

Toruń, dnia 28 maja 2019 r.

dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Judyty Kruk
pt. „*Opracowanie chromatograficznych metod rozdzielania i oznaczania enancjomerów
wybranych flawonoidów i ich aplikacja*”
wykonanej w Katedrze Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii
Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej

Ocena wyboru tematyki badawczej

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Judyty Kruk jest elementem szerokiego zakresu prac badawczych związanych z wykorzystaniem technik chromatograficznych do oznaczania enancjomerów wybranych flawonoidów. prowadzonych w zespole kierowanym przez Panią Profesor Irenę Staneczko-Baranowską, która jest promotorem niniejszej rozprawy i przy wsparciu dr hab. inż. Sylwii Bajkacz jako promotora pomocniczego. Zespół ten od wielu lat z ogromnym zaangażowaniem opracowuje nowe rozwiązania z zakresu chemii analitycznej a rezultaty tych prac są doceniane zarówno w kraju, jak i poza jego granicami. Tematyka badawcza wpisuje się niewątpliwie w nurt prac z zakresu chemii analitycznej i dotyka istotnej problematyki pozyskiwania i kontrolowania zawartości enancjomerów substancji bioaktywnych, które izolowane są z materiału roślinnego i stosowane w przemyśle zielarskim czy kosmetycznym. Ze względu na biologiczną aktywność enancjomerów flawononów (grupa związków, którą zajęła się Doktorantka) rośnie zainteresowanie nimi również w farmacji i medycynie. W konsekwencji wymusza to konieczność oznaczania enancjomerów R i S oraz określenia czystości pozyskiwanych związków izolowanych z matrycy jaką są różne części morfologiczne roślin. Pomimo licznych doniesień literaturowych z zakresu zastosowania technik enancjoseparacyjnych do analizy związków syntetycznie otrzymywanych z przeznaczeniem ich jako potencjalnych substancji czynnych do produkcji leków, nie są to zagadnienia trywialne. W tym kontekście wybór tematyki doktoratu jest bardzo trafny: kompleksowe badania przeprowadzone przez Panią mgr inż. Judytę Kruk dotyczące opracowania metod równoczesnego izolowania i oznaczania enancjomerów flawononów z grupy flawonoidów z zastosowaniem ultrasprawnej chromatografii ciekowej połączonej ze spektrometrią mas, wypełniają istniejącą lukę literaturową. Uzyskane rezultaty tych badań są tym cenniejsze, że stanowią niezbędne ogniwo w projekcie badawczo-wdrożeniowym nt. „*Rośliny uprawne oraz produkty naturalne*

jako źródło substancji biologicznie aktywnych przeznaczonych do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety”.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Judyty Kruk to cykl pięciu opublikowanych oryginalnych prac naukowych opatrzonych 62 stronicowym komentarzem. Stanowi on wprowadzenie uwzględniające dotychczasowy stan wiedzy i krytycznie pozycjonujący uzyskane osiągnięcia badawcze na tle światowej literatury. Dane bibliometryczne pokazują, że łączny *impact factor* (IF) dla pięciu prac stanowiących podstawę rozprawy wynosi 11,061, co daje bardzo dobry średni IF wynoszący 2,212. Liczba współautorów dla trzech prac opisanych jako D.1, D.2 i D.3 to skład trzyosobowy, dla publikacji D.4 – czteroosobowy i dla D.5 – sześćosobowy. Należy podkreślić, że w tych dwóch ostatnich publikacjach Doktorantka występuje jako pierwszy autor a w jednej (D.5) jest autorem korespondencyjnym. Wszystkie te prace zostały już opublikowane (w latach 2016-2019), przeszły zatem proces recenzji i spełniły wysokie wymagania stawiane w renomowanych czasopismach międzynarodowych, zarówno co do poziomu merytorycznego, jak i językowego oraz edytorskiego. Poziom wszystkich pięciu publikacji jest bez zarzutu. Za cenne należy uznać przedłożenie oświadczeń potwierdzających istotny wkład merytoryczny Pani mgr inż. Judyty Kruk do każdej z nich. Należy podkreślić, że zaangażowanie Doktorantki było znaczące i obejmowało udział we wszystkich zaplanowanych eksperymentach, częściowy w analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Bez wątplenia można konkludować, że wyniki badań są dobrze postrzegane przez środowisko naukowe, gdyż trzy pierwsze artykuły były cytowane 18 razy.

Pierwsza spośród prac stanowiących podstawę doktoratu oznaczona jako D.1 i zatytułowana: *Simultaneous chiral separation of flavanone, naringenin, and hesperetin enantiomers by RP-UHPLC-DAD* (Chirality 28(2), 2016, 147-152) opublikowana została przez Doktorantkę wraz z Promotorem i Promotorem pomocniczym. Publikacja ta poświęcona jest opracowaniu metody pozwalającej na jednoczesną analizę enancjomerów flawanonu, naryngeniny i hesperetyny w warunkach elucji izokratycznej i gradientowej z wykorzystaniem chromatografii cieczonej z detektorem spektrofotometrycznym (DAD). Przeprowadzony został dobór warunków chromatograficznych takich, jak: rodzaj kolumny chiralnej (trzy kolumny Typu II na bazie żelu krzemionkowego otoczkowane pochodnymi celulozy i amylozy), skład fazy ruchomej (nateżenia przepływu i programy elucji) oraz długości fal niezbędne do identyfikacji oznaczanych analitów. Niewątpliwe, jak zauważyła Doktorantka, opracowana metoda wyróżnia się na tle dotychczasowych doniesień – charakteryzują ją krótkie czasy analizy, co w konsekwencji przekłada się na niski koszt jednostkowy. Metodyka ma jednak pewne wady - selektywność i czułość są niskie w przypadku analizy próbek rzeczywistych. Zgodnie ze złożonym oświadczeniem,

Doktorantka była odpowiedzialna za „przeprowadzenie eksperymentów LC-DAD i LC-ESI-MS/MS w ujemnym trybie jonizacji, walidację metody, wstępną interpretację wyników, przygotowanie szaty graficznej oraz wstępnej wersji manuskryptu”, można więc uznać, że jej wkład jest dominujący.

Praca D.2 (*Development and validation of a RP-UHPLC-ESI-MS/MS method for the chiral separation and determination of flavanone, naringenin and hesperetin enantiomers*, Talanta 159, 2016, 181-188) przedstawia wyniki badań Doktorantki uzyskane dzięki zastąpieniu detekcji spektrofotometrycznej bardziej czułym detektorem - spektrometrem mas w dodatnim trybie jonizacji. W tym celu przeprowadzono optymalizację wymaganych parametrów pracy detektora dla każdego zidentyfikowanego związku z uwzględnieniem modyfikacji składu fazy ruchomej, które powinny zwiększyć jonizację analitów. Zaproponowana metoda wykazuje wysoką selektywność i czułość w odniesieniu do zidentyfikowanych związków. Za bardzo wartościowe osiągnięcie należy uznać zaproponowanie struktur jonów potomnych dla oznaczanych analitów. Doktorantka wyznaczyła granice oznaczalności dla flawanonu, naryngeniny i hesperetyny, które są niższe niż w pracy D.1 i mieszczą się w zakresie od 0,1 do 2,0 ng/ml. Bardzo cenne jest wykorzystanie opracowanej metody do analizy ekstraktów różnych gatunków pieprzu i korzenia lukrecji. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantka dokonała doboru warunków pracy spektrometru mas, opracowała procedury przygotowania próbek rzeczywistych (SPE, hydroliza), zaproponowała struktury jonów potomnych, wstępną interpretację danych i przygotowała artykuł.

Kolejne prace D.3 (*LC-ESI-MS/MS method for the enantioseparation of six flavanones*, Anal. Meth. 9, 2017, 1018-1030) i D.4 (*Separation and determination of selected polyphenols from medicinal plants*, J. Chromatogr. Sci., 57(1), 2019, 17-26) dotyczą kompleksowego podejścia analitycznego poprzez opracowanie warunków rozdzielania dwunastu enancjomerów flawanonu, naryngeniny, hesperetyny, eriodiktiole, likwirytygeniny i pinostrobinu oraz ich izolowanie z próbek rzeczywistych z różnych części morfologicznych wybranych roślin. Do oczyszczania ekstraktów z materiału roślinnego Doktorantka wykorzystwała różnego rodzaju sorbenty o bardzo zróżnicowanym charakterze: od silnie polarnych do niepolarnych. Użycie tak różnorodnych adsorbentów wymagało bardzo szerokiej wiedzy i umiejętności w opracowaniu pełnej procedury izolowania dwunastu związków. Staranność przeprowadzonych badań rzutuje na wiarygodność uzyskiwanych wyników, które uzupełniono o tzw. efekt matrycowy. Należy podkreślić, że zakres wykonanych badań eksperymentalnych jest imponujący.

Ostatnia praca z cyklu, D.5 *Flavonoids enantiomer distribution in different parts of goldenrod (Solidago virgaurea L.), lucerne (Medicago sativa L.) and phacelia (Phacelia tanacetifolia Benth.)* (Chirality 31, 2019, 138-149), dotyczy badań związanych z ustaleniem zawartości poszczególnych enancjomerów w różnych częściach morfologicznych (korzeń, kwiaty, liście) wybranych roślin uprawnych (mięta pieprzowa) i dziko rosnących (lucerna siewna,

facelia błękitna i nawłóć pospolita). Otrzymane wyniki pozwoliły na określenie zawartości enancjomerów S i R w różnych częściach roślin. Praca ta przedstawia wyniki badań, autorstwa Pani mgr inż. Judyty Kruk i pięcioosobowego zespołu, zgodnie z oświadczeniem, udział Doktorantki należy uznać za znaczący.

Przedstawiony przez Doktorantkę komentarz to 62 stronicowy tekst przeprowadzający czytelnika przez najistotniejsze wyniki i osiągnięcia przedstawione w publikacjach (D.1-D.5). Całość jest napisana poprawnym językiem, w sposób zwarty i przejrzysty. We *Wstępie* Autorka przedstawiła listę publikacji stanowiącą podstawę rozprawy. W rozdziale wstępnym (*Wprowadzenie*, 10 stron) zamieszczone zostały typowe wiadomości podręcznikowe, wiedza dobrze znana. Nie wnosi on wiele w merytoryczną zawartość rozprawy i uważam, że jest zbyt obszerny. Za cenny uznaję przegląd literaturowy dotyczący aktualnego stanu wiedzy, gdzie w przejrzysty sposób (w formie tabeli) Doktorantka zestawiała osiągnięcia innych badawczy odnośnie wykorzystania technik chromatograficznych do oznaczania substancji optycznie czynnych. W kolejnym rozdziale sformułowane są cele pracy, do których wprowadzenie uważam za zbyt rozbudowane. Głównym rozdziałem komentarza jest *Omówienie wyników badań*, 31 stron. Jest to bardzo dobrze napisany przewodnik po publikacjach stanowiących podstawę pracy. W ostatniej części (*Podsumowanie i wnioski*) wypunktowane są te wyniki badań, które Doktorantka uznała za najistotniejsze, a zaraz potem sformułowane są najważniejsze wpływające z nich wnioski. Całość kończy bibliografia obejmująca 52 pozycje literaturowe. Dobór cytowanej literatury świadczy o dobrej orientacji Pani mgr inż. Judyty Kruk w reprezentowanej dziedzinie wiedzy.

Przedstawiona dokumentacja zawiera także *Wykaz dorobku naukowego* (strona 63). Na podkreślenie zasługuje duża liczba wystąpień konferencyjnych (28), w tym 8 komunikatów ustnych prezentowanych osobiście. Z uznaniem należy odnotować uzyskane nagrody za działalność naukową (1 za wystąpienie ustne, 5 za prezentacje plakatowe) oraz stypendia.

Uwagi szczegółowe

Ocena pracy, której rezultaty przeszły już szczegółowy proces weryfikacji pod kątem wymogów stawianych oryginalnym pracom badawczym przez redakcje międzynarodowych czasopism z listy *Journal Citation Reports* jest dla recenzenta zadaniem poniekąd niewdzięcznym. Opublikowane prace poddawane były bowiem niezależnej ocenie merytorycznej, edytorskiej i językowej przez recenzentów będących przeważnie autorytetami w dziedzinie wiedzy, w której zostały opublikowane badania. Już sam fakt zaakcentowania uzyskanych wyników przez ekspertów międzynarodowych czasopism oraz zainteresowanie innych badaczy, przejawiające się w zauważalnie wysokiej liczbie cytowań podkreślają wysoką wartość pracy Pani mgr inż. Judyty Kruk. W tej sytuacji, poszukiwanie niejako „na siłę” ewentualnych niedociągnięć w przedstawionej do oceny

rozprawie doktorskiej może być nieco niestosowne. Niemniej jednak, podczas uważnej lektury nasunęły się pewne pytania, które stanowią raczej przyczynek do dyskusji z Doktorantką, niż wskazują na uchybienia rozprawy. Byłabym zatem bardzo zobowiązana, gdyby Kandydatka wyjaśniła następujące kwestie:

- 1) Str. 39 – „Najlepszymi odzyskami cechował się filtr strzykawkowy NY 0,45 μm ...”
Proszę o wyjaśnienie tego stwierdzenia w oparciu o rysunek 8.
- 2) Rys. 7, 8 i 9 – Jakie były wartości standardowego odchylenia dla uznanych odzysków?
- 3) Tabela 3 i 4 – Proszę uzasadnić dlaczego zawartości związków podawane są z dokładnością do drugiego lub trzeciego miejsca po przecinku, a współczynnik zmienności tylko do pierwszego miejsca po przecinku lub zaokrąglony do pełnych wartości?

Drobne uwagi dotyczą wtrętów obcojęzycznych i żargonu laboratoryjnego, które oczywiście pojawiły się tylko w komentarzu: „*nastrzyk próbki*” (str. 35), „*rozcieńczano zakwaszaną wodą*” (str. 38), „*wpływ ładowania mniejszych porcji próbki na kolumnkę SPE*” (str. 38), czy też popularno-naukowych sformułowań „*dobre wartości współczynnika determinacji*”, „*odpowiedni model regresji*” (str. 36), „*ciekawy efekt*” (str. 51), itp. Pewne drobne błędy edytorskie pojawiające się w tekście w żaden sposób nie umniejszają ogólnej, bardzo dobrej oceny pracy.

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są pozytywne i istotne naukowo. Do znaczących osiągnięć wnoszących znaczny wkład w światowy rozwój chemii analitycznej należy zaliczyć:

- opracowanie metody umożliwiającej równoległe oznaczanie dwunastu enancjomerów wybranych flawonoidów (naryngeniny, hesperytiny, flawanonu – artykułu D.1-D.3 oraz naryngeniny, hesperytiny, flawanonu eriodiktiolu, likwirytygeniny i pinostrobinę – D.4, D.5) wyizolowanych z różnych części morfologicznych roślin uprawnych i dziko rosnących między innymi: lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.), faceli błękitniej (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) i nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea*) oraz lukrecji (*Glycyrrhizae radix*) i mięty pieprzowej (*Menthae piperitae*),
- opracowanie skutecznej procedury wydzielania wybranych związków z materiału roślinnego oraz hydrolizy ich połączeń glikozydowych do aglikonów, która zapobiega procesom izomeryzacji analitów,
- potencjalne wdrożenie opracowanych metod oznaczania enancjomerów wybranych flawonoidów w analityce klinicznej.

Wszystkie opracowane metodyki analityczne spełniają w pełni założone kryteria akceptacji odnośnie: zakresu pomiarowego, liniowości, granicy wykrywalności i oznaczalności, dokładności, precyzji, selektywności/specyficzności, odzysku oraz odporności. Doktorantka sama odniosła się krytycznie do uzyskanych wyników, widząc

trudności w ich interpretacji ze względu na przyjętą metodologię. Świadczy to o dojrzałości naukowej i doskonałej znajomości zagadnień dyskutowanych w pracy.

Wniosek końcowy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została zredagowana w sposób bardzo czytelny, a wyniki badań zamieszczone w niej zaprezentowane zostały w przejrzysty i klarowny sposób. Uważna lektura rozprawy nasunęła mi nieliczne uwagi merytoryczne i nomenklaturowe, które w żaden sposób nie umniejszają jej wartości. Chciałabym wyrazić moje uznanie dla przeprowadzonych przez Doktorantkę tak licznych eksperymentów, które zostały prawidłowo zaplanowane i wykonane. Należy podkreślić, wysokie znaczenie naukowe otrzymanych wyników, co pozwala ocenić recenzowaną przeze mnie rozprawę doktorską bardzo dobrze. Doktoranta dała dowód znajomości podjętej tematyki badawczej, a umiejętność zaplanowania i realizacja z ogromną starannością eksperymentów, zasługuje na uznanie. Umiejętny wybór tematu i rozwiązanie postawionych problemów powodują, że stanowi ona znaczące poszerzenie wiedzy z tej tematyki w światowej literaturze.

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Judyty Kruk nt. „*Opracowanie chromatograficznych metod rozdzielania i oznaczania enancjomerów wybranych flawonoidów i ich aplikacja*” spełnia wymagania sformułowane w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Judyty Kruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Gadziś-Kopciuch