

Ing. Eva Cífková: Lipidomická analýza rostlinných a živočišných tkání technikou HPLC/MS

Disertační práce Ing. Evy Cífkové se zabývá vývojem a aplikacemi chromatografických a hmotnostně-spektrometrických metod pro komplexní analýzu směsí lipidů.

Uchazečka vypracovala metodu pro off-line dvourozměrnou chromatografickou separaci celkových lipidových extraktů s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie kombinující HILIC a reverzní chromatografii. Prvním krokem byla optimalizace separace v HILIC módu, kdy byla testována celá řada komerčních kolon obsahujících plně porézní i povrchově porézní částice s pevným jádrem. Podařilo se nalézt podmínky pro separaci 16 lipidových tříd. V dalším kroku byl optimalizován systém reverzní chromatografie pro dělení molekulových druhů na základě délky jejich acylových řetězců a počtu dvojných vazeb. I zde byla optimalizace velmi pečlivá, založená na důkladném testování velkého počtu kolon a podmínek. Polární lipidy byly ionizovány pomocí elektrospreje v kladném i záporném módu. Podařilo se vzájemně dělit i lipidy lišící se vazbou mastné kyseliny, tj. estery, ethery a vinyl ethery (plasmalogeny). K ionizaci neutrálních triacylglycerolů a cholesterolu byla využita technika APCI. Další část práce byla věnována kvantitativnímu stanovení lipidů, a to zejména vývoji necílené metody pro kvantifikaci lipidových tříd. Navržený postup využívá jednoho vnitřního standardu a odezvoových faktorů lipidů jednotlivých tříd. Správnost metody byla ověřena srovnávací kvantitativní analýzou založenou na MS/MS (SRM na trojitém kvadrupólu) a dále měřením ^{31}P NMR spekter.

Disertační práce je členěna klasickým způsobem, je zpracována jasně a přehledně. Teoretická část přináší úvod do problematiky lipidů a jejich analýzy. Na téměř 30 stranách je čtenář podrobně seznámen s jednotlivými třídami lipidů, technikami a systémy kapalinové chromatografie a detaily instrumentace hmotnostních spektrometrů. Zařazení některých kapitol však nepovažuji za nutné, např. všeobecně známé informace o HPLC (kap. 2.2.1.) či kapitoly o principech hmotnostních analyzátorů, které v práci využity nebyly (kap. 2.3.2.2., 2.3.2.4., 2.3.2.5.). Experimentální část dostatečně podrobně informuje o použitých postupech a podmínkách měření. Následující kapitola odpovídajícím způsobem informuje o výsledcích experimentů a přináší relevantní diskusi. Disertační práce je ukončena závěrečným shrnutím, seznamem literatury a přílohami.

Celkově hodnotím disertační práci Ing. Evy Cífkové jako mimořádně zdařilou. Díky velmi pečlivé optimalizaci separačních systémů a detekce se podařilo vypracovat obecně použitelnou metodu pro necílenou kvalitativní a kvantitativní analýzu komplexních směsí lipidů. Správnost a přesnost tohoto postupu byla ověřena srovnáním se standardními metodami a její praktická použitelnost byla demonstrována na vzorcích lipidů z několika orgánů prasete domácího. O skvělé úrovni práce svědčí i to, že na jejím základě vzniklo několik prací, které byly publikovány v prestižních časopisech (*Analytical chemistry*, *Journal of Chromatography A*).

I přes velmi pečlivé zpracování se v práci objevuje několik nepřesností, na které je mou povinností upozornit:

1/ str. 16. Eikosanoidy většinou neposkytují při hydrolýze 3 a více produktů.

2/ str. 19. Tuk z vorvaně, vorvaňovina, dnes není významnou surovinou pro průmysl, protože velryby jsou celosvětově chráněné.

3/ str. 22. V Tabulce 2 je chybně uvedena funkční skupina fosfatidylethanolaminu.

4/ str. 35. U DESI nedopadá na povrch vzorku proud iontů, ale proud nabitých kapek.

A ještě drobná poznámka použité k terminologii měřených vzorků, která mi připadá příliš „řeznická“. Do vědecké literatury by se např. dle mého názoru spíše hodil termín „mozek prasete domácího“ než v práci uváděný „vepřový mozek“.

K práci mám následující dotazy:

1/ str. 20. Na str. 20 se uvádí, že TG jsou v lipoproteinech vázány na bílkovinné řetězce. Jakým způsobem jsou tyto lipidy vázány?


2/ str. 55. V reverzní chromatografii byl pozorován výrazný vliv koncentrace vody v mobilní fázi na retenci lipidů obsahující polynenasycené acylové řetězce. Očekával bych obdobný vliv i u lipidů s nasycenými či mononenasycenými acyly. U nich tento efekt pozorován nebyl?

3/ str. 59. Použití hmotnostního spektrometru s nízkým rozlišením v některých případech komplikovalo jednoznačnou identifikaci. Autorka uvádí například PC, u nichž může pozorovaný signál odpovídat jak $[M+H]^+$ tak $[M+Na]^+$. Jakým způsobem bylo rozhodnuto, o jaký adukt a tedy i o jaký lipid se jedná?

4/ str.72. Na Obr. 29 je zobrazeno relativní zastoupení tříd lipidů v orgánech prasete zjištěné pomocí necílené kvantitativní analýzy lipidů. Byly měřené vzorky reprezentativní, tj. odpovídá uvedené složení průměrné distribuci těchto lipidů v celém orgánu?

Závěrem rád konstatuji, že Ing. Eva Cífková vypracovala velmi kvalitní vědeckou práci, ve které dostatečně prokázala připravenost k samostatné vědecké činnosti. Disertační práci proto **doporučuji** přijmout k obhajobě.

V Praze dne 19. února 2013


.....
doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
<http://www.faf.cuni.cz>, tel. +420 495 067 381, fax +420 495 067 164

POSUDEK NA DOKTORSKOU DISERTAČNÍ PRÁCI

Název práce: Lipidomická analýza rostlinných a živočišných tkání technikou HPLC/MS

Kandidát: Ing. Eva Cífková

Oponent: Doc. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

OBECNÁ CHARAKTERISTIKA:

Předložená disertační práce se zabývá extrakcí, separací, identifikací a kvantifikací lipidů z různých tříd s využitím LC-MS a několika separačních přístupů. Práce je sepsána na 114 stranách textu včetně příloh a seznamu předložených výstupů a obsahuje 158 literárních odkazů. V teoretické části se autorka podrobně zabývá klasifikací a charakteristikou lipidů a základními principy použitých technik kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Je škoda, že autorka se na jedné straně věnuje principům běžných technik, zatímco krátký komentář a některé aspekty méně obvyklé techniky 2D-HPLC v teoretické části chybí. Největší výtkou k této části je opomenutí literárních referencí při popisu teoretických zákonitostí, které jsou obecně dobře známy, avšak autorka práce není zároveň autorkou těchto teorií. Následuje experimentální část a výsledky a diskuse, kde autorka stručně, ale jasně a výstižně popisuje jednotlivé experimenty a následně hodnotí a komentuje získané výsledky. Část výsledky a diskuse je dokumentována mnoha chromatografickými záznamy, grafy a několika souhrnnými tabulkami, které jsou pak také součástí příloh. Tento fakt však lehce komplikoval orientaci v textu a jeho přehlednost, protože logika zařazení obrázku do textu nebo do přílohy mi nebyla zcela zřejmá.

Celkově práci hodnotím velmi kladně. Její členění odpovídá obvyklým normám. Práce je sepsána přehledně s minimem překlepů a gramatických chyb. Vybraná témata jsou adresována stručně, věcně a výstižně.

Autorka ve své disertační práci předkládá 2 články přijaté ve velmi kvalitních mezinárodních odborných časopisech (Journal of Chromatography A a Analytical Chemistry), dále jeden článek, který je v recenzním řízení (časopis Lipids) a 4 články publikované v národních vědeckých časopisech. Ing. Eva Cífková je také autorkou nebo spoluautorkou

mnoha odborných prezentací, a to posterů i přednášek, jak na tuzemských, tak na zahraničních konferencích. Publikační aktivitu hodnotím jako vysoce nadstandardní, zejména díky rozsahu experimentů potřebných pro získání publikovaných výsledků a dále díky vysoké kvalitě publikovaných článků. Vynikajícím výsledkem a opravdovou výjimečností je prvoautorství na publikaci v časopise Analytical Chemistry.

K PRÁCI MÁM NÁSLEDUJÍCÍ PŘIPOMÍNKY A KOMENTÁŘE:

- V seznamu zkratk chybí některé zkratky, jako např. názvy analyzátorů uvedené v Tabulce 3. Jde sice o velmi obvyklé zkratky, ale vzhledem k tomu, že jsou zahrnuty i zkratky typu HPLC, měl by seznam být kompletní.
- Pro pojem „interní standard“ existuje v češtině lépe zavedený název „vnitřní standard“.
- Zkratka UHPLC by správně měla být interpretována jako ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (analogicky jako HPLC).
- V tabulce 2 jsou některé funkční skupiny uvedeny nesprávně (jmenovitě pro fosfatidylethanolamin a pro kyselinu fosfatidovou).
- Str. 28: v závorkách jsou uvedeny velikosti částic pro povrchově porézní částice a částice menší než 2 μm , což je v tomto kontextu poněkud zavádějící. Není jasné, zda jde o příklad nebo zda to jsou jediné dostupné rozměry.
- Str. 28: konstatování „mrtvý objem systému je minimalizován...“ atd. postrádá nejdůležitější aspekt, a to snížení vlivu mimokolonových příspěvků na účinnost separace.
- Str. 28: nesouhlasím s konstatováním „stacionární fáze na základě silikagelu jsou stabilní pouze do 30 MPa“.
- Str. 30: mechanismus adsorpce analytu se v HILIC uplatňuje, ale spíše jako vedlejší, hlavním mechanismem je zde rozdělování, jak je popsáno až v závěru tohoto odstavce.
- Str. 48: termín povrchově porézní kolony není z odborného hlediska správně vyjádřen.
- Str. 48 a dále: vyjádření jednotek koncentrace by mělo být jednotné a správné. Koncentrace octanu amonného vyjádřená v mmol je nesprávně.
- Str. 54: rozlišení separace není terminologicky správný pojem.
- Obr. P2: je vyjádření koncentrace octanu amonného 0 mM správně? Nejde o překlep? Byly testovány také další koncentrace pufru nebo pouze tyto dvě?

DOTAZY A NÁMĚTY DO DISKUSE:

- 1) Na straně 51 je uvedeno: „Robustnost optimalizované extrakční metody byla testována srovnáním koncentrací atd.“ Je toto konstatování správně z pohledu validace metody? Jaká je definice robustnosti?
- 2) Kapitola 4.2 je nazvána „Optimalizace HILIC separace“. Na straně 54 je poté jako testovaná mobilní fáze uveden také hexan. Prosím o komentář a vysvětlení.
- 3) Obr. P5: gradientová eluce v RP-HPLC: Byl čas gradientu ve všech třech případech 60 minut? Interpretace těchto záznamů není úplně jasná. Jaký byl systémový tlak při použití isopropanolu v mobilní fázi?
- 4) Jaká byla opakovatelnost kvantifikace při použití $[M+Na]^+$ jako prekurzorového iontu? Byla fragmentace těchto iontů pro získání SRM přechodu snadná?

ZÁVĚR A DOPORUČENÍ:

Předložená disertační práce „Lipidomická analýza rostlinných a živočišných tkání technikou HPLC/MS“ je sepsána velmi kvalitně a splňuje požadavky kladené na tento typ prací jak po formální, tak po odborné stránce. Přináší nové a hodnotné vědecké výsledky a potvrzuje schopnost autorky Ing. Evy Cífkové samostatně vědecky pracovat, vyhodnotit získané výsledky a vyvodit příslušné závěry.

Práci proto doporučuji k obhajobě a následně k udělení titulu Ph.D.

Lucie Nováková

Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

V Hradci Králové, 16. 02. 2013

Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.
Katedra analytické chemie
Farmaceutická fakulta
Univerzita Karlova v Praze
500 05 Hradec Králové
novakoval@faf.cuni.cz