

Předkládaná diplomová práce studentky Petry Macháčkové se zabývá hledáním nových ionizačních matic pro analýzu extrémně nepolárních látek (uhlovodíky, voskové estery) pomocí techniky desorpce-ionizace laserem za spoluúčasti matrice (MALDI) spojené s hmotnostní spektrometrií. Jedná se o velice relevantní tématiku s přímou návazností na aktuální analytickou praxi v oblasti lipidomiky. Řada těchto analytů je příliš nepolárních pro elektrosprejovou ionizaci a zároveň je často nelze analyzovat plynovou chromatografií a technika MALDI tedy zůstává jako poslední možnost, jak uskutečnit analýzu hmotnostní spektrometrií. Hledání nových matic je ovšem velice komplikované, protože zatím neexistuje jednotná teorie, která by kompletně popisovala procesy během MALDI ionizace. Téma diplomové práce tak lze označit za obtížné. Úvod práce je výborný a zvláště oceňuji moderní pojetí rozdělení lipidů, které vychází z novější nomenklatury (reference 7) a nikoliv z dnes již zastaralých monografií či skript. Z textu je zřejmé, že autorka rozumí zkoumané problematice i použitým analytickým technikám a postupům. Výsledková část je velmi přehledná a k prezentovaným výsledkům nemám vážnějších připomínek, snad až na skutečnost, že je škoda, že příloha neobsahuje samotná hmotnostní spektra příslušných modelových analytů s testovanými maticemi. Místo toho jsou diskutovány již rovnou interpretované výsledky. To je překvapivé i proto, že přílohová část práce se nesnaží být nijak stručná a obsahuje vyčerpávající množství spekter ukazujících metastabilní fragmentace jednotlivých matic za různých podmínek.

Celkově je ale diplomová práce velice kvalitní a dosažené výsledky mohou být bez problémů publikovány v předním analytickém nebo hmotnostněspektrometrickém odborném periodiku. K předložené práci mám tedy jen několik drobných výhrad, které jsou spíše doplňujícího charakteru:

-Velmi zřetelná systematická chyba při stanovení lithia metodou atomové spektrometrie nemůže být způsobena třemi důvody, které uvádí autorka (nepřesnost navážky se projevuje oběma směry, sorpce lithia na stěnách by způsobovala opačnou chybu a vypařování rozpouštědel se týká i kalibračních standardů a je tedy již obsažené v kalibrační křivce). Vzhledem k tomu, že kalibrační křivka stanovení prochází nulou, je pravděpodobné, že systematická chyba je způsobena nějakou interferencí v metodě atomové spektrometrie. Osobně se domnívám, že v tomto případě došlo k tomu, že vzorky s maticemi obsahovaly větší koncentrace sodných a draselných kationtů, než kalibrační standardy. Je známo, že přítomnost těchto alkalických kovů ve vzorku zvyšuje účinnost ionizace lithia při stanovení atomovou emisní spektrometrií v plameni.

-K textu na straně 17 bych rád doplnil několik věcí k historii techniky MALDI. Tato technika se vyvíjela nezávisle na ESI, pouze k tomu došlo přibližně ve stejné době (byť vývoj ESI se započal o hodně dříve). MALDI je pouze jednou podskupinou technik obecně nazývaných jako *soft laser desorption ionization* i když je tou jasně nejpoužívanější. Technika dnes nazývaná jako MALDI byla vypracována téměř výhradně Hillenkampem a Karasem. Koichi Tanaka obdržel jednu čtvrtinu NC za chemii v roce 2002 nikoliv za vývoj techniky MALDI, jak se mylně uvádí, ale za první laserovou ionizaci bílkoviny spojenou s hmotnostně spektrometrickou detekcí (celá tato NC byla udělena za analýzu bílkovin: její druhá čtvrtina za ESI-MS bílkovin a zbylá polovina za vývoj proteinového NMR).

-Na straně 18 bych autorku upozornil, že by měla dávat větší pozor na to, kdy hovoří o energii laseru v kvantověmechanickém smyslu (tedy o vlnové délce) a kdy o příkonu (což je energie dodaná za čas pulsu daného příslušnou frekvencí laseru). Později v textu je používán výraz intenzita, který je již lépe srozumitelný.

-Na straně 19 je uvedeno, že oblak po desorpci obsahuje atomy vodíků. Vzhledem k jejich reaktivitě si nejsem jist správností tohoto tvrzení.

-Na straně 26 je uvedeno, že matrice CHCA se používá pro výzkum proteinů. Jedná se o zavádějící tvrzení. CHCA se ve standardní proteomice používá při ionizaci peptidů získaných enzymatickým štěpením bílkovin. Pro skutečnou ionizaci proteinů se používají jiné matrice, například autorkou uvedená kyselina sinapová. Ta je - v rozporu s autorčiným tvrzením- důležitá i v lipidomickém výzkumu. Používá se totiž pro ionizaci lipoproteinů jako je například známý apolipoprotein.

-Na straně 31 je uvedeno, že hmotnostní spektrometr Reflex IV může v reflekonovém módu měřit do 100kDa. I když tento konkrétní spektrometr neznám, tak mám o tomto tvrzení určité pochybnosti. Buď se jedná přímo o překlep (a má být uvedeno 10kDa) nebo autorka nebere v úvahu velmi nízkou kvalitu spekter, která by byla tímto způsobem získána.

-Závěrem bych se autorky rád otázal, zda se dle jejího pozorování zkoumané matrice liší velikosti krystalů, které po uschnutí matrice a vzorku na MALDI desce zůstanou. Dále by mě zajímalo, zda se autorka domnívá, že hlavním důvodem „úspěchu“ nové matrice LiVA je dobrá mísitelnost se vzorkem nebo zda mohou existovat i další důvody.

Diplomová práce působí opravdu velmi dobrým dojmem a jistě se i v dnešní době jedná o práci vysoce nadprůměrnou. Zejména je obdivuhodné, že autorka skutečně našla novou použitelnou ionizační matici, která je lepší než matrice standardně používaná a její práce je tak zcela jistě aplikovatelná pro řešení skutečných analytických problémů. **Doporučuji tedy tuto práci bezvýhradně klasifikovat známkou výborně.**



Michael Volný

22.5.2011