

### Z á z n a m

#### **z vědecké rozpravy při obhajobě disertační práce Ing. Evy DADÁKOVÉ dne 22. června 2006**

V úvodu seznámil předseda komise prof. Kalač přítomné s jedinou došlou odezvou na rozeslané autoreferáty disertační práce: Dr. D. Elhottová z Ústavu půdní biologie AV ČR v Č. Budějovicích příznivě hodnotila práci a položila dotaz na porovnání analytických postupů stanovení flavonoidů kapilární elektroforézou a HPLC. Tato problematika byla podrobně zodpovězena v předchozích odpovědích doktorandky oponentovi doc. Klejdusovi.

#### Vlastní rozprava:

- prof. Kalač: jsou v literatuře k dispozici údaje o biologické využitelnosti kvercetinu a rutinu z potravy ?  
Odpověď: tyto údaje jsou zatím jen ojedinělé a liší se. Je uváděna velmi nízká využitelnost, ale jiné údaje uvádějí uspokojivou. Shoda je v tom, že z biologických materiálů (ovoce a zeleniny) je využitelnost vyšší než z čistých preparátů ve formě potravních doplňků.  
Reakce prof. Kalače: ano, to je v souladu se zjištěními u četných dalších biologicky významných látek.
- prof. Kalač: existuje vysvětlení, proč je právě v pohance tak vysoký obsah rutinu ?  
Odpověď: S vysvětlením jsem se v literatuře nesečkala.  
Rovněž členové komise tuto záležitost nedokázali vysvětlit.
- prof. Kubáň: jaké jsou možnosti identifikace dalších látek, které se objevují v elektroforetickém záznamu?  
Odpověď: k tomuto účelu by bylo výhodné využití metod MS. V současnosti probíhá spolupráce s pracovištěm AV ČR, které je vybaveno přístrojem LC/MS.
- doc. Klejdus: bylo by možné využít pro identifikaci látek jejich UV/VIS spektra?  
Odpověď: kvalitativní informační hodnota těchto spekter je poměrně malá a jejich využití v oblasti identifikace látek je jen velmi omezené.
- doc. Šafařík: jaké jsou možné příčiny rozdílů v obsahu sledovaných flavonoidů ve světlém a tmavém pivu?  
Odpověď: možná příčina může být hledána v odlišnostech v technologickém postupu při výrobě, například při přípravě sladu.  
V následné živé diskusi zmínil doc. Klejdus pokusy o výrobu piva z pohanky a zajímavou možnost využití takového nápoje jako zdroje rutinu.

Zapsal: doc. J. Špička



Ing. Eva Dadáková  
katedra aplikované chemie a učitelství chemie  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Studentská 13  
České Budějovice 370 05

Odpovědi na připomínky doc. Ing. Vladislava Čurna, Ph.D. JU v Českých Budějovicích

Děkuji za cenné připomínky a upozornění ohledně grafických parametrů práce.

### **Vzorkování rostlinného materiálu**

Všechny vzorky prošly procesem zmrazení při  $-16^{\circ}\text{C}$ , potom v rozmezí 2 až 4 týdnů byly lyofilizovány za popsanych podmínek, bezprostředně po lyofilizaci homogenizovány a až do analýzy uchovávány v uzavřených vzorkovnicích při  $-16^{\circ}\text{C}$  (naměřená teplota v použitém mrazicím boxu). Rozdíl zhruba 2 týdnů podle mého názoru by neměl mít výrazný vliv na obsah flavonoidů.

### **Přesný popis analyzovaného ovoce a zeleniny**

Soubor ovoce a zeleniny byl sestaven tak, aby představoval běžně konzumované druhy. Výsledky by měly laickému spotřebiteli dát představu o obsahu kvercetinu. Informace o odrůdě prodávaného ovoce a zeleniny často v obchodě chyběla a snaha získat tento údaj narážela na hrubé nepochopení ze strany zaměstnanců prodejny („Vy jste z Obchodní inspekce? Ale to musíte dát předem vědět!“).

Odrůda a pěstitelské podmínky mají na obsah flavonoidů vliv. Obsah fenolických látek během zrání se mění, obsah některých (katechiny) během zrání klesá, u jiných se obsah během dozrávání zvyšuje (anthokyany,). U flavonolů je obsah v rámci jednoho plodu nerovnoměrný (více ve slupce, směrem do středu plodu se obsah snižuje, Davídek, 1983).

Souhlasím s tím, že ovoce a zelenina z obchodní sítě nebývá vždy v nejlepším stavu, ale je to zejména pro městského člověka výhradní způsob získání těchto potravin.

### **Analýza obsahu kvercetinu v jednotlivých suknicích cibule**

Myslím, že nerovnoměrné rozložení obsahu kvercetinu je pro cibuli typické, závěry potvrzují již dříve publikované údaje (Patil a Pike, 1995).

### **Statistické hodnocení dat**

Pro statistické hodnocení jsem použila nástroje programu MS Excel jako nejběžnější dostupný nástroj. Program Statistica běžně nepoužívám a nemám s ním zkušenosti.

### **Volba délky extrakce u pohanky**

Stejná doba extrakce (60 minut) byla zvolena z důvodů zjednodušení metody pro všechny typy vzorků pohanky. Pokles obsahu rutinu v nažkách při extrakci trvajících 60 minut je velmi nízký, zhruba 1% (viz obr. 12, str. 63).

### **Stabilitní studie**

Meze na grafech 22 a 23 představují hranice  $2\sigma$  a  $3\sigma$  ( $\sigma$  = kombinovaná nejistota odhadnutá rozborem dílčích nejistot).

### **Kuchyňské úpravy ovoce**

Pro tuto studii byly jako modelový materiál vybrány plody bezu černého (bezinky). Dá se předpokládat, že ostatní ovoce se bude při kuchyňských úpravách chovat podobně. Kapitola 6.2.5. se týká květu bezu černého.

### **Obsah celkového kvercetinu v křídlatce**

vzorky tří druhů křídlatky byly odebrány v okolí Českého Krumlova, vzorky pořizoval kolektiv analytické laboratoře Ústavu systémové biologie a ekologie. Nízký obsah celkového kvercetinu v křídlatce české je zřejmě druhovým znakem.

*Éow Dadačová*

Ing. Eva Dadáková  
katedra aplikované chemie a učitelství chemie  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Studentská 13  
České Budějovice 370 05

Odpovědi na připomínky Prof. Ing. Jaromíra Lachmana, CSc. ČZU v Praze

Děkuji za cenné připomínky a upozornění ohledně grafických parametrů práce.

### **Zastoupení flavonoidů v černém a zeleném čaji**

Zelený čaj obsahuje hlavně katechiny (epikatechingallát, epigallokatechingallát), přibližně 20% v sušině. Během fermentace dochází k enzymové oxidaci působením polyfenoloxidas a peroxidasy. Obsah katechinů klesá na asi 3%. Tvoří se teaflavin (dimer) a tearubigin. (Davídek, 1983). Pojem „teasinensin“ se mi nepodařilo najít.

### **Stručné srovnání parametrů metod HPLC a CZE**

Obě metody se hodí pro analýzu směsí látek podobných vlastností, protože mají vysokou rozlišovací schopnost, u obou technik je možné propojení s hmotnostním spektrometrem.

CZE umožňuje obvykle kratší dobu analýzy, má velmi nízkou spotřebu rozpouštědel. Na druhé straně vyžaduje předúpravu elektricky vodivých vzorků před analýzou. Zvláštní pozornost je třeba věnovat stavu kapiláry, na kterém závisí kvalita dělicího procesu.

U HPLC je nákladnější provoz (větší spotřeba velmi čistých rozpouštědel, dražší kolony). Metoda používá větší objem nástříku (řádově  $\mu\text{l}$  oproti  $\text{nL}$  u CZE), z čehož vyplývá i možnost dosažení vyšší citlivosti. Je to rozšířenější metoda.

### **Pokles obsahu celkového kvercetinu během skladování**

Během dlouhodobého skladování se glykosidy kvercetinu mohou rozpadat a uvolňovat volný kvercetin. Kvercetin může být oxidován na chinony a tím může klesat obsah celkového kvercetinu. Biosyntézu kvercetinu během skladování nepředpokládám.

Anthokyany jsou ve srovnání s ostatními skupinami flavonoidů méně stabilní, takže pokles jejich koncentrace je pravděpodobný.

### **Nárůst koncentrace kvercetinu během pečení (Lombard, 2005)**

Autoři v této práci konstatovali nárůst obsahu glukosidů kvercetinu v průběhu pečení a smažení cibule. Mechanismus syntézy kvercetinu se zdá příliš složitý na to, aby docházelo k poměrně vysokému přírůstku (25%) během pečení nebo smažení.

### **Tendence v meziodrůdových a meziročních rozdílech v obsahu kvercetinu v cibuli**

Vzhledem k tomu, že vzorky cibule použité pro stanovení obsahu celkového kvercetinu v letech 2001 a 2002 nebyla shodná odrůda, netroufám si z výsledků vyvozovat žádné závěry.

### **Pokles obsahu rutinu při sušení**

Největší úbytek obsahu rutinu při sušení květenství bezu černého byl pozorován při sušení při  $50^{\circ}\text{C}$ . Při sušení zřejmě dochází k rozpadu glykosidu a uvolnění kvercetinu. Jeho obsah však vzhledem k obsahu rutinu bude nízký. Volný kvercetin však může podléhat dalším reakcím, např. oxidaci.

Eva Dadáková

Ing. Eva Dadáková  
katedra aplikované chemie a učitelství chemie  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Studentská 13  
České Budějovice 370 05

Odpovědi na připomínky doc. Mgr. Bořivoje Klejduse, Ph.D., MZLU v Brně

Děkuji za cenné připomínky a upozornění ohledně grafických parametrů práce.

### **Obsah flavonoidů v řasách a houbách.**

Informaci jsem našla v knize : Kindl H., Wober B.: Biochemie rostlin, str. 289, 1981.  
Uznávám, že zdroj informace je poněkud starší. Nicméně přítomnosti flavonoidů v řasách a houbách jsem dále nevěnovala pozornost, protože nebyly předmětem mého zkoumání.

### **Štěpení glukosidické vazby pomocí enzymů**

Glukosidasy katalyzují štěpení glukosidů (glykosidů majícím jako cukernou složku glukosu) různých typů. Mezi nimi jsou důležité  $\beta$ -glukosidasy. Tyto enzymy jsou substrátově specifické, účastní se mnoha biochemických pochodů v rostlině. Například štěpí látky, které jsou zásobními glykosidickými formami látek obranného systému (kyanogenní glykosidy štěpí enzym emulsin a uvolňuje se kyanovodík, glukosinoláty štěpí myrosinasa). Glukosidasy jsou odpovědné za hydrolýzu konjugátů flavonoidů.

### **Str. 28**

Omlouvám se za neobratnou formulaci. Věta měla postihnout různé instrumentální možnosti provádění extrakce. Zřejmě lépe by bylo vyjádření: ...extrakce může být provedena buď v Soxhletově ekstraktu, nebo ve varné baňce pod zpětným chladičem, případně za pomoci ultrazvuku.

### **Vliv teploty na štěpení glukosidické vazby**

Se vzrůstající teplotou bude rychlost reakce růst, po dosažení teplotního optima enzymu bude rychlost klesat až k denaturaci enzymu.

### **SFE**

Principem superkritické fluidní extrakce je extrakce materiálu pomocí kapalného  $\text{CO}_2$ . Představuje velmi šetrný způsob extrakce přírodních látek (nízká teplota). Nevýhodou je náročné technické vybavení, ve srovnání s např. extrakcí v Soxhletově ekstraktu.

### **Použití 50% methanolu jako extrakčního činidla**

Metodika vychází z dříve publikovaných prací (Hertog, Kreft), ve kterých je používána koncentrace alkoholu 50, resp. 60%. Koncentrace rozpouštědla nebyla optimalizována. Rozpustnost rutinu v různých vodně-methanolicích roztocích nebyla testována. Pro 50% methanol je rozpustnost 0,4% a tedy předpokládám plnou rozpustnost v rámci pracovního rozsahu. Případná nedostatečná rozpustnost rutinu by se projevila při vyhodnocení standardního přídatku.

### **Pokles obsahu rutinu při delších extrakčních časech**

Pokles je vzhledem k celkovému obsahu rutinu malý. Rozklad rutinu při delších extrakčních časech je možný. Případný úbytek analytu je korigován pomocí standardního přídatku.

### **Testované typy SPE kolon**

Uvedené typy SPE kolon byly pracovišti k dispozici. V rámci experimentu bylo se všemi kolonkami zacházeno stejným způsobem. „Chemicky modifikovaná oktadecylová fáze“ je chybný termín. Tyto kolonky nemají zakotvený řetězec C18, ale kratší, pravděpodobně C3.

### **Typ interakce na vytypovaných sorbentech**

Na sorbentech typů NH<sub>2</sub>, CN a Si nedocházelo k zachycení sledovaných látek. Pro kolonky RP-18 je typická nepolární interakce. Analyty jsou sorbovány z kyselého roztoku, v kterém je potlačena disociace fenolických skupin.

### **Testování kolonek STRATA-X**

Extrakce kvercetinu ze vzorku pro použití kolon Strata byla provedena stejným způsobem jako u kolonek RP-18. Roztok aplikovaný na kolonky Strata měl stejné parametry (pH, obsah methanolu, objem).

Kolonky Strata používají jako sorbent povrchově modifikovaný styren-divinylbenzenový polymer. Uváděné mechanismy retence zahrnují hydrofobní a aromatické interakce a H-můstky (podle aplikačního listu firmy Phenomenex).

Výrobce uvádí u kolonek Strata značnou robustnost ve vztahu k hodnotám pH, obsahu rozpouštědel a dekontaminaci.

*Evá Dadošová*



**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta**

**PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP**

Jméno studenta: **Ing. Eva Dadáková**  
Narozen(a): **5.8.1966 v Benešově**

Studijní program: **Chemie**  
Studijní obor: **Zemědělská chemie**  
Forma studia: **kombinovaná**

Název disertační práce: **Vývoj metodiky stanovení významných flavonoidů a její aplikace na vybrané zemědělské plodiny**  
Výsledek obhajoby:

**Vyhověl (a)**

**~~Nevyhověl(a)~~**

**Komise:**

	<b>JMÉNO</b>	<b>PODPIS</b>
Předseda:	prof. Ing. Pavel Kalač, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
Členové:	doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	doc. Mgr. Bořivoj Klejdus, Ph.D., ÚCHB AF MZLU (oponent)	
	prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc., MZLU Brno	
	prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc., ČZU Praha (oponent)	
	doc. Ing. Ivo Šafařík, DrSc., ÚSBE AV ČR	
	doc. Ing. Jiří Špička, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
Školitel:	doc. Ing. Martin Křížek, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 22.6.2006





# Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

## PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Ing. Eva Dadáková**  
Narozen(a): 5.8.1966 v Benešově

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Zemědělská chemie  
Forma studia: kombinovaná

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 7

počet platných hlasů: 7

počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 7

kladných: 7

záporných: 0

### Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	prof. Ing. Pavel Kalač, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
Členové:	doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	doc. Mgr. Bořivoj Klejdus, Ph.D., ÚCHB AF MZLU (oponent)	
	prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc., MZLU Brno	
	prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc., ČZU Praha (oponent)	
	doc. Ing. Ivo Šafařík, DrSc., ÚSBE AV ČR	
	doc. Ing. Jiří Špička, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
Školitel:	doc. Ing. Martin Křížek, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 22.6.2006