

Oponentský posudek disertační práce

Název disertační práce: Využití technik HPLC a UHPLC - MS/MS pro klinický výzkum

Autor disertační práce: Mgr. Kateřina Kučerová

Disertační práce Mgr. Kateřiny Kučerové se zaměřuje na aplikaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie při analýze omeprazolu, retinolu a kreatininu. V první části disertační práci se autorka věnuje charakterizaci biologických vlastností vybraných analytů s ohledem na jejich využití v současné terapii či diagnostice. V případě omeprazolu je představena rovněž problematika farmaceutické formulace suspenzí, která významně ovlivňuje možnosti užití tohoto léčivého přípravku v praxi. U kreatininu a retinolu, jakožto potenciálního biomarkeru poškození ledvin, je naproti tomu větší pozornost věnována glomerulární filtraci a problematice bioanalytické práce s močí. Stěžejní kapitoly teoretické části disertační práce se zabývají metodami úpravy vzorků před analýzou, a zejména pak současnými požadavky na validaci analytických a bioanalytických metod.

Teoretická část je sestavena z logicky seřazených kapitol, které vytvářejí základní opěrné body pro rozvinutí experimentální části disertační práce. Jelikož bylo cílem disertační práce navrhnout a validovat LC-UV, popř. LC-UV-MS/MS metodu, pro stanovení omeprazolu, retinolu a kreatininu v rámci řešení několika výzkumných projektů ve spolupráci s Fakultními nemocnicemi v Motole a v Olomouci, vybrala autorka do teoretické části témata, která jsou nezbytná pro porozumění dané problematice, odvození správného metodického postupu a kvalifikovanou interpretaci získaných výsledků. Teoretická část zahrnuje dále odkazy na zhruba 130 odborných prací, čímž je ozřejmena jak aktuálnost zvoleného předmětu výzkumu, tak potřeba zdokonalit některé rutinně užívané bio/analytické metody v daném aplikačním kontextu.

V experimentální části je přehledně představen vývoj, optimalizace a validace dvou bio/analytických metod. Je zde systematicky popsána použitá instrumentace, použité chemikálie, pomůcky a zejména metodologie analytického a bioanalytického výzkumu. Výsledky práce jsou kontinuálně doprovázené diskuzí, přičemž jsou k prezentaci získaných dat využívány kvalitně zpracované chromatogramy, radiální grafy a tabulky. Experimentální část společně s kapitolou Výsledky a diskuze prokazuje, že zvolené metody a postupy bioanalytického výzkumu byly adekvátní pro řešení daných výzkumných otázek a že se vytčené cíle disertační práce podařilo naplnit. Tuto skutečnost také dokládají tři prvoautorské články s evidentním vztahem k tématu disertační práce, které se autorce podařilo publikovat v prestižních vědeckých časopisech náležejících do nejvyšších kvantilů současných bibliografických měřítek v oboru analytické chemie.

Celkově je disertační práce napsaná přehledným a kritickým stylem, který dokládá hluboké porozumění autorky zvoleným tématům výzkumu. Autorka kompetentně využívá doporučené české metrologické pojmy a opírá své závěry o znalost odborné literatury a experimentální data. V textu jsou jen ojedinělé překlepy či jiné gramatické nedostatky. Disertační práci tvoří celkem 149 stran, přičemž do tohoto počtu náleží i 4 přílohy plných textů článků, ve kterých má autorka disertační práce většinou majoritní autorský podíl.

Po pročtení celé práce včetně příložených publikací navrhuji, aby při obhajobě byly zohledněny některé z následujících bodů či otázek:

- 1) V teoretické části jsou uvedeny strukturní vzorce omeprazolu, retinolu a kreatininu. Pro potřeby vývoje analytické metody by bylo výhodné doplnit také hodnoty $\log P$ či pK_a , z kterých je možné usuzovat na retenční vlastnosti těchto látek.
- 2) V kapitole zaměřené na rešerši chromatografických metod pro stanovení omeprazolu (3.1.3) jsou zmíněny většinou metody využívající isokratickou eluci na reverzní stacionární fázi. Jsou pro chromatografickou analýzu omeprazolu tedy v praxi gradientové eluční metody užívané méně často?
- 3) Na str. 53 jsou porovnávány separační mechanismy na stacionárních fázích typu C18, PFP a HILIC. Bylo by možné říci, které dva separační mechanismy jsou tedy ortogonální?
- 4) Pro kvantitativní stanovení zvolených látek byly použity analytické standardy. Byly u těchto standardů určeny čistoty?
- 5) V popisu analytické metody pro stanovení omeprazolu v suspenzích byly zvoleny určité parametry (např. teplota kolonového termostatu a vlnová délka pro spektrofotometrickou detekci 303 nm). Byly tyto parametry optimalizovány v rámci disertační práce?
- 6) V rámci vývoje analytické metody pro stanovení omeprazolu byly studovány různé stacionární fáze. Byly ověřovány též různé systémy mobilních fází či gradientový eluční program?
- 7) Na str. 79 jsou uvedeny závislosti retenčních časů na typu chromatografické soustavy. K relativně významné změně retence nečistoty D vzhledem k ostatním sledovaným látkám dochází na stacionární fázi typu PFP. Bylo by možné chromatografickou metodu využívající stacionární fázi PFP optimalizovat tak, aby došlo k rozlišení všech tří látek?
- 8) Na str. 81 je uveden přehled validačních parametrů chromatografické metody pro stanovení omeprazolu. K údajům by bylo vhodné přidat informaci, na jakém rozložení koncentračních hladin byla stanovena linearita metody.
- 9) Na str. 83 jsou uvedeny výsledky druhé analýzy stability omeprazolu v suspenzích. Při analýze vzorku suspenze SUS 2.4 byl během prvních 15 dnů prokázán rostoucí trend výtěžnosti omeprazolu. Jak by bylo možné tuto anomálii vysvětlit?
- 10) Na str. 87 je uvedeno, že kvantifikace retinolu byla provedena vzhledem k TIC signálu v MS/MS. Jaké ionty, resp. hodnoty m/z byly, byly tedy kvantifikovány?
- 11) Na str. 90 jsou zobrazeny závislosti relativních velikostí odezvy UV a MS detektoru. Byly relativní odezvy detektorů vypočítány na základě plochy pod píkem v příslušných chromatogramech?
- 12) Na str. 93 jsou uvedeny normalizované matricové efekty (ME) pozorované při stanovení retinolu ve vzorcích moči. Hodnoty ME pro nízkou a vysokou koncentraci retinolu fluktuují v rozmezí 70,18 – 118,08 %. Dalo by se spekulativně říci, čím může být významná variabilita ME v tomto případě způsobena?

Po důkladném zvážení kvality disertační práce, a s ní souvisejících publikačních a dalších vědeckých aktivit, si dovoluji říci, že:

disertační práci Mgr. Kateřiny Kučerové doporučuji k obhajobě.