

Téma diplomové práce	Stanovení vitamínů A, D, E metodou sekvenční injekční chromatografie
Jméno studenta, studentky	Kateřina Trefilová
Jméno oponenta	PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

II. Posudek oponenta

Diplomantka Kateřina Trefilová, vypracovala svou diplomovou práci (DP) na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové pod vedením PharmDr. Hany Sklenářové, Ph.D. DP obsahuje 63 stran a udává 24 citací a je členěna do šesti základních kapitol. V teoretické části jsou představeny analyzované látky a metody jejich stanovení dle platného lékopisu. Dále je popsána metoda SIA a SIC včetně přehledu monolitických kolon. V kapitole „Experimentální část“ diplomantka podrobně popisuje vývoj a optimalizaci analýzy a to zejména chromatografických podmínek separace a stanovení vitamínů A, D₂, D₃ a E. Analýza byla optimalizována ve dvou krocích nejprve na přístroji HPLC a poté na přístroji SIC. Vyvinutá metoda byla validována a byl proveden test vhodnosti chromatografického systému. V kapitole „Výsledky a diskuze“ je v mnoha tabulkách a grafech popsáno testování dvou různě dlouhých monolitických kolon se stejnou stacionární fází při použití tří mobilních fází a zvyšující se průtokovou rychlostí. Pro nejvhodnější podmínky byly vyhodnoceny validační parametry, opakovatelnost a stabilita roztoků jednotlivých vitamínů. V kapitole „souhrn“ jsou shrnuty dosažené výsledky. DP je po formální stránce zpracována standardním způsobem bez gramatických chyb.

Moje připomínky jsou:

1. Sekvenční injekční analýza byla sice vyvinuta Růžičkou a Marshalem, ale ne na Universitě ve Washingtonu, ale na Washingtonské univerzitě v Seattle.
2. V seznamu literatury jsou drobné chyby ve formátování a jeden zdvojený, případně chybně uvedený odkaz (20).
3. Nadpisy kapitol a podkapitol ne vždy zcela vystihují obsah kapitoly (2.5 Monolitické kolony).
4. V práci je používán výraz vitamín E, byť podle seznamu použitých chemikálií byl používán tokoferol acetát, tedy syntetický prekurzor vitamínu E.
5. V popisu přípravy roztoků standardů je uváděna koncentrace v μM byť jednotka byla jistě zamýšlena $\mu\text{M l}^{-1}$. U standardních roztoků směsi vitamínů by výrazně prospělo uvádět finální koncentraci jednotlivých složek.
6. V abstraktu a závěru je uváděna optimální průtoková rychlost mobilní fáze při analýze 10 ml min^{-1} ačkoli v tabulkách jsou uváděny hodnoty v $\mu\text{l sec}^{-1}$.
7. Chromatografickým záznamům chybí jednotnější formátování, popisky os a píků pro snazší pochopení a přehlednost.
8. Podrobně rozepsané podmínky testu vhodnosti chromatografického systému obsahují chybu ve vzorcích (rozlišení píků, faktor symetrie píků), bohužel však i výpočty provedené podle vzorců mají poněkud záhadné výsledky, což celkově ovlivňuje výsledky a závěry celé práce (vypočtené průměry a RSD).
9. Kapitola věnující se testování obou kolon se třemi druhy mobilní fáze při různých průtokových rychlostech sice poukazuje na množství naměřených záznamů, ale pouhá charakterizace chromatografického procesu pomocí retenčního času je poněkud nedostatečná, u záznamu směsi by jistě bylo názornější uvádět rozlišení píků. Běžné praxi také neodpovídají grafy závislosti retenčních časů na průtokové rychlosti. Kdy závislá veličina je na ose x (retenční čas).

10. V kapitole „vyhodnocení stability“ chybí podrobnější uvedení podmínek analýzy i popis vzorků jako takových. Není zde jakékoliv shrnutí výsledků, zejména když výsledky neodpovídají předpokladu (rozptyl hodnot a neklesající koncentrace). Ke zkreslení výsledků při mezidenní opakovatelnosti měření by zřejmě nemuselo dojít při použití vnitřního standardu.

11. Jako součást validace by jistě bylo dobré doplnit kalibrační závislosti pro jednotlivé vitamíny, LOD, LOQ, případně opakovatelnost na třech různých koncentračních hladinách.

Přes formální a faktické nedostatky, které kvalitu práce ovlivňují, je možné konstatovat, že diplomová práce má uspokojivou úroveň, a proto ji doporučuji k obhajobě

Otázky do diskuse:

1. Proč nebyly využity podmínky separace, kdy docházelo k rozdělení píků vitamínů D2 a D3 (mobilní fáze acetonitril) a proč došlo k výměně pořadí píku vitamínu D3 a E.

2. Podle čeho jste určila optimální podmínky separace?

3. Jak jste ověřila možnost použití metody pro stanovení účinných látek (vitamínu) v léčivých přípravcích?

Navrhovaná klasifikace

V Hradci Králové dne 18. 5. 2009

Podpis oponenta diplomové práce