Oponentský posudek habilitační práce

RNDr. Tomáš Křížek, PhD., Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha:

Flexibilita kapilární elektroforézy a její analytické aplikace

Oponent: RNDr. Václav Kašička, CSc., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha

---

Předložená habilitační práce shrnuje hlavní výsledky vědeckovýzkumné činnosti RNDr. Tomáše Křížka, PhD., v období let 2013-2021. Představuje ucelený soubor 11 publikací, jejichž společným tématem je vývoj metodiky kapilární (zónové) elektroforézy (CE / CZE) a využití této vysokoúčinné elektromigrační separační metody v analytické chemii, zejména pro kvalitativní i kvantitativní analýzu a charakterizaci prakticky významných analytů.

Vývoj nových analytických metod je problematikou vysoce aktuální a vědecky i společensky významnou, neboť výsledky analýz více či méně komplexních směsí organických i anorganických sloučenin a biologicky aktivních látek jsou často důležitými podklady pro řešení závažných problémů v mnoha oblastech lidské činnosti, jako příklady lze uvést např. analýzu léčiv a potravin ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, analýzu škodlivin v životním prostředí a sledování přeměn biologicky aktivních látek v základním biologickém a biochemickém výzkumu i v humánní a veterinární medicíně. Společenská praxe klade na analytické chemiky stále náročnější požadavky, vybrané látky je třeba stanovovat na stále nižších koncentračních hladinách, ve stále menších množstvích vzorku, ve složitých (bio)matricích a ve stále kratším čase. Odpovědí na tyto požadavky je miniaturizace analytických metod, jejíž jednou z možných realizací v oblasti separačních metod je využití křemenných či plastových kapilár nebo mikrokanálků v plošných čipech jako separačního prostoru. Předností této miniaturizace separačního prostoru je, že vede nejen ke zvýšení citlivosti chromatografických a elektromigračních metod, ale i k jejich vyšší separační účinnosti a rychlosti.

Cílem předkládaných prací, jejichž soubor je základem habilitační práce, bylo přispět k rozvoji metodiky kapilární elektroforézy a vypracovat nové postupy pro kvalitativní i kvantitativní analýzu prakticky významných analytů. Tyto analyty zahrnují široké spektrum látek, od malých aniontů anorganických i organických kyselin, aminokyselin a mono- a disacharidů, přes středně velké oligo- a polypeptidy až po makromolekuly biopolymerů – proteinů a polysacharidů, např. insulinu a heparinu, a to v jednoduchých i komplexních matricích.

Rád konstatuji, že těchto cílů bylo v předložených pracích úspěšně dosaženo. Oceňuji zejména přínos Dr. Křížka k obecnému rozvoji metodiky kapilární elektroforézy, kdy využitím v titulu habilitační práce zdůrazněné flexibility této metody, dosáhl zrychlení CE analýz a vysoké průchodnosti vyvinutých CE metod. Kladně rovněž hodnotím vývoj CE metodiky nejen pro analýzu širokého spektra látek, ale i pro jejich biochemickou a fyzikálně chemickou charakterizaci a pro sledování biochemických reakcí a interakcí. Velmi cenné jsou také výsledky výzkumu chování elektroneutrálních molekul jakožto markerů elektroosmotického toku, které ukázaly, že ne všechny tyto běžně užívané markery a ne za všech podmínek splňují podmínku nulové elektroosmotické mobility. Práce byly většinou publikovány v kvalitních impaktovaných časopisech, jako např. Analytical and Bioanalytical Chemistry a Electrophoresis. Celkem je Dr. Křížek spoluautorem 40 původních výzkumných článků a dvou přehledových článků v impaktovaných časopisech. Jejich vědecký přínos a význam pro další rozvoj vědního oboru jsou velmi oceňovány a uznávány.

Po formální stránce je habilitační práce sepsána přehledně a v pěkné grafické úpravě. Práce je vhodně členěna; po krátkém úvodu postupně podrobněji rozebírá vybrané aspekty flexibility CE s příslušnými s odkazy na jednotlivé publikace tvořící základ habilitační práce. Kopie těchto publikací, ve kterých jsou vývoj metod a jejich praktické využití podrobně popsány, jsou jako přílohy součástí habilitační práce.

Připomínky, dotazy a náměty do diskuse:

1. Některá tvrzení a definice resp. charakterizace jednotlivých metod, pojmů a jevů nejsou zcela přesné či úplné.
   i) V definici pH (str. 4) chybí, že se jedná o "záporně vzatý" dekadický logaritmus aktivity vodíkového iontu.
   ii) Obecné konstatování, že "kvůli nižší citlivosti detekce k tak rozsáhlému využití CE v praxi nedošlo" (str. 8, ř. 7-8), není správné, neboť relativně nízká je pouze koncentrační citlivost nejčastěji používané UV-vis absorpční spektrofotometrické detekce. Citlivost CE vyjádřená hmotností či látkovým množstvím je vysoká obecně a s citlivými detektory (fluorescenčními nebo hmotnostně spektrometrickými) je vysoká i koncentrační citlivost.
   iii) Místo "šířka kapiláry" (str. 9, bod 4) by mělo být "vnitřní a vnější průměr kapiláry".
   iv) Charakterizace dalších kapilárních elektromigračních metod jako různých módů či režimů kapilární elektroforézy není přesná a ani oficiálně správná. Podle oficiální IUPAC terminologie (viz M.L. Riekkola, J. A. Jonsson, and R. M. Smith. Terminology for analytical capillary electromigration techniques - (IUPAC recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry* 76 (2):443-451, 2004), by měl být termín kapilární elektroforéza užíván pouze pro "kapilární zónovou elektroforézu" a nikoli jako souhrnný název pro všechny kapilární elektromigrační metody. Odlišné názvy i separační principy ostatních kapilárních CE metod (izoelektrická fokusace, afinitní elektroforéza, elektrokinetická chromatografie a elektro-chromatografie) ukazují, že se jedná o samostatné metody, nikoli módy kapilární elektroforézy.
   v) V českých názvech metod by měl být přepis předpon "iso" a "izo" jednotný, není důvod psát isoelektrická fokusace a izotachoforéza (str. 11, par. 3 a 4).
2. Literární odkazy týkající se využití kapilárních elektromigračních metod by měly být aktuálnější, např. odkazované články na využití cyklodextrinů a crown-etherů v afinitní CE a na pokroky v jednotlivých elektromigračních metodách (odkazy [3-10]) jsou většinou z devadesátých let minulého století, ačkoli existují novější přehledové články z nedávné doby.
3. Proč na Obr. 2, str. 15, znázorňujícím princip zakoncentrování analytů zesílením elektrického je koncentrace kationického analytu na počátku kapiláry vysoká, když pro zakoncentrování analytu je žádoucí, aby jeho koncentrace a tudíž i elektrická vodivost jeho roztoku v celém nadávkovaném objemu byla nízká?
4. Jaké je přiřazení píků markerům elektroosmotického toku na Obr. 17 a který z testovaných markerů považuje autor za nejvhodnější?
5. Kde vidí autor hlavní možnosti pro širší využití kapilárních elektromigračních metod v praxi?

Závěr:

Vědecké publikace Dr. Tomáše Křížka tvořící základ jeho habilitační práce představují významný přínos pro rozvoj metodiky kapilární elektroforézy. Přinášejí řadu nových originálních postupů, které významně rozšiřují aplikační možnosti této vysoce citlivé a vysokoúčinné elektroseparační metody pro analýzu a charakterizaci prakticky významných analytů, včetně léčiv a jiných biologicky aktivních látek. Proto jednoznačně doporučuji, aby předložená habilitační práce byla přijata jako podklad pro udělení vědecko-pedagogického titulu docent RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD.

V Praze, dne 21. 2. 2022 RNDr. Václav Kašička, CSc.