

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Hany Vlčkové „Analýza statinů v biologickém materiálu“

Mgr. Hana Vlčková se ve své disertační práci zabývala vývojem a validací metod pro stanovení hypolipidemicky účinných statinů a jejich metabolitů. Autorka využila moderních metodických přístupů ve zpracování biomatrice, separace extrahovaných komponent použitím UHPLC a identifikací a stanovením xenobiotik obsažených v biomatrici s použitím hmotnostní spektrometrie (QqQ). Vyvinuté metodiky byly zvalidovány v souladu s požadavky směrnic ICH-Q a EMEA. Validované SPE-UHPLC-MS/MS a MEPS-UHPLC-MS/MS metody byly použity v terapeutickém monitorování (TDM) plasmatických hladin atorvastatinu a simvastatinu + *phase I* metabolitů ve spolupráci s fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Metoda s mikroextrakcí tuhým sorbetem, která pracuje s malými objemy biomatrice, snížila zátěž monitorovaných pacientů a usnadnila studium farmakokinetiky (PK) malých laboratorních zvířat (pravastatin a jeho lakton v potkaním séru a moči).

Disertace má rozsah 150 stran, je členěna způsobem obvyklým pro tento typ kvalifikační práce, použitá literatura zahrnuje 74 citací. Na 83 stranách příloh disertační práce jsou uvedeny kopie 5 publikací (1 review a 4 experimentální práce, na dvou z nich je uchazečka prvním autorem), dále citace tří experimentálních prací, které nesouvisí přímo s disertací, citace 2 autorčiných přednášek a citace 15 posterů, kterými Mgr. Vlčková prezentovala své dílčí výsledky na různých odborných setkáních (včetně 8 zahraničních).

V teoretické části autorka nastínila současný stav poznání ve skupině statinů od jejich objevu v roce 1976 (mevastatin v ascomycetách) přes polosyntetické a syntetické modifikace struktury s lepším farmakodynamickým a toxikologickým profilem, výsledky ADME studií neúčinnějších struktur, přehled vedlejších a nežádoucích účinků a současné terapeutické indikace. Tato kapitola vybavená instruktivními obrázky a tabulkami je velmi přehledně a didakticky zpracována.

V následující analytické části se autorka věnuje ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografii, stacionárním fázím použitelným v UHPLC, porovnání různých typů hmotnostně spektrometrické detekce, tandemovému spojení LC-MS a matricovému efektu, který bývá typickou komplikací tohoto spojení v bioanalýze.

Třináct stran disertační práce je věnováno přípravě vzorku biomatrice k instrumentální analýze. Přehledně jsou zpracovány nejnovější trendy mikroextrakce vycházející z liquid-liquid extrakce a solid phase extrakce. Tyto trendy byly zdařile prezentovány také v review

zveřejněném v periodiku *Analytica Chimica Acta* s IF=4,31. Zmíněný článek byl za dva roky od svého vydání již 45x citován.

V kapitole „Validace analytické metody“ autorka porovnává validační požadavky směrnic International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) a European Medicines Agency (EMA), jejímiž doporučeními by se měla povinně řídit validace bioanalytické metody již od února 2012.

Dosud publikované metodiky bioanalýzy statinů jsou zpracovány tabelárně. Se zřetelem k přítomnosti poměrně slabého chromofóru (fluorofóru) ve struktuře některých zkoumaných molekul a s ohledem na nízkou biologickou dostupnost statinů se autorka disertace zcela správně orientovala na vývoj bioanalytických metod zahrnujících výtěžnou extrakci analytů z minimálního množství biomatrice a následnou HPLC s MS/MS detekcí. Autorka vyvinula, zvalidovala a v praktických aplikacích (TDM, PK) použila SPE-UHPLC-MS/MS a MEPS (microextraction by packed sorbent)-UHPLC-MS/MS simvastatinu, atorvastatinu a jeho metabolitů

V předložené disertační práci jsem nenalezl závažnější formální nebo obsahové nedostatky, drobné překlepy a formulační nepřesnosti jsou zmíněny na konci posudku.

Závěr :

Podle mého názoru, předložená disertační práce Mgr. Hany Vlčkové splňuje po stránce obsahové i formální všechny požadované náležitosti. O instrumentální bioanalýzu jevila Mgr. Vlčková velký zájem již ve třetím ročníku pregraduálního studia (2006). Předměty, které jsem přednášel („Analýza exogenních látek v biologickém materiálu“ a „Správná laboratorní praxe“) absolvovala s výborným prospěchem. Během své postgraduální výchovy se disertantka seznámila velmi detailně s teorií, metodologií a novými trendy v úpravě biomatrice, v separaci extrahovaných xenobiotik ultra vysoceúčinnou kapalinovou chromatografií i identifikaci a stanovením analytů hmotnostním spektrometrem. Vyvinuté a zvalidované metody dokázala ve spolupráci s odborníky z Fakultní nemocnice v Hradci Králové prakticky využít v TDM i jiných bioanalytických aplikacích. Autorka prokázala značnou experimentální erudici při řešení zadané analytické problematiky i tvůrčí talent a formulační schopnosti při sepisování svých publikací.

Doporučuji proto, aby disertační práce Mgr. Hany Vlčkové byla přijata k obhajobě a stala se podkladem k udělení vědecké hodnosti Ph.D.

Připomínky :

- Str.4, 23...k léčbě **Familiární hypercholesterolemie...**“ vs. „...vzorky pacientů s familiární hypercholesterolemii...“. Není důvod pro velké „F“.
- str.7.....2krát objasnění zkratky MEPS
- str.7.....molecularly imprinted polymer
- str.10.....pojem „detektor diodového pole“ bych nahradil pojmem „detektor s diodovým polem“. PDA se používá k detekci analytů a nikoli k detekci diodového pole.
- str.13, tab.1 fluvastatin-**slabě hydrofilní**-logP=4,57
atorvastatin-**lipofilní**-logP=3,85 Slovní popis rozpustnosti bych vynechal.
- str. 14... „...lipofilita a ionizovatelnost ...“
- str. 25.....Kapalinový chromatograf pracující za ultravysokého tlaku umožňuje (*zde patrně vypadlo slovo „použití“*) **kolon** s menším vnitřním průměrem...“.Nejasná stylizace?!?
- str. 26.....obr. 11 mohl být větší pro lepší čitelnost
- str. 31.....magnetický analyzátor (B) by mohl být uveden mezi zkratkami na str. 6
- str. 32.....ale na stejném místě, Obr. 17. **Zatímco**...“. Nelogická stylizace způsobená patrně automatickou korekcí Wordem !!!
- str. 50.....Tab.6: selektivita...limitní hodnota < 20% LOQ →správně 20 % LLOQ
lineární rozsah: správnost ± 15%, pro LLOQ ± 20 %
sklon kalibrační křivky → správně: směrnice kalibrační křivky
přesnost c.v.=RSD=(100*SD/průměr) má pouze kladnou hodnotu
- str. 58.....0,5 mM octanu amonného...“
- str. 58.....údaj o „...limitu kvantifikace nižším než $5 \cdot 10^{-9}$ ng/ml...“ se mi zdá nesprávný, asi mělo být $5 \cdot 10^{-9}$ g/ml nebo 5 ng/ml.

Náměty do diskuse :

Ke str. 23... „...další možností jsou pryskyřice ...“ Prosil bych objasnění.

Ke str. 28, obr. 12 a str.35....kapilární elektroforéza je založena na různých pohyblivostech analytů v prostředí anorganických pufrů. Není problémem zanášení ionizační komory solemi z těchto pufrů?

V disertaci jste se nezmínila o možnostech využití dvoudimenzionální chromatografie v bioanalýze. Mohla byste tuto variantu krátce charakterizovat?

Simvastatin má slabý chromofór, nicméně atorvastatin a jeho metabolity obsahují ve své molekule rozsáhlý systém konjugovaných násobných vazeb a heteroatomů s volnými elektronovými páry. Zkoušeli jste stanovení atorvastatinu v extraktech pomocí PDA nebo FL detektorů? (viz JCB 879 (2011) 557). Byl zaznamenán u atorvastatinu matricový efekt?

Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Ústav experimentální biofarmacie

Heyrovského 1207

500 03 Hradec Králové

V Hradci Králové, 29.12.2011