

## Oponentský posudek disertační práce

**Ing. Magdy Staňkové**

### *Monolitické kapilární kolony pro analytické separace*

Disertační práce Ing. Magdy Staňkové představuje obsažnou systematickou studii vlivu struktury a proporcí výchozích monomerů, polymerační teploty a polymeračního času na chromatografické charakteristiky polymethakrylátových monolitických kolon. O rozsahu práce svědčí zahrnutí celkem 9 síťujících monomerů různých strukturních typů, doplněných buďto laurylmethakrylátem jako funkčním monomerem pro chromatografii s reverzními fázemi nebo strukturou se sulfobetainovým zwitteriontem jako funkčním monomerem pro chromatografii hydrofilních interakcí. Ocenil jsem rovněž využití chromatografie sterické vyluky při charakterizaci distribuce velikosti pórů ve všech připravených kolonách. Studie chromatografických vlastností jsou vhodně doplněny popisem řady aplikací připravených kolon, soustředěných především na separace nízkomolekulárních látek s významem pro lidské zdraví.

Předložená disertační práce byla zpracována v celkovém rozsahu 193 stran, z čehož 118 stran připadá na vlastní text práce, 5 stran na bibliografii autorky a 70 stran na 6 příložených publikací. Členění textu práce je účelné a důsledně vychází z povahy podávaných informací. V kapitole 1 autorka podává přehled literatury k tématu separací malých molekul pomocí monolitických stacionárních fází; z této části je dobře patrné silné zázemí pracoviště v oblasti dvourozměrných separací a vysoce zesítených stacionárních fází. Kapitola 2 podává přehled použitého přístrojového a materiálového vybavení a postupů přípravy a charakterizace monolitických kolon. V kapitole 3 autorka diskutuje vliv síťujícího monomeru na účinnost kolon vhodných pro systémy s reverzními fázemi a kapitola 4 podává obdobný přehled u kolon vhodných pro chromatografii hydrofilních interakcí. Po relativně stručné kapitole 5 o vazbě mezi délkou kolony a účinností kolon pro chromatografii hydrofilních interakcí následuje poměrně obsáhlá kapitola 6 s popisem 10 okruhů aplikací připravených kolon.

Po formální stránce je práce zpracována pečlivě, i když na řadě míst se vyskytují drobné nepřesnosti a překlepy, z nichž patrně nejpůsobnější je „nejhodnější kolona“ místo „nejvhodnější kolona“ (3. řádek na str. 19).

Dále uvádím několik poznámek k disertační práci a z nich plynoucích otázek k autorce:

V části 2.1 o použitých materiálech a chemikáliích autorka neuvádí vnitřní průměr křemenných kapilár použitých k přípravě kolon. Z údajů v tabulkách č. 1 a 3 lze odvodit, že vnitřní průměr kolon byl 0.320 mm, což se potvrzuje až v dalších částech textu. Z popisu v části 2.1 rovněž není zcela jasné, zda byl na vstupu kolony použit dělič toku (splitter), a pokud ano, s jakým dělicím poměrem?

Na obr. 3 (str. 38) je místo vanilinu zřejmě nedopatřením kyselina vanilová (struktura č. 33 – molekula vanilinu obsahuje aldehydickou, nikoli karboxylovou skupinu).

Hodnoty permeabilit kolon s laurylmethakrylátem jako funkčním monomerem se pohybují v relativně úzkém rozpětí ( $1.2 \times 10^{-14}$ – $1.8 \times 10^{-14}$  m<sup>2</sup>, Tab. 1, str. 46), zatímco relativní rozpětí

permeabilit u kolon s funkčním monomerem MEDSA pro HILIC je mnohem širší ( $0.7 \times 10^{-14}$ – $5.6 \times 10^{-14}$  m<sup>2</sup>, Tab. 3, str. 56). Má autorka pro tento rozdíl nějaké vysvětlení?

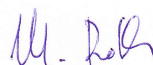
V diskusi účinnosti připravených kolon (odst. 3.2 a 4.2) autorka implicitně předpokládá, že veškeré rozdíly v naměřených hodnotách výšky teoretického patra (HETP) mezi jednotlivými kolonami jdou na vrub vlivu variací struktury síťujícího monomeru, tj. že vliv mimokolonového rozptylu na výsledné hodnoty HETP je zanedbatelný. Z popisu v odstavcích 3.2 a 4.2 není jasné, zda už i na tam uvedené výsledky byla uplatněna korekce experimentálních hodnot HETP odečtením mimokolonového příspěvku, jak autorka následně popisuje v kapitole 5 (?).

Využila autorka při kompilaci seznamu literatury některého z programů pro správu a organizaci odkazů, např. EndNote? K této otázce mne vede fakt, že v citacích č. 32, 120 a 121 jsou nesprávně uvedena jména některých autorů.

Výše uvedené připomínky jsou však vesměs technického rázu a nesnižují věcnou hodnotu předložené práce, která představuje velmi užitečný souhrn značného objemu experimentů v oblasti přípravy polymethakrylátových monolitických kolon, detailního studia jejich chromatografických vlastností a testování řady aplikací s důrazem na analyty významné pro lidské zdraví. Zejména kolony s dioxyethylendimethakrylátem a bisfenol A glycerolát dimethakrylátem jako síťujícími monomery a se sulfobetainovým funkčním monomerem se v aplikacích ukázaly jako velmi široce použitelné.

Závěrem konstatuji, že předložená disertace podle mého názoru prokazuje autorčinu způsobilost k samostatné tvůrčí činnosti. Doporučuji proto, aby disertační práce Ing. Magdy Staňkové byla přijata k obhajobě.

V Brně dne 27. července 2015



doc. RNDr. Michal Roth, CSc.  
Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.  
Veveří 97  
602 00 Brno



## Oponentský posudek na disertační práci Ing. Magdy Staňkové

Název práce: Monolitické kapilární kolony pro analytické separace

Cílem disertační práce Ing. Magdy Staňkové bylo připravit vhodné monolitické kolony s duálním separačním mechanismem pro separace v reverzních a HILIC systémech kapalinové chromatografie. Podrobně byl studován vliv použitého síťujícího monomeru a dalších složek polymerní směsi na distribuci pórů a separační účinnost. K prozkoumání vlastností monolitických kolon v reverzním resp. HILIC separačním systému byly použity sady sloučenin různých struktur a vlastností, proměřeny závislosti  $\log k$  na obsahu vodné složky mobilní fáze a určeno při jakém složení mobilní fáze přechází systém z HILIC módu do RP a naopak a určeny rozsahy složení mobilní fáze, kde se uplatňuje RP a kde HILIC mechanismus. Byla sledována též opakovatelnost přípravy monolitů, která byla opravdu vynikající. Aplikace ukázaly, že na připravených monolitických kolonách lze dosáhnout, díky vysoké separační účinnosti, rychlé separace řady nízkomolekulárních látek. Pro separaci nízkomolekulárních látek a biopolymerů je třeba použít jiné monolity. Byly formulovány určité zevšeobecňující závěry vyjadřující souvislosti mezi strukturou monolitů, monomeru, a separačními vlastnostmi.

Paní inženýrka měla možnost pracovat na významném pracovišti s dlouholetou tradicí, kde jsou však nadále uplatňovány nové, aktuální přístupy. Není tedy překvapující, že výsledky prezentované v předkládané práci představují přínos pro řešení dané problematiky.

Práce Ing. Staňkové měla široký záběr. Zahrnovala jak přípravu monolitických kolon různých vlastností, tak jejich charakterizaci a následně i aplikaci. Ing. Staňková je spoluautorkou šesti publikací.

Poznámky, dotazy, náměty do diskuze:

Nejedná se o slohovou práci, nicméně některé části bylo možné vyjádřit lépe.

Na str. 10 se vloudila dvakrát stejná věta.

V práci jsou nedůsledně kontrolované názvy sloučenin - mnoho chyb a překlepů, nejednotné názvosloví.

V tabulkách 5 a 6 chybí uvedení složení směsi a – f.

Bylo pH opravdu měřeno jen s přesností na jednotky?

Často se v práci opakuje pojem „95% pufrovaný acetonitril“, např. str. 83, (a jemu podobné pojmy). Co to znamená, jak se určuje pH takového pufru? Podobně zvláštní je tvrzení „80% acetonitril s obsahem 10 mM vodně-organického octanu amonného“.

Je správné říkat reverzní kolona, HILIC kolona? Nejedná se spíše o reverzní či HILIC separační systém?

Dvourozměrné systémy spíše než „zvyšují maximální účinnost separace“, zvyšují selektivitu (str. 32). Čím si vysvětlujete rychlou ztrátu účinnosti monolitické kolony DiEDMA, 530  $\mu\text{m}$  (str. 80)?

Na str. 73 a 74 je opačné tvrzení než jaké lze vyčíst z obr. 18 a 19. Nejvíce zadržovanou látkou je kyselina galová,.....

Na str. 14 se hovoří o použití multivariační nelineární regrese pro hodnocení faktorů ovlivňujících tvorbu pórů u organických polymerů. Můžete tento přístup blíže vysvětlit?

Mohla byste prosím porovnat na základě zkušeností získaných při práci na disertaci monolitické kolony a kolony naplněné povrchově porézními částicemi stacionární fáze? Posoudit přednosti a nevýhody obou.

Proč se nedaří připravit účinné chirální monolitické kolony?

Uvedené připomínky nikterak nesnižují kvalitu předkládané práce, která je navíc podtržena šesti publikacemi v recenzovaných časopisech s dobrými impaktními faktory. Práce Ing. Magdy Staňkové splňuje požadavky kladené na disertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě a dalšímu řízení.

V Praze dne 10.7.2015



Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

e-mail: tesarove@natur.cuni.cz



červenec 27, 2015

## Oponentský posudek

Předložená disertační práce ing. Magdy Staňkové nazvaná „Monolitické kapilární kolony pro analytické separace“ se týká přípravy polymerních monolitických kolon s použitím skupiny methakrylátových síťovadel a jejich aplikacemi v separacích malých organických molekul. Již na tomto místě bych rád zdůraznil, že tato práce je velmi dobrá a bylo mi potěšením jí číst a hodnotit. Vzhledem k tomu, že valná většina výsledků byla již opublikována v časopisech vyznačujících se tvrdým recenzním řízením, nelze v celé práci nalézt žádné zásadní problémy, které by snižovaly její vysokou kvalitu.

Celá práce je rozdělena do šesti kapitol. První z nich shrnuje literární poznatky týkající se monolitických stacionárních fází připravovaných speciálně pro separace malých molekul. Tato problematika je svým způsobem současným „zlatým grálem“ monolitických kolon a reprezentuje velkou výzvu, protože většina přístupů vedoucích ke kolonám, jež by měly separovat malé molekuly, v podstatě zkrachovala. Kapitola sice ukazuje pozitivní vývoj v této oblasti, leč dosavadní výsledky zůstávají na hony vzdálené účinnostem typickým pro moderní kolony plněné např. sub 2 mikrometrovými silikovými částicemi. Tento fakt však také reprezentuje motivaci pro další výzkum, který je též přemětem této práce.

V této kapitole autorka na 17 stránkách popisuje typy monolitických stacionárních fází. Domnívám se, že reference k seminální práci Hjerténa (J. Chromatogr. 473, 273, 1989), jež zavedla monolity na bázi akrylamidu, měla být uvedena. V další části se pak probírají vlivy jednotlivých proměnných polymerizačních reakcí na porézní a separační vlastnosti. V části týkající se vlivu porogenních rozpouštědel se autorka mýlí v tom, že směs propanol-butandiol-voda je nejrozšířenějším typem porogenní směsi. Tato směs byla poprvé použita Petersem (Anal. Chem. 69, 3646, 1997), ale myslím, že není tou nejčastější. Tou je spíše směs hexanolu a dodekanolu či dekanolu převzatá z přípravy makroporézních částic (viz J. Chromatogr. A 1217, 902, 2010).

Sekce 1.3.4. obsahuje popis vlivu funkčního monomeru na účinnost. Postrádám v ní reference k pracím z Bonnovi skupiny jejichž monolity připravené z vinylkarbazolu a divinylbenzenu (Analyst 138, 5089, 2013 a Anal. Bioanal. Chem. 406, 5897, 2014) představují do jisté míry přelomové výsledky jakkoliv ještě musí být reprodukovány. Nutnost validace platí i pro data představovaná v ref. 86.



Tato kapitola rovněž shrnuje metody používané k charakterizaci monolitických kapilárních kolon což později umožňuje čtenáři snadněji pochopit výsledky presentované v dalších kapitolách. Jisté obecné výhrady lze mít ke stanovení průtočné porozity s použitím vysokomolekulárního polystyrenu v tetrahydrofuranu (THF). Ačkoliv je tato metoda běžně používána i v mé skupině, její problém je, že toto rozpouštědlo není běžně používáno v separacích popisovaných později. Proto je možné, že výsledek naměřený v THF může být odlišný od skutečnosti v typických rozpouštědlech jako acetonitril-voda.

Druhá kapitola shrnuje materiály, metody a přístrojové vybavení použité k výzkumu uvedenému v této disertaci. Zde zejména oceňuji zajímavý výběr síťovadel, který byl použit. Zahrnuje monomery jež se liší délkou spojovací jednotky což umožňuje pozorovat efekty často v literatuře opomíjené.

Kapitola 3 je pak první v níž jsou uvedeny výsledky vlastní experimentální práce. Výsledky byly publikovány v angličtině (Příloha II) a zdá se, že se autorka místy ztratila v překladu do češtiny. Např. síťující monomery se neliší „délkou (n) alkylového řetězce mezi dvěma methakrylátovými jednotkami“ jakmile se pozorně podíváme na vzorce v obr.1. Zde n je počet spojených ethylenových jednotek. Experimenty se neměří, jak je uvedeno, nýbrž provádějí, a alkylmethakrylátové monomery jsou ve skutečnosti alkylen dimethakrylátové.

Za daleko důležitější však považuji pozoruhodné změny celkové porozity při použití různých síťovadel. Jestliže procentuální zastoupení monomerů v polymerizační směsi obnáší vždy 35% váhových, očekávaná porozita by podle mne měla být v rozsahu kolem 0,65 (=65%). Jak je pak možné, že nalezená porozita je až 80%? To totiž znamená, že podíl polymeru v monolitu reprezentuje jenom 20% a otázka zní kam se podělo zbývajících 15%. Jediné vysvětlení jež mne napadá je, že polymerizace neproběhla do úplné konverze. Možná se však mýlím a autorka má mnohem plausibilnější vysvětlení.

V této souvislosti bych rovněž rád připomenul, že různá síťovadla neovlivňují výsledek polymerizace jenom rozdíly v chemické struktuře. Je třeba si uvědomit, že se síťovadla liší molární hmotností. To znamená, že molární koncentrace dvojných vazeb není stejná ve všech polymerizujících systémech i když váhový podíl síťovadla je konstatní. U směsí obsahujících síťovadla s vyšší molární hmotností je celkový obsah dvojných vazeb ve směsi nižší. To pak ovlivňuje kinetiku polymerizace i stupeň sesítnění polymeru.

Za významné pozitivum této části považuji studii opakovatelnosti přípravy monolitických kolon. Odpůrci monolitů často argumentují jejich malou reprodukovatelností kvůli jejich individuální přípravě. Přitom záměrně neberou v úvahu fakt, že i plněné kolony se vyrábějí každá zvlášť. Autorka však zde jasně dokazuje, že toto osočování je bezpředmětné a monolitické kolony lze připravovat reprodukovatelně. Podobný výsledek byl publikován v minulosti (J. Chromatogr. A 1140, 140, 2007) a tato práce ho v plném rozsahu potvrzuje s použitím nových polymerizačních směsí.

Další kapitola se věnuje vlivu síťujícího monomeru na účinnost v HILIC modu. Tato část je významná zejména tím, že podobný výzkum nebyl dosud prováděn. Získané výsledky jsou zajímavé i tím, že demonstrují možnost přípravy dostatečně účinných monolitických kolon pro separace v HILIC modu. Doporučuji však nepoužívat „zvětšení“ k charakterizaci SEM fotografií

---

Frantisek Svec  
The Molecular Foundry  
E.O. Lawrence Berkeley National Laboratory  
1 Cyclotron Rd.  
Berkeley, CA 94720-8139, USA

Phone: (510) 418 5174  
Fax (510) 486 7413  
Email: fsvec@lbl.gov  
<http://svec.lbl.gov/>



průřezu kolon. Každá změna velikosti obrázku totiž vede ke změně nominálního zvětšení. Aby se tomuto zamezilo, jsou v obrázcích zahrnuty úsečky s označením jejich skutečné délky. Jejich velikost se pak mění úměrně změnám ve velikosti obrázku a lze z nich snadno vidět velikost ukázaných struktur.

Kapitola pátá je pak do jisté míry pokračováním kapitoly předchozí a popisuje vliv délky kolony na účinnost HILIC separací. Důležité je, že autorka vtipně použila tento přístup k posouzení příspěvku mimokolonových objemů na rozmývání píků, a tedy na účinnost celého separačního systému. Tyto objemy representují vážný problém soudobých chromatografických přístrojů bránící snahám o zmenšování velikosti kolon.

Poslední kapitola pak shrnuje výsledky separací různých typů molekul s použitím monolitických kolon. Začíná perfektní demonstrací velmi rychlých isokratických separací alkybenzenů v reverzně-fázovém modu a směsi polárních látek v HILIC modu. Ani separace bílkovin nezůstaly opomenuty a demonstrují použitelnost některých kolon pro velmi kvalitní a rychlé separace. Za vysvětlení snad stojí krátká doba po níž se objevuje negativní pík rozpouštědla v panelu c) jež je významně kratší než ty pozorované v ostatních případech .

Jak již bylo zmíněno, můj celkový dojem z předložené disertační práce je velmi pozitivní. Autorka dokumentovala její schopnost provádět výzkum na vysoké úrovni a publikovat jeho výsledky. Proto vřele doporučuji přijmout tuto práci k obhajobě.

Profesor František Švec Dr.Sc.

---

Frantisek Svec  
The Molecular Foundry  
E.O. Lawrence Berkeley National Laboratory  
1 Cyclotron Rd.  
Berkeley, CA 94720-8139, USA

Phone: (510) 418 5174  
Fax (510) 486 7413  
Email: fsvec@lbl.gov  
<http://svec.lbl.gov/>