



Přírodovědecká  
fakulta

### Oponentský posudek disertační práce

autor: Ing. Michaela Janečková  
název práce: Izotachoforetické stanovení biologicky aktivních látek –  
analýza léčivých přípravků a doplňků stravy  
školitel: prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
Ing. Martin Bartoš, CSc.

---

Disertační práce Ing. Janečkové se zabývá vývojem metod pro stanovení vybraných látek (aminokyselin s rozvětveným řetězcem, vitamínů skupiny B, ethanolaminů, vybraných antidiabetik a formaldehydu) pomocí izotachoforézy (ITP). V rámci teoretické části se autorka popisně a přehledně věnovala tématu biologicky aktivních látek, jejich významu a využití. Dále zpracovala rešerši na téma ITP stanovení zmíněných sloučenin (včetně přehledných tabulek se skoro 100 odkazy na původní literární zdroje). V rámci části výsledků pak autorka komentuje dosažené výsledky, konverzi aminokyselin na hydroxykyseliny, optimalizaci stanovení aminokyselin, vitamínů skupiny B, ethanolaminů, antidiabetik a formaldehydu. Každá z těchto částí je uzavřena validací optimalizované metody a analýzou reálných vzorků. Ing. Janečková je první autorkou dvou publikací v časopisech s impakt faktorem (IF 1,5), které již prošly přísným oponentským řízením.

Z prezentovaných výsledků v rámci disertační práce bych rád vyzdvihнул:

- autorčino zvládnutí techniky dvoukolonové izotachoforézy, které oproti plně automatizovaným přístrojům, rozhodně vyžaduje dostatečnou trpělivost a zručnost,
- zaměření práce na praktické problémy (vývoj metod pro stanovení látek v reálných vzorcích),
- doslova ukázkové provedení izotachoforézy vitamínů skupiny B s použitím vodivostního a spektrofotometrického detektoru (str. 106, obrázek 24).

Z formálního pohledu je práce psána dobře s minimem překlepů. K práci mám následující připomínky:

- Teoretická část pojednávající o biologicky aktivních látkách (kap. 1.1) mi přijde příliš učebnicová, určitě by jí slušelo přidat nějaký nadhled na danou problematiku, zajímavost (zejména kapitole o aminokyselinách).
- V teoretické části mi chybí alespoň zmínka o teorii izotachoforézy, resp. o dvoukolonovém uspořádání, které autorka v experimentální části používá.

- V tabulce 11, str. 65, je uveden seznam použitých chemikálií s výrobcem bez uvedení čistoty (nebo katalogového čísla). Jelikož je čistota chemikálií poměrně zásadní pro ITP, byla by tato informace určitě přínosem.
- Některé obrázky v práci jsou uvedeny v anglickém jazyce (např. obr. 23, str. 105) zatímco jazykem práce je čeština.

Uvedené výtky nicméně nesnižují celkovou kvalitu disertační práce.

V rámci diskuse bych se autorky rád zeptal na následující dotazy:

- Můžete okomentovat výsledky stanovení aminokyselin ve vzorcích doplňků stravy (tabulka 12, str. 81)? Např. koncentrace valinu v Liquid Orange Flavour byla stanovena na 170,0, resp. 177,1 mg/20 ml, zatímco výrobcem byl deklarován obsah 200 mg/20 ml.
- Máte vysvětlení (hypotézu) proč je stanovený obsah taurinu, tabulka 15, str. 98, nižší než deklaruje výrobce?
- V rámci kalibrace kyseliny listové (str. 106) byly připraveny roztoky o koncentracích 10,2; 27,8; 55,5; 101,0; 202,0 a 404,0  $\mu\text{mol/l}$ , což jsou řekněme méně typické hodnoty. Můžete osvětlit důvod pro takto zvolené koncentrační hladiny?
- Na obrázku 32, str. 129, je uvedena separace vybraných biguanidů s použitím spektrofotometrické detekce. Bylo by teoreticky možné nějak upravit ITP systém a detektovat oddělené zóny metforminu, buforminu a fenforminu s použitím detekce při 230 nm?

Závěrem si dovoluji shrnout, že uvedená práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na disertační práce v daném oboru, Ing. Michaela Janečková řádně prokázala své tvůrčí schopnosti, a proto **práci doporučuji k obhajobě.**

V Olomouci dne 1. července 2020

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Palackého v Olomouci  
17. listopadu 12  
77146 Olomouc

E-mail: jan.petr@upol.cz; secjpetr@gmail.com  
Tel.: 00420-585-63-4416



prof. Ing. František Kvasnička, CSc.

## Oponentský posudek disertační práce

Název práce: *Izotachoforetické stanovení biologicky aktivních látek – analýza léčivých přípravků a doplňků stravy*

Autor: Ing. Michaela Janečková

Isotachoforesa, jejíž teoretické základy byly položeny Friedrichem Kohlrauschem koncem 19. století, se na scéně chemické analýzy v kapilárním uspořádání objevila až počátkem šedesátých let minulého století. Hlavním důvodem pro více než půl století dlouhé zpoždění praktického využití této techniky bylo to, že do té doby nebyly k dispozici materiály nutné pro konstrukci analyzátoru. V průběhu šedesátých let se vývoje ujalo několik pracovišť v zemích, ve kterých byla v té době rozvinuta elektrochemie, jako bylo Švédsko, Holandsko, Japonsko a také Československo. A českoslovenští vědci zásadním způsobem přispěli k rozvoji této techniky, jak po stránce teoretické, tak i praktické. Touto technikou a její aplikací v chemické analýze, zejména potravin, se věnuji již téměř 40 let. Je pro mne vždy potěšením, když se do mých rukou dostane vědecká práce pojednávající o kapilární isotachoforesě. A to je právě případ disertační práce "*Izotachoforetické stanovení biologicky aktivních látek – analýza léčivých přípravků a doplňků stravy*" Ing. Michaely Janečkové, která byla vypracována na Katedře analytické chemie University Pardubice.

Předkládaná disertační práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část a je členěna v souladu s formálními náležitostmi pro závěrečné práce University Pardubice. Práce obsahuje celkem 159 číslovaných stran, 35 obrázků, 39 grafů, 20 tabulek a čerpá z úctyhodných 287 literárních pramenů.

V teoretické části je podán stručný přehled vybraných biologicky aktivních látek, jmenovitě aminokyselin a jejich derivátů, peptidů a bílkovin, mastných kyselin a lipidů, sacharidů, vitaminů, organických kyselin a nukleových kyselin. Tato část však neobsahuje žádné informace o možnostech stanovení těchto látek kapilární isotachoforesou (cITP), jak je uvedeno v thesích disertační práce. Obsahuje pouze tabulku s přehledem aplikací cITP pro analýzy vybraných bioaktivních látek bez jakéhokoliv komentáře. Literární přehled metod cITP pro vybrané analyty je uveden až v kapitole výsledky a diskuse, což pro mne bylo velkým překvapením. Takovéto uspořádání práce je hodně netradiční a podle mého názoru i nepraktické – čtenář je nucen neustále listovat mezi kapitolou v teoretické části a částí diskuse výsledků. Nicméně informace potřebné jako úvod do problematiky analýzy vybraných bioaktivních látek jsou v práci k nalezení. Co však postrádám, jsou alespoň základní informace o cITP, tj. principu metody, instrumentaci a aspektech praktických aplikací této metody v chemické analýze včetně zásad pro validaci analytických metod.

Při nahlédnutí do obsahu (str. 18) této disertační práce čtenář s údivem zjistí, že experimentální část má jen tři strany! Tato obsahuje jen tabulku s použitými chemikáliemi a kapitolku o použitých přístrojích. Popis vyvinutých isotachoforetických metodik, přípravy roztoků pro kalibrace, postup úpravy vzorků a rozpis experimentů jsou uvedeny až v kapitole

Výsledky a diskuse! V této „universální kapitole“ se tak mísí teoretická část s experimentální a získanými výsledky včetně jejich diskuse. Velmi netradiční.

Musím však konstatovat, že tato kapitola obsahuje velké množství výsledků, které jsou poměrně podrobně diskutovány a učiněny závěry pro praktické využití vyvíjených cITP metod.

K předložené disertační práci mám následující formální a věcné připomínky a dotazy, které mohou být i námětem pro vědeckou rozpravu při obhajobě práce.

#### Formální:

- ✓ Obrázek 1e: chybný strukturní vzorec adrenalinu
- ✓ Str. 36: místo ...*Kyselina dokohexaenová* má být *Kyselina dokosa~~h~~hexaenová*
- ✓ Str. 43: místo ...*za vzniku roodopsinu...* má být ...*za vzniku rodopsinu...*
- ✓ Str. 48: odkaz na literární zdroj, který v seznamu literatury chybí [48]
- ✓ Tabulka 3, předposlední řádek na str. 56: místo *1 mM MES* má být zřejmě *10 mM MES*
- ✓ Tabulka 9, poslední řádek: ve sloupci „režim“ chybí *aniontový*
- ✓ Str. 68: Pohyblivost *neutrálních* aminokyselin je v rozmezí pH 3 – 10 nízká, nikoliv obecně všech jak je uvedeno v textu
- ✓ Str. 95: namísto výrazu „kyselé vodíky“ používat termín „hydroxonium“ nebo „hydroxoniový kation“
- ✓ Tabulka 15, 1. sloupec: chybí *r* ve slově *taurin*
- ✓ Str. 99: výraz „...*nejoptimálnější*“ je nesprávný, stačí jen „*optimální*“
- ✓ Graf 19 a 20: špatně čitelné (odlišitelné) závislosti pro jednotlivé vitamíny
- ✓ průběžně v textu: místo *kalibrační křivka* je lepší použít *kalibrační přímka*
- ✓ průběžně v textu: namísto „*parametry metody*“ je vhodnější používat výraz „*charakteristiky metody*“
- ✓ Tabulka 16 a 17: chybí hodnoty koeficientu determinace
- ✓ Kapitola Závěr (str. 140): Druhá věta shora je nesrozumitelná, prosím přeformulujte.
- ✓ Str. 153: informace získané z wikipedie nejsou vhodným zdrojem pro disertační práci

#### Věcné:

- ✓ Str. 50 (a v celé práci): výraz „*stanovení obsahu nukleotidů...*“ je pleonasmus podobně jako *globální pandemie* či *dárek zdarma*; výraz *stanovení* v sobě zahrnuje kvalitativní i kvantitativní analýzu, takže správně má být „*stanovení nukleotidů...*“
- ✓ Tabulka 11: chybí čistota použitých chemikálií
- ✓ Str. 67: objem separačních kapilár lze spočítat přesně; předseparační 160x0,8 mm má objem 80  $\mu$ l a analytická 160x0,3mm má objem 11  $\mu$ l.
- ✓ Str. 67 (a dále v textu): zkratka RSH není *Relative Signal Height* nýbrž *Relative Step Height*
- ✓ Str. 69: kyselina valerová je dostatečně rozpustná pro přípravu koncového elektrolytu (ca 3 g/100 ml), hydroxid se přidává za účelem zvýšení vodivosti elektrolytu
- ✓ Str. 70: V předposledním odstavci se píše, že byl použitý standard 2-hydroxyisokapronové kyseliny pro kalibraci, avšak tato látka není uvedena v seznamu chemikálií? Byly použity i další standardy hydroxykyselin?
- ✓ Str. 75 a dále v textu či obrázcích a grafech: používat výraz „*délka vlny*“ místo *délka zóny*! Zóna je uvnitř kapiláry, její délku neměříme
- ✓ Str. 78: zde je uvedeno, citují:...*Octan byl použit namísto valerátu z důvodů urychlení analýzy vlivem vyšší mobility v elektrickém poli...*; záměna valerové za octovou však neurychlí analýzu, prosím vysvětlíte!
- ✓ Obrázek 12: vlna mezi dusitanem a valinem je nečistota z elektrolytů nebo produkt konverze aminokyseliny?
- ✓ Str. 79: místo *Linearita kalibrační závislosti* je lepší výraz *Linearita*

- ✓ Str. 80 a dále v textu: minimální detekovatelná vlna v cITP analýze má délku 1 s, tj. LOD a LOQ pak odpovídá délce 3 s
- ✓ Str. 80 (a dále v textu): opakovatelnost byla určena tak, že byly pětkrát opakovány všechny operace metody (tj. příprava roztoku aminokyseliny 1 mmol/l, konverze na hydroxykyselinu, ředění a cITP analýza) nebo jen 5x opakovanou cITP analýzou jednoho roztoku aminokyseliny?
- ✓ Str. 80 (a dále v textu): výtěžnost (správnost) se zjišťuje buď metodou standardního přidavku (v rozsahu 50 až 150 % nálezů ve vzorku) nebo analýzou referenčního vzorku, nikoliv však analýzou standardu! Popsaný postup je jen ověření kalibrace a nijak nezohledňuje matici vzorku!
- ✓ Podle jakého kritéria jste posuzovala to, že metoda v určité charakteristice (opakovatelnost, výtěžnost, linearita) vyhovuje? Jak jistě víte, akceptovatelná přesnost a správnost (výtěžnost) závisí na koncentraci analytu. Můžete uvést akceptovatelné charakteristiky pro analýzy uvedené v disertační práci?
- ✓ Str. 83: vedoucí elektrolyt o složení 10 mM HCl +  $\beta$ -alanin do pH 2,4 (což je asi 6 mM) je mimo pufrční rozmezí  $\beta$ -alaninu, což je neobvyklé. V takovém případě může složení vzorku ovlivňovat cITP analýzu. Proč jste nepoužila jako protiion například glycin o pK 2,32?
- ✓ Graf 11: Kalibrační analýzy prolinu byly počítány jako součet obou vln nebo byla vybrána jenom jedna? Byly délky obou vln pro různé koncentrace ve stejném poměru?
- ✓ V textu celé výsledkové části: vysvětlíte, proč jste použila různé hnací proudy (250 až 400  $\mu$ A) v předseparační kapiláře pro stejný/podobný elektrolytový systém? Například hnací proud 250  $\mu$ A pro BCAA a 400  $\mu$ A pro theanine a přitom jsou analýzy stejně dlouhé (cf. Obr.12 a Obr.17)?
- ✓ Str. 97: Byl poměr délek vln 1T, 2T a 3T stejný pro různé koncentrace taurinu nebo se měnil?
- ✓ Str. 97: Proč byly navážky taurinu různé a byl tak nutný přepočítání?
- ✓ Str. 106 a dále: Jak byla určena plocha píku z UV záznamu analýzy vitamínu vzhledem k UV absorpci vedoucího a koncového elektrolytu?
- ✓ Str. 110: na základě čeho byla určena plocha píku 10 mAU\*s pro LOQ? Jaká je plocha píku slepého stanovení (místo vzorku dávkován koncový elektrolyt)? LOD by měl být roven trojnásobku plochy píku slepého pokusu. Úseky na ose Y kalibračních rovnic pro spektrofotometrické stanovení vitamínů jsou i násobně vyšší než zvolený LOD (viz. Tabulka 16 a 17)
- ✓ Graf 28 a 29: Proč jsou uvedeny absolutní výšky vlny ethanolaminů a nikoliv jejich RSH?
- ✓ Str. 135: vedoucí elektrolyt HCl/histidin o pH 4,5 je mimo pufrční kapacitu, proč jste nepoužila jiný protiion? Jaký by byl vhodný pro pH 4,5?
- ✓

#### Dotazy:

- ✓ Vysvětlíte vliv uhličitanu na isotachoforetickou separaci při vysokém pH elektrolytů a uveďte způsoby minimalizace tohoto vlivu.
- ✓ Na straně 103 uvádíte, že při separaci vitamínu skupiny B byl pozorován „vynucený isotachoforetický systém“, neboli inverze efektivní mobility. Vysvětlíte, prosím, tento jev.
- ✓ Na základě jakých experimentů byl zvolen elektrolytový systém HCl/beta-alanin (vedoucí) a octová/valerová/kapronová (koncový)?
- ✓ Jak byste vyřešila elektroforetickou analýzu vitamínů skupiny B ve vzorcích s vysokým obsahem sodíku?
- ✓ Str. 118: nízká elektroforetická mobilita analytu nemůže být důvodem pro volbu vedoucího iontu. Vysvětlíte, prosím toto tvrzení?

Přes uvedené připomínky formálního či věcného rázu pokládám práci Ing. Janečkové vcelku za dobrou. Celkový přínos předkládané disertační práce spatřuji v tom, že přispěla k rozšíření aplikací kapilární isotachoforesy v analýze doplňků stravy, léčivých či kosmetických přípravků na obsah vybraných bioaktivních látek. Zejména si cením aplikace van Slykeovy reakce pro analýzu aminokyselin metodou cITP, která byla autorkou zveřejněna ve vědeckém časopise jako dosud první publikace na toto téma. Tento postup nepochybně najde využití v analýze aminokyselin nejen v doplňcích stravy.

Závěrem mohu konstatovat, že Ing. Michaela Janečková podle §47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje. Je tedy mou milou povinností práci

**doporučit k obhajobě.**

V Praze dne 1. července 2020

prof. Ing. František Kvasnička, CSc.

A large black rectangular redaction box covering the signature of the professor.