

POSUDEK NA DOKTORSKOU DISERTAČNÍ PRÁCI

Název práce: Vývoj a optimalizace kroku úpravy vzorku pro rychlé chromatografické analýzy

Autor: Mgr. Veronika Pilařová

Oponent: Doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Předkládaná doktorská disertační práce se věnuje vývoji a optimalizaci moderních extrakčních postupů pro úpravu vzorku před jeho analýzou spojením ultraúčinné kapalinové nebo superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Práce má klasické členění na Úvod, Cíl práce, Teoretickou část, Výsledky a diskusi, Závěr a Literaturu. Dále obsahuje seznam publikovaných prací, posterů a přednášek, které tematicky s disertační prací souvisí. Jednotlivé publikované práce jsou do disertační práce vevázány formou příloh.

Teoretická část je rozdělena na část zabývající se různými postupy úpravy biologických vzorků před analýzou a na kapitoly věnované chromatografickým metodám s důrazem na rychlost separace. Teoretickou část vzhledem k zaměření práce logicky doplňuje kapitola zabývající se validacemi analytických metod. Teoretická část práce ukazuje, že autorka má ve sledované problematice hluboké znalosti a nadhled. K těmto kapitolám si dovoluji jen několik otázek a komentářů:

1. Na straně 24 autorka uvádí, že centrifugace (jako metoda pro úpravu vzorku) slouží kromě oddělení pevné od kapalné složky k homogenizaci vzorku, pokud jsou do biologického materiálu přidány kuličky. Může autorka postup blíže popsat? Je homogenizace důsledkem centrifugace nebo některého kroku předcházejícího centrifugaci?
2. K určité polemice vede konstrukce Tabulky 1. Autorka například uvádí jako nevýhodu SPE extrakce nutnost speciálního vybavení (vakuová pumpa a SPE manifold). Centrifugace ale v tomto smyslu také vyžaduje určitou investici – pořízení centrifugy, tu ale už autorka za nákladnější zařízení nepovažuje. Navíc, centrifugace je často také součástí ostatních uváděných purifikačních metod a dle mého názoru není úplně šťastné ji dávat na roveň ostatním popisovaným purifikačním metodám. Tabulka 1. nepodává zobecňující informaci a odráží spíše situaci v určitém typu laboratoří.
3. Na straně 27 autorka uvádí on-line extrakční metody. Mezi ně řadí i RAM (restricted access material). Ten se ale dá použít i off-line.
4. Ve výčtu metod používaných pro úpravu biologických vzorků postrádám dialýzu.
5. Na straně 42 autorka uvádí van Deemterovu rovnici a člen C popisuje, jako odpor proti převodu hmoty **mezi** mobilní a stacionární fází. Představa, že tento člen popisuje převod hmoty (přes rozhraní) mezi oběma fázemi, ale není úplně správná. Jde o popis odporu proti převodu hmoty v mobilní fázi **a** ve fázi stacionární. Význam odporu proti převodu hmoty v jednotlivých fázích je potom závislý na použitém chromatografickém systému (velikost částic sorbentu a charakter stacionární, stagnantní a mobilní fáze).

Na Teoretickou část navazují Výsledky a diskuze, přinášející v šesti kapitolách informace o vlastní experimentální práci autorky. Na tomto místě je třeba vyzdvihnout pečlivost, s jakou autorka prostudovala velké množství experimentálních parametrů purifikace a separace pro různé typy vzorků. Všechny

experimenty jsou dobře popsány a doplněny výsledky validací. I k této části mám několik připomínek a dotazů:

1. Na straně 70, v kapitole věnované stanovení tokoferolů a tokotrienolů, autorka uvádí, že byla vyvinuta metoda pro analýzu 8 izomerních forem vitamínu E. Toto vyjádření není přesné, protože izomerní jsou v této směsi jen beta a gama-tokoferol a beta a gama-tokotrienol.
2. Struktura isorhamnetinu na obr. 39 není správná – isorhamnetin nese jen jednu methoxyskupinu na B-kruhu.
3. Na obr 40 jsou vidět rozdíly v separaci isorhamnetinu a tamarixetinu. Nejlepší separace je pozorována na při použití kolony BEH Shield RP C18, 100 mm. Na této koloně je ale výrazně vyšší šum nebo nižší signál analytů, než u ostatních kolon. Pokud jsou všechny ostatní parametry kromě typu kolony zachovány, čím si autorka tento rozdíl oproti dalším dvěma kolonám vysvětluje?
4. V kapitole 4.5. je popisován vývoj metody pro přečištění vzorku a stanovení tyrosolu a farnesolu. Obě látky byly ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu. Tyrosol jako slabá kyselina by mohl být ionizován i v negativním módu. Jaký je názor autorky na tuto možnost?
5. Prosim o podrobnější interpretaci obrázků 58 a 59 popisující grafické znázornění přesnosti, správnosti a matricových efektů. Pro každou látku a každý postup přečištění je v grafu přítomno větší množství bodů (experimentálních bodů stejného tvaru a barvy). Co vlastně znázorňují? Jde o opakované sety měření? Proč jsou v obrázku 58 pro každý systém čtyři body a v obrázku 59 jen dva? Jak interpretovat rozdíly v jednotlivých systémech (mezi body stejného tvaru)?

Součástí práce je přehled publikovaných prací autorky. Všechny práce jsou publikovány v časopisech s velmi slušným impakt faktorem, prošly přísnou a nezávislou recenzí a o jejich kvalitě není sporu. Dle tohoto přehledu je Mgr. Pilařová první autorkou dvou prací (J. Chromatogr. B a Anal. Chim Acta) a spoluautorkou dalších tří prací.

Závěrem mohu konstatovat, že předložená disertační práce je po obsahové, jazykové i formální stránce zdařilým dílem. Uvedené připomínky nejsou zásadního charakteru a nesnižují hodnotu této práce. Autorce se podařilo získat řadu zajímavých výsledků, které jsou dobře implementovatelné do farmaceutické a klinické kontrolní praxe. Jak již bylo zmíněno, o kvalitě jejich výsledků svědčí i jejich uveřejnění prestižních odborných časopisech. Práce jednoznačně splňuje požadavky stanovené zákonem pro tento typ prací.

PŘEDLOŽENOU DISERTAČNÍ PRÁCI DOPORUČUJI K OBHAJOBĚ.

V Olomouci, dne 25.1. 2017

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc