

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Bc. Martin Smolík

Vedoucí práce: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Konzultant: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj LC-MS metody pro látky využívané pro stanovení aktivity cytochromu

Cytochromy P450 (CYP450) jsou enzymy s klíčovou rolí v metabolismu xenobiotik a některých endobiotik (cholesterol, steroidní hormony, eikosanoidy). Vyskytují se v játrech, gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách. Stanovení aktivity CYP450 je vhodným nástrojem pro zjištění možných lékových interakcí vznikajících z důvodu inhibice či indukce různých izoform tohoto enzymu.

Tato diplomová práce je věnována vývoji a validaci nové analytické metody využívající kapalinovou chromatografii spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení aktivity CYP450 izoform 3A4, 2C9 a 2B6, které jsou nezbytné pro metabolismus mnoha léčiv a biologicky aktivních látek. V rámci diplomové práce byla vyvinuta metoda poskytující rychlé, přesné a spolehlivé měření aktivity těchto enzymů na základě kvantifikace specifických substrátů CYP450, a to midazolamu (3A4), diklofenaku (2C9) a bupropionu (2B6) a jejich příslušných hydroxylovaných metabolitů v buněčném médiu.

Analyty byly separovány na koloně Phenomenex Luna® Phenyl-Hexyl (3 μm , 100 \times 3 mm, Phenomenex), za použití gradientu mobilní fáze s přidavkem 0,05% kyseliny octové ve vodě i acetonitrilu (v/v). Detekce probíhala pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM) s ionizací elektrosprejem. Limity kvantifikace byly stanoveny na 0,05 $\mu\text{mol/l}$ pro bupropion, midazolam, 4-hydroxymidazolam a diklofenak a 0,025 $\mu\text{mol/l}$ pro hydroxybupropion, 1-hydroxymidazolam a 4-hydroxydiklofenak.

Nově zavedená analytická metoda byla částečně validována, kdy validovanými kritérii byly kalibrační křivky, kontrola kvality, přesnost, správnost, senzitivita, selektivita a carry-over. Výsledky validace prokázaly, že analytická metoda splňuje všechna akceptační kritéria stanovená americkou Food and Drug Administration.

V závěru přípravy diplomové práce byla použitelnost metody prokázána při analýze 16 reálných vzorků v buněčném médiu, na nichž byl testován vliv rifampicinu na indukci CYP450 v *in vitro* modelu primárních lidských hepatocytů ve 3D uspořádání. Naměřená data se stanou součástí publikace s impakt faktorem.

Klíčová slova:

Analýza, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, cytochrom P450, 3D hepatální buňky, midazolam, diklofenak, bupropion, 1-hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam, 4-hydroxydiklofenak, hydroxybupropion