ. Charakteristiky obou detektorů jako šum,  $n$ , odezva detektoru,  $R$ , poměr signál/šum,  $R/n$ , mez detekce,  $LOD$ , a citlivost,  $S$ , jsou uvedeny v **tabulce 8**. Uvedené hodnoty byly získány jako průměry dvou následných analýz s maximálním rozdílem 2% v odezvě detektoru. Z tabulky vyplývá, že hodnoty poměrů  $R/n$  a meze detekce pro OT a AVP byly u obou detektoru srovnatelné.

**Tabulka 8** Charakteristiky detektorů stanovené při CZE analýze peptidů v BGE II.

Peptid	Detektor	$c$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	$R$ [mV] <sup>a</sup> [mAU] <sup>b</sup>	$R/n$	$S$ [V.mol <sup>-1</sup> .dm <sup>3</sup> ] <sup>a</sup> [AU.mol <sup>-1</sup> .dm <sup>3</sup> ] <sup>b</sup>	$LOD$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]
OT	ÚOCHB	89,1	64,0	89,0	717,7	3,00
	PDA	85,0	43,8	109,3	51,4	2,34
AVP	ÚOCHB	84,4	141,8	197,3	1680,6	1,28
	PDA	92,0	67,2	167,6	72,9	1,65

*Průměrná hodnota šumu pro detektor ÚOCHB byla 0,72 mV a pro detektor PDA 0,04 mAU; <sup>a</sup> – ÚOCHB detektor; <sup>b</sup> – PDA detektor.*

Vliv absorpce základního elektrolytu na citlivost detektoru s polem fotodiod (PDA), mez detekce a mez stanovení byl studován v práci I a II.

Porovnání citlivosti detektoru s využitím tris-fosfátového pufru (BGE II) a kyseliny octové (BGE VI) bylo ukázáno na analýze oxytocinu a Arg<sup>8</sup>-vasopressinu. Kyselina octová absorbuje více světla a píky peptidů byly proto menší, nižší však byl i šum. Separace peptidů v kyselině octové byla také ovlivněna elektromigrační disperzí, píky byly širší a méně symetrické. Hodnoty jednotlivých vlastností detektoru jako poměru signál/šum,  $R/n$ , meze detekce,  $LOD$ , citlivosti,  $S$ , a meze stanovitelnosti,  $LOQ$ , jsou uvedeny v **tabulce 9**. Citlivost detektoru poklesla přibližně 2,5krát v kyselině octové, ve stejném poměru se zvýšila mez detekce. Tyto rozdíly nejsou tedy příliš dramatické a lze říci, že kyselina octová může být používána jako BGE v CZE.

Porovnání dvou kyselých pufrů tris-fosfátového (BGE II) a izoelektrického (BGE III) pufru bylo demonstrováno na sérii enkefalinů a dalarginu a jejich derivátů a

fragmentů. Byla použita stejná kritéria pro hodnocení citlivosti detektoru jako pro NHPs (viz **tabulka 9** a publikace **II**, tabulka 4). Z tabulky vyplývá, že více absorbující kyselina iminodioctová poskytuje srovnatelné charakteristiky detektoru jako tris-fosfátový pufr. Negativní vliv absorpce základního elektrolytu BGE III je v tomto případě kompenzován rychlejší analýzou, užšími píky a vyšší separační účinností.

**Tabulka 9** Vlastnosti UV-absorpčního detektoru PDA při vlnové délce 206 nm.

Peptid	BGE	$c$ [mmol.dm <sup>-3</sup> ]	$R/n$ ·10 <sup>-3</sup>	$S$ [AU.mol <sup>-1</sup> .dm <sup>3</sup> ]	$LOD$ [μmol.dm <sup>-3</sup> ]	$LOQ$ [μmol.dm <sup>-3</sup> ]
OT	II	0,85	1,09	51,4	2,34	7,80
	VI	0,91	0,86	18,0	3,18	10,6
AVP	II	0,92	1,68	72,9	1,65	5,50
	VI	0,86	1,29	28,4	2,02	6,73
[Leu <sup>5</sup> ]ENK	II	2,08	4,02	42,6	1,55	5,17
	III	2,01	4,06	46,5	1,48	4,95
[Met <sup>5</sup> ]ENK	II	1,61	5,46	74,7	0,88	2,95
	III	1,49	7,41	114,4	0,60	2,01

#### 6.1.4.2 Porovnání citlivosti UV-absorpční detekce a laserem indukované fluorescenční detekce

V práci **I** byla srovnávána citlivost UV-absorpčního PDA detektoru s fluorescenčním detektorem s argonovým laserem indukovanou fluorescencí (LIF) s excitační vlnovou délkou 488 nm a emisní vlnovou délkou 520 nm v komerčním přístroji Beckman P/ACE MDQ. CZE analýzy byly provedeny s derivatizovaným lidským insulinem a s jeho B23-30 oktapeptidovým fragmentem, oba peptidy byly derivatizovány fluorescenční značkou NBD. NBD-HI a NBD-B23-30-HI byly analyzovány v kyselém základním elektrolytu 0,5 M kyselině octové, BGE VI. Fluorescenční značka NBD je vázána na ε-aminoskupinu Lys B29, excitační maximum dosahuje při 475-478 nm a emisní maximum při 530-534 nm. Hlavní charakteristiky obou detektorů jsou uvedeny v **tabulce 10**. Z hodnot mezí detekce vyplývá, že fluorescenční detekce je o 1 až 2 řády citlivější.

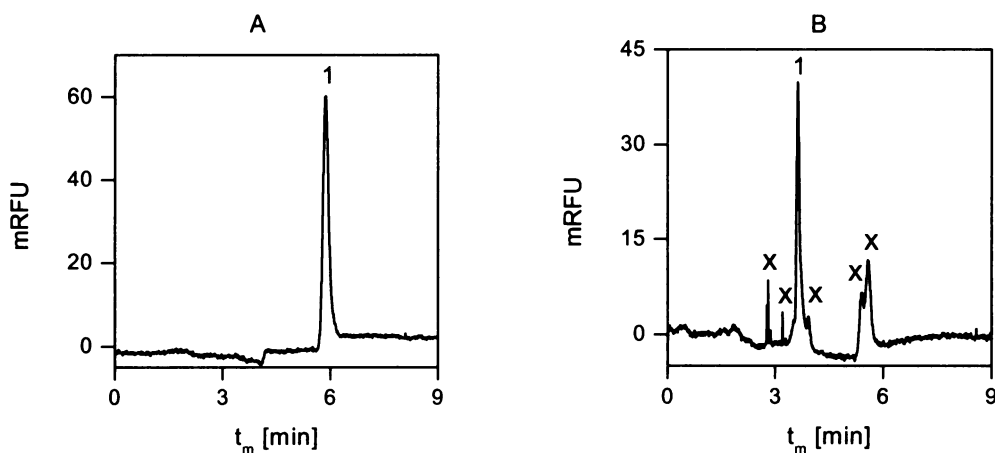
Elektroforegramy CZE analýz NBD-B30-30-HI a NBD-HI v kyselině octové, pH 2,5 s LIF detekcí jsou na **obrázku 2**. Zatímco pro NDB-B23-30-HI byl detekován

jeden pík (obr. 2A), při analýze NBD-HI kromě hlavního píku analyzované látky bylo nalezeno několik příměsí (obr. 2B). Je pravděpodobné, že fluorescenční činidlo nebylo zcela odstraněno z preparátu oktapeptidového fragmentu a reagovalo následně s nechráněnými skupinami aminokyselinových zbytků v desoktapeptidu HI.

**Tabulka 10** Charakteristiky UV-absorpčního PDA detektoru nastaveného na 206 nm a LIF detektoru (488/520 nm) stanovené z CZE analýz insulinu a jeho oktapeptidového fragmentu v BGE VI

Peptid	Detektor	$c$	$R$	$R/n$	$S$	$LOD$
		$[\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$[\text{mAU}]^a$		$[\text{AU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3]^a$	$[\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$
			$[\text{mRFU}]^b$		$[\text{RFU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3]^b$	
NBD-HI	PDA	63,2	2,77	184,7	44,1	1,02
	LIF	5,09	505,7	136,6	99331	0,112
NBD-B23-30	PDA	729	8,57	571,1	11,7	3,83
	LIF	0,89	629,1	169,9	706590	0,016

Průměrná hodnota šumu pro LIF detektor byla 3,70 mRFU a pro PDA detektor 0,02 mAU; <sup>a</sup> – PDA detektor; <sup>b</sup> – LIF detektor.



**Obrázek 2** CZE analýzy fluorescenčně značených peptidů s LIF detekcí. (A) NBD-B23-30-HI,  $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , (B) NBD-HI,  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Analýzy byly prováděny v BGE VI, dávkování 10 mbar, 10 s, separační napětí 15 kV, proud 20-21  $\mu\text{A}$ ; 1 – hlavní syntetický produkt; x – neidentifikované příměsi.

### 6.1.5 Kvalitativní a kvantitativní analýza

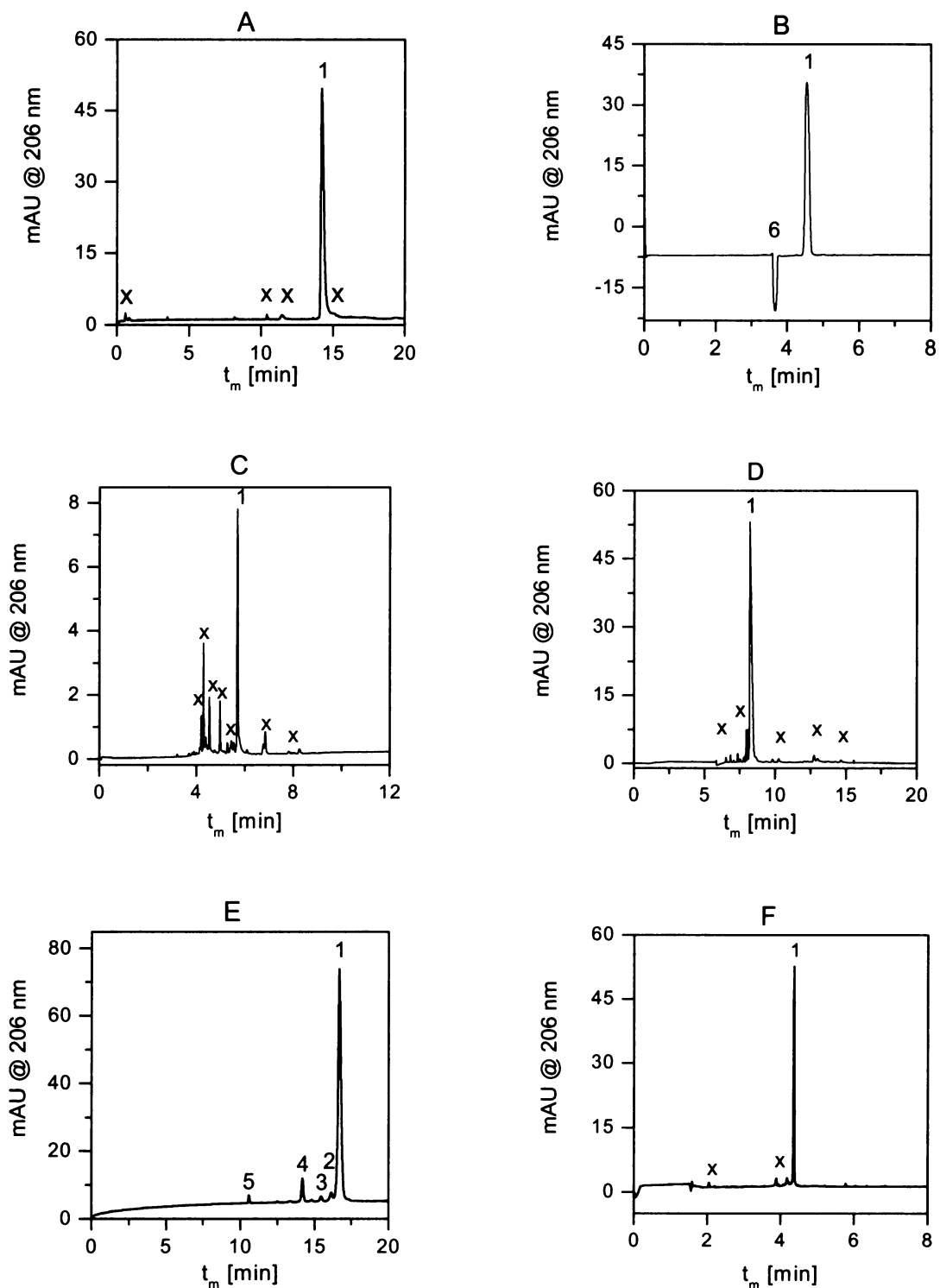
Kvalitativní a kvantitativní analýza byla prvním a základním krokem při studiu nových peptidů. Pro úplnou charakterizaci peptidových preparátů, zvláště pak těch, jež

byly dále užívány pro biologické testy, bylo důležité znát obsah příměsí vznikajících nejčastěji při jejich syntéze a následných čistících operacích.

Stupeň čistoty syntetických a semisyntetických peptidových hormonů čištěných chromatografickými metodami jako RP-HPLC a/nebo SEC byl stanoven v publikacích **I**, **II**, **III** a **IV**. Peptidy byly analyzovány v základních elektrolytech vybraných podle strategie pro racionální volbu podmínek pro separaci peptidů. Standardy nově připravených peptidů nebyly dostupné, takže nebylo možné je stanovit metodou kalibrační křivky či vnitřního standardu. Proto byl stupeň čistoty určen pomocí relativní výšky píku,  $P_h$ , relativní plochy píku,  $P_A$ , a relativní korigované plochy píku  $P_{CA}$  (viz kapitola 2.1.1). Většinou se hodnoty stupňů čistoty pohybovaly mezi hodnotami 85-99%, pro NHPs 80-96% (přesné hodnoty viz tabulka 2, publikace **I**), ENKs a DLR 85-99,9% (přesné hodnoty viz tabulka 3, publikace **II**), IOPs 95-99% a GnRHs 88-99%. Stupně čistoty peptidových hormonů byly stanoveny ze dvou měření, která se lišila o méně než 1%.

Vybrané příklady CZE a CMEKC analýz jsou uvedeny na **obrázku 3**, ostatní viz publikace **I-IV**. CZE analýzy peptidů s vysokým stupněm čistoty jsou demonstrovány na oxytocinu (viz **obrázek 3A**) stanoveném jako kation v kyselém elektrolytu, BGE II, a na [Leu<sup>5</sup>]enkefalinu (viz **obrázek 3B**) analyzovaném jako anion v alkalickém prostředí, BGE VII. Opačným příkladem je elektroforegram [Des-Gly-NH<sub>2</sub>]cGnRH II (viz **obrázek 3C**) s mnoha neidentifikovanými příměsími, kde stupeň čistoty dosáhl hodnoty pouze 55,1%. Všechny tyto tři příklady poskytovaly podobné hodnoty stupně čistoty stanovené všemi třemi možnými způsoby vyhodnocení, tj. podle relativní výšky, plochy a korigované plochy. Na příkladu CZE analýzy dalarginu je ukázáno (viz **obrázek 3D**), že mohou být velké rozdíly ve stupni čistoty v závislosti na použitém způsobu vyhodnocování. Stupeň čistoty stanovený pomocí relativní výšky píku byl o 10-15% menší než stupeň čistoty stanovený pomocí relativní plochy píku nebo relativní korigované plochy píku v závislosti na použitém základním elektrolytu v důsledku relativně velké výšky a malé plochy ostrého píku hlavní příměsí. Příkladem kvantitativní analýzy peptidu s vysokým stupněm čistoty metodou CMEKC je stanovení deamino-oxytocinu v alkalickém prostředí BGE VIII (viz **obrázek 3F**). Z uvedených příkladů analýz je zřejmé, že získaný stupeň čistoty závisí na experimentálních podmínkách a také na způsobu jeho stanovení.

V práci **III** je na příkladě dekaeptidu YDPAP<sub>6</sub> ukázána identifikace minoritních příměsí. Na elektroforegramu dekaeptidu (viz **obrázek 3E**) jsou jasně



**Obrázek 3** CZE (A)-(E) a CMEKC (F) analýzy peptidových hormonů: (A) oxytocin,  $0,95 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , BGE II,  $U = 10 \text{ kV}$ ,  $I_{el} = 69-70 \text{ }\mu\text{A}$ ; (B)  $[\text{Leu}^3]\text{enkefalin}$ ,  $1,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , BGE VII,  $U = 10 \text{ kV}$ ,  $I_{el} = 13,2-14,2 \text{ }\mu\text{A}$ ; (C)  $[\text{Des-Gly-NH}_2]\text{cGnRH II}$ ,  $1,10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , BGE II,  $U = 15 \text{ kV}$ ,  $I_{el} = 43,2 \text{ }\mu\text{A}$ ; (D) dalargin,  $1,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , BGE III,  $U = 10 \text{ kV}$ ,  $I_{el} = 36,7-37 \text{ }\mu\text{A}$ ; (E) YDPAP<sub>6</sub>,  $1,15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , BGE II,  $U = 10 \text{ kV}$ ,  $I_{el} = 69-70 \text{ }\mu\text{A}$ ; (F) deamino-oxytocin  $1,15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , BGE VIII,  $U = 20 \text{ kV}$ ,  $I_{el} = 69-71 \text{ }\mu\text{A}$ ; 1 – hlavní syntetický produkt, x – neidentifikované příměsi, 2 – YDPAP<sub>5</sub>, 3 – YDPAP<sub>4</sub>, 4 – YDPAP<sub>2</sub>, 5 – YD, 6 – elektroosmotický marker.

patrné čtyři příměsi, které byly identifikovány jako jeho kratší fragmenty, YDPAP<sub>5</sub>, YDPAP<sub>4</sub>, YDPAP<sub>2</sub>, YD, na základě porovnání jejich efektivních elektroforetických pohyblivostí. Jejich přítomnost byla také potvrzena přidavkem standardů těchto kratších peptidů ke vzorku dekapektidu YDPAP<sub>6</sub>. Stupeň čistoty tohoto dekapektidu dosahoval 86,7%.

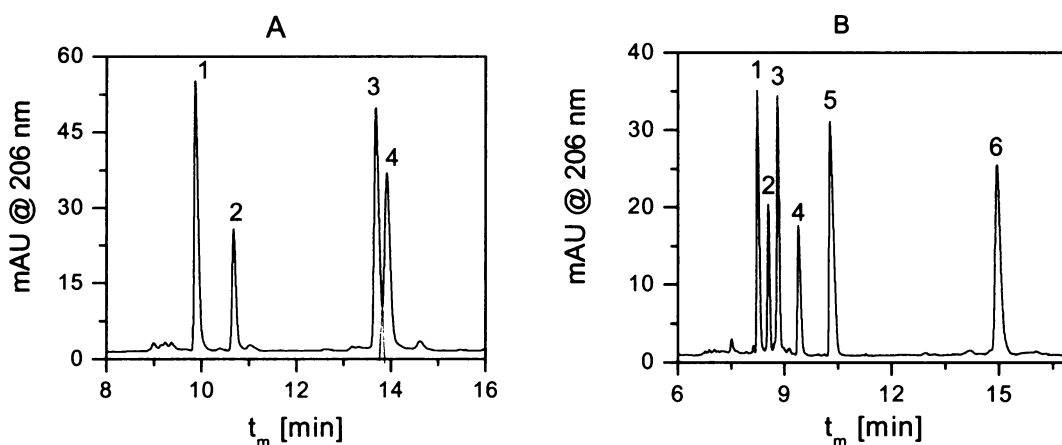
### 6.1.6 Separace strukturně podobných peptidů

Separace strukturně podobných peptidů má velký význam při jejich čištění po syntéze, ale také při sledování biochemických procesů v organismech, například při monitorování degračních produktů biologicky aktivní peptidů. Příkladem separace strukturně podobných peptidových hormonů jsou separace skupiny dvou enkefalinů a jejich dvou fragmentů, dalarginu a jeho pěti fragmentů a derivátů (publikace II), dvou skupin oostatických peptidů (publikace III) a tří čtyřčlenných skupin hormonů uvolňující gonadotropin (publikace IV). Vhodné experimentální podmínky byly odvozeny na základě strategie pro racionální výběr podmínek pro separaci peptidů, především ze závislosti specifického náboje peptidů na pH, a ze zkušeností získaných z analýz jednotlivých peptidů v základních elektrolytech.

Na základě výsledků z předešlých analýz pro separaci enkefalinů a dalarginů a jejich fragmentů a derivátů byl vybrán izoelektrický pufr, 100 mM kyselina iminodioctová, BGE III. K získání lepšího rozlišení byly testovány různé koncentrace IDAA a separační napětí. Nakonec jako nejlepší podmínky pro separaci směsi dalarginu, jeho fragmentů a derivátů byly vybrány tyto podmínky – 100 mM IDAA, pH 2,30, separační napětí 10 kV. Dvojnásobná koncentrace IDAA, tedy 200 mM, pH 2,32, BGE IV, byla nalezena jako nejlepší BGE pro separaci ENKs a jejich derivátů při stejném separačním napětí 10 kV. Separace směsi enkefalinů a jejich fragmentů ([Leu<sup>5</sup>]ENK, [Met<sup>5</sup>]ENK, YGG, YG) je na **obrázku 4A**, separace směsi dalarginu a jeho fragmentů a derivátů (DLR, YA, YaG, DLR-NHEt, I<sub>2</sub>DLR, PacDLR) na **obrázku 4B**. Rozlišení každé dvojice peptidů bylo alespoň 2,1 s výjimkou [Leu<sup>5</sup>]ENK a [Met<sup>5</sup>]ENK, kde rozlišení dosáhlo pouze hodnoty 1,2, tedy rozdělení nebylo úplné. Ve směsi ENKs a jejich fragmentů se nejrychleji pohybovaly fragmenty a poté ENKs (YG, YGG, [Leu<sup>5</sup>]ENK, [Met<sup>5</sup>]ENK). Ve směsi dalarginu, jeho analogů a fragmentů rychleji migrovaly delší peptidy s vyšším efektivním a specifickým nábojem než kratší fragmenty s nižším specifickým nábojem.



CZE separace směsí IOPs lišících se v počtu aminokyselinových zbytků v lineárním řetězci nebo v malé změně složení aminokyselin, jako záměna prolinu za dehydroprolin nebo tyrosinu za homotyrosin, byly provedeny ve třech kyselých

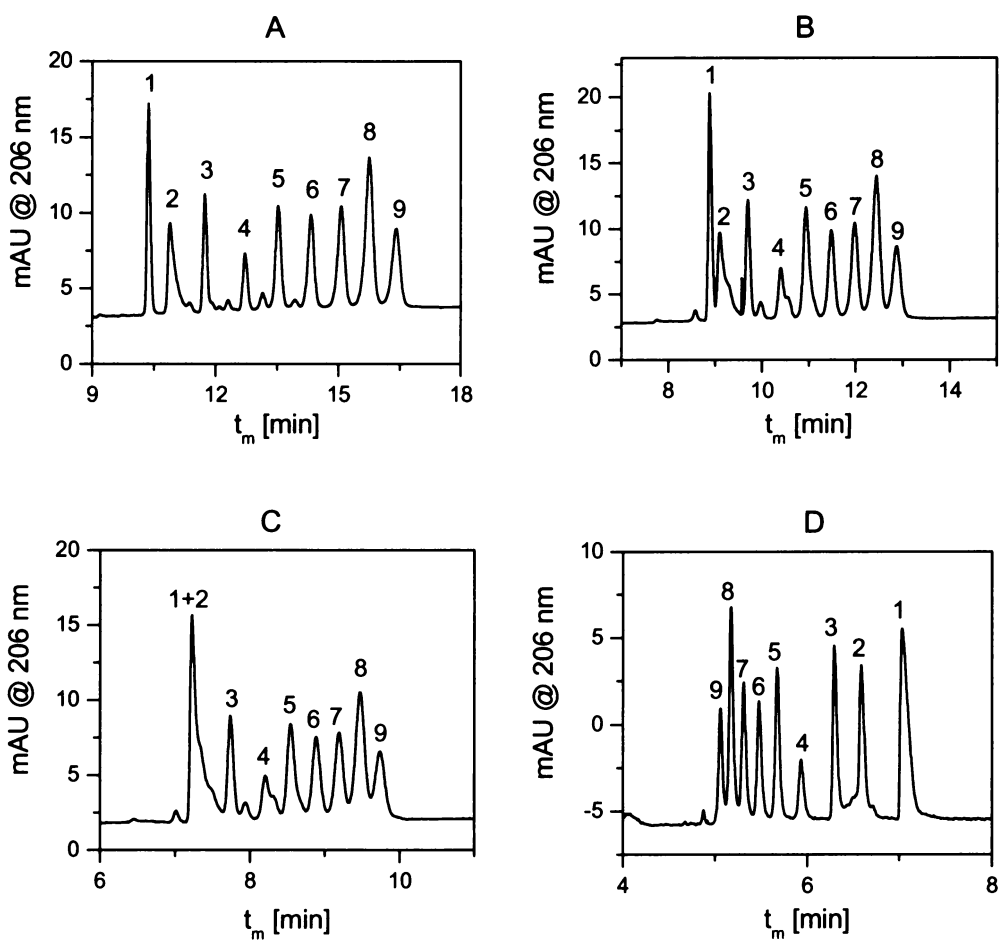


**Obrázek 4** CZE separace (A) enkefalinových analogů a fragmentů v BGE IV, pH 2,32, 1 – YG, 2 – YGG, 3 – [Leu<sup>5</sup>]ENK, 4 – [Met<sup>5</sup>]ENK; (B) dalarginové fragmenty a analogy v BGE III, pH 2,30, 1 – DLR-NHEt, 2 – DLR, 3 – I<sub>2</sub>DLR, 4 – YA, 5 – YaG, 6 – PacDLR. Experimentální podmínky: křemenná kapilára celk./efekt. délka 394/292 mm, i.d. 75 μm, o.d. 375 μm, separační napětí 10 kV, UV absorpční detektor, λ = 206 nm.

BGEs, BGE II, III, V, a v jednom alkalickém elektrolytu, BGE VII. Elektroforegramy separace peptidů se stejným efektivním nábojem a s klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci řetězce YDPAP<sub>x</sub>, x = 6-0, a dipeptidu, YD a tripeptidu, YDP, analyzovaných jako kationty v kyselých základních elektrolytech a jako anionty v alkalickém pufru, jsou na **obrázku 5**. Nejlepší rozlišení separace bylo nalezeno v klasickém tris-fosfátovém pufru, BGE II (**obrázek 5A**). V izoelektrickém pufru BGE III byl rychlejší EOF, čas analýzy byl kratší, ale píky nebyly úplně rozděleny na základní linii (**obrázek 5B**). V BGE V, 50 mM IDAA, dipeptid a tripeptid migrovaly ve směsné zóně (**obrázek 5C**). V alkalickém tris-tricinovém pufru, BGE VII, pomalejší IOPs nebyly rozděleny na základní linii a rychlejší IOPs měly trojúhelníkový tvar píku způsobený elektromigrační disperzí (**obrázek 5D**).

Další strukturálně podobné peptidy ze skupiny 20 IOPs byly separovány pouze ve vybraných elektrolytech. Tetrapeptid, YDPA, a jeho analog s homotyrosinem na N-konci, HtyDPA, byly úspěšně separovány v alkalickém BGE VII s rozlišením 1,92. V kyselých puffrech byly rozděleny s rozlišením 1,01-1,5, v izoelektrických puffrech, BGE III a V, nebyly rozděleny na základní linii. Analogy s delším peptidovým řetězcem lišící se prolinem nahrazeným dehydroprolinem dekaeptidů, YDPAP<sub>6</sub> a YDPAP<sub>5</sub>ΔP, a

pentapeptidů, YDPAP a YDPAΔP, byly úplně separovány na základní linii ve třech kyselých elektrolytech BGE II, III a V, na rozdíl od kratších analogů, tetrapeptidů, YDPA a YDΔPA, a tripeptidů YDP a YDΔP, které byly rozděleny pouze částečně nebo migrovaly ve směsných zónách. Žádný z derivátů s dehydroprolinem se nedělil od analogu s prolinem v alkalickém BGE VII. Cyklické analogy byly separovány pouze v alkalickém BGE VII, neboť v kyselých základních elektrolytech nebyly nabitě.



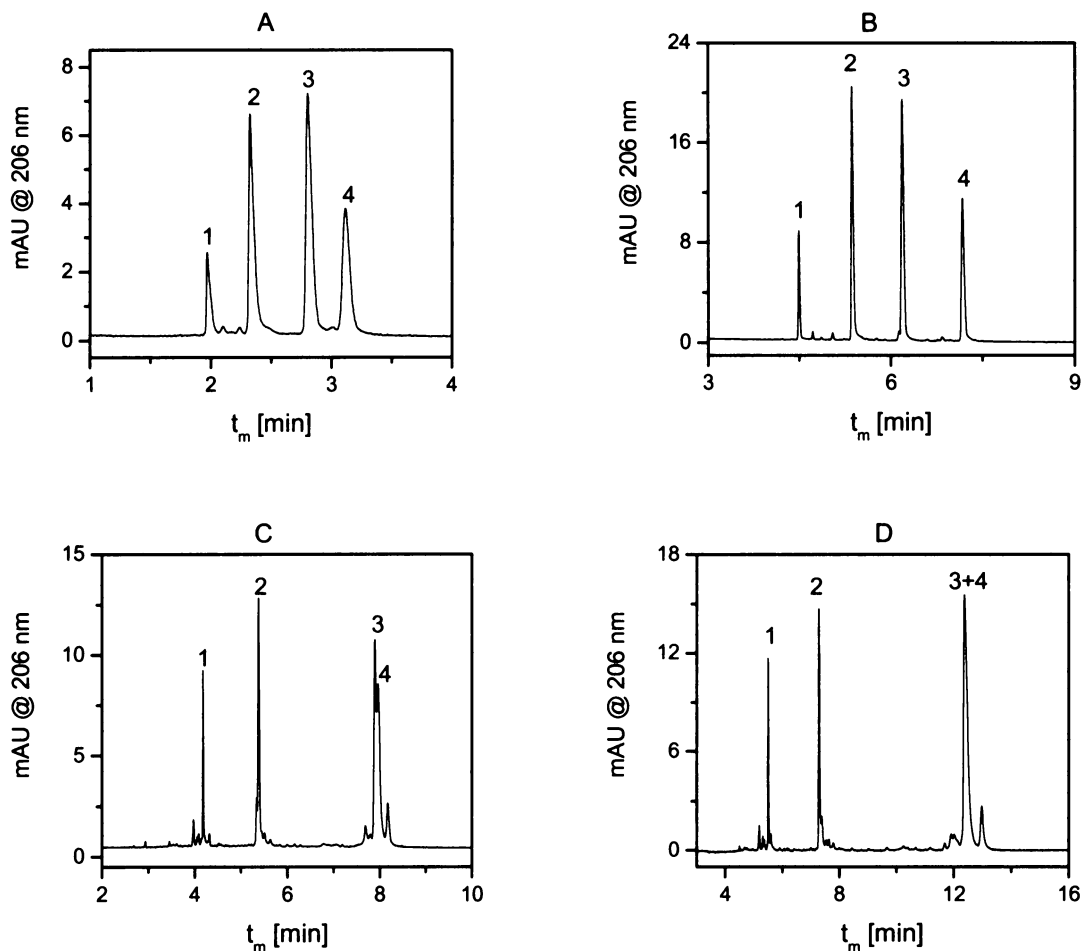
**Obrázek 5** CZE separace devíti IOPs s klesajícím počtem aminokyselinových zbytků v lineárním řetězci v (A) BGE II, pH 2,25, (B) BGE III, pH 2,30, (C) BGE V, pH 2,40 a (D) BGE VII, pH 8,1. 1 – YD, 2 – YDP, 3 – YDPA, 4 – YDPAP, 5 – YDPAP<sub>2</sub>, 6 – YDPAP<sub>3</sub>, 7 – YDPAP<sub>4</sub>, 8 – YDPAP<sub>5</sub>, 9 – YDPAP<sub>6</sub>. Experimentální podmínky: křemenná kapilára celk./efekt. délka 402/300 mm, i.d. 75 μm, o.d. 375 μm, separační napětí 10 kV, UV absorpční detektor λ = 206 nm.

Tři směsi po čtyřech GnRHs byly na základě experimentálních podmínek zvolených dle strategie pro racionální výběr podmínek pro separaci peptidů děleny v kyselém prostředí v úzkém rozsahu pH 2,18-2,50 v pěti různých základních

elektrolytech, BGE I-IV a BGE VI. Směs 1 byla složená z lidského GnRH a jeho fragmentů (pGluHWS, SYGLRPG-NH<sub>2</sub>, dAPGNH<sub>2</sub>-hGnRH), směs 2 z dekapeptidů tří druhů GnRH ([βAla<sup>6</sup>-ProNH<sub>2</sub><sup>10</sup>]hGnRH, hGnRH, sGnRH, cGnRH I) a směs 3 z [Des-pGlu<sup>1</sup>-D-Orn<sup>6</sup>]sGnRH, [Des-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>]hGnRH, sGnRH a [Des-Gly-NH<sub>2</sub>]sGnRH, viz **tabulka 6**. Srovnání účinností a rozlišení separace jednotlivých peptidů ve směsích v klasických BGEs jako kyselině octové, BGE I a BGE VI, a tris-fosfátovém pufru, BGE II, a v izoelektrických BGEs, 0,1-0,2 M kyselině iminodioctové, BGE III a BGE IV, je uvedeno v **tabulce 11**. Nejrychlejší separace peptidů byly provedeny v kyselině octové, ale hodnoty jejich rozlišení a separační účinností dosahovaly nejnižších hodnot. Nejkratší čas analýzy, 3,4-4,5 minut, byl získán v 0,5 M kyselině octové (BGE VI), jak je doloženo na separaci směsi 1 na **obrázku 6A**. Nejvyšší hodnoty separační účinnosti, 0,5-1,6·10<sup>6</sup> teoretických pater na metr, byly nalezeny pro izoelektrický BGE IV 0,2 M IDAA, pH 2,32. Důkazem úspěšné separace směsi 1 je **obrázek 6B** a směsi 3 **obrázek 6C**. Hodnoty rozlišení peptidů ve směsích 1 a 2 v klasickém tris-fosfátovém (BGE II) a izoelektrickém pufru (BGE IV) byly srovnatelné, ale ve směsi 3 peptidy [Des-Gly-NH<sub>2</sub>]sGnRH a sGnRH v BGE II migrovaly ve směšné zóně bez náznaku rozlišení (viz **obrázek 6D**) na rozdíl od separace s rozlišením 1,1 v izoelektrickém BGE IV (viz **obrázek 6C**). Z výsledků vyplývá, že úspěšná separace nezávisí pouze na pH základního elektrolytu, které se v daném případě lišilo o minimální rozdíl 0,05 jednotky, ale také na složení BGE a tedy na interakcích mezi ionty analytu a složkami BGE. Na příkladě separace GnRHs lze ukázat, že izoelektrický BGE, kyselina iminodioctová, může poskytnout lepší dělení než klasické BGEs.

**Tabulka 11** Separací účinnost a rozlišení CZE separace tří směsí GnRHs a jejich fragmentů a analogů v pěti kyselých základních elektrolytech, BGE I-IV, BGE VI. Složení BGEs je uvedeno v tabulce 7.

Směs	Peptid	Separací účinnost [počet teoretických pater na metr]										Rozlišení				
		BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI	BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI			
1	SYGLRPG-NH <sub>2</sub>	21709	125188	60959	164189	14299		-	-	-	-	-	-	-	-	
	hGnRH	18605	67104	43677	112854	12955	6,3	16,8	11,2	15,7	4,8					
	pGluHWS	21967	56571	40334	106615	13811	6,7	10,9	9,6	11,5	5,4					
	dAPGNH <sub>2</sub> -hGnRH	17631	75473	47091	123868	12119	5,6	14,6	9,2	12,2	3,0					
	βANHET-hGnRH	28602	104971	67695	152187	17714	..	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	hGnRH	16941	58881	42961	100696	11929	0,8	2,1	1,8	2,5	1,2					
	sGnRH	12807	36244	26417	55750	8739	6,9	24,9	17,9	23,6	8,0					
	cGnRH I	12807	36244	26417	55750	8739	0	0	0	0	0					
	dPyrDOrn-sGnRH	27892	211526	74027	148832	14898	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	dPGNH <sub>2</sub> -hGnRH	17129	106062	54877	120507	13414	10,7	25,8	18,3	24,7	9,2					
	sGnRH	12985	36711	18131	59590	6529	13,4	29,3	18,2	29,6	10,6					
	dGNH <sub>2</sub> -sGnRH	12985	36711	13857	48050	4681	0	0	0,7	1,1	0,2					

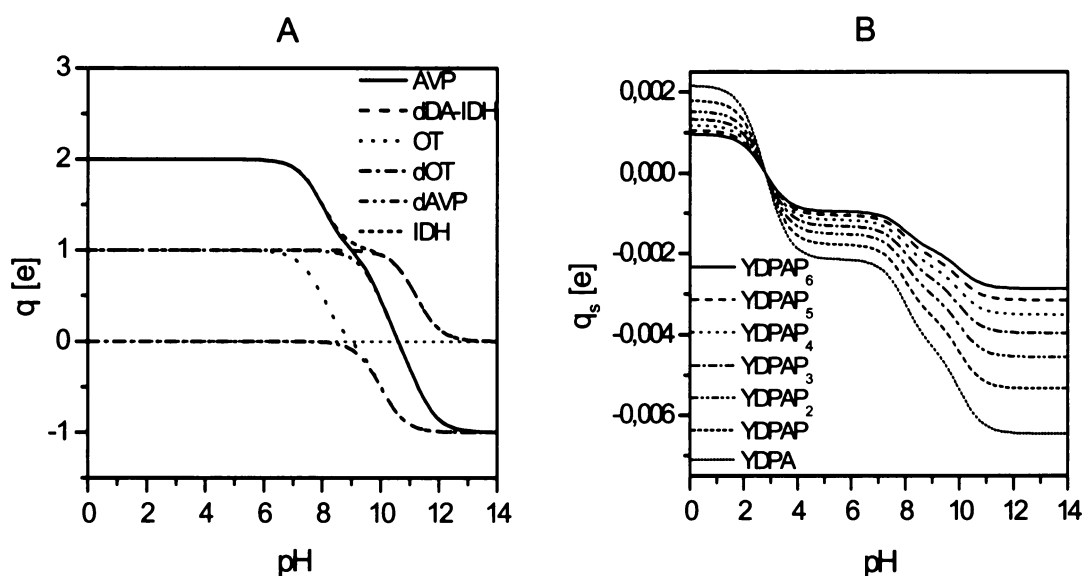


**Obrázek 6** CZE separace strukturálně podobných GnRHs. Směs 1 v (A) BGE VI, pH 2,50,  $U = 25$  kV; (B) BGE IV, 2,32,  $U = 15$  kV; a směs 3 v (C) BGE IV, pH 2,32,  $U = 15$  kV; (D) BGE II, pH 2,25,  $U = 15$  kV; směs 1, 1 – SYGLRPG-NH<sub>2</sub>, 2 – hGnRH, 3 – pGluHWS, 4 – dAPGNH<sub>2</sub>-hGnRH; směs 3, 1 – dPyrDOrn-sGnRH, 2 – dPGNH<sub>2</sub>-hGnRH, 3 – sGnRH, 4 – dGNH<sub>2</sub>-sGnRH. Experimentální podmínky: křemenná kapilára celk./efekt. délka 390/288 mm, i.d. 50  $\mu$ m, o.d. 375  $\mu$ m, UV absorpční detektor  $\lambda = 206$  nm.

## 6.2 Fyzikálně-chemická charakterizace peptidů

### 6.2.1 Výpočet efektivního a specifického náboje

Efektivní náboj a specifický náboj (efektivní náboj dělený relativní molekulovou hmotností) peptidů byl vypočten pomocí dříve vytvořeného počítačového programu Nabamfo [88]. Při výpočtu jsme vycházeli ze známých primárních struktur peptidů (viz **tabulky 3-6** a **obrázek 1**), tj. z přítomnosti jednotlivých ionogenních skupin v peptidových řetězcích. Vstupními daty pro výpočet byly hodnoty acidobazických disociačních konstant těchto ionogenních skupin, které byly získány jako průměrné hodnoty tabelovaných acidobazických disociačních konstant pro ionogenní skupiny aminokyselin uvedených v **tabulce 1**, kapitola 2.5.1. Závislosti efektivního náboje NHPs a specifického náboje pro sedm IOPs s klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci řetězce YDPAP<sub>x</sub>, x = 6-0, na pH jsou znázorněny na **obrázku 7**.



**Obrázek 7** (A) Závislost efektivního náboje,  $q$ , neurohypofyzárních hormonů na pH; (B) Závislost specifického náboje,  $q_s$ , sedmi vybraných lineárních hmyzích oostatických peptidů s klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci řetězce, YDPAP<sub>x</sub>, x = 6-0, na pH.

Pro pH optimálních základních elektrolytů byly vypočteny hodnoty efektivního náboje. Pro ionogenní NHPs v kyselém pH 2,25-2,50 byly vypočteny hodnoty 1e nebo 2 e. Efektivní náboj pro ENKs a jejich fragmenty v kyselém pH 2,25-2,30 nabýval kladných hodnot v rozsahu 0,6-0,7 e, zatímco v alkalickém pH 8,1 byly nabitě záporně (kolem hodnoty -0,6 e). DLR, jeho fragmenty a analogy se chovaly jako kationty nejen

v kyselém pH s hodnotou náboje v rozsahu 0,6-2 e, ale i v alkalickém pH 8,1 některé s blokováním C-koncem peptidového řetězce byly kladně nabitě v rozmezí 0,4-1,4 e. Zbylé dalarginy s volným C-koncem peptidového řetězce měly záporný efektivní náboj (kolem hodnoty -0,6 e) jako ENKs. Přesné hodnoty pro jednotlivé ENKs, DLR, jejich fragmenty a analogy jsou uvedeny v publikaci II v tabulce 5. Lineární IOPs v kyselých pufrách, pH 2,25-2,40, byly kladně nabitě v rozsahu 0,7-0,8 e, a záporně nabitě (-1,6 e) v alkalickém BGE VIII, pH 8,1. Pro cyklické IOPs v kyselém prostředí se blížila hodnota efektivního náboje k nule a v alkalickém dosahovala hodnot -2 e nebo -1 e. GnRHs byly analyzovány pouze v kyselé oblasti pH 2,18-2,50, kde v závislosti na počtu ionogenních skupin dosahovaly pozitivního efektivního náboje 0,9-3 e, závislost specifického náboje na pH je znázorněna v publikaci IV na obrázku 1 a přesné hodnoty jsou uvedeny tamtéž v tabulce 3.

### 6.2.2 Stanovení efektivní elektroforetické pohyblivosti při standardní teplotě

Pro výpočet efektivní elektroforetické pohyblivosti peptidů v základních elektrolytech s dostatečně rychlým EOF jsme použili vztah (2.5). V případě, že EOF byl pomalý a stanovení jeho pohyblivosti bylo časově náročné, použili jsme tzv. tlakem urychlené stanovení elektroosmotické pohyblivosti, a efektivní elektroforetickou pohyblivost vypočítali ze vztahu (2.6).

Pohyblivost je závislá na teplotě, vzrůstá přibližně o 2% na 1°C, proto pro přesné stanovení a porovnání pohyblivosti je nezbytné znát teplotu, při které byla pohyblivost změřena. V pracích II, III, IV byl pro stanovení teploty uvnitř kapiláry použit dříve navržený postup [97] založený na měření elektrické vodivosti roztoku standardního roztoku 0,02 M chloridu draselného o známé teplotní závislosti elektrické vodivosti. Pro specifickou vodivost,  $\kappa$ , 0,02 M KCl platí v teplotním rozmezí 15-35°C lineární vztah:

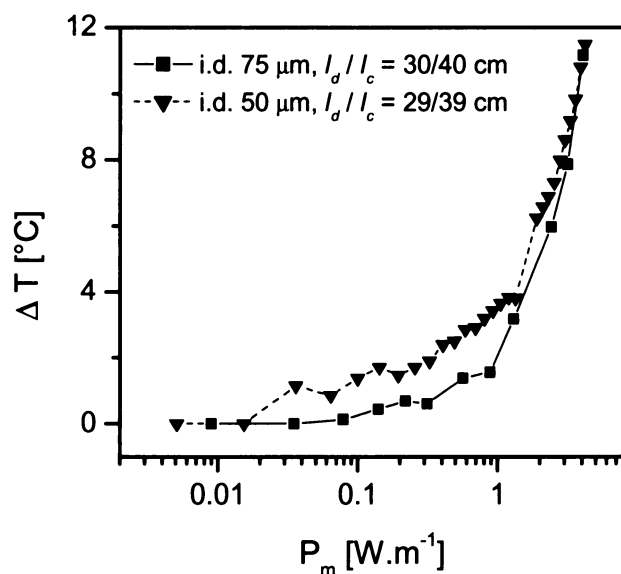
$$\kappa = 0,14304 + 5,36 \cdot 10^{-3} T \quad (5.1)$$

Aktuální specifickou vodivost roztoku KCl lze vypočítat ze vztahu:

$$\kappa = \frac{I_{el}}{U} \frac{l_c}{\pi R_i^2} = \theta \frac{I_{el}}{U} \quad (5.2)$$

kde  $l_c$  je celková délka kapiláry,  $R_i$  je vnitřní poloměr kapiláry,  $\theta$  je odporová konstanta nádoby,  $I_{el}$  je elektrický proud a  $U$  je elektrické napětí na kapiláře. V použité metodě sloužila separační kapilára za konduktometrickou celu a měřeným roztokem byl 20 mM KCl. Konstanta nádoby se stanovila z hodnoty proudu,  $I_{el}$ , protékajícího kapilárou při

nízkém napětí,  $U$ , nejčastěji 1 kV, kdy bylo možné zanedbat nárůst teploty roztoku uvnitř kapiláry. Poté byla proměřena závislost elektrického proudu na napětí a byl sestrojen kalibrační graf ve tvaru závislosti rozdílu teplot uvnitř a vně kapiláry na elektrickém příkonu vloženém na kapiláru. Kalibrační graf byl poté použit pro kapiláry o stejných délkách a vnitřních průměrech pro daný přístroj.



**Obrázek 8** Kalibrační graf nárůstu teploty roztoku uvnitř kapiláry vzhledem k okolí,  $\Delta T$ , v závislosti na elektrickém příkonu vztáženém na jednotku délku kapiláry,  $P_m$ , i.d. – vnitřní průměr kapiláry,  $l_c$  – celková délka kapiláry,  $l_d$  – efektivní délka kapiláry.

V rámci této práce pro přesné stanovení pohyblivostí byl použit komerční přístroj Beckman P/ACE MDQ a kapiláry o dvou různých vnitřních průměrech, 50  $\mu m$  a 75  $\mu m$ . Závislost rozdílu teplot uvnitř a vně kapiláry na elektrickém příkonu vloženém na kapiláru pro obě kapiláry je zobrazena na **obrázku 8**. Teplotní nárůsty v křemenné kapiláře s i.d. 50  $\mu m$  byly 3,6°C pro BGE I a BGE V, 4,8°C pro BGE II, 4,5°C pro BGE III a 3,9°C pro BGE IV a v kapiláře s i.d. 75  $\mu m$  4,5°C pro BGE II, 2,1°C pro BGE III, 3,2°C pro BGE IV, 1,5°C pro BGE V a 0,7°C pro BGE VII. Efektivní elektroforetické pohyblivosti korigované na standardní teplotu,  $\mu_{ep,25}$ , byly spočteny podle vztahu:

$$\mu_{ep,25} = \mu_{ep,t} [1 - 0,020(t - 25)] \quad (5.3)$$

kde  $\mu_{ep,25}$  je efektivní pohyblivost při teplotě 25°C a  $\mu_{ep,t}$  je efektivní elektroforetická pohyblivost měřená za skutečné teploty,  $t$ , uvnitř kapiláry.



Efektivní elektroforetické pohyblivosti korigované na standardní teplotu 25°C byly určeny pro enkefaliny, dalargin, jejich fragmenty a deriváty v práci II, tabulka 5, pro IOPs v práci III, tabulka 3 a pro GnRHs v práci IV, tabulka 3. Elektroforetické pohyblivosti byly určeny jako průměrné hodnoty ze dvou měření, které se nelišily o více než 1%. Tlakem urychlené stanovení elektroosmotické pohyblivosti byla použito u stanovení GnRHs, ENKs a DLR v tris-fosfátovém pufru, BGE II, kde elektroosmotická pohyblivost byla velmi nízká, mezi  $0,1 - 0,9 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

### 6.2.3 Testování semiempirických modelů korelujících pohyblivost peptidů a jejich náboj, velikost a prostorové uspořádání

V pracích III a IV bylo testováno sedm respektive šest semiempirických modelů korelujících pohyblivost IOPs a GnRHs s jejich nábojem, velikostí a tvarem: model pro sféricky tvarované molekuly viz vztah (2.15) [107], model pro klasický lineární polymer (2.16), Offordův model (2.14) [101], Grossmanův model (2.20) [114], Crossův model (2.17) [109], model Cifuentes a Poppeho (2.21) [119] a Kimův model (2.18) [112]. Kromě toho v práci II byl Crossův model aplikován na nehomologickou řadu ENKs a DLRs.

Všech sedm modelů bylo testováno na 20 IOPs s relativní molekulovou hmotností v rozsahu 299,3 až 1087,2 obsahujících 2 až 10 aminokyselinových zbytků. Grafy korelací aplikovaných na celou sérii těchto peptidů jsou v publikaci III, obrázek 5. V tomto případě žádný z modelů nepopisoval závislost pohyblivostí peptidů na jejich nábojích a velikostech zcela přesně, což se projevilo na hodnotách korelačních koeficientů pohybujících se v rozsahu 0,972-0,888. Hodnoty směrnice a korelačního koeficientu lineární závislosti Crossova modelu  $\log(\mu_{ep}/q)$  versus  $\log(M_r)$ , vztah (2.17), umožňují navrhnout nejpravděpodobnější model pro daný elektrolyt (viz **tabulky 2 a 12**). Model pro sféricky tvarované molekuly nejlépe vyhovoval elektromigraci peptidů v kyselém BGE III s korelačním koeficientem,  $r = 0,972$ , a v BGE V s  $r = 0,958$ . Pohyblivost peptidů v kyselém BGE II nejlépe popisoval model pro klasický lineární polymer s  $r = 0,981$ . Stejně tak model pro klasický lineární polymer se nejlépe hodil pro peptidy v alkalickém BGE VII s  $r = 0,972$ , alternativně by byl též použitelný Offordův model s  $r = 0,963$ . Ostatní modely jako Grossmanův model s  $r = 0,888-0,936$ , model Cifuentes a Poppeho s  $r = 0,911-0,965$ , stejně tak jako Kimův model s  $r = 0,933-0,965$  jsou méně vhodné pro popis chování IOPs v kyselých elektrolytech BGE II, III, V a v alkalickém BGE VII.

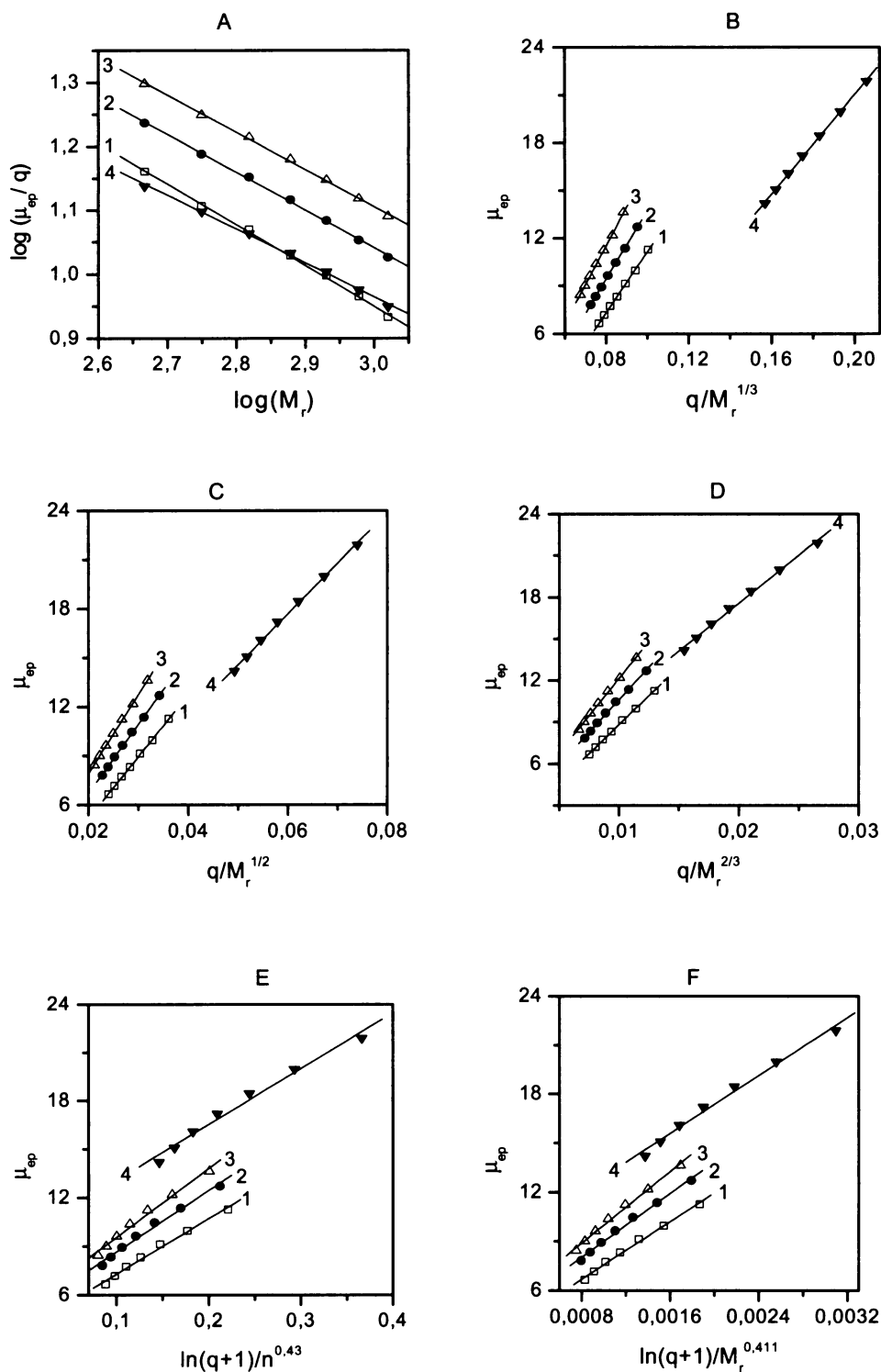
Pro další testy byla vybrána skupina devíti analogů IOPs s klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci řetězce, od dekaeptidu, YDPAP<sub>6</sub>, k dipeptidu, YD. Výsledkem byly vyšší hodnoty korelačních koeficientů získaných regresní analýzou. Z grafů bylo také zřejmé, že body odpovídající di- a tripeptidu vybočovaly z lineární části grafu. Kvůli nelineárnímu charakteru korelací mezi pohyblivostí a poměrem náboje a velikosti dvou krátkých peptidů s ohledem na malou pravděpodobnost tvorby organizované sekundární struktury, byla skupina omezena na sedm peptidů s lineárně klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci peptidového řetězce, YDPAP<sub>x</sub>, x = 6-0, s konstantním klesajícím rozdílem relativní molekulové hmotnosti 97,1. Grafy šesti empirických modelů aplikovaných na homologickou sadu sedmi IOPs jsou na **obrázku 9**. Z grafů je patrné, že korelace efektivních elektroforetických pohyblivostí peptidů s jejich efektivním nábojem a velikostí se výrazně zlepšila,  $r = 0,999$ , (viz **tabulka 12**), peptidy této série tedy vykazují podobné migrační chování.

**Tabulka 12** Parametry lineární regrese Crossova modelu  $\log(\mu_{ep}/q)$  versus  $\log(M_r)$  pro nehomologickou řadu 20 IOPs a pro homologickou řadu 7 lineárních IOPs s klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci řetězce, YDPAP<sub>x</sub> (x = 6-0), ve čtyřech základních elektrolytech. Složení a pH BGEs jsou uvedeny v tabulce 7.

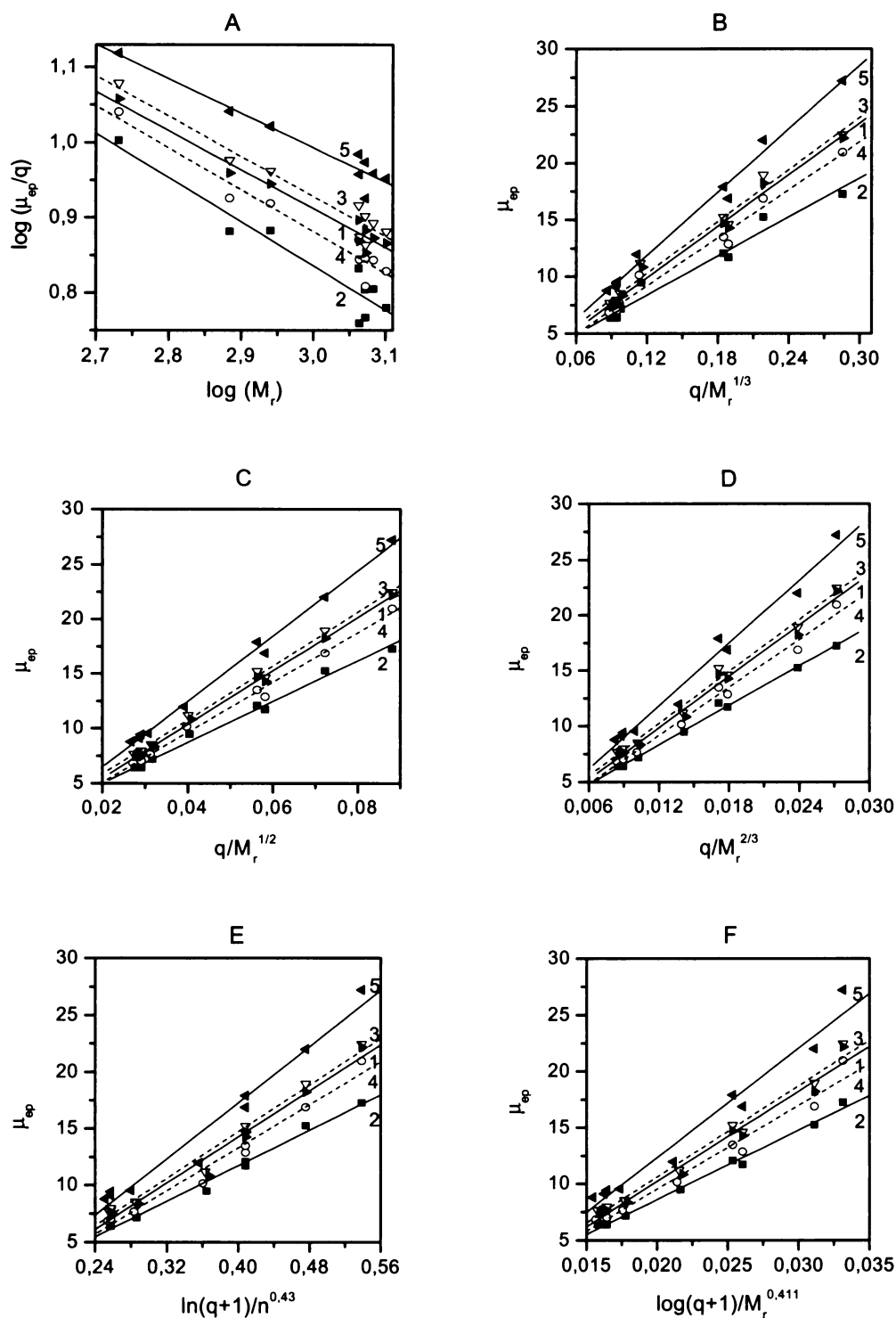
BGE	Nehomologická řada 20 IOPs		Sada lineárních IOPs, YDPAP <sub>x</sub> (x = 6-0)	
	<i>k</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>r</i>
II	-0,557	0,9821	-0,638	0,9992
III	-0,506	0,9738	-0,594	0,9993
V	-0,481	0,9546	-0,583	0,9993
VII	-0,441	0,9792	-0,531	0,9988

*k* – směrnice přímky, *r* – korelační koeficient

Všechny uvedené modely kromě Kimova byly aplikovány na sadu deseti GnRHs v pěti kyselých základních elektrolytech, BGE I-IV a VI, v oblasti pH 2,18-2,50, grafy jejich korelací jsou na **obrázku 10**. Z lineárních závislostí je zřejmé, že nejvhodnějším modelem je model pro klasický lineární polymer. Toto tvrzení je podpořeno také nejvyšším korelačním koeficientem, jehož hodnoty se pro všech pět základních elektrolytů pohybovaly v rozmezí 0,995-0,999. Výsledek je též v souladu s dříve publikovanou prací podobné série peptidů obsahující též triptorelin a buserelin



**Obrázek 9** Semiempirické modely korelace mezi absolutní hodnotou efektivní pohyblivosti peptidů,  $\mu_{ep}$ , a jejich efektivním nábojem,  $q$ , a velikostí (vyjádřenou relativní molekulovou hmotností,  $M_r$ , nebo počtem aminokyselinových zbytků v peptidovém řetězci,  $n$ ) aplikované na sadu sedmi IOPs s klesajícím počtem prolinových zbytků na C-konci, YDPAP<sub>6</sub> – YDPA, ve čtyřech základních elektrolytech, 1 – BGE II, pH 2,25, 2 – BGE III, pH = 2,30, 3 – BGE V, pH = 2,40, 4 – BGE VII, pH 8,10, (A) Crossův model, (2.17), (B) model pro sféricky tvarované molekuly (2.15), (C) model pro klasický lineární polymer (2.16), (D) Offordův model (2.14), (E) Grossmanův model (2.20), (F) model Cifuentes a Poppeho (2.21).



**Obrázek 10** Semiempirické modely korelace mezi absolutní hodnotou efektivní pohyblivosti peptidu,  $\mu_{ep}$ , a jejich efektivním nábojem,  $q$ , a velikostí (vyjádřenou relativní molekulovou hmotností,  $M_r$ , nebo počtem aminokyselinových zbytků v peptidovém řetězci,  $n$ ) aplikované na sadu deseti GnRHs v pěti kyselých základních elektrolytech, 1 – BGE I, pH 2,18, 2 – BGE II, pH 2,25, 3 – BGE III, pH = 2,30, 4 – BGE IV, pH = 2,32, 5 – BGE VI, pH 2,50, (A) Crossův model (2.17), (B) model pro sféricky tvarované molekuly (2.15), (C) model pro klasický lineární polymer (2.16), (D) Offordův model (2.14), (E) Grossmanův model (2.20), (F) model Cifuentes a Poppeho (2.21).

analyzované v pH 2,85 [187]. Vhodným modelem pro popis peptidů v elektrolytech BGE I-IV je rovněž Offordův model s hodnotami korelačního koeficientu 0,994-0,998. Alternativním modelem pro základní elektrolyt BGE VI je model pro sféricky tvarované molekuly. Model Cifuentes a Poppeho nebo Grossmanův model jsou pro popis elektroforetické migrace této série peptidů v kyselině octové jako základním elektrolytu méně vhodné ( $r = 0,990$  a  $0,984$ ). Konkrétní hodnoty korelačních koeficientů jsou uvedeny v publikaci IV, tabulce 5.

Vztahy mezi pohyblivostí peptidů a jejich nábojem a velikostí pro skupinu ENKs, DLR, jejich fragmentů a derivátů ve třech elektrolytech, BGE II, III a VII, byly prostudovány s využitím Crossova modelu. Protože peptidy netvořily homologickou řadu, podobně jako v případě 20 IOPs některé body nezapadaly do lineární části této závislosti, viz obrázek 4 v publikaci II. Nejvyšší koeficient korelace této závislosti byl získán pro kyselý základní elektrolyt BGE II,  $r = 0,960$ . Pro alkalický elektrolyt BGE VII, se po vyřazení odlehlých bodů korelační koeficient zvýšil na hodnotu 0,957.

#### 6.2.4 Predikce pravděpodobné struktury peptidu v roztoku

Na základě výběru vhodného semiempirického modelu v předchozí kapitole 6.2.3 a především z hodnot směrnice,  $k$ , lineární závislosti  $\log(\mu_{ep}/q)$  versus  $\log(M_r)$  v Crossově modelu, vztah (2.17), bylo možné předpovědět nejpravděpodobnější tvar molekuly peptidu v roztoku. Tvary molekul odvozené ze vztahu mezi směrnicí v Crossově modelu a exponentem relativní molekulové hmotnosti jsou uvedené v **tabulce 2**, kapitola 2.6.2.

Studiem tvaru molekul peptidů v základních elektrolytech se zabývaly práce II, III a IV. Pro nehomologickou sadu enkefalinů, dalarginu, jejich fragmentů a derivátů je z Crossova grafu zřejmé, že směrnice v závislostech jsou podobné pro dva kyselé elektrolyty,  $k = -0,674$  pro BGE II a  $k = -0,596$  pro BGE III, zatímco pro alkalický BGE VII nabývá směrnice výrazně odlišné hodnoty  $k = -0,323$ . Z hodnot směrnice tedy vyplývá, že v kyselých základních elektrolytech se hodnota blíží k  $2/3$ , a tedy pravděpodobný tvar molekul ENKs, DLR, jejich fragmentů a derivátů v roztoku při pH 2,25-2,30 je tvar zploštělého disku. V alkalickém pufru se blíží hodnotě  $1/3$ , což odpovídá kulovitému tvaru molekuly. Pro homologickou řadu GnRHs je směrnice  $k$  v rozmezí  $(-0,5) - (-0,6)$ , přesněji od  $-0,519$  do  $-0,589$  pro BGE I-IV, jen pro BGE VI je poněkud nižší,  $-0,457$ . Nejpravděpodobnějším tvarem molekul GnRHs v pH 2,18-2,50 je náhodné klubko. Pro skupinu dvaceti různě velkých IOPs nebylo možné určit

stejný pravděpodobný tvar molekuly v roztoku. Z homologické skupiny devíti IOPs s klesajícím počtem aminokyselin v lineárním řetězci, od dekapektidu, YDPAP<sub>6</sub>, k dipeptidu, YD, byly dva nejkratší peptidy vyloučeny. Vzhledem ke krátkosti jejich řetězce netvoří organizované struktury. Z **tabulky 12** pro skupinu sedmi lineárních homogenních IOPs vyplývá, že v Crossově modelu hodnota  $k$  v alkalickém elektrolytu BGE VII se blíží  $1/2$ , takže nejpravděpodobnějším tvarem jejich molekul v roztoku je náhodné klubko. Pro klasický kyselý elektrolyt BGE II, pH 2,25, se hodnota  $k$  přiblížila k  $2/3$ , což odpovídá tvaru zploštělého disku. V izoelektrických pufrech BGE III a V, lišících se pouze v iontové síle, jsou hodnoty  $k$  téměř stejné,  $-0,583$  a  $-0,593$ , což odpovídá tvaru náhodného klubka.

*Handwritten text, likely a signature or note, partially illegible.*

## 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 ( $\text{pH} = 2-2,5$ ) a jako anionty v amfoterním pufru ve slabě alkalické oblasti pH,  $\text{pH} = 8,1$ . Neionogenní peptidy byly analyzovány metodou micelární elektrokinetické chromatografie s micelární fází tvořenou anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným v alkalickém prostředí,  $\text{pH} 8,8$ . 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 rozdíly 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.



## 8 Literatura

1. Hjerten, S., *Arkiv. Kemi* 1958, 151-152.
2. Hjerten, S., *Chromatogr. Rev.* 1967, 9, 122-219.
3. Everaerts, F. M., Hoving-Keulemans, W. M. L., *Sci. Tools* 1970, 17, 25-28.
4. Virtanen, R., *Acta Polytech. Scand.* 1974, 123, 1-67.
5. Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., *J. Chromatogr.* 1979, 169, 11-20.
6. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298-1302.
7. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Science* 1983, 222, 266-272.
8. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal. Chem.* 1984, 56, 111-113.
9. Terabe, S., *Anal. Chem.* 2004, 76, 240A-246A.
10. Grossman, P. D., in: Grossman, P. D., Colburn, J. C. (Eds.), *Capillary Electrophoresis*, Academic Press, San Diego 1992, pp. 3-43.
11. Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2000, 21, 3888-3897.
12. Gaš, B., Štědrý, M., Kenndler, E., *Electrophoresis* 1997, 18, 2123-2133.
13. Kenndler, E., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley&Sons Inc., New York 1998, pp. 25-76.
14. Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 3817-3826.
15. Ghosal, S., *Electrophoresis* 2004, 25, 214-228.
16. Xuan, X. C., Li, D. Q., *Electrophoresis* 2005, 26, 166-175.
17. Gaš, B., *J. Chromatogr.* 1993, 644, 161-174.
18. Willems, A. V., Deforce, D. L., Van Peteghem, C. H., Van Bocxlaer, J. F., *Electrophoresis* 2005, 26, 1221-1253.
19. Beckers, J. L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 518-535.
20. Štědrý, M., Jaroš, M., Gaš, B., *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 187-198.
21. Gaš, B., Jaroš, M., Hruška, V., Zusková, I., Štědrý, M., *LC GC Eur.* 2005, 18, 282-288.
22. Jaroš, M., Hruška, V., Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 3080-3085.

23. Mclaughlin, G. M., Anderson, K. W., Hauffe, D. K., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley&Sons Inc., New York 1998, pp. 637-681.
24. Regnier, F. E., Lin, S., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley&Sons Inc., New York 1998, pp. 683-727.
25. Dolnik, V., *Electrophoresis* 2004, 25, 3589-3601.
26. Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 34-54.
27. Horvath, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644-655.
28. Herr, A. E., Molho, J. I., Santiago, J. G., Mungal, M. G., Kenny, T. W., Garguilo, M. G., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1053-1057.
29. Potoček, B., Gaš, B., Kenndler, E., Štědrý, M., *J. Chromatogr. A.* 1995, 709, 51-62.
30. Cohen, N., Grushka, E., *J. Chromatogr. A.* 1994, 684, 323-328.
31. Jussila, M., Palonen, S., Porrás, S. P., Riekkola, M. L., *Electrophoresis* 2000, 21, 586-592.
32. Mol, R., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Electrophoresis* 2005, 26, 146-154.
33. Kašička, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 4139-4162.
34. Kašička, V., *Electrophoresis* 2003, 24, 4013-4046.
35. Kašička, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 142-175.
36. Novatchev, N., Holzgrabe, U., *Chromatographia* 2003, 57, 345-349.
37. Lucas, C., Foley, J. P., Ahuja, E. S., *Biomed. Chromatogr.* 2003, 17, 172-181.
38. Hettiarachchi, K., Ridge, S., *J. Chromatogr. A.* 1998, 817, 153-161.
39. Ridge, S., Hettiarachchi, K., *J. Chromatogr. A.* 1998, 817, 215-222.
40. Frerichs, V. A., Herrmann, J. K., Aguirre, A., Colon, L. A., *Microchem. J.* 2004, 78, 135-142.
41. Wittke, S., Fliser, D., Haubitz, M., Bartel, S., Krebs, R., Hausadel, F., Hillmann, M., Golovko, I., Koester, P., Haller, H., Kaiser, T., Mischak, H., Weissinger, E. M., *J. Chromatogr. A* 2003, 1013, 173-181.
42. Na, D. H., Youn, Y. S., Lee, S. D., Son, M. W., Kim, W. B., DeLuca, P. P., Lee, K. C., *J. Control. Release* 2003, 92, 291-299.
43. Na, D. H., Lee, K. C., *Anal. Biochem.* 2004, 331, 322-328.
44. Poinot, V., Bayle, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2003, 24, 4047-4062.

45. Migneault, I., Dartiguenave, C., Vinh, J., Bertrand, M. J., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 2004, 25, 1367-1378.
46. Hamrníková, I., Mikšík, I., Uhrová, M., Deyl, Z., *Anal. Chim. Acta* 1998, 372, 257-272.
47. Kašička, V., in: Aboul-Enein, H. Y. (Ed.), *Analytical and Preparative Separation Methods of Biomacromolecules*, Marcel Dekker, Inc., New York 1999, pp. 39-97.
48. Mogensen, K. B., El Ali, J., Wolff, A., Kutter, J. P., *Appl. Optics* 2003, 42, 4072-4079.
49. Djordjevic, N. M., Widder, M., Kuhn, R., *HRC-J. High. Res. Chromatogr.* 1997, 20, 189-192.
50. Boring, C. B., Dasgupta, P. K., *Anal. Chim. Acta* 1997, 342, 123-132.
51. Simonet, B. M., Rios, A., Valcarcel, M., *Trac-Trend. Anal. Chem.* 2003, 22, 605-614.
52. Lee, T. T., Yeung, E. S., *J. Chromatogr.* 1992, 595, 319-325.
53. Riollet, P., Couderc, F., *J. Capillary Electrophor.* 2004, 9, 1-11.
54. Lacroix, M., Poinot, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2005, 26, 2608-2621.
55. Huang, Y. F., Huang, C. C., Chang, H. T., *Langmuir* 2003, 19, 7498-7502.
56. Pinto, D. M., Arriaga, E. A., Craig, D., Angelova, J., Sharma, N., Ahmadzadeh, H., Dovichi, N. J., Boulet, C. A., *Anal. Chem.* 1997, 69, 3015-3021.
57. Baars, M. J., Patonay, G., *Anal. Chem.* 1999, 71, 667-671.
58. Garcia, C. D., Henry, C. S., *Electroanalysis* 2005, 17, 1125-1131.
59. Holland, L. A., Leigh, A. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3649-3658.
60. Kubáň, P., Hauser, P. C., *Electroanalysis* 2004, 16, 2009-2021.
61. Šolínová, V., Kašička, V., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1743-1762.
62. Jin, W. R., Dong, Q., Yu, D. Q., Ye, X. Y., *Electrophoresis* 2000, 21, 1535-1539.
63. Jin, W. R., Li, W., Xu, Q., *J. Chromatogr. Sci.* 2000, 38, 545-550.
64. Gawron, A. J., Lunte, S. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3205-3211.
65. Baltussen, E., Guijt, R. M., van der Steen, G., Laugere, F., Baltussen, S., van Dedem, G. W. K., *Electrophoresis* 2002, 23, 2888-2893.
66. Abad-Villar, E. M., Kubáň, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 3609-3614.

67. Stutz, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 1254-1290.
68. Monton, M. R. N., Terabe, S., *Anal. Sci.* 2005, 21, 5-13.
69. Simpson, D. C., Smith, R. D., *Electrophoresis* 2005, 26, 1291-1305.
70. Yates, J. R., *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 2004, 33, 297-316.
71. Lane, C. S., *CMLS-Cell. Mol. Life S.* 2005, 62, 848-869.
72. Tomer, K. B., *Chem. Rev.* 2001, 101, 297-328.
73. Issaq, H. J., Chan, K. C., Janini, G. M., Muschik, G. M., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2000, 23, 145-154.
74. Righetti, P. G., in: Righetti, P. G. (Eds.), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, CRC Series in Analytical Biotechnology, 1996.
75. Issaq, H. J., Janini, G. M., Chan, K. C., Elrassi, Z., in: Brown, P. R., Grushka, E. (Eds.), *Advances in Chromatography, Vol.35*, Marcel Dekker, Inc., New York 1995, pp. 101-169.
76. Boček, P., in: Churáček, J. (Ed.), *Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Academia, Praha 1993, pp. 97-141.
77. Foret, F., Křivánková, L., and Boček, P., in: Radola, B. J. (Ed.), *Capillary Zone Electrophoresis*, Verlag Chemie, Electrophoresis Library, Weinheim, 1993.
78. Reijenga, J. C., Verheggen, T. P. E. M., Martens, J. H. P. A., Everaerts, F. M., *J. Chromatogr. A.* 1996, 744, 147-153.
79. Righetti, P. G., Gelfi, C., Bossi, A., Olivieri, E., Castelletti, L., Verzola, B., Stoyanov, A. V., *Electrophoresis* 2000, 21, 4046-4053.
80. Nielsen, R. G., Rickard, E. C., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 99-114.
81. Greve, K. F., Nashabeh, W., Karger, B. L., *J. Chromatogr. A.* 1994, 680, 15-24.
82. Novotny, M. V., Cobb, K. A., Liu, J. P., *Electrophoresis* 1990, 11, 735-749.
83. Perez-Rama, M., Vaamonde, E. T., Alonso, J. A., *Electrophoresis* 2005, 26, 610-620.
84. Psurek, A., Feuerstein, S., Willbold, D., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2006, 27, 1768-1775.
85. Yang, Y. Z., Boysen, R. I., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1043, 81-89.
86. Stauff, J., Jaenicke, R., in: Rauen, H. M. (Ed.), *Biochemisches Taschenbuch*, Springer-Verlag, Berlin 1964, pp. 37-121.
87. Sillero, A., Ribeiro, J. M., *Anal. Biochem.* 1989, 179, 319-325.
88. Kašička, V., Prusík, Z., *J. Chromatogr.* 1989, 470, 209-221.

89. Cifuentes, A., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 321-340.
90. Mosher, R. A., Gebauer, P., Thormann, W., *J. Chromatogr.* 1993, 638, 155-164.
91. Nath, S., Schutte, H., Hustedt, H., Deckwer, W. D., *Electrophoresis* 1990, 11, 612-616.
92. Hirokawa, T., Kiso, Y., Gaš, B., Zusková, I., Vacík, J., *J. Chromatogr.* 1993, 628, 283-308.
93. Righetti, P. G., Gelfi, C., *J. Capillary Electrophor.* 1994, 1, 27-35.
94. Klepárník, K., Šlais, K., Boček, P., *Electrophoresis* 1993, 14, 475-479.
95. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 774-781.
96. Včeláková, K., Zusková, I., Kenndler, E., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 309-317.
97. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 145-154.
98. Sanz-Nebot, V., Toro, I., Benavente, F., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2002, 942, 145-156.
99. Psurek, A., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 765-773.
100. Foulon, C., Danel, C., Vaccher, C., Yous, S., Bonte, J. P., Goossens, J. F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1035, 131-136.
101. Offord, R. E., *Nature* 1966, 211, 591-593.
102. Issaq, H. J., Janini, G. M., Atamna, I. Z., Muschik, G. M., Lukszo, J., *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15, 1129-1142.
103. Rickard, E. C., Strohl, M. M., Nielsen, R. G., *Anal. Biochem.* 1991, 197, 197-207.
104. Basak, S. K., Ladisch, M. R., *Anal. Biochem.* 1995, 226, 51-58.
105. Tessier, B., Blanchard, F., Vanderesse, R., Harscoat, C., Marc, I., *J. Chromatogr. A* 2004, 1024, 255-266.
106. Jalali-Heravi, M., Shen, Y., Hassanisadi, M., Khaledi, M. G., *Electrophoresis* 2005, 26, 1874-1885.
107. Grossman, P. D. and Colburn, J. C., in: Grossman, P. D. and Colburn, J. C. (Eds.), *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, Inc., San Diego 1992.
108. Tanford, C., *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York 1961, 390-392.

109. Cross, R. F., Garnham, N. F., *Chromatographia* 2001, 54, 639-646.
110. Cross, R. F., Wong, M. G., *Chromatographia* 2003, 58, 427-437.
111. Cross, R. F., Wong, M. G., *Chromatographia* 2003, 58, 439-447.
112. Kim, J., Zand, R., Lubman, D. M., *Electrophoresis* 2003, 24, 782-793.
113. Compton, B. J., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 357-366.
114. Grossman, P. D., Colburn, J. C., Lauer, H. H., *Anal. Biochem.* 1989, 179, 28-33.
115. Simo, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2003, 24, 834-842.
116. Adamson, N. J., Reynolds, E. C., *J. Chromatogr. B* 1997, 699, 133-147.
117. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2002, 950, 99-111.
118. Gaus, H. J., Becksickinger, A. G., Bayer, E., *Anal. Chem.* 1993, 65, 1399-1405.
119. Cifuentes, A., Poppe, H., *Electrophoresis* 1997, 18, 2362-2376.
120. Hearn, M. T. W., Keah, H. H., Boysen, R. I., Messana, I., Misiti, F., Rossetti, D. V., Giardina, B., Castagnola, M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1964-1972.
121. Verzola, B., Perduca, M., Mezo, G., Hudecz, F., Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2003, 24, 794-800.
122. Sitaram, B. R., Keah, H. H., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 1999, 857, 263-273.
123. Micinski, S., Gronvald, M., Compton, B. J., in: Karger, B. L., Hancock, W. S. (Eds.), *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules, Pt A*, Academic Press Inc, San Diego 1996, pp. 342-358.
124. Janini, G. M., Metral, C. J., Issaq, H. J., Muschik, G. M., *J. Chromatogr. A* 1999, 848, 417-433.
125. Hanč, O., Pádr, Z., *Hormony*, Academia, Praha 1982, pp. 274-311.
126. Sewald, N., Jakubke, H. D., in: Sewald, N., Jakubke, H. D. (Eds.), *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002, pp. 61-134.
127. Mařík, J., Buděšínský, M., Slaninová, J., Hlaváček, J., *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2002, 67, 373-392.
128. Pacáková, V., Suchánková, J., Štulík, K., *J. Chromatogr. B-Bio. Med. Appl.* 1996, 681, 69-76.
129. Jiskra, J., Pacáková, V., Tichá, M., Štulík, K., Barth, T., *J. Chromatogr. A* 1997, 761, 285-296.
130. Sutcliffe, N., Corran, P. H., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 95-103.

131. Vizioli, N. M., Rusell, M. L., Carducci, C. N., *Anal. Chim. Acta* 2004, 514, 167-177.
132. Walhagen, K., Unger, K. K., Olsson, A. M., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 263-275.
133. Deng, B. Y., Chan, W. T., *Electrophoresis* 2001, 22, 2186-2191.
134. Han, K. Y., Ban, E. M., Yoo, Y. S., *J. Chromatogr. A* 2003, 1013, 215-220.
135. Zaitso, K., Kimura, Y., Ohkura, Y., *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17, 763-766.
136. Kunkel, A., Gunter, S., Dette, C., Watzig, H., *J. Chromatogr. A* 1997, 781, 445-455.
137. Kunkel, A., Gunter, S., Watzig, H., *Amer. Lab.* 1998, 30, C76-C89.
138. Arcelloni, C., Falqui, L., Martinenghi, S., Pontiroli, A. E., Paroni, R., *Electrophoresis* 1998, 19, 1475-1477.
139. Tong, W., Yeung, E. S., *J. Chromatogr. B-Bio. Med. Appl.* 1996, 685, 35-40.
140. Sowell, J., Parihar, R., Patonay, G., *J. Chromatogr. B* 2001, 752, 1-8.
141. Lee, H. G., Desiderio, D. M., *Anal. Chim. Acta* 1999, 383, 79-99.
142. Lazar, I. M., Lee, E. D., Rockwood, A. L., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* 1998, 829, 279-288.
143. Furtosmatei, A., Li, J. J., Waldron, K. C., *J. Chromatogr. B* 1997, 695, 39-47.
144. Kašička, V., Prusík, Z., Pospíšek, J., *J. Chromatogr.* 1992, 608, 13-22.
145. Stroink, T., Wiese, G., Teeuwse, J., Lingeman, H., Waterval, J. C. M., Bult, A., de Jong, G. J., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2003, 24, 897-903.
146. Stroink, T., Schravendijk, P., Wiese, G., Teeuwse, J., Lingeman, H., Waterval, J. C. M., Bult, A., de Jong, G. J., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2003, 24, 1126-1134.
147. Desiderio, D. M., *J. Chromatogr. B* 1999, 731, 3-22.
148. Furtosmatei, A., Day, R., Stpierre, S. A., Stpierre, L. G., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 2000, 21, 715-723.
149. Huang, Y., Duan, J. P., Chen, Q. R., Chen, G. N., *Electrophoresis* 2004, 25, 1051-1057.
150. Chen, C. P., Pollack, G. M., *J. Chromatogr. B-Bio. Med. Appl.* 1996, 681, 363-373.
151. Chen, C. P., Jeffery, D., Jorgenson, J. W., Moseley, M. A., Pollack, G. M., *J. Chromatogr. B* 1997, 697, 149-162.
152. Catai, J. R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2004, 25, 817-824.

153. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 4333-4340.
154. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Balaguer, E., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2003, 24, 883-891.
155. Huang, Y., Duan, J. P., Jiang, X. Y., Chen, H. Q., Chen, G. N., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 2534-2539.
156. Psurek, A., Matysik, F. M., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2006, 27, 1199-1208.
157. Babu, C. V. S., Chung, B. C., Lho, D. S., Yoo, Y. S., *J. Chromatogr. A* 2006, 1111, 133-138.
158. Borovsky, D., Mahmoot, T., Carlson, D. A., *J. Fla. Anti-Mosqv. Assoc.* 1989, 60, 66-70.
159. Borovsky, D., Carlson, D. A., Griffin, P. R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., *Insect Biochem. Molec.* 1993, 23, 703-712.
160. Hlaváček, J., Bennettová, B., Barth, T., Tykva, R., *J. Pept. Res.* 1997, 50, 153-158.
161. Hlaváček, J., Tykva, R., Bennettová, B., Barth, T., *Bioorg. Chem.* 1998, 26, 131-140.
162. Hlaváček, J., Buděšínský, M., Bennettová, B., Mařík, J., Tykva, R., *Bioorg. Chem.* 2001, 29, 282-292.
163. Maloň, P., Dlouhá, H., Bennettová, B., Tykva, R., Hlaváček, J., *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2003, 68, 1309-1318.
164. Slaninová J., Bennetová B., Nazarov E. S., Šimek P., Holík J., Vlasáková V., Hlaváček J., Černý B., Tykva R., *Bioorg. Chem.* 2004, 32, 263-273.
165. Borovsky D., Mahmood F., *Regul. Peptides* 1995, 57, 273-281.
166. Slaninová J., Bennetová B., Hlaváček J., Tykva R., *Chemosphere* 2002, 48, 591-595.
167. Waterval, J. C. M., Bestebreurtje, P., Lingeman, H., Versluis, C., Heck, A. J. R., Bult, A., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2001, 22, 2701-2708.
168. Sanz-Nebot, V., Balaguer, E., Benavente, F., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 1457-1465.
169. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2003, 985, 411-423.
170. Naylor, S., Tomlinson, A. J., *Talanta* 1998, 45, 603-612.



171. Johannesson, N., Wetterhall, M., Markides, K. E., Bergquist, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 809-816.
172. Janini, G. M., Conrads, T. P., Wilkens, K. L., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., *Anal. Chem.* 2003, 75, 1615-1619.
173. McComb, M. E., Krutchinsky, A. N., Ens, W., Standing, K. G., Perreault, H., *J. Chromatogr. A* 1998, 800, 1-11.
174. Perkins, J. R., Tomer, K. B., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2835-2840.
175. Watzig, H., Degenhardt, M., *J. Chromatogr. A* 1998, 817, 239-252.
176. Zuberovic, A., Ullsten, S., Hellman, U., Markides, K. E., Bergquist, J., *Rapid Commun. Mass Sp.* 2004, 18, 2946-2952.
177. Corran, P. H., Sutcliffe, N., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 87-94.
178. Ledger, R., Tucker, I. G., Walker, G. F., *J. Chromatogr. B* 2002, 769, 235-242.
179. Rezeli, M., Vilaghy, B., Kilar, F., Kanyo, K., Torok, B., Torok, A., *J. Biochem. Bioph. Meth.* 2002, 53, 151-156.
180. Waterval, J. C. M., Hommels, G., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A. J. R., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2001, 22, 2709-2716.
181. Sewald, N., Jakubke, H. D., in: Sewald, N., Jakubke, H. D. (Eds.), *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002, pp. 135-267.
182. J. Pospíšek, Z. D. Běsálková, E. Kovaříková, M. I. Titov, T. Barth, K. Medzihradský, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1987, 52, 1867-1871.
183. M. Tichá, T. Trnka, T. Barth, J. Pospíšek, V. Pacáková, V. Kašíčka, L. Hauzerová, K. Ubik, *Book of Abstracts "Biological Active Peptides"*, IOCB, Praha, 1997, p.52.
184. Ciencialová, A., Klasová, L., Jiráček, J., Barthová, J., Barth, T., in: Slaninová, J. (Ed.), *Biological Active Peptides, Collection Symposium Series, 4*, IOCB, Praha 2001, pp. 41-44.
185. A. Ciencialová, L. Klasová, J. Barthová, T. Barth, *Book of Abstracts "Biological Active Peptides"*, IOCB, Praha 2003, p.17.
186. Kašíčka, V., Prusík, Z., Sazelová, P., Brynda, E., Stejskal, J., *Electrophoresis* 1999, 20, 2484-2492.
187. Benavente, F., Balaguer, E., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Chromatogr. A* 2006, 1117, 94-102.

## 9 Seznam publikací

### a) publikace v recenzovaných časopisech

1. Šolínová V., Kašička V.: Recent Applications of Conductivity Detection in Capillary and Chip Electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1743-1762.
2. 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* 2006, 27, 1006-1019.
3. Šolínová V., Kašička V., Barth T., Hauzerová L., Fanali S.: Analysis and Separation of Enkephalin and Dalargin Analogues and Fragments by Capillary Zone Electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 9-18.
4. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J.: Separation and Investigation of the Structure-Mobility Relationships of Insect Oostatic Peptides by Capillary Zone Electrophoresis, *Electrophoresis* 2004, 25, 2299-2308.
5. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Barth T., Cencialová A., Žáková L.: Analysis of Synthetic Derivatives of Peptide Hormones by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography with Ultraviolet-Absorption and Laser-Induced Fluorescence Detection, *J. Chromatogr. B* 2004, 808, 75-82.
6. Šolínová V., Jelínek I., Opekar F., Kašička V.: Determination of Selected Cations in Mineral Waters and Infusion Solution of Procaine by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection, *Chem. listy* 2004, 98, 191-196.
7. Sázelová P., Kašička V., Šolínová V., Koval D.: Determination of Purity Degree and Counter-Ion Content in Lecirelin by Capillary Zone Electrophoresis and Capillary Isotachopheresis, *J. Chromatogr. B* 2006, 841, 145-151.
8. Česnek M., Masojídková M., Holý A., Šolínová V., Koval D., Kašička V.: Synthesis and Properties of 2-Guanidinopurines, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006, 71, 1303-1319.

### b) publikace ve sbornících konferencí

1. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T.: Analysis, Separation and Investigation of Structure-Mobility Relationships of Biopeptides by Capillary Zone Electrophoresis, Proceedings of 2<sup>nd</sup> International Student Conference "Modern Analytical Chemistry", Prague, 26-27.9.2005, p. 36-40.

2. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T.: Investigation of Structure-Mobility Relationships and Estimation of Secondary Structure of Biopeptides by Capillary Zone Electrophoresis, in Slaninová J. (Ed.): Biologically Active Peptides, Proceedings of IX<sup>th</sup> Conference, Prague, 20-22.4.2005, Collection of Symposium Series, Vol. 8, 2005, p. 80-83.
3. Šolínová V., Kašička V., Barth T., Hauzerová L.: Analyses of Enkephalin and Dalargin Analogues and Fragments by Capillary Zone Electrophoresis, in Flegel M., Fridkin M., Gilon C., Slaninová J. (Ed.): Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Symposium, 5-10.9.2004, Prague, Czech Republic, p. 473-474.
4. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T., Ciencialová A., Klasová L., Straková J.: Analysis of Peptides by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography, in Slaninová J. (Ed.): Biologically Active Peptides, Proceedings of VIII<sup>th</sup> Conference, Prague, 23-25.4.2003, Collection of Symposium Series, Vol. 6, 2003, p.105-108.

#### **c) příspěvky na konferencích**

1. Šolínová V., Barth T., Kašička V., Barthová J., Lepša L.: Synthesis of Peptides Derived from GnRH and Their Analysis and Characterization by Capillary Zone Electrophoresis, 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium, 3-8.9.2006, Gdaňsk, Poland, J. Pept. Sci., suppl. Vol. 12, 2006, P510, p. 232.
2. Šolínová V., Kašička V., Barth T.: Analysis and Investigation of Structure-Mobility Relationships of Gonadotropin-Releasing Hormones by Capillary Zone Electrophoresis in Conventional and Isoelectric Acidic Background Electrolytes, 15<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, 28-31.8.2006, Paris, France, Abstracts Book, P03, p. 39.
3. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T.: Analysis, Separation and Investigation of Structure-Mobility Relationships of Biopeptides by Capillary Zone Electrophoresis, 2<sup>nd</sup> International Student Conference "Modern Analytical Chemistry", Prague, 26-27.9.2005, p. 8.
4. Šolínová V., Koval D., Kašička V., Česnek M., Holý A.: Estimation of Dissociation Constants ( $pK_a$ ) of Amino- and Guanidinopurines and Their Analogues by Capillary Zone Electrophoresis, 4<sup>th</sup> International Symposium on Separations in the

- BioSciences, SBS 2005, 18-21.9.2005, Utrecht, The Netherlands, Abstracts Book, P409, p. 122.
5. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Česnek M., Holý A.: Determination of Acid-Base Dissociation Constants of Guanidinopurine Nucleosides and Their Analogs by Capillary Electrophoresis, 11<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences 2005, 12-14.9.2005, Pardubice, Czech Republic, Book of Abstracts, P17-Tu, p. 229-230.
  6. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T.: Investigation of Structure-Mobility Relationships and Estimation of Secondary Structure of Biopeptides by Capillary Zone Electrophoresis, Czech and Slovak National Conference, Biologically Active Peptides IX, 20-22.4.2005, Prague, Czech Republic, Program & Abstracts, J. Slaninová, M. Collinsová, L. Žáková (Eds.), IOCB AS CR, Prague, p. 40.
  7. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T.: Analysis and Investigation of Structure-Mobility Relationships of Biologically Active Peptides by Capillary Zone Electrophoresis, Pokroky v chromatografii a elektroforéze, Chiranal 2005, 7-10.2.2005, Olomouc, Czech Republic, Abstracts Book, p. 94.
  8. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J.: Separation and Investigation of Structure-Mobility Relationships of Insect Oostatic Peptides by Capillary Zone Electrophoresis, 14<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, 12-15.9.2004, Rome, Italy, Abstracts Book, P 86.
  9. Šolínová V., Kašička V., Hauzerová, L., Barth T.: Analyses of Enkephalin and Dalargin Analogues and Fragments by Capillary Zone Electrophoresis, 3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Symposium, 5-10.9.2004, Prague, Czech Republic, J. Pept. Sci., suppl. Vol. 10, 2004, P210, p. 174.
  10. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T., Ciencialová A., Klasová L., Straková J.: Analysis of Synthetic Peptides by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography, 5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 3-5.9.2003, Siofok, Hungary, Book of Abstracts, P-88.
  11. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Hlaváček J., Barth T., Ciencialová A., Klasová L., Straková J.: Analysis of Peptides by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography, Biologically Active Peptides VIII, 23-25.4.2003, Prague, Czech Republic, Program & Abstracts, p. 46.

## 10 Dodatek - jiné projekty

Souběžně se studiem peptidových hormonů pomocí kapilární zónové elektroforézy byla tato metoda využita rovněž ke stanovení acidobazických disociačních konstant,  $pK_a$ , ionogenních skupin třinácti amino- a guanidinopurinových nukleotidových analogů a jejich příbuzných látek. Tyto nově syntetizované acyklické nukleosidové fosfonáty, acyklické nukleosidové fosfonátové diestery a další analogy představují významnou skupinu látek s cytostatickými a antivirovými účinky. Hodnoty acidobazických disociačních konstant ionogenních skupin, protonované guanidinylové skupiny, kyseliny fosforité disociované do druhého stupně a protonovaného dusíku v pozici (N1) purinové báze, byly stanoveny nelineární regresní analýzou experimentálně změřené pH závislosti jejich efektivních elektroforetických pohyblivostí. Efektivní elektroforetická pohyblivost byla změřena v sérii základních elektrolytů s širokým rozsahem pH (3,50-11,25) za konstantní iontové síly (25 mM) a teploty (25°C). Termodynamické acidobazické disociační konstanty protonované guanidinylové skupiny dosahovaly hodnot v rozmezí 7,75-10,32;  $pK_a$  kyseliny fosforité disociované do druhého stupně byly v rozsahu 6,64-7,46; a  $pK_a$  protonovaného dusíku v pozici (N1) purinové báze byly v rozmezí 4,13-4,89. Detailní informace o výsledcích jsou uvedeny v příložené publikaci V, 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*, 2006, 27, 1006-1019.

Během mého doktorského studia byl sepsán přehledný článek, VI, Šolínová V., Kašička V., Recent Applications of Conductivity Detection in Capillary and Chip Electrophoresis, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 1743-1762, který shrnuje problematiku, kterou se zabývala moje diplomová práce „Využití bezkontaktního vodivostního detektoru v kapilární zónové elektroforéze“. Publikace se zabývá přehledem aktuálních aplikací kontaktní a hlavně bezkontaktní vodivostní detekce ve spojení s kapilární a čipovou elektroforetickou analýzou širokého spektra látek. Též shrnuje poslední vývoj v oblasti konstrukce vodivostních detektorů.