



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

POSUDEK OPONENTA NA ~~BAKALÁŘSKOU~~/DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Bc. Martina Poncarová
Název práce: Identifikace produktů fotochemické degradace antibiotik ze skupiny fluorochinolonů
Školitel práce: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.
Oponent práce: Mgr. Karel Hořejší
Pracoviště opONENTA: UCH, PŘF, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Komentář opONENTA:

Diplomová práce autorky se zabývá reakční kinetikou fotochemické degradace vybraných fluorochinolonových antibiotik v systémech relevantních přírodním vodám, přičemž velký důraz je kladen na identifikaci struktur degradačních produktů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Literární rešerše je v první části zaměřena na oblast hmotnostní spektrometrie a interpretaci hmotnostních spekter pro analýzu xenobiotik. Ve druhé části se zabývá popisem tří studovaných fluorochinolonových antibiotik. Literární rešerše je zpracována v požadovaném rozsahu (přibližně 1/3 celé práce), zahrnuje celkem 46 citací, přičemž zdroje jsou vhodně zvolené a většinou aktuální. Rešeršní část zabývající se hmotnostní spektrometrií je až příliš obsáhlá a mohla být alespoň z části nahrazena kapitolou o kapalinové chromatografii, o níž tu není zmínka.

Experimentální část práce se nejprve zabývá průběhem fotochemické degradace tří vybraných fluorochinolonových antibiotik při různém pH a různých ozařovacích časech, a to za pomoci HPLC-PDA/FLD. Následně byla provedena identifikace degradačních produktů u tří studovaných antibiotik pomocí HPLC-MS/MS. Posloupnost těchto kroků byla vhodně zvolena, avšak zpracování a prezentace výsledků týkajících se identifikace struktur jednotlivých produktů obsahuje značné množství více či méně závažných nedostatků a nesrovnalostí. Zejména se jedná o nerespektování dusíkového pravidla, výskyt protonovaných molekul v negativní módu polarit, hodnota m/z neodpovídající uvedené struktuře apod., což zřejmě vedlo k chybnému určení struktur u relativně velkého množství produktů.

Téma diplomové práce je značně obsáhlé a náročné. Zpracování a prezentace výsledků vyžadovaly velmi dobrou znalost pravidel pro interpretaci hmotnostních spekter včetně alespoň základní zkušenosti s interpretací, čehož však nebylo zcela dosaženo. Stanovené cíle však byly do určité míry splněny, tudíž i přes některé formální a grafické nedostatky, neodborné či neúplné formulace, které jsou blíže specifikovány v tomto posudku, a s ohledem na časovou náročnost práce, je možné práci celkově hodnotit jako vyhovující požadavkům, které jsou kladeny na kvalifikační práce magisterského stupně studia.

* Nehodící se škrtněte

(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	2
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	2
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	3
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
Formální požadavky – body celkem		18

(2) VĚCNÉ POŽADAVKY	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
Splnění cílů práce	0-3	1
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	1
Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	2
Experimentální náročnost práce	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	1
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	1
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		17

(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
Jazyková a stylistická úroveň	0-3	---
CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	48/51²	35³

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nehovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

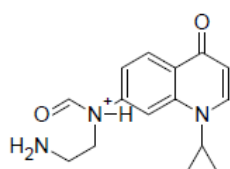
² Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práce, 51 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

³ Zadejte počet přidělených bodů.

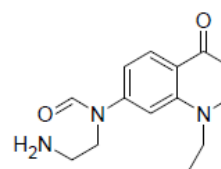
Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě.

- 1) Zvažovali jste, popř. zvažujete, možnost frakcionace vzorků pomocí HPLC a následné testy toxicity jednotlivých produktů *in vitro*, např. na organismu *Daphnia magna*?
- 2) Jaký postoj zaujímá autorka k možnosti implementace vhodných zdrojů UV záření v rámci technologií čištění odpadních vod, aby se zamezilo vypouštění látek tohoto typu do povrchových vod? Je tato realizace možná?
- 3) Tab. VI (str. 35): Na základě čeho se autorka domnívá, že neurčené produkty 29 a 30 detekované v negativní módu polariry při $m/z = 380,2$ (retenční časy 6,52 min a 3,65 min) jsou stereoizomery? Je možné za experimentálních podmínek uvedených v této práci takto výrazné rozlišení stereoizomerů?
- 4) Tab. VII (str. 43): Zde je uveden produkt 26, který byl pozorován v obou módech polariry, přičemž rozdíl hodnot m/z iontu tohoto produktu detekovaného v obou módech polariry je $\Delta m/z = 0,3$, což není principiálně možné. Prosím o vysvětlení a uvedení MS spekter tohoto produktu v obou módech polariry včetně uvedení retenčních časů.
- 5) Pro názornost uvažujme Obr. 6, str. 23, tj. degradaci ciprofloxacinu v neutrálním prostředí:

- 5.1) Zde je znázorněna degradace produktu 6 ($m/z = 272,0$) na produkt 7 ($m/z = 229,0$), nicméně struktura produktu 7 uvedená v Tab. III (str. 24) odpovídá elementárnímu složení $C_{14}H_{17}N_3O_2$, což odpovídá iontu $[M+H]^+$ o hodnotě $m/z = 260,1$ či iontu $[M-H]^-$ o hodnotě $m/z = 258,1$, ale nikoliv hodnotě $m/z = 229,0$. Oba výše zmíněné produkty zároveň obsahují tři atomy dusíku, tudíž dle dusíkového pravidla by pozorovaná hmota m/z obou produktů měla být SUDÉ číslo, což v případě produktu 7 není splněno. Prosím o vysvětlení nesrovnalostí a uvedení MS spekter (popř. i MS/MS spekter) pro oba produkty včetně retenčních časů obou produktů.

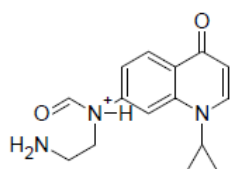


Produkt 6

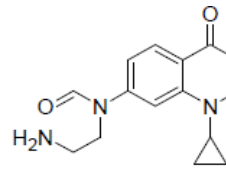


Produkt 7

- 5.2) Dále je uvedena degradace produktu 6 ($m/z = 272,0$) na produkt 8 ($m/z = 271,0$). Ze struktur uvedených v Tab. III (str. 24) je zřejmé, že se jedná o deprotonaci produktu 6. Prosím o vysvětlení, o jaký typ detekovaného iontu se tedy jedná, jestliže struktura produktu 6 je určena správně a odpovídá iontu $[M+H]^+$ o hodnotě $m/z = 272$.

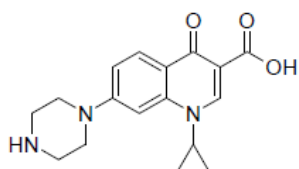


Produkt 6

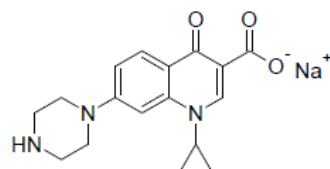


Produkt 8

5.3) Dále je uvedena přeměna produktu 10 ($m/z = 313,3$) na produkt 11 ($m/z = 295,1$). Ze struktur uvedených v Tab. III (str. 25) je zřejmé, že oba produkty se liší přítomností sodíku na karboxylové skupině, z čehož plyne, že $\Delta m/z$ obou produktů musí být 22, což není splněno (zde odpovídá $\Delta m/z = 18$). Zároveň hodnota m/z produktu 11 by měla být o 22 vyšší než produktu 10, což rovněž není splněno (zde je hodnota m/z pro produkt 11 dokonce NIŽŠÍ). Opět není respektováno dusíkové pravidlo. Oba produkty mají lichý počet dusíků, tudíž hodnota pozorované m/z pro oba produkty by měla být SUDÉ číslo (zde pro oba produkty liché číslo). Prosím autorku o vysvětlení a názornou demonstraci pomocí MS a/nebo MS/MS spekter, jak k těmto strukturám došla.



Produkt 10



Produkt 11

Některé příklady nedostatků a chyb, na které si má dávat student v budoucnu pozor.

Níže uvedené komentáře není nutné z časových důvodů u obhajoby číst. Tyto komentáře jsou zde uvedeny zejména pro potřeby autorky, aby věděla, čeho se v budoucnu vyvarovat.

Nedostatky a chyby vztahující se k celému textu práce:

- 1) V případě číslování kapitol se za poslední číslicí nepíše tečka a za názvem dvojtečka.
 - *tj. 1. Úvod: (nesprávně) vs. 1 Úvod (správně)*
- 2) Vzhledem k nepříliš velkému počtu kapitol bych nedoporučoval členění podkapitol 1.1.1 a 1.1.2 na nižší úroveň – *tj. 1.1.1.X*.
- 3) Citace je vždy součástí věty, tudíž tečku píšeme až za citací, nikoli před citací.
V případě citace ve formě horního indexu není potřeba uvádět citaci do závorek.
 - *str. 1, např. „... efektivní hmotnosti^{1,2}“ nebo „... efektivní hmotností (1,2)/[1,2].“*
- 4) Pro oddělení zkratk používáme lomítko bez mezer.
 - *str. 2, např. „GC/MS“, apod.*
- 5) Za zkratkami končící souhláskou se píše tečka, po níž následuje mezera.
 - *týká se zejména obrázků a tabulek – např. „Obr. 1:“, „Tab. 1:“, apod.*
- 6) V textu se často objevuje nesprávné a nejednotné použití spojovníku „-“ a pomlčky „-“.
 - ve spojení složených přídavných jmen v souřadném vztahu používáme spojovník
str. 2, např. fyzikálně-chemické, apod.
 - pro vyjádření rozsahu „od .. do“ používáme pomlčku bez mezer
str. 3, např. 0,00001–0,001 Pa, apod.
 - pro vyjádření názvu zkratky používáme pomlčku oddělenou mezerami
str. 3, např. EI – elektronová ionizace, apod.
- 7) Kvalita obr. 1 (str. 12), 2 (str. 17), 6 (str. 23), 7 (str. 26), 8 (str. 27), 9 (str. 31), 10 (str. 40), 11 (str. 45) je zjevně nižší v porovnání s obr. 12 (str. 52), který je ve výborné kvalitě. Některé obrázky jsou navíc deformované (např. obr. 2, 7, 8, 11).

Pro vkládání obrázků ve vysoké kvalitě přímo do textu práce je vhodnější využívat místo funkce „CTRL+C a CTRL+V“ funkci „vložit jinak“ a zvolit „obrázek (formát EMF)“. Tato funkce umožňuje vkládání grafického objektu v podobě Enhanced Windows Metafile, přičemž je zachována kvalita grafického objektu z programu, v němž byl vytvořen.
- 8) Hlavní kapitoly textu práce je lepší začínat vždy na začátku nové stránky
- 9) Věta odkazující se na obrázek/tabulku, který/která bezprostředně následuje, by měla být umístěna na stejné stránce – viz např. str. 22, 39, 44, 51

Nedostatky a chyby vztahující se ke konkrétní části textu:

- 1) str. 1, kap. 1.1
 - číslovky řadové se oddělují od následujícího výrazu mezerou
tj. 19. _století, 40. _letech, apod.
- 2) str. 2, kap. 1.1.1
 - zde je uvedeno, že tzv. “měkké” ionizační techniky jsou charakteristické téměř výhradně přítomností pouze molekulových iontů

Toto výše uvedené tvrzení je neúplné a nesprávně formulované. Při použití “měkké” ionizace dochází k tvorbě převážně (de)protonovaných molekul $[M+H]^+$ či $[M-H]^-$, ale v případě analýzy většiny reálných vzorků a/nebo použití aditiv mobilní fáze dochází také velmi často i k tvorbě aduktových iontů – např. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Cl]^-$, apod.
- 3) str. 3, kap. 1.1.1.2
 - zde je uvedeno, že mezi tzv. “měkké” ionizační techniky patří elektronová ionizace

Toto výše uvedené tvrzení je chybné. Elektronová ionizace (EI) patří mezi tzv. „tvrdé“ ionizační techniky.
- 4) str. 3, kap. 1.1.1.2
 - nejsou definovány některé zkratky (*tj. GC, LC*)
- 5) str. 3, kap. 1.1.1.2
 - na konci odstavce začínajícího větou „*V plynné fázi ...*“ chybí citace
- 6) str. 3, kap. 1.1.1.2
 - zde je uvedeno, že ion $[M+H]^+$ bývá označován jako molekulární ion

Toto výše uvedené tvrzení je chybné. Pod pojmem molekulární ion se rozumí částice vzniklá odtržením/přibráním jednoho či více e^- – tj. ion s lichým počtem e^- (M^+/M^-). Pro ionty $[M+H]^+$ či $[M-H]^-$ se sudým počtem elektronů vzniklé interakcí molekuly s protonem nebo odštěpením protonu se používá termín (de)protonovaná molekula.
- 7) str. 4
 - pro značení dopovaných materiálů je vhodné používat pro oddělení obou složek spíše dvojtečku než spojovník/pomlčku (*tj. Nd:YAG*)
- 8) str. 5
 - není definována zkratka „*HPLC-MS*“, resp. zkratka je definována až na str. 7
(*veškeré zkratky by měly být vždy definovány při PRVNÍM použití v textu*)
- 9) str. 8, kap. 1.1.3
 - není definována zkratka „*FTICR*“

- 10) str. 9, kap. 1.1.3
 - znaménko vyjadřující kladnou/zápornou hodnotu by mělo přiléhat k číslu
tj. -1 až -5 kV, ± 3 kV, apod.
- 11) str. 9, kap. 1.1.3
 - není definována zkratka „CCD“
- 12) str. 9, kap. 1.1.4
 - není definována zkratka „2D NMR“
- 13) str. 10, kap. 1.1.5
 - pro oddělování číslic užíváme lomítko bez mezer
tj. EU 2018/840, apod.
- 14) str. 10, kap. 1.1.5
 - v chemickém názvosloví užíváme vždy spojovník
tj. 17- β -estradiol, apod.
- 15) str. 14
 - nadbytečné písmeno ve slově „dusiiku“
- 16) str. 15
 - chyba ve shodě podmětu s přísudkem: „hodnota/y ... rostla/y“
- 17) str. 16
 - v česky psaném textu je lepší se vyvarovat anglicismům jako např. „defluorinace“
a nahradit je českým výrazem „defluorace“
- 18) str. 17
 - u kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného není uvedena čistota chemikálie
- 19) str. 17
 - u parametrů chromatografické kolony je chybně zvolen symbol krát
tj. $30 \times 2,1$ mm
- 20) str. 17
 - při vyznačení poměru oddělujeme dvojtečku mezerou z obou stran
tj. $92 : 8$, apod.
- 21) str. 18
 - u parametrů chromatografické kolony je chybně zvolena jednotka velikosti částic
tj. 100×3 mm, $2,2$ μ m
- 22) str. 19–22
 - u jednotek se exponenty zapisují bez mezer
tj. $0,558$ min⁻¹, apod.

- 23) str. 22
- v Tab. II je pro enrofloxacin uvedena hodnota pH = 6,8, která není konzistentní s hodnou uvedenou v textu na str. 20 a na Obr. 5 na str. 21 (tj. hodnota pH = 7,00)
- 24) str. 22
- zde je napsáno, že chromatogramy uvedené v Příloze 4 znázorňují složení reakční směsi v takovém ozařovacím čase, kde byly "VŠECHNY" produkty dobře patrné, avšak následnou HPLC-MS/MS analýzou bylo ve většině případů identifikováno více produktů, než je uvedeno na chromatografických záznamech v Příloze 4.
- 25) str. 23, Tab. III
- u všech produktů není ve sloupci „m/z“ uveden mód polariry, v němž byla daná hmota pozorována
- 26) str. 26
- není definována zkratka „IC“
- 27) str. 27
- zde je uvedena věta „*U enrofloxacinu a produktů 1, 2, 7 a 8 byla detekce možná v obou módech.*“, přičemž z Tab. IV na téže straně je patrné, že produkt 2 byl detekován pouze v pozitivní módu polariry
- 28) str. 28, Tab. V
- u produktu 2 není ve sloupci „m/z“ uveden mód polariry, v němž byla daná hmota pozorována
- 29) str. 29 a 30, Tab. V
- u produktu 13 (str. 29) a 21 (str. 30) je ve sloupci „m/z“ uvedena hodnota „3,01“, resp. „3,40“, která není blíže specifikována – zřejmě se jedná o retenční čas
- 30) str. 33, Tab. VI
- u produktu 13 je ve sloupci „m/z“ chybně uvedena předložka – tj. ~~v~~ + ESI
- 31) str. 34, Tab. VI
- u produktu 17 není ve sloupci „m/z“ uveden mód polariry, v němž byla daná hmota pozorována
- 32) str. 39, Tab. VI
- u produktu 56 a 60 je ve sloupci „m/z“ překlep v označení módu polariry tj. ~~-ESI~~ (pro produkt 56) a ~~+ESI~~ (pro produkt 60)
- 33) str. 40, Obr. 10
- na obrázku je znázorněn vznik produktu 37, který však není uveden v Tab. VII.

- 34) str. 45, Obr. 11
- ve schématu degradace není uvedena degradační cesta vzniku produktu 49, který byl také pozorován, jak je dále uvedeno v Tab. VIII (str. 51)
- 35) str. 45, Obr. 11 a str. 46, Tab. VIII
- v popisu obrázku 11 a tabulky VIII je uvedena hodnota pH pouze na jedno desetinné místo (tj. $pH = 8,9$), zatímco v Tab. II na str. 22 je uvedena hodnota na dvě desetinná místa (tj. $pH = 8,95$)
- 36) str. 50, Tab. VIII
- u produktu 42 ve sloupci „Vzorec“ chybí písmeno ve výrazu STEREOIZOMER
- 37) str. 56, kap. 5
- v části textu „... může spočívat v autokatalýze_či autosensitizaci reakce ...“ není před spojkou „či“ mezera
- 38) str. 57, kap. 5
- v části textu „... s tandemovou (MS/MS) spektrometrií ...“ zřejmě chybí závorky, jinak zkratka „MS/MS“ představuje duplikátní informaci ke slovu „tandemová“
- 39) str. 58, kap. 5
- nesprávný tvar slova „nahradit“ (tj. ~~nahražen~~ vs. nahrazení)
- 40) str. 59, kap. 5
- opět výskyt anglicismu „... další *ingredients* v tabletě ...“, lépe volit přísady/složky
- 41) kap. 7 – reference nejsou občas vedeny v jednotném formátu a občas chybí údaje:
- v česky psané práci se nepoužívají zkratky v anglickém jazyce (např. No., Vol., pp.)
 - u některých citací chybí základní údaje (např. název, stránkování, číslo vydání, ...)
 - kolísá uvádění malých a velkých písmen v názvu publikace
 - není dodržen jednotný styl názvu časopisu (tj. plný název vs. zkrácený název)
 - některé citace jsou doprovázeny nesprávným odkazem na zdroj informací
 - u některých citací jsou překlepy ve slovech (např. patented, spektra, ...)
 - u některých citací je část názvu publikace nesprávný, popř. název je neúplný
 - jména autorů jsou v některých případech chybně zapsána (např. Z#eng, Wi#tek)

Uvedené nedostatky vznikly zřejmě ručním opisováním údajů a jsou zcela zbytečné. Např. MS Word umožňuje automatické vytváření citací dle různých požadavků.

V případě článků z vědeckých sborníků (periodik) by bylo vhodnější uvádět namísto hypertextových odkazů tzv. DOI identifikátor (pokud je dostupný), který je neměnný, čímž je zároveň zajištěn TRVALÝ odkaz na dokument.

- 42) Přílohy 1–3
- v Příloze 1 jsou oproti Příloze 2 a 3 v grafech uvedeny jiné jednotky plochy píku tj. „ $mAU \times min$ vs. $counts \times min$ “, včetně chybně uvedeného znaku pro násobení; bylo by tedy vhodné v popisu obrázku specifikovat typ detektoru, který byl použit pro změření a následné vyhodnocení průběhu příslušné degradační křivky
- 43) Příloha 4
- v popisících chromatogramů nejsou uvedené časy ozařování v souladu s časy uvedenými v Tab. II na str. 22
- 44) Příloha 5
- tato příloha týkající se mechanismu degradace je velice důležitá a proto bych ji zařadil spíše do kapitoly „Výsledky“, kde by vhodně doplňovala příslušné tabulky a demonstrovala vznik jednotlivých produktů v nich uvedených

Závěr:

Práci

d o p o r u č u j i / n e d o p o r u č u j i*

k obhajobě a navrhuji známku dobře.⁴

V Českých Budějovicích dne 20. 05. 2020.

.....
podpis

⁴ Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Znamky: výborné (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).