

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra KFCHFA

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autorka práce: **Kristýna Švarcová**

Vedoucí/školitel práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant práce: RNDr. Martin Mžik, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Oponentka práce: Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková

Název práce:

LC-HRMS analýza vybraných léčiv v biologickém materiálu II

Rozsah práce: počet stran: 62, počet obrázků: 23, počet tabulek: 19, počet citací: 52

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: velmi dobrá
- c) Zpracování teoretické části: výborné
- d) Popis metod: velmi dobrý
- e) Prezentace výsledků: velmi dobrá
- f) Diskuse, závěry: výborné
- g) Teoretický či praktický přínos práce: výborný

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Diplomová práce byla vypracována na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky na úseku klinické a forenzní toxikologie (FNHK). Cílem předložené diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat extrakční metodu pro analýzu sedmi benzodiazepinů a zolpidemu v lidském séru. Extrakční metoda, společně s UHPLC-HRMS metodou byla validována a spolehlivost metody byla ověřena také pomocí externího hodnocení kvality.

Teoretická část je sepsána stručně a přehledně, jednotlivé kapitoly na sebe plynule navazují. V první části se autorka věnuje benzodiazepinům a Z-drugs. Další část teorie se zaměřuje na úpravu biologického vzorku před analýzou, kde jsou rozepsány konvenční extrakční techniky jako je proteinová precipitace (PP), LLE a SPE. Poslední část teorie je zaměřena na LC-MS instrumentaci, bohužel je zde poměrně málo informací o HRMS.

Experimentální část je rozdělena na několik částí, nejprve se věnuje optimalizaci extrakce benzodiazepinů a zolpidemu. Byla testována LLE a PP, u jednotlivých extrakcí bylo vyzkoušeno poměrně velkým množstvím extrakčních a precipitačních činidel. Následně probíhal výběr vhodného IS pro látky, u kterých nebyl k dispozici izotopicky značený IS. Další část je zaměřena na validaci metody a také na externí hodnocení kvality. Protokol o vyhodnocení podobnosti závěrečné práce v Theses.cz vyhodnotil 0 podobných dokumentů.

Práce má obvyklé členění a text obsahuje minimum překlepů. Pro lepší čtivost a přehlednost by bylo lepší spojit kapitolu „výsledky“ s „diskuzí“. Takto jsou v diskuzi výsledky znovu opakovány. Jako formální nedostatek hodnotím nedodržení doporučeného řádkování 1,5 a

také jednostranný tisk. Teoretická část práce obsahuje velké množství převzatých obrázků, s anglickými popisky, jelikož je práce psaná v českém jazyce, bylo by vhodnější, kdyby i popisky obrázků byly přeloženy do českého jazyka. Graf 11 a tabulka 11 poskytují naprosto stejné výsledky, stačilo by tedy vybrat pouze jednu formu prezentace výsledků. Dále u tabulek 15 a 16 by bylo přehlednější, kdyby namísto označení QC vzorku byla zmíněna daná koncentrační hladina.

Dotazy a připomínky:

- na str. 13 uvádíte: Ze struktury BZDZ vyplývá jejich výrazný lipofilní charakter... - věděla byste, jakým parametrem se například hodnotí lipofilita látky?
- na str. 14 uvádíte: Důležitým kritériem je v dnešní době také automatizace metody, časová a finanční nenáročnost, počet vzorků k analýze a v neposlední řadě ekologický přístup. - lze u konvenčních extrakčních metod, které zmiňujete ve své diplomové práci hovořit o ekologickém přístupu?
- na str. 18 uvádíte 4) Promývání: Analyt nesmí být v těchto roztocích rozpustný a nadále zůstává v kolonce. Vysvětlíte prosím toto tvrzení.
- str. 23 - Pravděpodobně překlep? - Specifické konstrukční řešení UHPLC systému umožňuje pracovat při tlacích nad 1300 bar.
- na str. 39 v podkapitole Kalibrace uvádíte, že vzorky byly 5 minut třepány na vortexu. V předchozích kapitolách o optimalizaci PP uvádíte, že vzorky byly třepány 1 min, z jakého důvodu byl tento čas navýšen na 5 min?
- str. 39 - podkapitoly Recovery a Matricové efekty jsou napsány poměrně zmatečně a chybí zde informace, jak byly tyto parametry počítány. Současně na str. 41 uvádíte, že pro optimalizaci extrakce byl hodnocen parametr výtěžnost a matricové efekty byly zanedbány. Nicméně parametr, který zde uvádíte není výtěžnost, ale tzv. extrakční účinnost, do které je vliv matrice započítán. Mohla byste prosím doplnit jednotlivé výpočty?
- na str. 40 stručně zmiňujete HRMS a využití interní kalibrace, vzhledem k tomu, že jste tyto informace vůbec nezmiňovala v teoretické části, mohla byste říct rozdíl mezi HRMS a MS s nízkým rozlišením? Proč HRMS vyžaduje kalibraci?
- tabulka 8 - zmiňujete zde pouze retenční časy jednotlivých analytů, bylo by zde možné doplnit chromatogramy pro jednotlivé analyty vytažené z full-scan záznamu?
- tabulka 17 - jak vycházely matricové efekty, které nebyly korigované pomocí IS? Vzhledem k tomu, že je výtěžnost nižší, oproti extrakční účinnosti stanovené při optimalizaci extrakce, předpokládám, že docházelo k enhancementu signálu, je to tak?
- str. 53 - externí hodnocení kvality mělo být zmíněno v teoretické části, případně v metodice. Jaký je rozdíl mezi cílovou koncentrací a hodnotou Spiked value? Z čeho byla počítána směrodatná odchylka sloužící pro výpočet z-skóre? Hodnoty Z-skóre mohou vycházet i záporné, je tedy hodnocena absolutní hodnota?
- V diskuzi u SPE zmiňujete, jaké analyzátory byly použity pro extrakci. Na druhou stranu jste opomenula, jaké SPE kolonky byly použity. Můžete doplnit? Dále uvádíte, že 96-jamkové SPE je "nový přístup" ke stanovení BZDZ, nicméně se stále jedná o základní SPE pouze v 96-jamkovém uspořádání, nebo šlo o něco jiného?
- V závěru uvádíte že doba zpracování vzorku byla do 10 minut. Jak je to možné, když se vzorek 5 minut třepal na vortexu a následně byl 5 minut centrifugován? A byly vzorky před analýzou filtrovány?

Uvedené připomínky nesnižují kvalitu diplomové práce.

Celkové hodnocení, práce je: výborná, k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové dne 8.9.2020

.....
podpis oponentky / oponenta