

**POUŽITÍ MODERNÍCH ANALYTICKÝCH METOD KE STANOVENÍ BIOLOGICKY  
AKTIVNÍCH LÁTEK**

Univerzita Karlova v Praze; Přírodovědecká fakulta; Katedra analytické chemie

Tématem této disertační práce je využití několika analytických metod (vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), afinitní HPLC a afinitní kapilární elektroforézy (ACE)) ke stanovení biologicky aktivních látek. Sledovanými analyty byly žaludeční enzymy pepsiny a plazmatické metanefriny. Všechny analyzované látky jsou přirozenou součástí těla savců a stanovení jejich patologických koncentrací hraje významnou roli v identifikaci určitých onemocnění.

Pro analýzu pepsinů byly vybrány afinitní HPLC a ACE. V experimentech byla využita zvýšená afinita pepsinů k substrátům obsahujícím jodem substituované tyrozinové zbytky. Této zvýšené afinity bylo využito k přípravě stacionárních fází pro afinitní HPLC a modifikovaných kapilár pro afinitní kapilární elektroforézu umožňujících selektivní adsorpci pepsinu. Metodou zvolenou pro stanovení plazmatických metanefrinů byla HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-EC).

Práce sestává z 41 stran textu, 86 citací a 5 přiložených publikací doktorandky, které byly či budou publikovány v impaktovaných a recenzovaných neimpaktovaných časopisech (J. Chromatogr. A, Chem. Listy, 2x J. Hypertension a Vnitřní lékařství).

**K práci bych měl několik drobných poznámek, komentářů či otázek:**

- Str. 14-17: Popis elektrochemického detektoru je příliš detailní, bylo by možno jej zestručnit
- Str. 10, ř. 5 „Afinitní interakce jsou velmi silné. Patří sem např. vodíkové vazby, elektrostatické působení mezi analytem a ligandem nebo van der Waalsovy vazby [16]“. Vodíkové vazby, van der Waalsovy síly patří mezi energeticky slabé interakce než mezi „velmi silné“.
- Str. 13, ř. 19: Na rtuťové elektrodě se sledují i oxidace
- Str. 13, ř. 19: Vzhledem k mechanickým vlastnostem je HMDE či DME méně vhodná k napojení na HPLC. Vhodnější by bylo uvést v tomto případě použití „rtuťových elektrod neobsahujících kapalnou rtuť, např. amalgámových či filmových“.
- Str. 14, ř. 11: Bohužel, selektivita elektrochemických detektorů je většinou velmi nízká
- Str. 20, ř. 4: „Pepsiny náleží mezi aspartátové proteasy (kyselé proteasy) s pH optimumem v kyselé oblasti pH a jsou produkovány buňkami žaludeční sliznice obratlovců.“ Jaké je optimální pH?
- Str. 20, ř. 12: „Je známo, že sekrece pepsinogenu probíhá paralelně se sekrecí žaludečních kyselin.“ Kde je pepsinogen syntetizován před sekrecí do žaludku?
- Str. 26, ř. 10: Jaký ED byl použit?
- Str. 26, ř. 22: „v karbonátovém pufru o odpovídajícím pH“ – jaké je odpovídající pH?
- Str. 26, ř. 22: Jaké bylo složení „karbonátového pufru“?
- Str. 27, ř. 23: Co má být chápáno „po předchozí dietě“?
- Str. 29, ř. 20: Jaká byla úloha vnitřního standardu HMBA?
- Str. 31 ř. 18: Termín „chymázová aktivita“ by mohl být objasněn v textu.
- Str. 31 ř. 28: Bylo by vhodné nadefinovat, jak byl variační koeficient vypočítáván, protože v literatuře lze nalézt několik způsobů výpočtu (např. totožně s relativní směrodatnou odchylkou). Z kolik dat byl počítán?

**Jazykové, pravopisné, formální a jiné drobné připomínky**

- V textu nemůžu nalézt odkaz na Tabulku 1. a Obr. 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a na Obr. 10 jsou textu dříve než odkaz na ně.
- Popisky v Obr. 6 jsou špatně čitelné.
- Str. 26, ř. 22: Pokud se jedná o komerční výrobky (HEMA BIO E, EPOXY TOYOPEARL, HEMA BIO VS), bylo by vhodné uvést výrobce.
- Str. 27, ř. 8: Zkratka „BOC“ by měla být zavedena i v textu, nejen v seznamu zkratk.
- Str. 28, Obr. 9: Vhodnější by bylo uvedení plných názvů látek místo zkratk v popisku.
- Str. 29, ř. 12: za slovem „hladinách“ nemá být „.“.
- Str. 29, ř. 16: za slovem „intervaly“ nemá být „ , “.
- Str. 33, ř. 7: Místo „Kd“ má být „K<sub>d</sub>“
- Str. 32 ř. 30: Před slovem „viz“ by neměla být tečka
- Str. 35, ř. 12: jsou použity proměnné x a y, které nejsou v předchozím textu zavedeny,
- Str. 36, ř. 17: Koeficient determinance se značí D, nikoliv R<sup>2</sup>, vyjadřuje se v procentech
- Str. 39, ř. 3: místo „J.Chromatigr. A“ má být „J.Chromatogr. A“
- Str. 39, ř. 5: závorku „(práce přijatá redakcí, dosud nepublikovaná)“ lze vypustit.
- Str. 41, ř. 24, 25, 32: Proč v datech „10.12. 2007“ je za druhou tečkou mezera a ne za první?

#### **Shrnutí:**

Práce je dobře, srozumitelně a přehledně sepsána. Dané téma je rozpracováno podrobně, metodicky správně a umožňuje i méně zasvěceným čtenářům pochopit a využít uvedené poznatky. Použité přístupy řešení problémů jsou odpovídající a nelze nic namítnout ani proti interpretaci výsledků. Veškerá použitá literatura byla dle mého názoru řádně citována (86 citací).

Téma předkládané práce patří k vysoce aktuálním a pro potřeby praxe vysoce využitelným. Všechny analyzované látky jsou přirozenou součástí těla savců a stanovení jejich patologických koncentrací hraje významnou roli v identifikaci určitých onemocnění. Důležitost stanovení těchto látek v medicíně je patrná z lékařských publikací, které jsou součástí práce.

Domnívám se, že cíl práce byl splněn a metodický přístup k řešení považuji za odpovídající.

Všechny uváděné poznámky a komentáře je možno považovat spíše za formální, doplňující a mají sloužit autorce k podpoře dalších vědeckých postupů. Nenalezl jsem žádnou závažnou chybu, která by bránila úspěšnému přijetí této disertační práce.

Podle mého názoru, založeném na předložené disertační práci RNDr. Alice Vránkové, jmenovaná splnila všechny předpoklady pro úspěšné přijetí disertační práce a práci k obhajobě, po jejímž úspěšném absolvování jí bude udělen akademický titul „Doktor“ (Ph.D.),

***d o p o r u č u j i***

.....

Dr. Ing. Tomáš Navrátil

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.

V Praze, 10. 5. 2009