

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Katarína Molnárová

**OPTIMALIZÁCIA ELEKTROFORETICKÉHO STANOVENIA
PROTAMÍNU A INZULÍNU**

Optimization of electrophoretic determination
of protamine and insulin

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědomá toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22.5.2017

Katarína Molnárová

Abstrakt

Táto práca sa venuje optimalizácií stanoveniu protamínu a inzulínu pomocou kapilárnej zónovej elektroforézy. Počas experimentov sa optimalizovalo zloženie základného elektrolytu, jeho pH a spôsob dávkovania. Postupne sa vyskúšala kyselina citrónová v rozsahu koncentrácie 80 až 240 mmol l⁻¹ a kyselina chlórctová v rozsahu 50 mmol l⁻¹ až 150 mmol l⁻¹. Optimalizovaná metóda používa kremennú kapiláru s vnútorným priemerom 50 µm. Celková dĺžka kapiláry je 50,0 cm, efektívna dĺžka je 8,5 cm. Dávkovanie vzorky prebieha na krátkom konci kapiláry. Základným elektrolytom je 100 mmol l⁻¹ kyselina chlórctová. Separácia prebieha pri napätí 20 kV. Vzorka je dávkovaná hydrodynamicky tlakom 5 kPa na 3 s. Detekcia prebieha pri vlnovej dĺžke 200 nm. Metódou je možné stanoviť protamín a inzulín v rozsahu koncentrácií 4 µg ml⁻¹ až 300 µg ml⁻¹ a 5 µg ml⁻¹ až 300 µg ml⁻¹. Medza detekcie pre protamín je 1 µg ml⁻¹ a pre inzulín 2 µg ml⁻¹. Opakovateľnosti plôch pík a migračných časov s hydrodynamickým dávkovaním pre koncentrácie 30 µg ml⁻¹ a 200 µg ml⁻¹ vykazujú hodnoty relatívnych smerodajných odchýlok neprevyšujúce 6 % z čoho plynie, že optimalizovaná metóda vykazuje uspokojivú opakovateľnosť. Počas elektrokinetického dávkovania sa použilo napätie 5 kV po dobu 5 s. Elektrokinetické dávkovanie je menej presné, ale je možné ho použiť pri nižších koncentráciách analytov. Funkčnosť optimalizovanej metódy bola overená na reálnej vzorke NPH inzulínu. Suspenziu NPH inzulínu je pred stanovením nutné rozpustiť v dostatočne kyslom prostredí. Vzorka NPH inzulínu sa rozpustila v 4,5 mmol l⁻¹ roztoku kyseliny fosforečnej. Výhodou stanovenia je krátka doba analýzy, separácia prebieha behom asi 2 minút, a jednoduchá príprava vzorky. Nevýhodou stanovenia je neschopnosť separovania jednotlivých protamínových peptidov.

Kľúčové slová

kapilárna elektroforéza, protamín, inzulín

Abstract

This work deals with optimization of a method for separation and detection of protamine and insulin using capillary zone electrophoresis. The composition of background electrolyte, the solution pH and the injection method were optimized. Citric acid in a concentration range of 80 to 240 mmol L⁻¹ and chloroacetic acid ranging from 50 to 150 mmol L⁻¹ were tested sequentially. The optimized method uses a fused silica capillary with inner diameter of 50 μm. The total length of capillary is 50.0 cm, effective length is 8.5 cm. The injection of the sample is performed on the short end of the capillary. The method uses chloroacetic acid of 100 mmol L⁻¹ concentration as the background electrolyte. Driving voltage is 20 kV. Sample is injected hydrodynamically with a pressure of 5 kPa for 3 s. The analytes are detected spectrophotometrically at wavelength of 200 nm. The method allows for determination in case of protamines in concentration range between 4 μg mL⁻¹ and 300 μg mL⁻¹ and insulin from 5 μg mL⁻¹ to 300 μg mL⁻¹. The limits of detection are 1 μg mL⁻¹ for protamine and 2 μg mL⁻¹ for insulin. Repeatability of migration times and peak areas tested at 30 μg mL⁻¹ and 200 μg mL⁻¹ concentration levels using hydrodynamic injection showed values of relative standard deviation lower than 6 % suggesting satisfactory repeatability. Electrokinetic injection was also tested by applying voltage of 5 kV during 5 s. Electrokinetic injection is less accurate, but it can be used at lower concentration range. The applicability of the optimized method was tested on a real sample of NPH insulin. Before the detection the suspension of the sample had to be dissolved in acidic environment. The sample was dissolved in aqueous solution of phosphoric acid of 4.5 mmol L⁻¹ concentration. The main advantage of the method is the rapid analysis; separation was done in about 2 minutes and the undemanding sample preparation. The disadvantage is that this method is not able to separate individual protamine peptides.

Keywords

capillary zone electrophoresis, protamine, insulin

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať každému kto ma podporoval počas môjho štúdia a pri písaní bakalárskej práce, hlavne svojmu školiteľovi RNDr. Tomášovi Křížekovi, Ph.D. Ďakujem za odbornú pomoc, za cenné rady a v neposlednom rade za venovaný čas.

Obsah

1 CIEĽ PRÁCE	8
2 TEÓRIA	9
2.1 Protamíny	9
2.1.2 Využitie protamínu	9
2.1.3 Stanovenie protamínu	10
2.1.4 Chemické vlastnosti protamínu a ich využitie v kapilárnej elektroforéze	12
2.2 NPH inzulín	14
2.3 Stanovenie inzulínu	16
2.4 Stanovenie protamínu v inzulínových prípravkoch	17
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	19
3.1 Stanovenie mobility elektroosmotického toku	19
3.2 Použité chemikálie	20
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA	21
4.1 Základná optimalizácia metódy	21
4.1.1 Výber vhodného základného elektrolytu	21
4.1.2 Dávkovanie vzorky	27
4.2 Kalibračné závislosti pre štandardy protamínu a inzulínu	28
4.3 Overenie opakovateľnosti merania štandardov protamínu a inzulínu	29
4.4 Overenie stanovenia s reálnou vzorkou NPH inzulínu	31
5 ZÁVER	33
6 POUŽITÁ LITERATÚRA	34

Použité symboly a skratky

BGE	– Základný elektrolyt (background electrolyte)
CE	– Kapilárna elektroforéza (capillary electrophoresis)
EOF	– Elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
HPLAC	– Afinitná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high-performance liquid affinity chromatography)
HPLC	– Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high-performance liquid chromatography)
LOD	– Medza detekcie (limit of detection)
LOQ	– Medza stanovenia (limit of quantification)
MEKC	– Micelárna elektrokinetická chromatografia (micellar electrokinetic chromatography)
NPH	– Neutrálny Protamín Hagedorn (Neutral Protamine Hagedorn)
PFOA	– Kyselina perfluoroktánová (perfluorooctanoic acid)
PMTEMA	– Poly(2-(2-(4-metyltiofén-3-yloxy)etyl) malónová kyselina (poly(2-(2-(4-methylthiophen-3-yloxy)ethyl) malonate acid))
PZI	– Protamín zinok inzulín (Protamine Zinc Insulin)
RP-HPLC	– Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach (reversed-phase high-performance liquid chromatography)
RSD	– Relatívna smerodajná odchýlka (relative standard deviation)
SD	– Smerodajná odchýlka (standard deviation)
SDS	– Dodecylsírany sodný (sodium dodecyl sulfate)
A	– Plocha píku
E	– Intenzita elektrického pola
I	– Prúd
l_d	– Efektívna dĺžka kapiláry
l_t	– Celková dĺžka kapiláry
q	– Náboj iónu
r	– Hydratovaný polomer iónu
t_{EOF}	– Migračný čas elektroosmotického toku
$t_{mig,i}$	– Migračný čas analytu i
U	– Separáčné napätie
v_{EOF}	– Rýchlosť elektroosmotického toku
v_i	– Migračná rýchlosť látky i
ε	– Dielektrická konštanta roztoku
ζ	– Zeta potenciál
η	– Dynamická viskozita prostredia
μ	– Elektroforetická mobilita
μ_{EOF}	– Mobilita elektroosmotického toku
$\mu_{eff,i}$	– Efektívna mobilita látky i

1 Cieľ práce

Cieľom tejto práce je optimalizácia elektroforetického stanovenia celkového protamínu a inzulínu pomocou kapilárnej elektroforézy a overenie jej funkčnosti na reálnej vzorke. Optimalizuje sa zloženie základného elektrolytu, postupne sa vyskúša kyselina citrónová a kyselina chlórctová. Okrem zloženia základného elektrolytu sa optimalizuje jeho pH a spôsob dávkovania vzorky.

2 Teória

2.1 Protamíny

Protamíny patria do skupiny *nukleoproteínov*. Nukleoproteíny sú látky, v ktorých je proteín viazaný na nukleovú kyselinu. Spôsob väzby medzi týmito dvomi skupinami biopolymérov je rôznorodý. Niektoré nukleoproteíny sú ľahko disociovateľné na jednotlivé zložky, kým ďalšie nie. Medzi disociovateľné patria napr. nukleohistóny a nukleoprotamíny. Nukleohistóny sa nachádzajú v jadre somatických buniek zvierat. Nukleoprotamíny sú prítomné v spermiiach niektorých druhov rýb [1].

Protamínmi sa označuje skupina silne bázických nízkomolekulárnych proteínov. Obsahujú niekoľko druhov aminokyselín, hlavnou zložkou je však arginín (približne 66 % celkovej hmoty). Vo všetkých protamínoch dominujú bázické aminokyseliny a to v pomere dve bázické aminokyseliny na jednu nebázickú. Niektoré protamíny obsahujú vedľa arginínu ďalšiu bázickú aminokyselinu, buď histidín alebo lyzín, v niektorých sa vyskytujú všetky tri. Prvý protamín bol izolovaný Miescherom (1874) zo spermie lososa (*Salmo salar*). V roku 1896 Kossel preukázal, že protamíny sú tvorené aminokyselinami, a preto sa môžu považovať za bielkoviny. Kossel pre svoje pozorovania používal spermie jesetera (*Acipenseridae*). Takto získaný protamín sa neskôr nazval ako sturín. Protamín získaný z jesetera bol podobný k protamínu získanému zo spermie lososa, ale líšil sa zložením [2]. Jednotlivé protamíny sú nazvané podľa rodu alebo druhu ryby, v ktorom boli objavené. Medzi najznámejšie protamíny patrí salmín izolovaný zo spermie lososa, klupeín izolovaný zo spermie sleda a iridín pochádzajúci zo pstruha [1].

2.1.2 Využitie protamínu

Protamín má vysoké uplatnenie v medicíne a v potravinárskom priemysle. Vo forme svojich sulfátov sa využíva na potlačenie antikoagulačného účinku heparínu. Heparín je negatívne nabitý sulfatovaný glykosaminoglykán. K vzniku komplexu protamín-heparín dochádza na pozitívne nabitej guanidinovej skupine arginínu a na negatívne nabitej časti heparínu, tým sa vytvorí neaktívny komplex, ktorý nemá žiadnu protizrážanlivú aktivitu [3]. Účinok protamínu nastupuje 1 až 2 minúty po vnútrožilnej injekcii. Protamín sulfát sa využíva počas operácií srdca, pri ktorých sa vkladá kardiopulmonálny bypass. Aj keď je protamín účinným antikoagulačným prípravkom, má mnoho nepriaznivých účinkov medzi ktoré patrí aj anafylaktická reakcia [4].

Ďalšou oblasťou využitia protamínu je príprava inzulínu. Pri zmiešaní protamínu

a inzulínu pri pH 7,2 v prítomnosti zinočnatých iónov sa vytvorí zrazenina, ktorá je málo rozpustná v podkožných tkanivách, čím sa predĺži jeho vstrebávanie. Bežne používaný inzulín hydrochlorid sa oproti protamín inzulínu vstrebáva rýchlo, kvôli čomu je ho potreba podávať viackrát denne. Ďalším rozdielom medzi rozpustným inzulínom a protamín zinok inzulínom (PZI) je rozličná doba účinku. Kým rozpustný inzulín zníži hladinu krvného cukru behom 15 až 30 minút, PZI začne pôsobiť 3 až 6 hodín po podkožnom podaní. Hlavnou výhodou dlhodobu účinkujúceho PZI je, že oproti krátkodobu účinkujúcemu inzulínu postupne znižuje hladinu cukru v krvi, čím sa zníži výskyt hypoglykemického a hyperglykemického šoku [5].

Protamíny sa využívajú v potravinárskom priemysle vďaka svojim antibakteriálnym účinkom. Medzi priaznivé vlastnosti protamínu patrí vysoká stabilita pri vyšších teplotách, konzervačný účinok v neutrálnych a zásaditých potravinách. Protamíny nemajú vplyv na textúru, vôňu a chuť jedla, do ktorého sa pridávajú [6].

2.1.3 Stanovenie protamínu

V súčasnosti väčšina metód zaoberajúce sa prečistením a separáciou protamínu zahrňujú časovo náročné chromatografické postupy. Doposiaľ publikované metódy používajú organické rozpúšťadlá, alkoholy, acetonitril alebo acetón. Likvidácia zmienených rozpúšťadiel často predstavuje problémy. Medzi dodnes používané metódy patrí *Sakaguchiho reakcia* zahrňujúca kolorimetrickú detekciu guanidinovej skupiny arginínu. Počas tejto reakcie sa používa *oxín a brómnan sodný*. Výhodou tohto stanovenia je, že arginín je možné stanoviť v hydrolyzátu proteínu. Toto stanovenie je veľmi špecifické a citlivé [7].

MacKay a kol. získali kompletnú sekvenciu šiestich protamínov získaných zo zreých spermií pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*). Na získanie čisto homogénnej vzorky bola použitá extrakcia kyselinou, gélová, iónexová a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach. Sekvencie prečistených protamínov boli získané použitím plynovej chromatografie [8].

Na kvantifikáciu protamínu vo vodných roztokoch neobsahujúce žiadne možné interferujúce látky sa používa farbivo *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Minimálna koncentrácia pre detekciu protamínu je $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Koncentráciu protamínu v roztoku je možné získať pomocou *Lambertova-Beerova zákona* využitím spektrometrického merania absorbancie pri vlnovej dĺžke 595 nm [9].

Ďalšia kolorimetrická metóda bola vyvinutá na kvantifikáciu protamínu v krvnej plazme. Ako farbivo sa v tomto prípade uplatnila látka nazývaná *Azúr A*, ktorá je schopná naviazať sa na heparín. Výsledok tejto interakcie je posunutie absorpčného maxima z 620 nm (modrá) na 530 nm (fialová). Táto interakcia je slabšia ako väzba v komplexe protamín-heparín. Ak je v plazme prítomný protamín naviaže sa na heparín, tým nahradí isté množstvo farbiva z komplexu heparín-azúr A. Vďaka tejto výmene sa absorpčné maximum farbiva Azúru A obnoví na pôvodnú hodnotu 620 nm. Pridaním testovanej plazmy do zmesi obsahujúca komplex heparín-azúr A a následným meraním absorbancie pri 620 nm je možné zistiť obsah protamínu v plazme [10].

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach (RP-HPLC) je široko využívaná chromatografická metóda slúžiaca na separáciu protamínových peptidov. Protamín sulfát sa skladá zo štyroch hlavných polypeptidov, ktoré majú skoro rovnaké zloženie, veľkosť a hodnotu izoelektrického bodu (*pI*). Optimalizovaná metóda používala ako mobilnú fázu 100 mmol l⁻¹ pufor dihydrogenfosforečnanu sodného (pH 2,25), 1,8 % acetonitril a 0,3 % metanol. Medza detekcie (LOD) bola stanovená na hodnotu 0,015 mg ml⁻¹, medza stanovenia (LOQ) na hodnotu 0,06 mg ml⁻¹. Separácia prebehla behom 25 minút. Protamín bol detegovaný pri vlnovej dĺžke 214 nm [11].

Detekcia protamínu je relatívne náročná kvôli neprítomnosti aromatických aminokyselín vďaka čomu klasické merania UV-absorpcie pri vlnovej dĺžke 280 nm sú neefektívne. V súčasnosti existuje len niekoľko štúdií, ktoré sa zaoberajú jednoduchým a efektívnym stanovením protamínu. Niektoré z nich sa zaoberajú optickými sondami. Základom týchto sond je kolorimetická a fluorescenčná odozva na zmenu prostredia. Jedna z chemických analýz využíva derivát polytiofenu, poly(2-(2-(4-metyltiofén-3-yloxy)etyl) malónovú kyselinu (PMTEMA). Táto negatívne nabitá látka je schopná vytvoriť komplex s pozitívne nabitým protamínom. Vďaka tejto interakcie dôjde ku konformačným zmenám základnej kostry polytiofenu z náhodnej do viac usporiadanej štruktúry. Tieto zmeny sú spojené so zhasaním fluorescencie a zmenou farby roztoku. Voľný roztok PMTEMA má maximálnu absorbanciu pri vlnovej dĺžke 404 nm (žltá farba). S pridaním vzorky protamínu sa absorpčný maximum posunie na hodnotu 485 nm (ružovočervená farba). Týmto spôsobom je možné stanoviť protamín v koncentračnom rozmedzí 1,0 až 25,0 µg ml⁻¹. Vzhľadom na to, že fluorimetrické stanovenia sú citlivejšie ako absorpčné, sú vhodné na stanovenie nižších koncentrácií protamínu. S využitím fluorimetrie je detekcia možná už pri koncentrácii protamínu 0,1 µg ml⁻¹ [12].

2.1.4 Chemické vlastnosti protamínu a ich využitie v kapilárnej elektroforéze

Bežne používané chromatografické metódy nie sú len časovo, ale aj materiálovo náročné. Problémy predstavuje ako kvantifikácia tak aj automatizácia jednotlivých stanovení. Rýchlym vývojom kapilárnej elektroforézy (CE) boli tieto ťažkosti prekonané. CE je rýchla a účinná metóda vhodná na stanovenie elektricky nabitých častíc. Na stanovenie je potrebné minimálne množstvo vzorky a tá sa musí upravovať iba minimálne. Táto metóda patrí medzi elektromigračné separačné metódy. Základným princípom separácie je rozdielna pohyblivosť elektricky nabitých častíc v elektrickom poli. Dôležitou veličinou v CE je elektroforetická mobilita, μ , ktorá je definovaná ako rýchlosť pohybu iónov v roztoku v elektrickom poli o jednotkovej intenzite. Z rovnice 1 vyplýva, že elektroforetická mobilita iónu je priamo úmerná jeho náboji a nepriamo úmerná jeho hydratovanému polomeru a dynamickej viskozite roztoku.

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad (1)$$

μ	–	elektroforetická mobilita [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
v	–	rýchlosť pohybu nabitkej častice [m s^{-1}]
E	–	intenzita elektrického pola [V m^{-1}]
q	–	náboj iónu [C]
r	–	hydratovaný polomer iónu [m]
η	–	dynamickej viskozity prostredia [Pa s]

Ďalšou hnacou silou separácie v CE je elektroosmotický tok (EOF), ktorý vzniká dôsledkom existencie elektrickej dvojvrstvy na vnútornom povrchu kapiláry. V CE sa používa kremenná kapilára s malým priemerom, ktorá je pokrytá vrstvou polyimidu, vďaka čomu je kapilára pružná a menej krehká. Na vnútornom povrchu kapiláry sú prítomné siloxánové skupiny ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). Pri nízkych hodnotách pH dochádza najprv k hydrolyze siloxánových skupín za vzniku silanolových ($\equiv\text{Si-OH}$), ktoré následne disociujú na kremičitanové skupiny ($\equiv\text{Si-O}^-$). Vnútorný povrch kapiláry tak získa negatívny náboj, ktorý sa vykompenzuje kationmi prítomnými v roztoku [13]. Takto vznikne elektrická dvojvrstva, kde kationy tvoria nepohyblivú časť dvojvrstvy. V difúznej časti roztoku tak prevláda prebytok voľného náboja, čím sa v blízkosti stene kapiláry vytvorí potenciálny rozdiel. Jeho časť v difúznej oblasti dvojvrstvy sa nazýva *zeta* potenciál. Pri vložení elektrického napätia kationy začnú migrovať ku katóde. Pretože ióny sú solvatované a kvôli malému rozmeru kapiláry, k pohybu je nútený celý objem roztoku smerom ku

katóde, pričom katióny sa pohybujú najrýchlejšie a anióny najpomalejšie. Pre mobilitu elektroosmotického toku platí vzťah 2 [14]. V CE je elektroosmotický tok pozitívnym benefitom, jednak skráti separačný čas a zároveň umožňuje súčasné stanovenie katiónov a aniónov. EOF však znižuje reprodukovateľnosť migračných časov analytov, čo je v CE nevýhodou.

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} = \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{1}{t_{EOF}} \cdot \frac{l_t \cdot l_d}{U} \quad (2)$$

μ_{EOF}	–	mobilita elektroosmotického toku [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
ε	–	dielektrická konštanta roztoku [F m^{-1}]
ζ	–	zeta potenciál [V]
η	–	dynamická viskozita prostredia [Pa s]
E	–	intenzita elektrického pola [V m^{-1}]
v_{EOF}	–	rýchlosť elektroosmotického toku [m s^{-1}]
t_{EOF}	–	migračný čas elektroosmotického toku [min]
l_t	–	celková dĺžka kapiláry [m]
l_d	–	efektívna dĺžka kapiláry [m]
U	–	separačné napätie [V]

Vlastnosti elektrolytu zahrňuje tzv. efektívna mobilita, μ_{eff} . V prípade slabých elektrolytov je mobilita závislá na pH prostredia. Efektívna mobilita slabých elektrolytov je vzťahnutá k danému pH, k iónovej sile a k teplote separačného prostredia. V praxi sa efektívna mobilita nepočíta zo stupne disociácie, ale z rozdielu pozorovanej mobility a mobility elektroosmotického toku (rovnica 3). Efektívna mobilita, je mobilita ktorú skutočne nameriame, zvyčajne je menšia ako limitná elektroforetická mobilita.

$$\mu_{eff,i} = \frac{v_i - v_{EOF}}{E} = \left(\frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \cdot \frac{l_t \cdot l_d}{U} \quad (3)$$

$\mu_{eff,i}$	–	efektívna mobilita látky i [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
v_i	–	migračná rýchlosť látky i [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
v_{EOF}	–	rýchlosť elektroosmotického toku [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
E	–	intenzita elektrického pola [V m^{-1}]
$t_{mig,i}$	–	migračný čas analytu [min]
t_{EOF}	–	migračný čas elektroosmotického toku [min]
l_t	–	celková dĺžka kapiláry [m]
l_d	–	efektívna dĺžka kapiláry [m]
U	–	separačné napätie [V]

Molekulová hmotnosť protamínu sa pohybuje okolo hodnoty 5 kDa, hodnotu izoelektrického bodu (*pI*) majú okolo 12-13. V kyslom prostredí budú arginínové skupiny protamínu kladne nabité, čo predstavuje isté problémy pri separácii pomocou kapilárnej elektroforézy. Hlavným problémom separácie pozitívne nabitých peptidov je elektrostatická interakcia medzi kladne nabitou časťou peptidu a negatívne nabitým povrchom kapiláry. Na zlepšenie výsledku separácie je možné použiť rôzne modifikované vnútorné povrchy kapiláry [15]. Ďalšou možnosťou slúžiacou na potlačenie interakcie proteínov s vnútornou stenou kapiláry je použitie vhodného prídavku, ktorý je efektívny v maskovaní silanolových skupín. Tento prídavok sa priamo pridáva do základného elektrolytu. Väčšina týchto látok buď maskujú silanolové skupiny, alebo priamo súťažajú o väzobné miesto na stene kapiláry, tým pádom nedochádza k ich interakcii s proteínmi [16]. Ďalšou možnosťou slúžiacou na potlačenie interakcie analytov so stenou kapiláry je zníženie pH. Pri vysokých hodnotách pH sa siloxánové skupiny na vnútornom povrchu kapiláry úplne disociujú, kvôli čomu dochádza k interakcii kladne nabitých analytov so stenou kapiláry. Znížením pH základného elektrolytu sa tomuto nežiadajúcemu efektu dá vyhnúť.

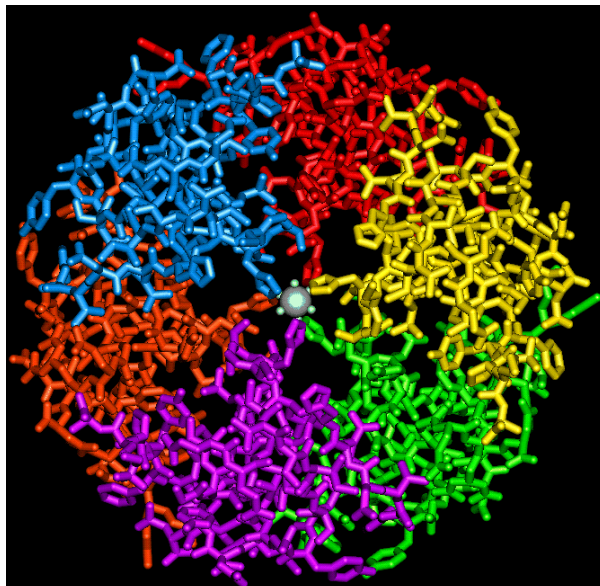
Ďalším faktorom ovplyvňujúci účinnosť a kvalitu separácie je vplyv tzv. Joulovho tepla. Joulovo teplo vzniká prechodom elektrického prúdu cez roztok. Vývoj tepla a následný teplotný gradient vedie napr. k zmenám viskozity a pH roztoku, odparovaniu roztoku, k termálnej degradácii analytov, hlavne v prípade proteínov a peptidov. Tieto zmeny majú za následok rozšírenie píku a nižšiu separačnú účinnosť. Jedna z možností ako znížiť množstvo vygenerovaného tepla je buď zníženie vkladanej napätia, alebo použitie BGE, ktorý vyvíja nízke hodnoty prúdu a má nízku vodivosť. Zvyčajne sa to docieli riedením roztoku [17].

2.2 NPH inzulín

Inzulín je polypeptidový hormón vylučovaný Langerhansovými ostrovčekmi podžalúdkovej žľazy.

Biologická účinnosť inzulínu bola preukázaná v roku 1922, od tej doby sa používa na liečbu cukrovky. Inzulín musí regulovať hladinu cukru v krvi (glykémia) počas celého dňa a zároveň musí reagovať na náhle zvýšenie jej hodnoty. Tejto podmienke je možné vyhovieť podaním prípravkov alebo zmesí, ktoré obsahujú ako dlhodobu pôsobiacu, tak aj krátkodobu účinkujúcu zložku. Kým v rýchlo pôsobiacich prípravkoch je inzulín prítomný

v rozpustnej forme, základom dlhodobu účinkujúcich je suspenzia kryštalického alebo amorfného inzulínu [18]. V roku 1936 Hans Christian Hagedron a kol. pripravili prvý inzulín s predĺženou účinnosťou, protamín inzulín. Neutrálne suspenzia takto pripraveného inzulínu však bola nestála. Stabilita inzulínu sa upravila pomocou prídavku nadbytku protamínu a malého množstva zinočnatých iónov. Týmto spôsobom pripravený produkt (PZI) mal dlhotrvajúci hypoglykemický účinok, preto bolo potrebné pridať rozpustnú formu inzulínu, aby sa získal prípravok s priemernou dobou účinku. Napriek tomu, že účinok produktu sa predĺžil neskôr sa preukázalo, že je nestály. V roku 1946 Hagedron a jeho spolupracovníci predstavili stabilnejšiu modifikáciu PZI, kryštalický NPH inzulín. Pripravili ho zmiešaním ekvimolárneho množstva inzulínu a protamínu pri neutrálnom pH v prítomnosti malého obsahu zinku. Prídavkom fenolu, prípadne derivátu fenolu, získali amorfnú zrazeninu inzulínu, ktorá sa postupne premenila do kryštalickej podoby s predĺženou tetragonálnou sústavou [19]. Komerčne dostupný je tzv. *Ľudský biosyntetický Izofáninzulín*, biela suspenzia s hodnotou pH 6,9 až 7,5, obsahujúca 0,9 molekúl protamínu a dve zinočnaté ióny na jeden hexamér inzulínu. Protamín a zinočnaté ióny regulujú asociáciu do hexamérnej formy a zvyšujú stabilitu inzulínu. Hexamér inzulínu je na Obr. 1. Inzulínové kryštály sú nerozpustné vo vode. Vstrebávanie NPH inzulínu po subkutánnom podaní začína po 1,5 hodín. Najvyššiu koncentráciu v krvnej plazme má po 4 až 12 hodinách a vymizne behom 24 hodín [20].



Obr. 1 Hexamér inzulínu [21].

2.3 Stanovenie inzulínu

Molekulová hmotnosť inzulínu je približne 5700 Da, z ktorého B reťazec predstavuje 60 % (3400 Da) a A reťazec 40 % (2300 Da). Na stanovenie inzulínu bolo vyvinuto mnoho metód. Pomocou afinitnej vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLAC) je možné sledovať vplyv rôznych fyzikálno-chemických parametrov (koncentrácia inzulínu, pH a teplota roztoku) ovplyvňujúce interakciu medzi povrchom stacionárnej fázy a inzulínom [22].

Na separáciu rôznych typov inzulínu (ľudský, hovädzí, bravčový) je možné použiť micelárnu elektrokinetickú chromatografiu (MEKC). Do roztoku obsahujúci nenabitú molekulu sa pridávajú povrchovo aktívne látky, *tenzidy*, ktoré sa začnú organizovať do priestorovo guľovitých útvarov, *micel*. Základom separácie je rozdielne zastúpenie analytu medzi micelárnou a vodnou fázou. Micelárna fáza sa častokrát označuje ako *pseudostacionárna fáza*, pretože sa pohybuje vlastnou elektroforetickou rýchlosťou. Najčastejšie používaným tenzidom je *dodecylsírán sodný* (SDS). MEKC sa ukázala, ako vhodná metóda na separáciu proteínov, ktoré majú podobnú štruktúru. Hovädzí inzulín sa líši od ľudského len v troch, bravčový len v jednej aminokyseline, kvôli čomu je separácia zložitá. Po optimalizácii zloženia základného elektrolytu sa ukázalo, že najvhodnejšie je použiť 50 mmol l⁻¹ roztok octanu amonného (pH 9), 65 mmol l⁻¹ perfluoroktánovej kyseliny (PFOA) a 4% metanol. Separácia troch foriem inzulínu prebehla behom 12 minút [23].

Na stanovenie inzulínu v rôznych prípravkoch existuje len málo akceptovaných metód. Mnoho z nich zahŕňa rôzne imunotesty, ktoré sú aj finančne, aj časovo náročné stanovenia [24]. Zo separačných metód stojí za zmienku stanovenie inzulínu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Doba stanovenia inzulínu pomocou HPLC bola 16 až 20 minút, čo pri vyššom množstve vzoriek mohlo predstavovať problémy. Od roku 1978 sa na analýzu inzulínu začínala používať RP-HPLC. Tieto stanovenia inzulínu regulovali mieru ionizácie inzulínu použitím vhodnej mobilnej fázy s nízkou hodnotou pH a vysokou salinitou. Inzulínové prípravky obsahujú konzervačné látky, ktoré vykazujú vysokú absorpciu UV žiarenia. Preto je nutné, aby pri takýchto stanoveniach boli k dispozícii analytické techniky umožňujúce oddelenie signálov konzervačných látok od signálu analytu. Detekcia inzulínu bola umožnená pri vlnovej dĺžke 214 nm, pri ktorom pík inzulínu bol zreteľne oddelený od píku konzervačných látok. Retenčný čas inzulínu sa zredukoval na 4,67 min [25].

2.4 Stanovenie protamínu v inzulínových prípravkoch

Predĺžená doba účinku protamín inzulínu vo veľkej miere závisí na typu a množstve pridaného protamínu. Kvôli tomu bolo nutné vyvinúť vhodnú analytickú metódu, ktorá sa zaoberá so stanovením množstva protamínu v inzulínových prípravkoch. Bežne používané testy sa zvyčajne zaoberajú len overením vyznačeného množstva protamínu. Tieto testy však neumožňujú separáciu a výskum stability štyroch hlavných protamínových peptidov. Ako na stanovenie samotného inzulínu, aj na stanovenie protamínu v inzulínových prípravkoch je možné použiť RP-HPLC s detekciou pri vlnovej dĺžke 214 nm. Stanovenie umožňuje detekciu a kvantifikáciu štyroch hlavných protamínových peptidov a celkové množstvo protamínu. Nevýhodou tohto stanovenia je časová náročnosť separácie. Separácia prebehla behom 35 min, čo zahŕňa aj reekvilibráciu kolóny [26].

Účinnou a časovo menej náročnou metódou na stanovenie protamínových peptidov v inzulínových prípravkoch sa ukázala byť CE. Behom experimentov sa používali ako vodné tak aj bezvodné rozpúšťadlá. Výhodou bezvodých rozpúšťadiel je, že majú nižšiu vodivosť. Na druhej strane pH vodných roztokov BGE je jednoduchšie prispôbiť a optimalizovať. Ukázalo sa, že použitie bezvodých rozpúšťadiel na stanovenie protamínu v inzulínových prípravkoch je nevhodné, pretože sa objavili len tri píky. Pri použití vodných roztokov BGE sa objavili všetky štyri očakávané píky behom 25 min. Do roztoku BGE sa však musela pridať neutrálna povrchovo aktívna látka (Thesit), aby sa vymedzila interakcia protamínu s vnútornou stenou kapiláry a tým sa zvýšila aj selektivita. Finálne zloženie BGE obsahovalo 100 mmol l⁻¹ fosfátový pufo (pH 2) a 50 mmol l⁻¹ Thesit. Aby separácia prebehla rýchlejšie separačné napätie sa zvýšilo na 30 kV. S optimalizovanými metódami sa previedlo stanovenie aj na reálnej vzorke NPH inzulínu. Píky boli detegované v očakávanom časovom intervale, bez iných dodatočných pík. Metóda nepopisuje žiadnu kalibračnú závislosť, ani limit detekcie a stanovenia [27].

Doba stanovenia celkového množstva protamínu a inzulínu sa dá znížiť nadávkovaním vzorky z opačného konca kapiláry, tzv. dávkovanie cez krátky koniec kapiláry, *short-end injection*. V tomto prípade dávkovanie prebieha na strane kapiláry bližšiemu k detektoru za súčasného obrátenia napätia. Ako základný elektrolyt sa používala 45 mmol l⁻¹ kyselina fosforečná, pH 1,85. Nízke hodnoty LOD a LOQ ukazujú na možnosť použitia tejto metódy pri nízkych koncentráciách analytov. LOD a LOQ protamínu bola stanovená na hodnotu 1,0 µg ml⁻¹ a 2,5 µg ml⁻¹, inzulínu na 0,7 µg ml⁻¹

a $2,3 \mu\text{g ml}^{-1}$. Stanovenie tiež vykazuje vysokú linearitu v rozsahu koncentrácií $2,5$ až $500 \mu\text{g ml}^{-1}$. Napriek priaznivým výsledkom sa počas stanovenia objavili isté ťažkosti. Prúd počas stanovenia bol nestabilný, životnosť kapiláry bola krátka, kvôli čomu sa zhoršila reprodukovateľnosť stanovenia [28]. Na vymedzenie týchto problémov je možné použiť iné kyseliny ako základný elektrolyt, ako napríklad kyselinu chlóróctovú alebo citrónovú. Preskúmanie týchto možností bolo cieľom tejto práce.

3 Experimentálna časť

Merania boli prevedené na prístroji *Agilent Technologies CE 1600* (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko). Analyty boli detegované spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 200 nm. Separácia prebiehala v kremennej kapiláre s vnútorným priemerom 50 μm (MicroSolv Technology Corporation, New Jersey, USA). Dávkovanie prebiehalo na krátkom konci kapiláry. Celková dĺžka kapiláry bola 50,0 cm, efektívna dĺžka bola 8,5 cm. Kapilára bola termostatovaná prúdom vzduchu na teplotu 25 °C. Každý experimentálny deň bola kapilára premytá roztokom NaOH s koncentráciou 1 mol l⁻¹ po dobu 10 min, následne deionizovanou vodou po dobu 10 min. Pred každým jednotlivým meraním kapilára bola premytá roztokom základného elektrolytu po dobu dvakrát 1 min. Prvú minútu bola na výstupe kapiláry umiestnená odpadná vialka, druhú minútu vialka obsahujúca základný elektrolyt. Základným elektrolytom bola kyselina fosforečná, kyselina citrónová alebo kyselina chlórctová. Na meranie pH bol použitý pH meter Jenway 3540 (Bibby Scientific Ltd., Veľká Británia).

Optimalizovaná metóda použitá na stanovenie celkového protamínu a inzulínu v injekcii NPH inzulínu používala ako základný elektrolyt vodný roztok kyseliny chlórctovej s koncentráciou 100 mmol l⁻¹, hydrodynamické dávkovanie tlakom 5 kPa po dobu 3 s. Vzorka NPH inzulínu bola rozpustená v roztoku kyseliny fosforečnej s koncentráciou 4,5 mmol l⁻¹.

3.1 Stanovenie mobility elektroosmotického toku

Elektroosmotický tok sa zmeral pomocou roztoku tiomočoviny s koncentráciou 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Vzorka sa nadávkovala v troch zónach hydrodynamicky tlakom 5 kPa po 3 s. V prvom kroku sa kapilára naplnila základným elektrolytom, po čom sa nadávkovala prvá zóna neutrálneho markéru. Prvá nadávkovaná zóna sa tlakom 5 kPa po 1 minútu preniesla do kapiláry, po čom sa nadávkovala ďalšia zóna, ktorá sa rovnakým tlakom preniesla do kapiláry. Pred nadávkovaním tretej zóny sa vložilo napätie 20 kV na 2 minúty, počas čoho prvá a druhá zóna obsahujúca neutrálny markér migrovala s mobilitou μ_{EOF} . Po spádu napätia na hodnotu 0 kV sa nadávkovala tretia zóna. Následne sa kapilára začala premývať základným elektrolytom tlakom 5 kPa a súčasne sa spustilo získavanie údajov a zaznamenávanie prechodu všetkých troch zón detektorom [29]. Mobilita elektroosmotického toku sa vypočítala pomocou rovnice (4).

$$\mu_{EOF} = \frac{[(t_{N_3} - t_{N_2}) - (t_{N_2} - t_{N_1})] \cdot l_d \cdot l_c}{t_{N_3} \cdot t_D \cdot U} \quad (4)$$

μ_{EOF}	–	mobilita elektroosmotického toku [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
$t_{N,i}$	–	migračné časy nadávkovaných zón [min]
l_d	–	efektívna dĺžka kapiláry [m]
l_c	–	celková dĺžka kapiláry [m]
t_D	–	doba aplikovania napätia [s]
U	–	separačné napätie [V]

3.2 Použité chemikálie

Kyselina ortofosforečná 85 % w/w, p. a. (Lach-Ner, Česká republika), kyselina chlórctová 99,9 % (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA), bezvodá kyselina citrónová 99,5 % (Lach-Ner, Česká republika), 1 mol l⁻¹ hydroroxid sodný, salmin-protamínsulfát z lososa, Grade X (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA), rekombinantný ľudský inzulín, exprimovaný v kvasinkách (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, USA), *Humulin N* - NPH insulin (Eli Lilly and Company, Indiana, USA), deionizovaná voda pripravená systémom Premier NFG/D Systems (Phoenix, AZ, USA).

4 Výsledky a diskusia

4.1 Základná optimalizácia metódy

4.1.1 Výber vhodného základného elektrolytu

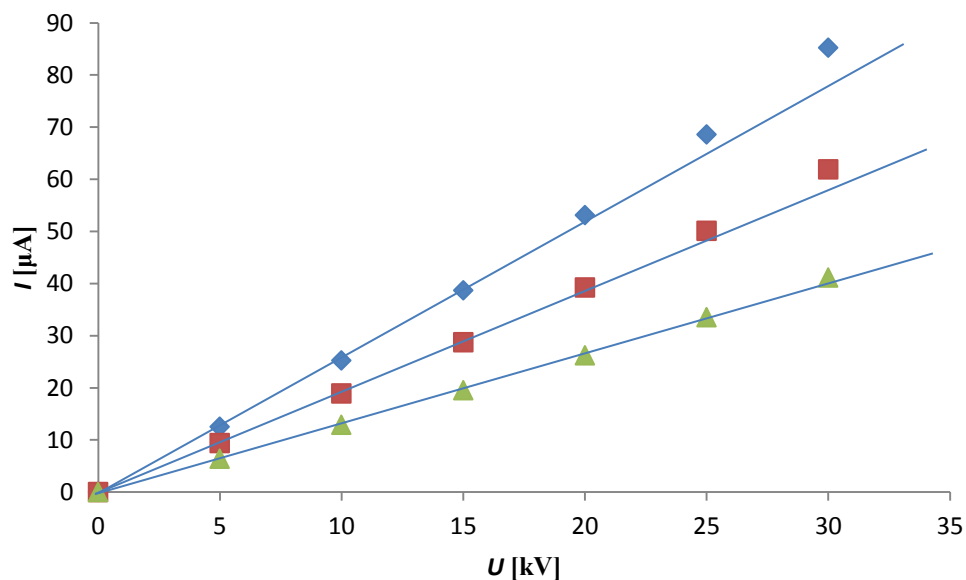
Počas prvej série meraní sa premeralo závislosť prúdu v elektroforetickom systéme na vložnom napätí v roztokoch jednotlivých kyselín. Použila sa kyselina fosforečná, chlórctová a citrónová s rôznou koncentráciou. Koncentrácia jednotlivých kyselín sa zvolila tak, aby pH roztokov sa pohybovala v rozsahu hodnôt 1,90 až 2,22. Jednotlivé hodnoty pH použitých kyselín sú uvedené v Tab. 1. Je vidieť, že s rastúcou hodnotou $pK_{a,1}$ rastie koncentrácia kyseliny potrebná k dosiahnutiu požadovaného pH.

Tab. 1 Namerané hodnoty pH jednotlivých roztokov kyselín. Hodnoty $pK_{a,1}$ a hodnoty pH uvedené kurzívou sú prevzaté z programu *PeakMaster* [30].

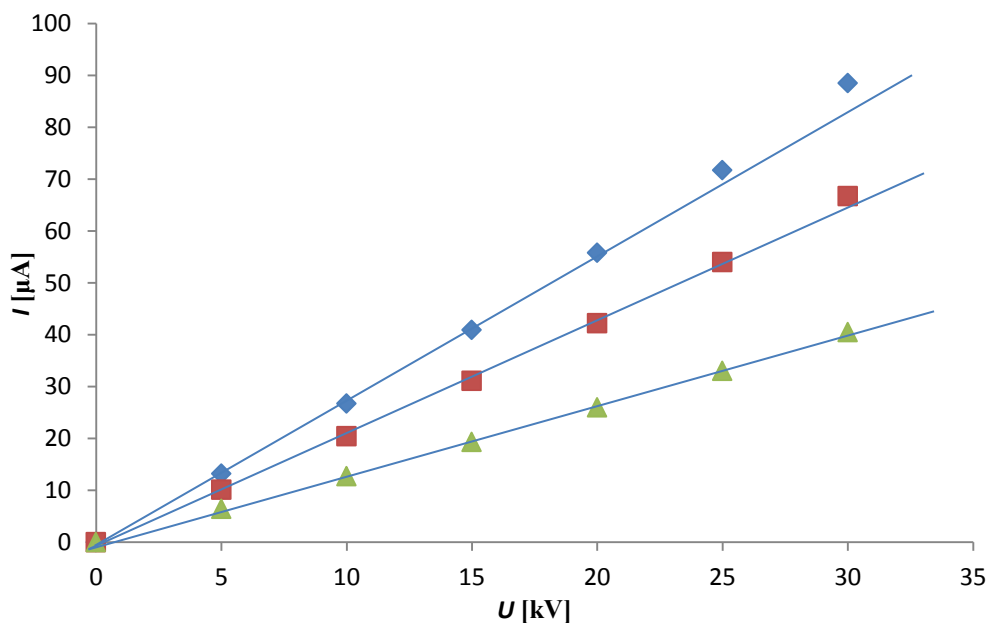
	Kyselina fosforečná			Kyselina chlórctová			Kyselina citrónová		
c [mmol l ⁻¹]	45	30	15	150	100	50	240	160	80
pH	1,93	2,01	2,22	1,94	2,05	2,19	1,97	2,05	2,25
	<i>1,85</i>	<i>1,96</i>	<i>2,15</i>	<i>1,89</i>	<i>1,96</i>	<i>2,12</i>	<i>1,89</i>	<i>1,98</i>	<i>2,13</i>
$pK_{a,1}$	2,160			2,865			3,128		

Protamín je kladne nabitý pri nízkych hodnotách pH základného elektrolytu vďaka vysokému podielu arginínu. Znížením pH roztoku sa mobilita protamínu zvyšuje, zároveň sa skracaje čas analýzy. Na pH tiež závisí rýchlosť elektroosmotického toku, so zvyšujúcim pH sa zvyšuje jej rýchlosť. Na druhej strane zo zvyšujúcou koncentráciou základného elektrolytu, klesá rýchlosť elektroosmotického toku, a tým sa predĺži doba analýzy. Dôležité bolo nájsť takú koncentráciu základného elektrolytu, aby sa počas separácie negenerovalo príliš veľké Joulovo teplo. Miera generovaného tepla závisí na rozmeroch kapiláry, na vodivosti základného elektrolytu a na vložnom napätí. Vysoké hodnoty Joulovho tepla majú za následok rozšírenie zón, čo vedie k nižšiemu rozlíšeniu separovaných analytov. Najjednoduchší spôsob, ako obmedziť výšku Joulovho tepla je vkladanie nižšieho napätia. Z Obr. 2, 3 a 4 je vidieť, že pri vyšších koncentráciách jednotlivých kyselín sa roztoky základného elektrolytu rýchlejšie zahrievajú. Podľa Ohmova zákona napätie je priamo úmerné elektrickému prúdu a odporu. Miera zahrievania roztoku závisí na výkone, ktorý je súčinom prúdu a napätia. Čím väčšie teplo vzniká, tým viac klesá viskozita roztoku a zároveň rastie jeho vodivosť. Pri aplikácii stále väčšieho

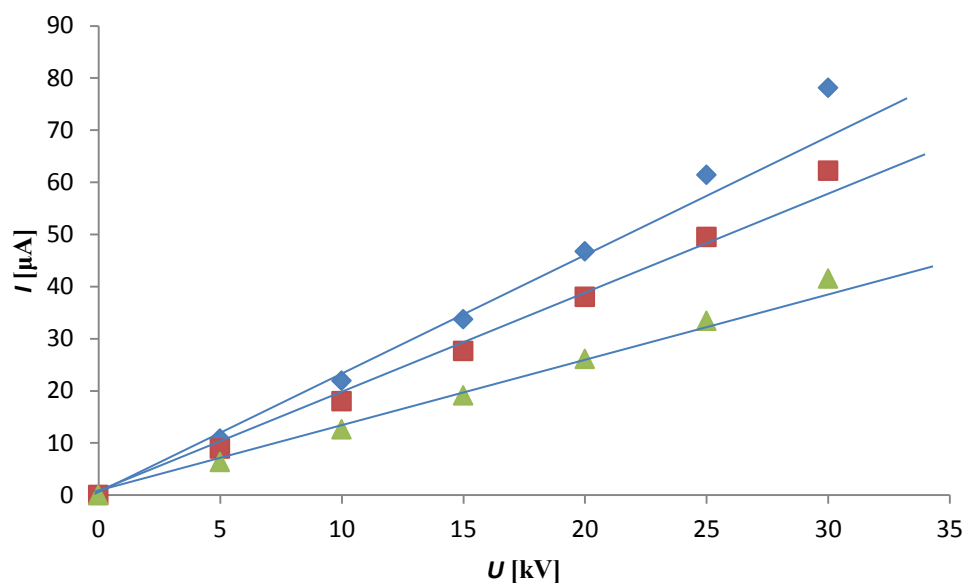
napätia zahrievanie roztoku sa prejavilo nelineárnym rastom prúdu. Z toho dôvodu najvyššie koncentrácie roztokov boli považované za nevhodné na separáciu analytov. Z Obr. 4 je ďalej vidieť, že v prípade kyseliny citrónovej sa aj pri najnižšej zvolenej koncentrácii (80 mmol l^{-1}) roztok rýchlo zahrieval a odchyľoval sa od lineárneho chovania.



Obr. 2 Závislosť prúdu na napätí v roztoku kyseliny chlórctovej s koncentráciou 150 mmol l^{-1} (kosoštvorce), 100 mmol l^{-1} (štvorce), 50 mmol l^{-1} (trojuholníky)

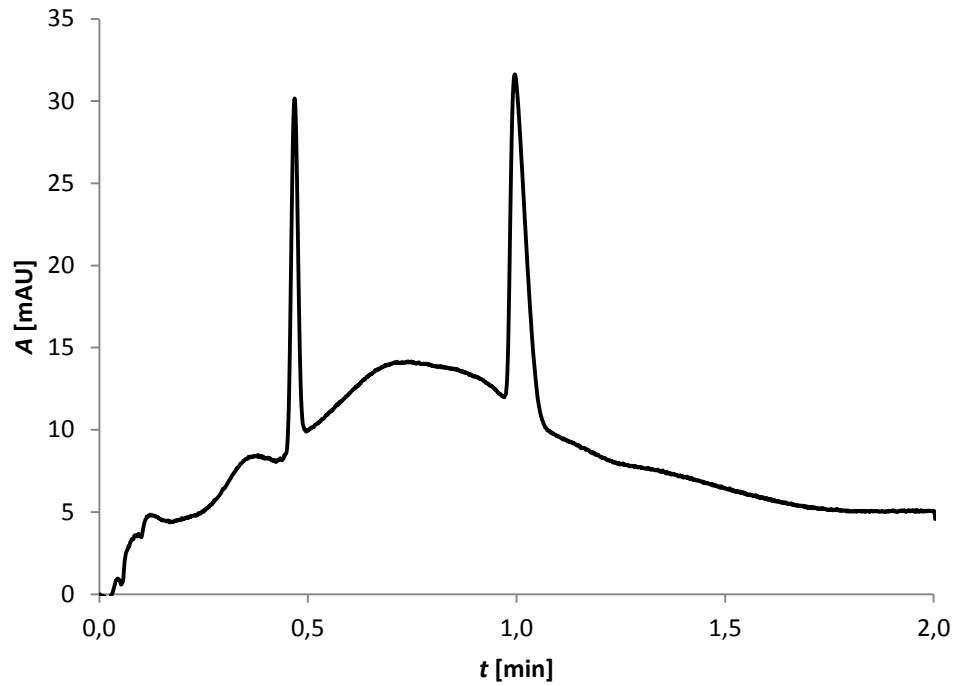


Obr. 3 Závislosť prúdu na napätí v roztoku kyseliny fosforečnej s koncentráciou 45 mmol l^{-1} (kosoštvorce), 30 mmol l^{-1} (štvorce), 15 mmol l^{-1} (trojuholníky)

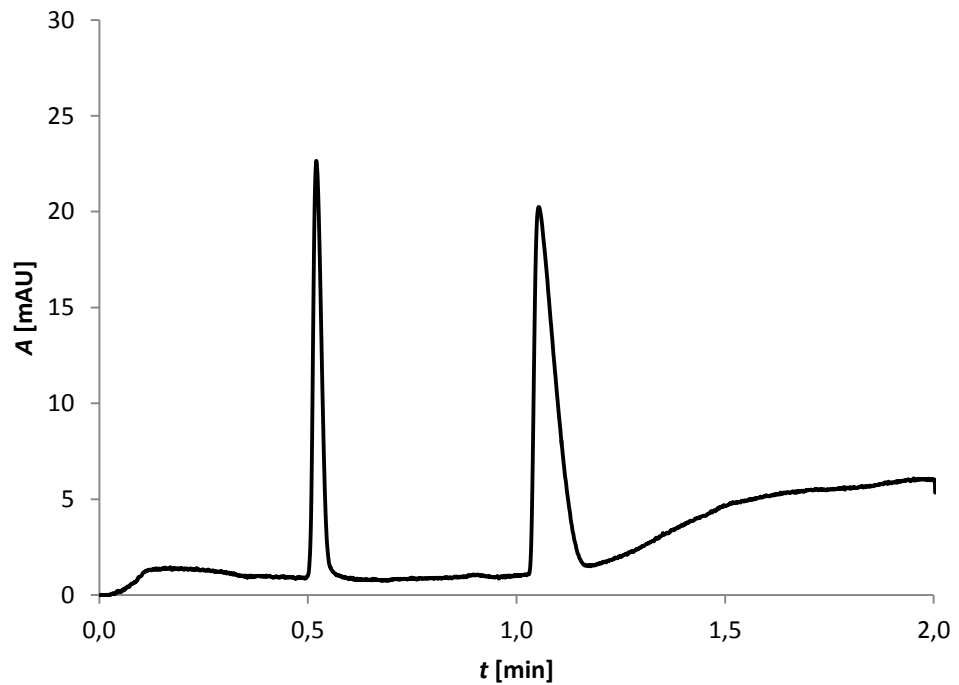


Obr. 4 Závislosť prúdu na napätí v roztoku kyseliny citrónovej s koncentráciou 240 mmol l^{-1} (kosoštvorce), 160 mmol l^{-1} (štvorce), 80 mmol l^{-1} (trojuholníky)

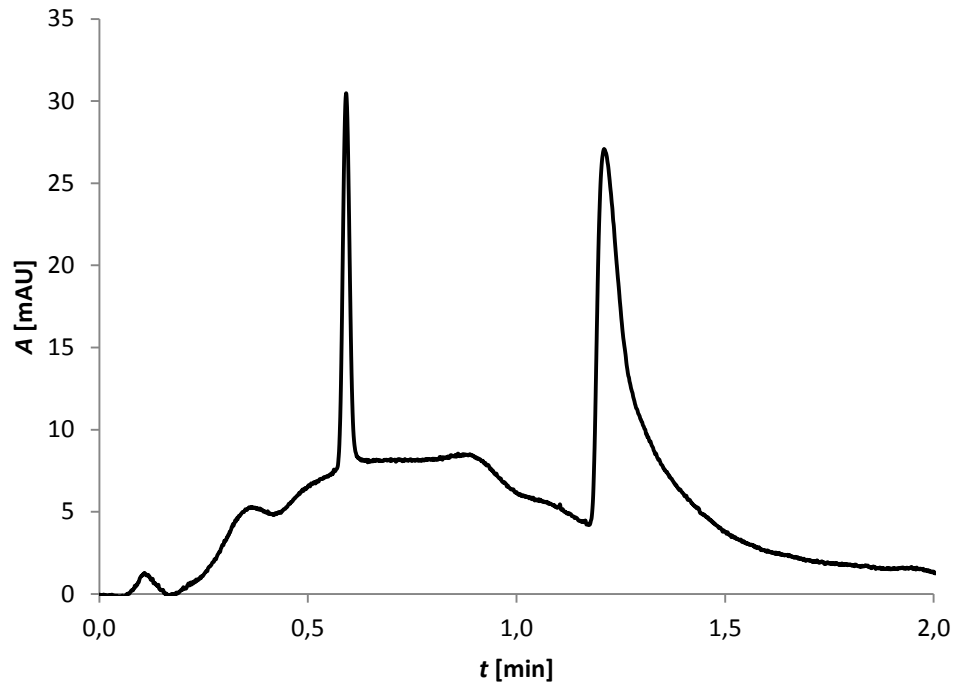
V ďalších krokoch sa postupne premerali elektroforeogramy štandardov protamínu a inzulínu. Ako prvé sa previedli separácie pri ktorých sa ako základné elektrolyty použili jednotlivé kyseliny s najvyššími koncentraciami. Koncentrácia štandardov bola 1 mg ml^{-1} , boli pripravené rozpustením v 45 mmol l^{-1} kyseliny fosforečnej. Pre jednotlivé merania sa vzalo 50 μ l inzulínového a 50 μ l protamínového štandardu. Táto zmes sa doplnila 150 mmol l^{-1} kyselinou chlórctovou na 500 μ l. Počas týchto meraní sa použilo hydrodynamické dávkovanie, aplikoval sa tlak 5 kPa po dobu 3 s. Separačné napätie sa nastavilo na 30 kV. Separácia prebehla behom 2 min, migračná doba protamínu bola asi 0,5 min, inzulínu asi 1 min. Najvyššie koncentrácie kyselín sa ukázali za nevhodné, pretože kvôli rýchlemu zahrievaniu roztoku základná línia počas separácie nebola dostatočne stabilná. Jednotlivé elektroforeogramy pre najvyššie koncentrácie použitých kyselín sú na Obr. 5, 6 a 7.



Obr. 5 Separácia štandardov inzulínu a protamínu, základný elektrolyt 150 mmol l^{-1} kyselina chlóróctová, separačné napätie 30 kV. Prvý pík patrí protamínu, druhý inzulínu. Koncentrácia protamínu a inzulínu vo vzorke $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

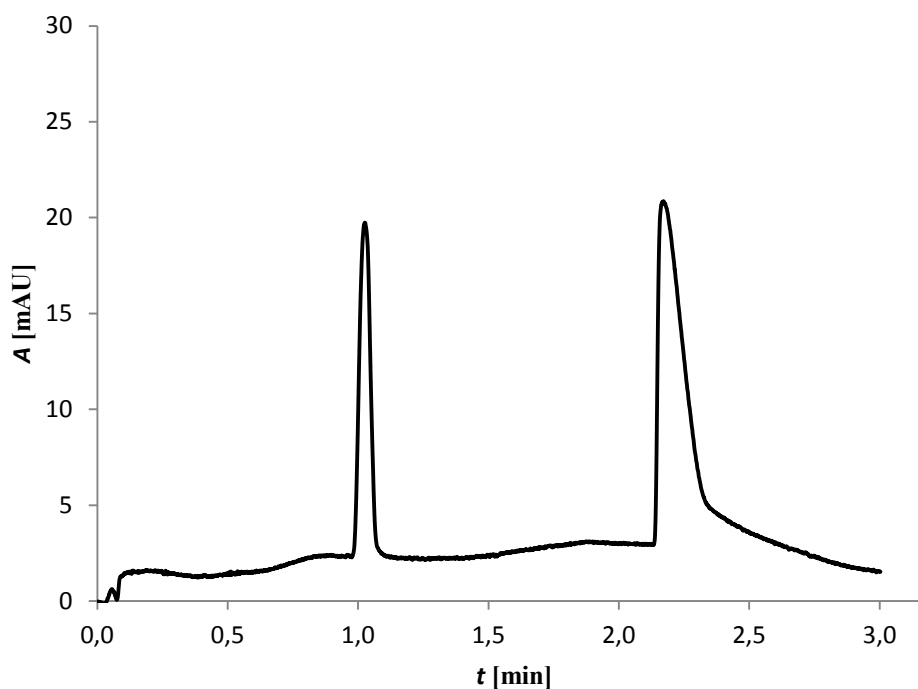


Obr. 6 Separácia štandardov inzulínu a protamínu, základný elektrolyt 45 mmol l^{-1} kyselina fosforečná, separačné napätie 30 kV. Prvý pík patrí protamínu, druhý inzulínu. Koncentrácia protamínu a inzulínu vo vzorke $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.



Obr. 7 Separácia štandardov inzulínu a protamínu, základný elektrolyt 240 mmol l^{-1} kyselina citrónová, separačné napätie 30 kV. Prvý pík patrí protamínu, druhý inzulínu. Koncentrácia protamínu a inzulínu vo vzorke $100 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Najnižšie koncentrácie sa tiež ukázali za nevhodné, pretože píky inzulínu boli nesymetrické, rozširovali sa. To bolo spôsobené vyššou hodnotou pH, čím sa zosilnila interakcia analytu so stenou kapiláry. Ako najvhodnejšia kyselina sa ukázala byť 100 mmol l^{-1} kyselina chlórctová. Pri separačnom napätí 30 kV základná línia bola nevyhovujúca, preto sa postupne vyskúšalo zníženie separačného napätia na hodnoty 25 až 15 kV. Znížením napätia sa regulovala generácia Joulovho tepla, tvar píku sa zaostřil a znížili sa nerovnosti na základnej línii. Zníženie napätia viedlo k predĺženiu doby separácie na 3 min. Vhodnými podmienkami separácie sa ukázalo byť hydrodynamické dávkovanie 5 kPa po dobu 5 s, s použitím 20 kV separačného napätia, elektroforeogram je na Obr. 8.



Obr. 8 Separácia štandardov inzulínu a protamínu, základný elektrolyt 100 mM kyselina chlórctová, separačné napätie 20 kV. Prvý pík patrí protamínu, druhý inzulínu. Koncentrácia protamínu a inzulínu vo vzorke 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Hlavným cieľom metódy je dosiahnuť symetrické tvary píkov. Čím sú píky užšie a vyššie, tým je stanovenie citlivejšie, integrácia píkov presnejšia a metóda má vyššiu účinnosť. Na porovnanie účinnosti sa porovnali počty teoretických priehradiek 45 mmol l^{-1} kyseliny fosforečnej, 150 mmol l^{-1} , 100 mmol l^{-1} a 50 mmol l^{-1} kyseliny chlórctovej. Účinnosť separácie v roztoku kyseliny fosforečnej bola vypočítaná kvôli porovnaniu s výsledkami študovanej práce [28]. Účinnosti separácie pre roztoky kyseliny chlórctovej sa vypočítali, pretože sa považovali za najvhodnejšie na separáciu analytov. Výsledky sú zhrnuté v Tab. 2. Z výsledkov je vidieť, že roztok kyseliny fosforečnej poskytuje najlepšiu účinnosť (najväčšie hodnoty teoretických priehradiek), ale kvôli nestabilnému prúdu počas separácie sa ďalej nepoužívala. Separácia v roztoku kyseliny chlórctovej s koncentráciou 150 mmol l^{-1} mala vyššiu účinnosť, ale mala nestabilnú základnú líniu, kvôli čomu bola považovaná za nevhodnú na stanovenie analytov. Z toho dôvodu bola 100 mmol l^{-1} kyselina chlórctová použitá v ďalších meraniach, ako kompromis medzi stabilnou základnou líniou a účinnosťou separácie. V Tab.2 je ďalej porovnanie mobilit analytov a elektroosmotického toku. Je vidieť, že mobilita elektroosmotického toku závisí na pH roztoku. Čím je pH roztoku väčšia, tým je väčší elektroosmotický tok. Skoro rovnaké hodnoty elektroosmotickej mobility majú roztoky 45 mmol l^{-1} kyseliny

fosforečnej (pH 1,93) a 150 mmol l⁻¹ kyseliny chlórctovej (pH 1,94). Naopak so zvyšujúcou sa pH sa znižuje mobilita analytov, pretože klesá ich náboj.

Tab. 2 Porovnanie účinností separácie v jednotlivých základných elektrolytoch, priemerná hodnota elektroosmotických a efektívnych mobilit a priemerná hodnota prúdu. V zátvorke sú uvedené hodnoty smerodajných odchýlok.

	kyselina fosforečná		kyselina chlórctová	
c [mmol l ⁻¹]	45	50	100	150
I [μA]	63	44	63	83
$N_{PROTAMÍN}$ [10 ³ priehradka/m]	35 (0,9)	24 (2,7)	24 (1,7)	29 (1,2)
$N_{INZULÍN}$ [10 ³ priehradka/m]	29 (3,2)	15 (0,2)	24 (0,8)	24 (2,3)
μ_{EOF} [10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	2,783 (0,063)	3,587 (0,014)	2,679 (0,110)	2,794 (0,170)
$\mu_{eff,PROTAMÍN}$ [10 ⁻⁸ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	4,342 (0,049)	4,164 (0,004)	4,620 (0,030)	4,766 (0,003)
$\mu_{eff,INZULÍN}$ [10 ⁻⁸ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	2,028 (0,041)	1,707 (0,021)	2,067 (0,043)	2,175 (0,048)

4.1.2 Dávkovanie vzorky

Počas meraní sa vyskúšalo tiež elektrokinetické dávkovanie. Elektrokinetické dávkovanie sa používa menej často. Pri elektrokinetickom dávkovaní sa na koniec kapiláry aplikuje napätie po dobu niekoľkých sekúnd. Výhodou elektrokinetického dávkovania je, že môže dôjsť k zakoncentrovaniu analytov, čím sa zvýši citlivosť stanovenia. K zakoncentrovaniu dochádza, ak je rozličná vodivosť vzorky a základného elektrolytu. Po nadávkovaní vzorky v kapiláre vzniknú dve zóny s rôznou elektrickou vodivosťou. Zóna vzorky má nižšiu vodivosť ako zóna základného elektrolytu. Oboma zónami musí prechádzať rovnaký elektrický prúd, preto v jednotlivých zónach bude iná hodnota intenzity elektrického pola. V oblasti s nižšou vodivosťou je intenzita pola vyššia. Dôsledkom toho sa mení rýchlosť migrácie stanovenej látky v oboch zónach, analyty v zóne vzorky migrujú rýchlejšie a zakoncentrujú sa na rozhraní oboch zón [31]. Nevýhodou je závislosť dávkovania vzorky na jej vodivosti. Zároveň elektrokinetickým

dávkovaním sa nadávkuje rôzne zloženie vzorky, elektrokinetické dávkovanie preferuje nadávkovanie katiónov, ktoré migrujú smerom ku katóde.

Postupne sa vyskúšalo elektrokinetické dávkovanie s vložení napätia 5 kV po dobu 5 až 15 sekúnd. Aby bol väčší rozdiel vo vodivostiach BGE a stanovenej látky koncentrácia kyseliny fosforečnej, v čom boli rozpustené štandardy protamínu a inzulínu, sa znížila na hodnotu $0,9 \text{ mmol l}^{-1}$. Pri aplikovaní napätia po dlhšiu dobu (10-15 s) sa píky analytov zdeformovali, doba dávkovania sa znížila na 5 s. Elektroforeogramy získané z elektrokinetického dávkovania sa nelíšili od elektroforeogramov získaných hydrodynamickým dávkovaním, kvôli čomu nie sú súčasťou tejto práce.

4.2 Kalibračné závislosti pre štandardy protamínu a inzulínu

Po optimalizácii podmienok separácie sa zmerali kalibračné závislosti ako pre hydrodynamické, tak aj pre elektrokinetické dávkovanie.

Kalibračná závislosť hydrodynamického dávkovania bola zameraná v rozsahu koncentrácií $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ až $500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Hodnota pre koncentráciu $500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ bola odstránená zo závislosti kvôli nelineárneho chovania kalibrácie. Na zostrojenie kalibračnej závislosti elektrokinetického dávkovanie sa zvolil koncentračný rozsah $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ až $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Parametry kalibračných priamok sú uvedené v Tab. 3 a 4.

Medza detekcie (LOD) sa určila ako trojnásobok, medza stanovenia (LOQ) ako desaťnásobok pomeru výšky šumu základnej línie k smernice kalibračnej závislosti z výšky píkov pre najnižšie hodnoty koncentrácie. Výška šumu sa stanovila na hodnotu $0,17 \text{ mAU}$. LOD protamínu hydrodynamickým dávkovaním sa určila na hodnotu $1,0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ na $4,0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. V prípade inzulínu sa tieto hodnoty určili na $2,0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a $5,0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Elektrokinetickým dávkovaním sa LOD protamínu a inzulínu stanovila na hodnotu $0,2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ resp. $0,7 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, LOQ na $0,7 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ resp. $1,0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Citlivosť daných metód, je možné porovnať zo získaných smerníc kalibračných priamok. Čím je väčšia hodnota smernice, tým je dané stanovenie citlivejšie. Elektrokinetické dávkovanie je menej presné, ale asi päťkrát citlivejšie, preto je ho možné použiť pre nízke koncentrácie, čo je vidieť aj na hodnotách LOD a LOQ. V prípade hydrodynamického dávkovania koeficienty determinácie (R^2) majú vyššie hodnoty ako v prípade elektrokinetického, z čoho vyplýva, že stanovenie je spoľahlivejšie. Hodnoty R^2 hydrodynamického dávkovania sú v prípade kalibračnej závislosti získanej z plôch štandardov vyššie ako $0,993$, čo ukazuje na dobrú spoľahlivosť stanovenia.

Tab. 3 Parametry kalibračných priamok z výšok píkov štandardov protamínu a inzulínu. Spočítané hodnoty LOD a LOQ. Kalibračná priamka zostavená z 14 bodov. V zátvorke sú uvedené chyby parametrov.

	Elektrokinetické dávkovanie		Hydrodynamické dávkovanie	
	PROTAMÍN	INZULÍN	PROTAMÍN	INZULÍN
k [mAU ml μg^{-1}]	2,589 (0,078)	1,203 (0,056)	0,271 (0,010)	0,182 (0,008)
q [mAU]	1,21 (0,48)	0,91 (0,34)	3,92 (1,49)	7,96 (1,11)
R^2	0,9909	0,9791	0,9830	0,9795
LOD [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	0,2	0,4	1,0	2,0
LOQ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	0,7	1,0	4,0	5,0
rozsah koncentrácií [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	1-10		10-300	

Tab. 4 Parametry kalibračných priamok z plôch píkove štandardov protamínu a inzulínu. Kalibračná priamka zostavená z 14 bodov. V zátvorke sú uvedené chyby parametrov.

	Elektrokinetické dávkovanie		Hydrodynamické dávkovanie	
	PROTAMÍN	INZULÍN	PROTAMÍN	INZULÍN
k [mAU s ml μg^{-1}]	4,387 (0,140)	3,218 (0,208)	0,308 (0,007)	0,820 (0,009)
q [mAU s]	0,55 (0,85)	- 0,67 (1,26)	0,73 (1,05)	3,51 (1,31)
R^2	0,9899	0,9599	0,9935	0,9985
rozsah koncentrácií [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	1-10		10-300	

4.3 Overenie opakovateľnosti merania štandardov protamínu a inzulínu

Za optimalizované podmienky bola zmeraná opakovateľnosť pre štandardy protamínu a inzulínu. Opakovateľnosť sa zmerala pre hodnoty koncentrácie 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v prípade hydrodynamického dávkovania a 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v prípade elektrokinetického. Každá koncentrácia bola zmeraná desaťkrát. Základný elektrolyt sa menil po troch meraniach, aby sa vymedzila možnosť chyby spôsobená elektrolýzou elektrolytu. Hodnoty relatívnych smerodajných odchýlok (RSD) plôch pri hydrodynamickom dávkovaní neprevyšujú 5,3 %, a v prípade časov 0,4 %. V prípade

elektrokinetického dávkovania sú tieto hodnoty vyššie, RSD plôch sú nižšie ako 8,2 %, v prípade časov sú nižšie ako 0,5 %. Zvýšené hodnoty RSD poukazujú na nižšiu opakovateľnosť. Pre zvolené koncentrácie sa ďalej overila správnosť stanovenia. Koncentrácie sa vypočítali z rovníc kalibračných závislostí plôch pík na koncentracii. Výsledky sú uvedené v Tab. 5 a 6. Správnosť stanovenia v prípade vzorky s koncentráciou $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ bola 105 % v prípade protamínu a 95 % v prípade inzulínu. Podobné hodnoty sú pri stanovení s koncentráciou $200 \mu\text{g ml}^{-1}$, správnosť sa pre protamín stanovil na 94 % a pre inzulín na 95 %. V prípade elektrokinetického dávkovania správnosť stanovenia pre protamín sa určil na hodnotu 83 % , pre inzulín na 75 %. S 5 % chybou stanovenia je hydrodynamické dávkovanie správnejšie.

Tab. 5 Opakovateľnosť a správnosť so štandardom protamínu a inzulínu ($n=10$). Hydrodynamické dávkovanie.

$c = 30 \mu\text{g ml}^{-1}$						
	PROTAMÍN			INZULÍN		
	Priemer	SD	RSD [%]	Priemer	SD	RSD [%]
A [mAU s]	10,5	0,6	5,3	27,1	1,0	3,7
t_{mig} [min]	0,723	0,003	0,4	1,462	0,004	0,3
c^* [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	31,5	1,8	5,7	28,7	1,2	4,2
$c = 200 \mu\text{g ml}^{-1}$						
	PROTAMÍN			INZULÍN		
	Priemer	SD	RSD [%]	Priemer	SD	RSD [%]
A [mAU s]	58,7	1,8	3,1	159,8	3,1	1,9
t_{mig} [min]	0,712	0,001	0,2	1,409	0,004	0,3
c^* [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	187,9	5,9	3,2	190,4	3,7	2,0
c^* je stanovená koncentrácia						

Tab. 6 Opakovateľnosť a správnosť so štandardom protamínu a inzulínu ($n=10$). Elektrokinetické dávkovanie.

$c = 4 \mu\text{g ml}^{-1}$						
	PROTAMÍN			INZULÍN		
	Priemer	SD	RSD [%]	Priemer	SD	RSD [%]
A [mAU s]	15,0	1,2	8,2	9,0	0,5	5,7
t_{mig} [min]	0,743	0,002	0,3	1,592	0,008	0,5
c^* [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	3,3	0,3	8,5	3,0	0,2	5,3
c^* je stanovená koncentrácia						

4.4 Overenie stanovenia s reálnou vzorkou NPH inzulínu

Po optimalizácii metódy sa pristúpilo k overeniu stanovenia na reálnej vzorke. Pretože vzorka NPH inzulínu je suspenzia rozpustná v kyslom prostredí bolo treba nájsť vhodnú koncentráciu kyseliny fosforečnej v čom sa suspenzia rozpustila. Ako vhodná koncentrácia sa ukázala byť $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$. Po rozpustení suspenzie sa získaný roztok zriedil v pomere 1:7 vodou. Meranie s touto vzorkou poskytlo dva píky. Pík inzulínu bol výrazne väčší ako pík protamínu. K tejto vzorke sa pridalo $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ štandardu protamínu. Pred prídavkom štandardu protamínu sa koncentrácia protamínu v pôvodnom roztoku určila na hodnotu $36,7 \mu\text{g ml}^{-1}$. Po prídavku sa táto hodnota sa zvýšila na $64,1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Rozdiel medzi nameranými hodnotami je $27,7 \mu\text{g ml}^{-1}$. Správnosť stanovenia sa určila 92 %. Pretože pík inzulínu bol príliš veľký, roztok sa pred pridaním prídavku musel zriediť v pomere 1:79. K takto získanému roztoku sa pridalo $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ štandardu inzulínu. Pred prídavkom štandardu inzulínu sa koncentrácia inzulínu v pôvodnom roztoku určila na hodnotu $33,3 \mu\text{g ml}^{-1}$. Po pridaní prídavku sa zvýšila na $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Rozdiel medzi nameranými hodnotami je $29,2 \mu\text{g ml}^{-1}$. Správnosť stanovenia sa určila na 97 %. Vysoké hodnoty správnosti stanovenia sú veľmi priaznivé a ukazujú, že matrica vzorky neovplyvňuje správnosť stanovenia. Na zmeranie opakovateľnosti sa muselo nájsť také riedenie vzorky, aby oba analyty boli dostatočne viditeľné a ostali v kalibračnom rozsahu. Použilo sa $83,4 \mu\text{l}$ rozpustenej suspenzie, ktorá sa doplnila vodou na objem $500 \mu\text{l}$. V Tab. 7 sú uvedené zmerané hodnoty pre opakovateľnosť s optimalizovanou koncentráciou. Nízke hodnoty RSD ukazujú, že na stanovenie nemá negatívny vplyv matrica vzorky. Hodnoty RSD plôch neprevyšujú 2,0 % a v prípade časov 0,2 %.

**Tab. 7 Zmeraná opakovateľnosť pre reálnu vzorku NPH inzulínu riedená pätnásťkrát ($n=10$).
Hydrodynamické dávkovanie.**

	PROTAMÍN			INZULÍN		
	Priemer	SD	RSD [%]	Priemer	SD	RSD [%]
A [mAU s]	5,6	0,1	2,0	190,9	0,9	0,5
t_{mig} [min]	0,7075	0,001	0,2	1,356	0,002	0,2
c^* [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	15,8	0,4	2,3	228,3	1,1	0,5
c^* je spočítaná koncentrácia						

Vzhľadom k riedeniu NPH inzulín obsahoval $236,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($SD = 5,42 \mu\text{g ml}^{-1}$) protamínu a $3424,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($SD = 17,15 \mu\text{g ml}^{-1}$) inzulínu. Podľa výrobcu reálna vzorka NPH inzulínu obsahuje $3470 \mu\text{g ml}^{-1}$ inzulínu, čo predstavuje 99 % správnosť stanovenia. Koncentrácia protamínu nie je výrobcom uvedená.

5 Záver

V rámci tejto práce bola optimalizovaná metóda stanovenia protamínu a inzulínu pomocou kapilárnej elektroforézy. Optimalizovaná metóda je schopná účinne separovať obe analyty. Protamín je možné stanoviť v rozsahu $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ až $300 \mu\text{g ml}^{-1}$, inzulín v $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ až $300 \mu\text{g ml}^{-1}$. Najnižšia koncentrácia, pri ktorej je možné protamín a inzulín spoľahlivo detegovať, je $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $2 \mu\text{g ml}^{-1}$. V prípade potreby je možné s použitím elektrokinetického dávkovania detegovať až $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ protamínu a $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ inzulínu, zároveň sa zníži opakovateľnosť merania. Pri meraní opakovateľnosti hodnoty RSD nameraných časov neprevyšujú 0,5 % a pri plochách 5,6 %. Nízke hodnoty RSD naznačujú, že optimalizovaná metóda má veľmi dobrú opakovateľnosť migračných časov a uspokojivú opakovateľnosť plôch pík. Správnosť optimalizovanej metódy bola testovaná na reálnej vzorke NPH inzulínu. Obsah inzulínu sa stanovil na $3425 \mu\text{g ml}^{-1}$ a obsah protamínu na $237 \mu\text{g ml}^{-1}$. Stanovený obsah inzulínu je veľmi podobný k hodnote uvedenej výrobcom ($3470 \mu\text{g ml}^{-1}$), obsah protamínu nie je výrobcom uvedený. Výhodou stanovenia je časová a materiálová nenáročnosť, príprava vzorky je jednoduchá a rýchla. Analýzy prebehli behom asi dvoch minút, pričom protamín bol detegovaný asi pri 0,7 min a inzulín asi pri 1,5 min. Medzi ďalšie výhody patrí vysoká stabilita prúdu a vysoká životnosť kapiláry, vďaka čomu má optimalizovaná metóda vysokú opakovateľnosť. Nevýhodou metódy je, že nie je schopná separovať jednotlivé protamínové peptidy.

6 Použitá literatura

- [1] ANDO, T.; YAMASAKI, M.; SUZUKI, K.. Protamines: Isolation· Characterization· Structure and Function. New York: Springer, 1973, 2-8.
- [2] ANFINSEN, C.B. , JR. et al. *Advances in protein chemistry* [15]. New York: Academic, 1960, 1-12.
- [3] CARR, J. A.; SILVERMAN, N. *The heparin-protamine interaction: a review*. Journal of cardiovascular surgery, 1999, 40.5: 659.
- [4] LIANG, J.F., et al. *A less toxic heparin antagonist—low molecular weight protamine*. Biochemistry (Moscow), 2003, 68.1: 116-120.
- [5] LAWRENCE, R. D.; ARCHER, N. *Zinc protamine insulin*. British medical journal, 1937, 1.3974: 487.
- [6] MIURA, T., et al. *Basic peptide protamine exerts antimicrobial activity against periodontopathic bacteria—Growth inhibition of periodontopathic bacteria by protamine*. Journal of Biomedical Science and Engineering, 2010, 3.11: 1069.
- [7] SAKAGUCHI, SHOYO. *A new method for the colorimetric determination of arginine*. The Japanese Medical Journal, 1948, 1.4: 278-281.
- [8] MACKAY, D. J.; RENAUX, B. S.; DIXON, G. H. *Rainbow trout protamines: amino acid sequences of six distinct proteins from a single testis*. Eur J Biochem, 1986, 158: 361-366.
- [9] CHAN, J. K.; THOMPSON, J. W.; GILL, T. A. *Quantitative determination of protamines by coomassie blue G assay*. Analytical biochemistry, 1995, 226.1: 191-193.
- [10] YANG, V. C., et al. *A method for the quantitation of protamine in plasma*. Thrombosis research, 1994, 74.4: 427-434.
- [11] AWOTWE-OTOO, D., et al. *Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2012, 62: 61-67.
- [12] YAO, Z., et al. *Colorimetric and fluorescent detection of protamines with an anionic polythiophene derivative*. Organic & biomolecular chemistry, 2013, 11.38: 6466-6469.
- [13] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004.
- [14] KAŠIČKA, V. *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chem. Listy, 1997, 91: 320-329.
- [15] GUO, X. F., et al. *One step physically adsorbed coating of silica capillary with excellent stability for the separation of basic proteins by capillary zone electrophoresis*. Talanta, 2015, 144: 110-114.

- [16] CORRADINI, D.; BEVILACQUA, L.; NICOLETTI, I. *Separation of basic proteins in bare fused-silica capillaries with diethylenetriamine phosphate buffer as the background electrolyte solution*. *Chromatographia*, 2005, 62: s43-s50.
- [17] WILSON, I. D., E. R. ADLARD, M. COOKE a C. F. POOLE. *Encyclopedia of separation science*. San Diego: Academic Press, c2000. 108-112
- [18] NORRMAN, M.; HUBÁLEK, F.; SCHLUCKEBIER, Gerd. *Structural characterization of insulin NPH formulations*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 30.5: 414-423.
- [19] OWENS, D.R. *Human Insulin Clinical Pharmacological Studies in Normal Man*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1986, 134-135
- [20] GUALANDI-SIGNORINI, A. M.; GIORGI, G. *Insulin formulations-a review*. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2001, 5: 73-84.
- [21] *Insulin: Relationship between tertiary and quaternary structure*. Dostupné z URL <http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/course/section11/insulin.html> [cit. 7.5.2017]
- [22] LAKHIARI, H.; MULLER, Daniel. *Insulin adsorption on coated silica based supports grafted with N-acetylglucosamine by liquid affinity chromatography*. *Journal of Chromatography B*, 2004, 808.1: 35-41
- [23] LAMALLE, C., et al. *Separation of human, bovine, and porcine insulins, three very closely related proteins, by micellar electrokinetic chromatography*. *Electrophoresis*, 2015, 36.19: 2504-2506.
- [24] HINSBERG III, W. D.; MILBY, K. H.; ZARE, R.N. *Determination of insulin in serum by enzyme immunoassay with fluorimetric detection*. *Analytical chemistry*, 1981, 53.9: 1509-1512.
- [25] RAJAN, D. S., et al. *Development of RP-HPLC for analysis of human insulin*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 2006, 68.5.
- [26] HVASS, A.; SKELBAEK-PEDERSEN, B. *Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2005, 37.3: 551-557.
- [27] LAMALLE, C., et al. *Analysis of protamine peptides in insulin pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis*. *Journal of separation science*, 2016.
- [28] MALÝ, M.; KŘÍŽEK, T. *Determination of Protamine and Insulin Using Short-End Injection Capillary Electrophoresis*. *Chromatographia*, 2016, 79.23-24: 1643-1648.
- [29] WILLIAMS, B. A.; VIGH, Gy. *Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis*. *Analytical chemistry*, 1996, 68.7: 1174-1180.
- [30] ZUSKOVÁ, I.; GAŠ, B.; UŠELOVÁ-VČELÁKOVÁ, K.: *Peakmaster 5.3* [počítačový program, dostupný z <https://web.natur.cuni.cz/gas/>]
- [31] HORÁKOVÁ, J.; MAIER, V. *On-line prekoncnetrační techniky v kapilární elektroforéze*. *Chem. Listy*, 2006, 100: 163-168.