

Téma diplomové práce	Stanovení neopterinu a jeho derivátů metodou HPLC s fluorescenční detekcí
Jméno studenta, studentky	Lenka Říhová
Jméno oponenta	PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.

II. Posudek oponenta

Lenka Říhová vypracovala svoji diplomovou pod vedením PharmDr. Lucie Novákové, Ph.D. Studentka se zabývala optimalizací a validací HPLC metody pro stanovení biopterinu, 7,8 – dihydroneopterinu, 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu, neopterinu a kreatininu metodou HPLC s fluorescenční, resp. UV detekcí.

Práce je členěna obvyklým způsobem, má 88 stran textu, včetně 47 odkazů na odbornou literaturu, obsahuje 23 tabulek a 27 obrázků.

Teoretická část uvádí charakteristiku pteridinů a kreatininu, představuje metodu HPLC a shrnuje validační parametry a parametry testu způsobilosti chromatografického systému. Práce přibližuje čtenáři pohled na problematiku separace polárních látek, včetně stacionárních fází pro HILIC.

V experimentální části je popsáno přístrojové vybavení, chemikálie a příprava vodných složek mobilní fáze. V rámci optimalizace chromatografických podmínek bylo naměřeno velké množství experimentálních dat, které jsou dokumentovány v tabulkách a na obrázcích. U vybraných mobilních fází (za použití kolony ZIC-HILIC) jsou porovnány výsledky testu způsobilosti systému. Výsledky validace vyvinuté HPLC metody jsou kriticky zhodnoceny. V DP oceňuji kritický pohled studentky na naměřená data a hodnocené parametry SST. V závěru studentka uvádí, že zadaný cíl práce byl splněn pouze částečně a navrhuje další možná řešení problematiky, což přidává na kvalitě DP. Vyvinutá metodika byla testovaná na reálných vzorcích biologického materiálu.

Práce po obsahové i formální stránce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci a proto ji doporučuji k obhajobě.

Připomínky:

-v DP není český ekvivalent zkratky HILIC

-str. 31 – vzorec pro výpočet parametru asymetrie píku neodpovídá vzorci, který je uvedený v citovaném literárním zdroji. V experimentální části vychází požadavek při hodnocení asymetrie z USP (str.71). Uvedený požadavek (menší než 2) platí obecně pro chromatografickou analýzu? USP by měl být uveden v přehledu použité literatury.

-str.71 – v DP není uvedeno, ze kterého literárního zdroje vychází požadavek na počet teoretických pater

-str. 83 – v závěru je uvedeno, že byla nalezena optimální mobilní fáze pro separaci zkoumaných látek. Výraz optimální není vzhledem k výsledkům DP správný, látky nejsou rozděleny

-směrodatná odchylka pro opakovatelnost plochy píku je v případě dihydroneopterinu a tetrahydroneopterinu (hodnoceny jako suma dvou píků) 23,5%. Takto vysoká odchylka je přisuzována právě vlivu hodnocení píků jako sumy dvou píků. V DP není zdokumentován chromatogram, který by ukazoval analýzu těchto analytů a shodu jejich retenčních časů jednotlivě, což by mohlo pomoci potvrdit nebo vyvrátit výše uvedené tvrzení.

Otázky:

1. V závěru práce je uvedeno, že možným řešením pro dosažení lepších výsledků separace je použití kolony s lepší separační účinností. Které kolony by přicházely v úvahu pro vyzkoušení?
2. Celková doba analýzy je 25 minut. Pík neopterinu a pík odpovídající DHN a THN jsou přes 4 minuty. Jakým způsobem by mohlo dojít k zúžení jednotlivých zón těchto analytů?

Navrhovaná klasifikace

V Hradci Králové dne 26. 5. 2009

Podpis oponenta diplomové práce