

Oponentský posudek
doktorské disertační práce Ing. Evy Dadákové
„Vývoj metodiky stanovení významných flavonoidů a její aplikace na vybrané
zemědělské plodiny“

V poslední době výrazně stoupá zájem o analytické metody, které mohou rozdělit a stanovit látky flavonoidního charakteru, které mají řadu příznivých biologických účinků na lidské zdraví. Zejména flavonoly s nejrozšířenějším aglykonem kvercetinem a jeho glykosidem rutinem mají výrazné antioxidační účinky a působí preventivně proti vzniku a rozvoji onemocnění srdce a cév.

Přínosem práce je využití méně rozšířené metody kapilární zónové elektroforézy (CZE) pro stanovení těchto látek v širokém souboru zeleniny a ovoce a rovněž nápojích bohatých na tyto látky. Přínosem je optimalizace analytických postupů pro stanovení obsahu kvercetinu a rutinu a srovnání parametrů metody kapilární elektroforézy s HPLC metodou z hlediska pracovního rozsahu metody, meze detekce a stanovitelnosti a hodnoty rozšířené nejistoty měření. Dalším přínosem jsou pak konkrétní údaje o obsazích stanovovaných flavonoidů v jednotlivých rostlinných zdrojích, jejich změnách během skladování a dalších technologických úpravách.

K vlastní práci mám několik připomínek a dotazů:

- str. 12: lepší formulace...hydroxybenzoová a hydroxyskořicová kyselina a jejich deriváty...
- str. 12: vzhledem k tomu, že leukoanthokyanidiny se nevyskytují ve formě glykosidů, volil bych spíše tento název pro tuto skupinu látek, než název leukoanthokyany (viz srovnání anthokyany – glykosidy a anthokyanidiny – aglykony)
- str. 13, 3. ř.zd.: *p*-kumarová kyselina – označení *o*-, *m*-, *p*- psát italicou
- str. 22: ...teaflaviny, tearubiginy a také teasinensiny. Jak se vzájemně liší a jak se liší fermentované čaje od zelených v zastoupení flavonoidních látek?
- V obilovinách převažují spíše flavony – např. ječmen, pšenice...
- str. 29: spíše česky β -O-D-rutinosid kvercetinu, kvercetin-O-D-rutinosid je způsob převzatý z anglosaské literatury
- str. 33: v práci sjednotit: buď isoflavony nebo izoflavony
- str. 38 a další: ...získán...; ...citrónové kyseliny (obrácený slovosled v nomenklatuře organických kyselin než je tomu u anorganických kyselin) – salicylová kyselina, acetylsalicylová kyselina, benzoová kyselina, 1-naftylactová kyselina, askorbová kyselina (str. 59) atd.
- str. 43: Ze zbývajících materiálů...
- str. 56: název sodium dodecyl sulfát je převzat z anglosaské nomenklatury, dle systematické nomenklatury organických sloučenin (Názvoslovná pravidla IUPAC, Chem. Listy 95, 650-690 (2001) by mělo být natrium-dodecyl-sulfát
- str. 60: NaHCO₃ (2 g); ...provedena neutralizace přídavkem...
- str. 61: (TBHC) jako antioxidantu; TBHC
- str. 65: Supernatanty...
- str. 68: ... (NH₂, CN)...
- str. 72: ...kvercetinu v kontrolním vzorku...
- str. 75: 200 %

- str. 80: HPLC a CZE ač principiálně rozdílné, přesto poskytují výsledky stanovení rutinu dostatečně shodné. Bylo by možné velmi stručně charakterizovat přednosti i nedostatky obou metod, tj. srovnat je komplexně a z tohoto srovnání vyvodit vhodnost a doporučení jejich použití pro stanovení flavonoidních látek za určitých daných podmínek? Jedná se o stručné srovnání všech parametrů u obou metodik.
- Cenným poznatkem vícekrát potvrzeným je, že paprika červená a cibule žlutá a červená představují nejbohatší zdroje kvercetinů v naší výživě. Ovšem je nutno vzít v úvahu i množství konzumované plodiny, např. pro srovnání brambory a cibule. U ovoce je již tento faktor zohledněn (viz jablka x jeřáb červený). Zajímavý je poznatek o vysokém obsahu celkového kvercetinů v šalotce (zatím jsou dostupné údaje především pro různobarevné cibule).
- Jak by bylo možné vysvětlit pokles obsahu celkového kvercetinů během skladování (chemická degradace)? Mohlo by docházet během enzymatických hydrolytických procesů k jeho uvolňování z glykosidických forem nebo naopak k biosyntéze? Někteří autoři potvrzují úbytek anthokyanových glykosidů červené cibule během skladování, např. Gennaro L., Leopardi C., Esposito F., Salucci M., Maiani G., Quaglia G., Fogliano V.: Flavonoid and carbohydrate contents in Tropea red onions: Effects of homelike peeling and storage. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 1904-1910, zatímco jiní během skladování zjistili dokonce nárůst 3,4'-O- β -D-diglukosidu kvercetinů, např. Okamoto D., Noguchi Y., Muro T., Morishita M.: Genetic variation of quercetin glucoside content in onion (*Allium cepa* L.). *J. Jap. Hort. Sci.*, 2006, 75: 100-108.
- V tepelné úpravě cibule je uvedeno pečení s minimálními změnami v obsahu kvercetinů. Lze souhlasit s poznatkem v práci Lombard K., Peffley E., Geoffriau E., Thompson L., Herring A.: Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *J. Food Comp. Anal.*, 2005, 18: 571-581, kteří během pečení zjistili nárůst 7-25 % obsahu kvercetinů?
- Mezi odrůdovými a meziročními rozdíly byly zjištěny jako statisticky nevýznamné. Lze ale charakterizovat alespoň tendence? Rozdíly mezi odrůdami mohou značně záviset na jejich výběru a ve skupinách různě barevných cibulí mohou být různé (viz výše zmíněná práce Okamoto et al., 2006).
- Při sušení květu bezu černého byl zjištěn pokles obsahu rutinu při sušení při vyšší teplotě (50 °C). Jak by asi vypadal v tomto kontextu obsah volného kvercetinů?
- Cenným poznatkem jsou nalezené obsahy kvercetinů v čajích černých, zelených, oolong, bylinných a ovocných). Je však uvážit, že především v klasických čajích je polyfenolický komplex nesmírně bohatý a jsou to především katechiny a gallokatechiny, které přispívají k antioxidačním účinkům zmíněných čajů.

Práce je velmi pečlivě zpracována na vysoké grafické úrovni s množstvím dokumentujících grafů, názorných obrázků a příloh. Je zpracována velmi přehledně se členěním do osmi hlavních kapitol a se seznamem prací vztahujících se k danému tématu. Práce je zpracována v českém jazyce na velmi dobré odborné úrovni a je dokumentována řadou odkazů. Publikační činnost doktorandky je dokumentována 2 původními články v impaktovaných časopisech v přílohové části a řadou prezentací

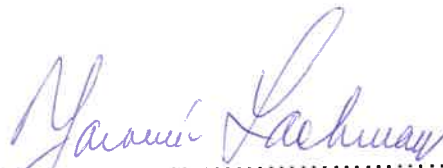
na mezinárodních i celostátních konferencích a rovněž řešením pěti grantů, kde byla Ing. Dadáková řešitelkou nebo spoluřešitelkou.

Na základě objektivního a kritického rozboru předložené disertační práce dle § 47, odst. 4, Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb.

d o p o r u č u j i

disertační práci Ing. Evy D a d á k o v é k přijetí k obhajobě a po úspěšné obhajobě udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 12. května 2006



.....
Prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
Česká zemědělská univerzita,
Kamýcká 129,
165 21 Praha 6 – Suchbátka

doc.Mgr. Bořivoj Klejdus,Ph.D.
ústav chemie a biochemie
MZLU v Brně
Zemědělská 1
613 00 Brno
klejdusb@seznam.cz

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Ing. Evy Dadákové „Vývoj metodiky stanovení významných flavonoidů a její aplikace na vybrané zemědělské plodiny“

Předložená doktorská disertační práce se zabývá vývojem metodiky stanovení významných flavonoidů ve vybraných zemědělských plodinách. Zaměření této disertační práce zcela odpovídá náplni doktorského studijního programu Zemědělská chemie, především díky své aplikaci pro monitoring významných flavonoidů v zemědělských plodinách.

Práce je prezentována tradičním způsobem (úvod, teoretická část, experimentální část, výsledky a diskuse a závěr). Práce je doplněna 2 publikacemi s IF faktorem (Electrophoresis IF 4,282; Chemické listy IF 0,345), ve kterých je doktorandka prvním autorem.

Za hlavní přednosti a přínosy disertační práce pokládám:

- vývoj a optimalizaci analytické koncovky pro stanovení rutinu a kvercetinu pomocí kapilární zónové elektroforézy
- optimalizaci extrakčních postupů
- monitoring rutinu v pohance

K vlastní práci mám několik připomínek a dotazů:

Formální stránka:

- z hlediska grafického bych doporučil zarovnat text do sloupců, nezarovnaný text působí rušivě.

Věcné připomínky , otázky a náměty do rozpravy:

- str.14 řasy a houby flavonoidy neobsahují ?!
- str. 27 popište štěpení glukosidické vazby pomocí enzymů
- str.28 extrakce bývá provedena v Sox. Extraktoru ve varné baňce pod zpětným chladičem a za pomocí ultrazvuku
- popište vliv teploty na štěpení glukosidické vazby

- popište přednosti a úskalí SFE při extrakci flavonoidů
- v teoretické části postrádám podkapitulu věnovanou SPE, která bývá u tak složitých matric jakou je rostlinný materiál nezbytná (v praktické části je SPE použita)
- str.61 optimalizace extrakčního postupu pro rutin..
proč byl zvolen 50% methanol? Byla prováděná extrakční studie jiných koncentrací methanolu? Jaká je rozpustnost rutinu ve vodných methanolických roztocích?
- vysvětlíte pokles obsahu rutinu při delších extrakčních časech?
- kap. 6.1.4.5.1. proč byly vybrány SPE sorbety $-NH_2$, $-CN$, $-Si$ pro separaci flavonoidů? Byl proveden s těmito sorbety stejný extrakční protokol jako s C18 sorbenty?
- je správné: chemicky modifikovanou oktadecylovou fází ($-NH_2$, $-CN$) ?
- jaký typ interakce je možný u flavonoidních látek typu rutinu a kvercetin u vytypované sorbenty?
- Kap. 6.1.4.5.4. testování kolonek Strata X. Jak byla provedena SPE extrakce na kolonkách Strata X? Jsou nutné promývací kroky u polymerních sorbetů? Pokud ne tak proč?

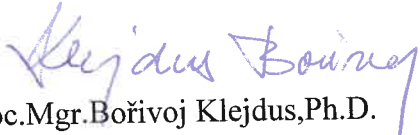
Závěr:

Doktorandka Ing. Eva Dadáková předloženou disertační práci a publikovanými výsledky prokázala schopnost pracovat týmově či samostatně v oblasti aplikovaného výzkumu. Dosáhla velmi zajímavých a cenných výsledků v oblasti zemědělské chemie. Své výsledky prezentovala ve vědeckých časopisech (v případě Electrophoresis s vysokým impakt faktorem IF 4,282) a na řadě národních a mezinárodních konferencích..

Práce splnila po všech stránkách požadavky kladené na § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách .

Doporučuji ji přijmout k obhajobě a souhlasím, aby byl po jejím úspěšném obhájení udělen Ing. Evě Dadákové akademický titul „Ph.D.“

V brně 29.5.2006


doc.Mgr.Bořivoj Klejdus,Ph.D.



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Biotechnologické centrum

Studentská 13, 370 05 České Budějovice

doc. Ing. Vladislav Čurn, PhD.

☎ *420-387772588

fax: *420-387772588

e-mail: curn@zf.jcu.cz

Oponentský posudek na disertační práci
Ing. Evy Dadákové

„Vývoj metodiky stanovení významných flavonoidů a její aplikace na vybrané zemědělské plodiny“

Předložená doktorská disertační práce řeší velmi specifickou problematiku aplikace techniky kapilární elektroforézy, vývoje a ověření analytické metody pro stanovení obsahu dvou flavonoidů – kvercetinu a rutinu ve vybraném souboru ovoce, zeleniny a nápojů.

Po formální stránce se jedná o kvalitně zpracovanou práci, doplněnou publikovanými pracemi autorky. Členění práce pak odpovídá standardu kladenému na disertační práci, byť je poněkud netypické. Dle mého názoru „*Experimentální část*“ zahrnuje nejen v této kapitole uvedené metodické postupy přípravy materiálu a analýzy ale i následující kapitolu „*Výsledky a diskuse*“.

Úvodní kapitola podává přehled o problematice disertační práce – biosyntéze flavonoidů, jejich významu, zastoupení v ovoci a zelenině a značná pozornost je věnovaná i problematice analýzy těchto látek. Podaný přehled je zajímavý, uvádí problematiku, kterou se disertační práce zabývala, poznámku bych mohl mít k *plynulosti textu*, kdy ve snaze obsáhnout velké množství informací jsou některé pasáže psány příliš zkratkovitě.

Velmi jsem ocenil vložení kapitoly *Cíle práce*, kde jsou vhodnou formou naformulované cíle disertační práce.

Experimentální části, výsledkům a diskusi je pak věnována obsáhlá část disertace. Výsledky představuje nově vyvinutý a ověřený metodický postup přípravy vzorku, extrakce analyzovaných látek a vlastní analytická a detekční metoda. Vývoj metody je velmi pečlivě a podrobně dokumentován a zhodnocen. Rovněž tak

součástí práce jsou výsledky, které byly na základě vyvinutého metodického postupu získány. Možná, že bych se klonil k oddělení kapitoly Výsledky a Diskuse, zejména z důvodu větší přehlednosti a také zvýraznění dopadu práce disertantky a porovnání jejích výsledků s dosud publikovanými pracemi.

V části Závěry jsou uvedeny jasně formulované a korektní výstupy práce doktorandky. Na základě dosažených závěrů práce a publikovaných výsledků mohu konstatovat, že cíle disertační práce byly beze zbytku naplněny, že výsledky disertace jsou velmi cenné a významné z pohledu teoretického, metodického i z pohledu praktického uplatnění výsledků.

Práce je doplněna seznamem literárních pramenů, přehledem vlastních prací disertantky a přehledem grantových projektů, které řešila.

Připomínky a poznámky

k práci mám řadu poznámek a připomínek týkajících se jak drobných formálních nedostatků, tak i věcných otázek:

- Řada připomínek se týká formálního zpracování práce - překlepy, formátování textu, místy příliš stručné až heslovité vyjadřování.
- v anglickém abstraktu by bylo vhodné používat jednotně vědecké názvy analyzovaných rostlinných druhů, kromě toho správné „anglické jméno“ pro *Fagopyrum tataricum* je *tartarian buckwheat*.
- ocenil jsem vložení anglického *Summary*, nicméně kapitoly *Souhrn* a *Závěr* mi poněkud splývají, vyskytují se v nich obdobné formulace a kromě toho kapitola *Závěr* obsahuje konkrétnější a věcnější formulace.
- Pohanka je významnou starou plodinou, pěstovanou i na našem území. Proto se domnívám, že pro uvedení pěstování „řady odrůd“ by bylo vhodnější citovat domácí zdroje. Kromě toho kapitola o pohance je v nepoměru ke kapitolám *Ovoce a zelenina* a *Nápoje*.
- Kapitola *CZE a MECC* – popisuje metody kapilární elektroforézy a techniku *MEKC*. Domnívám se, že by bylo vhodné sjednotit označení těchto metod.
- Poznámka ke vzorkování rostlinného materiálu – po přečtení kapitoly *Literární přehled* jsem nabyl dojmu, že vzhledem k zachování stability analyzovaných látek je nejvhodnějším postupem lyofilizace vzorku, jeho homogenizace a uchování v mrazáku. V experimentální části je pak uveden postup, kdy vzorky byly zamrazeny (na -16°C , proč ne na -20°C ?) a pak během 1 měsíce lyofilizovány. Byl u všech vzorků dodržen stejný postup? Nemohla mít pozdější lyofilizace vliv na obsah analyzovaných flavonoidů?
- V práci mi chybí přesnější popis analyzovaného rostlinného materiálu, v popisu materiálu uvedený počet 14 resp. 15 druhů ovoce a zeleniny s tím, že vzorky byly zakoupeny v obchodní síti a odebrány v konzumní zralosti je poněkud nedostatečný. Je obsah studovaných flavonoidů druhově stálý? Byl uvažován vliv odrůdy a pěstitelských podmínek? Resp. je něco známo o těchto dvou faktorech a jejich vlivu na obsah flavonoidů? Mění se obsah flavonoidů se zráním plodů? Osobně se domnívám, že zejména ovoce,

- kteřé je k dostání v obchodní síti má dosti daleko k přirozenému stavu (z pohledu dozřívání).
- Kap. 5.1.2 a úvodní pasáže kap. 5.1.6., 5.1.7., 5.1.7.1. jsou spíše charakteru literárního přehledu.
 - Kap. 5.1.2.2. – nemohlo dojít ke zkreslení výsledků na základě toho faktu, že analýza byla prováděna jen jednou a navíc z netypického vzorku cibule?
 - Jsou sice uvedeny použité chemikálie a přístroje, ale není podána informace o analyzovaném materiálu.
 - Statistické hodnocení – proč nebyly pro vyhodnocení dat použity běžné statistické programy, např. Statistica? Navíc v disertaci postrádám statistické vyhodnocení dat, údaje v tabulkách jsou uvedeny absolutními zjištěnými hodnotami, bez dalšího vyhodnocení.
 - Volba délky extrakce u pohanky – u nažek dochází k poklesu obsahu rutinu již po 30 minutách extrakce. Proč i u tohoto typu materiálu byla zvolena délka extrakce 60min?
 - Kapitulu Vývoj metody bych patrně rozdělil tak, aby byl zdůrazněn výsledek práce disertantky, optimalizované pracovní postupy se pak mírně „ztrácí“ s obrovským souborem informací.
 - Na obr. 22-23 jsou uvedeny výsledky stabilitních analýz, jsou meze spolehlivosti nastavené správně?
 - Kap. 6.2.3. resp. její název napovídá, že se bude týkat širšího spektra materiálu než jen bezu. Navíc v této části i v části popisu metod se analýza bezu vyskytuje ve dvou oddělených kapitolách.
 - Kde byly získány vzorky křídlatky a jak si lze vysvětlit řádově odlišné hodnoty naměřené u jednoho ze vzorků?

Autorka předložené disertační práce výrazně prokázala schopnost samostatné vědecké práce, práce s literaturou a interpretace získaných dat. Předložená práce je splňuje všechny požadavky a dokumentuje kvalitu dosažených výsledků. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělit Ing. Evě Dadákové akademický titul „Doktor“.



doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta