

**Posudek na Diplomovou práci Bc. Blanky Červené**  
**“Stanovení volného homocysteinu a dalších aminothioliů v lidské plazmě“**

Předložená diplomová práce se zabývá možnostmi stanovení zejména volného homocysteinu v plazmě. V teoretické části je shrnut přehled této problematiky, jsou zde podrobně popsány kapitoly o aminothiolech a onemocnění aterosklerózou. Nesystematicky a poněkud chaoticky je popsána kapitola stanovení homocysteinu. Pouze namátkou uvádím např. kapitola 2.3.1 Detekce pomocí kapilární elektroforézy – kapilární elektroforéza rozhodně neslouží k detekci, ale je metodou separační. Kapitola 2.3.5 LC-MS-MS a 2.3.6 HPLC metody – z názvů kapitol by bylo možné usuzovat, že LC-MS-MS je speciální technika, která nepatří mezi HPLC metody.

V experimentální části je popis použitých chemikálií, přístrojů a pomůcek, chromatografických podmínek, uspořádání a pracovní postup analýzy. Dále práce obsahuje postup přípravy jednotlivých roztoků potřebných k experimentům.

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

- **str. 34:** kapitola 3.2 – je uvedeno, že homocystein byl stanovován v krevní plazmě dobrovolných dárců – v celé práci jsem nikde nenašla shrnuté naměřené hodnoty v plazmě – pouze v diskuzi na str. 46 je zmíněno, že hodnoty volného homocysteinu vycházely v plazmě o mnoho nižší, než uvádí literatura.
- **Obr. 9** je znázorněn chromatogram reálného vzorku plazmy – domnívám se, že je dost odvážné, vzhledem k celé práci a komentářům - jak moc závisí retenční časy jednotlivých standardů na pH mobilní fáze, tvrdit, že pík homocysteinu je právě v retenčním čase 7,95 – klidně tak by to mohl být i pík, který je před tímto píkem. Jak je možné vysvětlit posuny retenčních časů v tak malém rozpětí pH – příloha 3? V přístrojovém vybavení v experimentální části by měla být uvedena přesnost měření používaného pH metru vzhledem k výrazným posunům retenčních charakteristik standardů v závislosti na setinách pH.
- **str. 36:** kapitola 3.5.2 – dle uvedeného postupu jedna analýza trvá 32 minut + propláchnutí 20 minut vodou + 30 minut proplach směsí acetonitril/voda – je tomu opravdu tak?
- **str. 38:** uvedeným postupem u zásobního roztoku HCl rozhodně nepřipravíme 1 mol/l
- **str. 39:** kapitola 3.6.3 – takto připravená kalibrace byla přímo proměřována nebo dále nějakým způsobem zpracována? Proč nebyla provedena kalibrace o známých koncentračních hladinách přímo z plazmy? Myslím, že je troufalé udělat kalibraci pouze z vody a na základě toho pak vyhodnocovat výsledky z reálných vzorků, když nevím jaká je účinnost celého postupu.
- **str. 42:** Na obr. 10 není uvedena jednotka koncentrace Hcy na ose x. Byl každý koncentrační bod připraven pouze jednou nebo několikrát?
- **str. 43, tab. 5:** jsou zde sice uvedeny výsledky výtěžnosti, ale není nikde popsáno, jak bylo postupováno. Jak byly vzorky se standardním přídatkem připravovány a následně vyhodnoceny? Přídatek 0  $\mu\text{mol/l}$  byla vyhodnocena koncentrace 0,286  $\mu\text{mol/l}$  – je možné vyhodnotit tuto koncentraci správně, když kalibrace byla připravena s nejnižším kalibračním bodem 0,5  $\mu\text{mol/l}$  (limit kvantifikace – LOQ).
- **Str. 46:** je zde shrnuté, že určení správnosti metody na základě vyhodnocení pomocí standardních přídatků je uspokojivé – jsou někde uváděny pravidla do kolika procent výtěžnosti jsou výsledky uspokojivé? Čím mohla být způsobena výtěžnost 131%?
- **příloha 2:** Jsou zde shrnuté chromatografické záznamy kalibračních roztoků, o kterých se v celé práci autorka nikde nezmiňuje, jak byly připravovány.

Zcela postrádám hodnocení výsledků reálných vzorků, ze kterých v diskuzi byly vyvozovány nějaké závěry.

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

- velmi dobře - m -

V Pardubicích 18. května 2011

  
Ing. Petra Bajerová, Ph.D.