

Oponentský posudek disertační práce

Doktorandka: **Mgr. Hana Tomková**

Název disertační práce: **ANALYTICKÉ METODY PRO VÝZKUM FOSFOLIPIDŮ**

Doktorská disertační práce Mgr. Hany Tomkové se zabývá problematikou agregačních vlastností přírodní fosfolipidové směsi Asolectinu na pevném povrchu. Ke studiu vlastností připravené fosfolipidové membrány využila doktorandka cyklickou voltametrii a elektrochemickou impedanční spektroskopii. V rámci experimentální části práce navrhla postup pokrytí celého povrchu pevné uhlíkové elektrody kompaktní vrstvou fosfolipidů. U takto modifikované elektrody zkoumala její interakce, a to jak s vybranými anorganickými ionty, tak s herbicidem paraquat. Nedílnou součástí předložené práce je i návrh stanovení této organické látky.

Práce má celkem 100 stran a 6 příloh, které dokumentují 5 autorčinych původních prací a její profesní životopis. Obsahuje všechny požadované náležitosti (prohlášení o původnosti, anotaci, seznam použitých zkratk). Použitá literatura zahrnuje 262 odkazů na původní práce.

Součástí předložené disertační práce je i prezentace doktorandčiny obsáhlé publikační činnosti ve formě separátů.

V teoretické části se autorka zabývá představením jednotlivých lipidů, které se podílejí na vzniku biologických membrán. Pozornost věnovala také modelovým biologickým membránám, které se dají snadněji využít pro studium membránových procesů. V této kapitole jsou rovněž shrnuty vybrané metody vhodné ke studiu membrán.

Experimentální část práce zahrnuje postup stanovení paraquatu pomocí uhlíkové pastové elektrody modifikované fosfolipidy. Dále je věnována pozornost přípravě modifikace elektrody ze skelného uhlíku fosfolipidovou vrstvou a studiu jejich interakcí s paraquatem. Na závěr je popsáno stanovení této látky připraveným senzorem.

Ve výsledkové části jsou pak shrnuty dosažené poznatky vyplývající z poměrně rozsáhlého souboru experimentálních prací.

K předloženému textu disertační práce, která je napsána srozumitelně a přehledně, mám několik připomínek a dotazů:

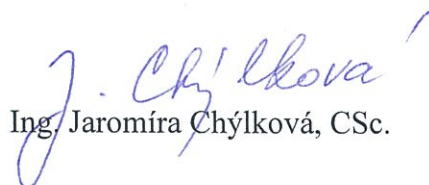
1. Na straně 15 se uvádí, že „izolovaný drátek je odříznut po jeho ponoření do roztoku fosfolipidů“. Skutečně se to tak provádí (je odřezáván ponořený do roztoku)?

2. Co si představuje autorka pod pojmem „zemědělský kanál“?
3. Obrázek na str. 23 dole je označen jako „Obr. 5“. Obrázek se stejným číslem je v textu uveden již na str. 15.
4. Také označení „Obr. 6“ se vyskytuje v práci 2x u různých obrázků.
5. Str. 33 – při přípravě fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE byl používán roztok KCl místo NaCl. Jaký to má vliv na připravenou membránu?
6. Popisy obrázků 12,13 a 14 a také popisy jejich os jsou podle mého názoru nedostačující. Čtenář se dozví až z textu práce, oč se jedná. Popisy obrázků by měly být „samoobjasňující“.
7. Na straně 56 je uveden poněkud pracný postup čištění modifikované elektrody, na str 57 je pak uvedeno, že je třeba jej provádět po každém měření. Co tímto měřením autorka myslí?
8. Proč byl zvolen paraquat jako model lipofilní látky? Sama autorka uvádí, že se jedná o iontovou látku s vysokou rozpustností ve vodě.
9. Domnívám se, že tvrzení v úvodní části kapitoly 5.6 je příliš odvážné. Lze chování paraquatu zobecnit na všechny lipofilní látky?
10. Autorka v teoretické části práce uvádí, že se paraquat silně sorbuje na půdu, sedimenty atd. Jak by se postupovalo v případě analýz těchto matric?

Závěrem svého hodnocení konstatuji, že mé výše uvedené drobné připomínky nijak nesnižují dobrou odbornou úroveň disertační práce Mgr. Hany Tomkové. Její experimentální výsledky přinášejí cenné poznatky o přípravě modelových membrán a o modifikaci pevných elektrod, což může být využito v oblasti přípravy selektivních senzorů významných biologicky aktivních látek či kontaminantů životního prostředí.

Doporučuji, aby předložená doktorská disertační práce byla přijata k obhajobě a aby byl v případě jejího úspěšného obhájení Mgr. Haně Tomkové udělen vědecko-akademický titul Ph.D.

V Pardubicích 23.5.2017


prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc.



Přírodovědecká
fakulta

OPONENTSKÝ POSUDOK doktorskej dizertačnej práce

Mgr. Hany Tomkovej

Analytické metody pro výzkum fosfolipidů

Oponovaná doktorská dizertačná práca sa zaoberá prípravou asolectínom modifikovanej elektródy zo sklovitého uhlíku, štúdiom zloženia, kompaktnosti, topografie a stability vzniknutej fosfolipidovej nanovrstvy na pevnom povrchu upraveného uhlíku pomocou pokročilých analytických techník (XPS, AFM, CV, EIS) a vrcholí vývojom citlivého elektrochemického senzoru pre stanovenia paraquatu vo vode odobranej z rieky Moravy pomocou square wave voltametrie. Práca je veľmi pekným príkladom účinného prepojenia získaných bádateľských poznatkov s ich následnou praktickou aplikáciou a demonštruje jednoduchosť a krásu chemie v podaní autorky práce a školiaceho tandemu pani doktorky Janky Skopalovej a pána docenta Petra Bartáka.

Vlastná dizertačná práca pozostáva z veľmi pekne a mne zrozumiteľne spracovaného krátkeho uvedenia do problematiky prípravy lipidových membrán, vybraných analytických metód ich charakterizácie a predstavenia paraquatu ako modelového analytu, ktorý je v práci používaný pre podrobné štúdium ako kvality a stability vyvíjaného asolectínového membránového elektrochemického senzoru, tak i dejov prebiehajúcich vo vytvorenej fosfolipidovej dvoj vrstve. Pomyselnou čerešničkou završujúcou ucelenosť práce je úspešná tvorba veľmi citlivej elektrochemickej metódy stanovenia paraquatu vo vode s LOD 2,2 nmol/l. Výsledky dlhodobého štúdia agregácie fosfolipidových molekúl autorka publikovala formou vedeckých článkov v European Journal of Lipid Science and Technology, Chemických Listoch, Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium a Electroanalysis. Výsledky venované stanoveniu paraquatu

elektrochemickým senzorom boli zaslané k recenznému riadeniu do odborného časopisu Talanta. Autorka sa vo všetkých prácach prezentuje svojou cieľavedomosťou, nadhľadom nad riešenou problematikou a potrebnou experimentálnou zručnosťou. Drobné nepresnosti a preklepy boli opravené priamo v práci.

V rámci rozpravy k práci by som rád s autorkou vo všeobecnej rovine diskutoval o nasledujúcich otázkach:

- 14₆ Trošičku som neporozumel pojmu „spacerová skupina“?
- 18₂ Skutočne bola chrenová peroxidáza ukotvená vo fosfatidylcholínovej dvoj vrstve pomocou ditiotreitolu (technika prípravy hybridnej lipidovej membrány)?
- 25¹² Dal by sa použiť AFM pre štúdium povrchu stierateľných losov?
- 31⁸ Ako sa pripravuje sklovitý uhlík a aké má fyzikálne chemické vlastnosti?
- 31¹² Mohlo by pri príprave lipidovej dvoj vrstvy z asolectínu dochádzať k akumulácii hexanu do jej stredovej hydrofóbnej oblasti?
- 43⁸ Ak je asolectín dobre rozpustný vo vode, môže dochádzať k postupnému rozpúšťaniu vytvorenej asolectínovej dvoj vrstvičky? Aká je CMC asolectínu?
- 54₂ Prečo ste sa rozhodli v neskorších pokusoch používať k úprave povrchu elektród zo sklovitého uhlíku po očistení s aluminou anodickú polarizáciu v roztoku 9g/l NaCl namiesto roztoku 9g/l KCl?
- 65₇ Sme analytici chemici: 12,5 x alebo 14 x (cit. 258)?
- 74₃ Budete pokračovať vo vývoji ďalších analytických aplikácií s „odladeným“ elektrochemickým systémom?

Záverom rád konštatujem, že vytýčené ciele práce, ktorými boli skúmanie možností využitia zmesi fosfolipidov zo sójových bobov na tvorbu stabilnej fosfolipidovej dvoj vrstvy na pevnom povrchu sklovitého uhlíku a následné využitie vyrobenej modifikovanej elektródy pre stanovenie nanomolárnych koncentrácií lipofilného paraquatu v reálnych vzorkách vody, boli bezo

zvyšku splnené. Rozsah vykonanej práce svedčí o doktorandkinej skúsenosti a orientácii v riešenej problematike. Práca svojim obsahom i formou vyhovuje podmienkam pre doktorskú dizertačnú prácu, odporúčam ju k obhajobe a na základe jej úspešnej obhajoby navrhujem udeliť Mgr. Hane Tomkovej vedecko-akademickú hodnosť „philosophiae doctor“ („PhD“).

V Olomouci 23. mája 2017


prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

Oponentský posudek disertační práce
Mgr. Hany Tomkové (roz. Švecové)
ANALYTICKÉ METODY PRO VÝZKUM FOSFOLIPIDŮ

Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci

Předkládaná disertační práce je psána v českém jazyce, sestává ze souhrnu (101 stran) a 5 příložených prací, z nichž 3 byly publikovány v impaktovaných časopisech (Chem. Listy – IF=0.529; autorka 1. místo; Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014; Autorka 1. místo IF= 3,676, Electroanalysis 2013 IF=2.502; 3. místo); jeden byl zaslán do neznámého časopisu k publikování - (Autorka 1. místo) a poslední publikovaný v Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica (Autorka – 3. místo). V práci je citováno 262 literárních zdrojů a další v příložených publikacích.

Tato disertační práce se zabývá studiem vlastností fosfolipidových molekul a jejich agregátů různými analytickými metodami. V práci byly studovány agregační vlastnosti směsi fosfolipidů izolovaných ze sójových bobů, komerčně dostupné pod názvem Asolectin. Ten byl využit jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody pro zvýšení citlivosti stanovení pesticidu paraquat ve vodě. Agregačních vlastností asolectinu bylo využito pro vytvoření lipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Cyklickou voltametrií, elektrochemickou impedanční spektroskopií a mikroskopií atomárních sil bylo zjištěno, že fosfolipidová vrstva pokrývá celý povrch elektrody, je kompaktní a její tloušťka ($7,1 \pm 1,2$ nm) odpovídá tloušťce biologické membrány (5-10 nm). Takto připravená lipidová membrána je stabilní nejméně 24 hodin i v prostředí obsahujícím paraquat. Elektroda s lipidovou membránou byla využita pro studium interakcí s látkami různé hydrofobicity. Selektivní propustnost a schopnost akumulace lipofilních látek umožnila vyvinout elektrochemický sensor pro square wave voltametrické stanovení paraquat s mezí detekce $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$.

První příloha se zabývá studiem agregace fosfolipidových molekul, ve druhé příloze autorka studuje možnosti zlepšení citlivosti a selektivity uhlíkových elektrod při aplikaci fosfolipidu pro stanovení paraquat. Obdobně, třetí příloha se zabývá konstrukcí elektrochemického senzoru pro stanovení paraquat (elektroda ze skelného uhlíku s příměsí fosfolipidu). Čtvrtá příloha se zabývá zkoumáním tvorby liposomů a rozdělováním liposom-voda za použití GC/MS. V poslední práci je popisováno použití křemenné kapilární rtuťové kapkové elektrody pro elektrokapilární měření.

K práci bych měl jen několik drobných poznámek, komentářů či otázek:

- Abstrakt: Anglická verze: Bylo by vhodné provést korekturu nejlépe rodilým mluvčím.
- V názvech komerčních firem jsou drobné nepřesnosti: Např. přesný název firmy „Penta“ je „Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.“, u některých je uváděno město (Fluka, Buchs), u jiných jen stát (Lach-Ner). Eco-Tribo Polarorograf byl vysoce pravděpodobně vyroben firmou „Polaro-Sensors, Praha, Česká republika a nikoliv „ECO-TREND PLUS“

- Některé obrázky nemají unikátní číslování (např. Obr. 5 – str. 15 a 23 a Obr 6. – str. 19 a 26)
- Např. Obr. 3: U obrázků převzatých z jiných publikací nebo z internetu je třeba uvádět původní zdroj.
- Str. 20, ř. 18: „Jeho sorpční koeficient je v rozsahu od 8400 do 40000000“ – Jak je tento koeficient definován?
- Měřicí technika (systém ,...) je technika, která v dané chvíli něco měří, jakožto označení přístroje je to „měřicí“ technika (analogicky hasicí přístroj hasí vs. hasicí přístroj visí na zdi a bude někdy možná použit).
- Tabulka 6, Tabulka 7, aj.: Počet platných cifer u výsledků a intervalů spolehlivosti není zcela podle pravidel - 2 platné cifry intervalu spolehlivosti určují počet platných cifer střední hodnoty ([Miller, J. N.; Miller, J. C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 2nd ed.; Pearson Education: Harlow, 2005.] nebo [Meloun, M.; Militky, J.; Forina, M., Chemometrics for Analytical Chemistry, Volume 1: PC-Aided Statistical Data Analysis, Volume 2: PC-Aided Regression and Related Methods. Ellis Horwood: Chichester, 1992; p 175.]).
- Str. 35, ř. 12: „vzorek byl upevněn v držáku na vzorky (o velikosti 1 palec v průměru)“ – Jsou pouze 3 státy na světě, které nepoužívají soustavu SI a ČR mezi tyto odpadlíky a odloučence nepatří (Myanmar (dříve Barma), Libérie a USA; výjimky v UK pro rychlost a v Kanadě lidská výška).
- Obr. 7., Obr. 17 a Obr. 28 jsou identické.
- Graf neodpovídá zvyklostem pro EIS, tj. poměr úseků na osách 1:1 (Např. Obr. 11, Obr. 29)
- Obrázky by měly být popsány „samonosně“ (tj. tak, aby k jejich vysvětlení nebylo třeba číst v textu práce) – např. Obr. 13, Obr. 20, Obr. 25, Tabulka 3, 4.
- Str. 59, Obr. 20: Bylo by lépe změny vyjádřit relativně, tedy v %.
- Str. 67, ř. 7 a Str. 72, ř. 7: Chybí informace o potenciálu akumulace, pokud byl nějaký vkládán.

Minoritní poznámky:

- Seznam zkratk by bylo vhodné umístit např. za obsah. Umístění mezi text práce a přílohy komplikuje čtenáři jejich pohotové nalezení.
- V textu, resp. přehledu referencí by bylo vhodné odlišit práce autorky, aby čtenář věděl, kde je odkaz na její vlastní dílo.
- Podle typografických pravidel se nepíše v češtině jednopísmenné předložky a spojky na konci řádku. Hodnoty a jednotky taktéž a nedělí se (např. str. 35, ř. 29-30).
- „Sója“ se píše dle „Ústavu pro jazyk český AV ČR, v.v.i.“ (<http://prirucka.ujc.cas.cz/?slovo=soja>) s dlouhým „ó“, což je v práci jen 1x, oproti 8 výskytům krátkého „o“.
- I přes připustnost bych se vyhnul téměř archaickému „detegovat“ a požíval „detekovat“.
- Str. 20, ř. 32: Doporučoval bych posuzovat karcinogenitu podle dat publikovaných IARC.
- Str. 31, ř. 7: u Brittonova-Robinsonova pufru se skloňují obě jména.
- Bylo by dobré sjednotit jednotky: Např. Str. 31, ř. 2 vs. ř. 5: „od -0,1 do -1,3 V“ vs. „pro akumulaci paraquatu byl -500 mV“.
-

Otázky k obhajobě:

- Abstrakt, ř. 13 vs. Str. 20 ř. 10: „Paraquat je velice dobře rozpustný ve vodě (620 g l⁻¹ při 25 °C)“ Je možné považovat paraquat za lipofilní látku?
- Autorka používá SW voltametrii. V čem vidí výhodu této techniky proti DPV?

- Str. 30, ř. 20 a následující v témže odstavci: „6 ml deionizované vody (pH 9)“. Podle teorie a definice má „čistá“ voda pH=7. Vzhledem k výskytu CO₂ ve vzduchu lze očekávat pH spíše mezi 5-6. pH 9 je na horní hranici i pro pitnou vodu (dle Vyhlášky 252/2004 Sb. – pH 6,5-9,5). Lze takovou vodu považovat ještě za deionizovanou? Jakou má vodivost? Nebylo by vhodné vrátit se k osvědčené destilaci?
- Str. 33, ř. 2: Co vedlo autorku k použití KCl místo NaCl při těchto experimentech? Bylo by pro nebiochemické čtenáře vhodné, kdyby autorka vysvětlila, proč používala koncentraci NaCl 9 g L⁻¹.
- Co vedlo autorku k použití ekvivalentního obvodu Obr. 7. Byly zkoušeny i jiné ekvivalentní obvody?
- Charakterizace fosfolipidových membrán byla prováděna v NaCl (KCl), ale v kapitole 4.3.8 jsou přidávány síranové ionty. Ovlivnilo to nějak dříve zjištěné vlastnosti fosfolipidových vrstev?
- Str. 50, ř. 4: „Tloušťka připravené fosfolipidové vrstvy byla stanovena na $7,1 \pm 1,2$ nm“. To přibližně odpovídá teoretické tloušťce dvojvrstvy (cca 6 nm). Dle str. 50, ř. 10: „Výsledky získané pomocí AFM potvrdily, že připravená fosfolipidová vrstva na povrchu GCE je kompaktní a její tloušťka odpovídá dvojvrstvě na většině povrchu“.
 - o Co znamená slovo „většina“?
 - o Je opravdu tato dvojvrstva stabilní, i když potenciál nebude vkládán nebo bude dosahovat negativních hodnot?
 - o AFM testy (str. 47-48) čisté GCE byly realizovány na elektrodě pokryté oxidy, tj. za aplikace +1,5 V?
- Existují izomery paraquatu, které mají průmyslové využití? Bylo by možné tyto izomery od sebe odlišit?
- Str. 30, ř. 10: Jaké bylo "minimální množství chloroformu" potřebné pro rozpuštění Asolectinu pro přípravu modifikované pastové elektrody?
- Jaké výhody přináší použití asolectinu pro přípravu fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE? Jaké výhody má samouspořádaná vrstva oproti jiným typům lipidových membrán?

Shrnutí:

Posouzení předkládané práce usnadňuje skutečnost, že obsah výzkumu byl publikován v časopisech s IF nebo v recenzovaném časopise, takže každý ze článků byl recenzován 2-3 nezávislými a ve většině případů se dá předpokládat, že i zahraničními posuzovateli. Tím byla většina možných připomínek vyjasněna ještě před jejich publikováním.

Práce je relativně rozsáhlá, pečlivě, srozumitelně a přehledně sepsána, její členění je odpovídající (souhrn a 5 příložených publikací). Použité přístupy řešení problémů jsou odpovídající a nelze principiálně nic namítat ani proti interpretaci výsledků. Důkladná literární rešerše poskytla autorce dobré východisko pro následné experimenty. Domnívám se, že veškerá použitá literatura byla řádně citována.

Oceňuji především velké množství provedené experimentální práce, a to jak na přístrojích na UPOL, tak ve spolupráci s jinými institucemi.

Téma předkládané práce patří k vysoce aktuálním a pro potřeby praxe vysoce využitelným.

Domnívám se, že cíl práce byl splněn a metodický přístup k řešení považuji za odpovídající.

Jazyková i formální úroveň práce je zcela odpovídající běžným standardům kladeným na disertační práce v daném oboru.

Všechny uváděné poznámky a komentáře je možno považovat spíše za formální, doplňující a mají sloužit autorovi k podpoře dalších vědeckých postupů. Nenalezl jsem žádnou závažnou chybu, která by bránila úspěšnému přijetí této disertační práce.

Celkově je autorka (dle WOS) spoluautorkou 6 impaktovaných prací a 5 příspěvků ve sbornících indexovaných ve WOS, H-index 2, 17 citací (z toho jen jedna autocitace).

Podle mého názoru, založeném na předložené disertační práci Mgr. Hany Tomkové jmenovaná prokázala, že je schopna samostatné práce, prokázala dostatečné tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu a jsem přesvědčen, že její práce splňuje požadavky kladené na disertační práce v daném oboru. Tím podle mého splnila všechny předpoklady pro úspěšné přijetí disertační práce, a proto práci k obhajobě, po jejímž úspěšném absolvování jí bude udělen akademický titul „Doktor“ (Ph.D.),

doporučuji.



Doc. Dr. Ing. Tomáš Navrátil

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.

V Praze, 15. 5. 2017