

Posudek oponenta diplomové práce

Autor práce: Bc. Kryštof Pelcl

Název práce: GC/MS stanovení mastných kyselin v třídách lipidů lidské plazmy.

Bc. Kryštof Pelcl se v diplomové práci zabývá využitím spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) pro analýzu mastných kyselin v izolovaných třídách lipidů, které byly frakcionovány kapalinovou chromatografií. V teoretické části se diplomant zabývá rozdělením lipidů na jednotlivé třídy a jejich analýzou. Věnuje se různým extrakčním postupům a následným separačním technikám včetně derivatizace potřebné pro GC/MS stanovení. V experimentální části jsou popsány podmínky a postupy stanovení, závěrem jsou diskutovány dosažené výsledky, které jsou doloženy obrázky a tabulkami.

Předložená diplomová práce je psána přehledně, s logickým členěním textu do jednotlivých kapitol, avšak s větším množstvím překlepů, typografických chyb či neobratných formulací. Z formálních nedostatků bych zmínila nesprávné uvádění citací v textu. Citace jdoucí za sebou se spojují, např. [1,2,3,4] se spojí na [1-4]. Dále by citace neměla zůstat osamocena na novém řádku bez dalšího textu. Níže jsou uvedeny formální nedostatky a připomínky či náměty k diskuzi.

Formální nedostatky:

- První číslovaná stránka je úvod, proto se v obsahu neuvádí číslo stránky seznamu obrázků, tabulek a zkratk. Poděkování, anotace a klíčová slova se zpravidla do obsahu nezařazují.
- Str. 27 – „*V lipidomické analýze se pracuje nejčastěji se vzorky plazmy nebo se vzorky rostlin. Ta je odebírána od pacientů na příslušném odběrovém místě nebo v nemocnici.*“ Věty na sebe nenavazují. V další větě se píše už o jen o plazmě.
- Tabulka 4 – přehled extrakčních metod pro izolaci lipidů je velice pěkně sestrojena a shrnuje možné extrakční postupy. K dokonalosti chybí jen citace literatury, ze které diplomant čerpal.
- Obrázek 16 na str. 32 nevystihuje přesně princip HILIC, je zde spousta nejasností.
- Vzorek se neanalyzuje „na“ plynové chromatografii nebo GC/MS, ale „pomocí“ plynové chromatografie či GC/MS. Směs nebyla odpařena „na“ dusíku, ale „pod“ proudem dusíku.
- V odborném textu se nepoužívají slangové výrazy, které se běžně používají v laboratoři při práci, např. IS mix – správně směs interních standardů. Navíc zkratka IS nebyla zavedena.
- Str. 41 – První uvedený gradient je změna koncentrace jednotlivých složek mobilní fáze, ne změna průtoku.
- Popisky obrázku nejsou samo vypovídající, v některých případech nevhodně volené. Např. u obrázku 27 se zřejmě jedná o ověřování čistoty frakce nežli „ověřování frakce“.
- Na obrázku 31 není osa y a značky. Obrázek je poté nepřehledný. Pokud jsou v popisku uvedené jednotky, nemusí být na ose číslo uvedené s jednotkou.

Připomínky či náměty k diskuzi:

- Obrázky si diplomant kreslil sám? U některých obrázků není odkaz.
- Str. 31 – V systémech s normálními fázemi se opravdu během gradientové eluce zvyšuje množství vody?
- Str. 34 – Mezi běžná derivatizační činidla pro přípravu metylesterů patří kyselina chlorovodíková a sírová?
- Str. 44 – V práci se píše „*V průběhu optimalizace byly zkoušeny různé varianty gradientů mobilních fází.*“ Co autor myslí různé varianty gradientů? Co konkrétně měnil a testoval?
- Str. 45 – Byla testována doba nutná pro ustálení kolony? Proč bylo pro ustálení kolony vybráno zmíněných 30 minut?
- Str. 45 – Na obrázku 25 je uvedený chromatogram standardů zástupců lipických tříd. Jaké standardy zástupců lipických tříd byly analyzovány? Seznam standardů není uvedený. Na obrázku je uvedeno 5 lipických tříd, ale v oblasti, která nepatří do žádné z uvedených tříd eluují v časech 6,59 a 8,33 minut látky, které nejsou nikterak diskutovány. O jaké látky se jedná a proč se tato oblast nevyužívá pro další analýzu?
- V experimentální části je uvedeno, že sběr frakcí byl proveden 2x a byl použit nástřik vzorku 4 μ l. Předpokládám tedy, že se jedná o finální experimentální podmínky. V diskuzi je však uvedeno, že dávkování muselo být sníženo na 2 μ l z původních 4 μ l. Poté je na straně 47 uvedeno, že při prvním sběru byly dávkovány 4 μ l vzorku a u dalších 2 sběrů bylo dávkováno 2 μ l. Jak tedy experiment probíhal, kolik bylo dávkováno a kolik se dělalo sběrů frakcí?
- Dala by se na výsledky aplikovat nějaká statistická metoda, která by pomohla diskutované rozdíly mezi frakcemi nějak zhodnotit?
- Autor v závěru píše, že zásobní roztok metanolu byl kontaminován a ve slepém vzorku byly nalezeny estery kyseliny palmitové, stearové, olejové a epoxidy. Zároveň píše, že výskyt mastných kyselin nebyl ovlivněn kontaminací. Kolik tedy bylo ve slepém vzorku přítomno zmíněných mastných kyselin? Bylo by dobré uvést chromatogram slepého vzorku či množství obsažených mastných kyselin pro posouzení ovlivnění výsledků. Váhám o smysluplnosti poslední kapitoly, kde se diskutují rozdíly v jednotlivých frakcích. Má tato kapitola smysl, když byl použitý metanol kontaminovaný? Bez znalosti množství mastných kyselin ve slepém vzorku toto nemůžu posoudit.

Závěrem mohu konstatovat, že Bc. Kryštof Pelcl splnil zadání diplomové práce, proto ji doporučuji k obhajobě a na základě výše uvedených skutečností ji hodnotím

C.

prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.