

Prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.
Ústav chemie a biochemie
Mendelova univerzita v Brně
Zemědělská 1
613 00 Brno

Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Andrey Čížkové
**Moderní mikroextrakční metody pro analýzy těkavých složek ve vzorcích
bylinného původu**

Disertační práce Ing. Andrey Čížkové je pojata moderním způsobem. Předložená disertační práce obsahuje současný stav problematiky, metodiku, experimentální část, výsledky, diskuzi a závěr, celkem 168 stran. Práce je přehledně uspořádána, sepsána srozumitelně, dobrým slohem, vyjadřování vystižné, po grafické stránce velmi dobře provedena.

Výběr tématu považuji za velmi aktuální a vychází ze zaměření pracoviště, kde autorka působí. Vývoj mikroextrakčních postupů s využitím dostupných technik (GC/FID, GC/MS) a jejich vzájemných kombinací považuji za správný krok v oblasti studia těchto látek. Každý nový poznatek v této oblasti je přínosem v oblasti extrakčních technik. Cílem této disertační práce je nalézt vhodné mikroextrakční metody pro izolaci těkavých složek z rostlinného materiálu (čajové směsi a koření). Autorka se tohoto úkolu ujala aktivně a důsledně, o čemž svědčí dosažené výsledky.

Za velmi cenné považuji:

Velmi dobrou systematičnost celé disertační práce. Z toho vyplývá, že autorka je dobrým vědeckým pracovníkem v dané oblasti.

Vzájemnou propojenost analytické chemie s potravinářskou chemií.

Autorčinu publikační činnost 2 vědecké práce s vysokým impakt faktorem.

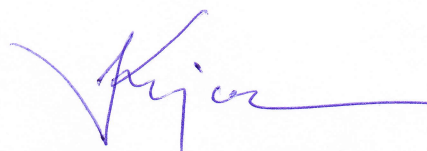
K autorce mám následující dotaz: mohla by jste srovnat výhody – nevýhody porovnání extrakčních technik pro stanovení silic pomocí superkritické fluidní extrakce a mikroextrakčních technik?

Závěr:

Disertační práci Ing. Andrey Čížkové nelze vytknout žádné závažné chyby. Z materiálu je zřejmé, že se autorka s daným problémem vyrovnala velmi dobře a je velmi dobrým odborníkem v oblasti nejen analytické chemie, ale i potravinářské chemie. Oceňuji především systematičnost celé práce s širokým rozsahem jednotlivých analytických

metod. Bylo dosaženo velmi cenných výsledků. Velmi oceňuji autorčinu publikační a vědeckou činnost. Autorka je autorem, či spoluautorem 2 vědeckých prací s velmi vysokým impakt faktorem. Po prostudování , některých autorčiných vědeckých prací jasně vyplývá, že autorka je velmi dobrým odborníkem v oblasti analytické chemie. Nezbyvá než konstatovat: **doporučuji** komisi doktorského studijního programu v oboru "Analytická chemie" přijmout disertační práci "**Moderní mikroextrakční metody pro analýzy těkavých složek ve vzorcích bylinného původu**" Ing. Andree Čížkové k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělit Ing. Andree Čížkové akademický titul "**Ph.D.**".

V Brně 19. srpna 2015



prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Posudek disertační práce

s názvem

„Moderní mikroextrakční metody pro analýzy těkavých složek ve vzorcích bylinného původu“

vypracované ing. Andreou Čížkovou na Katedře analytické chemie,
Fakultě chemicko-technologické, Univerzity Pardubice v roce 2015

Téma práce

Práce se zabývá aplikací, optimalizací a srovnáním mikroextračních metod při analýze těkavých složek vzorků rostlinného původu. Současný důraz na rozvoj metod analytické chemie je z velké části věnován právě vývoji takových metod úpravy vzorků, které jsou rychlé, ekonomické a šetrné k životnímu prostředí. Předkládaná práce tak svým obsahem plně zapadá do tohoto aktuálního trendu. Práce navíc využívá rovněž pokročilé statistické metody optimalizace analytického postupu. Navíc analýza biologického materiálu v kombinaci s těkavými cílovými látkami přináší další stupně obtížnosti. Z tohoto hlediska je téma práce poměrně ambiciózní.

Rozsah a formální úroveň práce

Předkládaná práce má rozsah 163 stran, 23 stran příloh, obsahuje 127 citací a její součástí jsou kopie dvou článků v kvalitních zahraničních časopisech, jejichž je předkladatelka práce spoluautorkou. Výsledky práce jsou shrnuty v 79 tabulkách a 119 obrázcích (včetně příloh). Celkový rozsah práce je poměrně velký, což značně odrazuje jak potencionálního čtenáře, tak oponenty.

Práce je rozdělena do standardních kapitol, které jsou svým relativním rozsahem přiměřené.

Grafická úroveň práce je na vysoké úrovni, je vytištěna barevně, tabulky a obrázky jsou kvalitně zpracovány.

Stylistika jazyka je rovněž na velmi dobré úrovni, ovšem pár neobratností či hovorových výrazů do práce přesto proniklo (asi nejhorší příklad na str. 111: „Porovnání obouh metodou“). Na některých místech se mísí anglické a české názvy analytů v jednom odstavci (např. str. 142, kapitola 4.2.1.7, první odstavec: camfor (anglicky správně ovšem camphor) a kafr).

Největší kritiku zaslouží vysoký počet překlepů v práci, který je při současných možnostech kontroly pravopisu těžko omluvitelný. Všechny zjištěné překlepy jsem v práci označil tužkou a jejich seznam by byl příliš dlouhý. Pravdou však je, že překlepy nejsou takového rázu, že by znemožňovaly pochopení smyslu textu.

Faktické připomínky, komentáře a dotazy

1. Str. 62, kapitola 2.7, druhý odstavec: „Retenční index není závislý na provozních podmínkách s výjimkou polaritý stacionární fáze“ - RI je ovšem závislý i na teplotě
2. Str. 63, kapitola 2.7, rovnice 12: za RTx lze v rovnici dosadit retenční časy pouze v případě, že retenční teplota eluce analytu je lineárně závislá na čase
3. Str. 81, není popsáno, co je míněno pod provedením kvantitativní analýzy metodou kalibrační přímky pomocí MHE (multi headspace extrakce). Teprve ke konci práce (str. 152, kapitola 4.2.2.2) se dozvídáme odkaz na původní pramen, princip metody však zůstává neobjasněn.
4. Str. 86, kapitola 4.1: chybí jednoznačná definice odezvy použitého modelu optimalizace. V této kapitole bylo provedeno objektivní hodnocení přípravy bylinných nápojů pomocí GC-FID, aby byla nakonec zvolena příprava nápojů čistě podle senzorického hodnocení. Z tohoto pohledu bylo objektivní měření zbytečné a výsledek by se nezměnil.
5. Str. 88, kapitola 4.1.2 Senzorická analýza bylinných čajů: není zcela objasněn důvod provedení této analýzy a chybí závěry z ní vyplývající.
6. Str. 94, kapitola 4.1.3: opět chybí jednoznačná definice odezvy modelu – byly použity plochy píků zmíněných tří analytů nebo jejich součet, nebo součet ploch všech píků? Na str. 98 je zmíněno použití interního standardu, ovšem ten není nikde upřesněn.
7. Str. 104 a 105, Tab. 24 a 25: Jak lze vysvětlit rozdíly v hodnotách LOQ pro GC-FID v rozsahu 3 řádů? V Tab. 24 jsou LOQ v jednotkách ng/ml, zatímco v Tab. 25 v jednotkách µg/ml.
8. Str. 105, Tab. 25: číselné hodnoty směrnice a úseků kalibračních rovnic jsou uvedeny s velmi optimistickou přesností; zde by bylo na místě vhodné zaokrouhlení. Obdobný problém se vyskytuje i na některých dalších místech práce (např. Tab. 28 na str. 108). Koncentrace analytů na str. 108 v kapitole 4.1.7 jsou nesmyslně přesné.
9. Str. 107, Tab. 27: porovnáním číselných hodnot směrnice a úseků kalibračních rovnic s přílohou Ic ukazuje na nesrovnalosti se zaokrouhlováním hodnot. Např. hodnoty pro borneol v tabulce $y = 0,231x + 0,02$ vs. příloha $y = 0,2315x + 0,0279$.
10. Str. 107, kapitola 4.1.6: v přílohách chybí v textu zmiňovaná příloha Id. Stejně tak chybí v příloze IIb grafické znázornění opakovatelnosti metody SPME-GC-MS popisované v kapitole 4.1.7 na straně 108.
11. Při zřetelném pohledu na obr. 1.a. a 1.b. v příloze III je patrné chybné označení píků 3 a 4 pro kafr a mentol v obr. 1.b.
12. Str. 111, bylo by vhodné okomentovat důvod, proč poskytuje metoda SPME statisticky významně vyšší hodnoty oproti metodě SDME. Rovněž srovnání přesnosti obou metod by bylo pro čtenáře zajímavé.
13. Kapitola 4.1.8.2, str. 112 - 115: tato důležitá kapitola obsahující pracně získané výsledky je zcela bez komentáře a jakýchkoliv závěrů.
14. Kapitola 4.2.1, str. 116: toto je velmi vhodný objekt pro multifaktorovou optimalizaci např. metodou CCD. Je škoda, že byl přesto zvolen postup OVAT.
15. Str. 123, kapitola 4.2.1.3 a Tab. 49: podle jakého kritéria byly vybrány „klíčové sloučeniny“, protože s plochami píků to nekoreluje. V textu jsou uvedeny jako klíčové pro šarži B thymol (0,5 %) a estragol (0,3 %), přičemž z tabulky 49 lze odečíst pro p-cymen 7,7 % a L-fenchon 5,5 %. Obdobné nejasnosti jsou i ve srovnání textu na str. 127 s hodnotami v tab.

50 pro čaj Zažívání, a pro tentýž čaj na str. 140 a tab. 60, kde je v textu uveden jako dominantní estragol, ale v tabulce je majoritně zastoupen karvon.

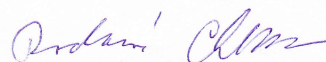
16. Str. 143, kapitola 4.2.2.1: je zmíněna analýza koření metodou mikrodestilace, ovšem výsledky nejsou nikde uvedeny
17. Jakým způsobem byla provedena identifikace jednotlivých terpenů, protože mají relativně velmi bohatá EI-MS spektra? MS software často nabízí kandidáty látek prakticky se nelišící shodou spekter (match faktorem).
18. Některé zdroje (citace) jsou v seznamu literatury uvedeny způsobem, který neumožní jejich dohledání (40, 43, 78, 114).

Závěr

Vzhledem k množství a nepochybné kvalitě získaných výsledků mohla práce dosáhnout lepší úrovně. Analýza dosažených údajů mohla být jistě hlubší a detailnější. Současně trpí práce relativně velkým rozsahem a mohla být v některých částech stručnější. Přes uvedené nedostatky je však práce dostatečně kvalitní a splňuje požadavky na disertační práci. Proto ji doporučuji k přijetí a obhajobě.

V Praze, 20. 8. 2015

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.



OPONENTSKÝ POSUDEK

na doktorskou disertační práci zpracovanou na téma
„Moderní extrakční metody pro analýzy těkavých složek ve vzorcích bylinného původu“

Autor disertace: **Ing. Andrea Čížková,**

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie

Oponent: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.,**

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany ŽP

Předkládaná disertační práce je zaměřena na vysoce aktuální problematiku, kterou je aplikace moderních mikroextrakčních metod pro stanovení těkavých látek izolovaných ze vzorků bylinných čajů a koření. Disertační práce je rozdělena do šesti základních kapitol; rozsáhlá teoretická část je rozčleněna na 9 podkapitol a po obsahové stránce poskytl teoretická část autorce disertace dostatek informací, na jejichž základě mohla naplánovat své rozsáhlé experimenty. Aplikaci vhodných mikroextrakčních postupů, což bylo cílem této disertační práce, ověřovala na čajích připravených z bylinných směsí, dále na sypkých bylinných čajích a na koření oregano. Právě u posuzování koření oregano využila poznatky ze své stáže v Univerzitě v Turíně, v Itálii.

Disertační práce je velmi rozsáhlá a svědčí o tom, že její autorka pro splnění vytčených cílů musela zvládnout více preanalytických a analytických technik, aby mohla provést všechny v práci diskutované analýzy. Po obsahové stránce je práce zpracována na velmi vysoké úrovni, což však nelze říci o stylistické části této disertace; kromě menšího množství překlepů jsou zde obsažena zejména některá nevhodně zvolená slova, špatné mluvnické tvary, nevhodně použité předložky a ve větách často chybí slovesa, a to zejména v experimentální části práce, což činí práci poněkud nepřehlednou. Platí to například pro obsahovou látku karvakrol, která je v tomto tvaru obsažena v tabulce 70, zatímco v nadpisu této tabulky je tato látka uvedena jako carvacrol. V jednotlivých odstavcích se často opakuje několikrát stejné sloveso, např. uvedeno; jsem toho názoru, že český jazyk poskytuje dostatek jiných možností, aby se text stal více čtivým. Také užívání slovíčka „či“ lze posoudit spíše jako slangové, v mnoha případech by bylo vhodnější je nahradit slůvkem „nebo“ a „případně“; v textu se vyskytlo toto slovíčko téměř 30x.

Kromě těchto stylistických chyb jsou v práci prezentovány také některé nesprávné výrazy a příslušné věty jsou použity tak, že zcela neobjasní řešenou problematiku;

- na str. 16 je napsáno, že se používá metoda s iontově plamennou detekcí, patřilo by tam spíše plamenoionizační detektor nebo plamenový ionizační detektor,

- výraz R^2 není hodnota spolehlivosti, nýbrž koeficient determinace,
- věta „Pro volbu teploty byla použita čajová směs....“ (str. 116) je zmatečná,
- rovněž zcela nesouhlasím s částí věty uvedené na str. 123 (...stanovili metodou HS-SPME...); metoda HS-SPME slouží pro izolaci analytu z matrice, nikoliv pro stanovení,
- také věta prezentovaná na str. 129 (...bylo detekováno 44 píků, z toho 37 sloučenin...) není správná, spíše by tam mělo být uvedeno, že na chromatogramu bylo separováno 44 píků, z nichž 37 představovalo identifikované látky,
- co znamená výraz nejintenzivnější sloučenina,
- v práci není jasně specifikováno, jak byly kombinovány teploty 80 °C a 40 °C; v této souvislosti bylo by vhodné vysvětlit část věty ze str. 134 (...vždy pro teplotu v kombinaci těchto teplot...)
- bylo by dobré si ujasnit, kdy je vhodné uvádět slova „nalezeno, stanoveno, identifikováno, izolováno“; potom by asi věta prezentovaná na str. 157 nemusela znít „Stanovením bylo zjištěno, že větší množství silic bylo nalezeno za použití metody DI – SPME“, nýbrž třeba „Pomocí metody DI – SPME bylo stanoveno větší množství silic“.
- str. 157 – množství se spíše stanovuje, ne určuje
- také následující věta není příliš srozumitelná „Pomocí multi-headspace mikroextrakce bylo určeno množství nejvíce thymol a karvakrol, tj. majoritních složek silic“.

I přes tyto uvedené chyby a ne vždy jednoznačná objasnění však mohu konstatovat, že tato disertační práce je velmi obsažná, po odborné stránce je na vysoké úrovni, protože jejím řešením bylo získáno velmi mnoho hodnotných výsledků, na něž budou moci navázat další studenti řešící diplomové a disertační práce.

Experimentální část byla velmi náročná zejména z časového hlediska, protože studentka musela nejprve veškeré vzorky čajů připravit a následně u nich ověřovat dva způsoby mikroextrakce, a to mikroextrakci tuhou fází a mikroextrakci jednou kapkou v různém provedení. Veškeré experimenty byly zpracovány do přehledných tabulek a značná část výsledků byla statisticky zhodnocena moderními statistickými metodami. Předpokládám, že takové úctyhodné množství výsledků experimentálních studií bude dále zpracováno do publikací, kde by se výše specifikované omyly již neměly vyskytovat.

K práci nemám již žádné podstatné připomínky, pouze bych pokládala za přínosné a zajímavé, aby mi Ing. Čížková v rámci odborné rozpravy při obhajobě zodpověděla následující dotazy:

1. V práci uvádíte, že prodlužování doby extrakce nepřinese významnější zlepšení účinnosti extrakce. Pro kolik bylinných čajů byl tento Váš poznatek potvrzen?
2. Prováděla jste porovnání stanovení silic pomocí GCIFID a GC/MS u stejných vzorků čaje? Pokud ano, můžete to při obhajobě dokumentovat, případně porovnat Youdenovou metodou?
3. Předpokládám, že Vaše výsledky jsou součástí nějakého projektu řešeného na Katedře analytické chemie. Pokud ano, byly již výsledky výzkumu, na kterém jste se podílela, předány do praxe?

Závěrečné kapitoly disertační práce tvoří seznam použité literatury (127 citací) a vlastní příspěvky a publikace autorky disertace. Ing. Andrea Čížková byla spoluautorem dvou článků uveřejněných v časopisech s IF, a to Food Chemistry – 1x, J. Sep. Sci – 1x; jednoho článku v domácím odborném recenzovaném časopise, dále vesměs jako hlavní autor nebo spoluautor přednesla 17 sdělení na mezinárodních a domácích konferencích a seminářích a plakátová sdělení uvedla na pěti mezinárodních a domácích vědeckých konferencích. Tuto její prezentaci dílčích výsledků ještě v průběhu doktorského studia považuji za velmi významnou.

Proto mohu závěrem konstatovat, že předložená disertační práce Ing. Andrei Čížkové splňuje veškerá kritéria Studijního a zkušebního řádu Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice a proto doporučuji tuto práci přijmout k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu udělit jmenované vědeckou hodnost Ph.D.

Brno, 28. 8. 2015


Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

FCH VUT v Brně