

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studijní program: Bioanalytická LDZ

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2024

Autor/ka práce: **Bc. Martin Smolík**

Vedoucí práce: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Konzultant/ka: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Oponent/ka: RNDr. Ondřej Horáček, Ph.D.

Název práce: **Vývoj LC-MS metody pro látky využívané pro stanovení aktivity cytochromu**

Rozsah práce: 74 stran, 19 obrázků, 15 tabulek, 39 citací

**Hodnocení práce:**

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

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Bc. Martin Smolík vypracoval svou diplomovou práci na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy pod vedením dr. Lukáše Lochmana. Cílem práce bylo vyvinout a částečně validovat LC-MS metodu pro 7 různých látek používaných ke stanovení aktivity izoformy CYP450 3A4, 2B6 a 2C9. Vhodnost LC-MS metody k tomuto účelu byla následně testována na biologických vzorcích.

Z hlediska formální úrovně práce jsem pozoroval minimum překlepů. Zřídka dochází k zaměňování termínů *sensitivita/senzitivita* či *MRM/SRM*. Je vhodné vybrat si jeden tvar a toho se pak držet v celé práci. Zkratky *AMK*, *AC*, *DC*, *RF* jsou použity pouze 2-3krát, není je tedy potřeba zavádět. Z mého hlediska bych uvítal seznam obrázků, grafů a tabulek. Kapitola *matricové efekty* by měla být zahrnuta v obsahu. Obecně není vhodné citovat celé knihy, protože informace se pak těžko dohledávají a je vhodné vyhnout se citování faktů z brožur od výrobců, viz citace 7.

Teoretická část diplomové práce je sepsána přehledně. Vyzdvihl bych především kapitulu zabývající se *Cytochromy P450*. Přesto obsahuje teoretická část menší množství nepřesností, např. str. 14 SF je uložena v kolonovém termostatu; str. 14 ventil s mixážní

komorou MF; obrázek 6 plášťový plyn, str. 22 nelze ke spojení LC a MS použít magnetický sektor nebo ICR-FT; str. 22 pokud bychom chtěli vzorky analyzovat pouze pomocí LC (LC-UV), str. 27 analytický instrument. Pouze zřídka se vyskytují slovní spojení neurčitého významu, např. str. 12 metoda umožňuje efektivní separaci; str. 43 ..., aby byla zachována separace analytů, str. 47 bylo nutné analyty tzv. naladit, či, str. 48 ...poskytovala optimální separační podmínky.

Praktická část práce a část výsledky a diskuze byla zřídka ne zcela srozumitelná, např. vysvětlení přípravy standardních roztoků či popis gradientu (Tabulka 9 a 10) byl z mého hlediska příliš složitý. Dále jsem pozoroval opakování té samé informace v několika pasážích práce, např. kapitola 7.5.1 je významově stejná s kapitolou 7.3., podobně jako kapitola 7.8 s kapitolou 5.3. Z mého hlediska patří některé informace uvedené v praktické části spíše do výsledků a diskuze, viz kapitoly 7.3, 7.5 a 7.6. Naopak kapitolu 8.2 Příprava vzorků bych uvedl v praktické části, a ne v části výsledky a diskuze. Z hlediska vyhodnocení dat postrádám v grafech směrodatné odchylky. Naopak v tabulce 15 jsou přebytečně uvedeny koncentrace změřené pod LLOQ metody.

V rámci hodnocení podobnosti Theses našel 14 podobných dokumentů. Nicméně podobnost u všech dokumentů je maximálně 2%. Turnitin uvádí celkovou 12% podobnost, ale u všech dokumentů krom jednoho (2%), jde o podobnost do 1%. Všechny nalezené shody se týkají zejména podobnosti v obecných termínech používaných v diplomových pracích tohoto typu.

Dotazy a připomínky:

V abstraktu píšete, že metoda byla částečně validována. Co je v tomto kontextu míněno částečnou validací?

Uvádíte: „Pro svoji jednoduchost a univerzálnost jsou rozšířené spektrofotometrické detektory, nicméně v posledních dekádách jsou na ústupu na úkor detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).4,5“ V jaké oblasti farmaceutické analýzy toto tvrzení platí a v jaké ne?

Na str. 17 uvádíte: „ESI lze nastavit takovým způsobem, že fragmentace bude v omezené míře probíhat...“ Jak lze nastavit ESI, aby probíhala fragmentace a jak se tomuto typu fragmentace říká? Můžete stručně a výstižně popsat princip ionizace analytů pomocí ESI?

Na str. 21 je uvedena neúplná definice TIC a skenu neutrálních ztrát. Opravdu se měří pouze prekurzorové ionty? V jakém režimu pracují Q1 a Q2 při skenu neutrálních ztrát?

Uvádíte, že: „Na základě výchozí metody byl zvolen průtok 0,4 ml/min. Bylo testováno zvýšení průtoku 0,6 ml/min, které umožnilo zkrácení analýzy, ale způsobilo snížení separační účinnosti.“ Opravdu jste sledovali změnu v separační účinnosti, tedy počtu teoretických pater, nebo je myšleno rozlišení mezi kritickými páry píků?

Na str. 35 uvádíte, že většina publikovaných metod neumožňuje simultánní analýzu více substrátů. Ovšem toto neplatí pro metody, které rozebíráte v tabulce 5, kde 67% metod umožňuje simultánní analýzu více substrátů najednou. Mohl byste porovnat Vámi vyvinutou metodu s již dříve vyvinutými metodami, např. formou tabulky?

Na str. 40 uvádíte přípravu roztoku vnitřních standardů. Proč se přidávaly různé objemy I.S. o stejné koncentraci? Z čeho se při jejich výběru vycházelo?

Na str. 48 uvádíte, že 4-OH-DCF špatně ionizoval v 0,1% HCOOH. Jako nejlepší aditivum byla nakonec zvolena slabší kyselina o nižší koncentraci (0,05% CH<sub>3</sub>COOH). Zaujalo mě, že jste měřili DCF v negativní polaritě a 4-OH-DCF v kladné polaritě. Mohl byste představit data pro optimalizaci ionizace v pozitivní a negativní polaritě ESI pro DCF a 4-OH-DCF?

Str. 54, Graf 10. Zkoušeli jste proložit kvadratickou funkcí i kalibrační body DCF?

Na str. 55 uvádíte že: „Výsledné chromatogramy blanků media jsou na Obr. 16 a 17, kdy je zřetelné, že ke carry-overu nedochází.“ V obrázku 16 i 17 pozoruji v přechodu 10 jakýsi

široký pík s podobným retenčním časem jako DCF. Vzali jste při hodnocení carry-overu tento pík v úvahu?

Závěrem chci vyzdvihnout množství a kvalitu naměřených dat, které vedly k vývoji LC-MS metody, jenž bude použita v dalším výzkumu cytochromů CYP450 a bude i součástí chystané publikace v impaktovaném vědeckém časopise. Z praktické části oceňuji zejména precizní přístup diplomanta k hodnocení validace LC-MS metody.

Diplomová práce Bc. Martina Smolíka splňuje náležitosti kladené na tento typ prací a můžu ji vřele doporučit přijmout k obhajobě.

**hodnocení, práce je: výborná**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

24. května 2024

podpis oponenta/ky