

## **ANALÝZA SILIC V ROSTLINNÝCH VZORCÍCH S VYUŽITÍM SORPČNÍ EXTRAKCE NA MÍCHADĚLKU**

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo optimalizovat podmínky techniky SBSE (sorpční extrakce na míchadle, Stir-Bar Sorptive Extraction) pro extrakci složek silic u vybraných vzorků rostlinného původu. Diplomantka se zaměřila na sirné složky silic, které byly následně separovány pomocí plynové chromatografie (GC) a detekovány pomocí hmotnostního spektrometru (MS) a detektoru elektronového záchytu (ECD). Diplomová práce je po experimentální i obsahové stránce přiměřeně rozsáhlá.

V teoretické části diplomantka zpracovala rešerši týkající se rostlinných silic, a to extrakce silic z rostlinných vzorků, vlastností sirných složek silic, jejich vzniku v rostlinách rodu česnek (*Allium*) a také jejich účinků na mikroorganismy. Hlavní pozornost byla věnována různým typům mikroextrakčních technik. Dále se diplomantka v teoretické části práce zabývala analýzou extraktů pomocí GC ve spojení s různými typy detekce sirných složek. Byl také zmíněn princip statistického plánování experimentu. Rešerše je přehledná a srozumitelná s dostatečným výčtem citací odborné literatury.

V praktické části diplomantka prezentuje výsledky analýz pěti rostlinných vzorků pomocí SBSE a GC s detekcí sirných složek silic pomocí ECD a MS. Za tímto účelem byla provedena optimalizace SBSE. Nejprve byly pomocí vyhodnocení Plackett-Burmanova návrhu experimentu stanoveny statisticky významné parametry extrakce, které byly dále optimalizovány pomocí centrálně kompozitního plánování. Závislou proměnnou, podle které bylo statistické vyhodnocení experimentu provedeno, byla suma všech píků v chromatogramu. Celý experiment byl statisticky vyhodnocen, byly zvoleny optimální podmínky pro SBSE a ty byly aplikovány při extrakci silic z reálných vzorků. Během optimalizace parametrů SBSE byly extrakty analyzovány pomocí GC-ECD. Analýzy extraktů rostlinných vzorků byly realizovány pomocí GC-ECD i GC-MS, přičemž identifikace jednotlivých sirných sloučenin byla provedena s využitím retenčních indexů.

### **K práci mám následující připomínky, náměty pro diskuzi a dotazy:**

- Str. 13, kapitola 1.1.1, 1. odstavec: nesedí odkaz na literaturu, diplomantka píše o SDME a odkaz je na publikaci pojednávající o SPME [3].
- Str. 13, kapitola 1.1.1, 3. odstavec: „Nejvhodnější metodou pro detekci a stanovení silic a jejich složek je plynová chromatografie“ – GC je metoda separační, ne detekční.
- Str. 20, Obr. 2: zde jsou texty ponechány v angličtině. Dle mého názoru, když už je snaha převádět názvy jako Stir-bar extraction celé do češtiny, tak by i jednoduché anglické texty měly být přeloženy do češtiny.
- Význam použitých zkratk by měl být uveden při prvním výskytu zkratky v textu (konkrétně např. HPLC).
- Str. 30, 1. odstavec: „Sloučeniny jsou identifikovány vyhodnocením tzv. retenčních časů“ – tady by mělo být napsáno, jakým způsobem jsou identifikovány, tzn. např. porovnáním retenčních časů se

standardy, vypočtením retenčního indexu a vyhodnocením MS spektra atd., to tvrzení jak je napsané není správně. Stejně tak předchozí věta, plynovou chromatografií lze látky ve směsi pouze separovat, rozhodně ne identifikovat, to je záležitost např. hmotnostního spektrometru.

- Str. 42, poslední odstavec: pojmenování „dietyleter“ není správné, má to být „diethylether“

- Str. 43, předposlední odstavec: proč bylo míchadlo přečištěno při 250°C 30 minut? Mělo to nějaký zvláštní důvod? Při takové teplotě dochází k rychlejší degradaci sorbentu. 30 minut je navíc dost dlouhá doba, analyzované těkavé sloučeniny jsou při tak vysoké teplotě desorbovány téměř okamžitě. Je to také možný důvod ztmavnutí sorbentu, jak je prezentováno na Obr. 24 (str. 60). Byl zkoušen carry-over efekt po desorpci rozpouštědlem bez přečištění míchadla při 250°C?

- Str. 45, kapitola 2.3.3: dle mého názoru je nemožné, aby se proudem dusíku odpařilo pouze rozpouštědlo a veškeré vyextrahované těkavé látky zůstaly jako odparek. Bylo otestováno, že se při odpařování rozpouštědla neztrácí také některé vyextrahované sloučeniny?

- Str. 51, Tab. 6: podle čeho byly voleny obě úrovně jednotlivých parametrů? Např. čas extrakce pro úroveň +1 (30 minut) se mi nezdá vhodně zvolený. Extrakce na SPME vlákna, které mají mnohem nižší množství sorbentu, trvají i několik desítek minut. Domnívám se, že tady měl být zvolen mnohem delší čas pro úroveň +1, pak by se možná tento parametr ukázal po statistickém vyhodnocení experimentu jako statisticky významný.

Taktéž se mi nezdá jako vhodné zařazení parametru „teplota extrakce“, a to z toho důvodu, že závislost vyextrahovaného množství analytů na teplotě není lineární (může být lineární pouze v omezeném rozsahu teplot) – zvolené teploty 30°C a 80°C mohly být náhodně zvoleny tak, že ve výsledku teplota extrakce neovlivňovala výsledek... Ale protože se jedná o headspace extrakci těkavých látek, tak je víc než pravděpodobné, že teplota extrakce bude výrazně ovlivňovat výsledek celého stanovení.

Jak byla realizována desorpce při teplotě 10°C? Domnívám se, že tento parametr je v návrhu experimentu také zbytečný, u analyzovaných látek se přece nepředpokládá zlepšení desorpce snížením teploty, maximálně zvýšením (což ale vzhledem k povaze stanovovaných látek výsledek spíš zhorší).

- Str. 53, Obr. 20: v souvislosti s vyhodnocením Plackett-Burmanova návrhu mám dotaz: během experimentu se pro jednotlivé extrakce měnila navážka vzorku. Vyhodnocení bylo nakonec provedeno podle sumy ploch všech píků v chromatogramech. Byly tyto sumy vztaženy (přepočteny) na jednotnou navážku (např. 1g)?

- Str. 54: „Vzorek byl před navážením rozdrcen pro lepší uvolnění složek silic“. Proč, když parametr „drcení“ byl vyhodnocen jako nejméně statisticky významný ze všech testovaných parametrů?

- Str. 54: Proč byla zvolena teplota extrakce 70°C? Podle Obr. 21 vychází optimum kolem 51°C. Stejně tak str. 60, kapitola 3.8.

- Str. 59, kapitola 3.5, 2. odstavec: Byla něčím omezena velikost (objem) extrakční nádoby? Nemohla být použita větší nádoba a tím i větší navážka vzorku?

- Str. 60, 3. odstavec: „Ze sady Twister-Kit bylo vybráno míchadélko s nejmenšími rozměry, které bylo shledáno jako dostatečně účinné“. Podle čeho bylo shledáno jako dostatečně účinné?
- Str. 61, 1. odstavec: Proč byla zvolena 20 ml nádobka pro desorpci extraktu do 1,5 ml rozpouštědla? Dle mého názoru je to zbytečně velká nádobka, navíc se domnívám, že nádobka neměla kónické dno a následné rozpouštění odparku ve 20  $\mu$ l hexanu je ve 20 ml nádobce s rovným dnem diskutabilní.
- Str. 61, Tab. 9: analyzována byla homologická řada alkanů C8-C20 (viz seznam chemikálií, str. 42), ale v tabulce chybí retenční čas alkanu C8. Je pro to nějaký důvod? Stejně je to i v dalších tabulkách s retenčními časy homologické řady alkanů.
- Str. 62, Tab. 11: byl přepočet retenčních časů alkanů zpětně ověřen výpočtem retenčních indexů jednotlivých standardů uvedených v Tab. 10 pro FID i ECD a porovnáním mezi sebou? Tady se domnívám, že rozdíly mezi retenčními indexy pro jednotlivé GC systémy mohou být poměrně velké.
- Str. 62, Tab. 12: tabulka obsahuje sloupečky nazvané „počet identifikovaných látek“. Podle čeho byly tyto látky identifikovány? Celkovou plochu píků není nutné uvádět na setiny.
- Str. 65, poslední odstavec: proč se při GC-MS analýze zaznamenával chromatogram až od 15. minuty? Alkan C9 (retenční index 900) má retenční čas 9,72 min, *n*-hexan (retenční index 600) musel být tou dobou plně eluován. Dle mého názoru se data mohly zaznamenávat od 7. minuty bez obav z přepálení filamentu a následně mohl být i počet identifikovaných sloučenin vyšší. Mimoto, retenční čas *n*-hexanu mohl být jednoduše zjištěn chromatografickou analýzou samotného rozpouštědla za stejných podmínek jako vzorek a podle výsledku analýzy mohl být nastaven start záznamu dat.
- Přílohy II, seznamy identifikovaných sloučenin: podle čeho byly sloučeniny v jednotlivých vzorcích identifikovány? Pouze podle retenčních indexů nelze. Je nutné mít identifikaci podpořenou např. GC-MS analýzou, což ale vzhledem k počtu identifikovaných látek (Tab. 14, str. 65) zcela určitě nebylo. Nelze tedy určit, že daný pík podle retenčního indexu odpovídá dané látce. Stejný retenční index může mít jiná látka, dokonce s jiným heteroatomem (např. kyslíkem), takže se nemusí jednat ani o sírnou sloučeninu. Např. pík s retenčním indexem 1107 byl označen jako dipropyl disulfid, ale podobný retenční index mají 2-nonanol (1104), hex-(3Z)-enyl acetát (1106) nebo pelargonaldehyd (nonanal, 1105), všechno těkavé látky s heteroatomem, tedy aktivní pro ECD detektor.

Rozsah diplomové práce je přiměřený. Formální úroveň práce je velmi dobrá, ojediněle se vyskytují gramatické chyby a překlepy, chyby formátování se prakticky neobjevují. Po odborné stránce se vyskytují výše popsané nedostatky, hlavně z důvodu nezkušenosti diplomantky s danou tematikou. Předložená práce i přes uvedené nedostatky splňuje požadavky kladené na diplomové práce.

Navržený stupeň hodnocení: **– velmi dobře-m –**

Závěrečné stanovisko: **doporučuji k obhajobě**

V Pardubicích dne 23. února 2016

  
Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

Oponent diplomové práce