

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA HORVAT

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA HORVAT

**VPELJAVA IZKLJUČITVENE
KROMATOGRFIJE (SEC) ZA VREDNOTENJE
PROTEINOV**

**INTRODUCTION OF SIZE EXCLUSION
CHROMATOGRAPHY (SEC) FOR EVALUATION
OF PROTEINS**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na katedri Biofarmacija s farmakokinetiko pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Robertu Roškarju za usmeritve in strokovno pomoč pri eksperimentalnem delu, prijetno delovno okolje ter pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Iskrena hvala tudi somentorju izr. prof. dr. Vojku Kmetcu za usmeritve pri eksperimentalnem delu in strokovno pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Hvala tudi vsem, ki so mi v času študija stali ob strani in mi dajali vsodbudo ter podporo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca.

Martina Horvat

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član diplomske komisije: doc. dr. Jožko Cesar

Ljubljana, 2011

VSEBINA

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 PEPTIDI IN PROTEINI	1
1.1.1 Struktura proteinov.....	1
1.1.2 Lastnosti proteinov	2
1.1.3 Vloga proteinov	3
1.1.4 Nestabilnost proteinov.....	3
1.1.4.1 Fizikalna nestabilnost proteinov	3
1.1.4.2 Kemična nestabilnost proteinov	4
1.1.5 Analitika proteinov.....	5
1.1.6 Proteini kot zdravilne učinkovine	6
1.2 INZULIN	7
1.2.1 Delovanje inzulina.....	7
1.2.2 Zgradba inzulina.....	8
1.2.3 Stabilnost inzulina	10
1.3 KROMATOGRFSKE METODE	10
1.3.1 Vrste kromatografij	11
1.3.2 Tekočinska kromatografija, HPLC	11
1.3.2.1 HPLC sistem.....	13
1.3.2.2 Reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC)..	16
1.3.3 Izključitvena kromatografija	16
1.3.3.1 Kromatografska kolona za izključitveno kromatografijo	17
1.3.3.2 Uporaba izključitvene kromatografije	18
1.3.3.3 Prednosti in slabosti izključitvene kromatografije	19
1.3.3.4 Določanje molekulske mase z izključitveno kromatografijo	19
1.3.3.5 Proteini pri izključitveni kromatografiji	20
2 NAMEN DELA	21
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 MATERIALI	22
3.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI IN TOPILA	22

3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR	23
3.2 METODE	24
3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN	24
3.2.2 PRIPRAVA VZORCEV	24
3.2.2.1 Priprava vzorcev za razvoj SEC in RP-HPLC metode.....	24
3.2.2.2 Priprava vzorcev za vrednotenje SEC in RP-HPLC metode.....	25
3.2.2.3 Priprava vzorcev za stabilnostno študijo	26
3.2.2.4 Priprava vzorcev za LC/MS analizo.....	27
3.2.3 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA MOBILNO FAZO	27
3.2.3.1 SEC metoda	27
3.2.3.2 RP-HPLC metoda	28
3.2.3.3 LC-MS metoda	28
3.2.3.4 Pregled uporabljenih mobilnih faz	29
3.2.4 KROMATOGRAFSKI POGOJI.....	29
3.2.4.1 Kromatografski pogoji pri SEC metodi.....	29
3.2.4.2 Kromatografski pogoji pri RP-HPLC metodi.....	30
3.2.4.3 Kromatografski pogoji pri LC-MS metodi.....	30
3.2.5 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE.....	30
3.2.5.1 Selektivnost	31
3.2.5.2 Linearnost	31
3.2.5.3 Točnost	31
3.2.5.4 Ponovljivost.....	32
3.2.6 DOLOČITEV VSEBNOSTI INZULINA V INZULINSKIH PRIPRAVKIH ...	32
3.2.7 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA	33
3.2.8 OBDELAVA PODATKOV	33
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1 RAZVOJ SEC METODE NA STANDARDU PROTEINOV IN ALBUMINU	35
4.1.1 VPLIV KONCENTRACIJE PUFRA.....	35
4.1.1.1 Zmes standarda proteinov.....	35
4.1.1.2 Albumin.....	36
4.1.2 VPLIV pH MOBILNE FAZE	37
4.1.2.1 Zmes standarda proteinov.....	37
4.1.2.2 Albumin.....	38

4.1.3 VPLIV DODATKA ACETONITRILA MOBILNI FAZI	39
4.1.3.1 Zmes standarda proteinov	39
4.1.3.2 Albumin	40
4.2 APLIKACIJA SEC METODE NA INZULIN	40
4.3 DOLOČITEV MOLEKULSKE MASE ALBUMINA IN INZULINA.....	46
4.4 ZAZNAVA MONOMERA, DIMERA, HEKSAMERA IN KOVALENTNEGA DIMERA INZULINA.....	47
4.5 VREDNOTENJE SEC METODE	50
4.5.1 Selektivnost	50
4.5.2 Linearnost in ponovljivost.....	51
4.5.3 Meddnevna ponovljivost	53
4.6 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA	53
4.6.1 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA PRI 50 °C.....	53
4.6.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA S STRESALNIKOM	57
4.7 VREDNOTENJE VSEBNOSTI INZULINA Z RP-HPLC	60
4.7.1 PRILAGODITEV RP-HPLC METODE ZA INZULIN	60
4.7.2 VREDNOTENJE RP-HPLC METODE	60
4.7.2.1 Selektivnost	61
4.7.2.2 Linearnost in ponovljivost	63
4.7.2.3 Meddnevna ponovljivost	64
4.7.3 DOLOČITEV VSEBNOSTI INZULINA V INZULINSKIH PRIPRAVKIH ...	64
4.8 VREDNOTENJE INZULINA Z LC-MS METODO	65
5 SKLEP	68
6 LITERATURA	70

POVZETEK

Proteini predstavljajo pomemben del terapevtskega področja za zdravljenje različnih bolezni. Specifične lastnosti proteinov zahtevajo posebno obravnavo v stabilnosti zdravil vključno z razvojem analiznih metod, ki pa je hkrati tudi svojevrstna za vsak protein posebej. Da biotehnološko pridobljen protein zadosti zahtevam regulatornih organov, mora imeti visoko stopnjo čistote, kar zagotavljajo kromatografske metode.

Izključitvena kromatografija, ki je del HPLC kromatografije, predstavlja pomemben člen pri vrednotenju proteinov. Ločevanje komponent vzorca poteka glede na njihovo obliko in velikost, in sicer tako, da majhne molekule prodirajo v pore in se dalj časa zadržijo na koloni, večje molekule pa potujejo z mobilno fazo, saj so prevelike, da bi prodirale v pore. Namen naše diplomske naloge je bil vpeljati ustrezno SEC metodo za vrednotenje in določitev proteinov. To smo dosegli na osnovi zmesi standarda proteinov in albumina, da smo spreminjali kromatografske pogoje. Izbrano metodo smo prenesli na inzulin, jo optimirali ter na osnovi umeritvene premice zmesi standarda proteinov preizkusili možnost določitve molekulske mase inzulina in albumina. V primeru albumina smo potrdili dejansko molekulsko maso.

Z različno pripravo vzorcev smo preverili možnost sočasne zaznave monomera, dimera, heksamera in kovalentnega dimera inzulina. Ugotovili smo, da je SEC metoda sposobna ločiti le kovalentni dimer ob prisotnosti inzulina.

Izbrano SEC metodo smo tudi vrednotili, in sicer s pripravo standardnih raztopin inzulina. S tem smo potrdili ustreznost delovanja aparature ter verodostojnost dobljenih rezultatov. Vrednotili in potrdili smo ustreznost naslednjih parametrov: selektivnost, linearnost, ponovljivost ter meddnevno ponovljivost.

SEC metodo smo nato aplicirali še na stabilnostno študijo inzulina. Spremljali smo stabilnost različno pripravljenih vzorcev inzulina pri povišani temperaturi in stresanju. Ugotovili smo linearen upad koncentracije inzulina in porast nastanka kovalentnega dimera inzulina s časom. Hkrati smo pri stresanju vzorcev ugotovili hiter upad vsebnosti inzulina v raztopini, ki je posledica adsorpcije na površino ovojnine.

Hkrati z vpeljavo SEC metode smo optimirali in vrednotili tudi metodo za določanje vsebnosti inzulina z RP-HPLC metodo in kasneje tudi kvantitativno ovrednotili vsebnost inzulina v komercialnem pripravku inzulina. Za identifikacijo inzulina in njegovih potencialnih agregatov smo uporabili še LC-MS metodo. Dodatno smo s to metodo primerjali in potrdili skladnost rezultatov stabilnostne študije inzulina s SEC metodo.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN – acetonitril

AK – aminokislina

AUC – površina pod krivuljo (ang. Area Under Curve)

CID – kovalentni dimer inzulina (ang. Covalent Insulin Dimer)

ESI – elektrorazprševalna ionizacija (ang. Electrospray Ionization)

FP – fosfatni pufer

HMWT – oblike inzulina višjih molekulskih mas (ang. Higher Molecular Weight Transformation products)

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)

ICH – Mednarodna konferenca o harmonizaciji (ang. International Conference on Harmonisation)

IU – mednarodna enota (ang. International Units)

LC-MS – tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo

MF – mobilna faza

MM – molekulska masa

MQ – Milli Q voda

m/z – razmerje med maso in nabojem

PAS – površinsko aktivna snov

RP-HPLC – reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

RSD – relativni standardni odklon

SD – standardni odklon

SEC – izključitvena kromatografija (ang. Size Exclusion Chromatography)

SF – stacionarna faza

t_R – retencijski čas

UV – ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 PEPTIDI IN PROTEINI

1.1.1 Struktura proteinov

Peptidi in proteini so biološki polimeri aminokislin (AK), ki se povezujejo s peptidnimi vezmi med α -karboksilno skupino prve in α -aminsko skupino naslednje aminokislina. Obstaja 20 aminokislin, ki so sestavni del proteinov. Razlika med peptidi in proteini je zgolj v številu aminokislin. Vse te aminokislina so α -aminokislina z L-konfiguracijo (le glicin nima kiralnega centra). Kljub temu da je osnovna struktura proteinskih molekul enaka – linearna veriga medsebojno povezanih aminokislin, pa so nativne konformacije zelo različne. Številne aminokislina imajo namreč poleg α -aminske in α -karboksilne skupine še potencialno reaktivne funkcionalne skupine v stranski verigi (npr. aminska, hidroksilna, gvanidinska, tiolna, karboksilna). Nepolarne skupine so usmerjene v notranjost molekule, polarne pa na zunanjo stran, saj tvorijo vodikove vezi z vodo. Značilna sestava in zaporedje AK omogočata vsakemu proteinu, da se zvije v natančno določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo potrebuje za svojo biokemijsko vlogo (1, 2).

Pri obravnavanju strukture proteinov razlikujemo glede na stopnjo kompleksnosti štiri nivoje (1, 3, 4).

Primarna struktura

Primarna struktura obsega poznavanje zaporedja aminokislin v proteinu in položaj morebitnih kovalentnih povezav stranskih verig (disulfidne vezi).

Sekundarna struktura

Sekundarna struktura prikazuje konformacije ogrodja peptidne verige. Na strukturo vpliva aminokislinsko zaporedje, povezanost stranskih verig, vodikove in disulfidne vezi. Primera ponavljajočih vzorcev sekundarne strukture sta α -vijačnica in β -struktura.

Terciarna struktura

Terciarna struktura upošteva prostorsko razporeditev stranskih verig, ki so med seboj povezane s šibkimi nekovalentnimi vezmi (vodikove vezi, hidrofobne interakcije) in

kovalentnimi disulfidnimi vezmi. Rezultat interakcij je nativna konformacija, ki je odgovorna za biološko aktivnost proteina.

Kvartarna struktura

O kvartarni strukturi govorimo, kadar proteini vsebujejo več polipeptidnih verig. Kvartarna struktura torej pomeni združitev več podenot v funkcionalen protein. Podenote se med seboj povezujejo s pomočjo šibkih nekovalentnih interakcij, kot so vodikove, ionske, van der Waalsove vezi in hidrofobne interakcije. Proteini z več podenotami imajo navadno zelo kompleksno biološko vlogo.

Kadar so proteini zgrajeni iz ene same polipeptidne verige, jih uvrščamo med monomerne proteine. Druge, kompleksnejše proteine, ki so sestavljeni iz dveh ali več polipeptidnih verig, štejemo med oligomerne proteine. Posamezno polipeptidno verigo imenujemo podenota, medtem ko celotnemu proteinu pravimo protein z več podenotami. Podenote so lahko enake ali različne, povezujejo pa jih nekovalentne interakcije. Število podenot je največkrat enako številu polipeptidnih verig, vendar so tudi izjeme (1, 2, 3).

1.1.2 Lastnosti proteinov

Fizikalne lastnosti proteinov so predvsem odvisne od narave stranskih verig na aminokislinskih ostankih. Na osnovi oblike, pa tudi topnosti, delimo proteine v dve kategoriji, in sicer na fibrilarne proteine, ki so temelj strukturne čvrstosti in trdnosti celic in organizmov ter globularne proteine, ki so topni v vodnem mediju in imajo dinamično vlogo pri transportu, imunski zaščiti, katalizi in drugih procesih.

Zaradi heterogenosti strukture je ena od pomembnih lastnosti proteinov njihova molekulska masa. To vrednost lahko zelo preprosto izračunamo iz molekulskih mas posameznih aminokislin.

Funkcionalna aktivnost proteina je v razmerah, ki vladajo v celici, zelo odvisna od tega, kako se protein zvije v točno določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo imenujemo nativna konformacija. Posledica zvitja proteina iz naključnega klobčiča (razvito stanje) v visoko organizirano strukturo je veliko znižanje konformacijske entropije zaradi zvišane entalpije. Strukturo proteinov stabilizirajo številne vodikove vezi, ki se vzpostavijo med atomi posameznih aminokislinskih ostankov ali pa med atomi aminokislinskih ostankov in vodo (3, 5, 6).

1.1.3 Vloga proteinov

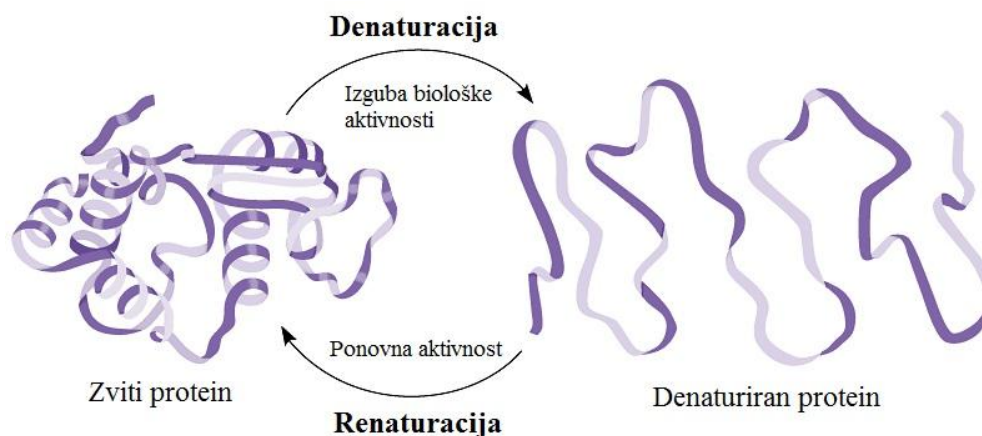
Proteini se kot skupina biomolekul odlikujejo z veliko funkcijsko raznovrstnostjo. Tako nekateri sodelujejo pri katalizi (encimi), regulaciji (hormoni, receptorji, inhibitorji), transportu, strukturi ali zaščiti (imunoglobulini). Veliko število raznovrstnih bioloških funkcij je pri proteinih posledica številnih možnih kombinacij v aminokislinski sestavi in zaporedju (1).

1.1.4 Nestabilnost proteinov

Nestabilnost proteinov je neposredno povezana z njihovo zgradbo. Nestabilnost proteina lahko vpliva na njegovo učinkovitost in imunogenost v telesu. Poznamo fizikalno in kemično nestabilnost proteinov.

1.1.4.1 Fizikalna nestabilnost proteinov

Fizikalna nestabilnost povzroča spremembe višjih nivojev molekule proteina, primarna struktura pa pri tem ostane nespremenjena. Konformacijske spremembe so posledica porušanja ravnotežja vezi v molekuli. Vsako porušenje teh interakcij pripelje do zmanjšane ali pa celo do izgube biološke aktivnosti. Ta proces destabilizacije imenujemo denaturacija (Slika 1). Na destabilizacijo proteinov vplivajo različni dejavniki, kot so temperatura, pH, mehanske sile (stresanje, strižne sile in pritisk) in kovinski ioni. Med fizikalne nestabilnosti torej prištevamo reakcije, ki ne vključujejo tvorbe ali cepitve kovalentnih vezi. K fizikalni nestabilnosti spadajo poleg denaturacije, ki je predpogoj ostalih oblik nestabilnosti, tudi agregacija, precipitacija in adsorpcija proteinov na površino.



Slika 1: Prikaz denaturacije proteina.

Agregacija je najpogostejši proces fizikalne nestabilnosti. Predpogoj tega procesa je odvitje molekule proteina. Pri tem se izpostavijo hidrofobne skupine iz notranjosti, ki so sposobne združevanja z drugimi molekulami preko hidrofobnih interakcij. Obstajajo še drugi mehanizmi agregacije (izsoljevanje). Nastanek večjih topnih agregatov je lahko odgovoren za spremembe v imunogenosti terapevtskih proteinov. Najpomembnejša posledica nestabilnosti je zmanjšanje vsebnosti terapevtskega proteina in s tem manjša učinkovitost zdravilnega pripravka.

Precipitacija je agregacija večjega števila molekul. Nastanek večjih netopnih delcev povzroči spremenjen videz pripravka – zamotnitev, sedimentacijo.

Adsorpcija proteinov na površino (npr. vsebnika, filtra) lahko zmanjša njihovo učinkovitost. To velja predvsem za pripravke z nizko koncentracijo proteinov. Tako kot agregacija je tudi adsorpcija na površino posledica hidrofobnih in elektrostatskih interakcij. Proces je odvisen od konformacije proteina, pH, ionske moči raztopine in narave površine, ki je v stiku z raztopino. Adsorpciji proteinov se lahko izognemo z uporabo snovi, ki se prednostno adsorbirajo na površine (6, 7).

1.1.4.2 Kemična nestabilnost proteinov

Kemično nestabilnost proteinov definiramo kot proces, v katerega je vpletena sprememba primarne strukture proteina. Do spremembe aminokislinskega zaporedja lahko pride zaradi tvorbe ali cepitve kovalentne vezi, posledično pa so lahko spremenjeni tudi višji strukturni nivoji. Osnovni vzrok te nestabilnosti je v lastnostih aminokislin, ki podležejo različnim kemijskim reakcijam (hidroliza, oksidacija, deamidacija, racemizacija, izomerizacija, β -eliminacija, redukcija) (4, 6) (Preglednica I).

Preglednica I: Aminokislina in njihove potencialne razgradne poti (4).

Aminokislina	Okrajšava	Potencialna razgradna pot
alanin	Ala	relativno stabilen
arginin	Arg	relativno stabilen
asparagin	Asn	deamidacija, racemizacija, izomerizacija
asparaginska kislina	Asp	hidroliza, racemizacija, izomerizacija
cistein	Cys	oksidacija, β -eliminacija, disulfidna izmenjava, racemizacija
glicin	Gly	N-terminalna lokacija pospešuje tvorbo diketopiperazina
glutamin	Gln	deamidacija, racemizacija, izomerizacija
glutaminska kislina	Glu	relativno stabilna
histidin	His	oksidacija
izolevcin	Ile	relativno stabilen

levcin	Leu	relativno stabilen
lizin	Lys	relativno stabilen
metionin	Met	oksidacija
fenilalanin	Phe	relativno stabilen
prolin	Pro	N-terminalna lokacija pospešuje tvorbo diketopiperazina
serin	Ser	β -eliminacija, racemizacija
treonin	Thr	β -eliminacija, racemizacija
triptofan	Trp	oksidacija
tirozina	Tyr	oksidacija
valin	Val	relativno stabilen

1.1.5 Analitika proteinov

Razvoj ustreznih analiznih metod je ključnega pomena pri testiranju zdravil. Izbira metod za testiranje stabilnosti proteinov v primerjavi s tradicionalnimi učinkovinami zahteva posebno obravnavo zaradi kompleksne strukture. Uporabljene analizne metode za analizo proteinov naj bi bile dovolj občutljive in selektivne, torej sposobne zaznati že majhne spremembe v stabilnosti. Omogočiti morajo tudi razlikovanje med nativnim in spremenjenim proteinom in njegovimi morebitnimi razpadnimi produkti.

Za spremljanje fizikalne in kemijske nestabilnosti obstajajo različne metode. Tako lahko pri določanju agregatov proteinov uporabimo izključitveno kromatografijo ali termične metode, pri hidrolizi proteinov HPLC, peptidno mapiranje ali SDS-PAGE, pri deamidaciji, oksidaciji in ostalih oblikah kemijske nestabilnosti pa HPLC, kapilarno elektroforezo, masno spektrometrijo in cirkularni dihroizem (1, 5).

Specifične lastnosti proteinov zahtevajo posebno obravnavo v stabilnostnih študijah, ki pa je hkrati tudi svojevrstna za vsak protein posebej. Biološka aktivnost proteina je ključna za njegovo delovanje, zato je testiranje te z ustreznim testom nujno potrebno za zagotavljanje kakovosti produkta. Za kontrolo kakovosti so bile vpeljane ICH smernice Q5, ki podajajo splošen okvir za testiranje stabilnosti. V primeru biotehnoloških produktov je potrebno zaradi obsežnejšega in bolj problematičnega ugotavljanja nestabilnosti proteinov uvesti ustrezen stabilnostno indikativen profil, ki zagotavlja detekcijo sprememb v lastnostih. Ta zajema ugotavljanja sprememb v identiteti, čistosti, vsebnosti, biološki aktivnosti in imunokemijskih lastnostih (1, 3, 6, 8).

1.1.6 Proteini kot zdravilne učinkovine

Zaradi hitrega razvoja molekularne biologije, tehnologije rekombinantne DNA in farmacevtske kemije dobivajo biotehnoško pridobljene molekule vedno večji pomen. Posledično se je tudi povečala proizvodnja proteinov za terapevtske in diagnostične namene. Danes je še vedno nekaj proteinskih učinkovin izoliranih iz plazme, večina pa je rekombinantnih proteinov. Terapevtski proteini vključujejo naravno prisotne človeške proteine (predvsem plazemski proteini), rekombinantne kopije naravno prisotnih proteinov, monoklonska protitelesa in mutirane ali modificirane različice naravno prisotnih proteinov, ki so učinkovitejše, manj toksične ali s spremenjeno funkcijo. Terapevtske proteine lahko razvrstimo na hormone (npr. inzulin, eritropoetin), encime (npr. alfa dornaza), citokine (npr. interferoni), cepiva in monoklonska protitelesa (7, 9).

Obstajajo pa tudi omejitve pri uporabi terapevtskih proteinov. Problem je v tem, da s peroralno aplikacijo proteinov ne moremo doseči visokih in konstantnih koncentracij na mestu delovanja, prav tako pa proteini zaradi kompleksne strukture predstavljajo skupino nestabilnih učinkovin.

Biološko uporabnost peptidov omejujejo:

- slaba prehodnost bioloških membran (velikost molekul),
- kislinsko in encimsko (proteaze, peptidaze) katalizirana razgradnja v želodcu in prebavnem traktu,
- metabolizem prvega prehoda skozi jetra in
- fizikalna nestabilnost (adsorpcija na površine, nastanek agregatov).

Zato je proteine potrebno aplicirati parenteralno, pogosto in v visokih odmerkih, saj le majhen delež doseže mesto delovanja. Hkrati se proteini pred uporabo največkrat shranjujejo v obliki raztopin, kar lahko še dodatno poveča njihovo nestabilnost. Alternativni načini aplikacije za sistemsko uporabo so nazalna, pulmonalna, rektalna, transdermalna in sublingvalna aplikacija. Tako se v primerjavi s peroralno aplikacijo izognemo metabolizmu prvega prehoda in tudi zmanjšamo verjetnost proteoliznega razkroja (10).

1.2 INZULIN

1.2.1 Delovanje inzulina

Inzulin je človeški hormon, ki v telesu uravnava anabolno metabolne poti ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob. V telesu ga tvorijo celice beta Langerhansovih otočkov v trebušni slinavki, ki ga izločajo v krvni obtok. Sinteza proteina v celicah se začne s preproinzulinom preko proinzulina v inzulin, ki se skladišči v sekretornih celicah in se ob ustreznem dražljaju sprosti iz njih. Nastali inzulin je povezan z disulfidnimi mostovi. Če se te vezi reducirajo, postane inzulin neaktiven. Najpomembnejšo vlogo pri uravnavanju izločanja inzulina ima koncentracija glukoze v krvi. Za delovanje inzulina v obtoku je potreben receptor za inzulin.

Ob pomanjkanju učinkov inzulina se pojavi hiperglikemija, zato predstavlja inzulin ključno zdravilo pri zdravljenju nekaterih oblik sladkorne bolezni. Ljudje s sladkorno boleznijo tipa I ne proizvedejo dovolj inzulina, zato so odvisni od zunanjega inzulina. Nasprotno ljudje s sladkorno boleznijo tipa II niso odvisni od inzulina, vendar sčasoma lahko tudi pri njih pride do pomanjkanja inzulina, zato ga morajo za ohranjanje normalnega nivoja glukoze nadomestiti od zunaj. Inzulin je poleg tega potreben še med zmanjšano toleranco na glukozo med nosečnostjo ali pri sladkorni bolezni nastali zaradi drugih bolezni (bolezni trebušne slinavke, sladkorna bolezen izzvana z zdravili ali kemikalijami, genetski sindromi, okvare receptorja za inzulin). Zdravljenje z insulinom začnemo takrat, ko nefarmakološki ukrepi skupaj z najvišjimi odmerki peroralnih antidiabetikov ne zadoščajo za vzdrževanje ciljne ravni urejenosti glikemije. V vsakem primeru se inzulin odmerja individualno glede na potrebe bolnika, njegovo prehrano in življenjske navade.

Inzulin za zdravljenje so včasih pridobivali iz prašičje ali goveje trebušne slinavke, danes pa ga večinoma izdelujejo humanega z rekombinantno tehnologijo DNA, kemijsko modifikacijo živalskega inzulina ali pa naredijo njegove analoge s spreminjanjem aminokislinskega zaporedja molekule inzulina. Poznamo kratko, srednje in dolgodelujoče oblike inzulina. Navadni inzulin je kratkodelujoč. Srednje in dolgodelujoči insulini imajo dodan cink ali proteine (protamin) (7, 11, 12). Pregled pripravkov inzulina na tržišču predstavlja Preglednica II. (7)

Preglednica II: Pregled pripravkov inzulina.

Učinkovina	Zdravilo	Farmacevtska oblika
Hitro delujoči inzulini		
inzulin glulizin	Apidra [®]	raztopina za injiciranje
inzulin lispro	Humalog [®] , Liprolog [®] ,	raztopina za injiciranje
inzulin aspart	NovoLog [®] , NovoRapid [®]	raztopina za injiciranje
Navadni inzulini		
humani inzulin	Humulin R [®] , Novolin R [®] , Actrapid [®] ,	raztopina za injiciranje
Srednje delujoči inzulin		
humani inzulin NPH	Humulin N [®] , Novolin N [®]	suspenzija za injiciranje
humani inzulin lente	Humulin L [®] , Novolin L [®]	suspenzija za injiciranje
Dolgo delujoči inzulini		
humani inzulin ultralente	Humulin U [®] , Insulatard [®]	suspenzija za injiciranje
humani inzulin NPH	Protaphane [®]	suspenzija za injiciranje
inzulin detemir	Levemir [®]	suspenzija za injiciranje
inzulin glagarin	Lantus [®]	suspenzija za injiciranje
Zmesi inzulinov		
lispro/lispro-protamin	Humalog Mix [®] , Liprolog Mix [®]	suspenzija za injiciranje
aspart/aspart-protamin	NovoMix [®]	suspenzija za injiciranje
humani inzulin/inzulin-protamin	Mixtard [®] , Actraphane [®] , Isuman Comb [®]	suspenzija za injiciranje

1.2.2 Zgradba inzulina

Molekula inzulina je sestavljena iz 51 aminokislin, nanizanih v dveh verigah (A in B), ki sta med seboj povezani z dvema disulfidnima vezema (Slika 2). Tretja disulfidna vez je znotraj verige A. Prašičji in goveji inzulin se ločita od humanega po zamenjavi treonina z alaninom na mestu B30 ter v primeru govejega inzulina še dodatno z zamenjavo treonina z alaninom na mestu A8 in izolevcina z valinom na mestu A10. Lega znotrajmolekulskih vezi je pri vseh sesalskih inzulinih ohranjena. Pri vseh inzulinskih oblikah so kljub različnim primarnim zaporedjem ohranjeni hidrofobno jedro in posamezne aminokislone, ki so nujne za primarno zvijanje proteina. Površino inzulinskega monomera tvorijo polarne in nepolarne molekule (7, 11).

1.2.3 Stabilnost inzulina

Povišana temperatura shranjevanja inzulina po določenem času privede do preoblikovanja inzulina v kovalentni dimer inzulina (CID), možen pa je tudi nastanek oblik inzulina višjih molekulskih mas (HMWT) (16).

Shranjevanje inzulina pri 50 °C več tednov brez stresanja pospeši nastanek kovalentnega dimera inzulina, medtem ko shranjevanje pri 50 °C s sočasnim stresanjem privede do hitrejšega nastanka kovalentnega dimera inzulina, in sicer se ta pojavi že v 7-10 dnevih. Sočasno začnejo pri stresanju nastajati tudi oblike inzulina višjih molekulskih mas (HMWT). Ti rezultati so pričakovani, saj pod stalnim stresanjem inzulini tvorijo kovalentne polimere.

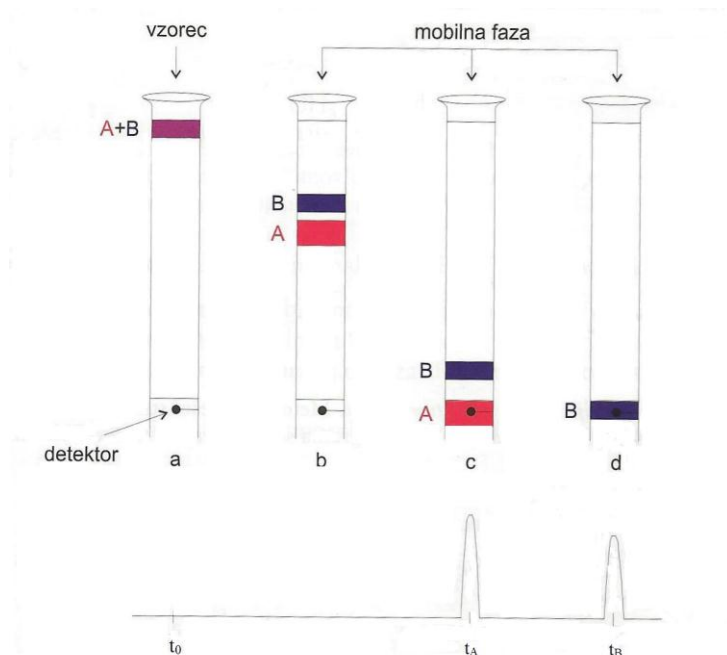
Na vrsto nastanka HMWT ima vrsta inzulina le malo vpliva, lahko pa na to vplivata oblika in sestava pripravka. Temperatura ima izrazit učinek na nastanek CID in še posebej na nastanek kovalentnih oligo- in polimerov HMWT (17, 18, 19, 20).

1.3 KROMATOGRFSKE METODE

Specifične lastnosti proteinov zahtevajo posebno obravnavo vključno z razvojem analiznih metod, ki je svojevrstna za vsak protein posebej. Danes so kromatografske metode najpogosteje uporabljane separacijske metode, ki omogočajo analizo, izolacijo in čiščenje tovrstnih vzorcev. Temeljijo na ločitvi posameznih komponent v vzorcu, ki poteka na osnovi porazdelitve med mobilno (MF) in stacionarno (SF) fazo zaradi različnih fizikalno-kemičnih lastnosti. Tok mobilne faze nosi molekule vzorca skozi stacionarno fazo, pri čemer se te ločujejo zaradi različnih fizikalnih interakcij s stacionarno oziroma mobilno fazo. Pri kromatografiji izkoriščamo molekulsko maso, obliko, hidrofilnost oziroma lipofilnost molekul ter njihovo specifično afiniteto do drugih snovi. Kombinacije stacionarne in mobilne faze glede na njuno sestavo in agregatno stanje so lahko različne. Doseči želimo čim boljše separacijo v čim krajšem času, kar naredimo z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema (21, 22).

Princip ločevanja komponent vzorca prikazuje Slika 3. Vzorec sestavljen iz komponente A in B nanese na kolono. Mobilna faza, ki konstantno prehaja skozi kolono, potiska komponente vzorca vzdolž stacionarne faze. Zaradi različne afinitete komponent A in B do stacionarne oz. mobilne faze pride do ločitve – najprej se eluira komponenta (A) z manjšo afiniteto do stacionarne faze, nato pa še komponenta (B) z večjo afiniteto do stacionarne faze.

Signal iz detektorja zaznamo kot dva kromatografska vrhova s pripadajočima retencijskima časoma (t_A in t_B) (7).



Slika 3: Potek ločitve vzorca, ki vsebuje komponenti A in B, ter signal na detektorju.

1.3.1 Vrste kromatografij

V osnovi je izvedba kromatografij planarna ali kolonska. Pri planarni kromatografiji je stacionarna faza nanescena na plošče iz stekla, plastike, aluminijeve folije (prekrite s tanko plastjo adsorpcijskega materiala) ali pa v pore na papirju. Pri kolonski kromatografiji pa se stacionarna faza nahaja v ozkih kolonah, skozi katere potuje mobilna faza. Danes se nekatere kromatografije praktično ne uporabljajo več (npr. papirna kromatografija), druge pa so dosegle izreden razvoj, kar velja zlasti za nekatere oblike tekočinske kromatografije (HPLC). Te vedno bolj izpopolnjene oblike kromatografij temeljijo na izredno mehansko odpornih nosilcih ali na nosilcih, ki specifično vežejo določene snovi. Glede na vrsto mobilne faze razdelimo kolonsko kromatografske metode v tri osnovne skupine: tekočinsko, plinsko in kromatografijo superkritičnih plinov (7, 22).

1.3.2 Tekočinska kromatografija, HPLC

Tekočinska kromatografija, predvsem tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), je najpogosteje in najširše uporabljana kromatografska metoda. Ločitev komponent poteka pod

visokim tlakom, s čimer zagotovimo enakomeren pretok. Za to tehniko je značilna hitra in dobra ločljivost ter občutljivost. Lahko jo uporabljamo za določevanje termolabilnih snovi, zelo polarnih snovi ter spojin z majhno, kakor tudi z veliko molekulsko maso. Glede na mehanizem ločevanja komponent v vzorcu jo razdelimo na adsorpcijsko, porazdelitveno, izključitveno, ionsko izmenjevalno in afinitetno kromatografijo (Preglednica III) (7, 21, 23).

Preglednica III: Razdelitev metod HPLC kromatografije glede na naravo interakcije med stacionarno fazo in komponentami vzorca (7).

Vrsta kromatografije	Princip ločevanja
Adsorpcijska kromatografija	Snovi se razlikujejo po moči adsorpcije (npr. hidrofobne in hidrofilne interakcije) na stacionarno fazo.
Porazdelitvena kromatografija	Na osnovi razlik v topnosti – porazdelitvi med stacionarno in mobilno fazo.
Ionsko izmenjevalna kromatografija	Na osnovi različnih elektrostatskih interakcij med molekulami v mobilni fazi in nabitimi skupinami stacionarne faze.
Izključitvena kromatografija (SEC)	Na osnovi razlik v velikosti in obliki molekul.
Afinitetna kromatografija	Razlike v afiniteti do liganda, ki je kot stacionarna faza imobiliziran na nosilcu.

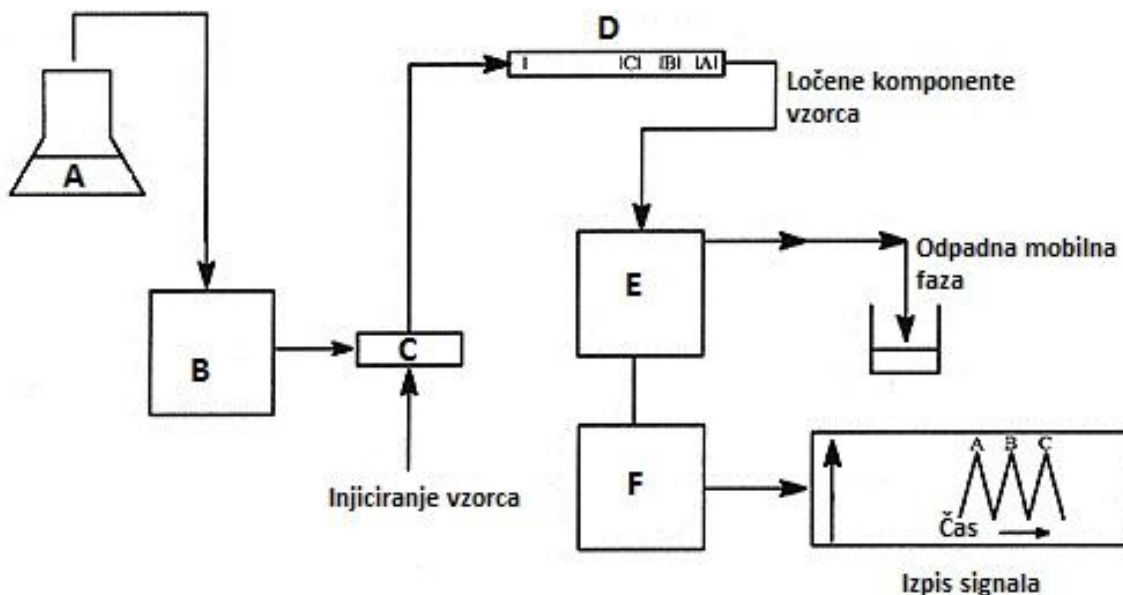
Kromatografske metode izberemo glede na naravo snovi, ki jo želimo iz kompleksne mešanice očistiti oziroma kvantificirati. Tako npr. za majhne in manj polarne molekule uporabljamo metodo, ki snovi ločuje na osnovi topnosti (npr. adsorpcijska ali porazdelitvena kromatografija), za večje molekule (npr. proteine) pa izberemo ločevanje na osnovi naboja (ionsko izmenjevalna), velikosti (izključitvena) ali afinitete do neke druge snovi (afinitetna).

HPLC se v glavnem uporablja kot porazdelitvena ali ionsko-izmenjevalna kromatografija za ločevanje različnih molekul. Danes so na trgu nosilci, narejeni na osnovi gelov ali delcev z dovolj velikimi porami, a hkrati tudi z dovolj veliko odpornostjo, ki omogočajo tudi ločevanje makromolekul. Prednosti analitskih in ločitvenih tehnik HPLC pred klasično kromatografijo so večja sposobnost separacije, kratki časi ločbe, dobra ponovljivost in visoka občutljivost detekcije (21, 23).

1.3.2.1 HPLC sistem

Osnovna oprema za HPLC je sestavljena iz več komponent (Slika 4):

- rezervoar z mobilno fazo,
- razplinjevalec mobilne faze,
- sistem za injiciranje (vzorec injicira na kromatografsko kolono),
- termostatirana komora s kromatografsko kolono (v njej poteka ločevanje komponent vzorca),
- črpalka (pod tlakom poganja mobilno fazo skozi sistem),
- rezervoar za odpadna topila,
- detektor (zazna komponente vzorca) in
- programska oprema za obdelavo podatkov (23, 24).



Slika 4: Sestava HPLC sistema; A: mobilna faza, B: črpalka, C: injektor, D: kromatografska kolona, E: detektor, F: računalnik.

Rezervoar z mobilno fazo in razplinjevalec

Mobilne faze za HPLC ponavadi shranjujemo v steklenih vsebnikih, ki morajo biti zaprti, da iz njih ne izhajajo hlapi topila, hkrati pa ne smejo popolnoma tesniti, saj bi drugače prišlo do nastanka podtlaka. Prisotnost raztopljenih plinov iz ozračja (N_2 , O_2 , CO_2) v mobilni fazi lahko vpliva na separacijo, saj pride do nastanka mehurčkov, ki spremenijo konstanten pretok mobilne faze ali motijo samo detekcijo analitov. Temu se izognemo, da pred uporabo damo MF v ultrazvočno kadičko in jo razplinimo. Razplinjenje je možno izvesti tudi s podtlakom, prepihanjem z inertnimi plini (npr. He), difuzijo ali online razplinjevalcem (21, 25).

Črpalka

Osnova vsakega HPLC-sistema je črpalka, ki poganja mobilno fazo skozi celoten sistem. Zagotavljati mora enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Pri analitskem delu mora zadoščati zahtevam po brezpulznem delovanju, konstantnem pretoku in ponovljivosti pretoka. Črpanje mobilne faze na kolono je lahko izokratsko, kar pomeni, da črpa na kolono mobilno fazo s konstantnim razmerjem topil, ali pa gradientno, kar dosežemo s poljubnim spreminjanjem razmerij med različnimi topili (21, 22).

Injektor

Vzorec vbrizgamo na kolono preko posebne zanke z iglo (injektor). Injektor mora omogočati dobro ponovljivost injiciranja med posameznimi doziranjmi in čim manjšo kontaminacijo med zaporednimi vzorci. Omogočati mora tudi injiciranje različnih volumnov in s tem tudi različnih vsebnosti vzorcev. Danes se uporabljajo injektorji z dozirno zanko, ki omogočajo doziranje poljubnega ali točno določenega volumna vzorca. Volumen takšnih zank je od 1 do 100 μL za analitsko delo in od 100 μL do nekaj mL za preparativno delo. Vzorce lahko injiciramo ročno (dozirna igla ali brizga) ali z avtomatskim injektorjem, ki omogoča tudi boljšo ponovljivost injiciranja (23).

Kolona

Kromatografska kolona je cevka dolžine 3-30 cm, ki predstavlja bistveni del HPLC sistema, saj na njej poteka separacija komponent vzorca. Zaradi notranjih pritiskov morajo biti kolone mehansko odporne in so zato narejene iz nerjavečega jekla. Uporabljamo kolone z različnimi notranjimi premeri, različnih proizvajalcev in z različno velikostjo delcev SF. Analitske HPLC-kolone so relativno majhnih dimenzij, večinoma od 5 do 25 cm z notranjim premerom med 0,2 in 0,4 cm. Semi-preparativne kolone so nekoliko debelejše in z notranjim premerom med 1 in 2,5 cm. Za ločevanje sta pomembni velikost delcev SF in dolžina kolone, ki odreja število teoretičnih porazdelitvenih podov v koloni. Zaradi velikega števila teoretičnih podov v HPLC-kolonah, je resolucija molekul v takih kolonah večja.

Z uporabo predkolone preprečujemo kontaminacijo kolone z mehanskimi in kemijskimi primesmi iz MF in vzorca ter tako podaljšujemo življenjsko dobo kolone. Pri izrabljeni koloni lahko namreč opazimo padec ločljivosti, posedanje kolone in povišan pritisk v njej. Temu se z menjavo predkolone izognemo. Danes za analizo uporabljamo termostahirane predkolone in kolone, saj kontrola temperature poveča kvaliteto separacije in ponovljivost analize (21, 22, 23).

Nosilci (stacionarna faza), ki se uporabljajo v HPLC-kolonah, so ponavadi narejeni na osnovi silikagela. Večino nosilcev je pripravljena s kemično modifikacijo, s čemer dobimo različne oblike stacionarne faze (normalnofazna – polarna SF, reverznofazna – nepolarna SF ali nosilci, ki delujejo kot ionski izmenjevalci). Silikagel spremenimo tako, da na silanolne skupine ($\equiv\text{Si-OH}$) vežemo različno dolge alifatske verige na te pa še dodatno fenilne, ciano in nitro skupine, ki dajejo nosilcu bolj ali manj nepolaren značaj. Lahko pa vežemo tudi skupine kot so amino, dimetilamino, sulfonska in kvartarna amonijeva skupina, ki delujejo kot ionski izmenjevalci. Delci, ki sestavljajo nosilec, so lahko sferični ali nepravilnih oblik in imajo večinoma velikost od 3 do 10 Å s porami, velikimi od 5 do 400 Å. Nosilci s porami velikosti od 300 do 400 Å se uporabljajo za ločevanje bioloških makromolekul (polipeptidov in proteinov). Taki nosilci nam služijo kot reverzna faza za ločevanje velikih molekul ali za ločevanje molekul na osnovi različnih molekulskih mas (SEC, size exclusion chromatography) (21).

Detektor

Detektor je odgovoren za zaznavo posamezne komponente vzorca, ki pride po ločitvi iz kolone. Detektor meri spremembo določene fizikalne količine (absorbanca, masa, volumen, sipanje svetlobe), ki jo povzroči prehod snovi skozi merilno pretočno celico detektorja. Pri HPLC metodi je zelo pomembna sposobnost detektorja za določevanje koncentracije ločene komponente vzorca. Najpogosteje uporabljamo UV-VIS spektrofotometre in detektorje z nizom diod (DAD), lahko pa uporabljamo tudi druge detektorje: fluorescenčni, elektrokemični, radioaktivni, masni detektor, kar je odvisno od samih lastnosti molekul v vzorcu. Detektor mora biti občutljiv, stabilen skozi čas in zmožen filtrirati večino šumov. Večino HPLC-sistemov krmili računalnik, preko katerega uravnavamo vse parametre. Z njegovo pomočjo tudi ovrednotimo rezultate in optimiziramo metodo ločevanja snovi.

Ob ustrezni izbiri metode so analiti vzorca primerno ločeni ter ozkih in simetričnih vrhov. Položaj posameznega vrha opredeljujejo retencijski ali zadrževalni časi, ki nam povedo, koliko časa se je neka snov v koloni zadržala in kakšne so razmere, pri katerih se snov spere iz kolone. Če HPLC deluje pravilno in ponovljivo, morajo biti retencijski časi v enakih kromatografskih pogojih za isto snov vedno enaki ali vsaj zelo podobni. Za nek analit lahko predvidevamo, da je ustrezne čistote takrat, kadar ni prisotnih drugih kromatografskih vrhov. Vrh mora biti simetričen in dobro ločen od ostalih komponent v vzorcu. V nasprotnem primeru je potrebna ustrezna sprememba metode (kolone, mobilne faze, temperature, količine nanosa) (23, 25).

1.3.2.2 Reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC)

Ta vrsta kromatografije danes predstavlja nepogrešljivo opremo vsakega analiznega laboratorija. Stacionarno fazo predstavljajo zaetrene silanolne skupine slikagelnih delcev, kot mobilno fazo pa najpogosteje uporabljamo vodne raztopine v kombinaciji z metanolom, acetonitrilom ali/in tetrahidrofuranom. Ločevanje komponent vzorca se odvija zaradi porazdeljevana molekul med stacionarno in mobilno fazo, pri čemer se bolj polarne molekule iz kolone eluirajo prej, manj polarne pa se v večji meri porazdeljujejo v stacionarno fazo, zato je njihov retencijski čas daljši. Ločitev komponent poteka na osnovi moči in selektivnosti topila, nanjo pa lahko vplivata temperatura kolone in pH. Za detekcijo spojin največkrat uporabljamo UV detektor (21).

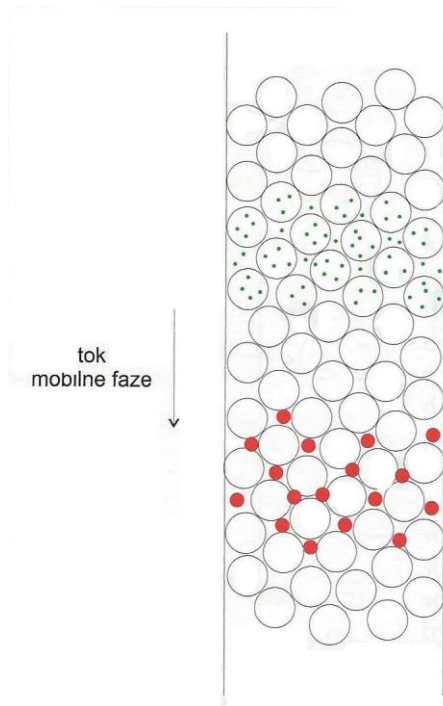
Mobilna faza, ki jo uporabljamo pri reverzni HPLC (RP-HPLC), je sestavljena iz mešanice vode in organskega topila. Čas, ki je potreben za elucijo določene snovi iz kolone, je v veliki meri odvisen od razmerja med obema komponentama v mobilni fazi. Bolj polarni vzorci potrebujejo proporcionalno manjši odstotek organskega topila za elucijo iz kolone. V praksi navadno uporabljamo mešanice acetonitrila in vode ali metanola in vode. Pri ionskih izmenjevalcih eluiramo snovi iz kolone s spremembo pH ali ionske jakosti mobilne faze (24).

1.3.3 Izključitvena kromatografija

Izključitvena kromatografija je najnovejša od tekočinskih kromatografskih metod. Je metoda, ki se uporablja pri ločevanju molekul z višjo molekulsko maso. Ločitev komponent vzorca poteka na osnovi njihove velikosti oziroma oblike. Kromatografska kolona je napolnjena s stacionarno fazo, ki jo predstavljajo porozni delci silikagela ali polimerov (agaroze, dekstrana, poliakrilamida ali polistirena). Ko vanjo injiciramo vzorec, začnejo molekule zaradi toka mobilne faze difundirati v pore stacionarne faze in izmenjevati svoj položaj med topilom v mobilni fazi in topilom, ki se nahaja v porah. Največje molekule potujejo najhitreje, saj se lahko gibljejo le med delci stacionarne faze, ne morejo pa difundirati vanje in se sperejo s kolone s prostim volumnom, tj. volumnom mobilne faze med gelskimi kroglicami. Manjše molekule na svoji poti vzdolž kolone zahajajo v pore, se v njih nekaj časa zadržujejo in nato oddifundirajo v mobilno fazo. Njihov elucijski volumen je zato večji. Čim manjše so molekule, tem večji del por jim je na voljo in počasnejše bo potovanje. Velikost por stacionarne faze določa obseg velikosti molekul, ki se bodo lahko med seboj ločile.

Izključitvena kromatografija se razlikuje od ostalih kromatografskih metod v tem, da ni kemičnih ali fizikalnih interakcij med analitom in stacionarno fazo (21, 25).

Ločevanje molekul z izključitveno kromatografijo prikazuje Slika 5. Velike molekule potujejo skozi kolono hitreje, saj zaradi svoje velikosti ne morejo difundirati v pore (7).



Slika 5: Princip ločevanja molekul vzorca z izključitveno kromatografijo (majhne molekule prodirajo v pore in se zadržijo nekaj časa v njih, večje molekule pa potujejo z mobilno fazo).

1.3.3.1 Kromatografska kolona za izključitveno kromatografijo

Kromatografska kolona za izključitveno kromatografijo je lahko hidrofilna ali hidrofobna. Kromatografijo, ki temelji na hidrofilnih kolonah imenujemo tudi gelska filtracija (GFC, gel filtration) in se uporablja za ločevanje polarnih vzorcev, medtem ko kromatografijo, ki temelji na hidrofobni koloni in jo uporabljamo za ločevanje nepolarnih vzorcev imenujemo gelska permeacijska kromatografija (GPC, gel permeation). Za obe vrsti kolon so možne različne dimenzije por za ločevanje velikosti molekul, in sicer od nekaj sto, do več milijonov Da (6, 7). Kolone za izključitveno kromatografijo so ponavadi dolge 25-60 cm, njihov premer pa je od 0,45-1 cm. Polnjene so s silikagelnimi ali polimernimi delci premera 15 μm ali manj. Ponavadi so boljše kolone na silikagelski osnovi, saj dobimo rezultate z boljšo ločljivostjo. To je posledica boljše razporeditve velikosti por in tudi obseg por je širši kot pri kolonah, ki temeljijo na polimerih. Pretok mobilne faze v koloni je ponavadi 1 ml/min, čas analize pa manj kot 20 minut (21, 24).

Pri izključitveni kromatografiji so zelo pomembni parametri kolone. Vsaka kolona mora imeti opredeljen celotni (totalni) volumen (V_t ; volumen mobilne in stacionarne faze), prosti volumen (V_0 ; volumen mobilne faze med gelskimi delci), volumen delcev gela (V_x ; volumen

stacionarne faze) in elucijski volumen (V_e ; volumen MF, ki je potreben, da se neka snov spere iz kolone). Slednji je značilen za vsako snov in ga določimo eksperimentalno. Iz znanih volumnov lahko izračunamo porazdelitveni koeficient za neko molekulo, K :

$$K = (V_e - V_0) / V_x \quad (\text{Enačba 1})$$

Stacionarna faza mora biti inertna do mobilne faze, prav tako pa ne sme reagirati z vzorcem, ki ga ločujemo. Mora biti nenabita in kemično ter bakteriološko stabilna.

Proizvajalec ponavadi navede naslednje parametre, ki opredelijo posamezno stacionarno fazo:

- delovno območje, ki nam pove razpon molekulskih mas, ki jih stacionarna faza uspešno ločuje,
- mejno velikost analitov, ki definira zgornjo mejo delovnega območja. Vse večje molekule se sperejo s prostim volumenom,
- kapaciteto, ki je podana s količino (g) določene molekule, ki lahko penetrira v pore gela. Kapaciteta je lahko podana glede na težo suhega ali nabrekli gela,
- gradacijo, ki nam pove kakšna je velikost posameznih delcev (grobi, srednji, fini zelo fini). Bolj ko so delci majhni in je manjši pretok, boljša je ločljivost,
- privzem vode, ki nam pove, koliko časa je potrebnega, da gel pri določeni temperaturi popolnoma nabrekne (25).

1.3.3.2 Uporaba izključitvene kromatografije

Pogosto izključitveno kromatografijo uporabljamo na laboratorijskem nivoju, in sicer v analitske namene in v zadnjih korakih čiščenja vzorca. Uporabljamo jo za:

- ločitev molekul različnih velikosti,
- razsoljevanje vzorcev, ki temelji na veliki razliki v molekularni masi med molekulami analitov,
- določevanje molekulske mase,
- določevanje porazdelitve velikosti molekul analita,
- izmenjavo pufrov,
- spremljanje stabilnosti nastanka agregatov,
- frakcioniranje,
- ločevanje celic in subceličnih delcev in
- ločevanje detergentov od proteinov (21, 24).

1.3.3.3 Prednosti in slabosti izključitvene kromatografije

Izključitvena kromatografija ima pred drugimi kromatografskimi tehnikami vrsto prednosti. Lahko jo uporabljamo za ločevanje vseh vrst molekul, ki se razlikujejo po molekularni masi, ne glede na ionsko sestavo, pH in mobilno fazo. Ker pri izključitveni kromatografiji praktično ne prihaja do kemijskih interakcij z nosilcem, lahko ločujemo tudi zelo nestabilne snovi, saj potovanje vzorca skozi kolono ne spremeni njihove strukture. Difuzija je zanemarljiva, zato so vrhovi kromatograma razmeroma ostri, elucijski volumen pa je proporcionalen logaritmu molekularne mase eluirane snovi. Razvoj SEC metode je v primerjavi z ostalimi HPLC metodami enostaven, saj ločevanje analitov ne temelji na interakcijah s stacionarno fazo. Tako moramo za ustreznost metode preveriti le nekaj parametrov, ki vplivajo na ločljivost (21, 23).

Slabost izključitvene kromatografije je v tem, da moramo poznati približno obliko proteina, ki ga določamo (npr. globularni), saj lahko oblika molekule vpliva na prodiranje v pore SF. Pri proteinih je ločevanje manj zanesljivo, saj lahko vsebnost aromatskih aminokislin povzroči upočasnitev potovanja in poveča elucijski volumen. Nekateri proteini lahko vseeno tvorijo tudi sekundarne ionske ali ionsko izmenjevalne interakcije s SF, kar lahko vpliva na zadrževanje proteina na koloni (22, 23).

1.3.3.4 Določanje molekularne mase z izključitveno kromatografijo

Izključitveno kromatografijo lahko uporabimo v analitske namene, s tem da proteinom določimo čas zadrževanja na koloni. Snovi z znanimi molekularnimi masami nanesemo na kolono in jim določimo elucijske volumne. Iz časov zadrževanja in molekularskih mas lahko naredimo umeritveno premico. Pri enakih pogojih lahko preverimo zadrževanje neznanega proteina in iz umeritvene premice določimo molekularsko maso tega proteina. Dobra lastnost te metode je, da ne zahteva čiste snovi (26).

Če poznamo elucijske volumne posameznih proteinov, lahko preprosto določimo molekularsko maso neznanega proteina preko odvisnosti $\log MM$ od elucijskega volumna oziroma retencijskega časa. Omejitev izključitvene kromatografije je v tem, da morajo biti proteini podobne oblike, npr. globularne. Ker je malo znanega o obliki proteinov, moramo biti previdni pri interpretaciji dobljenih podatkov izključitvene kromatografije. V primeru da imajo proteini sekundarne ionske interakcije s stacionarno fazo, lahko to privede do daljšega zadrževanja na koloni in neustrezne določitve molekularne mase proteina. Eden od načinov preprečitve teh interakcij je dodatek 100-300 mM NaCl ali podobne soli. Določanje

molekulske mase nativnega proteina nam pomaga pri določitvi kvartarne strukture posameznega proteina. Zelo majhni proteini imajo fleksibilno obliko v raztopini, zato jih lahko najdemo v različnih konformacijah (22, 27, 28, 29, 30).

1.3.3.5 Proteini pri izključitveni kromatografiji

Proteini in druge biomolekule se večinoma med seboj precej razlikujejo po masi in obliki molekule. Gelska filtracija izkorišča to različnost biomolekul za ločevanje komponent vzorca, saj je elucijski volumen proteinov odvisen od molekulske mase teh (25).

Izključitvena kromatografija se uporablja tudi za namene kontrole kakovosti terapevtskih proteinov in pri čiščenju vzorca proteinov. Ta metoda se pogosto uporablja na koncu sinteze proteinov (7). Po evropski farmakopeji je analiza z izključitveno kromatografijo predvidena pri:

- albuminu (določanje porazdelitve velikosti molekul),
- alteplazi (ločevanje eno in dvoverižnih oblik),
- aprotininu (določanje proteinskih nečistot z višjimi molekulskimi masami),
- botulinum toksinu (določanje istovetnosti in sestave),
- eritropoetinu (določanje dimerov in spojin z višjimi molekulskimi masami),
- inzulinih (določanje nečistot z višjimi molekulskimi masami),
- imunoglobulinu proti limfocitom T (določanje porazdelitve velikosti molekul),
- interferonu γ -1b (določanje prisotnosti monomerov, dimerov, oligomerov in agregatov),
- običajnem človeškem imunoglobulinu (določanje porazdelitve in velikosti molekul),
- rekombinantnem dejavniku strjevanja krvi VIII (določanje porazdelitve velikosti molekul),
- somatotropinu (določanje dimerov in sorodnih spojin z višjimi molekulskimi masami),
- urokinazi (določanje frakcij z različnimi molekulskimi masami) (31).

2 NAMEN DELA

Peptidna in proteinska zdravila oblikujejo pomemben del terapevtskega področja za zdravljenje različnih bolezni. Njihova kompleksna struktura in strukturna raznolikost otežuje njihovo karakterizacijo. Za vrednotenje tovrstnih spojin potrebujemo zato različne analzne metode, ena od teh je tudi izključitvena kromatografija.

Izključitvena kromatografija ločuje spojine le na osnovi njihove velikosti in oblike, zato je pomembna metoda za vrednotenje peptidov in proteinov na področju stabilnosti.

Namen diplomske naloge bo vpeljati ustrezno SEC metodo za vrednotenje oz. karakterizacijo proteinov. Razvoj metode bomo dosegli na osnovi zmesi standarda proteinov in s spreminjanjem kromatografskih pogojev, s čimer bomo hkrati ugotavljali tudi zakonitosti te metode. Z ustrezno zmesjo standarda proteinov bomo preverili možnost določitve molekulske mase dveh modelnih proteinov, in sicer humanega inzulina ter albumina. Izbrano metodo bomo nato prenesli na inzulin.

Naš namen bo v nadaljevanju z različno pripravo vzorcev inzulina preveriti možnost zaznavanja monomera, dimera, heksamera ali kovalentnega dimera inzulina.

Optimirano SEC metodo za inzulin bomo vrednotili s ciljem potrditve ustreznosti delovanja metode in verodostojnosti dobljenih rezultatov. Vrednotili bomo naslednje parametre: selektivnost, linearnost, ponovljivost ter meddnevno ponovljivost.

Vpeljano SEC metodo bomo nato uporabili pri stabilnostni študiji inzulina. Spremljali bomo stabilnost različno pripravljenih vzorcev pri povišani temperaturi in stresanju. Preverili bomo vpliv temperature na upad vsebnosti inzulina ter obseg in hitrost nastanka agregatov inzulina.

Z namenom možnosti kvantitativnega ovrednotenja vsebnosti inzulina v pripravkih inzulina bomo prilagodili in vrednotili tudi metodo za določevanje vsebnosti inzulina na RP-HPLC koloni.

Za identifikacijo inzulina oz. njegovih potencialnih agregatov bomo dodatno uporabili LC-MS metodo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI IN TOPILA

- Goveji inzulin; 10 mg/mL v hepesu 25 mM, pH = 8,2; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Humani inzulin; 10 mg/mL v hepesu 25 mM, pH = 8,2; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Mixtard[®] 30 NovoLet, suspenzija za subkutano uporabo, humani inzulin, 100 UI/mL; dobavitelj: Novo Nordisk,
- L-argininijev hidroklorid, empirična formula: $C_6H_{14}N_4O_2$, MM = 174,2; stopnja čistosti ≥ 98 %; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Cinkov acetat dihidrat, empirična formula: $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$, MM = 219,48; stopnja čistosti $\geq 99,5$; dobavitelj: Kemika,
- Hepar: (N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etansulfonska kislina]), empirična formula: $C_8H_{18}N_2O_4S$, MM = 238,3, pKa = 7,5, pH območje 6,8-8,2; stopnja čistosti $\geq 99,5$ %; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Humani albumin, raztopina za infundiranje, 200 mg/mL, stopnja čistosti ≥ 96 %; dobavitelj: Octapharma,
- Zmes standarda proteinov za SEC, Aqueous SEC 1; dobavitelj: Phenomenex,
- o-fosforjeva kislina 85 % za analizo, empirična formula: H_3PO_4 , MM = 98,0; gostota 1,71 g/mL; dobavitelj: Merck,
- Na_2SO_4 , MM = 142,04; stopnja čistosti $\geq 99,0$ %; dobavitelj: Merck,
- KH_2PO_4 , MM = 136,08; dobavitelj: Merck,
- 100 % očetna kislina (glacialna), empirična formula: CH_3COOH ; MM = 60,05; stopnja čistosti $\geq 99,8$ %; dobavitelj: Merck,
- Protaminijev sulfat, USP testiran; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Acetonitril kromatografske čistoče za HPLC, empirična formula: CH_3CN , MM = 41,05; stopnja čistosti: 99,9 %; dobavitelj: Sigma-Aldrich,
- Milli Q voda (MQ) s specifično upornostjo 18,2 M Ω cm; pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore), FFA,
- m-krezol, empirična formula: C_7H_8O , MM = 108,14, stopnja čistosti ≥ 99 %; dobavitelj: Sigma-Aldrich,

- Fenol za kromatografijo, empirična formula: C_6H_5OH , MM = 94,11,
- Natrijev klorid, p.a., empirična formula: $NaCl$, MM = 58,44; dobavitelj: Merck,
- Tween 80, polioksietilen sorbitanmonooleat, 0,1 % raztopina, 100 mL; dobavitelj: Fluka,
- Mravljična kislina, empirična formula: CH_2O_2 , MM = 46,03, stopnja čistosti: 98-100 %; dobavitelj: Merck,
- NaOH (natrijev hidroksid) - Titrisol[®], za pripravo 1 M NaOH, dobavitelj: Merck,
- HCl (klorovodikova kislina) - Titrisol[®], za pripravo 1 M HCl, dobavitelj: Merck.

3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR

- HPLC sistem Agilent Series 1100: kvarterna črpalka, razplinjevalec, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor ChemStation, programska oprema,
- Analitski sistem LC/MS-MS: Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream LC/MS,
- Kromatografska kolona:
 - SEC: BioSep-SEC-S 2000, 300 x 7,80 mm, delci 5 μm , SF: silikagel; Phenomenex,
 - RP-HPLC: Luna C₁₈, 250 x 4,6 mm, delci 5 μm , SF: silikagel; Phenomenex,
 - LC/MS: Kinetex C₁₈ 50 x 2,1 mm, delci 2,6 μm , SF: silikagel; Phenomenex,
- pH meter MA 5750; Iskra,
- Ultrazvočna kadička Sonis 4; Iskra,
- Vodna kopel WB-30E, moč 1000 W; Kambič,
- Stresalnik VORTEMP 56EUC; Tehnica,
- Digitalna tehtnica Mettler Toledo AB54-S,
- Avtomatske pipete: 1-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL ; Eppendorf,
- Vortex Vibramix 10; Tehnica
- Magnetno mešalo HI 190M; Hanna Instruments,
- Hladilnik; LTH,
- Digestorij,
- Steklovina: čaše, merilne bučke, merilni valji, epruvete, čolnički za tehtanje, viala, inserti za viala,
- Sistem za filtriranje mobilne faze: vodna črpalka, elenmajerica, stekleni lij, gumijast zamašek, prižema, filter mrežica, filter papir (celulozno acetatni filter, pore 0,45 μm ; Sartorius),

- Ostali inventar: nastavki za pipete, epice 1,5 mL, Parafilm M, kovinske spatule, puhalke, plastične kapalke, zamaški za vialo, držala za inserte, magnetek.

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

Hepes pufer (hepes 8,2): Za pripravo 25 mL hepes pufra s koncentracijo 25 mM smo natehtali 149 mg hepesa, ga prenesli v merilno bučko in napolnili do oznake z Milli Q vodo (MQ). Raztopino smo dobro premešali in uravnali pH pufra do 8,2 z 1 M NaOH.

Raztopina cinka: Za pripravo 25 mL cinkove raztopine smo natehtali 196 mg cinkovega acetata, ga prenesli v merilno bučko, dopolnili z MQ vodo do oznake in pomešali. Tako smo dobili raztopino s koncentracijo cinka 35,75 mM.

Fosfatni pufri za stabilnostno študijo: pH 2, 4 in 6 (FP 2, FP 4, FP 6): Pripravili smo raztopino 100 mM fosfatnega pufra, in sicer tako, da smo natehtali ustrezno količino KH_2PO_4 , jo raztopili v MQ vodi in pH med mešanjem raztopine z 1 M NaOH uravnali na 6, pri pH 2 in 4 pa smo uporabili 1 M HCl.

3.2.2 PRIPRAVA VZORCEV

3.2.2.1 Priprava vzorcev za razvoj SEC in RP-HPLC metode

Zmes standarda proteinov: Proteinski standard smo dobili v trdni obliki v dveh vialah. V prvi viali so bili proteini: goveji tiroglobulin (670 kDa), humani γ -globulin (150 kDa), ovalbumin (44 kDa) in mioglobulin (17 kDa). V drugi viali pa je bil uridin (0,244 kDa). Po navodilu za pripravo standarda proteinov smo vsebini obeh vial raztopili v 1 mL 100 mM fosfatnega pufra pH = 6,8. Nato smo 60 μL raztopine uridina prenesli v drugo vialo s proteini in pomešali.

Albumin: Standardno raztopino albumina smo pripravili tako, da smo v epico odpipetirali 50 μL albumina s koncentracijo 200 mg/mL in redčili s hepes pufrom pH = 8,2 do 1000 μL .

Inzulin:

Osnovno raztopino inzulina 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo s pipeto odpipetirali v epico 100 μ L standardne raztopine inzulina s koncentracijo 10 mg/mL (humani, goveji inzulini ali pripravki inzulina) in ga redčili s hepes pufrom pH = 8,2 do 1000 μ L.

Inzulin s HCl: v epice smo odpipetirali 100 μ L standarda govejega ali humanega inzulina s koncentracijo 10 mg/mL, mu dodali 200 oz. 400 μ L 1 M HCl in vzorec redčili z MQ vodo do 1000 μ L.

Inzulin s cinkom: v epico smo odpipetirali 100 μ L standarda govejega inzulina s koncentracijo 10 mg/mL, dodali 20 μ L 35,75 mM raztopine cinka in redčili z MQ vodo do 1000 μ L.

Pripravek inzulina: Iz peresnika humanega inzulina Mixtard 30 smo po stresanju peresnika z injekcijsko brizgo potegnili inzulini. Odpipetirali smo 100 μ L suspenzije in jo redčili s hepes pufrom do 1000 μ L.

Na RP-HPLC kolono smo vedno injicirali 20 μ L, na SEC kolono pa 10 μ L vzorca s koncentracijo 1 mg/mL. V primeru nerazredčenega inzulina s koncentracijo 10 mg/mL smo injicirali 1 μ L raztopine.

3.2.2.2 Priprava vzorcev za vrednotenje SEC in RP-HPLC metode

Za vrednotenje metode na standardnih raztopinah inzulina smo pripravili pet različnih koncentracij inzulina pripravljenih iz standardne raztopine humanega inzulina s koncentracijo inzulina 10 mg/mL. Pripravo raztopin standardov inzulina v hepes pufri prikazuje Preglednica IV.

Preglednica IV: Priprava vzorcev inzulina za vrednotenje metode.

Končna koncentracija inzulina (mg/mL)	Volumen standardne raztopine inzulina (μL)	Volumen dodane raztopine hepes pufra (μL)
0,2	20	980
0,5	50	950
1	100	900
2	50	200
5	125	125

Za vrednotenje selektivnosti smo pripravili tudi vzorce fenola, m-krezola in protamina, ki so prisotni v pripravku inzulina.

Raztopina fenola: Natehtali smo 10 mg fenola, ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in z MQ vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo dobro premešali, da se je ves fenol raztopil. Pripravljeno raztopino fenola (1 mg/mL) smo prenesli v vialo. Na kolono smo injicirali 1 μ L vzorčne raztopine.

Raztopina m-krezola: V 25 mL bučko smo odpipetirali 25 μ L standarda m-krezola in dopolnili bučko do oznake z MQ vodo. Raztopino smo dobro premešali in jo 1000 krat redčili z MQ vodo. Na kolono smo injicirali 1 μ L tako pripravljene raztopine.

Raztopina protamina: V 25 mL bučko smo prenesli natehtan protamin in ga raztopili v MQ vodi, da smo dobili protamin koncentracije 1 mg/mL. Na kolono smo injicirali 1 μ L vzorčne raztopine.

3.2.2.3 Priprava vzorcev za stabilnostno študijo

Za stabilnostno študijo smo pripravili različne vzorce inzulina. Pripravili smo jih tako, da smo odpipetirali 100 μ L standarda inzulina (koncentracije 10 mg/mL) in redčili do 1000 μ L z ustreznim topilom. Pripravljene vzorce so predstavljeni v Preglednici V.

Preglednica V: Priprava vzorcev inzulina za stabilnostno študijo.

Št. vzorca	Vzorec	Osnovna raztopina (vsaka 100 μ L)	Topilo (do 1000 μ L)
Vz 1	Goveji inzulin	Goveji standard inzulina	Hepes pufer pH = 8,2
Vz 2	Humani inzulin – stari *	Humani standard inzulina	Hepes pufer pH = 8,2
Vz 3	Humani inzulin	Humani standard inzulina	Hepes pufer pH = 8,2
Vz 4	Humani inzulin v FP 2 **	Humani standard inzulina	Fosfatni pufer pH = 2
Vz 5	Humani inzulin v FP 4 **	Humani standard inzulina	Fosfatni pufer pH = 4
Vz 6	Humani inzulin v FP 6 **	Humani standard inzulina	Fosfatni pufer pH = 6
Vz 7	Nerazredčen humani inzulin	Humani standard inzulina	/
Vz 8	Inzulin z albuminom	Humani standard inzulina + albumin (200 mg/mL)	Hepes pufer pH = 8,2
Vz 9	Inzulin s Tweenom 80	Humani standard inzulina + Tween 80 (0,1 % raztopina)	Hepes pufer pH = 8,2

* starejši standard inzulina (odprt približno 5 mesecev), pri ostalih vzorcih smo uporabili novejši standard inzulina; ** FP – fosfatni pufer, pH 2, 4 in 6.

3.2.2.4 Priprava vzorcev za LC/MS analizo

Vzorci za LC/MS analizo smo pripravili s 1000 kratnim redčenjem standarda humanega inzulina (10 mg/mL) z MQ vodo. Že uporabljene vzorce pri SEC metodi za vrednotenje stabilnosti inzulina smo redčili 100-krat, saj so bili ti že predhodno redčeni 10-krat. Tako smo dobili vzorce s koncentracijo inzulina 10 µg/mL.

3.2.3 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA MOBILNO FAZO

3.2.3.1 SEC metoda

- a) Fosfatni pufer, pH = 6,8, 4,8 in 2,8

Pripravili smo raztopine za mobilno fazo z različno močjo pufra in sicer 20 mM, 50 mM, 100 mM in 200 mM. Natehtali smo ustrezno količino KH_2PO_4 , ga raztopili v MQ vodi in dopolnili bučko do oznake. pH raztopine smo z 1 M NaOH uravnali na pH 6,8, za pripravo pufrov s pH 2,8 in 4,8 pa smo uporabili 1 M HCl. Med uravnavo pH smo raztopino mešali z magnetnim mešalom, pred uporabo na HPLC sistemu pa smo jo prefiltrirali in razplinili v ultrazvočni kadički.

- b) L-arginin, pH = 2,5 in 2,8

Pripravili smo raztopino L-arginina v MQ vodi s koncentracijo 1 g/L. pH raztopine smo med mešanjem z magnetnim mešalom z očetno kislino uravnali na pH = 2,5 oz. 2,8. Raztopino smo pred uporabo prefiltrirali in razplinili v ultrazvočni kadički.

- c) L-arginin in fosfatni pufer, pH = 6,8

Natehtali smo L-arginin in KH_2PO_4 , ju kvantitativno prenesli v merilno bučko in raztopili v MQ vodi, da smo dobili koncentracijo L-arginina 1 g/L in koncentracijo KH_2PO_4 100 mM. pH raztopine smo med mešanjem z magnetnim mešalom z NaOH uravnali na 6,8, nato pa prefiltrirali in razplinili v ultrazvočni kadički.

- d) Fosfatni pufer z 0,1 in 0,2 M NaCl, pH = 6,8

Za pripravo 300 mL 100 mM fosfatnega pufra z dodatkom NaCl smo natehtali 4,08 mg KH_2PO_4 in 1,75 oz. 3,50 mg NaCl in dopolnili bučko do oznake. pH raztopine smo med mešanjem z magnetnim mešalom uravnali na 6,8. Pred uporabo smo raztopino prefiltrirali in razplinili v ultrazvočni kadički.

- e) L-arginin s cinkom, pH = 5,5

Pripravili smo raztopino L-arginina v MQ vodi s koncentracijo 1 g/L. Raztopino cinka s koncentracijo 35,75 mM smo redčili do koncentracije cinka v raztopini 57 μ M. Pripravljeni raztopini smo med mešanjem na magnetnem mešalu uravnali pH z očetno kislino na 5,5. Pred uporabo smo raztopino prefiltrirali in jo razplinili v ultrazvočni kadički.

3.2.3.2 RP-HPLC metoda

- a) 0,1 % fosforjeva kislina, pH = 3

Raztopino smo pripravili iz 85% o-fosforjeve kisline, in sicer tako, da smo za pripravo 500 mL raztopine v merilno bučko odpipetirali 588 μ L o-fosforjeve kisline in dopolnili z MQ vodo do oznake. pH tako pripravljene raztopine je 3. Raztopino smo pred uporabo razplinili v ultrazvočni kadički.

- b) 0,5 % fosforjeva kislina, pH = 2,3

Raztopino smo pripravili iz 85 % o-fosforjeve kisline, tako da smo za pripravo 500 mL raztopine v merilno bučko odpipetirali 2,94 mL o-fosforjeve kisline in jo dopolnili z MQ vodo do oznake. pH tako pripravljene raztopine je 2,3. Raztopino smo pred uporabo razplinili v ultrazvočni kadički.

- c) 50 mM Na₂SO₄, H₃PO₄ do pH = 2,4

Za pripravo 0,5 L vodne raztopine smo natehtali 3,551 g Na₂SO₄, ga kvantitativno prenesli v 500 mL bučko in dopolnili z MQ vodo do oznake. pH raztopine smo z o-fosforjevo kislino uravnali na 2,4. Pri uravnavi pH smo raztopino ves čas mešali s pomočjo magnetnega mešala. Nato smo raztopino prefiltrirali in jo pred uporabo razplinili v ultrazvočni kadički.

3.2.3.3 LC-MS metoda

- a) 0,1 % mravljična kislina

Raztopino za mobilno fazo pri LC-MS metodi smo pripravili iz 100 % mravljične kisline, in sicer tako, da smo jo 1000-krat redčili z MQ vodo. Tako smo dobili 0,1 % raztopino. Pred uporabo smo raztopino razplinili v ultrazvočni kadički.

3.2.3.4 Pregled uporabljenih mobilnih faz

V Preglednici VI so predstavljene mobilne faze, ki smo jih uporabili pri razvoju SEC, RP-HPLC in LC-MS metod.

Preglednica VI: Pregled vseh uporabljenih metod HPLC kromatografije.

Metoda	Kolona	Raztopina za MF	Delež ACN (%)
1	SEC	20 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	0
2	SEC	50 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	0
3	SEC	100 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	0
4	SEC	200 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	0
5	SEC	MQ voda	0
6	SEC	100 mM fosfatni pufer, pH = 4,8	0
7	SEC	100 mM fosfatni pufer, pH = 2,8	0
8	SEC	100 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	10
9	SEC	100 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	20
10	SEC	100 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	30
11	SEC	L-arginin (1 g/L), očetna kislina pH = 2,8	0
12	SEC	L-arginin (1 g/L), očetna kislina pH = 2,8	10
13	SEC	L-arginin (1 g/L), očetna kislina pH = 2,8	20
14	SEC	L-arginin (1 g/L), očetna kislina pH = 2,5	20
15	SEC	100 mM fosfatni pufer + 0,1 M NaCl, pH = 6,8	0
16	SEC	100 mM fosfatni pufer + 0,2 M NaCl, pH = 6,8	0
17	SEC	L-arginin (1 g/L) + 100 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	20
18	SEC	L-arginin (1 g/L) + 100 mM fosfatni pufer, pH = 6,8	30
19	SEC	L-arginin (1 g/L), pH = 5,5	20
20	SEC	L-arginin (1 g/L), pH = 5,5	30
21	SEC	L-arginin + 57 μM Zn^{2+} , očetna kislina pH = 5,5	20
22	RP-HPLC	0,1 % H_3PO_4 , pH = 3	30
23	RP-HPLC	0,5 % H_3PO_4 , pH = 2,3	30
24	RP-HPLC	50 mM Na_2SO_4 , H_3PO_4 pH = 2,4	30
25	LC-MS	0,1 % mravljična kislina	10-50 v 10 min *

* gradientno izpiranje

3.2.4 KROMATOGRAFSKI POGOJI

3.2.4.1 Kromatografski pogoji pri SEC metodi

Kromatografska separacija je potekala na koloni BioSep-SEC-S 2000 (300 x 7,80 mm, 5 μm delci). Kolona je bila termostatorirana na temperaturo 40 °C. Na kolono smo injicirali 10 μL raztopine vzorca. Mobilno fazo smo dovajali iz dveh kanalov z metodo izokratskega izpiranja.

Za analizo smo uporabili metode 1-21 iz Preglednice VI. Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min, odziv na UV detektorju smo merili pri valovni dolžini 214 ali 276 nm.

3.2.4.2 Kromatografski pogoji pri RP-HPLC metodi

Kromatografska separacija je potekala na koloni Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm delci). Kolona je bila termostatirana na temperaturo 40 °C. Na kolono smo injicirali 20 µL raztopine vzorcev pri detekciji 214 ali 276 nm. Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min. Mobilna faza je bila sestavljena iz 70 % pripravljene vodne raztopine za mobilno fazo in 30 % organskega topila - acetonitrila. Za analizo smo uporabili metode 22-24 iz Preglednice VI.

3.2.4.3 Kromatografski pogoji pri LC-MS metodi

Kromatografska separacija je potekala na koloni Kinetex (50 x 2,1 mm z delci 2,6 µm). Na kolono smo injicirali 0,1 µL vzorčne raztopine. Za analizo smo uporabili metodo 25 iz Preglednice VI. Dovajali smo jo z metodo gradientnega izpiranja. Na začetku smo dovajali 0,1 % mravljično kislino in acetonitril v volumskem razmerju 90:10, nato pa smo delež acetonitrila v času 10 minut linearno povečali do 50 %. Pretok mobilne faze je bil 0,3 mL/min. Kot vir ionizacije smo uporabili pozitivni ESI (electrospray ionization), meritve smo izvajali v "full scan" načinu v območju od 250 do 1500 m/z.

3.2.5 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

Vrednotenje analizne metode je sistematičen dokumentiran postopek, ki z visoko mero zaupanja zagotavlja, da bo specifičen proces stalno deloval v skladu s predpisanimi specifikacijami in tako ustrezal namenu uporabe. Z rezultati take metode lahko sodimo o kakovosti, zanesljivosti in doslednosti dobljenih rezultatov. Pri vrednotenju analizne metode upoštevamo različne smernice, med katerimi je široko uporabljena ICH smernica.

V okviru vrednotenja HPLC metode na standardnih raztopinah inzulina smo pri obeh HPLC metodah (SEC in RP-HPLC) vrednotili selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost in meddnevno ponovljivost. Pri vrednotenju metode smo upoštevali ICH smernico Q2 (R1) (32, 33).

Vrednotenje metode smo izvedli v treh dneh. Priprava vzorcev je predstavljena v preglednici IV. Pripravili smo pet različnih koncentracij standarda inzulina, in sicer: 0,2, 0,5, 1, 2 in 5 mg/mL. Vzorce smo injicirali od najnižje do najvišje koncentracije. Vsak vzorec smo

injicirali trikrat. Izvedli smo tudi meddnevno ponovljivost, in sicer tako, da smo enak postopek vrednotenja ponovili še drugi in tretji dan.

3.2.5.1 Selektivnost

Selektivnost je sposobnost analizne metode, da loči analit od ostalih komponent prisotnih v vzorcu (npr. drugi analiti, nečistote, razpadni produkti, dodatki ob izdelavi farmacevtskih oblik). Metoda je selektivna, kadar so kromatografski vrhovi na kromatogramu analiziranih komponent vzorca jasno ločeni, kar pomeni, da ni prekrivanja kromatografskih vrhov. Večja kot je ločljivost, boljša je selektivnost kromatografske metode.

Mi smo preverili selektivnost metode tako, da smo injicirali standard humanega in govejega inzulina, topilo za pripravo standardov (hepes; pH = 8,2), pripravek inzulina in ostale komponente v pripravku (fenol, m-krezol in protamin). Identificirali smo posamezne kromatografske vrhove na kromatogramu in preverili ali so ustrezno ločeni med sabo (24, 32).

3.2.5.2 Linearnost

Metoda je linearna, če obstaja direktna linearna ali preko ustreznega matematičnega izračunana (npr. log, ln) povezava med koncentracijo in odzivnostjo. Linearnost razmerja med obema spremenljivkama preverimo s pomočjo regresijske premice, ki jo dobimo po metodi vsote najmanjših kvadratov. Rezultat podamo v obliki premice $y = kx + n$, pri čemer y predstavlja površino pod kromatografskim vrhom, n odsek na ordinati, x koncentracijo analita in k naklon premice. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podamo s Pearsonovim koeficientom R oz. kvadratom tega R^2 . Pri popolni linearni povezavi naj bi bil $R^2 = 1$. ICH smernica priporoča izračun linearnosti pri meritvah z vsaj petimi različnimi koncentracijami.

Linearnost naše metode smo preverili na območju koncentracij standarda inzulina med 0,2 in 5,0 mg/mL, kar predstavlja 20-500 % koncentracije našega delovnega območja. Rezultate smo ovrednotili s pomočjo enačbe umeritvene premice in R^2 – determinacijskim koeficientom. Kot ustrezno linearnost smo postavili vrednosti $R^2 \geq 0,99$ (24, 33).

3.2.5.3 Točnost

Točnost je definirana kot ujemanje med izmerjenim rezultatom in dejansko vrednostjo. Podamo jo kot razliko med dejansko količino analizirane spojine in količino, ki jo izračunamo iz umeritvene premice. ICH smernica določa izračun točnosti pri vsaj treh različnih koncentracijah vzorca.

Točnost sistema nismo določali v skladu z ICH smernicami, ampak smo na osnovi dobljene enačbe premice iz umeritvene krivulje izračunali koncentracijo inzulina v treh pripravljenih kontrolnih vzorcih standarda inzulina s koncentracijo 1 mg/mL ter njeno odstopanje od dejanske koncentracije. Pri vrednotenju metode smo kot zadovoljivo točnost upoštevali mejo $100 \pm 5 \%$ (24, 33).

3.2.5.4 Ponovljivost

Ponovljivost sistema predstavlja skladanje med posameznimi odzivi med večkratnim injiciranjem istega vzorca. Definirana je kot stopnja ujemanja med posameznimi odzivi pri večkratni pripravi enakih vzorcev. Merilo za ponovljivost predstavljata standardni odklon (SD) in relativni standardni odklon (RSD).

ICH smernica predpisuje oceno ponovljivosti pri vsaj treh različnih koncentracijah znotraj območja meritev ali pa šest ponovitev pri izbrani koncentraciji.

Ponovljivost smo vrednotili znotraj enega dneva, kakor tudi v več zaporednih dneh. Vseh pet pripravljenih vzorcev inzulina smo po trikrat injicirali še dva naslednja dneva in izračunali ponovljivost posamezne koncentracije v vzorcu med dnevi. Kot ustrezno ponovljivost smo upoštevali mejo $100 \pm 5 \%$ (24, 33).

3.2.6 DOLOČITEV VSEBNOSTI INZULINA V INZULINSKIH PRIPRAVKIH

Vsebnost inzulina smo določali po metodi 24 iz Preglednice VI. Pretok MF je bil 1 mL/min. Meritve so potekale pri valovni dolžini 276 nm. Uporabili smo pripravek inzulina za injiciranje v obliki suspenzije, in sicer Mixtard 30. Pripravek smo dobro premešali in iz njega pripravili 10-krat redčene vzorce s hepes pufrom pH = 8,2 v treh paralelkah. Vsak tako pripravljen vzorec smo injicirali na kolono. Iz površine pod krivuljo inzulina smo po enačbi umeritvene premice izračunali koncentracijo inzulina v posamezni paralelki in kakšen delež inzulina predstavlja ta glede na vsebnost, ki je navedena na pripravku. Za ustrezno smo predpostavili koncentracijo 90-110 % deklarirane, ki pravi da je 1 UI inzulina enaka 45,5 µg. Ker je v 1 mL pripravka 100 UI inzulina, je koncentracija inzulina v pripravku 4,55 mg/mL (34, 35).

3.2.7 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA

Pripravljene vzorce Vz 1 do Vz 7 iz preglednice V smo dali v termostatirano vodno kopel 50 °C in jih vzorčili v petih časovnih točkah, in sicer ob času 0, 7, 14, 21 in 28 dni. Vzorce smo po odvzemu še isti dan analizirali s SEC metodo v dveh različnih mobilnih fazah (metoda 13 in 18, Preglednica VI). Spremembe v vsebnosti inzulina in kovalentnega dimera inzulina smo ponazorili z relativno skalo, saj nas je zanimalo razmerje med nastalim kovalentnim dimerom inzulina in inzulinom ter kako se njuno razmerje s časom spreminja. V primeru spremljanja stabilnosti inzulina pri 50 °C v stresalniku (100 obratov/min), smo izvedli analize vzorcev Vz 1 do Vz 7 v časovnih točkah 0, 1, 2, 3 in 7 dni. Vzorca Vz 8 in Vz 9 smo analizirali v časovni točki 0 in 1 dan.

3.2.8 OBDELAVA PODATKOV

Za urejanje in obdelavo rezultatov smo uporabili program Excel (Microsoft Office 2010). Preglednice in grafe smo oblikovali z namenom lažjega razumevanja in predstavitve dobljenih rezultatov.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Proteini predstavljajo pomemben del terapevtskega področja za zdravljenje različnih bolezni. Specifične lastnosti proteinov zahtevajo posebno obravnavo v stabilnosti zdravil vključno z razvojem analiznih metod, ki so hkrati tudi svojevrstne za vsak protein posebej. Da biotehnološko pridobljen protein zadosti zahtevam regulatornih organov, mora imeti visoko stopnjo čistote, kar preverjajo kromatografske metode. Uporabne so za ločevanje različnih količin snovi, za preparativne ali analizne namene.

Izključitvena kromatografija predstavlja pomemben člen pri vrednotenju proteinov. Pri SEC metodi poteka ločitev komponent vzorca glede na njihovo velikost in obliko. Princip ločevanja molekul vzorca z izključitveno kromatografijo temelji na tem, da majhne molekule prodirajo v pore in se zadržijo nekaj časa v njih, večje molekule pa potujejo z mobilno fazo, saj so prevelike, da bi prodirale v pore. Tako predstavljajo kromatografski vrhovi s krajšim retencijskim časom (t_R) spojine z višjo molekulsko maso, vrhovi z daljšim t_R pa predstavljajo spojine z nižjo molekulsko maso. Najdaljši čas potovanja ima topilo, zato se za tem vrhom praviloma nobena komponenta vzorca več ne eluira iz kolone. Na separacijo komponent v vzorcu lahko vplivajo različni parametri, kot so izbira kolone, stacionarne faze, vrste puфра, jakosti puфра, pH puфра, delež dodanega organskega topila...

Naš namen je bil vpeljati ustrezno SEC metodo za vrednotenje oz. karakterizacijo proteinov. Optimizirali smo metodo na primeru zmesi standarda proteinov, albumina in inzulina, in sicer preverili smo vpliv sprememb določenih parametrov na kromatografsko ločitev. Preverili smo spremembo mobilne faze, jakosti in vrste puфра, pH puфра in deleža organske komponente v mobilni fazi. V nadaljevanju smo se osredotočili na inzulin, zato smo optimirano SEC metodo ustrezno vrednotili in poskusili zaznati različne oblike agregatov inzulina. SEC metodo smo nato aplicirali še na stabilnostno študijo inzulina. Spremljali smo stabilnost različno pripravljenih vzorcev pri povišani temperaturi in stresanju.

Preverili smo tudi možnost določitve vsebnosti inzulina v izbranem pripravku inzulina z RP-HPLC metodo. Za identifikacijo inzulina oz. njegovih potencialnih agregatov smo dodatno uporabili še LC-MS metodo ter tako primerjali in potrdili rezultate stabilnostne študije inzulina.

4.1 RAZVOJ SEC METODE NA STANDARDU PROTEINOV IN ALBUMINU

Cilj razvoja analizne metode je bil učinkovita kromatografska separacija komponent zmesi standarda proteinov in albumina ter specifična detekcija izbranega analita.

Kot izhodišče za razvoj metode in vrednotenje proteinov s SEC metodo nam je bila metoda priporočena za uporabljeno kolono BioSep-SEC-S 2000 (36). Kot mobilno fazo smo uporabili 100 mM fosfatni puffer. Za razvoj metode smo uporabili zmes standarda proteinov in albumin. Analizo smo izvedli pod enakimi kromatografskimi pogoji kot so navedeni pri vzorčnem kromatogramu. Kromatogram zmesi standarda proteinov in vzorčni kromatogram sta bila skladna, zato smo lahko identificirali kateri kromatografski vrh predstavlja posamezen protein.

4.1.1 VPLIV KONCENTRACIJE PUFRA

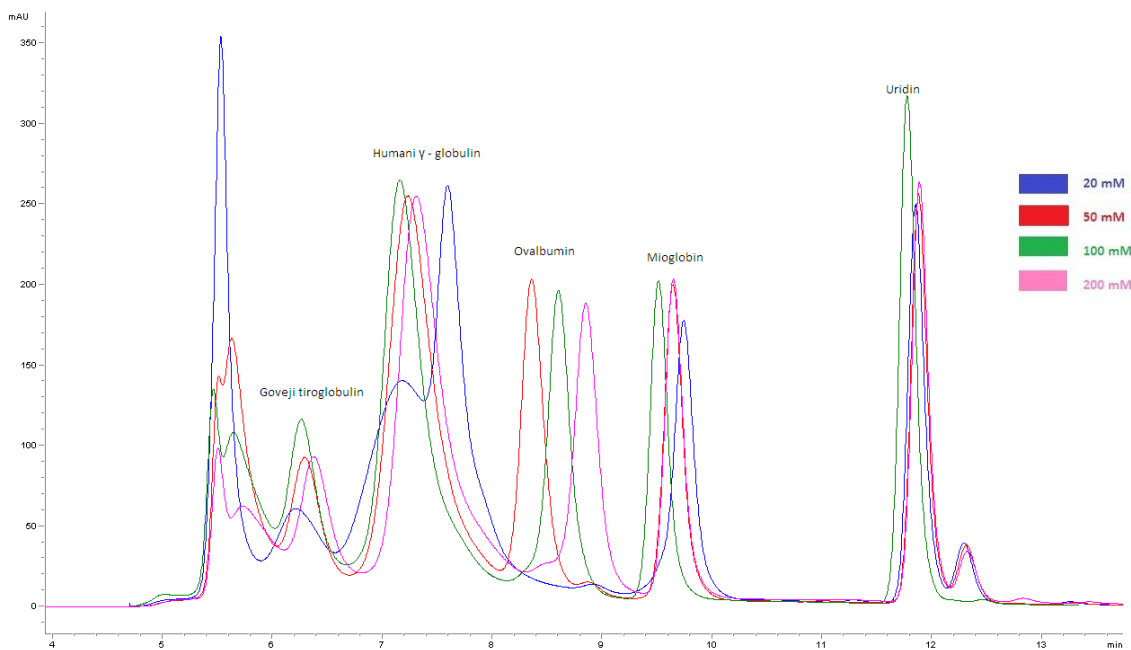
Najprej smo preverili, kakšen vpliv ima koncentracija fosfatnega pufra na retencijski čas in obliko kromatografskega vrha pri zmesi standarda proteinov in albumina. Pripravili smo mobilne faze fosfatnega pufra s koncentracijami 0, 20, 50, 100 in 200 mM (metode 1-5, Preglednica VI). Ugotovili smo, da koncentracija pufra različno vpliva na posamezne proteine.

4.1.1.1 Zmes standarda proteinov

Zmes standarda proteinov sestavljajo štiri proteini: goveji tiroglobulin (670 kDa), humani γ -globulin (150 kDa), ovalbumin (44 kDa) in mioglobulin (17 kDa). Uridin je dodan za zaznavo najmanjših molekul v vzorcu. Tako vidimo kdaj se celotni vzorec eluira iz kolone.

V 20 mM pufri se kromatografska vrhova humanega γ -globulina in ovalbumina ne ločita popolnoma (Slika 6), v 200 mM pufri pa ni ločitve vrhov ovalbumina in mioglobina. Na uridin, ki predstavlja elucijo topila, jakost mobilne faze nima bistvenega vpliva, saj se pri vseh koncentracijah pufra eluira pri podobnem t_R . Pri nizki koncentraciji pufra smo opazili povišan prvi vrh, za katerega smo predvidevali, da pripada višjim molekulskim masam, saj se najprej iz kolone eluirajo komponente z višjo molekulsko maso. Sklepali smo, da nastajajo agregati proteinov.

Ugotovili smo, da so vrhovi najlepše ločeni in hkrati simetričnih oblik pri 100 mM pufri (Slika 6).



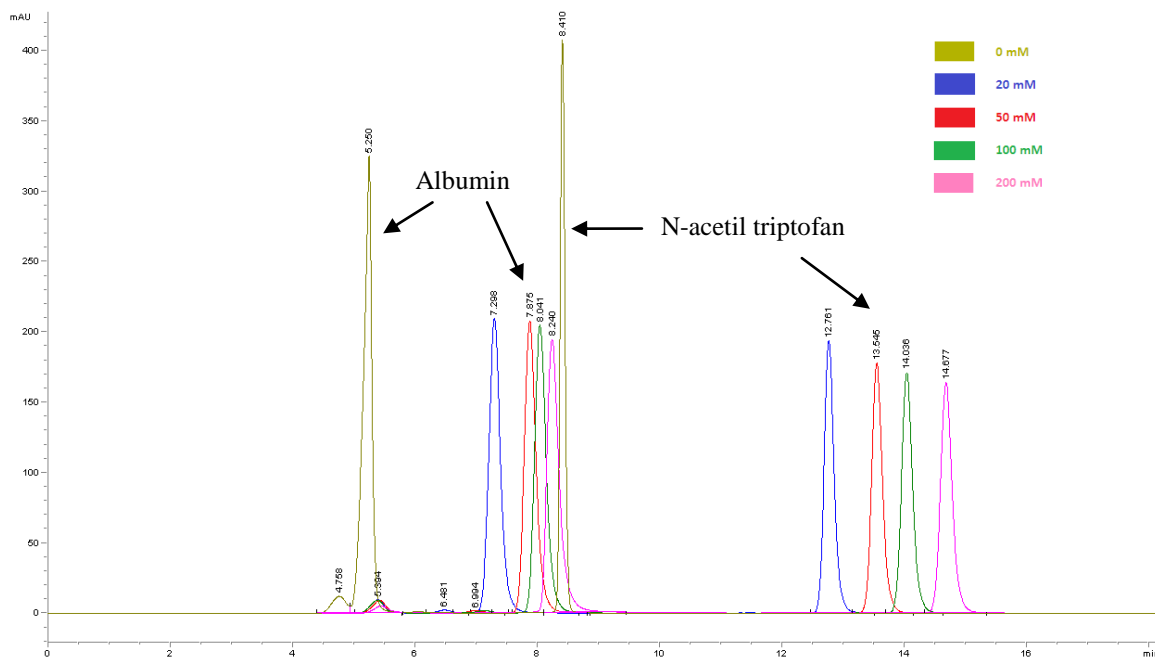
Slika 6: Zmes standarda proteinov: vpliv različne koncentracije puфра; metode 1-4, Preglednica VI.

4.1.1.2 Albumin

Na kromatogramu albumina sta opazna dva večja kromatografska vrhova (Slika 7). Prvi predstavlja albumin, medtem ko smo za drugega predvidevali, da pripada N-acetil triptofanu, ki je prisoten v standardu albumina. To domnevo potrjuje tudi dejstvo, da N-acetil triptofan v strukturi vsebuje aromatski obroč. Detekcijo smo izvajali pri valovni dolžini 276 nm, kjer so namreč zaznavni aromatski strukturni elementi. Manjši vrhovi pri krajših t_R pa verjetno predstavljajo agregate albumina.

Ugotovili smo, da večja koncentracija puфра povzroči pomik kromatografskih vrhov albumina in N-acetil triptofana k daljšim t_R . Vpliv koncentracije fosfatnega puфра je manjši pri albuminu, saj se t_R albumina pri povišani koncentraciji fosfatnega puфра manj pomakne na desno. Ker se vrh N-acetil triptofana pojavi za pikom topila, sklepamo, da obstajajo določene interakcije N-acetil triptofana s kolono, ki ga zadržijo dalj časa na koloni.

Na obliko vrha albumina koncentracija mobilne faze nima posebnega vpliva, zato ugotavljamo, da so vse metode ustrezne za albumin.



Slika 7: Albumin: vpliv različne koncentracije puфра; metode 1-5, Preglednica VI.

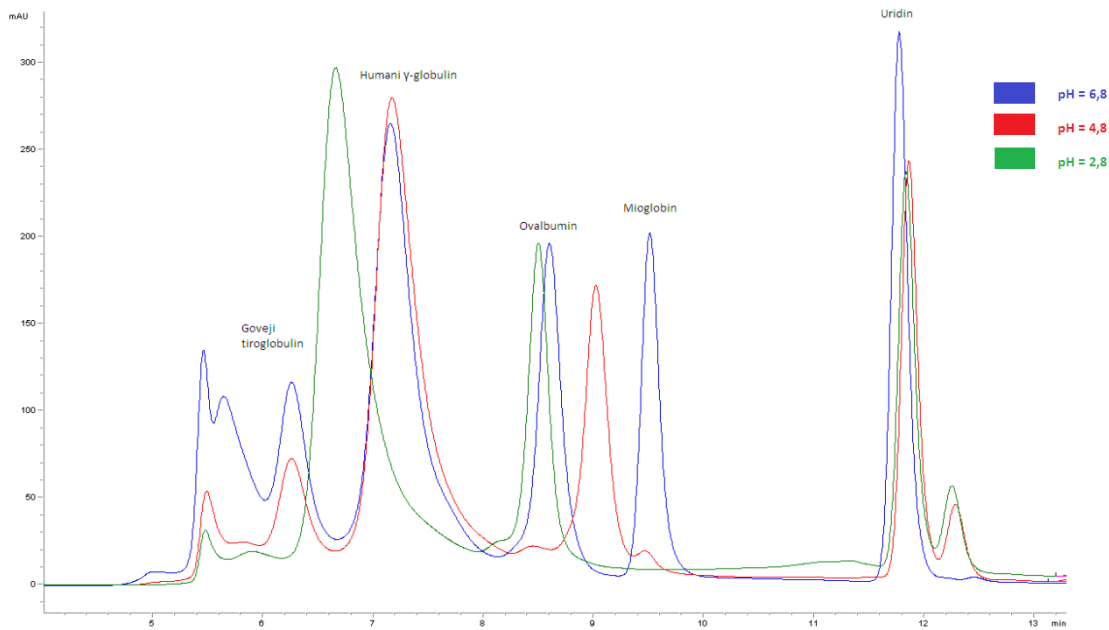
4.1.2 VPLIV pH MOBILNE FAZE

Poleg pH 6,8, ki je podan za zmes standarda proteinov smo preverili tudi razporeditev in obliko kromatografskih vrhov proteinov pri spremembi pH mobilne faze. Pripravili smo 100 mM fosfatni pufer s pH 2,8, 4,8 in 6,8 (metode 3, 6 in 7, Preglednica VI).

4.1.2.1 Zmes standarda proteinov

Ugotovili smo, da pri pH mobilne faze 4,8 in 2,8 ni več jasne ločitve ovalbumina in mioglobina, saj vidimo le en kromatografski vrh, ne vemo pa, kateremu proteinu pripada (Slika 8). Tudi vrh govejega tiroglobulina pri pH 2,8 ni več viden. Sprememba pH pa ne vpliva na obliko vrhu humanega γ -globulina, pri nizkem pH se ta nekoliko pomakne k krajšim t_R . Na t_R uridina sprememba pH mobilne faze ne vpliva. Z znižanjem pH MF se zmanjša tudi prvi vrh, s čimer sklepamo, da nizek pH povzroči cepitev agregatov proteinov. To je tudi v skladu z literaturnimi podatki, ki pravijo, da pri nižjem pH ni favoriziran nastanek agregatov (11).

S spreminjanjem pH fosfatnega puфра kot mobilne faze smo ugotovili, da je najprimernejši pH za ločevanje zmesi standarda proteinov pri 6,8, saj so kromatografski vrhovi proteinov simetričnih oblik, medtem ko se v nižjem pH območju začnejo posamezni vrhovi združevati in ne moremo več identificirati kateremu proteinu pripadajo.

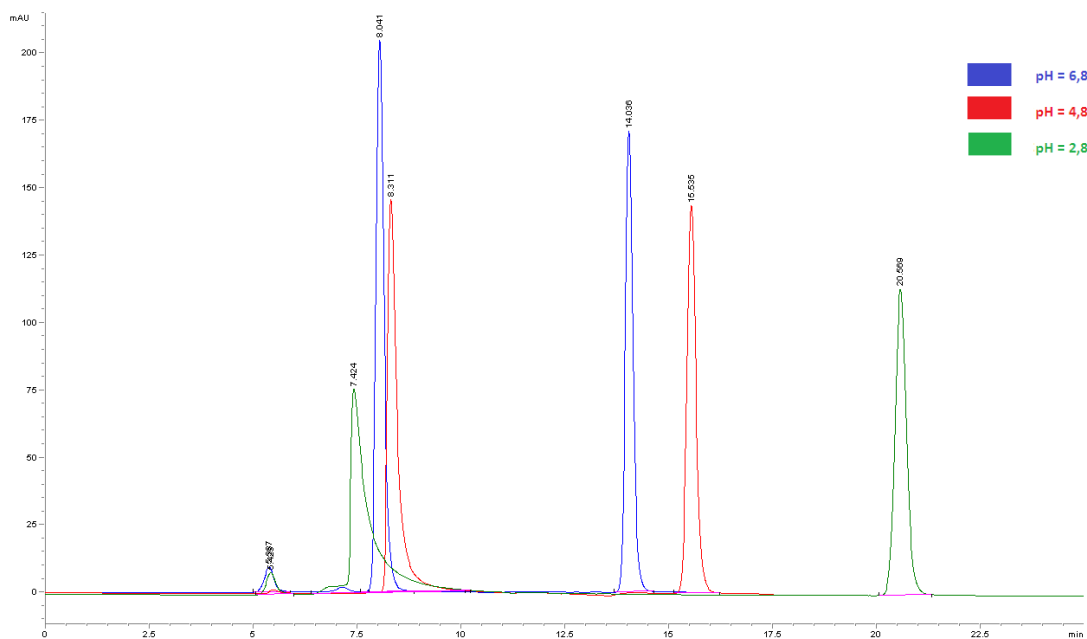


Slika 8: Zmes standarda proteinov: vpliv različnega pH MF; metode 3, 6, 7, Preglednica VI.

4.1.2.2 Albumin

Znižanje pH mobilne faze deluje na kromatografski vrh albumina tako, da se ta zmanjša in postane širši (Slika 9). Bistvene razlike v površini ni. Vrh pri pH 4,8 se v primerjavi s pH 6,8 pomakne k daljšemu t_R , medtem ko se pri pH 2,8 pomakne k krajšemu t_R . Enako se z nižjim pH niža tudi vrh N-acetil triptofana in pomika k daljšemu t_R .

Ugotovili smo, da je pri albuminu najbolj ustrezen pH fosfatnega pufra 6,8.



Slika 9: Albumin: vpliv različnega pH MF; metode 3, 6, 7, Preglednica VI.

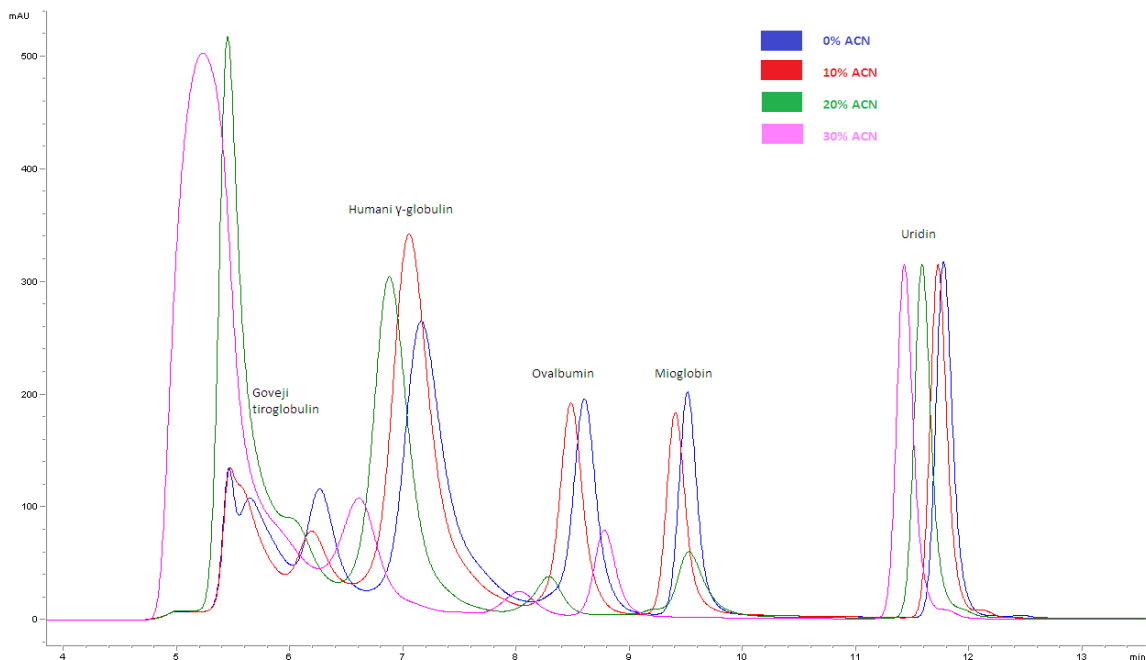
4.1.3 VPLIV DODATKA ACETONITRILA MOBILNI FAZI

V nadaljevanju smo preverili tudi retencijski čas in obliko kromatografskih vrhov zmesi standarda proteinov in albumina ob dodatku organske komponente k pripravljeni raztopini 100 mM fosfatnega pufru. Raztopini pufru smo dodali različne deleže acetonitrila, in sicer 0-30 % (Preglednica VI, metode 3, 8, 9, 10).

4.1.3.1 Zmes standarda proteinov

Z dodatkom acetonitrila raztopini pufru se kromatografska vrhova ovalbumina in mioglobina precej nižata, pri višjih deležih acetonitrila pa se tudi vrhovi ostalih proteinov nižajo (Slika 10). Pri 30 % acetonitrila ni več jasno viden vrh govejega tiroglobulina. Pri višjem deležu acetonitrila se poveša in razširi prvi vrh, ki verjetno predstavlja agregate proteinov. Hkrati pa se več ne ločita vrhova govejega tiroglobulina in agregatov proteinov. Delež acetonitrila na velikost in obliko vrha uridina nima vpliva, tudi t_R se le malo spremeni. Sklepamo, da je z večjim deležem acetonitrila večja verjetnost denaturacije proteinov in posledično večje število nastalih agregatov proteinov.

Za zmes standarda proteinov je tako najprimernejša mobilna faza z nizkim deležem oziroma brez dodatka acetonitrila.

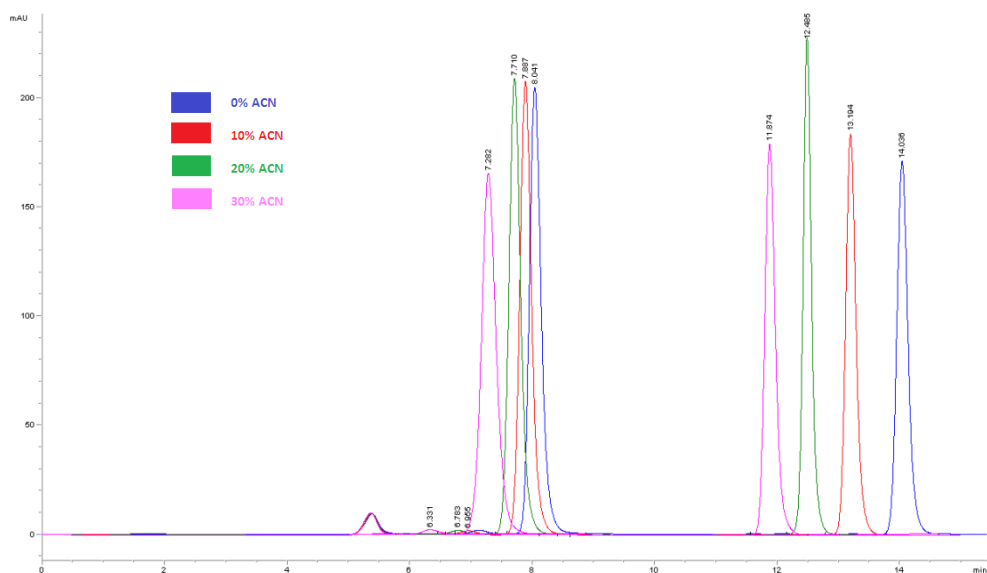


Slika 10: Zmes standarda proteinov: vpliv različnega deleža ACN; metode 3, 8, 9, 10, Preglednica VI.

4.1.3.2 Albumin

Z dodatkom acetonitrila se t_R albumina le malo spremeni, medtem ko je večji vpliv acetonitrila na N-acetil triptofan (Slika 11). Do 20 % deleža acetonitrila se oblika kromatografskega vrha albumina ne spreminja, pri 30 % acetonitrila pa postane vrh nižji in širši. Površina vrha albumina pa se pri tem ne spremeni.

Za albumin je tako ustrezna mobilna faza z deležem acetonitrila do 20 %.

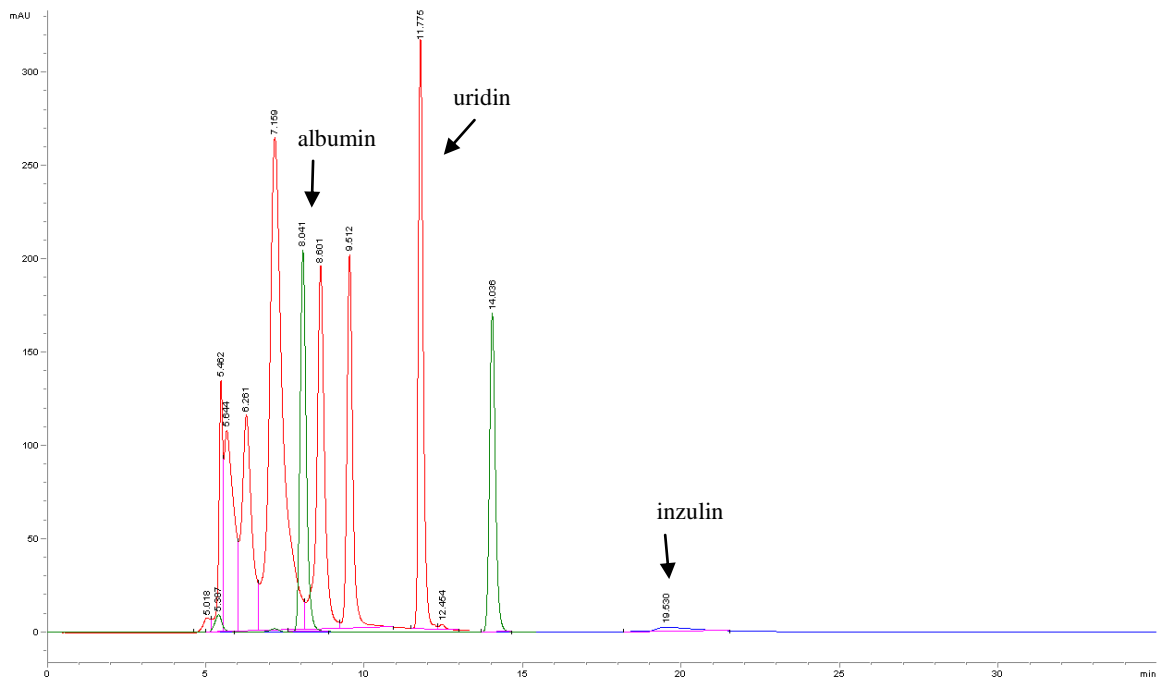


Slika 11: Albumin: vpliv različnega deleža ACN; metode 3, 8, 9, 10, Preglednica VI.

4.2 APLIKACIJA SEC METODE NA INZULIN

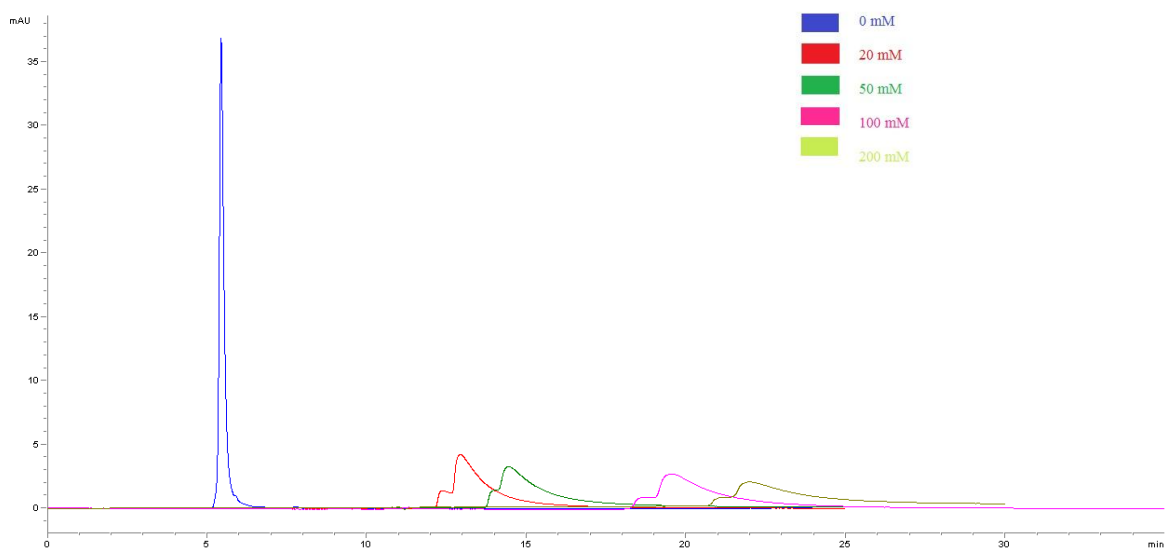
Ob ugotavljanju vpliva različnih modifikacij mobilne faze na proteine smo izbrali metodo, ki se je pri zmesi standarda proteinov in albumina izkazala za najustreznejšo. Tako smo izbrali smo MF s 100 mM fosfatnim pufrom in pH uravnanim na 6,8 (metoda 3, Preglednica VI). Pri tej mobilni fazi se kromatografski vrhovi zmesi standarda proteinov dobro ločijo. Tudi vrh albumina je simetričen in pride iz kolone pri t_R , ki glede na ostale proteine zmesi standarda približno ustreza njegovi velikosti. Zato smo pri tej mobilni fazi injicirali tudi inzulin. Glede na molekulsko maso inzulina smo pričakovali kromatografski vrh pri približno desetih minutah. Na naše presenečenje se je vrh inzulina (velikost monomerne oblike je približno 5,8 kDa), pojavil pri 19,5 minutah, kar je v primerjavi z uridinom (0,244 kDa) pri skoraj dvakrat daljšem t_R (Slika 12). To pomeni, da obstajajo interakcije inzulina s stacionarno fazo in se zato zadrži dalj časa na njej. Vrh inzulina je raztegnjen čez daljši čas, kar še dodatno potrdi

domneve o interakcijah na koloni. Torej je izbrana metoda ustrezna za določitev albumina in zmesi standarda proteinov, ne pa tudi za inzulin.



Slika 12: Zmes standarda proteinov, albumin in inzulin; metoda 3, Preglednica VI.

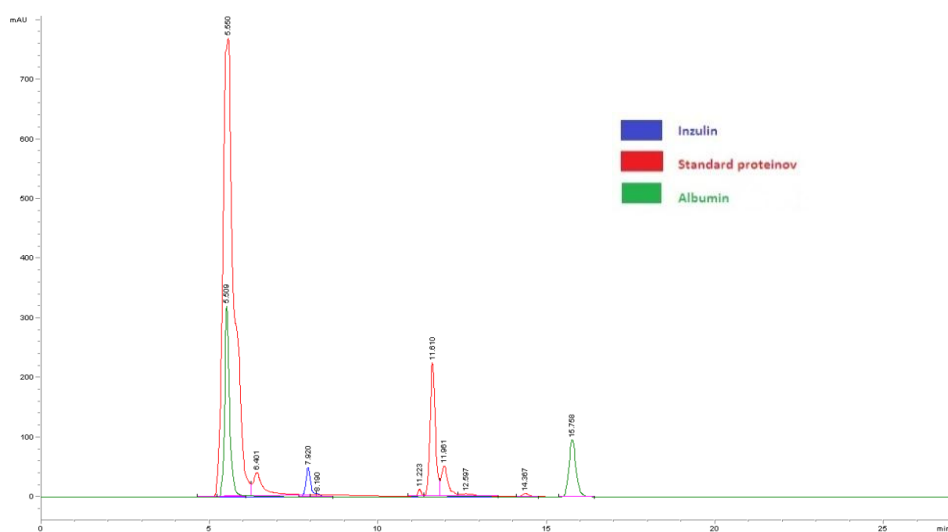
V nadaljevanju smo tudi ugotovili, da se z večanjem koncentracije fosfatnega pufru kromatografski vrh inzulina pomika k daljšim t_R in postaja bolj razvlečen, kar pomeni daljše zadrževanje inzulina na koloni (Slika 13). Sklepamo, da večja koncentracija pufru poveča interakcije inzulina s SF, kar povzroči daljše zadrževanje na koloni.



Slika 13: Standard humanega inzulina; vpliv različne koncentracije pufru; metode 1-5, Preglednica VI.

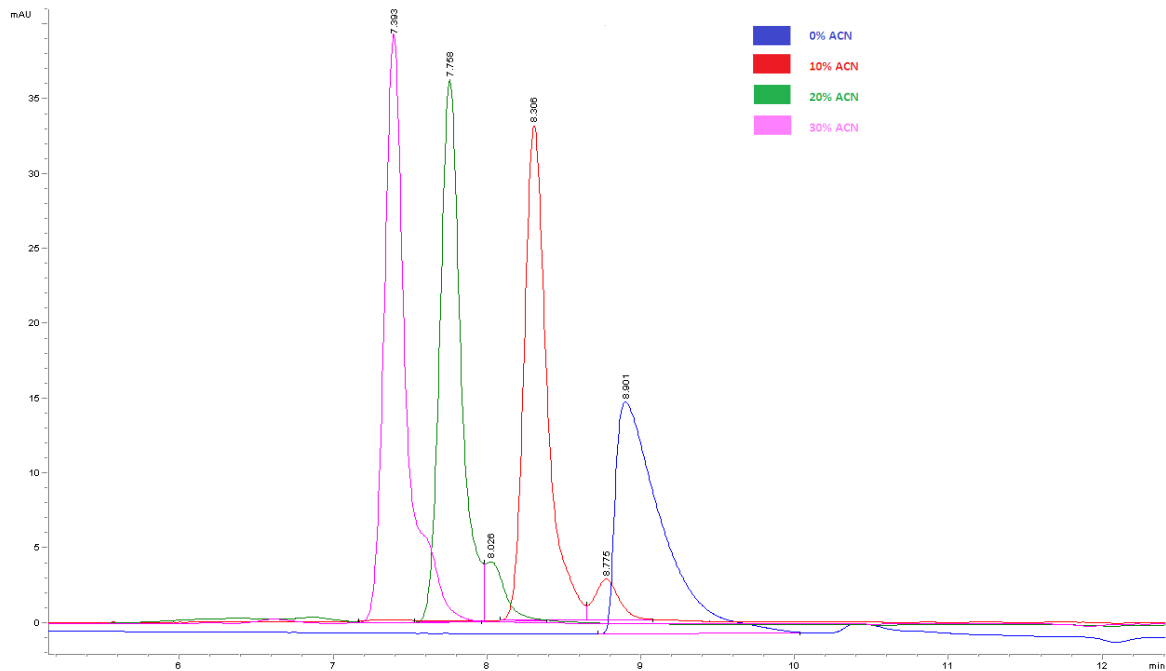
Ker izbrana MF (metoda 3, Preglednica VI) ni primerna za inzulin, smo se odločili za spremembo sestave mobilne faze. Kot izhodišče smo uporabili metodo, ki je opisana v Evropski farmakopeji 6.0 (31) za določanje različnih oblik inzulina, vendar smo jo nekoliko modificirali. V farmakopeji je za določanje vsebnosti inzulina z metodo HPLC-SEC za mobilno fazo podana kombinacija 100 % očetne kisline (glacialna kislina), L-arginina (1 g/L) in acetonitrila v volumskem razmerju 15:65:20. Po farmakopejski metodi ima pripravljena mobilna faza pH ~ 2,2, Ker bi ta pH vrednost lahko vplivala na ustreznost rezultatov in življenjsko dobo kolone, smo uporabili nekoliko modificirano sestavo mobilne faze. Uporabljali smo namreč kolono BioSep-SEC-S 2000, katere delovno območje je med pH 2,5 in 8,5. Zato smo pripravili mobilno fazo z enako koncentracijo L-arginina kot je navedena v farmakopeji (1g/L) in uravnali pH z očetno kislino na 2,8. Delež acetonitrila je ostal enak (20 %) (metoda 13, Preglednica VI). Preizkusili smo tudi mobilno fazo z mejno vrednostjo pH 2,5 (metoda 15, Preglednica VI), pri kateri nismo ugotovili bistvene razlike pri obnašanju analiziranih vzorcev inzulina, zato smo se odločili za MF s pH = 2,8.

Na kolono smo nato poleg inzulina injicirali tudi zmes standarda proteinov in albumin (Slika 14). Kromatografski vrh inzulina je pri tej metodi pred vrhom uridina in je simetrične oblike. Ugotovili pa smo, da se z dodatkom acetonitrila v mobilno fazo proteini zmesi standarda proteinov ne ločijo, saj se skoraj vsi eluirajo istočasno. Vrh albumina se prekriva z vrhom zmesi standarda proteinov, medtem ko se vrh N-acetil triptofana še vedno eluira za vrhom topila. S tem smo potrdili primernost farmakopejske metode za inzulin, vendar hkrati neprimernost te za ostale proteine (albumin in zmes standarda proteinov) in posledično ni ustrežna za določevanje velikosti agregatov inzulina na osnovi primerjave z zmesjo standarda proteinov.



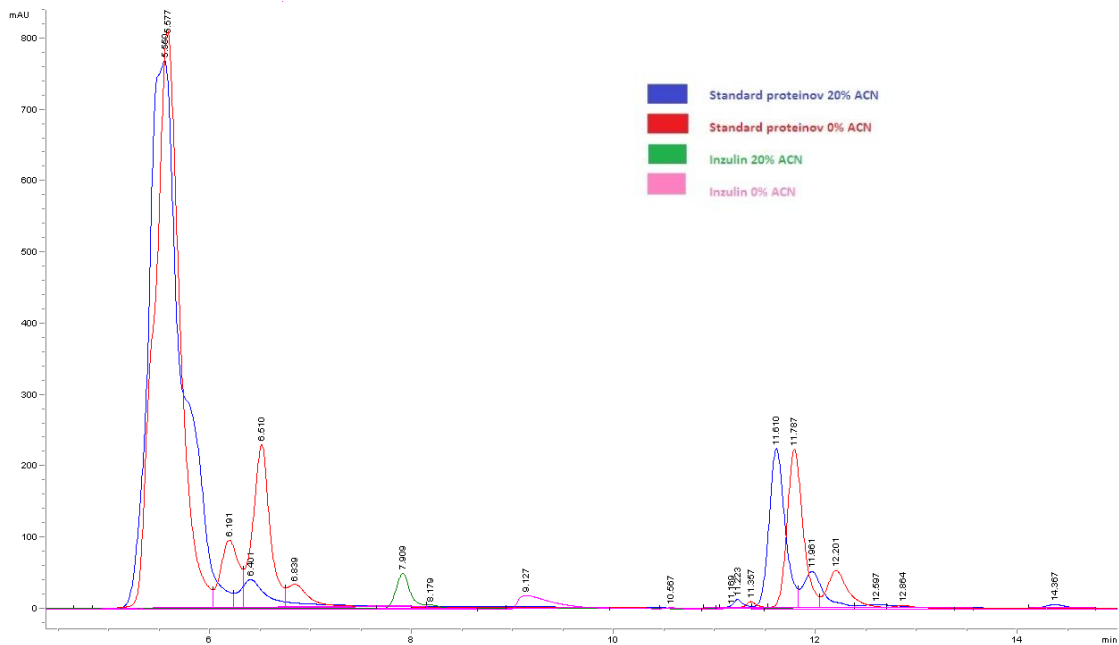
Slika 14: Zmes standarda proteinov, inzulin in albumin; metoda 13, Preglednica VI.

Kromatografski vrh inzulina pri mobilni fazi L-arginina 1 g/L in dodatku očetne kisline do pH = 2,8 je pravilne in simetrične oblike, če dodamo ACN (metode 11-14, Preglednica VI), medtem ko je brez njegovega dodatka razpotegnjen in pride iz kolone pri daljšem t_R (Slika 15). Pri dodatku ACN se kromatografski vrh inzulina pojavi pri krajšem t_R , postane višji in ožji.



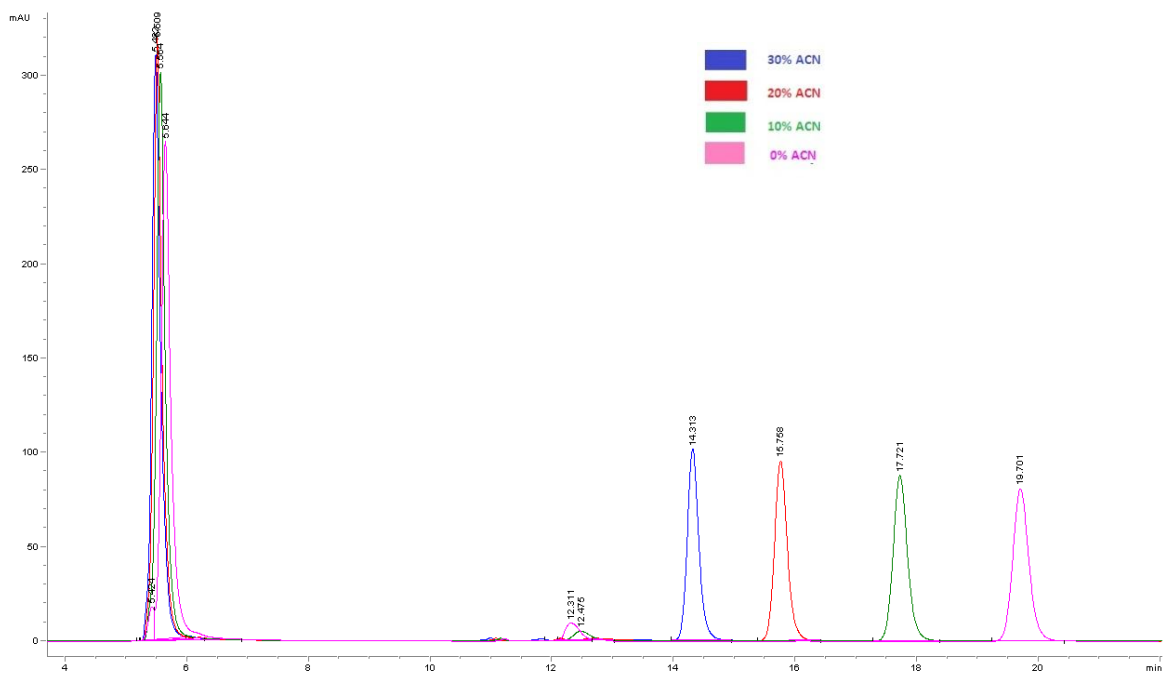
Slika 15: Inzulin; vpliv različnega dodatka ACN; metode 11-14, Preglednica VI.

Primerjali smo tudi obnašanje inzulina in zmesi standarda proteinov ob različnem deležu acetonitrila (Slika 16) (metoda 11 in 13, Preglednica VI). Kot smo že predhodno ugotovili, je kromatografski vrh inzulina brez dodatka ACN razvlečen in pri daljšem t_R , medtem ko je pri dodatku ACN pravilne in simetrične oblike in pride iz kolone pri krajšem t_R . Pri zmesi standarda proteinov vpliva dodatek ACN ravno obratno kot pri inzulinu. Proteini iz zmesi standarda proteinov se pri mobilni fazi brez ACN nekoliko ločijo, medtem ko se pri MF z 20 % deležem acetonitrila eluirajo vsi proteini skupaj pri krajšem t_R . V obeh primerih pa je težko določiti, kateri kromatografski vrh predstavlja posamezen protein iz zmesi standarda proteinov.



Slika 16: Zmes standarda proteinov in inzulin; metoda 11 in 13, Preglednica VI.

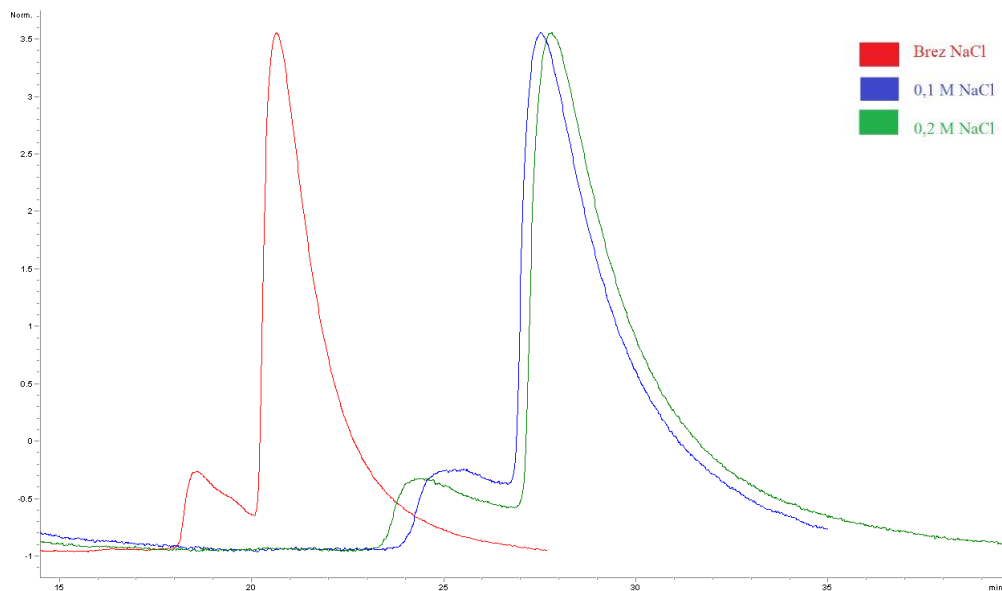
Pri albuminu je sprememba t_R ob različnem deležu acetonitrila le minimalna, oblika vrha pa pri tem ostaja enaka (Slika 17). Vrh se tako pojavi pri krajšem t_R . Vrh N-acetil triptofana se ob povečanju deleža acetonitrila pomika k krajšim t_R . Tako smo ugotovili, da delež acetonitrila v mobilni fazi ne vpliva na položaj vrhov albumina, ker se ta že v primeru odsotnosti ACN v MF ne ujame v pore delcev kolone in se posledično eluira ob kratkem t_R .



Slika 17: Albumin: različen delež ACN; metode 11-13, Preglednica VI.

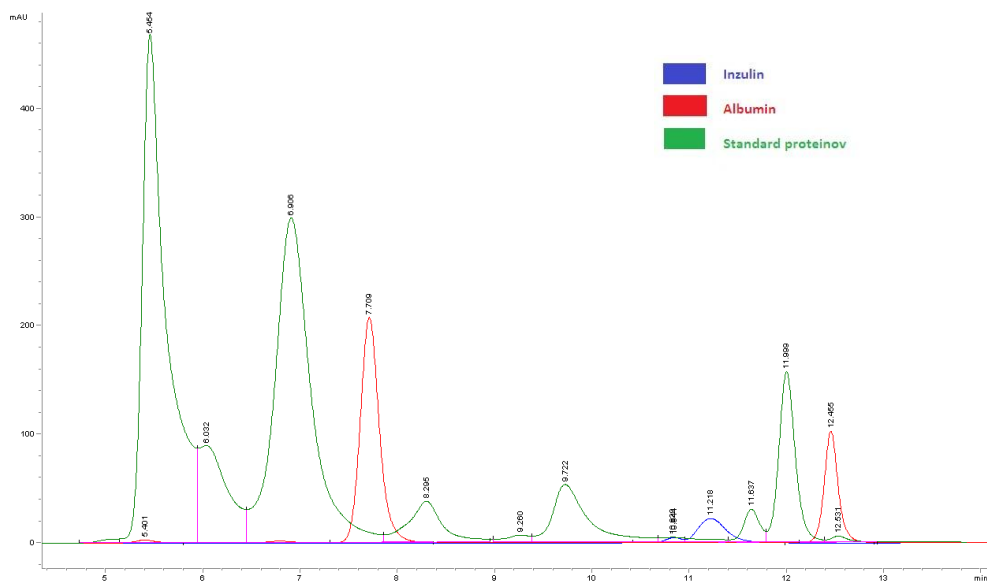
Ugotovili smo, da je mobilna faza L-arginina in acetonitrila primerna za inzulin in neustrezna za ločitev zmesi standarda proteinov in tako tudi za določitev velikosti posameznih proteinov. Medtem ko je mobilna faza s fosfatnim pufrom pri višjem pH ustrezna za ločitev zmesi standarda proteinov in albumina, je hkrati neustrezna za inzulin.

Z namenom da bi pripravili mobilno fazo primerno tako za inzulin kot ostale proteine, smo mobilni fazi s fosfatnim pufrom dodali NaCl (metoda 16 in 17, Preglednica VI), ki naj bi zmanjšal interakcije posameznih komponent vzorca s kolono (22, 26). Pripravili smo raztopini za mobilno fazo z dodatkom NaCl v koncentraciji 0,1 oz. 0,2 M. S tem smo pričakovali, da se bo kromatografski vrh inzulina pojavil pri krajšem t_R . Vendar so analize pokazale, da se vrh inzulina pojavi pri še daljšem t_R , kar pomeni, da dodatek NaCl ne zmanjša ampak poveča interakcije inzulina s kolono (Slika 18).



Slika 18: Inzulin: dodatek NaCl; metode 3, 16, 17, Preglednica VI.

Da bi preprečili interakcije inzulina s kolono, smo se odločili preizkusiti še kombinacijo obeh mobilnih faz (fosfatnega pufra in L-arginina) (metoda 18, Preglednica VI) in preveriti možnost hkratne določitve inzulina, zmesi standarda proteinov in albumina v isti mobilni fazi. Po injiciranju vzorcev smo dobili dobro ločene vrhove zmesi standarda proteinov in tudi vrh inzulina se je eluiral pred vrhom topila (Slika 19). Edino pik N-acetil triptofana se še vedno zadrži na koloni, a ta v okviru našega dela nima pomembne vloge. Na ta način smo dobili MF primerno za sočasno analizo inzulina, albumina in zmes standarda proteinov.



Slika 19: Standard proteinov, albumin in inzulin; metoda 18, Preglednica VI.

4.3 DOLOČITEV MOLEKULSKE MASE ALBUMINA IN INZULINA

Po izbiri najbolj ustrezne mobilne faze za sočasno analizo inzulina, albumina in zmesi standarda proteinov smo se odločili, da preizkusimo možnost določitve molekulske mase albumina in inzulina z izbrano SEC metodo (metoda 18, Preglednica VI). Na kolono smo najprej injicirali zmes standarda proteinov, nato pa še albumin in inzulin (Slika 19). Molekulske mase proteinov standarda so 670 kDa za goveji tiroglobulin, 150 kDa za humani γ -globulin, 44 kDa za ovalbumin, 17 kDa za mioglobulin in 0,244 za kDa za uridin (33). Znana MM albumina znaša približno 66 kDa, pri inzulinu pa v obliki monomera 6 kDa, dimera 12 kDa in v primeru heksamera 36 kDa.

Na podlagi dobljenih t_R posameznega proteina v zmesi standarda proteinov in njihove MM v obliki logMM smo narisali umeritveno premico (Slika 20). Iz enačbe umeritvene premice smo nato izračunali MM albumina in inzulina.

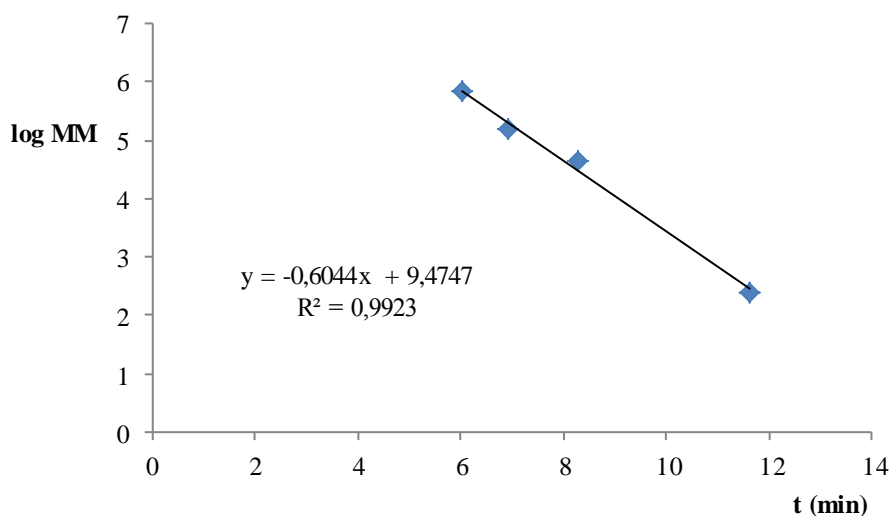
Izračunana MM albumina znaša 65,3 kDa, kar se ujema z dejansko MM albumina, medtem ko smo pri inzulinu dobili veliko manjšo MM od dejanske, neglede v kateri obliki bi se inzulin nahajal (Preglednica VII in VIII). Pri inzulinu sta na kromatogramu vidna dva vrhova, in sicer prvi manjši vrh, ki po naših domnevah predstavlja kovalentni dimer inzulina, drugi pa inzulin.

Tako smo pokazali, da pri izbrani MF lahko ustrezno določimo MM albumina, medtem ko MM inzulina ne moremo določiti. Glede na predhodne analize je to v skladu s pričakovanji, saj se inzulin obnaša drugače kot ostali proteini v okviru preverjanja SEC metode.

Preglednica VII in VIII: Zmes standarda proteinov za umeritveno premico in izračunane molekulske mase inzulina in albumina po metodi 18 (Preglednica VI).

Protein	t (min)	MM (kDa)	log MM
Goveji tiroglobulin	6,032	670	5,826075
Humani γ -globulin	6,906	150	5,176091
Ovalbumin	8,295	44	4,643453
Uridin	11,637	0,244	2,387746

Protein	t (min)	MM (kDa)
Inzulin 1	10,844	0,8
Inzulin 2	11,218	0,5
Albumin	7,709	65,4



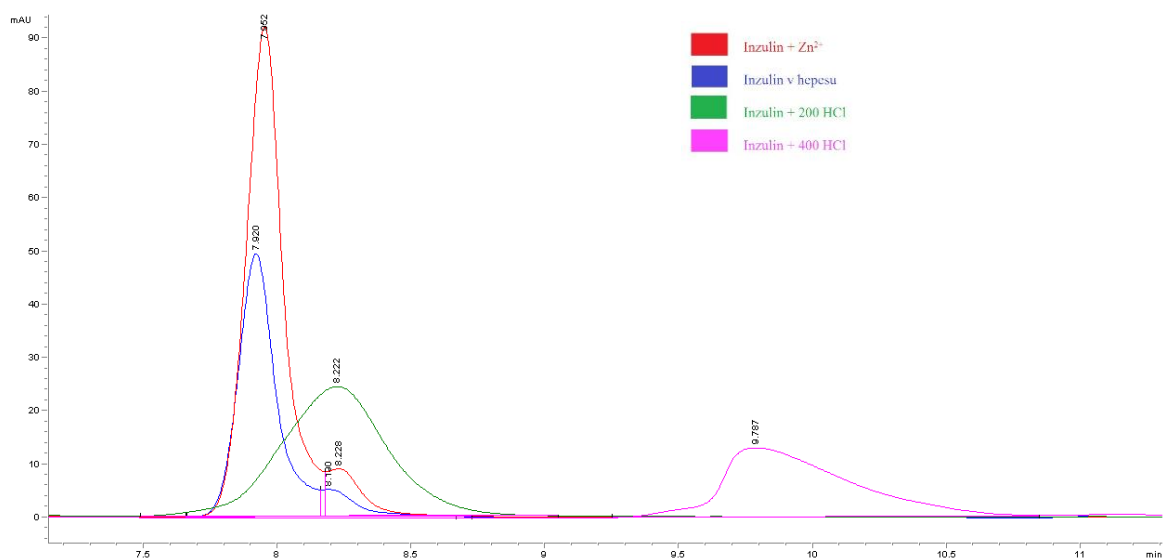
Slika 20: Odvisnost t_R proteinov standarda od log MM; metoda 18, Preglednica VI.

4.4 ZAZNAVA MONOMERA, DIMERA, HEKSAMERA IN KOVALENTNEGA DIMERA INZULINA

Inzulina lahko obstaja kot monomer, dimer ali heksamer. Povezave med posameznimi molekulami inzulina so lahko kovalentne in nekovalentne. V obliki nekovalentne povezave najdemo inzulin kot monomer, dimer in heksamer, nastane pa lahko tudi kovalentni dimer inzulina, katerega določevanje predstavlja tudi enega izmed ciljev naše diplomske naloge. Iz literature smo razbrali, kakšni pogoji so potrebni za nastanek posamezne oblike inzulina. Monomer inzulina je prevladujoča oblika v kislem okolju ($\text{pH} < 2$), kot tudi v nevtralnem pH pri nizkih koncentracijah inzulina ($c < 0,1 \mu\text{M}$). V odsotnosti cinkovih ionov je pri nevtralnem pH prevladujoča dimerna oblika, ob prisotnosti cinkovih ionov v mM koncentracijah inzulina pa je prevladujoča heksamerna oblika inzulina (37). Heksamer je stabilen v območju pH 5-8, je tudi bolj stabilen kot monomer, saj je pri heksameru zmanjšan

dostop do reaktivnih mest. V območju pH med 2 in 4 in temperaturi višji od 35 °C poteka pretvorba inzulina v kovalentni dimer inzulina, ki ga tvorijo disulfidne vezi med cisteini. Iz Evropske farmakopeje 6.0 smo razbrali, da je pri ekvivalentni SEC koloni, MF sestavljena iz L-arginina (1g/L), očetne kisline in ACN v volumskem razmerju 65:15:20 in pretoku 0,5 mL/min kromatografski vrh polimernih kompleksov inzulina med 13 in 17 minut, kovalentnega dimera pri času 17,5 minut, monomera približno 20 minut in soli pri 22 minuti (31, 37).

Zato smo z namenom, da bi preverili uporabnost SEC metode v tem konkretnem primeru, pripravili različne vzorce inzulina, v katerih bi se naj tvorila posamezna oblika inzulina. Pripravljene vzorce smo injicirali na kolono (Slika 21) (metoda 13, Preglednica VI). Ugotovili smo, da se kromatografska vrhova razredčenega inzulina (dimerna oblika) in inzulina z dodatkom cinka (heksamerna oblika) po t_R ne razlikujeta. Oblika vrha je v obeh primerih enaka, medtem ko je površina vrha inzulina z dodanim cinkom dvakrat višja od samega inzulina. Pri vzorcu inzulina z dodano kislino HCl (monomerna oblika), se vrh inzulina razvleče čez daljši čas, površina pa je približno enaka površini inzulina v hepesu pufri.



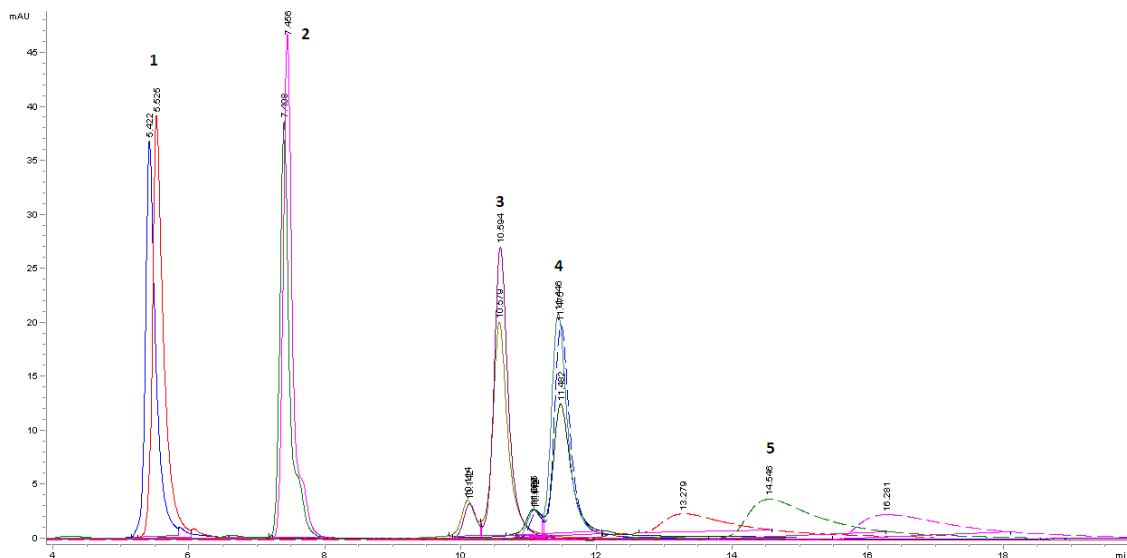
Slika 21: Inzulin, inzulin + 200 (oz. 400) μ L HCl, inzulin + 20 Zn^{2+} ; metoda 13, Preglednica VI.

Ker se kromatografska vrhova monomera in heksamera inzulina ne razlikujeta, smo pripravili tudi mobilno fazo s cinkom (metoda 19 in 20, Preglednica VI), z namenom da bi z mobilno fazo pretvorili vzorec inzulina v obliko heksamera (37). Kromatografski vrhovi so se v tem primeru pojavili ob različnih časih, vendar smo po večkratnih injiciranjih vzorcev ugotovili, da se je vsak nadaljnji vzorec pomikal k daljšemu t_R (Slika 22). Po določenem številu

injiciranj vzorcev pa so se vrhovi ustalili pri enakem t_R neglede na pripravljen vzorec. To pomeni, da rabi MF z dodatkom cinka v primerjavi z ostalimi mobilnimi fazami več časa za vzpostavitev ravnotežja na koloni. Z dodatkom cinka v mobilno fazo v primerjavi z ostalimi MF se vrh inzulina precej zniža, razpotegne čez daljši čas in pomakne k daljšim t_R . To pa je ravno v nasprotju z navedbami iz literature, ki podajajo, da ob dodatku cinka nastane heksamerna oblika inzulina. Tako bi se moral vrh inzulina v tem primeru pojaviti pri krajšem t_R , saj kot prve iz SEC kolone na detektor pridejo molekule z višjo molekulsko maso.

Ob opazovanju oblike kromatografskih vrhov smo ugotovili, da ima vzorec inzulina pri nizkem pH mobilne faze manjši vrh še desno od glavnega vrha, pri višjem pH pa levo od glavnega vrha. Ta vrh verjetno predstavlja razgradni produkt inzulina. S povečanjem pH mobilne faze se vrh pomakne k daljšemu t_R .

S primerjavo različno pripravljenih vzorcev inzulina smo ugotovili, da s pripravo samega vzorca nismo sposobni zaznati želene oblike inzulina (monomer, dimer ali heksamer), saj sestava MF pretvori inzulina, ko ta potuje skozi kolono. Torej sklepamo, da lahko zaznamo določeno obliko inzulina le s spremembo MF, ne pa tudi s pripravo različnih vzorcev. Vendar obstoja posamezne oblike inzulina ne moremo dokazati. To je zanimivo, saj različna literatura navaja obstoj različnih oblik inzulina (monomer, dimer, heksamer in kovalentni dimer), vendar nikjer nismo zasledili ustreznega kromatograma različnih oblik, razen za kovalentni dimer inzulina. Obstoj kovalentne oblike inzulina smo preverili v nadaljevanju pri stabilnostni študiji inzulina, kjer smo nastanek kovalentnega dimera inzulina spremljali pri staranju na povišani temperaturi in stresanju.



Slika 22: Inzulina in inzulina + Zn, vpliv različne MF; preglednica VI: **1** – metoda 5, **2** – metoda 13, **3** – metoda 20, **4** – metoda 19, **5** – metoda 21.

4.5 VREDNOTENJE SEC METODE

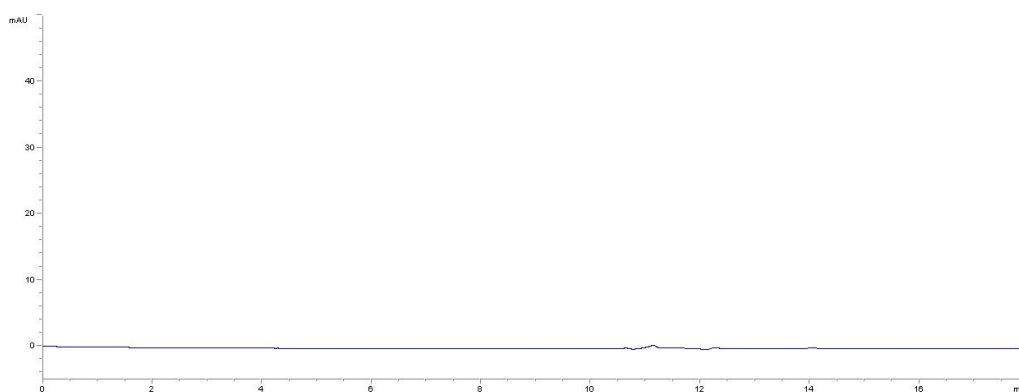
Vrednotenje analizne metode je sistematičen dokumentiran postopek, ki z visoko mero zaupanja zagotavlja, da bo specifičen proces stalno deloval v skladu s predpisanimi specifikacijami in tako ustrezal namenu uporabe.

V okviru vrednotenja optimirane SEC metode za inzulin smo vrednotili selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost in meddnevno ponovljivost (3.2.5 Vrednotenje analizne metode). Metodo (metoda 13, Preglednica VI) smo vrednotili s standardno raztopino inzulina koncentracij od 0,2 do 5 mg/mL (Preglednica VI). Naš cilj je bil ustrezno ovrednoteno metodo prenesti na stabilnostno študijo inzulina.

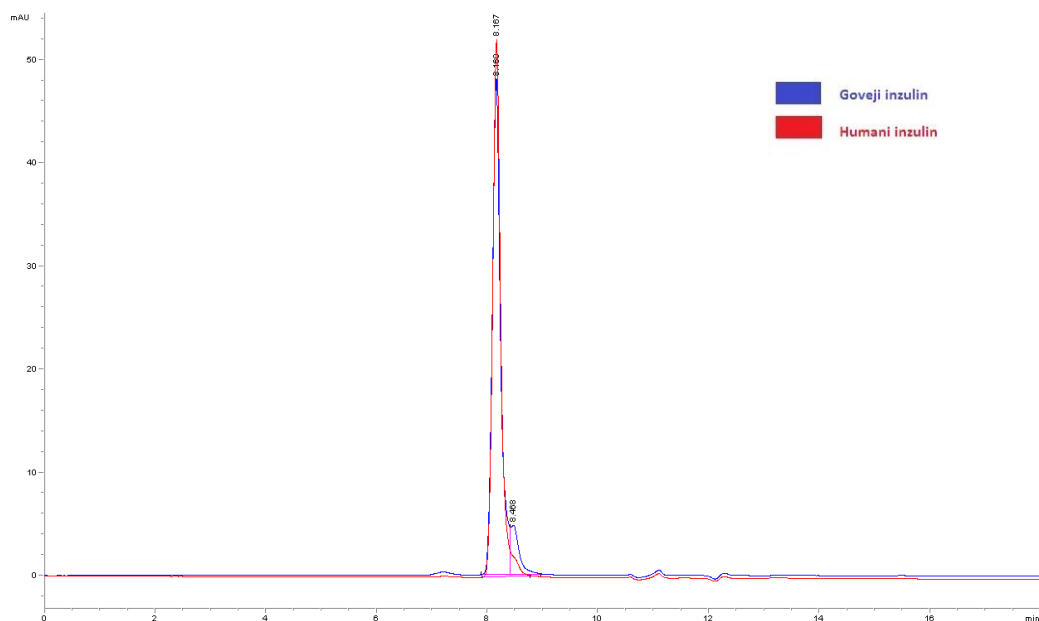
4.5.1 Selektivnost

Ker je standard inzulina je pripravljen v hepes puftru, zato smo najprej preverili, če ni prekrivanja kromatografskih vrhov inzulina in topila. Ob primerjavi kromatogramov standarda humanega inzulina in hepes puftra smo pokazali, da se vrhova topila in inzulina na kromatogramu ne prekrivata, saj pride vrh inzulina iz kolone pri približno 8,6 minutah, vrh hepesa pa pri približno 11 minutah (Slika 23 in 24). Iz primerjave vrhov standarda humanega inzulina in pripravka inzulina Mixtard 30 (Slika 25), je razvidno, da kromatografski vrh pri približno 8,6 minutah pripada inzulinu. Vsi vrhovi so ločeni med sabo. Pri vzorcu pripravljenem iz preparata inzulina sta vidna še dva večja vrhova. Za prvega pri približno 14,5 minutah smo dokazali, da pripada m-krezolu, saj se je ta vrh prekrival z vrhom pripravljenega standarda m-krezola. Vrh pri približno 15,4 minutah pripravka inzulina pa ustreza fenolu, kar smo potrdili na osnovi pripravljenega standarda fenola. V pripravku je prisoten tudi protamin, zato smo injicirali tudi tega in ugotovili, da nima odziva pri 276 nm..

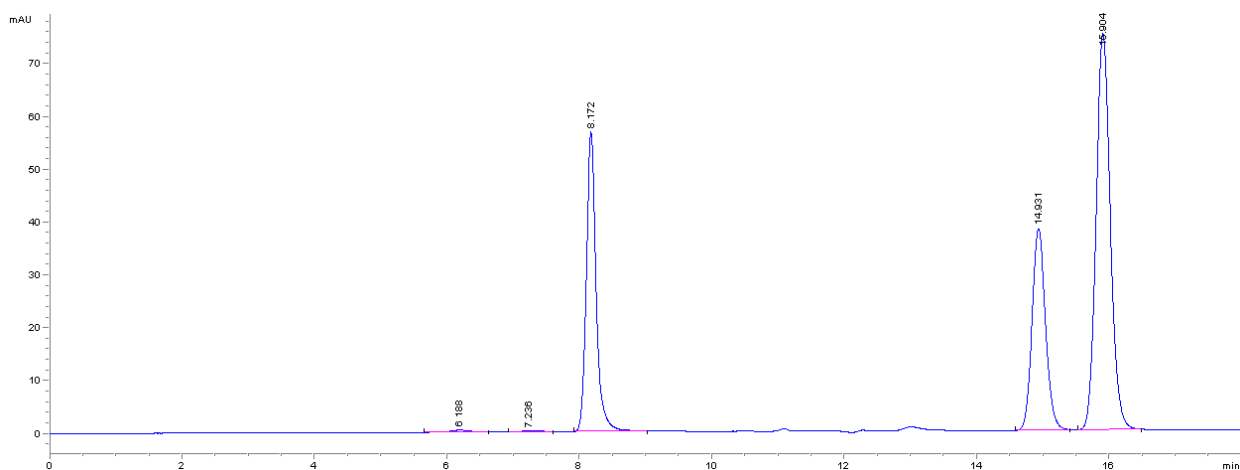
Ugotovili smo še, da s SEC metodo ne moremo ločiti med humanim in govejim inzulinom, saj se vrhova obeh pojavita ob istem t_R . To nam nakazuje tudi molekulska masa, ki je pri obeh skoraj enaka.



Slika 23: Hepes pufer 8,2 – topilo v standardu inzulina; metoda 13, Preglednica VI.



Slika 24: Humani in goveji inzulin; metoda 13, Preglednica VI.



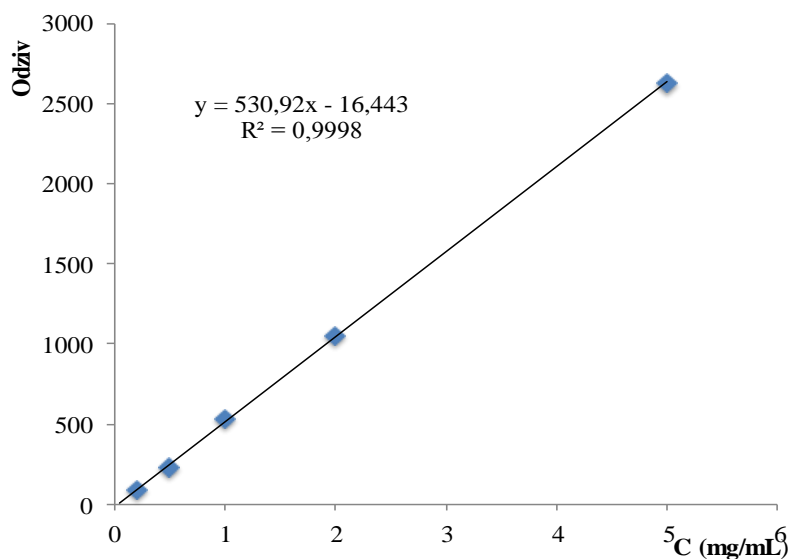
Slika 25: Preparat inzulina; metoda 13, Preglednica VI.

Ker ni prekrivanja kromatografskih vrhov, smo potrdili selektivnost uporabljene SEC metode.

4.5.2 Linearnost in ponovljivost

Iz dobljenih odzivov posameznih koncentracij vzorcev inzulina smo narisali umeritveno premico in določili determinacijski koeficient (R^2) (Slika 26). Odzivi so glede na koncentracijo inzulina v linearni zvezi. Ker je vrednost R^2 0,9998 višja od minimalne predvidene vrednosti (0,99), potrdimo, da je metoda linearna v območju koncentracij inzulina

med 0,2 in 5 mg/mL. Linearnost sistema smo potrdili tudi z odstopanjem od točne vrednosti (Preglednica XI).



Slika 26: Umeritvena premica inzulina s SEC metodo.

Vsak vzorec smo injicirali trikrat zaporedoma in preverili ponovljivost sistema. Odstopanje v odzivu je bilo nižje kot 5 %, zato smo potrdili, da ima sistem ustrezno ponovljivost (Preglednica IX).

Točnost sistema smo določili s tremi kontrolnimi vzorci standarda inzulina s koncentracijo 1 mg/mL in ker nobeno odstopanje koncentracije inzulina ni večje od 5 %, potrdimo točnost sistema.

Preglednica IX: Ponovljivosti pri SEC metodi znotraj enega dneva.

Dejanska koncentracija (mg/mL)	Odziv 1	Odziv 2	Odziv 3	Povprečje odziva	Odstopanje odziva RSD (%)	Izračunana koncentracija (mg/mL)	Odstopanje od točne vrednosti (%)
0,20	86,8	85,5	82,4	84,9	2,9	0,19	4,62
0,50	232,7	232,1	230,5	231,8	0,6	0,47	4,91
1,00	532,5	533,2	531,9	532,5	0,1	1,03	3,44
2,00	1054,5	1054,9	1055,5	1055,0	0,0	2,02	0,90
5,00	2630,8	2634,9	2632,3	2632,7	0,0	4,99	0,22

4.5.3 Meddnevna ponovljivost

Enake vzorce smo z namenom določitve meddnevne ponovljivosti injicirali po trikrat zaporedoma še naslednja dva dneva. Po izračunih smo ugotovili, da se meritve med dnevi ne razlikujejo in da obstaja ustrezna meddnevna ponovljivost merjenja koncentracije pripravljenih vzorcev (Preglednica X).

Preglednica X: Ponovljivost SEC metode med dnevi.

Dejanska koncentracija (mg/mL)	Odziv 1. dan	Odziv 2. dan	Odziv 3. dan	Povprečje odziva	Odstopanje odziva RSD (%)
0,2	84,9	89,9	92,3	89,0	4,6
0,5	231,8	248,8	250,2	243,6	4,8
1,0	532,5	535,4	534,4	534,1	0,1
2,0	1055,0	1069,0	1075,2	1066,4	1,1
5,0	2632,7	2638,5	2662,2	2644,5	0,7

4.6 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA

4.6.1 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA PRI 50 °C

Za stabilnostno študijo smo se odločili zaradi problematične stabilnosti mnogih proteinov, predvsem v smeri nastajanja agregatov med shranjevanjem pri povišani temperaturi in stresanju. Hkrati smo želeli preveriti tudi uporabnost vpeljane SEC metode. V ta namen smo SEC metodo za inzulin aplicirali za vrednotenje inzulina pri stabilnostni študiji. Odločili smo se spremljati upad koncentracije inzulina in preveriti hitrost nastajanja kovalentnega dimera inzulina. Pogoji nastanka tega so navedeni v literaturi (18, 19, 20), ki pravi, da naj bi kovalentni dimer nastajal pri shranjevanju inzulina pri povišani temperaturi, hitrejši nastanek pa naj bi bil še ob sočasnem stresanju vzorcev (15, 16).

Za spremljanje stabilnosti inzulina smo uporabili vzorce predstavljene v Preglednici V.

Analizo vzorcev inzulina smo izvedli z obema SEC metodama, ki sta primerni za inzulin (Preglednica VI, metoda 13 in 18). Po injiciranju inzulina na SEC kolono po shranjevanju na povišani temperaturi smo dobili dva kromatografska vrhova. Prvi, manjši vrh zelo verjetno predstavlja kovalentni dimer inzulina, medtem ko drugi predstavlja monomer inzulina. Po tednih shranjevanja so se pred vrhom kovalentnega dimera inzulina pojavili še dodatni vrhovi, ki zelo verjetno predstavljajo kovalentne oblike inzulina višjih molekulskih mas (HMWT). Na kovalentno obliko inzulina mobilna faza ne vpliva, saj so kovalentne vezi močnejše in

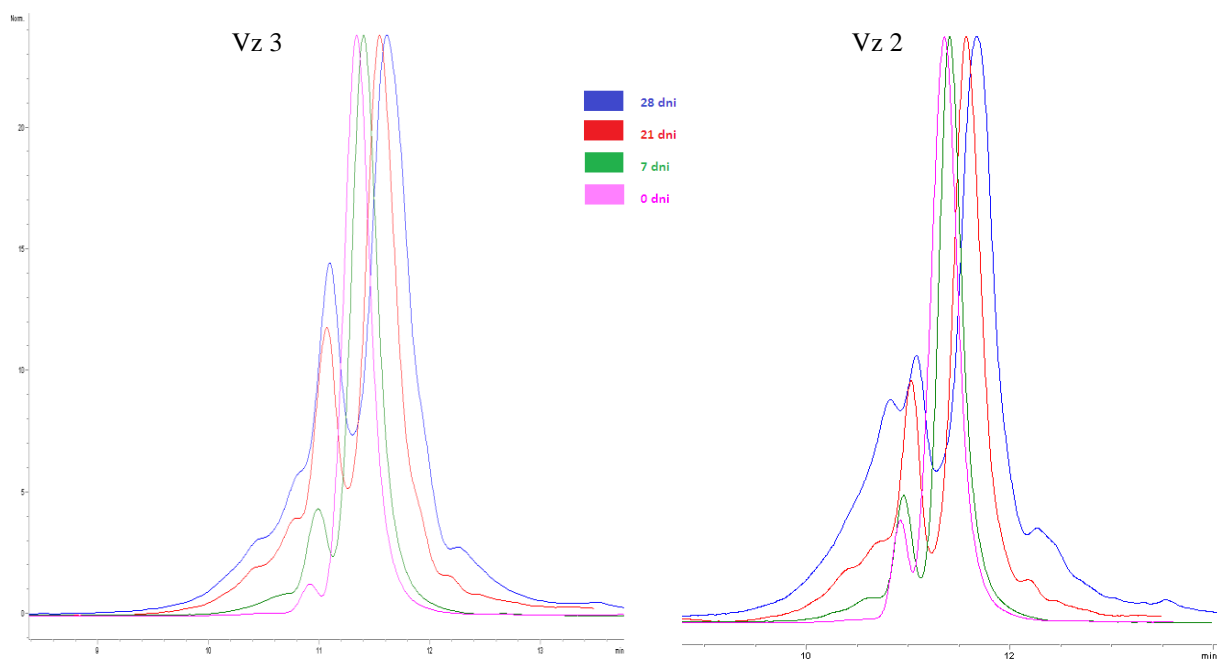
obstojnejše kot nekovalentne (nekovalentni dimeri, heksameri) kar smo že predhodno pokazali (15, 16).

Podatki predstavljeni v nadaljevanju, se nanašajo na metodo 18 (Preglednica VI).

Preglednica XI: Razmerje prisotnosti posamezne oblike inzulina v % (inzulin, CID – kovalentni dimer inzulina, HMWT – oblike inzulina z višjo molekulsko maso) po času shranjevanja pri 50 °C.

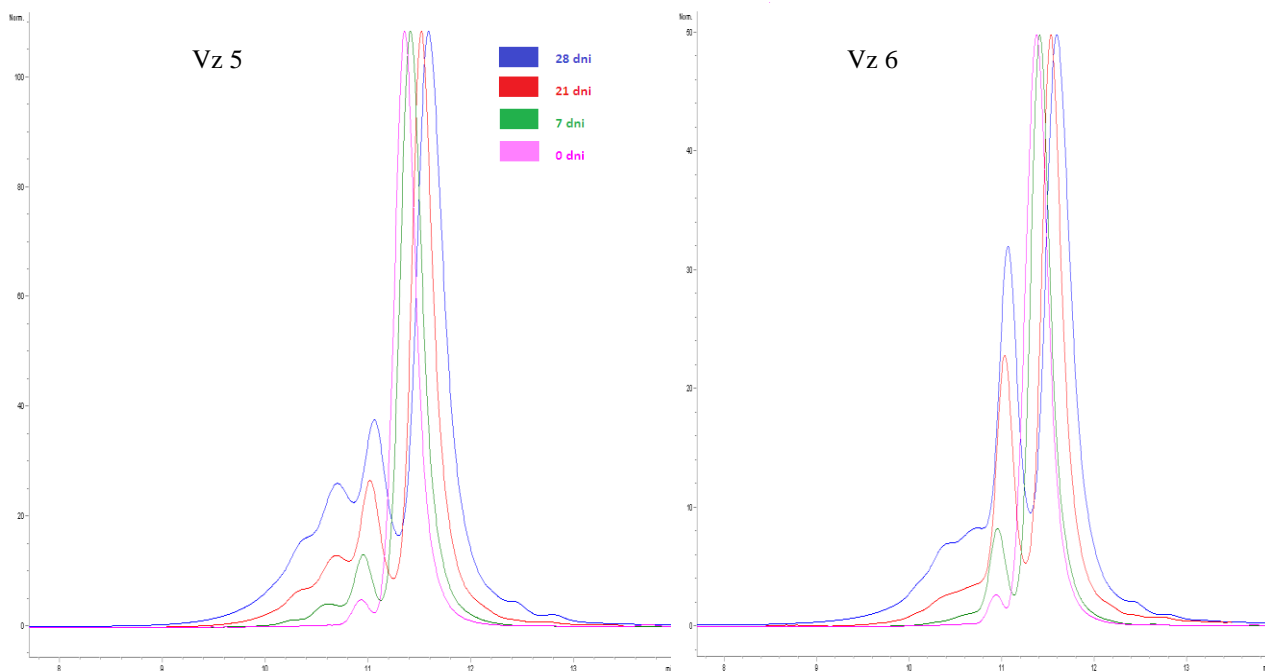
Čas (dnevi)	0			7			14			21			28		
Oblika inzulina Vzorec	Inzulin	CID	HMWT	Inzulin	CID	HMWT	Inzulin	CID	HMWT	Inzulin	CID	HMWT	Inzulin	CID	HMWT
Vz 2	91,28	8,72	0	82,39	13,88	3,73	76,46	17,21	6,33	67,76	19,63	12,61	60,95	14,28	24,77
Vz 3	97,24	2,76	0	85,07	11,84	3,09	75,98	18,33	5,69	65,99	23,83	10,18	62,98	22,93	14,09
Vz 5	97,20	2,80	0	88,07	8,57	3,36	79,97	11,53	8,50	70,06	15,88	14,06	59,78	17,61	22,61
Vz 6	97,25	2,75	0	86,71	11,90	1,39	77,42	18,48	4,10	68,26	24,29	7,45	57,23	25,89	16,88

Po pregledu vzorcev dveh standardov humanega inzulina – Vz 2 in Vz 3 (prvi je bil odprt približno 5 mesecev, drugi pa dobavljen pred to študijo) smo ugotovili, da se je pri obeh s časom povečeval delež kovalentnega dimera inzulina v primerjavi z inzulinom. Pri starejšem standardu inzulina smo že na začetku opazili več kovalentne oblike inzulina. S časom shranjevanja vzorcev inzulina pri 50 °C se je povečeval tudi delež inzulina oblik višjih molekulskih mas, in sicer v večjem obsegu pri starejšem standardu inzulina (Slika 27). Rezultate smo ponazorili z relativno skalo, saj so piki nihali med meritvami po posameznih tednih.



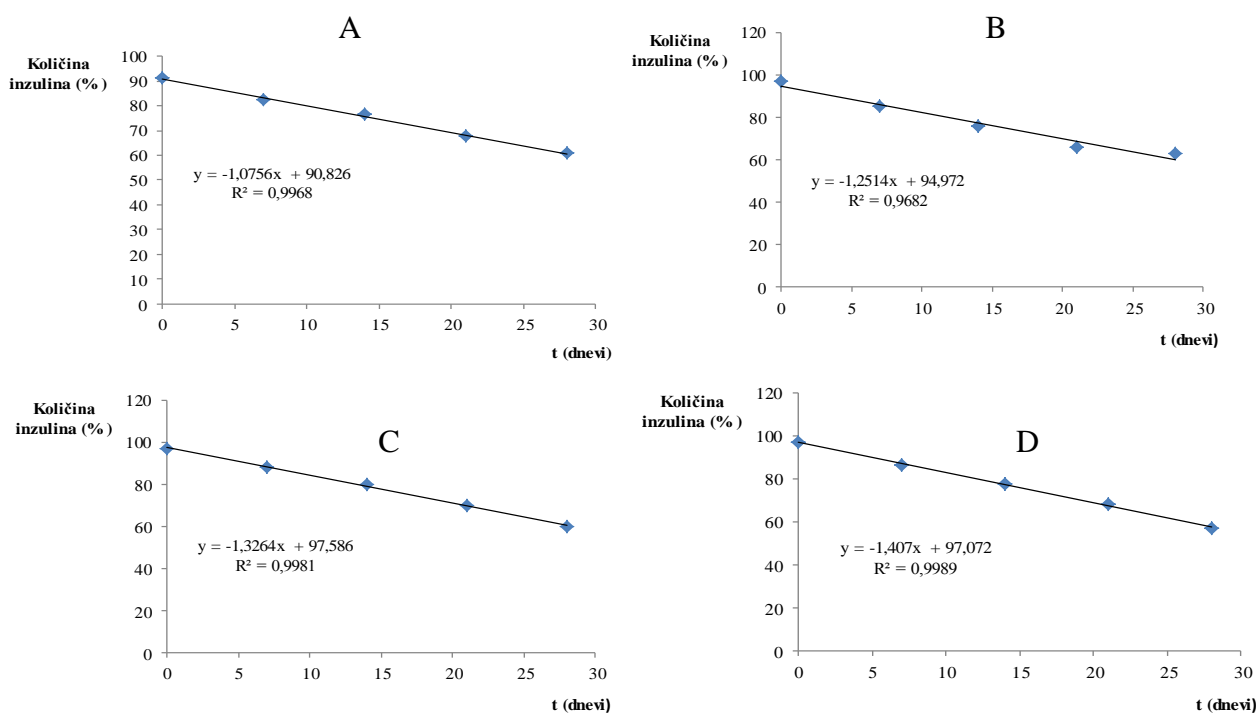
Slika 27: Standard humanega insulina, Vz 2 in Vz 3, Preglednica V; metoda 18, Preglednica VI.

Pri primerjavi humanega insulina redčenega s fosfatnim pufrom različnih pH vrednosti smo ugotovili, da nastaja več kovalentnega dimera insulina pri vzorcu insulina pripravljenem pri višjem pH – Vz 6 (Slika 28).



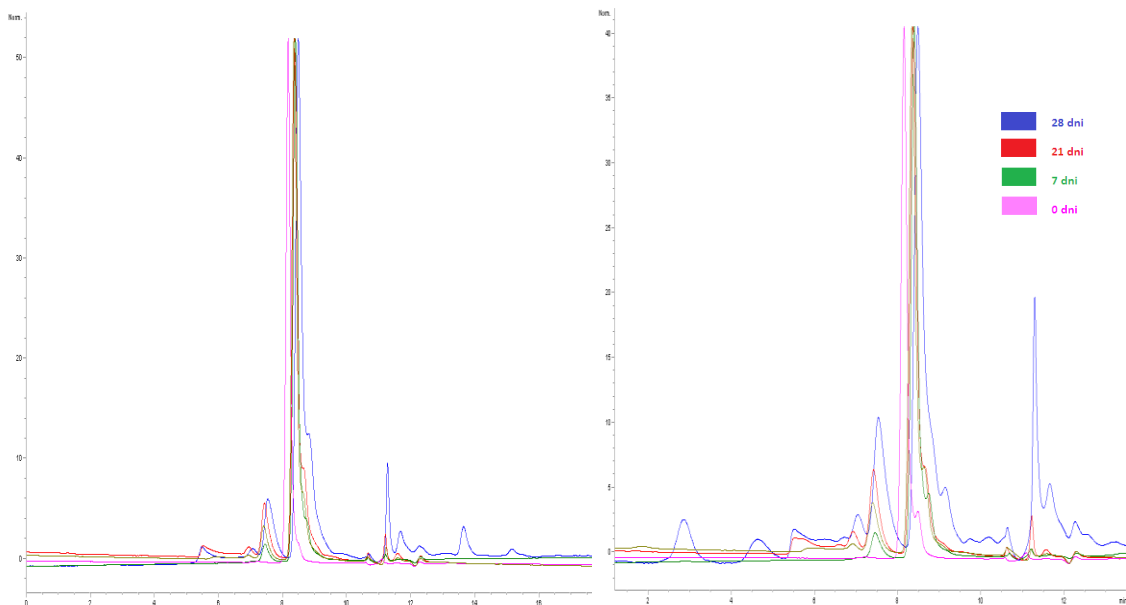
Slika 28: Humani inzulin, Vz 5 in Vz 6, Preglednica V; metoda 18, Preglednica VI.

Pri izračunu deleža pretvorbe inzulina v kovalentni dimer inzulina in dalje do molekul inzulina z višjo molekularno maso smo ugotovili, da je upad vsebnosti inzulina linearen s časom za vse navedene vzorce inzulina iz Preglednice XI (Slika 29). Na začetku je bilo najmanj inzulina prisotnega v vzorcu pripravljenem iz starega standarda inzulina (Vz 2, preglednica V). Že po 7-14 dneh pa se je delež nespremenjenega inzulina izenačil in je kasneje pri vseh vzorcih potekala pretvorba približno enako (Preglednica XI). Po štirih tednih shranjevanja inzulina pri 50 °C je padla vsebnost inzulina v vzorcu iz začetnih 91 % (Vz 2) oziroma 97 % (Vz 3) na približno 60 % pri obeh standardih inzulina. Največji padec inzulina opazimo pri vzorcu v fosfatnem pufru s pH = 6 (Vz 6). Nastanek HMWT se med posameznimi vzorci močno razlikuje. Največ HMWT inzulina nastane pri vzorcu pripravljenem v fosfatnem pufru pH 4. Pri vzorcu Vz 4 in Vz 7 se je skupna koncentracija inzulina v vzorcu s tedni precej znižala.

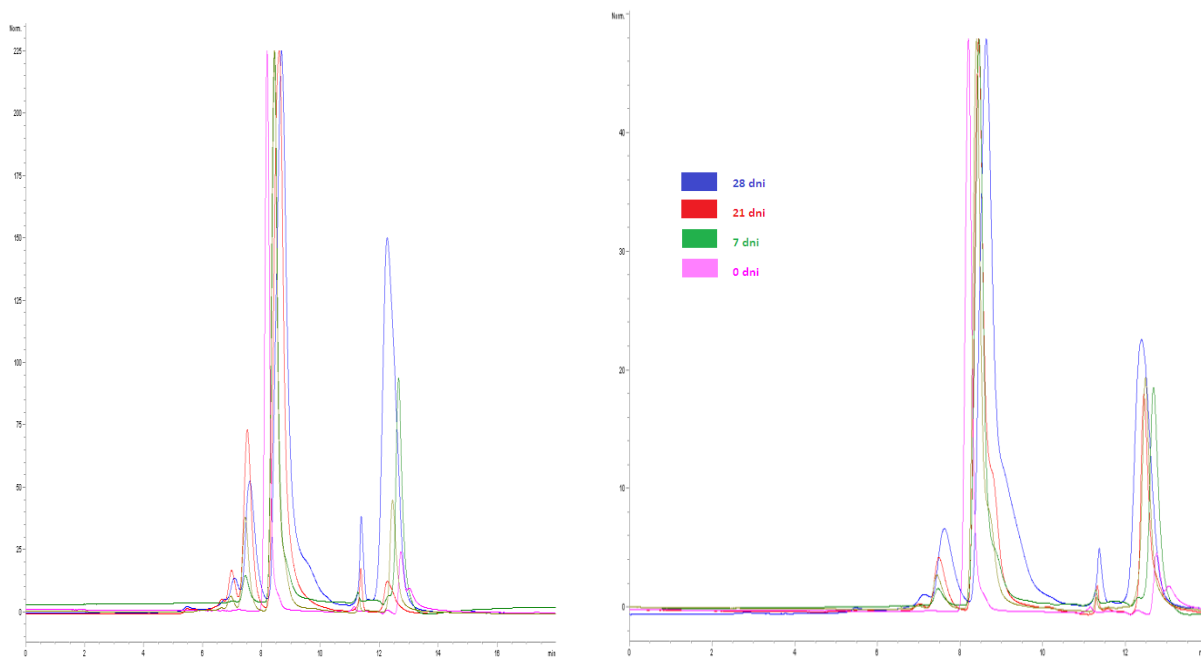


Slika 29: Prikaz linearne odvisnosti zmanjšanja količine inzulina v posameznem vzorcu v odvisnosti od časa. A – Vz 2, B – Vz 3, C – Vz 5, D – Vz 6.

Podobno kot pri metodi 18 (Preglednica VI), smo opazili upad vsebnosti inzulina in nastanek kovalentnega dimera ter HMWT inzulina pri metodi 13 (Preglednica VI) (Slika 30 in 31), saj so rezultati primerljivi z metodo 18.



Slika 30: Standard humanega inzulina, Vz 2 in Vz 3, Preglednica V; metoda 13, Preglednica VI.

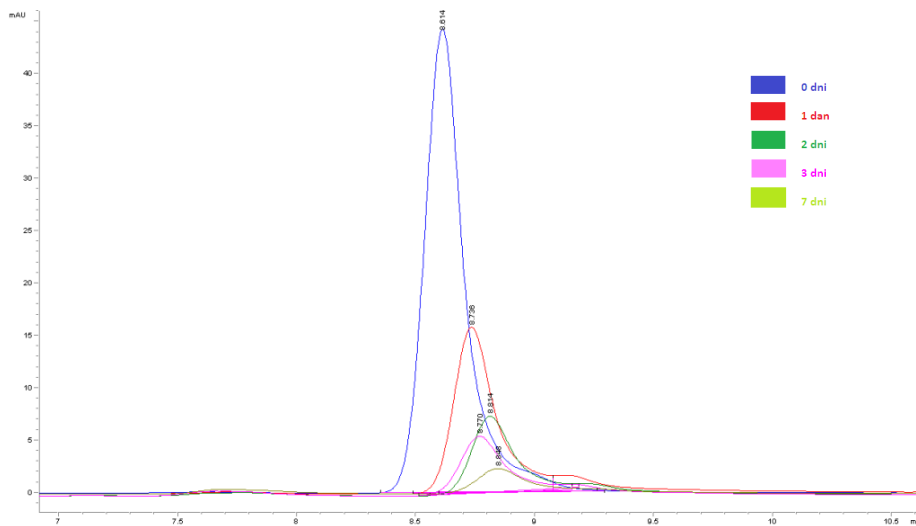


Slika 31: Humani inzulin, Vz 5 in Vz 6, Preglednica V; metoda 13, Preglednica VI.

4.6.2 STABILNOSTNA ŠTUDIJA INZULINA S STRESALNIKOM

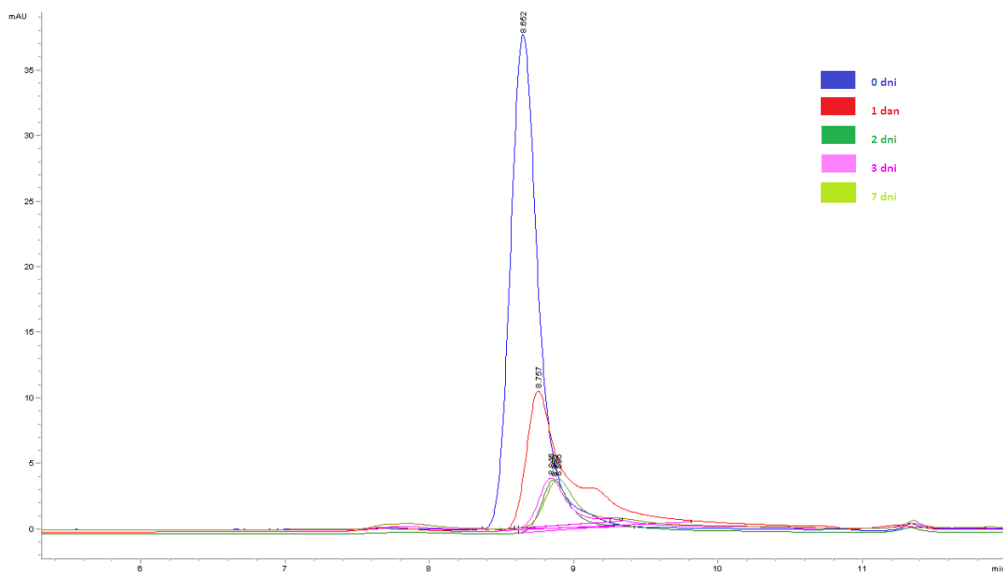
Preverili smo še stabilnost inzulina in hitrost nastajanja kovalentnega dimera inzulina v termostataranem stresalniku. Temperaturo v stresalniku smo naravnali na 50 °C, kar je enako kot na vodni kopeli (4.6.1. Stabilnostna študija inzulina), stresali pa smo s 100 obrati/min. Te

pogoje smo ohranili neprekinjeno do konca poskusa, pri čemer so bili pripravljene vzorci inzulina (Preglednica V, Vz 1-7) shranjeni v plastičnih epicah. Po enem dnevu stresanja smo ugotovili, da je koncentracija inzulina v vzorcih močno padla, v nekaterih primerih tudi za več kot 50 % (Slika 32). Po nekaj dneh stresanja v večini vzorcev skoraj ni bilo več zaznanega inzulina. Predvidevali smo, da verjetno obstajajo interakcije inzulina s površino epice (adsorpcija na površino), saj so te iz umetne mase.



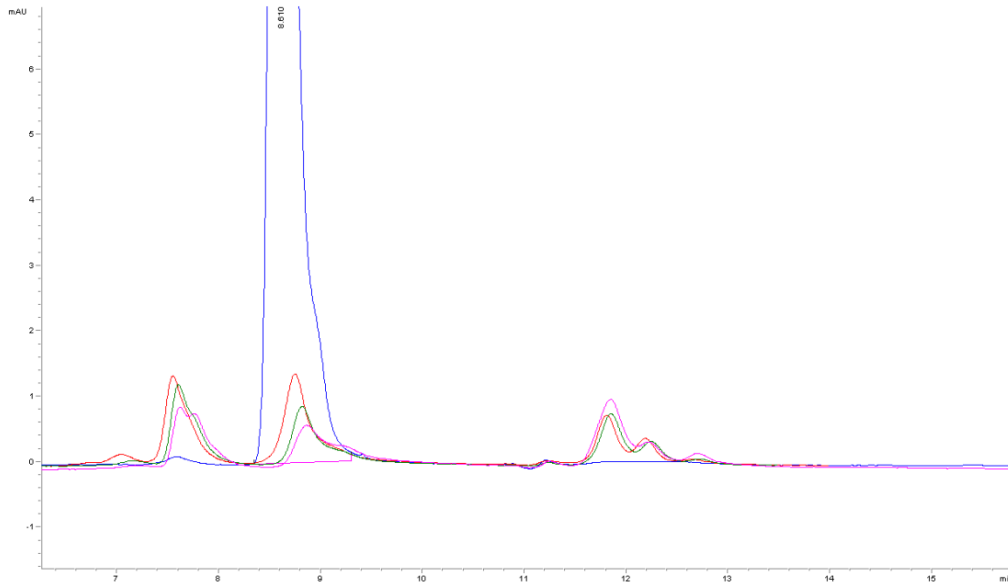
Slika 32: Standard humanega inzulina (Vz 3, Preglednica V) v stresalniku pri 50 °C, metoda 13, Preglednica VI.

Pri vzorcu humanega inzulina redčenega s FP 4 (Vz 5, Preglednica V) je koncentracija po prvem dnevu močno upadla, nato pa se je počasi ustalila in ostala konstantna. To nakazuje na to, da se je ovojna verjetno hitreje "nasitila" z inzulinom (Slika 33).



Slika 33: Humani inzulin v fosfatnem pufri pH = 4 (Vz 5, Preglednica V), metoda 13, Preglednica VI.

Pri nerazredčenem vzorcu inzulina (Vz 7, Preglednica V) smo že po enem dnevu opazili velik upad inzulina v vzorcu (Slika 34), kar nakazuje, da ima bolj koncentriran inzulin večjo afiniteto do ovojnine in se hitreje veže nanjo. V naslednjih dneh je bila koncentracija inzulina v vzorcu ustaljena. Podobne rezultate za nerazredčeni inzulin smo dobili že pri stabilnostni študiji inzulina brez stresalnika (4.6.1. Stabilnostna študija inzulina).



Slika 34: Nerazredčen humani inzulin (Vz 7, Preglednica V), metoda 13, Preglednica VI.

Ker smo predvidevali, da prihaja do adsorpcije inzulina na površino plastične ovojnine, smo ponovno pripravili vzorce inzulina in študijo ponovili, vendar smo vzorce dali v steklene vial. Ugotovili smo, da obstajajo podobne interakcije inzulina tudi s steklom.

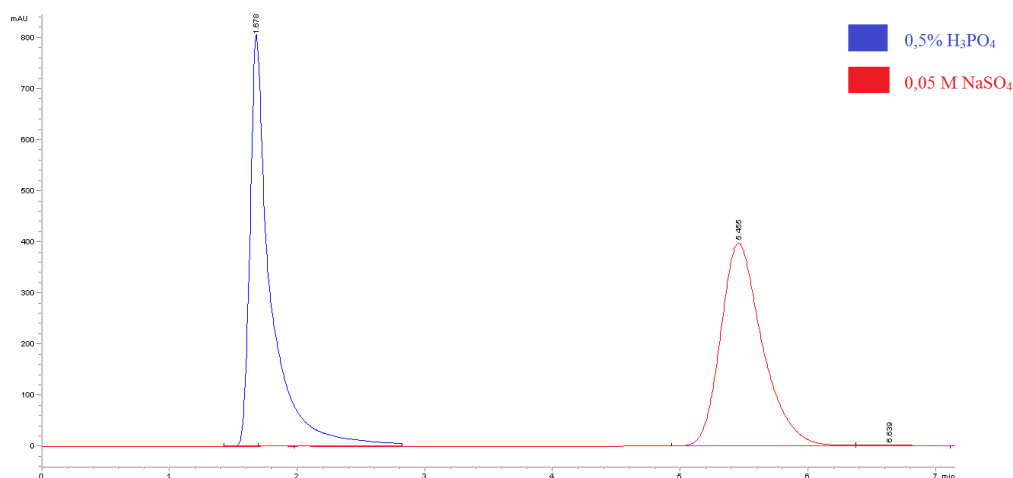
Zato smo še testirali interakcijo inzulina s primarno ovojnino ob dodatku površinsko aktivne snovi (PAS), ki se veže na površino ovojnine in tako prepreči interakcije vzorca z ovojnino. Izbrali smo albumin (Vz 8, Preglednica V), ki bi se naj prednostno adsorbiral na ovojnino in Tween 80, ki je PAS (Vz 9, Preglednica V). Tudi v primeru dodanega albumina se je koncentracija inzulina v vzorcu po enem dnevu enako znižala kot v predhodnih študijah, medtem ko je v vzorcu z dodanim Tween 80 vsebnost inzulina ostala ista. Tako smo dokazali, da je za hitro zmanjšanje koncentracije inzulina v vzorcih izpostavljenih stresanju pri povišani temperaturi odgovorna interakcija inzulina z ovojnino, ki pa jo lahko preprečimo z dodatkom ustrezne PAS (Tween 80). S tem smo tudi pokazali, da večjo vezavo inzulina na površino vsebnika povzroči stresanje vzorca in ne le povišana temperatura, saj pri vzorcih shranjenih na povišani temperaturi brez stresanja ni bilo opaznega tovrstnega upada vsebnosti (razen nerazredčen inzulin in delno tudi inzulin pri pH = 2).

4.7 VREDNOTENJE VSEBNOSTI INZULINA Z RP-HPLC

Primarni namen diplomske naloge je bil vpeljati SEC metodo za vrednotenje inzulina in drugih proteinov, vendar smo še dodatno z RP-HPLC metodo razširili uporabnost kromatografskih metod na področju proteinskih zdravil. RP-HPLC metodo smo prilagodili in vrednotili z namenom, da bi lahko določili vsebnost inzulina v pripravku inzulina.

4.7.1 PRILAGODITEV RP-HPLC METODE ZA INZULIN

Ker se vsebnost inzulina določa z RP-HPLC metodo, smo se odločili prilagoditi tudi to metodo (31). Preizkusili smo več različnih mobilnih faz (0,1 % H_3PO_4 , 0,5 % H_3PO_4 in 50 mM Na_2SO_4 z uravnanim pH z H_3PO_4 na 2,4) (Slika 35) (metode 22, 23 in 24, Preglednica VI) na klasični C_{18} stacionarni fazi. Kot najbolj ustrezna se je izkazala mobilna faza s 50 mM Na_2SO_4 , pH uravnanim na 2,4 in deležem acetonitrila 30 %. Pri tej mobilni fazi je kromatografski vrh inzulina simetrične oblike, medtem ko je pri ostalih mobilnih fazah prisoten "tailing".



Slika 35: Inzulin: različne mobilne faze; metoda 23 in 24, Preglednica VI.

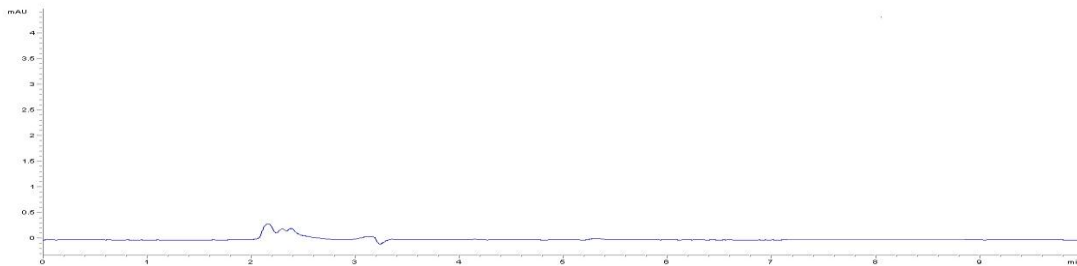
4.7.2 VREDNOTENJE RP-HPLC METODE

Za vrednotenje metode za določanje inzulina z RP-HPLC kolono smo izbrali metodo 24 iz Preglednice VI. Uporabili smo enake vzorce kot pri vrednotenju SEC metode (Preglednica IV). Identificirali smo posamezne kromatografske vrhove na kromatogramu in vrednotili selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost in meddnevno ponovljivost.

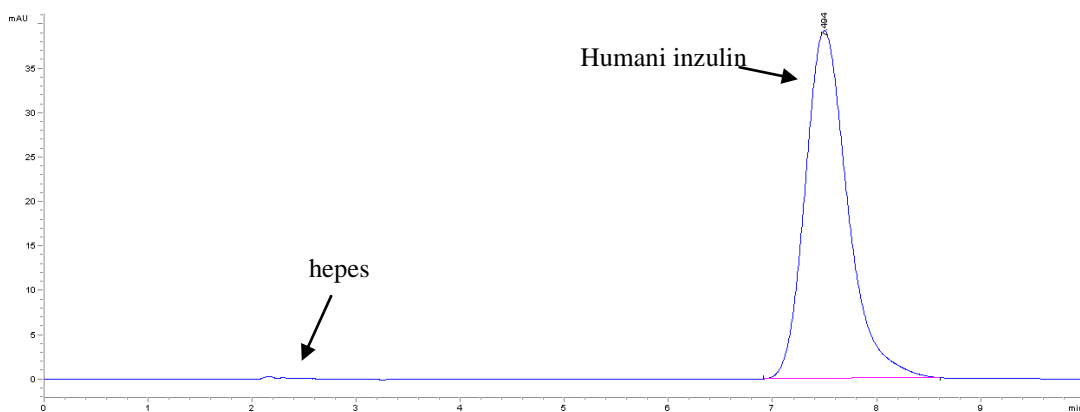
4.7.2.1 Selektivnost

Na kolono smo injicirali vzorec govejega in humanega inzulina, hepes pufra s $\text{pH} = 8,2$, pripravka inzulina ter standarde fenola, m-krezola in protamina.

Pri injiciranju hepes pufra in standarda humanega ali govejega inzulina smo ugotovili, da ni prekrivanja kromatografskih vrhov, kar pomeni, da obstaja ustrezna selektivnost med vrhovi. (Slika 36 in 37)

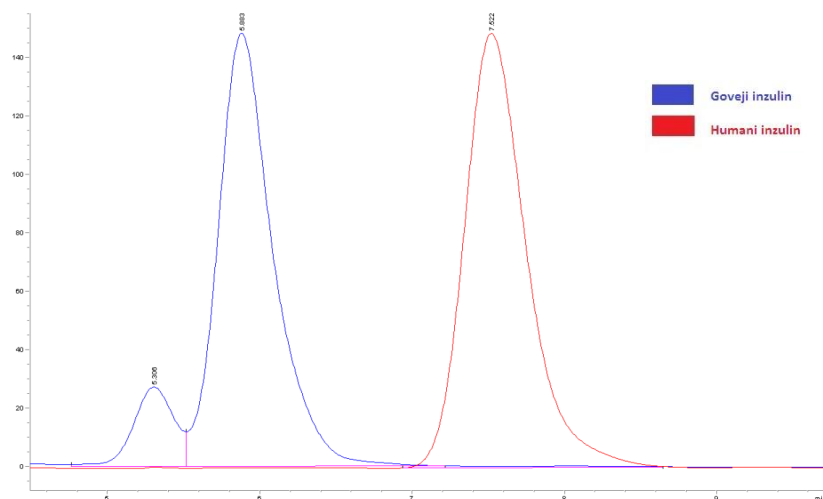


Slika 36: Hepes pufer 8,2; metoda 24, Preglednica VI



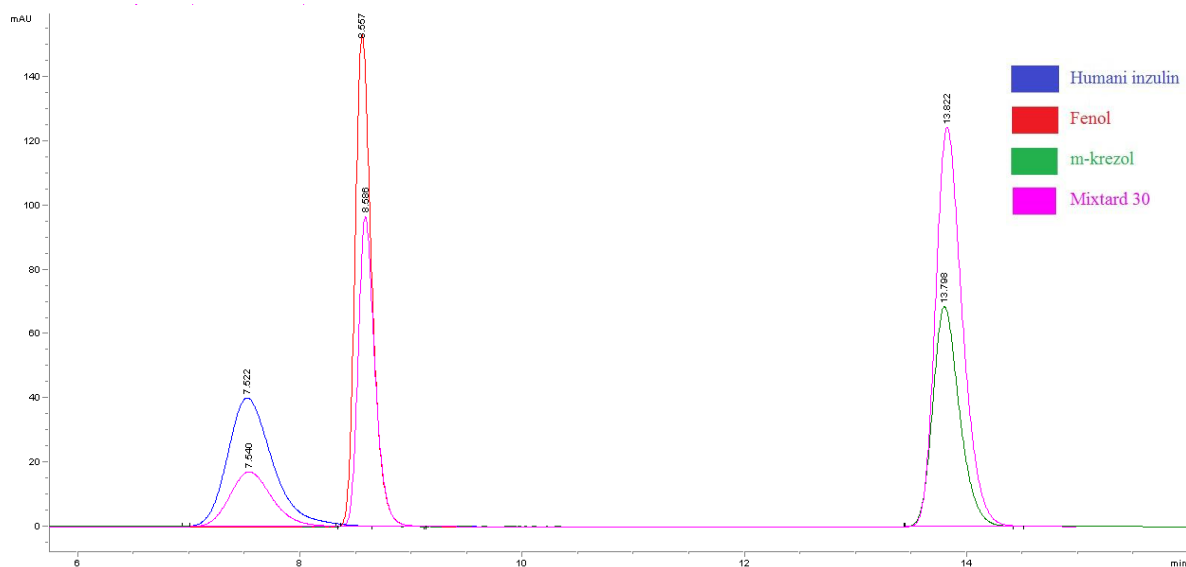
Slika 37: Hepes pufer in standard humanega inzulina; metoda 24, Preglednica VI

Ugotovili smo tudi, da za razliko od SEC metode, lahko pri RP-HPLC metodi ločimo med govejim in humanim inzulinom (Slika 38). Vzorca obeh inzulinov se namreč eluirata pri različnih t_R . Humani inzulin ima t_R približno 7,5 minut, vrh je enojen in lepe oblike, medtem ko je vrh govejega inzulina razcepljen. Pri govejem inzulinu dobimo dva vrhova, in sicer manjšega pri t_{R1} približno 5,3 minut in glavnega pri t_{R2} 5,9 minut. V tem primeru predvidevamo, da je manjši kromatografski vrh kovalentni dimer inzulina, saj je bil ta standard inzulina že starejši.



Slika 38: Ločitev humanega in govejega inzulina; metoda 24, Preglednica VI.

Na kolono smo injicirali tudi pripravek inzulina za injiciranje (Mixtard 30) (Slika 39). Za razliko od standarda inzulina, smo tu dobili tri kromatografske vrhove pri časih 7,5, 8,6 in 13,8 minut. Prvi vrh predstavlja inzulin, saj sovpada s standardom humanega inzulina. Za ostala dva vrhova smo na osnovi standardov obeh konzervansov potrdili prisotnost fenola in m-krezola v pripravku. Ugotovili smo, da vrh fenola sovpada z drugim vrhom pripravka pri približno 8,6 minutah, vrh m-krezola pa s tretjim vrhom pripravka pri 13,8 minutah. Protamin pri 276 nm nima odziva.

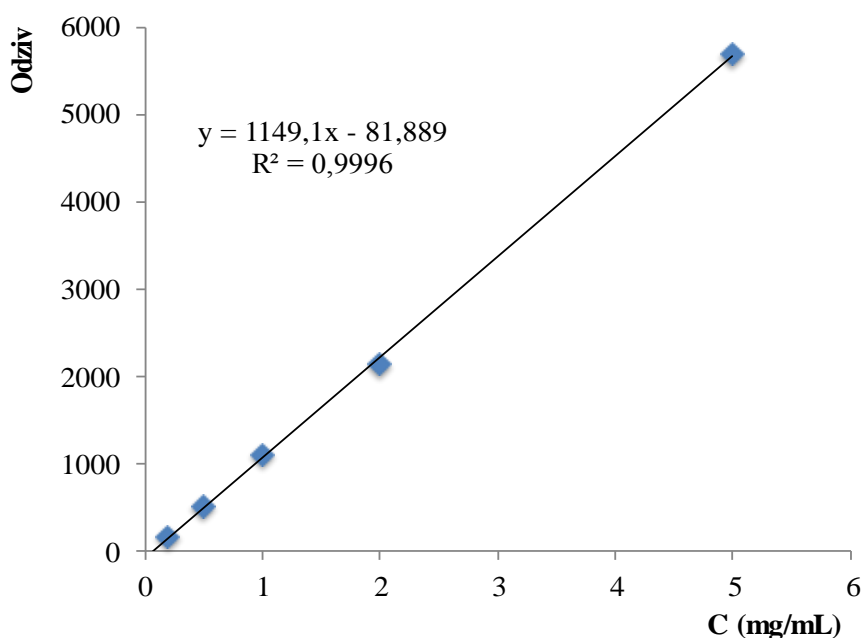


Slika 39: Humani inzulin, fenol, m-krezol in pripravek inzulina Mixtard 30, metoda 24, Preglednica VI.

4.7.2.2 Linearnost in ponovljivost

Linearnost metode smo preverili na območju koncentracij standarda inzulina med 0,2 in 5 mg/mL, kar predstavlja 20-500 % koncentracije delovnega območja inzulina.

Iz dobljenih odzivov pri posameznih koncentracijah smo narisali graf odvisnosti površine pod kromatografskim vrhom od koncentracije pripravljenega vzorca inzulina (Slika 40). Pokazali smo, da obstaja linearna povezava med površino pod krivuljo in koncentracijo inzulina znotraj celotnega koncentracijskega območja. R^2 premice je namreč 0,9996 in je višji od predhodno postavljenega kriterija. Linearnost sistema smo potrdili tudi z izračuni koncentracije inzulina in odstopanjem od točne vrednosti, ki ni v nobenem primeru višje od 5 %.



Slika 40: Umeritvena premica inzulina z RP-HPLC metodo.

Ponovljivost sistema znotraj enega dneva smo določili s trikratnim zaporednim injiciranjem istega vzorca. Vrednotenje ponovljivosti je pokazalo, da je metoda ustrezna, saj RSD v nobeni točki ne odstopa več kot 5 % (Preglednica XII). Točnost smo določili s primerjavo izračunanih koncentracij treh vzorcev inzulina s koncentracijo 1 mg/mL z dejansko vrednostjo. Po izračunu posamezne koncentracije smo ugotovili, da v nobenem primeru ni odstopanje v koncentraciji inzulina večje od 5 %, kar pomeni, da imamo ustrezno točnost sistema.

Preglednica XII: Ponovljivosti RP-HPLC metode znotraj enega dneva.

Dejanska koncentracija (mg/mL)	Odziv 1	Odziv 2	Odziv 3	Povprečje odziva	Odstopanje odziva RSD (%)	Izračunana koncentracija (mg/mL)	Odstopanje od točne vrednosti (%)
0,2	150,0	152,0	149,1	150,4	1,1	0,20	1,12
0,5	510,1	509,0	508,9	509,3	0,2	0,51	2,91
1,0	1102,9	1104,6	1104,1	1103,9	0,0	1,03	3,20
2,0	2138,1	2139,6	2138,1	2138,6	0,0	1,93	3,43
5,0	5678,2	5693,2	5685,7	5685,7	0,1	5,02	0,40

4.7.2.3 Meddnevna ponovljivost

Vseh pet pripravljenih vzorcev smo po trikrat injicirali še dva naslednja dneva in izračunali ponovljivost posamezne koncentracije v vzorcu med dnevi.

Po izračunih smo ugotovili, da se meritve med dnevi ne razlikujejo in da obstaja ustrezna meddnevna ponovljivost merjenja koncentracije pripravljenih vzorcev (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Ponovljivosti RP-HPLC metode med dnevi.

Dejanska koncentracija (mg/mL)	Odziv 1. dan	Odziv 2. dan	Odziv 3. dan	Povprečje odziva	Odstopanje odziva RSD (%)
0,2	158,2	155,3	150,4	154,6	2,7
0,5	525,1	524,7	509,3	519,7	2,0
1,0	1116,8	1108,2	1103,9	1109,6	0,6
2,0	2159,3	2148,1	2138,6	2148,7	0,5
5,0	5682,3	5681,9	5685,7	5683,3	0,0

4.7.3 DOLOČITEV VSEBNOSTI INZULINA V INZULINSKIH PRIPRAVKIH

Metodo 24 iz Preglednice VI smo nato uporabili za določitev vsebnosti inzulina v pripravku inzulina Mixtard 30. Iz površine pod krivuljo inzulina smo po enačbi dobljeni z umeritveno premico izračunali koncentracijo inzulina v pripravku in delež inzulina glede na koncentracijo navedeno na pripravku (Preglednica XIV). Koncentracija inzulina v pripravku določena na osnovi treh paralelk znaša $95 \pm 2\%$ deklarirane začetne vsebnosti.

Preglednica XIV: Vsebnost inzulina v pripravku

Vzorec	AUC	C (mg/mL)	Vsebnost (%)
Mix 1	403,8	4,227	92,89
Mix 2	423,1	4,395	96,59
Mix3	418,4	4,354	95,69
		PV ± SD	95,06 ± 1,94

Ugotovili smo, da je vsebnost inzulina v pripravku Mixtard 30 ustrezna, saj je vsebnost v vseh treh vzorcih nad minimalno postavljeno mejo vsebnosti (90 %). Vrednosti so sicer nekoliko nižje, vendar to je verjetno posledica dejstva, da je imel preparat le še nekaj mesecev do izteka roka uporabnosti.

4.8 VREDNOTENJE INZULINA Z LC-MS METODO

Namen uporabe LC-MS metode v okviru diplomske naloge je bil identifikacija kromatografskih vrhov vzorcev inzulina. Pri tem smo uporabili elektrorazprševalno ionizacijo (ESI), ki je znotraj MS metod zelo primerna za proučevanje proteinov.

Čeprav je območje mas (m/z) našega masnega analizatorja do 2000, je primeren tudi za vrednotenje visokomolekularnih spojin, saj so proteini večkrat nabiti in masni analizator spremlja prehod ionov na osnovi mase z nabojem (m/z).

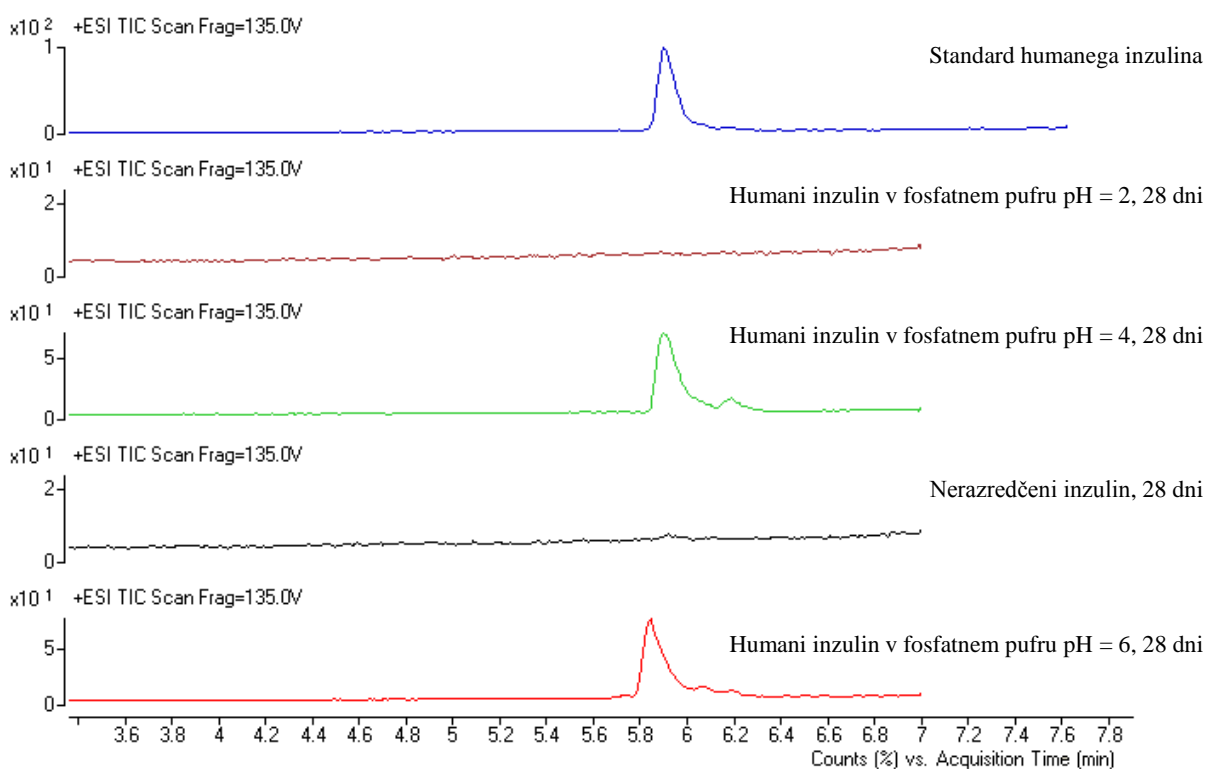
Inzulin ima molekulsko maso 5808, in zato uporabljeni detektor ni primeren za detekcijo molekulskega signala $[M+H]^+$, če uporabimo pozitivni način ionizacije. Vendar ker je inzulin večkrat pozitivno nabit, lahko na ta način potrdimo njegovo strukturo (38). Potencialne masne pike za večkrat nabite ione inzulina predstavlja preglednica XV.

Preglednica XV: Potencialni masni piki (m/z) pri večkrat nabitih ionih (z) inzulina (MM = 5808 Da)

z	3	4	5	6	7
m/z	1936	1452	1162	969	830

LC-MS analize smo izvajali po metodi 25 (Preglednica VI) pri čemer smo kot mobilno fazo izbrali 0,1 % mravljično kislino, ki favorizira pozitivno ionizacijo analitov. Za namene potrditve identitete inzulina smo izbrali »full scan« način masne detekcije, in sicer v območju med 250 in 1500 m/z .

Najprej smo injicirali vzorec sveže pripravljene standarda humanega inzulina, prisoten je bil samo en kromatografski vrh (Slika 41, prvi kromatogram). V "full scan" spektru tega kromatografskega vrha so bili prisotni trije masni piki, in sicer pri m/z 1452, 1162 in 969. Ker je dobljeni masni spekter v skladu s podatki o večkratni nabitosti inzulina (Preglednica XV), smo s tem potrdili prisotnost inzulina v vzorcu.

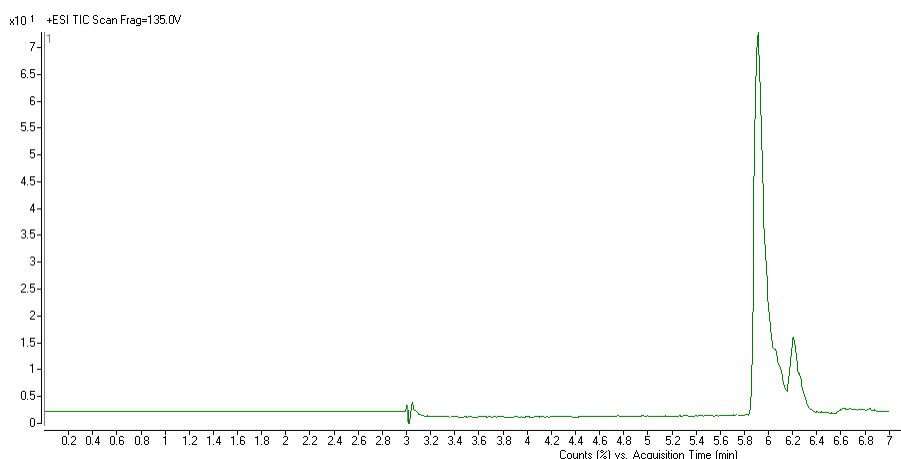


Slika 41: LC-MS analiza sveže pripravljene standarda (zgornji kromatogram) in staranih vzorcev inzulina; metoda 25, Preglednica VI.

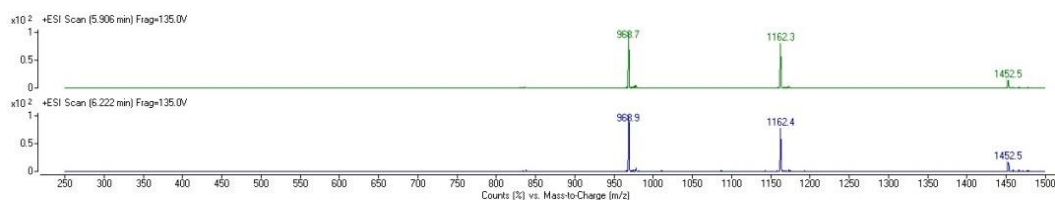
Dodatno smo s pomočjo LC/MS metode analizirali tudi nekatere vzorce iz stabilnostne študije (28 dni na 50 °C) z namenom primerjave rezultatov vrednotenja istih vzorcev s SEC metodo. Predvsem nas je zanimalo, če je inzulin prisoten v posameznem vzorcu in v kakšni obliki se nahaja.

Po injiciranju staranega vzorca inzulina (Vz 5, Preglednica V) smo ugotovili, da je kromatografski vrh inzulina razcepljen. Vrhova sta pri času 5,9 minut in 6,2 minut (Slika 41, tretji kromatogram in Slika 42). Sklepali smo, da predstavlja drugi kromatografski vrh kovalentni dimer inzulina. Zato smo tudi želeli preveriti to domnevo. Ker smo ugotovili, da je pri obeh vrhovih enak masni spekter (Slika 43), smo sklepali, da gre v obeh primerih za

inzulinski molekuli. Vendar kljub temu predvidevamo, da je drugi vrh dimer inzulina, saj se pri dimeru ohrani razmerje m/z in je posledično MS spekter enak za obe spojini. To domnevo potrdimo tudi s tem, da je v sveže pripravljenem standardu inzulina le en kromatografski vrh, pri staranem vzorcu inzulina pa najdemo dva kromatografska vrhova. Dodatni vrh torej predstavlja kovalentni dimer inzulina, katerega prisotnost smo predhodno potrdili že s SEC metodo staranih vzorcev.



Slika 42: LC-MS analiza vzorca standarda inzulina (Vz 5, Preglednica V) v "full scan" načinu detekcije; metoda 25, Preglednica VI.



Slika 43: Masni spekter kromatografskih vrhov pri $t_R = 5,9$ min (zgoraj) in pri $t_R = 6,2$ min (spodaj).

Pri nekaterih staranih vzorcih inzulina po 28 dneh s SEC metodo ni bilo več mogoče zaznati inzulina v vzorcu, in sicer v primeru vzorca Vz 4 (inzulin v fosfatnim pufrom $pH = 2$) in Vz 7 (nerazredčen inzulini). Tudi z LC-MS metodo pri teh dveh vzorcih nismo dobili kromatografskega vrha inzulina, kar pomeni, da se rezultati ujemajo z rezultati SEC metode po 28 dneh (Slika 41). Pri ostalih vzorcih (Vz 5 in 6, Preglednica V) smo dobili dva kromatografska vrhova kar tudi potrjuje skladnost s SEC metodo vrednotenja inzulina v stabilnostni študiji in nakazuje na njegovo nestabilnost s posledičnim nastankom kovalentnega dimera inzulina.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo optimizirali SEC metodo za vrednotenje oz. karakterizacijo proteinov na primeru zmesi standarda proteinov, albumina in inzulina. Preverili smo vpliv določenih parametrov (jakost in vrsta pufra, pH pufra in delež organske komponente, sprememba mobilne faze) na kromatografsko ločitev. Ugotovili smo, da le s kombinacijo MF (fosfatnega pufra in L-arginina) dobimo hkrati ustrezno ločene vrhove zmesi standarda proteinov, albumina in inzulina. Zato smo tudi to MF uporabili za preverjanje MM albumina in inzulina. Na osnovi enačbe umeritvene premice proteinov iz zmesi proteinskega standarda smo izračunali MM albumina 65,3 kDa, kar se ujema z njegovo MM, medtem ko smo pri inzulinu dobili manjšo MM od dejanske. Glede na predhodne analize je to v skladu s pričakovanji, saj se je inzulin obnašal drugače kot ostali proteini v okviru vpeljave SEC metode.

V nadaljevanju smo se osredotočili na inzulin, zato smo optimirano SEC metodo za inzulin ustrezno vrednotili in poskusili zaznati različne oblike agregatov inzulina. S primerjavo različno pripravljenih vzorcev inzulina smo ugotovili, da s pripravo samega vzorca nismo sposobni zaznati želene oblike inzulina (monomer, dimer ali heksamer), saj sestava MF pretvori inzulin, ko ta potuje skozi kolono. Sklepamo, da lahko zaznamo določeno obliko inzulina le s spremembo v MF. Dobljeni rezultati pa niso čisto v skladu z literaturnimi navedbami o ugotavljanju obstoja različnih oblik inzulina.

Obstoj kovalentne oblike inzulina smo pokazali pri stabilnostni študiji inzulina. Pri izračunu deleža pretvorbe inzulina, izpostavljenega povišani temperaturi, smo ugotovili, da je upad vsebnosti inzulina linearen s časom. Po štirih tednih shranjevanja inzulina pri 50 °C pade vsebnost inzulina v vzorcu iz začetnih 91-97 % na približno 60 %. Naraste pa delež kovalentnega dimera (do 25 %) in ostalih kovalentnih oblik inzulina višjih molekulskih mas. Pri spremljanju vsebnosti inzulina v termostatiranem stresalniku pri povišani temperaturi smo ugotovili, da koncentracija inzulina v vzorcih hitro pade, saj po nekaj dneh stresa v večini vzorcev nismo več zaznali inzulina. Predvidevali smo, da obstajajo interakcije inzulina z ovojnino (adsorpcija na površino). To smo dokazali z dodatkom površinsko aktivne snovi Tween 80, saj je v tem primeru ostala vsebnost inzulina nespremenjena.

Z namenom možnosti kvantitativnega ovrednotenja deleža inzulina v pripravkih inzulina smo prilagodili in vrednotili tudi metodo za določevanje vsebnosti inzulina na RP-HPLC koloni. Ugotovili smo, da je vsebnost inzulina v pripravku inzulina ustrezna. Za identifikacijo inzulina oz. njegovih potencialnih agregatov smo dodatno uporabili LC-MS metodo in

potrdili strukturo inzulina. Primerjali in potrdili smo tudi skladnost rezultatov stabilnostne študije inzulina s SEC metodo.

6 LITERATURA

1. Boyer Rodney F: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 70-124.
2. Berg M. J, Tymoczko J. L, Stryer L: Biochemistry, W. H. Freeman, New York, 2007: 53-257.
3. Tišler M: Organska kemija, Državna Založba Slovenije, Ljubljana, 2005: 371-390.
4. Carstensen J. T, Rhodes C.T: Drug stability Principles and practices, 3. Izdaja, Marcel Dekker, Inc., New York, 2000; 2-18, 385-413, 515-613.
5. Campbell M. K, Farrell S. O: Biochemistry, Thompson Brooks/Cole, Belmont, USA, 2006: 138-259.
6. Garrett R. H, Grisham C. M: Biochemistry, Thomson Brooks/Cole, Australia, 2005: 53-158.
7. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 127-143.
8. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, Q5C, 1995.
9. Lien S, Lowmann H.B: Therapeutic peptides. Trends Biotech 2003; 21: 556-562.
10. Zadavec D, Kerič J, Kristl J: Metode za izboljšanje biološke uporabnosti peptidnih učinkovin v peroralnih farmacevtskih oblikah, Farm Vestn 1997; 48: 561-572.
11. Walsh G: Proteins Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2002; 281-293.
12. Bliss: The discovery of insulin, Paul Harris publishing, Einburgh 1982.
13. Oliva A, Fariña J, Llabrés M: Analysis of peptides and proteins: Evaluation of purity, stability, and structural characterization of insulin, Drug Dev Ind Pharm; 1997; 23 (9): 915-927.
14. Oliva A, Fariña J, Suárez M, Llabrés M: Developement of two high-performance liquid chromatographic methods for the analysis and characterization of insulin and its degradation products in pharmaceutical preparations, J Chromatogr B 2000; 749: 25-34.
15. Oliva A, Suárez M, Hernández J. R, Llabrés M, Fariña J: Evaluation of non-isothermal methods in stability studies of human insulin pharmaceutical preparations, J Pharm Biomed Anal; 2009; 49: 916-922.

16. Brange J, Langkjær L, Havelund S, Vølund A: Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations, *Pharm Res*; 1992; Vol. 9, No. 6: 715-726.
17. Brange J, Havelund S, Hougaard P: Chemical stability of insulin. 2. Formation of Higher Molecular Weight Transformation products during storage of pharmaceutical preparations, *Pharm Res* 1992; Vol. 9, No. 6: 727-734.
18. Oliva A, Fariña J, Llabrés M: Fingerprint analysis of insulin: Application in stability studies of pharmaceutical preparations, *Drug Dev Ind Pharm*; 1997; 23 (2): 127-132.
19. Oliva A, Fariña J, Llabrés M: Influence of temperature and shaking on stability of insulin preparations: degradation kinetics, *Int J Pharm* 1996; 143: 163-170.
20. Pikal J. M, Rigsbee R.D: The stability of insulin in crystalline and amorphous solids: Observation of greater stability for the amorphous form, *Pharm Res* 1997; Vol. 14, No. 10.
21. Skoog Douglas A, West Donald M, Holler F. J: *Fundamentals of analytical chemistry*, 8. izdaja, Belmont, Thomson-Brooks/Cole, 2004: 920-992.
22. Sheehan D: *Physical biochemistry: principles and applications*, Wiley, Chichester 2000: 12-59.
23. Anderluh G: *Eksperimentalne metode v biokemiji*, Študentska založba, Ljubljana 2009: 51-79.
24. Hagel L, Jagschies G, Sofer G: *Handbook of process chromatography: Development, manufacturing, validation and economics*, 2. Izdaja, Copyright, Elsevier 2008: 127-142, 219-234, 337-292.
25. Sepčič K: *Biokemijski praktikum*, Študentska založba, Ljubljana 2002: 36-61.
26. Skoog D. A: *Principles of instrumental analysis* 1998; 5. izdaja: 550-558.
27. Brent G. I: High-performance size-exclusion chromatography of peptides, *J Biochem Biophys Methods* 2003; 56: 233-242.
28. Barth H, Boyes B, Jackson C: Size exclusion chromatography, *Anal Chem* 1996; 68: 445-466.
29. Yu C, Mun S, Wang L: Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography, *J Chromatogr A*, 2006; 1132: 99-108.
30. Corbett R, Roche R: Use of high-speed size exclusion chromatography for the study of protein folding and stability, *Biochem*, 1984; 23: 1888-1894.
31. *European Pharmacopoeia 6.0*, Council of Europe, Strasbourg 2007.

32. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures, Q2A, 1994; Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 1996.
33. Yoshioka S, Stella V. J: Stability of drugs and dosage forms, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000; 3-145, 205-225.
34. Jaenecke R: Protein stability and protein folding, Ciba Found Symp, 1999; 206-216.
35. http://en.wikipedia.org/wiki/International_unit#Mass_equivalents_of_1_IU, dostop: november 2010.
36. Phenomenex, Product guide 08/09, 113-117.
37. Tantipolphan R, Romeijn S, Engelsman J: Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH, J Pharm Biochem Anal 2010; 52: 195-202.
38. http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_9708.pdf, dostop: januar 2011.