

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Rok obhajoby: 2024

Autor/ka práce: **Dominika Dubecová**
Vedoucí práce: PharmDr. Kateřina Plachká, Ph.D.
Konzultant/ka: Mgr. Taťána Gazárková
Oponent/ka: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.
Název práce: **Vývoj a validace SLE metody pro úpravu plasmy před UHPLC-MS/MS analýzou pro stanovení steroidů**

Rozsah práce: 83 stran, 25 obrázků, 23 tabulek, 66 citací

Hodnocení práce:

- | | |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: | výborná |
| b) Náročnost použitých metod: | výborná |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat: | velmi dobrá |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost): | velmi dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy: | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: | velmi 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): | výborná |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | velmi dobrá |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Předkládaná práce se zabývá vývojem a validací metody úpravy vzorků pro analýzu 38 endogenních a syntetických steroidů v lidské, potažmo myší plasmě. Byla testována proteinová precipitace a SLE, které byly porovnány. SLE metoda byla následně validována. Definované cíle práce byly splněny.

Práce dodržuje klasickou doporučenou strukturu, je psána věcně. Teoretická část je dostatečně rozepsaná s ohledem na zadání práce (vybraná skupina analytů, úprava vzorků, analytické přístupy). Experimentální část práce je logicky vystavěná a ucelená. Nicméně práce obsahuje drobné nedostatky a nepřesnosti:

- nadbytečně definované zkratky v Abstraktu, nedefinované zkratky v textu práce
- obrázky nízké kvality, např. Obrázek 1 a 2
- Obrázek 3 s anglickými popisky
- opakování informace o manuální náročnosti úpravy vzorků následované informacemi o jednoduchosti provedení jednotlivých metod

- číslování podkapitol, např. kapitola 3.4.6. by dle mého názoru měla být značena jako 3.5
- chybí zmínka o stacionárních fázích použitých v uvedených již publikovaných metodách
- zavedení zkratk analytů v Tabulce 1 a následné používání čísel 1-38 ve všech tabulkách a grafech, kde u některých chybí alespoň odkaz na Tab. 1. Používání zkratk by zjednodušilo orientaci v textu práce
- obecně nadbytečné používání tabulek, kdy dle mého názoru např. Tab. 2 - 5 mohou být znázorněny strukturami analytů, či Tab. 19 - 23 shrnující vybrané validační výsledky působí velmi nepřehledně. Navíc, formátování čísel (červená a černá barva), není ve všech buňkách správně. U posledních 5 tabulek mi v popisku také chybí limity pro hodnocené parametry (matricové efekty, výtěžnosti, a další), které jsou v celém textu špatně dohledatelné.

Hodnocení podobnosti závěrečné práce vyšlo 18 % (vždy < 3%), respektive 10 % (všechny < 4 %).

Dotazy a připomínky:

- 1) V Tabulce 1 je uvedena hodnota m/z. Jedná se opravdu o tento parametr? Jaký je rozdíl mezi m/z a molekulovou hmotností?
- 2) V teoretické části je adsorpce uvedena jako jediný mechanismus LC. Je tomu opravdu tak?
- 3) Z Tabulky 11 vyplývá, že byla publikována pouze jedna práce na analýzu steroidů pomocí SFC. S tímto tvrzením nesouhlasím. Podle čeho byla tato práce vybrána jako reprezentativní do přehledu metod?
- 4) V Kapitole 4.7.3. je uvedeno, že fosfátový tlumivý roztok byl připraven ze sloučenin HPO₃ a H₂PO₃. Prosím o objasnění. (erratum)
- 5) Diplomová práce se zabývala analýzou 38 steroidů, v Tabulce 13 je ale uvedeno 37 SRM přechodů. Prosím o objasnění. (erratum)
- 6) V práci není specifikováno, na kterém typu manifoldu byla prováděna optimalizace SLE. Prosím o doplnění. (erratum)
- 7) V experimentální části jsou zmíněny vnitřní standardy. Nicméně jejich použití v průběhu celé práce není objasněno. V uvedených vzorcích pro výpočty jsou uvedeny pouze plochy pík samotných neznačených standardů. Při kterých výpočtech byly IS použity? Prosím o doplnění. (erratum)
- 8) Na straně 51 a dalších je uvedeno "bylo možné pozorovat nízkou přesnost výsledků". Co tento pojem znamená? Prosím o doplnění. (erratum)
- 9) MTBE a EtAc a jejich směs 80/20 (v/v) byly testovány jako vhodná extrakční rozpouštědla v SLE. Protože směsný roztok poskytoval nejlepší výsledky, byl následně testován vliv poměru jednotlivých složek - tedy směsi 70/30 a 50/50 MTBE/EtAc. Byly také testovány roztoky s vyšším obsahem MTBE, jestliže EtAc snižoval výtěžnost některých steroidů a zvyšoval matricové efekty?
- 10) V kapitole 5.3.2. je uvedeno, že výrobce SLE doporučuje maximální přídavek 5% organické složky k nanášenému vzorku pro narušení vazby látek na proteiny. Při vyšší koncentraci organického rozpouštědla může dojít ke strhávání matrice do výsledného extraktu. Můžete vysvětlit, z jakého důvodu tedy byly testovány následující směsi plasmy, isopropanolu a vody: 40 uL plasmy a 360 ul (IPA/voda, v/v) a 40 ul plasmy, 160 ul vody a 200 ul IPA. V obou případech IPA dosahuje mnohonásobně vyšších koncentrací než je doporučeno.
- 11) V Tab. 18 shrnující kalibrační rozmezí atp. je uveden sloupec s názvem průměrná výtěžnost. Jak byla tato hodnota vypočítána? Prosím o doplnění k popisu tabulky. (erratum)

12) V textu na straně 68 je uvedeno, že matricové efekty nejvíce zatížily výsledky u nízkých koncentračních hladin. Nicméně Tabulka 20 ukazuje opačné výsledky, tedy nejvyšší matricové efekty u vysokých koncentračních hladin. Prosím o kontrolu výsledků, kdy pravděpodobně došlo k prohození koncentračních hladin, a případné opravení tabulky formou errat. Z tohoto důvodu prosím také o kontrolu výsledků u tabulky 22, které kopírují trendy tabulky 20.

hodnocení, práce je: velmi dobrá

V Hradci Králové

16. září 2024

k obhajobě: doporučuji

podpis oponenta/ky



