

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Kateřina Vatrasová

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Konzultant: PharmDr. Klára Petřů, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro analýzu proteinů

V současnosti existují různé způsoby stanovení bílkovin. Cílem této práce bylo vyvinout, optimalizovat a charakterizovat metodu kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí pro analýzu modelové směsi proteinů (α -laktalbumin, β -laktoglobulin, karboanhydráza, lysozym a ribonukleáza) a porovnat s konvenční UV detekcí.

Mezi zkoumané podmínky patřily vliv pokrytí vnitřní stěny kapiláry na adsorpci proteinů, dále složení a koncentrace vhodného separačního elektrolytu, vliv napětí a teploty. K analýze byla využita křemenná kapilára o délce 50 cm (efektivní délka pro vodivostní detektor 35cm, pro UV detektor 41,5 cm) a vnitřním průměru 50 μ m. V případě UV detekce byla vybrána vlnová délka 210 nm. Vhodným způsobem úpravy kapiláry bylo statické pokrytí vnitřní stěny několikanásobnou vrstvou iontových polymerů (polybren-dextran sulfát-polybren). Rozdělení směsi pěti proteinů bylo dosaženo v základním elektrolytu 1,5M kyselině octové (pH 2). Separace probíhala při napětí -25 kV a teplotě 25 °C.

Po zavedení optimálních podmínek byla zjištěna kalibrační závislost, která měla pro všechny analyty v rozmezí koncentrací 0,03125-1mg/ml lineární průběh (korelační koeficienty byly v rozmezí 0,9899-0,9976). Hodnoty LOD se pohybovaly u vodivostní detekce od 4,79 μ g/ml (karboanhydráza) do 10,04 μ g/ml (β -laktoglobulin) a u UV detekce od 3,38 μ g/ml (karboanhydráza) do 8,75 μ g/ml (β -laktoglobulin). Dále byla vypočtena opakovatelnost, vyhodnocena jako % RSD efektivních mobilit a korigovaných ploch píků (n=6). Hodnoty RSD pro opakovatelnost efektivních mobilit se pohybovaly v rozmezí 0,3-0,7 % (vodivostní detektor) a 0,3-0,9 % (UV detektor). Pro korigované plochy byly RSD 0,8-4,6 % (vodivostní detektor) a 0,4-5,7 % (UV detektor). Limity detekce, stejně jako metody opakovatelnost metody, byly u obou detektorů srovnatelné.