

Oponentský posudek disertační práce: **Využití moderních separačních metod pro klinické účely**

Univerzita Karlova Praha
Děkanát Farmaceutické fakulty
Referát doktorského studia
Akademika Heyrovského 1203
500 05 Hradec Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Využití moderních separačních metod pro klinické účely

Dizertant: **Mgr. Barbora Honegrová**

Vedoucí školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Školitel –specialista: doc. RNDr. Dagmar Solichová, CSc.

Studijní program: Bioanalytická chemie

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Zpracoval: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta UHK
Katedra biologie
Rokitanského 62
500 03 Hradec Králové

Úvod:

Předložená dizertační práce je sepsána na 101 stranách včetně literatury a obsahuje 9 přehledných tabulek a 30 pěkných obrázků. Dále následuje přehled publikovaných prací a příspěvků, práce publikované v časopisech, přehled posterových sdělení, přednášky prezentované na konferencích, spoluúčast na řešených grantech – celkem 109 stran a konečně 5 příloh, kterými jsou publikace- celkový rozsah 151 stran. Závěr práce přehledně shrnuje, jak se podařilo naplnit vyčtený cíl práce. Dizertační práce je zpracována pečlivě, čtivě, je přehledně členěna a má logickou návaznost. Literatura v textu je číslována a jde o úplné citace, které jsou mnohem cennější než zkrácené citace. Citací je celkem 115, včetně nejnovějších literárních údajů.

Aktuálnost zvolené problematiky:

Vývoj chromatografických metod pro stanovení biologicky aktivních látek, např. vitaminů A a E, v biologickém materiálu a jejich využití v klinickém výzkumu, např. při sledování stability těchto vitaminů v mateřském mléce *jsou žádané a aktuální záležitosti.*

Cíl disertační práce:

Vyvinout novou analytickou metodu pro simultánní UHPLC stanovení retinolu, α - a γ - tokoferolu v biologickém materiálu (např. sérum, lipoproteinové vrstvy) s využitím vnitřního standardu za pomoci monolitické kolony (stacionární fáze), která se pro své vlastnosti s výhodou využívá právě při stanovení látek v biologickém materiálu. Použít metodu vnitřního standardu, eliminující případné ztráty během extrakčního postupu a zkrátit čas analýzy tak, aby to bylo výhodné pro měření série velkého počtu vzorků v klinické laboratoři. *Tento cíl byl naplněn.*

Zvolené metody práce:

Zvolené metody práce odpovídají stavu poznání v dané době, dále technickému vybavení a možnostem pracoviště. Dizertant správně vybral chemikálie pro přípravu standardních roztoků, připravil zásobní a pracovní roztoky, otestoval různé chromatografické kolony se záměrem nalézt optimální řešení pro rutinní stanovení hladin retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu, séru a mateřském mléce. Z porovnávaných parametrů byly nejdůležitějšími účinnost kolony, rozlišení a rychlost analýzy.

Výsledky práce:

Na základě získaných výsledků byla vybrána jako nejlepší kolona pro vývoj nové UHPLC metody pro rutinní stanovení retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu monolitická kolona druhé generace Chromolith HighResolution o rozměrech 100 x 4,6 mm, objem nástřiku vzorku na kolonu 1 μ l, mobilní fáze 100% metanol, rychlost průtoku 2,5 ml/min, optimální teplota analýzy 50 °C. Retenční čas retinolu byl 0,77 minuty a α -tokoferolu 1,19 minuty. Celkový čas analýzy byl 1,4 minuty, spotřeba mobilní fáze na 1 analýzu činila 3,5 ml. Dále byla testována stabilita vitaminů A a E v mateřském mléce během jeho zpracování a uskladnění v Mléčné bance Tkáňové ústředny FNHK a výsledky ukázaly, že hladina sledovaných liposolubilních vitaminů retinolu a α - tokoferolu není ovlivněna pasterizací a ani následným skladováním při teplotě -27 °C po celou dobu stanovené trvanlivosti mléka. Změny hladin sledovaných vitaminů nebyly statisticky významné.

Přednosti dizertační práce:

Práce je jasným přehledem řešené problematiky s přehlednými tabulkami, velmi pěknými obrázky a poskytuje zajímavé výsledky, které byly mimo jiné publikovány v 5-ti časopisech s IF, kde je dizertant 1 x první autor (IF= 2,594) a dále se spolupodílí na publikacích- 1 x jako čtvrtý spoluautor (IF= 1,200), 2 x jako pátý spoluautor (IF = 3,511; a 3,498) a konečně 1 x jako sedmý spoluautor (IF= 0,827).

Nedostatky dizertační práce:

Pouze formálního rázu:

Vzhledem k rozsahu dizertační práce se dizertant neubráníl některým ojedinělým překlepům, což je patrné teprve při velmi pečlivém přečtení textu (např. str. 41: odstavec 5.2.3.8. Přenos (Carry-over): Během validace by přenos měl být posouzen tak, že po nastříknutí vzorku s vysokou koncentrací nebo kalibračního standardu v horní mezi stanovitelnosti se nastříkneme slepý vzorek.

Odborné:

Nemám připomínky.

Dotazy na dizertanta plynoucí z předkládané dizertační práce:

1. Předložená práce se zabývá vývojem metod pro stanovení vitamínů A a E v biologickém materiálu pomocí kapalinové chromatografie. Může dizertant porovnat metody HPLC stanovení s jinými analytickými metodami, např. imunochemickými, jaké jsou jejich vzájemné přednosti a nedostatky ?

Závěry:

Dizertant zpracoval přehlednou dizertační práci, zdokumentoval výsledky experimentální práce a prokázal dobrou schopnost samostatného tvůrčího řešení. Po odborné stránce dizertant dosáhl hlavních cílů a splnil tak zadání stanovené na školícím pracovišti. Práce je dobře využitelná v další jak rutinní, tak vědecké práci a představuje cenný studijní a informační materiál.

Podle § 47 odst. 4 zákona č. 11/1998 Sb., o vysokých školách, navrhuji příslušné komisi přijmout její práci jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Hradci Králové, dne 11. 1. 2016

Podpis: F. Malíř

