

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY
S BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKČÍ PRO
ANALÝZU PROTEINŮ**

Diplomová práce

Školitel diplomové práce: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Konzultant diplomové práce: PharmDr. Klára Petrů, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2015

Bc. Kateřina Vátrsová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Kateřina Vatrosová

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 průměrem 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 (polybrendextran 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.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Kateřina Vátrsová

Supervisor: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Consultant: PharmDr. Klára Petřů, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for the analysis of proteins

Nowadays there exist many methods for the determination of proteins. The aim of this work was to develop, optimize and characterize method for the analysis of a model mixture of proteins (α -lactalbumin, β -lactoglobulin, carboanhydrase, lysozyme and ribonuclease) by capillary electrophoresis with conductivity detection and to compare it with conventional capillary electrophoresis with UV detection.

The influence of the capillary inner wall coating on the adsorption of proteins, the composition and concentration of convenient background electrolyte, and the voltage and temperature were examined as experimental conditions possibly affecting the separation. A 50-cm fused-silica capillary (effective length 35 cm for conductivity detector and 41.5 cm for UV detector) with internal diameter 50 μm was used for the analysis. The UV detection wavelength was 210 nm. The static coating of the inner capillary wall realized by successive multiple soaking with ionic-polymer (polybrene-dextran sulphate-polybrene). The separation of five proteins was achieved in background electrolyte of 1.5 M acetic acid (pH 2). The separation voltage of -25 kV was applied and the temperature was maintained at 25 $^{\circ}\text{C}$.

The calibration curves measured in the concentration range $\approx 0.03 - 1 \text{ mg/ml}$ were linear for all analytes (correlation coefficients 0.9899 - 0.9976). The detection limits for conductivity detection ranged from 4.8 $\mu\text{g/ml}$ (carboanhydrase) to 10.0 $\mu\text{g/ml}$ (β -lactoglobulin) and for UV detection from 3.4 $\mu\text{g/ml}$ (carboanhydrase) to 8.8 $\mu\text{g/ml}$ (β -lactoglobulin). Repeatability expressed as % RSD of effective mobilities ($n=6$) ranged between 0.3 - 0.7 % (conductivity detection) and 0.3 - 0.9 (UV detection). For corrected peak areas the RSD values were 0.8 - 4.6 % (conductivity detection) and 0.4 - 5.7 % (UV detection). The limits of detection as well as method repeatability were found comparable for both detection approaches.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 6. 5. 2015

Bc. Kateřina Vatrosová

Poděkování:

Moc ráda bych poděkovala své konzultantce diplomové práce PharmDr. Kláře Petřů, Ph.D. za ochotu, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc a také panu doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. za celkovou revizi této práce.

Tato práce je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/30.006

OBSAH

ABSTRAKT	2
ABSTRACT.....	3
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	10
2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	11
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1 Kapilární elektroforéza (CE)	12
3.1.1 Techniky kapilární elektroforézy	13
3.1.2 Elektroforetická pohyblivost.....	15
3.1.3 Elektroosmotický tok.....	17
3.1.4 Úprava vnitřní stěny kapiláry	19
3.1.5 Migrační čas.....	23
3.1.6 Instrumentální uspořádání.....	23
3.2 Možnosti stanovení bílkovin.....	27
3.2.1 Metody stanovení.....	28
3.2.2 C ⁴ D detektor v analýze bílkovin.....	28
3.2.3 Kompatibilita PB-DS-PB a C ⁴ D.....	31
3.2.4 Modelová směs bílkovin.....	31
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
4.1 Použité přístroje a laboratorní pomůcky.....	35
4.2 Použité chemikálie.....	35
4.3 Příprava pracovních roztoků	36
4.4 Pracovní postup.....	38
4.5 Výpočetní postupy.....	39
4.5.1 Způsobilost systému	39
4.5.2 Kalibrační závislost.....	41
4.5.3 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)	42
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1 Vývoj a optimalizace metody	43
5.1.1 Volba elektrolytu	43
5.1.2 Vliv koncentrace kyseliny octové.....	46

5.1.3	Přídavek ethylenglykolu	49
5.1.4	Vliv vloženého napětí	50
5.1.5	Vliv teploty	51
5.1.6	Optimální podmínky analýzy.....	53
5.2	Způsobilost systému	56
5.2.1	Rozlišení	56
5.2.2	Faktor symetrie píku	56
5.2.3	Účinnost separace	57
5.2.4	Opakovatelnost analýzy	57
5.3	Kvantitativní analýza	59
5.3.1	Kalibrační závislost.....	59
5.3.2	Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)	65
5.4	Souhrn výsledků zkoumané metody	66
5.5	Výhled.....	69
6	ZÁVĚR	70
7	LITERATURA.....	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK.....	75

SEZNAM ZKRATEK

BACE	bioafinitní kapilární elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
C ⁴ D	bezkontaktní vodivostní detektor
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DDAB	didodecyldimethylamonium bromid
EOT	elektroosmotický tok
HEC	hydroxyetylcelulóza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHAPS	(3-[(3-cholamidpropyl)-dimethylamonio]-propan sulfonát
IC	iontová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MCE	mikročipová kapilární elektroforéza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
N	počet teoretických pater
PB-DS-PB	polybren-dextran sulfát-polybren)
PDMA	polydimethylakrylamid
PEI	polyethylenimin
PEO	poly(etylen oxid)
PVA	polyvinyl alkohol
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS-PAGE	elektroforéza v kapalných síťovacích médiích

SMIL	několikanásobná vrstva ionizovaných polymerů (successive multiple ionic-polymer coating)
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromide
UV/VIS	ultrafialové-viditelné záření

1 ÚVOD

V současné době lze zaznamenat vzrůstající požadavky, týkající se analytických procesů při stanovování celé řady látek. Z toho důvodu jsou prováděny rozsáhlé studie, jejichž cílem je vytvořit ucelený přehled o možnostech stanovení a nalézt optimální podmínky analýzy. Předmětem zkoumání často bývají bílkoviny, které mohou být určovány např. v rámci klinické diagnostiky a pomoci tak odhalit různá onemocnění. Velký zájem o přesnější a citlivější analýzu bílkovin souvisí také se skutečností, že nově vyvíjené farmakologické přípravky jsou v mnoha případech rovněž bílkovinné povahy.

Mezi nejpoužívanější metody analýzy bílkovin se řadí chromatografie, elektroforéza, hmotnostní spektrometrie a další spektroskopické metody. Jednou z možností stanovení je kapilární elektroforéza (CE), k jejímž výhodám patří vysoká výkonnost, krátká doba analýzy, velmi dobrá separační účinnost, minimální objem analytu a použitých reagensů a samozřejmě možnost automatizace. Při využití CE pro stanovování bílkovin je potřeba najít optimální podmínky analýzy, jako je vhodný elektrolyt, vložené napětí, teplota, úprava kapiláry, volba detektoru a další.

Podle dostupných studií bylo velmi dobrých výsledků při modifikaci vnitřního povrchu separační kapiláry dosaženo s použitím statického pokrytí kapiláry iontovými polymery, které bude tvořit základ také při všech analýzách, popsanych v této práci. Se zvoleným typem pokrytí bývá nejčastěji využívána a zároveň nejlépe prozkoumána spektrofotometrická (UV) detekce, kdežto volba vodivostního (C^4D) detektoru s daným typem úpravy kapiláry do současné doby příliš prozkoumaná není. Porovnání obou typů detektorů, sledující separaci modelové směsi bílkovin v rozsahu molekulových hmotností 13 700-29 000 Da a izoelektrických bodů 4,4-11,35, se s využitím CE + SMIL (několikanásobné pokrytí vrstvou ionizovaných polymerů) věnuje tato práce.

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat a optimalizovat metodu vhodnou pro analýzu modelové směsi proteinů, a to α -laktalbuminu, β -laktoglobulinu, karboanhydrázy, lysozymu a ribonukleázy pomocí kapilární zónové elektroforézy, charakterizovat způsobilost analytického systému a porovnat vhodnost a citlivost UV a C^4D detekce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kapilární elektroforéza (CE)

Pojmem elektroforéza se rozumí fyzikální analytická separační metoda založená na schopnosti elektricky nabitých částic migrovat ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole vzniká po ponoření kladné (anoda) a záporné (katoda) elektrody do roztoku obsahujícího ionty. Aby došlo k pohybu nabitých částic k opačně nabitým elektrodám, je potřeba mezi tyto elektrody vložit napětí. ^[1]

První zmínky o pohybu anorganických částic v elektrickém poli pochází již z roku 1892, nedlouho poté byl zjištěn pohyb také u bílkovin ve vodných roztocích. Ve 30. letech 20. století dochází k sestrojení první elektroforetické aparatury, na které bylo provedeno rozdělení proteinů krevního séra. O to se zasloužil švédský elektrochemik Arne Tiselius, jenž za svůj objev získal roku 1948 Nobelovu cenu. V samotných začátcích této metody byl jako nosné médium využíván papír, výhodou byla nízká cena a nenáročná příprava. Mezi další nosná média patřil například škrobový gel, acetát celulózy, nebo polyakrylamidový gel, který je pro gelovou elektroforézu využíván dodnes. Kapiláry se pro separaci začaly využívat až na počátku 90. let 20. století. ^[1]

Kapilární elektroforéza patří díky své účinnosti dosahující stovky až miliony teoretických pater a citlivosti na úrovni 10^{-15} – 10^{-21} mol analytu ve velmi malých (nanolitrových) objemech k velmi účinným analytickým metodám. K výhodám CE patří rozsáhlé možnosti automatizace, jednoduchost přípravy vzorku i separační aparatury, efektivní chlazení, rychlost analýzy a také skutečnost, že při detekci získáváme signál přímo z „on-column“ detektoru, na rozdíl od „off-line“ densitometrického vyhodnocování na ploše gelu. Kapilární rozměry separačního systému s sebou přináší i některé nevýhody, jako jsou problémy s dávkováním, čištěním povrchu kapiláry a citlivostí detekce. Za nevýhodu by se dala považovat také nutnost po každé analýze vyčistit její povrch a uvést jej tím do opakovatelného stavu (neplatí u kapilár plněných gelem). ^[1]

Kapilární elektromigrační metody mají velmi široké spektrum aplikace. Využívají se k separaci a analýze všech typů rozpustných ionogenních látek, a to jak nízkomolekulárních, tak i vysokomolekulárních, organických i anorganických kyselin a bází, kovových iontů, aminokyselin, peptidů, bílkovin, nukleosidů, nukleotidů,

nukleových kyselin, sacharidů a syntetických polymerů. Je možné separovat také nabitě biočástice, jako jsou nejrůznější viry a buněčné organely. Ve spojení s chromatografickými metodami lze stanovovat také látky neionogenní, např. alifatické a aromatické uhlovodíky a jejich deriváty, což znamená alkoholy, aldehydy, ketony atd. ^[1]

3.1.1 Techniky kapilární elektroforézy

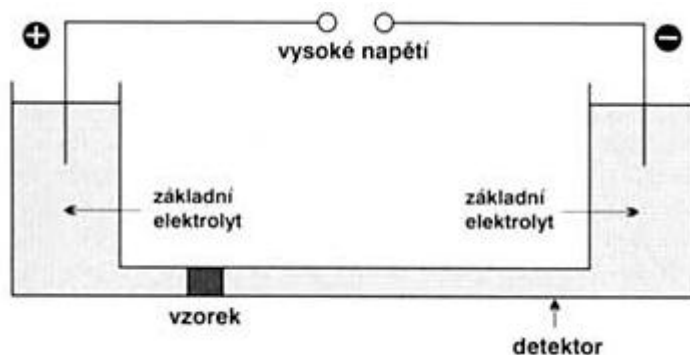
V dnešní době existuje celá řada elektromigračních separačních metod, využívajících kapilárního instrumentálního formátu. Liší se především mechanismem separace a patří sem: ^[1]

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Izotachoforéza (CITP)
- Izoelektrická fokusace (CIEF)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Elektroforéza v kapalných síťovacích médiích (SDS-elektroforéza bílkovin, SDS-PAGE)
- Bioafinitní elektroforéza (BACE)
- Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární zónová elektroforéza

Transport a separace analyzovaných iontů probíhá v kapiláře, která propojuje 2 nádoby. Pro tento typ analýzy se obvykle využívá kapilára z taveného křemene o délce 10 cm až 1 m s vnitřním průměrem 25-100 μm . Elektrické napětí, obstarávající pohyb iontů je přiváděno elektrodami, vnořenými do roztoku základního elektrolytu. Ten se do kapiláry dostává za pomoci přetlaku, vytvořeného nad hladinou kapaliny v jedné z nádobek. Poté je jeden konec kapiláry vnořen do nádoby s měřeným vzorkem, přičemž část vzorku vniká na její začátek. Nakonec se kapilára vrací zpět do nádoby se základním elektrolytem a zapne se hnací napětí. ^[2, 3]

Elektricky nabité částice ve vzorku se na základě různé migrační rychlosti jednotlivých složek pohybují v oddělených zónách. Rychlost migrace každé zóny souvisí s elektroforetickou pohyblivostí látek a elektroosmotickým tokem. Tento typ kapilární elektroforézy je díky své vysoké účinnosti vhodný pro analýzu jak velmi malých molekul ($M_r < 2000$), tak i látek poměrně velkých ($M_r > 100\,000$). Je možné provést separaci molekul s velmi malým rozdílem v poměru náboje k hmotnosti, nebo také látek chirálních. Analytický signál generovaný detektorem je zpracován počítačem, který zobrazí časový záznam s píky (elektroforeogram).^[2, 3]



Obr. č. 1: Uspořádání kapilární zónové elektroforézy^[2]

Další typy CE

Na podobném principu jako CZE funguje izotachofórze, liší se především tím, že při separaci využívá 2 elektrolyty (vedoucí a koncový) a vzorek je dávkován na jejich rozhraní. Kapiláry v CIEP jsou výhradně z plastu, převážně teflonové. CIEF je určena pro molekuly amfolytické povahy, ty jsou rozděleny na základě jejich izoelektrického bodu (pI). CGE a SDS-PAGE využívají k analýze síťovacích médií, to znamená hlavně gely (polyakrylamidový, agarózový atd.) kterými jsou molekuly různě zadržovány podle molekulové hmotnosti. Dalším typem je BACE, která se zakládá na selektivním zpomalování vybraných složek směsi analytu vlivem biospecifických interakcí, např. enzym-inhibitor, antigen-protilátka, hormon-receptor. Metody MEKC a CEC kombinují prvky chromatografie a elektroforézy.^[1, 2, 4]

3.1.2 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetickou pohyblivost - neboli mobilitu (μ_e), lze chápat jako ústřední veličinu elektromigračních separačních metod. Může být definována jako rychlost pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě, což lze vyjádřit vztahem:

$$\mu_e = \frac{v}{E}$$

v - rychlost pohybu iontu v elektrickém poli
 E - intenzita elektrického pole

Rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou sil. Ion s velikostí náboje (q) je do pohybu uváděn silou elektrického pole (F_e).

$$F_e = q \cdot E$$

Tento pohyb iontu je brzděn frikční silou prostředí (F_f), což je dáno Stokesovým zákonem:

$$F_f = -6\pi\eta r v$$

η - viskozita prostředí
 r - poloměr iontu
 v - rychlost pohybu iontu

V ustáleném stavu jsou si tyto opačně orientované síly rovny, platí tedy $F_e = F_f$. Z toho lze odvodit následující rovnici:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Z této rovnice vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a zároveň nepřímo úměrná jeho poloměru (velikosti, relativní molekulové hmotnosti) a

viskozitě prostředí. Je tedy zřejmé, že nejvyšší elektroforetickou mobilitu budou vykazovat vysoce nabití ionty o velmi malé velikosti. ^[4,5]

Hodnotu elektroforetické mobility je možné najít v tabulkách jako fyzikální konstantu, ta je určena bodem, kdy je nekonečně zředěný elektrolyt plně nabitý ($\alpha_i=1$). V praxi se však hodnota naměřená v laboratoři od hodnoty tabelované liší, nazýváme ji efektivní mobilita (μ_{eff}):

$$\mu_{eff} = \alpha_i \cdot \mu_e$$

α_i - stupeň ionizace (nebo disociace) molekuly

Po aplikaci vzorku migruje nosným elektrolytem v kapiláře každý analyzovaný druh iontů jako nezávislá zóna podle své elektroforetické pohyblivosti. ^[5]

Jevy ovlivňující elektroforetickou pohyblivost

K vlivům, které mohou nějakým způsobem ovlivňovat elektroforetickou pohyblivost, patří podélná difuze, Joulovo teplo, interakce roztoku s povrchem kapiláry a elektrodisperze. Podélná molekulární difuze je způsobena koncentračním gradientem analyzované látky v kapiláře a je třeba ji chápat jako přirozenou součást CZE. ^[5] Vznik Joulova tepla je důsledkem průchodu proudu (pohybu náboje) v každém elektrickém vodiči. V CE způsobuje lokální ohřev kapaliny v kapiláře a tudíž její konvekční pohyb, což následně způsobuje promíchávání procházejících zón, jejich rozšiřování projevující se rozšířením píků, popř. ztrátou jejich rozlišení. ^[1]

Tyto a další jevy jsou velmi dobře popsány v celé řadě publikací (např. High Performance Capillary Electrophoresis ^[5]).

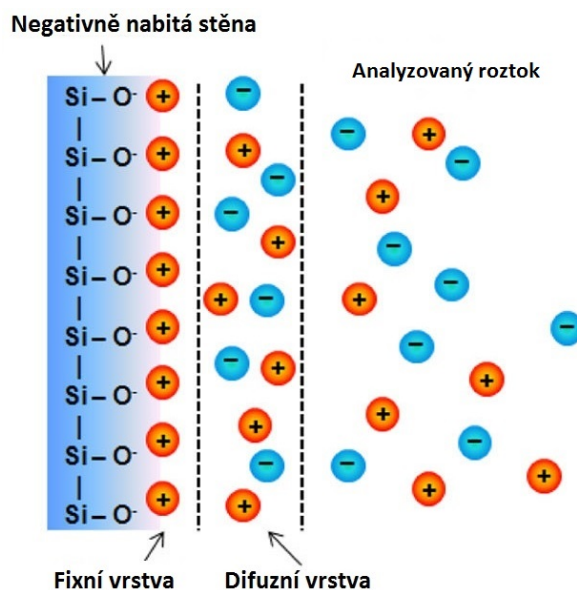
3.1.3 Elektroosmotický tok

Základním jevem, vyskytujícím se při analýze pomocí CE je elektroosmotický tok (EOT). Jedná se o pohyb celého objemu kapaliny směrem k detektoru, a to v důsledku přítomnosti náboje na vnitřní stěně kapiláry. EOT vzniká za působení stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy, která se nachází na rozhraní pevné a kapalné fáze uvnitř kapiláry. ^[5]

Imobilizovaná (fixní) část dvojvrstvy vzniká při selektivní adsorpci jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry, popř. disociaci ionogenních skupin na její vnitřní povrch. U nejčastěji využívaných kapilár z taveného křemene dochází k ionizaci silanolových skupin (SiOH), vzniká jejich aniontová forma SiO^- a vnitřní stěna tak získá záporný náboj. Vlivem záporného náboje vnitřní stěny dochází k interakci s kladně nabitými ionty elektrolytu a dotváří tak podobu imobilizované části stabilní elektrické dvojvrstvy. ^[4, 5]

Difuzní vrstva této dvojvrstvy je tvořena přebytkem volného náboje, tím dojde v blízkosti stěny k vytvoření potenciálního rozdílu, jehož část, která se vyskytuje v difuzní oblasti elektrické dvojvrstvy, se nazývá elektrokinetický potenciál (zeta potenciál ζ). ^[4] Po vložení elektrického pole se uvádí do pohybu jak difuzní část elektrické dvojvrstvy, tak také veškerý roztok uvnitř kapiláry. Děje se tak v důsledku působení vnitřního tření v kapalině. ^[1] Za normálních podmínek (vnitřní povrch kapiláry je nabitý negativně) se elektroosmotický tok pohybuje směrem od kladně nabitě anody k záporně nabitě katodě, přičemž všechny ionty, přítomny v roztoku se pohybují ve směru EOT. Nejrychleji k detektoru dorazí kationty, následně neutrálně nabitě částice a nakonec anionty. Ty migrují nejpomaleji, jelikož jsou stále přitahovány k anodě vlivem elektroforetické pohyblivosti, která je ale vůči EOT slabší. ^[5]

Vzhledem k tomu, že EOT unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, působí z hlediska separace jako neselektivní síla. Má ale schopnost významně ovlivňovat výslednou migrační rychlost analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy.



Obr. č. 2: Uspořádání vnitřního povrchu kapiláry [6]

Velikost elektroosmotického toku může být vyjádřena pomocí těchto vztahů: [5]

Rychlost elektroosmotického toku

$$v_{EOT} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \cdot E$$

Elektroosmotická mobilita

$$\mu_{EOT} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

ε – dielektrická konstanta pufru

ζ - zeta potenciál

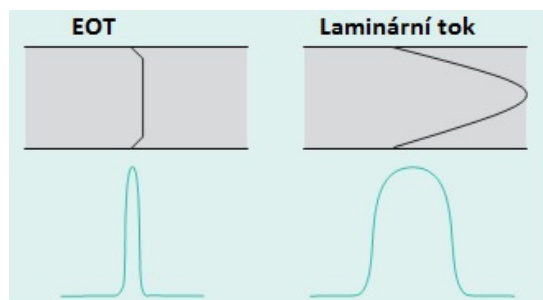
η - viskozita

E – aplikované elektrické pole

Je známo několik různých způsobů, jak lze ovlivnit velikost EOT. Významnou roli zde hraje hodnota pH elektrolytu, na níž je závislá míra ionizace silanolových skupin. Při vysokém pH (nad 9) jsou prakticky všechny skupiny ionizovány a velikost elektroosmotického toku je značně vyšší, než při nízkých hodnotách pH (cca 2-4). V souvislosti s příliš vysokou hodnotou pH základního elektrolytu se mohou občas

objevit problémy, jako je např. jeho velmi rychlý pohyb ke kapiláře, aniž by došlo k řádné separaci iontů. Proto některé módy kapilární elektroforézy vyžadují redukci, či úplnou absenci EOT. K dalším možnostem úpravy se řadí např. změna elektrického pole (s jeho snížením dojde ke zpomalení EOT), iontová síla či koncentrace pufru, teplota (ovlivnění viskozity), organické modifikátory elektrolytu (ovlivnění viskozity a zeta potenciálu) a další přídatné látky, např. vhodné surfaktanty (více v kapitole 1.4).^[5]

Významnou předností EOT při srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry. Na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku dochází k zanedbatelné disperzi zón analytů. Na obrázku níže lze vidět, jak může rychlostní profil souviset s tvarem píku.^[5]



Obr. č. 3: Srovnání EOT a laminárního toku^[5]

3.1.4 Úprava vnitřní stěny kapiláry

Při analýze CE bývá první volbou kapilára bez jakékoli úpravy vnitřního povrchu. Takový povrch získává vlivem disociace silanolových skupin záporný náboj (viz kapitola 1.3). V případě separace bílkovin však dochází k jejich adsorpci na vnitřní stěnu a k dalším nežádoucím interakcím, což vede k rozmývání zón a deformaci (chvostování) píků, tím pádem i ke ztrátě účinnosti a reprodukovatelnosti separace.^[5, 7] V literatuře lze najít několik způsobů, jak těmto problémům předcházet:^[8]

- regulace pomocí změny pH nebo koncentrace iontů BGE
- dynamické pokrytí kapiláry
- statické pokrytí kapiláry

U prvního z uvedených způsobů je třeba mít na paměti, že extrémní hodnoty pH elektrolytu mohou způsobit denaturaci a strukturální změny bílkovin. Velmi nízké pH zpomaluje-až eliminuje EOT, naopak vysoké pH způsobuje velmi rychlý EOT. Nadměrně vysoká koncentrace pufru způsobí kromě zpomalení EOT také znatelný nárůst Joulova tepla. ^[5, 7]

Dynamické pokrytí kapiláry

Dynamická úprava vnitřního povrchu spočívá v přidání modifikátoru přímo k elektrolytu, který pak reaguje s vnitřní stěnou a následně dojde k pozměnění náboje a hydrofobnosti. Vůbec nejčastějšími modifikátory v CE jsou surfaktanty, které mohou být jednořetězcové (anionty, kationty, zwitteriony - amfoterní ionty a další neiontové částice), nebo dvouřetězcové (kationty, zwitteriony). Mezi nejvýznamnější surfaktanty se řadí SDS (dodecylsírán sodný), CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonát), DDAB - didodecyldimethyl - amonium bromid) a další. Surfaktanty deaktivují povrch kapiláry za pomoci hydrofobních nebo iontových interakcí. K výhodám dynamického způsobu úpravy patří jistě nenáročnost přípravy, možnost využití širokého rozsahu koncentrací pufru a nízká cena. I přes to, že je v dnešní době dynamické pokrytí preferováno před statickým ^[5], pro analýzu nativních proteinů se nejeví jako vhodné. ^[7]

Statické pokrytí kapiláry

Statická modifikace zahrnuje buď permanentní (trvalou) změnu vnitřní stěny pomocí vytvoření kovalentních vazeb, nebo tzv. semi-permanentní (dalo by se říci částečně trvalou) změnu, způsobenou fyzikální adsorpcí modifikátoru na stěnu kapiláry. Tento typ pokrytí je využíván především pro vysokou schopnost rozlišení a reprodukovatelnosti separace, jeho realizace je však náročnější. ^[8] Při porovnání obou možností statického pokrytí zjistíme, že fyzikální adsorpce má oproti kovalentnímu pokrytí několik výhod: jednodušší tvorba pokrývací vrstvy, možnost regenerace pokrytí, lepší přístup k informacím, co se týká vlastností modifikátoru a menší závislost procesu na chemických vlastnostech povrchu. Jako modifikátory se využívají polymery, které se adsorbují na stěnu kapiláry a mohou být neutrální, kladně nabitě, či vytváří několikanásobnou vrstvu střídavě kladně a záporně nabitých polymerů (SMIL). ^[9]

Použití semi-permeabilního pokrytí nevyžaduje před každou analýzou přidávání polymeru k elektrolytu, nicméně i zde je doporučeno mezi jednotlivé kroky zařadit promývání kapiláry z důvodu její regenerace. Přehled nejčastěji využívaných polymerů v případě úpravy pomocí fyzikální adsorpce je uveden v následující tabulce: ^[9]

Tabulka č. 1: Přehled polymerů používaných k pokrytí pomocí fyzikální adsorpce

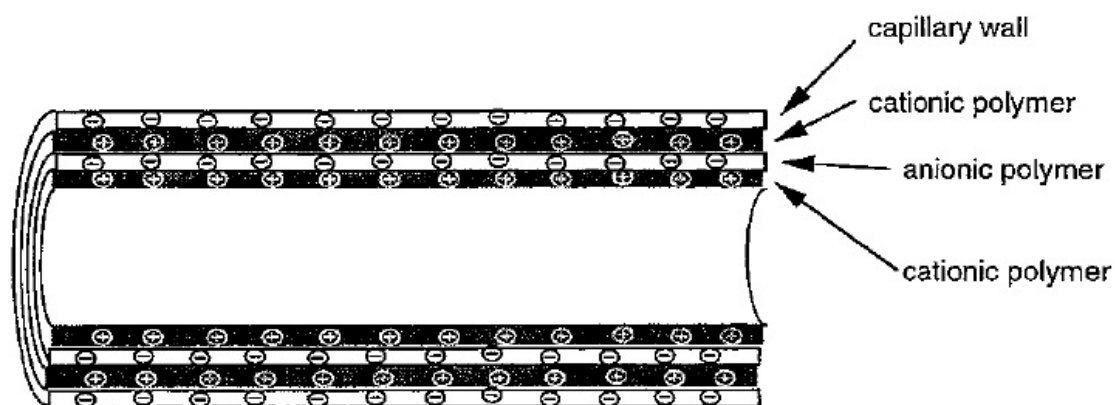
Neutrální polymery	Pozitivně nabitě polymery	SMIL
PEO Poly(etylen oxid)	PEI Polyetylenimin	SMIL-DS (PB-DS) Polybren-dextran sulfát
PEO-PPO-PEO PEO-polypropylenoxid-PEO	PB Polybren	SMIL-PB (PB-DS-PB) Polybren-dextran sulfát-polybren
PVA Polyvinyl alkohol	PDADMAC Polydiallyldimethylammonium chlorid	PB-PVS Polybren-polyvynylsulfonát
PDMA Polydimethylakrylamid	PolyE-323 1,2-bis-(3 aminopropylamino)ethan	PDADMAC-PSS PDADMAC-polystyren sulfonát
PHEA Poly-N-hydroxyetylakrylamid	3,75% Poly-LA 0,1% Chitosan	
2% EPDMA 2% epohy-polydimethylakrylamid		
DMA-EPyM N,N-Dimethylakrylamid-etylpyrrolidin metakrylát		
1% acetát celulózy		

Každý polymer byl opakovaně použit k úpravě vnitřní stěny kapiláry, přičemž na základě výsledků vznikl souhrn typických vlastností: např. výborná rezistence vůči adsorpci, ale na úkor snížené výkonnosti, co se týká separace bazických proteinů (PEO), nutnost každodenní regenerace pokrytí (PEO), chvostování píků (PVA), snížená schopnost zabránění adsorpce proteinů (PVA, PDMA), nestabilní EOT (PEI) atd. Na druhou stranu velmi dobrých výsledků dosahuje poměrně nová metoda úpravy kapiláry, a to SMIL-PB, což je v podstatě „sendvičová“ vrstva polybrenu-dextran sulfátu-polybrenu (PB-DS-PB). ^[9]

SMIL

SMIL (successive multiple ionic-polymer coating) znamená postupné několikanásobné pokrytí iontovými polymery, kdy se na ionizovanou (pomocí NaOH) vnitřní stěnu kapiláry připojuje vrstva kationtů, na kterou navazuje další vrstva, tentokrát aniontových polymerů. Častým modelem bývá PB-DS, kde kationtovou vrstvu představuje polybren a aniontovou vrstvu dextran sulfát. Kapilára potažená SMIL vykazuje dlouhou životnost (více než 100 měření) a je odolná vůči některým organickým rozpouštědlům. ^[7]

S poměrně neobvyklou a inovativní úpravou kapiláry přichází H. Katayama ^[10] a kol., který ve své studii představuje několikanásobné pokrytí kapiláry, avšak tentokrát se třemi vrstvami polymeru. Výsledné pokrytí pak obsahuje 2 vrstvy polybrenu, z obou stran obklopující vrstvu dextran sulfátu (viz obr. č. 4).



Obr. č. 4: Vnitřní stěna kapiláry po potažení PB-DS-PB ^[10]

Po opakovaném měření směsi proteinů s využitím kapiláry potažené PB-DS-PB byla zjištěna až pozoruhodná stabilita tohoto pokrytí. Po více než 600 analýzách zůstává povrch stále stejně odolný vůči 1M NaOH a 0,1M HCl, což značí dobrou chemickou stabilitu. Závislost elektroosmotického toku na pH umožňuje rychlou analýzu i v alkalické oblasti, kdy se pH elektrolytu blíží pI proteinů. Jednou z největších výhod je dobrá opakovatelnost (dosahovány jsou RSD nižší než 1 %). ^[10]

3.1.5 Migrační čas

Migrační čas (t_a) můžeme definovat jako dobu, kterou rozpuštěná látka potřebuje k migraci po vzdálenosti l , to znamená od místa nástřiku do detekční cely. Je dán výrazem:

$$t_a = \frac{l}{\mu_e \pm \mu_{EOT}} = \frac{l \cdot L}{(\mu_e \pm \mu_{EOT}) \cdot V}$$

l - efektivní délka kapiláry

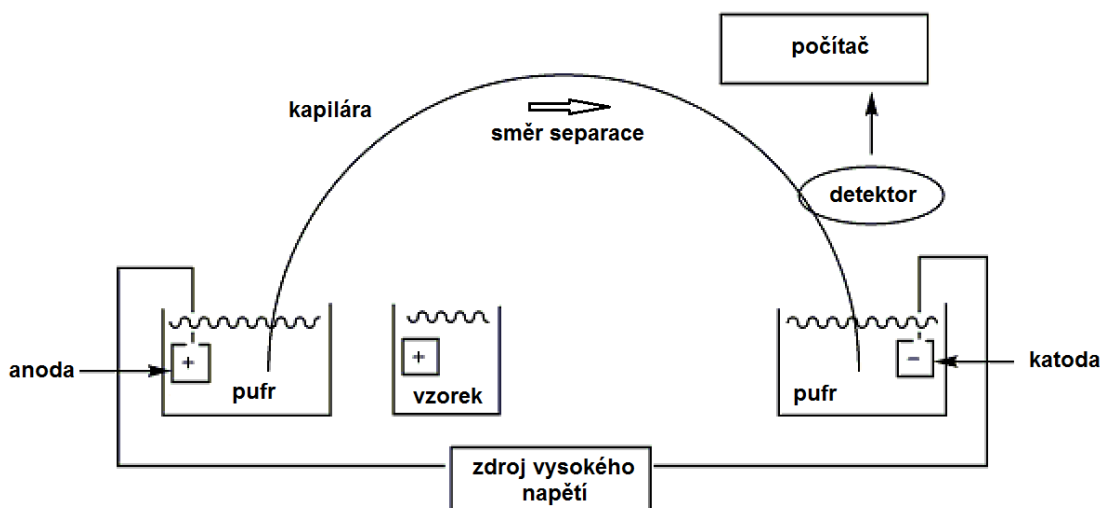
L - celková délka kapiláry

V - aplikované napětí

Skutečná rychlost analytu je dána součtem rychlostí elektroosmotického toku a vlastní elektroforetické rychlosti. Efektivní délka kapiláry je brána od místa nástřiku po detekční celu. Pokud detekce probíhá mimo kapiláru (např. při spojení s hmotnostním spektrometrem), je tato délka rovna celkové délce kapiláry. Z uvedených vztahů je patrné, že migrační čas je přímo úměrný délce kapiláry (s rostoucí efektivní délkou se bude prodlužovat i t_a) a zároveň nepřímo úměrný součtu rychlostí iontů a vloženému napětí. ^[5]

3.1.6 Instrumentální uspořádání

Základní instrumentální uspořádání pro elektroforézu není vůbec složité. Skládá se ze 3 částí - stabilizovaného zdroje vysokého napětí, zásobníku základního elektrolytu (katodový a anodový prostor) spojených separačním ložem a detekčního systému. ^[11]



Obr. č. 5: Schéma uspořádání kapilární elektroforézy ^[12]

Kapilára

V kapilární elektroforéze jsou obvykle využívány křemenné kapiláry o vnitřním průměru 20–200 μm (u CZE nejčastěji 25-100 μm), na vnějším povrchu chráněné polyimidovým potahem, jelikož tavený křemen je sám o sobě velmi křehký. Při optické detekci je potřeba část ochranného obalu sejmout (např. upálením) a vytvořit tak tzv. detekční okno. Toto okénko je pak centrováno mezi dvě kulové čočky detektoru. Kromě křemenných kapilár je možné využít také kapiláry teflonové, či skleněné. Jejich délka se pohybuje mezi 5–100 cm. Výhodou využití kapiláry z taveného křemene je její chemická a elektrická neutralita, flexibilita a zároveň pevnost, dobrá propustnost pro UV záření a také velmi hladký vnitřní povrch. Aby se zabránilo přelomení nebo pohybu kapiláry v optickém okénku, bývají upevněny v kazetě. ^[1, 13]

Zdroj vysokého napětí

Zdroj napětí je potřeba k vytvoření stejnosměrného elektrického proudu, který za normálních okolností umožní pohyb analytů od anody ke katodě. V některých případech (např. při změně náboje stěny kapiláry vlivem pokrytí nebo při změně pH) se směr migrace mění a je tedy potřeba změnit i polaritu elektrického pole. Velikost napětí se obvykle nachází v rozmezí 5-30 kV, aby produkovalo proud kolem 10-100 μA . Pokud by byla hodnota elektrického proudu vyšší, může docházet k nadměrnému ohřevu uvnitř kapiláry, který nelze dostatečně efektivně odvádět, což má za následek rozmývání zón a ztrátu rozlišení. ^[1, 5]

Dávkování vzorku

Roztok vzorku (typicky 10-100 nl) nuceně vniká do jednoho konce kapiláry, obvykle vzdálenějšího od detektoru. Dávkování lze provést několika způsoby. Pokud je kapilára umístěna volně v prostoru, může se použít hydrostatické dávkování zvednutím dávkovacího konce kapiláry nad úroveň druhého konce (tzv. sifonový efekt). Ve většině případů se však používá dávkování hydrodynamické, kde je potřeba aplikace přetlaku na nádobku u injekčního konce kapiláry nebo podtlaku na nádobku u detektorového konce. Tento způsob vyžaduje pneumaticky uzavřený systém nádobka-kapilára. Existuje ještě třetí možnost, a to je dávkování elektrokinetické (aplikováním napětím), kdy se konec kapiláry ponoří do zásobníku se vzorkem a určitou dobu se nechá procházet proud. Nevýhodou tohoto způsobu dávkování je, že i přes stejnou koncentraci jednotlivých složek se do kapiláry dostane více iontů s větší pohyblivostí než iontů s pohyblivostí menší. ^[1, 11]

Teplota

Pro zajištění dobrého rozlišení a reprodukovatelnosti kapiláry je nutná regulace teploty. Komerční přístroje bývají vybaveny termostatovými systémy, které zajišťují chlazení kapiláry ventilací chlazeného bloku. ^[1] Ačkoliv je hlavní výhodou termostatového systému kontrola teploty a chlazení, lze jej využít také pro nastavení požadované teploty při optimalizaci metody. ^[5]

Možnosti detekce

K detekci separovaných analytů lze využít různé typy detektorů. K nejběžnějším z nich patří UV/VIS, vodivostní a fluorescenční detektory. Běžně bývají spojeny s počítačem, který řídí sběr dat a umožňuje automatizaci analýzy. Výsledkem je záznam v podobě píků. Pro určení kvality stanovované látky je důležitý migrační čas, o kvantitě nás informuje především plocha píku. ^[1, 14]

UV/VIS detektor

V CE patří k nejvyužívanějším detektorům UV/VIS detektor s diodovým polem (DAD). Je schopen velmi rychle (v průběhu analýzy) snímat celá spektra analytů. ^[1, 15] UV/VIS detekce je založena na Lambert-Beerově zákoně: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$, kde ε je molární absorpční koeficient, charakteristický při konstantní vlnové délce pro danou látku, c je

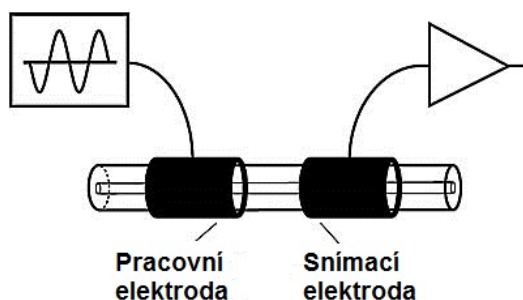
koncentrace látky a l je délka absorpční vrstvy. Pokud je v analyzovaném roztoku přítomno více absorbujících složek, výsledná absorbance je rovna součtu absorbancí jednotlivých složek. [15]

Oproti ostatním detektorům má UV/VIS detektor nižší citlivost (LOD je asi 10^{-12} - 10^{-15} mol v injikovaném objemu), což je jeho nevýhodou. Další nevýhodou je například nutnost vytvoření detekčního okna, čímž se kapilára stává v tomto místě velmi křehkou a při manipulaci často dojde k jejímu zlomení. [5]

Vodivostní detektor

V posledních letech dochází k revitalizaci vysokofrekvenčních impedančních metod, které umožňují měření vodivosti nebo permitivity roztoků. Atraktivní je na těchto metodách skutečnost, že elektrody jsou umístěny na vnějších stěnách nádobek či potrubí z nevodivého materiálu, v nichž se nachází analyzovaný vzorek, jelikož vysokofrekvenční signál stěnami prochází. Elektrody tak nejsou v přímém kontaktu s roztokem, tudíž nedochází v důsledku vzájemné interakce ke změnám jejich vlastností. [16]

V minulosti bylo použití tohoto typu detekce problematické, a to především z technických důvodů (používané vysoké frekvence kladly mimořádný nárok jak na zpracovatelskou elektroniku založenou na vakuových elektronkách, tak i na geometrickém uspořádání detekčních cel). Obtížná byla však také interpretace měřených odezev. Revitalizace této metody se zaměřila hlavně na použití nižších frekvencí, zjednodušení používané elektroniky, zesilovačů a detekčních cel. Snadnější pak byla i interpretace měřených signálů. Inovovaná metoda byla navržena především pro bezkontaktní vodivostní detekci v CE a často je označována jako C^4D . [16]



Obr. č. 6: Schéma uspořádání detekční cely vodivostního C^4D detektoru [17]

Bezkontaktní detekční cely obsahují dvě elektrody izolované od testovaného roztoku. Na jednu z nich je přiváděn střídavý signál o vhodné frekvenci (pracovní el.), signál prošlý roztokem je snímán elektrodou druhou (snímací el.), usměrněn, zesílen a registrován. ^[16]

Detekční limit tohoto detektoru je velmi nízký, to znamená 10^{-15} - 10^{-16} mol, což je jeho další velkou výhodou. Na rozdíl od UV detektoru je univerzálnější, protože jím lze detekovat i analyty, které neobsahují chromofory. ^[5]

Další detektory

K dalším možnostem detekce ve spojení s CE patří:

- fluorescenční detektor - vysoká citlivost, často nutná derivatizace vzorku, jen pro fluoreskující látky
- MS - dobrá citlivost, strukturní informace, finančně nákladné
- elektrochemické, radiometrické - málo používané ^[1,5]

3.2 Možnosti stanovení bílkovin

Bílkoviny tvoří ústřední část hmoty živých organismů. Na složení těchto biopolymerů se podílí převážně základní druhy α -aminokyselin, mezi nimiž se vytváří spojení pomocí peptidových vazeb. V organismu mohou bílkoviny zastupovat celou řadu funkcí, slouží např. jako katalyzátory chemických reakcí (enzymy), mají regulační funkce (hormony), schopnost transportu látek, zprostředkování pohybu (svalová vlákna), snímání smyslových funkcí, obranyschopnost, podpůrnou funkci atd. ^[18] Jejich vlastnosti, jako hodnota izoelektrického bodu, molekulová hmotnost nebo polarita, mohou být velice rozdílné, což naznačuje, že ani jejich analýza nebude jednoduchá. Práci neulehčuje ani skutečnost, že se manipuluje s biologickými vzorky, jejichž matrice jsou složité a stejně jako bílkoviny velmi rozmanité. V důsledku toho zatím nebyla vyvinuta metoda, která by byla, i přes intenzivní rozvoj proteomiky, obecně použitelná. Vždy je tedy nutné zvolení vhodného přístupu a jeho optimalizace pro daný problém. ^[19]

3.2.1 Metody stanovení

K metodám, které umožňují stanovení intaktních proteinů, patří především: ^[20]

- chromatografie
- elektroforéza
- hmotnostní spektrometrie (MS)
- spektroskopie

Uvedené metody se liší mechanismem separace a mohou se navzájem doplňovat. Kapilární elektroforéza je díky svým výhodám (vysoká výkonnost, krátká doba analýzy, výborná schopnost rozlišení, minimální objem analytu a reagensů, automatizace) jednou z poměrně často využívaných metod. ^[8]

3.2.2 C⁴D detektor v analýze bílkovin

Vzhledem ke zvyšujícím se nárokům na stanovení a detekci nejrůznějších látek ve stále nižších koncentracích a složitějších matricích, se zvyšují také nároky na výzkum a vývoj nových detekčních metod. K detekci jsou využívány nejen standardní měřicí principy, ale objevují se i inovace principů již v podstatě opuštěných. Inovace byla navržena především pro bezkontaktní vodivostní detekci v CE a často je označována jako C⁴D (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection), té se blíže věnuje kap. 1.6. ^[16]

Na základě celé řady pokusů, využívajících CE s detekcí C⁴D, bylo zjištěno, že tato kombinace je vhodná nejen pro analýzu anorganických a malých organických iontů, ale také pro analyty z oblasti biochemie jako jsou aminokyseliny, malé peptidy a dokonce i větší peptidy, proteiny a imunoglobuliny. ^[22]

Přednosti a využití C⁴D pro kapilární elektroforézu byly shrnuty v přehledovém článku Kubáně a kol. ^[24] Hlavní výhody a nevýhody jsou uvedeny v tab. č. 2. Kubáň zároveň popisuje lepší analytické parametry při využití C⁴D detektoru oproti DAD detektoru při analýze aminokyselin. V přímém srovnání detektorů byly ve všech aspektech pozorovány lepší parametry pro vodivostní detektor.

Tabulka č. 2: Výhody a nevýhody C⁴D detektoru ^[24]

+	-
<ul style="list-style-type: none"> • univerzální pro všechny nabitě částice • nízké náklady • minimální údržba • snadná manipulace • nepotřebuje detekční okno • komerčně dostupný • kompatibilní s komerční CE • jeden kus vhodný pro CE, IC, HPLC, FIA • malé rozměry • přenosnost • pro kapiláry s různým vnitřním i vnějším průměrem • vysoká citlivost přímé detekce 	<ul style="list-style-type: none"> • citlivé na teplotu, což může vést k nerovnosti základní linie • absorpce CO₂ ze vzduchu při vyšším pH ovlivňuje základní linii • optimalizace pufru pro lepší citlivost vede k trojúhelníkovitému tvaru píku a tím k horšímu rozlišení • příležitostné artefakty

Uplatnění našlo spojení CE-C⁴D i ve farmaceutické a biologické analýze (A. A. Elbashir a kol.) ^[42] Autor shrnuje výsledky analýz farmaceutických a biologických látek. Ukázalo se, že CE A MCE (mikročipová kapilární elektroforéza) s C⁴D jsou spolehlivé a vhodné metody pro analýzu anorganických iontů a dalších látek do té doby detekovaných UV detektory. Vyhodnocení jednotlivých parametrů analýz, např. hodnoty LOD, potvrzují, že spojení CE a C⁴D je vhodné.

Janar Tursen a kol. ^[8] se zabývala CE-C⁴D/UV analýzou směsi sedmi modelových proteinů v rozmezí pI 4,7 - 11 a molekulových hmotností 14 - 250 kDa. Jako BGE byla použita 20 mM kyselina vinná (pH 2,4), kde byly pouze dva píky rozdělené na základní linii. Při použití 20 mM kyseliny citronové se objevily 3 píky, navíc v obou případech byla základní linie značně nestabilní. Základní linie s použitím 50 mM kyseliny mléčné (pH 2,5) byla sice rovná, ale opět došlo k detekci pouze tří píků. Čtvrtým zkoumaným elektrolytem byla kyselina octová (200 mM; pH 2,5), u níž byla základní linie nejstabilnější a citlivost detekce nejvyšší.

Srovnání vlastností C⁴D a DAD detektorů nízkomolekulárních, biologicky aktivních látek pomocí CE s BGE na bázi kyseliny octové studoval Tůma a kol.) ^[21] V této práci byly pomocí CE-C⁴D a DAD analyzovány kreatinin, arginin a 3-methylhistidin s kyselinou octovou jako BGE (pH 2,1). Využity byly dvě kapiláry (délka

80 cm, šířky vnitřního průměru 50 a 75 μm), jejichž povrch byl upraven hydroxyetylcelulózou (HEC), přidanou k BGE v rámci dynamického pokrytí. Výsledky ukazují, že pokud se jedná o citlivost detektoru v závislosti na koncentraci BGE, jeví se jako vhodnější DAD, jenž vykazoval stabilní výsledky v celé škále zkoumaných koncentrací, kdežto C^4D se ukázal jako silně závislý na koncentraci, přičemž maximální citlivost byla zjištěna při 1 M koncentraci kyseliny octové v BGE. Nicméně z praktického hlediska je důležitější porovnání limitů detekce, kde od koncentrace BGE 0,1 M vykazoval lepší výsledky C^4D detektor. Následující tabulka shrnuje výsledky získané měřením v BGE 2,5 M + 0,1% (w/v) HEC, s průměrem kapiláry 75 μm .

LOD [μM]	Kreatinin	Arginin	3-methylhistidin
C^4D	3,6	2,6	3,1
DAD	15	19,2	28,3

Výsledky jasně ukazují, že C^4D detektor má v tomto případě vyšší citlivost než DAD.

Kapilárně elektroforetické metody popisující stanovení aminokyselin, peptidů nebo proteinů s využitím vodivostní a spektrofotometrické detekce jsou shrnuty v Tabulce č. 3

Tabulka č. 3: Příklady užitých metod v analýze proteinů

Analyt	Mr [kDa]	pI	BGE	Metoda	Detekce
Arginin ^[21]	174,12	10,76	2,5 M kyselina octová + 0,1% w/v HEC* (pH 2,1)	CE	UV, C^4D
Histidin ^[21]	113,12	7,59			
Cytochrom c ^[22]	[12,327]	9,6	2,3 M kyselina octová (pH 7,8)	CE	C^4D , MS
Myoglobin ^[22]	[16,89]	7,1			
α -laktalbumin ^[7]	[14,2]	4,4	kys. octová; úprava kapiláry SMIL-DS	CE	UV
β -laktoglobulin B ^[7]	[18,276]	5,2			
Albumin ^[8]	[66,478]	4,7	200 mM kyselina octová (pH 2,5)	CE	UV, C^4D
Hemoglobin ^[8]	[64,5]	6,9			
Lysozym ^[8]	[14,3]	11			
Kataláza ^[8]	[250]	5,4			
Ribonukleáza A ^[10]	[13,7]	8,7	nezjištěno; úprava kapiláry PB-DS-PB	CE	UV
α -chymotrypsinogen ^[10]	[25,6]	8,8			
Angiotenzin II ^[23]	[53,154]	5,87	100 mM fosfátový pufr (pH 2,5)	CE, MEKC	UV, C^4D
Oxytocin ^[23]	[1]	7,7			

* HEC = hydroxyethylcelulóza

3.2.3 Kompatibilita PB-DS-PB a C⁴D

H. Katayama a kol. ^[10] demonstroval efektivitu statického pokrytí vnitřní stěny CE kapiláry pomocí SMIL (PB-DS-PB) na analýze proteinů (α -chymotrypsinogen A, ribonukleáza, lysozym a cytochrom c). S tímto typem pokrytí byl zjištěn reverzní stabilní EOT (od katody k anodě) s pouze nepatrnými změnami. Při analýze byly testovány: fosfátový pufr (pH 2-3), fosfátový pufr (pH 6-7), octanový pufr (pH 4-5) a borátový pufr (pH 8-13). Detekce probíhala pomocí UV detektoru při 214 nm, napětí bylo 7 kV, průměr kapiláry 50 μ m, délka 27 cm a efektivní délka 27 cm. Výsledky jsou uvedeny spíše obecně, soustředí se především na pokrytí kapiláry, které se ukázalo jako velmi stabilní a funkční.

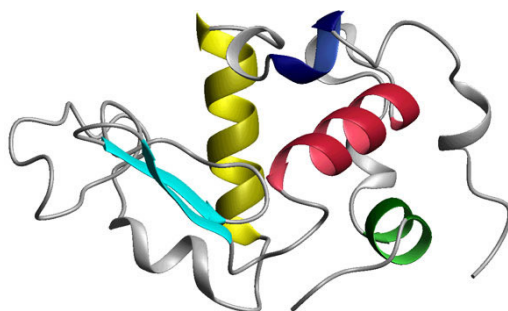
Studii nejběžnějších aditiv ovlivňujících EOT v CE s bezkontaktní vodivostní detekcí se zabývala K. Svobodová a kol. ^[25] Zde byl zkoumán vliv aditiv, způsobujících reverzní EOT na signál C⁴D detektoru, měřeny byly anorganické a organické ionty. Studie vychází z poznatků, že tyto aplikace vyžadují omezení, potlačení nebo dokonce obrácení EOT, což někdy vede ke snížení poměru signálu k šumu nebo k narušení základní linie. Přidáním aditiv k BGE (20 mM 4-morfolinetansulfonová kyselina) upr. LiOH na pH 6 bylo dosaženo dynamické úpravy kapiláry. Bylo zjištěno, že TTAB, CTAB, spermin, spermidin a hexamethonium bromid redukovaly a obracely EOT a ovlivňovaly signál C⁴D. Mnohem slibnější výsledky byly získány s úpravou PEI a polybrenem. Nakonec byl polybren vyzkoušen v kombinaci PB-DS-PB, kdy nedošlo k žádným změnám signálu C⁴D a EOT byl stabilní.

3.2.4 Modelová směs bílkovin

V této práci byla pro testování nově vyvíjeného systému zvolena směs bílkovin, které se navzájem lišily mimo jiné svou molekulovou hmotností (13 700-29 000 Da) a izoelektrickými body (4,4-11,35).

α -laktalbumin ^[26]

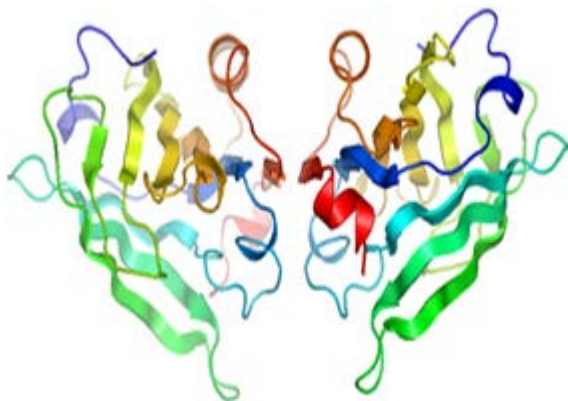
- malý globulární metaloprotein
- 123 aminokyselin (cystin, lysin, tryptofan)
- Mr = 14 200 Da
- pI = 4,4



Obr. č. 7: Struktura α -laktalbuminu ^[27]

β -laktoglobulin B ^[28]

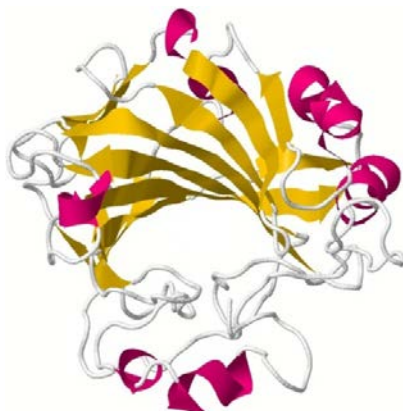
- malá molekula, vyskytující se ve formě dimerů
- 162 aminokyselin
- Mr = 18 276 Da
- pI = 5,2



Obr. č. 8: Struktura β -laktoglobulinu ^[29]

Karboanhydráza ^[30]

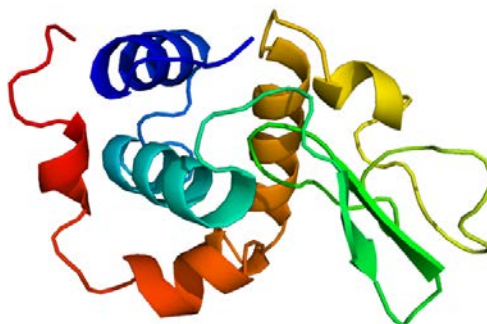
- enzym ze skupiny lyáz
- podílí se na udržování acidobazické rovnováhy
- $M_r = 29\ 000\ \text{Da}$
- $pI = 5,9$



Obr. č. 9: Struktura karboanhydrázy ^[31]

Lysozym ^[32]

- polypeptidický antimikrobiální enzym
- 129 aminokyselin
- $M_r = 14\ 307\ \text{Da}$
- $pI = 11,35$



Obr. č. 10: Struktura lysozymu ^[33]

Ribonukleáza ^[34]

- malý protein, patřící do skupiny enzymů tzv. nukleáz
- 124 aminokyselin
- Mr = 13 700 Da
- pI = 9,3



Obr. č. 11: Struktura ribonukleázy ^[35]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a laboratorní pomůcky

- kapilární elektroforetický systém PrinCE 750 (Prince Technologies, Holandsko) se softwarem Dax 3D (verze 8.1) pro získávání a analýzu dat, detekce pomocí TraceDec[®] vodivostního detektoru (Innovate sensor Technologies GmbH, Strasshof, Rakousko) a UV detektoru, dodávaného spolu s přístrojem
- kapilární elektroforetický systém Agilent 7100 (Agilent Technologies, Německo) se softwarem Agilent ChemStation, s CCD-ADMET vodivostním detektorem (Rev. 5.06, ČR) a UV detektorem, dodávaného s přístrojem
- kapilára TSP050375 firmy Polymicro TECHNOLOGIES
- pH metr SI400 s pH elektrodou MicroFET , Sentron, Holandsko
- ultrazvuková lázeň BANDELIN electronic, Německo
- analytické váhy Sartorius 2004, Německo

4.2 Použité chemikálie

- Ultračistá voda - připravena systémem Milli-Q-System (Millipore, Bedford, USA)
- Methanol ($\geq 99,9\%$; Sigma-Aldrich, Praha)
- NaOH (p.a., Penta, a.s., Praha)
- NH₄OH (25 - 27 %; Penta, a.s., Praha)
- Kyselina octová ledová ($\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich)
- Kyselina fosforečná (85%; Sigma-Aldrich)
- Histidin (Sigma-Aldrich)
- Hexadimethrin bromid (polybrene) ($\geq 95\%$; Sigma-Aldrich)
- Dextran sulfát (Pharmacia LKB, kód 17-0340-01)
- Ethylenglykol (čistý, 1000 ml = 1110 g, Lachema, Brno)
- Karboanhydráza ($\geq 95\%$; Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes - lyofilizovaný prášek; Sigma-Aldrich)

- Ribonukleáza ($\geq 60\%$; Ribonuclease A from bovine pancreas, lyofilizovaný prášek; Sigma-Aldrich)
- α -laktalbumin ($\geq 85\%$; α -lactalbumin from bovine milk, lyofilizovaný prášek; Sigma-Aldrich)
- β -laktoglobulin ($\geq 90\%$; β -lactoglobulin B from bovine milk, lyofilizovaný prášek; Sigma-Aldrich)
- Lyozym ($\geq 90\%$; Lyozyme from chicken egg white, lyofilizovaný prášek; Sigma-Aldrich)

4.3 Příprava pracovních roztoků

Příprava roztoků pro potažení kapiláry

Pro potažení vnitřní stěny kapiláry byly připraveny roztoky 0,5% (w/v) dextran sulfátu a 10% (w/v) polybrenu. Do první odměrné baňky bylo naváženo 0,05 g dextran sulfátu a doplněno ultračistou vodou po rysku do 5 ml, do druhé odměrné baňky přišlo 0,5 g hexadimethrin bromidu a opět byla doplněna po rysku, tentokrát do objemu 10 ml. Pro lepší rozpuštění práškového vzorku ve vodě byla využita ultrazvukovou lázeň.

Příprava roztoků základních elektrolytů

100 mM kyselina octová o pH 3,1

Roztok byl připraven smícháním předem vypočítaného množství kyseliny octové s podílem ultračisté vody ve vhodné kádince. Poté bylo pH roztoku upraveno na hodnotu pH 3,1 přidávkem 1M NH_4OH a takto upravený roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

50 mM kyselina octová o pH 5

Roztok byl připraven smícháním předem vypočítaného množství kyseliny octové s podílem ultračisté vody ve vhodné kádince. Konečná úprava pH na hodnotu 5 byla provedena přidáním roztoku histidinu.

100mM fosfátový pufr o pH 2,5

Byl připraven roztok předem zjištěného množství kyseliny fosforečné, který byl smíchán s podílem ultračisté vody. Konečná úprava pH na hodnotu 2,5 byla provedena přidávkem NaOH.

Vodný roztok kyseliny octové

V rámci optimalizace metody byly testovány BGE obsahující různý podíl kyseliny octové. Vypočítaný správný objem 99% kyseliny octové byl pipetován do odměrné baňky a byl doplněn ultračistou vodou po rysku. U takto připravených elektrolytů bylo změřeno pH.

Tabulka č. 4: Roztoky kyseliny octové pro optimalizaci

Koncentrace	0,1 M	0,5 M	1 M	1,5 M	2 M	2,5 M	3 M	5 M
Objemová procenta	0,6 %	2,9 %	5,7 %	8,6 %	11,4 %	14,3 %	17,8 %	28,6 %
pH pufru	2,6	2,2	2,1	2	1,9	1,8	1,7	1,4

Příprava zásobních roztoků standardů

Jako vzorek byl používán roztok s obsahem pěti předem zvolených bílkovin o různých Mr a pI. Do 1ml odměrných baněk byly na analytických vahách naváženy standardy α -laktalbuminu, β -laktoglobulinu, karboanhydrázy, lysozymu a ribonukleázy a obsah odměrných baňkách byl doplněn po rysku. Koncentrace standardů v zásobních roztocích byly 1 mg/ml pro lysozym (využit při volbě elektrolytu), 5 mg/ml pro α -laktalbumin, β -laktoglobulin, karboanhydrázu a lysozym a 10 mg/ml pro ribonukleázu. Zásobní roztoky byly přepraveny do mikrozkuvek a byly uchovávány v mrazicím boxu.

Příprava pracovního roztoku standardů

Ze zásobních roztoků standardů byl připraven směsný roztok proteinů (α -laktalbumin, β -laktoglobulin, karboanhydráza, lysozym a ribonukleáz) určený k optimalizaci metody. Do vialky bylo pipetováno množství analytu tak, aby koncentrace všech proteinů ve finálním objemu roztoku odpovídala 1 mg/ml. Konečný objem byl doplněn vodou a obsah byl řádně promíchán.

Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobních roztoků byl do 1ml odměrné baňky připraven směsný vzorek, v němž byla koncentrace všech analytů 1 mg/ml. Postupným ředěním ultračistou vodou bylo získáno šest kalibračních roztoků o koncentracích 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml a 0,03125 mg/ml pro každý analyt.

4.4 Pracovní postup

Příprava kapiláry

Byla připravena kapilára o celkové délce 50 cm a vnitřním průměru 50 μm . Před jejím vložením do přístroje se na kapiláře vypálilo detekční okno pro UV detektor (efektivní délka 41,5 cm pro Agilent 7 100 a 43 cm pro PrinCE 750). Dále byla na kapiláru umístěna detekční cela vodivostního detektoru, a to ve vzdálenosti 35 cm od inletu (efektivní délka = 35 cm).

Dalším krokem byla kondicionace kapiláry, která zahrnovala její promytí a zároveň potažení vnitřní stěny vrstvou ionizovaných polymerů. Jednotlivé kroky kondicionace jsou uvedeny v tabulce č. 5. Takto potažená kapilára byla připravena k okamžitému použití.

Tabulka č. 5: Kondicionace kapiláry

Činidlo	Tlak [mbar]	Čas [min]
Metanol	1000	5
Voda	1000	1
1M NaOH	1000	30
Voda	1000	10
Polybren 10 % (w/v)	250	30
Voda	500	10
Dextran sulfát 0,5% (w/v)	250	45
Voda	500	10
Polybren 10 % (w/v)	250	30
Voda nebo BGE	500	10

Každý den byl připraven čerstvý roztok kyseliny octové, který byl na 10 min vložen do ultrazvukové lázně za účelem odplynění. Stejně tak byla připravována také

čerstvá směs standardů. Na počátku analýzy byla kapilára promyta novým pufrem po dobu 10 min při tlaku 1000 mbar. Pro zajištění reprodukovatelnosti analýzy byly promývací kroky zařazeny také mezi jednotlivá měření. Zde byla opět použita kyselina octová, tentokrát po dobu 5 min při tlaku 1000 mbar.

Po promytí byly nastaveny parametry měření a mohla být spuštěna samotná analýza. Vzorek byl do přístroje dávkován pod tlakem 50 mbar, a to po dobu 6 s. Separace probíhala při vloženém napětí -25 kV. Detekce proběhla pomocí dvou detektorů – vodivostní detektor a UV detektor, u něhož byla zvolena vlnová délka 210 nm. Teplota byla nastavena na 25 °C.

Po skončení analýzy byla kapilára znovu propláchnuta elektrolytem a oba konce kapiláry byly ponořeny do vialek s vodou.

4.5 Výpočetní postupy

4.5.1 Způsobnost systému

Ke zhodnocení způsobnosti systému byly zjišťovány následující parametry: počet teoretických pater (N), faktor symetrie píku (A_s), rozlišení (R) a opakovatelnost mobilit a korigovaných ploch píků jednotlivých analytů. ^[3] Pro výpočet byly použity průměrné hodnoty ze šesti nástřiků pracovního roztoku standardů za optimálních podmínek analýzy.

Zdánlivý počet teoretických pater

Zdánlivý počet teoretických pater byl vypočítán dle vztahu: ^[3]

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R - migrační čas nebo vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu sledovaného píku
 w_h - šířka píku v polovině výšky

Rozlišení

Rozlišení mezi píky dvou složek s podobnými výškami bylo vypočítáno podle rovnice: ^[3]

$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} a t_{R2} - migrační časy nebo vzdálenosti podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků

w_{h1} a w_{h2} - šířky píku v polovině jejich výšky

Faktor symetrie píku

Faktor symetrie píku byl vypočítán podle vzorce: ^[3]

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla hodnocena jako % RSD korigovaných ploch píků (plocha/migrační čas) a jednotlivých efektivních mobilit (μ_{eff}) analytů vyhodnocených z šesti opakovaných nástřiků pracovního roztoku standardů.

Směrodatná odchylka (s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

n - počet jednotlivých měření

x - jednotlivý výsledek měření

\bar{X} - průměr hodnot výsledků měření

Relativní směrodatná odchylka (RSD)

$$RSD = 100 \frac{s}{\bar{X}}$$

Efektivní mobilita ^[5]

Efektivní mobilita je dána rozdílem zdánlivé mobility (μ_a) a mobility EOT (μ_{EOT}).

$$\mu_{eff} = \mu_a - \mu_{EOT} \Rightarrow \frac{l \cdot L}{t_a \cdot V} - \frac{l \cdot L}{t_{EOT} \cdot V}$$

l - efektivní délka kapiláry

L - celková délka kapiláry

t_a - migrační čas analytu

t_{EOT} - migrační čas EOT

V - napětí

4.5.2 Kalibrační závislost

Pro zjištění kalibrační závislosti bylo připraveno 6 kalibračních roztoků modelové směsi bílkovin o šesti hladinách koncentrace každého analytu v měřeném roztoku, a to 0,03125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml. Celkem bylo pro každou koncentraci kalibračního roztoku provedeno 6 měření.

Kalibrační závislost korigovaných ploch píků na jejich koncentraci byla vyhodnocena pomocí metody lineární regrese v programu MS Excel 2007.

Obecná rovnice regresní přímky: $y = ax + b$

y – závisle proměnná (plocha pod píkem)

a – směrnice přímky

x – nezávisle proměnná (koncentrace analytu)

b – absolutní člen

4.5.3 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)

Výpočty limitu detekce (LOD, mez detekce) a limitu kvantifikace (LOQ, mez kvantifikace) jsou často upravovány pro konkrétní metody a vždy je nutné k jejich zjištění uvádět také způsob výpočtu. LOD a LOQ jsou závislé především na chybě měření, která může být reprezentována směrodatnou odchylkou nebo tzv. šumem, to znamená časovou fluktuací měřeného signálu v nepřítomnosti analytu. Dále tyto veličiny závisí na citlivosti metody, to znamená na strmosti kalibrační závislosti. ^[36]

Limit detekce můžeme vyjádřit jako takové množství (koncentrace) analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu. U limitu kvantifikace je to desetinásobek. ^[36] Jiná definice např. uvádí, že LOD odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu, LOQ pak odpovídá koncentraci, při které přesnost a správnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení. ^[37] V této práci byly pro výpočet LOD a LOQ použity následující vztahy ^[38], vycházející z rovnic kalibračních závislostí:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot SDb}{a} \qquad LOQ = \frac{10 \cdot SDb}{a}$$

SDb - průměrná hodnota směrodatných odchylek členu b (absolutní člen) z rovnic kalibračních přímek

a - průměrná hodnota členu a (směrnice přímky) z rovnic kalibračních přímek

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vývoj a optimalizace metody

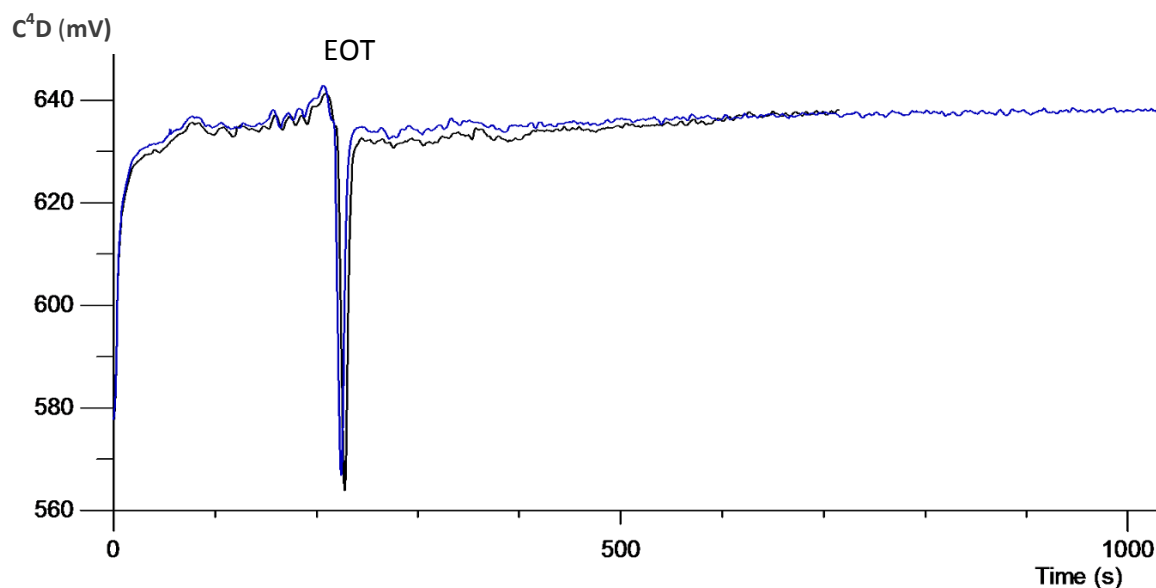
Analýzu látek pomocí kapilární zónové elektroforézy ovlivňuje celá řada faktorů, ať už se jedná o správně zvolený pracovní elektrolyt, rozměry a úpravu kapiláry, napětí nebo teplotu atd. Některé parametry zůstaly po celou dobu všech analýz neměnné, sem patří délka kapiláry (50 cm), vnitřní průměr kapiláry (50 μm), úprava jejího vnitřního povrchu a doba dávkování vzorku (6 s) tlakem 50 mbar. Pro zjištění podmínek optimální separace modelové směsi bílkovin byly sledovány tyto parametry: složení BGE, koncentrace a pH elektrolytu, teplota a napětí.

Pro detekci pomocí UV detektoru byla stanovena vlnová délka 210 nm, při níž všechny analyty dosahovaly absorpčního maxima.

5.1.1 Volba elektrolytu

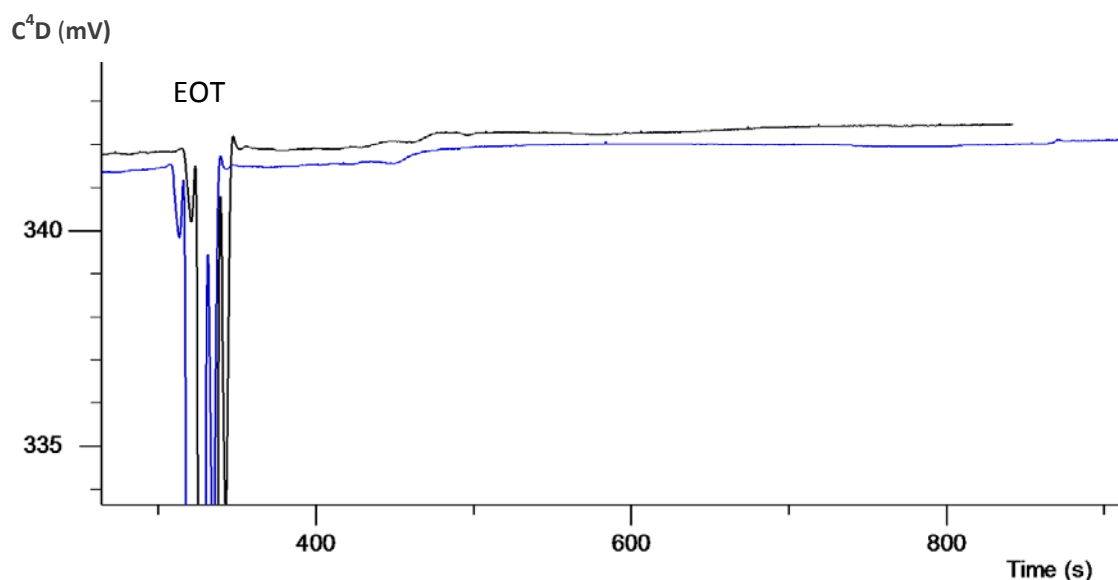
Volba vhodného pracovního elektrolytu je pro správnou separaci analytů a interpretaci výsledků velmi důležitá. Mezi požadavky na vhodný elektrolyt patří co nejkratší doba analýzy, přičemž by však mělo dojít k úplnému rozdělení jednotlivých píků. Píky by také měly být symetrické a dobře rozlišitelné od základní linie. Jako BGE byly vyzkoušeny kyselina octová, octanové pufrы a fosfátový pufr o různých koncentracích a pH. Vhodný elektrolyt byl vybírán na základě analýzy bazického proteinu lysozymu ($\text{pI} = 11,35$) o koncentraci 1 mg/ml. Byla sledována zejména účinnost pokrytí PB-DS-PB (zda byl protein efektivně chráněn před adsorpcí na stěnu kapiláry).

Fosfátový pufr byl vyloučen z toho důvodu, že ani po 15 minutách (nastavený čas analýzy) nebyl pík lysozymu pozorován, kromě toho byla zjištěna nestabilní základní linie (viz obr. č 12). Průběh analýzy s UV a vodivostní detekcí byl prakticky totožný, proto byl pro ilustraci vybrán pouze pro vodivostní detektor.



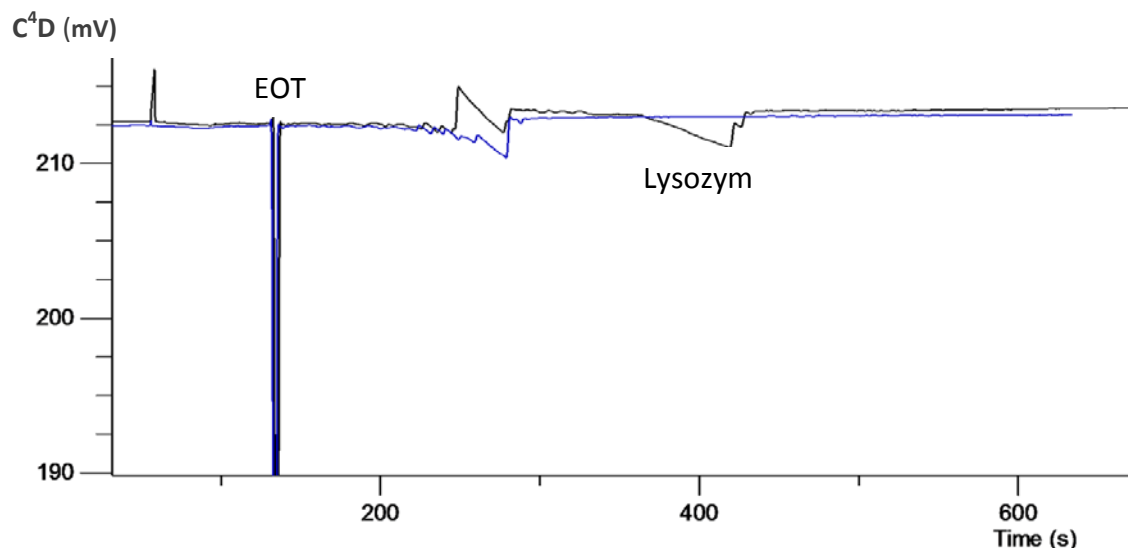
Obr. č. 12: Elektroforeogram blanku (černý) a vzorku lysozymu (modrý) s použitím 100mM fosfátového pufru upr. na pH 2,5 pomocí NaOH; kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV; vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

Ani octanové pufrы se neukázaly jako příliš vhodné. Při použití 50mM kyseliny octové s přidavkem histidinu nebyly po celou dobu analýzy patrné žádné píky (obr. 13).



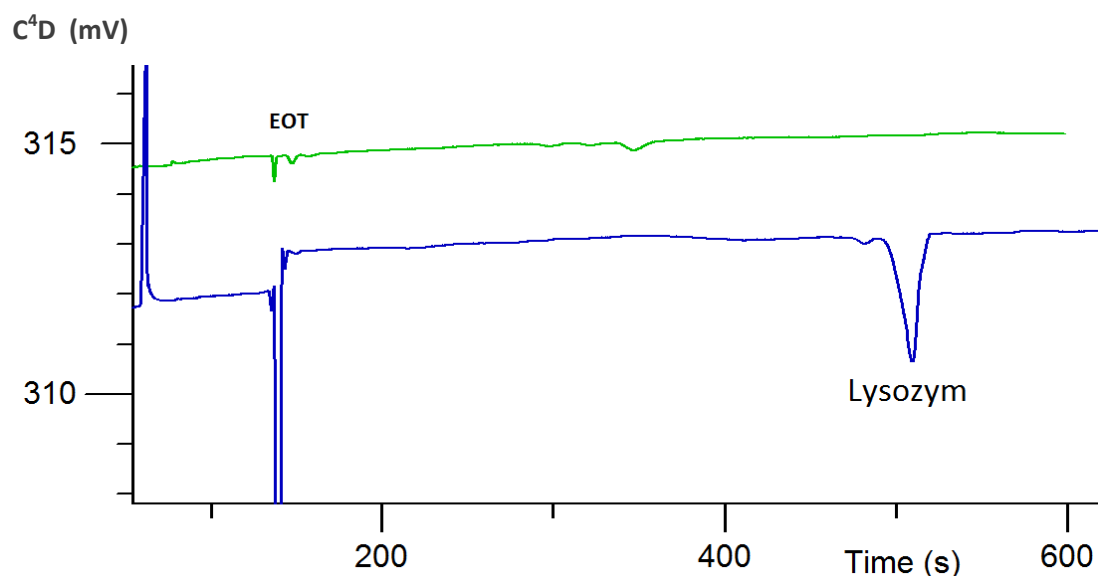
Obr. č. 13: Elektroforeogram blanku (černý) a vzorku lysozymu (modrý) s použitím 50mM kyseliny octové, upravena na pH 5 přidáním histidinu; kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

Ve 100mM kyselině octové s přidavkem NH_4OH již bylo dosaženo lepších výsledků, základní linie byla poměrně rovná, nicméně pík lysozymu stále nemá požadovaný tvar (obr. 14).



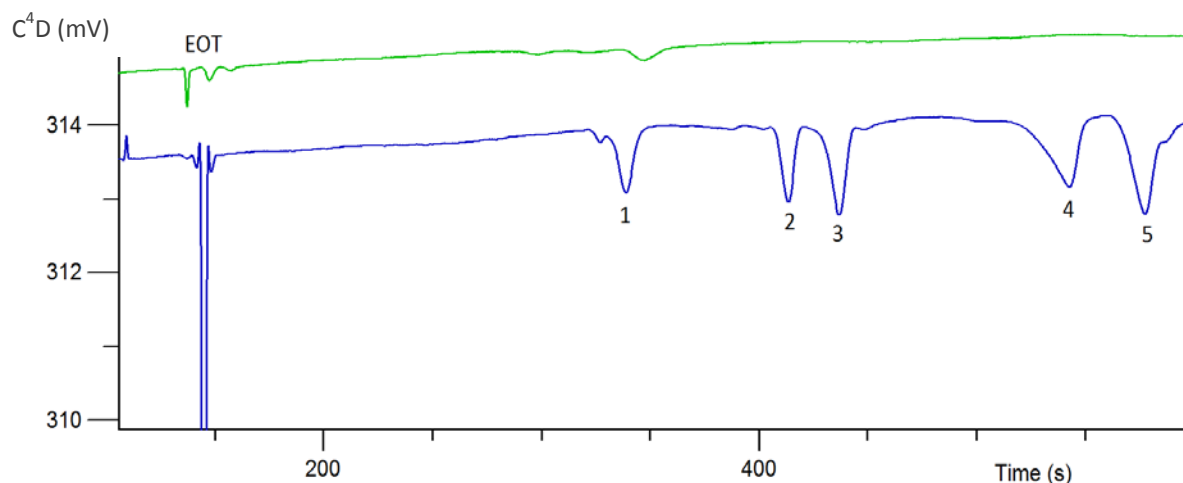
Obr. č. 14: Elektroforeogram blanku (modrý) a vzorku lysozymu (černý) s použitím 100mM kyseliny octové, upravena na pH 2,5 přidáním NaOH; kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μm , délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}\text{C}$ a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

Ze všech testovaných BGE byla nakonec vybrána 2M kyselina octová. Byl pozorován mírně frontující pík s dobrou intenzitou odezvy při vodivostní detekci.



Obr. č. 15: Elektroforeogram lysozymu; BGE: 2M kyselina octová (pH 1,9); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μm , délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}\text{C}$ a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

Po úspěšné analýze lysozymu byla dále účinnost separace využívající potahovanou kapiláru a základní elektrolyt 2M kyseliny octovou demonstrována na směsi proteinů o různém rozsahu pI a Mr.



Obr. č. 16: Elektroforeogram modelové směsi proteinů (1-karboanhydráza, 2- α -laktalbumin, 3-ribonukleáza, 4- β -laktoglobulin, 5-lysozym); BGE: 2M kyselina octová (pH 1,9); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

5.1.2 Vliv koncentrace kyseliny octové

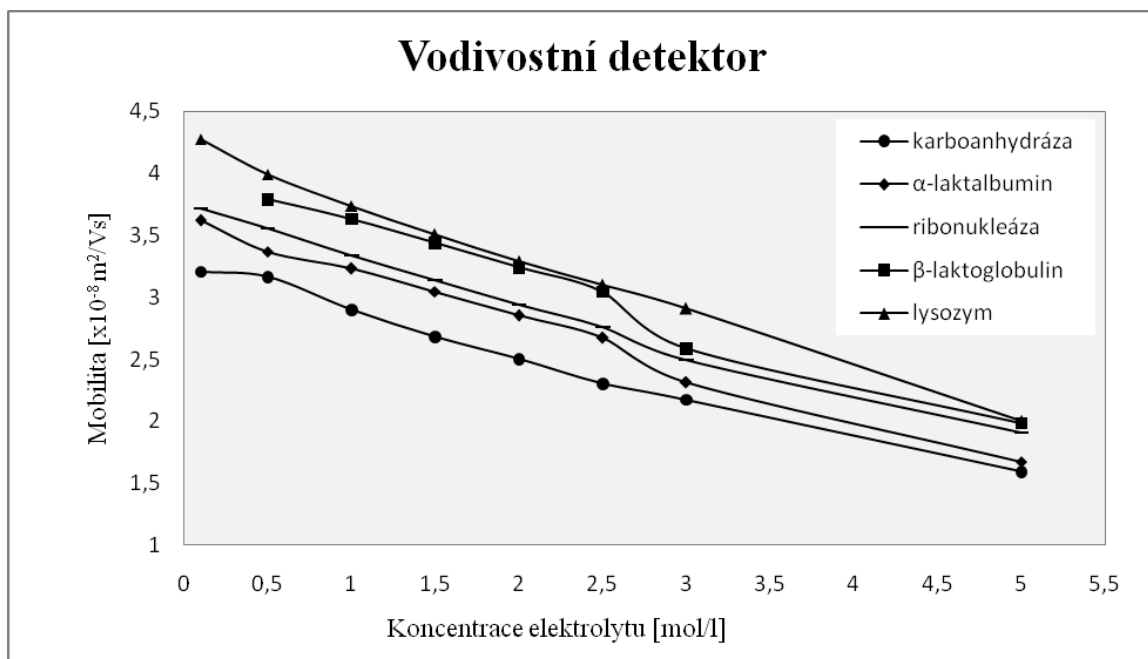
Kvalita separace modelové směsi analytů byla testována v elektrolytech o koncentracích kyseliny octové v rozmezí 0,1-5 M, přičemž bylo zjištěno, že 0,1M, 0,5M a 1M kyselina není vhodná, jelikož nedošlo k dostatečnému oddělení všech píků. S postupnou zvyšující se koncentrací elektrolytu docházelo kromě prodlužujícího se času analýzy také k většímu rozestupu mezi píkы. U 2,5M kyseliny již byla patrná deformace píku pro β -laktoglobulin a při použití 3 a 5M kyseliny došlo téměř ke splynutí posledních dvou píků se základní linií.

S ohledem na přijatelný čas analýzy, tvar a rozlišení jednotlivých píků byla nakonec jako nejvhodnější elektrolyt zvolena 1,5M kyselina octová (pH 2). Analyty migrovaly v pořadí karboanhydráza, α -laktalbumin, ribonukleáza, β -laktoglobulin a lysozym.

Byly vypočítány efektivní mobility všech analytů v jednotlivých elektrolytech (tabulky 6 a 7). Vliv koncentrace kyseliny octové na efektivní mobility jednotlivých analytů je znázorněn na obr. 17 a 18.

Tabulka č. 6: Mobilita analytů v závislosti na koncentraci elektrolytu (c) - vodivostní detektor

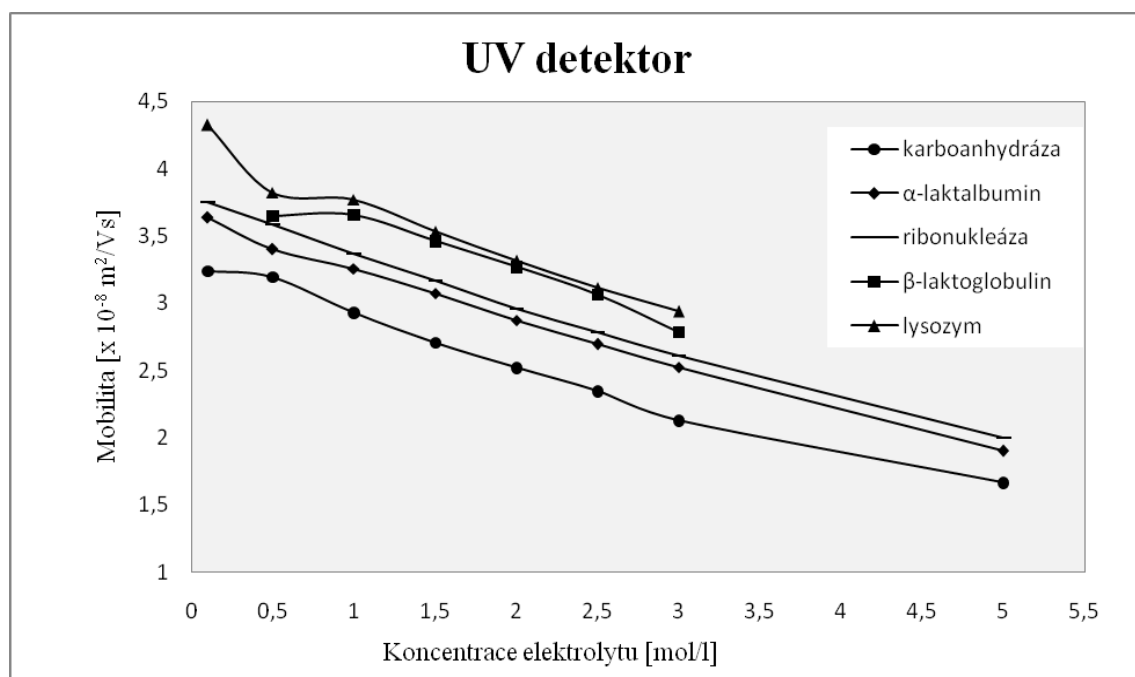
c [mol/l]	Mobilita [$\times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$]				
	Karboanhydráza	α -laktalbumin	Ribonukleáza	β -laktoglobulin	Lysozym
0,1	3,21	3,62	3,72	nedetekováno	4,28
0,5	3,17	3,37	3,56	3,79	3,99
1	2,92	3,23	3,34	3,64	3,74
1,5	2,68	3,05	3,14	3,44	3,50
2	2,50	2,85	2,94	3,24	3,29
2,5	2,34	2,67	2,76	3,05	3,10
3	2,172	2,31	2,49	2,59	2,91
5	1,59	1,67	1,91	1,98	2,00



Obr. č. 17: Závislost mobility na koncentraci elektrolytu (kyselina octová); teplota 25 °C a napětí -25 kV; pokrytí kapiláry PB-DS-PB; vodivostní detektor

Tabulka č. 7: Mobilita analytů v závislosti na koncentraci elektrolytu (c) - UV detektor

c [mol/l]	Mobilita [$\times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$]				
	Karboanhydráza	α -laktalbumin	Ribonukleáza	β -laktoglobulin	Lysozym
0,1	3,24	3,64	3,76	nedetekováno	4,33
0,5	3,19	3,40	3,58	3,65	3,82
1	2,93	3,26	3,37	3,66	3,77
1,5	2,71	3,07	3,17	3,46	3,53
2	2,52	2,88	2,96	3,27	3,31
2,5	2,35	2,70	2,78	3,07	3,12
3	2,13	2,52	2,61	2,79	2,94
5	1,67	1,90	2,00	nedetekováno	nedetek.



Obr. č. 18: Závislost mobility na koncentraci elektrolytu (kyselina octová); teplota 25 °C a napětí -25 kV; pokrytí kapiláry PB-DS-PB; UV detektor

Se zvyšující se koncentrací elektrolytu dochází ke snížení mobility jednotlivých analytů a zároveň k prodlužování migračních časů. Při koncentraci 0,1 mol/l nebylo možné detekovat β -laktoglobulin. Stejný problém se vyskytl také při koncentraci 5 mol/l u β -laktoglobulinu a lysozymu pravděpodobně z důvodu dlouhého migračního času těchto analytů.

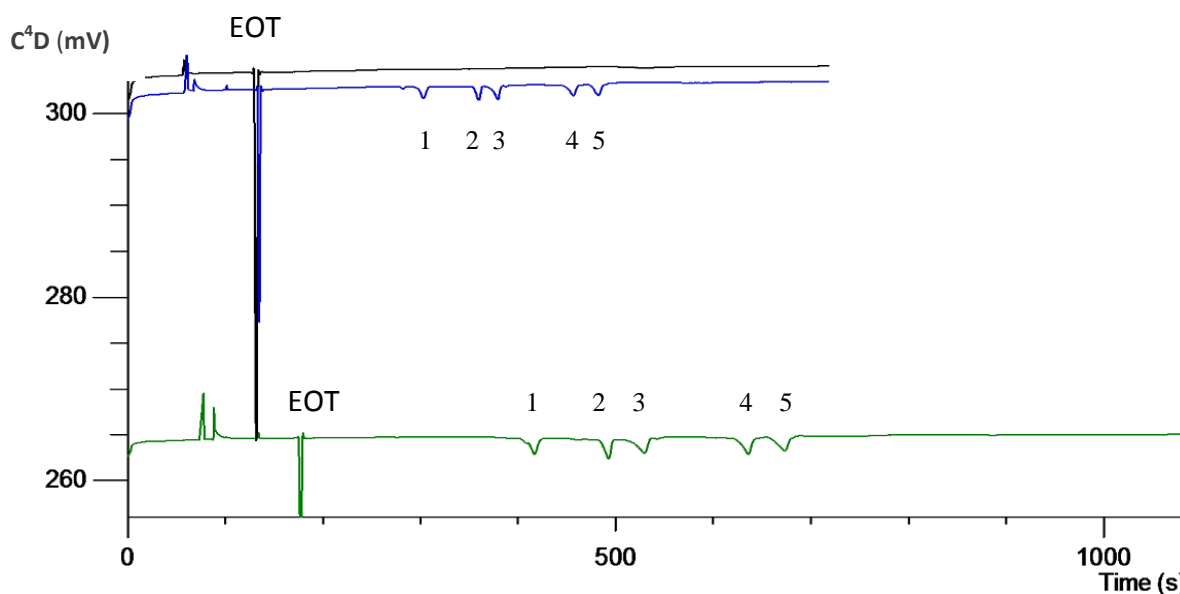
5.1.3 Přídavek ethylenglykolu

Ethylenglykol slouží jako organický modifikátor, který je vhodné použít spolu se zvoleným typem pokrytí (PB-DS-PB) vnitřní stěny kapiláry. Přidáním ethylenglykolu k základnímu elektrolytu dochází k zvýšení viskozity, což vede ke zpomalení EOT. ^[39] Pro měření byla připravena 1,5M kyselina octová s 10% obsahem ethylenglykolu.

Tabulka č. 8: Rozlišení píků v závislosti na ethylenglykolu

Dvojice píků analytů	Rs bez ethylenglykolu	Rs s ethylenglykolem
Karboanhydráza - α -laktalbumin	6,55	6,78
α -laktalbumin - ribonukleáza	2,21	2,27
Ribonukleáza - β -laktoglobulin	7,32	5,97
β -laktoglobulin - lysozym	2,21	2,22

Při hodnocení elektroforeogramů byla potvrzena schopnost ethylenglykolu zpomalovat EOT, což může vést k lepšímu rozlišení jednotlivých píků. Zároveň může být ovlivněn i tvar píku. V tomto případě měl ale vliv ethylenglykolu na tvar píku spíše negativní charakter a při zachovaném rozlišení docházelo pouze k prodlužování času analýzy. Ethylenglykol proto nebyl při dalších pokusech do BGE přidáván.



Obr. č. 19: Porovnání výsledků analýzy s přídavkem ethylenglykolu a bez něj (černá - blank, modrá - směs bez ethylenglykolu, zelená - směs s ethylenglykolem; 1-karboanhydráza, 2- α -laktalbumin, 3-ribonukleáza, 4- β -laktoglobulin, 5-lysozym); BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

5.1.4 Vliv vloženého napětí

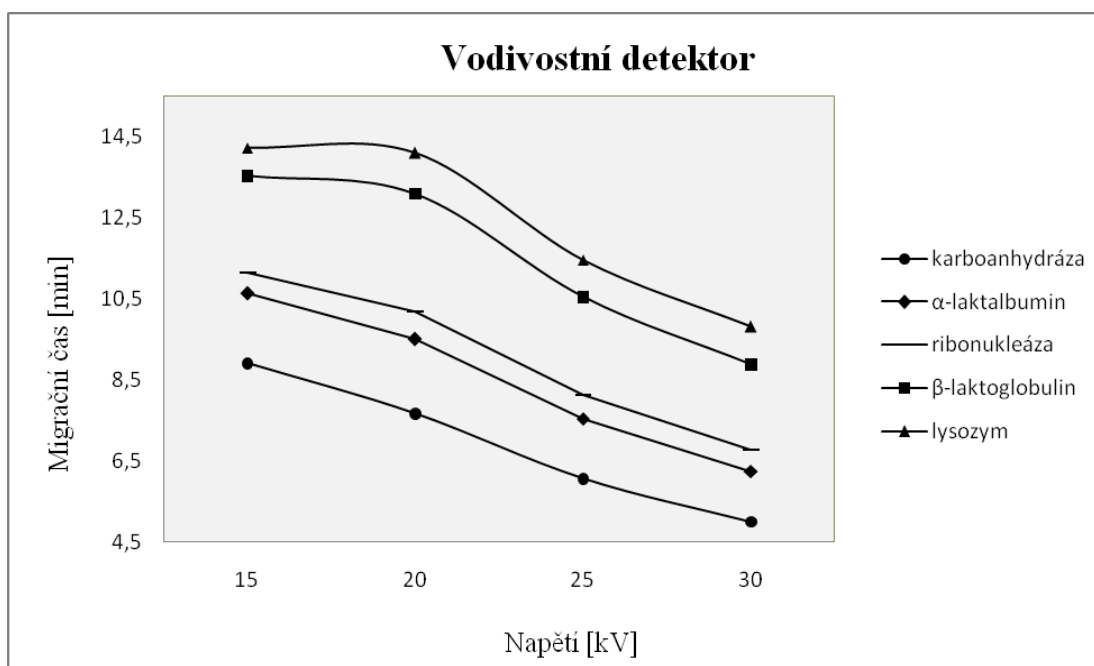
Napětí bylo testováno v rozmezí hodnot -15 kV, -20 kV, -25 kV a -30 kV.

Konstantní parametry

- 1,5M kyselina octová (pH 2)
- teplota 25 °C

Tabulka č. 9: Závislost migračních časů na napětí (VD = vodivostní detektor, UV = UV detektor)

Napětí [kV]		-15	-20	-25	-30
Proud [μ A]		-10,3	-14,3	-18	-22,2
t_a karboanhydrázy [min]	VD	8,91	7,67	6,07	5
	UV	10,98	9,43	7,45	6,14
t_a α -laktalbuminu [min]	VD	10,63	9,51	7,55	6,25
	UV	13,09	11,7	9,29	7,67
t_a ribonukleázy [min]	VD	11,16	10,17	8,12	6,78
	UV	13,76	12,54	9,98	8,3
t_a β -laktoglobulinu [min]	VD	13,54	13,1	10,5	8,89
	UV	16,7	16,12	13	11,11
t_a lysozymu [min]	VD	14,23	14,1	11,47	9,81
	UV	17,48	17,35	14,08	12,27



Obr. č. 20: Vliv vloženého napětí; BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); teplota 25 °C; pokrytí kapiláry PB-DS-PB; vodivostní detektor

Se zvyšujícími se absolutními hodnotami vloženého napětí docházelo k postupnému zkracování migračních časů jednotlivých analytů (průměrné hodnoty t_a pro každý analyt uvedeny v tabulce č. 9 a vyneseny do grafů). S ohledem na migrační časy analytů, tvary a rozlišení píků, bylo jako optimální zvoleno napětí -25 kV. Průběh závislosti t_a na napětí byl pro oba detektory prakticky stejný, proto je uveden pouze pro vodivostní detekci.

5.1.5 Vliv teploty

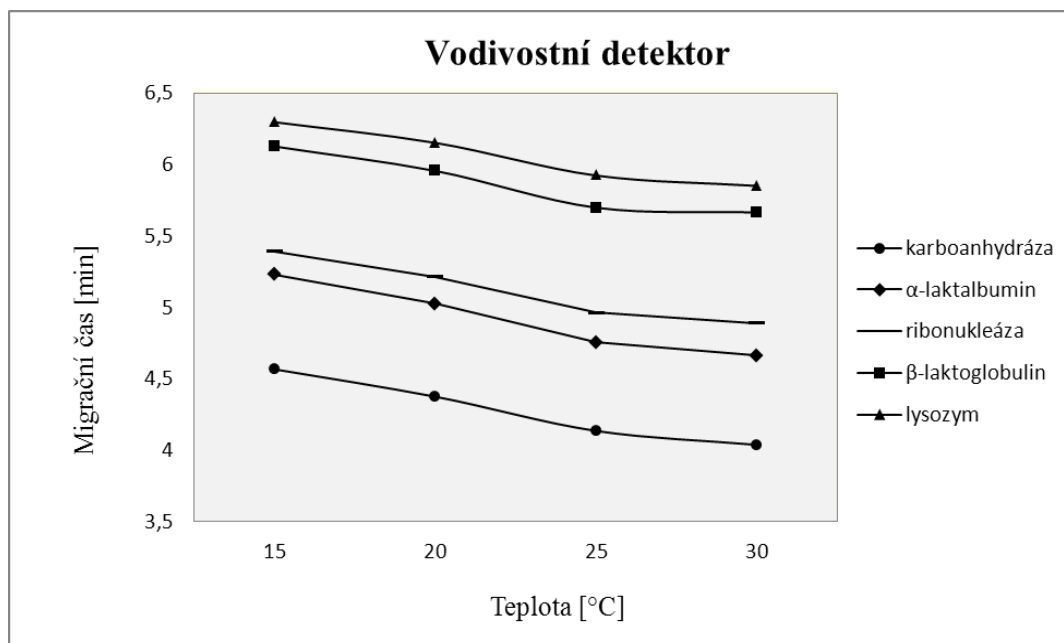
Teploty byly testovány v rozmezí hodnot 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C.

Konstantní parametry

- 1,5M kyselina octová (pH 2)
- napětí -25 kV

Tabulka č. 10: Závislost migračních časů na teplotě (VD = vodivostní detektor, UV = UV detektor)

Teplota [°C]		15	20	25	30
t_a karboanhydrázy [min]	VD	4,57	4,37	4,14	4,04
	UV	5,41	5,2	4,91	4,73
t_a α -laktalbuminu [min]	VD	5,23	5,03	4,76	4,66
	UV	6,2	5,96	5,64	5,46
t_a ribonukleázy [min]	VD	5,39	5,21	4,96	4,89
	UV	6,4	6,19	5,88	5,72
t_a β -laktoglobulinu [min]	VD	6,13	5,95	5,7	5,66
	UV	7,27	7,08	6,75	6,61
t_a lysozymu [min]	VD	6,3	6,15	5,92	5,85
	UV	7,48	7,32	7,02	6,95



Obr. č. 21: Vliv teploty; BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); napětí -25 kV; pokrytí kapiláry PB-DS-PB; vodivostní detektor

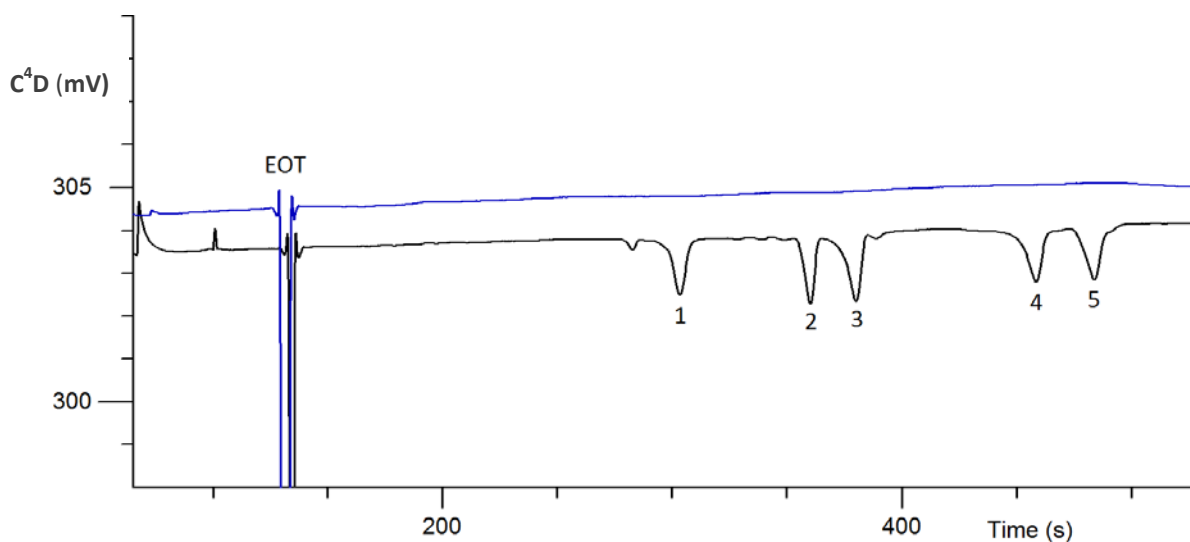
Průměrné hodnoty migračních časů pro jednotlivé analyty byly zaznamenány v tabulce a vyneseny do grafů. Se zvyšující se teplotou docházelo ke zkracování jednotlivých migračních časů. Nejlepších výsledků (symetrie a intenzita píků) bylo dosaženo při 25 °C, z tohoto důvodu byla tato zvolena jako optimální teplota. Průběh závislosti t_a na teplotě byl pro oba detektory prakticky stejný, proto je uveden pouze pro vodivostní detekci.

5.1.6 Optimální podmínky analýzy

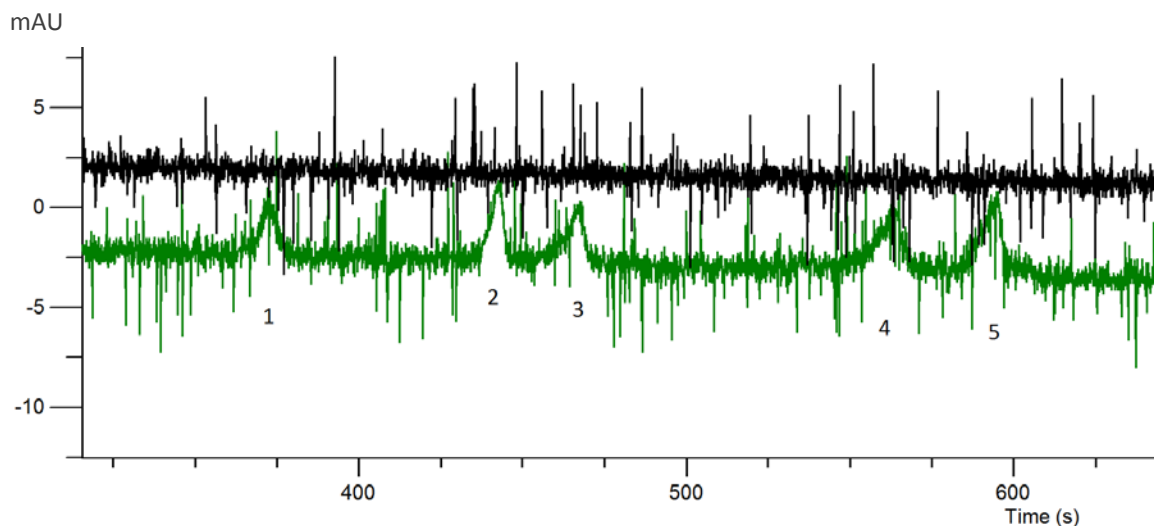
Parametry, které byly na základě měření modelové směsi bílkovin vyhodnoceny jako optimální, jsou uvedeny v tabulce č. 11. Elektroforeogramy získané za optimálních podmínek na přístroji PrinCE 750 jsou znázorněny na obr. 22 a 23.

Tabulka č. 11: Optimální podmínky analýzy

BGE	1,5M kyselina octová
Teplota	25 °C
Napětí	-25 kV
Vlnová délka	210 nm
Doba trvání nástřiku vzorku	6 s
Tlak	50 mbar
Celková délka kapiláry	50 cm
Efektivní délka kapiláry VD	35 cm
Efektivní délka kapiláry UV	41,5 cm (43 cm)
Vnitřní průměr kapiláry	50 μ m
Vnitřní potah	PB-DS-PB

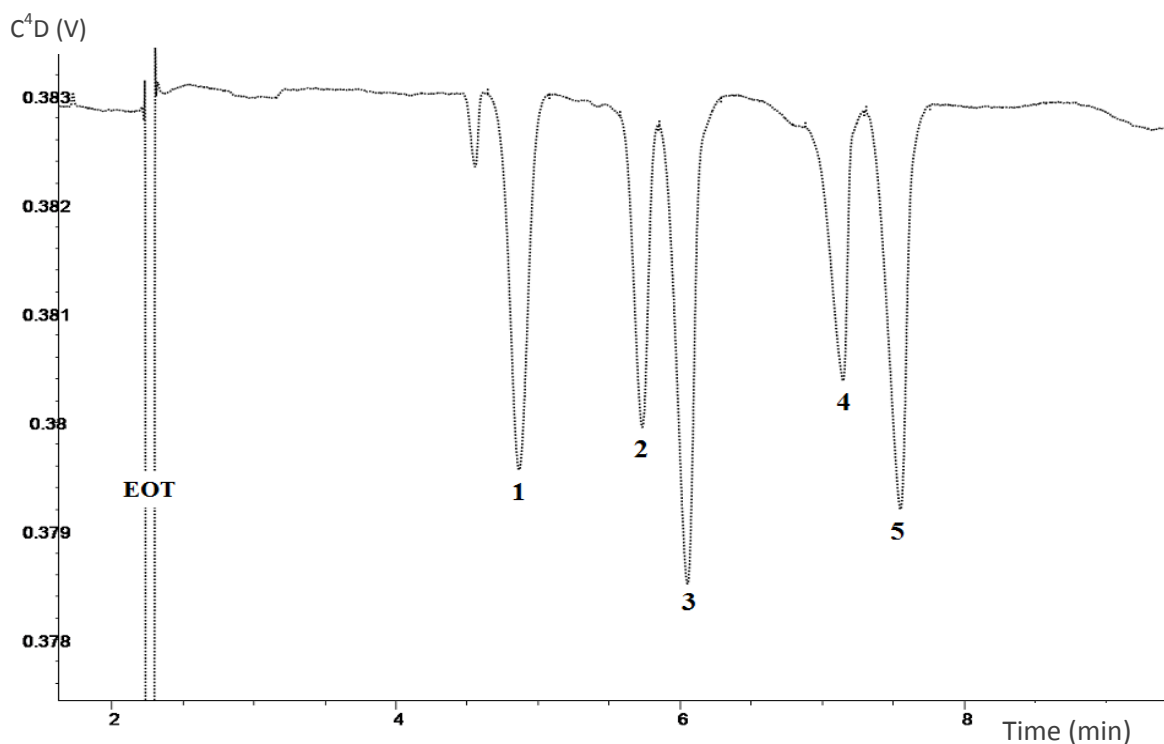


Obr. č. 22: Elektroforeogram modelové směsi proteinů (1-karboanhydráza, 2- α -laktalbumin, 3-ribonukleáza, 4- β -laktoglobulin, 5-lysozym); BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 °C a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj PrinCE 750

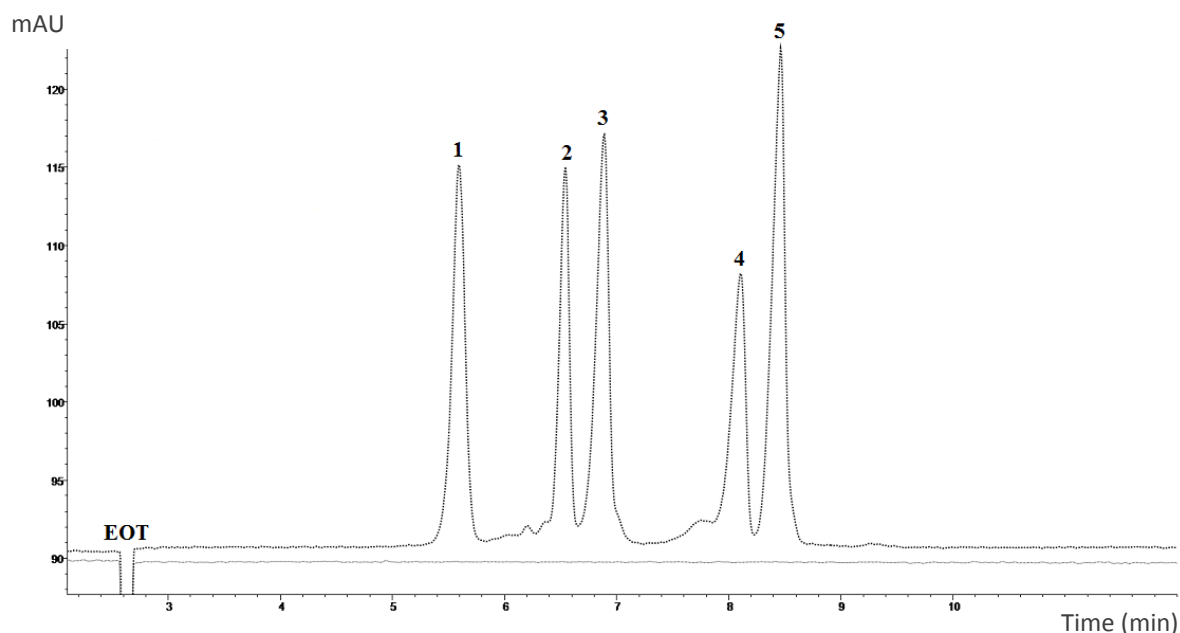


Obr. č. 23: Elektroforeogram modelové směsi proteinů (1-karboanhydráza, 2- α -laktalbumin, 3-ribonukleáza, 4- β -laktoglobulin, 5-lysozym); BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV, UV detektor; přístroj PrinCE 750

Vzhledem k technickým problémům, vyskytujícím se na kapilárním systému PrinCE 750, na kterém byla metoda optimalizována, byla metoda převedena na přístroj Agilent 7100. Celková délka a efektivní délka kapiláry pro vodivostní detektor byly zachovány, efektivní délka UV detekce byla nově upravena na 41,5 cm (dříve 43 cm). Elektroforeogramy získané za optimálních podmínek na elektroforetickém systému Agilent 7100 jsou uvedeny na obr. 24 a 25.



Obr. č. 24: Elektroforeogram modelové směsi proteinů (1-karboanhydráza, 2- α -laktalbumin, 3-ribonukleáza, 4- β -laktoglobulin, 5-lysozym); BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV, vodivostní detektor; přístroj Agilent 7100



Obr. č. 25: Elektroforeogram modelové směsi proteinů (1-karboanhydráza, 2- α -laktalbumin, 3-ribonukleáza, 4- β -laktoglobulin, 5-lysozym); BGE: 1,5M kyselina octová (pH 2); kapilára se statickým pokrytím PB-DS-PB, vnitřní průměr 50 μ m, délka 50 cm; teplota 25 $^{\circ}$ C a napětí -25 kV, UV detektor; přístroj Agilent 7100

5.2 ZPŮSOBILOST SYSTÉMU

5.2.1 Rozlišení

Mírou separace dvou píků je rozlišení (R_s). Pokud $R_s \geq 1,5$, považují se píky za rozdělené na základní linii ^[40] Byl vypočítán průměr hodnot získaných z 6 analýz pomocí vzorce uvedeného v kapitole 7.1. Hodnoty rozlišení jsou udány v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Hodnoty rozlišení mezi jednotlivými píky

Dvojice píků analytů	R_s (vodivostní detektor)	R_s (UV detektor)
Karboanhydráza - α -laktalbumin	4,75	4,47
α -laktalbumin - ribonukleáza	1,78	1,77
Ribonukleáza - β -laktoglobulin	5,28	4,96
β -laktoglobulin - lysozym	1,96	2,24

Hodnoty rozlišení se pohybovaly od 1,78 po 5,28 pro vodivostní detektor a od 1,77 po 4,96 pro UV detektor. Při měření byly všechny píky úplně rozděleny na základní linii.

5.2.2 Faktor symetrie píku

Faktor symetrie píku vyjadřuje jeho tvar, v ideálním případě je roven jedné. Vypočítané hodnoty faktoru symetrie uvádí tabulka č. 13.

Tabulka č. 13: Faktor symetrie píku

Analyt	A_s (vodivostní detektor)	A_s (UV detektor)
Karboanhydráza	0,94	0,96
α -laktalbumin	0,86	0,89
Ribonukleáza	0,85	0,84
β -laktoglobulin	0,72	0,72
Lysozym	0,91	0,9

Hodnoty faktoru symetrie píku pro vodivostní detektor se pohybují v rozmezí 0,72-0,94 a pro UV detektor 0,72-0,96. Faktor symetrie β -laktoglobulinu $\leq 0,8$ značí mírnou asymetrii píku.

5.2.3 Účinnost separace

Míru účinnosti separace lze vyjádřit jako počet teoretických pater (N).^[40] Hodnoty byly vypočítány z 6 opakovaných měření podle vzorce, uvedeném v kap. 7.1. Průměr těchto hodnot udává tabulka č. 14. Obvykle se počty teoretických pater pohybují v hodnotách okolo 10^4 - 10^5 .^[41]

Tabulka č. 14: Hodnoty počtů teoretických pater

Analyt	N (vodivostní detektor)	N (UVdetektor)
Karboanhydráza	13745	8014
α -laktalbumin	18464	19833
Ribonukleáza	19154	15177
β -laktoglobulin	16503	17929
Lysozym	18006	19126

Pro oba detektory byl spočítán počet teoretických pater, který se pohyboval v rozmezí 13745-19154 pro vodivostní detektor a 8014-19833 pro UV detektor.

5.2.4 Opakovatelnost analýzy

Byla hodnocena opakovatelnost (% RSD) efektivních mobilit analytů (μ_{eff}) a korigovaných ploch píků (P), a to pro koncentrace 0,0625 mg/ml, 0,25 mg/ml a 1 mg/ml každého analytu. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulkách 15 a 16.

Tabulka č. 15: Opakovatelnost efektivních mobilit analytů (n=6)

Analyt	c [mg/ml]	Vodivostní detektor		UV detektor	
		μ_{eff} [$\times 10^{-8}$ m ² /Vs]	RSD [%]	μ_{eff} [$\times 10^{-8}$ m ² /Vs]	RSD [%]
Karboanhydráza	0,0625	2,73	0,3	2,77	0,3
	0,25	2,74	0,3	2,77	0,9
	1	2,72	0,7	2,75	0,6
α -laktalbumin	0,0625	3,08	0,3	3,12	0,3
	0,25	3,09	0,3	3,12	0,4
	1	3,07	0,7	3,10	0,6
Ribonukleáza	0,0625	3,18	0,3	3,22	0,3
	0,25	3,19	0,3	3,22	0,4
	1	3,17	0,7	3,20	0,6
β -laktoglobulin	0,0625	3,47	0,4	3,51	0,3
	0,25	3,49	0,4	3,52	0,5
	1	3,47	0,7	3,50	0,6
Lysozym	0,0625	3,55	0,3	3,59	0,3
	0,25	3,56	0,4	3,60	0,5
	1	3,54	0,7	3,58	0,6

Hodnoty RSD pro opakovatelnost mobility se v případě vodivostního detektoru pohybovaly v rozmezí 0,3 %-0,4 % (pro c=0,0625 mg/ml i 0,25 mg/ml), a 0,7 % (c=1mg/ml). Pro UV detektor byly vypočteny hodnoty 0,3 % (c=0,0625 mg/ml), 0,4 %-0,9 % (c=0,25 mg/ml) a 0,6 % (1 mg/ml). Nejvyšších hodnot RSD dosáhl ve většině případů lysozym, žádná z hodnot nepřekročila 0,9 %.

Tabulka č. 16: Opakovatelnost korigovaných ploch (n=6)

Analyt	c [mg/ml]	Vodivostní detektor		UV detektor	
		P	RSD [%]	P	RSD [%]
Karboanhydráza	0,0625	0,003	1,8	17,88	0,7
	0,25	0,0208	1,2	120,08	1,7
	1	0,0616	2,0	383,21	2,6
α -laktalbumin	0,0625	0,0015	1,2	9,76	1,3
	0,25	0,0125	2,1	85,11	2,2
	1	0,0376	2,0	290,1	5,7
Ribonukleáza	0,0625	0,0093	0,8	48,6	0,4
	0,25	0,0215	2,1	118,79	2,4
	1	0,0632	2,7	398,46	1,5
β -laktoglobulin	0,0625	0,0015	1,9	11,07	4,6
	0,25	0,0132	2,3	94,38	3,2
	1	0,0461	5,0	368,63	4,8
Lysozym	0,0625	0,0034	2,6	27,77	1,6
	0,25	0,0208	2,4	165,49	2,4
	1	0,0714	4,6	612,94	3,9

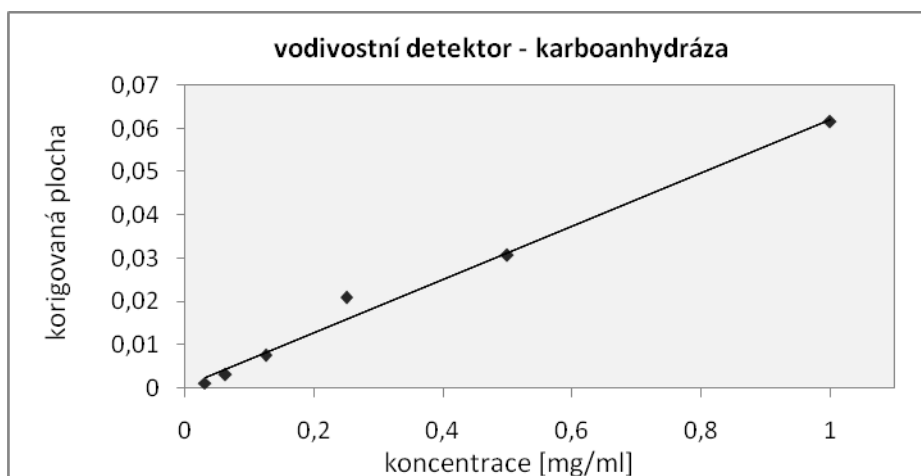
Hodnoty RSD pro opakovatelnost korigovaných ploch se v případě vodivostního detektoru pohybovaly v rozmezí 0,8 %-2,6 % (c=0,0625 mg/ml), 1,2 %-2,4 % (c=0,25 mg/ml) a 2 %-5 % (c=1mg/ml). Pro UV detektor byly vypočteny hodnoty 0,4 %-4,6 % (c=0,0625 mg/ml), 1,7 %-3,2 % (c=0,25 mg/ml) a 1,5 %-5,7 % (1 mg/ml).

5.3 Kvantitativní analýza

5.3.1 Kalibrační závislost

Kalibrační závislost byla stanovena pomocí metody lineární regrese pro všech 5 analytů přítomných ve směsi standardů, to znamená pro karboanhydrázu, lysozym, α -laktalbumin, β -laktoglobulin a ribonukleázu. Grafické znázornění vyjadřuje závislost průměrné velikosti korigované plochy pod píkem analytu na jeho koncentraci v mg/ml. Měření probíhalo za optimálních podmínek (napětí -25 kV a teplota 25 °C), detekce pomocí vodivostního a UV detektoru. Pro každý analyt byly hodnoceny koncentrace 0,03125 mg/ml; 0,0625 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml a 1 mg/ml.

Kalibrační závislost pro karboanhydrázu



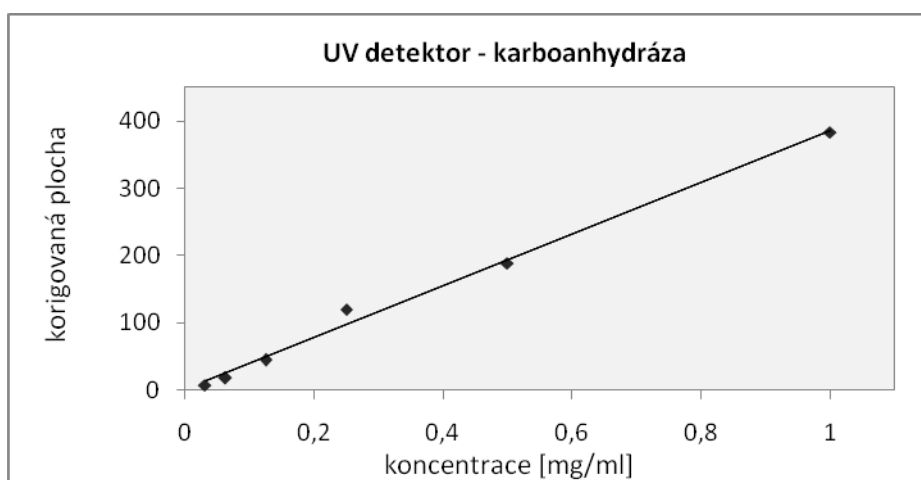
Obr. č. 26: Kalibrační závislost pro karboanhydrázu - vodivostní detektor

Počet bodů: 6

Směrnice přímky: 0,0689

Absolutní člen: -0,0003

Korelační koeficient: 0,9934



Obr. č. 27: Kalibrační závislost pro karboanhydrázu - UV detektor

Počet bodů: 6

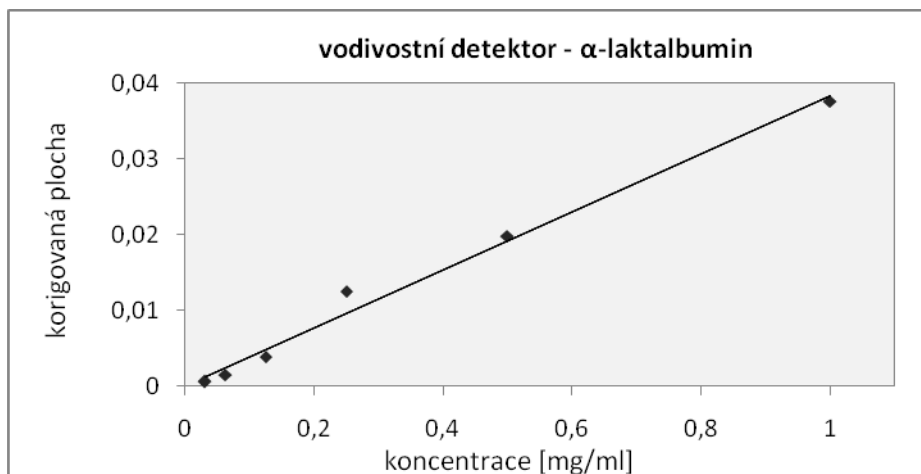
Směrnice přímky: 406,55

Absolutní člen: -2,56

Korelační koeficient: 0,9974

Ve sledovaném koncentračním rozmezí je v případě obou detektorů závislost lineární (kor. koeficient $R^2 = 0,9934$ pro vodivostní detektor a $0,9974$ pro UV detektor).

Kalibrační závislost pro α -laktalbumin



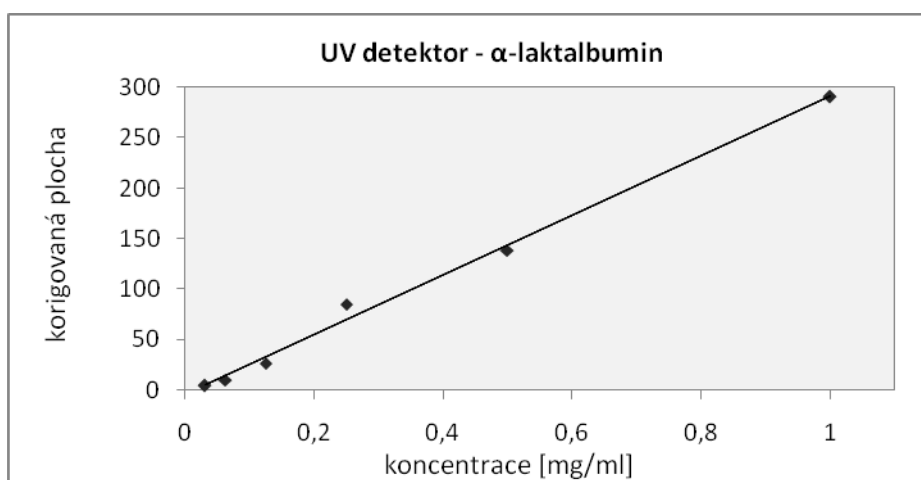
Obr. č. 28: Kalibrační závislost pro α -laktalbumin - vodivostní detektor

Počet bodů: 6

Směrnice přímky: 0,0426

Absolutní člen: -0,0006

Korelační koeficient: 0,9927



Obr. č. 29: Kalibrační závislost pro α -laktalbumin - UV detektor

Počet bodů: 6

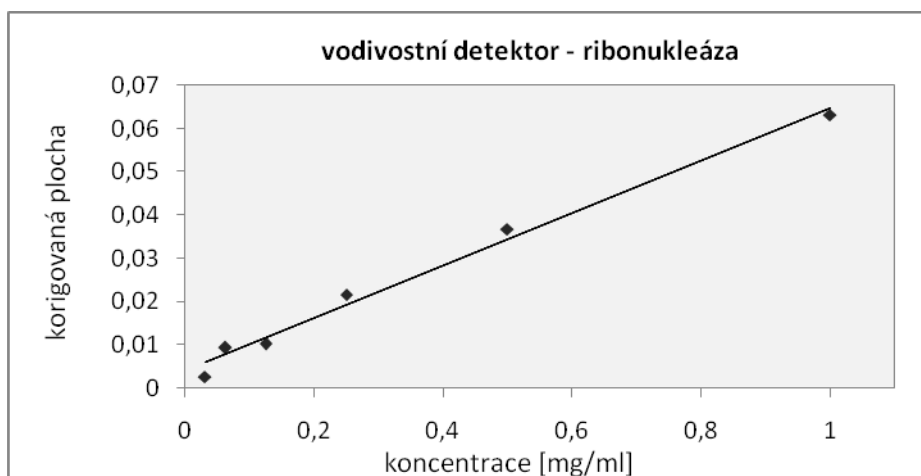
Směrnice přímky: 318,2

Absolutní člen: -8,87

Korelační koeficient: 0,9965

Ve sledovaném koncentračním rozmezí je v případě obou detektorů závislost lineární ($R^2 = 0,9927$ pro vodivostní detektor a $0,9965$ pro UV detektor).

Kalibrační závislost pro ribonukleázu



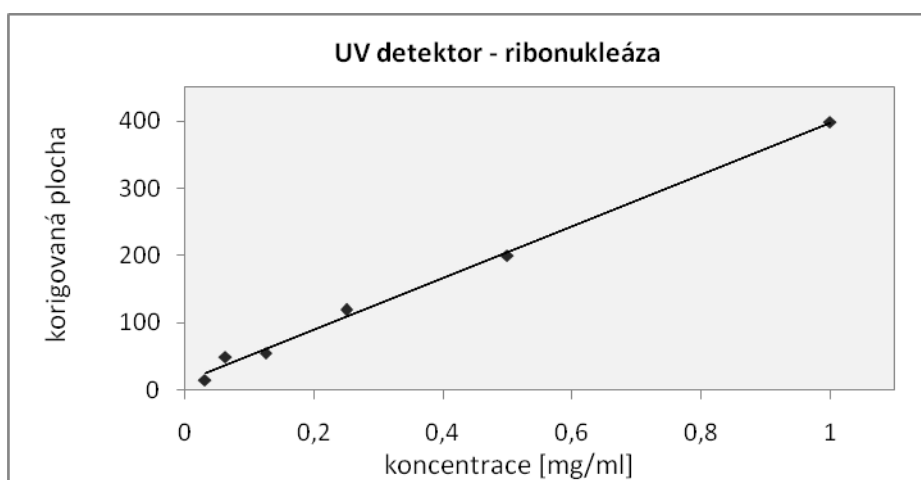
Obr. č. 30: Kalibrační závislost pro ribonukleázu - vodivostní detektor

Počet bodů: 6

Směrnice přímky: 0,0685

Absolutní člen: 0,00305

Korelační koeficient: 0,9932



Obr. č. 31: Kalibrační závislost pro ribonukleázu - UV detektor

Počet bodů: 6

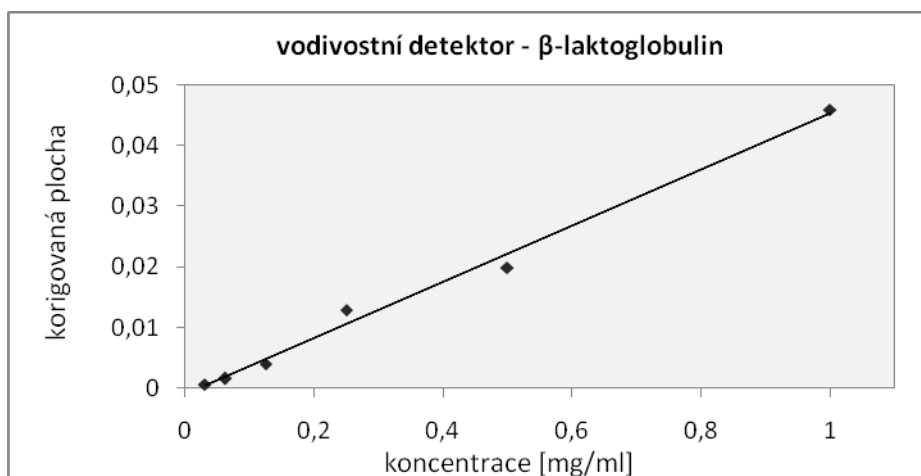
Směrnice přímky: 428,85

Absolutní člen: 7,74

Korelační koeficient: 0,9940

Ve sledovaném koncentračním rozmezí je v případě obou detektorů závislost lineární ($R^2 = 0,9932$ pro vodivostní detektor a $0,9940$ pro UV detektor).

Kalibrační závislost pro β -laktoglobulin



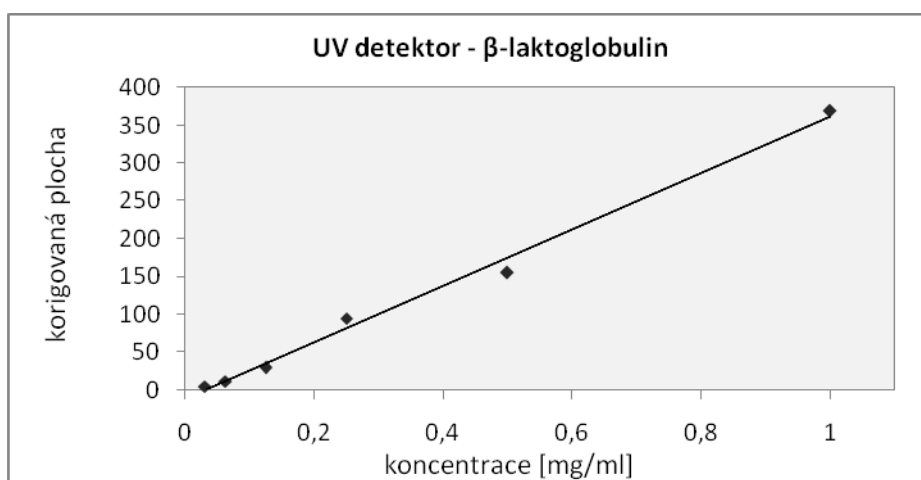
Obr. č. 32: Kalibrační závislost pro β -laktoglobulin - vodivostní detektor

Počet bodů: 6

Směrnice přímky: 0,0411

Absolutní člen: -0,00047

Korelační koeficient: 0,9899



Obr. č. 33: Kalibrační závislost pro β -laktoglobulin - UV detektor

Počet bodů: 6

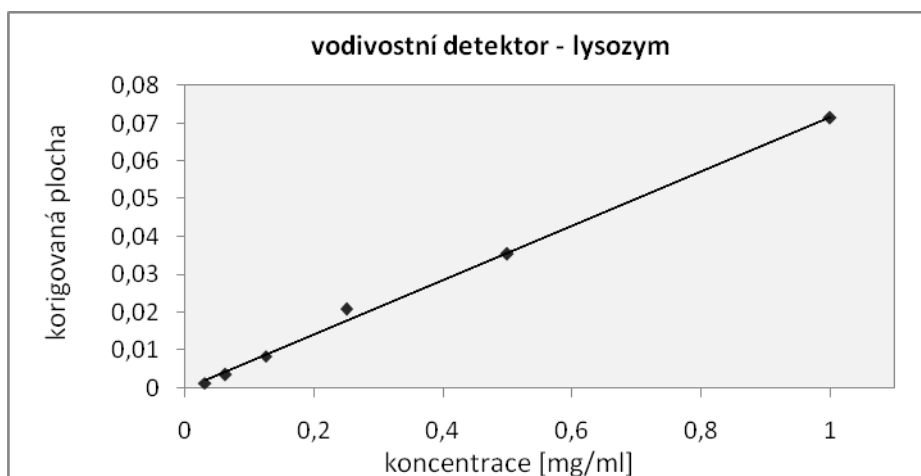
Směrnice přímky: 430,05

Absolutní člen: -19,46

Korelační koeficient: 0,9935

Ve sledovaném koncentračním rozmezí je v případě obou detektorů závislost lineární ($R^2 = 0,9899$ pro vodivostní detektor a $0,9935$ pro UV detektor).

Kalibrační závislost pro lysozym



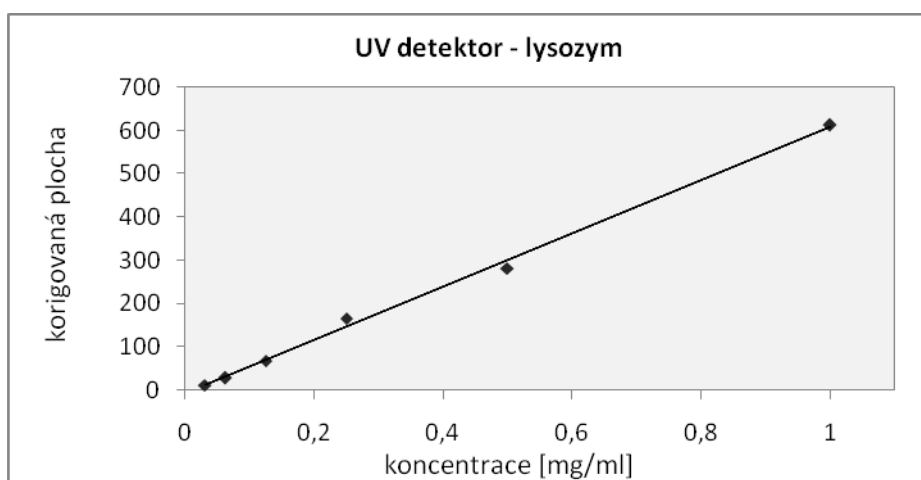
Obr. č. 34: Kalibrační závislost pro lysozym - vodivostní detektor

Počet bodů: 6

Směrnice přímky: 0,078

Absolutní člen: -0,0014

Korelační koeficient: 0,9976



Obr. č. 35: Kalibrační závislost pro lysozym - UV detektor

Počet bodů: 6

Směrnice přímky: 670,65

Absolutní člen: -16,19

Korelační koeficient: 0,9935

Ve sledovaném koncentračním rozmezí je v případě obou detektorů závislost lineární ($R^2 = 0,9976$ pro vodivostní detektor a $0,9935$ pro UV detektor).

5.3.2 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)

Pro každý analyt a zároveň pro oba způsoby detekce byly vypočítány limity detekce a kvantifikace podle vztahů, které jsou uvedeny v kap. 7.3. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v následujících tabulkách.

Tabulka č. 17: Hodnoty dosažených LOD pro standardy proteinů (VD - vodivostní detektor, UV - UV detektor)

Analyt	LOD [$\mu\text{g/ml}$] - VD	LOD [$\mu\text{g/ml}$] - UV
Karboanhydráza	4,79	3,38
α -laktalbumin	7,29	6,98
Ribonukleáza	9,64	5,49
β -laktoglobulin	10,04	8,75
Lysozym	8,46	8,27

Tabulka č. 18: Hodnoty dosažených LOQ pro standardy proteinů (VD - vodivostní detektor, UV - UV detektor)

Analyt	LOQ [$\mu\text{g/ml}$] - VD	LOQ [$\mu\text{g/ml}$] - UV
Karboanhydráza	14,51	10,23
α -laktalbumin	22,08	21,17
Ribonukleáza	29,20	16,64
β -laktoglobulin	30,41	26,51
Lysozym	25,64	25,05

Limity detekce se v případě vodivostního detektoru pohybovaly v rozmezí 4,79-10,04 $\mu\text{g/ml}$, přičemž nejnižší hodnoty dosáhla karboanhydráza a nejvyšší β -laktoglobulin. Pro UV detektor se limity detekce pohybovaly v rozmezí 3,38-8,75 $\mu\text{g/ml}$, nejnižší hodnota byla zjištěna u karboanhydrázy, nejvyšší u β -laktoglobulinu.

5.4 Souhrn výsledků zkoumané metody

Kapilární elektroforéza dnes patří v oblasti analýzy proteinů k nejvyužívanějším metodám. Hlavními výhodami CE jsou vysoká rychlost a účinnost separace, kapilární uspořádání, což znamená menší objemy vzorků a elektrolytů, výborné rozlišení, krátká doba analýzy, plná automatizace a detekce v reálném čase. Ještě před několika lety byla analýza proteinů touto metodou poměrně problematická, jelikož docházelo k adsorpci proteinů na vnitřní stěnu kapiláry. Z tohoto důvodu byly prováděny nejrůznější pokusy, jejichž cílem bylo vyvinout postup, jak adsorpci předcházet. Jako nejúčinnější způsob se zdá být typ statické úpravy vnitřního povrchu PB-DS-PB, jenž je tvořen třemi vrstvami iontových polymerů. Stejný způsob pokrytí byl využit i při analýze modelové směsi bílkovin, jejichž M_r se pohybovaly v rozmezí 13700-29000 Da a pI 4,4-11,35.

K optimalizaci a vývoji metody byly využity 2 přístroje, jedná se o kapilární elektroforetický systém PrinCE 750, na kterém byl proveden výběr optimálního elektrolytu a o kapilární elektroforetický systém Agilent7100, na který byly do té doby zjištěné optimální podmínky aplikovány a zároveň byly zkoumány další podmínky, jako ideální napětí, teplota nebo také koncentrace elektrolytu. Vzorky na obou přístrojích byly detekovány jak vodivostním detektorem, tak i UV detektorem při vlnové délce 210 nm, při které všechny látky dosahovaly maxima.

Co se týče optimalizace metody, nejprve byl testován typ elektrolytu, kdy byla jako BGE nakonec vybrána kyselina octová. Při testování koncentrací elektrolytu na pak byla s ohledem na tvar a rozlišení píků a migrační časy analytů nakonec jako optimální zvolena koncentrace kyseliny octové 1,5 M.

Dále byla vyzkoušena úprava elektrolytu pomocí přidání etylenglykolu, což by mělo zpomalovat EOT a vést tak k lepšímu rozlišení píků. Při porovnání výsledků rozlišení pro každá analyt nebyly pozorovány výraznější rozdíly, ovšem skutečně došlo ke zpomalení EOT a navíc i k lehké deformaci píků. Etylenglykol již dále používán nebyl.

Při testování vlivu napětí bylo ve shodě s teorií zjištěno, že s rostoucí absolutní hodnotou napětí dochází ke zkracování migračních časů. U obou detektorů se ukázalo jako optimální napětí -25 kV, kdy byly píky rozděleny na základní linii a měly optimální tvar.

Hodnota optimální teploty je 25 °C. S jejím stoupaním došlo ke zkracování migračních časů a u obou detektorů byl zjištěn nejpříjemnější tvar píků právě při této teplotě, kdežto při 30 °C již docházelo k rozmytí zón a lehké deformaci píků.

Byla testována také způsobilost systému, která zahrnuje rozlišení (R_s), faktor symetrie píku (A_s), účinnost (N) a opakovatelnost separace. Rozlišení mezi jednotlivými píky se pohybovalo v rozmezí 1,78-5,28 pro vodivostní detektor a 1,77-4,96 pro UV detektor. Všechny analyty byly plně rozděleny na základní linii.

Hodnoty faktoru symetrie píku se pohybovaly v případě vodivostního detektoru mezi 0,72-0,914 a v případě UV detektoru 0,72-0,96. Při porovnání obou detektorů byly hodnoty A_s v podstatě srovnatelné. Nejnižšího faktoru symetrie dosáhl β -laktoglobulin (vždy 0,72), nejvyššího naopak karboanhydráza. Dalo by se říci, že všechny píky byly symetrické (β -laktoglobulin mírně asymetrický).

Účinnost separace se dá vyjádřit jako počet teoretických pater (N). Pro oba detektory byl spočítán počet teoretických pater, který se pohyboval v rozmezí 13745-19154 pro vodivostní detektor a 8014-19833 pro UV detektor. Vzhledem k tomu, že obvykle se počty teoretických pater pohybují okolo 10^4 - 10^5 , dala by se metoda vyhodnotit jako velmi účinná.

Při hodnocení opakovatelnosti metody pomocí RSD zdánlivých mobilit bylo zjištěno, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci vzorku 0,25 mg/ml pro vodivostní detektor a 0,0625 mg/ml pro UV detektor. Nejvyšších hodnot RSD dosáhl u vodivostního detektoru lysozym (0,72 %; 1 mg/ml) a u UV detektoru karboanhydráza (0,91 %; 0,25 mg/ml). RSD při hodnocení opakovatelnosti efektivních mobilit vyšly velmi dobře. Hodnoty RSD při zkoumání opakovatelnosti korigovaných ploch byly poměrně vysoké (až 5,7 %, což se ale ukázalo jako ojedinělý případ), stále však pro danou metodu přijatelné.

Pro každý analyt a detektor byla sestavena kalibrační závislost, která byla ve všech případech lineární (R^2 v rozmezí 0,9899-0,9976).

Jako poslední byly zjišťovány hodnoty LOD a LOQ, a to pro testované rozmezí koncentrací vzorku 0,03125 mg/ml - 1 mg/ml. Nejnižší limit detekce u vodivostního detektoru byl zjištěn u karboanhydrázy (LOD = 4,79 μ g/ml), nejvyšší u β -laktoglobulinu (10,04 μ g/ml). Pro UV detektor byly také nejnižší hodnoty zjištěny u karboanhydrázy (3,38 μ g/ml) a nejvyšší u β -laktoglobulinu (8,75 μ g/ml).

Bylo využito pokrytí PB-DS-PB, které by podle H. Katayama a kol. ^[10] mělo zajistit reverzní a stabilní EOT a účinně zabránit adsorpci proteinů na stěnu kapiláry. V této diplomové práci byla tato teorie potvrzena.

K. Svobodová a kol. ^[25] představila studii nejběžnějších aditiv ovlivňující EOT v CE s C⁴D detekcí. Z celé řady testovaných aditiv bylo nejlepšími výsledky dosaženo pokrytím PB-DS-PB, kdy nedošlo k žádným změnám signálu C⁴D a EOT byl stabilní. V této diplomové práci byla kompatibilita pokrytí PB-DS-PB s detektorem C⁴D potvrzena.

Při testování vhodných typů elektrolytu bylo podle J. Tursen ^[8] dosaženo s využitím kyseliny octové (200 mM; pH 2,5), u níž byla základní linie nejstabilnější a citlivost detekce nejvyšší. V této diplomové práci byla kyselina octová zvolena jako optimální BGE, avšak při parametrech 200 mM a pH 2,5 nebylo dosaženo dobrých výsledků. Dva sousední píky (α -laktalbumin a ribonukleáza) od sebe nebyly prakticky vůbec odděleny. Podobný případ nastal i u dvojice píků β -laktoglobulin-lysozym. Proto byla nakonec jako nejvhodnější vybrána 1,5M kyselina octová o pH 2.

Závěry nejrozličnějších studií (např. A. A. Elbashir a kol. ^[42], P. Tůma a kol. ^[21], P. Kubáň ^[24]) často hovoří o tom, že spojením CE-C⁴D je dosahováno velmi dobrých výsledků analýzy, dokonce byla opakovaně zjištěna vyšší citlivost tohoto spojení, než při použití UV detektoru. V této diplomové práci bylo na základě výpočtů LOD a LOQ zjištěno, že citlivost detektorů v analýze modelové směsi proteinů byla srovnatelná.

5.5 Výhled

Po celém světě existují nejrůznější farmaceutické společnosti, jejichž snahou je přispět k celosvětovému zlepšení kvality léčiv, a tím samozřejmě ke zlepšení zdraví celé populace. Mezinárodní seznam léků, který najdeme např. v lékopisu, je pravidelně revidován a jsou upravovány případné nepřesnosti, či inovace, související s novější technologií přípravy léčiv apod. ^[42] Převážná část nově vznikajících léčivých přípravků je bílkovinné povahy ^[43], to se pojí se zvyšujícími se nároky na analytické parametry (co nejkratší doba analýzy, malá spotřeba analytu i reagensů, automatizace procesu a především výborná citlivost), při zjišťování např. jejich čistoty, což bylo jedním z hlavních důvodů, proč tuto práci zaměřit právě na optimalizaci analýzy bílkovin.

K nejrychleji se rozšiřujícím skupinám léčiv patří monoklonální protilátky, které jsou použitelné např. pro léčbu revmatoidní artritidy, psoriatické artritidy, ankylozující spondylitidy, Crohnovy choroby nebo metastazujícího karcinomu tlustého střeva exprimujícím EGFR. ^[44]

V podstatě by se dalo říci, že metoda CZE ve spojení s pokrytím kapiláry PB-DS-PB byla úspěšně zavedena pro proteiny s molekulovou hmotností (13 700-29 000 Da) a jelikož jejich analýza byla úspěšná, dalo by se uvažovat o dalším zkoumání, tentokrát právě třeba monoklonálních protilátek, pro které je charakteristická molekulová hmotnost 150 kDa. Po vhodné přípravě (např. redukci disulfidických můstků nebo digesci) mohou vzniklé fragmenty o molekulové hmotnosti 25-50 kDa představovat zajímavou alternativu využití pro rychlá předběžná měření před CE-MS analýzou, se kterou je PB-DS-PB potah kompatibilní. ^[46]

V CE-MS by se také dalo využít již dříve zmíněných výhod vysokoúčinné kapilární elektroforézy a zároveň pomocí MS získat strukturální informace o zkoumaných proteinech. To přináší výhody hlavně v případě analýzy složitějších směsí bílkovin (kromě léčiv také nejrůznější biologické vzorky, odebrané např. za diagnostickými účely), kde se může objevit zhoršená schopnost CE separovat proteiny, mohou být přítomny komigrující analyty a není příliš snadné je identifikovat. ^[42, 46]

6 ZÁVĚR

V diplomové práci byla stanovována modelová směs bílkovin (α -laktalbumin, β -laktoglobulin, karboanhydráza, lysozym a ribonukleáza) pomocí kapilární zónové elektroforézy s využitím vodivostního (C^4D) a UV (DAD) detektoru, přičemž cílem práce bylo nalézt optimální podmínky jejich analýzy. Teoretická část uvádí principy kapilární elektroforézy a rešerši, shrnující současné poznatky, týkající se stanovování bílkovin. Experimentální část se zabývá ověřováním těchto poznatků v praxi.

Po optimalizaci všech parametrů byla pro každý analyt změřena kalibrační závislost, dále byla zjištěna účinnost separace, její opakovatelnost a také limity detekce a kvantifikace.

Na základě získaných výsledků všech provedených měření byla tato metoda vyhodnocena jako dostatečně citlivá a reprodukovatelná a může sloužit jako podklad pro další zkoumání proteinů.

7 LITERATURA

1. PAZOUREK, J. Moderní elektroforetické analytické metody [online]. [cit./vid. 16. 4. 2015]. Dostupné z: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickych-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf>
2. GAŠ, B. Kapilární elektroforéza, Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír*. 2001, 80, 360
3. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. *Český lékopis* 2009.1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 138-143
4. KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 1997, 91, 320-329
5. LAUER, H. H., ROZING, G. P. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Germany, 2014. Publication number 5990-3777EN
6. LUO, Yong, QIN, Jianhua a LIN, Bingcheng. Methods for pumping fluids on biomedical lab-on-a-chip. *Frontier in Bioscience* [online]. ©2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3500/fulltext.php?bframe=figures.htm>
7. KATAYAMA, H., ISHIHAMA, Y., AKASAWA, N. Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2254-2260
8. TURSEN, J., WANG, A., QIN, W. Electrophoretic separation of acidic and basic proteins in the presence of micromolar concentrations of an ionic liquid. *Microchim Acta*. 2011, 174:63-71
9. LUCY, Ch. A., MacDONALD, A. M., GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1184, 81-105
11. KATAYAMA, H., ISHIHAMA, Y., AKASAWA, N. Stable Cationic Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers for Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 1998, 70, 5272-5277
12. Capillary electrophoresis. Wikipedia [online]. ©2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/37/Capillaryelectrophoresis.png>
13. MACOMBER, Joe, O'CONNOR, Kevin. The advantages of pure fused silica capillary tubing in medical Applications. Qualified Suppliers to the Medical Device Industry [online]. UBM Canon, ©2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.qmed.com/sites/default/files/987651-1063.pdf>
14. Elektroforéza. ELFHK webová knihovna [online]. ©2015 [cit./vid. 24. 2. 2015]. Dostupné z: <https://publi.cz/admin/books/140/03.html>
15. DOUŠA, Michal. UV/VIS HPLC detektory. HPLC.CZ [online]. Michal Douša, ©1999-2013 [cit./vid. 4. 4. 2015]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html

16. OPEKAR, F., ŠTULÍK, K. Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok - znovuzrození bezkontaktních impedančních metod. *Chemické listy*. 2010, 104, 1148-1154
17. MAI, Thanh Duc, HAUSER, Peter C. Contactless Conductivity Detection for Electrophoretic Microseparation Techniques. The chemical record. John Wiley & Sons, © 1999-2015 [cit./vid. 16. 4. 2015]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tcr.v12.1/issuetoc>
18. KLOUDA, P. *Základy biochemie*. 2005, nakladatelství P. Klouda, Ostrava
19. KŘÍŽEK, T., COUFAL, P., BOSÁKOVÁ, Z., TESAŘOVÁ, E., SOBOTNÍKOVÁ-SUCHÁNKOVÁ, J. Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy*. 2009, 103, 130-135
20. STAUB, A., GUILLARME, D., SCHAPPLER, J., VEUTHEY, J-L., RUDAZ, S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, 55, 810-822
21. TŮMA, P., OPEKAR, F., SAMCOVÁ, E., ŠTULÍK, K. A Comparison of the Properties of Contactless Conductivity and Diode-Array Photometric Detectors in Analyses of Low-Molecular, Biologically Active Substances by Capillary Electrophoresis in Acetic Acid Solutions. *Electroanalysis*, No. 5. 2008, 20, 477-484
22. SCHUCHERT-SHI, A., HAUSER, P. C. Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytical biochemistry*. 2009, 387, 202-207
23. 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*. 2002, 23, 2888-2893
24. KUBÁŇ, P., HAUSER, P. C. Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE - a review. *Electrophoresis*. 2009, 3, 176-188
25. SVOBODOVA, K., MADR, A., GLATZ, Z. Study of the most common additives affecting electro-osmotic flow for use in capillary electrophoresis with contactless conductivity detection setup. *Chemické listy*. 2013, 107, 454-455
26. SIGMA-ALDRICH [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l6010?lang=en®ion=CZ>
27. Breast-feeding, HAMLET, and cancer. University at Buffalo [online]. Anders Hakansson, © 2008-2014 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.acsu.buffalo.edu/~andersh/research/milkcancer.asp>
28. SIGMA-ALDRICH [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l3908?lang=en®ion=CZ>
29. Hypoallergenic Milk. Biol1020 [online]. © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: http://biol1020-2012-2.blogspot.cz/2012/10/hypoallergenic-milk_11.html
30. SIGMA-ALDRICH [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2624?lang=en®ion=CZ>

31. Enzymklassen. ChemgaPedia [online]. Wiley Information Services GmbH, © 1999-2014 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/4/cm/kinetik/enzymklassen.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biokatalyse/carboanhydrase.vscml.html>
32. SIGMA-ALDRICH [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/7/l6876dat.pdf>
33. Protein Data Bank Deposition. Md Munan Shaik [online]. © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://munanshaiks.yolasite.com/protein-data-bank.php>
34. SIGMA-ALDRICH [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r4875pis.pdf
35. FLOUDAS, Christodoulos A. Computational chemistry, molecular biology and bioinformatics. Princeton university [online]. The Trustees of Princeton University, © 2015 [cit./vid. 19. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.princeton.edu/cbe/people/emeritus/floudas/>
36. POHANKA, M. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, 79, 60-63
37. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vydání. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2. sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3
38. SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*. 2003, 987, 57-66
39. HUHN, C., RAMAUTAR, R., WUHRER, M., SOMSEN, G. Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2010, 396, 297-314
40. PAZOUREK, J., KAPUSTÍKOVÁ, I., ODEHNALOVÁ, K. *Cvičení z analytické chemie 2. Analytická chemie kvantitativní. Ústav chemických léčiv. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*, 1. vydání. 58 s. ISBN 978-80-7305-735-0
41. CHANG, Y-S., SHIH, Ch-M., LI, Y-Ch., LIN, Ch-H. Large-Volume Sample Sweeping with a High Theoretical Plate Number Using a Coupled-Capillary in Capillary Electrophoresis. *Analytical sciences*. 2006, 22, 557-561
42. AHUJA, S., JIMIDAR, I. M. Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis. First edition, 2008. ISBN 978-0-12-372573-8
43. MULLARD, A. 2010 FDA drug approvals. *Nature*. 2011, 10, 82-85
44. NELSON, A. R., DHIMOLEA, E., REICHERT, J. M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature*. 2010, 9, 767-774
45. AMERICA'S BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH COMPANIES. Biologics Research Promises to Bolster the Future of Medicine. *Medicines in development*. 2013, 1-8 s.
46. HASELBERG, R., JONG, G. J. de, SOMSEN, G. W. CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012. *Electrophoresis*. 2013, 34, 99-112

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. č. 1 Uspořádání kapilární zónové elektroforézy
- Obr. č. 2 Uspořádání vnitřního povrchu kapiláry
- Obr. č. 3 Srovnání EOT a laminárního toku
- Obr. č. 4 Vnitřní stěna kapiláry po potažení PB-DS-PB
- Obr. č. 5 Schéma uspořádání kapilární elektroforézy
- Obr. č. 6 Schéma uspořádání detekční cely vodivostního C⁴D detektoru
- Obr. č. 7 Struktura α -laktalbuminu
- Obr. č. 8 Struktura β -laktoglobulinu
- Obr. č. 9 Struktura karboanhydrázy
- Obr. č. 10 Struktura lysozymu
- Obr. č. 11 Struktura ribonukleázy
- Obr. č. 12 Elektroforeogram blanku a lysozymu (100mM fosfátový pufr, pH 2,5)
- Obr. č. 13 Elektroforeogram blanku a lysozymu (50mM k. octová, pH 5)
- Obr. č. 14 Elektroforeogram blanku a lysozymu (100mM k. octová, pH 2,5)
- Obr. č. 15 Elektroforeogram směsi proteinů (2M k. octová, pH 1,9; PrinCE)
- Obr. č. 16 Elektroforeogram směsi proteinů (1,5M k. octová, pH 2; PrinCE)
- Obr. č. 17 Závislost mobility na koncentraci elektrolytu - vodivostní detektor
- Obr. č. 18 Závislost mobility na koncentraci elektrolytu - UV detektor
- Obr. č. 19 Výsledek analýzy směsi s a bez etylenglykolu
- Obr. č. 20 Vliv vloženého napětí - vodivostní detektor
- Obr. č. 21 Vliv teploty - vodivostní detektor
- Obr. č. 22 Elektroforeogram za optimálních podmínek (PrinCE, vodivostní d.)
- Obr. č. 23 Elektroforeogram za optimálních podmínek (PrinCE, UV detekce)
- Obr. č. 24 Elektroforeogram za optimálních podmínek (Agilent, vodivostní d.)
- Obr. č. 25 Elektroforeogram za optimálních podmínek (Agilent, UV detekce)
- Obr. č. 26 Kalibrační závislost pro karboanhydrázu - vodivostní detektor
- Obr. č. 27 Kalibrační závislost pro karboanhydrázu - UV detektor
- Obr. č. 28 Kalibrační závislost pro α -laktalbumin - vodivostní detektor
- Obr. č. 29 Kalibrační závislost pro α -laktalbumin - UV detektor
- Obr. č. 30 Kalibrační závislost pro ribonukleázu - vodivostní detektor
- Obr. č. 31 Kalibrační závislost pro ribonukleázu - UV detektor
- Obr. č. 32 Kalibrační závislost pro β -laktoglobulin - vodivostní detektor
- Obr. č. 33 Kalibrační závislost pro β -laktoglobulin - UV detektor
- Obr. č. 34 Kalibrační závislost pro lysozym - vodivostní detektor
- Obr. č. 35 Kalibrační závislost pro lysozym - UV detektor

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1	Přehled polymerů používaných k pokrytí pomocí fyzikální adsorpce
Tab. č. 2	Výhody a nevýhody C ⁴ D detektoru
Tab. č. 3	Příklady užitých metod v analýze proteinů
Tab. č. 4	Roztoky kyseliny octové pro optimalizaci
Tab. č. 5	Kondicionace kapiláry
Tab. č. 6	Mobilita analytů v závislosti na koncentraci elektrolytu - vodivost. d.
Tab. č. 7	Mobilita analytů v závislosti na koncentraci elektrolytu - UV detektor
Tab. č. 8	Rozlišení píků v závislosti na etylenglykolu
Tab. č. 9	Závislost migračních časů na napětí
Tab. č. 10	Závislost migračních časů na teplotě
Tab. č. 11	Optimální podmínky analýzy
Tab. č. 12	Hodnoty rozlišení mezi jednotlivými píky
Tab. č. 13	Faktor symetrie píku
Tab. č. 14	Hodnoty počtů teoretických pater
Tab. č. 15	Opakovatelnost zdánlivých mobilit analytů
Tab. č. 16	Opakovatelnost korigovaných ploch analytů
Tab. č. 17	Hodnoty dosažených LOD pro standardy proteinů
Tab. č. 18	Hodnoty dosažených LOQ pro standardy proteinů