

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Analytické chemie

Kandidát: Mgr. Lenka Krčmová

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Název disertační práce: Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení biologicky aktivních látek v klinické praxi

Disertační práce se zabývá vývojem a validací HPLC metod aplikovatelných pro klinický výzkum a praxi ve Výzkumné laboratoři Kliniky gerontologické a metabolické (GMK) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. V této práci byly využity některé moderní analytické postupy umožňující přípravu velkých sekvencí vzorků biologického materiálu, sloužící k urychlení separace analyzovaných látek a dosahující snížení spotřeby rozpouštědla i analyzovaného vzorku, atd.

Nově byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení kyseliny 13-cis a all-trans retinové, retinolu, alfa- a gama-tokoferolu v lidském séru s vnitřní standardizací pro pacienty trpící akutní promyeloidní leukémií léčené kyselinou retinovou. Jako extrakční postup byla zvolena extrakce na tuhou fázi a pro separaci bylo využito výhod monolitické stacionární fáze. Nově byla také vyvinuta metoda pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru s využitím monolitických stacionárních fází. Tato metoda byla vyvinuta s ohledem na velké série vzorků, které je nutno zpracovat. Pro přípravu biologického materiálu bylo sérum pouze naředěno, deproteinováno, centrifugováno a filtrováno. Pro filtraci byly použity mikrotitrační destičky s filtry a speciální manifold umožňující filtrovat 96 vzorků v jednom kroku ve velmi krátké době. Výhodou byla také kombinace se speciálním autosamplerem pro mikrotitrační destičky, jež nabízí možnost vzorky uchovávat v chladu, chráněné před světlem a zakoncentrováním. Tato metoda byla také částečně validována pro jiné druhy biologického materiálu jako jsou plodová voda a exsudát a bude využita pro stanovení cílových analytů u pacientů prof. Melichara z Onkologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové a Fakultní nemocnice v Olomouci. Některé již zavedené metody ve Výzkumné laboratoři GMK byly modernizovány. Došlo k modernizaci extrakčního postupu metody pro stanovení retinolu a alfa-tokoferolu v lidském séru, metoda byla rozšířena o separaci gama-tokoferolu. Pro extrakci na pevnou fázi bylo

využito vnitřní standardizace, následně byl postup miniaturizován, HPLC metoda převedena na moderní kapalinový chromatograf Prominence LC 20 (Shimadzu) a kompletně revalidována. Metoda pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči, využívaná pro velké sekvence vzorků, byla obohacena o další analyt (kynurenin), který pomáhá objasnit procesy týkající se aktivace imunitního systému, bylo využito výhod hybridní kolony Gemini-Twin, jež se osvědčila pro velké série vzorků (1 kolona/1000 analýz filtrované moči). Tato metoda byla revalidována.

Všechny vyvinuté i modernizované metody umožnily rozšířit spektrum vyšetření ve Výzkumné laboratoři Kliniky gerontologické a metabolické ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (FNHK) a jsou v současné době využívány pro klinické studie prováděné na různých odděleních Fakultní nemocnice v Hradci Králové a na Onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci.