

# **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Petra Sadílka „Moderní trendy v úpravě vzorků z biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek“**

Disertační práce Mgr. Petra Sadílka se skládá z několika dílčích celků, které se snaží postihnout celou problematiku instrumentální bioanalýzy xenobiotik, od odběru a uchování vzorku, přes jeho zpracování a extrakci analytů, následnou analýzu, vyhodnocení dat a interpretaci výsledků. Velmi pečlivě a přehledně jsou zpracovány moderní metody ošetření vzorku biomatrice, které vycházejí z denaturace, extrakce mezi dvěma nemísitelnými kapalinami (liquid-liquid extrakce, LLE) a extrakci na pevné fázi (solid-phase extrakce, SPE). Významnou součástí disertační práce je kapitola zabývající se materiály s omezeným přístupem (Restricted Access Materials, RAM). Tyto moderní extrakční sorbety jsou použitelné v in-line (on-line) extrakci prováděné v automatickém režimu přímo v chromatografické sestavě s použitím techniky přepínání kolon (CSW).

Experimentální část disertační práce se zabývala vývojem a validací bioanalytických HPLC metod vybraných exogenních látek (xenobiotik), konkrétně vitaminů A, E *via* RAM / CSW-HPLC-UV) v plasmě a séru a stanovením statinů (simvastatinu a atorvastatinu + metabolitů) v séru a lipoproteinových frakcích metodou SPE-UPLC-MS/MS.

Teoretický úvod kvalifikační práce obvykle koresponduje s problematikou, která je řešena v experimentální části. První 30-stránkový blok se pokouší sumarizovat preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření. Část nazvaná osoba pacienta popisuje faktory, které mohou ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření. Nezpochybňuji význam presentovaných faktorů a jejich případných vlivů na výsledky biochemického vyšetření. Informace o změnách fyziologických hladin endogenních látek (eobiotik) mohou významně přispět ke správné diagnóze, ale podle mého názoru tématicky nezapadají do problematiky řešené v této jinak velmi dobré disertační práci. Presentovaná práce Mgr. Sadílka se zabývá vývojem a validací HPLC metod pro analýzu xenobiotik (vitaminů, léků) a nikoli endogenních látek. Bylo by zajímavé sledovat vliv změny koncentrací některých produktů intermediárního metabolismu v biomatrici na extrakci a HPLC stanovení. Očekával bych tudíž spíše studium konsekvencí mezi vlivem některých nefyziologických stavů na složení vzorku biomatrice, na výtěžnost extrakce analytů a na jejich HPLC stanovení. Např.: vliv potravy a jiných faktorů na tvorbu chylosního vzorku séra nebo plasmy a následný vliv

chybnosti biomatrice na extrahovatelnost xenobiotik; vliv příměsí krve v hemolytické krevní plasmě nebo séru na koeluci absorbujících fragmentů krevních barviv s xenobiotiky a jejich vliv na UV detekci; nebo vliv zvýšené přítomnosti fosfolipidů ve vzorku na matrix efekt v LC-MS/MS stanovení xenobiotik). Podobně například na straně 41-42: odběr sputa a výtěry a stěry sliznic pro mikrobiologické vyšetření a kultivaci bakterií, virů plísňů, odběr žaludečního obsahu nekorespondují s instrumentálně analytickým zaměřením práce a mohlo být vynecháno. K ostatním částem disertace mám jen drobné připomínky, které jsou uvedeny v dotazech.

Autor se během své postgraduální výchovy zúčastnil aktivně tří zahraničních (26th ISC 2006, Kodaň; Point Meeting 2006, Marburg; IS on luminiscence spectrometry, Bologna) a jedné tuzemské konference (Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice), na kterých postupně prezentoval dílčí výsledky své experimentální práce. Finálním výsledkem autorovy postgraduální výchovy bylo sepsání čtyř publikací, které byly zveřejněny v prestižních impaktovaných zahraničních periodících: 1 review v TRAC (IF=6,602), 1 původní práce v *Current Analytical Chemistry* (IF=1,809), 1 práce v periodiku *Ateroskleróza* a jedna v *Journal of Chromatography B* (IF=2,971).

#### **Závěr :**

Předložená disertační práce Mgr. Petra Sadílka splňuje přes některé výše zmíněné výhrady požadované formální i obsahové náležitosti. Autor během své postgraduální výchovy studoval preanalytické vlivy, seznámil se velmi detailně s problematikou moderních metod přípravy biomatricí k analýze s využitím vysoceúčinné kapalinové chromatografie. Detailně prostudoval možnosti on-line extrakce přímo v chromatografickém systému pomocí extrakčních kolon plněných sorbetem s omezeným přístupem (RAM) v sestavě HPLC s technikou přepínání kolon (CSW). Vysoce hodnotím review zaměřené právě na problematiku RAM/CSW, které bylo prezentováno v TRAC, a od roku 2007 zaznamenalo již 32 citačních ohlasů. Teoretické poznatky načerpané během postgraduálního studia využil Mgr. Sadílek v experimentální činnosti, která vyústila ve vývoj a validaci bioanalytických HPLC metody pro současné stanovení A a E vitamínu a HPLC metody pro kvantifikaci dvou statinů a jejich metabolitů. Tyto metody byly rovněž opublikovány v prestižních periodikách.

Se zřetelem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji proto, aby disertační práce Mgr. Petra Sadílka byla přijata k obhajobě a stala se podkladem k udělení vědecké hodnosti PhD.

**Dotazy, připomínky a náměty do diskuse :**

**Str.9...** na místo starší zkratky LOQ doporučuji používat frekventovanější zkratku LLOQ (lower limit of quantitation) jako protilehlou hodnotu ULOQ (upper limit of quantitation), které vymezují rozsah použitelnosti validované metody.

**Str.13, řádek 6-14...**Mezi aplikacemi instrumentální analýzy biologicky aktivních látek postrádám ADME studie, zejména farmakokinetické a bioekvivalenční studie. Autor disertace má prokázat celkový přehled a širší orientaci v problematice, nikoli zmínit pouze aplikace, se kterými se ve své praxi setkal.

**Str 34, řádek 7...**monitoringu

**Str 45, řádek 12...**kyselina fosfátová...???

**Str 46, řádek 1...**Material může být rozmražen a zamražen jen jednou...???

**Str 48.....**Postrádám zmínku o významu Potterova-Elvehjemova homogenizátoru.

Postrádám zmínku o významu I.S. Kdy a proč se přidává do biomatrice???

**Str 49, řádek 18...**10<sup>4</sup> Da

**Str 57, obr. 12.....**chybí jednotky g pro získání jednotlivých frakcí (supernatantů a pelet)

**Str 59, obr.15.....**Jak se perforuje centrifugační zkumavka?

**Str 61, řádek 1-4...**derivatizace aminokyselin a dalších amfoterních analytů je stále velmi frekventovaná

**Str 62, řádek 5...**LLE se běžně provádí v dělicí nálevce (k analytickým účelům nikoli)

**Str 69, str. 89, řádek 5-7..**Jak hodnotíte DLLME z pohledu ochrany životního prostředí

Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Ústav experimentální biofarmacie

společné pracoviště PRO.MED.CS Praha a.s.

a AV ČR

Heyrovského 1207

CZ-500 02 Hradec Králové

V Hradci Králové, 31.8.2012