



Uniwersytet Medyczny w Lublinie

KATEDRA CHEMII
Zakład Chemii Analitycznej
ul. Chodźki 4a 20-081 Lublin
tel/fax (081) 535-73-50

Lublin, dn. 30.09.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Marty Gil**

pt. *” Wpływ metody przygotowania próbki na zawartość wybranych metabolitów wtórnych w materiale roślinnym”*

Praca została wykonana w Katedrze Chromatografii, Instytutu Nauk Chemicznych

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Promotor rozprawy: Dr hab. Dorota Wianowska, prof. UMCS

Recenzja została wykonana na wniosek Dyrektora Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie - Pani prof. dr hab. Małgorzaty Grabarczyk.

Roślinne metabolity wtórne to związki organiczne będące najczęściej produktami końcowymi szlaków metabolicznych. Mają one zróżnicowaną strukturę chemiczną i ze względu na ich aktywność są często nazywane „substancjami biologicznie czynnymi”. W roślinach pełnią szereg funkcji m.in. działają protekcyjne przed atakiem owadów, chronią rośliny przed wirusami i bakteriami oraz niwelują skutki stresu metalami ciężkimi, wysokim zasoleniem, brakiem wody czy stresem termicznym. W ostatnim czasie obserwuje się duży wzrost zainteresowania naukowców tymi molekułami, zarówno pod kątem ich izolacji i oznaczania, jak i badania aktywności oraz modyfikacji ich struktur w celu zwiększenia biodostępności i bardziej selektywnego działania. Prowadzi się również poszukiwanie nowych związków. Dzieje się tak m.in. dlatego, że znajdują one zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego, spożywczego i innych. Szczególnie ciekawe jest prozdrowotne działanie tych analitów, mają one potwierdzoną badaniami naukowymi

aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową, przeciwnowotworową, przeciwzapalną, antyoksydacyjną i wiele wiele innych.

Dzięki bardzo dużemu wzrostowi technologicznemu, który nastąpił w ciągu ostatnich dwóch dekad, znacznie zwiększyły się możliwości aparaturowe i to zarówno na etapie przygotowania próbki, jak i końcowego instrumentu analitycznego wykorzystywanego do analizy jakościowej i ilościowej. Istotne również jest skrócenie samej procedury analitycznej oraz poszukiwanie skuteczniejszych i szybszych metod przygotowania próbki np. pod kątem zawartości określonych grup roślinnych metabolitów wtórnych. Jednak, ze względu na zróżnicowaną trwałość związków, poszukiwanie nowych i rozwijanie istniejących metod pozyskiwania analitów z matrycy roślinnej jest wciąż wyzwaniem analitycznym związanym z jak najbardziej rzetelną analizą składu fitochemicznego badanego obiektu roślinnego. I właśnie temu ważnemu zagadnieniu poświęcona jest recenzowana rozprawa doktorska. Moim zdaniem, z punktu widzenia jej „aktualności naukowej”, jak najbardziej wpisuje się ona w obecne trendy naukowe w chemii analitycznej. Ponadto, w mojej ocenie, możliwości aplikacyjne oraz potencjalne wykorzystanie danych zawartych w dysertacji przez innych badaczy zajmujących się analizą metabolitów wtórnych są duże.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w standardowym układzie, typowym dla prac o charakterze doświadczalnym. Liczy 184 strony i została podzielona na kilka głównych części: Wstęp, Część literaturowa, Cel pracy, Część eksperymentalna, Wyniki i ich dyskusja, Podsumowanie oraz Literatura. Dodatkowo zawiera Spis tabel, rysunków, i skrótów a dysertację kończy wykaz dorobku naukowego Doktorantki. W ramach głównych rozdziałów zostały wyodrębnione racjonalnie zaplanowane podrozdziały.

Części literaturowa zawiera dwa główne podrozdziały: pierwszy dotyczy wtórnych metabolitów roślinnych ze szczególnym uwzględnieniem reprezentantów kilku głównych grup związków które w dalszej części będą poddane badaniom, a drugi dotyczy metod izolacji tych związków z próbek materiału roślinnego. W pierwszym rozdziale Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała kwasy chlorogenowe, stilbeny oraz kurkuminoidey, zarówno pod kątem występowania w roślinach, aktywności biologicznej, możliwości transformacji, jak i potencjalnych szlaków przemian wywołanych różnymi czynnikami. Kolejny rozdział w usystematyzowany sposób przybliży czytelnika do zagadnienia związanego ze współczesnym podejściem do izolowania związków docelowych z roślin. W wyczerpujący sposób opisuje rozpuszczalnikowe techniki ekstrakcyjne wspomagane: energią mikrofal (MASE), ultradźwiękami (UASE), wysokim ciśnieniem (PLE) oraz coraz częściej stosowaną technikę

jaką jest ekstrakcja rozpuszczalnikiem z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD). Literaturowa część pracy, oparta na podstawie 117 pozycji bibliograficznych, napisana jest w sposób przemyślany, stanowi dobre nakreślenie tła do prowadzonych badań i świadczy o odpowiednim przygotowaniu teoretycznym oraz o umiejętności Pani Magister korzystania ze źródeł naukowych.

Część doświadczalna zawiera opis przeprowadzonych eksperymentów oraz wykorzystywaną aparaturę, materiały i odczynniki. Na tym etapie zwraca uwagę czasochłonność i pracochłonność prac eksperymentalnych. Część doświadczalną poprzedza syntetycznie przedstawiony cel pracy wraz z krótkim przedstawieniem kolejnych etapów badań.

Rozdział Wyniki i ich dyskusja jest najobszerniejszą częścią pracy i stanowi ponad połowę całego manuskryptu - jest to bardzo dobry współczynnik dla prac eksperymentalnych. Doktorantka określiła wpływ metody ekstrakcyjnej: MASE, UASE, PLE i MSPD na zawartość substancji wzorcowych: wybranych kwasów chlorogenowych (m. in. kwasu 5-kawoilochinowego i 1,3-dikawoilochinowego), przedstawiciela stilbenów – resweratrolu oraz kurkuminy jako przedstawiciela kurkuminoidów, określając stabilność tych analitów w warunkach symulowanej ekstrakcji. W badaniach uwzględniła szereg parametrów, m.in. częstotliwość ultradźwięków, moc generatora promieniowania mikrofal, temperaturę procesu oraz czas jego trwania. Do identyfikacji związków docelowych zastosowała RP-HPLC z detekcją PDA oraz MSⁿ, co jest zgodne z obecnymi trendami stosowanymi w analityce metabolitów wtórnych opisanymi w literaturze. W badaniach własnych Doktorantka wykorzystwała nie tylko układy modelowe, ale również zastosowała rzeczywiste warunki ekstrakcji dla dość licznej grupy surowców roślinnych takich jak: wysuszone ziele podbiału pospolitego (*Tussilago farfara* L.), wysuszony kwiat wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.), wysuszone ziele krwawnika pospolitego (*Achillea millefolium* L.), wysuszony kwiat rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.), wysuszone liście oraz łodygi karczocha zwyczajnego (*Cynara scolymus* L.), świeże serce karczocha (*Cynara scolymus* L.), ziarna zielonej kawy, świeże winogrona (*Vitis* L.), odmian fioletowa; świeży korzeń ostryżu długiego - kurkumy (*Curcuma longa* L.), korzeń ostryżu długiego w formie przyprawy firmy Knorr. Uwagę moją zwrócił rozdział, w którym do identyfikacji kurkuminy będącej związkami o dużej labilności i jej pochodnych, Doktorantka zastosowała MSⁿ oraz HRMS. Rozdział ten dodatkowo wzbogaciła stosując analizę NMR do potwierdzenia struktur produktów przemian powstających w wyniku transformacji kurkuminy. W tym celu wykonała analizę ¹H i ¹³C z

wykorzystaniem specjalnie do tego celu zsyntetyzowanego związku (4Z, 6E)-1,5-dihydroksy-1,7-bis(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)hepta-4,6-dien-3-onu.

Rozdział Wyniki i dyskusja jest czytelnie opracowany, wyczerpująco omówiony i udokumentowany - rezultaty zaprezentowane są w ok. 40 tabelach i na 40 rycinach. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są obszernie przedyskutowane z najnowszym piśmiennictwem a założone cele badań zrealizowane.

Rozdział Podsumowanie zawiera krótkie wprowadzenie oraz punktowe przedstawienie najważniejszych osiągnięć doktorantki. Stwierdziła ona m.in. że technika MSPD (a właściwie jej modyfikacja - SSDM), w przeciwieństwie do innych stosowanych technik, jest niedestrukcyjna dla badanych związków i może być metodą odniesienia do porównania pozostałych technik ekstrakcyjnych. Natomiast, stosując MASE, UASE i PLE dochodzi nie tylko do degradacji analizowanych metabolitów wtórnych ale także ich konwersji do pochodnych, których zawartości w ekstraktach zależą od warunków procesu. Najbardziej niestabilne z badanych związków okazały się kwasy chlorogenowe, w przypadku których liczba tworzonych pochodnych była uwarunkowana ilością reszt kwasu hydroksycynamonowego w cząsteczce kwasu chinowego i rosła ze wzrostem liczby reszt. Natomiast kurkuminoidy okazały się związkami najbardziej odpornymi na destrukcyjny wpływ wspomaganych technik ekstrakcji. Ważnym osiągnięciem Doktorantki było zidentyfikowanie po raz pierwszy w środowisku zasadowym dziesięciu dodatkowych związków powstałych z przekształceń kurkuminy do adduktów z wodą i alkoholem. Moim zdaniem wnioski wynikające z prowadzonych doświadczeń zostały poprawnie sformułowane.

Piśmiennictwo wykorzystane do opracowania dysertacji zawiera 146 pozycji literaturowych i są to prawie wyłącznie pozycje anglojęzyczne opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej. Literatura jest aktualna i ściśle dotyczy tematyki podjętej w rozprawie doktorskiej.

Ogólnie jakość prowadzonych badań i całą rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Warto też podkreślić, że Pani Magister jest współautorką 5 prac opublikowanych głównie w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (4 z nich) a ich sumaryczny IF wynosi 28,952 - co uważam za wynik bardzo dobry. Ponadto, moją uwagę zwróciły trzy z nich opublikowane w czasopismach znajdujących się w górnym decylnie (97 percentyl) najlepszych czasopism z danej dyscypliny (co odpowiada 140 punktom na liście MNiSW) - są to 2 prace poglądowe i jedna badawcza. Dorobek naukowy uzupełniają 2 rozdziały w monografiach, których Doktorantka jest współautorką. Pani magister Gil była również kierownikiem projektu

badawczego pt. „Badanie wpływu warunków ekstrakcji związków fenolowych na wynik ich analizy w materiale roślinnym” finansowanego ze środków wewnętrznych UMCS.

Niezależnie od mojej wysokiej oceny jakości badań opisywanych w przedłożonej dysertacji, pragnę z obowiązku recenzenta przedstawić kilka drobnych uwag/sugestii – głównie natury edytorskiej:

- 1) Moim zdaniem główne rozdziały pracy powinny być także ponumerowane - zwiększyłyby to czytelność i przejrzystość poszczególnych części pracy,
- 2) W pracy jest brak ewidentnie wyartykułowanej hipotezy badawczej,
- 3) Tytuł rozdziału 2 („Metody analizy metabolitów wtórnych”) jest niewłaściwie sformułowany – rozdział ten jest głównie poświęcony metodom izolacji metabolitów z matrycy roślinnej,
- 4) Do badań można by było włączyć metody matematyczne planowania doświadczeń (Design of Experiment - DoE),
- 5) Tabela skrótów powinna znaleźć się na początku pracy a nie na końcu, co ułatwiłoby śledzenie tekstu pracy ,
- 6) Podpisy osi X na niektórych rysunkach (m.in. Rys. 24, 31) są niekompletne,
- 7) Brak niektórych szczegółów eksperymentalnych np. przez jakie sita przesiano surowce roślinne (str. 46); brak podanego stężenia trans-resweratrolu w roztworze (str. 48) itd.,
- 8) Stwierdzenie (Str. 27): „Nie ma oficjalnych i powszechnie akceptowalnych metod analizy MW” jest w mojej ocenie nieco kontrowersyjne, ponieważ wiele metod np. HPLC, GC jest oficjalnie rekomendowanych do analiz określonych metabolitów,
- 9) - Str.49: nie jasne ile wzorców wzięto do eksperymentów (w jednej linijce 10 mg a w innej 5 mg),
- 10) W pracy pojawiają się również drobne błędy edytorskie i „niezręczne” sformułowania, kilka przykładów podaję poniżej:

- Str. 5.: „...**hormony są głównym narzędziem...**”

- Str. 9: „część **kompozycji** roślinnej”

- Str. 11: „Kwasy hydroksycynamonowe poza **skłonnością grupy karboksylowej** do ...”

- Str. 13: „procesowi towarzyszy **obróbka** cieplna i/lub **enzymatyczna**,”

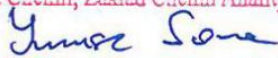
- Str. 28: „Konwencjonalne techniki znane są z wielu wad,”

- Str. 28 „ekstrakcja nadkrytyczna” – raczej ekstrakcja fazą w stanie nadkrytycznym

- Str.31: „materiale **sonifikowanym**” – spolszczenie angielskiej nazwy
- Str.36: „pozwala uzyskać **zdrowsze** ekstrakty”
- Str.37: „ekstrakcji w fazie stałej (SPE)”
- w pracy są drobne błędy literowe Str.31: „prowadzonej w **śrdowisku**”, Str. 41 „rozprawy **obrono** oszacowanie”; str 49 „zmianę czasu **cykly**”; str 51 „wykorzystane **wbaaniach**”....
- W wielu miejscach pracy pojawia się sformułowanie: „**związków kwaśnych**” - powinno być raczej związków o charakterze kwasowym, „...**rozdziały**...” - powinno być: rozdzielanie chromatograficzne.

Jednak pragnę podkreślić, że powyższe uwagi nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej przedłożonej do recenzji dysertacji.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest nowatorska, cechuje się dużą wartością aplikacyjną uzyskanych wyników oraz wnosi w obecny stan wiedzy istotny element nowości naukowej. Realizacja celu jaki postawiła sobie mgr Marta Gil wymagała ogromnej pracy eksperymentalnej i praktycznej umiejętności posługiwania się zarówno metodami ekstrakcyjnymi (MASE, UASE, PLE i MSPD), jak i technikami analitycznymi (HPLC-PAD, MSⁿ, HR MS czy NMR). Badania cechują się oryginalnością, a zakres przeprowadzonych prac badawczych, sposób ich prezentacji, wyczerpująca dyskusja w świetle dostępnej literatury oraz umiejętność wyciągania trafnych wniosków na poszczególnych etapach pracy świadczą o wysokim poziomie naukowym Doktorantki i Jej predyspozycjach do prowadzenia badań naukowych. Na tej podstawie stwierdzam, że recenzowana dysertacja w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym, z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Nauk Chemicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Marty Gil do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na istotne walory oryginalności naukowej oraz mając na uwadze wysoką jakość uzyskanych wyników, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej

prof. dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa