



V Brně, dne 10. září 2018

Oponentský posudek disertační práce Ing. Petry Šilarové

Ve své disertační práci „*Analyza antioxidantů v přírodních matricích s využitím spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií*“ se Ing. Šilarová věnuje stanovení různých typů antioxidantů v čaji, černém bezu, ječmenu a lilku. Práce je členěna obvyklým způsobem na teoretickou a výsledkovou část, kdy výsledková část je tvořena samostatnými kapitolami obsahujícími výsledky získané na jednotlivých matricích.

Hned na začátek budiž uvedeno, že se jedná o velmi kvalitní práci s dostatečným množstvím experimentálních dat a výsledků, což potvrzují dvě kapitoly, které byly publikovány v respektovaném impaktovaném mezinárodním časopise *Food Chemistry* (IF = 4.946). Musím ale také poznamenat, že jak článek publikovaný v časopise *Journal of Research Analytica*, tak i samotný časopis se mi nepodařilo dohledat.

Jak již bylo řečeno, úvodní teoretické kapitoly 1 - 3 se věnují popisu jednotlivých tříd antioxidantů, analytických metod určených k jejich stanovení a v neposlední řadě i využití spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. K této části mám následující poznámky:

- Strana 22: Vedle optimalizace metody krok za krokem lze využít také matematické plánování, které nejen, že umožňuje zkrátit proces celé optimalizace, ale také pomáhá objevit skryté vazby mezi jednotlivými proměnnými.
- Strana 23, Obrázek 3: Zde se jedná spíše o porovnání vnitřní struktury stacionárních fází, než částic.

Velmi oceňuji fakt, že všechny experimentální kapitoly práce obsahují podrobné statistické zpracování dat. Chemometrické postupy tvoří významnou část interpretace výsledků disertační práce a potvrzují jejich pochopení a správné využití doktorandkou. Kapitola 4 pak shrnuje teoretické základy jednotlivých metod použitých v disertační práci.

Pátá kapitola se věnuje studiu degradace katechinů v zeleném čaji, k čemuž využívá vícerozměrnou analýzu výsledků získaných pomocí HPLC/MS metody a spektrofotometrických technik. Tato kapitola patří mezi dvě publikované v časopise *Food Chemistry*. Bohužel, při zpracování článku do formy kapitoly disertační práce došlo k zestručnění některých údajů, které pak v samotné kapitole chybí. Příkladem budiž uvedení pouze výběru optimální HPLC kolony

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika
T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224
V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



bez uvedení na základě jakých kritérií. Stejně tak v textu chybí informace o využití Cattelova grafu (Obrázek 7A) k určení optimálního počtu hlavních komponent. Tato informace je uvedena až v závěru kapitoly (strana 48).

Jemným neduhem této kapitoly, kterému je ale obtížné se vyhnout, je popis vzorků přes jednotlivá kódová označení, i přesto, že jednotlivé znaky jsou v textu vysvětleny (číslo vzorku, S9W3, S8W0, apod.). I při pečlivém čtení je nutné se vracet k označení jednotlivých vzorků čajů. Navrhoval bych popis jednotlivých vzorků s využitím pomocných kritérií (např. čínské čaje, jednotlivé značky apod.).

Následují menší poznámky a dotazy:

- Mohla by doktorandka vysvětlit pojem epimerizace? (Strana 29)
- Popis jednotlivých hlavních komponent byl experimentálním podmínkám přiřazen na základě Obrázku 7 (Strana 37)?
- Na základě čeho byly vytvořeny shluky faktorové analýzy vyznačené v Obrázku 8 (Strana 38)?
- Sledovala doktorandka i zvýšenou koncentraci kyseliny gallové jako produktu degradace katechinů (Strana 48)?
- V závěru této kapitoly doktorandka uvádí, že přináší „užitečné informace pro běžného spotřebitele“. Ačkoli jsou tato data v dané kapitole zcela jistě prezentovaná, uvítal bych jejich shrnutí v závěru kapitoly. Který čaj je nejstabilnější z hlediska teploty zalévací vody, doby skladování, a kterému čaji je (z hlediska obsahu katechinů) lepší se vyhnout.

Kapitola 6 popisuje vliv úpravy vzorku (sušený vs. zmražený) na obsah antokyanů v bobulích černého bezu a jeho celkové antioxidační schopnosti. Výsledky získané pomocí HPLC metody byly porovnány s výsledky získanými spektrofotometricky.

- Jaké jsou jednotky obsahu sušiny v Tabulce 5 (Strana 50)?
- Molární absorpční koeficient v rovnici (1) na straně 52 byl získán spektrofotometricky z kalibrační závislosti jednotlivých standardů?
- Vliv úpravy vzorku byl testován pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), jak je uvedeno na straně 53. Nicméně v samotném textu kapitoly nejsou tyto výsledky uvedeny. Jedná se o korelační závislosti Obrázku 26 (Strana 61)?
- Mražený koncentrát (Tabulka 5, Vzorek 16, Georgia) odpovídá vzorku získanému od firmy Deva Nutricia (Strana 53)?
- Při optimalizaci HPLC metody (mimořadně mylně uvedené kapitoly 7.4.4.1 a 7.4.4.2) byl studován vliv koncentrace kyseliny mravenčí na kvalitu separace. Testovala doktorandka i jiné typy kyselin používaných jako aditiva (kyselina trifluoroctová, kyselina octová, apod.)? Ačkoli by pravděpodobně nedošlo k odstranění problémů spojených s nízkým pH mobilní fáze, jiné kyseliny by mohly poskytnout lepší separaci při stejné hladině pH a nižší koncentraci.
- Proč vícerozměrná analýza sušených vzorků černého bezu vykazuje větší rozptyl (Obrázek 27, Strana 62)?
- Pokud by doktorandka měla srovnat jednotlivé metody využitelné ke stanovení celkové antioxidační aktivity, případně celkovému obsahu antioxidantů, která z nich by poskytovala nejrychlejší, nepřesnější a nejlevnější výsledky? Je možné získat celkový

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 2, 602 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



přehled o kvalitě vzorku pouze při použití jedné metody nebo je nutná kombinace více (všech) metod?

Kapitola 7 je druhou kapitolou disertační práce publikovanou v mezinárodním impaktovaném časopise a věnuje se vlivu úpravy vzorku na obsah volných a vázaných látek v ječmeni s využitím HPLC/MS metody. Doktorandka použila vícekrokovou extrakci k získání fenolických látek ze vzorků čtyř odrůd ječmene. Výsledkem této části disertační práce je zjištění, že kyselá hydrolyza je nutným krokem úpravy vzorku vedoucím k získání vyššího množství látek ze vzorku než v případě jednoduché extrakce.

- Jaké kritérium bylo použito k optimalizaci gradientu? Jaké chromatografické rozlišení je dostačující při kvantitativní analýze provedené pomocí monitorování hmotnostního přechodu vybraného iontu (Obrázek 29, Strana 71)?

Závěrečná osmá kapitola se zaměřuje na testování vlivu tepelné úpravy a skladování lilku na obsah kyseliny chlorogenové. Byly porovnány hladiny kyseliny chlorogenové v čerstvém vzorku lilku, stejně tak jako v lilku pečeném, smaženém a grilovaném.

Zde si dovoluji malou poznámku týkající se absence konkrétních teplot použitých při jednotlivých typech tepelných úprav. Věřím, že tato informace (případně použití vyšší škály teplot při různých tepelných úpravách) by mohlo ještě více osvětlit tvorbu kyseliny chlorogenové. Ačkoli si jsem vědom toho, že při vlastní kuchyňské úpravě se může jednat o nepodstatnou informaci.

- Na Obrázku 30 (Strana 80) je sice dobře patrný rozdíl v chromatografickém záznamu jednotlivých vzorků, i tak si ale myslím, že například čtyři samostatné chromatogramy by tento rozdíl ukázaly přehledněji.
- Jak byla optimalizována gradientová eluce? Relativně strmý krok změny složení mobilní fáze (10 – 85 % acetonitrilu v jedné minutě) vedl pravděpodobně pouze k eluci kyseliny chlorogenové (Strana 79 a Obrázek 30).
- Z kterých látek dochází v lilku v průběhu skladování k tvorbě kyseliny chlorogenové (Obrázek 37, Strana 87)? Je možné tyto látky také analyzovat?

Jak již bylo uvedeno, disertační práce Ing. Šilarové obsahuje velké množství experimentálních výsledků, které jsou kvalitně zpracovány a prezentovány. K práci jako celku mám pouze jednu menší výhradu, kterou je absence závěru týkajícího se celé práce. Jednotlivé kapitoly jsou velmi dobře shrnuty, ale celkové vyznění celé práce je ponecháno jakoby ve vzduchoprázdnu. Velmi bych přivítal shrnutí obecných závěrů jednotlivých kapitol, z kterého by mohla těžit nejen odborná veřejnost.

I přes výše uvedené poznámky, které jsou spíše marginálního významu a mají sloužit k vyvolání diskuze, se jedná o velmi kvalitní práci, kterou **doporučuji k obhajobě**.



Doc. RNDr. Jiří Urban, Ph.D.

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 2, 602 00 Brno, Česká republika
T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224
V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



Oponentský posudek disertační práce Ing. Petry Šilarové na téma „Analýza antioxidantů v přírodních matricích s využitím spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií“

Předložená disertační práce Ing. Petry Šilarové na téma „Analýza antioxidantů v přírodních matricích s využitím spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií“ je zaměřená na studium látek s antioxidačními účinky pomocí různých analytických metod. Práce je obsáhlá, co se týče množství experimentů i počtu analyzovaných vzorků. Název disertační práce však zcela nekoresponduje s obsahem jednotlivých experimentů, protože kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií je pouze jednou z dílčích instrumentací. Hmotnostní spektrometrie není zmíněna v anotaci a není uvedena ani v klíčových slovech práce.

1. Struktura disertační práce

Práce není zcela přehledně členěná. Kapitoly 1 – 4 tvoří pravděpodobně obecnou část disertační práce. V kapitolách 3 – 8 jsou popisovány jednotlivé experimenty, které mají členění dílčích vědeckých prací. Chybí jednotný úvod a závěr, který by jasně propojoval všechny experimenty.

2. Teoretická část

Tuto část považuji za slabinu disertační práce. Kapitoly na sebe nenavazují a jejich obsah není vyvážený. V kapitole č.2 se autorka podrobně zabývá spektrofotometrickými metodami, které jsou určeny zejména pro stanovení celkového obsahu fenolických látek a pro jejich antioxidační kapacitu. Jsou zde shrnuty extrakční procesy využívané pro stanovení fenolických látek v bylinných matricích. Podkapitola 2.3. je věnována současným trendům v kapalinové chromatografii. Informace, v ní uvedené, jsou zajímavé, ale nejsou dány do souvislosti s analyzovanými typy matric a dávají pouze obecnou informaci. Kapitola č.3, která se zabývá LC/MS by si zasloužila mnohem obsáhlejší zpracování.

Chybí souhrnné představení následující experimentální části a definice hlavních cílů disertační práce.

3. Jednotlivé experimenty

Experimentální část má charakter 4 nezávislých vědeckých prací, ve kterých se autorka zabývá degradací katechinů v zeleném čaji (kapitola 5), změně obsahu antokyanů v plodech bezu černého v závislosti na způsobu jejich konzervace (kapitola 6), způsobem extrakce volných a vázaných fenolických látek z ječmene (kapitola 7) a vlivem tepelné úpravy lilku na obsah kyseliny chlorogenové. Dvě z těchto prací (kapitoly 5 a 7) byly publikovány v letech 2017 a 2018 v časopise *Food Chemistry* (autorka je uvedena jako první autor a třetí autor) a prošly náročným recenzním řízením. Proto není třeba detailně diskutovat odborné aspekty těchto prací.

Kapitola č.6 Analýza antokyanů v černém bezu

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv konzervace (sušení a mražení) plodů bezu černého na změnu obsahu antokyanů a celkové antioxidační kapacity. Zpracování tohoto tématu není optimální, poměrně nepřehledné je i členění samotné práce. Experimentální část obsahuje pouze vzorky a chemikálie. Příprava vzorků a statistická analýza zcela nelogicky spadá pod podkapitulu přístroje a zařízení.

Myslím, že by mohl být experiment mnohem komplexnější, kdyby byly v práci uvedeny informace o podmínkách sušení a mražení vzorků. Dále bych doporučila doplnit data o výsledky obsahu antokyanů v původních vzorcích plodu bezu černého. Bylo by potom možné posoudit vliv konzervace na změnu obsahu antokyanů v plodech bezu černého.

Kapitola č. 8. Vliv tepelné úpravy lilku na koncentraci kyseliny chlorogenové

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv různých domácích technik vaření na změnu obsahu kyseliny chlorogenové v lilku.

Lilek v nativní formě obsahuje vysoký podíl vody. Domnívám se, že naměřené hodnoty jsou zkresleny tím, že se autorka nezabývala obsahem sušiny ve vzorcích a výsledky takto nepřepočítala. Hodnoty jsou tak dle mého názoru zatíženy velkou chybou a jeden ze závěrů, že „kyselina chlorogenová během tepelné úpravy (grilování) vzrostla až o 91%“ považuji v této souvislosti za značně odvážný.

Formální připomínky práce

- Zkratky, které jsou všeobecně známé, není třeba definovat (např. USA, ČR).
- Str. 18: Název kapitoly č.2 „Analytické metody používané k charakterizaci flavonoidů“ je nevhodně zvolen, protože v podkapitolách se autorka věnuje i dalším fenolickým látkám. Mnohem výstižnější by byl obecnější název „Analytické metody používané k charakterizaci fenolických látek“.
- Na str. 35 je v textu chybně uveden odkaz na číslo tabulky.
- Doporučuji termín „bobule“ nahradit termínem „plody bezu černého“.
- Na str. 56 a 58 jsou chybně číslovány podkapitoly práce.
- V kapitole č.7 je sledován vliv způsobu extrakce vzorku ječmene na obsah volných a vázaných fenolických látek, název „Vliv úpravy vzorku na obsah volných a vázaných látek v ječmeni“ je matoucí.
- Str. 67: Větné spojení „chromatogramy byly extrahovány“ doporučuji nahradit termínem „chromatogramy byly registrovány“.
- Str. 78: Tepelné úpravy lilku (vaření, grilování apod.), mají vliv na výsledný obsah kyseliny chlorogenové ve zkoumaných vzorcích lilku, nikoliv na její kvantitativní stanovení. Jde zde o nesprávnou formulaci.

Otázky oponenta pro obhajobu

- Proč jste v tabulce č.1 vybrala pro popis chemických a fyzikálních vlastností pouze tyto konkrétní fenolické látky, když jste se ve svých dílčích experimentech věnovala i jiným sloučeninám? (str. 17)
- Proč jste si v tabulce č.2 vybrala pro shrnutí extrakčních postupů fenolických látek pouze rostlinné drogy a jaké fenolické látky byly z jednotlivých matric vyextrahovány? (str. 21)
- V práci uvádíte, že čaj je druhý nejvíce konzumovaný nápoj na světě těsně za pitnou vodou. Můžete toto své tvrzení nějak citačně doložit? (str.29)
- Existuje nějaká bezpečná dávka pro konzumaci zeleného čaje?
- Jaká byly podmínky sušení a mražení vzorků plodů bezu černého?
- V tabulce č. 5 je uveden obsah sušiny ve vzorcích plodu bezu černého. Zjišťovala jste obsah sušiny i v analyzovaných (sušených a mražených) vzorcích?
- V textu se na str. 52 zmiňujete i o extrakci volných i vázaných fenolických látek. Byly tyto látky opravdu ze vzorků extrahovány? Pokud ano, tak jakým způsobem a které?
- Stanovovala jste obsah antokyanů i v původních vzorcích plodu bezu černého?
- Prosím o doplnění bližších informací, které se týkají tepelné úpravy vzorků lilku. Lilek obsahuje cca 90 % vody. Brala jste v úvahu ztrátu vody během těchto tepelných operací?
- Popište prosím blíže chromatogram (obr.30) na str. 80.

Závěr:

V předložené práci bylo provedeno mnoho experimentů a shromážděno velké množství cenných a zajímavých dat. Je proto velká škoda, že stejná pečlivost a osobní zaujetí nebyly vynaloženy při koncipování výsledné disertační práce. Konkrétní připomínky jsou uvedeny výše. Domnívám se, že autorka se dostala do jisté časové tísně, a v budoucí vědecké práci bych jí doporučila se podobných nepřesností a chybných formulací vyvarovat.

I s přihlédnutím k výše uvedeným skutečnostem a výtkám mám nicméně za to, že disertační práce akceptovatelně splňuje podmínky kladené na tento typ vědecké práce.

Se zohledněním výše uvedeného, zejména publikační aktivity autorky, přes veškeré zmíněné výhrady **DOPORUČUJI** předloženou práci přijmout k obhajobě a po zodpovězení všech dotazů a úspěšném obhájení navrhuji, aby Ing. Petře Šilarové **BYL UDĚLEN** akademický titul „doktor“, ve zkratce „Ph. D.“

V Brně dne 3. září 2018


Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.