

Posudek oponenta Ing. Petra Česly, Ph.D. na diplomovou práci Bc. Zuzany Koukalové

## JEDNOROZMĚRNÁ A DVOUROZMĚRNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE S VYUŽITÍM POVRCHOVĚ PORÉZNÍCH NÁPLNÍ KOLON

V závěrečné kvalifikační práci předkládané k obhajobě se diplomantka zaměřuje na studium některých aspektů spojených s možným použitím kolon pro kapalinovou chromatografii plněných povrchově porézními částicemi v systému s obrácenými fázemi a při chromatografii hydrofilních interakcí. Při svých studiích hodnotila vybrané krátké kolony určené pro rychlé separace v druhé dimenzi dvourozměrného systému z hlediska účinnosti, retenčních dat, průběhu gradientu, rozpouštědla a objemu vzorku dávkovaného na kolonu. Jako modelový systém analytů byly zvoleny směsi alkylbenzenů, fenolických kyselin a flavonoidních látek. Studované aspekty představují klíčové problémy při realizaci dvourozměrných separací v kombinaci HILIC x RP (nebo RP x HILIC) a získaná data jsou po vědecké stránce velice cenná s ohledem na realizaci těchto separací.

Práce samotná je velice obsáhlá, obsahuje 91 číslovaných stran a dále 54 stran tabulek a 48 stran obrázků v přílohách. Rozsahem je tedy více než nadprůměrná. Při přípravě obdobného textu je však potřeba dbát nejen na samotný obsah, ale nemalou měrou také na přehlednost a kvalitu zpracování. Tady se zřejmě projeví autorčiny menší zkušenosti. Místy se v textu obtížně orientuje, vyhledávání v tabulkách a obrázcích podle sloučenin komplikuje jejich anotace čísla, která jsou v tabulce v experimentální části a podobně. Přehlednosti práce by například významně prospěla už taková maličkost, jako je rozdělení přílohy na několik samostatných částí podle použitých kolon. V textu práce se také objevuje řada překlepů a drobných chyb. Namátkou zde uvádím pouze několik z nich – str. 17, silikagel uvedený s nulou místo O; str. 20, popisek u obr. 7C a D je přehozený; str. 30 dole, „reptodukovatelnosti“; str. 31 „selektivitu“; str. 39 dole „polycyklycké uhlovodíky“; str. 44, 2. odstavec, „automatickeho dávkovače“; str. 57 dole, „rovníc“; str. 71, 2. odstavec, „Po odečtení mrtvého času“; str. 82, 3. odstavec dole, „aniž by byla došlo“. Na druhou stranu bych rád vyzdvihl vyčerpávající přehled všech skutečností podstatných pro pochopení diplomové práce shrnutých v teoretické části a obdobné zpracování experimentální a diskusní části diplomové práce. Dále uvádím některé zásadnější připomínky k obsahu práce:

- Na str. 12 jsou uváděny termíny „kapacitní poměr“ a „kapacitní faktor“. IUPAC doporučuje použití termínu „retenční faktor“.
- První a druhý výraz pro píkovou kapacitu (str. 15, rovnice 12) se nemohou rovnat, protože  $V_R = (k + 1)V_M$  a tedy:

$$P_C = \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left( \frac{V_{R,Z}}{V_{R,1}} \right) + 1 = \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left( \frac{k_Z + 1}{k_1 + 1} \right) + 1$$

- Diplomantka na několika místech v textu správně uvádí nutnost použití vysoké frekvence sběru dat při rychlých separacích. Proto bych očekával uvedení této hodnoty v experimentální části. Jaká byla frekvence záznamu dat při měření šířky píku uracilu při stanovení mimokolonových příspěvků (str. 54, 55)? Pro šířku  $w_{0,5} = 0,01$  ml a průtok 3 ml/min se jedná o šířku píku při základně cca 0,3 s; pro záznam při 20 Hz by bylo naměřeno pouze šest bodů přes pík.
- V textu se často operuje s termínem korelační koeficient  $R^2$ . Správný termín je však koeficient determinace.

- Str. 61 dole – popis HILIC módu je mylný, platí, že s vyšší koncentrací acetonitrilu a tudíž s nižší koncentrací vody retence polárních látek obecně roste.
- Na str. 62 je uváděno, že tabulky P19 a P20 a obrázky P20 a P21 obsahují závislosti  $\log k$  vs.  $\varphi_{ACN}$ , nebo  $\log \varphi_{ACN}$ . U uvedených obrázků je však v popisu  $\varphi_{H_2O}$ , resp.  $\log \varphi_{H_2O}$ . Co je správně?
- Str. 64, první odstavec uvádí retenční čas naringeninu 0,82 min, v obr. P26 však eluuje při cca 0,1 min. V příloze je navíc obrázek separace mylně označen také jako P25.
- Na str. 66 je popisována separace fenolických kyselin na koloně Fenyl-Hexyl s gradientovou elucí (obr. P34, tabulka P32). Poslední látka na záznamu eluuje v 3,3 min, zatímco tabulka uvádí časy pouze do 2 min. Navíc podle popisu separace koeluuje dvojice kyselin p-kumarová/salicylová, ale v textu je uváděna dvojice salicylová/chlorogenová.
- U všech záznamů separací je y-ová osa označena jako Intenzita. Přitom se jedná zjevně o absorbanci.
- Str. 71, druhý odstavec – u koelucí je epikatechin uveden dvakrát.
- V seznamu literatury je uveden stejný odkaz 34 a 52 s jiným zdrojem. Který název časopisu je správně?
- Poněkud nelogicky působí koncept experimentů – vlivy dávkování jsou studovány pouze pro dvě kolony, symetrie píků pouze u jedné. Ohromné množství experimentálních dat získaných v diplomové práci si přímo říká o aplikaci vícerozměrné statistické analýzy.

Ke stimulaci diskuse nad diplomovou prací v rámci její obhajoby bych rád vznesl několik dotazů:

- Jaké vysvětlení má diplomantka pro různé hodnoty mimokolonových příspěvků a zpoždění gradientu s průtokem mobilní fáze? Jedná se o veličiny charakterizující daný chromatografický systém, které by měly být nezávislé na objemovém průtoku mobilní fáze.
- Jak si lze vysvětlit výrazně vyšší obsah kyseliny galové při analýze na koloně Ascentis Express ES-CN a Raptor Biphenyl a na obr. P84 a P85? Jednalo se o stejný vzorek čaje?
- Jaký smysl má porovnání kolon pomocí selektivního koeficientu (tabulky P63 a P64), když pro dvourozměrnou separaci byly kolony aplikovány v kombinaci s monolitickou kolonou BIGDMA?
- Čím si vysvětlujete změnu retenčního času/pořadí eluce v druhé dimenzi na obr. P88 a P89 u některých látek (např. 20/26; 2/5; 25/15)?

Závěrem konstatuji, že výše uvedené připomínky převážně drobného charakteru jsou vyváženy rozsahem předkládané diplomové práce a množstvím provedených experimentů. Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou

**výborně-m**

V Pardubicích dne 1. června 2014

  
Ing. Petr Česla, Ph.D.