

**„Validace metody chromatografického dělení plazmatických lipidů
na tenké vrstvě“**

Diplomantka vypracovala diplomovou práci na Katedře biologických a biochemických věd FCHT UPCE a řešila v ní problematiku aplikace interních standardů při analýze mastných kyselin v různých lipidových frakcích lidské plazmy. Současná analytická metoda používá pouze jeden interní standard – cis,cis,cis-13,16,19-dokosatrienovou kyselinu, které prochází celým analytickým postupem ve frakci volných mastných kyselin a vypočtená korelace mezi její koncentrací a plochou píku je využívána pro výpočet koncentrací mastných kyselin i v ostatních frakcích. Úkolem diplomové práce bylo zjištění, zda je tento analytický a výpočetní postup přesný i v chemicky odlišných plazmatických frakcích – fosfolipidy, diacylglyceroly, triacylglyceroly a estery cholesterolu.

Výsledky a diskuse prokázaly, že tento analytický a výpočetní postup je nepřesný a bude nutné použít vhodné interní standardy pro každou plazmatickou frakci.

Z grafů studovaných analytických validací je zřejmé, že většina kalibračních přímek měla korelační koeficienty R^2 v intervalu 0,913 – 0,983 s výjimkou deproteinační fáze interního standardu 4 (kyselina pentadekanová) a interního standardu 6 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin), kde hodnoty R^2 byly 0,872 a 0,860. Směrnice kalibračních přímek testovaných interních standardů většinou vykazovaly odlišné hodnoty při porovnání s používaným interním standardem a je tedy zřejmé, že korelace mezi koncentrací interního standardu a plochou píku jsou zatíženy poměrně velkou chybou. Použití směrnice kalibrační přímkou původního interního standardu pro přepočtení plochy píku na koncentraci ve srovnání s novým interním standardem prokázalo nadhodnocení zjištěných koncentrací o 40,97% ve frakci TAG, o 28,53% ve frakci PL a o 3,28% ve frakci DG. Dále bylo zjištěno, že kyselina pentadekanová, testovaná jako nový interní standard, je nepoužitelná, protože směrnice její kalibrační přímkou je oproti srovnatelným hodnotám používaného interního standardu téměř trojnásobná (15,601 oproti 6,059).

Výsledky diplomantka přehledně prezentovala formou grafů a hodnoty směrnice kalibračních přímek využila k charakterizaci vhodnosti použití nových interních standardů. Výsledky těchto kalibrací ale pro mne nejsou zcela přesvědčivé, protože měření byla prováděna pouze jednou bez statistického vyhodnocení. V závěru diplomové práce je konstatováno, že použití kyseliny cis-13,16,19-dokosatrienové jako interního standardu nadhodnocuje zjištěné koncentrace mastných kyselin v ostatních frakcích.

K práci mám následující otázky:

- Proč se při derivatizaci mastných kyselin přidává do reakční směsi jako katalyzátor acetylchlorid? Jedná se zde opravdu o katalyzátor?
- Metoda převodu mastných kyselin na methylestery byla vyvinuta v rámci diplomové práce, nebo byla převzata?
- Proč nebylo provedeno více měření pro statistické vyhodnocení dle bodu 4. zadání diplomové práce?

Závěrem konstatuji, že diplomantka splnila zadání diplomního úkolu ve většině bodů zadání. Diplomovou práci Bc. Sabiny Vebrové doporučuji k obhajobě, protože splňuje všechny formální požadavky kladené na její vypracování a vzhledem k výše uvedeným připomínkám ji hodnotím známkou:

„ C „

V Pardubicích 16. května 2022

doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.
oponent