



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Kraków, 30 maja 2019 r.

Dr hab. Jolanta Kochana, prof. UJ
Zakład Chemii Analitycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 24 18
email: jolanta.kochana@uj.edu.pl

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. **Judyty Kruk**
zatytułowanej

**„Opracowanie chromatograficznych metod rozdzielania i oznaczania enancjomerów
wybranych flawonoidów i ich aplikacja ”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Judyty Kruk powstała w Katedrze Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Ireny Staneczko-Baranowskiej.

Recenzowana praca dotyczy oznaczania flawonoidów, ważnych związków bioaktywnych występujących w roślinach oraz produktach pochodzenia roślinnego. Flawonoidy wzbudzają duże zainteresowanie ze względu na ich właściwości antyoksydacyjne oraz lecznicze, takie jak przeciwzapalne, antyalergiczne, antybakteryjne, przeciwgrzybiczne i antywirusowe, które stwarzają potencjalne możliwości wykorzystania ich w leczeniu oraz jako składniki kosmetyków. Są one substancjami optycznie czynnymi, w związku z czym mogą występować w postaci enancjomerów. Wiadomym jest, iż aktywność biologiczna związków optycznie czynnych może być zróżnicowana dla poszczególnych enancjomerów, czego przykładem może być amfetamina czy popularny ibuprofen. Z tego względu niezwykle istotne jest opracowywanie metod analitycznych umożliwiających oznaczanie poszczególnych form enancjomerycznych związków wykazujących aktywność biologiczną. Większość doniesień literaturowych dotyczących tego zagadnienia opisuje enancjoseparację pojedynczych flawonoidów. Można znaleźć publikacje przedstawiające oznaczanie

enancjomerów dwóch lub trzech flawonoidów, ale w różnych układach chromatograficznych, z wykorzystaniem różnych kolumn. Możliwość szybkiego i prostego oznaczenia składu enancjomerycznego mieszaniny różnych flawonoidów w roślinach oraz produktach roślinnych w toku jednego procesu analitycznego, jest pożądane ze względu na potencjalne wykorzystanie tych związków w przemyśle farmaceutycznym, jako składniki leków czy suplementów diety, oraz w przemyśle kosmetycznym. Opracowane metody mogą być przydatne do kontroli produkcji farmaceutyków, które powinny występować w czystej postaci jednego z enancjomerów. Wiedza ta jest również istotna w badaniach fizjologii roślin oraz procesów metabolicznych zachodzących w ich tkankach.

Rośliny i produkty roślinne są bogate w różnorodne substancje bioaktywne, w tym flawonoidy, a ich równoczesne oznaczanie, uwzględniające wyznaczenie zawartości poszczególnych enancjomerów, stanowi duże wyzwanie analityczne. Wymaga ono wydzielenia analitów, ich rozdzielania, a następnie równoczesnego oznaczenia, charakteryzującego się dobrymi parametrami analitycznymi w stosunku do wszystkich analitów, w możliwie krótkim czasie. Dodatkową trudność stanowi to, iż enancjomery danego flawonoidu, mogą występować na bardzo różnych poziomach stężeń. Należy więc podkreślić, iż mgr inż. Judyta Kruk w swojej rozprawie doktorskiej, której celem było opracowanie i walidacja nowych chromatograficznych procedur rozdzielania i równoczesnego oznaczania enancjomerów wybranych flawonoidów, podjęła się rozwiązania aktualnego i niełatwego problemu analitycznego.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest 5 oryginalnych prac naukowych obejmujących spójną tematykę chromatograficznego rozdzielania i oznaczania enancjomerów sześciu flawonoidów. Prace zostały opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie czasopism JCR, w szczególności dwie w czasopiśmie *Chirality* (IF 1,956 oraz 1,833), po jednej w *Talencie* (IF 4,162), *Analytical Methods* (IF 2,073) oraz w *Journal of Chromatographic Science* (IF 1,037).

Praca doktorska obejmuje autoreferat (66 stron) oraz teksty 5 manuskryptów. Autoreferat wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką pracy. Pierwszy rozdział to wstęp. Otwiera go wprowadzenie opisujące budowę i występowanie flawonoidów, aspekt ich aktywności optycznej oraz krótką charakterystykę technik enancjoseparacyjnych stosowanych do oznaczania enancjomerów flawonoidów. Kolejny rozdział zawiera przegląd literaturowy chromatograficznych metod określania składu chiralnych flawonoidów. W ostatniej części wstępu Autorka sformułowała cel pracy oraz nakreśliła zakres prac badawczych. Druga część pracy zawiera omówienie badań, w tym opracowania metod jednoczesnego oznaczania enancjomerów wybranych flawonoidów, opracowanie metod przygotowania próbek do analizy oraz zastosowanie opracowanych procedur analitycznych do oznaczania chiralnych flawonoidów w różnorodnych próbkach rzeczywistych. Kolejne części pracy obejmują podsumowanie i wnioski, spis cytowanej literatury oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Najistotniejszą część pracy stanowi spójny tematycznie cykl pięciu publikacji. W pierwszej pracy (D.1.) przedstawiono metodę oznaczania enancjomerów trzech flawonoidów: flawanonu, naryngeniny i hesperetyny z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej z detektorem z matrycą diodową (DAD) w odwróconym układzie faz (RP-UHPLC-DAD). Opracowana metoda została zastosowana do analizy soku pomarańczowego, charakteryzującego się stosunkowo ubogą matrycą biorąc pod uwagę zawartość polifenoli. Równoczesna enancjoseparacja tych samych izomerów optycznych z wykorzystaniem tej samej techniki rozdziału została opisana w kolejnej publikacji (D.2.). Zastosowanie znacznie bardziej czułego detektora, tandemowego spektrometru masowego (MS/MS), pozwoliło na polepszenie parametrów analitycznych metody, m.in. na obniżenie granic oznaczalności w stosunku do oznaczeń opartych na detektorze DAD. Zastosowany detektor pozwolił również na wykorzystanie opracowanej metody analitycznej RP-UHPLC-ESI-MS/MS do oznaczenia sześciu enancjomerów flawonoidów w próbkach przypraw roślinnych (w papryce słodkiej, ostrej i chili) oraz w korzeniu lukrecji, charakteryzujących się skomplikowaną matrycą. Kolejno, rozszerzono grupę docelowych analitów o trzy flawanony: eriodiktioł, likwirytygeninę oraz pinostrobinę (D.3.). Opracowana procedura wykorzystująca, jak w poprzednich badaniach, ultrasprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz sprzężoną z tandemowym spektrometrem mas z elektrorozpylaniem umożliwiła oznaczanie dwunastu enancjomerów sześciu flawonoidów w toku jednego pomiaru analitycznego i została wykorzystana do analizy próbek rzeczywistych: mięty pieprzowej, kropli miętowych oraz korzenia lukrecji. W następnym etapie badań rozszerzono produkty roślinne stanowiące przedmiot analizy na zawartość optycznie czynnych flawonoidów o susz roślinny i wyciąg z dziurawca zwyczajnego oraz o susz roślinny i płyn do ust z szalwii lekarskiej (D.4.). W celu opracowania metody oczyszczania i wzbogacania próbek zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) wybierając jako sorbent krzemionkę modyfikowaną grupami oktadecylowymi (C18), po wcześniejszym sprawdzeniu możliwości wykorzystania innych sorbentów. Ostatnia publikacja cyklu (D.5.) dotyczy analizy na zawartość dwunastu enancjomerów flawanonów różnych części popularnych roślin uprawnych i dziko rosnących: lucerny siewnej, facelii błękitnej i nawłoci pospolitej. W ramach badań porównano zawartość analitów w łodygach, liściach i kwiatach.

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej na cyklu prac, opublikowanych w recenzowanych czasopismach, rola recenzenta jest w zasadzie ograniczona. Opublikowane manuskrypty zostały już zaopiniowane i przeanalizowane przez wybitnych specjalistów z danej dziedziny, a ewentualne niedociągnięcia wskazane autorom i przez nich skorygowane. Oryginalność rozwiązania problemu naukowego, w kontekście ukazania się prac w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, nie może budzić wątpliwości. Recenzentowi pozostaje stwierdzenie, jaki był udział Autorki w badaniach, ponieważ wszystkie prace zgłoszone do rozprawy są wieloautorskie. Oświadczenia mgr inż. Justyny Kruk o jej udziale w każdej z publikacji wskazują na jej znaczący udział w realizacji projektów. W trzech pracach nazwisko Doktorantki znajduje się na drugim miejscu, za promotorem prof.

I. Staneczko-Baranowską, a w dwóch na pierwszym miejscu. W ostatniej publikacji (D.5.) Doktorantka jest autorem korespondencyjnym.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej zaliczam opracowanie wiarygodnych, szybkich i niedrogich metod równoczesnego oznaczania kilkunastu enancjomerów flawonoidów występujących powszechnie w roślinach i produktach roślinnych, ważnych z punktu widzenia aktywności biologicznej którą wykazują. Każda z zaproponowanych metod zastała starannie zwalidowana. Zaletą zaproponowanych metod jest zastosowanie do analizy jednego układu separacyjnego (jednej kolumny chromatograficznej), co znacznie obniża koszty w stosunku do wcześniej zaproponowanych metod odrębnego oznaczania każdego z analitów. Umożliwia to również przeprowadzenie równoczesnego oznaczenia w krótkim czasie, sześciu enancjomerów w czasie 6 minut, a dwunastu związków w przeciągu 15 minut. Na podkreślenie zasługuje aspekt aplikacyjny rozprawy. Zaproponowane procedury Doktorantka wykorzystwała do przeprowadzenia analizy na zawartość enancjomerycznych flawonoidów w szeregu roślin i produktów roślinnych, po wcześniejszym opracowaniu procedur przygotowania próbek do analizy. Na tym etapie pracy uwzględniła ważny aspekt zachowania stabilności konfiguracji enancjomerów oznaczanych analitów. Na zwrócenie uwagi zasługuje również ustalenie kolejności wymywania z kolumny poszczególnych enancjomerów, co stanowiło duże wyzwanie biorąc pod uwagę małą dostępność, a w zasadzie brak, odpowiednich materiałów referencyjnych.

Podczas czytania rozprawy oraz załączonych manuskryptów nasunęło mi się kilka uwag. Chciałabym poprosić p. Jodytę Kruk o ustosunkowanie się podczas obrony pracy do poniższych kwestii.

- Zgodnie z definicją IUPAC, specjacja to występowanie różnych fizycznych i chemicznych form danego pierwiastka, indywiduów w badanym materiale („*Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości*” pod red. D. Barańkiewicz i E. Bulskiej, Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2009). Wśród wielu rodzajów specjacji wyróżnia się specjację funkcjonalną, odnoszącą się do indywiduów chemicznych o określonej aktywności chemicznej i/lub biologicznej. Ponadto, w literaturze, szczególnie angielskojęzycznej, pojawia się pojęcie specjacji chiralnej, związanej z występowaniem w badanym materiale związku w postaci dwóch enancjomerów. Czy opracowane metody można zaliczyć do metod analizy specjacyjnej?

- Jak już wspominałam, każda z zaproponowanych metod analizy została starannie zwalidowana. Jednym z ważniejszych parametrów walidacyjnych jest granica wykrywalności, LOD (z ang. limit of detection). W autoreferacie nie znalazłam informacji w jaki sposób wartości LOD były obliczane, a istnieje wiele na to sposobów. W publikacji D.3. parametr ten był szacowany według często stosowanej w chromatografii reguły „stosunek sygnału do szumu” (The LOQ values were calculated using a signal-to-noise script.). Natomiast informacje podane w tekstach innych publikacji nie są dla mnie jednoznaczne. Autorzy podają wzór $3.3 \times S_{xy}/b$, z wyjaśnieniem, że S_{xy} „is the calibration curve SD” (D.1.), „is the

standard deviation" (D.2.), „ S_{xy} represents the response standard deviation”(D.4.). O jakie odchylenie standardowe chodzi?

- Czy planowane są dalsze badania w tej tematyce? Wydaje się, iż interesującym byłoby analizy różnych części roślin podczas poszczególnych etapów ich wzrostu.

Praca jest napisana klarownie, poszczególne rozdziały logicznie wprowadzają czytelnika w prezentowaną tematykę. Wnioski końcowe są napisane przejrzysto, zgodnie z sekwencją prowadzonych badań i podsumowują najważniejsze osiągnięcia pracy. W autoreferacie, jak w każdej pracy, można znaleźć błędy redakcyjne, literówki i niefortunne sformułowania. Wspomniane niedoskonałości pracy nie rzutują na pozytywny odbiór pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska leży w obszarze badań podstawowych. Zawiera ona w swojej treści elementy nowości naukowej, a także co jest niezwykle istotne – propozycję zastosowania praktycznego uzyskanych wyników. Przedstawione drobne uwagi nie mają wpływu na moją ocenę rozprawy. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż przedstawiona praca doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr inż. Judyty Kruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

