

Mgr. Tereza Tylová:

**Liquid chromatography methods for analysis of microbial
secondary metabolites of bioactive nature**

Mgr. Tereza Tylová vypracovala disertační práci, ve které shrnuje výsledky výzkumu analýzy antibiotik a sekundárních metabolitů hub. Použité analytické postupy zahrnovaly izolaci a prekoncentraci analytů pomocí extrakce tuhou fází a jejich následnou analýzu kapalinovou chromatografií se spektrofotometrickou a hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Motivací pro studium těchto látek je rostoucí rezistence patogenů vůči současným antibiotikům používaným v humánní i veterinární medicíně.

Disertační práce byla vypracovaná v anglickém jazyce a je řešena jako soubor publikovaných prací doplněný obsáhlým úvodem, experimentální částí a komentáři k získaným výsledkům. Samozřejmou součástí práce jsou i jednoznačně definované cíle práce, dvojjazyčný abstrakt a seznam zkratk. Disertační práce je sepsána čtivě a velmi pečlivě s minimem chyb a překlepů. Celkově ji hodnotím jako velmi zdařilou.

Úvodní kapitoly detailně seznamují čtenáře s problematikou sekundárních metabolitů s důrazem na antibiotika a jejich třídění. Podrobně jsou diskutovány skupiny látek, které byly předmětem výzkumu. Zmíněny jsou způsoby získávání nových antibiotik z přírodních zdrojů. Autorka se dále v úvodu věnuje separačním technikám vhodným pro získání a následnou analýzu sekundárních metabolitů. S ohledem na nejnovější vývoj v oboru jsou diskutovány moderní stacionární fáze pro HPLC a UHPLC založené na sub-2 µm porézních částicích, povrchově-porézních částicích a monolitických fázích. Přehledně jsou popsány detektory pro kapalinovou chromatografii a úskalí matričních efektů, které ovlivňují hmotnostně-spektrometrickou odezvu analytů. Teoretický úvod je zakončen kapitolami o chromatografickém „fingerprintingu“ sekundárních metabolitů a vyhledávání nových antimikrobiálních látek pomocí chromatografických technik a biotestů. Vysoká úroveň úvodních kapitol svědčí o velmi dobré orientaci uchazečky ve studované problematice.

Komentáře k výsledkům jsou členěny podle jednotlivých dílčích cílů práce. V první části se autorka věnuje analýzám antibiotik v chlévské mrvě a odpadních a povrchových vodách, druhá část se zabývá vývojem analytických metod pro studium sekundárních metabolitů produkovaných houbami rodu *Geosmithia* a třetí část představuje srovnání kolon s povrchově porézními částicemi a plně porézními částicemi pro analýzu sekundárních metabolitů. Výsledky komentované v disertační práci byly publikovány formou čtyř článků v renomovaných odborných časopisech, u nichž je uchazečka první autorkou (*Chemosphere, Analytical Methods, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Chromatographia*).

K práci mám tyto připomínky a dotazy:

1. Veličina H , která vystupuje ve van Deemterově rovnici na str. 37 a odpovídá výškovému ekvivalentu teoretického patra (HETP) je v textu označena jako „separation efficiency“. Tento termín nepovažuji za vhodný, neboť hodnota HETP je účinnosti kolony či systému úměrná nepřímo.
2. Struktura přírodní látky chlortetracyklinu uvedená na str. 21 je zajímavá přítomností chloru. Látky obsahující chlor obecně nejsou v přírodě příliš rozšířené. Jak je tomu u mikroorganismů? Je něco známo o zdroji chlóru při biosyntéze těchto sloučenin?
3. Na str. 40 je uvedeno, že výhodou analyzátoru TOF je jeho schopnost analyzovat teoreticky neomezený počet látek. Domnívám se, že autorka spíše než výhody TOFu má na mysli obecné výhody necílené analýzy s využitím analyzátoru s vysokým rozlišením, kterou lze realizovat např. i pomocí orbitrapu či iontové cyklotronové rezonance. Prosím o komentář.
4. V tabulce na str. 59 jsou uvedeny koncentrace antibiotik zjištěné před a za čistírnou odpadních vod. Čistírny jsou označeny anonymně. V případě čistírny označené písmenem A byl zjištěn výrazně nižší obsah antibiotik než u ostatních lokalit. Je možné tento výsledek komentovat?
5. Při dělení sekundárních metabolitů houby *Geosmithia* byly získány dvě frakce s výraznou antimikrobiální aktivitou. U těchto látek byla změřena hmotnostní spektra a určeno elementární složení. Fragmentační spektra negativních iontů naznačují chemickou příbuznost těchto látek. Jaký byl či by mohl být další postup při identifikaci (charakterizaci) těchto látek pomocí hmotnostní spektrometrie? Lze pomocí preparativní chromatografie izolovat dostatečné množství těchto metabolitů pro NMR analýzu?

Závěrem rád konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Terezy Tylové je podložena kvalitními vědeckými výsledky, které přináší nové poznatky v oblasti analýzy antibiotik a sekundárních metabolitů hub. Lze shrnout, že uchazečka dostatečně prokázala připravenost k samostatné vědecké činnosti a proto její disertační práci **doporučuji přijmout k obhajobě**.

V Praze dne 27. března 2012

Cvačka

.....
doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.