

VÝVOJ A VYUŽITÍ ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD V ÚSTAVU ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

Článek je dodatečně věnován 70. výročí založení Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v Praze a aktuálně 100. výročí založení Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a významnému životnímu jubileu profesora Jiřího Barka.

VÁCLAV KAŠIČKA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 542/2, 160 00 Praha 6, Česká republika
vaclav.kasicka@uochb.cas.cz

Došlo 15.8.24, přijato 27.9.24.

Tento článek shrnuje vývoj a využití elektromigračních metod v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky v Praze (ÚOCHB AV ČR) od jeho založení až po současnost. Popisuje vývoj instrumentace, metodiky a využití následujících metod: a) nechlazená a chlazená papírová elektroforéza pro analytické i semipreparativní separace aminokyselin a peptidů při určování primární struktury bílkovin, b) kontinuální průtoková elektroforéza ve volném roztoku (FFE) pro čištění biologicky aktivních peptidů, zejména peptidových hormonů, s preparativní kapacitou 50–100 mg h⁻¹, c) kapilární izotachoforéza (CITP) pro kontrolu čistoty (kvality) synteticky připravených nebo z přírodního materiálu izolovaných biologicky aktivních peptidů a pro stanovení jejich protiiontů; d) vysokoúčinné kapilární elektromigrační metody (HPCE) zahrnující zónovou elektroforézu, izotachoforézu, izoelektrickou fokusaci, afinitní elektroforézu, elektrokinetickou chromatografii a elektrochromatografii, a využití těchto metod pro separace, analýzy a fyzikálně-chemické a biochemické charakterizace širokého spektra (bio)molekul izolovaných, (bio)syntetizovaných a studovaných v ÚOCHB AV ČR, např. aminokyselin, peptidů, bílkovin, nukleosidů, nukleotidů, fragmentů nukleových kyselin, steroidů, katecholaminů a různých funkčních organických molekul, např. azahelicenů, helquatů a diquatů.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, izotachoforéza, izoelektrická fokusace, afinitní elektroforéza, elektrokinetická chromatografie, elektrochromatografie

Obsah

1. Úvod
2. Papírová elektroforéza
3. Kontinuální průtoková elektroforéza ve volném roztoku
4. Kapilární izotachoforéza
5. Vysokoúčinné kapilární elektromigrační metody (HPCE)
 - 5.1. Vývoj instrumentace
 - 5.2. Metodický vývoj a analytické využití
 - 5.3. Fyzikálně chemická charakterizace (bio)molekul
6. Závěr a perspektivy dalšího rozvoje

1. Úvod

Hlavním předmětem základního výzkumu v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB) je (bio)syntéza, izolace, purifikace a charakterizace nových funkčních organických molekul

a biologicky aktivních látek a studium jejich vlastností a interakcí s jinými látkami v živých i neživých systémech. Studované látky se většinou vyskytují ve více či méně komplexních směsích, ze kterých je třeba tyto látky od ostatních nejprve oddělit, izolovat, purifikovat a analyzovat. K tomu slouží mnoho separačních, spektroskopických, elektrochemických a dalších analytických metod a jedněmi z těch, které jsou pro tyto potřeby v ÚOCHB vyvíjeny a využívány již od jeho založení, jsou elektromigrační metody.

Elektroforéza je velice účinná separační metoda založená na jednom z elektrokinetických jevů, tj. na pohybu elektricky nabitých částic (malých iontů, makroiontů (bio)polymerů a živých i neživých nano- a mikročástic) v kapalném prostředí působením elektrického pole. Jelikož se tyto částice liší velikostmi svých nábojů i svými rozměry a tvary, pohybují se ve stejnosměrném elektrickém poli různými rychlostmi a na tomto principu se od sebe oddělují. Probíhá-li tento proces dostatečně dlouhou dobu, dojde po určitém čase k úplnému oddělení jednotlivých

vých druhů částic do samostatných zón, ve kterých mohou být detegovány nebo ze kterých mohou být izolovány. Elektroforéza může být využita pro analytické i preparativní separace širokého spektra anorganických i organických (bio)molekul a (bio)částic.

Podle autorovi známých informací první elektroforetické experimenty v Československu byly shodou okolností provedeny právě v budově později založeného ÚOCHB již v letech 1948–1949 (cit.^{1,2}). Tehdy tam sídlilo Oddělení organické technologie Technické university v Praze, později přeměněné na Fakultu organické technologie Vysoké školy chemicko-technologické. Tehdejší průkopníci elektroforetických metod na tomto pracovišti si byli vědomi rušivých jevů termokonvekce a sedimentace v Tiseliově elektroforéze pohyblivého rozhraní prováděné ve volném roztoku ve vertikální U trubici³, a proto provedli elektroforetické separace krevních bílkovin a bílkovin vaječného bílku na laboratorně připraveném zařízení v agarovém želé umístěném na vodou chlazené skleněné desce. V tomto antikonvektivním a částečně síťovacím prostředí byli schopni oddělit krevní bílkoviny feritin a hemoglobin, hemocyanin a pepsin a částečně frakcionovat bílkoviny vaječného bílku a bílkoviny krevní plasmy^{1,2}. Toto pracoviště bylo v roce 1950 přeměněno na Ústřední ústav chemický a v roce 1953, po vzniku Československé akademie věd (ČSAV), zde začal působit Ústav organické chemie ČSAV, který byl od roku 1960 názvem i zaměřením rozšířen na Ústav organické chemie a biochemie ČSAV. Oba tyto ústavy vedl akademik F. Šorm, který si uvědomoval důležitost separačních metod pro organickou chemii a biochemii a podporoval zavádění tehdy nových chromatografických a elektroforetických metod do chemických a biochemických laboratoří.

2. Papírová elektroforéza

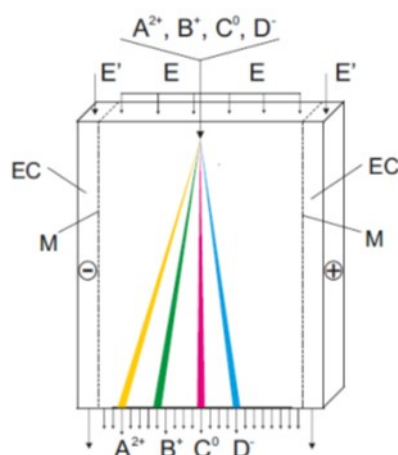
V padesátých letech minulého století bylo v ÚOCHB sestaveno několik typů tehdy nejrozšířenějšího instrumentálního formátu elektroforézy – papírové elektroforézy. Mezi nimi největšího využití dosáhla nechlazená nízkonapěťová tzv. sestupná papírová elektroforéza sestvojená O. Mikešem⁴. V této aparatuře se vzorky (hydrolyzované proteiny, oligo- a polypeptidy) nanášely do středu vsle orientovaného chromatografického papíru naplněného separačním pufrem. Papír byl na obou koncích ponořen do elektrodoých nádobek, dolní anodové a horní katodové, obou naplněných rovněž separačním pufrem. Elektrické napětí bylo na tuto sestavu přiváděno platinovými elektrodami. Výsledný pohyb peptidů byl kombinací jejich elektroforetické migrace, elektroosmotického toku a vztlínávého toku pufru z obou elektrodoých nádobek v pórovitém prostředí nosného papíru v důsledku odpařování pufru z papíru zahřívávaného procházejícím elektrickým proudem. Světově prioritní bylo využití této aparatury pro diagonální papírovou elektroforézu pro dvoudimenzionální separaci peptidů, které umožnilo identifikovat disulfidové můstky v molekulách bílkovin⁵.

Vyšší separační účinnosti a rychlejší separace než v této aparatuře byly dosaženy ve vysokonapěťové papírové elektroforéze chlazené pomocí elektricky izolovaného vodou chlazeného kovového výměníku tepla, kterou vyvinuli Z. Prusík a B. Keil⁶. Účinné chlazení umožnilo provádět elektroforézu při vysokých napětích (až 5 000 V) a dovolilo dokonalejší oddělení analyzovaných látek. Oba typy těchto papírových elektroforéz byly široce využívány pro analytické i semipreparativní separace aminokyselin, peptidů a peptidových fragmentů bílkovin po jejich předchozím chemickém a enzymovém štěpení. Z těchto tak zvaných peptidových map byly určovány primární struktury bílkovin, tj. sekvence aminokyselin v jednotlivých řetězcích bílkovin včetně určení míst intra- i interřetězcových disulfidových můstků v jejich molekulách.

3. Kontinuální průtoková elektroforéza ve volném roztoku

Dalším významným mezníkem v historii elektromiografických metod v ÚOCHB byl vývoj aparatury pro kontinuální beznosičovou elektroforézu ve volném roztoku v průtokové elektroforetické komoře týmem vedeným Z. Prusíkem⁷. Separační komora se skládala ze dvou rovnoběžných skleněných desek o rozměrech 500×500×4 mm, mezi kterými byla tenká štěrbiná (0,5 mm). Touto štěrbinou kontinuálně proudil laminárním tokem základní (nosný) elektrolyt, do kterého byl ve středu vstupní strany komory tenkým proudem zaváděn roztok vzorku, viz obr. 1. Komořa byla oboustranně chlazená na 4 °C rychle proudícím vzduchem. Ve směru kolmém na hydrodynamický tok základního elektrolytu i vzorku bylo aplikováno separační napětí (2 500–3 000 V), které během průtoku nosného elektrolytu a vzorku komorou (20–40 minut) vychylovalo kladně nabitě látky ke katodě a záporně nabitě látky k anodě. Katoda a anoda ve formě platinových vodičů byly umístěny v postranních elektrodoých komůrkách oddělených od separační komory iontoměničovými membránami. Elektroneutrální látky byly hydrodynamickým tokem unášeny v přímém směru. Na výstupní straně byla komora rozdělena do 48 komůrek, ze kterých byly více či méně oddělené složky vzorku v pravidelných intervalech odsávány tenkými hadičkami do sběrače frakcí se 48 nádobkami. Tato unikátní aparatura byla hojně využívána pro izolaci a purifikaci biologicky aktivních peptidů a bílkovin, zejména peptidových a proteinových hormonů a enzymů. Preparativní kapacita dosahovala 50–100 mg peptidů či bílkovin za hodinu. Schéma komory a princip kontinuální průtokové separace jsou ukázány na obr. 1 a fotografie této aparatury je na obr. 2.

Na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let minulého století byl další vývoj této metody dokonce zařazen do programu Interkosmos. V jeho rámci, již s účastí autora tohoto článku, bylo vyvíjeno zařízení pro kontinuální průtokovou izotachoforézu ve volném roztoku⁸. V něm měla být ověřena hypotéza, zda v podmínkách mikrogravitace, kdy nebude docházet k termokonvekci a sedimentaci mak-



Obr. 1. Schéma separační komory a princip kontinuální průtokové elektroforézy. A^{2+} , B^+ , C^0 a D^- , složky vzorku zaváděné tenkým proudem do středu komory; E, základní elektrolyt laminárně proudící separační komorou; E', základní elektrolyt turbulentně proudící elektrodovými komůrkami (EC) oddělenými iontoměničovými membránami (M) od separační komory



Obr. 2. Aparatura pro kontinuální průtokovou elektroforézu

romolekul bílkovin v separační komoře, bude možné zvýšit preparativní kapacitu této metody a v budoucnosti ji dokonce využívat k přípravě superčistých proteinových léčiv v kosmickém prostoru. Prototyp „kosmické izotachoforézy“ byl tehdy intenzivně vyvíjen ve spolupráci s Vývojovými dílnami ČSAV, ale ke hvězdám nakonec neletěl. Kvůli nedostatku financí byl projekt předčasně ukončen.

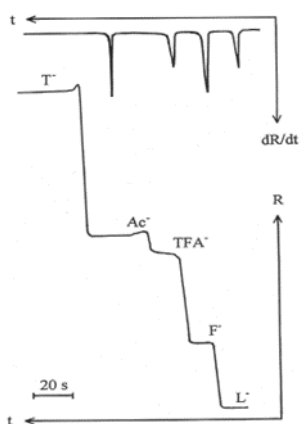
4. Kapilární izotachoforéza

Novým impulzem pro další rozvoj elektromigračních metod v Československu včetně ÚOCHB byl vývoj nové metody, kapilární izotachoforézy (CITP), skupinou F. Everaertse na Technické univerzitě v Eindhoven⁹. Díky koncentračnímu a samozaostřujícímu efektu diskontinuálního elektrolytového systému složeného z vedoucího a koncového elektrolytu byly dosaženy velmi rychlé separace a vysoce citlivé analýzy kationických nebo anionických analytů. CITP byla považována za velmi perspektivní analytickou metodu s širokým uplatněním pro analýzu ve vodě rozpustných ionogenních látek. Již v roce 1970 se na trhu objevil první komerční CITP analyzátor Tachophor vyráběný švédskou firmou LKB.

Z důvodu omezených devizových prostředků však nebylo možné tento přístroj v ÚOCHB ani na jiných pracovištích v tehdejší ČSSR získat. Proto čeští a slovenští vědci, aby mohli tuto metodu využívat a dále rozvíjet, si nejdříve museli příslušné zařízení sami vyrobit. Zpočátku to byla nevýhoda, ale nakonec se to projevilo jako výhoda, neboť čeští a slovenští badatelé hlouběji pronikli nejen do teoretických, ale i praktických základů této metody a patří-

li a stále patří k předním mezinárodně uznávaným odborníkům na tuto metodu a později i na další kapilární elektromigrační metody. Čeští a slovenští specialisté zkonstruovali řadu unikátních zařízení pro CITP. Výzkum této metody a vývoj instrumentace probíhal v několika výzkumných institucích^{10,11}. Jednou z nich byl i ÚOCHB, dalšími takovými pracovišti byly Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Ústav analytické chemie ČSAV v Brně¹², Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Přírodovědecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislavě.

První funkční model CITP sestrojil Z. Prusík ve spolupráci s pracovníky Vývojových dílen ÚOCHB v roce 1976. V následujících letech byl přístroj zdokonalován a v letech 1978–1980 již s přispěním autora tohoto článku a ve spolupráci s VD ÚOCHB byl vyvinut CITP analyzátor, jenž byl svými parametry srovnatelný s výše uvedeným analyzátozem Tachophor. Separace probíhala v tenké teflonové kapiláře s vnitřním/vnější průměrem 0,45/0,70 mm, celkovou délkou 25–40 cm a efektivními délkami k univerzálnímu kontaktnímu vodivostnímu detektoru a UV-absorpčnímu detektoru) o 6 a 4 cm kratšími. Kapilára byla umístěna v nevodivé kapalině v uzavřené kazetě chlazené peltierovými termočlánky. Zdvojený kontaktní vodivostní detektor byl založen na měření rozdílu elektrického potenciálu v podélné ose kapiláry mezi dvěma platínovými mikroelektrodami o průměru 0,1 mm vzdálenými rovněž 0,1 mm. UV-absorpční detektor pracoval při vlnové délce 254 nm. Pro analýzu postačovalo několik málo mikrolitrů 10–100 μM roztoků analyzovaných látek a detekční limity dosahovaly úrovně 10–100 pikomolů. Tato aparatura byla často využívána pro kontrolu čistoty syntetických organických molekul i izolovaných či biosyntetizovaných biologicky aktivních látek, zejména peptidů a bílkovin purifikovaných chromatografickými metodami^{13,14}. Oblíbená byla zejména pro stanovení anionických protiiontů (fluoridů, acetátů a trifluoracetátů) bazic-



Obr. 3. CITP separace fluoridů (F^-), trifluoacetátů (TFA^-) a acetátů (Ac^-). Experimentální podmínky: teflonová kapilára: 270/230 mm celková/efektivní délka; 0,45/0,7 mm vnitřní/vnější průměr (id/od); L, vedoucí elektrolyt: 5 mM HCl, 10 mM histidin, pH 6,1; T, koncový elektrolyt: 10 mM glutamát sodný, pH 6,7; konstantní proud: 50 μ A; teplota: 20 $^{\circ}$ C; R, signál vodivostního detektoru; dR/dt , derivace signálu vodivostního detektoru; t, čas. Koncentrace analytů: 1 mM F^- , 1 mM TFA^- , 2 mM Ac^- ; dávkovaný objem: 2 μ l

kých peptidů, viz obr. 3. Tato stanovení byla v naší laboratoři prováděna i pro peptidové preparáty vyráběné firmou Léčiva Modřany.

Na počátku osmdesátých let byla tato aparatura modifikována vložením tzv. sorpčního elementu mezi dávkovací ventil vzorku a elektrodovou nádobku koncového elektrolytu a byla využita pro vývoj nové metody, desorpční izotachofórey¹⁵. Sorpční element obsahoval imobilizovaný transferin, na kterém byly z ascitické tekutiny zachytávány monoklonální protilátky proti tomuto proteinu. Toto uspořádání představovalo světově prioritní online spojení extrakce tuhou fází s kapilárními elektromigračními metodami. V následném kroku byly monoklonální protilátky ze sorbentu uvolňovány elektrodorpcí za mírných elučních podmínek zachovávajících jejich vazebnou aktivitu na rozdíl od jejich eluce skokovou změnou pH, při které se vazebná schopnost snižovala nebo dokonce ztrácela. Metoda rovněž umožňovala kvantitativní charakterizaci sorpční kapacity sorbentu a sorpčních a desorpčních podmínek v mikroměřítku¹⁶. Díky koncentračnímu efektu CITP byly desorbované protilátky online zkoncentrovány do relativně vysokých koncentrací v malém objemu. Konstrukce této sestavy ve větším měřítku pak umožnila izolaci čistých protilátek¹⁷ a jejich využití pro imunanalytické stanovení transferinu v různých vzorcích biologického původu.

5. Vysokoučinné kapilární elektromigrační metody (HPCE)

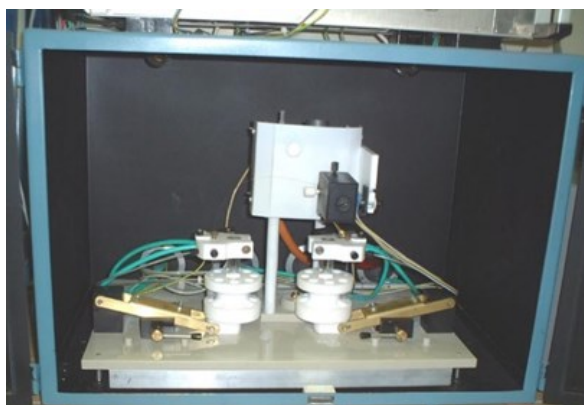
5.1. Vývoj instrumentace

V první polovině osmdesátých let minulého století se „horkým tématem“ v oblasti separačních metod stal vývoj vysokoúčinných kapilárních elektromigračních metod (HPCE). Průlomovými experimenty byly separace fluorescenčně značených aminokyselin, peptidů a aminů kapilární zónovou elektroforézou (CZE) provedené v letech 1981–1983 Jorgensonem a Lukacsovou^{18,19} a separace neutrálních organických molekul principiálně novou metodou, kapilární micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC), realizované Terabem a spol. v letech 1984–1985 (cit.^{20,21}). Obě tyto metody byly provedeny v tenkých skleněných nebo křemenných kapilárách o vnitřním/vnějším průměru 50–75/375–550 μ m. Výhodný poměr plochy a objemu separačního prostoru zajistil účinný odvod Jouleova tepla a umožnil použití vysokých separačních napětí (až 30 kV na 50–80 cm dlouhé kapiláře) při nízkých proudech v řádu desítek μ A. Bylo tak dosaženo vysoké separační účinnosti několika set tisíc pater v krátkém čase 10–30 min.

V ÚOCHB jsme nemohli ve vývoji těchto metod zůstat stranou. První funkční model HPCE analyzátoru byl sestaven již v roce 1985. Separace probíhala v křemenných kapilárách s vnějším polymerním povlakem o vnitřním/vnějším průměru 50–75/200–300 μ m, které byly získány z Ústavu skelných a keramických materiálů ČSAV. Specifická byla konstrukce UV-absorpčního fotometrického detektoru při alternativně volených třech vlnových délkách, 206, 254 a 280 nm. Zdrojem záření pro vlnové délky 206 a 280 nm byla bezelektrodová vysokofrekvenčně buzená jodová výbojka; pro vlnovou délku 254 nm to byla výbojka stejného typu, ale rtuťová. Jako monochromátory sloužily interferenční filtry o výše uvedených vlnových délkách a detektorem záření byla fotodioda se zvýšenou citlivostí v hluboké UV oblasti záření. První výsledky dosažené na tomto přístroji jsme prezentovali na 5th International Symposium on Capillary Isotachopheresis, ITP 1986, v holandském Maastrichtu. Metodou CZE byly analyzovány elektricky nabitě látky, aminokyseliny, peptidy a bílkoviny, a metodou MEKC byly separovány elektroneutrální sloučeniny, např. alifatické a aromatické alkoholy²².

V pokročilejší verzi tohoto analyzátoru (viz obr. 4) bylo navíc možné ovlivňovat elektrokinetický potenciál na vnitřní stěně kapiláry vnějším příčným elektrickým polem a tímto způsobem potlačovat sorpci analytů na vnitřní stěnu kapiláry a regulovat směr a rychlost elektroosmotického toku a optimalizovat tak účinnost separace a dobu analýzy v závislosti na rozdílech elektroforetických pohyblivostí analyzovaných látek^{23,24}.

Na základě podobnosti kapilární zónové elektroforézy (CZE) a volné průtokové zónové elektroforézy (FFZE) byl vytvořen model korelace mezi těmito metodami, který byl využit k převodu analytických separací



Obr. 4. HPCE analyzátor s regulací elektroosmotického toku vnějším příčným elektrickým polem

metodou CZE na preparativní separace metodou FFZE s kapacitou 50–100 mg h⁻¹ (cit.²⁵⁻²⁷). Metodou FFZE byly připraveny biologicky aktivních peptidy ve vysokém stupni čistoty.

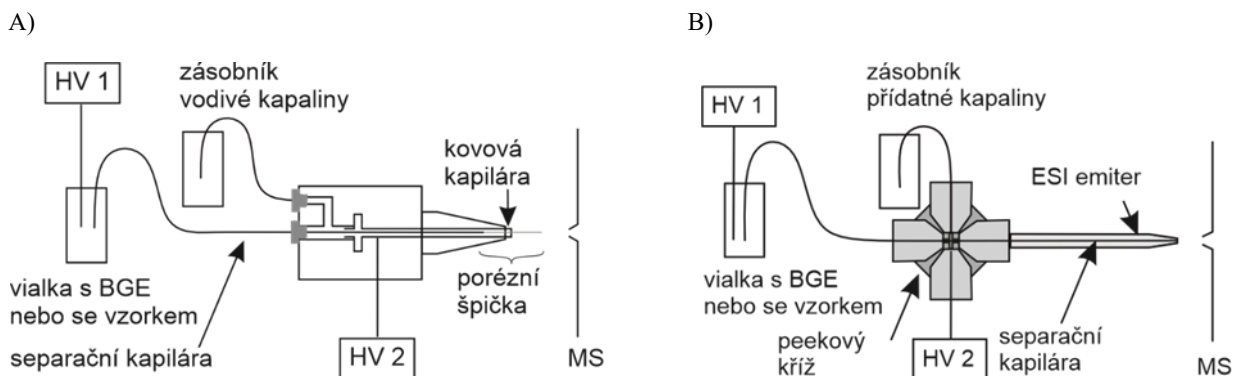
Vývoj dokonalejších zařízení pro kapilární elektromigrační metody pokračoval i v dalších letech. V letech 2006–2008 byl vyvinut univerzální HPCE analyzátor nové generace, který byl vybaven multidimenzionálním detekčním systémem. Tento systém obsahoval univerzální bezkontaktní vodivostní detektor, výše uvedený UV-absorpční detektor alternativně operující při vlnových délkách 206, 254 a 280 nm a fluorescenční detektor s laserem indukovanou fluorescencí při excitační vlnové délce 266 nm umožňující detekci na základě nativní fluorescence peptidů a bílkovin obsahujících aromatické aminokyseliny. Bylo tak možno separovat a detegovat nejen látky obsahující chromofor nebo fluorofor, ale i látky UV-transparentní a nefluoreskující. Detekční limity se pohybovaly v řádu subfemtomolů.

Toto zařízení představovalo univerzální kapilární elektrokinetický analyzátor, ve kterém bylo možné provádět všechny hlavní kapilární elektromigrační metody, a to jak elektroforetické techniky, CZE, CITP, izoelektrickou fokusaci (CIEF) a afinitní elektroforézu (ACE) pro analýzy elektricky nabitých látek, tak i kombinované elektrochromatografické metody, elektrokinetickou chromatografii (CEKC), zejména její micelární mód (MEKC) a elektrochromatografii (CEC), pro analýzu látek nabitých i elektroneutrálních²⁸.

Další významný pokrok v rozvoji instrumentace nastal v posledních letech, kdy se podařilo laboratorní CZE modul online spojit s hmotnostně spektrometrickou detekcí s ionizací elektrosprejem (ESI-MS). Tato současně univerzální i specifická a vysoce citlivá detekce umožňuje podstatně rozšířit aplikační možnosti HPCE metod. Pro toto spojení byly vyvinuty dva typy CE-ESI-MS rozhraní: a) s porézni špičkou separační kapiláry v kovové jehle a s vodivou kapalinou pro přívod sprejovacího napětí a b) se separační kapilárou ústící do skleněného emiteru s přídatnou kapalinou, která protéká emitrem nízkým nano-průtokem a na kterou je přiváděno sprejovací napětí^{29,30}, viz obr. 5. Obě rozhraní byla použitelná pro analýzu draselných komplexů 18-crown-6-etheru a jeho mono-dibenzoderivátů a řady dalších látek, ale rozhraní s emitrem bylo robustnější; udržovalo konstantní sprejovací napětí při různých separačních podmínkách.

5.2. Metodický vývoj a analytické využití

Kromě instrumentace byla rozvíjena i metodika HPCE technik. CZE byla prováděna v základních elektrolytech v širokém rozmezí pH, včetně silně kyselých a silně alkalických základních elektrolytů, a to nejen v klasických pufrách, ale i v tzv. izoelektrických pufrách obsahujících buď jednotlivé amfoterní látky (většinou aminokyseliny) při pH blízkém jejich izoelektrickému bodu³¹ nebo frakcionované směsné amfolyty s úzkým rozsahem pH (cit.^{32,33}),



Obr. 5. Dva typy rozhraní pro spojení HPCE s ESI-MS. A) Rozhraní s porézni špičkou separační kapiláry bez přídatné kapaliny, B) Rozhraní se separační kapilárou ústící do skleněného emiteru s proudící přídatnou kapalinou. BGE, základní elektrolyt; ESI, elektrosprejová ionizace; HV 1, zdroj separačního napětí; HV 2, zdroj sprejovacího napětí

tj. při nízkých elektrických vodivostech těchto elektrolytů dovolujících použití vysokých intenzit elektrického pole (800–1000 V cm⁻¹) a dosažení vysokých separačních účinností a krátkých dob analýz peptidových hormonů. Ve vodě nerozpustné látky byly analyzovány v základních elektrolytech v nevodných^{34,35} nebo směsných hydroorganických rozpouštědlech^{36,37}.

Metodou CEKC s micelárními pseudofázemi tvořenými anionickými nebo kationickými detergenty (dodecyl síranem sodným nebo cetyltrimethylammonium bromidem) byly analyzovány elektroneutrální látky, např. peptidy se zablokovanými N-koncovými aminoskupinami a C-koncovými karboxylovými skupinami a neobsahující aminokyseliny s ionogenními skupinami v postranních řetězcích³⁸ a triazolové fungicidy v rajčatech³⁹.

CEKC metoda s monomolekulárními pseudofázemi cyklodextrinového typu, kterou lze též klasifikovat jako ACE s přidávkou cyklodextrinů (CD) jako afinitních ligandů do základního elektrolytu, byla široce využívána pro separaci enantiomerů a diastereomerů chirálních látek. Velmi účinná ACE metoda s β -CD jako chirálním selektorem⁴⁰ byla vypracována pro kontrolu enantiomerní čistoty významného anti-AIDS léčiva (9-(*R*)-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu ((*R*)-PMPA, tenofovir) vyvinutého v ÚOCHB ve skupině A. Holého⁴¹. Rychlá separace *R*- a *S*-enantiomerů tohoto preparátu byla dosažena v krátkém čase 5 minut v alkalickém BGE (50 mM borát sodný, pH 10,0), viz obr. 6. Dalšími příklady chirálních analýz jsou separace enantiomerů příbuzných antivirových acyklických nukleosid fosfonátů⁴², helquatů⁴³, diquatů⁴⁴ a difluorovaných alkoholů⁴⁵.

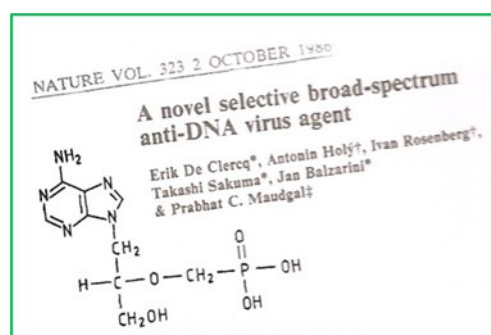
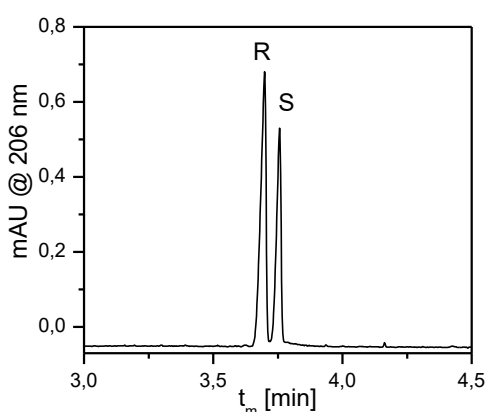
Speciální HPCE metody byly vyvinuty pro separace komplexních směsí peptidů a bílkovin, např. při peptidovém mapování bílkovin a při profilování peptidů a bílkovin v biologických tekutinách a tkáňových extraktech⁴⁶. Peptidové mapy získané CZE separací peptidových frag-

mentů enzymově štěpených vepřových a lidských pepsinů a pepsinogenů umožnily rozlišit jejich fosforylované a defosforylované formy^{47,48}. CZE profilování ve vodě rozpustných bílkovin extrahovaných z jemně rozemletých zrn nativních a geneticky modifikovaných druhů kukuřice⁴⁹ a peptidové mapování tryptických hydrolyzátů těchto bílkovin⁵⁰ umožnilo rozlišit tyto dvě kukuřičné odrůdy. Podobně, na základě CZE profilování peptidů vzniklých tryptickým štěpením bílkovin ve zdravých a zánětem postižených kostních tkáních bylo možné tyto dva druhy tkání jednoznačně odlišit⁵¹.

V poslední době byly vyvinuty nové typy kovalentně vázaných kationických⁵² i anionických⁵³ polymerních povlaků křemenných kapilár s různým stupněm náboje, které potlačují sorpci analytů se stejným typem náboje na vnitřní stěnu kapiláry a dovolují regulovat směr a rychlost elektroosmotického toku. Tím přispívají ke zvýšení separační účinnosti a optimalizaci doby HPCE analýz.

5.3. Fyzikálně chemické charakterizace (bio)molekul

HPCE metody jsou využívány hlavně pro analytické účely, ale velmi významné jsou jejich aplikace i pro fyzikálně chemické a biochemické charakterizace biologicky aktivních látek a funkčních organických molekul. V této oblasti jsme vypracovali postupy pro přesné měření efektivních elektroforetických pohyblivostí včetně jejich korekcí na konstantní iontovou sílu a konstantní teplotu základních elektrolytů^{54–56}, které umožnily stanovení důležitých parametrů ionogenních látek, konstant acidity (pK_a), aktuálních a limitních iontových pohyblivostí, izoelektrických bodů, efektivních nábojů a iontových poloměrů řady nově (bio)syntetizovaných či izolovaných biologicky aktivních látek, např. fosfinátových pseudopeptidů^{55,57,58}, peptidových hormonů a jejich fragmentů⁵⁹, hmyzích antimikrobiálních peptidů^{60,61}, antivirových léčiv na bázi



Obr. 6. HPCE separace *R*- a *S*-enantiomerů 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu. Experimentální podmínky: křemenná kapilára: 392/290 mm celková/efektivní délka, 50/375 μ m id/od; základní elektrolyt: 50 mM H₃BO₃, 45 mM NaOH, pH 10,0; chirální selektor: 20 mg ml⁻¹ β -CD; separační napětí: 15 kV; proud: 22,7 μ A; teplota: 25 °C; koncentrace vzorku: 200 μ M *R*-izomer, 100 μ M *S*-izomer; dávkovací tlak \times čas: 13,9 mbar \times 10 s

acyklických nukleosidů fosfonátů^{62,63}, cyklických dinukleotidů⁶⁴, nativních i syntetických (bio)polymerů^{65,66} a funkčních organických molekul, např. karboranových inhibitorů enzymů⁶⁷ a triazolových fungicidů⁶⁸ ve vodě a hydrofobních azahelicenů v methanolu^{69,70}.

ACE s přísádkem afinitních ligandů na bázi nativních i derivatizovaných CD byla využita pro stanovení vazebných konstant komplexů těchto chirálních selektorů s enantiomery a diastereomery různých sloučenin, např. acyklických nukleosid fosfonátů s β -CD⁷¹, cyklického diadenosin difosforothiolátu a diastereomerů jeho difluorovaného derivátu s 2-hydroxypropyl- β -CD⁷², antimikrobiálního dipeptidu β -alanyl-D,L-tyrosinu a jeho derivátů s 2-hydroxypropyl- β -CD⁷³, diquatů s náhodně vysoce sulfatovanými CD⁷⁴ a komplexů D- a L-enantiomerů Ru(II) a Fe(II) polypyridylových asociátů se single-izomery 2,3-diacetylovaných-6-sulfatovaných α -, β - a γ -CD⁷⁵. Vazebné konstanty byly stanoveny i pro jiné typy molekulových komplexů, např. komplexů cyklických peptidů, valinomycinu³⁴ a [Gly⁶]-antamanidu³⁵ s ionty alkalických kovů v methanolu a komplexů benzo- a dibenzo-18-crown-6-etheru s ionty alkalických kovů ve směsných hydroorganických rozpouštědlech, ve vodě s methanolem, ethanolom nebo acetonitrilem^{36,37}.

Metodou ACE s částečným plněním (PF-ACE) byla studována specifita a síla interakcí DNA oligonukleotidu (Dickersonova dodekameru) s klasickým DNA interkalátorovým ligandem (ethidium bromidem) a s potenciálními novými DNA ligandy oligofenylenového typu⁷⁶ a komplexů helquatů s chirálními aromatickými léčivy a katalyzátory⁷⁷.

Tlakem-asistovaná PF-ACE byla využita ke studiu síly interakcí mezi lidským inzulinem (HI) a čtyřmi biologicky aktivními ligandy (dopaminem, serotoninem, argininem a fenolem) ve vodném slabě alkalickém prostředí⁷⁸. Vazebné konstanty komplexů HI-ligand byly určeny ze závislosti změny migračního času ligandů na délce zóny HI v základním elektrolytu. Silný kationický elektroosmotický tok byl snížen hydrodynamickým protiproudem vyvolaným externím tlakem na výstupním konci kapiláry. Tím bylo zabráněno vyputování zóny HI z kapiláry a bylo umožněno studovat jeho interakce s ligandy. Komplexy HI-ligand byly slabé až středně silné s vazebnými konstantami v rozsahu 385–1 314 l mol⁻¹ vzrůstajícími v pořadí HI-arginin < HI-serotonin < HI-dopamin < HI-fenol.

6. Závěr a perspektivy dalšího rozvoje

Elektromigrační metody byly po celou dobu 70 let existence ÚOCHB intenzivně rozvíjeny a široce a úspěšně využívány pro separaci, kvalitativní i kvantitativní analýzu, izolaci, purifikaci a fyzikálně chemickou a biochemickou charakterizaci (bio)molekul v ústavu izolovaných, (bio)syntetizovaných či studovaných. Na základě dosažených výsledků lze předpokládat, že tomu tak bude i nadále. Další vývoj bude zaměřen zejména na zdokonalování

vysokoúčinných kapilárních elektromigračních metod (HPCE) s cílem zvýšit jejich separační účinnost, citlivost a rychlost. V oblasti instrumentace bude zdokonalováno on-line spojení HPCE s hmotnostně spektrometrickou detekcí s vysokým rozlišením (CE-HRMS) a bude vyvinuto on-line spojení HPCE modulu se sběračem mikrofrakcí pro nanášení elektroeluoovaných nanolitrových objemů analytů na membrány nebo destičky, na kterých budou následně analyzovány MS s maticí asistovanou laserovou desorpčí/ionizací (MALDI-MS). Metodický rozvoj bude zahrnovat vývoj nových: a) elektrolytových systémů kompatibilních s MS detekcí, b) (pseudo)stacionárních fází pro separaci látek nabitých i elektroneutrálních, c) stereoselektorů pro separace a analýzy chirálních sloučenin a d) povlaků potlačujících sorpci analytů na vnitřní stěnu křemenných kapilár. Vyvinutá instrumentace a metodika budou široce využívány pro separace, analýzy, mikropreparace a charakterizace nově připravených funkčních organických molekul a biologicky aktivních látek a pro studium jejich interakcí s jinými (bio)molekulami a (bio)částicemi v živých i neživých systémech.

Práce byla podpořena Akademií věd České republiky, projekt č. RVO 61388963. Autor děkuje spolupracovníkům, kteří se podíleli na prezentovaných výsledcích: Z. Prusík, V. Lišková, P. Sázelová, D. Koval, V. Šolinová, S. Štěpánová, R. Konášová, M. Růžička, T. Tůmová, S. Pangavhane, D. Geffertová, J. Bilek, J. Jaklová-Dyrťová a I. Kovač.

LITERATURA

- Gordon A. H., Keil B., Šebesta K.: *Nature* 164, 498 (1949).
- Gordon A. H., Keil B., Šebesta K., Knessl O., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 15, 1 (1950).
- Tiselius A.: *Trans. Faraday Soc.* 33, 524 (1937).
- Mikeš O.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 22, 831 (1957).
- Mikeš O., Holeysovsky V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 23, 524 (1958).
- Prusík Z., Keil B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 2049 (1960).
- Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 91, 867 (1974).
- Prusík Z., Štěpánek J., Kašička V., v knize: *Electrophoresis' 79* (Radola, B. J., ed.), str. 284. Walter de Gruyter: Berlin/New York 1980.
- Everaerts F. M., Verheggen T. P. E. M.: *J. Chromatogr.* 53, 315 (1970).
- Jandera P.: *J. Sep. Sci.* 29, 465 (2006).
- Gebauer P., Foret F.: *Chem. Listy* 114, 3 (2020).
- Křivánková L.: *Chem. Listy* 114, 10 (2020).
- Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 470, 209 (1989).
- Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 569, 123 (1991).
- Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 273, 117 (1983).

16. Kašička V., Prusík Z.: *J. Chromatogr.* 320, 75 (1985).
17. Prusík Z., Kašička V.: *J. Chromatogr.* 320, 81 (1985).
18. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Anal. Chem.* 53, 1298 (1981).
19. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Science* 222, 266 (1983).
20. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: *Anal. Chem.* 56, 111 (1984).
21. Terabe S., Otsuka K., Ando T.: *Anal. Chem.* 57, 834 (1985).
22. Prusík Z., Kašička V., Staněk S., Kuncová G., Hayer M., Vrkoč J.: *J. Chromatogr. A* 390, 87 (1987).
23. Kašička V., Prusík Z., Sázelová P., Chiari M., Mikšík I., Deyl Z.: *J. Chromatogr. B* 741, 43 (2000).
24. Kašička V., Prusík Z., Sázelová P., Brynda E., Stejskal J.: *Electrophoresis* 20, 2484 (1999).
25. Kašička V., Prusík Z., Pospíšek J.: *J. Chromatogr. A* 608, 13 (1992).
26. Kašička V., Prusík Z., Sázelová P., Jiráček J., Barth T.: *J. Chromatogr. A* 796, 211 (1998).
27. Kašička V.: *Electrophoresis* 30, S40-S52 (2009).
28. Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320 (1997).
29. Konášová R., Koval D., Jaklová Dyrtrtová J., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1568, 197 (2018).
30. Konášová R., Koval D., Hošek J., Kašička V.: *Talanta* 228, 122212 (2021).
31. Šolínová V., Kašička V., Sázelová P., Barth T., Mikšík I.: *J. Chromatogr. A* 1155, 146 (2007).
32. Koval D., Busnel J. M., Hlaváček J., Jiráček J., Kašička V., Peltre G.: *Electrophoresis* 29, 3759 (2008).
33. Šolínová V., Poitevin M., Koval D., Busnel J. M., Peltre G., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1267, 231 (2012).
34. Ehala S., Kašička V., Makrlík E.: *Electrophoresis* 29, 652 (2008).
35. Pangavhane S., Makrlík E., Ruzza P., Kašička V.: *Electrophoresis* 40, 2321 (2019).
36. Ehala S., Makrlík E., Toman P., Kašička V.: *Electrophoresis* 31, 702 (2010).
37. Konášová R., Jaklová Dyrtrtová J., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 39, 4429 (2016).
38. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Barth T., Ciencialová A., Žáková L.: *J. Chromatogr. B* 808, 75 (2004).
39. Kovač I., Jakl M., Šolínová V., Konášová R., Kašička V., Jaklová Dyrtrtová J.: *J. Chromatogr. A* 1652, 462385 (2021).
40. Šolínová V., Kašička V., Sázelová P., Holý A.: *Electrophoresis* 30, 2245 (2009).
41. De Clercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986).
42. Šolínová V., Kaiser M. M., Lukáč M., Janeba Z., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 37, 295 (2014).
43. Koval D., Severa L., Adriaenssens L., Vávra J., Teplý F., Kašička V.: *Electrophoresis* 32, 2683 (2011).
44. Bílek J., Koval D., Sázelová P., Šolínová V., Severa L., Gutiérrez P. E. R., Teplý F., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 46, 2300417 (2023).
45. Pomeisl K., Lamatová N., Šolínová V., Pohl R., Brabcová J., Kašička V., Krečmerová M.: *Bioorg. Med. Chem.* 27, 1246 (2019).
46. Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 45, 4245 (2022).
47. Hynek R., Kašička V., Kučerová Z., Káš J.: *J. Chromatogr. B* 681, 37 (1996).
48. Hynek R., Kašička V., Kučerová Z., Káš J.: *J. Chromatogr. B* 688, 213 (1997).
49. Sázelová P., Kašička V., Ibanez E., Cifuentes A.: *J. Sep. Sci.* 32, 3801 (2009).
50. Sázelová P., Kašička V., Leon C., Ibanez E., Cifuentes A.: *Food Chem.* 134, 1607 (2012).
51. Michalusová I., Sázelová P., Cejnar P., Kučková S., Hynek R., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 43, 3949 (2020).
52. Konášová R., Butnariu M., Šolínová V., Kašička V., Koval D.: *Anal. Chim. Acta* 1178, 338789 (2021).
53. Šolínová V., Tůma P., Butnariu M., Kašička V., Koval D.: *Electrophoresis* 43, 1953 (2022).
54. Kašička V., Prusík Z., Mudra P., Štěpánek J.: *J. Chromatogr. A* 709, 31 (1995).
55. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M., Garrow T. A.: *J. Chromatogr. B* 770, 145 (2002).
56. Koval D., Kašička V., Zusková I.: *Electrophoresis* 26, 3221 (2005).
57. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M.: *Electrophoresis* 24, 774 (2003).
58. Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M.: *Electrophoresis* 27, 4648 (2006).
59. Šolínová V., Kašička V.: *Electrophoresis* 34, 2655 (2013).
60. Tůmová T., Monincová L., Čerovský V., Kašička V.: *Electrophoresis* 37, 3186 (2016).
61. Tůmová T., Monincová L., Nešuta O., Čerovský V., Kašička V.: *Electrophoresis* 38, 2018 (2017).
62. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Česnek M., Holý A.: *Electrophoresis* 27, 1006 (2006).
63. Geffertová D., Ali S. T., Šolínová V., Krečmerová M., Holý A., Havlas Z., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1479, 185 (2017).
64. Štěpánová S., Andris E., Gutten O., Buděšínský M., Dejmek M., Břehová P., Rulíšek L., Kašička V.: *Electrophoresis* 45, 687 (2024).
65. Ibrahim A., Koval D., Kašička V., Faye C., Cottet H.: *Macromolecules* 46, 533 (2013).
66. Chamieh J., Koval D., Besson A., Kašička V., Cottet H.: *J. Chromatogr. A* 1370, 255 (2014).
67. Šolínová V., Brynda J., Šícha V., Holub J., Grüner B., Kašička V.: *Electrophoresis* 42, 910 (2021).
68. Konášová R., Dyrtrtová J. J., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1408, 243 (2015).
69. Ehala S., Míšek J., Stará I. G., Starý I., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 31, 2686 (2008).
70. Šolínová V., Štěpánová S., Jančařík A., Klívar J., Šámal M., Stará I. G., Chocholoušová J. V., Vacek J., Starý I., Kašička V.: *Electrophoresis* 43, 696 (2022).
71. Šolínová V., Mikysková H., Kaiser M. M., Janeba Z., Holý A., Kašička V.: *Electrophoresis* 37, 239 (2016).

72. Štěpánová S., Břehová P., Kašička V.: *Electrophoresis* 45, 1000 (2024).
73. Sázelová P., Šolínová V., Schimperková T., Jiráček J., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 45, 3328 (2022).
74. Bílek J., Koval D., Šolínová V., Talele H. L., Severa L., Gutiérrez P. E. R., Teplý F., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 47, 2400286 (2024).
75. Sázelová P., Koval D., Severa L., Teplý F., Vigh G., Kašička V.: *Electrophoresis* 40, 523 (2020).
76. Růžička M., Čížková M., Jirásek M., Teplý F., Koval D., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1349, 116 (2014).
77. Růžička M., Koval D., Vávra J., Reyes-Gutierrez P. E., Teplý F., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1467, 417 (2016).
78. Šolínová V., Žáková L., Jiráček J., Kašička V.: *Anal. Chim. Acta* 1052, 170 (2019).

V. Kašička (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Development and Application of Electromigration Methods at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences**

This article summarizes the development and application of electromigration methods at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences in Prague (IOCB Prague) since the founding of the Institute up to the present time. The development of instrumentation, methodology and applications of the following methods is described: (i) non-cooled and cooled paper electrophoresis and its application for both analytical and semipreparative separation of amino acids and peptides for determination of primary structure of proteins; (ii) continuous flow-through electrophoresis in a free solution (FFE) applied for purification of biologically active peptides, especially peptide hormones, with the preparative capacity of 50–100 mg h⁻¹; (iii) capillary isotachopheresis (CITP) used for the quality control of synthetic or isolated biological active peptides and their counterions; (iv) high performance capillary electromigration methods (HPCE) including zone electrophoresis, isotachopheresis, isoelectric focusing, affinity electrophoresis, electrokinetic chromatography, and electrochromatography, and their application for separation, analysis and physicochemical and biochemical characterization of a wide spectrum of (bio)molecules isolated, (bio)synthesized and investigated at the IOCB, e.g. amino acids, peptides, proteins, nucleosides, nucleotides, fragments of nucleic bases, steroids, catecholamines, and various functional organic molecules, such as azahelicenes, helquats and diquats.

Keywords: capillary electrophoresis, isotachopheresis, isoelectric focusing, affinity electrophoresis, electrokinetic chromatography, electrochromatography

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Academy of Sciences, project no. RVO 61388963.

The author thanks his coworkers participating in the presented results: Z. Prusík, V. Lišková, P. Sázelová, D. Koval, V. Šolínová, S. Štěpánová, R. Konášová, M. Růžička, T. Tůmová, S. Pangavhane, D. Geffertová, J. Bílek, J. Jaklová Dytrtová, and I. Kovač.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.