

## Oponentský posudek na bakalářskou práci Martina Víta:

### Stanovení vybraných léčiv tandemovou hmotnostní spektrometrií

Předkládaná práce Martina Víta vyniká především svým nadstandardním rozsahem. Nebývá příliš zvykem, a ani to podle mého názoru není nutné, aby bakalářská práce zabrala téměř sto stran textu. Bohužel v tomto případě platí snad beze zbytku rčení, že méně je někdy více. Značný díl práce zabírá teoretická část. Podle mého názoru je opisování skript poněkud zbytečné. Zvědavý čtenář by si jistě počel lépe v originále než v často nepřesně parafrázovaném výkladu, kdyby ovšem autor dokázal správně citovat své informační zdroje. V celé práci není prakticky ani jeden obrázek citován akceptovatelným způsobem. Například poznámku „Převzato z vydavatelství VŠCHT“ považuji za názornou ukázkou chybné práce s přebíranými informacemi. Je potřeba si uvědomit, že přesná identifikace pramene je důležitá pro zpětné vyhledávání použitých dokumentů. Nutno poznamenat, že práce s literaturou činí autorovi značné problémy obecně. Bohužel jsem toho názoru, že by to měla být jedna z hlavních dovedností, kterou by při vypracovávání bakalářské práce měl student získat. Soupis zjištěných nedostatků uvádím v příloze a z časových důvodů zde upozorním pouze na některé zajímavosti či vážné omyly v chronologickém sledu.

Například mě velmi zaujalo, jak autor na str. 10 popisuje integraci chromatografického píku, když píše: „Výpočet by se provedl integrací součtu tenkých ploch, které jsou na sebe naskládané jako dřevěné lamely...“. Bohužel v textu není uvedeno, odkud tato formulace pochází. V kapitole 1.3 na str. 17 je uváděno obecné tvrzení zcela bez kontextu se stacionární fází, že mobilní fáze s větší polaritou dokáže zkrátit retenční čas a naopak mobilní fáze s menší polaritou pak prodlouží retenční časy. Toto tvrzení je chybné a za rozhodující v tomto ohledu je nutné považovat tzv. eluční sílu, která závisí na vlastnostech použité stacionární fáze. Na str.19 je nesprávně uvedeno, že kapilární kapalinová chromatografie pracuje s kolonami o vnitřních průměrech menších než desítky milimetrů. Předpokládám, že se mělo jednat o desetiny milimetru. Na straně 27 je poněkud chybně pochopen fyzikálně-chemický princip chromatografie. Autor uvádí, že díky interakcím složek se stacionární fází dochází k rozmývání zón a dále pokračuje tvrzením, že jsou-li zóny málo rozmyty, příslušná složka opustí separační prostor rychle, jelikož není zachycená na stacionární fází. Potom by tedy platilo, že méně rozmyté píky se eluují dříve než více rozmyté, což neplatí. Co ještě způsobuje rozšiřování chromatografických zón? Dovolím si nesouhlasit s tvrzením na str. 40, že FT-ICR funguje na podobném principu jako iontová past. Dále nechápu, proč je v kapitole „Detektory“ popisováno, jak při ionizaci vzniká proponovaná či deprotonovaná molekula. To sem rozhodně nepatří. Za velmi nešťastné považuji to, že stejná kapitola „Iontové separátory“ se v textu objevuje dvakrát. Poprvé se o separátorech iontů dozvídáme v kapitole 1.6.2 a výklad je dokončen o pár stránek později v kapitole 1.7.1. Velmi obšrný popis rozličných hmotnostně spektrometrických instrumentací považuji za neopodstatněný, podle mého názoru se měl autor ve výkladu omezit nanejvýš na techniky, se kterými se v rámci své bakalářské práce setkal, nebo které nějak souvisí s jeho tématem. Na straně 48 není zcela přesné tvrzení, že molekuly peptidů jsou několikanásobně protonizované díky velké molekulové hmotnosti. Několikanásobně nabití ionty při ESI ionizaci vznikají zejména díky velkému množství funkčních skupin a nelze mluvit o přímé souvislosti s molekulovou hmotností. Navzdory tomu, že teoretická část zabírá téměř 50 stran textu, čtenář se nemá šanci dozvědět nic o současném stavu poznání v dané problematice. V tomto smyslu nám autor zůstává hodně dlužen a zde by měla teprve začít systematická rešerše, která by odpověděla na otázky: zabýval se již někdo

v minulosti stanovování těchto vybraných léčiv? Jestli ano, tak s jakým výsledkem a jaké metody byly použity? V čem bude přístup autora nový?

### **Připomínky k experimentální části**

Na str.49 chybí informace, čím byl (po odpaření do sucha) ibuprofen rekonstituovaný. Na obrázku na str.51 jsou oba enantiomery, i když popis hovoří pouze o enantiomeru R. V seznamu chemikálií a zařízení není potřeba uvádět každou kádinku, místo toho u chemikálií postrádám velmi důležitý údaj o čistotě. Tabulku č.1 „ředění standardů“ kde se čtenář dozvídá, že naředěním standardu v poměru 1:1 získá poloviční koncentraci, považuji za zbytečnou. Pokud je práce publikována v českém jazyce, pak je nutné, aby i položky uváděné v tabulkách č.6, 7 na str. 64 a následujících byly přeloženy do češtiny. Dále musím autorovi vytknout chybný systém číslování tabulek. Skutečně není možné aby se v textu vyskytovaly různé tabulky pod stejnými čísly. Tabulka č.5 je na str.61 a zároveň na str.71. Tabulka č.6 je na str.64 a zároveň na str.72. Tabulka č.8 je na str.65 a zároveň na str.74. Na straně 68 je nesprávně uvedeno, že adukty s vápníkem tvoří ionty  $M+41$  a rovněž mě neuspokojuje vysvětlení, že příčinou domnělé přítomnosti vápníku je prošlá trvanlivost standardu. Autorství všech kalibračních křivek je připisováno jakési Daniele Vondrákové, která není zmíněna ani v odstavci „Poděkování“. Toto je v rozporu s prohlášením, že byla práce vypracována samostatně. Na obrázcích č.29 a č.37 vytvořila paní Vondráková velmi podivuhodnou kalibrační závislost s osmi hodnotami na jedné koncentrační hladině  $1\mu\text{g/ml}$ . Stejná připomínka platí pro dvojici obrázků č.36 ač.37. Na straně 75 autor připouští, že mohlo dojít k chybě při pipetování kalibračních roztoků. Poněkud nechápu, proč místo přiznání omylu nebyla kalibrace přepracována, i když nás autor v následujícím odstavci uklidňuje, že všechna kritéria pro vývoj metody stanovená firmou CEPHA s.r.o. byla splněna. S odkazem na tuto větu musím konstatovat, že pod pojmem „vývoj metody“ si představuji něco víc než naměření kalibračních závislostí. Pokud jsou prováděna stanovení metodou vnitřního standardu, pak se tento standard musí přidat i ke slepému vzorku. Z hodnot v tabulkách č.6, č.13 a č.14 je zřejmé, že tomu tak nebylo. Za nejzávažnější chybu v celé práci považuji chybnou interpretaci hmotnostních spekter v kapitole 2.1.10.9b Tvrzení na str.81, že iont  $m/z$  605 je buď disodný adukt nebo původní vápenatá sůl je chybné. Následující popis fragmentace atorvastatinu a 2hydroxy atorvastatinu a vysvětlení vzniku společného iontu  $m/z$  440 je bohužel mylné.

pozoruhodná tvrzení:

- „V nízkotlaké kolonové kapalinové chromatografii, též pouze nazývané jako kolová chromatografie nebo pouze jako LC.“ Str.18
- „trajektorie dráhy“ na str. 44
- „Hamiltoniánka“ na str.55 v seznamu zařízení
- „...dceřiný iont o molekulové hmotnosti...“ str.66
- „...zpětné nasycení benzenového skeletu...“ str.82
- „Největším problémem stanovení...byl nedostatek přiděleného strojového času“ str.91
- „Z tabulky lze vyčíst, že I.S. měl v každém standardu různou koncentraci, což by nasvědčovalo nepřesnostem během pipetování.“ str.91

Dotazy:

- Na str. 49 uvádíte: „Optimalizace byla provedena navážením a naředěním ibuprofenu“. Jak byla provedena optimalizace metody?
- Na str.45 operujete s molekulovými hmotnostmi a neuvádíte jejich jednotky. Jaké jednotky se v hmotnostní spektrometrii používají pro vyjádření hmotnosti iontů?
- Na str.57 uvádíte jakýsi faktor čistoty F<sub>C</sub> , není jasné, odkud pochází jeho hodnota.
- Proč jsou hmotnostní spektra naměřena v tak nízkém rozlišení, že není možné zaznamenat ani izotopické píky? Jaká byla rychlost skenování (scan rate)?
- Na str.68 uvádíte, že nejvíce zastoupený adukt měl hodnotu m/z 287. Jak vzniká?
- Na str.70 naznačujete, že se retenční čas zdvojnásobil, když jste standard rozpustil v jiném rozpouštědle? Je to možné?
- Jakým mechanismem vzniká dceřiný ion m/z 440 při fragmentaci ATN a OH-ATN. Jaká skupina s musí odštěpovat, když obě látky poskytují stejný fragment?

.....

Předkládané dílo je bezesporu značně rozsáhlé, a to jak po stránce teoretické tak praktické, čímž přesahuje nároky kladené na bakalářskou práci. K hodnocení je nutné přistupovat s ohledem na to, že se jedná o autorův první publikační počín a z tohoto důvodu nelze očekávat výtvar prostý omylů a chyb. Je ovšem nutné, aby autor vytknuté chyby v práci opravil, poučil se z nich a do budoucna se jich vyvaroval. I přes uvedené nedostatky práci doporučuji k dalšímu řízení.

v Praze 16.6.2012  
RNDr. Martin Štícha

## Seznam oprav v bakalářské práci Martina Víta:

### Stanovení vybraných léčiv tandemovou hmotnostní spektrometrií

- Úvodní strana – CsC. nahradit CSc.
- Str.7 – *látek* nahradit *látkách*
- Str.7 – *od krve* nahradit *z krve*
- Str.7 – GC-MS nahradit GC
- Str.7 – *běžné zařízení* nahradit *běžná zařízení*
- Str.7 – *rozmanité využití* nahradit *rozmanité využití*
- Str.7 – v poslední větě vypustit *pro*
- Str.8 – *je vytvářena* nahradit *jsou vytvářeny*
- Str.8 – *mohou být přijeti* nahradit *mohou být přijati*
- Str.9 – *vysokoúčinnostní kapalinové chromatografie* nahradit *vysokoúčinné kapalinové chromatografie*
- Str.9 – *sě* nahradit *se*
- Str.9 – u všech obrázků počínaje č.1 uvádět správně zdroj
- Str.10 – *a místě průsečíku vytvářena* nahradit *v místě průsečíku*
- Str.13 – *Kapalinová* uprostřed věty všude nahradit *kapalinová*
- Str.13 – *známé* nahradit *známá*
- Str.13 – *polární až vazbu* nahradit *polární vazbu*
- Str.13 – *s polární sloučeninou* nahradit *polární sloučenina*
- Str.13 – dC18 není polární stacionární fáze
- Str.13 – *je dáno adsorbent* nahradit *je dáno absorbentem*
- Str.13 – *dalším sorbenem* nahradit *dalším sorbentem*
- Str.14 – *Dalším typem, který je zároveň na obrázku 3B, kdy mohou mít pevné částice okolo svého povrchu navázanou vrstvu filmu.* Tato věta je nedokončená .
- Str.15 – Není pravda, že by distribuční poměr LLC přímo závisel na molekulové hmotnosti.
- Str.15 – *Do slabých kyselých skupin* nahradit *Do slabých kyselých skupin*
- Str.15 – *Principiálně* nahradit *Principiálně*
- Str.15 – *kvarterní amoniové soli –NR<sup>4+</sup>* nahradit *kvarterní amoniové soli –NR<sub>4</sub><sup>+</sup>*
- Str.16 – *nest kladný náboj* nahradit *nést kladný náboj*
- Str.16 – *do v hydroxilového cyklu* nahradit *do hydroxylového cyklu*
- Str.16 – *výměny iontů* nahradit *výměny iontů*
- Str.16 – *od ostatních látek v analytu* nahradit *od ostatních látek ve směsi*
- Str.17 – afinitní chromatografie má příslušnou zkratku AC
- Str.17 – Je chyba tvrdit zcela bez ohledu na stacionární fázi, že mobilní fáze s větší polaritou dokáže zkrátit retenční čas a naopak mobilní fáze s menší polaritou pak prodlouží retenční časy.
- Str.18 – *dělicí kolóny* nahradit *dělicí kolony*
- Str.18 – *V nízkotlaké kolonové kapalinové chromatografii, též pouze nazývané jako kolová chromatografie nebo pouze jako LC.* Tato věta je nedokončená a nedává smysl.
- Str.18 – *dělicí kolóny* nahradit *dělicí kolony*
- Str.18 – *pygmentů* nahradit *pigmentů*
- Str.19 – *desítky milimetrů* nahradit *desetiny milimetrů*
- Str.20 – *aparatura je zachycen* nahradit *aparatury jsou zachyceny*
- Str.25 – *odpovídající modrému světlu (500nm)* nahradit *odpovídající zelenému světlu*
- Str.26 – *řevzato* nahradit *převzato*

Str.26 – *mezi kapalnou a stacionární* nahradit *mezi mobilní a stacionární*  
Str.27 – *podhalit* nahradit *poodhalit*  
Str.27 – *chromatogram* nahradit *chromatografický pík*  
Str.28 – *Rychlost pohybu analytu kolem částic stacionární fáze závisí na velikosti kanálků, které vytvářejí sousední.* Tato věta je nedokončená.  
Str.28 – *prostorách* nahradit *v prostorách*  
Str.29 – *odpor přenosu hmoty* nahradit *odpor proti přenosu hmoty*  
Str.31 – *mateřský ion* nemusí být molekulární  
Str.31 – *elektronová ionizace je uváděn* nahradit *je uváděna*  
Str.32 – Chemická ionizace CI a chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI jsou dva různé pojmy, které nelze směřovat.  
Str.32 – Citace č.13 odkazuje na článek o MALDI a nikoliv o APCI.  
Str.33 – Stránka [eso.vscht.cz/matejka](http://eso.vscht.cz/matejka) ze je údajně převzat obrázek č.15, neexistuje.  
Str.35 – *smíšená matrice* nahradit *smíšená*  
Str.35 – *řadíme mez ionizační techniky* nahradit *řadíme mezi ionizační techniky*  
Str.36 – *abychom rychlost měla* nahradit *aby rychlost měla*  
Str.36 – *uspořádání trubcí* nahradit *uspořádání trubic*  
Str.38 – *Hojně využívaným iontovým analyzátozem jsou* nahradit *Hojně využívanými iontovými analyzátory jsou*  
Str.38 – *udělena rychlost* nahradit *udělena kinetická energie*  
Str.40 – Citace č.20 odkazuje na článek o LC/MS a nikoliv o FT-ICR  
Str.42 – *rozdíl tkvív v tom* nahradit *rozdíl tkví v tom*  
Str.42 – *stejného násobící efektu* nahradit *stejného násobícího efektu*  
Str.44 – *Trajektorie dráhy* nahradit *Trajektorie*  
Str.44 – *spojíme hmotnostní filtru* nahradit *spojíme hmotnostní filtr*  
Str.45 – *uspořádání se zvyšuje citlivost* nahradit *uspořádání zvyšuje citlivost*  
Str.45 – *Dalé můžeme* nahradit *Dále můžeme*  
Str.47 – *Principiálně* nahradit *Principiálně*  
Str.49 – *Po optimalizaci soustavy byla naměřena kalibrační závislost bez přídavku I.S., jimž byl použit ketoprofen.* Tato věta nedává smysl.  
Str.49 – Všechny chemikálie jako ibuprofen, ketoprofen, atorvastatin... psát uprostřed věty s malým písmenem na začátku.  
Str.49 – *oddchylkami* nahradit *odchylkami*  
Str.50 – *Atorvastatin s jeho metabolit* nahradit *Atorvastatin a jeho metabolit*  
Str.51 – *enantiomer R* nahradit *enantiomery R,S*  
Str.54 – Do seznamu chemikálií a zařízení doplnit čistoty chemikálií, výrobce magnetického míchadla a automatických pipet.  
Str.55 – *Hamiltoniánka* nahradit *mikrostríkačka*  
Str.59 – *OHATN* nahradit *OH-ATN*  
Str.62 – *blank* nahradit *slepý pokus*  
Str.63 – *karucelu* nahradit *karuselu*  
Str.64 – Všechny tabulky přeložit do češtiny, tabulky 5,6,8 přečíslovat  
Str.66 – u molekulových hmotností chybí jednotky  
Str.68 – fragmentové ionty nemají molekulovou hmotnost  
Str.69 – *Chromatogram s retenčním časem* nahradit *Pík s retenčním časem*  
Str.70 – *při vzorků* nahradit *u vzorků*  
Str.70 – Není možné volně prokládat text angličtinou  
Str.82 – *zpětné nasycení benzenového skeletu* je nesmysl  
Str.93 – V seznamu zkratk chybí: RT, DEE-DCM, IBU, I.S., AcN  
Str.94 – V seznamu použité literatury jsou některé odkazy uvedeny vícekrát. Citace č.8 je shodná s č.15. V citaci č.18 je asi omylem nakopírováno kus abstraktu. Citace č.19 a č. 24 obsahují více odkazů.