

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra Analytické chemie

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Autor/ka práce: **Dmitro Kosolapov**

Vedoucí/školitel/ka práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Konzultant/ka práce: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Oponent/ka práce: Mgr. Maria Khalikova, CSc.

Název práce:

**Peptidové mapování bioléciv pomocí CE**

---

Rozsah práce: počet stran: 79, počet obrázků: 22, počet tabulek: 11, počet citací: 41

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: velmi dobrá
- c) Zpracování teoretické části: výborné
- d) Popis metod: velmi dobrý
- e) Prezentace výsledků: velmi dobrá
- f) Diskuse, závěry: velmi dobré
- g) Teoretický či praktický přínos práce: výborný

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací kapilárně elektroforetické metody pro peptidové mapování a enzymatického štěpení proteinu pomocí trypsinu. Byly testované dvě metody štěpení za pomoci komerčně dostupného kitu a klasického štěpení v roztoku. LC metoda byla využívána pro kontrolu štěpení dvou modelových látek – koňského myoglobinu a modelového bioléciva. Práce je zpracována po odborné a gramatické stránce na velmi dobré úrovni. Teoretická část je sepsána stručně a výstižně. V diplomové práci se objevují překlepy a několik chyb v textu, které je třeba opravit.

Dotazy a připomínky: Dovolím si vytknout několik připomínek k textu:

Orientaci v textu poněkud komplikuje rozdělení postupů přípravy vzorků na několik částí, např. štěpení protilátky, ředění a SPE přečistění digestu jsou popsány zvlášť.

K rovnici 5 by mohlo být uvedeno, že se jedná o Lambert-Beerův zákon.

Na obrázku 3 ve struktuře protilátky chybí znázornění disulfidických můstků, které jsou klíčové jak pro funkci protilátky, tak i pro klasifikaci protilátek.

s. 31 některé chemikálie chybí v seznamu použitých například iodacetamid. Čistota deoxycholátu sodného není uvedena.

s. 35, bod g) - není uvedeno, které činidlo zapříčiní tvorbu sraženiny. Je to jedna z nevýhod jeho použití. Nesouhlasím, že výsledná koncentrace vzorku je 1 µg/µL, protože při odstředění a odebírání supernatantu vždy dochází ke ztrátě vzorku. Buď by měla být uvedena koncentrace "kolem 1 µg/µL", ale přesnější by bylo odebrat objem měřit a následně koncentraci přepočítat. V kroku eluce se obvykle dodává i TFA.

s. 34, c) – SMART kit používá imobilizovaný trypsin na částice, tudíž reakční směs tvoří nestabilní suspenzi. Domnívám se, že odběr alikvotů během štěpení vede k možné změně

množství enzymu anebo poměru E/P v reakční směsi. V těchto případech doporučuji připravit 7 vzorků a každý používat ke zkoumání určité doby štěpení.

s. 58 – místo kapitoly 5.4.6.1 má být 5.4.5.1

s. 70, Obr. 21 – chyba v uvedené koncentraci vzorku. Má být 0,10715  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Odkaz na zdroj [28] v textu diplomové práce chybí. Pro odkaz [1] nejsou uvedeni autoři S. Shaikh a P. Jaiswal.

Sjednotila bych v textu: použití pro koncentraci kyselin buď % anebo mM; použití mM a mmol/L; počet desetinných míst v uvedených koncentracích;  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a kyselina octová.

Dotazy:

s. 21 - v diplomové práci uvádíte, že hlavním faktorem limitujícím citlivost UV-VIS detekce v průběhu CE separace je malá délka absorpční vrstvy. Chybí však alespoň zmínka o způsobech řešení tohoto problému. Jaké jsou známé?

Obrázek 6 a 9B ukazují chromatogram peptidové mapy myoglobinu po dvouhodinovém štěpení. Peptidový profil vypadá úplně jinak. Nejedná se o chybu?

Proč se v metodách používají jiné vlnové délky pro UV-VIS detekci - 214, 280 a 200 nm.

Ukažte prosím chromatogram peptidové mapy protilátky při 214 a 280 nm.

s. 49 – vysvětlíte prosím větu „kolona Halo Peptide o porozitě 160 Å není vhodná pro analýzu intaktních proteinů kvůli riziku ucpání kolony“.

Proč se pro optimalizaci on-line zakoncentrování nepoužíval vzorek myoglobinu, který sloužil pro optimalizaci celé metody CE?

Jak se provádělo stanovení přesnosti? Proč se pro pík fibrinopeptidu B stanovila hodnota N, a pro vzorky Cp?

Výrazný růst základní linie je pozorován na elektroferogramech s dobou nástřiku 70 s (obr. 18) a 60 s (obr. 16), ale ne u 80 s (obr. 19), proč tomu tak je?

Elektroferogram na obr. 17 a 20 se výrazně liší. Jako možný důvod uvádíte vznik EOF. Bylo provedeno odsolení a SPE přečištění tohoto vzorku?

**Celkové hodnocení, práce je: velmi dobrá, k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové dne 18.9.2020

.....  
podpis oponentky / oponenta