

Posudek disertační práce

s názvem

Moderní a klasické metody pro extrakci bioaktivních složek z rostlinných matic

předložené Ing. Danielem Kremrem

na Univerzitě Pardubice, Fakultě chemicko-technologické, Katedře analytické chemie

Předkládaná práce je kompilací šesti prací publikovaných v recenzovaných časopisech doplněných společným úvodem. U třech prací je ing. Kremr uveden jako první autor. Z uvedených článků je pět původních sdělení a jeden je přehledový.

Samotné články (přílohy) prošly vlastními recenzními řízeními jednotlivých časopisů, proto nejsou předmětem tohoto posudku.

Společným tématem spojujícím jednotlivé publikace jsou extrakční techniky a jejich optimalizace pro zvolené látky a matrice. Aplikujeme-li toto hledisko na předkládanou kompilaci článků, lze práci posuzovat jako logický souhrn získaných výsledků.

K práci mám několik poznámek, komentářů a dotazů.

Obecné

Práce má velmi rozsáhlou teoretickou část 3 - Extrakční metody, zatímco kapitola 6 – Shrnutí, obsahující abstrakty přiložených prací, je velmi stručná. Pro práci by bylo přínosnější zasadit jednotlivé práce do obecnějšího rámce, případně uvést více podrobností. Bez přečtení jednotlivých článků v příloze čtenář stěží získá detailnější přehled o výsledcích.

Velmi pozitivně lze hodnotit systematické použití pokročilých statistických metod při plánování experimentů a optimalizaci metod.

Terminologické nepřesnosti

Termín „podkritická voda“, uvedený v Souhrnu, je technickým slangem, vhodnější by byl pojem voda v podkritickém stavu.

Dále je zde použit výraz „ultrazvukové záření“, přičemž dále v práci na straně 27 v kapitole 3.4.1. je již užíván správný termín ultrazvukové vlnění.

V kapitole 3.2.4.1. Výběr vlákna na str. 18 je zmíněn v souvislosti s extrakcí málo těkavých a nízkomolekulárních látek pojem „málo specifický povrch a specifický povrch“, avšak není blíže specifikováno jakou specifickost má autor na mysli.

Uvedené nepřesnosti jsou však jen minoritního významu a nesnižují pochopitelnost textu.

Věcné námitky

V úvodu autor zmiňuje rostoucí popularitu extrakčních metod pro extrakce biologicky aktivních látek pro jejich pozitivní účinky na lidské zdraví. Nesmí se však zapomínat na extrakční metody užívané při výrobě drog a jiných škodlivých látek.

V kapitole 3.1 Rozdělení extrakčních metod autor míchá dvě rozdílná kritéria, která k sobě nepatří: hledisko rovnováhy extrakce a hledisko rozsahu vyextrahování analytu z matrice. Zatímco rovnovážná extrakce není nikdy totální (vyčerpávající), nerovnovážná extrakce může být jak neúplná, tak i vyčerpávající.

Destilace nepatří z definice mezi extrakční techniky. Zatímco extrakce je založena na rozdělovací rovnováze, destilace je založena na rozdílném složení kapalně a plynné fáze minimálně dvousložkového systému. Zde autor evidentně zaměnil pojem separační techniky za pojem extrakční.

V kapitole 3.2.2 Instrumentace v SPME autor uvádí: „ ... , při SPME není vzorek extrahován v co nejvyšší koncentraci, nýbrž pouze do ustavení koncentrační rovnováhy v systému.“ Z toho vyplývá, že při dosažení rovnováhy není koncentrace analytu v extrakční fázi nejvyšší, což není pravda. Obdobně neobratná formulace je na str. 17 v kapitole 3.2.2.1 Sorpce analytů, kde je uvedeno: „Extrakce může probíhat buď do ustavení rovnováhy, nebo, v případě nižší koncentrace látek, do úplného vyčerpání (totální extrakce) sledovaných analytů“. I v případě nízké koncentrace látek však může extrakce probíhat do ustavení rovnováhy.

V druhém odstavci téže kapitoly autor popisuje výhody HS-SPME v případě matric obsahujících vysokomolekulární látky (např. proteiny), kdy není vlákno v kontaktu s touto matricí, avšak hned v dalším odstavci tvrdí: „Pokud vzorek obsahuje netěkavé vysokomolekulární látky,, použití HS-SPME i DI-SPME je prakticky nemožné.“

V kapitole 5 o Statistickém plánování experimentů chybí zmínka o alfa-bodech v CCD, které jsou používány v publikovaných pracích.

Jazykové nepřesnosti

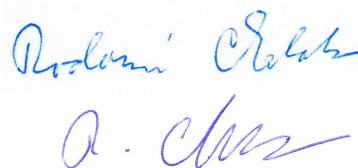
Anglické Summary trpí špatným slovosledem, typickým čechizmem.

Práce obsahuje minimum překlepů.

Uvedené připomínky a námitky nejsou závažného charakteru a podle mého názoru práce splňuje všechny požadavky disertační práce, proto ji doporučuji k přijetí a udělení titulu Ph.D.

V Praze, 23. srpna 2016

doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.



Radomír Čabala
R. Čabala

Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Daniela Kremra „Moderní a klasické metody pro extrakci bioaktivních složek z rostlinných matric“.

Extrakce bioaktivních látek z rostlin provádí člověk již po tisíciletí. I když se metody extrakce vyvíjejí od zcela jednoduchých po dnešní moderní techniky, o rostlinné látky vždy bude zájem jako o náhradu či doplněk léčiva. Způsob extrakce se liší podle skupin cílových látek a zajímavé je i srovnávání účinnosti a náročnosti různých extrakčních technik pro získávání stejných látek či zpracování téhož rostlinného materiálu. Téma disertační práce je proto vysoce zajímavé a aktuální.

Předloženou disertační práci hodnotím vysoko po stránce odborné, mám však připomínky k její formě. Práce má formu souboru separátů spojených literárním úvodem. Přestože je tato forma přípustná a já jsem rozhodně jejím příznivcem (nač opisovat či dokonce překládat články, které prošly mezinárodní, mnohdy tvrdou recenzí?), postrádám v ní diskusi vlastních výsledků, obsažených v separátech. Literární úvod, byť obsáhlý a zajímavý, následovaný příloženými separáty, které již prošly zahraniční recenzí, nedávají oponentovi mnoho prostoru pro komentář a diskusi. Vložení kratšího popisu výsledků a komentáře k nim mezi úvod a vlastní separáty by jednak prospělo čtivosti disertace, jednak by to tvořilo základ pro diskusi při vlastní obhajobě. V disertační práci zcela chybí kapitoly Výsledky, Diskuse, Závěr. Čtyřstránková kapitola nazvaná Shrnutí jen stručně opakuje metodiku publikovaných článků, ale nezmiňuje se o výsledcích. Předložená disertace je tak ukázkou toho, že i dobrou práci se někdy nepodaří dobře „prodat“.

Soubor článků pro disertaci má tvořit jeden celek, ale ze způsobu presentace tento celek a souvislost publikací nejsou zcela zřejmé. Žádám proto na tomto místě doktoranda, aby se v obhajovací řeči zaměřil tímto směrem, ukázal logickou návaznost publikací a zhodnotil výsledky (i případné negativní výsledky, které se obvykle do článků nedávají) jako celek.

Doktorand publikoval 6 článků, které jsou podstatou disertace. Publikace se objevily v mezinárodních časopisech s dobrými impakt faktory v daném oboru, což je samo o sobě známkou úspěšného splnění zadaného tématu. Doktorand je prvním autorem u tří článků, což svědčí o jeho zásadním podílu na získaných výsledcích. Samotné články jsou kvalitní a jsou rozhodně dostačujícím podkladem pro doktorskou disertační práci.

Konkrétní dotazy a připomínky k práci uvádím v následujícím přehledu:

1. Zatímco některé triviální extrakční techniky jsou popisovány až příliš podrobně (např. Soxhletova extrakce), jiné, méně známé (alespoň pro mne) jsou odbyty velmi stručně (např. IT SPME).
2. SPME technika se někdy používá i v dynamickém head-space módu. Zabýval jste se pouze statickou variantou, nebo oběma variantami? Máte nějaké zkušenosti s porovnáním účinnosti a opakovatelnosti?
3. Řada obrázků v práci je patrně převzala z literatury nebo stažena z internetu. Řada z nich má díky tomu i špatnou kvalitu (např. obr. 4, 9-13, 15). U některých je citován zdroj, u jiných nikoliv. Jak jste se vyrovnal s autorskými právy?
4. Str. 33: K výhodám SFE bych dodala, že použití CO₂ je má hlavní výhodou v tom, že se po ukončení extrakce snadno zplyní a odstraní.
5. Str. 35: Dovoluji si oponovat tvrzení, že „extrakce kapalina-kapalina se využívá především v případě, že organická rozpouštědla mají vyšší hustotu než voda“. Při zpracování chemických reakcí je naopak výhodné extrahovat produkt do etheru a několikrát etherovou vrstvu promýt vodou, aby se odstranil reakční balast. Záleží tedy vždy na situaci a záměru experimentátora.

6. Str. 36: Nesprávně vyjádřené „Jako nepolární sorbenty se často používají např. oktadecyl, oktyl nebo ethyl, vždy navázané na silikagel.“ Doporučovala bych spíše formulaci „... silikagel s navázanými oktadecylovými, oktylovými nebo ethylovými skupinami“.
7. Str. 47-48: V souhrnu by bylo bývalo užitečné uvést vzorce diskutovaných kapsaicinoidů, aby bylo možné ze struktury rychle odhadnout i jejich fyzikální vlastnosti.
8. Str. 50: Jak doktorand sám konstatuje, je v literatuře zmatek kolem názvosloví kyseliny chlorogenové a jejich isomerů. Pro jednoznačnost by bylo nejlépe držet se *R/S* notace, ta je jednoznačná.
9. Poznámka k článku 1: V tabulce 4 se objevuje označení „n.i., not identified“. Domnívám se, že autoři mají na mysli spíše „not detected“. „N.I.“ evokuje představu neznámé látky, kterou se nepodařilo identifikovat.
10. Otázka k článkům 2 a 3: Našel jste podmínky pro optimální výtěžnost extrakce. Jak se provádí extrakce kapsaicinoidů ve větším měřítku pro účely farmaceutického průmyslu, kde se kapsaicin používá v přípravcích na prohřátí a prokrvení kůže? Jak je průmyslová extrakce výtěžná v porovnání s Vaší metodou?
11. Komentář a otázky k článku 4:
 - a) Ve vzorcích z jitrocele bylo identifikováno mezi 76 % a 86 % látek. Co byl zbytek do 100 %? Nějaké více zastoupené neznámé látky, nebo větší počet minoritních složek, jejichž spektra byla kvůli nízké koncentraci neprůkazná?
 - b) V tabulce 2 je několik řádků nesprávně posunutých, čímž nesouhlasí součty procentuálního zastoupení.
 - c) Zjevné kontaminanty jako ftaláty nebo naftalen bych do tabulky osobně nedávala. Až na jeden vzorek bylo kontaminantů poměrně malé zastoupení, z čehož je vidět, že vzorky i analytické zařízení byly dosti čisté.
 - d) Byly pro identifikaci použity standardy, nebo jen hmotnostní spektra a porovnání s knihovnou?
 - e) V závěru článku píšete, že novum spočívá v extrakci pomocí hydrodestilace. Můžete tuto metodu a její použití pro extrakci jitrocele porovnat s jinými metodami, které používali ostatní autoři? V čem vidíte výhody a nevýhody?

Závěrem bych chtěla říci, že uvedené dotazy a připomínky nejsou zásadního charakteru a nikterak nesnižují úroveň předložené práce. Po odborné stránce hodnotím práci jako velmi dobrou a doporučuji ji k obhajobě.

I. Valterová

Irena Valterová

Praha, 21. září 2016

Oponentský posudek

na disertační práci zpracovanou na téma

„**Moderní a klasické metody pro extrakci bioaktivních složek z rostlinných matic**“

Autor disertace: **Ing. Daniel Kremr**

Školitel: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**

Oponent: prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

Předložená dizertační práce je experimentálně zaměřena a je členěna do 9 kapitol podle běžných zvyklostí. Celkem je sepsána na 55 stranách a její úvodní část je tvořena textem, tabulkami a grafy.

Následujících 46 stran představují již publikované a recenzované články, s IF, případně vědecky recenzované. Po Úvodu do řešené problematiky je zcela jasně specifikován Cíl práce. Autor disertační práce se věnoval zejména extrakčním metodám a na základě toho je v teoretické části definováno rozdělení extrakčních metod, dále mikroextrakce tuhou fází, extrakce podporované tlakem, extrakce s využitím ultrazvuku, Soxhletova extrakce, destilace a další, dosud v předchozích kapitolách již nespecifikované extrakční techniky.

V rámci použitých experimentálních postupů jsou zde prezentovány disoluční (rozpuštěcí) studie a statistické plánování experimentu. Ve shrnutí jsou diskutovány získané poznatky, zahrnující extrakce sirných látek z rostlin metodou HS-SPME, využití PHWE pro stanovení kapsaicinoidů v chilli papričkách, porovnání dvou ultrazvukových technik pro extrakci alkaloidů z chilli paprik, využití hydrodestilace pro izolaci těkavých látek z jitrocele, *in-vitro* disoluční studie kyseliny chlorogenové z potravinových doplňků a názvosloví kyseliny chlorogenové. Literatura, ze které bylo při zpracování disertace čerpáno, obsahuje celkem 111 citací domácích a zahraničních autorů. Na závěr disertační práce je uveden seznam použitých zkratk a přílohy, kde jsou presentovány dosavadní publikační aktivity autora disertace. Z jejich přehledu je zřejmé, že získané výsledky již byly publikovány v šesti zahraničních impaktovaných časopisech, z čehož ve třech příspěvcích byl autor disertace prvním autorem. Další dvě publikace byly již zveřejněny v ostatních vědeckých recenzovaných časopisech. Na domácích vědeckých konferencích byly předneseny tři příspěvky a na zahraničních vědeckých konferencích rovněž tři příspěvky. U všech šesti příspěvků byl autor disertace vždy prvním autorem. Kromě toho byl hlavním autorem nebo

spoluautorem sedmi plakátových sdělení uvedených na domácích a zahraničních vědeckých konferencích. Další přílohy představují již publikované příspěvky na dané téma.

Vzhledem k tomu, že všechny prezentované příspěvky již prošly recenzním řízením, nebudu je proto podrobně rozebírat, protože jejich publikování v impaktovaných a vědeckých recenzovaných časopisech je dostatečnou zárukou jejich odborné kvality.

Celkové zhodnocení disertační práce:

Předložená disertační práce přináší řadu nových, případně zpřesňujících vědeckých poznatků. Proto hodnotím dizertační práci jako velice zdařilou.

Závěr

Disertační práce **Ing. Daniela Kremra** splňuje po stránce vědecké, obsahové a formální všechny požadavky stanovené příslušnými vyhláškami pro získání vědecko-akademické hodnosti.

Na základě uvedeného navrhuji, aby **Ing. Danielu Kremrovi** byla po úspěšné obhajobě udělena akademická hodnost Ph.D. v příslušném studijním oboru.

V Brně dne 8.10.2016



Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.