

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

**ANALÝZA, CHARAKTERIZACE A SEPARACE
DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ
METHIONIN-STATINU KAPILÁRNÍMI
ELEKTROMIGRAČNÍMI METODAMI**

Diplomová práce

studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Petra Buriánková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pod vedením externího školitele RNDr. Václava Kašičky, CSc., a školitele Doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne. *30. 4. 2008*.....

.....*Bausch*.....

podpis

Poděkování

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, výzkumným záměrem Z 40550506 Akademie věd České republiky a projektem č. 203/06/1044 Grantové agentury České republiky.

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu laboratoře Elektromigračních metod na ÚOCHB AV ČR, v.v.i. RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., za konzultace, které mi vždy s ochotou poskytoval, a za zájem, se kterým tuto práci vedl. Také bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D., za konzultace a odborné vedení po celou dobu mého studia.

Anotace

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) v kyselých klasických i izoelektrických základních elektrolytech byla využita jako kontrolní analytická metoda ke stanovení stupně čistoty a efektivní elektroforetické pohyblivosti nově syntetizovaných dipeptidových derivátů methionin-statinu, potenciálních inhibitorů methionin-aminopeptidas. Směsi těchto dipeptidů byly separovány metodou CZE a kapilární micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC) v kyselých základních elektrolytech s micelární pseudofází tvořenou dodecylsulfátem sodným.

Předmětová hesla: analytická chemie, separační metody, kapilární elektromigrační metody, peptidy

Klíčová slova: kapilární zónová elektroforéza, kapilární elektrokinetická chromatografie, dipeptidové deriváty methionin-statinu

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	7
SEZNAM TABULEK.....	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
SEZNAM PŘÍLOH.....	13
1 ÚVOD.....	14
2 TEORETICKÝ ÚVOD	16
2.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	16
2.1.1 Migrace iontů v elektrickém poli.....	16
2.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost.....	16
2.1.1.2 Elektroosmotický tok.....	17
2.1.2 Disperzní vlivy.....	18
2.1.3 Separační účinnost a rozlišení.....	21
2.1.4 Módy kapilárních elektromigračních metod.....	22
2.1.4.1 Kapilární zónová elektroforéza.....	23
2.1.4.2 Kapilární elektrokinetická chromatografie	26
2.1.4.3 Ostatní módy kapilárních elektromigračních metod.....	29
2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA PEPTIDŮ.....	30
2.2.1 Elektromigrační vlastnosti peptidů	31
2.2.2 Volba separačních podmínek.....	32
2.2.2.1 Elektrolytový systém	32
2.2.2.2 Instrumentální parametry.....	34
2.2.3 Detekce peptidů	35
2.2.3.1 Základní parametry detektoru.....	35
2.2.3.2 UV-absorpční detekce.....	35
2.2.3.3 Další detekční techniky.....	36
2.2.4 Kvalitativní a kvantitativní analýza	37
2.2.4.1 Stanovení stupně čistoty peptidů	38
2.2.5 Fyzikálně-chemická charakterizace	39
2.2.5.1 Efektivní a specifický náboj, izoelektrický bod.....	39
2.2.5.2 Efektivní elektroforetická pohyblivost	40
2.2.5.3 Další fyzikálně-chemické parametry	40
2.3 DIPEPTIDOVÉ DERIVÁTY METHIONIN-STATINU	41
3 VÝZKUMNÉ CÍLE.....	43
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
4.1 CHEMIKÁLIE.....	44
4.2 ÚPRAVA VZORKU	44
4.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	44
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	46
5.1 ANALÝZA DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ METHIONIN-STATINU	46
5.1.1 Strategie volby experimentálních podmínek	46
5.1.1.1 Složení základních elektrolytů.....	46
5.1.1.2 Volba kapiláry.....	47

5.1.2	Stanovení stupně čistoty	47
5.1.3	Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti	51
5.2	CHARAKTERIZACE DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ METHIONIN-STATINU	54
5.2.1	Výpočet efektivních a specifických nábojů	54
5.2.2	Stanovení efektivních pohyblivostí	55
5.2.2.1	Korekce na standardní teplotu	55
5.2.2.2	Efektivní pohyblivosti v různých základních elektrolytech	56
5.3	SEPARACE STRUKTURNĚ PODOBNÝCH DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ METHIONIN-STATINU.....	58
5.3.1	Separace v módu CZE	58
5.3.2	Separace v módu CMEKC.....	61
6	ZÁVĚR	75
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1** Příklad elektroferogramu separace kladně nabitě látky, záporně nabitě látky a elektroneutrální látky (značkovače elektroosmotického toku).
- Obrázek 2** Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody.
- Obrázek 3** Schéma vzniku relativního pohybu vodné a micelární fáze v elektrokinetické chromatografii.
- Obrázek 4** Separační princip elektrokinetické chromatografie.
- Obrázek 5** CZE analýzy dipeptidových derivátů methionin-statinu.
- Obrázek 6** Kalibrační graf závislosti nárůstu teploty roztoku uvnitř kapiláry oproti okolí $\Delta T (T_i - T_0)$ na elektrickém příkonu, P , vztaženém na jednotku délky kapiláry.
- Obrázek 7** CZE separace směsí I a III.
- Obrázek 8** MEKC separace směsí II a III, A, B.

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1** Základní módy kapilárních elektromigračních metod.
- Tabulka 2** Kritické micelární koncentrace (CMC) a agregační čísla (n) některých tenzidů.
- Tabulka 3** Strukturní vzorce a M_r dipeptidových derivátů methionin-statinu.
- Tabulka 4** Složení, pH a elektroosmotická pohyblivost, m_{eo} , základních elektrolytů, vložené napětí, U , a elektrický proud, I .
- Tabulka 5** Stupeň čistoty P_{CA} jednotlivých analytů vyjádřený relativní korigovanou plochou píku stanovený metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI.
- Tabulka 6** Stupeň čistoty P_A jednotlivých analytů vyjádřený relativní plochou píku stanovený metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI.
- Tabulka 7** Stupeň čistoty P_h jednotlivých analytů vyjádřený relativní výškou píku stanovený metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI.
- Tabulky 8 - 10** Charakteristiky detektoru stanovené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE I, III a V.
- Tabulka 11** Hodnoty meze detekce, LOD , stanovené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE I - VI.
- Tabulka 12** Hodnoty meze stanovitelnosti, LOQ , určené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE I - VI.
- Tabulka 13** Efektivní náboj, q_{eff} , a specifický náboj, q_{sp} , dipeptidových derivátů methionin-statinu pro BGE I a BGE VI.
- Tabulka 14** Efektivní pohyblivosti analytů v BGE I – VI při standardní teplotě 25 °C.
- Tabulka 15** Rozdělení dipeptidových derivátů methionin-statinu do směsí I - III.
- Tabulka 16** Rozdělení dipeptidových derivátů methionin-statinu do směsí A a B.
- Tabulky 17 - 22** CZE separace směsí I-III v BGE I, III – VI , efektivní elektroforetická pohyblivost, elektroosmotická pohyblivost, rozlišení a účinnost separace.
- Tabulky 23 - 28** MEKC separace směsí I-III, směsí A a B v BGE I, III – VI , efektivní elektroforetická pohyblivost, elektroosmotická pohyblivost, rozlišení a účinnost separace.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetát
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
ACN	acetonitril
BGE	základní (nosný) elektrolyt
CBQCA	(4-karboxybenzoyl)chinolin-2-karboxyaldehyd
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CEKC	kapilární elektrokinetická chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CMEKC	kapilární micelární elektrokinetická chromatografie
CNGSE	kapilární elektroforéza ve fyzikálních gelech
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DMSO	dimethylsulfoxid
DTAB	dodecyltrimethylamoniumbromid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EKC	elektrokinetická chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FITC	fluorescein izothiokyanát
FQ	furoylchinolin-3-karboxyaldehyd
HEC	hydroxyethyl celulosa
HEPES	kyselina <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazin-2'-(2-ethansulfonová)
HPCE	vysokoučinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CHES	kyselina 2-(<i>N</i> -cyclohexylamino)ethansulfonová
ID	vnitřní průměr
IDAA	kyselina iminodioctová
IEF	izoelektrická fokusace
IT	iontová past
ITP	izotachoforéza
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MES	kyselina morfolinethansulfonová
MHEC	methylhydroxyethyl celulosa
MHPC	methylhydroxypropyl celulosa
MS	hmotnostní spektrometrie
NDA	naftalen-2,3-dikarboxyaldehyd

Nd: YAG	neodymem dopovaný granátový laser
PAG	polyakrylamidový gel
PVA	polyvinylalkohol
SDS	dodecylsulfát sodný
TAPS	kyselina <i>N</i>-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonová
TFA	kyselina trifluoroctová
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTAB	tetradecyltrimethylamoniumbromid
UV	ultra-fialový
UV-VIS	ultrafialový-viditelný

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

α	stupeň disociace
ε	permitivita prostředí [F.m ⁻¹]
v	rychlost pohybu [m.s ⁻¹]
v_{eo}	rychlost elektroosmotického toku [m.s ⁻¹]
v_{ep}	elektroforetická rychlost [m.s ⁻¹]
η	viskozita prostředí [N.m ⁻² .s]
κ	měrná vodivost [S.m ⁻¹]
λ_{emise}	emisní vlnová délka [nm]
λ_{ext}	excitační vlnová délka [nm]
σ	standardní odchylka
σ^2	rozptyl
ζ	elektrokinetický (zeta) potenciál [V]
A	plocha píku
A_c	korigovaná plocha píku
A_s	faktor symetrie píku
A_{206}	absorbance při 206 nm [a.u.]
c	koncentrace [mol.L ⁻¹]
D	difúzní koeficient [m ² .s ⁻¹]
E	intenzita elektrického pole [V.m ⁻¹]
F_e	síla elektrického pole [N]
F_f	frikční síla [N]
h	výška píku
H	výška teoretického patra [m]
I	elektrický proud [A]
K_a	acidobazická disociační konstanta
L	délka kapiláry [m]
L_{ef}	efektivní délka kapiláry [m]
L_t	celková délka kapiláry [m]
m	elektroforetická pohyblivost [m ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]
m_{eff}	efektivní elektroforetická pohyblivost [m ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]
m_{eo}	elektroosmotická pohyblivost [m ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	šum [V]
N	počet teoretických pater
N_{av}	průměrný počet teoretických pater
P	elektrický příkon [W.m ⁻¹]
P_{CA}	stupeň čistoty vyhodnocený podle relativní korigované plochy píku [%]
P_A	stupeň čistoty vyhodnocený podle relativní plochy píku [%]
P_h	stupeň čistoty vyhodnocený podle relativní výšky píku [%]
q	náboj [e]
r	poloměr iontu [nm]
R	rozlišení
R_{av}	průměrné rozlišení
R_D	odezva detektoru [V]
R_i	vnitřní poloměr kapiláry [m]

S	průřez kapiláry [m^2]
S_D	citlivost detektoru [$\text{V} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]
t	čas [s]
t_m	migrační čas [s]
T	teplota [$^{\circ}\text{C}$]
U	separační napětí [V]
w	šířka píku
W	disipovaný elektrický výkon na jednotku objemu [$\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$]

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A Příklady analýz peptidů metodou CZE.

Příloha B Příklady analýz peptidů metodou MEKC.

1 ÚVOD

Kapilární elektromigrační metody jsou moderní separační techniky založené na migraci iontů v kapalném prostředí působením elektrického pole. Vlastní separace se provádí v kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů, zhotovených zpravidla z taveného křemene, méně často z jiného materiálu. Kapilární elektromigrační metody vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, vysokou účinností separace a velkou rychlostí analýzy.

Z historie elektromigračních metod jsou známy první experimenty již na počátku 19. století spojené s migrací iontů v trubicích ve tvaru U [1]. V roce 1897 odvodil německý chemik F. Kohlrausch regulační funkci, která kvantitativně popisuje vztah mezi koncentrací iontů pohybujících se v elektrickém poli [2]. K vývoji elektroforetických technik v kapilárním měřítku docházelo v druhé polovině 20. století prostřednictvím prací Hjerténa [3], Everaertse [4], Virtanena [5], Mikkerse [6] a dalších. Američtí badatelé J. Jorgenson a K. Lukacsová poprvé použili v roce 1981 křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 μm jako separační kolony v kapilární zónové elektroforéze [7]. S. Terabe v roce 1984 poprvé využil tenzid, dodecylsulfát sodný (SDS) pro separaci neutrálních látek, a tím položil základy pro micelární elektrokinetickou chromatografii [8]. První komerční přístroj pro kapilární elektromigrační metody se objevil na trhu v roce 1988 [9].

Kapilární elektromigrační metody jsou pro svou účinnost dosahující stovek tisíc až miliónů teoretických pater a citlivost na úrovni femtomol-zeptomol (10^{-15} – 10^{-21} mol) analytu v nano- až pikolitrových objemech analyzovaných vzorků považovány za jedny z nejúčinnějších a nejcitlivějších analytických separačních metod. Kapilární elektromigrační metody se souhrnně označují jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (high-performance capillary electrophoresis, HPCE), jakožto protějšek resp. doplněk dosud nejrozšířenějších separačních metod - různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [10].

Do kapilárních elektromigračních separačních metod se řadí celkem šest základních technik, které se liší především médiem přítomným v separační kapiláře během separace a vlastním mechanismem separace. Jsou to metody elektroforetické:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE, Capillary Zone Electrophoresis)

1a. Kapilární gelová elektroforéza (CGE, Capillary Gel Electrophoresis)

2. Kapilární izotachoforéza (CITP, Capillary Isotachopheresis)
3. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF, Capillary Isoelectric Focusing)
4. Kapilární afinitní elektroforéza (CAE, Capillary Affinity Electrophoresis)

Dále jsou to metody elektrochromatografické:

5. Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC, Capillary Electrokinetic Chromatography)
6. Kapilární elektrochromatografie (CEC, Capillary Electrochromatography).

Elektroforetické metody lze použít pouze pro separace elektricky nabitých částic, elektrochromatografické metody jsou vhodné pro elektroneutrální molekuly i ionty [9]. Využití CE je velmi rozsáhlé, dosud byla popsána separace různých vzorků zahrnujících aminokyseliny [11], peptidy [12], nukleotidy [13], organické kyseliny [14], organické aminy [7], anorganické ionty [15], bílkoviny [16], nukleové kyseliny a jejich fragmenty [17].

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

2.1.1 Migrace iontů v elektrickém poli

2.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita), m , definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$m = \frac{v}{E} \left[m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1} \right] \quad (1)$$

kde v je rychlost pohybu iontu (nabitá částice) v elektrickém poli o intenzitě E . Intenzita pole v kapiláře je dána podílem napětí U připojeného ke koncům kapiláry a délky kapiláry L :

$$E = \frac{U}{L} \quad (2)$$

Výsledný rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou sil. Iont s nábojem q je uváděn do pohybu silou elektrického pole F_e :

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

Iont o poloměru r je brzděn frikční silou prostředí, F_f , danou Stokesovým zákonem:

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

kde v je rychlost pohybu iontu a η je viskozita prostředí.

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil v ustáleném stavu lze pro elektroforetickou pohyblivost m odvodit:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Z rovnice (5) vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru (velikosti, relativní molekulové hmotnosti) a viskozitě roztoku.

Elektroforetické pohyblivosti jsou kvalitativními charakteristikami ionogenních látek pro dané prostředí a teplotu. Elektroforetická pohyblivost iontů silných elektrolytů

při dané iontové síle a teplotě se nazývá aktuální pohyblivost, elektroforetická pohyblivost iontů v nekonečném zředění se nazývá limitní pohyblivost.

V případě slabých elektrolytů je pohyblivost závislá na stupni jejich disociace, a tudíž na pH prostředí. Pohyblivost slabých elektrolytů při daném pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí se nazývá efektivní pohyblivost. Závislosti efektivní pohyblivosti na pH se v praxi často využívá. Elektromigrační separace slabých elektrolytů a amfolytů (peptidů, bílkovin) se provádí při takovém pH, při kterém jsou rozdíly v efektivních pohyblivostech separovaných látek maximální [10].

2.1.1.2 Elektroosmotický tok

Kromě elektroforetického pohybu je častým transportním jevem v kapilárních elektromigračních metodách elektroosmotický tok (EOF). Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry. EOF unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy.

Pro rychlost EOF, v_{eo} , a pro její velikost vztaženou na jednotkovou intenzitu elektrického pole, tzv. elektroosmotickou pohyblivost, m_{eo} , platí následující vztahy:

$$v_{eo} = m_{eo} E \quad (6)$$

$$m_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}, \quad (7)$$

kde ζ je elektrokinetický (zeta) potenciál, η je viskozita roztoku a ϵ je permitivita prostředí.

Elektrokinetický potenciál je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilár je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je EOF při elektromigračních separacích v křemenných kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu. Mezi pH 3 - 8 EOF několikanásobně (4 - 5 krát) stoupá a elektroosmotická pohyblivost v alkalických základních elektrolytech převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů, např. chloridů.

Elektrokinetický potenciál, a tudíž i EOF lze regulovat změnou složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla), úpravou vnitřního povrchu kapiláry nebo též vnějším příčným elektrickým polem [18].

Význačnou předností EOF ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku, takže jeho příspěvek k celkové disperzi zón analytů při jejich elektromigrační separaci je téměř zanedbatelný [19]. Toho se využívá zejména v kombinovaných technikách elektrokinetické chromatografie a elektrochromatografie, kde EOF slouží jako hybná síla mobilní fáze [10].

2.1.2 Disperzní vlivy

Difúze

Vzorek k elektroforetické analýze, tak jak je nadávkován do separační kapiláry, reprezentuje zónu analyzovaných látek, na jejímž rozhraní je velmi ostrý skok koncentrací těchto látek. S postupem času se ostrý skok koncentrací (pokud nepůsobí jiná síla proti tomuto jevu) plynule rozmývá difúzí. Za zjednodušeného předpokladu, že dávkovaný vzorek tvoří v čase $t = 0$ pravoúhlý tenký obdélníkový schod koncentrací analyzovaných látek, pak po určitém čase t jsou výsledkem difúze koncentrační profily „gaussovského“ tvaru. Lze je charakterizovat rozptylem σ^2 či standardní odchylkou σ danou vztahem

$$\sigma = \sqrt{2Dt} \quad (8)$$

kde t je čas a D je difúzní koeficient [20].

Adsorpce

Interagují-li ionty analyzovaných látek se stěnou separační kapiláry, dochází ke změnám migračního chování jejich zón. Vzhledem k tomu, že na stěnách křemenných kapilár jsou po naplnění elektrolytem přítomny ionizované skupiny, dochází k hromadění separovaných látek opačného náboje v blízkosti stěn separační kapiláry. Stěny se pak vůči separovaným iontům chovají jako iontoměnič, což vede ke

zvýšené sorpci [21]. Tato sorpce vede k rozmývání zón, to se obvykle projeví silným chvostováním zadního rozhraní. Někdy je fixace látky na stěnu tak silná, že sorbovanou látku již nelze z kapiláry základním elektrolytem vymýt. Sorbované látky mohou zároveň změnit rozložení náboje podél stěn separační kapiláry, a tím i lokálně ovlivnit EOF. Tyto jevy vedou k rozmývání zón analyzovaných látek a někdy mohou i zcela znemožnit analýzu. Proto bylo navrženo několik způsobů, jak tyto jevy potlačit.

Jednou z možností je použití BGE o takovém pH, že stěny kapiláry i separované ionty nesou náboj stejného znaménka a navzájem se odpuzují. Tímto způsobem byly separovány některé bílkoviny jako anionty v BGE o pH větším než 8, tj. při pH nad jejich izoelektrickým bodem [16]. Analogicky lze očekávat, že ve vhodném elektrolytu a při kladně nabitým vnitřním povrchu kapiláry bude možno separovat bazické látky jako kationty.

V současnosti je nejčastějším způsobem omezení sorpce deaktivace stěn kapiláry. K tomu jsou využívány různé postupy vyvinuté původně pro kapilární chromatografii. Lze zmínit pokrývání stěn separační kapiláry různými hydrofilními polymery typu alkylcelulos, případně polyakrylamidu. Tímto způsobem bývá zároveň podstatně snížen i EOF během separace [22].

Jouleovo teplo

Při průchodu elektrického proudu sloupcem elektrolytu o průřezu S (m^2), délce l (m) a měrné vodivosti κ ($\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$) je produkováno Jouleovo teplo

$$W = \frac{EI}{S} = \frac{I^2}{\kappa S^2} \quad (9)$$

kde W značí disipovaný elektrický výkon v jednotce objemu ($\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$), I je elektrický proud (A) a E je intenzita elektrického pole ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$).

Elektrický ohřev je hlavním limitujícím faktorem pro používání vysokých intenzit elektrického pole, a tím i proudů a elektrických výkonů, při snaze o zrychlení analýzy. Je zřejmé, že dvojnásobné zrychlení analýzy vyžaduje dvojnásobné napětí, avšak tepelný výkon tím stoupne čtyřikrát.

Nadbytečný ohřev je příčinou nežádoucích efektů v elektroforetickém systému. Může dojít k poškození termolabilních separovaných látek, např. k denaturaci bílkovin. Další problémy plynou z toho, že teplo vzniká v celém objemu sloupce elektrolytu,

avšak je odváděno jen na okrajích, kde se elektrolyt stýká se stěnami separační kolony. Tím je dáno, že vnitřní část sloupce je teplejší než okrajové části. Rozdíl může být větší než 10 K [23]. Přítomnost teplotních gradientů má za následek nehomogenitu dalších fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou mobility, pH, hustota, atd.

Teplotní efekty mohou být minimalizovány optimalizací elektrolytových systémů či konstrukcí aparatury. Ze vzorce (9) je patrné, že poměr intenzity elektrického pole (ovlivňující rychlost analýzy - pozitivní jev) k Jouleovu ohřevu (rušivé jevy) je při daném průřezu kolony S tím větší, čím menší je proud I . V praxi to znamená, že je výhodné použít pufry s nízkou elektrickou vodivostí, např. tzv. izoelektrické pufry [20].

Elektromigrační disperze

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. Pro silné elektrolyty platí, že pokud iont analytu má vyšší pohyblivost než koiont základního elektrolytu, tak jeho pík bude rozmytý v přední části. Když bude pohyblivost iontu analytu nižší než pohyblivost koiontu základního elektrolytu, bude pík „chvostovat“, tedy bude rozmytý v zadní části [24]. V případě, že pohyblivosti iontu analytu i koiontu základního elektrolytu budou stejné, nebude docházet k deformaci zóny [25]. Pro slabé elektrolyty je situace složitější, protože jejich efektivní elektroforetická pohyblivost je ovlivněna také pH [26].

K celkové disperzi zón v CE dále přispívají hustotní rozdíly BGE a vzorku, zakřivení kapiláry, šířka zóny vzorku a šířka detekčního okénka.

2.1.3 Separační účinnost a rozlišení

Separační účinnost

Separační účinnost volné zónové elektroforézy lze vyjádřit pomocí počtu teoretických pater, N :

$$N = \frac{L}{H} \quad (10)$$

kde L je délka kolony a H je výška teoretického patra daná vztahem:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (11)$$

Zde je rozptyl (variance), σ^2 , detekované zóny dán součtem všech disperzních vlivů, které na migrující zónu působí. V ideálním případě, kdy jediným zdrojem rozmytí je difúze, lze psát

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (12)$$

kde D je difúzní koeficient separovaného iontu a t je čas analýzy. Vzhledem k tomu, že čas analýzy lze vyjádřit vztahem

$$t = \frac{L}{v} \quad (13)$$

a rychlost migrace vztahem

$$v = mE \quad (14)$$

lze odvodit vztah pro účinnost separace ve tvaru

$$N = \frac{mU}{2D} \quad (15)$$

kde U je elektrické napětí mezi konci separační kapiláry. Rovnice (15) je významná pro praktické provádění CZE, neboť udává, že počet teoretických pater je přímo úměrný použitému napětí v kapiláře, a to bez ohledu na její délku [7]. Tato lineární závislost účinnosti na vloženém napětí byla experimentálně ověřena. Při vyšších hodnotách napětí však závislost přestává být monotónní, objevuje se maximum a následuje snižování účinnosti způsobené nadměrným Jouleovým ohřevem.

Počet teoretických pater může být stanoven přímo z elektroferogramu užitím

$$\text{vztahu } N = 5,54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (16)$$

kde t je migrační čas a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky. Tato rovnice by měla být použita pouze pro symetrické (Gaussovské) píky.

Rozlišení

Pro kvantitativní popis vzájemné separace dvou látek se užívá parametr rozlišení, R , definované vztahem

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (17)$$

kde t je migrační čas, w je šířka píku v základně a σ je standardní odchylka koncentrační distribuce [27]. Dvě zóny pokládáme za plně separované, je-li jejich rozlišení rovno nebo větší než 1,5. Na základě výše zmíněných vztahů lze odvodit relace mezi rozlišením a počtem teoretických pater ve tvaru

$$R = \frac{1}{4} \frac{\Delta m}{m_{av}} \sqrt{N_{av}} \quad (18)$$

kde Δm je rozdíl mobility sledovaných analytů, m_{av} je jejich průměrná pohyblivost a N_{av} je průměrný počet teoretických pater.

2.1.4 Módy kapilárních elektromigračních metod

Základní módy kapilárních elektromigračních metod jsou stručně shrnuty v **Tabulce 1** (viz str. 23). Různé separační mechanismy umožňují užívat CE techniky pro širokou škálu látek bez ohledu na jejich relativní molekulovou hmotnost, náboj, chemické vlastnosti, atd. Totéž zařízení nebo jen s nepatrnou úpravou může být užíváno pro všechny módy CE. Někdy jen výměna pufru, která je jednoduchá a vyžaduje pár minut, je dostačující pro změnu jednoho separačního módu na jiný. To dělá z CE metod velmi přizpůsobivé a cenově dostupné techniky. Separační principy jednotlivých módů CE jsou podrobněji popsány na další straně.

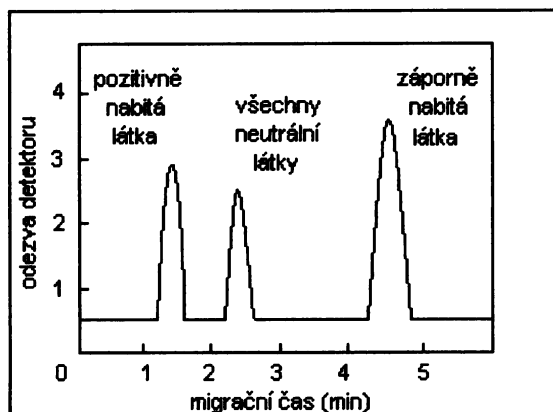
Tabulka 1 Základní módy kapilárních elektromigračních metod [1].

Mód	Separační princip	Analyt
Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	Separace nabitých analytů podle jejich pohyblivosti.	Nabitě malé i velké analyty
Kapilární gelová elektroforéza (CGE)	Separace analytů podle jejich velikosti v nosném elektrolytu v gelovém prostředí vykazujícím síťový efekt.	Nabitě analyty střední a větší velikosti
Kapilární izotachoforéza (CITP)	Separace nabitých analytů v diskontinuálním elektrolytovém systému podle jejich pohyblivosti.	Nabitě malé i velké analyty
Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)	Separace nabitých analytů podle jejich izoelektrického bodu v BGE s gradientem pH.	Amfoterní látky
Kapilární afinitní elektroforéza (CAE)	Selektivní zpomalení analytů pomocí ligandů, ke kterým vykazují afinitu.	Biomolekuly vykazující vazebnou aktivitu ke složce BGE
Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC)	Distribuce nabitých a neutrálních analytů mezi dvě pseudofáze pohybující se různou rychlostí.	Neutrální a nabitě analyty
Kapilární elektrochromatografie (CEC)	Rozdělení analytů mezi stacionární a mobilní fázi, jejíž hnací silou je EOF.	Neutrální a nabitě analyty

2.1.4.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejrozšířenějším módem kapilárních elektromigračních metod. Pohyb nabitých částic je způsoben působením elektrického pole, přičemž ionty migrují ve směru a v pořadí určeném jejich nábojem a pohyblivostí a při migraci kapilárou vytváří v základním elektrolytu samostatné zóny, jejichž hranice jsou neostré. V hydrodynamicky otevřeném systému v křemenné kapiláře s neupravovaným vnitřním povrchem kationty migrují jako první v pořadí, neboť směr jejich migrace je stejný jako směr EOF. Neutrální látky v systému migrují, ale nejsou separovány, protože jejich mobilita je nulová a jsou unášeny pouze EOF. Anionty migrují jako poslední, neboť směr jejich migrace je opačný než EOF (viz **Obrázek 1**). CZE separace probíhá v kapiláře naplněné základním elektrolytem (BGE). BGE použitý pro separaci by měl mít dostatečnou pufrací kapacitu, nízkou absorpci

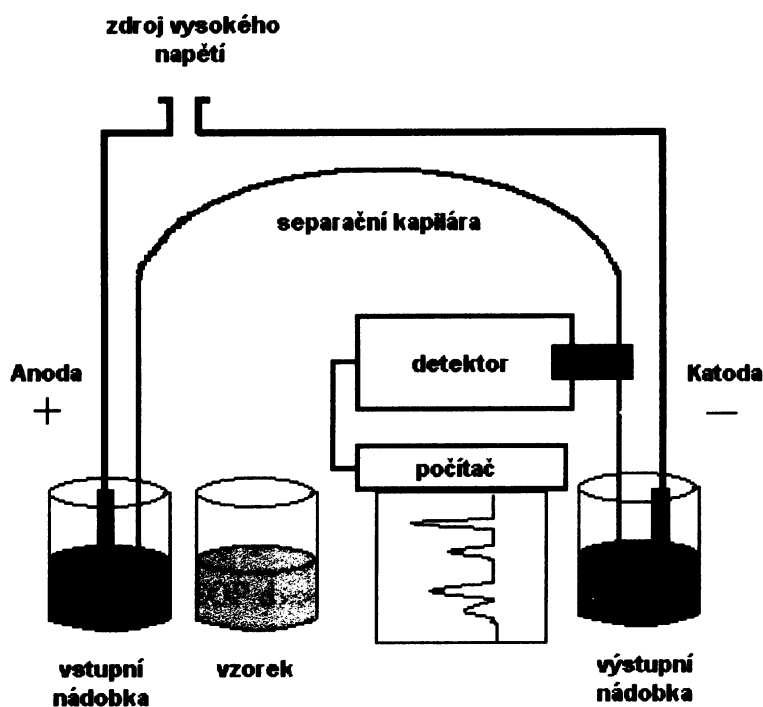
viditelného a UV záření (při použití přímé UV-VIS-absorpční detekce) a nízkou elektrickou vodivost s ohledem na tvorbu Jouleova tepla.



Obrázek 1 Příklad elektroferogramu separace kladně nabitě látky, záporně nabitě látky a elektroneutrální látky (značkovače elektroosmotického toku).

Základní experimentální sestava pro CZE i ostatní CE metody je schématicky znázorněna na **Obrázku 2** (viz str. 25). Oba konce tenké křemenné kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných základním elektrolytem, kterým je naplněna též kapilára. Vnitřní průměr křemenné kapiláry je obvykle menší než 100 μm (typicky 50 resp. 75 μm) a její délka je většinou v rozsahu 30 až 80 cm. Kapilární formát separačního prostoru dovoluje relativně účinný odvod Jouleova tepla, což umožňuje použití vysokých intenzit elektrického pole (desítky kV/m), a tím i dosažení vysokých účinností a rychlostí separace.

Na počátku experimentu je velmi krátký úsek kapiláry (cca jednotky mm) naplněn roztokem vzorku. Dávkování vzorku se provádí hydrodynamicky nebo elektrokineticky. Hydrodynamické dávkování se provádí pomocí přetlaku na vstupu či podtlaku na výstupu separační kapiláry. Změnu tlaku lze uskutečnit pomocí stlačeného plynu, vývěvy nebo prostým zvýšením polohy nádoby se vzorkem oproti nádobce s BGE na výstupu kapiláry. Elektrokinetické dávkování vzorku spočívá v aplikaci dávkovacího napětí po stanovenou dobu. Při elektrokinetickém dávkování závisí množství nadávkovaných látek na jejich elektroforetických pohyblivostech a na EOF. Jakmile je zóna vzorku zavedena do kapiláry, je konec kapiláry obsahující vzorek ponořen zpět do elektrodové nádoby a k systému je připojeno stejnosměrné elektrické pole ze zdroje vysokého napětí schopného poskytovat konstantní napětí (až 30 kV), nebo konstantní proud (pracovní hodnoty v HPCE obvykle v řádu desítek μA).



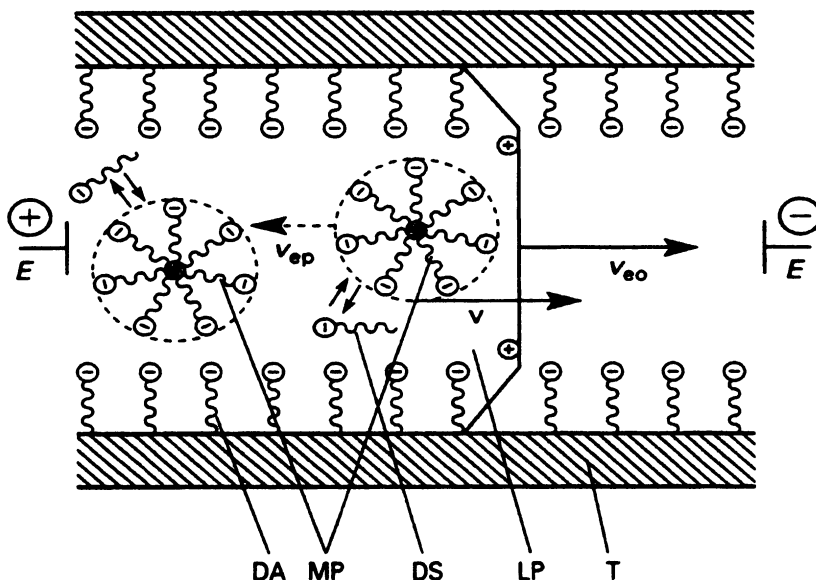
Obrázek 2 Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody

CZE je vhodná pro separaci a stanovení iontů lišících se svým nábojem, molekulovou hmotností a tvarem. Složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a na tomto principu se od sebe oddělují. Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem. V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě a jeho rychlost je relativně vysoká (většinou vyšší než rychlost elektroforetická), takže výsledná rychlost pohybu kationtů a aniontů má stejný směr (katodický) a anionty i kationty mohou být analyzovány současně v průběhu jednoho experimentu.

Pohyb zón vzorku v kapiláře je nejčastěji sledován pomocí „on-column“ UV-VIS-absorpčního detektoru, tj. v určitém místě kapiláry je při zvolené vlnové délce měřena absorpce záření pohybujícího se nosného elektrolytu a zón analytů. Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce může být získána kvalitativní i kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku. Kvalita daného analytu je dána migračním časem jeho píku a kvantita tohoto analytu je přímo úměrná výšce resp. ploše jeho píku [10].

2.1.4.2 Kapilární elektrokinetická chromatografie

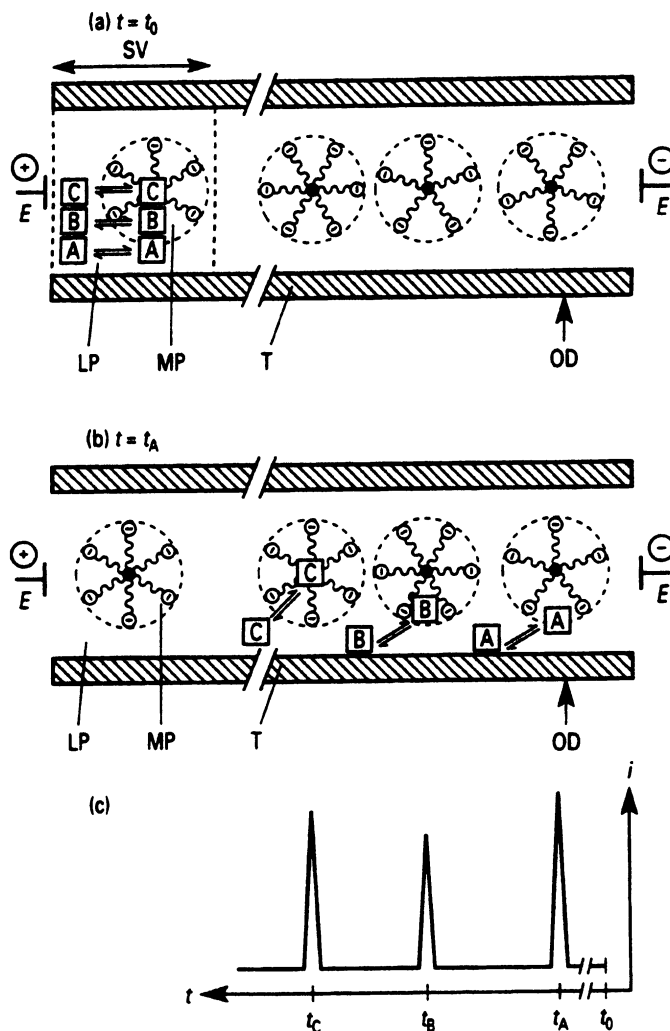
Elektrokinetická chromatografie (EKC) je z kapilárních elektromigračních technik nejmladší. Byla vynalezena Terabem a spol. v roce 1984 [8]. Jde o kombinovanou separační techniku, která využívá jevy elektrokinetické (elektroforézu a elektroosmózu) i princip chromatografický, tj. distribuci analyzovaných látek mezi dvě fáze a relativní pohyb těchto fází vůči sobě. V EKC je separace založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi pseudofází tvořenou např. micelami ionogenního detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS) a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu, ve které je pseudofáze homogenně rozptýlena. Relativní pohyb těchto (pseudo)fází vůči sobě, což je nezbytná podmínka pro převedení jednorázové distribuce na kontinuální separační proces, je vyvolán EOF dvoufázového systému jako celku. Celý dvoufázový systém se pohybuje v kapiláře rychlostí v_{eo} a nabitá micelární pseudofáze se pohybuje elektroforetickým pohybem o velikosti v_{ep} ve směru opačném. Jelikož absolutní hodnota rychlosti v_{eo} je vyšší než elektroforetická rychlost v_{ep} , výsledný směr pohybu obou fází je stejný, ale jejich rychlosti jsou různé. Vodnou fází nosného elektrolytu je tedy možno považovat za fázi mobilní a micelární fázi za fázi pseudostacionární (viz **Obrázek 3**).



Obrázek 3 Schéma vzniku relativního pohybu vodné a micelární fáze v elektrokinetické chromatografii; T – kapilára, E – elektrody, LP – vodná fáze, MP – micelární pseudofáze iontového detergentu, DS – monomer detergentu ve vodné fázi, DA – detergent absorbovaný na vnitřní stěnu kapiláry, v_{ep} - elektroforetická rychlost micelární fáze, v_{eo} - rychlost elektroosmotického toku roztoku v kapiláře, v - výsledná rychlost micelární fáze.

(Převzato z [10]).

V důsledku různých afinit složek vzorku k micelární pseudofázi jsou tyto složky rozdílně zpomalovány zpětným pohybem micel, což vede k jejich rozdílné migrační rychlosti, a tudíž i k jejich separaci v pořadí zvyšující se afinity k micelární fázi (viz Obrázek 4).



Obrázek 4 Separáční princip elektrokinetické chromatografie; a – počáteční stav v čase t_0 : do kapiláry (T) naplněné roztokem skládajícím se z vodné fáze (LP) a micelární fáze (MP) je zavedena zóna vzorku (SV) obsahující složky A, B, C se vzrůstající afinitou k micelární fázi; E – elektrody, b – stav separace v čase t_A : složka A s nejnižší afinitou k micelární fázi prochází jako první detektorem (OD), c – schematický chromatogram: i – signál detektoru, t_A , t_B , t_C – migrační časy složek A, B, C. (Převzato z [10]).

Kromě micel jsou v EKC využívány i jiné typy pseudofází, např. ionogenní polymery, olejové mikroemulze a cyklodextriny. Téměř pravouhlý (pístový) profil EOF, na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku, a rychlé ustavování rovnováh v makroskopicky homogenním systému dvou fází v beznosičovém prostředí

přispívá k vyšší separační účinnosti této metody ve srovnání s klasickou chromatografií. EKC podstatně zvyšuje aplikační potenciál HPCE metod, neboť umožňuje i separaci látek neionogenních (elektroneutrálních). Ionogenní látky se v režimu EKC separují na kombinovaném principu rozdílných interakcí s pseudofází a rozdílných elektroforetických pohyblivostí ve vodné fázi [10].

Při rozpouštění tenzidu v základním elektrolytu nedochází hned od počátečních malých koncentrací k tvorbě micel – molekuly tenzidu existují v roztoku zpočátku osamocené a neuspořádané. Až po překročení kritické micelární koncentrace (CMC), která je specifickou charakteristikou každého detergentu (tenzidu), dochází k organizování molekul tenzidu do micel. Počet molekul detergentu podílejících se na tvorbě jedné micely se označuje jako agregační číslo, n , jež je opět specifickou charakteristikou každého tenzidu. Kromě SDS se v MEKC používají i jiné tenzidy, jejichž přehled včetně CMC a n je uveden v **Tabulce 2**. Aniontové detergenty vytvářejí v základním elektrolytu záporně nabitě micely, které elektroforeticky migrují k anodě, tedy proti EOF. Naopak kationtové tenzidy se organizují do micel s kladným nábojem na svém povrchu, a proto migrují ke katodě. Po přidání kationtového tenzidu do základního elektrolytu dochází k obrácení směru EOF k anodě, neboť kationtový detergent změnil náboj na vnitřní stěně kapiláry. Je tedy zřejmé, že i pseudostacionární fáze tvořené micelami kationtového tenzidu migrují proti EOF základního elektrolytu. Neiontové detergenty vytvářejí elektroforeticky nepohyblivé micely, a proto je nelze samostatně použít v MEKC k separacím neutrálních analytů. Jsou však vhodné k modifikacím hydrofobních vlastností micel iontových detergentů [9].

Tabulka 2 Kritické micelární koncentrace (CMC) a agregační čísla (n) některých tenzidů [9].

	Tenzid	CMC [mmol.L ⁻¹]	n
aniontový	dodecylsulfát sodný (SDS)	8,3	62
	dodecylsulfonan sodný	9,8	54
	kyselina cholová	14,0	3
	kyselina deoxycholová	5,0	4
kationtový	dodecyltrimethylamoniumbromid (DTAB)	14,6	61
	tetradecyltrimethylamoniumbromid (TTAB)	4,4	64
	cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB)	0,9	78
neiontový	polyoxyethylen-23-laurylether (Brij 35)	0,1	40

2.1.4.3 Ostatní módy kapilárních elektromigračních metod

Elektroforéza v síťovacích prostředích

Kapilární elektroforéza se nejčastěji provádí ve volném roztoku. Mají-li však být děleny látky s rozdílnou velikostí molekul a velmi blízkým či identickým specifickým nábojem, tj. nábojem vztaženým na jednotku relativní molekulové hmotnosti, např. komplexy bílkovin s ionogenním detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS), polynukleotidy a nukleové kyseliny, je nezbytné, aby elektromigrační separace těchto látek probíhaly v prostředích vykazujících síťový efekt. Tento efekt způsobuje zpomalení rychlosti migrujících částic, jež je přímo úměrné velikosti těchto částic, tj. výsledná elektroforetická pohyblivost těchto částic je nepřímo úměrná jejich velikosti a tyto látky jsou oddělovány v pořadí podle vzrůstajících relativních molekulových hmotností.

Izotachoforéza

Izotachoforéza (ITP) je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů [28]. Vzorek, obsahující směs iontů jednoho typu náboje (anionty, nebo kationty), jež mají být odděleny, a téměř libovolné protiionty, je vložen mezi tzv. vedoucí a koncový elektrolyt, přičemž pohyblivosti dělených iontů vzorku musí být intermediární vzhledem k pohyblivosti vedoucího iontu vedoucího elektrolytu a koncového iontu koncového elektrolytu. Protiiont vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrací kapacitu při daném pH separace, protiiont koncového elektrolytu je do značné míry libovolný. Pokud k takto definovanému systému připojíme stejnosměrné elektrické pole, dojde po určitém čase k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedících zónách s velmi ostrými rozhraními, jejichž ostrost se díky samozaostřujícímu efektu s časem nemění. V důsledku koncentračního efektu diskontinuálního elektrolytového systému je koncentrace separované látky v ITP zóně nezávislá na původní koncentraci ve vzorku. Ustavuje se podle Kohlrauschovy regulační funkce a je konstantní v celém objemu zóny. Záznam ITP separace (izotachofogram) získaný nejčastěji univerzálním vodivostním detektorem má charakteristický stupňovitý průběh, ve kterém výška stupně odpovídá kvalitě separované látky a délka stupně je přímo úměrná její kvantitě.

Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) umožňuje dělení amfoterních látek (bílkovin a peptidů) podle jejich izoelektrických bodů, tj. podle distribuce kladných a záporných nábojů v jejich molekulách. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na komplexní směsi amfolytů, jež tvoří nosný elektrolyt této metody. Dělené látky v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. Na rozdíl od plošných gelových uspořádání IEF, je třeba v kapilární IEF [29] po dosažení ustáleného stavu fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány detektorem pevně umístěným u jednoho z konců kapiláry. Mobilizace se uskutečňuje hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u konců kapiláry, elektroelucí [29] nebo elektroosmotickým tokem [30].

Elektrochromatografie

Kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography – CEC) je technika analogická kapilární HPLC, tj. separační prostor je tvořen plněnou kapilární kolonou, jejíž sorbent představuje stacionární fázi [31]. Na rozdíl od HPLC však pohyb mobilní fáze není realizován tlakově vyvolaným hydrodynamickým tokem, ale EOF vyvolaným stejnosměrným elektrickým polem připojeným k oběma koncům kolony ponořeným do roztoku mobilní fáze v elektrodových nádobkách. Podobně jako v EKC, kde je hlavní předností pravoúhlý profil EOF na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku. Kromě toho v CEC lze díky absenci zpětného tlaku kolony užít menší částice sorbentu než v HPLC, což též zvyšuje účinnost separace [32].

2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA PEPTIDŮ

Peptidy představují velkou a komplexní skupinu biologicky aktivních látek. V přírodě se vyskytují v obrovském množství a jejich funkce je velmi rozmanitá. Hrají významnou roli v řízení a regulaci procesů ve všech živých organismech. Peptidy působí např. jako hormony, neurotransmitery a imunitní modulátory, koenzymy, substráty a inhibitory enzymů, léčiva, toxiny a antibiotika.

Zájem farmakologického výzkumu o analogy peptidů jako terapeutik v posledních letech stoupl; mnoho těchto látek má silný účinek při velmi nízké dávce, a proto farmakologické a farmakokinetické studie musí být podpořeny vysoce citlivou a specifickou analytickou metodou. Řada peptidů a jejich derivátů je syntetizována, aby napomáhaly při studiu metabolismu a mechanismu jejich působení v organismu. Kontrola syntézy, identity a čistoty nabývá na důležitosti, a proto zde mají své nezastupitelné místo vysokoúčinné separační metody. Separace peptidů vzniklých enzymatickým štěpením bílkovin či bílkovinných směsí je klíčovým krokem při proteomických studiích.

Peptidy se skládají z aminokyselin spojených peptidovými vazbami nebo disulfidovými můstky. Obrovské množství variací sekvencí (pořadí) aminokyselin v peptidovém řetězci je příčinou neobyčejné pestrosti peptidů. Náboj a tvar peptidů nezávisí jen na typu aminokyselinových zbytků, ale také na jejich pořadí v peptidovém řetězci. Všechny tyto odlišnosti mají za následek různé elektroforetické pohyblivosti peptidů, což umožňuje jejich dělení pomocí elektromigračních metod [33]. Elektromigrační metody separace peptidů se nepřetržitě rozšiřují a jednotlivé elektroforetické, elektrokinetické a elektrochromatografické módy jsou uznávány jako rovnocenné protějšky resp. doplňky HPLC metod [34].

2.2.1 Elektromigrační vlastnosti peptidů

Jako hlavní elektromigrační vlastnost je brána elektroforetická pohyblivost, která má hlavní význam pro všechny elektromigrační metody. Mobilita peptidů je funkcí:

- vlastností peptidů (náboj, velikost, tvar),
- vlastností média (základní elektrolyt, jeho složení, pH, iontová síla, viskozita a teplota),
- interakcí peptidů se složkami média (solvatace, disociace, tvorba komplexů).

Malé peptidy se chovají jako jednoduché organické látky (ionty). Mobilita je přímo úměrná náboji a nepřímo úměrná relativní molekulové hmotnosti, M_r .

Prvně kvantitativně popsal tento vztah Offord [35] pro sérii oligo- a polypeptidů dělených papírovou elektroforézou:

$$m_{ep} = k \cdot \frac{q}{M_r^{2/3}} \quad (19)$$

kde k je konstanta proporcionality, m_{ep} je elektroforetická pohyblivost a q je efektivní náboj.

Následující vztah byl odvozen pro rigidní sférické molekuly v pufrch s nízkou iontovou silou [36]:

$$m_{ep} = k \cdot \frac{q}{M_r^{1/3}} \quad (20)$$

Další semiempirický model byl navržen pro syntetické polymery s cylindrickým nebo tyčovitým tvarem molekul [36]:

$$m_{ep} = k \cdot \frac{q}{M_r^{1/2}} \quad (21)$$

2.2.2 Volba separačních podmínek

Volba separačních podmínek je komplexní proces, v němž hrají významnou roli různé separační parametry. Hlavní faktory, které je třeba brát v úvahu při vývoji separace, jsou parametry roztoku základního elektrolytu a instrumentální parametry.

2.2.2.1 Elektrolytový systém

Základní elektrolyt je pro CZE velmi důležitý, neboť jeho složení zásadně ovlivňuje migrační chování analytů. Vhodný elektrolytový systém musí zajistit správné elektroforetické chování všech rozpuštěných látek v roztoku, dále musí zajistit dostatečnou stabilitu systému a vyhovující separaci analytů.

Složení pufru a koncentrace. Vhodné pufrы (tlumivé roztoky) pro CZE mají dostatečnou pufracní kapacitu ve vybrané oblasti pH a nízkou elektrickou vodivost, aby se minimalizoval procházející elektrický proud. Pro zaostření zóny vzorku v kapiláře, které zvyšuje separační účinnost a zlepšuje detekci, je také důležitý typ použitého rozpouštědla vzorku. Zvýšení koncentrace základního elektrolytu (pro dané pH) snižuje EOF a pohyblivost analytu.

pH pufru. pH pufru může ovlivnit separaci změnou náboje stanovované látky nebo přísady a změnou EOF. Při separaci bílkovin a peptidů se při změně pH z hodnoty nad izoelektrickým bodem (pI) na hodnotu pod izoelektrickým bodem změní výsledný

náboj rozpuštěné látky ze záporného na kladný. Zvýšení pH pufru v křemenné kapiláře zvyšuje EOF.

Velká rozmanitost elektrolytových systémů je využívána při separaci široké škály analytů v CE. Většina z těchto elektrolytů jsou vodné pufrů. Mezi běžně používané pufrů v CE patří: fosfátový pufr (pH 1,1 – 3,1 a pH 6,2 – 8,2), acetátový pufr (pH 3,8 – 5,8), borátový pufr (pH 8,1 – 10,1), Tris (pH 7,3 – 9,3) a amfoterní pufr jako například MES (pH 5,5 – 6,7), MOPS (pH 6,5 – 7,5), které jsou široce používány pro separace peptidů a proteinů. Volba elektrolytového systému v CE závisí na mnoha faktorech, jako je například rozpustnost, stabilita analytů v elektrolytu, stupeň ionizace analytů, vliv aniontů a kationtů přítomných v elektrolytu, pH a organické modifikátory.

Anionty pufrů

Anionty přítomné v elektrolytovém systému ovlivňují elektrický proud, vytvořené Jouleovo teplo, elektroosmotický tok, interakci analytů se stěnou kapiláry i pohyblivosti iontů. Různá měření poukázala na velké rozdíly v migračních časech analytů (větší než 50 %), které mohou být způsobeny použitím různých pufrů. Bylo zjištěno, že některé páry píků měly lepší rozlišení pouze v jednom určitém pufru a že jiné páry měly rozlišení stejně dobré ve všech zkoumaných pufrůch. Tento fakt dokumentuje existenci rozdílů v selektivitě pufrů. Tyto rozdíly způsobují, že změna typu aniontu pufru může být považována za metodu zlepšení rozlišení v CE separaci [37]. Vzhledem k významným vlivům aniontů pufrů na EOF, proud, migrační čas, rozlišení a selektivitu je proto velmi důležité věnovat zvláštní pozornost správné volbě pufru [38].

Kationty pufrů

Kationty v základním elektrolytu ovlivňují migraci analytů v CE systému. Přítomnost různých kationtů kovů na stěně kapiláry brání adsorpci proteinů [39]. Například kationty solí LiCl, NaCl, KCl a CsCl brání adsorpci proteinů v tomto pořadí: $Cs^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$.

Organické modifikátory

Přidání organických rozpouštědel do základního elektrolytu umožňuje stanovení některých analytů, které nejsou rozpustné ve vodě. Organická rozpouštědla jsou také

známá jako látky snižující elektroosmotickou mobilitu, která může mít za následek lepší rozlišení v delším čase analýzy. Elektroosmotická pohyblivost se snižuje s rostoucí koncentrací přidaných organických rozpouštědel do elektrolytu. Nejméně je ovlivněna elektroosmotická mobilita v případě acetonitrilu [38].

2.2.2.2 Instrumentální parametry

Napětí. Čas separace je nepřímo úměrný vloženému napětí. Zvýšení napětí však může způsobit nadměrnou tvorbu tepla, které zvyšuje teplotu, výsledkem je gradient viskozity základního elektrolytu v kapiláře. Tento jev způsobuje rozšíření zóny a snižuje rozlišení.

Teplota. Teplota ovlivňuje především viskozitu a elektrickou vodivost základního elektrolytu, a tím i migrační rychlost. V některých případech může zvýšení teploty způsobit konformační změny bílkovin, což pozmění migrační čas a účinnost separace.

Kapilára. Rozměry kapiláry (délka a vnitřní průměr) ovlivňují čas analýzy, účinnost separace a píkovou kapacitu. Zvětšení celkové délky kapiláry snižuje intenzitu elektrického pole (při konstantním napětí), což prodlouží migrační čas. Pro daný základní elektrolyt a intenzitu elektrického pole závisí uvolněné teplo a tím i rozšíření zóny vzorku na vnitřním průměru kapiláry. Ten také ovlivňuje detekční limit, který dále závisí na nastříknutém objemu vzorku a použitém detekčním systému. Jelikož adsorpce složek vzorku na stěnu kapiláry omezuje účinnost, musí být při vývoji separační metody brány v úvahu postupy, které těmto interakcím zabraňují. V případě bílkovin bylo navrženo několik metod, jak zabránit adsorpci na stěnu kapiláry. Některé z těchto metod vyžadují pouze modifikaci složení tlumivého roztoku (použití extrémní hodnoty pH, adsorpce kladně nabitých přísad tlumivého roztoku). V jiných případech je vnitřní stěna kapiláry pokryta kovalentně navázaným polymerem na oxid křemičitý, který zabraňuje interakcím mezi bílkovinami a záporně nabitým křemenným povrchem. Pro tyto účely jsou dostupné komerční kapiláry pokryté neutrálními hydrofilními, kationtovými a aniontovými polymery.

2.2.3 Detekce peptidů

2.2.3.1 Základní parametry detektoru

Citlivost CZE analýzy je zejména závislá na typu použitého detektoru. Všeobecně lze říci, že CZE s UV-absorpční detekcí se vyznačuje poměrně omezenou koncentrační citlivostí v důsledku dávkování malých objemů vzorku (běžně 1 % objemu kapiláry, 2 až 10 nL) a díky krátké optické detekční dráze (rovna maximálně průměru kapiláry: 50 až 75 μm). Tato skutečnost je nepříjemnou překážkou v rutinní analýze látek. Jiné detektory jako fluorescenční a elektrochemické se sice vyznačují vyšší citlivostí, ale za to je možné je aplikovat na méně typů analytů a to i po modifikaci pomocí chemické derivatizace. Efektivní cestu ke zvýšení citlivosti přináší on-line prekoncentrační techniky, kde jsou do kapiláry dávkovány větší objemy vzorku než obvykle a postupně dochází k zaostření vzorku do úzké zóny. Dosud jsou známé tři hlavní on-line prekoncentrační techniky, které se opírají o odlišný fokusační mechanismus: „Field enhanced stacking“ [40], „sweeping“ [41], „dynamic pH junction“ [42].

Citlivost detektoru, S_D , lze vyjádřit vztahem:

$$S_D = \frac{R_D}{c} \left(\text{V} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \right) \quad (22)$$

kde R_D [V] je odezva detektoru a c [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] je koncentrace analytu. Limit detekce, LOD , a limit stanovitelnosti, LOQ , jsou dány vztahy:

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

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

v nichž n [V] značí šum a S_D [$\text{V} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$] citlivost detektoru.

2.2.3.2 UV-absorpční detekce

Nejčastěji používanou detekcí peptidů v CE je UV-absorpční detekce v rozsahu vlnových délek 200 až 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 [43]. Citlivost se může též zvýšit použitím speciálních typů detekčních cel, jako jsou například cely ve tvaru Z, U, „sleeve“ nebo

bubliny [44]. Peptidy obsahující v řetězci aromatické aminokyseliny mohou být detekovány při vlnové délce 275 - 280 nm anebo s nižší citlivostí při 254 nm. Nejvyšší molární absorpční koeficienty mají tryptofan a tyrosin, o něco nižší hodnotu molárního absorpčního koeficientu má fenylalanin.

2.2.3.3 Další detekční techniky

Laserem indukovaná fluorescenční detekce

Nejcitlivější detekcí v CE je laserem indukovaná fluorescenční detekce (LIF), jejíž citlivost je o dva až tři řády vyšší než UV-absorpční detekce. Při této detekci je většinou nutné provádět pre-, on- a postcolumn derivatizace peptidů fluorescenčními značkami [45]. Tento postup znamená v detekci peptidů a proteinů určitý problém. Peptidy a proteiny obvykle obsahují více derivatizačních center v molekule. Mezi často 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) [46]. Pouze peptidy obsahující aromatické aminokyseliny s excitační vlnovou délkou 240 až 280 nm mohou být detekovány bez derivatizace [47].

Hmotnostní spektrometrická detekce

Hmotnostní spektrometrie (MS) představuje ideální detekční princip, protože je to citlivá, univerzální i selektivní detekční technika pro CE [48]. MS má velmi významné postavení při analýze a určování struktury peptidů a proteinů. 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, ale také poskytují důležité informace o struktuře a sekvenci aminokyselin v řetězci, o post-translačních modifikacích, o peptidových mapách bílkovin a o nekovalentních interakcích peptidů.

Elektrochemická detekce

Mezi elektrochemické detekce patří amperometrická, voltametrická a vodivostní. Elektrochemická detekce není příliš častá v kapilární elektroforéze peptidů. Vysoce citlivá i 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. Univerzální bezkontaktní vodivostní detekcí lze detekovat všechny peptidy bez omezujících požadavků na jejich strukturu [24].

2.2.4 Kvalitativní a kvantitativní analýza

V CZE migrují zóny separovaných látek různými rychlostmi a procházejí detektorem v různých časech. Získaný záznam se nazývá elektroferogram, který je obrazem zón separovaných analytů. Počet separovaných zón analytů prošlých detektorem pak odpovídá počtu píků v elektroferogramu. Poloha píku v elektroferogramu udává migrační čas příslušného analytu, z něhož lze vypočítat jeho elektroforetickou pohyblivost a ta může částečně sloužit i k jeho identifikaci. Jinými slovy řečeno, elektroforetická pohyblivost závisí na povaze analyzované látky a je tedy **kvalitativní informací** o analytu. Plocha píku v elektroferogramu je úměrná množství příslušného analytu nadávkovaného do separační kapiláry a vztažena na dávkovaný objem vzorku udává koncentraci analyzované látky ve vzorku. Plocha píku nese tudíž **kvantitativní informaci** o analytu. Pro kvantitativní vyhodnocování elektroferogramů se nejčastěji používá metoda kalibrační přímky, ale i další vyhodnocovací metody jako je metoda vnitřního standardu, metoda standardního přídatku a metoda vnitřní normalizace, nacházejí uplatnění v CE [9]. Kolísající rychlost EOF, jež je často pozorována v CE, značně ovlivňuje opakovatelnost migračních časů a ploch píků analyzovaných látek. Pro lepší opakovatelnost se proto obvykle místo plochy píku vyhodnocuje korigovaná plocha píku, což je plocha píku dělená migračním časem analytu. Korigovaná plocha píku se pak vynáší do kalibračních závislostí místo plochy píku a slouží ke kompenzaci posunu migračních časů od analýzy k analýze (dochází tím ke zmenšení rozptylu odezvy) a rozdílu v odezvách složek vzorku s různými migračními časy.

Velmi výhodná pro kvalitativní analýzu je simultánní detekce univerzálním a selektivním detektorem, např. vodivostním a optickým [49]. Kvantitativní analýza je v CE založena na kalibraci standardními roztoky, kdy kalibrační graf reprezentuje závislost plochy píku na dávkovaném množství [50].

2.2.4.1 Stanovení stupně čistoty peptidů

Čistota peptidů a obsah jednotlivých složek ve vzorku mohou být stanoveny různými postupy, které závisí na dostupnosti standardu peptidu. Jestliže je standard peptidu dostupný, může být množství peptidu v analyzovaném vzorku určeno 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: relativní výšky píku, $P_h(i)$ (25), relativní plochy píku, $P_A(i)$ (26) a relativní korigované plochy píku, $P_{CA}(i)$ (27):

$$P_h(i) = \frac{h(i)}{\sum h(i)} \quad i = 1 \dots n, \quad (25)$$

$$P_A(i) = \frac{A(i)}{\sum A(i)} \quad i = 1 \dots n, \quad (26)$$

$$P_{CA}(i) = \frac{A_c(i)}{\sum A_c(i)} \quad i = 1 \dots n, \quad (27)$$

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 ve vzorku peptidového preparátu. Korigovaná plocha píku je plocha píku vztahovaná k migrační rychlosti daného analytu a 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 (25) je vhodné použít v případech, kdy píky mají podobný tvar a šířku. Stanovení na základě relativní plochy píku (26) 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.

2.2.5 Fyzikálně-chemická charakterizace

2.2.5.1 Efektivní a specifický náboj, izoelektrický bod

Z fyzikálně-chemického hlediska jsou peptidy amfolytické (poly)elektrolyty nebo (poly)amfolyty. Amfolyty, tedy látky amfolytické povahy, mají ve své molekule jak kyselou funkční skupinu, tak funkční skupinu zásaditou, a mohou proto nést kladný, záporný nebo nulový náboj, podle pH okolního prostředí. Efektivní náboj peptidů je dán sumou nábojů všech iontových skupin přítomných v polypeptidovém řetězci. Z přítomných iontových skupin v polypeptidovém řetězci a jejich disociačních konstant je možné odhadnout, které skupiny jsou disociovány v daném pH a jak přispívají k efektivnímu náboji. Specifický náboj je dán efektivním nábojem děleným relativní molekulovou hmotností.

Obecně platí, že při $\text{pH} = \text{p}K_a$ budou dané skupiny disociovat v roztoku z 50 %, při $\text{pH} = \text{p}K_a + 1$ bude disociace 90 % a při $\text{pH} = \text{p}K_a - 1$ bude disociace 10 %. Aminokyseliny asparagová a glutamová kyselina způsobují přítomnost negativního náboje na peptidovém řetězci, lysin, arginin a zčásti histidin jsou nosiči pozitivního náboje na peptidovém řetězci.

Přesnější charakteristiku amfolytů poskytuje počítačový program, který vypočítá efektivní náboje na základě matematických modelů acido-bazických rovnováh základních amfolytů [51].

Velmi důležitou charakteristikou peptidů je jejich izoelektrický bod (pI), je to pH roztoku, při kterém je efektivní náboj peptidu nulový, a proto i jeho efektivní mobilita při tomto pH bude nulová. Pro některé malé oligopeptidy obsahující malý počet aminokyselinových zbytků má pI , ve kterém je jejich efektivní náboj nulový, poměrně široký rozsah. A proto místo o izoelektrickém bodu mluvíme o izoelektrickém pásmu. Peptidy se v elektrickém poli pohybují jako kationy při $\text{pH} < pI$ nebo jako anionty při $\text{pH} > pI$ [34].

Závislost efektivního náboje nebo efektivní pohyblivosti peptidů na pH lze určit též jinými metodami, jako např. acidobazickou titrační křivkou [52] nebo elektroforetickou titrační křivkou [53], případně pro malé oligopeptidy v rozmezí pH 4 až 10 kapilární izotachoforézou [54]. Isoelektrický bod peptidů lze též stanovit kapilární nebo gelovou izoelektrickou fokusací [55] nebo CZE [56].

2.2.5.2 Efektivní elektroforetická pohyblivost

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

$$m_{eff} = \frac{L_t L_{ef}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad (28)$$

kde L_t [m] je celková délka kapiláry, L_{ef} [m] je efektivní délka kapiláry, U [V] je vložené separační napětí.

Při analýzách v silně kyselých základních elektrolytech s velmi pomalým EOF způsobeným potlačenou disociací silanolových skupin na stěnách křemenné kapiláry byla efektivní elektroforetická pohyblivost stanovena pomocí tlakem urychleného měření EOF [57]. Vzorek byl dávkován společně se zónou A neutrálního elektroosmotického markeru do kapiláry naplněné základním elektrolytem. Poté bylo vložené 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 nádoby 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:

$$m_{eff} = \frac{L_t L_{ef}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_u} + \frac{t_A}{t_u t_B} \right) \quad (29)$$

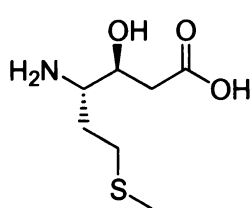
kde L_t [m] je celková délka kapiláry, L_{ef} [m] je efektivní délka kapiláry, U [V] je vložené separační napětí a t_m [s] je migrační čas peptidu.

2.2.5.3 Další fyzikálně-chemické parametry

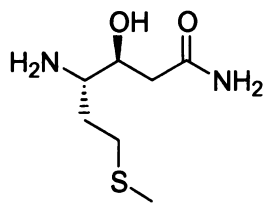
Dalšími fyzikálně-chemickými parametry, které ovlivňují CE analýzu a separaci peptidů a které lze z jejich CE analýz určit jsou: Stokesův poloměr, relativní molekulová hmotnost, difuzní koeficient, acidobazická disociační konstanta, asociační konstanty komplexů peptidů s nízko- i vysokomolekulárními ligandy [58].

2.3 DIPEPTIDOVÉ DERIVÁTY METHIONIN-STATINU

Dipeptidové deriváty methionin-statinu (dále v textu užívané označní **MStaxaa**) se skládají ze společné základní struktury methionin-statinu, ke které je připojena příslušná standardní aminokyselina. Tímto spojením dochází k tvorbě peptidové vazby. Níže jsou znázorněny dvě základní formy methionin-statinu, MStOH a MStNH₂, strukturní vzorce dipeptidových derivátů jsou uvedeny na další straně v **Tabulce 3** [59].



MStOH
 $M_r = 193,08$

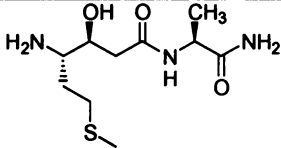
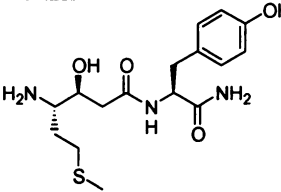
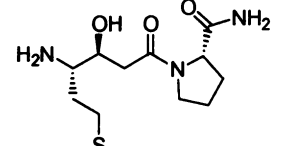
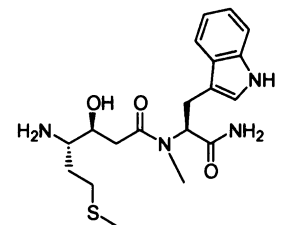
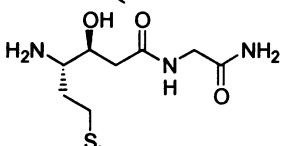
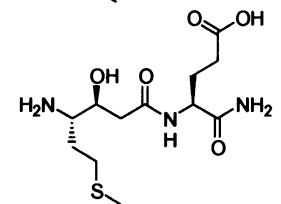
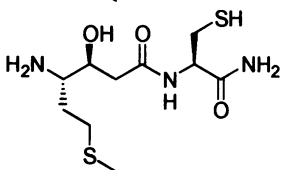
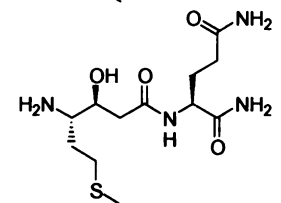
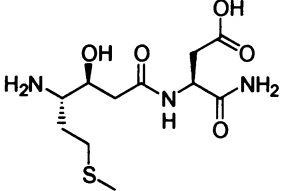
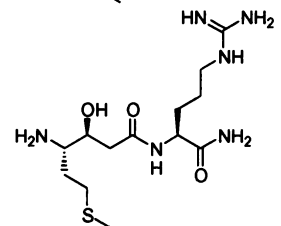
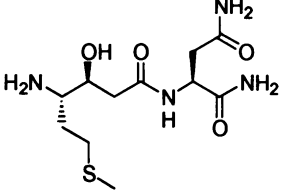
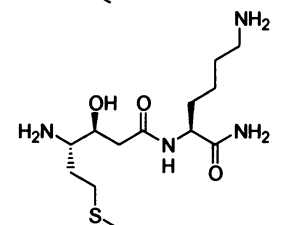
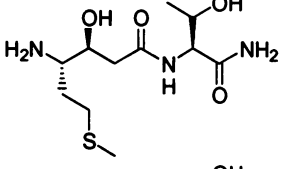
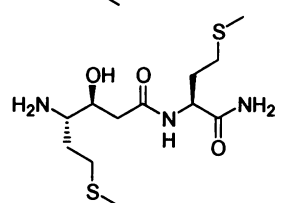
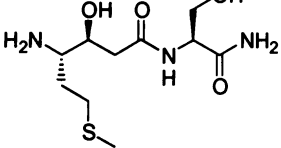
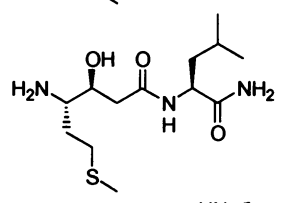
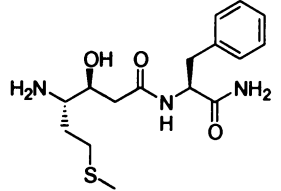
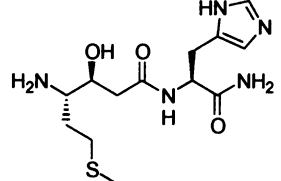
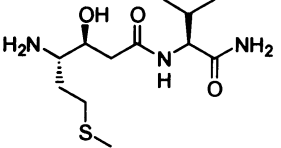
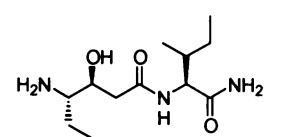


MStNH₂
 $M_r = 192,09$

MStaxaa byly syntetizovány na pevné fázi a poté byly purifikovány pomocí HPLC a charakterizovány MS. Jedním z cílů této práce bylo stanovit stupeň čistoty daných MStaxaa.

Dipeptidové deriváty MStaxaa byly syntetizovány s cílem testovat je jako inhibitory významné třídy proteolytických enzymů, methionin aminopeptidas. Methionin aminopeptidasy odštěpují N-terminální methionin z nascentního peptidového řetězce a představují tak jedny z klíčových enzymů v biosyntéze a zrání bílkovin v eukaryotických buňkách, neboť biosyntéza všech eukaryotických proteinů v cytosolu začíná pomocí iniciátoru methioninu. Aminopeptidasy se podílejí na tvorbě nových krevních cév (angiogenezi) při šíření agresivních nádorových buněk, proto inhibice angiogeneze prostřednictvím inhibitorů aminopeptidas je jednou ze zkoumaných strategií léčby rakovinových onemocnění [60]. Z dvaceti testovaných peptidů prokázaly nejvyšší inhibiční účinky dipeptidové deriváty MStCys a MStVal, jejichž struktury poskytují vhodný základ pro syntézu nových ještě účinnějších inhibitorů aminopeptidas.

Tabulka 3 Strukturální vzorce a M_r dipeptidových derivátů methionin-statinu.

Označení analytu	Strukturální vzorec	M_r	Označení analytu	Strukturální vzorec	M_r
MStaAla		263,16	MStaTyr		355,16
MStaPro		289,15	MStaTrp		378,17
MStaGly		249,11	MStaGlu		321,40
MStaCys		295,10	MStaGln		320,15
MStaAsp		307,12	MStaArg		348,19
MStaAsn		306,14	MStaLys		320,19
MStaThr		293,14	MStaMet		323,13
MStaSer		279,13	MStaLeu		305,18
MStaPhe		339,16	MStaHis		329,15
MStaVal		291,41			
MStaIle		305,44			

3 VÝZKUMNÉ CÍLE

Cílem diplomové práce bylo:

1. Provést analýzu a stanovit stupně čistoty dipeptidových derivátů methionin-statinu kapilární zónovou elektroforézou (CZE) v různých kyselých (klasických a izoelektrických) základních elektrolytech, určit limit detekce a limit stanovitelnosti těchto látek v CZE analyzátoru s UV-absorpčním detektorem.
2. Vypočítat efektivní a specifické náboje dipeptidových derivátů methionin-statinu a určit jejich efektivní elektroforetické pohyblivosti metodou CZE v různých základních elektrolytech při standardní teplotě 25 °C.
3. Separovat směsi strukturně podobných dipeptidových derivátů methionin-statinu metodou CZE a micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC), testovat vhodnost kyselých (klasických a izoelektrických) základních elektrolytů pro analýzu a separaci dipeptidových derivátů methionin-statinu.
 - Porovnat separační účinnost a rozlišení různých základních elektrolytů (klasických a izoelektrických).
 - Porovnat separační účinnost a rozlišení metod CZE a MEKC.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p.a., kromě derivátů celulosy, které byly dostupné ve stupni čisté. Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), SDS (dodecylsulfát sodný), MHPC (methylhydroxypropyl celulosa), MHEC (methylhydroxyethyl celulosa) a HEC (hydroxyethyl celulosa) byly dodány firmou Serva (Heidelberg, Německo). Kyselina fosforečná, kyselina octová, kyselina mravenčí, dimethylsulfoxid (DMSO) a hydroxid sodný byly získány od firmy Lachema (Brno, ČR), methanol od firmy Penta (Chrudim, ČR), kyselina iminodioctová (IDAA) byla dodána od Bachemu (Bubendorf, Švýcarsko), hexadecyl-trimethylamoniumbromid (CTAB) a hydroxid litný od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Kyselina asparagová byla dodána firmou Sigma – Aldrich (Steinheim, Německo) a kyselina glutamová byla získána od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

4.2 ÚPRAVA VZORKU

Dipeptidové deriváty methionin-statinu byly syntetizovány na pevné fázi [61] v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB). Rozpustnost peptidů je dána jejich aminokyselinovým složením a sekvencí. Při CE analýze se peptidy nejčastěji rozpouštějí v deionizované vodě nebo v základním elektrolytu. Dodané vzorky byly rozpuštěny v deionizované vodě (v koncentračním rozsahu 2,62 - 9,88 mmol.L⁻¹) z důvodu možnosti použití stejného roztoku vzorku v různých elektrolytových systémech.

4.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Všechna měření byla prováděna na laboratorním CE analyzátoru sestrojeném v ÚOCHB AV ČR [62]. Tento analyzátor byl obsluhován manuálně, sběr a zpracování dat bylo prováděno pomocí chromatografické stanice Clarity (DataApex, Praha, ČR). Byla použita křemenná kapilára Polymicro o vnějším průměru 375 μm a vnitřním průměru 50 μm, která měla celkovou délku 31 cm a efektivní délku 20 cm. Jednotlivé experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě 23 až 24 °C, 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).

Kapilára před změnou základního elektrolytu byla promývána nejprve vodou, poté 0,1 M hydroxidem sodným, opět vodou a nakonec novým základním elektrolytem. Separační napětí bylo v rozsahu 6 až 20 kV. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky, tlakem 10 – 14 mbar po dobu 5 až 15 s.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 ANALÝZA DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ METHIONIN-STATINU

5.1.1 Strategie volby experimentálních podmínek

Strategie pro volbu vhodných podmínek pro CE separaci peptidů byla použita při výběru experimentálních podmínek pro analýzu dipeptidových derivátů methionin-statinu. Tato strategie je závislá na charakteristických vlastnostech peptidů, které vyplývají z jejich aminokyselinového složení a sekvence a určují tak elektrický náboj peptidu, velikost, tvar, hydrofobicitu a specifické vazebné schopnosti. Ze struktury také vyplývá ionogenní či neionogenní charakter peptidu, který hraje důležitou roli při volbě separačního módu metody. Pokud jsou peptidy nabitě alespoň v určité oblasti pH, můžeme volit metodu CZE, pokud ne, volíme metodu CMEKC.

Další důležitý faktor, který ovlivňuje výběr základního elektrolytu, je rozpustnost analytu. Na rozpustnost peptidu má zásadní vliv pH, iontová síla a složení pufru, ale také různá aditiva.

5.1.1.1 Složení základních elektrolytů

Základní elektrolyt (BGE) byl vybírán tak, aby splňoval několik důležitých kritérií. Bylo nezbytné, aby zaručoval požadované pH v zóně putujícího analyzovaného vzorku. To znamená, že BGE musel mít dostatečnou pufrací kapacitu a jeho pH bylo co nejméně vzdálené od konstanty acidity (pK_a) pufrující složky nebo byly použity poměrně vysoké koncentrace slabých kyselin, které také dostatečnou pufrací kapacitu zajistily. V úvahu byla také brána použitá UV-absorpční detekční technika.

Na základě strategie pro racionální volbu experimentálních podmínek byly pro CZE analýzu dipeptidových derivátů methionin-statinu vybrány BGE v kyselé oblasti (pH 2,05 až 2,98). V **Tabulce 4** je uvedeno jejich složení, pH, zkratka dále používaná v této práci, jejich elektroosmotická pohyblivost, napětí a elektrický proud, při kterých byly experimenty prováděny.

Tabulka 4 Složení, pH a elektroosmotická pohyblivost, m_{eo} , základních elektrolytů, vložené napětí, U , a elektrický proud, I .

Zkratka	Složení základního elektrolytu	pH	$m_{eo} \cdot 10^9$ [m ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹]	U [kV]	I [μA]
BGE I	100 mM H ₃ PO ₄ ; 50 mM Tris	2,18	2,27	10	49,5
BGE II	500 mM kyselina octová	2,54	5,72	15	11,4
BGE III	2 M kyselina octová	2,18	7,87	15	20,7
BGE IV	200 mM kys. mravenčí; 200 mM kys. octová	2,05	6,24	15	31,9
BGE V	200 mM kyselina iminodioctová	2,26	4,92	10	33,8
BGE VI	100 mM kyselina asparagová	2,98	2,69	15	10,5

5.1.1.2 Volba kapiláry

Pro výběr vhodné separační kapiláry byla důležitá dvě hlediska, geometrické parametry a vnitřní povrch kapiláry. Délka kapiláry byla volena 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 optické detekce. Pro analýzu a později i separaci dipeptidových derivátů methionin-statinu byla použita vnitřně nepokrytá křemenná kapilára s polyimidem na vnější straně dodaná od firmy Polymicro Technologies, Phoenix, AR, USA. Vnitřní průměr separační kapiláry byl 50 μm a vnější průměr 375 μm, její celková délka byla 31 cm a efektivní délka 20 cm, proto všechny analýzy probíhaly v poměrně krátkém čase, CZE analýzy do 5 min, MEKC separace do 5 – 25 min.

5.1.2 Stanovení stupně čistoty

Analýza a stanovení stupně čistoty dipeptidových derivátů methionin-statinu byly uskutečněny metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI. Určení stupně čistoty analytů je velmi důležitým hlediskem pro další využití těchto látek. Standardy těchto nově syntetizovaných látek nebyly dostupné, proto byl stupeň čistoty daných dipeptidových derivátů kvantifikován na základě vyhodnocení relativní korigované plochy píku a dále na základě relativní plochy a relativní výšky píku (viz kap. 2.2.4.1). Hodnoty stupně čistoty všech analytů s výjimkou MStaCys se pohybovaly v rozmezí 90,9 až ~100 %. MStaCys s několika neidentifikovanými příměsmi měl hodnotu stupně čistoty kolem 60 %. V **Tabulkách 5 - 7** (viz str. 48 a 49) jsou shrnuty přesné hodnoty stupňů čistoty měřených analytů třemi výše uvedenými postupy

vyhodnocení. Stanovení stupně čistoty na základě vyhodnocení relativní korigované plochy píku je z uvedených způsobů vyhodnocení nejpřesnější. Hodnoty stupňů čistoty, získané vyhodnocením relativní plochy a výšky píku byly velmi podobné jako u vyhodnocení pomocí korigované plochy píku.

Příklady některých analýz dipeptidových derivátů methionin-statinu jsou znázorněny na **Obrázku 5** (viz str. 50). CZE analýza dipeptidu s vysokým stupněm čistoty (~100 %) je představena na záznamu s MStaVal (viz **Obr. 5A**) v kyselém elektrolytu BGE IV. Opačným příkladem je CZE analýza MStaCys, který představuje znečištěný analyt s několika neidentifikovanými příměsmi (viz **Obr. 5B**), na **Obrázku 5C** je znázorněn MStaPhe jako analyt s minoritními příměsmi. Na příkladech CZE analýzy MStaGlu je ukázáno (viz **Obr. 5D a 5E**), že se mohou objevovat rozdíly ve stupni čistoty v závislosti na použitém základním elektrolytu. MStaGlu měl stupeň čistoty ~100 % v 2 M kyselině octové, zatímco v 0,2 M kyselině iminodioctové byl stupeň čistoty tohoto analytu 97,7 %.

Tabulka 5 Stupeň čistoty P_{CA} jednotlivých analytů vyjádřený relativní korigovanou plochou píku stanovený metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI. Složení BGE viz **Tabulka 4**.

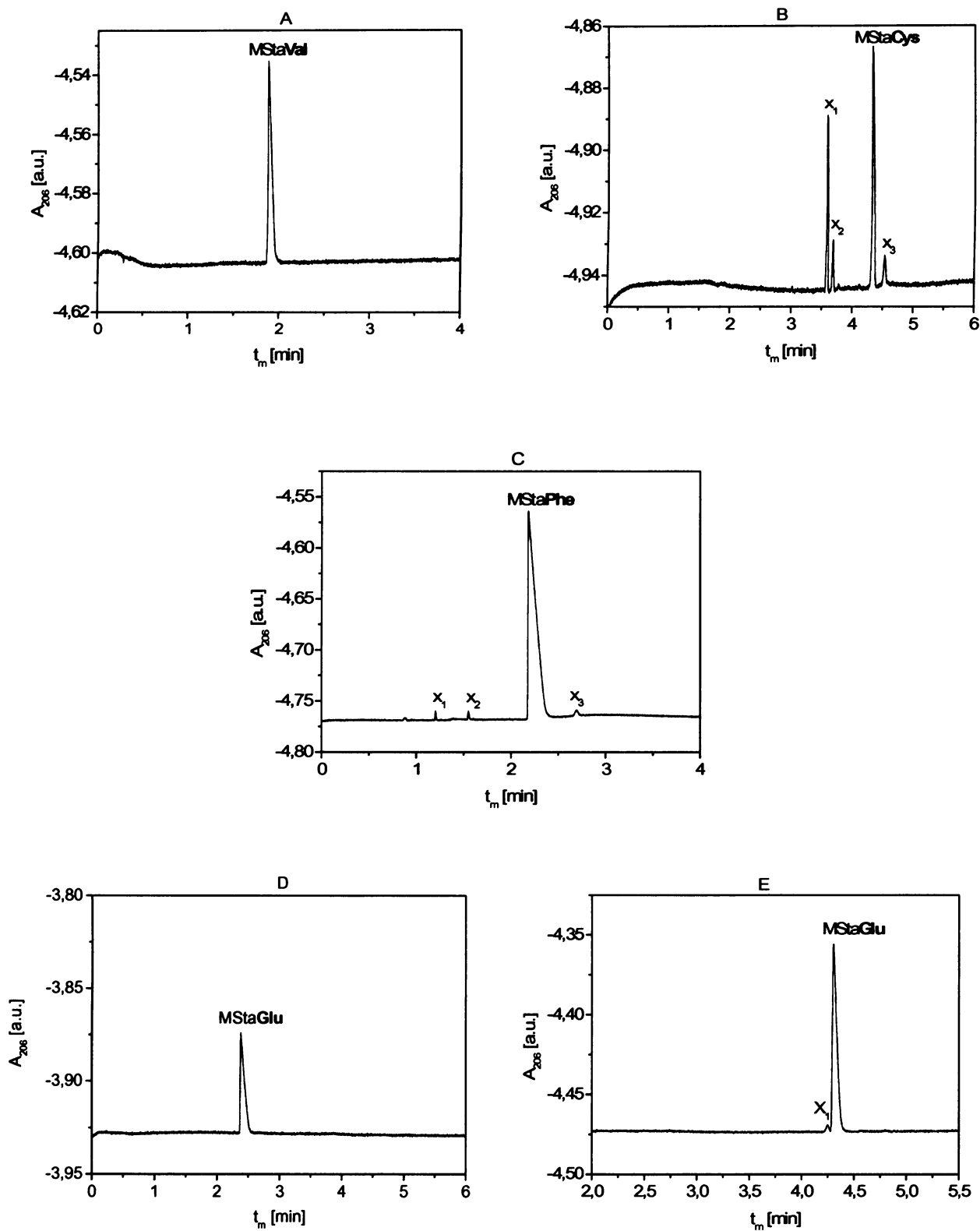
Analyt	P_{CA} [%]					
	BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI
MStaAla	~100	~100	~100	98,5	~100	98,3
MStaPro	~100	~100	~100	96,9	~100	97,6
MStaGly	~100	~100	~100	97,7	~100	~100
MStaCys	56,6	54,2	67,7	58,9	53,7	52,4
MStaAsp	94,2	95,1	~100	95,0	~100	93,3
MStaAsn	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaThr	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaSer	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaPhe	96,4	96,7	97,1	96,9	97,6	96,0
MStaVal	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStalle	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaTyr	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaTrp	98,4	97,6	99,5	97,5	98,9	97,4
MStaGlu	~100	97,5	~100	~100	97,7	97,6
MStaGln	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaArg	~100	98,8	~100	98,8	~100	98,4
MStaLys	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaMet	95,9	95,2	96,3	94,6	~100	~100
MStaLeu	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaHis	98,6	98,8	~100	98,5	~100	98,8
MStaOH	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaNH ₂	~100	~100	~100	~100	~100	~100

Tabulka 6 Stupeň čistoty P_A jednotlivých analytů vyjádřený relativní plochou píku stanovený metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI.

Analyt	P_A [%]					
	BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI
MStaAla	~100	~100	~100	98,4	~100	97,9
MStaPro	~100	~100	~100	98,6	~100	98,6
MStaGly	~100	~100	~100	97,3	~100	~100
MStaCys	61,5	59,8	61,3	53,1	55,7	62,0
MStaAsp	92,0	94,1	~100	94,0	~100	90,9
MStaAsn	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaThr	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaSer	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaPhe	98,7	99,0	98,9	98,8	99,2	98,0
MStaVal	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStalle	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaTyr	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaTrp	98,8	99,0	98,7	98,8	99,2	98,9
MStaGlu	~100	97,5	~100	~100	97,6	97,6
MStaGln	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaArg	~100	98,8	~100	98,7	~100	98,0
MStaLys	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaMet	97,8	98,2	96,0	97,8	~100	~100
MStaLeu	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaHis	98,3	98,6	~100	98,2	~100	96,9
MStaOH	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaNH ₂	~100	~100	~100	~100	~100	~100

Tabulka 7 Stupeň čistoty P_h jednotlivých analytů vyjádřený relativní výškou píku stanovený metodou CZE v kyselých základních elektrolytech BGE I – VI.

Analyt	P_h [%]					
	BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI
MStaAla	~100	~100	~100	97,3	~100	98,3
MStaPro	~100	~100	~100	95,1	~100	98,1
MStaGly	~100	~100	~100	96,7	~100	~100
MStaCys	77,7	73,2	69,8	77,7	71,4	53,8
MStaAsp	91,1	94,7	~100	91,1	~100	93,7
MStaAsn	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaThr	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaSer	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaPhe	97,8	97,9	97,2	97,0	97,9	98,6
MStaVal	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStalle	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaTyr	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaTrp	97,8	97,7	97,3	98,2	98,2	98,5
MStaGlu	~100	95,8	~100	~100	96,4	96,9
MStaGln	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaArg	~100	98,4	~100	97,4	~100	97,0
MStaLys	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaMet	94,4	95,9	95,4	94,9	~100	~100
MStaLeu	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaHis	95,8	96,2	~100	96,7	~100	96,3
MStaOH	~100	~100	~100	~100	~100	~100
MStaNH ₂	~100	~100	~100	~100	~100	~100



Obrázek 5 CZE analýzy dipeptidových derivátů methionin-statinu:

(A) MStaVal, $c = 0,452 \text{ mM}$ ($P_{CA} \sim 100 \%$) v BGE IV; (B) MStaCys, $c = 0,763 \text{ mM}$ ($P_{CA} = 60 \%$) v BGE I; (C) MStaPhe, $c = 0,740 \text{ mM}$ ($P_{CA} = 96,7 \%$) v BGE II; (D) MStaGlu, $c = 0,860 \text{ mM}$ ($P_{CA} \sim 100 \%$) v BGE III; (E) MStaGlu, $c = 0,860 \text{ mM}$ ($P_{CA} = 97,7 \%$) v BGE V; dávkování 14 mbar, 5 s; složení BGE viz **Tabulka 4**; x- neidentifikované příměsi.

5.1.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Při detekci peptidů v CE je nejvíce používána UV-absorpční detekce v oblasti 200 až 220 nm, tj. v oblasti absorpce UV-záření peptidovou vazbou. Absorpční detektor, který byl součástí CE-analyzátoru sestrojeného v ÚOCHB, se skládal z vysokofrekvenčně buzené jódové výbojky s emisní vlnovou délkou 206 nm jako zdroje světla a UV-senzitivní křemíkové fotodiody s vestaveným předzesilovačem.

Šum, n , odezva detektoru, R_D , poměr signál/šum, R_D/n , mez detekce, LOD , mez stanovitelnosti, LOQ , a citlivost, S_D , jsou charakteristikami detektoru, které jsou uvedeny v **Tabulkách 8 - 10**. Tyto charakteristiky byly stanoveny metodou CZE pro všechny analyty a ve všech testovaných základních elektrolytech (BGE I - VI). Kvůli větší přehlednosti byly v těchto tabulkách uvedeny charakteristiky detektoru pro 10 vybraných analytů reprezentujících dipeptidy s hydrofóbními i hydrofilními, ionogenními i neionogenními, aromatickými i nearomatickými aminokyselinovými zbytky v poloze 2 dipeptidu a samotný methionin-statin ve třech základních elektrolytech, mezi kterými je zastoupen neabsorbující BGE v UV oblasti BGE I (0,1 M H_3PO_4 ; 0,05 M Tris), relativně silně absorbující základní elektrolyt BGE III (2 M kys. octová) a jako představitel izoelektrického základního elektrolytu je uvedena 0,2 M kys. iminodioctová, BGE V.

Tabulka 8 Charakteristiky detektoru (R_D , odezva detektoru; S_D , citlivost detektoru; LOD , limit detekce; LOQ , limit stanovitelnosti) stanovené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE I (0,1 M H_3PO_4 ; 0,05 M Tris).

Analyt	c [mmol.dm ⁻³]	R_D [mV]	R_D/n^* [-]	S_D [V.mol ⁻¹ .dm ³]	LOD [μmol.dm ⁻³]	LOQ [μmol.dm ⁻³]
MStAla	0,967	127,38	136,97	131,73	21,18	70,60
MStVal	0,452	98,73	106,16	218,43	12,77	42,58
MStAsp	0,594	99,68	107,18	167,81	16,63	55,42
MStAsn	0,756	131,28	141,16	173,65	16,07	53,56
MStSer	0,262	58,61	63,02	223,70	12,47	41,57
MStCys	0,763	77,33	83,15	101,35	27,53	91,76
MStPhe	0,740	369,98	397,83	499,97	5,58	18,60
MStTrp	0,461	343,90	369,78	745,99	3,74	12,47
MStLys	0,406	136,23	146,48	335,54	8,31	27,72
MStOH	0,715	35,87	38,57	50,17	55,61	185,38

* n , šum, $n = 0,93 \pm 0,08$ mV

Tabulka 9 Charakteristiky detektoru (R_D , odezva detektoru; S_D , citlivost detektoru; LOD , limit detekce; LOQ , limit stanovitelnosti) stanovené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE III (2 M kys. octová).

Analyt	c [mmol.dm ⁻³]	R_D [mV]	R_D/n^* [-]	S_D [V.mol ⁻¹ .dm ³]	LOD [μmol.dm ⁻³]	LOQ [μmol.dm ⁻³]
MStAla	0,967	37,80	48,83	39,09	59,41	198,03
MStVal	0,452	37,68	48,68	83,36	27,86	92,86
MStAsp	0,594	36,25	46,83	61,03	38,05	126,84
MStAsn	0,756	46,26	59,76	61,19	37,95	126,51
MStSer	0,262	23,97	30,97	91,49	25,38	84,61
MStCys	0,763	28,95	37,40	37,94	61,21	204,02
MStPhe	0,740	136,96	176,93	185,08	12,55	41,82
MStTrp	0,461	133,20	172,07	288,94	8,04	26,79
MStLys	0,406	30,49	39,39	75,10	30,92	103,08
MStOH	0,715	9,98	12,89	13,96	166,38	554,58

* n , šum, $n = 0,77 \pm 0,09$ mV

Tabulka 10 Charakteristiky detektoru (R_D , odezva detektoru; S_D , citlivost detektoru; LOD , limit detekce; LOQ , limit stanovitelnosti) stanovené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE V (0,2 M kys. iminodioctová).

Analyt	c [mmol.dm ⁻³]	R_D [mV]	R_D/n^* [-]	S_D [V.mol ⁻¹ .dm ³]	LOD [μmol.dm ⁻³]	LOQ [μmol.dm ⁻³]
MStAla	0,967	129,04	148,87	133,44	19,49	64,96
MStVal	0,452	72,77	83,95	161,00	16,15	53,84
MStAsp	0,594	74,53	85,98	125,47	20,73	69,08
MStAsn	0,756	99,30	114,56	131,35	19,80	65,99
MStSer	0,262	44,51	51,35	169,89	15,31	51,02
MStCys	0,763	52,25	60,28	68,48	37,97	126,58
MStPhe	0,740	298,92	344,85	403,95	6,44	21,46
MStTrp	0,461	321,54	370,94	697,48	3,73	12,43
MStLys	0,406	103,41	119,30	254,70	10,21	34,03
MStOH	0,715	26,54	30,62	37,12	70,06	233,52

* n , šum, $n = 0,87 \pm 0,06$ mV

Porovnání těchto charakteristik detektoru ve třech BGE prokazuje, že nejnižší hodnoty meze detekce z hlediska měření v různých BGE byly dosaženy při měření analytů v neabsorbujícím BGE v UV oblasti (tj. 0,1 M H₃PO₄; 0,05 M Tris) a naopak nejvyšší hodnoty meze detekce byly nalezeny při analýze v relativně nejvíce absorbujícím BGE (ve 2 M kyselině octové). Citlivost detektoru poklesla přibližně třikrát ve 2 M kyselině octové oproti BGE I (0,1 M H₃PO₄; 0,05 M Tris) a BGE V (0,2 M kys. iminodioctová), ve stejném poměru se zvýšila mez detekce. Hodnoty šumu jako další důležité vlastnosti detektoru byly přibližně srovnatelné, pohybovaly se v rozmezí 0,77 až 0,93 mV.

Porovnání *LOD* a *LOQ* 10 zástupců dipeptidových derivátů methionin-statinu v kyselých (klasických a izoelektrických) BGE je uvedeno v **Tabulkách 11 - 12**. Nejnižší hodnoty meze detekce, *LOD*, z hlediska měření různých analytů se objevily u dipeptidů s aromatickými aminokyselinami v poloze 2 jako je MStaPhe a MStaTrp, u ostatních analytů odpovídala mez detekce hodnotám o jeden řád vyšším. Podobně tomu bylo i při stanovení meze stanovitelnosti, *LOQ*, kdy nejnižší hodnoty se objevily u analytů s aromatickou skupinou. Nejvyšší hodnoty *LOD* a *LOQ* ze všech uvedených analytů měl MStaOH, který neobsahuje peptidovou vazbu, a tudíž nejméně absorbuje UV záření.

Tabulka 11 Hodnoty meze detekce, *LOD*, stanovené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE I - VI.

Analyt	c [mmol.dm ⁻³]	<i>LOD</i> [μmol.dm ⁻³]					
		BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI
MStaAla	0,967	21,18	49,12	59,41	32,97	19,49	20,59
MStaVal	0,452	12,77	18,01	27,86	14,54	16,15	19,06
MStaAsp	0,594	16,63	26,23	38,05	23,21	20,73	22,65
MStaAsn	0,756	16,07	28,09	37,95	24,13	19,80	23,27
MStaSer	0,262	12,47	17,61	25,38	16,17	15,31	19,15
MStaCys	0,763	27,53	38,89	61,21	35,91	37,97	39,97
MStaPhe	0,740	5,58	9,28	12,55	8,13	6,44	7,66
MStaTrp	0,461	3,74	6,72	8,04	4,71	3,73	4,69
MStaLys	0,406	8,31	28,29	30,92	18,07	10,21	26,74
MStaOH	0,715	55,61	137,68	166,38	95,35	70,06	88,34

Tabulka 12 Hodnoty meze stanovitelnosti, *LOQ*, určené při CZE analýze dipeptidových derivátů methionin-statinu v BGE I - VI.

Analyt	c [mmol.dm ⁻³]	<i>LOQ</i> [μmol.dm ⁻³]					
		BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI
MStaAla	0,967	70,60	163,67	198,03	109,91	64,96	68,66
MStaVal	0,452	42,58	60,01	92,86	48,48	53,84	63,52
MStaAsp	0,594	55,42	87,39	126,84	77,37	69,08	75,51
MStaAsn	0,756	53,56	93,59	126,51	80,43	65,99	77,58
MStaSer	0,262	41,57	58,67	84,61	53,92	51,02	63,84
MStaCys	0,763	91,76	129,61	204,02	119,70	126,58	133,23
MStaPhe	0,740	18,60	30,93	41,82	27,09	21,46	25,53
MStaTrp	0,461	12,47	22,39	26,79	15,69	12,43	15,64
MStaLys	0,406	27,72	94,28	103,08	60,22	34,03	89,14
MStaOH	0,715	185,38	458,77	554,58	317,97	233,53	294,48

5.2 CHARAKTERIZACE DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ METHIONIN-STATINU

5.2.1 Výpočet efektivních a specifických nábojů

Efektivní, q_{eff} , a specifický náboj, q_{sp} , (efektivní náboj dělený relativní molekulovou hmotností) byly vypočteny pro všechny dipeptidové deriváty analyzované v BGE I (100 mM H₃PO₄; 50 mM Tris, pH 2,18) a v BGE VI (100 mM kyselina asparagová, pH 2,98). Efektivní a specifické náboje analytů jsou uvedeny v **Tabulce 13**.

Tabulka 13 Efektivní náboj, q_{eff} , a specifický náboj, q_{sp} , dipeptidových derivátů methionin-statinu pro BGE I a BGE VI.

Analyt	BGE I		BGE VI	
	q_{eff} [e]	q_{sp} [e]	q_{eff} [e]	q_{sp} [e]
MStaArg	+2	+0,0057	+2	+0,0057
MStaLys	+2	+0,0062	+2	+0,0062
MStaHis	+2	+0,0061	+2	+0,0061
MStaGly	+1	+0,0040	+1	+0,0040
MStaAla	+1	+0,0038	+1	+0,0038
MStaSer	+1	+0,0036	+1	+0,0036
MStaPro	+1	+0,0035	+1	+0,0035
MStaThr	+1	+0,0034	+1	+0,0034
MStaCys	+1	+0,0034	+1	+0,0034
MStaVal	+1	+0,0034	+1	+0,0034
MStalle	+1	+0,0033	+1	+0,0033
MStaLeu	+1	+0,0033	+1	+0,0033
MStaMet	+1	+0,0031	+1	+0,0031
MStaPhe	+1	+0,0029	+1	+0,0029
MStaTyr	+1	+0,0028	+1	+0,0028
MStaTrp	+1	+0,0026	+1	+0,0026
MStaAsn	+1	+0,0033	+1	+0,0033
MStaGln	+1	+0,0031	+1	+0,0031
MStaGlu	+0,99	+0,0031	+0,95	+0,0030
MStaAsp	+0,98	+0,0032	+0,91	+0,0030

Efektivní náboj peptidů je funkcí pH roztoku základního elektrolytu a pK_a hodnot ionogenních skupin aminokyselinových zbytků obsažených v peptidu [63]. Pro peptidy s jednou kyselou a jednou bazickou skupinou MStaAsp a MStaGlu se vypočte podle vztahu:

$$q_{\text{eff}} = \frac{1 \cdot 10^{pK_{a,1} - pH} - 1 \cdot 10^{pH - pK_{a,2}}}{10^{pK_{a,1} - pH} + 10^{pH - pK_{a,2}} + 1} \quad (30)$$

kde q_{eff} je efektivní náboj, $pK_{a,1}$ a $pK_{a,2}$ jsou záporné dekadické logaritmy acidobazických disociačních konstant ionogenních skupin analytu. Pro dipeptidy s bazickými aminokyselinami v poloze 2 byl efektivní náboj roven 2 e a pro ostatní dipeptidy byl roven

1 e. 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.

5.2.2 Stanovení efektivních pohyblivostí

5.2.2.1 Korekce na standardní teplotu

Všechny experimenty byly uskutečněny na laboratorním CE analyzátoru sestrojeném v ÚOCHB AV ČR bez aktivního chlazení kapiláry. Z tohoto důvodu byly naměřeny efektivní elektroforetické pohyblivosti při okolní teplotě rozdílné od standardní teploty 25 °C. Aby metoda poskytovala spolehlivé výsledky, je nutné provádět měření efektivních pohyblivostí při známé a konstantní teplotě. Za účelem kompenzace změn efektivních pohyblivostí kvůli zvyšující se teplotě uvnitř kapiláry byla použita korekce efektivních pohyblivostí na standardní teplotu 25 °C [64].

V této práci byl použit postup korekce založený na měření elektrické vodivosti vodného roztoku chloridu draselného o koncentraci 20 mmol.L⁻¹. Elektrický proud byl změřen při širokém rozsahu vloženého napětí za stejných experimentálních podmínek, pouze s výjimkou toho, že kapilára byla naplněna roztokem KCl. Pro specifickou vodivost, κ , 20 mM vodného roztoku KCl platí v teplotním rozmezí 15 – 35 °C lineární vztah:

$$\kappa = 0,14304 + 5,36 \cdot 10^{-3} T \quad (31)$$

Specifická vodivost základního elektrolytu, κ [S.m⁻¹], byla vypočtena z rovnice:

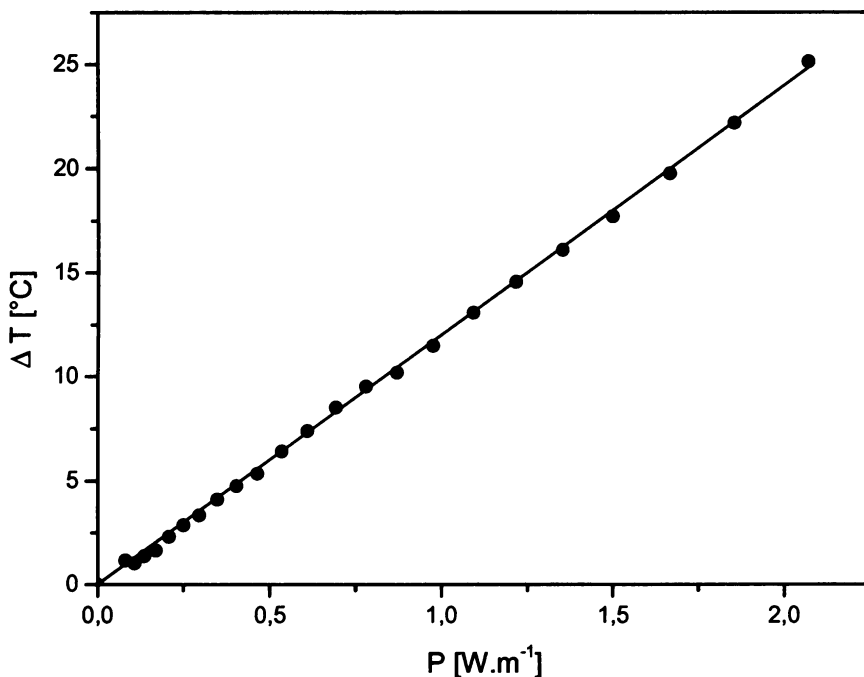
$$\kappa = \frac{L_t}{\pi R_i^2} \frac{I}{U} \quad (32)$$

kde L_t [m] je celková délka kapiláry, R_i [m] je vnitřní poloměr kapiláry a I [A] je elektrický proud vyvolaný napětím U [V]. Při nízkém aplikovaném napětí (do 2 kV) se může zanedbat teplotní nárůst roztoku uvnitř kapiláry. V širokém rozsahu byla proměřena závislost elektrického proudu na vloženém napětí a byl sestrojen graf závislosti rozdílu teplot uvnitř a vně kapiláry na elektrickém příkonu, P , vloženém na kapiláru (viz **Obrázek 6**). Okolní teplota během měření byla obvykle v rozmezí 23 až 24 °C a teplota v kapiláře T_i byla vyšší než standardní teplota 25 °C, proto byly efektivní elektroforetické pohyblivosti naměřené při teplotě T_i přepočteny na efektivní pohyblivosti

při standardní teplotě podle níže uvedeného vzorce, ve kterém se uvažuje nárůst efektivní pohyblivosti o 2 % na 1 °C:

$$m_{eff,25} = m_{eff,T_i} [1 - 0,020(T_0 + \Delta T - 25)] \quad (33)$$

kde $m_{eff,25}$ je efektivní elektroforetická pohyblivost při 25° C, m_{eff,T_i} je efektivní elektroforetická pohyblivost při aktuálních experimentálních podmínkách, T_0 je okolní teplota během experimentu a ΔT ($T_i - T_0$) je rozdíl teplot roztoku uvnitř kapiláry oproti okolí.



Obrázek 6 Kalibrační graf závislosti nárůstu teploty roztoku uvnitř kapiláry oproti okolí ΔT ($T_i - T_0$) na elektrickém příkonu, P , vztaženém na jednotku délky kapiláry.

5.2.2.2 Efektivní pohyblivosti v různých základních elektrolytech

Elektroforetické pohyblivosti 20 dipeptidových derivátů methionin-statinu a elektroosmotický tok byly měřeny v různých základních elektrolytech BGE I – VI, jejichž složení a pH je uvedeno v **Tabulce 4**. BGE byly voleny tak, aby ve skupině různých BGE byly jak klasické, tak i izoelektrické pufry.

Jednotlivé analýzy CZE byly dostatečně rychlé. Přístroj, na kterém se prováděly jednotlivé analýzy, nebyl vybaven aktivním chlazením kapiláry. Proto bylo nutné naměřené pohyblivosti analytů přepočítat na efektivní pohyblivosti při standardní teplotě 25 °C. Tato

korekce je velmi důležitá pro případné pozdější analýzy těchto látek na jiných přístrojích. Efektivní pohyblivosti jednotlivých analytů v BGE I – VI při standardní teplotě 25 °C jsou uvedeny v **Tabulce 14**. Zde je patrné, že hodnoty efektivních pohyblivostí strukturně podobných analytů obsahujících stejně nabitě skupiny jsou velmi blízké. Tento poznatek byl nadále využit tak, aby při přípravě směsí dipeptidů pro separaci byly společně v jedné směsi obsaženy obtížně oddělitelné analyty. Tedy ty, které mají velmi podobné hodnoty efektivních pohyblivostí.

Nejvyšší hodnoty efektivních pohyblivostí dipeptidů byly nalezeny při analýzách v BGE II (0,5 M kys. octová, pH 2,54), protože tento BGE má nejmenší iontovou sílu. Nejnižší hodnoty efektivních pohyblivostí byly zjištěny u analýz v BGE I (0,1 M H₃PO₄; 0,05 M Tris, pH 2,18), jehož iontová síla je nejvyšší. Porovnáním efektivních pohyblivostí podle specifického náboje analytů bylo zjištěno, že nejvyšší efektivní pohyblivost vykazují dipeptidy s bazickými aminokyselinami, které měly největší specifický náboj. Nejnižší hodnoty efektivních pohyblivostí byly nalezeny u dipeptidů s aromatickou skupinou, které měly specifický náboj nejmenší.

Tabulka 14 Efektivní pohyblivosti analytů v BGE I – VI při standardní teplotě 25 °C.

Analyt	$m_{\text{eff},25} \cdot 10^9 [\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$					
	BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI
MStaAla	14,12	21,23	18,11	19,27	15,74	19,75
MStaPro	14,10	20,65	17,82	18,75	15,75	19,32
MStaGly	15,11	22,81	19,37	20,26	17,00	20,51
MStaCys	14,16	20,84	18,41	18,54	15,70	19,25
MStaAsp	13,02	18,96	16,75	17,38	14,31	15,59
MStaAsn	13,79	20,70	17,70	18,26	15,41	18,76
MStaThr	13,34	20,43	17,59	18,12	15,21	18,66
MStaSer	13,81	20,71	18,02	18,53	15,87	19,37
MStaPhe	13,05	19,90	17,00	17,53	14,74	18,06
MStaVal	13,46	20,25	17,53	18,01	14,79	18,71
MStalle	13,16	19,77	17,25	17,67	14,52	18,27
MStaTyr	12,53	18,53	16,00	16,48	13,69	17,38
MStaTrp	12,69	18,37	16,20	16,64	13,85	17,48
MStaGlu	12,81	18,56	16,81	17,41	14,36	16,93
MStaGln	13,00	19,46	16,98	17,77	14,99	18,41
MStaArg	21,71	36,98	31,68	32,98	25,94	31,70
MStaLys	22,05	36,87	32,05	33,07	26,43	32,48
MStaMet	13,08	19,21	17,10	17,34	14,82	17,50
MStaLeu	13,26	19,25	17,02	17,54	14,87	17,82
MStaHis	22,77	38,28	33,00	34,22	27,70	33,03
MStaOH	16,64	22,75	20,85	21,56	18,59	19,78
MStaNH ₂	17,58	24,74	22,18	22,72	20,05	23,59

5.3 SEPARACE STRUKTURNĚ PODOBNÝCH DIPEPTIDOVÝCH DERIVÁTŮ METHIONIN-STATINU

Separace nově syntetizovaných dipeptidových derivátů methionin-statinu má velký význam při jejich čistění po syntéze a při jejich současném biologickém testování. Základní elektrolyty používané pro separaci analytů byly vybrány na základě jejich složení, pH a podle zkušeností získaných z předchozích analýz jednotlivých dipeptidů. Separace směsí dipeptidů byly provedeny v režimu CZE a MEKC. Rozdělení analytů do směsí I - III a směsí A a B bylo provedeno na základě naměřených hodnot efektivních elektroforetických pohyblivostí dipeptidů v BGE I-VI a podle jejich podobné struktury. Při separaci směsí byly testovány separační schopnosti BGE a určeny efektivní elektroforetické pohyblivosti jednotlivých analytů, elektroosmotická pohyblivost, dále pak rozlišení a účinnost separace.

5.3.1 Separace v módu CZE

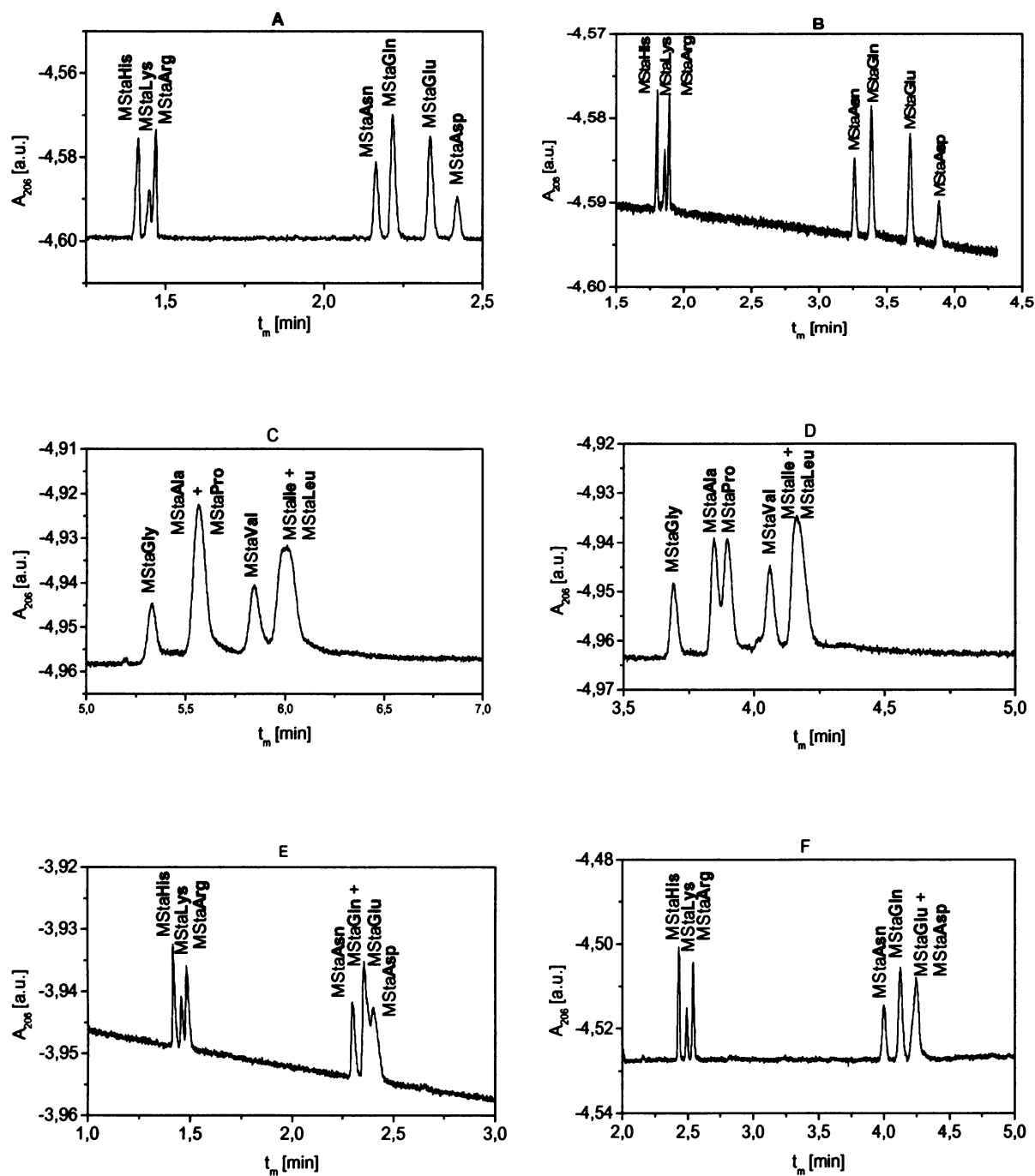
Dipeptidové deriváty methionin-statinu byly rozděleny do tří směsí (směs I - III), složení těchto směsí je uvedeno v **Tabulce 15**.

Tabulka 15 Rozdělení dipeptidových derivátů methionin-statinu do směsí I - III.

Směs		
I	II	III
MStalys	MStacys	MStagly
MStaarg	MStaser	MStapro
MStahis	MStathr	MStaala
MStaasn	MStamet	MStaval
MStaasp	MStaphe	MStaleu
MStagln	MStatrp	MStalle
MStaglu	MStatyr	-

Separace dipeptidů rozdělených do tří směsí (směsi I – III) byly provedeny v BGE I - VI, v těchto BGE různého složení, různé iontové síly a s přísadky 3 druhů celulosy (0,1 % (m/v) HEC, MHEC, MHPC). Směs I obsahovala analyty s bazickými a kyselými aminokyselinovými zbytky, směs II obsahovala analyty s aromatickými a polárními aminokyselinovými zbytky a směs III hydrofobní aminokyselinové zbytky. Výsledky těchto separací, efektivní pohyblivosti analytů, elektroosmotické pohyblivosti, rozlišení a účinnost separace jsou uvedeny v **Tabulkách 17 – 22** (viz str. 63 – 68).

Na základě porovnání kyselých klasických a izoelektrických BGE bylo zjištěno, že nejlepší podmínky pro separaci směsí I - III se objevily u izoelektrických základních elektrolytů, tj. 100 mM kyselina asparagová, pH 2,98, a 200 mM kyselina iminodioctová, pH 2,26, s přísávkami derivátů celulosy (viz **Tabulka 22**). Nejvyšší hodnotu separační účinnosti až $1,99 \cdot 10^6$ teoretických pater na metr poskytovala 200 mM kyselina iminodioctová (viz **Tabulka 17**). Nejlepší rozlišení separace bylo nalezeno ve 100 mM kyselině asparagové s přísávkou 0,1 % (m/v) MHEC (viz **Obr. 7B**). Změna kationtu v BGE (Tris, Na⁺, Li⁺) při těchto analýzách neměla zásadní vliv na rozlišení a separační účinnost (viz **Tabulka 18**). Na **Obrázku 7A a 7B** je ukázáno, že po přísávkou derivátů celulosy dochází k výraznému zlepšení rozlišení v tomto případě hlavně u analytů s bazickou funkční skupinou a k prodloužení času analýzy. Změna iontové síly elektrolytu vyvolala značné odlišnosti u rozlišení a účinnosti, a to takové, že jejich hodnoty se zvýšily u analýz s elektrolytem s nižší iontovou silou (viz **Tabulka 19, Obr. 7C a 7D**). Zvýšení rozlišení v izoelektrickém BGE oproti klasickému BGE je zobrazeno na **Obrázku 7E a 7F**.



Obrázek 7 CZE separace: (A) směsi I v 0,1 M kys. asparagové, pH 2,98; (B) směsi I v 0,1 M kys. asparagové; 0,1 % (m/v) MHEC, pH 2,98; (C) směsi III v 0,2 M H_3PO_4 ; 0,1 M LiOH, pH 2,18; (D) směsi III v 0,1 M H_3PO_4 ; 0,05 M LiOH, pH 2,18; (E) směsi I v 2 M kys. octové, pH 2,18; (F) směsi I v 0,2 M kys. iminodioctové, pH 2,26. Experimentální podmínky: křemenná kapilára celk./efekt. délka 310/200 mm, i.d./o.d. 50/375 μm , separační napětí 15 kV, UV absorpční detektor, $\lambda = 206$ nm.

5.3.2 Separace v módu CMEKC

Analyty byly nejprve rozděleny do tří směsí (směsi I - III), jejich rozdělení do směsí je uvedeno **Tabulce 15** a dále pak do dvou směsí (směsi A a B), toto rozdělení je uvedeno v **Tabulce 16**.

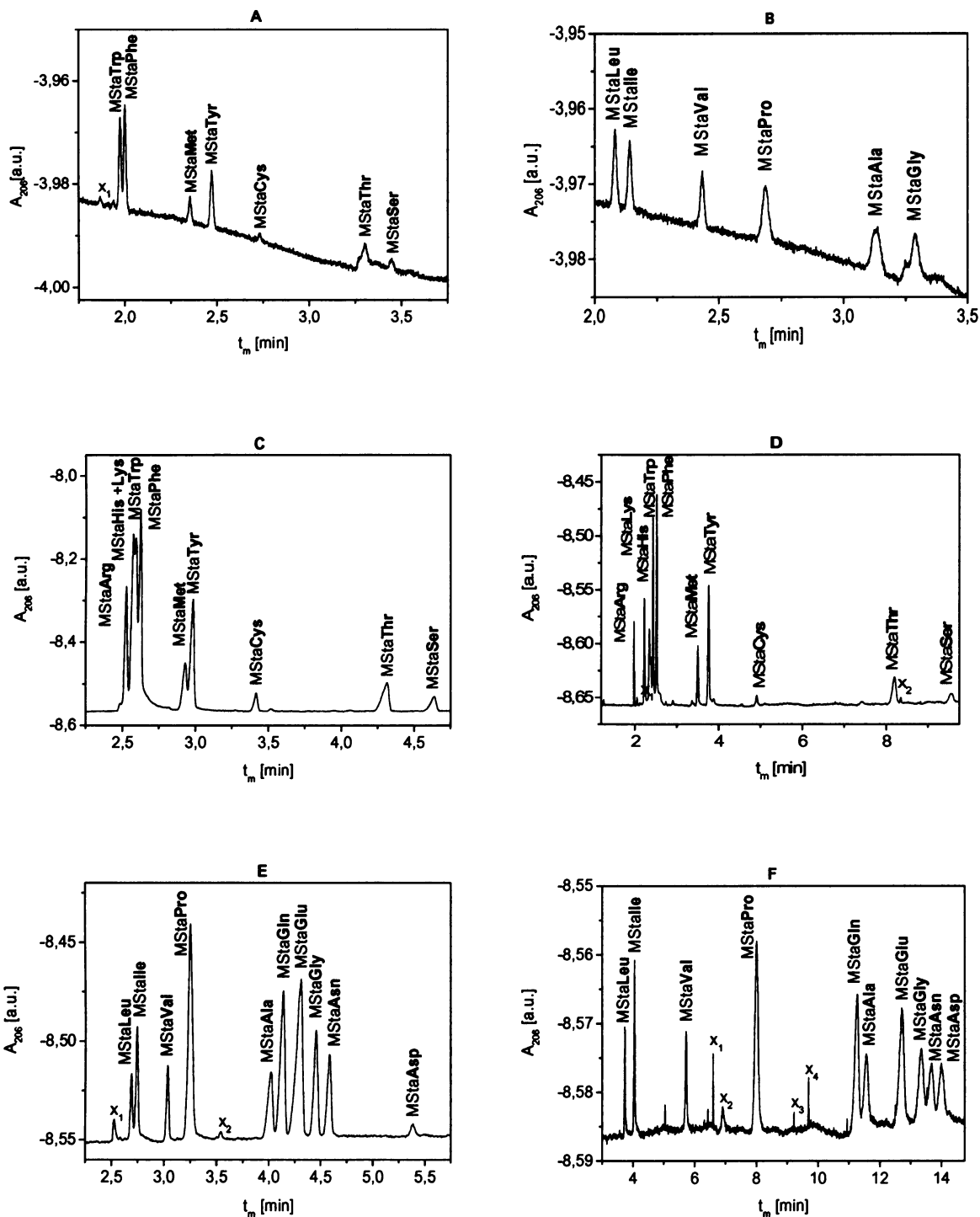
Tabulka 16 Rozdělení dipeptidových derivátů methionin-statinu do směsí A a B.

Směs	
A	B
MStalys	MStaAsn
MStaArg	MStaAsp
MStaHis	MStaGln
MStacys	MStaglu
MStaSer	MStagly
MStaThr	MStaPro
MStamet	MStaAla
MStaphe	MStaVal
MStatr	MStaLeu
MStatyr	MStalle

Separace dipeptidů byly uskutečněny v kyselých základních elektrolytech s micelární pseudofází tvořenou dodecylsulfátem

sodným (SDS) a dále v těchto elektrolytech s přísadkou organických modifikátorů (methanolu, acetonitrilu). Výsledky těchto separací, efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů, elektroosmotická pohyblivost, rozlišení a účinnost separace jsou uvedeny v **Tabulkách 23 – 28** (viz str. 69 – 74).

V porovnání s CZE separacemi mají separace v MEKC režimu obecně lepší rozlišení, ale za to delší čas analýzy. Porovnáním rozlišení a separační účinnosti mezi BGE s různou koncentrací SDS bylo zjištěno, že nejlepší podmínky separace se objevily u BGE s koncentrací SDS $c = 40$ mM. K výraznému zlepšení rozlišení a účinnosti separace došlo po přidání organických modifikátorů (methanol, acetonitril). Nejvyšší hodnoty separační účinnosti až $2,90 \cdot 10^6$ teoretických pater na metr (viz **Tabulka 26**) byly dosaženy v Tris-fosfátovém základním elektrolytu (100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS). Nejlepší rozlišení u MEKC separace směsí I - III bylo nalezeno u analýz v klasickém základním elektrolytu (2 M kys. octová; 20 mM SDS), separace směsí II a III jsou znázorněny na **Obrázku 8A** a **8B**. Důkazem úspěšné separace směsi A s nejlepším rozlišením je **Obrázek 8D** a směsi B **Obrázek 8F**, kdy se v obou případech jednalo o separaci v základním elektrolytu (100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS) s přísadkou organických modifikátorů acetonitrilu pro směs A a methanolu pro směs B. **Obrázky 8C** a **8E** představují MEKC separace směsí A a B v samotném základním elektrolytu (100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS) bez přísadky organických modifikátorů.



Obrázek 8 MEKC separace (A) směsi II ve 2 M AcOH; 40 mM SDS, pH 2,18; (B) směsi III ve 2 M AcOH; 40 mM SDS, pH 2,18; (C) směsi A v 100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS, pH 2,18; (D) směsi A v 100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS; 10 % (m/v) ACN, pH 2,18; (E) směsi B v 100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS, pH 2,18; (F) směsi B v 100 mM H_3PO_4 ; 50 mM Tris; 40 mM SDS; 20 % (m/v) MeOH, pH 2,18. Experimentální podmínky: křemenná kapilára celk./efekt. délka 310/200 mm, i.d./o.d. 50/375 μm , separační napětí 15 kV, UV absorpční detektor, $\lambda = 206$ nm.

Tabulka 17 CZE separace směsí I - III v BGE I, IV – VI. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	0,1 M H ₃ PO ₄ ; 0,05 M Tris				2 M AcOH				0,2 M kys. iminodictová				0,1 M kys. asparagová			
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
His	34,96	/	626000	40,29	/	330000	37,39	/	676000	37,83	/	376000	37,83	/	376000	
Lys	34,46	1,13	691000	38,95	1,72	316000	36,33	2,26	710000	36,66	1,59	324000	36,66	1,59	324000	
Arg	33,89	1,42	712000	38,12	0,95	214000	35,55	1,77	738000	36,00	0,95	573000	36,00	0,95	573000	
Asn	20,80	34,3	446000	21,60	26,3	414000	20,72	37,4	520000	21,00	29,9	473000	21,00	29,9	473000	
Gln	19,96	2,51	374000	20,89	1,21	130000	19,95	2,33	466000	20,23	1,82	460000	20,23	1,82	460000	
Glu	19,80	0,46	420000	20,89	0,00	130000	19,34	2,27	1220000	18,66	3,89	444000	18,66	3,89	444000	
Asp	19,39	1,26	368000	20,31	0,71	8900	19,22	0,40	329000	17,62	2,61	418000	17,62	2,61	418000	
$R_{av}=6,85$; $N_{av}=519571$ $R_{av}=5,15$; $N_{av}=220414$ $R_{av}=7,74$; $N_{av}=665571$ $R_{av}=6,79$; $N_{av}=438285$																
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
Cys	21,52	/	175000	21,84	/	301000	26,66	/	745000	28,14	/	655000	28,14	/	655000	
Ser	20,71	1,91	426000	21,84	0,00	301000	21,52	16,4	485000	21,48	15,5	497000	21,48	15,5	497000	
Thr	20,08	2,45	1250000	21,12	1,43	267000	20,75	2,20	452000	20,71	1,91	522000	20,71	1,91	522000	
Met	19,96	0,42	297000	20,43	1,43	352000	20,10	1,80	456000	20,11	1,55	502000	20,11	1,55	502000	
Phe	19,96	0,00	297000	20,05	0,75	203000	19,78	0,97	432000	19,79	0,79	442000	19,79	0,79	442000	
Trp	19,18	2,16	329000	19,18	1,51	190000	18,86	2,67	415000	19,05	1,77	405000	19,05	1,77	405000	
Tyr	19,05	0,38	415000	19,18	0,00	190000	18,86	0,00	415000	19,05	0,00	405000	19,05	0,00	405000	
$R_{av}=1,22$; $N_{av}=455571$ $R_{av}=2,95$; $N_{av}=257714$ $R_{av}=3,22$; $N_{av}=485714$ $R_{av}=3,07$; $N_{av}=489714$																
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
Gly	23,20	/	451000	23,82	/	395000	23,51	/	486000	23,07	/	463000	23,07	/	463000	
Ala	22,15	3,05	640000	22,80	1,88	339000	22,35	3,08	460000	21,94	2,49	425000	21,94	2,49	425000	
Pro	21,83	0,88	548000	22,20	1,02	266000	21,91	1,14	401000	21,50	1,01	355000	21,50	1,01	355000	
Val	20,88	2,85	482000	21,32	1,64	294000	20,87	2,64	357000	20,58	1,99	432000	20,58	1,99	432000	
Ile	20,32	1,50	159000	20,77	1,07	203000	20,70	0,58	1990000	20,00	1,27	304000	20,00	1,27	304000	
Leu	20,32	0,00	159000	20,55	0,47	197000	20,26	1,42	275000	20,00	0,00	304000	20,00	0,00	304000	
$R_{av}=1,66$; $N_{av}=406500$ $R_{av}=1,22$; $N_{av}=282333$ $R_{av}=1,77$; $N_{av}=661500$ $R_{av}=1,35$; $N_{av}=380500$																

Tabulka 18 CZE separace směsí I - III v 100 mM H₃PO₄; 50 mM Tris(NaOH)/LiOH. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [10^{-9} m²·V⁻¹·s⁻¹]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

	H ₃ PO ₄ ; Tris		m _{eo} =2,89		H ₃ PO ₄ ; NaOH		m _{eo} =3,07		H ₃ PO ₄ ; LiOH		m _{eo} =3,31	
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
His	34,96	/	626000	39,97	/	659000	38,56	/	752000			
Lys	34,46	1,13	691000	39,37	1,23	677000	37,97	1,23	709000			
Arg	33,89	1,42	712000	38,67	1,43	553000	37,31	1,44	624000			
Asn	20,80	34,3	446000	23,05	34,4	429000	22,35	34,0	432000			
Gln	19,96	2,51	374000	22,10	2,57	381000	21,47	2,48	412000			
Glu	19,80	0,46	420000	21,71	1,03	352000	21,16	0,88	271000			
Asp	19,39	1,26	368000	21,42	0,70	261000	20,84	0,71	326000			
R_{av}=6,85; N_{av}=519571												
R_{av}=6,89; N_{av}=473142												
R_{av}=6,79; N_{av}=503714												
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Cys	21,52	/	175000	23,90	/	181000	23,50	/	192000			
Ser	20,71	1,91	426000	23,04	1,82	640000	22,64	1,81	868000			
Thr	20,08	2,45	1250000	22,29	2,54	1710000	21,93	2,34	1650000			
Met	19,96	0,42	297000	22,15	0,40	412000	21,78	0,41	300000			
Phe	19,96	0,00	297000	22,15	0,00	412000	21,78	0,00	300000			
Trp	19,18	2,16	329000	21,17	2,26	332000	20,86	2,20	278000			
Tyr	19,05	0,38	415000	21,04	0,40	547000	20,75	0,47	617000			
R_{av}=1,22; N_{av}=455571												
R_{av}=2,97; N_{av}=604857												
R_{av}=3,31; N_{av}=600714												
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Gly	23,20	/	451000	25,84	/	434000	25,02	/	432000			
Ala	22,15	3,05	640000	24,67	2,83	365000	23,88	2,90	412000			
Pro	21,83	0,88	548000	24,33	0,75	244000	23,52	0,87	311000			
Val	20,88	2,85	482000	23,17	2,64	408000	22,44	2,66	407000			
Ile	20,32	1,50	159000	22,55	1,19	135000	21,85	1,77	574000			
Leu	20,32	0,00	159000	22,55	0,00	135000	21,75	0,32	578000			
R_{av}=1,66; N_{av}=406500												
R_{av}=1,48; N_{av}=286833												
R_{av}=1,70; N_{av}=452333												

Tabulka 19 CZE separace směsí I - III v lithium-fosfátovém pufru o různé iontové síle. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; N , počet teoretických pater; R_{av} , průměrné rozlišení; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	0,1 M H ₃ PO ₄ ; 0,05 M LiOH			0,2 M H ₃ PO ₄ ; 0,1 M LiOH			0,4 M H ₃ PO ₄ ; 0,2 M LiOH			
	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
Směs I, MStaXaa										
His	38,56	/	752000	31,91	/	493000	24,87	/	345000	
Lys	37,97	1,23	709000	31,91	0,00	493000	24,53	0,79	353000	
Arg	37,31	1,44	624000	31,20	1,55	490000	24,29	0,55	294000	
Asn	22,35	34,0	432000	18,84	27,6	282000	14,80	24,1	270000	
Gln	21,47	2,48	412000	17,93	2,45	313000	14,00	2,54	260000	
Glu	21,16	0,88	271000	17,22	1,77	185000	13,39	1,69	136000	
Asp	20,84	0,71	326000	17,22	0,00	185000	13,39	0,00	136000	
			$R_{av}=6,79$; $N_{av}=503714$				$R_{av}=4,94$; $N_{av}=256285$			
Směs II, MStaXaa										
Cys	23,50	/	192000	20,21	/	328000	16,25	/	454000	
Ser	22,64	1,81	868000	19,97	0,55	239000	15,95	1,09	385000	
Thr	21,93	2,34	1650000	19,38	1,27	382000	15,54	1,42	337000	
Met	21,78	0,41	300000	18,74	1,57	267000	15,12	1,29	221000	
Phe	21,78	0,00	300000	18,74	0,00	267000	15,12	0,00	221000	
Trp	20,86	2,20	278000	17,84	2,32	290000	14,34	2,28	238000	
Tyr	20,75	0,47	617000	17,57	0,75	262000	14,01	1,02	244000	
			$R_{av}=3,31$; $N_{av}=600714$				$R_{av}=3,19$; $N_{av}=290714$			
Směs III, MStaXaa										
Gly	25,02	/	432000	21,59	/	397000	17,50	/	159000	
Ala	23,88	2,90	412000	20,52	2,42	189000	16,71	1,85	221000	
Pro	23,52	0,87	311000	20,52	0,00	189000	16,71	0,00	221000	
Val	22,44	2,66	407000	19,33	2,73	326000	15,69	2,92	307000	
Ile	21,85	1,77	574000	18,70	1,75	337000	15,16	1,67	263000	
Leu	21,75	0,32	578000	18,65	0,14	509000	15,08	0,23	309000	
			$R_{av}=1,70$; $N_{av}=452333$				$R_{av}=1,41$; $N_{av}=324500$			
							$R_{av}=1,33$; $N_{av}=246667$			

Tabulka 20 CZE separace směsí I - III v BGE I (100 mM H₃PO₄; 50 mM Tris); 0,1 % (m/v) HEC/MHEC/MHPC. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [10^{-9} m²·V⁻¹·s⁻¹]; R, rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N, počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	H ₃ PO ₄ ; Tris		H ₃ PO ₄ ; Tris; HEC		H ₃ PO ₄ ; Tris; MHEC		H ₃ PO ₄ ; Tris; MHPC		
	m_{ef}	R	m_{ef}	R	m_{ef}	R	m_{ef}	R	
Směs I, MStaXaa	$m_{eo}=2,89$		$m_{eo}=0,77$		$m_{eo}=1,02$		$m_{eo}=1,01$		
His	34,96	/	31,98	/	35,78	/	34,83	/	
Lys	34,46	1,13	31,38	1,29	35,27	1,24	34,27	1,25	
Arg	33,89	1,42	30,74	1,45	34,63	1,54	33,57	1,59	
Asn	20,80	34,3	16,73	34,1	20,67	37,5	18,73	35,8	
Gln	19,96	2,51	15,86	2,67	19,75	3,01	17,79	2,73	
Glu	19,80	0,46	15,72	0,51	19,54	0,72	17,63	0,49	
Asp	19,39	1,26	15,31	1,45	19,18	1,19	17,20	1,36	
		$R_{av}=6,85; N_{av}=519571$		$R_{av}=6,91; N_{av}=332285$		$R_{av}=7,53; N_{av}=510571$		$R_{av}=7,20; N_{av}=388285$	
Směs II, MStaXaa	$m_{eo}=1,22; N_{av}=455571$		$m_{eo}=3,52; N_{av}=408571$		$m_{eo}=3,44; N_{av}=421142$		$m_{eo}=3,28; N_{av}=371571$		
Cys	21,52	/	21,69	/	21,62	/	21,49	/	
Ser	20,71	1,91	20,89	2,13	20,76	2,20	20,69	1,92	
Thr	20,08	2,45	20,17	2,52	20,06	2,80	19,93	2,69	
Met	19,96	0,42	20,03	0,62	19,92	0,51	19,82	0,38	
Phe	19,96	0,00	20,03	0,00	19,92	0,00	19,82	0,00	
Trp	19,18	2,16	19,18	2,72	19,04	2,90	18,97	2,77	
Tyr	19,05	0,38	19,11	0,35	18,96	0,30	18,88	0,31	
		$R_{av}=1,22; N_{av}=455571$		$R_{av}=3,52; N_{av}=408571$		$R_{av}=3,44; N_{av}=421142$		$R_{av}=3,28; N_{av}=371571$	
Směs III, MStaXaa	$m_{eo}=1,66; N_{av}=406500$		$m_{eo}=1,78; N_{av}=319333$		$m_{eo}=1,80; N_{av}=316633$		$m_{eo}=1,73; N_{av}=2898333$		
Gly	23,20	/	23,37	/	23,38	/	23,17	/	
Ala	22,15	3,05	22,26	3,32	22,26	3,30	22,05	3,21	
Pro	21,83	0,88	21,94	0,95	21,95	0,91	21,74	0,91	
Val	20,88	2,85	20,93	3,13	20,91	3,16	20,72	2,97	
Ile	20,32	1,50	20,31	1,49	20,23	1,61	20,04	1,55	
Leu	20,32	0,00	20,31	0,00	20,23	0,00	20,04	0,00	
		$R_{av}=1,66; N_{av}=406500$		$R_{av}=1,78; N_{av}=319333$		$R_{av}=1,80; N_{av}=316633$		$R_{av}=1,73; N_{av}=2898333$	

Tabulka 21 CZE separace směsí I - III v BGE III (2 M AcOH), 0,1 % (m/v) HEC/MHEC/MHPC. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{so} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	2 M AcOH		$m_{so}=8,15$		AcOH; HEC		$m_{so}=0,55$		AcOH; MHEC		$m_{so}=0,49$		AcOH; MHPC		$m_{so}=0,43$
Směs I, MStaxaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
His	40,29	/	330000	39,62	/	445000	39,86	/	227000	40,44	/	466000			
Lys	38,95	1,72	316000	38,33	2,27	476000	38,50	1,79	242000	39,12	2,53	551000			
Arg	38,12	0,95	214000	37,51	1,45	380000	37,67	1,03	164000	38,29	1,54	392000			
Asn	21,60	26,3	414000	21,00	38,3	385000	21,12	28,1	264000	21,76	38,9	461000			
Gln	20,89	1,21	130000	20,22	2,31	318000	20,38	1,90	252000	20,97	2,45	335000			
Glu	20,89	0,00	130000	19,98	0,74	338000	20,22	0,41	237000	20,75	0,69	412000			
Asp	20,31	0,71	8900	19,66	0,97	230000	19,82	0,75	109000	20,41	0,96	236000			
$R_{av}=5,15; N_{av}=220414$ $R_{av}=7,67; N_{av}=367428$ $R_{av}=5,66; N_{av}=213571$ $R_{av}=7,85; N_{av}=407571$															
Směs II, MStaxaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Cys	21,84	/	301000	21,68	/	399000	21,70	/	205000	22,20	/	364000			
Ser	21,84	12,6	351000	21,68	18,7	419000	21,70	13,9	246000	22,20	17,4	389000			
Thr	21,12	1,43	267000	20,82	2,43	427000	20,95	2,03	231000	21,46	2,20	379000			
Met	20,43	1,43	352000	20,12	2,49	506000	20,26	2,31	418000	20,75	2,71	473000			
Phe	20,05	0,75	203000	19,72	1,42	360000	19,84	1,24	425000	20,34	1,48	534000			
Trp	19,18	1,51	190000	18,82	2,83	297000	18,95	2,33	246000	19,44	2,77	372000			
Tyr	19,18	0,00	190000	18,82	0,00	297000	18,95	0,00	212000	19,44	0,00	327000			
$R_{av}=2,95; N_{av}=264857$ $R_{av}=4,64; N_{av}=386428$ $R_{av}=3,64; N_{av}=283285$ $R_{av}=4,43; N_{av}=405428$															
Směs III, MStaxaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Gly	23,82	/	395000	23,32	/	400000	23,57	/	350000	23,87	/	430000			
Ala	22,80	1,88	339000	22,24	3,28	439000	22,50	2,59	224000	22,79	3,00	327000			
Pro	22,20	1,02	266000	21,68	1,74	376000	21,89	1,42	237000	22,21	1,64	398000			
Val	21,32	1,64	294000	20,79	2,86	475000	21,01	2,33	378000	21,33	2,86	479000			
Ile	20,77	1,07	203000	20,24	1,46	161000	20,44	1,35	139000	20,76	1,66	246000			
Leu	20,55	0,47	197000	20,00	0,76	640000	20,23	0,56	524000	20,61	0,48	730000			
$R_{av}=1,22; N_{av}=282333$ $R_{av}=2,02; N_{av}=415167$ $R_{av}=1,65; N_{av}=308667$ $R_{av}=1,93; N_{av}=435000$															

Tabulka 22 CZE separace směsí I - III v BGE V (200 mM kyselina iminodictová), 0,1 % (m/v) HEC/MHEC/MHPC. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	0,2 M IDAA		$m_{eo}=5,12$		IDAA; HEC		$m_{eo}=1,74$		IDAA; MHEC		$m_{eo}=1,62$		IDAA; MHPC		$m_{eo}=1,54$	
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
His	37,39	/	676000	34,67	/	661000	35,82	/	742000	36,40	/	663000	35,37	2,31	700000	
Lys	36,33	2,26	710000	33,89	2,51	699000	34,81	2,55	727000	35,37	2,31	700000	34,52	1,91	732000	
Arg	35,55	1,77	738000	32,96	2,09	731000	33,95	2,16	661000	34,52	1,91	732000	19,31	42,5	413000	
Asn	20,72	37,4	520000	17,42	40,6	400000	18,93	43,2	495000	19,31	42,5	413000	18,50	2,86	407000	
Gln	19,95	2,33	466000	17,00	2,72	419000	18,11	2,99	415000	18,50	2,86	407000	17,85	2,44	703000	
Glu	19,34	2,27	1220000	16,56	2,52	826000	17,47	2,34	443000	17,85	2,44	703000	17,76	0,31	297000	
Asp	19,22	0,40	329000	16,41	0,58	313000	17,39	0,29	312000	17,76	0,31	297000				
$R_{av}=7,74$; $N_{av}=665571$ $R_{av}=8,50$; $N_{av}=578428$ $R_{av}=8,92$; $N_{av}=542142$ $R_{av}=8,72$; $N_{av}=559285$																
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
Cys	26,66	/	745000	24,01	/	685000	25,06	/	686000	25,84	/	557000	20,16	18,0	476000	
Ser	21,52	16,4	485000	18,77	18,3	443000	19,53	19,9	409000	20,16	18,0	476000	19,38	2,84	551000	
Thr	20,75	2,20	452000	17,52	2,52	429000	18,76	2,59	455000	19,38	2,84	551000	18,72	2,57	527000	
Met	20,10	1,80	456000	17,21	2,26	359000	18,10	2,31	441000	18,72	2,57	527000	18,38	1,25	407000	
Phe	19,78	0,97	432000	16,51	1,13	394000	17,77	1,19	405000	18,38	1,25	407000	17,39	3,49	389000	
Trp	18,86	2,67	415000	15,96	3,50	378000	16,81	3,53	379000	17,39	3,49	389000				
Tyr	18,86	0,00	415000	15,96	0,00	378000	16,81	0,00	379000	17,39	0,00	389000				
$R_{av}=3,22$; $N_{av}=485714$ $R_{av}=3,96$; $N_{av}=438000$ $R_{av}=4,22$; $N_{av}=450571$ $R_{av}=4,02$; $N_{av}=470857$																
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	
Gly	23,51	/	486000	20,34	/	448000	21,29	/	460000	22,01	/	468000	20,81	3,83	433000	
Ala	22,35	3,08	460000	19,36	3,71	429000	20,13	3,81	458000	20,81	3,83	433000	20,40	1,32	406000	
Pro	21,91	1,14	401000	18,92	1,32	402000	19,71	1,35	344000	20,40	1,32	406000	19,33	3,48	420000	
Val	20,87	2,64	357000	17,56	3,42	403000	18,70	3,33	458000	19,33	3,48	420000	18,67	0,00	420000	
Ile	20,70	0,58	1990000	17,56	0,00	403000	18,70	0,00	458000	18,67	0,00	420000				
Leu	20,26	1,42	275000	17,14	1,80	189000	18,04	1,92	197000	18,67	1,89	217000				
$R_{av}=1,77$; $N_{av}=661500$ $R_{av}=2,05$; $N_{av}=379000$ $R_{av}=2,08$; $N_{av}=395833$ $R_{av}=2,10$; $N_{av}=394000$																

Tabulka 23 MEKC separace směsí I - III v 100 mM H₃PO₄; 50 mM Tris; 20/40 mM SDS. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [10^{-9} m²V⁻¹s⁻¹]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	H ₃ PO ₄ ; Tris; 20 mM SDS			H ₃ PO ₄ ; Tris; 40 mM SDS		
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Arg	-39,59	/	166000	-50,28	/	425000
His	-38,31	1,43	377000	-49,11	1,31	308000
Lys	-38,31	0,00	377000	-49,11	0,00	308000
Gln	-15,42	25,3	321000	-26,04	29,8	195000
Glu	-13,53	3,45	299000	-24,77	2,26	220000
Asn	-12,66	1,97	545000	-23,48	2,64	283000
Asp	-11,67	2,80	582000	-22,69	1,93	275000
			$R_{av}=5,82$; $N_{av}=381000$	$R_{av}=6,32$; $N_{av}=287714$		
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Trp	-39,82	/	466000	-40,21	/	295000
Phe	-38,15	1,97	828000	-39,83	0,60	272000
Met	-37,27	1,18	104000	-34,50	8,02	262000
Tyr	-29,44	11,8	134000	-33,81	1,19	274000
Cys	-28,80	1,24	125000	-28,58	9,39	269000
Thr	-21,73	16,1	673000	-21,62	14,2	194000
Ser	-13,33	21,5	842000	-19,62	5,27	234000
			$R_{av}=8,96$; $N_{av}=453142$	$R_{av}=5,73$; $N_{av}=257142$		
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-35,03	/	154000	-37,27	/	226000
Ile	-33,76	2,28	126000	-36,44	1,15	247000
Val	-27,57	11,5	117000	-32,16	6,23	203000
Pro	-24,14	4,33	221000	-29,52	3,50	118000
Ala	-15,73	11,7	405000	-22,44	10,9	177000
Gly	-13,77	4,33	546000	-20,72	3,51	183000
			$R_{av}=6,81$; $N_{av}=261500$	$R_{av}=5,06$; $N_{av}=192333$		

Tabulka 24 MEKC separace směsí I - III v 2 M AcOH; 20/40/60 mM SDS. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	AcOH; 20 mM SDS			AcOH; 40 mM SDS			AcOH; 60 mM SDS		
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Arg	-41,91	/	443000	-44,82	/	793000	-34,71	/	999000
His	-40,98	1,27	205000	-44,19	1,18	534000	-34,09	0,86	791000
Lys	-40,98	0,00	205000	-44,19	0,00	534000	-34,09	0,00	791000
Gln	-15,96	45,4	281000	-26,61	34,6	392000	-19,59	25,7	1090000
Glu	-14,44	5,32	311000	-25,08	3,95	418000	-18,35	2,95	866000
Asn	-14,19	0,78	169000	-24,67	1,02	314000	-17,89	1,09	902000
Asp	-13,40	3,37	471000	-23,99	1,83	699000	-17,34	1,42	1110000
$R_{av}=9,36$; $N_{av}=297857$ $R_{av}=7,10$; $N_{av}=526285$ $R_{av}=5,33$; $N_{av}=935571$									
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Trp	-35,96	/	436000	-42,10	/	586000	-32,87	/	642000
Phe	-34,37	2,31	155000	-41,54	1,09	601000	-32,47	0,13	299000
Met	-25,24	14,6	289000	-35,09	14,0	638000	-27,06	1,27	155000
Tyr	-23,52	4,12	392000	-33,34	4,03	517000	-25,35	0,41	179000
Cys	-19,33	16,5	623000	-30,01	8,18	589000	-22,83	0,71	223000
Thr	-14,30	26,3	646000	-24,59	15,6	559000	-18,33	0,82	33000
Ser	-12,80	8,98	619000	-23,53	3,24	468000	-17,39	0,17	770000
$R_{av}=12,3$; $N_{av}=451428$ $R_{av}=7,69$; $N_{av}=565428$ $R_{av}=0,59$; $N_{av}=328714$									
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-31,49	/	104000	-39,97	/	496000	-31,20	/	104000
Ile	-29,82	2,30	290000	-38,85	2,07	446000	-30,31	0,07	152000
Val	-23,63	13,1	327000	-34,04	9,52	497000	-26,32	0,93	221000
Pro	-19,72	8,60	173000	-30,69	6,23	245000	-23,44	0,59	348000
Ala	-15,32	12,6	380000	-26,07	7,68	180000	-19,87	1,16	242000
Gly	-13,83	6,04	363000	-24,80	2,40	254000	-18,78	1,34	291000
$R_{av}=8,53$; $N_{av}=272833$ $R_{av}=5,58$; $N_{av}=353000$ $R_{av}=0,82$; $N_{av}=226333$									

Tabulka 25 MEKC separace směsí I - III v 200 mM kyselině iminodiocetové; 20/40 mM SDS. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	IDAA; 20 mM SDS			IDAA; 40 mM SDS		
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Arg	-35,49	/	410000	-40,47	/	323000
His	-34,72	1,05	595000	-39,92	0,85	281000
Lys	-34,72	0,00	595000	-39,92	0,00	281000
Gln	-14,14	29,0	421000	-25,57	25,3	271000
Glu	-11,71	5,65	468000	-23,72	3,91	249000
Asn	-11,35	1,06	600000	-23,40	0,94	384000
Asp	-9,80	5,27	865000	-22,13	3,37	314000
$R_{av}=7,00$; $N_{av}=564857$						
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Trp	-34,10	/	200000	-40,05	/	317000
Phe	-33,22	1,48	260000	-39,67	0,63	436000
Met	-26,42	9,64	475000	-35,32	8,15	454000
Tyr	-25,59	1,31	460000	-34,64	1,38	471000
Cys	-19,31	13,7	936000	-30,18	9,88	467000
Thr	-11,54	21,5	788000	-23,88	15,0	330000
Ser	-9,56	6,43	536000	-22,17	4,77	455000
$R_{av}=5,73$; $N_{av}=300428$						
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-32,10	/	380000	-38,82	/	412000
Ile	-31,24	2,29	480000	-38,10	1,33	456000
Val	-25,40	11,4	320000	-34,24	6,93	352000
Pro	-22,41	4,59	275000	-31,98	3,65	182000
Ala	-14,41	14,2	750000	-25,66	10,7	295000
Gly	-12,69	5,00	774000	-24,18	3,40	341000
$R_{av}=5,20$; $N_{av}=339667$						
Směs I, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-32,10	/	380000	-38,82	/	412000
Ile	-31,24	2,29	480000	-38,10	1,33	456000
Val	-25,40	11,4	320000	-34,24	6,93	352000
Pro	-22,41	4,59	275000	-31,98	3,65	182000
Ala	-14,41	14,2	750000	-25,66	10,7	295000
Gly	-12,69	5,00	774000	-24,18	3,40	341000
$R_{av}=7,00$; $N_{av}=564857$						
Směs II, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Trp	-34,10	/	200000	-40,05	/	317000
Phe	-33,22	1,48	260000	-39,67	0,63	436000
Met	-26,42	9,64	475000	-35,32	8,15	454000
Tyr	-25,59	1,31	460000	-34,64	1,38	471000
Cys	-19,31	13,7	936000	-30,18	9,88	467000
Thr	-11,54	21,5	788000	-23,88	15,0	330000
Ser	-9,56	6,43	536000	-22,17	4,77	455000
$R_{av}=6,64$; $N_{av}=418571$						
Směs III, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-32,10	/	380000	-38,82	/	412000
Ile	-31,24	2,29	480000	-38,10	1,33	456000
Val	-25,40	11,4	320000	-34,24	6,93	352000
Pro	-22,41	4,59	275000	-31,98	3,65	182000
Ala	-14,41	14,2	750000	-25,66	10,7	295000
Gly	-12,69	5,00	774000	-24,18	3,40	341000
$R_{av}=5,20$; $N_{av}=339667$						

Tabulka 26 MEKC separace směsí A a B v 100 mM H₃PO₄; 50 mM Tris; 40 mM SDS; 20 % (v/v) MeOH/10 % (v/v) ACN. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; poměrblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R, rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N, počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	H ₃ PO ₄ ; Tris; 40 mM SDS				H ₃ PO ₄ ; Tris; 40 mM SDS; 20 % MeOH				H ₃ PO ₄ ; Tris; 40 mM SDS; 10 % ACN					
	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{eo} =1,14	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{eo} =0,86	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{eo} =0,68		
Směs A, MStaXaa														
Arg	-44,37	/	1295000		-30,01	/	396000		-41,26	/	1012000			
His	-43,53	1,10	1029000		-27,92	2,67	528000		-39,11	2,65	679000			
Lys	-43,53	0,00	1029000		-27,54	0,57	637000		-38,55	0,59	468000			
Trp	-43,19	0,51	1858000		-25,10	4,01	649000		-37,74	0,98	1205000			
Phe	-42,68	0,82	1396000		-23,84	2,32	717000		-36,37	2,12	992000			
Met	-38,04	6,10	707000		-13,66	22,8	561000		-25,95	18,2	1011000			
Tyr	-37,39	0,89	1093000		-11,86	5,49	543000		-24,10	3,99	980000			
Cys	-32,46	8,59	1437000		-9,36	6,66	203000		-18,25	14,5	940000			
Thr	-25,48	12,2	641000		-7,49	6,75	663000		-10,60	24,6	696000			
Ser	-23,62	3,69	1093000		-6,51	8,82	604000		-8,95	6,83	570000			
				$R_{av}=3,78$; $N_{av}=1157800$					$R_{av}=6,68$; $N_{av}=550100$					$R_{av}=8,28$; $N_{av}=855300$
Směs B, MStaXaa														
Leu	-41,59	/	888000		-22,19	/	1392000		-33,80	/	1144000			
Ile	-40,72	1,18	1172000		-20,42	5,23	1349000		-31,83	3,60	1286000			
Val	-36,71	6,42	1433000		-14,20	20,4	1007000		-24,20	16,2	1156000			
Pro	-34,15	3,54	538000		-9,89	14,5	443000		-19,13	8,39	261000			
Ala	-27,40	8,79	558000		-6,78	14,3	685000		-13,01	12,8	582000			
Gln	-26,57	1,29	668000		-6,59	1,10	533000		-12,27	2,48	699000			
Glu	-25,56	1,85	940000		-5,92	4,04	619000		-11,08	3,74	385000			
Gly	-25,46	0,27	2900000		-5,59	2,23	711000		-10,91	0,57	704000			
Asn	-24,60	2,31	1012000		-5,44	1,24	1057000		-10,28	2,46	578000			
Asp	-23,87	1,64	1071000		-5,30	1,23	751000		-9,87	1,65	744000			
				$R_{av}=3,03$; $N_{av}=1118000$					$R_{av}=7,14$; $N_{av}=854700$					$R_{av}=5,77$; $N_{av}=753900$

Tabulka 27 MEKC separace směsí A a B v 2 M AcOH; 40 mM SDS; 5% (v/v) ACN. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	2 M AcOH; 40 mM SDS				2 M AcOH; 40 mM SDS; 5 % ACN				
Směs A, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Arg	-39,69	/	350000	-37,84	/	1240000			
His	-39,19	0,03	849000	-36,68	1,77	473000			
Lys	-39,19	0,00	849000	-36,31	0,63	1000000			
Trp	-37,59	0,96	601000	-32,63	6,56	803000			
Phe	-37,12	0,52	615000	-31,61	1,84	799000			
Met	-31,66	3,85	108000	-22,53	17,8	979000			
Tyr	-30,29	1,15	737000	-20,62	5,22	1070000			
Cys	-27,50	0,83	830000	-17,58	11,0	1060000			
Thr	-22,91	1,46	108000	-13,04	15,7	1020000			
Ser	-22,01	0,61	668000	-12,10	3,48	896000			
$R_{av}=1,05$; $N_{av}=571500$ $R_{av}=7,11$; $N_{av}=934000$									
Směs B, MStaXaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-34,81	/	1146000	-29,29	/	880000			
Ile	-33,88	1,60	1208000	-27,96	2,85	948000			
Val	-29,91	7,40	1178000	-21,90	12,6	865000			
Pro	-27,14	4,78	631000	-18,56	7,92	355000			
Ala	-23,52	6,88	990000	-15,04	8,43	622000			
Gln	-23,52	0,00	990000	-15,04	0,00	682000			
Gly	-22,57	2,36	1076000	-13,82	2,27	875000			
Asn	-22,27	0,69	790000	-13,66	0,36	794000			
Glu	-21,82	0,98	1144000	-13,14	1,62	968000			
Asp	-21,19	1,74	1462000	-12,56	1,96	927000			
$R_{av}=2,94$; $N_{av}=1061500$ $R_{av}=4,22$; $N_{av}=791600$									

Tabulka 28 MEKC separace směsí A a B v 200 mM kyselíné iminodictové; 40 mM SDS; 10% (v/v) MeOH/10 % (v/v) ACN. m_{ef} , efektivní elektroforetická pohyblivost; m_{eo} , elektroosmotická pohyblivost; pohyblivosti udány v jednotkách [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]; R , rozlišení; R_{av} , průměrné rozlišení; N , počet teoretických pater; N_{av} , průměrný počet teoretických pater.

BGE	IDAA; 40 mM SDS			$m_{eo}=1,31$			IDAA ;40 mM SDS; 10% MeOH			$m_{eo}=1,16$			IDAA ;40 mM SDS; 10% ACN			$m_{eo}=1,24$		
Směs A, MStaxaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Arg	-44,24	/	803000	-31,07	/	549000	-36,35	/	549000	-36,35	/	549000	-36,35	/	763000	-36,35	/	763000
Hls	-43,01	0,97	241000	-30,26	0,88	324000	-34,66	2,17	324000	-34,66	2,17	324000	-34,66	2,17	677000	-34,66	2,17	677000
Lys	-43,01	0,00	241000	-30,26	0,00	324000	-34,21	0,59	324000	-34,21	0,59	324000	-34,21	0,59	695000	-34,21	0,59	695000
Trp	-42,45	0,42	556000	-29,49	0,88	605000	-33,04	1,59	605000	-33,04	1,59	605000	-33,04	1,59	743000	-33,04	1,59	743000
Phe	-42,45	0,00	556000	-28,83	0,97	751000	-31,62	1,96	751000	-31,62	1,96	751000	-31,62	1,96	667000	-31,62	1,96	667000
Met	-36,82	5,15	375000	-22,59	9,98	556000	-21,82	17,0	556000	-21,82	17,0	556000	-21,82	17,0	835000	-21,82	17,0	835000
Tyr	-35,80	1,04	640000	-21,50	1,97	691000	-20,00	4,04	691000	-20,00	4,04	691000	-20,00	4,04	752000	-20,00	4,04	752000
Cys	-30,39	7,01	628000	-17,17	9,14	644000	-15,56	8,14	644000	-15,56	8,14	644000	-15,56	8,14	265000	-15,56	8,14	265000
Thr	-23,02	11,3	557000	-11,02	15,1	456000	-14,46	0,86	456000	-14,46	0,86	456000	-14,46	0,86	228000	-14,46	0,86	228000
Ser	-20,93	1,64	1660000	-9,83	4,56	1360000	-13,92	0,22	1360000	-13,92	0,22	1360000	-13,92	0,22	1020000	-13,92	0,22	1020000
$R_{av}=3,06$; $N_{av}=625700$																		
Směs B, MStaxaa	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]	m_{ef}	R	N [t.p./m]
Leu	-41,96	/	396000	-27,42	/	825000	-29,06	/	825000	-29,06	/	825000	-29,06	/	939000	-29,06	/	939000
Ile	-41,07	0,80	593000	-26,25	2,09	893000	-27,20	3,59	893000	-27,20	3,59	893000	-27,20	3,59	1070000	-27,20	3,59	1070000
Val	-36,30	4,05	261000	-21,38	9,56	802000	-20,00	15,5	802000	-20,00	15,5	802000	-20,00	15,5	846000	-20,00	15,5	846000
Pro	-33,20	2,56	310000	-18,04	5,91	341000	-15,38	8,06	341000	-15,38	8,06	341000	-15,38	8,06	225000	-15,38	8,06	225000
Ala	-25,82	7,79	363000	-13,22	9,57	467000	-9,65	2,94	467000	-9,65	2,94	467000	-9,65	2,94	750000	-9,65	2,94	750000
Gln	-25,26	0,76	523000	-12,03	3,35	687000	-7,70	0,00	687000	-7,70	0,00	687000	-7,70	0,00	750000	-7,70	0,00	750000
Gly	-23,98	1,83	378000	-11,59	1,48	732000	-7,70	0,25	732000	-7,70	0,25	732000	-7,70	0,25	346000	-7,70	0,25	346000
Asn	-23,15	1,15	367000	-11,52	0,34	736000	-7,23	2,44	736000	-7,23	2,44	736000	-7,23	2,44	350000	-7,23	2,44	350000
Glu	-22,68	0,70	464000	-10,81	2,78	444000	-6,59	1,74	444000	-6,59	1,74	444000	-6,59	1,74	361000	-6,59	1,74	361000
Asp	-21,25	2,30	433000	-10,49	0,96	527000	-5,43	0,70	527000	-5,43	0,70	527000	-5,43	0,70	531000	-5,43	0,70	531000
$R_{av}=2,44$; $N_{av}=408800$																		
$R_{av}=4,00$; $N_{av}=645400$																		
$R_{av}=4,84$; $N_{av}=626000$																		
$R_{av}=4,06$; $N_{av}=664500$																		
$R_{av}=3,91$; $N_{av}=616800$																		

6 ZÁVĚR

Výsledky v této diplomové práci dokazují, že kapilární zónová elektroforéza (CZE) a kapilární micelární elektrokinetická chromatografie (CMEKC) jsou vhodnými metodami pro analýzu peptidů. Tyto metody s vysokou účinností a citlivostí jsou vhodné pro kvalitativní a kvantitativní analýzu, fyzikálně-chemickou charakterizaci a separaci nově syntetizovaných dipeptidových derivátů methionin-statinu.

Byla provedena analýza dipeptidových derivátů methionin-statinu metodou CZE v klasických a izoelektrických základních elektrolytech v kyselé oblasti pH (pH = 2,05 – 2,98) a dále byly stanoveny jejich stupně čistoty v těchto základních elektrolytech. Byly určeny základní charakteristiky detektoru, který byl součástí CE analyzátoru sestaveného na ÚOCHB AV ČR.

Kapilární zónová elektroforéza byla využita k fyzikálně-chemické charakterizaci analyzovaných dipeptidů. Byly vypočteny efektivní a specifické náboje analytů a určeny jejich efektivní elektroforetické pohyblivosti v kyselých (klasických a izoelektrických) základních elektrolytech. Pro přesné stanovení efektivních pohyblivostí při standardní teplotě 25 °C byl vypracován postup korekce efektivních pohyblivostí na standardní teplotu.

Byla provedena separace strukturně podobných dipeptidových derivátů methionin-statinu metodami CZE a CMEKC a bylo provedeno testování vhodnosti kyselých (klasických a izoelektrických) základních elektrolytů pro analýzu a separaci dipeptidů. Porovnáním separačních účinností a rozlišení různých kyselých (klasických a izoelektrických) základních elektrolytů pro metodu CZE bylo dokázáno, že nejlepší podmínky separace poskytovaly izoelektrické základní elektrolyty. Přidáním derivátů celulosy k základním kyselým elektrolytům došlo ve všech případech k výraznému zlepšení účinnosti separace a rozlišení.

Nejúspěšnější separace peptidových směsí s účinností přesahující milion teoretických pater byly dosaženy metodou CMEKC s micelární pseudofází tvořenou anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS) v Tris-fosfátovém pufru s přídavkem organických modifikátorů (acetonitril, methanol).

Porovnáním analýz metodou CZE a CMEKC bylo zjištěno, že metoda CMEKC poskytuje pro dané směsi dipeptidových derivátů methionin-statinu nejvyšší hodnoty separačních účinností a rozlišení, ale při delších časech analýzy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Chankvetadze, B.: Basic of capillary electrophoresis. In: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Chankvetadze, B. (ed.). Weinheim: John Wiley & Sons Ltd, 1997, p. 5-72.
- [2] Hjelmeland, L. M.; Chrambach, A.: The impact of longworth, L.G. (1905-1981) On the theory of electrophoresis. *Electrophoresis* **3**:1, 9-17 (1982).
- [3] Hjertén, S.: *Free Zone Electrophoresis* (Thesis). Faculty of Science, Univ. Uppsala 1967.
- [4] Everaerts, F. M.; Hoving-Keulemans, W. M. L.: Zone electrophoresis in capillary tubes. *Sci. Tools* **17**: 25-28 (1970).
- [5] Virtanen, R.: Zone Electrophoresis in A Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. *Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series* **123**: 1-67 (1974).
- [6] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.: High-performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **169**: 11-20 (1979).
- [7] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry* **53**:8, 1298-1302 (1981).
- [8] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**:1, 111-113 (1984).
- [9] Coufal, P.: Kapilární elektromigrační metody. In: *Analytické separační metody*. UK v Praze (ed.). Praha: nakladatelství Karolinum, 2004, p. 180-209.
- [10] Kašička, V.: Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chem. Listy.* **91**:5, 320-329 (1997).
- [11] Poinot, V.; Rodat, A.; Gavard, P.; Feurer, B.; Couderc, F.: Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis* **29**:1, 207-223 (2008).
- [12] Kašička, V.: Recent developments in CE and CEC of peptides. *Electrophoresis* **29**:1, 179-206 (2008).
- [13] Tsuda, T.; Nakagawa, G.; Sato, M.; Yagi, K.: Separation of nucleotides by high-voltage capillary electrophoresis. *J. Appl. Biochem.* **5**:4-5, 330-336 (1983).
- [14] Foret, F.; Deml, M.; Boček, P.: Capillary zone electrophoresis. Quantitative study of the effects of some dispersive processes on the separation efficiency. *J. Chromatogr.* **452**: 601-613 (1988).

- [15] Gebauer, P.; Deml, M.; Boček, P.; Janák, J.: Determination of nitrate, chloride and sulphate in drinking water by capillary free-zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **267**: 455-457 (1983).
- [16] Dolník, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis* **29**:1, 143-156 (2008).
- [17] Burton, D. E.; Sepaniak, M. J.; Maskarinec, M. P.: Analysis of B6 vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-excited fluorescence detection. *Journal of Chromatographic Science* **24**:8, 347-351 (1986).
- [18] Ghowsi, K.; Gale, R. J.: Field Effect Electroosmosis. *J. Chromatogr.* **559**:1-2, 95-101 (1991).
- [19] Tavares, M. F. M.; MCGuffin, V. L.: Theoretical model of electroosmotic flow for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **67**:20, 3687-3696 (1995).
- [20] Hjertén, S.; Valtcheva, L.; Elenbring, K.; Liao, J. L.: Fast, high-resolution (capillary) electrophoresis in buffers designed for high field strengths. *Electrophoresis* **16**:4, 584-594 (1995).
- [21] Regnier, F. E.; Lin, S.: Capillary electrophoresis of proteins. In: *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. Khaledi, M. G. (ed.). New York: John Wiley&Sons Inc., 1998, p. 683-727.
- [22] Boček, P.: Analytická kapilární elektroforéza. In: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Churáček, J. (ed.) Praha: Academia, 1993, p. 100-145.
- [23] Xuan, X. C.; Li, D. Q.: Band-broadening in capillary zone electrophoresis with axial temperature gradients. *Electrophoresis* **26**:1, 166-175 (2005).
- [24] Baltussen, E.; Guijt, R. M.; van der Steen, G.; Laugere, F.; Baltussen, S.; van Dedem, G. W. K.: Considerations on contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23**:17, 2888-2893 (2002).
- [25] Beckers, J. L.; Boček, P.: The preparation of background electrolytes capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. *Electrophoresis* **24**:3, 518-535 (2003).
- [26] Gaš, B.; Štědrý, M.; Kenndler, E.: Peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **18**:12-13, 2123-2133 (1997).
- [27] Giddings, J. C.: Generation of variance, "theoretical plates", resolution and peak capacity in electrophoresis and sedimentation. *Separ. Sci.* **4**:3, 181-189 (1969).
- [28] Boček, P.; Deml, M.; Gebauer, P.; Dolník, V.: *Analytical Isotachophoresis*. Weinheim, Verlag Chemie VCH 1988.

- [29] Hjertén, S.; Zhu, M.-D.: Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. *J. Chromatogr.* **346**: 265-270 (1985).
- [30] Mazzeo, J. R.; Krull, I. S.: Capillary Isoelectric Focusing of Proteins in Uncoated Fused- Silica Capillaries Using Polymeric Additives. *Analytical Chemistry* **63**:24, 2852-2857 (1991).
- [31] Tsuda, T.: *Electric Field Applications in Chromatography*. Weinheim, Industrial and Chemical Processes 1995.
- [32] Prusík, Z.; Kašička, V.: Desorption isotachopheresis as a tool for sorbent characterization on a microscale - a survey. *Journal of Chromatography* **390**:1, 39-50 (1987).
- [33] Kašička, V.: Analytical and preparative separations of peptides by capillary and free-flow zone electrophoresis. In: *Analytical and Preparative Separation Methods of Biomacromolecules*. Aboul-Enain, H. Y. (ed.). New York: Marcel Dekker, 1999, p. 39-97.
- [34] Kašička, V.: Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **27**:1, 142-175 (2006).
- [35] Offord, R. E.: Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups. *Nature* **211**: 591-593 (1966).
- [36] Grossman, P. D.; Colburn, J. C.: *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. San Diego, Academic Press 1992.
- [37] Atamna, I. Z.; Metral, C. J.; Muschik, G. M.; Issaq, H. J.: Factors That Influence Mobility, Resolution, and Selectivity in Capillary Zone Electrophoresis .3. The Role of the Buffers Anion. *J. Liq. Chromatogr.* **13**:16, 3201-3210 (1990).
- [38] Li, S. F. Y.: Electrolyte systems. In: *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Li, S. F. Y. (ed). Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 201-293.
- [39] Green, J. S.; Jorgenson, J. W.: Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary zone electrophoresis by the addition of alkali metal salts to the buffers. *J. Chromatogr.* **478**: 63-70 (1989).
- [40] Breadmore, M. C.: Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips. *Electrophoresis* **28**:1-2, 254-281 (2007).
- [41] Han, D. D.; Wang, C.; Wang, Z.; Wu, Q. H.; Zang, X. H.: On-line sweeping sample concentration in micellar electrokinetic chromatography with enhanced sensitivity for the determination of carbamazepine in human serum. *Chinese Chemical Letters* **17**:7, 953-956 (2006).

- [42] Britz-McKibbin, P.; Terabe, S.: High-sensitivity analyses of metabolites introduction in biological samples by capillary electrophoresis using dynamic pH junction-sweeping. *Chemical Record* **2**:6, 397-404 (2002).
- [43] Hamrníková, I.; Mikšík, I.; Uhrová, M.; Deyl, Z.: Ultraviolet detector response of glycine and alanine homopeptides: Some specific features in capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* **372**:1-2, 257-272 (1998).
- [44] Boring, C. B.; Dasgupta, P. K.: An affordable high-performance optical absorbance detector for capillary systems. *Analytica Chimica Acta* **342**:2-3, 123-132 (1997).
- [45] Riollet, P.; Couderc, F.: A catalogue of selected derivatization reactions to label molecules in the subnanomolar or nanomolar range for CE and micro-HPLC with LIF detection. *J. Capillary Electrophoresis* **9**:1-2, 1-11 (2004).
- [46] Lacroix, M.; Poinot, V.; Fournier, C.; Couderc, F.: Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **26**:13, 2608-2621 (2005).
- [47] Veledo, M. T.; de Frutos, M.; Diez-Masa, J. C.: Amino acids determination using capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **1079**:1-2, 335-343 (2005).
- [48] Stutz, H.: Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis* **26**:7-8, 1254-1290 (2005).
- [49] Müller, D.; Jelínek, I.; Opekar, F.; Štulík, K.: A conductometric detector for capillary separations. *Electroanal.* **8**:8-9, 722-725 (1996).
- [50] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.: Concentration distributions in free zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **169**: 1-10 (1979).
- [51] Kašička, V.; Prusík, Z.: Isotachophoretic analysis of peptides. Selection of electrolyte systems and determination of purity. *J. Chromatogr.* **470**:1, 209-221 (1989).
- [52] Mosher, R. A.; Gebauer, P.; Thormann, W.: Computer simulation and experimental validation of the electrophoretic behavior of proteins 3. Use of titration data predicted by the protein's amino acid composition. *J. Chromatogr.* **638**:2, 155-164 (1993).
- [53] Nath, S.; Schutte, H.; Hustedt, H.; Deckwer, W. D.: Correlation of migration behavior in free-flow zone electrophoresis and electrophoretic titration curve. *Electrophoresis* **11**: 612-616 (1990).

- [54] Lightwahl, K. J.; Loo, J. A.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D.; Witkowska, H. E.; Shackleton, C. H. L.; Wu, C. S. C.: Collisionally Activated Dissociation and Tandem Mass Spectrometry of Intact Hemoglobin beta-Chain Variant Proteins with Electrospray Ionization. *Biol. Mass. Spectrom.* **22**:2, 112-120 (1993).
- [55] Righetti, P. G.; Gelfi, C.: Isoelectric focusing in capillaries and slab gels: A comparison. *J. Capillary Electrophoresis* **1**:1, 27-35 (1994).
- [56] Klepárník, K.; Šlais, K.; Boček, P.: Determination of the Isoelectric Points of Low and High Molecular Mass Ampholytes by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **14**:5-6, 475-479 (1993).
- [57] Koval, D.; Kašička, V.; Jiráček, J.; Collinsová, M.: Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis in highly acidic background electrolytes. *Electrophoresis* **24**:5, 774-781 (2003).
- [58] Righetti, P. G. Determination of physicochemical parameters by capillary electrophoresis. In: *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. Khaledi, M. G. (ed.). New York: John Wiley&Sons Inc., 1998, p. 973-998.
- [59] Mitra, S.; Dygas-Holz, A. M.; Jiráček, J.; Žertová, M.; Žáková, L.; Holz, R. C.: A new colorimetric assay for methionyl aminopeptidases: Examination of the binding of a new class of pseudopeptide analog inhibitors. *Analytical Biochemistry* **357**:1, 43-49 (2006).
- [60] Folkman, J.: Tumor Angiogenesis. *Advances in Cancer Research* **43**: 175-203 (1985).
- [61] D'souza, V. M.; Holz, R. C.: The methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli* can function as an iron(II) enzyme. *Biochemistry* **38**:34, 11079-11085 (1999).
- [62] Kašička, V.; Prusík, Z.; Sázelová, P.; Brynda, E.; Stejskal, J.: Capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow controlled by external radial electric field. *Electrophoresis* **20**:12, 2484-2492 (1999).
- [63] Sillero, A.; Ribeiro, J. M.: Isoelectric points of proteins: Theoretical determination. *Analytical Biochemistry* **179**: 319-325 (1989).
- [64] Koval, D.; Kašička, V.; Jiráček, J.; Collinsová, M.; Garrow, T. A.: Analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **23**:2, 215-222 (2002).
- [65] Verzola, B.; Perduca, M.; Mezo, G.; Hudecz, F.; Righetti, P. G.: Monitoring folding transitions of synthetic, branched-chain polypeptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **24**:5, 794-800 (2003).

- [66] Rose, M. J.; Lunte, S. M.; Carlson, R. G.; Stobaugh, J. F.: Amino acid and peptide analysis using derivatization with p-nitrophenol-2,5-dihydroxyphenylacetate bis-tetrahydropyranyl ether and capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30**:6, 1851-1859 (2003).
- [67] Amini, A.; Olofsson, I. M.: Analysis of calcitonin and its analogues by capillary zone electrophoresis and matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **27**:9, 675-685 (2004).
- [68] Carru, C.; Zinellu, A.; Sotgia, S.; Marongiu, G.; Farina, M. G.; Usai, M. F.; Pes, G. M.; Tadolini, B.; Deiana, L.: Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1017**:1-2, 233-238 (2003).
- [69] Popa, T. V.; Mant, C. T.; Chen, Y.; Hodges, R. S.: Capillary zone electrophoresis of alpha-helical diastereomeric peptide pairs with anionic ion-pairing reagents. *Journal of Chromatography A* **1043**:1, 113-122 (2004).
- [70] Azad, M.; Silverio, C.; Zhang, Y.; Villareal, V.; Gomez, F. A.: On-column synthesis coupled to affinity capillary electrophoresis for the determination of binding constants of peptides to glycopeptide antibiotics. *Journal of Chromatography A* **1027**:1-2, 193-202 (2004).
- [71] Szucs, V.; Freitag, R.: Comparison of a three-peptide separation by capillary electrochromatography, voltage-assisted liquid chromatography and nano-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1044**:1-2, 201-210 (2004).
- [72] Huber, M. I.; Hennessy, T. P.; Lubda, D.; Unger, K. K.: Evaluation and comparison of tailor-made stationary phases based on spherical silica-based beads for capillary electrochromatography via peptide separation analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **803**:1, 137-147 (2004).
- [73] Govindaraju, K.; Govindaraju, V.; Eidelman, D. H.: Analysis of glutathione in rat airway surface liquid by capillary zone electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Chromatography B* **788**:2, 369-376 (2003).
- [74] Brunnkvist, H.; Karlberg, B.; Astervik, A.; Granelli, I.: Experimental design-based development of a rapid capillary electrophoresis method for determining impurities in the tetrapeptide H-Tyr-(D)Arg-Phe-Phe-NH₂. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **807**:2, 293-300 (2004).
- [75] Frerichs, V. A.; Herrmann, J. K.; Aguirre, A.; Colon, L. A.: Trace level determination of substance P using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Microchemical Journal* **78**:2, 135-142 (2004).

- [76] Van Dyck, S.; Nováková, S.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J.: Inhibition study of angiotensin converting enzyme by capillary electrophoresis after enzymatic reaction at capillary inlet. *Journal of Chromatography A* **1013**:1-2, 149-156 (2003).
- [77] Brunnkvist, H.; Karlberg, B.; Granelli, I.: Enantiomeric separation of TAPP, H-Tyr-(D)Ala-Phe-Phe-NH₂, by capillary electrophoresis using 18-crown-6-tetracarboxylic acid as a chiral selector. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **793**:2, 343-350 (2003).
- [78] Novatchev, N.; Holzgrabe, U.: Capillary electrophoresis method for determination of related substances in glutathione reduced drug substance. *Chromatographia* **57**:5-6, 345-349 (2003).
- [79] Šedo, O.; Billová, S.; Pena-Mendez, E. M.; Paleček, E.; Havel, J.: Derivatisation of peptides with osmium tetroxide, 2,2'-bipyridine: capillary electrophoretic and MALDI-TOF mass spectrometric study. *Analytica Chimica Acta* **515**:2, 261-269 (2004).
- [80] Huang, Y.; Duan, J. P.; Chen, H. Q.; Chen, M.; Chen, G. N.: Separation and determination of carnosine-related peptides using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **26**:3, 593-599 (2005).
- [81] Profumo, A.; Cardinali, B.; Cuniberti, C.; Rocco, M.: Separation of human fibrinopeptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **26**:3, 600-609 (2005).
- [82] Sassi, A. P.; Andel, F.; Bitter, H. M. L.; Brown, M. P. S.; Chapman, R. G.; Espiritu, J.; Greenquist, A. C.; Guyon, I.; Horchi-Alegre, M.; Stults, K. L.; Wainright, A.; Heller, J. C.; Stults, J. T.: An automated, sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry platform for discovery of biomarkers in human serum. *Electrophoresis* **26**:7-8, 1500-1512 (2005).
- [83] Arias, M.; Simo, C.; Ortiz, L. T.; los Mozos-Pascual, M.; Barbas, C.; Cifuentes, A.: Detection and quantitation of a bioactive compound in *Vicia narbonensis* L. seeds by capillary electrophoresis-mass spectrometry: A comparative study with UV detection. *Electrophoresis* **26**:12, 2351-2359 (2005).
- [84] Descroix, S.; Le Potier, I.; Niquet, C.; Minc, N.; Viovy, J. L.; Taverna, M.: In-capillary non-covalent labeling of insulin and one gastrointestinal peptide for their analyses by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **1087**:1-2, 203-209 (2005).
- [85] Vizioli, N. M.; Rusell, M. L.; Carbajal, M. L.; Carducci, C. N.; Grasselli, M.: On-line affinity selection of histidine-containing peptides using a polymeric monolithic support for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **26**:15, 2942-2948 (2005).

- [86] Assuncao, N. A.; Deziderio, L. A. G.; Paulino, L. G.; Lupetti, K. O.; Carrilho, E.: Nonaqueous capillary electrophoresis in coated capillaries: An interesting alternative for proteomic applications. *Electrophoresis* **26**:17, 3292-3299 (2005).
- [87] Abla, N.; Geiser, L.; Mirgaldi, M.; Naik, A.; Veuthey, J. L.; Guy, R. H.; Kalia, Y. N.: Capillary zone electrophoresis for the estimation of transdermal iontophoretic mobility. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94**:12, 2667-2675 (2005).
- [88] Huang, Y.; Duan, J. P.; Jiang, X. Y.; Chen, H. Q.; Chen, G. N.: Separation and determination of enkephalin-related peptides using capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **28**:18, 2534-2539 (2005).
- [89] Zavaleta, J.; Chinchilla, D.; Martinez, K.; Gomez, F. A.: Multiple-injection affinity capillary electrophoresis to examine binding constants between glycopeptide antibiotics and peptides. *Journal of Chromatography A* **1105**:1-2, 59-65 (2006).
- [90] Newman, C. I. D.; McGuffin, V. L.: Capillary electrophoresis for thermodynamic and kinetic studies of peptidyl-proline isomerization by the theoretical plate height model. *Electrophoresis* **27**:3, 542-552 (2006).
- [91] Ryvolová, M.; Táborský, P.; Vrábel, P.; Havel, J.; Preisler, J.: Derivatization of amino acids, peptides and proteins for laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Chemické Listy* **100**:3, 191-195 (2006).
- [92] Psurek, A.; Matysik, F. M.; Scriba, G. K. E.: Determination of enkephalin peptides by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* **27**:5-6, 1199-1208 (2006).
- [93] Huang, Y.; Shi, Y. F.; Duan, J. P.; Chen, G. N.: Field-amplified on-line sample stacking for determination of carnosine-related peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **29**:7, 1026-1030 (2006).
- [94] Psurek, A.; Feuerstein, S.; Willbold, D.; Scriba, G. K. E.: Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of alpha-helical polypeptides: Effect of secondary structure on separation selectivity. *Electrophoresis* **27**:9, 1768-1775 (2006).
- [95] Huck, C. W.; Bakry, R.; Huber, L. A.; Bonn, G. K.: Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis* **27**:11, 2063-2074 (2006).
- [96] Sanz-Nebot, V.; Benavente, F.; Hernandez, E.; Barbosa, J.: Evaluation of the electrophoretic behaviour of opioid peptides - Separation by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **577**:1, 68-76 (2006).
- [97] Terabe, S.; Monton, M. R. N.; Le Saux, T.; Imami, K.: Applications of capillary electrophoresis to high-sensitivity analyses of biomolecules. *Pure and Applied Chemistry* **78**:5, 1057-1067 (2006).

- [98] Puerta, A.; Axen, J.; Soderberg, L.; Bergquist, J.: Novel adsorptive polyamine coating for enhanced capillary electrophoresis of basic proteins and peptides. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **838**:2, 113-121 (2006).
- [99] Gennaro, L. A.; Salas-Solano, O.; Ma, S.: Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins. *Analytical Biochemistry* **355**:2, 249-258 (2006).
- [100] Moumakwa, B. A.; Crawley, C. D.; Purich, E.; Edinboro, L.; Karnes, H. T.: Use of capillary electrophoresis in drug quality assessment of synthetic porcine secretin. *Biomedical Chromatography* **19**:1, 68-79 (2005).
- [101] Monton, M. R. N.; Imami, K.; Nakanishi, M.; Kim, J. B.; Terabe, S.: Dynamic pH junction technique for on-line preconcentration of peptides in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1079**:1-2, 266-273 (2005).
- [102] Phinney, K. W.; Sander, L. C.: Dynamically coated capillaries for enantioselective separations by capillary electrophoresis. *Chirality* **17**: S65-S69 (2005).
- [103] Vrábel, P.; Táborský, P.; Ryvolová, M.; Havel, J.; Preisler, J.: Sensitive detection and separation of fluorescent derivatives using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection with 532 nm Nd : YAG laser. *Journal of Luminescence* **118**:2, 283-292 (2006).
- [104] Brown, A.; Desharnais, R.; Roy, B. C.; Malik, S.; Gomez, F. A.: Optimization of conditions for flow-through partial-filling affinity capillary electrophoresis to estimate binding constants of ligands to receptors. *Analytica Chimica Acta* **540**:2, 403-410 (2005).
- [105] Tempels, F. W. A.; Wiese, G.; Underberg, W. J. M.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: On-line coupling of size exclusion chromatography and capillary electrophoresis via solid-phase extraction and a Tee-split interface. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **839**:1-2, 30-35 (2006).
- [106] Sedláková, P.; Svobodová, J.; Mikšík, I.: Capillary electrophoresis of peptides and proteins with plug of Pluronic gel. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **839**:1-2, 112-117 (2006).
- [107] Heegaard, N. H. H.; He, X.; Blomberg, L. G.: Binding of Ca²⁺, Mg²⁺, and heparin by human serum amyloid P component in affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **27**:13, 2609-2615 (2006).
- [108] Psurek, A.; Neusüss, C.; Degenkolb, T.; Bruckner, H.; Balaguer, E.; Imhof, D.; Scriba, G. K. E.: Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Peptide Science* **12**:4, 279-290 (2006).

- [109] Sandra, K.; Lynen, F.; Devreese, B.; Van Beeumen, J.; Sandra, P.: On-column sample enrichment for the high-sensitivity sheath-flow CE-MS analysis of peptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **385**:4, 671-677 (2006).
- [110] Zhang, H. Y.; Le Potier, I.; Smadja, C.; Zhang, J. Y.; Taverna, M.: Fluorescent detection of peptides and amino acids for capillary electrophoresis via on-line derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**:5, 1387-1394 (2006).
- [111] Moini, M.: Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry of amino acids, peptides, and proteins. In: *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptide*. Strege, M. A.; Lagu, A. L. (eds.). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2004, p. 253-290.
- [112] Yashima, T.; Tsuchiya, A.; Morita, O.: Separation of Closely Related Large Peptides by Micellar Electrokinetic Chromatography with Organic Modifiers. *Analytical Chemistry* **64**:23, 2981-2984 (1992).
- [113] Šolínová, V.; Kašička, V.; Koval, D.; Barth, T.; Ciencialová, 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. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **808**:1, 75-82 (2004).
- [114] Schulte, S.; Singh, A. K.; Rauk, E.; Palmer, C. P.: Performance and selectivity of polymeric pseudostationary phases for the electrokinetic separation of amino acid derivatives and peptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**:3, 777-782 (2005).
- [115] Matsubara, N.; Terabe, S.: Separation of Closely Related Peptides by Capillary Electrophoresis with a Nonionic Surfactant. *Chromatographia* **34**:9-10, 493-496 (1992).
- [116] Djordjevic, N. M.; Fitzpatrick, F.; Houdiere, F.: Separation of peptides utilizing ultrahigh-temperature micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **22**:12, 2398-2402 (2001).
- [117] Dobos, Z.; Kiss, E.; Hallgas, B.; Keri, G.; Idei, M.: Micellar proportion: A parameter to compare the hydrophobicity of the pseudostationary phases or that of the analytes in micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **26**:4-5, 849-857 (2005).
- [118] Garcia-Campana, A. M.; Taverna, M.; Fabre, H.: LIF detection of peptides and proteins in CE. *Electrophoresis* **28**:1-2, 208-232 (2007).
- [119] Zacharis, C. K.; Tempels, F. W. A.; Theodoridis, G. A.; Voulgaropoulos, A. N.; Underberg, W. J. M.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: Coupling of sequential injection analysis and capillary electrophoresis - Laser-induced fluorescence via a valve interface for on-line derivatization and analysis of amino acids and peptides. *Journal of Chromatography A* **1132**:1-2, 297-303 (2006).

- [120] Furtosmatei, A.; Day, R.; Spierre, S. A.; Spierre, L. G.; Waldron, K. C.: Micellar electrokinetic chromatography separations of dynorphin peptide analogs. *Electrophoresis* **21**:4, 715-723 (2000).
- [121] Sabella, S.; Quaglia, M.; Lanni, C.; Racchi, M.; Govoni, S.; Caccialanza, G.; Calligaro, A.; Bellotti, V.; De Lorenzi, E.: Capillary electrophoresis studies on the aggregation process of beta-amyloid 1-42 and 1-40 peptides. *Electrophoresis* **25**:18-19, 3186-3194 (2004).
- [122] Liu, H. C.; Yang, C.; Yang, Q.; Zhang, W. B.; Zhang, Y. K.: On-line combination of capillary isoelectric focusing and capillary non-gel sieving electrophoresis using a hollow-fiber membrane interface: a novel two-dimensional separation system for proteins. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **817**:1, 119-126 (2005).
- [123] Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.: Optimized method for the determination of prednisolone, Zn-bacitracin and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Chromatographia* **58**:5-6, 277-281 (2003).

Příloha A - B

Příloha A Příklady analýz peptidů metodou CZE.

Analyzované peptidy	Složení a pH základního elektrolytu	Materiál, rozměry kapiláry (L _t /L _{ef} [cm]/ID [μm])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Literatura
poly(Lys(Glu ₁ -DL-Ala ₃))	40 mM H ₃ PO ₄ ; 10 % (v/v) MeOH, pH 2,1	SiO ₂ (24 / 19,4 / 50)	UV (214 nm)	22	8	[65]
Fosfinátové pseudopeptidy (N-Ac-Val-Ala ν (PO(OH)-CH ₂)Leu-His-NH ₂)	27 - 1050 mM H ₃ PO ₄ ; 0 - 25 mM Tris, pH 1,1-3,2	SiO ₂ (30 / 19 / 50)	UV (206 nm)	22-26	2,1 až 8,5	[57]
Dipeptidy (Gly-Pro, Gly-Gln, Gly-Ala, Gly-Gly, Gly-Glu) a angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), derivatizace-NDTE (p-nitrofenyl-2,5-dihydroxyfenylacetát bis-tetrahydropranyl ether)	100 mM MES; NaOH, pH 6,1	SiO ₂ (70 / -- / 75)	Ampérometrická s uhlíkovou elektrodou + 450 mV	25	25	[66]
Lososový kalcitonin složený z 32 aminokyselin	25 mM fosfátový pufr; NaOH, pH 3,1	SiO ₂ (60 / 50 / 75)	UV (210 nm)	25	-30	[67]
Glutacion oxidovaný (GSH) a jeho redukovaná forma (GSSG) v séru	300 mM borátový pufr; NaOH, pH 7,8	SiO ₂ (37 / -- / 75)	UV (200 nm)	25	28	[68]
α -helix diastereomerní peptidy (Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-Leu-Gly-Lys-NH ₂)	různé konc. TFA/PFPA/HFBA; LiOH, pH 2,0	SiO ₂ (60,2 / 50 / 50)	UV (195 nm) + DAD	15	25	[69]
Glykopeptidová antibiotika patřící do skupiny vankomycinu a dipeptid (N-Ac-D-Ala-D-Ala)	20 mM fosfátový pufr, pH 7,5	SiO ₂ (47 / 40,5 / 50)	UV (205 nm)	23	24	[70]
Angiotensin I a II, Met-enkefalin	40 mM fosfátový pufr; 30 % (v/v) ACN, pH 2,5	SiO ₂ (37 / 28,5 / 75)	UV (214 nm)	23	10	[71]
Desmopressin (Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Darg-Gly-NH ₂), oxytocin (H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂), karbetocin (Tyr(O-Me)-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂)	75 mM NH ₄ Ac; 20 % (v/v) ACN, pH 4,8	SiO ₂ (33 / 25 / 100)	UV (220 nm)	20	-15	[72]

Analyzované peptidy	Složení a pH základního elektrolytu	Materiál, rozměry kapiláry (L_t/L_{ef} [cm]/ID [μ m])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Literatura
Red. (GSH) a oxid. (GSSG) glutathion (γ -L-Glu-L-Cys-Gly) v 100 μ M kys. chloristě; 50 mM N-ethylmaleimid	100 mM CHES; 40 mM LiOH; 5 mM spermin, pH 9,1	SiO ₂ (60 / -- / 50)	Vodivostní, Au-Hg amalgamová elektroda	25	416 V/cm	[73]
H-Tyr-(D)Arg-Phe-Phe-NH ₂	50 mM kys. malonová; 7 mM heptakis(2,6 di-O-methyl)- β -cyklodextrin), pH 2,5	SiO ₂ potažen polyvinylalkoholem (PVA) (64,5 / 56,5 / 50)	UV (200 nm)	15-30	15 až 30	[74]
Undekapeptidová substance P (SP) derivatizovaná 2,3-naftalendikarboxaldehydem (NDA)	18,8 mM borát; 0,45 mg/mL HPMC (hydroxypropylmethylcelulosa); 10% (v/v) ACN, pH 9,3	SiO ₂ (60 / 50 / 100)	LIF (442 nm) He-Cd laser	18	13	[75]
Tripeptid hippuryl-L-His-L-Leu (HHT) a kys. hippurová (HA) HHT $\xrightarrow{EC.3.4.15.1}$ HL + HA	150 mM HEPES; 1 M NaOH, pH 8,0	SiO ₂ (31,2 / 21 / 75)	UV (230 nm) + DAD	37	6	[76]
Tetrapeptid H-Tyr-(D)Ala-Phe-Phe-NH ₂	100 mM H ₃ PO ₄ ; triethanolamin, pH 3,0	SiO ₂ potažený PVA (48,5 / 40 / 50)	UV (200 nm)	15	20	[77]
Glutathion, L- γ -Glu-Cys-Gly (GSH) v séru + fenylalanin (vnitřní standard)	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 85% (m/m) H ₃ PO ₄ , pH 1,8	SiO ₂ (60,2 / 50 / 75)	UV (200 nm)	25	20	[78]
Lidský LH-RH- pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	50 mM NaAc, pH 5,0	SiO ₂ (47,5 / 39 / 50)	UV (200 nm)	25	25	[79]
Imidazolový dipeptid karnosin (Car, β -Ala-L-His), anserin (Ans, β -Ala-L-1-methylhistidin) a homokarnosin (Hca, γ -aminobutyryl-L-His) derivatizace- 3-(4-karboxybenzoyl) chinolin-2-karboxaldehydem (CBQCA)	112 mM borát sodný, pH 10,51	SiO ₂ (60 / 50 / 50)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext}/\lambda_{emise}$, 488 / 520 nm)	25	20	[80]

Analyzované peptidy	Složení a pH základního elektrolytu	Materiál, rozměry kapiláry (L_c/L_{ef} [cm]/ID [μ m])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Literatura
Fibrinopeptid A (ADSGEGDFLAEGGGVR) a fibrinopeptid B (pEGVNDNEEGFFSAR) lidského fibrinogenu	20 mM fosfát sodný, pH 6,1-6,2	SiO ₂ (67,5 / 61 / 100)	UV (200 nm)	25	20	[81]
Peptidy a bílkoviny v lidském séru (neurotensin, angiotensin I, bradykinin, myoglobin, cytochrom c)	60mM CH ₃ COOH; 20% (v/v) MeOH, pH 3,2	SiO ₂ (60 / 50 / 50)	UV (214 nm)	25	-30	[82]
Dipeptid γ -Glu-S-ethenyl-Cys (GEC) extrahovaný 1 mL ethanol-voda (70:30, v/v)	20 mM NH ₄ HCO ₃ ; HCOOH, pH 7,0	SiO ₂ (37 / 30 / 50)	UV (200, 214 a 254 nm)	25	15	[83]
Insulin, gastrointestinální peptid (Arg-Arg-gastrin) v 2,5 mM Na ₂ B ₄ O ₇	50 mM H ₃ BO ₃ ; NaOH; 2,5 mM TTAB, pH 8,5	SiO ₂ (47 / 37 / 75)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext}/\lambda_{emise}$, 488 / 610 nm)	30	-25	[84]
Syntetický peptid angiotensin I	50 mM fosfát sodný, pH 7,0	SiO ₂ (45 / 27 / 75)	UV (214 nm)	25	10	[85]
Tryptické peptidy lysozymu v MeOH/ NH ₄ HCO ₃ (60/40, v/v)	30% ACN; 60% MeOH; 10% CH ₃ COOH; 12,5 mM NH ₄ Ac	SiO ₂ (60 / 30 / 75)	UV (214 nm)	30	30	[86]
Dipeptidy a) H-Glu- ϵ -Lys-OH b) H-Tyr-Gln-OH ve voda/acetone (95/5, v/v)	a) 30 mM NaHCO ₃ ; 133 mM NaCl, pH 7,4 b) PBS: 16,8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 136,9 mM NaCl, pH 7,4	SiO ₂ (96 / 87,5 / 50)	UV (200 nm)	25	15	[87]
Met-enkefalin, Ala-Leu-enkefalin, Leu-enkefalin, Leu-enkefalin-Lys, Leu-enkefalin-Arg, Tyr-Gly-Gly	67 mM NaH ₂ PO ₄ ; H ₃ PO ₄ , pH 3,1- 3,2	SiO ₂ (58 / 48,6 / 50)	UV (200 nm)	25	20	[88]
Glykopeptidová antibiotika (vankomycin, ristocetin, teikoplanin) a peptidy fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-(Gly,Ala, Val a Phe)-D-Ala-D-Ala	192 mM glycine; 25 mM Tris, pH 8,3	SiO ₂ (50 / 40,5 / 50)	UV (200 nm)	23	25	[89]

Analyzované peptidy	Složení a pH základního elektrolytu	Materiál, rozměry kapiláry (L_r/L_e [cm]/ID [μm])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Literatura
Prolinové dipeptidy- Ala-Pro a Phe-Pro	10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9,3	SiO_2 (34 / 26 / 75)	UV (210 nm)	10	25	[90]
Syntetický- a) isoleucin, glutamová kys., lidský angiotensin I a bradykinin b) hovězí insulin derivatizace a) a b) - rhodamin B- isothiokyanátem	a) 20 mM fosfátový pufr; 10% (v/v) MeOH, pH 10 b) 40 mM kys. citronová; 10% (v/v) MeOH, pH 2,6	SiO_2 (37 / 30 / 50)	LIF Nd:YAG- laser s násobnou frekvencí ($\lambda_{\text{exc.}} = 532$ nm)	25	10	[91]
Enkefalinové peptidy- Met-enkefalin, Leu-enkefalin v plazmě a [D-Ala]Leu-enkefalin (vnitř. standard)	25 mM NH_4Ac ; 0,5 M HCOOH	SiO_2 (47 / 40 / 50)	UV (215 nm)	25	25	[92]
Imidazolové dipeptidy- karnosin (Car, β -Ala-L-His), anserin (Ans, β -Ala-L-methylhistidin) a homokarnosin (Hcar, γ -aminobutyryl-L-His)	100 mM fosfát, pH 5,63	SiO_2 (60 / 50 / 50)	UV (200 nm)	25	15	[93]
α -helikální polypeptid- melittin (H-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln- NH_2)	25 mM amonium trifluoracetát; 50 mM TFA; 0,001 % hexadimethrin bromid v methanol/ACN (1/3, v/v), pH 2,3	SiO_2 (47 / 40 / 50)	UV (215 nm)	25	-25	[94]
α -helikální polypeptid- magainin 2 (H-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-lys-Phe-Gly-Lys-AlaPhe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH)	25 mM amonium acetat; 250 mM CH_3COOH ; 0,001% hexadimethrin bromid ve vodě, pH 3,7	SiO_2 (47 / 40 / 50)	UV (215 nm)	25	-25	[94]
Směs peptidů vasopresinu a neurotensinu	0,5 M CH_3COOH ; 10 mM triethylamin, pH 6,7	SiO_2 (30 / 28,9 / 75)	UV (254 nm)	25	10	[95]

Analyzované peptidy	Složení a pH základního elektrolytu	Materiál, rozměry kapiláry (L_t/L_{ef} [cm]/ID [μ m])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Litera- tura
Neuropeptidy; Met-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met), Met-enkefalinamid (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH ₂), endomorfín 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂)	20 mM kys. diethylmalonová; 1M NaOH, pH 5,5 - 6,5	SiO ₂ (57,5 / 48,5 / 75)	UV (195 nm)	25	25	[96]
Bradykinin, angiotensin I a angiotensin II, matrice- 350 mM CH ₃ COOH	100 mM NH ₄ COOH, pH 3,0	SiO ₂ (60 / -- / 50)	ESI-MS	25	14	[97]
Neuropeptidy; Met-enkefalin, Leu-enkefalin, oxytocin, angiotensin II, LHRH, bradykinin	15 mM HCOOH, pH 2,8	SiO ₂ (57 / -- / 50)	ESI-MS	25	450 V/cm	[98]
Syntetické neuropeptidy; angiotensin I, angiotensin II, endoproteinasa Lys-C	100 mM CH ₃ COOH, pH 3,1	SiO ₂ (68 / 58 / 75)	UV (214 nm)	20	20- 30	[99]
Syntetický prasečí sekretin (His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu- Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln- Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH ₂)	50 mM fosfát; NaOH, pH 3,5	SiO ₂ (57 / 50 / 75)	UV (210 nm)	25	10	[100]
Syntetické neuropeptidy- [Sar,Ile]-angiotensin II, angiotensin I, angiotensin II a bradykinin, matrice -350 mM CH ₃ COOH	200 mM borát, pH 11,0	SiO ₂ (60 / 50 / 50)	UV (200 nm)	25	15	[101]
Efedrin, methylefedrin, fenylpropanolamin, bupivakain v heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin, gluthation (GSH) oxid. a (GSSG) red. forma v séru, Cys-Gly a Glu-Cys	a) 25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 0,1 M HCl, pH 2,5 b) 50 mM NaH ₂ PO ₄ ;H ₃ PO ₄ , pH 1,8	SiO ₂ a) (53,5 / 45 / 50) b) (60,2 / 50 / 75)	a) UV (200 nm) b) UV (200 nm)	a) 25 b) 25	a) 25 b) 20	[102] [34]
Peptidy: (H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-OH) a fragmenty (H-Tyr-Asp-OH a H-Tyr-Asp-Pro-OH)	100 mM H ₃ PO ₄ ; 50 mM Tris, pH 2,25	SiO ₂ (40,2 / 30 / 75)	UV (200 nm)	25	10	[34]

Analyzované peptidy	Složení a pH základního elektrolytu	Material, rozměry kapiláry (L_r/L_e [cm]/ID [μ m])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Literatura
RBITC-insulin derivatizovaný rhodaminem B	60 mM kys. citronová; 10% (v/v) MeOH, pH 2,6	SiO ₂ (37 / 30 / 50)	LIF Nd:YAG laser s násob.frek- vencí (λ_{exc} = 532 nm)	25	15	[103]
Syntetický vankomycin	192 mM glycin; 25 mM Tris, pH 8,3	SiO ₂ (60,5 / 50,5 / 50)	UV (200 nm)	25	20	[104]
Syntetický Met-enkefalin	50 mM H ₃ BO ₃ ; NaOH, pH 8,0	SiO ₂ (60 / 50 / 75)	UV (215 nm)	25	20	[105]
Syntetický bradykinin	100 mM fosfát; 3 M HCl, pH 2,5	SiO ₂ (37 / 30 / 75)	UV (214 nm)	40	10	[106]
Syntetický peptid: Acetyl-Pro-Ser-Lys-Asp-OH	11 mM HEPES; NaOH, pH 8,17	SiO ₂ (52 / 44 / 50)	UV (200 nm)	25	15	[107]
Hexapeptidy obsahující kys. pyroglutamovou	12,5 mM NH ₄ COOH; MeOH	SiO ₂ (57 / -- / 50)	ESI-IT-MS	25	30	[108]
Peptidy: PPHFFVYK, VHLPVEK a angiotensin I	100 mM NH ₄ COOH; MeOH, pH 3,0	SiO ₂ (60 / -- / 50)	ESI-MS	25	30	[109]
Peptid buccalin, derivatizace- 4-fluoro-7-nitro-2,1,3- benzoxadiazolem	20 mM borát, pH 8,8	SiO ₂ (47 / 40 / 75)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext}/\lambda_{emise}$ 488 / 520 nm)	15	35	[110]
Neuropeptidy: Leu-enkefalin, Met-enkefalin, angiotensin II	10 - 30 mM CH ₃ COOH, pH 3 - 4	SiO ₂ (73 / 66 / 75)	ESI-MS	25	20	[111]
Peptidy: AFKAING a AFKADNG	20 mM kys. citronová, pH 2,5	SiO ₂ (65 / 45 / 50)	UV (200 nm)	30	277 V/cm	[36]
Heptapeptidy obsahující His	20 mM MES; 10 mM KCl; putrescin, pH 6,0	SiO ₂ (70 / 40 / 75)	UV (220 nm)	25	214 V/cm	[36]

Příloha B Příklady analýz peptidů metodou MEKC.

Analyzované peptidy	Složení a pH BGE Micelární pseudofáze	Materiál, rozměry kapiláry (L_r/L_{ef} [cm]/ID [μ m])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Litera- tura
Peptidy: AFDIDNG, AFAAING, AFKADNG	10 mM fosfát sodný, pH 7,0; 100 mM SDS	SiO ₂ (65 / 45 / 50)	UV (200 nm)	30	308 V/cm	[36]
Angiotensinové analogy: RVYIHPI, NRVYVHPF, DRVYIHPPF	25 mM Tris; fosfát sodný, pH 7,05; 50 mM CTAB	SiO ₂ (80 / 60 / 50)	UV (220 nm)	25	-250 V/cm	[36]
Insuliny různého původu (hovězí, ovčí, prasečí a koňský)	a) 50 mM CH ₃ COOH; 5 % (v/v) ACN, pH 3,6; 10 mM CTAB b) 50 mM borát; 15 % (v/v) ACN, pH 8,5; 50 mM SDS	SiO ₂ (65 / 50 / 50)	UV (215 nm)	25	15 až 25	[112]
Met-motilin a Leu-motilin	25 mM fosfát-200 mM borát; 5-25 % (v/v) ACN, pH 7,0; 10 mM CTAB	SiO ₂ (65 / 50 / 50)	UV (215 nm)	25	-15 až -25	[112]
Oxytocin, deamino-oxytocin, Arg-vasopresin	20 mM Tris; 5 mM H ₃ PO ₄ , pH 8,8; 50 mM SDS	SiO ₂ (30 / 19 / 50)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext.}/\lambda_{emise}$ 488 / 520 nm)	25	-20	[113]
Arg-Lys-Glu-Val-Tyr; Met-enkefalin-Arg-Phe	25 mM borát, pH 9,2; 35 mM SDS	SiO ₂ (48,5 / 40 / 50)	UV (225 nm)	25	-15	[114]
Met-motilin, Leu-motilin	25 mM fosfát; 200 mM borát; 2-25 % v/v ACN, pH 7,0; 10 mM CTAB	SiO ₂ (65 / 50 / 50)	UV (215 nm)	25	-15 až -25	[115]
Hovězí, ovčí, prasečí a koňský insulin	a) 50 mM AcOH; 5 % (v/v) ACN, pH 3,6; 10 mM CTAB b) 50 mM borát; 15 % (v/v) ACN, pH 8,5; 50 mM SDS	SiO ₂ (65 / 50 / 50)	UV (215 nm)	25	15 až 25	[115]

Analyzované peptidy	Složení a pH BGE Micelární pseudofáze	Materiál, rozměry kapiláry (L_c/L_{ef} [cm]/ID [μ m])	Detekce	T [°C]	U [kV]	Litera- tura
Cyklosporin A-D	25 mM borát; 15 % (v/v) ACN; 100 mM SDS	SiO ₂ (32 / 24 / 50)	UV (210 nm)	40	15	[116]
[BOC-Pro-Pro-Glu(OBzl)] ₂ -Lys-OMe [BOC-Pro-Glu(OBzl)] ₂ -Lys-OMe [BOC-Glu(OBzl)] ₂ -Lys-OMe	100 mM borát; 50 mM NaOH, pH 7,7; 75 mM SDS	SiO ₂ (60 / 40 / 50)	UV (205 nm)	25	21	[117]
Peptidy: Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly	75 mM borát; MeOH (65:35 v/v), pH 9,0; 50 mM SDS	SiO ₂ (75 / 50 / 33)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext.}/\lambda_{emise}$ 488 / 635 nm)	25	30	[118]
Peptidy: Thr-Ser, Thr-Gly, Gly-Ser, Thr-Ser-Gly	25 mM borát, pH 9,5; 10 mM SDS	SiO ₂ (85 / 75 / 55)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext.}/\lambda_{emise}$ 488 / 520 nm)	25	25	[119]
Dynorfinové analogy (Phe-Asn-Glu-Glu-Asp- Leu-Arg-Lys-Glu-Ala-Cys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe- Leu-Arg)	100 mM Na ₃ PO ₄ , pH 3,5; 5-50 mM CTAB	SiO ₂ (69,7 / 61,2 / 50)	UV (215 nm)	25	-25	[120]
β -amylloidové peptidy v plazmě a mozkomíšní tekutině (při Alzheimerově chorobě)	80 mM H ₃ PO ₄ , pH 7,4; 50 mM SDS	SiO ₂ (53 / 48,5 / 50)	UV (200 nm)	25	16	[121]
Inhibitor trypsinu (matrice- 10% (m/v) dextran + 0,5% (m/v) SDS v 60 mM aminomethylpropaniol-kakodylová kys.	50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,5% (m/v) SDS	SiO ₂ potažený polyakrylamidem (21 / 15 / 50)	UV (214 nm)	22- 24	10,5	[122]
Fenylefrin, prednisolon, Zn-bacitracin ve farmaceutických produktech	5 mM NaH ₂ PO ₄ -5 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 8,5; 40 mM SDS	SiO ₂ (57 / 50 / 75)	UV (195 nm)	25	30	[123]
Acetáty des-Tyr-[Met]-enkefalinamid (Gly-Gly- Phe-Met-NH ₂) a des-Tyr-[D-Ala-D-Leu]-enkefalin (D-Ala-Gly-Phe-D-Leu)	20 mM H ₃ BO ₃ ; 10 M NaOH, pH 9,5; 10 mM SDS	SiO ₂ (60 / 50 / 75)	LIF Ar-laser ($\lambda_{ext.}/\lambda_{emise}$ 488 / 520 nm)	25	25	[119]