

Posudek na disertační práci

Název práce: Vývoj moderních analytických metod pro analýzu biologicky aktivních látek

Autor: Ing. Jitka Klikarová

Školitelka: Doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Předkládaná disertační práce autorky Ing. Jitky Klikarové se zabývá analýzou fenolických látek ve vybraných vzorcích extra panenských olivových olejů (EVVO), produkovaných v různých částech Itálie a analýzou vybraných aminokyselin ve vzorcích, jejichž základem je med nebo jsou to iontové nápoje.

Práce je psána česky, čítá 166 stran včetně příloh. Je rozdělena na dvě velké kapitoly, z nichž každá je opatřena poměrně obsáhlým úvodem, který seznamuje čtenáře s původem reálných vzorků (EVVO, med, medovina, iontové nápoje), s jejich výrobou, charakterizací a s analyty, které budou v daném vzorku identifikovány a následně stanovovány. Text je napsán pečlivě a čtivě, je doplněn velkým počtem literárních odkazů, týkajících se i publikovaných metodik jak pro předúpravu vzorků, tak i pro samotné stanovení cílových analytů (celkem citováno 269 prací). V obou hlavních kapitolách po úvodu následuje experimentální část, kde autorka popisuje základní přístrojové vybavení, použité chemikálie, stručnou přípravu vzorků a podmínky metod, použitých pro vlastní analýzu. Experimentální část je zakončena popisem použité/použitých statistických metod pro zpracování velkého množství dat. Následující kapitola „Výsledky a diskuse“ je zaměřena zejména na kvantifikaci vybraných analytů, vývoj vlastních analytických metod je komentován velmi krátce, soustředí se spíše na pouhý výčet testovaných parametrů a detailnější vysvětlení vlivu jednotlivých parametrů chybí, což je z pohledu analytického chemika škoda. Také mi před každou kapitolou chybí jasné stanovení cílů, což by zvýšilo přehlednost této rozsáhlé části, zejména v případě stanovení aminokyselin. Na druhé straně oceňuji snahu autorky o porovnání výsledků získaných dvěma nezávislými metodami a také o velmi pěkné statistické zpracování získaných výsledků. Předkládaná práce je založena na 7 publikacích, z nichž 5 již vyšlo, jedna je akceptovaná a jedna zasláná a v pěti z nich je předkladatelka první autorkou.

K práci mám následující připomínky nebo dotazy:

- V práci postrádám přiložené originály výše zmíněných publikací, protože pokud chce čtenář najít nějakou další informaci, musí jít v lepším případě na Web of Science, v případě publikací v *Scientific Papers of the University of Pardubice* je nedohledá vůbec.
- Faktorová analýza přinesla velmi zajímavé výstupy, zejména diskriminační analýza. Čím si vysvětlujete největší variabilitu vzorků EVVO ze Sicílie? (obr. 11, str. 62)
- Str. 80: Tvrzení, že rozlišujeme pravotočivé D- a levotočivé L-aminokyseliny není správné. Velkým D- a L- se označuje pouze konfigurace, také se nepíše kurzívou.
- Str. 83: Opravdu CE vykazuje nižší píkovou kapacitu pro stanovení AMK než HPLC?
- Str. 121: Jaká byla funkce přídavku okyseleného 0,1% TEA do mobilní fáze?
- Str. 127: Jak a proč malá změna pH způsobuje zásadní změny v separační selektivitě? (obr. 23, str. 129)

Závěrem mohu konstatovat, že kandidátka prokázala schopnost samostatné tvůrčí práce a práci mohu doporučit k obhajobě.

V Praze 9. 9. 2020

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.



OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Název práce: Vývoj moderních analytických metod pro analýzu biologicky aktivních látek
Autor: Ing. Jitka Klikarová
Oponent: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a aplikací analytických metod, zejména kapalinové chromatografie pro analýzu vybraných fyziologicky aktivních látek v potravinách. Práce je tematicky rozdělena do dvou částí. První se zabývá analýzou fenolických látek v extra panenském olivovém oleji a druhá stanovením aminokyselin v nápojích. Každá část má svoji vlastní strukturu kapitol zahrnujících charakteristiku studovaných látek a potravin, experimentální část, výsledky a diskusi, závěrečné shrnutí a použitou literaturu. Práce je doplněna seznamem obrázků, tabulek, zkratk, samostatným úvodem a přílohami.

Obě teoretické části jsou psány s nadhledem a text vypovídá o tom, že autorka se ve studované problematice velmi dobře orientuje. K úvodní kapitole a teoretickým kapitolám si dovoluji několik připomínek a dotazů:

Věta v Úvodu: „S rostoucí poptávkou se však současně zvyšují i nároky na potraviny.“ Striktně z pohledu trhu by zvyšování poptávky vedlo ke dvěma jevům, a to je snižování nároků na potraviny (trh přijme i nižší kvalitu) a zvyšování ceny. Situace je složitější a v rámci diskuse bych ocenil bližší vysvětlení této věty a názor autorky týkající se nároků na potraviny v ČR.

Na str. 22, autorka píše: „Peroxidové číslo, někdy také uváděné jako číslo jodové, nám poskytuje informaci o míře primární oxidace oleje korelující s množstvím hydroperoxidů, jež vznikají degradačními procesy z nenasycených mastných kyselin“. Tato informace není správná. Principem stanovení peroxidového čísla je oxidace jodidu v kyselém prostředí peroxidovými skupinami za vzniku ekvivalentního množství jodu, který se dále stanovuje. Jodové číslo potom charakterizuje počet dvojných vazeb (procenta adovaného halogenu, např. jodmonobromidu, vyjádřeného jako jód) a přibližuje tedy obsah nenasycených sloučenin v daném tuku nebo oleji.

Za poněkud zkreslující považuji větu na str. 29: „Z fenolických látek proto může být CE aplikována pouze na fenolické kyseliny, které jsou v mírně alkalickém pH disociovány“. Pohodlně lze elektroforézu aplikovat i na jiné typy fenolických látek, pokud lze dosáhnout disociace fenolických OH skupin nebo protonizace jiné (např. flavyliové) skupiny. Navíc si i v případě velmi slabých elektrolytů lze pomoci přidavkem vhodného micelotvorného činidla a pracovat v módu micelární elektrokinetické chromatografie (bez potřeby změny instrumentace), kterou ostatně autorka i dále popisuje. Dále v textu (str. 34) autorka rovněž uvádí, že secoiridoidy (polyfenoly olivového oleje) nejde analyzovat kapilární elektroforézou. V rámci rozpravy by mě zajímalo, proč by tomu tak mělo být.

V kapitolách věnovaných vlastnímu výzkumu autorky je popsán vývoj chromatografických metod ve dvou aplikacích: i) pro analýzu fenolických látek v italských extra panenských olivových olejích s cílem bližší charakterizace jejich profilu a rozlišení dle provenience s využitím vícerozměrných statistických metod a ii) pro analýzu aminokyselin v medovinách a energetických nápojích v souvislosti s hodnocením kvality těchto produktů. Prezentované výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech, prošly tedy přísným recenzním řízením, což vypovídá o jejich vysoké kvalitě a přínosu pro obor potravinářské kontroly.

K získaným výsledkům mám rovněž několik připomínek a dotazů:

Ve studii zaměřené na olivové oleje poněkud postrádám diskusi o ESI-MS datech (identifikace a kvantifikace). Jedinou výjimkou je MS záznam vzorku 13 (TIC a RIC pro m/z oleaceinu). MS data však byla nepochybně pro studii velmi důležitá.

Obrázek 10., 11. a odpovídající diskuse k použití vícerozměrných statistických metod; prosím o podrobnější vysvětlení postupu, kterým bylo rozhodnuto o tom, že vzorky v grafu faktorového skóre ležící na rozhraní obou skupin (tj. např. 45, 27, 40 nebo 52, 55) nepatří do druhé skupiny, než do které jsou zařazeny. Dále, je vidět, že řada výsledků z faktorového skóre se liší od výsledků diskriminační analýzy: odlehle vzorky z faktorového skóre jsou součástí klastrů definovaných v obrázku z diskriminační analýzy (jsou tedy řazeny do skupin s řadou ostatních vzorků, od kterých jsou ve faktorové analýze odděleny jako outliery). Mohla by autorka tyto rozdíly blíže komentovat? V práci postrádám výsledky z PCA analýzy, o které autorka tvrdí, že poskytovala totožné výsledky k faktorové analýze (str. 60 a poslední odstavec Závěru na str. 64).

Překvapivá je informace na str. 120, že pro účely snížení pH extraktu nebo dokonce jeho neutralizaci byl použit uhličitán lithný nebo sodný. Obě tyto soli mají zásaditou reakci. Byla změna pH po přidavku uhličitánu experimentálně zjišťována?

Z chromatogramů na Obrázku 28. je patrné, že retenční čas vytvořeného PITC derivátu taurinu a činidla je v provedených analýzách stabilní, retenční čas produktu hydrolyzy se však mění. Čím si to autorka vysvětluje?

Práce je psána hezkým jazykem, přehledně a pečlivě s minimem překlepů a gramatických chyb a má velmi dobrou grafickou úroveň. Po formální stránce v disertaci postrádám explicitně definované cíle práce, které jsou však vyvoditelné ze závěrečných shrnutí pro obě studované oblasti. Ocenil bych rovněž reprinty nejvýznamnějších publikací autorky (viz výčet na str. 163) ve vázané do disertační práce formou příloh.

Závěrem mohu konstatovat, že toto dílo splňuje po faktické i formální stránce požadavky kladené na disertační práce a obsahuje nové a zajímavé výsledky využitelné v oborech analytické chemie a potravinářské kontroly i technologie. Tyto výsledky byly publikovány v impaktovaných a recenzovaných časopisech. Uvedené komentáře a poznámky nejsou zásadního charakteru a nesnižují kvalitu předkládané práce.

Předloženou disertační práci proto DOPORUČUJI k obhajobě a v případě jejího úspěšného průběhu navrhuji udělit Ing. Jitce Klikarové akademický titul Doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci, 23. srpna 2020

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

17. listopadu 12

77146 Olomouc

E_mail: petr.bednar@upol.cz



POSUDEK OPONENTA NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Autor práce: Ing. Jitka Klikarová
Název práce: Vývoj moderních analytických metod pro analýzu biologicky aktivních látek
Školitel práce: doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.
Oponent práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Přidělené body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce, vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet, vhodnost výběru a aktuálnost zdrojů)	0-3	2
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních názvů nebo zkratk časopisů)	0-3	1
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	3
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
Formální požadavky – body celkem		16
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	3
Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	2
Experimentální náročnost práce	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	2
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor	0-3	2
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		20
CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	45	36

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní.

Komentář oponenta:

Disertační práce autorky se v první části zabývá vývojem, optimalizací a kvantitativním stanovením polyfenolických sloučenin v extra panenských olivových olejích a ve druhé části stanovením aminokyselin v medovinách a stanovením taurinu v energetických nápojích, v obou případech pomocí chromatografických a dalších metod.

Literární rešerše obou částí jsou zpracovány v širokém rozsahu a celkově zahrnují nadprůměrný počet zdrojů (269 zdrojů). Zdroje z oblasti vědecké sféry jsou vždy aktuální a vhodně zvolené. V případě regulatorních zdrojů však bylo nalezeno použití zdroje neaktuálního (vyhláška č. 335/1997 Sb.) nebo uvedený zdroj nebyl regulatorní a prezentovaná informace byla navíc v rozporu s aktuálně platným nařízením (nařízení Komise (EHS) č. 2568/91) nebo regulatorní zdroj nebyl uveden vůbec, ačkoliv již existuje (FDA Guideline - Guidance for Industry: Highly Concentrated Caffeine in Dietary Supplements).

Experimentální část práce je zpracována v odpovídající posloupnosti, pracovní postupy jsou popsány až na výjimky dostatečně podrobně a měření jsou téměř vždy provedena v přiměřeném rozsahu. Vzhledem k názvu disertační práce „*Vývoj moderních analytických metod pro analýzu biologicky aktivních látek*“ by však mělo těžiště experimentální práce ležet více v oblasti optimalizace a validace analytických metod, což bohužel nebylo v odpovídajícím rozsahu naplněno. Optimalizační kroky podmínek přípravy vzorku k analýze i podmínek vlastní chemické analýzy byly provedeny v poměrně širokém rozsahu a většinou s úspěšnými závěry, ale prezentace rozsahu optimalizace a jejích výsledků byla často příliš strohá. V mnoha případech chyběla specifikace testovaných hodnot optimalizovaného parametru, specifikace veličiny použité k objektivnímu hodnocení, akceptační kritérium (v relevantních případech), sumarizace všech dosažených výsledků (grafy, tabulky) a diskuse výsledků optimalizace daného parametru. Validace vyvinutých metod, které demonstrují kvalitu analytické metody a důvěryhodnost poskytovaných výsledků analýz, byly provedeny v nedostatečném rozsahu a nekonzistentně. V některých případech byla validace metody provedena pouze analýzou roztoků standardních látek a nikoliv analýzou reálných vzorků obsahující matici vzorku (matricové referenční materiály popř. vlastní obohacené reálné vzorky). Postup přípravy vzorku k analýze a vliv matrice však hodnoty validačních parametrů velice často významně negativně ovlivňují a proto je nutné validovat analytickou metodu jako celek, tedy od navážky reálného vzorku, přes přípravu vzorku k analýze až po vlastní chromatografickou (či jinou) analýzu. Velice však oceňuji následnou aplikaci vyvinutých metod pro analýzu reálných vzorků, vyhodnocení výsledků a příslušnou diskusi. Zejména hodnocení obsahu polyfenolických látek v italských extra panenských olivových olejích (EVOO) je provedeno velice komplexně, na velkém počtu vzorků a objektivně za použití statistických metod faktorové analýzy (FA), analýze hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýzy (DA). Jedním z nejvýznamnějších závěrů zjištěným na základě DA byla jednoznačná klasifikace EVOO dle jejich geografického původu, čehož může být v budoucnu využito a dále rozvíjeno pro účely větší ochrany nejen spotřebitelů, ale i poctivých výrobců EVOO.

Téma disertační práce je velice zajímavé, náročné a bylo, je i bude vždy aktuální a žádoucí jak pro vědeckou sféru, tak i pro širokou veřejnost. Experimentální provedení bylo realizováno v přiměřeném rozsahu, grafická úprava obrázků i tabulek je na velmi dobré úrovni a vytčené cíle byly splněny. Kvalita výsledků práce autorky byla taktéž potvrzena jejich úspěšnou publikací v zahraničních odborných recenzovaných časopisech (např. Food Analytical Methods, Talanta aj.). I přes jisté více či méně závažné nedostatky uvedené níže lze tedy práci celkově hodnotit jako vyhovující požadavkům, které jsou kladeny na kvalifikační práce doktorského stupně studia.

Připomínky a dotazy, na které má studentka reagovat při obhajobě.

- 1) Kap. 1.3.3.3, str. 39: V průběhu přípravy vzorku k analýze dochází k opakované extrakci polyfenolických látek (PP) z nepolární fáze do polární fáze, při níž byl navíc proveden odběr nespécifikovaných objemů polární fáze obsahující PP, ale přidavek vnitřního standardu je proveden až po provedení extrakce vzorku. Proč nebyl vnitřní standard přidán před těmito extrakčními kroky, aby tak bylo korekcí na vnitřní standard zajištěno potlačení negativních vlivů doprovázející extrakce analytů z matrice vzorku a mohla být tak zvýšena spolehlivost výsledků? Na základě jakých podkladů byla provedena volba vnitřního standardu? Dle textu v kap. 1.4.2 na str. 45 byla účinnost extrakce hodnocena na 2 koncentračních úrovních (každá koncentrační úroveň ve 3 nezávislých opakováních a každé nezávislé opakování ve 3 nástřících), ale u výsledků uvedených v textu i v tab. 2 na téže straně již není specifikováno, o jakou koncentrační úroveň se jedná a ani není nijak vyjádřen rozptyl naměřených hodnot (např. pomocí relativní směrodatné odchylky). Prosím o upřesnění, o jaké výsledky se jedná a doplnění údajů týkající se rozptylu naměřených hodnot.
- 2) Kap. 1.4.2, str. 45. tab. 2: Představují limity detekce (LoD) a limity kvantifikace (LoQ) limity detekce i kvantifikace instrumentální nebo limity detekce a kvantifikace analytické metody? Dle kap. 1.3.3.2 byly všechny kalibrační roztoky připraveny v rozsahu 0,1–100 mg/kg, ale dle kap. 1.4.2, str. 45. tab. 2 činí mez kvantifikace pro oleuropein (HTY-EA) 133 µg/kg – prosím o vysvětlení použití nejnižšího kalibračního bodu 0,1 mg/kg pro konstrukci kalibrační křivky oleuropeinu. Jaké rozpouštědlo bylo použito pro přípravu kalibračních roztoků?
- 3) Kap. 1.4.3., str. 46: Jak byla provedena identifikace chromatografických píků jednotlivých izomerů analytů, když nebyly k dispozici jejich standardy a byla použita jen spektrofotometrická detekce pouze při 1 vlnové délce a hmotnostní detekce pouze pomocí základního skenu iontů?
- 4) Kap. 1.4.3, str. 47: Vzhledem k nedostatku komerčně dostupných standardů byly některé analyty kvantifikovány pomocí kalibračních křivek jiných analytů, pro něž byly standardy k dispozici. Strukturně odlišné sloučeniny však často poskytují více či méně odlišné absorpční koeficienty při shodné vlnové délce a tedy i různou odezvu spektrofotometrického detektoru při shodné koncentraci analytů. Bylo provedeno hodnocení absorpčních koeficientů jednotlivých analytů? Pokud ano, bylo zvoleno nějaké akceptační kritérium pro použití pro účely kvantifikace?
- 5) Kap. 2.5.2.1: V textu kapitoly je pouze velice stručně uvedeno, které parametry byly optimalizovány a poté až konečné podmínky derivatizace zjištěné optimalizací, ale již zde nejsou (ani v jiných kapitolách) uvedeny výsledky optimalizace – tj. hodnoty optimalizovaných parametrů, výsledky optimalizace parametrů ani závěrečné porovnání optimalizovaných metod. Na základě jakých výsledků (jaké všechny ukazatele byly použity) bylo provedeno hodnocení výsledků optimalizace? Byly pozorovány nějaké výrazné odchylky ve výsledcích optimalizace mezi jednotlivými aminokyselinami?

Některé další komentáře oponenta.

Níže uvedené komentáře není nutné z časových důvodů u obhajoby číst. Tyto komentáře jsou zde uvedeny zejména jako zpětná vazba pro potřeby autorky.

- 1) Chybně prezentované zkratky v Seznamu zkratk a dále v textu: Chráněné označení původu (ChOP → CHOP) a Chráněné zeměpisné označení (ChZO → CHZO). (zdroj: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:52010XC1216\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:52010XC1216(01))).
- 2) Překlep v textu: Seznam zkratk (Oxygen → Oxygen).
- 3) Používání nepřesných výrazů: RIC v Seznamu zkratk (Rekonstruovaný iontový proud → Rekonstruovaný iontový chromatogram (zdroj: <http://terminologie-ms.sci.muni.cz/records:443-reconstructed-ion-chromatogram>); vhodnější je používat zkratku XIC = extracted ion chromatogram = chromatogram extrahovaných iontů - zdroj: <http://terminologie-ms.sci.muni.cz/records:164-extracted-ion-chromatogram>).
- 4) Při úpravě textu by na některých místech nemělo dojít k zalomení řádku, aby text plynule navazoval, jeho členění bylo přehledné a čtení pohodlné: Prohlášení (a o změně), Prohlášení (a směrnicí), str. 32 (k ochraně), str. 80 (8 tzv.), str. 101 (k funkčnímu), str. 115 (50 mV) aj. (zdroj: <https://prirucka.ujc.cas.cz/?id=880>)
- 5) Kap. Úvod: Nevhodná volba zdroje (zahraniční odborná publikace) a vágní formulace v případě výkladu tuzemského termínu „falšování potravin“. Výklady odborných termínů by měly být provedeny dle definic nejvýznamnějších regulatorních autorit, je-li to možné. V tomto případě je pravděpodobně nejvhodnějším zdrojem Informační centrum bezpečnosti potravin (ICBP), které vzniklo v roce 2002 na základě usnesení vlády ČR č. 1320/2001 ke Strategii zajištění bezpečnosti potravin v České republice. ICBP je součástí odboru bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství ČR. (zdroj: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76481.aspx>).
- 6) Kap. Úvod: Vágní formulace v případě výkladu tuzemského termínu „funkční potravina“. (zdroj: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76773.aspx>).
- 7) Kap. 1.1.1 a 1.1.2: Vágní formulace v případě výkladu tuzemského termínu „Extra panenský olivový olej“ (str. 18) a chybná hodnota maximální povolené kyselosti (±% → 0,8 %). Dále jsou na str. 19 podobně vágně formulovány „výrobní regule“, přičemž jako zdroje jsou uvedeny odborné publikace a nikoliv příslušná závazná legislativa Nařízení Komise (EHS) č. 2568/91 (zdroje: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil_cs a <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:01991R2568-20161204&from=EN>).
- 8) Kap. 1.2.1, str. 26: Necitování původního zdroje ve větě: „Epidemiologické studie pak poukazují na jejich zvláštní význam v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny [3,55,56].“ Tato informace nepochází přímo ze zdroje evidovaného pod citací č. 55 (Pyrzyska, K., & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28(7), 893–902. doi:10.1016/j.trac.2009.03.015), ale pochází ze zdroje (Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20(7), 933–956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9) citovaného v tomto zdroji č. 55. Navíc byl proveden nepřesný překlad, když věta „Epidemiological studies point to their possible role in preventing cardiovascular diseases and cancer“ byla přeložena jako „Epidemiologické studie pak poukazují na jejich zvláštní význam v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny“.
- 9) Kap. 1.1.2, str. 28: Necitování původního zdroje ve větě: „Tyto inovativní postupy jsou oproti těm tradičním velmi rychlé, účinné, šetří energii, činidla i rozpouštědla a jejich optimalizace je nenáročná a mnohdy ani není nutná [72].“ Tato informace nepochází přímo ze zdroje evidovaného pod citací č. 72 (Habibi, H., Mohammadi, A., Farhoodi, M., & Jazaeri, S. (2018). Application and Optimization of Microwave-Assisted Extraction and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Oleuropein and Hydroxytyrosol in Olive Pomace. Food Analytical Methods. doi:10.1007/s12161-018-1279-x) ale pochází ze zdroje (Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from Agaricus bisporus L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. Food Chemistry, 197, 1054–1063. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.108) citovaného v tomto zdroji č. 72. Opravdu existují extrakční techniky, u nichž není nutná jakákoliv optimalizace podmínek extrakce?
- 10) Kap. 1.3.3.2, str. 35: Neúplný popis přípravy kalibračních roztoků fenolických látek. Nejsou uvedeny navážky (alespoň řádově) a objem rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků, není uveden popis ředění zásobního roztoku, použitá rozpouštědla ani přepočítání na z objemové koncentrace zásobních roztoků v g/l methanolu na hmotnostní koncentraci kalibračních roztoků v mg/kg v blíže nespecifikovaném rozpouštědle.

- 11) Kap. 1.4.2, str. 44: Tato kapitola se nazývá „Optimalizace a validace extrakce fenolických látek z EVOO“, ale v textu této kapitoly (ani jiných kapitolách) nejsou uvedeny hodnoty optimalizovaných parametrů, výsledky optimalizace parametrů ani závěrečné porovnání optimalizovaných metod.
- 12) Kap. 1.4.2, str. 45: Věta: „Postup obohacení vzorku zelného oleje známým množstvím jednotlivých standardů ve dvou koncentračních stupních je včetně jejich následné extrakce popsán v kapitole 1.3.3.3.“ V uvedené kapitole nejsou mj. specifikovány jednotlivé koncentrační stupně ani podrobný postup provedení (např. objem a koncentrace přidaného roztoku standardu aj.), který by byl dostatečně informativní pro provedení případné reprodukce přípravy vzorku.
- 13) Kap. 1.4.3, str. 46: Tato kapitola se nazývá „Optimalizace a validace HPLC stanovení fenolických látek v EVOO“, ale v textu této kapitoly (ani jiných kapitolách) nejsou uvedeny hodnoty optimalizovaných parametrů, výsledky optimalizace parametrů ani závěrečné porovnání optimalizovaných metod.
- 14) Kap. 1.4.3, str. 47: Věta: „Koeficienty determinace (R²) charakterizující danou kalibrační závislost byly...“ Hodnocení kalibrační závislosti pouze na základě koeficientu determinace či korelačního koeficientu je nedostatečné a pro tento účel by měly být použity i další parametry (např. QC koeficient s akceptačním kritériem ≤ 5 %). (zdroj: NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 9788026042440.)
- 15) Kap. 1.4.3, str. 47: Validace chromatografických metod vyžaduje dle aktuálních požadavků regulačních autorit (např. FDA, ICH, EMEA, IUPAC) i odborných chromatografických časopisů (např. Journal of Chromatography A) mj. i hodnocení důležitého validačního parametru správnost metody, který vyjadřuje těsnost shody mezi výsledkem měření (např. experimentálně zjištěná hodnota obsahu analytu) a přijatou referenční hodnotou (skutečná hodnota obsahu analytu), ale tento parametr hodnocen nebyl. V případě hodnocení přesnosti metody, který vyjadřuje míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky měření za předem specifikovaných podmínek, tento parametr hodnocen byl, ale pouze na roztocích standardních látek, tedy bez vlivu matrice vzorku a bez vlivu postupu přípravy vzorku k analýze. Tyto dva vlivy mají však téměř vždy významný negativní dopad nejen na přesnost metody, ale i na správnost metody a je nezbytné míru těchto vlivů kvantifikovat a ideálně ještě následně konfrontovat s danými či vhodně zvolenými akceptačními kritérii. Dále nebylo provedeno hodnocení linearity kalibrační křivky a některých dalších validačních parametrů.
- 16) Kap. 1.4.4: V této kapitole je uvedeno, že kvantifikace pomocí HPLC-DAD poskytuje pro některé analyty až téměř o 2 řády vyšší hodnoty obsahu analytu ve vzorku než kvantifikace pomocí NMR (viz Tab. 3). Dále je na konci této kapitoly (str. 52) uvedeno, že stanovení PP v EVOO pomocí HPLC a NMR nemůže vést ke stejným numerickým hodnotám. Pokud je tomu tak, tak je vždy nutné provést minimálně objektivní hodnocení správnosti analytické metody a následně zhodnotit, která ze dvou metod poskytuje správné či alespoň správnější výsledky a zda vůbec lze výsledky alespoň některé z použitých analytických metod považovat za spolehlivé a použitelné pro hodnocení reálných vzorků. Výsledky PP v EVOO (Tab. 3, str. 49-50) rovněž postrádají jakýkoliv údaj týkající se přesnosti výsledku (např. výběrovou směrodatnou odchylku, interval spolehlivosti apod.) ačkoliv byla příprava vzorku provedena ve 3 nezávislých opakováních (příprava 3 extraktů/vzorek) a každé toto nezávislé opakování bylo následně 3x analyzováno pomocí HPLC (3 analýzy/extrakt). Naopak výsledky AMK a taurinu (kap. 2.4.6, str. 116) jsou již uvedeny v odpovídajícím formátu, tj. střední hodnota ± nejistota.
- 17) Kap. 1.4.4, str. 51: Používání nespisovné formy českého jazyka (... jak jsme ~~zvyklí~~... → ... jak jsme zvyklí...).
- 18) Kap. 2.1.2, str. 83: Necitování původního zdroje ve větě: „Z tohoto důvodu si organizace EFSA vyžádala kontroly přítomnosti biogenních aminů (histaminu, tyraminu a dalších) v potravinách a fermentovaných nápojích, tedy i v medovinách [2]“. Tato informace nepochází přímo ze zdroje evidovaného pod citací č. 2 (Manig F., Kuhne K., von Neubeck C., Schwarzenbolz U., Yu Z., Kessler B.M., Pietzsch J. & Kunz-Schughart L.A. (2017). The why and how of amino acid analytics in cancer diagnostics and therapy. Journal of Biotechnology, 242, 30–54.), ale pochází ze zdroje (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2393>) citovaného v tomto zdroji č. 2. Navíc byl proveden nepřesný překlad, když věta „For this reason, the European Food Safety Authority (EFSA) has proposed a risk assessment for fermented foods based primarily on the most abundant biogenic amines histamine and tyramine“ byla přeložena jako „Z tohoto důvodu si organizace EFSA vyžádala **kontroly přítomnosti** biogenních aminů (histaminu, tyraminu a dalších) v potravinách a fermentovaných nápojích, tedy i v medovinách [2]“.
- 19) Používání nevhodných výrazů: „... spotřebitelé stále více **tlačí** na kvalitu...“ (str. 82); „MIP jsou zde **naroubovány** na povrch pevných nosičů...“ (str. 84); „... konkurenčním **bojem** o náboj...“ (str. 87); „... z **karbohydrátů**...“ (str. 88); „**Bohatý koktejl** těchto sloučenin...“ (str. 89); „... **vychytáváním** škodlivých látek přispívá...“ (str. 101); „... **nevzpytatelný koktejl** látek.“ (str. 103); „... o čem nás **můžou** přesvědčit...“ (str. 140) aj.
- 20) Kap. 2.2.5, str. 92: Necitování původního zdroje ve větě: „Dle legislativy... [11,32,33,39]. Ani jeden ze 4 citovaných zdrojů není legislativním dokumentem. Ve všech případech se jedná o vědecké články.

- 21) Kap. 2.2.9, str. 96: Uvedení již neplatného legislativního dokumentu - vyhláška č. 335/1997 Sb. byla zrušena k 1. 12. 2018 a byla nahrazena vyhláškou č. 248/2018 Sb. s účinností od téhož data.
- 22) Kap. 2.3.1, str. 99: Věta: „FDA ovšem udává povolená množství kofeinu pouze v potravinách a nealkoholických nápojích. Jelikož ale energetické nápoje spadají do kategorie potravinových doplňků, zůstávají i nadále bez právního ošetření limitů kofeinu [76,86,87].“ Ani jeden z citovaných zdrojů není zdrojem FDA. Navíc je tato informace nepravdivá, protože již v dubnu roku 2008 vydala FDA dokument „Guidance for Industry: Highly Concentrated Caffeine in Dietary Supplements“ (<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-highly-concentrated-caffeine-dietary-supplements>) upravující tyto skutečnosti. Více také zde: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-takes-step-protect-consumers-against-dietary-supplements-containing-dangerously-high-levels>.
- 23) Kap. 2.3.2, str. 101: Používání nespisovné formy českého jazyka (... nejsme na příjmu taurinu z potravy závislý. → ... nejsme na příjmu taurinu z potravy závislí.).
- 24) Kap. 2.5.1.1: V textu této kapitoly je provedeno hodnocení optimalizace volby elučního činidla, ale již zde nejsou (ani v jiných kapitolách) uvedeny výsledky optimalizace dalších optimalizovaných parametrů (množství vzorku k extrakci, pH vzorku, množství elučního činidla) – tj. hodnoty optimalizovaných parametrů, výsledky optimalizace parametrů ani závěrečné porovnání optimalizovaných metod.
- 25) Kap. 2.5.1.3: V textu této kapitoly je provedeno částečné hodnocení optimalizace obsahu TEA v mobilní fázi A a optimalizace excitační a emisní vlnové délky, ale již zde nejsou (ani v jiných kapitolách) uvedeny výsledky optimalizace dalších optimalizovaných parametrů (volba organického rozpouštědla v mobilní fázi, pH vodné složky mobilní fáze a gradientový program) – tj. hodnoty optimalizovaných parametrů, výsledky optimalizace parametrů ani závěrečné porovnání optimalizovaných metod.
- 26) Kap. 2.5.2.2: V textu kapitoly je uvedeno, které parametry byly optimalizovány a v jakém rozsahu (vč. konkrétních hodnot), ale již zde nejsou (ani v jiných kapitolách) uvedeny výsledky optimalizace – tj. výsledky optimalizace parametrů ani závěrečné porovnání optimalizovaných metod.
- 27) Kap. 2.5.2.2, str. 128: Jednotkové rozlišení ($R_{1,2} = 1$) je pro kvantitativní chromatografickou analýzu nedostatečné, zvláště v případě náročné matrice reálného vzorku. Obecně se doporučuje minimální rozlišení ($R_{1,2}$) na úrovni 1,5–2,0, v případě náročné matrice a nízké koncentrace analytů i vyšší než 2,0.
- 28) Kap. 2.5.2.3, str. 134-135: Pouze na základě výsledků z tab. 9 nelze tvrdit, že by výsledky obou nově vyvinutých chromatografických metod (HPLC) a výsledky referenční spektrofotometrické metody (SFM) byly srovnatelné, protože není provedeno objektivní hodnocení statistické významnosti rozdílu středních hodnot např. použitím Studentova t-testu (<http://www.eurachem.cz/user-files/files/metodicky-list-10-2018.pdf>, kap. 3.1, str. 4).
- 29) Kap. 2.5.3.3, str. 140: Věta: „O něco přesnější výsledky byly získány chromatografickou metodou, o čem nás můžou přesvědčit nejenom nižší hodnoty intervalů spolehlivosti uvedené v tab. 10, ale i identické chromatogramy získané po třech nástřících vzorku „Red Bull classic.“ V kap. 2.4.5.2 popisující přípravu vzorku je uvedeno, že analýzy reálných vzorků byly opakovány vždy pětkrát, ale v kap. 2.5.3.1 je uvedeno, že intervaly spolehlivosti i chromatogramy byly získány po 3 nástřících vzorku. Byl každý vzorek tedy analyzován v 5 opakováních nebo ve 3 opakováních? A byla to plnohodnotná nezávislá opakování vzorku zahrnující i kompletní přípravu vzorku k analýze (1 vzorek → 3 replikáty → 1 nástřik/1 replikát) nebo se jednalo pouze 3 nástřiky z 1 připraveného vzorku (1 vzorek → 1 replikát → 3 nástřiky/1 replikát)? Z naměřených dat (obr. 29, tab. 10) je patrné, že se pravděpodobně jedná o nezávislá opakování, ale informace z textu nejsou ani konzistentní, ani zcela jednoznačná.
- 30) S ohledem na dosažené nejistoty měření jsou výsledky analýz často uváděny na neadekvátní (někdy vyšší, někdy nižší) počet platných cifer. (zdroj: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf, kap. 9.5.1, str. 31).

Závěr: Disertační práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 9. září 2020.

.....
Ing. David Kahoun, Ph.D.