

Oponentský posudek disertační práce

Ing. Petra Janáse

Analýza polárních látek technikami HPLC v HILIC a RP módech

Disertační práce Ing. Petra Janáse se zabývá studiem retenčních mechanismů a optimalizací separačních podmínek vybraných okruhů aplikačně významných látek (fenolické kyseliny, flavonoidy, nukleové báze a nukleosidy) v kapalinové chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC) a v systému reverzních fází (RP). Byly charakterizovány čtyři komerční silikagelové kolony s navázanými diolovými a amidovými skupinami a dále čtyři silikagelové kolony s navázanými substituenty terminovanými fenylovou skupinou, které byly syntetizovány ve spolupracující laboratoři v Toruni. Nejvýznamnější okruhy problémů zahrnovaly studium vlivu variace složení vodně-organické mobilní fáze na retenci fenolických kyselin a flavonoidů s cílem lokalizovat přechod mezi HILIC a RP mechanismy, aplikaci LSER modelu pro fenolické kyseliny a flavonoidy, stanovení adsorpčních isoterem vody a studium a modelování gradientové eluce nukleosidů a nukleových bází.

Disertační práce je klasicky členěna a byla zpracována v rozsahu 82 stran, doplněných separáty čtyř souvisejících původních prací.

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

Otázka k sekci 2.3.5 *Iontové kapaliny navázané na silikagelu* (str. 6): I když práce s kolonami s iontovými kapalinami nebyla předmětem disertace, nesetkal se autor při rešerši s nějakou studií vlivu výměny mezi aniontem iontové kapaliny a anionty z mobilní fáze na retenci analytů a stabilitu kolony?

Poznámka k sekci 5.1 *Vliv složení mobilní fáze na retenci nízkomolekulárních látek*: V textu (str. 35, ř. 9) je zmínka o tom, že retence aromatických kyselin a flavonoidních látek byly měřeny téměř v plném rozsahu složení mobilní fáze (2–98% obsahu vodního pufu). V grafech na obr. 10 jsou však experimentální body soustředěny do okrajových oblastí složení mobilní fáze (v oblasti HILIC $\phi_{H_2O} < 0.1$, příp. 0.2 a v oblasti RP $\phi_{H_2O} > 0.7$, příp. 0.9). Výchozí experimentální složení mobilní fáze pro proložení pomocí rov. 6 je tedy poměrně hodně vzdáleno předpokládané pozici minimální retence (40–60% vodné složky), což podle oponentova názoru vnáší do vypočtené hodnoty ϕ_{min} určitou nejistotu. Má zde autor nějaký komentář? Na druhé straně je samozřejmě nutno respektovat, že v okolí ϕ_{min} jsou retence velmi nízké a přesné experimentální určení retenčního faktoru je tedy velmi obtížné, jak autor zmiňuje na str. 38.

Poznámka k téže sekci: V textu (str. 36, ř. 8) je zmíněna koeluce deoxyguanosinu a cytosinu na koloně YMC-Triart Diol HILIC. Obrázek 12 společně s vysvětlením zkratk v obr. 8 ale naznačuje, že ve skutečnosti jde spíše o koeluci deoxyguanosinu a cytidinu (?).

Otázka k téže sekci: Co přesně autor rozumí pojmem „oxy skupina“? V textu (str. 42, ř. 7–10) je uvedeno, že rutin a naringin oxy skupinu mají, zatímco eskulin a eskuletin nikoli; má autor na mysli kyslíkový atom mezi dvěma monosacharidovými skelety?

Poznámka k téže sekci: Na posledních dvou řádcích str. 43 autor zmiňuje, že na amidové a aminové koloně může být parametr d (rov. 12) zanedbán, protože závislost $\log k$ na φ_{ACN} je lineární. V Tab. 6 jsou ale pro většinu flavonoidů i na těchto dvou kolonách uvedeny nenulové (a zanedbatelné) hodnoty parametru d (?).

Poznámka k sekci 5.3 *Gradientová eluce nukleosidů a nukleových bází a predikce gradientových retenčních objemů*: První věta této sekce (str. 48) zní: Gradientovou elucí se výrazně snížila doba a účinnost analýzy nukleosidů a nukleových bází. Předpokládám, že účinnost analýzy by se použitím gradientové eluce měla spíše zvýšit (?).

Otázka k Tabulkám 3–6 (str. 70–75): Proč jsou v Tab. 3 a 4 uvedeny hodnoty regresního rabatu D^2 , zatímco v Tab. 5 a 6 jsou hodnoty koeficientu determinace R^2 ?

Po formální stránce je disertace zpracována pečlivě, i když na řadě míst se vyskytují drobné nepřesnosti a významové nejasnosti.

Všechny výše uvedené připomínky jsou však vesměs technické povahy a nesnižují věcnou hodnotu předložené práce, která přináší množství informací o mechanismech retence důležitých skupin analytů na řadě komerčních i laboratorně připravených chromatografických kolon. O kvalitě disertační práce svědčí i to, že část jejího obsahu již byla publikována v předních mezinárodních oborových časopisech.

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

V Brně dne 28. dubna 2017



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

Oponentský posudok
na doktorandskú dizertačnú prácu zo študijného odboru Analytická chemie,
študijného programu P1419

Názov práce: **Analýza polárnych látok technikami HPLC v HILIC a RP módech**

Autor práce: **Ing. Petr Janás**

Školiace pracovisko: **Katedra analytické chemie,**
Fakulta chemicko-technologická,
Univerzita Pardubice

Školiteľ: **prof. Ing. Pavel Jandera, DrSc.**

Oponent: **prof. RNDr. Milan Hutta, CSc.**
Katedra analytickej chémie , Prírodovedecká
fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Aktuálnosť zvolenej témy:

Predložená dizertačná práca spísaná v českom jazyku dostatočne podrobne a cielene sumarizuje teoretické poznatky, skúsenosti a praktické výsledky doktoranda z veľmi aktuálnej oblasti štúdia retenčného mechanizmu v systémoch HILIC v HPLC so zameraním sa na rôzne a rôznorodé moderné stacionárne fázy, fenylové stacionárne fázy v RP móde, duálny retenčný mechanizmus HILIC/RP vrátane gradientovej elúcie. Autoreferát dizertačnej práce spísaný v jazyku anglickom plne koreluje s dizertačnou prácou a je reprezentatívnym výberom poznatkov, výsledkov a záverov dizertanta.

Zvolené metódy spracovania dizertačnej práce:

Metódy vedeckej práce zodpovedajú súčasným štandardom a využívajú veľmi dobré technické, poznatkové a metodické možnosti pracoviska. Metodológia práce bola systematická, aktuálna a náročná, pretože zahŕňala viacero aspektov práce s novými typmi materiálov.

Dizertant **Ing. Petr Janás** vhodne kombinuje teoretické a metodologické štúdium súčasného stavu vo zvolenej oblasti

Modelové látky–analyty boli vyberané so skupín aromatických karboxylových kyselín (12), derivátov kyseliny benzoovej (7), flavonoidov (17), nukleových báz a nukleozidov (8). Spolu to bolo 44 látok, ktorých retenčné správanie sa bolo skúmané na 4 komerčných HILIC sorbentoch a 4 fenylových RP sorbentoch (pripravených na Katedre environmentálnej chémie a bioanalytiky Univerzity Mikuláša Kopernika, Toruň, Poľsko) v kyslých vodno-acetonitrilových mobilných fázach.

Po formálnej stránke je predložená práca spracovaná veľmi starostlivo a prehľadne v klasickom členení. V časti Cieľ práce (str. 23) sú tieto definované jasne, realisticky z pohľadu splniteľnosti, logicky a premyslene. Diskusia vzťahu vlastných dosiahnutých výsledkov a výsledkov publikovaných inými autormi v oblasti HPLC - HILIC, RP a interpretácie poznatkov o separačných mechanizmoch je korektne založená na naštudovanej poznatkovej báze Ing. Petra Janáse a úplne zodpovedá úrovni súčasných poznatkov.

V závere doktorand skonštatoval, že na základe jeho výsledkov bola pre študovanú skupinu solútov v HILIC móde dosiahnutá najvyššia separačná selektivita na TSKgel Amide-80 a najvyššia účinnosť na kolóne LiChrospher 100Diol.

Positívne vnímam aj druhú časť práce zameranú na využitie fenylových sorbentov, kde sa dosiahli lepšie separačné vlastnosti pre flavonoidy, a tiež LSER modely, ktoré úspešne vysvetľujú povahu interakcií v študovaných systémoch.

Dizertant správne sumarizuje a interpretuje dosiahnuté výsledky, čo vypovedá o splnení všetkých definovaných cieľov dizertačnej práce.

Vybrané, hore uvedené problémy, sú aktuálne, zaujímavé a z pohľadu dosiahnutých parametrov a výsledkov aj prínosné. V práci je štandardným spôsobom citovaných 149 pôvodných vedeckých prác majúcich priamy vzťah k problematike dizertačnej práce.

Autoreferát záverečnej práce predstavuje sprievodný text v anglickom jazyku k výsledkom publikovaným v prvoautorstve (2) a spoluautorstve (2) v 4 prácach v 4 impaktovaných vedeckých časopisoch, z toho 2 JCHA, 1 J. Sep. Sci, 1 Anal.Chim. Acta, čo je z môjho pohľadu plne a bez výhrad akceptované. Dizertant tiež prezentoval výsledky formou 11 posterov na vedeckých a odborných podujatiach doma a v zahraničí (3). Navyše jeho práce boli od roku 2013 citované bez autocitácií 19 krát.

Splnenie vytýčených cieľov:

Práca je spracovaná veľmi dobre a podrobne na 82 stranách textu sumarizujúceho teoretické poznatky a praktické experimentálne výsledky doktoranda. Ciele práce (str. 23 -25) sú definované dostatočne podrobne, logicky a zaujímavo. Dosiahnuté výsledky, ich diskusia a závery práce plne korešpondujú so súčasným stavom poznania v študovanej oblasti záujmu doktoranda a jeho pracoviska.

Ciele práce boli nepochybne a jednoznačne splnené v plnom rozsahu.

Výsledky práce s uvedením prínosu nových poznatkov a pre ďalší rozvoj vednej disciplíny:

Prezentované originálne výsledky práce predstavujú nepochybne teoretický a metodologický prínos v oblasti analytickej chémie a v zvlášť atraktívnej oblasti poznania a pochopenia separácií širokej skupiny rôznorodých polárnych látok a tiež vývoja, systematického štúdia a optimalizovania HILIC a RP separačných systémov v HPLC s cieľom ich následnej aplikácie.

Ing. Petr Janás nepochybne a úplne splnil požiadavky definované komisiou na začatie konania.

K dizertačnej práci mám nasledujúce otázky:

1. Str. 7, 8, 9, 41 a zvyšok práce- v súvislosti s pojmom „interakce“: Mohli by ste definovať rozdiely medzi pojmami reakcia, interakcia, väzba ? Aké je klasifikovanie väzieb a interakcií z pohľadu veľkosti ich potenciálovej väzbovej energie, smerovosti ich účinku, vplyvu zmien tlaku a teploty na ich veľkosť a ich zastúpenia v chromatografických systémoch?
2. Str.23: Vyslovene filozofickou otázkou je, či cieľom má a môže byť štúdium niečoho, alebo je to len prostriedok na dosiahnutie inak definovaného cieľa (spoznanie, pochopenie ...)? Aký je Váš názor?
3. Str. 32: Prečo ste sa rozhodli zamerať sa práve a len na kyslé mobilné fázy? Rád by som sa dozvedel trochu viac o tom aká bola logika tohto výberu ?
4. Str.38 ...“nízké hodnoty retenčných faktorů ($k=0,1$ a méně) nebyly kvůli velké pravděpodobnosti experimentální chyby ve výpočtech zahrnuty“. Bolo by možné pre štúdium v uvedených oblastiach experimentálnych

podmienok využiť tenkovrstvovú chromatografiu? Sú HILIC fázy dostupné aj v plošnom formáte?

5. Ako vnímate v češtine rozdiel medzi pojmami „množství, hmotnost, objem“? Pýtam sa kvôli tomu, že pre množstvo uvádzate aj jednotky hmotnosti aj objemu. Pritom pojem množstvo je napríklad v slovenčine viazané hlavne na počet, anglické „amount“ sa používa aj na vyjadrenie vzťahu ku koncentrácii (trace amount).
6. Str. 12 preklep „satcionární“ – stacionární, str 38 experimenttální,

Doktorand **Ing. Petr Janás** v predloženej dizertačnej práci prezentuje značný rozsah hodnotnej experimentálnej práce, svoje výsledky diskutuje adekvátnym spôsobom s konkrétnymi argumentmi, interpretuje ich v súlade so stavom poznania a zároveň ich veľmi vhodnou prehľadnou formou sprostredkováva vedeckej obci (doktorandská práca, odborné publikácie).

Uvedené otázky neznižujú hodnotu práce a sú skôr námetom do diskusie. Práca a jej autoreferát v plnej miere spĺňajú po stránke obsahovej aj formálnej kritériá kladené na dizertačnú prácu.

Z uvedených dôvodov odporúčam, aby predložená práca bola prijatá ako dizertačná práca a zároveň ju odporúčam k obhajobe. Odporúčam tiež, aby po úspešnej obhajobe bola **Ing. Petrovi Janásovi** udelená akademická hodnosť

„Philosophiae doctor“ - PhD

V Bratislave 12.05.2017



prof. RNDr. Milan Hutta, CSc.

Posudek oponenta na disertační práci **Ing. Petra Janáse** nazvanou „Analýza polárních látek technikami HPLC v HILIC a RP módech“

Předkládaná disertační práce zpracovává lákavé téma analýzy v systémech reversní kapalinové chromatografie (RPLC) a chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC).

Práce zahrnuje a komentuje výsledky uvedené ve čtyřech publikacích, kde je disertant spoluautor. Zmiňuje však i další práce vytvořené na pracovišti školitele Prof. Pavla Jandery, které zaujímá významné místo ve studiu této problematiky. Cílem práce bylo studium a podrobný popis interakcí uplatňujících se na diolových, amidových a fenylových stacionárních fázích při separaci vybraných nízkomolekulárních látek. Popis chování analytů a mechanismů separace v HILIC a RP systémech byl získáván různými přístupy. Roli sorbované vody na stacionárních fázích v HILIC bylo možné charakterizovat na základě výsledků získaných měření adsorpčních izoterem. Statistické přístupy (LSER s přidáním členem zohledňujícím iontové interakce, PCA) byly využity k porovnání podobností či rozdílů mezi studovanými stacionárními fázemi.

Bylo provedeno mnoho měření a bylo získáno velké množství experimentálních dat. Kvalitu velkého objemu práce snižuje častější nepřesné a neobratné vyjadřování a řada překlepu a chyb. Objevují se podivně počestěné názvy sloučenin, nejednotné zkratky, libovolně zaměňovaná velká a malá písmena (např. na začátku vět), nekompletní a občas chybné vysvětlení symbolů v rovnicích, desetinné tečky v tabulkách aj. Naopak bych vyzvedla pěkné vysvětlení, proč byla použita mobilní fáze určitého složení (str. 31).

Za zbytečné bych považovala opakování některých zcela jasných a obecně známých faktů – např. na str. 19, 1. odstavec kapitoly 2.4, příp. na str. 20, 1. odstavec kap. 2.5.

Práce má běžnou strukturu, zařazení jednotlivých částí textu do příslušných kapitol je však poněkud atypické nebo překvapivé. Např. Úvod je zpracován spíše jako obsažný Abstrakt, což však lze považovat za přínos pro čtenáře.

K práci mám několik dotazů/připomínek, které však nemají sloužit k negativní kritice, ale spíš jako návrhy do diskuze.

Ve výčtu stacionárních fází vhodných pro použití v HILIC systému nejsou zahrnuty cyklofruktany. Domníváte se, že nejsou vhodné pro tento chromatografický systém?

Soubor analytů s deskriptory byl pro RP a HILIC odlišný. Nebylo by pro srovnání správnější, aby byl stejný v obou případech? „Deskriptory byly dávány do souvislosti s retenčními faktory jednotlivých látek samostatně u kyselin a flavonoidů.“ (str. 49). Je tento přístup správný. Můžete tento přístup blíže objasnit?

Je počet analytů dostatečný pro LSER model? Je vhodné diskutovat separátně jednotlivé skupiny analytů? Není správnější rovnoměrně pokrýt všechny možné interakce, které se v separačním systému uplatňují, tedy zvolit skupinu analytů s rovnoměrně zastoupenými různými deskriptory?

Můžete upřesnit vysvětlení jednotlivých symbolů deskriptorů a regresních koeficientů (hlavně A/a, B/b a c)?

Hodnoty R^2 jsou především pro flavonoidy dost nízké. Můžete vysvětlit proč?

K opravě:

Str. 26 – kolona 150 x 2 m

Str. 39 – determinační koeficient se blíží 100?

Str. 44, obr. 16 chybí popis kolon na jednotlivých podobrázcích

Sjednotit různé způsoby zápisu: methanol x metanol; isokratické x izokratické; aj.

Závěrem lze konstatovat, že předkládaná disertační práce splňuje požadavky na práci kladené. Práci jsem podrobně prostudovala a mohu ji doporučit k obhajobě. Výše uvedené připomínky nepovažuji za zásadní. O kvalitě práce Ing. Petra Janáse dále vypovídají čtyři publikace v impaktovaných časopisech.

V Praze 5. 5. 2017



Eva Tesařová

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha