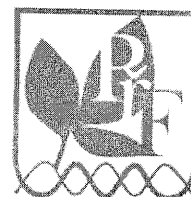




JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta



POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU\* PRÁCI

Autor práce: Tereza Kamišová

Název práce: Vývoj nové metody pro stanovení bilirubinu a jeho esterů

Školitel práce: prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.

Oponent práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

Pracoviště oponenta: Ústav chemie a biochemie PŘF JU

	Bodový rozsah hodnocení <sup>1</sup>	Body
<b>(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY</b>		
celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	2
kvalita literární rešerše (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	2
správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	1
grafická úprava textu a obrázků	0-3	1
adekvátnost a srozumitelnost výsledků a závěrů	0-3	1
úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	1
správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	1
<b>Formální požadavky – body celkem</b>		<b>11</b>
<b>(2) VĚCNÉ POŽADAVKY</b>		
výstižnost formulace cílů práce	0-3	2
splnění cílů práce	0-3	1
úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře	0-3	1
<b>Věcné požadavky – body celkem</b>		<b>4</b>

\* Nehodící se škrtněte

<sup>1</sup> Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovuje, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální a (2) Věcné požadavky, u experimentálních prací i (3) Věcné požadavky experimentálních prací, u prací v cizím jazyce i (4) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

### (3) VĚCNÉ POŽADAVKY – EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	1
úplnost popisu použitých metodik	0-3	2
experimentální náročnost práce	0-3	3
úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	1
aktuálnost použitých metod	0-3	3
přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	1
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		11

### (4) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

jazyková a stylistická úroveň	0-3	---
<b>CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)</b>	<b>51<sup>2</sup></b>	<b>26<sup>3</sup></b>

#### Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě:

Str. 8, kap. 2.1.2: Bylo pH pufrů změřeno autorkou nebo tyto hodnoty byly převzaty z nějakého zdroje?

Str. 13, kap. 3.1: Co autorka myslela tím, že získaný chromatogram na obr. 8 byl „*poněkud nesrozumitelný*“? Toto vyjádření je naprosto nevhodné, nekonkrétní a neposkytuje vůbec žádnou informaci. Jaké z toho autorka tedy vyvozuje závěry pro další postup? Co si lze pod pojem „*poněkud nesrozumitelný*“ autorka představovala a byla tato skutečnost nějak dále řešena?

Str. 13, kap. 3.1: V této kapitole je zmiňováno, že po nástřiku standardního roztoku bilirubinu docházelo „*k ucpávání jehly autosampleru a po každém nástřiku musel být vyměněn filtr předklonky HPLC, díky velké usazenině vzorku*“. Jak je možné, že po prvním zjištění usazeniny vzorku na filtru předklonky ihned po nástřiku bylo pokračováno v dalším dávkování těchto vzorků? V případě tohoto zjištění neměly být žádné další vzorky nastříkovány bez provedení vhodné předúpravy vzorku před analýzou (např. změna rozpouštědel a/nebo provedení filtrace vzorku za použití stříkačky přes diskový filtr z vhodného materiálu). Jedna ze základních podmínek při analýze vzorku pomocí kapalinové chromatografie je převedení analytu (i matrice) do roztoku a tento roztok (včetně analytu a matrice) musí být dokonale mísitelný s danou mobilní fází. Jestliže tato podmínka není splněna, tak vzorek nesmí být do systému HPLC nastříknut, natož nastříkovan opakovaně.

Str. 13., kap. 3.1: Věta: „*Všechny mobilní fáze byly před každým použitím v HPLC důkladně odvzdušněny pomocí vodní vývěvy*“. Jak se provádí odvzdušnění pomocí vodní vývěvy? Prosím o popis této techniky. Dále bych chtěl podotknout, že tato věta nepatří do této kapitoly věnované výsledkům, ale do kapitoly 2.3.

<sup>2</sup> Vyberte jednu z hodnot: 33 bodů pro teoretické práce, 36 bodů pro teoretické práce v cizím jazyce, 51 bodů pro experimentální práce, 54 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

<sup>3</sup> Zadejte počet přidělených bodů.

Str. 14, kap. 3.2.1: Proč bylo prováděno testování rozpustnosti bilirubinu v pufrch? Pro analýzu bilirubinu metodou HPLC je přece podstatná rozpustnost bilirubinu v mobilní fázi, což bylo prováděno v kap. 3.2.2.

Str. 16, kap. 3.2.3: Na základě měření v rámci této kapitoly bylo zjištěno, že optimální objem nástřiku standardního roztoku bilirubinu, který byl navíc ještě 20x zředěn, je pouhých 5  $\mu$ l, ale žádné další závěry a modifikace metody ze zjištění této podstatné skutečnosti učiněny nebyly. Proč nebyly na základě tohoto faktu učiněny nějaké závěry a nebyla provedena vhodná modifikace metody? Dále bych se chtěl autorky zeptat, na základě jakého kritéria byla prováděna tato optimalizace, jak provedla určení dynamického rozsahu detektoru a jak bylo provedeno hodnocení kritéria „*zkreslení velikosti plochy pod píkem*“.

Str. 17, kap. 3.2.3, obr. 13: Z jakého důvodu byla délka analýzy přibližně 15 minut, když k eluci docházelo již v oblasti kolem 2 minuty retenčního času. Na základě těchto chromatogramů lze také konstatovat, že podmínky chromatografické separace nejsou příliš vhodné, protože k eluci analytu (retenční čas je pravděpodobně přibližně 2 min) dochází téměř na úrovni mrtvého času (pravděpodobně přibližně 1,8 min), takže sloučenina není téměř zadržována na koloně a existuje tak velké riziko případné koeluce analytu s jinými sloučeninami podobných chromatografických vlastností (např. z reálných vzorků, nečistot z chemikálií či mobilní fáze) nebo se sloučeninami vyšší polarity.

Str. 17. kap., 3.3.1: Věta: „*Záznamy chromatogramů s jednotlivými alkoholy zachycuje Obr. 14, na kterém je vidět posun píků jednotlivých esterů...*“ Věta je nevhodně formulována a je nepřesná, protože z ní není jasné, zda jsou v chromatogramu zaznamenány alkoholy (viz první část věty) nebo estery (viz druhá část věty). Které z těchto sloučenin jsou tedy v chromatogramu zaznamenány a proč?

Str. 19, kap. 3.3.2: Jakým způsobem byla provedena kvantifikace změn výtěžků esterů uváděných v procentech?

Str. 20, kap. 4: Jaké kritérium (včetně uvedení hodnoty) bylo zvoleno pro hodnocení míry separace jednotlivých sloučenin a jakých hodnot bylo dosaženo?

### **Další komentáře oponenta:**

**Níže uvedené komentáře není nutné z časových důvodů u obhajoby číst. Tyto komentáře zde uvedeny zejména pro potřeby autorky, aby věděla, čeho se v budoucnu vyvarovat.**

Str. III aj.: Neponechávat neslabičné předložky (*v, s, z, k*), *slabičné předložky (o, u)* a spojky (*a, i*) na konci řádku. Místo klasické mezery se použije tzv. pevná mezera pomocí kombinace kláves „*shift+ctrl+space*“. Více informací lze nalézt na internetové stránce <http://prirucka.ujc.cas.cz/?id=880> Ústavu pro jazyk český Akademie věd ČR, v.v.i.

Str. III: Při uvádění data pomocí číslic se za řadovými číslovkami označujícími den a měsíc po tečce píše mezera. (např. 25. 4. 2013 a nikoliv 25.4.2013). Mezery lze vypustit pouze při použití tzv. dvoumístného způsobu zápisu (např. 25.04.2013 a nikoliv 25.4.2013). Více informací lze nalézt na internetové stránce <http://prirucka.ujc.cas.cz/?ref=880&id=810> Ústavu pro jazyk český Akademie věd ČR, v.v.i.

Str. 1, kap. 1.1: Zde je konstatováno, že bilirubin „vytváří nejčastěji roztoky žlutého či oranžového odstínu, s absorpcí v oblasti 400 – 490 nm a absorpčním maximem při 450 nm“. Hodnota absorpčního maxima pouze při vlnové délce 450 nm je uvedena nesprávně, protože není uvedeno o jaký konkrétní izomer se jedná. V materiálu výrobce je uvedeno, že se jedná o směs 3 izomerů s hodnotami vlnových délek absorpčních maxim v rozsahu od 449 nm do 458 nm. Dále by bylo vhodné uvést pro jaké rozpouštědlo jsou tyto hodnoty tabelovány, protože i rozpouštědlo může ovlivňovat intenzitu absorpce a vlnovou délku absorpčního maxima.

Str. 2, kap. 1.1: Formulace „Navenek se tento stav projeví žloutenkou.“ není formulací odbornou.

Str. 2, kap. 1.1.1: Formulace „Vyhovují mu ale organická rozpouštědla...“ je nevhodná. Slova s tímto podtextem by neměla být používána. O tom, zda něco něčemu vyhovuje závisí na úhlu pohledu člověka a nikoliv na „postoji“ dané sloučeniny. Mimochodem skutečnost, že se nějaká sloučenina v nějakém rozpouštědle nerozpouští může být v některém případě výhodné (např. při izolaci, přečišťování apod.) a v některém případě nevhodné (např. při snaze převedení sloučeniny do formy pravého roztoku k následné analýze).

Str. 2, kap. 1.1.1, tab. 1: V analytické chemii není doporučováno používání jednotek „ $\mu\text{M}$ “. Místo těchto jednotek by se měly používat jednotky „ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ “ tak, jak jsou používány dále v textu. S tím souvisí i další připomínka k nevhodnému používání více způsobů vyjádření molární koncentrace. Dále zde není uvedena teplota, pro kterou jsou tyto rozpustnosti definovány. Teplota totiž velmi často výrazně ovlivňuje rozpustnost sloučenin. Poslední připomínka je adresována na uvádění hodnoty „0“ pro rozpustnost v některých rozpouštědlech. Uvádění hodnoty „0“ je obecně velmi problematické. Mnohem vhodnější je uvádět rozpustnost ve formátu např. „ $< 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ “.

Str. 4, kap. 1.1.2: Uvádění koncentrace, koncentračního rozsahu či porovnání pomocí výrazů „v nepatrném množství“ nebo „ve znatelném množství“ bez bližší objektivní specifikace je velice nevhodné.

Str. 4, kap. 1.1.3: Věta: „Metoda používá gradient směsi acetonitrilu, 0,01 M fosfátového pufru (pH 5,5) a dimethylformamidu v poměrech 50:300:650 (v/v) do směsi stejných složek v poměru 200:150:650.“ Pasáž „do směsi stejných složek“ je poměrně zvláštní a hlavně zbytečná. V případě gradientové eluce je počet složek mobilní fáze na začátku separace stejný jako na konci separace. Rozdíl je pouze v obsahu jednotlivých složek v průběhu analýzy. V případě, že některá složka není na začátku nebo na konci separace do mobilní fáze dávkována, tak je uzančně stanoveno, že název této složky uváděn je, ale obsah této složky je vyjadřován jako „0 %“. Dále by bylo vhodné uvést jednotky „(v/v)“ i pro hodnoty „200:150:650“ a hodnoty v dalších odstavcích. V případě, že by se jednalo o lineární gradient, tak by bylo vhodné uvést i dobu gradientové eluce, aby čtenář získal základní představu o strmosti gradientu.

Str. 4, kap. 1.1.3: Co je to „hořečnatý stav“?

Str. 4, kap. 1.1.3: U popisu metod kapalinové chromatografie je vhodné zmínit i skutečnost, zda se jedná o gradientovou nebo isokratickou separaci. Tato informace nezabere mnoho místa a na první pohled prozradí způsob separace.

Str. 5, kap. 1.2: Věta: „...jejich absorpční maxima pohlcování světla...“. Zde by bylo vhodnější uvést formulaci např.: „vlnové délky absorpčních maxim...“, což měla autorka

patrně na mysli. Je nutné si uvědomit, že bod absorpčního maxima je vždy definován dvěma souřadnicemi – vlnovou délkou a hodnotou absorbance. Dále je zbytečné uvádět skutečnost, že se jedná o „*pohlcování světla*“, protože v případě měření absorpčních spekter to je naprosto zřejmé.

Str. 5, kap. 1.2, obr. 3 aj.: Na ose hodnot absorbance nejsou uvedeny jednotky. Jednotky by měli být uváděny i u bezrozměrných veličin. V těchto případech lze tuto skutečnost obecně vyjádřit číslovkou jedna v hranatých závorkách „[1]“. Lze ale použít i speciální jednotky, které se v daném oboru běžně používají. V případě analytické chemie či chemie obecně se pro veličinu absorbance nejčastěji používají jednotky „[AU]“ nebo „[mAU]“, které vycházejí ze slov „absorbance unit“. U levého obrázku není uvedeno, které spektrum patří které sloučenině. Není uvedeno jak byla spektra získána a za jakých podmínek byla změřena. Byla změřena autorkou, někým z jejích kolegů, získána z internetu, z odborné publikace či z jiného zdroje?

Str. 6, kap. 1.2, obr. 4 aj.: Vzorce nejsou znázorněny ve stejné velikosti a ve stejném stylu – ve vzorci na levé straně je např. methylová skupina znázorněna jako „-CH<sub>3</sub>“ a ve vzorci na pravé straně je stejná skupina znázorněna pouze čárkou. Obě formy jsou akceptovatelné, ale v celé práci by být vždy použit pouze jeden způsob (zvláště v rámci jednoho obrázku).

Str. 6, kap. 1.3: Věta: „*Estery se řadí mezi funkční deriváty karboxylových kyselin, u kterých došlo k záměně atomu vodíku.*“ V první řadě je nutné definovat o jaký vodík se jedná (i ta nejjednodušší karboxylová kyselina má vodíky dva). I přesto je však tato formulace nepřesná, protože při esterifikaci může docházet nejen k výměně vodíku na karboxylové skupině, ale také k výměně celé -OH skupiny (jak je znázorněno na obr. 5).

Str. 6, kap. 1.3: Věta: „*Estery ale mohou tvořit... a proto jsou rozpustné ve vodě, avšak s rostoucí délkou řetězce klesá jejich rozpustnost. Složitými estery jsou v přírodě tuky a oleje, tyto látky samozřejmě ve vodě rozpustné nejsou...*“ Jsou tedy estery rozpustné, nerozpustné či částečně rozpustné? Samozřejmě platí všechny tři možnosti a tak by bylo vhodné větu první větu doplnit slovy „*některé z nich*“ před slovo „*rozpustné*“.

Str. 6, kap. 1.3: Věta: „*Acylovou skupinou je nazývána nahrazená hydroxylová skupina na karboxylové kyselině...*“ Tato formulace je nesprávná, protože acylovou skupinou se rozumí část R-C=O a nikoliv -OH.

Str. 7, kap. 1.3: Věta: „*Pyridin a báze...*“. Jaké jiné báze jsou touto formulací myšleny? Vždyť právě pyridin je báze. Neměla být věta formulována jako „*Pyridin je báze, která...*“?

Str. 8, kap. 2.1.1: Dle materiálů výrobce bilirubinu neleží absorpční maximum izomeru III v rozsahu 445 – 458 nm, ale v rozsahu 455 – 458 nm. Dále je chybně uvedeno, že daná chemikálie obsahuje mj. izomer XIII a není uvedeno, že tato chemikálie obsahuje mj. izomer XII.

Str. 8 aj.: Neponechávat hodnoty veličiny (např. 5,0) na jednom konci řádku a jednotky veličiny (např. mg.ml<sup>-1</sup>) na začátku dalšího řádku. Místo klasické mezery se použije tzv. pevná mezera kombinací kláves „shift+ctrl+space“. Více informací lze nalézt na internetové stránce <http://prirucka.ujc.cas.cz/?id=880> Ústavu pro jazyk český Akademie věd ČR, v.v.i.

Str. 8, kap. 2.1.2: V popisu přípravy pufrů není uvedeno o jaké poměry se a dále zde není uvedena čistota methanolu.

Str. 9, kap. 2.1.2, tab. 2: Uvedení koncentrace pouze výrazem „molarita“ bez uvedení jednotek je nedostatečné. Jedná se o jednotky M, mM či snad  $\mu\text{M}$ ? Jednotky veličin je nutné uvádět vždy, a to i v případě, že je naprosto zřejmé o jaké jednotky se jedná (jako v tomto případě).

Str. 9, kap. 2.2: Proč je v této podkapitole pojednáváno o teorii esterifikace, když je tato podkapitola umístěna v části věnované specifikaci chemikálií, přístrojů a přípravě roztoků? Teorie esterifikace do této kapitoly nepatří a měla by být uvedena pouze v kapitole 1. V kapitole 2.2 věnované esterifikaci by měl být uveden pouze postup esterifikace, seznam použitých chemikálií apod.

Str. 9, kap. 2.2: Věta: „... a dobrým výtěžkům“. Co to znamená dobrý výtěžek? Kolik procent to představuje? V porovnání s čím je tento výtěžek dobrý? Je nevhodné uvádět takto nekonkrétní formulace.

Str. 10, kap. 2.2: Věta: „Vzorek byl naředěn jako pro standardní stanovení bilirubinu...“ Jak a čím byl vzorek naředěn a jak je prováděno standardní stanovení bilirubinu (není zde uveden ani odkaz na kapitolu a ani se žádná z kapitol takto nejmenuje).

Str. 10, kap. 2.2: Věta: „Nastříkovaný objem 50  $\mu\text{l}$ , byl předem stanovený jako optimální...“ O optimalizaci objemu nástřiku nebylo do této části práce dosud pojednáváno a výsledky optimalizace ani do této kapitoly nepatří, ale patří do kapitoly věnované výsledkům a/nebo diskusi.

Str. 11, kap. 2.3: Proč je v této subkapitole pojednáváno o teorii HPLC, když je tato subkapitola umístěna v části věnované specifikaci chemikálií, přístrojů a přípravě roztoků? Teorie esterifikace do této kapitoly nepatří a měla by být uvedena pouze v kapitole 1. V kapitole 2.3 věnované metodě HPLC by měly být uvedeny pouze podmínky chromatografické separace a detekce, příprava mobilních fází, příprava vzorků k analýze apod.

Str. 11, kap. 2.3: Věta: „...pík pro každou složku.“ Toto je pouze ideální případ a není pravidlem, že se podaří rozdělit všechny složky do jednotlivých píků, V případě analýzy vzorků s komplikovanou maticí, které obsahují mnoho sloučenin (např. extrakty z rostlin či jejich plodů) dochází velice často ke koelucím, kdy je v rámci jednoho píku eluováno více sloučenin nebo jsou píky nedokonale rozděleny.

Str. 11, kap. 2.3: Věta: „... u metod s korekcí mobilní fáze okolo 1000 psi (68 atmosfér), u CHINA metody 400 PSI.“ Jedná se o atmosféru technickou nebo o atmosféru fyzikální? Proč je na začátku věty uváděna jednotka tlaku malými písmeny (psi) a na konci věty velkými písmeny (PSI)? Není vhodné uvádět tlak v atmosférách, ale v jednotkách „MPa“ nebo „bar“.

Str. 11, kap. 2.3: Věta: „Vzorek se na kolonu nastříkuje ručně nebo s pomocí automatického podavače vzorků (autosampleru).“ Jedná se o automatický dávkovač a nikoliv podavač.

Str. 11, kap. 2.3: Věta: „... nejprve vytékají nepolární látky...“ Naprosto nevhodná formulace. V chromatografii se termín „vytékají“ nepoužívá. Pro výraz „vytékat“ se nejčastěji používá výraz „eluovat“ a pro výraz „nevytékat“ se nejčastěji používají výrazy „retence“ či „zadržovat“. Správná formulace by měla být např.: „...jsou postupně eluovány dle rostoucí polarity“.

Str. 11, kap. 2.3: Věta: „*Mobilní fáze se používá buď jedna (tzv. isokratická eluce) nebo se používá více mobilních fází, které jsou v čerpadle míchány a jejich poměr se v průběhu chromatografie mění (tzv. gradientová eluce)*“. Popis rozdílu mezi isokratickou a gradientovou elucí je nepřesný, protože i při isokratické eluci lze použít více mobilních fází. O rozdělení eluce na isokratickou a gradientovou nerozhoduje počet mobilních fází, ale pouze složení mobilní fáze v průběhu chromatografické separace, které musí být v případě isokratické eluce po celou dobu analýzy konstantní (nemění se v čase), ale v případě gradientové eluce se složení mobilní fáze v průběhu chromatografické separace mění (mění se v čase). I při isokratické separaci lze však použít více mobilních fází (např. voda jako mobilní fáze A a acetonitril či methanol jako mobilní fáze B), ale jejich poměr se nesmí v průběhu analýzy měnit (např. po celou dobu analýzy je dávkováno 80 % mobilní fáze A a 20 % mobilní fáze B). Tento způsob se při vývoji metod používá poměrně často, protože se mobilní fáze nemusí připravovat předem ve směsi, ale lze ji „připravovat“ operativně přímo v chromatografu z čistých zásobních rozpouštědel ve složení dle aktuální potřeby. Dále bych chtěl podotknout, že mobilní fáze nejsou míchány pouze v čerpadle, ale mohou být míchány i v gradientovém mixéru, který může být umístěn před pumpami (tzv. nízkotlaký gradient) nebo za pumpami (tzv. vysokotlaký gradient).

Str. 12, kap. 2.3: Věta: „*Pro detekci frakcí se obvykle používá...*“ Při metodě HPLC používané pro analytické účely se v drtivé většině sběr frakcí neprovádí. V tomto případě jde o kontinuální detekci sloučenin, které jsou postupně eluovány z chromatografické kolony. Byly snad nějaké frakce odebírány a pokud ano, tak za jakým účelem?

Str. 12, kap. 2.3: Věta: „*...s chromatogramem (záznam absorpce na jedné vlnové délce v závislosti na čase)*“. Formulace je nevhodná a nepřesná – místo výrazu „absorpce“ má být použit výraz „absorbance“ a místo výrazu „čase“ má být použit výraz „retenčním čase“. Dále je nutno uvést, že chromatogram je obecně definován jako záznam odezvy detektoru na retenčním čase. Může být tedy sestrojen nejen jako závislost absorbance změřené při jedné vlnové délce na retenčním čase (tzv. 1D chromatogram), ale může být sestrojen i jako závislost absorbance změřené při více vlnových délkách na retenčním čase (tzv. 2D či 3D chromatogramy – v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti osy s hodnotami absorbance).

Str. 12, kap. 2.3: Není uvedena čistota rozpouštědel použitých na přípravu mobilní fáze. Není uvedeno, zda se jedná o objemové či hmotnostní poměry, není uvedena teplota při níž byly prováděny chromatografické separace a není uvedena doba analýzy.

Str. 13., kap. 3.1: Věta: „*Bylo rozhodnuto upravit hodnotu pH mobilní fáze...*“. Na základě čeho bylo takto rozhodnuto? Čím a jak byla úprava pH provedena?

Str. 13., kap. 3.1.: Věta: „*Ani tato metoda se nejevila jako vhodná*“. Proč nebyla metoda vhodná? Jaké kritérium bylo hodnoceno a jaký byl výsledek?

Str. 13., kap. 3.1: Věta: „*... k setrvávání vzorku na koloně...*“. Tato formulace je naprosto nevhodná. Vhodnější formulace je např. „*... k silné retenci sloučenin...*“. Dále je nevhodné používat výraz „*vypláchnutí*“ kolony. Místo něj je vhodnější použít výraz „*propláchnutí*“ kolony.

Str. 13., kap. 3.1, obr. 8: V obrázku nejsou uvedeny jednotky u absorbance, není provedena identifikace píků či píků a není zvoleno vhodné měřítko (záznam signálu detektoru zasahuje pod osu x do oblasti popisků této osy).

Str. 13., kap. 3.1: Věta: „*Přesto bylo rozhodnuto setrvat u methanolu jako výchozí složky pro mobilní fázi...*“. Co vedlo autorku k rozhodnutí ponechat methanol jako majoritní (výraz „výchozí“ je v tomto případě nevhodný, zvláště u isokratické separace) složku mobilní fáze?

Str. 14., kap. 3.1: Stabilita nesouvisí s rozpustností. Stabilitou se přece rozumí skutečnost, že analyt nepodlehne degradaci.

Str. 14 aj.: Mezi hodnotou veličiny (např. 5,0) a jednotkami veličiny (např. mg.ml<sup>-1</sup>) vždy umístit mezeru (např. 5 mg.ml<sup>-1</sup>). Více informací lze nalézt na internetové stránce <http://prirucka.ujc.cas.cz/?id=880> Ústavu pro jazyk český Akademie věd ČR, v.v.i.

Str. 15, kap. 3.2.2: Činnosti v rámci této kapitoly měly být prováděny před prvním nástřikem do HPLC systému (tj. před činnostmi v kap. 3.1) aby byla zaručena rozpustnost vzorku v mobilní fázi. Z jakého důvodu byla testována takto extrémní koncentrace bilirubinu? V této kapitole je uvedeno, že se jednalo o nasycený roztok. Z tohoto důvodu se daly očekávat velké problémy s rozpustností a testování takto vysoké koncentrace pravděpodobně postrádá smysl, protože tato koncentrace bilirubinu je pro spektrofotometrický detektor HPLC systému příliš vysoká (jak je uváděno v kap. 3.2.3).

Str. 15, kap 3.2.2: Slovo „*nejoptimálnější*“ je lingvistický nesmysl, protože již slovo „optimální“ (z latinského „optimus“) znamená „nejlepší“. Nemůže existovat ještě lepší stav než nejlepší stav.

Str. 17, kap. 3.2.3, obr. 13: V popisu obrázku jsou jednotky objemu uvedeny v „μL“ místo v „μl“.

Str. 17., kap. 3.3.1: Nejen uvedeno čím si autorka vysvětluje přítomnost různého počtu píků v chromatogramech roztoku bilirubinu po esterifikaci jednotlivými alkoholy.

Str. 17., kap 3.3.1: Věta: „*Směs obsahuje dva chemicky blízké produkty – pík v chromatogramu má dva vrcholy.*“ Kromě skutečnosti, že není specifikováno o který pík se jedná, je věta i poměrně nepřesně formulována. Pík v chromatogramu, který má dva vrcholy, může totiž obsahovat dvě a více sloučenin, protože může docházet ke koeluci více sloučenin, což je při separaci tohoto vzorku velmi pravděpodobné. Použitý bilirubin je směsí 3 izomerů a každý izomer má 2 karboxylové skupiny, které mohou být esterifikovány. Z jednoho izomeru tedy mohou teoreticky vzniknout 3 různé estery (2 monoestery a 1 diester). Celkem tedy může po reakci tohoto bilirubinu (obsahujícího 3 izomery) s tímto primárním alkoholem teoreticky vzniknout 9 různých esterů.

Str. 18., kap 3.3.1, obr. 14: V obrázku není provedena identifikace píků. Dále by bylo vhodné doplnit osu y.

Str. 19, kap. 3.3.2: Nejsou specifikovány (názvem nebo retenčním časem) estery, které byly hodnoceny v rámci testování stability. Jak bylo uvedeno v kap. 3.3.1, tak po esterifikaci s butan-1-olem i heptan-1-olem bylo v příslušných chromatogramech (viz obr. 14) zaznamenáno více píků, které mají představovat produkty esterifikace.

Str. 19, kap. 3.3.2, obr. 15: V obrázku nejsou uvedeny jednotky u absorbance a není provedena identifikace píků.

Str. 19, kap. 3.3.2, obr. 16: V obrázku nejsou uvedeny jednotky u absorbance a není provedena identifikace píků. Dále by bylo vhodné zmínit skutečnost, že po 1 týdnu došlo



k eliminaci sloučeniny eluované v retenčních čase přibližně 10 minut a vzniku nové sloučeniny eluované v retenčních čase přibližně 9 minut.

Str. 20, kap. 4: Věta: „...bilirubin vytéká jen minutu po startu...“ Věta je formulována nevhodně a nesprávně. Místo výrazu „bilirubin vytéká“ je mnohem vhodnější použít např. výraz „bilirubin je eluován“. Číselné vyjádření retence je nesprávné, protože retenční čas bilirubinu je přibližně 2,3 minuty a mrtvý čas je přibližně 1,3 minuty. Bilirubin je tedy eluován přibližně 1 minutu po mrtvém čase a přibližně 2,3 minuty po zahájení separace (po „startu“).

Str. 21 – 22: Nejednotný formát citací (např. současné používání celého názvu odborného časopisu nebo zkratky odborného časopisu), v některých případech je citace zdroje z internetu provedena pouze uvedením internetové stránky a nejsou uvedena data získání (stažení) informace z internetové stránky.

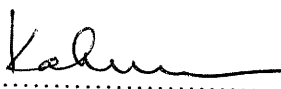
### Závěr:

Práci

d o p o r u č u j i / n e d o p o r u č u j i\*

k obhajobě a navrhuji známku dobře.<sup>4</sup>

V Českých Budějovicích dne 21. 5. 2013



.....  
podpis

---

<sup>4</sup> Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává)