

Posudek oponenta diplomové práce

Autor práce: Bc. Dominik Novák

Název práce: HPLC/MS stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě.

Bc. Dominik Novák se v diplomové práci zabývá optimalizací separace symetrického a asymetrického dimethylargininu pomocí spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. V teoretické části se diplomant zabývá methylovanými deriváty argininu a jejich stanovením pomocí různých biochemických a analytických technik. Teoretická část se opírá o 48 literárních odkazů převážně na anglicky psanou literaturu. V experimentální části jsou popsány podmínky a postupy stanovení, závěrem jsou diskutovány dosažené výsledky, které jsou doloženy obrázky.

Předložená diplomová práce je psána klasickou formou, s členěním textu do jednotlivých kapitol, avšak postrádám číslování dvou hlavních kapitol (teoretická a experimentální část), čímž se stává číslování zbylých kapitol poměrně zmatené. V textu se vyskytuje velké množství hovorových výrazů (např. tripl kvadrupól) a typografických chyb, diplomant nepoužívá správnou terminologii a celá diplomová práce je psána neformálním způsobem, což bohužel snižuje celkový dojem z předložené práce. Níže uvádím několik vybraných formálních nedostatků a také připomínky či náměty k diskusi.

Formální nedostatky a další připomínky:

- Pro hmotnostní spektrometrii je nesprávně uveden termín hmotnostní detekce, což je však daleko širší pojem. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky.
- Odrážky a mezery se nepoužívají najednou. Buď jeden nebo druhý způsob oddělování odstavců.
- Tečka za hlavní kapitolou se nedělá, stejně jako je tomu u vedlejších kapitol.
- Pokud se cituje literatura, která jde za sebou, tak se citace píší do jedné hranaté závorky, např. [7-11]. Postupné řazení [7,8,9,10,11] nebo [7], [8], [9], [10], [11] je nesprávné.
- Číslo nesmí zůstat bez jednotky na konci řádku (jednotka je pak sama na začátku řádku).
- V textu je souběžně několik různých termínů pro stejnou věc. Například v kapitole interní standard je v textu využíván český ekvivalent vnitřní standard. Střídají se ekvivalenty obrácená fáze a reverzní fáze, je potřeba používat jen jeden v celé práci. Navíc správné označení je *system* s obrácenými (reverzními) fázemi.
- Supelcosil není zástupcem kolon pro separaci v systémech s normálními fázemi. Supelcosil je značka kolon a těch může být velká řada v závislosti na chemické modifikaci silikagelu. V této publikaci (str. 41) se jednalo o silikagelovou kolonu, která se tradičně používá v systémech s normálními fázemi.
- V experimentální části je uvedena řada kapalinových chromatografů, ale jednalo se pouze o jednotlivé části, jako čerpadlo či detektor. Stačilo napsat kapalinový chromatograf (Nexera, Shimadzu) skládající se z těchto částí....
- Podmínky nemohou být neoptimálnější. Buď jsou nebo nejsou optimální.
- Kvadrupól je analyzátor s jednotkovým rozlišením, tudíž optimalizované přechody lišící se v desetinné či setině m/z nedokáže rozlišit. Proto dva z použitých MRM přechodů jsou bezvýznamné a pro sledování obou izomerních sloučenin jich postačí menší množství.

- Pokud se látky separují v čisté vodě a při sebemenším přidání acetonitrilu dochází ke zhoršení jejich separace, nemůže gradientová eluce ničím přispět ke zlepšení chromatografického rozlišení.
- Na obr. 11-34 nejsou zobrazeny hmotnostní spektra, jak diplomant uvádí na str. 47, ale jedná se o chromatografické separace, tudíž o chromatogramy.
- U obr. 11-13 jsou uvedeny špatně popisky obrázku, nejedná se o retenční čas, ale o chromatografickou separaci. Retenční čas můžete z těchto chromatogramů určit.
- Dle mého vkusu je ve výsledkové části velké množství chromatografických záznamů, které nutně nemusí být v textu, ale mohou být uvedeny v přílohové části. Tento způsob zbytečně komplikuje orientaci v textu, kde je za sebou několik stránek obrázků pouze s minimem textu.

Dotazy a náměty k diskusi:

- U symetrického dimethyl-L-argininu byl optimalizován přechod m/z 202,75 \rightarrow 71,2, ale v diskusi (str. 60) se píše o produktovém iontu m/z 172. Který z uvedených iontů je tedy správný? V diplomové práci se píše, že pro fragment m/z 172 nebylo dosaženo významné intenzity. Neměl to tedy být fragment m/z 71? Byl pro měření vybrán správný přechod?
- U obr. 33 a 34 je patrný další pík eluující za stanovovanými argininy. Dokázal by diplomant vysvětlit o jakou látku se jedná?
- Sledované látky jsou sloučeniny izomerní povahy a jejich separace v systémech s obrácenými fázemi je pochopitelně komplikovaná. Proč v rámci optimalizace nebyla testována jiná stacionární fáze nebo jiný fázový systém, který by se hodil pro separaci izomerních látek více? Dokázal by diplomant navrhnout vhodnější stacionární fázi, nebo vhodnější separační systém?
- Z diplomové práce není jasně patrné, zda diplomant pouze vycházel z předchozí diplomové práce nebo uvedené postupy i opakoval a poté porovnával s nově zaváděnou metodou. V experimentální části jsou sice uvedeny přístroje pro tento typ experimentů a naznačeny postupy, ale v diskusní části není uveden jediný obrázek separace pro podpoření svých závěrů. Může diplomant tuto situaci objasnit?
- Na str. 60 se píše, že diplomant nedetekoval signifikantní fragmenty pro oba metylované deriváty. Ve výsledkové práci a v uvedených obrázcích, je ale jasně patrné, že byly optimalizovány MRM přechody pro obě sledované látky, a tudíž fragmenty pozorovány být musely. Může diplomant své tvrzení objasnit?
- Téma práce je stanovení dimethylovaných L-argininů v lidské plazmě. V práci jsem však nenašla jedinou ukázkou separace reálných vzorků. Byly reálné vzorky tedy analyzovány, jak bylo předmětem diplomové práce?

Závěrem konstatuji, že Bc. Dominik Novák splnil zadání diplomové práce, proto ji doporučuji k obhajobě a na základě výše uvedených skutečností ji hodnotím

D.

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.