

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce:

Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení biologicky aktivních látek v klinické praxi.

Autorka disertace: Mgr. Lenka Krčmová

HPLC patří v bioanalýze mezi nejužívanější analytické metody vzhledem k neustálému rozvoji, modernizaci, flexibilitě, uplatňování moderních technologií a přizpůsobení se požadavku na miniaturizaci. To dokládá i tato předložená disertační práce, která prezentuje využitelnost HPLC analýzy při monitorování vybraných biologicky aktivních látek v klinické praxi na Gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Práce se zabývá vývojem, modernizací a validací HPLC metodik s cílem zajistit jednoduchou, rychlou a reprodukovatelnou analýzu biologicky aktivních látek v minimálním objemu biologických vzorků (měřených ve velkých sériích). Analyzovány byly vitamín A a E (a jejich deriváty), dále neopterin, kynurenin, tryptofan a kreatinin v různých biologických materiálech.

Předložená disertační práce má i se všemi přílohami 357 stran a odkazuje na 217 citací. Je členěna do 11 kapitol, v třetí kapitole je seznam zkratk. Práce je koncipována obvyklým způsobem – úvod, cíl práce, část teoretická a experimentální, přehled prací doktorandky, závěr, literatura a poté (od str. 200) následují přílohy publikací (kap. 10) a vybraných posterů (kap. 11). Abstrakty jsou uvedeny na počátku práce, před obsahem.

V teoretické části je velmi podrobně pojednáno o moderních trendech v HPLC, o validaci HPLC metod v bioanalýze, o biologickém materiálu a o jeho transportu i skladování (tj. o preanalytické části analýzy), dále o zpracování a úpravách biologického vzorku před HPLC analýzou a o hodnocených látkách (vitamin A, vitamin E, neopterin, kynurenin, tryptofan a kreatinin – jsou uvedeny vlastnosti, metabolismus, klinický význam, výskyt a rešerše jejich stanovení). Vše je doloženo mnoha obrázky a přehledy v tabulkách.

Experimentální část je rozdělena na dvě části – v první, analytické, jsou popsány vyvinuté metodiky a v druhé, klinické, je podán komentář k biomedicínským studiím, při nichž se uplatnily vyvinuté metodiky. V analytické části je uvedeno 5 vypracovaných metodik pro hodnocení výše zmíněných látek – u každé metodiky je úvod, cíl, výsledky (úprava biolog. vzorků, chromatogramy, tabulky, grafy, validační parametry) a v závěru je metodika zhodnocena a odkázáno na publikaci v kapitole přílohy.

Publikace uvedené v kap 10 (Přílohy I – publikace) jsou rozděleny na analytické (4 práce) a klinické (18 prací). Ve třech analytických publikacích je doktorandka autorkou, ve čtvrté je na druhém místě autorského kolektivu. Tyto 4 publikace jsou uveřejněny v časopisech, jejichž impakt faktor je od 1,7 do 3,27. Přehled všech prací doktorandky je uveden v kapitole 6.

K práci mám tyto připomínky a dotazy:

- domnívám se, že u kap. 4.5.3. a 4.5.7. (rešerše stanovení látek) by bylo vhodnější uvádět odkazy na literaturu průběžně v textu, tak jak je uváděno v celé disertační práci (nikoliv souhrnně na konci kapitoly)
- chemický název přesně neodpovídá uvedenému vzorci (obr 60, 64)
- určité nepřesnosti: např. str. 127 „...reverzní fáze C18 o velikosti 250x4,0 mm s velikostí částic 7-3 μm .“ a nebo v citacích v kap 9 , např. cit 131, cit 177

1. V disertační práci užíváte výraz „absorpční“. Mohla byste objasnit výrazy „absorpční“ a „adsorpční“ a uplatnění těchto výrazů v analytické chemii, event. i u chromatogr. metod (vztaženo na str. 22, 84)?

2. Jakou zkratkou je nejčastěji označován Evropský (event. americký) lékopis?

3. V kapitole 4.2.1. se zmiňujete o různých druzích validace. Použila jste průzkumovou validaci u vypracovaných metod? A jak často ve výzkumné laboratoři aplikujete retrospektivní validaci?

Závěrem lze konstatovat, že disertační práce je, i přes uvedené připomínky, pečlivě zpracována, o čemž svědčí i skutečnost, že v teoretické a experimentální části je celkem 106 obrázků a 43 tabulek. Zpracované téma je aktuální, výsledky využity v klinické praxi. Doktorandka prokázala teoretické i praktické znalosti svědčící o způsobilosti k samostatné vědecké práci. Presentace výsledků potvrzuje, že má zkušenosti jak s úpravou biologických vzorků, tak s HPLC metodou a též i její validací.

Předložená disertační práce, kterou vypracovala Mgr. Lenka Krčmová, splňuje požadavky kladené na disertační práci a proto doporučuji, aby byla přijata k dalšímu řízení o udělení vědecké hodnosti Ph.D.

Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

V Hradci Králové 6. září 2010