

## Oponentní posudek doktorské disertační práce Ing. Kateřiny Pravcové

Název práce: Analýza přírodních antioxidantů v potravinách a potravinových surovinách s využitím moderních analytických metod

Oponent: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Ing. Kateřina Pravcová v průběhu svého doktorského studia aplikovala vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s fotometrickou anebo hmotnostně spektrometrickou detekcí ke stanovení fenolických látek v medovině a pseudoobilovinách a ke stanovení reziduí pesticidů v environmentálních a potravinových vzorcích. Adekvátně tomu je disertační práce složena ze dvou celků, které těmto tématům odpovídají a z nichž každý má svou teoretickou část, experimentální část, část s výsledky a diskuzí a závěr. Disertační práce má rozsah 143 stran<sup>1</sup> včetně seznamu literárních zdrojů a příloh s naměřenými daty, cituje v úhrnu 319 literárních zdrojů (převážně původních časopiseckých sdělení) a je vybavena přiměřeným množstvím ilustrací, schémat a tabulek. Obsažnost práce jako celku a vyváženost jednotlivých kapitol z hlediska jejich délky pokládám za vyhovující. Výhradu mám k názvu práce, který opomíjí druhé z výše zmíněných dvou témat, tj. analýzu reziduí pesticidů. Pokud byla v průběhu přípravy práce tímto směrem rozšířena, měl být upraven její název i za cenu, že by byl delší nebo obecnější.

V první části práce je v teoretické rovině předložena definice a základní poznatky o fenolických látkách a antioxidantech, medu a medovině, pseudoobilovinách pohance a amarantu a o stanovení fenolických látek v těchto přírodních produktech. V experimentální části je popsána extrakce fenolických látek ze vzorků medovin, pohanky a amarantu včetně použití kyselých i alkalických hydrolýz. Byly vyvinuty LC/MS metody pro stanovení vybraných zástupců fenolických látek v jednotlivých typech matric a byly stanoveny jejich hlavní validační parametry. Tyto LC/MS metody byly použity ke stanovení profilu fenolických látek v extraktech dvaadvaceti vzorků medovin, dvou vzorků pohanky a jednoho vzorku amarantu. Výsledky analýzy extraktů medovin byly interpretovány prostřednictvím pokročilého statistického zpracování metodou analýzy hlavních komponent, mj. z hlediska vlivu technologie výroby nebo možnosti průkazu nedodržení správné výrobní praxe, příp. přidavku umělých aromat (vanilinu). U extraktů pohanky a amarantu byl kromě celkového obsahu fenolických látek zhodnocen i vliv způsobu extrakce a vliv doby klíčení. Dalším

---

<sup>1</sup> Poslední strana disertační práce má číslo 156, nicméně číslování stran začíná již prvním listem následujícím za přední deskou vazby. Zvykem je ale začínat číslování stran až od úvodu práce (str. 1).

stanovovaným parametrem byla antioxidační kapacita extraktů pohanky a amarantu zjišťovaná třemi různými metodami.

Druhá část práce se ve svém teoretickém úvodu věnuje definici, klasifikaci a charakterizaci vybraných pesticidů, konkrétně insekticidů a fungicidů. Následuje krátký přehled o metodách extrakce a stanovení pesticidů v environmentálních vzorcích vody a v biologických matricích. Je zmíněno i využití organokovových sítí (MOF) pro účely extrakce vzorků. Experimentální část popisuje syntézu zeolitického MOF materiálu modifikovaného zlatými nanočásticemi a jeho použití k extrakci pesticidů ze vzorku říční vody. Dále bylo provedeno stanovení několika pesticidů ve dvaceti vzorcích medu a dvanácti vzorcích medovin po extrakci technikou QUECHERS. Poslední sadou experimentů, které jsou v této části popsány, je stanovení fungicidu fenhexamidu ve vzorcích ovoce.

Práce je sepsána na dobré jazykové úrovni, obsahuje jen malé množství překlepů a gramatických chyb<sup>2</sup>. Bylo také nalezeno jen nevelké množství problematických formulací a termínů<sup>3</sup>. Grafická úprava práce je zdařilá. Z hlediska logických souvislostí a přesnosti vyjadřování místy text práce nepůsobí uceleným a provázaným dojmem, příp. byly nalezeny určité rozpory, což dokládá následující výčet:

- str. 15: Jedním z cílů práce je zhodnocení vlivu typu extrakčního činidla na obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu v pseudoobilovinách. Extrakční činidlo z logiky věci nemůže mít vliv na obsah fenolických látek v pseudoobilovinách jako takových, ale má vliv na obsah těchto látek v *extraktech* pseudoobilovin, tedy na *výtěžnost extrakce*.
- str. 32: ... voda je nahrazena ovocnou šťávou. Výhoda této varianty je především v nižší výrobní ceně, protože ovocná šťáva je cenově dostupnější v porovnání s medem.
- str. 35: Název pseudoobiloviny se používá díky podobným rysům se semeny pseudoobilovin...

<sup>2</sup> str. 24 – měřeného (*měřeného*); str. 25 – původu, jako je ovoce – nemá být čárka; str. 25 – světla na které – chybí čárka; str. 26 – nadpis enzymatická – chybí hydrolýza; str. 27 – za [35,65,67] – chybí tečka; str. 27 – glykosilovaných; str. 33 – Zatímco vyšší teplota... – zatímco je spojka, nemůže uvozovat samostatnou větu; str. 39 – méňe; str. 55 – obr. 16, ne 15; str. 57 – nacházeli (*nacházely*); str. 59 – falšovaný; str. 78 – měly dvě medová vína (*měla* dvě medová vína); str. 106 – varrózy (*varroázy*); str. 116 – v tabulkách 13 a 18 – má být 15 a 16; str. 120 – obrázek 45 – má být 43

<sup>3</sup> str. 19 – flavonoidy jsou syntetizovány pouze pomocí rostlin; str. 20 – zabraňuje vlivu – spíše průběhu; str. 28 – screening necílených sloučenin – spíše necílený screening sloučenin; str. 30 – podroben procesu industrializace – myslí se zpracován?; str. 32 – Obsahuje od 8-18% ethanolu – *buď* od 8 do 18% *nebo* 8-18%; str. 33 – ... refermentace, které jsou důvodem – má být *příčinou*; str. 34 – ... se medový roztok přeneso do dvou třetin výšky nádoby; str. 68 – v pozn. pod tabulkou je uvedeno, že se jedná o deriváty, zřejmě jde ale o *izomery*; str. 70 – na obr. 24 nejde o separaci standardů amarantu, ale o separaci standardů látek, které se v amarantu vyskytují; str. 104 – žracího hmyzu – spíše *žravého*; str. 127 – organická rozpouštědla jsou chybně označena jako detergenty

- str. 39: Čas kyselého hydrolyzy neodpovídá časům na str. 26.
- V experimentální části se popisy použité instrumentace, chemikálií a postupů opakují pro různé typy vzorků. To, co je pro všechny typy vzorků společné, mohlo být spojeno a dále mohlo být popsáno jen to, v čem je daný typ vzorku jedinečný.
- Na str. 111 je pod číslem [63] citována práce dokládající použití uhlíkových materiálů k extrakci pesticidů z vod. Práce se dle názvu v seznamu citací týká grafenových superkondenzátorů, nicméně vyhledáním podle názvu časopisu, svazku a stránky bylo zjištěno, že se ve skutečnosti jedná o práci nazvanou „*Electromagnetic Wave Absorbing Properties of Amorphous Carbon Nanotubes*“. V každém případě citovaný článek nijak nesouvisí s tématem disertace.
- Na str. 115 je uvedeno, že přes extrakční patronu byl prosát určitý objem vzorku, který byl dvakrát eluován 0,25 ml, čímž se dosáhlo šedesátinásobného zakoncentrování. Objem vzorku tedy musel být 30 ml, ovšem v legendě k obr. 44 se uvádí objem vzorku 15 ml. Legenda obr. 44 také zřejmě uvádí chybně jednotku koncentrace standardů jako  $\mu\text{g/ml}$ , kdy správně má asi být  $\mu\text{g/l}$  (viz str. 122).

Vidím také určité rezervy v popisu vykonaných experimentů tak, aby bylo čtenáři patrné, jakým způsobem se postupovalo a co přesně bylo provedeno:

- Na str. 64 a 79 se píše o vyhodnocení vlivu klíčení, ale popis provedení experimentu jsem našel až ve výsledkové části na str. 65 u stanovení antioxidační aktivity. Není také uvedeno, z jakého důvodu je relevantní sledovat naklíčenou pohanku. V tabulce P2 jsou pak uvedena množství analytů vztažená na gram sušiny naklíčené pohanky, ale nikde není uvedeno, jaký způsobem se sušina stanovovala a především nebyly nalezeny výsledky pro pohanku nenaklíčenou – přitom experimentální část popisuje výhradně zpracování nenaklíčených vzorků.
- Na str. 127 a 129 jsou uváděny výsledky kvantifikující množství fenhexamidu, které lze odstranit oplachem, ale v práci nejsou uvedeny žádné detaily o provedení takového experimentu.

Prosím autorku práce, aby se v rámci obhajoby vyjádřila k níže uvedeným komentářům, výhradám a otázkám:

- 1) Na str. 36 uvádíte barium mezi minerály, jichž je pohanka významným zdrojem. Jaká je jeho biologická úloha?

- 2) Na str. 37 uvádíte, že obsah aminokyseliny lysinu v amarantu je 61 – 80%. K jakému celku se tento podezřele úctyhodný obsah vztahuje?
- 3) Na str. 71 uvádíte, že bylo analyzováno 15 různých extraktů amarantu, proč je jich tedy na obr. 27 a v tabulce P3 uvedeno jen deset?
- 4) Vysvětlete prosím, jak je myšleno tvrzení na str. 72, že hydrolytickým štěpením vznikl velký počet glykosidů.
- 5) V závěru první části (str. 79) deklaruje porovnání způsobů hydrolýzy, ale není učiněn závěr, který způsob je vhodnější, a podle jakého kritéria – neměla by to být výtěžnost?
- 6) Tamtéž je řečeno, že nejlepším extrakčním činidlem byl 80% methanol a současně že okyselení zvyšuje účinnost extrakce. Proč v takovém případě nebyl jako nejlepší činidlo zvolen např. okyselený methanol? Jaké vlastně bylo vaše kritérium pro výběr nejlepšího extrakčního činidla?
- 7) Na str. 115 píšete o „taktu optimalizovaném SPE postupu“, ale žádná optimalizační procedura popsána není.
- 8) Kde je uveden výsledek analýzy vody odebrané ve Valencii? Jde o „neobohacený“ vzorek na obr. 43? Můžete prosím ukázat chromatogram vody z Valencie a k tomu chromatogram směsi standardů pesticidů ve vodě na koncentrační úrovni blízko meze detekce (řádově 0,1 µg/l dle tabulky 17) tak, aby měřítko osy y bylo stejné?
- 9) Nebylo by vhodné zjistit návratnost uváděnou v tabulce 18 i na nižší úrovni než 5 µg/l? Mez kvantifikace se nachází téměř o dva řády níže.
- 10) Testování extrakční účinnosti, jehož výsledky jsou uvedeny na str. 122, bylo prováděno s reálnou maticí environmentální vody nebo v čistém rozpouštědle?
- 11) Jak byly výsledky analýz pesticidů v medu přepočítány na kilogram medu? Předpokládá to znát objem organické vrstvy po extrakci. Nejistota určení tohoto objemu pak spoluurčuje nejistotu výsledku stanovení.
- 12) Na str. 127 uvádíte, že byla optimalizována návratnost a matriční efekt prostřednictvím obohacení vzorků fenhexamidem. Takový experiment není nikde v práci popsán, ani jeho výsledky. Jak definujete u tohoto typu stanovení matriční efekt?

13) Jak hodnotíte výsledky stanovení v původních a fenhexamidem obohacených vzorcích borůvek a jahod (viz tabulka 22)?

Závěrem konstatuji, že uvedené výhrady nejsou překážkou pro úspěšné obhájení práce. Je zřejmé, že autorka odvedla nemalé množství práce v laboratoři a přišla s poznatky a daty, které rozvíjí oblast monitorování potravin z hlediska obsahu jak prospěšných látek s antioxidačními vlastnostmi tak i potenciálně škodlivých pesticidových reziduí. Výsledky práce jsou použitelné např. v kontextu odhalování adulterace potravin a nápojů nebo v rámci kontroly bezpečnosti potravin. Odbornou úroveň doktorandky dokládá i její spoluautorský podíl na několika publikacích v kvalitních impaktovaných mezinárodních periodících. **Práci doporučuji k obhajobě.**

V Olomouci 24. května 2024

---

doc. RNDr./Petr Fryčák, Ph.D.  
Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Palackého v Olomouci