

POSUDEK NA DOKTORSKOU DISERTAČNÍ PRÁCI

Název práce: Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení endogenních a exogenních látek pro transportní a metabolické studie

Autor: Ing. Miloš Hroch

Oponent: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Předložená disertační práce má celkem 163 stran včetně všech příloh. Z celkového rozsahu je 60 stran věnováno teoretické části, dále následuje diskuze a výsledky experimentální části s vloženými publikacemi a postery. Autor v disertační práci předkládá 2 publikace s rozhodujícím podílem na vypracování, kde je uveden jako první autor a dalších 17 prací vesměs biologického či farmakologického zaměření s neurčeným podílem na analytické části. V závěru práce je krátké shrnutí dosažených výsledků výzkumu a 280 citací použité literatury.

V teoretické části se práce zabývá kapalinovou chromatografií, zejména novými typy stacionárních fází, možnostmi úpravy vzorků před analýzou a validací bioanalytických metod. Text práce je zpracován návazně a přehledně, a z návaznosti je zřejmé že autor čerpal a důkladně studoval veškeré zmíněné zdroje literatury, které v textu práce důsledně uvádí.

V druhé části práce Výsledky a diskuse autor komentuje 3 dílčí cíle tj. vývoj metody pro stanovení polyglutamátů metotrexátu v lidských erytrocytech; vývoj metody pro stanovení cytostatika 5-fluorouracilu včetně vybraných metabolitů pro TDM a vývoj metody pro stanovení inhibitoru argináz N-omega-hydroxy-nor-L-argininu pro pilotní farmakokinetickou studii. V diskuzi jsou obsáhle a logicky popisovány problémy při vývoji separačních metod a nalezení vhodné úpravy vzorků a způsob jakým byly řešeny komplikace, které se objevily při vývoji metod. Všechny práce prošly poměrně kritickým recenzním řízením, vykazují vysokou kvalitu prokazující systematický přístup uchazeče k řešení složité výzkumné práce, jakou vývoj a validace bioanalytických chromatografických metod je. Schopnosti autora věnovat se výzkumné činnosti dokladuje i seznam dalších kvalitních prací v časopisech s vysokým IF, na kterých se alespoň částečně podílel jejich analytickou částí.

K disertační práci mám následující připomínky a dotazy:

Teoretická část má přiměřený rozsah a je velmi kvalitně zpracována. Totéž platí i o kvalitě experimentální a výsledkové části. Celkový velmi dobrý dojem ze zpracování však snižuje přítomnost nepřesností, které mohou postupně zmiňovat:

1. V seznamu literatury nejsou sjednoceny zkratky časopisů vs. jejich plné názvy, popř. jejich chybné názvy. U autora, který má tak bohaté zkušenosti s publikováním bych očekával preciznější přístup.
2. Co znamená zkratka J Pharmaceut Biomed (citace 90, 121)?
3. Citace 131 – co znamená discussion 100? (uvedeno za odkazem)
4. U veškerých obrázků bych přímo u jejich legendy očekával citaci na použitý zdroj. Z textu u některých obrázků není zřejmé, z kterého zdroje byly převzaty.

5. Abstrakt str. 125 – nejedná se o rigorózní práci, ale o práci disertační....
6. Proč jsou cíle disertační práce uvedeny až na straně 61 a ne jak je běžné, na začátku práce hned za úvodem? Dle mého názoru by to tak bylo přehlednější.
7. Citace 116 – drobný překlep McCormick
8. Citace 164 – špatně uvedené jednotky μm .
9. Obrázek 19, str. 51 – organická vrstva je znázorněna zeleně, ne žlutě. Je obrázek vlastní autorovo dílo, či je převzat z nějakého zdroje?
10. Str. 9, střední odstavec – cílem studií je průkaz – vhodnější (důkaz, či potvrzení)
11. Str. 8 – co je myšleno tvrzením, že imunoanalytické metody mají menší specifitu než chromatografické? Je toto tvrzení pravdivé?
12. Nevhodná formulace absorpce v UV „oboru“ spektra.

Dotazy a náměty do diskuse:

Na str. 80 uvádíte při postupu SPE extrakce kondicionaci kolonky fosfátovým pufrem o pH 2,0. Je možné získat za popsaných podmínek takové pH? Nebylo by jednoduší použít ředěnou kyselinu fosforečnou? V jakém rozmezí pH se používají fosfátové pufrы?

Je možné tvrdit (str. 30), že HILIC módu (z hlediska teorie HILIC) lze použít i na sorbenty s pentafluorofenylem?

Jaký typ látek obecně vykazuje U-profil na pentafluorofenylových stacionárních fázích?

Na str. 50 uvádíte rozdělovací koeficient P. Jakým způsobem se tento parametr nejčastěji vyjadřuje a jak se experimentálně stanoví?

Jako oponent musím velice vyzdvihnout teze a myšlenky zmíněné v kapitole 1.10, která se trefně zaobírá problematikou biologického vzorku a analýzou. Zejména oceňuji až příliš pravdivou formulaci, že přes všechny pokroky v analytické instrumentaci je příprava vzorku stále úzkým hrdlem celého analytického procesu.

V návaznosti k této kapitole bych se rád zeptal, s jakými bizarními požadavky ze stran lékařů na analýzu jste se setkal?

Jaké výhody mají Zr sorbenty v úpravě biologických vzorků oproti jiným SPE sorbentům?

Závěr a doporučení:

Předložená disertační práce je velmi kvalitní. Ing. Miloš Hroch prokázal schopnost dobře teoreticky a prakticky zvládnout výzkum v oblasti moderních chromatografických metod a analýzy reálných biologických vzorků. Publikované práce zahrnuté do disertační práce jsou kvalitní a mají významný impakt faktor.

Celkově lze konstatovat, že práce splňuje požadavky kladené na disertační práce, proto ji doporučuji k obhajobě a udělení titulu Ph.D.

Hradec Králové 16. 2. 2012

Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Katedra analytické chemie,
Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové