

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Téma diplomové práce:      | <b><i>Využití nových typů stacionárních fází pro HPLC stanovení neopterinu a dalších metabolitů v moči</i></b> |
| Jméno studenta, studentky: | <b><i>Bc. Veronika Prokopová</i></b>   |
| Jméno oponenta:            | <b><i>PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.</i></b>   |

## II. Posudek oponenta

Cílem diplomové práce Veroniky Prokopové bylo zkoušení a porovnání separačních účinností kolon se stávající validovanou metodou pro stanovení neopterinu, kynureninu, kreatininu a kyseliny močové používanou v laboratoři FN HK. Diplomová práce je sepsána na 100 stranách, obsahuje 15 tabulek, 52 obrázků a 73 citací.

V teoretické části se autorka věnuje stanovovaným analytům a novým typům analytických kolon. Zde je však nutno poznamenat, že ne příliš úspěšně. Kapitola stacionární fáze postrádá kritický přístup k informacím a obecný vhled do problematiky, proto se stala překladem reklamních propagačních materiálů výrobců kolon, často opakovaných výroků s mnoha závažnými terminologickými chybami, které v pátém ročníku považují za celkem neakceptovatelné (např. termín normální fáze byl přejmenován na přímou fázi, účinnost kolony na výkon kolony apod.). Daleko přínosnější by bylo vytvořit ucelený obecný text o principu separací na jednotlivých fázích a ten doplnit hezkými ilustračními obrázky s tabulkou parametrů kolon tak, jak je uvedeno na začátku kapitol.

Experimentální část se zabývá porovnáním celkem 12 analytických kolon, z nichž většina je reverzní fáze C18, což při polaritě testovaných látek celkem nechápu. Práce je dokumentována přehlednými tabulkami avšak již nedostatečně vysvětlenými chromatografickými záznamy. Celkově sepsování práce nebyla věnována dostatečná pozornost, protože obsahuje překlepy a mnohé nepřesné formulace (silikové kolony, porózní částice, 5 micronové sorbenty netrpí protilakem a mnohé další - str. 12,19,32), anglické termíny (design je „fitován“, solvent, senzitivita nebo run) až výše uvedené závažné terminologické chyby.

### **K práci mám následující připomínky a dotazy:**

V názvu kapitol ani v textu nemá žádnou informační hodnotu uvádět rozměr a výrobce kolony. To vlastnosti stacionární fáze neovlivňuje. Údaj je uveden v tabulce a v textu zbytečně bezúčelně mnohokrát zopakován.

Jedna zkratka by v textu neměla vyjadřovat dva pojmy (str. 7 – MS).

Str. 8 – ZIC-pHILIC – absolutně nesouhlasím s vysvětlením zkratky!!!!

Str. 16 – autorka si protiřečí, jak je to ve skutečnosti s částicemi kolony Ascentis?

Str. 19 - obr. 8 není přehledný a nevysvětluje strukturu Synergi Hydro stacionární fáze

Str. 20 – nesouhlasím s uspořádáním kapitoly o hybridních stacionárních fázích – opět nepřehledné uspořádání, opakování stejných informací a reklamních sloganů. Také údaj o rozmezí pH je obecně chybný, což potvrzuje hned první uvedená kolona. Str.24 – předposlední odstavec patří do přehledného teoretického úvodu k separacím, který však chybí.

Str. 25 – Obr. 12 je uveden 2x

Str. 31 – chybně interpretované znaménko < v řadě rozpouštědel

Str. 62 – v experimentální části ZCELA chybí popis mobilních fází, které byly aplikovány na jednotlivých testovaných analytických kolonách – byl to vždy pufr? Naopak str. 65 – není třeba zcela opakovat celý postup HPLC metody, která je uvedena v části experimentální. Byl-li použit 100% fosfátový pufr, jak toto vysvětlíte vzhledem ke stabilitě C18 stacionárních fází? Jak toto vysvětlíte ve vztahu k HILIC kolonám? Na straně 31 totiž uvádíte, že fosfát nelze použít....

Str. 66 – popis a vysvětlení jednotlivých parametrů Testu způsobilosti patří spíše do teoretické části, v části výsledky a diskuse by měly být uvedeny výsledky a jejich zhodnocení. Stejně tak parametry validace by měly být v teoretické části alespoň popsány.

Str. 67 – uvádíte citaci [75], v seznamu je však maximálně 73 citací z nichž uvedená 73. je chybně citována.

Dále na stejné straně nesouhlasím s definicí parametru rozlišení pro účely této práce! Str. 72 – totéž je uvedeno

podruhé a opět chybně.

Str. 74 – popis provedení měření parametru linearita nepatří do části výsledky a diskuse ale do experimentu.

Str. 79 – chybí alespoň stručný komentář, proč byly vybrány zrovna uvedené 4 kolony.

Str. 80 a dále – chromatografické záznamy by měly obsahovat popis píku tak, aby si čtenář nemusel domýšlet identifikaci látek podle toho, který pík je zrovna maximální při kterém barevném záznamu. Chromatogramy působí velmi nepřehledně.

Kapitola 5.4 – dle mého názoru by první měla být uvedena opakovatelnost nástřiku a teprve potom opakovatelnost metody, která zahrnuje přípravu vzorků. Zde bych parametr nazvala „přesnost“ jak vyplývá z ICH guidelines.

Str. 91 – chybí komentář k výsledkům opakovatelnosti. Jaký je limit RSD pro plochu píku a retenční čas?

Str. 93 – v závěru autorka uvádí, že požadavek na rozlišení má být větší než 1,5, což ale nebylo splněno pro kyselinu močovou a kreatinin. Obecně se mi nezdá správné, že retenční časy látek jsou tak krátké vzhledem k tomu, že metodou přípravy vzorku je pouhé naředění a tudíž hrozí interference látek z biologické matrice, kterou UV detekce nedokáže selektivně „odfiltrovat“.

Str. 93 – opět chybí vysvětlení proč byla vybrána zrovna kolona Chromolith. Jenom kvůli rychlejší analýze? Nebo má i jiné výhody?

Citace [9] chybně

#### Dotazy:

- 1) Je jedinou stacionární fází v normálním uspořádání pouze silikagel?
- 2) Str. 17 – je tvrzení: Ionizované sloučeniny, jakými jsou kyseliny a báze, jsou zpravidla lépe separovány při použití mobilní fáze pufované na pH 2-3?
- 3) Co znamená pojem zwitterionický charakter stacionární fáze?
- 4) Proč jsou v chromatografickém záznamu neopterinu ze selektivního FD přítomny dva píky a to i ve standardu?
- 5) Existuje možnost, jak zjistit přítomnost interferencí kyseliny močové a kreatininu, které eluují obvykle velmi brzy na po mrtvém retenčním čase? Jak byla ověřována dostatečná separace od mrtvého retenčního času?
- 6) Str. 81 – jste si doopravdy jistá, že v chromatogramu moči jde o kyselinu močovou, když retenční čas standardu je 1,78 a u vzorku 1,20? Jak byste toto mohla dokázat?

I přes uvedené připomínky mohu konstatovat, že požadavky kladené na diplomové práce byly splněny a proto práci doporučuji k obhajobě.

Navrhovaná klasifikace: **velmi dobře**

V Hradci Králové dne: 23. 05. 2009

---

Podpis oponenta diplomové práce