

Moderní reverzní stacionární fáze na bázi silikagelu, oxidu zirkoničitého a organických monolitů; využití v analýze biologicky aktivních látek

Disertační práce Kláry Soukupové je podrobnou studií retenčního chování vybraných peptidů v několika separačních systémech HPLC. Studovanými analyty jsou dvě skupiny biologicky aktivních peptidů. První skupinu tvoří čtveřice pentapeptidů enkefalinů, druhou pak šest nonapeptidů, analogů vasopresinu a oxytocinu.

Předkládaná práce je sepsána pečlivě a přehledně, je ilustrována řadou obrázků a grafů. Úvodní část se zabývá studovanými peptidy, jejich strukturou a biologickými vlastnostmi. Následuje podrobný literární souhrn publikovaných chromatografických metod a přehled vlastností a separačních mechanismů, které se u testovaných stacionárních fází uplatňují. Relevantní literatura je řádně citována. Experimentální část stručně a jasně popisuje kolony, chemikálie i pracovní postupy. Vlastní práce je založena na velkém množství dat získaných pečlivým studiem retenčního chování a optimalizací separací na čtyřech typově odlišných stacionárních fázích. K obecné charakterizaci kolon byl využit Waltersův test. Zajímavé je srovnání výsledků tohoto testu pro kolony nové a opakovaně použité. V následujících kapitolách jsou postupně prezentovány a diskutovány výsledky pro jednotlivé kolony. Studován byl vliv mobilní fáze, zejména složení, pH a koncentrace pufru a vliv obsahu organického modifikátoru. Na základě naměřených dat byly nalezeny vhodné podmínky separace ve všech studovaných systémech. Kromě tří komerčních kolon byla připravena a testována i monolitická butyl-methakrylátová kapilární kolona. Výsledky experimentů shrnuje závěrečná část práce. Retenční chování analytů je diskutováno zejména vzhledem k výsledkům Waltersova testu.

Rád bych položil několik otázek:

1. Při měření na koloně C18 retence s pH v případě fosforečnanového pufru rostla (str. 41), zatímco v případě octanového pufru spíše klesala (str. 44). Jaké je pro toto chování vysvětlení? Pokoušela se uchazečka modelovat závislost celkového náboje peptidů na pH a korelovat výsledky s retenčním chováním? Jaké jsou hodnoty pI jednotlivých peptidů?
2. U testovaných kolon většinou klesá retence peptidů se zvyšující se koncentrací pufru (např. str. 42, 48, 58, 61, 69, 79). Jak lze toto chování vysvětlit?
3. V disertační práci byla použita isokratická eluce. Lze očekávat další zlepšení separace při použití gradientu?

4. Na koloně Discovery Zr PBD byla pozorována změna elučního pořadí analytů při snižování obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi (str. 70), což na kolonách C18 není běžné. Jaké by mohlo být vysvětlení, popř. existuje nějaký obdobný příklad či vysvětlení v literatuře?

5. HPLC separace peptidů je velmi významná v proteomice, kdy se analyzují hydrolyzáty získané štěpením bílkovin proteolytickými enzymy. Nejčastěji se používají stacionární fáze C18 a mobilní fáze obsahující acetonitril a mravenčanový nebo octanový pufr. Na základě Vašich zkušeností s peptidy – je některá z testovaných stacionárních fází vhodnější pro peptidy než C18?

Závěrem bych rád upozornil na to, že problematika diskutovaná v této disertační práci je tématem dvou článků v renomovaných odborných časopisech, u nichž je uchazečka prvním autorem. Jeden článek je ve stadiu přípravy. Výsledky experimentů byly prezentovány na několika mezinárodních i domácích konferencích. Práce již tedy úspěšně prošla nezávislým oponentním řízením. Mohu konstatovat, že Klára Soukupová dostatečně prokázala připravenost k samostatné vědecké činnosti a disertační práci plně **doporučuji přijmout k obhajobě**.

V Praze dne 30. září 2008



.....
RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.