

Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Lubora Urbánka „Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení specifických analytů v biologickém materiálu“

Předložená práce Mgr. Lubora Urbánka vznikla na pracovišti výzkumných laboratoří gerontologické a metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové a představuje inovativní rozvinutí chromatografických metod školitelky–specialistky RNDr. Dagmar Solichové, PhD. Příspěvek Mgr. Lubora Urbánka spočívá ve vývoji nových postupů v preanalytické fázi zpracování biomatrice včetně solid-phase extrakce studovaných analytů, v otestování a využití nových chromatografických materiálů a ve validaci celého bioanalytického postupu (tedy procesu extrakce analytů ze vzorku biomatrice a jejich HPLC analýzy) podle zásad správné laboratorní praxe. Studovanými analyty byly dva liposolubilní vitaminy A a E, jejich metabolity a pteridinový derivát neopterin.

Předložená dizertace má rozsah 182 stran s 94 citacemi, je členěna způsobem obvyklým pro tento typ kvalifikační práce. V úvodu autor nastínil možnosti využití bioanalytické HPLC v klinickém výzkumu a praxi biochemických laboratoří. V teoretické části se věnuje současným trendům a novinkám ve vysoceúčinné kapalinové chromatografii a preanalytické fázi, tedy odběru a přípravě biomatrice, extrakci analytů, které byly předmětem jeho zájmu. Vysoce oceňuji způsob zpracování kapitoly 3.3 věnované novým typům chromatografických materiálů. Poslední oddíl teoretické části je věnován podrobnějšímu popisu vlastností studovaných analytů, jejich metabolismu a klinické využitelnosti sledování hladin vitaminů A a E pro posuzování nutričního stavu organismu a sledování rozvoje oxidačního stresu u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Stanovení aktuálních hladin neopterinu bylo využíváno k monitorování aktivace imunitního systému u onkologických pacientů.

Experimentální část dizertace tvoří komentovaný rámec k 12 publikacím. Na dvou z nich je Mgr. Lubor Urbánek prvním autorem (*Analytica Chimica Acta*, IF=2,89; *Journal of Separation Science*, IF=2,54). Devět z těchto 12 publikací jsou biomedicínské publikace prof. Melichara a Dr. Kalabové, které využívají výsledky získané s použitím bioanalytických metodik vyvinutých Mgr. Urbánkem, Dr. Solichovou a jejich spolupracovníky. Dizertant se dále podílel jako autor nebo spoluautor na 21 posterových sděleních (8 z nich v zahraničí), 4 přednáškách a grantových projektech (2x hlavní řešitel, 8x spoluřešitel) a 2x jako spoluřešitel výzkumných záměrů.

Z uvedeného přehledu je evidentní, že Mgr. Lubor Urbánek získal během své postgraduální výchovy velké znalosti i praktické zkušenosti v oblasti bioanalytické

instrumentální metodologie, prokázal schopnost prezentovat a obhájit své výsledky na tuzemských i zahraničních odborných fórech a jím vyvinuté a aplikované bioanalytické metody se staly cenným zdrojem informací pro lékaře v klinickém a medicínském výzkumu.

Doporučuji tedy, aby dizertační práce Mgr. Lubora Urbánka byla přijata k obhajobě a stala se podkladem k získání vědecké hodnosti Ph.D.

Dotazy, připomínky, doporučení :

DAD, PDA jsou zkratky překládané autorem jako detektor diodového pole. Podle mého názoru se detegují analyty, nikoli diodové pole. Nebyl by tedy lepší překlad „detektor s diodovým polem“?

Podle současně platné normy CDER and CVM Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001 :

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>

se starší označení LOQ nahrazuje LLOQ, protože rozsah stanovitelnosti analytu je vymezen nejen spodním limitem kvantifikace (lower limit of quantification, LLOQ) ale také horním limitem kvantifikace (upper limit of quantification, ULOQ).

Str.14, řádek 13...termostat kolony zvyšuje nejen opakovatelnost stanovení, ale zvýšená teplota umožňuje urychlit desorpci analytu a zkrátit dobu analýzy.

Str.15, řádek 12...doporučuji lepší vyjádření : „Z hlediska architektury bychom analytické kolony mohli rozdělit na částicové a monolitní.“

Str.17, poslední odstavec a str.58...je uvedena 100% vodná fáze, kterou na str.59, 5. řádek zdola zpochybňujete

Str.28, 5.řádek zdola...“mohou působit na metabolismus stanovované látky jako enzymové induktory nebo inhibitory...”

Str. 30, 6.řádek zdola...extremní teplota je i -70 °C, která je pro transport biologického vzorku naopak výhodná

Str. 31.....není zmíněn význam vnitřního standardu pro HPLC analýzu extraktů z biomatrice.

Str.32, 15.řádek....přídavek kovových iontů (tvorba iontových párů) : vysvětlíte ???

Str. 33, 4. řádek, str.37, 8.řádek....“principiálně...“- Slovník spisovné češtiny, Academia 2005, str.308

Str. 35, 5. řádek zdola...“izolovanýchých...”

Str. 38, obr. 12...doporučuji očíslování skeletu

Str. 59, 9.řádek...“...fluorescenčního...”

Str.60-61, obr.17, 18...postrádám popis chromatogramu (t_R , název analytu). Obr. 18 je dvakrát (str.60 i 61)

Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Ústav experimentální biofarmacie

společné pracoviště PRO.MED.CS Praha a.s.

a Akademie věd České republiky

Heyrovského 1207

500 03 Hradec Králové

V Hradci Králové, 18.6.2009