

OPONENTSKÝ POSUDEK

na doktorskou práci Mgr. Terezy Tylové, nazvanou “**Liquid chromatography methods for analysis of microbial secondary metabolites of bioactive nature**”.

Doktorandka se ve své disertační práci věnovala vývoji chromatografických metod zaměřených na analýzu biologicky aktivních sekundárních metabolitů.

Práce je členěna do tří částí. Nejprve je popsán vývoj metody pro stanovení reziduálních antibiotik v odlišných maticích, odpadních a povrchových vodách a prasečí mrvě, kdy byla sledována hojně používaná humánní a veterinární antibiotika. Pro analýzu byly aplikovány moderní přístupy založené na kombinaci UHPLC s DAD a MS detekcí. Příprava vzorků před analýzou byla realizována s využitím technik SPE a LLE. Vyvinuté metody byly validovány a použity pro analýzu reálných vzorků z různých lokalit. Byla zjištěna alarmující skutečnost, že všechny testované vzorky vod na výstupu z čističek odpadních vod poskytly pozitivní výsledky.

Druhá část práce byla orientována na chromatografickou charakterizaci sekundárních metabolitů produkovaných houbami rodu *Geosmithia*. Zde byla vypracována nová UHPLC-DAD-TOFMS metoda pro “chromatografický fingerprinting” extracelulárních metabolitů ve fermentačním mediu. Tato metoda byla následně užita pro analýzu 48 kmenů rodu *Geosmithia*. Dále byly vyvinuty postupy pro “chromatografický screening” biologicky aktivních sekundárních metabolitů studovaných hub.

Ve třetí části práce autorka porovnávala separační schopnosti povrchově porézního sorbentu v módu HPLC s plně porézními hybridními částicemi určenými pro UHPLC.

Výsledky doktorské práce byly průběžně prezentovány nejen na konferencích, ale také ve formě čtyř publikací v kvalitních impaktovaných časopisech. Doktorská práce je napsána takovou formou, že dobře doplňuje zmíněné publikace a umožňuje získat celistvou představu o množství a kvalitě odvedené práce. Publikace i doktorská práce jsou psány zručně, přehledně a srozumitelně. Smysl a důležitost studované problematiky je jasně specifikována. Cíle přehledně stanoveny. Použité nástroje pro řešení problematiky jsou vhodně zvoleny a použity. Celkově lze konstatovat, že vytčené cíle byly splněny.

K práci mám jen několik poznámek a dotazů.

Česká verze anotace obsahuje více formálních nedostatků (překlepů, apod.) než verze anglicky psaná. Na druhou stranu, jak anglická forma anotace, tak doktorská práce psaná v angličtině, je téměř prosta překlepů, a to je třeba naopak vyzdvihnout.

V seznamu publikací v doktorské práci na straně 3 chybí u čtvrtého článku (v časopisu *Chromatographia*) rok publikování (a je tomu tak i v anotacích).

Na straně 36 doktorské práce je dvakrát zmíněno, že monolity poskytují významně nižší separační účinnosti než konvenční sorbenty. S tímto tvrzením lze těžko souhlasit a tato teze může být zajímavým námětem pro diskusi v rámci obhajoby.

Na straně 37 se hovoří o separační účinnosti (separation efficiency) a příslušná veličina je označena H , je také takto uvedena i v seznamu zkratk. Navíc je uvedeno, že význam této

veličiny je totožný s HEPT (výškový ekvivalent teoretického patra). Zavedení veličiny H a její označení jako separační účinnost je dle mého názoru nevhodné, zavádějící a zbytečné v daném kontextu. Je obvyklé symbolem H označovat právě výškový ekvivalent teoretického (nebo krátce výšku patra). Na druhou stranu, separační účinnost je obvykle vyjádřována počtem pater kolony, N .

Dále je na téže straně pro lineární rychlost toku mobilní fáze použit symbol v , nicméně v seznamu zkratk je uveden symbol μ_0 a v rovnici (1) a textu na straně 37 zase pouze symbol μ .

Na straně 64 a 65 je konstatováno, že během chromatografického fingerprintingu bylo zaregistrováno 206 hlavních složek, které pak byly statisticky zpracovány metodami PCA, PCoA a HCA. Jakým způsobem byly tyto látky vybírány/určovány, jaká byla kritéria pro jejich výběr, jinak řečeno, jak jste se vypořádala s případnými a jistě častými potížemi při částečných překryvech jednotlivých složek/komponent, tj. při koelucích, byla prováděna nějaká dekonvoluce složek? Dále, výsledky PCA nejsou v práci uvedeny, z jakého důvodu? Nakonec, na základě textu na straně 65 se domnívám, že by ve Fig. 15 měl být někde uveden výsledek pro CCF4197-b, ale nepodařilo se mi jej na obrázku identifikovat (možná jde jen o tiskovou chybu a chybí pouze písmeno "b" v popisu bodu v grafu).

V případě Fig. 20 asi v legendě chybí specifikace frakce, která byla separována (předtím získána izolací dle postupu podle Fig. 18). Alespoň tak lze usuzovat na základě informací na stranách 70-72.

Na straně 70 se uvádí, že největší pík v chromatogramu Fig. 20 obsahoval směs bioaktivních látek, ale že se je nepodařilo v daném systému rozdělit na jednotlivé složky a dále mu tedy nebyla věnována pozornost. Nebylo by vhodné aplikovat jiný chromatografický mód než RP a pokusit se dělení dosáhnout?

V textu souvisejícím s Fig. 21 se uvádí, že se podařilo izolovat a nakonec podrobně MS charakterizovat dvě bioaktivní látky označené jako RJ0258-F1 a RJ0258-F2, a že se jedná o dvě chemicky čistá individua. Nicméně ve Fig. 21 je patrné, že pík/frakce označená jako RJ0258-F1 vykazuje raménko. Prosím o komentář této skutečnosti.

Přes výše uvedené připomínky závěrem konstatuji, že předložená práce je kvalitní. Uchazečka prokázala, že ovládá metody vědecké práce, má odpovídající teoretické i praktické znalosti a přinesla nové poznatky v oboru. Doporučuji přijetí její práce k obhajobě.

V Praze 19.3. 2013

Doc. Dr. RNDr. David Sýkora
Vysoká škola chmicko-technologická
Ústav analytické chemie
Technická 5
16628 Praha 6