

## POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Katedra:</b>                 | Katedra analytické chemie  |
| <b>Autor:</b>                   | Bc. Hana Nadhajská   |
| <b>Název práce:</b>             | Retenční chování vybraných alkaloidů v systému s obrácenými fázemi |
| <b>Vedoucí diplomové práce:</b> | doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.  |
| <b>Oponent:</b>                 | Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.  |

Diplomová práce Bc. Hany Nadhajské je zaměřena na separaci alkaloidů pomocí kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi spojené se spektrofotometrickou detekcí. Studentka zjišťovala retenční chování vybraných alkaloidů na pěti kolonách s různou stacionární fází při izokratických podmínkách a testovala i gradientovou eluci.

V Teoretická částí práce jsou popsány základy kapalinové chromatografie, přehledně informace o testovaných alkaloidech, a rešerše pojednávající o stanovení alkaloidů kapalinovou chromatografií. V teoretické části je zbytečně velká pozornost věnována základům kapalinové chromatografie (10 stran), které jsou dohledatelné v jakémkoliv učebnici nebo internetových zdrojích, ale naopak chybí informace o použitých stacionárních fázích, jejich vlastnostech a rozdílech. Také chybí popis retenčního modelu, který diplomantka používala nebo rozsáhlejší informace o optimalizaci eluce v HPLC. Mimo to je literatura vedena naprosto chaoticky bez postupného číslování, např. po odkazu [2] následuje [8]; po [14] následuje [22]; po [17] je odkaz [23] a poté rovnou [26]; [25] je před [26]; po [35] je rovnou [46, 47]; a podobně.

Experimentální část je psána obvyklým způsobem. Jsou zde uvedeny přístroje, zařízení, chemikálie a postupy, podle kterých diplomantka pracovala. V Kapitole Výsledky a diskuze autorka na 14 stranách píše o dosažených výsledcích měření a je rozdělena na dvě podkapitoly: isokratickou a gradientovou eluci. Dost často chybí vysvětlení nebo komentáře, například podrobnější informace, jak byly vytvořeny okénkové diagramy, a čitelnost této části diplomové práce pokulhává.

V diplomové práci je minimum gramatických chyb, ale více typografických nebo věcných chyb. Např.: opravdu si nemyslím, že se RP-LC používá hlavně z důvodu bezpečnosti (hořlavosti rozpouštědel) (str. 25); na str. 26 se píše o členech rozlišení, ale co jsou v rovnici 2 jednotlivé

členy není uvedeno;  $k_{a1}$  a  $k_{a2}$  nebudou retenční faktory jen na začátku gradientu (Rovnice 3); vyplívá (str. 33); špatně označené obrázky (str. 34); některé věty nedávají smysl; nejednotnost psaní rozsahů, studentka dokázala v jednom odstavci použít hned tři různé formáty (str. 17); apod. Kvalita obrázků je na dobré úrovni, nicméně na osách grafů případně chromatogramů by měly být znázorněny značky, které umožní odečítání.

Dále uvádím k práci několik nejzávažnějších připomínek a dotazů:

1. Na jednu stranu jsou v práci uvedeny teoretické modely separací při isokratických podmínkách eluce bez porovnání s experimentem. Na druhou stranu optimalizace separace v gradientové eluci byla provedena pouze experimentálně bez teoretického modelu, což je mimochodem jeden z bodů v zadání diplomové práce. Nebylo možné provést několik separací pro ověření isokratického modelu, nebo vypočítat retenční data pro gradientovou eluci?
2. V práci se vyskytuje více mylných tvrzení, např.:
  - a. Jak mohly parametry  $a$  a  $m$  retenčního modelu sloužit k výpočtu rozlišení dle rovnice 2? (str. 49).
  - b. Účinnost vypočtená z mrtvého času 2,115 minut? (str. 50 a několikrát dále). Účinnost kolony ovlivňuje šířku píku, nikoliv mrtvý čas.
3. Kapitola 3.1.2: proč byla vybrána jako optimální koncentrace zrovna 5,7 % ACN? Co třeba koncentrace 3,5 % nebo 7,5 % ACN? Bylo rozlišení jediným kritériem optimalizace? Dále je v kapitole 3.1.6 uvedeno, že při koncentraci 5,7 % nejsou dvě dvojice látek separovány na základní linii. Toto tvrzení neodpovídá okénkovému diagramu, kdy rozlišení je cca 1,7 (již při 1,5 je překrytí pouze 0,15 %) a toto rozlišení je pro tři dvojice látek).
4. Kapitola 3.1.3: text nesouhlasí s Obrázkem 24. Autorka tvrdí, že „*Nejvyšší možné rozlišení všech látek by bylo dosaženo při 21,9 % ACN, ovšem hodnota rozlišení kritického páru látek (4-5) a (8-9) by činila 0,257.*“ Pominu skutečnost, že rozlišení tedy není u všech látek, tak z Obrázku je patrné že nejvyšší rozlišení mimo párů (4-5) a (8-9) je při koncentraci cca 25 % ACN a i rozlišení (4-5) a (8-9) bude někde okolo 0,2.
5. Kapitola 3.2 (str. 61): jak studentka zjistila, že mísení mobilní fáze bylo nedokonalé? Při pokusech s isokratickou elucí nedokonalé mísení nevadilo?

6. Kapitola 3.2: v práci je uvedeno, že „směsné roztoky byly podrobeny různým strmostem gradientu, přičemž strmost byla postupně snižována“. Strmosti gradientů nejsou nikde uvedeny, pouze rozsahy koncentrace acetonitrilu a doba analýzy (předpokládám, že se ve skutečnosti jedná o čas gradientu). Jaké jsou strmosti gradientů? Proč byla zvolena počáteční koncentrace 5 % ACN a čas 30 min, který se u jedné kolony změnil na 15 minut a u druhé nikoliv?
7. Kapitola 4: gradient neposkytl separaci v kratším časovém úseku, jak je tvrzeno (Obrázky 27 a 32; 30 a 33). Jak byla zjištěna vyšší intenzita píků u gradientové eluci? Chromatogram za isokratických podmínek je pouze simulace a chromatogram za gradientových podmínek je experimentálně změřen.

Závěrem mohu konstatovat, že z větší části bylo zadání diplomové práce splněno. Doporučuji tuto diplomovou práci k obhajobě a hodnotím ji známkou

C

V Pardubicích 23. 5. 2023

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.