

Petra Holdšvendová:
Využití monolitických kolon v kapilární kapalinové chromatografii

Disertační práce Petry Holdšvendové je věnována přípravě a využití methakrylátových monolitických kolon. Hlavním cílem bylo otestovat možnosti přípravy butylmethakrylátových kolon při iniciaci polymerace chemickou reakcí a srovnat je s kolonami, u nichž byla polymerace iniciována termicky. V dalších experimentech se pak uchazečka věnovala přípravě kolon pro specifické aplikace, jako je separace oligonukleotidů nebo derivátů cykvenu.

V úvodní části disertační práce je čtenář seznámen s historií a současným využitím monolitických kolon v chromatografických metodách, metodami jejich přípravy a některými aplikacemi. Literatura relevantní k dané problematice je řádně citována, cíle práce jsou přesně definovány. V experimentální části je dostatek údajů pro případné opakování experimentů, názvy použitých monomerů jsou doplněny strukturními vzorci. Drobnou chybou jsou však nesprávně uvedené vzorce 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu a (2-hydroxy)ethyl methakrylátu na str. 17-18. Výsledky jsou sepsány přehledně a jsou vhodně ilustrovány tabulkami a obrázky. Představují kvalitní vědeckou práci, která přispívá k poznání v oboru. Významným úspěchem jsou kolony na bázi HMMAA a MAPDS monolitů pro separace oligonukleotidů. Závěrečná kapitola pak nejen shrnuje dosažené výsledky, ale zároveň kriticky hodnotí přednosti a nedostatky kapilárních monolitických kolon v rámci současné HPLC.

K práci mám jen několik dotazů, poznámek a připomínek:

1. Butylmethakrylátové kolony měly většinou lepší separační vlastnosti při zapojení v opačném směru, než v jakém byly plněny. Jaké je pro toto pozorování vysvětlení? Souvisí to s morfologií stacionární fáze? Pokoušela se uchazečka charakterizovat morfologii vzniklých monolitů, např. elektronovou mikroskopií?
2. V práci uchazečka srovnává připravené monolitické kolony s “komerčními kolonami C18“ (str.37, 40), případně „běžnými komerčními kolonami“ (str.40). Myslí se tím monolitické, nebo náplňové kolony?
3. Bylo zjištěno, že kolony připravené polymerací iniciovanou chemickou reakcí mají velmi podobné vlastnosti jako kolony polymerované termicky. Výhodou byla nižší hodnota HETP, nevýhodou naopak horší reprodukovatelnost přípravy těchto kolon. Jako jeden z důvodů je

uvedena nestabilní teplota v laboratoři. Byly činěny pokusy zlepšit reprodukovatelnost přípravy kontrolou teploty, např. použitím běžného termostatu pro HPLC?

4. Pro separaci oligonukleotidů byly navrženy a připraveny kolony na bázi DEAEM, DMAEM a kopolymery BMA/DEAEM, avšak výsledky nebyly uspokojivé. Jak by se chovaly oligonukleotidy na osvědčených butylmethakrylátových kolonách popsanych v předchozí kapitole? Lze očekávat dělení analytů?

5. Optimalizace separace oligonukleotidů na kolonách HMMAA je dokumentována obrázky 11 a 12. Na obr.11 (Kolona3) je intenzita signálu 200 mV, tj., podstatně více než na ostatních obrázcích. Největší rozdíl je ve srovnání s obr.12 (Kolona3). Čím je dán tento rozdíl? Pokud bylo dávkováno různé množství vzorku, neovlivnilo se tím rozlišení? (Pozn.: Intenzity na osách "y" by bylo vhodné přepočítat na absorbanční jednotky.)

6. Prosím o vysvětlení pojmů "sférická selektivita" (str.29) a "zbořené píky" (str.58).

Po jazykové stránce odpovídá disertační práce standardům vědeckých publikací, ve výjimečných případech se však autorka neubráníla příliš subjektivnímu hodnocení výsledků – viz. str.56 - "...skvělá reprodukovatelnost ... jsou fantastické".

Popisky obrázků by je mohly přesněji vystihovat (obr.9 nese název "Základní struktura oligonukleotidu", ale spíše zobrazuje konkrétní molekulu d(ApCpGpT); obr. 11-13, 15-16, 18-22 jsou nazvány "Separace...", zobrazují však chromatogramy).

Závěrem bych rád upozornil na to, že problematika diskutovaná v této disertační práci je tématem dvou článků v renomovaných odborných časopisech, u nichž je uchazečka prvním autorem. Výsledky experimentů byly prezentovány na několika mezinárodních i domácích konferencích. Práce již tedy úspěšně prošla nezávislým oponentním řízením. Mohu konstatovat, že Petra Holdšvendová dostatečně prokázala připravenost k samostatné vědecké činnosti a disertační práci plně **doporučuji přijmout k obhajobě**.

V Praze dne 25.srpna 2009

.....
RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.