

Posudek disertační práce

Vývoj metod pro zvýšení citlivosti detekce v CZE polyfenolických přírodních látek s využitím on-line elektromigračních prekoncentračních technik

Mgr. Jan Honegr

Školitel: doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Pracoviště:

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie

Těžištěm práce je vývoj a popis tří nových metod pro analýzu polyfenolických látek v rostlinných extraktech s využitím on line zakoncentrování.

- A) Metoda ITP-CZE v dvoukolonovém uspořádání pro stanovení pěti fenolických kyselin a kvercitrinu v extraktu z rostlinné drogy. Touto metodou bylo dosaženo velmi dobrých LOD - v desítkách ng/ml.

Vyvinutá metoda je velice citlivá a selektivní, avšak v porovnání s klasickou CZE je dvoukolonová kombinace ITP a CZE velmi náročná jak na instrumentaci, tak zejména na analytika. Proces není příliš robustní a ani vhodný pro rutinní analýzu. Velice náročný je zejména převod analytů preseparační kolony do analytické kolony.

- B) Metoda CZE s využitím techniky zakoncentrování analytů z velkého objemu s přepínáním polarity (LVSS-CZE) v jedné kapiláře pro analýzu čtyř fenolických kyselin a čtyř flavonoidů v methanolickém extraktu

Vypracovaná metoda prekoncentrace pomocí LVSS je charakterizována dobrou opakovatelností, výborným rozlišením a velmi uspokojivými limity detekce a kvantifikace. Limity detekce obstojí i ve srovnání s limity chromatografických metod. Tato metoda je navíc nenáročná a může být prováděna na komerčně dostupném zařízení bez nutnosti složité úpravy vzorku. Metoda se může stát vhodnou alternativou k dnes používaným chromatografickým metodám pro rutinní fytochemickou analýzu.

- C) Kombinovaná metoda přechodné isotachofórey a kapilární zónové elektroforézy (t-ITP-CZE) v jednokolonovém uspořádání byla aplikována na analýzu sedmi fenolických kyselin v potravinovém doplňku.

Prezentovaná metoda přechodné isotachofórey - kapilární zónové elektroforézy je vhodná pro kvalitativní i pro kvantitativní analýzu polyfenolických složek v doplňcích

stravy a v rostlinném materiálu. Prezentovaná on-line prekoncentrační metoda (tITP-CZE) má ve srovnání s dříve publikovanou dvoukolonovou metodou řadu výhod: Jednokolonové provedení může být realizováno na komerčně dostupném elektroforetickém analyzátoru bez potřeby úpravy instrumentace. Další obrovskou předností je možnost automatizace procesu přechodné isotachoforézy. Při srovnání CZE bez zakoncentrování bylo dosaženo pomocí tITP v průměru 70 násobného zakoncentrování. Její určitou nevýhodou je délka (30 min.) elektrokinetického dávkování. Avšak kombinace přechodné isotachoforézy s elektrokinetickým dávkováním, známá jako „electrokinetic supercharging“, má velký potenciál pro ještě větší snížení detekčních limitů s kratší dobou analýzy.

V části 6. Polyfenolické látky jsou uvedeny jejich vlastnosti a vlastnosti rostlinných drog, které je obsahují.

Výsledky publikoval autor ve formě tří článků v odborných časopisech s vyšším IF, formou 7 posterů (plakátových sdělení) a 2 přednášek na konferencích.

V rámci doktorského studia vypracoval autor ještě několik metod využitelných pro stanovení léčivých látek v léčivých přípravcích, jak např.:

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) diosminu a hesperidinu.

MEKC léčiv používaných k symptomatické léčbě při chřipce a nachlazení. Byla studována léčiva paracetamol, kyselina askorbová, fenylefrin, kofein a terpin.

MEKC léčiva pantothenanu vápenatého a doprovodných antimikrobních přísad – methylparabenu a propylparabenu .

Všechny publikované práce jsou přiloženy k předkládané disertační práci a jsou její součástí.

Rozsah práce - 183 stran, 12 tabulek a 42 obrázků a 150 odkazů - je přiměřený.

Připomínky:

a) Část 4. „Elektromigrační separační metody“ je poměrně obecná a dlouhá, i když pěkně zpracovaná. Výrazně by bylo možno zkrátit příliš teoretické a obecné části na str. 19 – 54.

Např. část 4.5.2 Kapilární isotachoforéza je příliš detailní.

Část 4, str. 20

„Separační techniky můžeme rozdělit podle způsobu separace do dvou velkých podskupin. Jedná se o metody, které využívají nestejně distribuce jednotlivých složek směsi mezi dvě fáze – toto je

principem kapalinové chromatografie (liquid chromatography; LC) a techniky založené na různé rychlosti pohybu jednotlivých složek v téže fázi, což je podstatou elektromigračních metod.“

Nesouhlasím se žlutě zvýrazněným tvrzením. Známe i další chromatografické techniky a metody.

b) Validace 9.5, 10.5.1, 10.5.2 , 11.6 – název těchto částí by měl být spíše Ověření vybraných parametrů vyvinutých metod.

Ve smyslu směrnice ICH Q2(R1) (International Conference on Harmonization, Quality) by pozornost měla být věnována parametrům: přesnost, linearita, rozsah, správnost, detekční a kvantitativní limit, (korekční odezvový faktor), selektivita, robustnost.

9.5.1 – Kalibrační závislost – název této části by měl být spíše linearita (oblast linearity).

9.5.2 - Opakovatelnost metody

Provedeno 6 analýz vzorku v průběhu jednoho dne. Kolik analytiků provádělo analýzu a kolik bylo využito přístrojů?

c) Sjednocení názvosloví:

Např. účinná látka, str. 130, odst. 1. a 3. Označení je spíše slangové, i když často používané.

d) Drobné překlepy, např.:

- chyba v českém názvu CIEF (str. 14)

- CMC, chyba v angl. názvu (str.14)

- MEKC, chyba v angl. názvu (str.15)

- SDS-PAGE, chyba v angl. názvu (str.16). Označení je např. na str. 21 správně.

- chyby v interpunkci: str. 21, 1. řádek, str. 30, odstavec 4.2.3.2, str. 60, 2. a 3 řádek, odst. 5.2.1.2, str. 60 ad.

- Výraz species (str. 45 ad.) patří podle mého názoru do jiného typu odborné literatury, několikrát se opakující výraz „balík“ např. analytů, zón atd. (str. 96, 97, 99 ad.) rovněž. Práce je sepsána jazykem, který spíše odpovídá beletrii. Text by si v řadě případů zasloužil určitou korekturu a určité „zhutnění“.

Otázky:

- 1) Jaké jsou oblasti preferenčního využití elektromigračních separačních metod ve farmaceutické analýze?
- 2) Co brání jejich většímu rozšíření v oblasti farmaceutické analýzy, případně implementaci do lékopisných článků.
- 3) Jakou budoucnost přisuzujete kapilární elektrochromatografii?
- 4) Mohou být elektromigrační separační metody konkurentem iontové (iontově výměnné) chromatografie?

Elektromigrační separační metody jsou v oblasti farmaceutické analýzy a kontroly neprávem opomíjeny, přestože mají v řadě případů značné výhody oproti jiným separačním technikám a metodám, jako např. HPLC. Autor navazuje na tradice, které tyto metody mají v Českých zemích a na Slovensku, a svou prací přináší cenné informace o jejich dalším rozvoji a možnostech jejich praktického využití při analýze léčivých látek a přípravků.

Přes výše uvedené připomínky, které mají většinou formální charakter, považuji předloženou práci za velice kvalitní jak po stránce teoretické, tak po stránce praktické. Autor při její realizaci prokázal schopnost samostatné vědecké práce, tvůrčí přístup k řešení, dobré teoretické znalosti a velkou zručnost.

Z výše uvedených důvodů doporučuji jeho doktorskou disertační práci k obhajobě a dalšímu řízení podle zákona o VŠ k udělení titulu Ph.D.