



Věc: Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Zdeňka Nováka „**Analýza struktury alkaloidů metodami multidimenzionální NMR spektroskopie**“

Předložená disertační práce patří do oblasti chemie přírodních látek. Na 125 stranách textu autor seznamuje čtenáře se svými výsledky, které získal na poli strukturní analýzy složek extraktů tří rostlin (*Berberis vulgaris* L., *Fumaria officinalis* L. a *Nerine bowdenii* W. Watson).

Úvodem je čtenář seznámen se všemi třemi zmíněnými rostlinami, jejich výskytem, popisem a použitím. Součástí popisu je rovněž přehled alkaloidů, které byly v daných rostlinách doposud identifikovány. Následuje kapitola věnovaná stručným základům stereochemie a metodám pro její určování. Zde na mě text působí trochu nesourodým dojmem. Autor celkem chaoticky skáče „od pátého k devátému“, po stereochemii následuje kus NMR, pak zase stereochemie, pak cirkulární dichroismus, následuje NOE... Jsou vysvětlovány i zcela základní pojmy jako konstituční izomer, diastereoizomer... zatímco pokročilejší oblasti jako NOE, derivatizační činidla, Mosherova metoda, izotopický indukovaný efekt... jsou v porovnání s tím vysvětleny méně podrobně či systematicky než by si, vzhledem k zaměření práce, zasloužily. Především část týkající se NOE (str. 23) je, vzhledem k významu pro stereochemickou analýzu přírodních látek a závěry učiněné v disertaci, podle mého názoru značně podceňována a problematika podávána dost zjednodušeně. Celé části by prospělo více doplňujících obrázků. Hodnoty τ_m jsou ovlivněny i pohybovými vlastnostmi molekuly tj. jejich velikostmi, tvarem a prostředím, ve kterém se nacházejí. Proto se směšovací čas často musí často optimalizovat. Rovněž je zde opomenuta skutečnost, že některé molekuly vykazují malé až nulové NOE a jakým způsobem to můžeme řešit. Část o skalárních interakcích (str. 27) je rovněž pojata povrchně, spíše jako výťah z učebnic NMR. Vzhledem k tomu, že autor v následujících pasážích interakční konstanty často využívá pro identifikaci struktury, bych očekával, že toto téma bude rozvinuta více a to s ohledem na NMR alkaloidů. Alespoň by mohly být zmíněny typické hodnoty interakčních konstant u systémů, které budou později diskutovány. Čtenář, který není odborníkem v NMR spektroskopii alkaloidů, by tak mohl snáze sledovat úvahy při interpretaci struktur. Obrázky či schémata by prospěla i srozumitelnosti kapitoly o indukovaném izotopickém efektu.

Cíle práce, které následují, jsou celkem jasně definovány.

Jádrem celé disertace je kapitola Výsledky s komentářem. Komentář je doprovázen vzorcem, výtěžkem, velmi zaokrouhlenou molekulovou hmotností, dále zápisem protonového a uhlíkového NMR spektra s přiřazením. To je poněkud nezvyklé, obvykle je zápis NMR spekter součástí experimentální části, případně přílohy, nicméně to nemá na práci nějaký negativní vliv. Výtěžek v uvedené formě však není příliš vypovídající, protože si čtenář neudělá představu o tom, z jakého kvanta suroviny byla sloučenina získána. To se dozví až o řadu stránek dále v Experimentální části. Vhodnější by, podle mého názoru, bylo buď hmotnost výchozí zpracovávané suroviny uvést jako poznámku před začátkem vlastní komentované části nebo přesunout Experimentální část před Výsledky. Přehlednosti by rovněž prospělo, kdyby bylo u každé sloučeniny stručně naznačeno, z jaké frakce byla získána, případně chromatografická data (retenční faktor nebo retenční čas). Obvykle toto bývá součástí Experimentální části, ale vzhledem k tomu, že se autor rozhodl k jistému kompromisu tím, že do Výsledků zahrnul zápis spekter, by zde měla být i další charakterizační data. Vlastní popis izolací v Experimentální části je velmi nepřehledný a čtenář těžko najde příslušné údaje. Výše uvedené by přehlednost podstatně zvýšilo. Dále v práci zcela chybí výsledky HRMS (získané versus vypočtené). Tyto výsledky přitom autor považuje za „vstupní bránu k strukturní analýze“. U známých látek je popis jen stručný, zatímco u nově izolovaných nebo ne zcela charakterizovaných látek je popis podrobnější. V práci velmi postrádám přítomnost klíčových spekter v grafické podobě s vyznačenými důležitými korelacemi, na jejichž základě byly učiněny závěry. Čtenář by si mohl udělat představu sám, takto mu nezbyvá než autorovi věřit.

Po části Výsledky následuje Závěr, kde je stručně zrekapitulováno, jaké sloučeniny byly z té které rostliny izolovány.

Experimentální část je poněkud netypicky až na konci. Zde autor vysvětluje, jakým způsobem byla izolace studovaných sloučenin prováděna. Obecně je celý popis extrakcí nepřehledný a brzy se v něm čtenář ztrácí. Uvědomuji si, že se jedná o značně pracnou a složitou záležitost a oceňuji množství vynaloženého úsilí. Domnívám se však, že schématická rekapitulace celého procesu by přehlednosti výrazně napomohla. Kdyby se k tomu přidaly třeba vyjímatelné karty, na kterých by byl přehled sloučenin se vzorci, akronymy a stranami, kde je jejich popis, přehlednost by vzrostla o několik řádů. Tabulka 5 to příliš nezachraňuje.

Seznam zkratk budí poněkud rozpačitý dojem. Namísto běžných zkratk, jako NMR, MS nebo str. bych spíše doporučil vysvětlení některých akronymů pulzních sekvencí (HMBC, ADEQUATE, NOESY).

K práci mám následující připomínky a dotazy:

Obecně je výraz „para-substituované benzenové jádro“ nesprávný. Substituenty jsou tam dva, čili by mělo být „para-disubstituované“.

Str. 33: spojení „vodíkové ^1H NMR spektrum“ je nesmyslné. Dále výrazem „triplety spolu sousedily“ pro vyjádření, že v molekule je uskupení $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ je poněkud nešťastný, protože by to mohlo rovněž znamenat,

že signály leží ve spektru vedle sebe, což není v tomto případě pravda. Lepší vyjádření je např. ve smyslu „triplety vznikly vzájemnou spin-spinovou interakcí, viz. COSY“

V celé práci se operuje s HMBC korelacemi via $^3J(C,H)$. Není však jasné, jakým způsobem byly odlišeny krospektry indikující vicinální a geminální interakci. U běžné techniky gHMBC, kterou autor uvádí, že používal, se dosah koriguje velikostí příslušného „delay“ stejně jako to udává autor na str. 99 v Experimentální části. V případě, že interakční konstanty 2J a 3J budou mít blízké hodnoty (což u aromatických systémů bývá, viz. např. data v knize Kalinowski et al. Carbon- ^{13}C NMR Spectroscopy), však toto nepostačuje a ve spektru uvidíme krospektry indikující oba typy interakcí. Existují specializované pulzní sekvence, např. 1,1-ADEQUATE, které toto umožňují. Zmínku o jejich aplikaci jsem však v práci nenašel, jen na str. 19 o její existenci. Autor by měl uvést, jakým způsobem dosáhl toho, že tyto interakce od sebe rozlišil, vzhledem k tomu, že na základě 3J korelací byly učiněny významné závěry o struktuře. Příkladem je třeba obr. 7 (str. 33), kde byly na základě vicinální korelace odlišeny skupiny OMe a OX. V případě, že nejsou vicinální a geminální interakce spolehlivě odlišeny, jsou i závěry na vzájemnou polohu těchto skupin nejednoznačné a bylo by třeba je potvrdit dalšími údaji, např. technikou NOESY, která by ukázala prostorovou blízkost protonu H5 k methoxyskupině. Zde právě, podle mého názoru, citelně chybí ukázka příslušného HMBC spektra, kde by se čtenář mohl přesvědčit sám.

Str. 36: slovní vyjádření, že ze změřené molekulové hmotnosti 626 je zřejmé, že se jedná o jednu molekulu, mi nedává smysl.

Str. 36: nerozumím pojmu „korelace po řadě“.

Str. 40: v aromatické části by měly být tři singlety: 5, 5' a 8, nikoli dva. Autor by měl rovněž uvést, jakým způsobem odlišil obě *N*-methylyskupiny. Jedná se o klíčovou informaci, jelikož pokud by tyto nebyly jednoznačně rozlišeny, mohlo by to vést k chybnému určení polohy 4-hydroxybenzylskupiny. Předpokládám, že správné rozlišení vyplynulo z HMBC korelací jednotlivých *N*-CH₃ skupin, ale přesto by získání této informace mělo být uvedeno.

Str. 41: Výraz „substituent X nenese proton“ není korektní. To by znamenalo, že určená struktura není správně. Autor chtěl patrně říci, že substituent X neobsahuje proton na atomu bezprostředně vázanému ke kyslíku O–C8'. Volba stejného písmene (X) pro diskusi různých strukturních fragmentů téže molekuly není šťastná, protože to vede k neurčitosti při sledování úvah, o kterém fragmentu se vlastně hovoří.

Str. 46: v HMBC spektru nepozorujeme korelace mezi protony, tudíž výraz „vodík δ 4,05 ppm (H2'') měl korelace ve spektru HMBC jednak na sousední vodíky (H3'')“ není správně. Patrně se jednalo o uhlík C3''. V molekule se dále nemůže nacházet vodík H6'' (je to kvarterní uhlík).

Str. 46: Autor se zde zmiňuje o jakési hypotéze o vzniku zakončení, aniž by rozvedl podrobnosti. Tím je tato část vytržena z kontextu.

Str. 79: Přítomnost dvou sad signálů po aplikaci LSR ještě automaticky neznamená racemickou směs, ale směs dvou enantiomerů. Exaktně by mělo být doplněno, že se jedná o dvě sady signálů se stejnými intenzitami. Mělo by být rovněž specifikováno, v jakém rozpouštědle a jaké LSR bylo použito.

Str. 79: Věta „Zvláštností však bylo časté štěpení signálů, které se však následně vysvětlilo“ je vytržena z kontextu. Je to nakousnutí nějakého tématu, které není dokončeno. Buď by mělo následovat vysvětlení, o co se jednalo, nebo pokud to není relevantní k dané problematice, toto vůbec nezmiňovat.

Str. 81, ř. 2 pod obr. 28: místo methylovou skupinou zde má být methylenovou.

Str. 84: autor uvádí, že beladin je v rostlině nejvíce zastoupený. V rozporu s tím je ale uváděné izolované množství 5 mg, které je cca dvakrát menší než následující krinin.

Str. 89: sloučenina je deklarována jako epoxyambellin, ale ve skutečnosti se jedná o jeho sůl. Mělo by být uvedeno, co je v daném případě aniontem. Nelze tudíž ani tvrdit, že chemické posuny byly ve shodě s publikovanými daty pro epoxyambellin, když autor sám v další větě dodává, že u části struktury se tyto výrazně liší. Není ani zřejmé, jestli je v přírodním materiálu přítomna zmíněná sůl nebo zda k tvorbě soli z epoxyambellinu došlo až v průběhu izolace.

Str. 92: výraz „rentgenokrystalová struktura“ není vhodný, spíše „rentgenová difrakce“

Str. 99: nevím, co si mám představit pod pojmem „průchody“ (ř. 18). Z kontextu při čtení dalších řádků vyplynulo, že se jedná pravděpodobně o skeny. Autor by se měl držet stávající terminologie a nevytvářet svou vlastní. Jsou popisovány akviziční parametry, ale chybí zmínka o tom, jakým způsobem byla spektra zpracovávána (procesní parametry).

Str. 101: z popisu provedení deuteriového indukovaného efektu není zcela jasné, jak bylo toto prováděno. Bylo měření prováděno i za přítomnosti oddělených vrstev? Pokud ano, měla přítomnost druhé vrstvy vliv na kvalitu spektra? Deuteriová výměna se často provádí pomocí methanolu OD, který by měl výhodu v tom, že by k oddělování vrstev nedocházelo. Proč nebylo postupováno takto?

Str. 101: u LSR je známo, že jsou citlivá na přítomnost vody i jiných koordinujících příměsí. V experimentální části by proto mělo být, v zájmu reprodukovatelnosti, uvedeno, jak byla LSR před měřením upravována (např. sušením) popř. uchovávána.

Str. 102: použití diethylaminu jako báze pro reakci v chloridem kyseliny je překvapující. Očekával bych, že tento bude přednostně reagovat na diethylamid.

Str. 103, část 5.3.1: mělo by být uvedeno, jakým roztokem ethanolu byla perkolace provedena. U gradientní eluce by mělo být, v zájmu reprodukovatelnosti, uvedeno alespoň počáteční složení mobilní fáze. Něco podobného Tabulce 5 by bylo lepší.

Str. 104, ř. 18: není uvedeno, jakým způsobem byly hydrochloridy připraveny.

V celém textu se vyskytuje řada prohřešků proti mateřskému jazyku (slovosled, překlepy). Někde jsou i věty bez kontextu. V česky psaných textech je zvykem psát desetinné čárky místo teček. Při citování literatury je přehlednější používat intervaly než úplný výčet čísel, který se vyskytuje v disertaci. Domnívám se, že pečlivá korekce rukopisu by měla být samozřejmou součástí každého odborného textu. U obrázků dále postrádám jejich popis.

Bývá zvykem, že součástí disertační práce jsou separáty publikovaných prací doktoranda.

Závěrem konstatuji, že v rámci předkládané disertační práce autor pracně izoloval řadu alkaloidů, z nichž některé byly z daných rostlin izolovány poprvé, a určil, popř. verifikoval jejich strukturu pomocí jedno a dvoudimenzionální NMR spektroskopie a srovnání s analogickými publikovanými daty. Tím získal nové, původní poznatky, což by měla každá disertační práce splňovat. Domnívám se však, že měla být věnována daleko větší péče tvorbě rukopisu a způsobu prezentace výsledků. Rukopis na mě působí dojmem, že je dělaný narychlo, řada informací chybí nebo je podána neúplným nebo nepřesvědčujícím dojmem. Vzhledem k výrazně nadprůměrné publikační aktivitě doktoranda (9 publikací v impaktovaných mezinárodních časopisech a 2 v tisku) předpokládám, že závěry v práci prezentované byly již předmětem recenzí u jednotlivých článků (neměl jsem možnost je posoudit) a mnou uvedené výhrady jsou pouze formálními nedostatky textu a nikoli celé práce a budou vysvětleny při obhajobě.

Za výše uvedeného předpokladu disertační práci Mgr. Zdeňka Nováka **doporučuji k obhajobě** a dalšímu řízení k udělení vědecké hodnosti.

.....
Doc. Ing. Petr Šimůnek, Ph.D.