

Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Irena T Ů M O V Á: „STANOVENÍ VYBRANÝCH OXOKYSELIN V SUCHÉ KAPCE KRVE METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ“

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením 2-oxokyselin odvozených od aminokyselin v suché kapce krve s využitím kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizaci. Cílem vlastní práce je zavedení dostatečně citlivé a selektivní metody využívající nekarzinogenní derivatizační činidlo.

V teoretické části je nejprve shrnuta problematika stanovovaných 2-oxokyselin, včetně vybraných metabolických poruch souvisejících s těmito kyselinami. Další část teoretické části je věnována metodám stanovení 2-oxokyselin (zahrnuje papírovou a plynovou chromatografii, elektroforetické stanovení a velký důraz je kladen na vysokou účinnou kapalinovou chromatografii, ve které se autorka zabývá možnostmi derivatizace různými derivatizačními činidly. Jsou zde zmíněny i referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin a aminokyselin ve vzorcích plné krve.

V experimentální části je uveden popis získání biologických vzorků, jsou zde sumarizovány použité chemikálie, pomůcky, přístroje, postupy pro přípravu pracovních roztoků používaných v práci včetně chromatografických podmínek.

Dále bych zmínila některé nedostatky, které vyplynuly pravděpodobně z nezkušenosti autorky:

- **Kapitola 1.1.1-1.1.4, 1.1.6, 1.1.7, 5.9.1, 5.9.2, obrázek 5, 8, 12, 13 a další** – není uveden žádný literární zdroj, ze kterého autorka u těchto kapitol popřípadě obrázků čerpala.
- Citování zdrojů není chronologické – po odkazu 1, 2, 3 následuje zdroj 63, 64.
- Co je správné používat detekovat nebo detegovat? V textu se vyskytují oba tvary.
- **Str. 33** – je termín HPLC na obrácené fázi správný?
- **Str. 59** – na základě čeho byla zvolena koncentrační rozmezí jednotlivých standardů?
- **Kap. 6.1 - Příloha 1** – jak bylo postupováno při tomto pokusu, kdy jsou uvedeny dva chromatogramy – jeden bez lyofilizace a druhý s lyofilizací? Byl standard bez lyofilizace odpařen v proudu dusíku do sucha a pak derivatizován a ve druhém případě byla voda odstraněna lyofilizací? – z popisku chromatogramu ani z textu není možné jednoznačně rozlišit, co bylo provedeno a porovnáváno.  
Čím si autorka vysvětluje nereprodukovatelnost výsledků při přípravě vzorku, kdy vnitřní standard byl přidáván na filtrační papír před aplikací vzorku?
- **Str. 68 kap. 6.1** – ve druhém odstavci autorka píše, že v práci se využívala metoda standardního přídatku, ale hned v další větě píše o standardu vnitřním.
- **Str. 69 kap. 6.2.1** – nerozumím výběru extrakčního činidla – není nijak zdůvodněno. Z dané tabulky s výsledky ploch píků jednotlivých standardů, bych já vybrala úplně jiné extrakční činidlo např. 10% ethanol kvůli tomu, že odezvy ploch jednotlivých standardů jsou mnohem vyšší než u činidla zvoleného autorkou.
- **Kap. 6.2.3** – odpovídá tvrzení „analýza standardů s koncentracemi pokrývajícími rovnoměrně deklarovaný rozsah“ tomu, jaké byly připraveny koncentrační body?
- **Kap. 6.2.3** pojednává o analytických parametrech metody. Každá analytická metoda by měla být charakterizována alespoň limitem detekce nebo limitem kvantifikace – proč nebylo toto uvedeno? Navíc v tabulce 20 je např. pro 2-KG uvedeno minimální a maximální množství nalezené v reálných vzorcích dárců tj. 38,1 a 124,7  $\mu\text{mol/l}$ . Je možné


uvést maximální hodnotu 124,7  $\mu\text{mol/l}$ , když rozsah kalibrace byl v rozmezí 2,5-50,4  $\mu\text{mol/l}$ ?

V části výsledky a diskuze se velmi těžko orientuje. Přestože autorka provedla řadu experimentů, není snadné se orientovat ve výsledcích a závěrech vyvozených z měření. Závěry vyvozené z experimentů by bylo dobré lépe okomentovat a zdůvodnit.

Diplomovou práci doporučuji s výše uvedenými výhradami k obhajobě a hodnotím ji známkou

~ C ~

V Pardubicích 22. května 2018

  
doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.