

O p o n e n t s k ý p o s u d e k

na disertační práci ing. Miloše Hrocha

„Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení endogenních a exogenních látek pro transportní a metabolické studie“

Hlavním cílem předložené disertační práce byl vývoj a validace HPLC metod stanovení vybraných látek v biologických matricích. Rozsah práce činí 163 stran. Z nich 53 je věnováno teoretické části, experimentální část a výsledky vztahující se k 5-fluorouracilu jsou shrnuty na 28 stranách. 35 stran potom tvoří kopie 3 publikací prezentovaných v zahraničních odborných časopisech doplněné stručnými komentáři. Na obou analyticky zaměřených publikacích je zjevný rozhodující autorský podíl doktoranda jako prvního autora.

Z teoretické části je zřejmé že doktorand věnoval značnou pozornost studiu dostupné literatury. Zdařile jsou postiženy moderní trendy, které se uplatňují jak v oblasti kapalinové chromatografie, tak při předběžných úpravách vzorků. Podstatné je, že tyto trendy jsou nejen diskutovány, ale i aplikovány při řešení konkrétních analytických problémů.

Prvním studovaným farmakem byl 5-fluorouracil a jeho metabolity, tj. látky silně polární, reverzními fázemi slabě zadržované. Požadovaného rozlišení bylo dosaženo na, v biofarmaceutické analýze dosud sporadicky využívané, pentafluorofenylové stacionární fázi. Také úprava vzorků využívá relativně nový typ sorbetu, který by měl nalézt uplatnění především při analýzách polárních látek (hypercrosslinked resins). Musím konstatovat, že zvolený analytický přístup pro mne byl inspirativní. Použitelnost vyvinuté metody pro potřeby terapeutického monitorování 5-fluorouracilu je doložena validačními experimenty i analýzou reálných vzorků. Práce zabývající se klinickými aspekty individualizace dávkování 5-fluorouracilu s kapitolou věnovanou užité analytické metodě byla přijata do českého recenzovaného časopisu *Klinická farmakologie a farmacie*.

Druhý příspěvek je věnován stanovení nízkých hladin metotrexátu uvolněného enzymaticku hydrolýzou z jeho polyglutamátů tvořících se v erytrocytech během farmakoterapie metotrexátem. Požadované citlivosti metody bylo dosaženo fotochemickou oxidací metotrexátu na fluoreskující produkt. Validovaná metoda byla publikována v časopise *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (IF=1.246). Doktorand je zde prvním autorem. Její následné využití k individualizaci farmakoterapie nízkodávkovým metotrexátem dokládá publikace prezentovaná v *The Journal of Rheumatology* (IF= 3.551), již je doktorand spoluautorem.

Poslední studovanou látkou je inhibitor argináz, N-(ω)-hydroxy-nor-L-arginin. S ohledem na absenci literárních údajů se jedná o originální práci jejímž výstupem byla analytická metoda využitá v pilotní farmakokinetické studii. Pomocí LC-MS byl současně identifikován hlavní metabolit přítomný v krevní plazmě. Je to především tato práce publikovaná v *Journal of Chromatography* (IF=2.976), již autor prokázal vysokou erudici dosaženou na poli biofarmaceutické analýzy.

Posuzovanou disertační práci považuji za velmi zdařilou. Pro její výrazný přínos svědčí skutečnost, že všechny tři vyvinuté metody našly praktické uplatnění. Text byl sepsán pečlivě, prakticky se v něm nevyskytují chyby. Své drobné výhrady uvádím v poznámkách.

Poznámky k disertaci:

- str. 11 „Nevýhodou (vysokotlakého gradientu) je možnost pracovat pouze s binárním gradientem.“ Komentář: Vysokotlaký systém může sestávat z více než dvou pump. Generovat tudíž může např. ternární gradient.
- str. 23 „Separace v obrácených fázích“ Komentář: V české literatuře byl zaveden pojem separace v systému s obrácenými fázemi.
- str. 67 „Následuje promytí 1 ml mravenčanového pufru do sucha a eluce...“ Patrně vypadla část věty.

Otázky:

1. Z předloženého textu vyplývá, že minimálně 5-fluoro-5,6-dihydrouracil je v alkalické prostředí nestálý. Vzorky byly zpracovány na kolonkách, eluáty odpařeny, odparky rozpuštěny v 10 mmol/l HCl a analyzovány. Do výsledkové části nebyla zahrnuta stabilita vzorků v autosampleru. Byla to stabilita analytů v kyselém prostředí, která determinovala výběr rozpouštědla odparků?
2. V textu je dále uvedeno, že citlivost metody stanovení metotrexátu závisela na době ozařování analytu ve fotoreaktoru. Optimalizována však byla pouze délka derivatizační kapiláry pro průtok 0,6 ml/min. Separace přitom byla prováděna na koloně o vnitřním průměru 0,46 mm, pro níž zvykem volit průtok ~ 1,5 ml/min. Z jakého důvodu byl volen průtok 0,6 ml/min?
3. Na chromatogramech dokládajících selektivitu stanovení N-(ω)-hydroxy-nor-L-argininu a argininu nejsou patrné píky aminokyselin přítomných v biologické matrici. Vzorky byly přečištěny na směsném sorbentu (reverzní fáze + silný katex). Podařilo se vám skutečně izolovat na směsném sorbentu analyty od ostatních aminokyselin? Testovali jste i samotný katex? Arginin je katexem zadržován silněji, než ostatní aminokyseliny. Příčinou by měla být guanidinová skupina, kterou obsahuje nejen jeho molekula, ale i v molekuly ostatních analytů.

Závěr:

Ing Hroch prokázal svou schopnost samostatné vědecké práce. Osvojil si řešenou problematiku a dospěl k novým vědeckým poznatkům. Ty prezentoval v recenzovaných zahraničních časopisech, které jsou zárukou kvality publikovaných prací. Doporučuji tudíž, aby disertační práce byla přijata k obhajobě jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

V Hradci Králové dne 13. 2. 2012

Ing. Luděk Šišpera, CSc.
Ústav lékařské biochemie, Ústav fyziologie
Universita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové.