UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra Analytické chemie

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Posudek oponenta diplomové práce

Rok obhajoby: 2023

Autor/ka práce:	**Bc. Barbora Šejvlová**
Vedoucí práce:	prof. PharmDr. Lucie NOváková, Ph.D.
Konzultant/ka:	ing. Hana Chmelařová, Ph.D.
Oponent/ka:	RNDr. Hana Kočová Vlčková, Ph.D.
Název práce:	**Vývoj metody úpravy vzorku pro stanovení vybraných ochratoxinů v moči pomocí UHPLC-MS/MS**

Rozsah práce: 61 stran, 25 obrázků, 13 tabulek, 49 citací

Hodnocení práce:

a)	Odborná úroveň a zpracování teoretické části:	dobrá
b)	Náročnost použitých metod:	výborná
c)	Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost):	dobré
d)	Kvalita získaných experimentálních dat:	výborná
e)	Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost):	dobré
f)	Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy:	dobré
g)	Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:	dobrá
h)	Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:	velmi dobrá
i)	Splnění cílů práce:	výborné
j)	Množství a aktuálnost literárních odkazů:	výborné
k)	Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):	dobrá
l)	Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování):	velmi dobrá

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní ☐

Případné poznámky k hodnocení:

Studentka se v rámci experimentální práce seznámila s pokročilými technikami jako UHPLC, hmotnostní spektrometrií a různými druhy přípravy vzorků (SALLE, SLE a µSPE-PT), což je pro pregraduálního studenta nadstandardní náplň. Nicméně sepsaná diplomové práce je špatně srozumitelná zejména z důvodu nízké stylistické a jazykové úrovně, což velmi výrazně snižuje kvalitu zejména teoretické části práce. V této části je celá řada nepřesných, nejasných a chybných formulací, které mohou být pro člověka neorientujícího se v oboru velmi zavádějící. Často jsou tam uváděny neúplné informace a často chybí zásadní charakteristiky. Bylo by vhodné lépe vystihnout teorii o hmotnostní spektrometrii a podrobněji popsat používané extrakční techniky.

Experimentální část je podstatně lépe srozumitelná. Nicméně velmi často se informace opakují (i celé odstavce). Na druhou stranu podstatné informace v textu mnohdy chybí. Postrádám diskusi výsledků, možné zdůvodnění. Ve většině případů se jedná pouze u nevysvětlený popis dosažených výsledků.

Dotazy a připomínky:

- část "Cíl práce" - zbytečně dlouhý, obsahuje celou řadu informací, které na sebe nenavazují, jsou špatně srozumitelné a do této časti nepatří (např. poslední dva odstavce).

- nejednotné formulace či psaní názvů (např. ultra-vysoko-účinna kapalinová chromatografie,…)

- str. 12 - druhý a poslední odstavec jsou nesrozumitelné

- str.13-14 - kapitola Hmotnostní spektrometrie - obecně text v této kapitole je velmi těžko pochopitelný, nelogické členění informací do kapitol, chybí souvislost mezi větami, zavádějící informace….

např.: "Hmotnostní analyzátory jsou jednoduchý kvadrupól, trojitý kvadrupól a analyzátor doby letu"

"Hmotnostní spektrometr má velký rozsah pro měření molekulových hmotností …" (str. 14)

"Mezi základní parametry při rozlišení typu analyzátoru jsou řazeny: měřený hmotnostní rozsah, rychlost měřeného hmotnostního spektra či pořizovací cena" - formulace zcela nejasná, informace zavádějící, Ve výčtu parametrů chybí nejdůležitější parametr - rozlišení.

- nenašla jsem citaci zdroje 9 v textu

- str. 15 - 16: kapitola SPE - obecně mi druhá část této kapitoly přijde zmatená, chvíli se mluví o µSPE-PT, pak zas zpět o SPE. U µSPE-PT mi chybí hlavní vyhoda (možnost kombinace různých sorbentů).

- str. 20: kapitola "Fyzikálně- chemické a biologické vlastnosti" - biologické účinky ochratoxinů jsou popisovány již v obecné kapitole o ochratoxinech - mělo by to být na jednom místě.

- str. 27: "Ověření správnosti metody by mělo obsahovat minimálně 5 vzorků matricových standardů" - není jasné.

- str. 34: µSPE-PT - není uveden objem činidla pro kondicionaci. Co znamená: " Dále bylo do špičky naneseno 200µl moči okyselené 100%FA na 3%FA? Bylo by vhodné to lépe specifikovat.

- str. 34: Validace metody - termín "rozsah" by bylo vhodné lépe specifikovat.

- str. 35: začátek "Výsledků a diskuse" - je zde uvedeno, že jste dříve vyvinutou metodu UHPLC-MS/MS ověřili a změřili standardní kalibrační křivku. Jelikož řešíte v dalších částech zakoncentrování a LLOQ pro matricovou kalibrační křivku, dle mého názoru by bylo vhodné uvést i kalibrační rozsah pro standardní kalibrační křivku a znázornit chromatogram standardu.

- str. 35: v druhém odstavci není jasné na základě čeho jste vybírali jednotlivé techniky přípravy vzorků - tento odstavec si protiřečí s informacemi u jednotlivých technik

- str.35: 3. odstavec (Matricovým vzorek v našem případě …..) do této kapitoly nepatří, měl by být uveden v kapitole zabývající se přípravou roztoků a standardů.

- str. 35 - 39: popis postupů SLE, SALLE a µSPE-PT je shodný jako v kapitole 4.5.

- str. 37, Obr. 8: výsledky pro OTC jsou znázorněny pouze u koncentrace 1 ng/ml a pro tuto látku nejsou poskytnuty výsledky není ani u předchozích grafů? Ke konci práce jsem se dočetla, že je to z důvodu nedostupnosti standardu. Tato informace by měla být vysvětlena hnet na začátku.

Na str. 37, Obr: 9 Není specifikováno v jakém ionizačním módu je záznam měřen. Tato informace chybí u všech chromatografických záznamů. Měřilo se i v opačném módu?

- str. 38: "Vzorky, které byly odpařované v odparce a následně nadávkovány do stroje neměly žádnou odezvu , z námi neznámého důvodu…." Co třeba rozpustsnost? Stabilita? Ověřovalo se to?

- str. 39: u postupu µSPE-PTnení uveden elučí objem a to ani dále v textu

- str. 40 a 41 neshodují se testované koncentrace FA v textu a grafu, výsledky nejsou komentovány

- str. 41: v dalším experimentu bylo provedeno okyselení moči 100%FA na …… - bylo by lepší specifikovat kolik moči a kolik kyseliny bylo použito.

- str. 42, Obr.14 - opět chybí komentář, co bylo vybráno jako vhodné podmínky

- str. 44, Obr. 16 - OT alfa, není to přenos vzorku? Retenční časy látek by bylo lepší v chromatogramu zvýraznit nebo je napsat v textu.

OTÁZKY:

Na str. 17 popisujete metodu SLE. Co znamená pojem: "destička se nechá tlakovat dusíkem"? Jaký je princip metody a jaký přístroj se k provedení SLE používá a proč. Lze tuto metodu automatizovat? Jak?

Na str. 34 píšete, že matricové efekty byly stanoveny na dvou koncentračních hladinách: 5 a 20 ng/ml. Na základě čeho byly tyto koncentrace vybírány? Odpovídají kalibračnímu rozsahu? Jaké jsou požadavky na určení ME?

Na str. 35: píšete "Na základě pKa stanovovaných látek, bylo v případě ředících roztoků testována 0,1%;1%; 2%; 3% FA a HCl. Proč na základě pKa? Čeho jste chtěli dosáhnout? Měřili jste pH těchto roztoků a moči?

Na str. 36: u SLE jste testovali různá extrakční činidla a jejich kombinace. Na základě čeho jste vybrali kombinaci dichlormethanu a 2-isopropanolu v poměru 95/5 a 80/20? V grafu není znázorněno o jaký poměr této kombinace se jedná a není to specifikováno ani v textu, přestože byla tato kombinace vybrána jako nejvhodnější!

Na str. 37 nahoře: "Na Obr. 8 je ukázáno, že výtěžnost metody při nižší koncentraci obohacení klesala." Jak si to vysvětlujete? Počítali jste opravdu výtěžnost? Stejně tak, jak si vysvětlujete na str. 40, Obr. 12: výtěžnost 180% u OT alfa?

Na str. 37, Obr: 9 jsou patrné píky pro OTA a OTB i v čisté moči. Jsou v moči opravdu přítomny nebo se jedná o přenos vzorku či také nečistoty? Jak byste to ověřila? Měřili jste více přechodů pro jednu látku? Měřilo se i v opačném módu?

Na str.47-48, Obr. 19-21 - v textu píšete, že jste optimalizovali stacionární fázi za účelem separace nečistoty od OT alfa. Jako vhodné se jevily tři stacionární fáze jejichž chromatogramy jsou znázorněny na obr. 19 - 21. Nicméně na chromatogramech není separovaná nečistota patrná. Jak se lišily retenční časy?

hodnocení, práce je: velmi dobrá **k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové 29. května 2023 podpis oponenta/ky