

OPONENTSKÝ POSUDEK - DISERTAČNÍ PRÁCE

Název: Využití moderních separačních metod pro klinické účely

Autor: Mgr. Barbora Honegrová

Oponent: Doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Předložená disertační práce má celkem 151 stran, včetně přehledu publikační činnosti, řešených grantů a příloh ve formě odborných článků. Práce je zaměřena na analýzu retinolu a tokoferolu v biologických vzorcích pomocí UHPLC/HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí s hlavním důrazem na výběr vhodné stacionární fáze.

V úvodu se autorka zabývá chromatografickými metodami včetně trendů v dané oblasti. Následují kapitoly týkající se validace analytických metod v klinických laboratořích a mikroextrakčních technik. Vzhledem k tomu, že autorka v experimentální části nevyužívala mikroextrakce, ani nepopisuje optimalizaci extrakčního postupu, mohla by, dle mého názoru, být tato část práce poněkud stručnější. V poslední kapitole teoretického úvodu jsou zmiňovány charakteristiky analyzovaných vitamínů. Vzhledem k náplni práce by bylo pro čtenáře přínosné uvést stručný přehled separačních metod užívaných v klinické praxi pro analýzu vitamínu A a E.

Experimentální část práce je rozdělena na 3 oddíly. První oddíl je zaměřen na systematické porovnání účinnosti vybraných chromatografických kolon pro UHPLC analýzu retinolu a α -tokoferolu. Porovnávány byly kolony monolitické, kolony s částicemi s pevným jádrem i běžné stacionární fáze pro UHPLC. Výsledky této studie byly publikovány v časopise Journal of Separation Science. Druhá část popisuje hodnocení stability retinolu a α -tokoferolu v mateřském mléce po pasterizaci a při skladování. Tato studie prokázala stálost obou hodnocených vitamínů při zpracování i při skladování po dobu 12 týdnů ve tkáňové bance. Autorka uvádí, že výsledky této studie jsou sepsány a připraveny k publikaci. Tento rukopis však není k disertační práci přiložen a není uveden autorský kolektiv. Poslední část experimentální práce byla zaměřena na vývoj metody pro současné stanovení retinolu a α a γ -tokoferolu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Metoda je vhodná pro analýzu těchto vitamínů v séru a lipoproteinových vrstvách.

V závěru disertační práce autorka shrnuje získané výsledky. Dále je zařazen seznam citované literatury (115 literárních zdrojů), publikací, prezentací na konferencích (postery a přednášky) a grantů, na jejichž řešení se doktorandka podílela jako člen kolektivu.

Jako přílohy jsou zařazeny kopie 5 článků publikovaných v impaktovaných časopisech, u kterých je Mgr. Honegrová první autorkou (1x J. Sep. Sci. IF: 2,594) nebo je součástí autorského kolektivu (4x). U publikací, kde je doktorandka součástí kolektivu, by bylo vhodné specifikovat její autorský podíl a přiložené články okomentovat a rozdělit s ohledem na jejich vztah k experimentální části práce.

Práce je zpracována přehledně a obsahuje pouze malé množství gramatických chyb a překlepů, které jsou běžné pro práce tohoto rozsahu. K několika formálním chybám patří např. název práce v hlavičce abstraktu, který není zcela totožný s názvem disertační práce, v seznamu

zkratek není u některých český překlad (FDA, EMA, HR), v kopii článku (příloha 1) chybí stránka 149.

K práci mám následující připomínky a náměty k diskuzi.

Dotazy a připomínky:

- Str. 32: Jsou všechny dokumenty a směrnice, které uvádíte vhodnými „guidelines“ pro validaci chromatografických metod pro stanovení analytů v biologickém materiálu? Jaké konkrétní údaje týkající se validace metod lze nalézt v PhEur 8 a ČL 2009?
- Str. 40: Linearita – Uvádíte, že dle SÚKL by měl být koncentrační rozsah pro hodnocení linearity 50-150 % očekávané koncentrace. Je tento požadavek aplikovatelný pro stanovení analytů v biologickém materiálu?
- Jaký máte názor na potenciál mikroextrakčních technik pro zavedení do rutinní klinické praxe? Která z mikroextrakcí se Vám jeví jako nejperspektivnější?
- Str. 67: K čemu byla použita kyselina L-askorbová, kterou uvádíte v seznamu chemikálií?
- Str. 69, Obr. 24: Čemu patří pík na chromatogramech, který je eluován těsně před hlavním píkem retinolu?
- Str. 72: Je dostačující vyjádřit LOQ metody pouze podle poměru signál/šum?
- Str. 80 a 82, Tab. 5 a 6: Čím je způsobena vysoká variabilita (SD) výsledků stanovení u obou vitamínů? Jakou měrou se na ní podílí variabilita analytické metody a do jaké míry je dána biologickou variabilitou? Čím si vysvětlujete snížení variability u tokoferolu po 12-ti týdenním skladování?
- Str. 88: Je USP vhodným dokumentem pro validaci metody pro stanovení vitamínů v séru a lipoproteinových vrstvách?
- Str. 90: Jaká byla koncentrace IS? Existuje nějaké doporučení ohledně výběru koncentrace IS?
- Jaké úskalí pro kvantitativní stanovení endogenních látek v biologickém materiálu přináší absence „prázdné“ biologické matrice? Jaké jsou možné způsoby řešení a jaký máte názor na jejich případné limitace?

Závěr a doporučení: Práce splňuje požadavky kladené na disertační práce, proto ji doporučuji k obhajobě a jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Hradci Králové: 20.1. 2016

Doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.
Katedra farmaceutické chemie a kontroly
léciv
Farmaceutická fakulta UK