

Posudek oponenta diplomové práce

Stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky

Diplomantka: Bc. Radka Machová

Vedoucí diplomové práce: prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Michal Kopčil

Bc. Radka Machová ve své diplomové práci optimalizovala analytickou metodiku pro stanovení α -tokoferolu v suché kapce krve. Plná krev byla odebrána na odběrové karty Whatman #903 od 30 dobrovolných dárců krve a dále uchovávána standardním způsobem. Cílem diplomové práce byla optimalizace všech následných analytických postupů, extrakce vzorku z odběrové karty, optimalizace podmínek chromatografické separace α -tokoferolu ze vzorku a optimalizace odezvy hmotnostního detektoru. U všech částí analytického postupu byly stanoveny analytické parametry (výťažnost, přesnost v sérii i mezi sériemi, linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti).

Teoretická část obsahuje dostupné odborné informace o analytické metodice stanovení koncentrace α -tokoferolu v lidské krvi. Zde mám připomínky k popisu chemické struktury isomerů vitamínu E na str. 18: kap. 1.1.1, 3. řádek shora, číslování substituentů chromanolového cyklu je bez čárek, správně „v poloze 5 a 7“. kap. 1.1.1, 7 ř. sh., chirální centra tokoferolů se nacházejí v polohách 4', 8' a 12', nikoliv v polohách 2', 4' a 8'. Obr. 1, struktura tokoferolů a tokotrienolů není správná – v poloze 2 chromanolového cyklu je správně $-\text{CH}_3$, nikoliv $-\text{OH}$. Obr. 2: stejná chyba jako v Obr. 1. Str. 19, 1. ř. sh. název α -tokoferolu dle IUPAC: orientace chirálních center je opačná – správně 2R, 4R, 8R, a metyly v postranním řetězci mají správné číslování 4', 8' a 12'. V dalším textu jsem již žádné chyby nenalezl a teoretická část má vysokou odbornou úroveň, což dokazuje použití 223 literárních odkazů většinou v anglickém jazyce.

V experimentální části diplomantka obvyklým způsobem popisuje realizaci všech experimentálních postupů a dokládá je kalibračními křivkami a optimalizačními tabulkami.

Kapitola Výsledků a diskuse je poměrně obsáhlá, str. 59 patří do teoretické části, tabulky nemají boční orámování a vnitřní řádkování, jsou proto poměrně nepřehledné. Získané výsledky jsou vždy komentovány v textu a doloženy názornými obrázky. Popis výsledků uvedených v Grafu 9 a 10 na str. 70 jsem zcela nepochopil, vizuálně je závislost uvedená v Grafu 9 pro IS α -tokoferol-D6 podstatně lepší než závislost uvedená v Grafu 10 pro IS α -tokoferolacetát, přesto diplomantka zvolila jako vnitřní standard α -tokoferolacetát. Může to diplomantka vysvětlit. Str. 74, 3. ř. zdola: přesnost výsledků stanovení α -tokoferolu u dárců novou metodou je $1,20 \pm 0,20 \mu\text{mol/l}$, výsledky obdobné studie provedené obdobnou metodikou jsou $8,34 \pm 3,08 \mu\text{M}$ (literatura 224). Jsou tyto výsledky srovnatelné vzhledem k odlišným jednotkám?

V závěru na 4. až 2. ř. zdola diplomantka uvádí, že výsledky optimalizace a naměřené koncentrace α -tokoferolu u vzorků byly nejednoznačné, zmiňuje významné účinky matrice a nedostatečnou výťažnost α -tokoferolu ze vzorku DSB, což je v určitém rozporu s konstatováním diplomantky ve 2. řádku shora závěru: „Byla vyvinuta, optimalizována a ověřena dostatečně citlivá a rychlá metoda pro stanovení α -tokoferolu LC-MS/MS ve vzorcích krve získaných technikou DBS.“ Zde mám dotaz: Je tedy metodika analýzy α -tokoferolu v krvi

vyvinutá diplomantkou použitelná s dostatečnou přesností k stanovení jeho koncentrace v rutinních, nebo výzkumných laboratořích?

Závěrem mého posudku mohu konstatovat, že cíl diplomové práce byl splněn, metoda pro stanovení koncentrace α -tokoferolu v krvi LC-MS/MS metodikou byla diplomantkou vyvinuta a ověřena, ale její aplikace musí být zřejmě ještě dále validována, případně modifikována.

Diplomová práce splňuje základní stanovené požadavky, doporučuji ji k obhajobě a vzhledem k celkové úrovni diplomové práce a k uvedeným připomínkám ji hodnotím známkou:

“ C “

V Pardubicích 26. 5. 2022

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
oponent