UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Téma diplomové práce	**Analýza vybraných polárních látek v HILIC módu.**
Jméno studenta, studentky	**Anna Brychová**
Jméno oponenta	**PharmDr. Ivana Pasáková, Ph.D.**

II. Posudek oponenta

Předkládaná diplomová práce Anny Brychové má experimentální charakter a jejím cílem bylo vyvinout vhodné chromatografické podmínky pro současnou separaci šesti polárních látek (čtyř adeninribonukleotidů - ATP, ADP, AMP, cAMP a dále kreatinu a fosfokreatinu) za využití HILIC stanovení. Práce má rozsah 70 stran, je rozčleněna do 6 kapitol a obsahuje 69 literárních odkazů.

V teoretické části se autorka nejprve krátce věnuje základním principům a instrumentaci HPLC. Následuje kapitola zabývající se hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií (HILIC), která je zpracována detailněji, s ohledem na experimentální část. Po krátkém úvodu a mechanismu separace HILIC jsou popsány typy stacionárních fází, používané v současné době. Blíže jsou poté specifikovány chromatografické kolony Obelisc N a ZIC®-HILIC, které byly použity v rámci experimentální práce. Další kapitola je věnována charakteristice studovaných látek a jejich významu. Závěr teoretické části tvoří literární rešerše s přehledem analytických metod, které byly pro stanovení hodnocených látek použity.

V experimentální části autorka systematicky dokládá výsledky dosažené během vývoje nové metody pro separaci adenosin-5´-trifosfátu (ATP), adenosin-5´-difosfátu (ADP), adenosinmonofosfátu (AMP), cyklického adenosin-3´,5´-monofosfátu (cAMP), kreatinu (C) a fosfokreatinu (PC). Nejprve jsou krátce uvedeny podmínky optimalizace na chromatografické koloně Obelisc N, nicméně hlavní část experimentální práce byla provedena na koloně ZIC®-HILIC. Během vývoje metody byly vyzkoušeny změny složení jednotlivých mobilních fází lišících se z hlediska procentuálního zastoupení organické a vodné složky mobilní fáze, pH a síly či typu použitého pufru. Pro docílení optimální separace všech šesti látek bylo využito jak izokratického, tak gradientového profilu analýzy. Nakonec byly nalezeny podmínky, při kterých došlo k separaci všech šesti látek, nicméně špatná reprodukovatelnost metody neumožňuje další využití těchto podmínek. V závěru této části práce se autorka zamýšlí nad možnými příčinami, které mohly zmíněné problémy s reprodukovatelností metody způsobit.

Práce je sepsána pečlivě s minimálním množstvím překlepů. Velmi kladně hodnotím zpracování kapitoly 2.2 teoretické části, týkající se problematiky HILIC, čímž autorka dokládá dobrou orientaci ve studované problematice. Oceňuji také množství literárních zdrojů, které byly pro sepsání práce využity. Z hlediska formálního by bylo vhodné použít při formátování textu jeho zarovnání do bloku a uváděné retenční časy zaokrouhlit na jedno desetinné místo, nikoli na tři.

K práci mám následující dotazy:

1) Na straně 49 uvádíte, že jste v optimalizaci chromatografických podmínek na koloně Obelisc N nepokračovala vzhledem k nedostatečné separaci látek, nicméně jste zkoušela pouze relativně nízká procenta organiky. Proč nebyla vyzkoušena mobilní fáze s obsahem vysokého procenta organické složky, které by mohlo v HILIC prostředí separaci napomoci?

2) V práci uvádíte množství gradientových profilů, které byly během optimalizace chromatografických podmínek vyzkoušeny. Odkazujete se pouze na čísla a bližší specifikace je uvedena úplně na začátku experimentální části. Pro přehlednost by bylo vhodnější uvést nějakou shrnující tabulku i v části, která se touto problematikou zabývá.

3) V teoretické části uvádíte, že HILIC se s výhodou využívá ve spojení s MS detekcí. Která z Vámi zkoušených mobilních fází si myslíte, že by byla nejvhodnější při spojení s tímto typem detekce (s ohledem na složení mobilní fáze, sílu pufru, pH, atd.)?

Na závěr mohu konstatovat, že práce Anny Brychové splňuje všechny náležitosti kladené na diplomové práce, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Navrhovaná klasifikace **výborně**

V Hradci Králové dne 26.5 2010

Podpis oponenta diplomové práce