



Oponentský posudek disertační práce

Název: Vývoj nových metod ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie pro farmaceutické aplikace

Kandidátka: Mgr. Kateřina Plachká

Oponent: doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.

Předložená disertační práce Kateřiny Plachké se věnuje se využití superkritické fluidní chromatografie (SFC) pro stanovení účinných látek v léčivech i potravinových doplncích. Součástí této práce je komplexní pohled do problematiky superkritické fluidní chromatografie a farmaceutické analýzy. Autorka se zabývá teorií superkritických tekutin, historickým vývojem SFC techniky, současným stavem SFC instrumentace a jejími výhodami. Neopomíjí ani parametry vývoje SFC metod a různé aplikační oblasti, např. možnosti využití SFC ve farmaceutické analýze. Dále práce pokračuje uceleným komentářem k publikovaným pracím, které jsou zahrnuty v přílohách disertační práce. Přiloženo je 5 odborných publikací, 1 přehledová práce, 3 kapitoly v monografiích a 2 práce v disertační práci nezahrnuté. Příloha 6 (*"Effect of column history in supercritical fluid chromatography after one-year use – practical implications"* – manuskript připravený k podání do *Journal of Separation Science*) v předložené tištěné formě disertační práce chybí. Disertační práce je psána v českém jazyce, přehledně uspořádána, celkem o 104 stranách bez příloh. Finální grafické uspořádání je vyhovující. Citovaná literatura a přiložená přehledová práce i kapitoly v monografiích dokládají, že autorka dobře zná studovanou problematiku.

Výběr tématu je velmi aktuální a vychází ze zaměření vědecké skupiny, kde autorka působí. Cílem této disertační práce bylo ověřit vhodnost metod ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC) pro farmaceutickou kontrolu kvality.

Byla vyvinuta a validována SFC metoda pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot, která byla úspěšně srovnána s podobně optimalizovanou kapalinově chromatografickou (LC) metodou. Autorka se také podílela na vývoji rychlých analytických metod vhodných pro kontrolu kvality potravinových doplňků s obsahem různých forem vitamínu E. Výsledky opět potvrdily nejen komplementaritu SFC a LC metod, ale také rychlejší proces přípravy vzorků (extrakce kapalina-kapalina) ve spojení s SFC analýzou.

Dále bylo provedeno srovnání všeobecných chromatografických podmínek, které by měly zjednodušit využití SFC techniky při kontrole nečistot. Za použití vybraných směsí obsahujících účinnou látku a její nečistoty bylo testováno 8 stacionárních fází, 5 organických modifikátorů a 6 aditiv. Výsledky ukázaly na vysokou flexibilitu SFC techniky a její aplikovatelnost v laboratorní praxi, např. při separaci isomerů nebo kritických párů neutrálních látek. Byly doporučeny generické podmínky vhodné jako výchozí bod pro vývoj metody (diolová stacionární fáze a modifikátor 0,1% NH₄OH v methanolu).

V další části práce autorka diskutuje nutnost dostatečného chromatografického rozlišení mezi účinnou látkou a následující nečistotou a nezbytnou validaci nově vyvinutých SFC metod. Všechny sledované parametry (specifita, linearita, rozsah, dolní a horní mez stanovitelnosti, mez detekce, správnost a přesnost) splňovaly validační kritéria nezbytná pro farmaceutickou kontrolu kvality podle zavedených mezinárodních směrnic. Navíc byl aplikován inovativní přístup stanovení celkové chyby měření, což je nový způsob statistického vyhodnocení validačních dat. V neposlední řadě byl sledován efekt dlouhodobého používání SFC kolon, což je velmi kritický parametr, který ovlivňuje validitu analytických metod nejen ve farmaceutické kontrole. Srovnání starší i novější generace SFC stacionárních fází ukázalo nutnost regenerace některých typů kolon. Studie je přehledným shrnutím kvality a dlouhodobé použitelnosti komerčně dostupných SCF kolon.

Studentka se také podílela na mezinárodní studii přenosu SFC metody pro stanovení farmaceutických nečistot salbutamolu mezi laboratořemi. Výsledky potvrdily přenositelnost SFC metody mezi 19 laboratořemi a také snesly srovnání s podobnou LC metodou.

Za velmi cenné považuji:

- přehlednost Teoretické části. Z toho vyplývá, že autorka je erudovaným vědeckým pracovníkem v dané oblasti.
- velké množství prezentovaných výsledků, které jsou podpořeny 9 publikačními výstupy (z toho 4 prvoautorské).
- výsledky jsou dobře diskutovány v kontextu publikované literatury a vyvozované závěry odpovídají dílčím experimentům.
- týmovou práci nejen v rámci tuzemského pracoviště, tak zapojení do mezinárodních projektů.

K vlastní práci nemám vážnější kritické připomínky. Podle mého názoru drobné nepřesnosti (např. chybné datování SFC techniky do 60. let 19. století na str. 12) nesnižují kvalitu předložené práce.

Na tomto místě bych pouze rád autorku upozornil na problematiku spojení „chromatografie a citlivost metody“, které je v některých částech textu mírně zavádějící. Je důležité si uvědomit, že citlivost u LC či SFC metod vždy souvisí s připojenými detektory. Např. konstatování „UHPLC metoda poskytla 2,5x vyšší citlivost“ (str. 41) je nepřesné; v textu chybí informace o zvolené detekční technice. Pro přehlednost textu je důležité uvádění celých zkratk používaných metod SFC-UV či SFC-MS.

K autorce bych měl následující dotazy:

1. V kapitole 3.1.3. uvádí autorka dřívější propojení SFC instrumentace s plamenově ionizační detekcí (FID). Proč proud CO₂ přiváděný k detektoru nezhášel plamínek FID? Existuje na to v literatuře vysvětlení?
2. Velkou výhodou SFC metod je rychlost separace, která přímo souvisí s optimální lineární rychlostí a van Deemterovou rovnicí. Uveďte srovnání van Deemterových křivek pro různé LC a SFC techniky.
3. Při hledání generického přístupu ke kontrole nečistot (kap. 4.2.) byla srovnávána separace na různých typech stacionárních fázích (např. BEH a Torus). Jako modifikátor mobilní fáze byla použita různá organická rozpouštědla s aditivou a bez aditiv. Byly nějak optimalizovány použité

koncentrace u jednotlivých aditiv (10mM mravenčan nebo octan amonný; 0,1% roztok NH₄OH nebo HCOOH)?

4. Při propojení SFC a hmotnostním detektorem (MS) je v současnosti nejčastěji používána přídavná kapalina. Můžete shrnout vliv používaných rozpouštědel na výtěžnost ionizace. Optimalizovala jste někdy tento parametr v rámci vyvíjených SFC metod?
5. Pro separaci estradiolu a nečistot musely být použity 2 spřažené Torus DIOL kolony. Jakou měly délku a jaký byl generován tlak na binární pumpě?
6. Při sledování efektu historie SFC kolony (kap. 4.5.) bylo porovnáváno 8 stacionárních fází. Byly SFC stacionárních fází druhé generace (Torus) také regenerovány? Za jakých podmínek regenerace probíhala.
7. Str. 63: Jak by studentka zhodnotila dlouhodobé trendy retenčních časů u sledovaných látek (kyselých, neutrálních a bazických) na kolona Torus 2-PIC ve srovnání s dalšími hodnocenými kolonami?

Závěr:

Disertační práci Mgr. Kateřiny Plachké nelze vytknout žádné závažné chyby. Z materiálu je zřejmé, že se autorka s úskalími Ph.D. studia vyrovnala velmi dobře a stal se erudovaným odborníkem v oblasti moderních analytických metod. Bylo dosaženo velmi cenných výsledků, které jsou přínosem pro tuto oblast výzkumu. Závěry této práce jistě napomohou využití SFC technik v přísně regulovaných podmínkách farmaceutické kontrol kvality. **Předložená disertační práce dle mého názoru splňuje po stránce formální i věcné všechny nároky kladené na disertační práce, a proto ji doporučuji k obhajobě a kladnému posouzení.**

S pozdravem,
doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.

V Olomouci, dne 2. dubna 2020