

Posudek oponenta diplomové práce

Autor práce: Bc. Klára Sopóciiová

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

Bc. Klára Sopóciiová se v diplomové práci zabývá optimalizací chromatografických podmínek pro separaci symetrického a asymetrického dimethylargininu s využitím systémů s obrácenými fázemi a chromatografie hydrofilních interakcí. V teoretické části se diplomantka věnuje metabolismu a klinickému významu argininu a jeho methylovaných derivátů. Dále popisuje teoretické základy technik, které pro své měření využívá a v neposlední řadě se věnuje úpravě vzorků před vlastním chromatografickým stanovením. Diplomantka ve své práci cituje 58 literárních odkazů převážně na anglicky psanou literaturu. Vlastní rešeršní část týkající se úpravy vzorku, je však velmi chaotická. Není klasicky členěna na kapitoly, skládá se z odstavců věnované vždy jedné publikaci. Často jsou použité nesmyslné nadpisy jednotlivých metod. Zde bych ocenila, kdyby diplomantka sepsala souhrn ze všech publikovaných zdrojů a nepopisovala podmínky analýzy vždy jen z jedné publikované práce. Rešeršní část týkající se chromatografické separace je prezentována v tabulce, což hodnotím kladně, ale mohl zde být uveden alespoň krátký komentář. V experimentální části autorka popisuje podmínky a postupy stanovení, opět v některých místech chaoticky (např. použité mobilní fáze). Závěrem jsou diskutovány dosažené výsledky, které jsou doloženy chromatogramy. V experimentální a výsledkové části by bylo lepší pro popis výsledků používat trpný rod, který se u diplomových prací standardně využívá. Dále by bylo vhodnější více odlišit co byla práce samotné diplomantky a z čeho vycházela v rámci návaznosti na předchozí diplomovou práci, což nyní není jasně patrné. Vlastní diskuze je tvořena pouze komentáři jednotlivých chromatogramů, není zde žádná logická posloupnost a ucelený text.

Po formální stránce je diplomová práce psána klasickou formou, s členěním textu do jednotlivých kapitol. V textu se vyskytuje řada typografických chyb, což snižuje orientaci v textu a pochopení studované problematiky (vynechaná slova, špatné skloňování atd.). Autorka má problémy se zavedenou terminologií u separačních technik a hmotnostní spektrometrie, což se negativně odráží v textu. Tato skutečnost mě velmi mrzí, protože autorka absolvovala předmět „Chromatografie a elektroforéza“, kde se daná problematika podrobně probírala. Některé obrázky mají bohužel nižší kvalitu a u jednoduchých schémat bych doporučila obrázek dle zdroje nakreslit než pouze kopírovat. Další formální nedostatky, připomínky či náměty k diskusi jsou uvedeny níže.

Formální nedostatky a další připomínky:

- Číslování seznamu, obrázků a zkratk se neuvádí v obsahu s číslem stránky, protože tyto stránky nejsou číslovány. Chemické vzorce se neuvádí ve zkratkách, protože je to chemický vzorec, ne zkratka.
- Pro hmotnostní spektrometrii je v některých místech nesprávně uveden termín hmotnostní detekce, což je však daleko širší pojem. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky.
- K oddělování odstavců se nepoužívají odrážky a mezery najednou.

- Citace literatury je nesprávná. Autorka vždy uvádí citaci k odstavci, i když se údaj týká konkrétní věty. Daná skutečnost pak komplikuje orientaci v textu. Dále není vhodné, aby citace stála osamocena na novém řádku.
- U obrázků, které byly upraveny na základě literatury se tato informace uvádí až na konci citace, protože souvisí se zdrojem (upraveno dle [21] – použitá citace).
- Kapitola 1.4.1 – Tato kapitola nese název „*Arginin*“ a tudíž bych čekala, že zde bude diskutován klinický význam argininu, ale první věta v této kapitole je „*Astma je běžné onemocnění charakterizované přetrvávajícím zánětem dýchacích cest*“. Celá kapitola by měla být jinak koncipována a informací ze závěru kapitoly, že arginin je nezbytný pro funkci plic by měla začít, aby zde byla logická posloupnost.
- Str. 35 – Nesprávné použití mezer značně komplikuje orientaci v textu.
- Str. 39 – Nesprávné označení plochy ve vzorci dle dalšího popisku (A_{SS} , má být A_{SP}).
- Str. 43 – Mobilní fáze B – Kyselina močová se do mobilní fáze asi nedávala.
- Str. 45 – Kapitola 3.4.2 – Nesprávné použití anglicismů v českém textu.
- TIC není totální iontový proud, ale celkový.
- Popisky chromatogramů jsou nesprávné – není to retenční čas, ale chromatografický záznam.

Dotazy a náměty k diskusi:

- Str. 33 – Filtry – Co bylo úkolem těch filtrů? Jak byly odděleny proteiny?
- Str. 36 – Může diplomantka objasnit co myslela tvrzením: „*použití vysokého procenta vody v mobilní fázi minimalizuje separaci a mění se pouze retence*“?
- Str. 38 – Na obrázku 9 je uvedeno spektrum jednotlivých dimethylargininů, které je převzato z publikace. Proč si fragmentační spektrum diplomantka nezměřila sama v rámci své experimentální práce a neověřila si tvorbu produktových iontů?
- Str. 39 – V kapitole o kapalinové chromatografii autorka uvádí jako vhodnou ionizační techniku elektronovou ionizaci. Je tato technika opravdu vhodná při spojení HPLC/MS?
- Proč v systému s obrácenými fázemi autorka volila jako aditivum do vodné složky mobilní fáze kyselinu mravenčí a mravenčan amonný o dané koncentraci? Byla testována i jiná koncentrace?
- Str. 45 – Autorka píše, že k ionizaci a odpaření se používal dusík a uvádí průtoky plynů. Následuje informace, že se používal jako sušící plyn vzduch. Co je tedy správná informace?
- U symetrického dimethyl-L-argininu byl optimalizován přechod m/z 202,75 \rightarrow 71,2, ale na obrázku 9 je uveden charakteristický produktový iont m/z 172. Který z uvedených iontů je tedy správný? Navíc na obrázku 9 není iont o m/z 71 přítomen. Jak si danou skutečnost autorka vysvětluje?
- Str. 46 – V posledním odstavci autorka píše, že byly změřeny specifické hmotnosti jednotlivých látek. Co tím myslí?
- Proč autorka v legendě chromatogramů uvádí záznamy při snímání záporných iontů, když se vše měřilo při záznamu kladných iontů? Pokud autorka využívala MRM režim snímání iontů, proč zároveň uvádí i záznamy celkového iontového proudu? Pokud jde čistě o optimalizaci separace dimethylargininů, které nelze rozlišit na základě fragmentačního chování, je nutné využívat MRM režim? Jaký režim snímání iontů by autorka vybrala jako optimální pro tuto práci?
- Autorka by si neměla plést termíny opakovatelnost a reprodukovatelnost. Co který termín znamená? Co tedy v rámci své práce testovala?

- Proč diplomantka u HILIC chromatografie čekala 30 minut na ustálení rovnováhy (ne proplach jak píše), když se jednalo o isokratickou eluci?
- Jaké bylo zpoždění gradientu u použitého systému? Při optimalizace gradientové eluce by se mělo uvažovat. Bez jeho znalostí je optimalizace značně komplikovaná.
- Proč byly u gradientové eluce v HILIC systému vybrány nižší hodnoty koncentrací HCOOH a mravenčanu amonného, když u isokratické eluce nebyly úspěšné?
- Proč se neoptimalizovala separace i v systémech s obrácenými fázemi a pouze byly převzaty podmínky z předchozí diplomové práce? Nebylo by lepší jiné aditivum do mobilní fáze, nebo změna jeho koncentrace?
- Str. 66 – 67 – Jaké plochy autorka odečítala, z TIC nebo MRM záznamů? Uvedené plochy píků ve vzorku s přidavkem standardu (str. 67) jsou již po odečtení ploch zjištěných u samotného vzorku, aby odpovídala čistě jen standardu, nebo je to včetně vzorku? Diskuze je matoucí, prosím o objasnění. Byly přidavky standardu stejné? Kolikrát bylo měření opakováno? Byla uvažována i chyba měření?

Závěrem konstatuji, že i přes uvedené připomínky Bc. Klára Sopóciová splnila zadání diplomové práce, proto ji doporučuji k obhajobě a na základě výše uvedených skutečností ji hodnotím

D.

prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.