

## Posudek na diplomovou práci

Název práce: Určování poloh dvojných vazeb u triacylglycerolů pomocí HPLC/APCI-MS<sup>2</sup>

Autor: Eva Háková

Předkládaná diplomová práce se věnuje určení poloh dvojných vazeb v acylových řetězcích triacylglycerolů s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Studované téma je v současné době vysoce aktuální, protože vliv polohy dvojných vazeb na biochemické vlastnosti lipidů může být zcela zásadní. Pro určování polohy dvojných vazeb je využito tvorby aduktů dvojných vazeb s acetonitrilem a jejich následné charakteristické fragmentace.

V úvodu autorka stručně popisuje důvody studia poloh dvojných vazeb a definuje dílčí cíle práce. V teoretické části popisuje autorka vlastnosti triacylglycerolů, analytické techniky používané pro jejich identifikaci, způsoby určování poloh dvojných vazeb a vlastnosti a funkce novorozeneckého mázku. Teoretické části bych vytkl nevyváženost jednotlivých podkapitol, např. chromatografické techniky tvoří významnou součást práce a jsou zmíněny pouze okrajově, zatímco je věnován poměrně rozsáhlý popis novorozeneckému mázku, který nebyl hlavním tématem práce. Dále postrádám více informací o samotných triacylglycerolech, především o studovaných izomerech, které pro méně orientovaného čtenáře mohou být přínosné. V textu se také vyskytují často nepřesnosti, např.:

*str. 11 - "Mezi lipidy se řadí tuky, oleje, vosky..." - tuky, oleje a vosky jsou tvořeny lipidy*

*str. 12 - TG obsahující 2 mastné kyseliny nemusejí být vždy opticky aktivní, pouze pokud se budou v polohách sn-1 a sn-3 kyseliny lišit.*

*str. 17 - "adsorpční chromatografie" - separace v normálních fázích*

*- "mobilní fáze využívané v HILIC jsou normální fáze mísitelné s vodou..." - směsi organických rozpouštědel a vody s přísadkou aditiv*

*- v HILIC systému se neseperují lipidy jen podle polarity, ale i podle náboje*

*- dvojně vazby v argentační chromatografii netvoří stabilní komplexy s ionty stříbra, tím by došlo k nevratnému zadržení látek na koloně*

V experimentální části autorka detailně popisuje jednotlivé postupy práce. Následuje kapitola popisující dosažené výsledky a jejich příslušnou diskuzi. Zde musím zdůraznit, že

autorka provedla velké množství experimentů, kterými se podařilo poměrně podrobně zmapovat příslušnou problematiku. Získaná data vykazují velmi vysokou kvalitu a zaslouží si bezesporu zpracování pro publikaci v mezinárodním odborném časopise v oblasti analytické chemie.

K práci mám pouze následující náměty k diskuzi:

- Přírodní vzorky triacylglycerolů jsou většinou velmi složité směsi s obsahem látek o různých koncentracích. Jaká je přibližně koncentrační citlivost techniky pro takto složité směsi?

- Autorka uvádí optimalizaci parametrů APCI ionizace, ale neuvádí jaký vliv mají na zastoupení  $[M+55]^+$  iontu ve spektrech. Jaký vliv má změna teploty, průtoku sušícího plynu, atd.? Jak si autorka vysvětluje, že v pracích některých autorů se stejnou mobilní fází, nejsou tyto adukty pozorovány vůbec? Může to být dáno i odlišným typem přístroje?

- Autorka došla k závěru, že adukty nelze použít pro identifikaci cis-/trans- izomerů nebo izomerů s rozvětveným řetězcem. Zde bych se rád zeptal, jestli autorka předpokládá možnost identifikace regioizomerů TG pomocí studovaných aduktů?

- Při LC/MS analýze dochází k poklesu acetonitrilu a tím k ovlivnění relativní intenzity aduktu  $[M+55]^+$ , především pro TG s vyššími retenčními časy. Autorka zmínila možnost přidavku acetonitrilu za kolonou, jehož průtok by však nebyl v čase konstantní a docházelo by ke změnám optimálních podmínek ionizace. Lze tento jev zlepšit použitím např. "protisměrného" gradientu z druhé pumpy, který by zajistil konstantní složení mobilní fáze a průtoku?

Závěrem musím konstatovat, že předložená práce splňuje všechny náležitosti a celkově práci hodnotím kladně.

**Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji klasifikaci výborně.**

V Pardubicích, 21. 5. 2013

Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.

Univerzita Pardubice