

Téma diplomové práce	Development of LC/MS/MS method for determination of ambrisentan, midazolam and its metabolite in human plasma
Jméno studenta, studentky	Michal Klivický
Jméno oponenta	PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D

II. Posudek oponenta

Michal Klivický se ve své experimentální diplomové práci zabýval vývojem a validací LC/MS/MS metody pro současnou analýzu ambrisertanu, midazolamu a jeho metabolitu (1-hydroxymidazolamu) v plasmě. Následně byla metoda využita pro analýzu vzorků plasmy získaných od několika dobrovolníků, kterým byl aplikován midazolam.

Práce je sepsána na 69 stranách, autor cituje 65 literárních zdrojů. Za stručným úvodem je zařazena teoretická část. V té se autor nejprve zabývá pulmonární arteriální hypertenzí, poté uvádí stručné informace o analyzovaných léčivech (ambrisentan, midazolam). Dále popisuje základní principy vysokoučinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Poslední stručná kapitola této části je věnována extrakci na pevné fázi. Dalšími kapitolami jsou: Experimentální část, cíl práce, výsledky, diskuze, závěr, literatura a přílohy obsahující MS (MS/MS) spektra.

Předložená diplomová práce je sepsána přehledně. Poněkud nelogické se mi zdá zařazení cíle práce až za experimentální (metodickou) část, což vede k tomu, že čtenář nejprve zjistí jakým způsobem byly experimenty prováděny, ale teprve poté se dozví k jakému cíli měly vést. Vzhledem k cíli práce bych očekávala, že bude v teoretické části poněkud větší pozornost věnována některým analytickým aspektům např. úpravě biologického vzorku, popřípadě validaci bioanalytických metod. Vedle toho však musím ocenit zařazení samostatné kapitoly diskuze, která je sepsána jasně a svědčí o velmi dobré orientaci autora v řešené problematice.

Kromě těchto formálních připomínek mám k práci následující dotazy:

- Str. 16- Uvádíte, že hlavní eliminační cestou ambrisertanu je tvorba glukuronidů. Jde o glukuronidaci parentní látky nebo metabolitů (např. 4-hydroxymethyl ambrisertanu)?
- Str. 25 – Jak se nazývají dva typy pórů u monolitických kolon?
- Str. 36 – V seznamu chemikálií nejsou uvedeny pufr a kyselina, které byly použity pro přípravu mobilní fáze.
- Str. 39 – V tabulce č.4 uvádíte koncentrace analytů v plasmě, které byly použity pro sestavení kalibrační křivky. Nicméně až dále v textu na straně 41, je uvedeno, jaký objem kal.roztoků je přidáván do plasmy a jaké množství plasmy je analyzováno. Toto seřazení není příliš logické. V tabulce č. 4 navíc nejsou jednotky, ve kterých je koncentrace udávána.
- Str. 40. – Tabulka 5: Jak byly vypočítány koncentrace analytů označené jako „Adjusted concentration in plasma“? Jak byl stanoven LOQ?
- Str. 50 a přílohy- Máte nějakou představu o struktuře fragmentů molekulových iontů, které jste používali pro kvantifikaci?
- Příloha 1. Spektrum ABT obsahuje kromě molekulového iontů také další relativně intenzivní ionty, máte představu o jejich původů, případně struktuře?
- Příloha 6. Podle čeho byl vybrán fragment m/z 291 pro kvantifikaci pro midazolam?

- Příloha 1. V případě ABT se zdá, že dochází k jisté fragmentaci ve zdroji již v MS modu (přítomnost m/z 347 ve spektru). Testovali jste nižší teplotu na kapiláře, která by potenciálně mohla snížit fragmentaci, upřednostnit m/z 379 ion a tak i zvýšit citlivost stanovení?
- Farmakokinetické křivky jsou obvykle prezentovány pro všechny subjekty (jeden způsob podání, jeden analyt) formou jednoho obrázku, nejčastěji s využitím průměrné hodnoty a chybových úseček (SD nebo SEM).

Přes uvedené připomínky je práce Michala Klivického na výborné úrovni a proto ji doporučuji k obhajobě.

Navrhovaná klasifikace **Výborně**

V Hradci Králové dne 30.5 2011

Podpis oponenta diplomové práce