Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Dmytro Kosolapov

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Název diplomové práce: Peptidové mapování bioléčiv pomocí CE

Tato práce se zabývá optimalizací kapilárně elektroforetické (CE) metody pro peptidové mapování a enzymatického štěpení proteinů pomocí trypsinu. Jako substrát pro enzymatické štěpení byl použit koňský myoglobin a referenční protilátka. Byly testovány dvě metody štěpení: konvenční štěpení trypsinem v roztoku a štěpení za využití komerční soupravy Smart Digest Trypsin Kit, která využívá imobilizovaný trypsin. Štěpení bylo kontrolováno pomocí RP-HPLC. Po optimalizaci tryptického štěpení byla provedena řada pokusů pro stanovení optimálních podmínek pro kvalitní separaci hydrolyzátu pomocí CE. Všechna měření se prováděla v PVA-kapiláře s vnitřním průměrem 50 µm, efektivní délkou 56 cm a celkovou délkou 64,5 cm. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky za tlaku 50 mbar, vkládané napětí mělo hodnotu 30 kV, teplota kapiláry byla nastavena na 20 °C. Zóny analytů byly zaznamenávány UV-VIS detektorem při vlnové délce 200 nm. Byl testován vliv koncentrace a typu základního elektrolytu (30, 60, 90, 120, 150mM kyselina mravenčí a 0,5%, 1%, 1,5%, 2% kyselina octová), doby nástřiku (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 s), a také koncentrace vzorku. Při optimalizaci metody byla použita technika on-line zakoncentrování přechodným pH rozhraním.

Nejkvalitnější peptidové mapy referenční protilátky byly získány při 60s nástřiku roztoku hydrolyzátu o koncentraci 0,1075 µg/µl rozpuštěného v 10mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného o pH 8,5. Jako základní elektrolyt byl využit 90mM mravenčanový pufr o pH 3,0. Nejúčinnějšího štěpení protilátky bylo dosaženo za využití komerční soupravy Smart Digest Trypsin Kit po dobu 180 min.