

POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: Katedra analytické chemie

Autor: Bc. Michaela Merclová

Název práce: GC-MS stanovení izomerních mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích

Vedoucí diplomové práce: Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Oponent: Ing. Robert Jirásko, Ph.D.

Předložená diplomová práce se zabývá tematikou stanovení izomerních mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích s využitím konfigurace GC/MS. Z pohledu koncepce je diplomová práce vyvážená a je strukturována standardním způsobem. Monografie má celkový rozsah 113 stránek, z čehož je vlastní text na 82 stranách, literární zdroje tvoří dalších 7 stránek a zbylých 24 stran jsou přílohy.

Po stránce grafické je práce zpracována úhledně. Drobné výtky mám pouze k horší kvalitě některých obrázků (např. Obrázek 9, Obrázek 11 a Obrázek 12) a tabulce 6, která mohla být ucelená na jedné stránce. U seznamu obrázků, tabulek a příloh by mohlo být pro přehlednost větší odsazení čísla položky a příslušného názvu. Přestože lze v práci nalézt několik typografických chyb, text je srozumitelný a práce je čtivá.

V teoretické části je uvedena základní klasifikace lipidů a přehled analytických metod, které se využívají pro stanovení mastných kyselin a poskytuje dostatek informací, aby čtenář danou tematiku pochopil. V experimentální části jsou popsány použité přístroje, chemikálie a použité pracovní postupy. K těmto částím mám několik připomínek:

- Tvzení „*Lipidy se vyznačují malou rozpustností v polárních organických rozpouštědlech jako jsou ether, chloroform nebo aceton ...*“, které je uvedeno na str. 16 v teoretické části, je nesprávné, protože lipidy se v těchto rozpouštědlech rozpouštějí dobře a chloroform a ether jsou klíčové chemikálie pro extrakci lipidů.
- Název Obrázku 3 „Struktura fosfolipidu a druhy substituentů“ je příliš obecný a místo fosfolipidu by mělo být uvedeno glycerofosfolipidu, protože slovo fosfolipidy reprezentuje všechny lipidy s fosfátovou skupinou (kromě uvedených glycerofosfolipidů např. sfingomieliny nebo ceramid-fosfáty).
- Na obrázku 4, kde je znázorněna fosfolipidová dvojvrstva, je špatně popisek nepolárních acylových řetězců, které směřují dovnitř membrány. Místo „hydrophilic“ by mělo být „hydrophobic“. V textu je už správně uvedeno hydrofobní. Obrázek je převzatý a správně citovaný, takže jsem si ověřil, že chyba je přítomna i v původní literatuře.
- Podobný případ je u Obrázku 12, kde jsou přehozené názvy u struktur polyketidů a sacharolipidů. Opět se jedná o chybu na straně citované literatury, což vypovídá o skutečnosti, že při převzetí obrázků z ostatních zdrojů je třeba kontrola správnosti.
- V kapitole 1.3.2 „Spektrofotometrické metody“ je nesprávně zařazena podkapitola „Nukleární magnetická rezonance“, která nepatří mezi techniku spektrofotometrickou, ale spektrometrickou.
- V kapitole 2.3.1 na str. 46, „Příprava reakčních roztoků a roztoků standardů“, jsou špatně uvedeny jednotky navážky methanolátu sodného. Pokud by se navažovalo uvedených 0,68 mg do odměrné baňky o objemu 50 ml, tak by koncentrace

methanolátu byla o tři řády nižší než uvedená koncentrace 0,25 M. Předpokládám tedy, že se jedná o překlep a navážka činila 0,68 g.

- Ve stejné kapitole se vyskytuje další číselná chyba v koncentraci uhličitanu amonného, která má být pravděpodobně o jeden řád vyšší než uvedených 0,025 mol/l – viz citace textu „Roztok uhličitanu amonného o koncentraci 0,025 mol/l byl připraven rozpuštěním 6 g pevného uhličitanu amonného v 250 ml baňce doplněné po rysku destilovanou vodou.“
- V kapitole 2.3.4.3 na str. 49, kdy autorka píše o pipetování objemu extrahovaného vzorku, jsou chybně uvedené jednotky v mg. Správně má být pipetovaný objem uveden v ml.
- V kapitole 2.3.4 „Příprava biologických vzorků“ není uveden původ poskytnutých vzorků krevního séra.
- Autorka s oblibou používá slovo tuky, ačkoliv v mnoha případech by bylo vhodnější psát slovo lipidy, zejména u procesu izolace (extrakce), při které se nebudou extrahovat pouze tuky, za které jsou obecně považovány triacylglyceroly, ale většina lipidů.

Výsledky a diskuze jsou přehledně členěny, přičemž prvně je popsána optimalizace GC/MS analýzy methylesterů standardů mastných kyselin, během které bylo dosaženo velmi kvalitní separace všech potřebných izomerů. Následně byla provedena velmi krátká validace metody, která zahrnovala ověření reprodukovatelnosti experimentu v rámci jednoho i více dnů. Finálně byla metoda použita pro dvě aplikace. První z nich bylo stanovení procentuálního zastoupení přítomných mastných acylů v osmi různých olejích. Jako další aplikace byla malá klinická studie zahrnující zdravé kontroly a pacienty s rakovinou slinivky, při které se opět stanovovaly mastné acyly přítomné v krevním séru s cílem ověřit případné rozdíly mezi studovanými skupinami vzorků. Tato část je zdařilá a výsledky ukazují potenciál vyvinuté metodologie pro její praktické využití.

K předkládané práci mám dále následující připomínky a dotazy do diskuze:

1. V mnoha případech by bylo vhodné místo výrazu „*mastné kyseliny obsažené ve vzorcích*“ použít výraz mastné acyly, protože většina těchto mastných kyselin je ve formě acylů přítomných na molekule glycerolu. V práci je také uvedeno, že k převedení těchto mastných acylů (kyselin) na methylestery byla použita esterifikace (někde píše dokonce alkalická esterifikace). Je tím myšlena transesterifikace methanolátem sodným? Pokud ano, tak by bylo vhodné stejně pojmenovat i příslušné názvy kapitol 2.3.3.1 a 2.3.4.3. Současný název kapitol „Esterifikace“ nevystihuje přesně danou reakci, která byla použita pro uvolnění mastných acylů z glycerolu a jejich následnou methylaci.
2. V kapitole „Analýza vzorků olejů“ je ke konci diskutováno, které oleje jsou na základě výsledků vhodné ke smažení, z čehož nejlépe vyšel kokosový olej, který obsahuje převážně nasycené mastné acyly. Dále je k tomuto účelu doporučen i slunečnicový olej. Z tabulky 9, kde je uvedeno procentuálního zastoupení mastných acylů ve studovaných olejích, je zřejmé, že pro účel smažení se hodí i řepkový olej. Proč ho autorka nezmiňuje?
3. Nikde v práci není uvedeno, z jakého typu GC/MS záznamu byly použity plochy pro výslednou semikvantitativní analýzu. Jaké jsou výhody a nevýhody jednotlivých typů záznamů, jaký typ záznamu a z jakého důvodu byl použit v této diplomové práci pro vyhodnocování dat?

4. O jaké parametry by bylo vhodné validaci do budoucna rozšířit v případě následného publikování v impaktovaném časopise, aby byla validace v souladu s doporučeními lipidomické komunity?
5. V kapitole 3.4.2 „Obsah mastných kyselin ve vzorcích krevního séra“ na str. 70 je uvedena věta „*Jedna skupina dárců představovala zdravé lidi bez zdravotních komplikací (zdraví), další skupinou byli lidé, kteří již někdy v minulosti prodělali rakovinu slinivky břišní (nemocní), další skupina trpěla příznaky onemocnění (s příznaky) a u poslední skupiny byla rakovina již diagnostikována (nemoc prodělali).*“ Z tohoto tvrzení není zřejmý rozdíl mezi druhou a čtvrtou skupinou. Pokud se v druhém případě jedná o sledované pacienty, kterým byl nádor odstraněn, tak by bylo vhodnější uvést „...další skupinou byli přeživší pacienti, kterým byl nádor odstraněn. U čtvrté skupiny by bylo obecně v celé práci vhodnější psát PDAC pacienti (nebo pacienti s rakovinou slinivky) místo použitého výrazu nemocní dárci. Co je myšleno popisem třetí skupiny „...*další skupina trpěla příznaky onemocnění*“? O jaké příznaky se jednalo a jak byly daní pacienti vyšetřeni?
6. Ze záznamu i z textu na straně 71 je patrné, že nejdelší identifikovaný mastný řetězec má 22 uhlíků. Bylo ověřeno, zdali se ve vzorcích nevyskytují i delší acylové řetězce?
7. Krabicové grafy na str. 77 až 80 ukazují důležité dysregulované estery mastných kyselin mezi skupinami vzorků reprezentující konkrétnímu patologické stavy. Nicméně zde chybí statistická významnost těchto porovnání. Jaký statistický test by bylo možné použít pro změřená data, která nemají Gausiánskou distribuci kolem mediánu, jak je vidět z uvedených krabicových grafů?

Spolehlivá analytická charakterizace potravinářských a klinických vzorků je stále aktuální tématika a vývoj kvalitních metod je tedy důležitou součástí akademického výzkumu. Tato práce tak může sloužit jako dobrý podklad pro další aplikace stanovení obsahu mastných acylů v různých maticích.

Závěrem lze konstatovat, že studentka splnila zadání. Protože žádná z mých výše uvedených připomínek není zásadního charakteru a nesnižuje nijak vysokou kvalitu předložené diplomové práce, doporučuji, aby tato byla přijata k obhajobě a hodnotím ji

A.

Ing. Robert Jirásko, Ph.D.